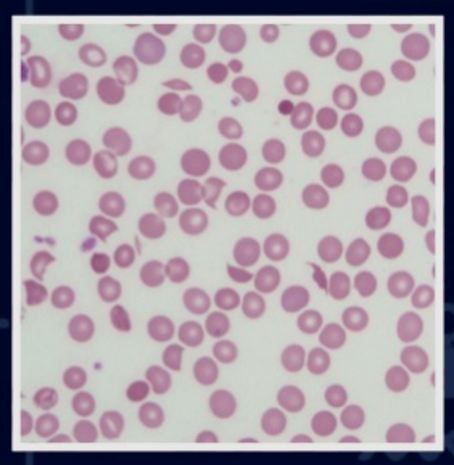
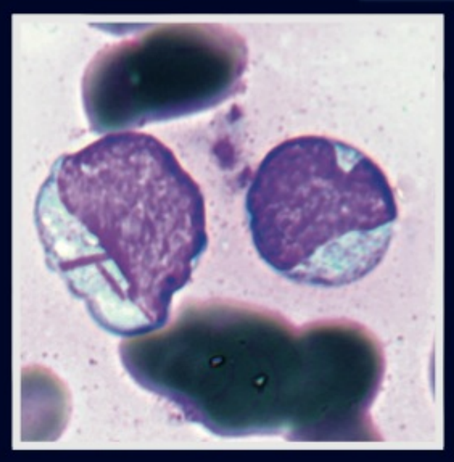
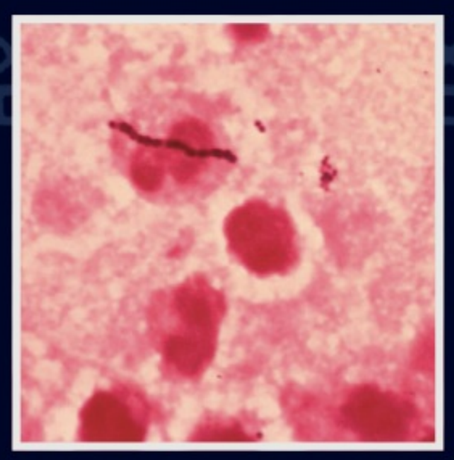
21ª edição







Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais

de Henry

EDITORES
RICHARD A. McPHERSON
MATTHEW R. PINCUS

Manole

PAINÉIS DE DOENÇA/ÓRGÃO

Anemia
CCS contendo índices, contagem de reticulócitos e exame microscópico
Microcítica: *ferro*, ESR
Normocítica: ESR, *padrão de hemólise*
Macrocítica: B_{12}, folato, TSH

Gases sanguíneos arteriais
pH
P_aCO_2
Saturação de O_2
P_aO_2
Conteúdo de CO_2
$P_{A-a}O_2$

Artrite
ESR (taxa de sedimentação)
Ácido úrico
ANA
Proteína C reativa
Fator reumatoide
Anticorpos para peptídeo citrulinado cíclico

Ossos/Articulações
Albumina
Cálcio
Fósforo
Osteocalcina
Proteína, total
Ácido úrico
Fosfatase alcalina

Lesão cardíaca*
Creatina quinase (CK)
CK-MB
Mioglobina
Troponina I

Triagem de coagulação
Tempo de protrombina
Tempo de trombina
Tempo de tromboplastina parcial
Contagem de plaquetas
Tempo de sangramento

Doença do colágeno/SLE
ESR
Proteína C reativa
C_3
C_4
ANCA (anticorpo para antígeno neutrofílico citoplasmático)
ANA
AntiDNA

Coma
Painel metabólico básico
Triagem toxicológica
Salicilato
Amônia
Intervalo aniônico
Padrão gasoso do sangue arterial
Álcool
Ácido lático
Cálcio (total e ionizado)
Osmolalidade sérica

DIC
Contagem de plaquetas
Tempo de trombina
Fibrinogênio
Produtos da quebra da fibrina
Tempo de protrombina
Tempo de tromboplastina parcial
CCS com exame de esfregaço sanguíneo

Supervisão do diabetes melito
Painel metabólico básico
Hemoglobina A_{1C}
Intervalo aniônico
Padrão lipídico

Supervisão de eletrólitos/líquidos
Painel metabólico básico
Osmolalidade do plasma e da urina
Depuração de creatinina
Depuração de água livre
Intervalo aniônico

Supervisão da nutrição enteral/parenteral
Painel metabólico básico
Magnésio
Albumina
Proteína total
Fosfatase alcalina
Fósforo
Triglicerídeos
Pré-albumina
CCS

Saúde geral
CCS
Painel metabólico completo
Painel lipídico
LD
Ácido úrico
GGT
TSH

Hemólise
CCS
Bilirrubina
Haptoglobina
Hemoglobina livre (soro e urina)
Lactato desidrogenase (LD)
Antiglobulina (direta e indireta)
Contagem de reticulócitos

Sorologia para hepatite, portador crônico
Anticorpos para hepatite Be
Antígeno de superfície da hepatite B
Antígeno da hepatite Be
Anticorpos para hepatite C

HIV
Anticorpos para HIV 1 e 2 (EIA) com confirmação por Western blot
Carga viral de HIV
Genótipo do HIV
CCS c/ subgrupos de linfócitos CD4 e CD8

Hipertensão
Painel metabólico completo
Cortisol urinário livre
Renina
Triagem da tireoide
Metanefrite urinária
Urinálise

Ferro/Hemocromatose
Ferro sérico
TIBC (capacidade de ligação ao ferro total)
% de saturação
Ferritina
Alanina aminotransferase (ALT)

Função hepática
Albumina
Tempo de protrombina
Bilirrubina (total e direta)
GGT
Proteína, total
Alanina aminotransferase (ALT)
Aspartato aminotransferase (AST)
Fosfatase alcalina

Triagem de recém-nascidos (Virginia)
Acidemia argininossuccínica (ASA)
Deficiência de b-cetotiolase (bKT)
Deficiência de biotinase (BIOT)
Defeito de captação de carnitina (CUD)
Citrulinemia (CIT)
Hiperplasia adrenal congênita (CAH)
Hipotireoidismo congênito (HC)
Fibrose cística (FC)
Galactosemia (GALT)
Acidemia glutárica de tipo I (AG I)
Hemoglobina falciforme/b-talassemia (Hb S/ bT)
Homocistinúria (HCY)
Acidemia isovalérica (IVA)
Deficiência de hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD)
Doença da urina de xarope de bordo (MSUD)
Deficiência de acetil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD)
Acidemia metilmalônica (deficiência de mutase) (MUT)
Acidemia metilmalônica (Cb1, A, B)

*A troponina I está substituindo a CK-MB no painel de lesão cardíaca. A determinação de CK-MB precocemente no soro do paciente pode esclarecer as mesmas elevações iniciais de cTnI na amostra e classifica de forma adequada um paciente com lesão miocárdica na semana precedente.

Deficiência múltipla de carboxilase (MCD)
Fenilcetonúria (PKU)
Acidemia propiônica (PROP)
Anemia falciforme (doença da HbSS) (Hb SS)
Tirosinemia de tipo I (TYR I)
Deficiência proteica trifuncional (TFP)
Deficiência de acetil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD)
Acidúria 3-hidroxi 3-metil glutárica (HMG)
Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3MCC)

Pancreático
Amilase
Cálcio (total e ionizado)
Triglicerídeos
Lipase
Glicose

Paratireoide
Albumina
Fosfatase alcalina
Magnésio
Creatinina
PTH (molécula integral, aminoterminal)
Proteína, total
Cálcio (total e ionizado)
Fósforo
Cálcio urinário

Triagem pré-natal
CCS
BUN
Ácido úrico
Tipagem ABO e Rh
Urinálise
Anticorpos para toxoplasmose
Anticorpos para CMV
Antígeno de superfície da hepatite B
Anticorpos para HIV
Esfregaço cervical de Papanicolau
Cultura cervical/amplificação para GC, *Chlamydia*, estreptococos do grupo B
Glicose
Creatinina
T_4 livre
Triagem de anticorpos para eritrócitos
Cultura de urina
Título de rubéola
VDRL
Anticorpos para herpes simples I e II

Renal
Painel metabólico básico
Magnésio
Albumina
Proteína de urina de 24 horas
Depuração de creatinina
Fósforo
Proteína, total
Creatinina de 24 horas
CCS

Triagem da tireoide
Tiroxina (T_4 livre)
TSH (terceira ou quarta geração)

Triagem toxicológica (urina)
Anfetaminas
Benzodiazepínicos
Metabólitos da maconha
Metaqualona
Fenciclidina
Barbitúricos
Metabólitos da cocaína
Metadona
Metabólitos de opiáceos
Propoxifeno

PAINÉIS DE DOENÇA/ÓRGÃO ESTABELECIDOS PELA AMA*

80048 Painel metabólico básico
Cálcio
Dióxido de carbono
Cloreto
Creatinina
Glicose
Potássio
Sódio
Nitrogênio ureico (BUN)

80076 Painel de função hepática
Albumina
Fosfatase alcalina
Alanina aminotransferase (ALT)
Aspartato aminotransferase (AST)
Bilirrubina direta
Bilirrubina total
Proteína total

80069 Painel de função renal
Albumina
Cálcio
Dióxido de carbono
Cloreto
Creatinina
Glicose
Fósforo
Potássio
Sódio
Nitrogênio ureico (BUN)

80053 Painel metabólico completo
Albumina
Fosfatase alcalina
Alanina aminotransferase (ALT)
Aspartato aminotransferase (AST)
Cálcio
Dióxido de carbono
Cloreto
Creatinina
Glicose
Potássio
Sódio
Bilirrubina total
Proteína total
Nitrogênio ureico (BUN)

80074 Painel de hepatite aguda
Anticorpos para hepatite A, IgM
Anticorpos centrais para hepatite B, IgM
Antígeno de superfície da hepatite B
Anticorpos para hepatite C

80051 Painel de eletrólitos
Dióxido de carbono
Cloreto
Potássio
Sódio

80061 Painel lipídico
Triglicerídeos
Colesterol HDL, direto
Colesterol total
Colesterol LDL, calculado

*CPT 2006, Current Procedural Terminology, Standard Edition, American Medical Association, Chicago, IL

Referências bibliográficas

*Department of Practice Parameters: Principles of Practice Parameters. Chicago, American Medical Association, 1995, pp 1-18.

Glenn GC, Altshuler CH, Gambino R, et al: Practice Parameter on Laboratory Panel Testing for Screening and Case Finding in Asymptomatic Adults. Arch Pathol Lab Med 1996; 120:929-941.

Henry JB, Howantiz PJ: Organ panels and the relationship of the laboratory to the physician. In AMA Council on Scientific Affairs: Laboratory Tests in Medical Practice. Chicago, 1980.

Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry

21ª EDIÇÃO

21ª Edição
Editores associados

Naif Z. Abraham Jr MD PhD
Staff Pathologist, Director of Chemistry,
Hematology, Immunology, and Microbiology
Department of Pathology
Veterans Affairs Medical Center;
Assistant Professor, Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Martin H. Bluth MD PhD
Director of Research
Assistant Professor
Departments of Surgery and Pathology
SUNY Downstate Medical Center
Brooklyn, NY, USA

Robert E. Hutchison MD
Professor of Pathology, Director of Clinical
Pathology and Director of Hematopathology
Department of Pathology
Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Mark S. Lifshitz MD
Director, Clinical Laboratories
NYU Medical Center
Clinical Professor, Department of Pathology
New York University School of Medicine
New York, NY, USA

H. Davis Massey MD PhD
Assistant Professor of Pathology
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Jonathan L. Miller MD PhD
Professor and Vice Chairman
Department of Pathology
The University of Chicago
Chicago, IL, USA

Gregory A. Threatte MD
Professor of Pathology
Director of Core Laboratories and Outreach
Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Elizabeth Unger MD PhD
Team Leader
Human Papillomavirus Laboratory
National Center for Infectious Diseases
Atlanta, GA, USA

Gail L. Woods MD
Professor of Pathology
Department of Pathology
University of Arkansas for Medical Sciences
Little Rock, AR, USA

Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry

21ª EDIÇÃO

Richard A. McPherson MD

Harry P. Dalton Professor and Chairman
Division of Clinical Pathology
Virginia Commonwealth University;
Director
Clinical Pathology
Medical College of Virginia Hospitals
Richmond, Virginia, USA

Matthew R. Pincus MD PhD

Professor
Department of Pathology
State University of New York Health Sciences
Center at Brooklyn;
Chairman
Department of Pathology and Laboratory Medicine
New York Harbor Veterans Affairs Health Care System
Brooklyn and New York, New York, USA

Manole

Título do original em inglês: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods – 21st edition*
Copyright © 2007 by W. B. Saunders Company. Todos os direitos reservados.
Esta edição de *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods–21st edition* de Richard A. McPherson, MD, e Mathew R. Pincus, MD, PhD, foi publicada mediante acordo com a Elsevier Inc. A Editora Manole é responsável pela tradução desta obra.
ISBN da edição original: 978-1-4160-0287-1

Este livro contempla as regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, que entrou em vigor no Brasil.

Tradução: Soraya Imon de Oliveira (caps. 0, 1, 6, 7, 9, 10, 12 a 17, 19 a 25, 27 a 30, 33, 35 a 37, 40 a 45, 48 a 53, 55, 57 a 59, 62, 64 a 70, 73 e Índice remissivo)
Marcos Ikeda (caps. 2 a 5, 8, 11, 18, 26, 31, 32, 54 e 61)
Idilia Ribeiro Vanzellotti (caps. 34, 38, 39, 43, 46, 56, 60, 63, 69, 71 e 72)
Fabiana Buassaly Leistner (caps. 47, 74 a 76 e apêndices 1 a 6)

Consultoria científica: Soraya Imon de Oliveira
Doutora em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP)
Especialista em Imunopatologia e Sorodiagnóstico pela Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)
Graduada em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Revisão: Depto. editorial da Editora Manole
Diagramação: JLG Editoração Gráfica
Adaptação da capa para a edição brasileira: Rafael Zemantauskas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

McPherson, Richard A.
Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais /
Richard A. McPherson, Matthew R. Pincus. -- 21. ed. -- Barueri, SP : Manole, 2012.

Título original: Clinical diagnosis and management by laboratory methods.
Vários colaboradores.
Vários tradutores.
Bibliografia.
ISBN 978-85-204-5185-4

1. Diagnóstico de laboratório 2. Laboratórios - Técnicas e procedimentos I. Pincus, Mathew R..
II. Título.

11-14140 CDD-616.0756

Índices para catálogo sistemático:

1. Laboratórios de análises clínicas : Ciências médicas 616.0756

Nenhuma parte deste livro poderá ser reproduzida, por qualquer processo, sem a permissão expressa dos editores.
É proibida a reprodução por xerox.
A Editora Manole é filiada à ABDR – Associação Brasileira de Direitos Reprográficos

A Medicina é uma área do conhecimento em constante evolução. As precauções de segurança padronizadas devem ser seguidas, porém novas pesquisas e experiências clínicas podem merecer análises e revisões. Alterações em tratamentos medicamentosos ou decorrentes de procedimentos tornam-se necessárias e adequadas. Os leitores são aconselhados a conferir as informações sobre produtos fornecidas pelo fabricante de cada medicamento a ser administrado, verificando a dose recomendada, o modo e a duração da administração, bem como as contraindicações e os efeitos adversos dos medicamentos. É responsabilidade do médico, com base na sua experiência e no conhecimento do paciente, determinar as dosagens e o melhor tratamento aplicável a cada situação. Nem os editores ou os autores assumem responsabilidade por quaisquer prejuízos ou lesões a pessoas ou propriedades.

Os editores

Edição brasileira – 2012

Direitos em língua portuguesa adquiridos pela:
Editora Manole Ltda.
Av. Ceci, 672 – Tamboré
06460-120 – Barueri – SP – Brasil
Tel.: (11) 4196-6000
Fax: (11) 4196-6021
www.manole.com.br
info@manole.com.br

Impresso no Brasil
Printed in Brazil

Sumário

Dedicatória viii
Tributo ix
Colaboradores xi
Prefácio xix
Agradecimentos xxiii

PARTE I – O laboratório clínico

Editada por Mark S. Lifshitz MD, Matthew R. Pincus MD PhD, Gregory A. Threatte MD

1 Conceitos gerais e questões administrativas 3
Anthony S. Kurec, Mark S. Lifshitz

2 Otimização do fluxo de trabalho e do desempenho do laboratório 14
Mark S. Lifshitz, Robert P. De Cresce, Irina Lutinger

3 Pré-análise 24
Herb Miller, Mark S. Lifshitz

4 Análise: princípios de instrumentação 37
Robert L. Sunheimer, Gregory A. Threatte, Mark S. Lifshitz, Matthew R. Pincus

5 Análise: automação do laboratório clínico 65
Robert L. Sunheimer, Gregory A. Threatte

6 Laboratórios de teste rápido e de consultório médico 74
Gregory A. Threatte

7 Pós-análise: tomada de decisão médica 79
Rohan John, Mark S. Lifshitz, Jeffrey Jhang, Daniel Fink

8 Interpretação de resultados laboratoriais 89
Matthew R. Pincus, Naif Z. Abraham Jr

9 Estatística laboratorial 106
Richard A. McPherson

10 Controle de qualidade 115
W. Greg Miller

11 Informática laboratorial clínica 130
Mark S. Lifshitz, Gary E. Blank, Katherine I. Schexneider

12 Administração financeira 142
Mark L. Jaros, Mark S. Lifshitz, Robert P. De Cresce

13 Terrorismo biológico, químico e nuclear: papel do laboratório 155
Philip M. Tierno Jr, Mark S. Lifshitz

PARTE II – Bioquímica clínica

Editada por Matthew R. Pincus MD PhD, Mark S. Lifshitz MD

14 Avaliação da função renal, da água, dos eletrólitos e do equilíbrio acidobásico 171
Man S. Oh

15 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo 197
Katrin M. Klemm, Michael J. Klein

16 Carboidratos 215
Mukhtar I. Khan, Ruth S. Weinstock

17 Lipídeos e dislipidemia 233
Timothy Hilbert, Mark S. Lifshitz

18 Avaliação de lesão e função cardíaca 255
Jay L. Bock

19 Proteínas específicas 268
Richard A. McPherson

20 Enzimologia clínica 285
Naif Z. Abraham Jr, Robert P. Carty, D. Robert Dufour, Matthew R. Pincus

21 Avaliação da função hepática 307
Matthew R. Pincus, Philip M. Tierno Jr, D. Robert Dufour

22 Diagnóstico laboratorial de distúrbios gastrintestinais e pancreáticos 327
Martin H. Bluth, Rosemarie E. Hardin, Scott Tenner, Michael E. Zenilman, Gregory A. Threatte

23 Toxicologia e monitoramento de fármacos terapêuticos 349
Matthew R. Pincus, Naif Z. Abraham Jr

24 Avaliação da função endócrina 383
Helena A. Guber, Amal F. Farag, James S. Lo, James W. Sharp

25 Função reprodutiva e gravidez 427
Robert A. Webster

26 Vitaminas e oligoelementos 444
Martin J. Salwen

PARTE III – Urina e outros fluidos corporais

Editada por Richard A. McPherson MD, Gregory A. Threatte MD, Matthew R. Pincus MD PhD, Mark S. Lifshitz MD

27 Exame de urina básico.....459
Jonathan Ben-Ezra, Shourong Zhao, Richard A. McPherson

28 Líquidos cerebrospinal, sinovial e seroso.....499
Joseph A. Knight, Carl R. Kjeldsberg

PARTE IV – Hematologia

Editada por Robert E. Hutchison MD, Richard A. McPherson MD

29 Exame básico de sangue e medula óssea.....535
Neerja Vajpayee, Susan S. Graham, Sylva Bem

30 Hematopoese 566
Sharad Mathur, Katherine Schexneider, Robert E. Hutchison

31 Distúrbios eritrocitários.....589
M. Tarek Elghetany, Katalin Banki

32 Distúrbios leucocitários.....637
Robert E. Hutchison, Naif Z. Abraham Jr

33 Avaliação de neoplasias hematopoéticas .....698 por citometria de fluxo
Brent L. Wood, Michael J. Borowitz

34 Imuno-hematologia.....717
Wendy V. Beadling, Laura Cooling

35 Medicina de transfusão 775
Robertson D. Davenport, Paul D. Mintz

36 Hemaférese.....794
Jeffrey L. Winters, Alvaro A. Pineda

37 Banco de tecidos e células progenitoras.....829
Charlene A. Hubbell, Lazaro Rosales

PARTE V – Hemostasia e trombose

Editada por Jonathan L. Miller MD PhD

38 Coagulação e fibrinólise.....843
Alvin H. Schmaier, Courtney D. Thornburg, Steven W. Pipe

39 Plaquetas sanguíneas e doença .....861 de von Willebrand
Jonathan L. Miller, A. Koneti Rao

40 Abordagem laboratorial do risco.....886 trombótico
Richard A. Marlar, Louis M. Fink, Jonathan L. Miller

41 Terapia antitrombótica.....895
Louis M. Fink, Richard A. Marlar, Jonathan L. Miller

PARTE VI – Imunologia e imunopatologia

Editada por H. Davis Massey MD PhD, Richard A. McPherson MD

42 Visão geral do sistema imune e .....907 distúrbios imunológicos
Richard A. McPherson, H. Davis Massey

43 Imunoensaio e imunoquímica 911
Yoshihiro Ashihara, Yasushi Kasahara, Robert M. Nakamura

44 Avaliação laboratorial do sistema .....938 imune celular
Roger S. Riley, Jonathan Ben-Ezra

45 Avaliação laboratorial da função .....956 de imunoglobulinas e da imunidade humoral
Richard A. McPherson, H. Davis Massey

46 Mediadores de inflamação: complemento, ...971 citocinas e moléculas de adesão
H. Davis Massey, Richard A. McPherson

47 Antígeno leucocitário humano: .....1000 o complexo principal de histocompatibilidade do homem
H. Davis Massey, Richard A. McPherson

48 O complexo principal de .....1021 histocompatibilidade e as doenças
Julio C. Delgado, Edmond J. Yunis

49 Distúrbios de imunodeficiência.....1035
Kimberly W. Sandford, Susan D. Roseff

50 Avaliação clínica e laboratorial de .....1046 doenças reumáticas sistêmicas
Carlos Alberto Von Mühlen, Robert M. Nakamura

51 Vasculite.....1064
Rex M. McCallum, David J. Bylund

52 Doenças autoimunes órgão-específicas.....1078
David J. Bylund, Robert M. Nakamura

53 Doenças alérgicas 1096
Henry A. Homburger

PARTE VII – Microbiologia médica

Editada por Gail L. Woods MD, Richard A. McPherson MD

54 Infecções virais.....1111
Michael Costello, Margaret Yungbluth

55 Infecções por clamídias, riquétsias e micoplasmas 1139
Gail L. Woods, David H. Walker

56 Bacteriologia clínica 1157
Gerri S. Hall, Gail L. Woods

57 Testes de agentes antimicrobianos *in vitro* 1193
Michael B. Smith, Gail L. Woods

58 Infecções por espiroquetas 1206
P. Rocco LaSala, Michael B. Smith

59 Micobactérias 1223
Gail L. Woods

60 Doenças micóticas 1236
Peter C. Iwen

61 Parasitologia médica 1272
Thomas R. Fritsche, Rangaraj Selvarangan

62 Patologia molecular das doenças infecciosas 1329
Michael A. Pfaller

63 Coleta e manipulação de amostras para o diagnóstico de doenças infecciosas 1350
Ann C. Croft, Gail L. Woods

64 Bioterrorismo: microbiologia 1368
Judy A. Daly

PARTE VIII – Patologia molecular

Editada por Elizabeth Unger MD PhD, Matthew R. Pincus MD PhD

65 Introdução à patologia molecular 1391
Matthew R. Pincus, Elizabeth R. Unger

66 Diagnóstico molecular: princípios e técnicas básicas 1394
Martin Steinau, Margaret A. Piper, Elizabeth Unger

67 Reação em cadeia da polimerase e outras tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos 1407
Frederick S. Nolte, Charles E. Hill

68 Tecnologias de arranjos de hibridização 1419
Martin H. Bluth, Michael E. Zenilman

69 Aplicações da citogenética na patologia moderna 1430
Constance Stein

70 Estabelecimento de um laboratório de diagnóstico molecular 1455
Andrea Ferreira-Gonzalez, David S. Wilkinson, Carleton T. Garrett

71 Diagnóstico molecular de neoplasias hematopoéticas 1470
David S. Viswanatha, Richard S. Larson

72 Diagnóstico molecular de doenças genéticas 1500
Wayne W. Grody, Walter W. Noll

73 Análise de identidade: uso dos polimorfismos de DNA em testes de paternidade e forenses 1520
Herbert F. Polesky, Rhonda K. Roby

PARTE IX – Patologia clínica do câncer

Editada por Richard A. McPherson MD, Matthew R. Pincus MD PhD, Martin H. Bluth MD PhD

74 Diagnóstico e tratamento de câncer com o uso de marcadores tumorais serológicos 1533
Peng Lee, Matthew R. Pincus, Richard A. McPherson

75 Oncoproteínas e detecção precoce de tumor 1549
Matthew R. Pincus, Paul W. Brandt-Rauf, Martin H. Bluth

76 Impacto diagnóstico e prognóstico de tecnologias genômicas e proteômicas de alto desempenho na era pós-genômica 1565
Jennifer Beane, Aran Kadar, Charles DeLisi, Martin H. Bluth, Avrum Spira

APÊNDICES

Editados por Naif Z. Abraham Jr MD PhD

1 Soluções fisiológicas, tampões, indicadores acidobásicos, materiais de referência padrão, e conversões de temperatura 1582

2 Pesos, área de superfície corporal e índice de massa corporal (IMC) desejáveis 1585

3 Aproximações do volume sanguíneo total (VST) 1589

4 Tabela periódica dos elementos químicos 1590

5 Unidades do sistema internacional (SI) 1591
H. Peter Lehmann
John Bernard Henry

6 Genes quiméricos comuns identificados em malignidades humanas 1607
Naif Z. Abraham Jr

Índice remissivo 1611

À minha esposa Stephanie Sammartino McPherson e às nossas filhas Jennifer e Marianne McPherson.
R.A.M.

À minha esposa Naomi Pincus.
M.R.P.

Somos profundamente gratos pelo amor e apoio dedicados ao longo da realização deste trabalho.

Dr. John Bernard Henry: um tributo

Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais é um livro bastante aclamado no campo da patologia clínica e tem servido como uma das principais fontes de consulta para profissionais de todas as áreas da medicina. O livro relata as mudanças dramáticas e revolucionárias pelas quais a medicina diagnóstica tem passado ao longo de quase um século. Foi escrito pela primeira vez em 1908, sob o título *A Manual of Clinical Diagnosis* (Manual de Diagnóstico Clínico), pelo legendário James C. Todd MD, que editou as primeiras seis edições e que, na sexta edição, uniu-se ao Dr. Arthur H. Sanford MD. Por conta própria, o Dr. Sanford deu continuidade a mais quatro edições da obra, contando com o Dr. George G. Stillwell na 11ª edição e com o Dr. Benjamin B. Wells na 12ª edição. A 13ª edição foi realizada pelo Dr. Israel Davidsohn, um pioneiro no campo da imunologia clínica e diagnóstica, sendo renomeado com o título *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (Diagnósticos Clínicos por Métodos Laboratoriais). Essa mudança refletiu a ocorrência de uma alteração importante nos testes de medicina diagnóstica, até então realizados por diferentes laboratórios, muitos dos quais empregando metodologias arcaicas, que passaram a ser executados em laboratórios diagnósticos centrais, utilizando testes padronizados com a apropriada verificação de métodos.

Em 1969, o Dr. John Bernard Henry uniu-se ao Dr. Davidsohn na produção da 14ª edição do livro. Essa edição apresentou o melhor nível de desenvolvimento. O Dr. Henry, como professor de patologia no State University of New York Upstate Medical Center, em Siracusa (EUA), e diretor do departamento de patologia clínica desse centro médico, foi pioneiro na organização dos laboratórios de patologia clínica e inovou ao introduzir métodos de última geração no laboratório diagnóstico centralizado. O Dr. Henry foi, e continua sendo, um professor notável que exerce papel central no treinamento de múltiplas gerações de líderes no campo da medicina laboratorial. Seu foco principal sempre esteve voltado ao paciente e foi ele quem estabeleceu o princípio de que a verificação final da validade de um resultado de qualquer teste consiste em sua capacidade de conduzir a uma intervenção terapêutica apropriada e eficiente. Esse princípio requer interações estreitas entre o patologista clínico e o médico clínico. Assim, como editor deste livro, além de promover discussões acerca dos empolgantes avanços recentes nas metodologias dos testes, abrangendo um vasto panorama desde a espectrofotometria ao diagnóstico microscópico e à abordagem por biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase, o Dr. Henry também enfatizou os aspectos clínicos das doenças passíveis de serem diagnosticadas por meio de testes. Essa síntese e a ampla cobertura da vasta área que abarca o campo da patologia clínica garantiram ao livro o sucesso como obra principal de referência para laboratoristas e médicos clínicos.

O Dr. Davidsohn e o Dr. Henry editaram a 15ª edição deste livro, publicada em 1974. Com a morte do Dr. Davidsohn em 1979, aos 84 anos de idade, o Dr. Henry tornou-se o editor da 16ª até a 20ª edição. Na 16ª edição, refletindo sua ênfase na assistência ao paciente e a emergente importância da utilização de testes laboratoriais no seguimento da progressão da doença e da eficácia terapêutica, o Dr. Henry deu ao livro seu título atual. Sob sua orientação, este livro-texto continua mantendo e expandindo a tradição de informar ao leitor os avanços mais recentes dos testes laboratoriais para diagnóstico e tratamento de doenças, bem como de descrever o modo como os testes devem ser empregados, seja para triagem da ocorrência de doenças, seja para monitoramento do progresso durante a supervisão delas.

É uma grande honra para nós herdar o manto de um estudioso médico tão prolífico e distinto como o Dr. John Bernard Henry. Fomos imensamente beneficiados pela estreita associação que mantivemos com ele no decorrer das últimas décadas. É com grande humildade e respeito que assumimos a edição deste livro-texto, que é o mais importante em sua área e que foi moldado por ele e por todos os demais líderes notáveis do campo da medicina diagnóstica. Nós nos sentimos ainda mais privilegiados por termos conseguido continuar a nossa interação com o Dr. Henry. Nós estamos (e para sempre estaremos) profundamente endividados com ele por suas massivas contribuições aos campos da patologia clínica e da medicina diagnóstica, por seu extraordinário exemplo como médico e professor, e por suas preciosas contribuições como editor deste livro, as quais têm garantido a permanência desta obra entre os livros-texto de maior valia na medicina moderna.

Em seu tributo e à sua liderança ao longo das últimas sete edições, este livro doravante passará a intitular-se permanentemente *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry*.

Richard A. McPherson MD
Matthew R. Pincus MD PhD

Colaboradores

Naif Z. Abraham Jr MD PhD
Staff Pathologist, Director of Chemistry,
Hematology, Immunology, and Microbiology, Department
of Pathology, Veterans Affairs Medical Center
Assistant Professor, Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Yoshihiro Ashihara PhD
Vice President, Board Member
Research & Development Division
Fujirebio Inc.
Tokyo, Japan

Katalin Banki MD
Assistant Professor of Pathology
Director of Special Hematology
Department of Pathology
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Wendy V. Beadling MS MT(ASCP)SBB
Assistant Supervisor, Blood Bank
Clinical Pathology
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Jennifer Beane BA BE
PhD Candidate
Bioinformatics Program
Boston University
Boston, MA, USA

Sylva Bem MD
Clinical Assistant Professor
Department of Pathology
Division of Hematopathology
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Jonathan Ben-Ezra MD
Professor of Pathology
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University School of
Medicine
Richmond, VA, USA

Gary E. Blank PhD
Associate Professor of Clinical Chemistry
Department of Pathology
University of Pittsburgh
Pittsburgh, PA, USA

Martin H. Bluth MD PhD
Director of Research
Assistant Professor
Departments of Surgery and Pathology
SUNY Downstate Medical Center
Brooklyn, NY, USA

Jay L. Bock MD PhD
Professor and Acting Chair
Department of Pathology
State University of New York at Stony Brook
Stony Brook, NY, USA

Michael J. Borowitz MD PhD
Professor of Pathology
Department of Pathology
Johns Hopkins University/Medical Center
Baltimore, MD, USA

Paul W. Brandt-Rauf MD PhD DPH
Chairman
Department of Environmental Health Sciences
Mailman School of Public Health
Columbia College of Physicians and Surgeons
New York, NY, USA

David J. Bylund MD
Staff Pathologist
Department of Pathology
Scripps Clinic - Torrey Pines
La Jolla, CA, USA

Robert P. Carty PhD
Associate Professor
Department of Biochemistry
SUNY Health Science Center at Brooklyn
Brooklyn, NY, USA

Laura Cooling MD MS
Clinical Assistant Professor
Associate Director, Transfusion Medicine
Department of Pathology
University of Michigan Hospitals
Ann Arbor, MI, USA

Michael Costello PhD
Technical Director
Advocate Shared Services Laboratory
Advocate Lutheran General Hospital
Park Ridge, IL, USA

Ann C. Croft MT(ASCP)
Supervisor
Bacteriology Laboratory
ARUP Laboratories
Salt Lake City, UT, USA

Judy A. Daly PhD
Clinical Professor
Department of Pathology
University of Utah School of Medicine
Salt Lake City, UT, USA

Robertson D. Davenport MD
Associate Professor of Pathology
Medical Director, Blood Bank and Transfusion Service
Ann Arbor, MI, USA

Robert P. De Cresce MD MBA MPH
Chairman, Department of Pathology
Director, Rush Medical Laboratories
Rush University Medical Center
Chicago, IL, USA

Julio C. Delgado MD
Assistant Professor of Pathology
University of Utah;
Associate Director, Laboratory of Immunology
ARUP Laboratories
Salt Lake City, UT, USA

Charles DeLisi PhD
Professor, Senior Associate Provost
Curriculum & Teaching
Boston University
Boston, MA, USA

D. Robert Dufour MD
Chief, Pathology and Laboratory Medicine Service
Veteran Affairs Medical Center
Washington, DC, USA

M. Tarek Elghetany MD
Professor and Vice-Chairman
Department of Pathology
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, USA

Amal F. Farag MD
Assistant Professor of Medicine
Department of Endocrinology
New York Harbour Healthcare System
Brooklyn, NY, USA

Andrea Ferreira-Gonzalez PhD
Professor and Director
Molecular Diagnostics Laboratory
Department of Pathology
Medical College of Virginia
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Daniel Fink MD
Associate Clinical Professor of Pathology
Department of Pathology
Columbia University Medical Center
New York, NY, USA

Louis M. Fink MD
Director, Core Laboratory Services
Nevada Cancer Institute
Las Vegas, NV, USA

Thomas R. Fritsche PhD MD ABMM
Director of Laboratories
JMI Laboratories
North Liberty, IA, USA

Carleton T. Garrett MD PhD
Division Chief
Pathology
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Susan S. Graham MS MT(ASCP)SH
Associate Professor and Chair
Department of Clinical Laboratory Science
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Wayne W. Grody MD PhD
Professor, Division of Molecular Pathology and Medical
Genetics Director, Diagnostic Molecular Pathology Laboratory
Departments of Pathology & Laboratory Medicine,
Pediatrics, and Human Genetics
UCLA School of Medicine
Los Angeles, CA, USA

Helena A. Guber MD
Assistant Professor of Medicine
Department of Endocrinology
New York Harbour Healthcare System
Brooklyn, NY, USA

Geraldine S. Hall PhD
Professor of Pathology
Division of Pathology and Laboratory Medicine
Cleveland Clinic Foundation
Cleveland, OH, USA

Rosemarie E. Hardin MD
Resident
Department of Surgery
SUNY Downstate Medical Center
Brooklyn, NY, USA

John Bernard Henry MD
Distinguished Service Professor of Pathology
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Timothy Hilbert MD PhD JD
Assistant Professor of Pathology
New York University School of Medicine
New York, NY, USA

Charles E. Hill MD PhD
Assistant Professor
Department of Pathology and Laboratory Medicine
Emory University School of Medicine
Atlanta, GA, USA

Henry A. Homburger MD
Professor of Laboratory Medicine
Mayo Clinic College of Medicine
Consultant
Mayo Clinic
Rochester, MN, USA

Charlene A. Hubbell BS MT(ASCP)SBB
Adjunct Associate Professor, Clinical Laboratory Science
College of Health Professions
Supervisor, Histocompatibility, Immunogenetics
and Progenitor Cell Bank
State University of New York, Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Robert E. Hutchison MD
Professor of Pathology, Director of Hematopathology
and Director of Clinical Pathology
SUNY Health Science Center
Syracuse, NY, USA

Peter C. Iwen MS PhD M(ASCP) SM(AAM)
Associate Professor
Pathology and Microbiology
University of Nebraska Medical Center
Omaha, NE, USA

Mark L. Jaros MBA MT(ASCP)
Administrative Director
Department of Pathology/Rush Medical Laboratories
Rush University Medical Center
Associate Professor, College of Allied Health
Rush University
Chicago, IL, USA

Jeffrey Jhang MD
Assistant Professor of Clinical Pathology
Department of Pathology
Columbia University Medical Center
New York, NY, USA

Rohan John MD
Resident
Department of Pathology
Rush University Medical Center
Chicago, IL, USA

Aran Kadar MD
PGY4/4th Year Resident
The Pulmonary Center
Boston University Medical Center
Boston, MA, USA

Yasushi Kasahara PhD
Visiting Professor
Department of Clinical Pathology
School of Medicine
Showa University
Tokyo, Japan

Mukhtar I. Khan MD
Assistant Professor of Medicine
Department of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Carl R. Kjeldsberg MD
Professor of Pathology
University of Utah School of Medicine
CEO and Chair, Board of Directors
ARUP Laboratories
Salt Lake City, UT, USA

Michael J. Klein MD
Professor of Pathology
Head, Section of Surgical Pathology;
Senior Scientist, Center for Metabolic Bone Disease
The University of Alabama School of Medicine
Birmingham, AL, USA

Katrin M. Klemm MD
Assistant Professor
Department of Pathology
University of Alabama
Birmingham, AL, USA

Joseph A. Knight BS MS MD
Professor of Pathology
Department of Pathology
University of Utah School of Medicine
Salt Lake City, UT, USA

Anthony S. Kurec MS DLM(ASCP)
Administrator, University Pathologists Laboratories, LLP
Clinical Associate Professor
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Richard S. Larson MD PhD
Senior Associate Dean for Research,
Associate Professor of Pathology
Department of Pathology
University of New Mexico HSC
Albuquerque, NM, USA

P. Rocco LaSala MD
Fellow, Medical Microbiology
Department of Pathology
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, USA

Peng Lee MD PhD
Assistant Professor
Department of Pathology
New York University Medical Center
Staff Pathologist
New York Harbor VA Medical Center
Brooklyn and New York, NY, USA

H. Peter Lehmann MD
Professor, Department of Pathology
Louisiana State University Medical Center
New Orleans, LA, USA

Mark S. Lifshitz MD
Director, Clinical Laboratories
NYU Medical Center
Clinical Professor, Department of Pathology
New York University School of Medicine
New York, NY, USA

James S. Lo MT(ASCP) PhD DABCC
Director, Pulmonary Function Blood Gas Laboratory
and Assistant Laboratory
Director, Department of Pathology Vassar Brothers Medical
Center
Affiliate Professor of Medical Technology, Department
of Medical Laboratory Sciences
Marist College
Poughkeepsie, NY, USA

Irina Lutinger MPH DLM(ASCP)
Senior Administrative Director
Clinical Laboratories
Tisch Hospital, Labs
NYU Medical Center
New York, NY, USA

Richard A. Marlar PhD
Professor of Pathology
Associate Director, Coagulation and Special Coagulation
Laboratories
Veteran Affairs Medical Center;
Oklahoma City, OK, USA

H. Davis Massey MD PhD
Assistant Professor of Pathology
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Sharad Mathur MD
Assistant Professor
Department of Pathology and Laboratory Medicine
University of Kansas Medical Center;
Chief, Pathology and Laboratory Medicine Service
V A Medical Center
Kansas City, MO, USA

Rex M. McCallum MD
Clinical Professor of Medicine, Division of Rheumatology
Associate Medical Director of the Private Diagnostic Clinic
Senior Clinical Advisor, Duke Department of Medicine
Duke University School of Medicine
Durham, NC, USA

Richard A. McPherson MD
Harry P. Dalton Professor and Chairman
Division of Clinical Pathology
Virginia Commonwealth University;
Director
Clinical Pathology
Medical College of Virginia Hospitals
Richmond, VA, USA

W. Greg Miller PhD
Professor of Pathology
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Herb Miller PhD MT (ASCP) CLS (NCA)
Chairman and Director
Department of Clinical Laboratory Sciences
College of Health Sciences
Rush University
Chicago, IL, USA

Jonathan L. Miller MD PhD
Professor and Vice Chairman
Department of Pathology
The University of Chicago
Chicago, IL, USA

Paul D. Mintz MD
Professor, Departments of Pathology and Internal Medicine Director, Division of Clinical Pathology/Clinical Laboratories
University of Virginia Health System
Charlottesville, VA, USA

Robert M. Nakamura MD
Senior Consultant and Chairman Emeritus
Department of Pathology
Scripps Clinic
La Jolla, CA, USA

Walter W. Noll MD
Professor of Pathology
Department of Pathology
Dartmouth-Hitchcock Medical Center
Lebanon, NH, USA

Frederick S. Nolte PhD
Professor, Pathology and Laboratory Medicine
Emory University School of Medicine
Atlanta, GA, USA

Man S. Oh MD
Professor of Medicine
Department of Medicine
State University of New York
Brooklyn, NY, USA

Michael A. Pfaller MD
Professor and Director, Molecular Epidemiology and Fungus Testing Laboratory
Departments of Pathology and Epidemiology
University of Iowa College of Medicine and College of Public Heath
Iowa City, IA, USA

Matthew R. Pincus MD PhD
Professor, Department of Pathology
State University of New York Health Sciences Center at Brooklyn; Chairman, Department of Pathology and Laboratory Medicine New York Harbor Veterans Affairs Health Care System
Brooklyn and New York, NY, USA

Alvaro A. Pineda MD
Emeritus Professor of Laboratory Medicine
Mayo Clinic College of Medicine
Rochester, MN, USA

Steven W. Pipe MD
Associate Professor
Department of Pediatrics
University of Michigan
Ann Arbor, MI, USA

Margaret A. Piper PhD MPH
Senior Consultant
Technology Evaluation Center
Blue Cross Blue Shield Association
Atlanta, GA, USA

Herbert F. Polesky MD
Former Professor of Laboratory Medicine and Pathology
University of Minnesota School of Medicine
Minneapolis, MN, USA

A. Koneti Rao MBBS
Professor of Medicine, Thrombosis Research and Pharmacology Assistant Dean, MD PhD Program
Division of Hematology and Thromboembolic Diseases
Temple University School of Medicine
Philadelphia, PA, USA

Roger S. Riley MD PhD
Director of Coagulation and Professor of Pathology
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Rhonda K. Roby MPH
Senior Forensic Specialist
Applied Biosystems
Foster City, CA, USA

Lazaro Rosales MD
Associate Professor of Pathology
Director of Hemapheresis and Deputy Director of Transfusion Medicine
Department of Pathology
Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Susan D. Roseff MD
Medical Director, Transfusion Medicine
Virginia Commonwealth University Medical Center
Associate Professor
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University School of Medicine
Richmond, VA, USA

Martin J. Salwen MD
Distinguished Service Professor
Department of Pathology
State University of New York
Brooklyn, NY, USA

Kimberly W. Sanford MD MT(ASCP)
Chief Resident
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University School of Medicine
Richmond, VA, USA

Katherine I. Schexneider MD
Medical Director, Blood Bank
Naval Medical Center Portsmouth
Portsmouth, VA, USA

Alvin H. Schmaier MD
Professor of Internal Medicine and Pathology
Director, Coagulation Laboratory
Department of Internal Medicine and Pathology
University of Michigan
Ann Arbor, MI, USA

Rangaraj Selvarangan BVSc PhD
Assistant Professor of Pediatrics
University of Missouri School of Medicine;
Director of Clinical Microbiology and Virology Laboratories
Children's Mercy Hospital
Kansas City, MO, USA

James W. Sharp MBA MD
Director of Laboratories
Department of Pathology
Vassar Brothers Medical Center
Medical Director, Medical Technology Program
Department of Medical Laboratory Sciences
Marist College
Poughkeepsie, NY, USA

Michael B. Smith MD
Assistant Professor and Director
Division of Clinical Microbiology
Department of Pathology
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, USA

Avrum Spira MD
Assistant Professor
MED Pulmonary Center
Boston University
Boston, MA, USA

Constance K. Stein PhD
Associate Professor
Department of Pathology
Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Martin Steinau PhD
Division of Viral and Rickettsial Diseases
National Center for Infectious Diseases
Atlanta, GA, USA

Robert L. Sunheimer MS MT (ASCP) SC SLS
Associate Professor
Department of Clinical Laboratory Science
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Scott Tenner MD MPH FACP FACG
Division of Gastroenterology, Maimonides Medical Center
Assistant Professor of Medicine, Mount Sinai School of Medicine
Director, Medical Education and Research
BrooklynGI.com
Brooklyn, NY, USA

Courtney D. Thornburg MD
Lecturer, Department of Pediatrics and Communicable Diseases
University of Michigan
Ann Arbor, MI, USA

Gregory A. Threatte MD
Professor and Chairman
Department of Pathology
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

Philip M. Tierno Jr PhD
Director, Clinical Microbiology and Immunology
Associate Professor, Departments of Microbiology and Pathology
New York University Medical Center
New York, NY, USA

Elizabeth Unger MD PhD
Team Leader
Human Papillomavirus Laboratory
National Center for Infectious Diseases
Atlanta, GA, USA

Neerja Vajpayee MD
Clinical Assistant Professor
Department of Pathology
Division of Hematopathology
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

David S. Viswanatha MD FRCPC
Senior Associate Consultant
Division of Hematopathology Mayo Clinic;
Associate Professor
Mayo Clinic College of Medicine
Rochester, MN, USA

Carlos Alberto von Mühlen MD PhD
Full Professor of Rheumatology and Internal Medicine
Pontifical Catholic University School of Medicine
Porto Alegre, RS, Brazil

David H. Walker MD
Professor and Chairman
Department of Pathology
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, USA

Robert A. Webster PhD
Assistant Professor
Departments of Pathology, Biochemistry, and Clinical Laboratory Science
Associate Director, Rush Medical Laboratories
Director, Core Laboratory
Rush University Medical Center
Chicago, IL, USA

Ruth S. Weinstock MD PhD
Professor of Medicine and Chief, Endocrinology, Diabetes and Metabolism
Department of Medicine
SUNY Upstate Medical University
Syracuse, NY, USA

David S. Wilkinson MD PhD
Professor and Chair
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

Jeffrey L. Winters MD
Assistant Professor of Laboratory Medicine
Department of Transfusion Medicine
Mayo Clinic College of Medicine
Rochester, MN, USA

Brent L. Wood MD PhD
Associate Professor of Laboratory Medicine
Department of Laboratory Medicine
University of Washington
Seattle, WA, USA

Gail L. Woods MD
Director, Clinical Laboratories
Professor of Pathology
Department of Pathology
University of Arkansas for Medical Sciences
Little Rock, AR, USA

Margaret Yungbluth MD
Staff Pathologist
Department of Pathology
St Francis Hospital
Evanston, IL, USA

Edmond J. Yunis MD
Professor of Pathology
Harvard Medical School
Boston, MA, USA

Michael E. Zenilman MD
Clarence and Mary Dennis Professor and Chairman
Department of Surgery
SUNY Downstate Medical Center
Brooklyn, NY, USA

Shourong Zhao MD MS
Fellow of Hematopathology
Department of Pathology
Virginia Commonwealth University Health System
Richmond, VA, USA

Prefácio

O papel da patologia clínica e da medicina laboratorial continua crescendo, no sentido de ser o único e maior componente de dados científicos objetivos junto ao registro médico de pacientes. A facilidade cada vez maior com que as análises laboratoriais podem ser fornecidas e a ampliação da diversidade das medidas obtidas com ensaios, contribuem para a supervisão clínica desde os dias de pré-natal ao nascimento de um bebê, seguindo com a triagem durante a infância, a idade adulta e até a idade avançada. Essa trilha de observações médicas e resultados de testes laboratoriais produzida ao longo da vida atualmente é organizada em um registro médico eletrônico contínuo e atual. O desafio da medicina do futuro consiste em encontrar um modo de utilizar da melhor forma todas essas informações para orientar os pacientes sobre como mudar de comportamento para prevenir doenças, baseando-se em uma ampla gama de dados médicos com um núcleo de testes genéticos em expansão, além dos procedimentos tradicionais de função de órgãos e metabolismo desenvolvidos por meio de disciplinas laboratoriais químicas, hematológicas e microbiológicas, entre outras.

A expansão do conhecimento acerca do genoma humano e de sua conversão nos fenótipos proteômicos do corpo humano oferece oportunidades sem precedentes para a exploração da saúde e da doença. Os métodos para examinar tanto os ácidos nucleicos como a expressão dos genes em proteínas certamente transformarão o modo como os laboratórios prestam os serviços de diagnóstico clínico nas próximas décadas. Inúmeras aplicações em testes clínicos já estão sendo conduzidas em microbiologia, coagulação, tipagem histológica, doenças genéticas, câncer e malignidades hematológicas. O ambiente proporcionado pelos laboratórios clínicos, que requer rigor nas análises, controle de qualidade, competências profissionais e operações custo-efetivas, também impulsionará a aplicação dessa nova tecnologia e desses novos métodos ao padrão de prática aceito atualmente. Devemos esperar que os futuros profissionais mais bem-sucedidos da medicina laboratorial sejam bem versados e preparados para buscar avanços na informática, em métodos analíticos básicos, na comunicação com colegas da clínica, na participação em esforços nacionais e internacionais de padronização e na implementação de mudanças complexas em nossa profissão. A atuação do laboratório pode se dar em múltiplos níveis da sociedade, desde o teste no paciente individual até iniciativas de saúde pública para prevenção de doenças, estendendo-se para a indústria e as políticas governamentais de assistência à saúde, bem como sua reforma para apoiar práticas melhores e promover saúde e bem-estar num cenário de recursos financeiros limitados.

A 21ª edição deste livro surge um século depois de sua criação, com a primeira publicação em 1908. Com o passar do tempo, *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais* continuou sendo uma autoridade como fonte de informação para residentes, estudantes e outros estagiários da disciplina de patologia clínica e medicina laboratorial, bem como para os médicos e laboratoristas envolvidos em sua prática. A 21ª edição incorpora novas descobertas e aplicações em todos os seus capítulos com o intuito de cumprir a missão de ser um livro-texto abrangente, ao mesmo tempo atualizado e de leitura agradável. O aspecto mais notável no formato desta edição é o uso de cores ao longo de todo o livro, com a inclusão de um número bem maior de imagens e figuras contendo gráficos, em comparação às edições anteriores. Uma de nossas metas foi apresentar os achados laboratoriais em uma versão que fosse a mais próxima possível da prática real. Essa abordagem proporcionou a cada um dos autores a oportunidade de incorporar figuras ilustrativas dos princípios e das interpretações diagnósticas.

A Parte I, "O laboratório clínico", trata da organização, dos propósitos e das práticas de análise, interpretação e administração junto ao laboratório clínico. De modo geral, nós reorganizamos essa seção em busca de maior clareza, considerando ordenadamente os aspectos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos dos testes laboratoriais. As questões relativas à organização administrativa e operacional são especificamente discutidas nos Capítulos 1 e 2. A abordagem da maneira correta de coletar, transportar e manusear as amostras, bem como de outras variáveis pré-analíticas, é descrita no Capítulo 3. Princípios de análises, instrumentação e automação são tratados nos Capítulos 4 e 5. A extensão dos serviços laboratoriais além daqueles prestados por um laboratório central hospitalar para pacientes externos, além das regulamentações que governam os serviços prestados próximo ao paciente e o avanço das novas tecnologias que os apoiam são o assunto do Capítulo 6. Os processos pós-analíticos de comunicação, tomada de decisão médica e interpretação de resultados são cruciais à utilidade dos testes (Cap. 7). A seleção e a interpretação de informações e resultados laboratoriais com o objetivo de alcançar soluções mais custo-efetivas e eficazes para os problemas médicos por meio de testes clínicos são exploradas no Capítulo 8. A análise estatística (Cap. 9) é imensamente importante em todas as fases do monitoramento dos processos laboratoriais e de tomada de decisão, sendo que algumas de suas aplicações mais explícitas se dão na área de controle de qualidade (Cap. 10). O montante de resultados laboratoriais e sua comunicação somente podem ser administrados por meio de sistemas de informação sofisticados, os quais são parte essencial de qualquer laboratório clínico (Cap. 11) e têm ganhado importância como ferramentas por meio das quais a integração de informações clínicas em múltiplos níveis pode ser disponibilizada ao cliente médico. A opção por instrumentação, automação do laboratório clínico e instalação de sistemas computadorizados num laboratório determina em grande parte a sua produtividade (maior volume/variedade de quantificações/exames complexos), bem como a seleção dos serviços laboratoriais mais rápidos no atendimento às necessidades de provedores e pacientes em termos de acesso, custo e qualidade. O impacto financeiro e as soluções aos desafios que se apresentam aos patologistas e a todos os laboratoristas, a partir da assistência administrada por meio de reembolso por capitação e/ou contratos de serviços com desconto, é fundamental à sobrevivência dos próprios laboratórios e também da instituição na qual atuam (Cap. 12). Um desafio relativamente novo com o qual os laboratórios estão se deparando é a necessidade de estarem preparados e produzirem respostas adequadas às ameaças de bioterrorismo a nível local, regional e nacional (Cap. 13). Esses são os temas abordados ao longo dos atuais 76 capítulos – novos, atualizados e/ou expandidos e reforçados – que incluem cada um dos tópicos de forma atraente, desde a coleta e o processamento da amostra obtidos do paciente até a comunicação dos resultados.

A Parte II, "Química clínica", foi sistematicamente organizada de modo a apresentar os exames laboratoriais conforme as doenças que acometem os sistemas orgânicos. Ela começa com a avaliação da função renal, da água, dos eletrólitos, dos intermediários metabólicos e da troca de moléculas de nitrogênio, além do equilíbrio acidobásico, que são tão importantes no monitoramento dos pacientes para cuidados intensivos, bem como na supervisão de pacientes com distúrbios renais e pulmonares (Cap. 14). Esse assunto conduz à (cada vez mais impor-

tante) avaliação laboratorial do metabolismo ósseo e da perda óssea (Cap. 15). Uma ênfase ainda maior é dispensada aos carboidratos no diagnóstico laboratorial e na supervisão do diabetes melito e de outras doenças (Cap. 16). O Capítulo 17 consiste em uma nova apresentação de estudos sobre lipídeos e suas anomalias, tão importantes na avaliação do risco de doença cardiovascular, enquanto o Capítulo 18 trata da avaliação imediata de doença e lesão cardíacas. O papel de proteínas sanguíneas específicas e as interpretações eletroforéticas são destacadas no Capítulo 19, enquanto a enzimologia clínica é abordada no Capítulo 20. A avaliação da função hepática é apresentada no Capítulo 21, e a dos distúrbios gastrintestinal e pancreático consta no Capítulo 22. A análise toxicológica e o monitoramento de fármacos terapêuticos são discutidos no Capítulo 23, enquanto os métodos complementares de avaliação da função endócrina são discutidos no Capítulo 24. O Capítulo 25, sobre testes de reprodução e gravidez, e o Capítulo 26, sobre vitaminas e oligoelementos, completam a Parte II.

A Parte III, "Urina e outros líquidos corporais", abrange o exame básico de urina (Cap. 27). Uma área que merece consideração especial é a análise de líquidos corporais, como de líquidos cerebrospinal, sinovial e seroso (Cap. 28).

A Parte IV, "Hematologia", traz atualizações sobre exames de sangue e medula óssea (Cap. 29), hematopoese (Cap. 30) e distúrbios eritrocíticos (Cap. 31) e leucocíticos (Cap. 32). Em rápida expansão, a área da análise por citometria de fluxo em hematologia foi também enfatizada (Cap. 33). A imunoematologia (Cap. 34) e a medicina de transfusão (Cap. 35) tratam dos testes pré-transfusionais e da solução dos problemas causados por reações inconvenientes ou inesperadas, bem como da terapia com produtos do sangue (componentes e derivados). Os Capítulos 36 e 37 abrangem as aplicações terapêuticas da aférese, incluindo coleta, processamento e distribuição de células progenitoras/tronco provenientes da medula óssea, do sangue periférico e do sangue de cordão umbilical, acopladas ao banco de tecidos.

Em reconhecimento aos avanços recentes que mais contribuíram para a nossa compreensão acerca dos fenômenos tromboembolíticos, resultando em novos protocolos de tratamento efetivos, adicionamos uma nova seção: a Parte V, "Hemostasia e trombose". Essa seção fornece uma maior abrangência do crescente corpo de conhecimentos nas áreas de coagulação e fibrinólise (Cap. 38), e também da função plaquetária com ênfase na doença do fator de von Willebrand (Cap. 39). Na última década, os principais avanços na área da coagulação levaram ao tratamento efetivo de muitas condições patológicas diferentes, incluindo infarto do miocárdio e derrame, com a criação de muitos fatores anticoagulantes novos e bastante eficazes. O uso desses novos agentes requer monitoramento cuidadoso de muitos aspectos do sistema de coagulação. Assim, essa seção discute não apenas os fundamentos da hemostasia, mas também os novos agentes empregados no tratamento de doenças trombóticas, seus mecanismos de ação e os métodos para monitorar seus efeitos. A avaliação do risco de trombose é discutida no Capítulo 40, e o papel desempenhado pelo laboratório na orientação da terapia antitrombótica é detalhado no Capítulo 41.

A Parte VI, "Imunologia e imunopatologia", foi atualizada e expandida em todos os seus capítulos, quanto à descrição das funções do sistema imune e os distúrbios imunológicos (Cap. 42), trazendo ainda informações abrangentes sobre os diferentes tipos de imunoensaios realizados na prática ao redor do mundo (Cap. 43). Explicações detalhadas e avaliações laboratoriais são fornecidas para o sistema imune celular (Cap. 44), a imunidade humoral (Cap. 45), o complemento e os mediadores inflamatórios (Cap. 46) e o complexo principal de histocompatibilidade (Cap. 47) e seu papel no transplante e em doenças específicas (Cap. 48). Os distúrbios de imunodeficiência requerem abordagens diagnósticas especiais que são destacadas no Capítulo 49. A autoimunidade é apontada nas explicações acerca das doenças reumáticas sistêmicas (Cap. 50), da vasculite (Cap. 51) e das doenças órgão-específicas (Cap. 52). Essa seção é completada por uma discussão sobre doenças alérgicas, envolvendo estreita correlação entre testes laboratoriais e diagnóstico (Cap. 53).

A Parte VII, "Microbiologia médica", trata dos agentes infecciosos, desde as infecções virais (Cap. 54) até as causadas por clamídia, riquétsia e micoplasma (Cap. 55), estendendo-se até os testes da bacteriologia médica clássica (Cap. 56) para determinação da suscetibilidade antimicrobiana (Cap. 57) e as infecções por espiroqueta (Cap. 58). A discussão sobre micobactérias (Cap. 59) destaca a tuberculose com emergente resistência a fármacos e infecção disseminada entre pacientes imunossuprimidos. As doenças micóticas (Cap. 60) e a parasitologia médica (Cap. 61) são considerações igualmente essenciais na medicina internacional. As técnicas clássicas de cultura de micro-organismos com identificação e teste de suscetibilidade antimicrobiana por meio de bioensaios funcionais estão mudando rapidamente, dada a evolução de novos métodos de diagnóstico molecular, que aumentarão e substituirão os métodos convencionais (Cap. 62). Dada a sua importância para que paciente e médico obtenham o máximo benefício proporcionado pelo laboratório, a coleta e o manuseio da amostra para diagnóstico de doenças infecciosas (Cap. 63) são especialmente importantes. Novas ilustrações e fotografias de organismos e métodos são particularmente proeminentes nessa parte do livro. Por fim, um novo capítulo sobre os aspectos microbiológicos do bioterrorismo (Cap. 64) encerra a seção.

A Parte VIII, "Patologia molecular", foi reorganizada com explicações aprofundadas sobre os princípios básicos da química de ácidos nucleicos e sua análise (Caps. 65 e 66), enfatizando métodos bastante importantes de amplificação de ácidos nucleicos (Cap. 67) e tecnologias de hibridização (Cap. 68). Foram incluídas as aplicações e os métodos de citogenética (Cap. 69) com modernas técnicas de cariotipagem. Esses capítulos abrangem os princípios e as técnicas básicas, bem como os procedimentos para estabelecer um laboratório de diagnóstico molecular (Cap. 70). Incluem também as aplicações especiais aos neoplasmas hematopoéticos (Cap. 71), o diagnóstico molecular de doenças genéticas (Cap. 72) e as técnicas de diagnóstico molecular utilizadas na identificação forense, bem como nos testes de paternidade abrangentes empregando DNA *fingerprinting* (Cap. 73).

A Parte IX, "Patologia clínica do câncer", é uma nova seção que destaca o papel significativo que o laboratório exerce no diagnóstico e monitoramento das malignidades e seus tratamentos. É vital que todos os patologistas tenham consciência da revolução ocorrida no campo da biologia molecular e celular, a qual resultou no sequenciamento integral do genoma humano. Tais descobertas agora permitem a identificação não apenas da existência mas também da suscetibilidade a doenças, principalmente do câncer. Do mesmo modo, levaram ao surgimento de novas técnicas, incluindo microarranjos de genes e proteômica, que permitem a rápida avaliação da expressão de genes e proteínas. A abordagem proteômica desenvolveu-se ao ponto de permitir a descoberta de que os padrões de proteínas componentes presentes no soro caracterizam estados cancerosos específicos, bem como a existência de outras doenças. Ambos, marcadores tumorais convencionais quantificados no soro (Cap. 74) e oncoproteínas marcadoras recém-descobertas, são discutidos paralelamente a suas aplicações na emergente área da proteômica (Cap. 75). Finalmente, despontam claramente no horizonte expectativas quanto à detecção precoce, ao prognóstico e ao planejamento de regimes de tratamento para o câncer por meio do conhecimento detalhado das alterações ocorridas no genoma humano. Diante disso, incluímos as novas abordagens baseadas na genômica, como aplicações para detecção e monitoramento do câncer em estágios iniciais, no último capítulo dessa seção sobre diagnóstico molecular de neoplasias (Cap. 76). Consideramos essa informação essencial, uma vez que, num futuro próximo, o laboratório clínico deverá ser solicitado a analisar amostras para avaliação genômica no diagnóstico de doenças, suscetibilidade a doenças e até mesmo avaliação de tratamentos mais efetivos para elas, como atualmente já ocorre no tratamento ideal de doenças virais, como hepatite e AIDS. Sendo assim, os patologistas estão incumbidos de compreender as bases do diagnóstico molecular e do modo como o genoma humano foi sequenciado.

Após alcançar uma sólida compreensão dos princípios analíticos e de interpretação de exames laboratoriais, bem como das armadilhas causadas por interferências, estado fisiológico ou interações farmacológicas, também é necessário dispor de estratégias para oferecer os testes, a fim de proporcionar o nível apropriado de assistência para triagem de doenças, confirmação de diagnósticos, estabelecimento de prognóstico e monitoramento dos efeitos do tratamento. Durante várias décadas, tem sido prática popular entre os médicos a requisição de painéis de múltiplos testes individuais para triagem de anomalias de vários órgãos diferentes que, de outro modo, não seriam suspeitas. Essa prática foi padronizada há vários anos pela ação conjunta da American Medical

Association e do United States Department of Health and Human Services, com o estabelecimento de um grupo de painéis de testes múltiplos, como o painel metabólico básico e o painel metabólico completo (no verso da capa frontal). Duas forças predominantes conduziram o projeto desses painéis. Uma delas foi a simplicidade tecnológica com que os analisadores químicos multicanais conseguem gerar muitos resultados de forma rápida e relativamente barata. A outra força foi a restrição da quantidade de reembolsos concedidos para a realização dos testes e a definição da necessidade médica de orientar a utilização da requisição do teste com base no diagnóstico clínico inicial, em vez de realizar uma ampla triagem na ausência de sintomas. Um equilíbrio entre capacidades tecnológicas e limitações de reembolso está previsto com o remanejamento que deve ocorrer nos próximos anos, à medida que as capacidades tecnológicas superarem as atuais e abrirem as comportas de testes de analitos baratos em números significativamente maiores. Os setores nos quais essa mudança mais provavelmente ocorrerá incluem vários tipos diferentes de testes genéticos. Particularmente, o uso de espectrometria de massa em tandem detecta simultaneamente múltiplas doenças genéticas possíveis em triagens de recém-nascidos. Em março de 2006, o estado de Virginia (EUA) aumentou de 9 para 28 o número de testes de triagem efetivos para crianças com menos de 6 meses de idade. Até então, a triagem de doenças metabólicas individuais era dirigida em grande parte pelo impacto financeiro da detecção e tratamento dos casos para prevenção de doenças e, assim, economia da receita estadual para institucionalizações vitalícias. As tecnologias modernas mudaram drasticamente essa equação, de modo que o custo tornou-se um fator bem menos importante, enquanto os propósitos humanitários passaram a ter peso bem maior na decisão sobre o que deve ser testado.

Esse modelo de teste de mega-analito atualmente está sendo explorado nos arranjos de expressão genética, que pode também ser previsto para os estudos de proteínas (proteômica). Estaremos profissionalmente equipados para interpretar as centenas a dezenas de milhares de resultados individuais de um único paciente? Provavelmente não, se não contarmos com os avanços nas análises estatísticas e tomada de decisões para distinguir resultados positivos verdadeiros de resultados aleatoriamente falso-positivos em meio a tantas interrogações sobre o corpo humano. Também será necessário haver meios eficientes e claros para comunicar esses resultados complexos e suas interpretações aos médicos e seus pacientes.

Esses são desafios maravilhosos para um laboratório clínico. Eles refletem a vitalidade de poder participar da medicina do futuro e o papel integral que a medicina laboratorial sempre exercerá na assistência à saúde. Nós tentamos destacar as áreas da medicina laboratorial que necessitam de trabalho investigativo, bem como estimular o leitor a realizar pesquisas nessas áreas (p. ex., arranjos de proteína contendo múltiplos anticorpos contra diferentes proteínas séricas, envolvidas na transdução de sinal, para detecção do câncer). Assim, esperamos que um dos efeitos produzidos por este livro seja o de estimular estudos investigativos que promovam avanços na eficácia diagnóstica. É com grande entusiasmo que acolhemos quaisquer comentários, reações ou sugestões referentes a este livro, que contribuam para tornar a próxima edição ainda melhor.

É um privilégio e uma honra para nós sermos os editores desta 21ª edição.

Richard A. McPherson MD
Matthew R. Pincus MD PhD

Agradecimentos

Agradecemos sinceramente pelas notáveis contribuições de nossos colegas especialistas e colaboradores, que atuaram como editores associados: Mark S. Lifshitz MD, Naif Z. Abraham MD PhD, Gregory Threatte MD, Robert E. Hutchison MD, Jonathan L. Miller MD PhD, H. Davis Massey MD PhD, Gail L. Woods MD, Elizabeth Unger MD PhD e Martin H. Bluth MD PhD. Cada um deles contribuiu extensivamente para a qualidade deste livro, seja por meio do desenvolvimento do conteúdo textual, seja por meio da revisão prática dos capítulos. A eles dirigimos nossas mais profundas apreciações pelos esforços dispensados à atual edição.

Somos igualmente gratos a Frederick R. Davey MD por suas contribuições iniciais às edições anteriores como editor associado. É com grande tristeza que comunicamos a passagem de nosso estimado amigo e companheiro, Chester J. Herman MD PhD, também um dos editores associados de edições anteriores. Ele será sempre lembrado por sua curiosidade intelectual e pela liderança na promoção dos testes de diagnóstico molecular.

Expressamos nossa gratidão a Helene M. A. Paxton MS, Susanna Cunningham-Rundles MD PhD, Maurice R. G. O'Gorman PhD, Eric Wagner PhD, Haixiang Jiang PhD, Michael M. Frank MD, Armead H. Johnson PhD, Carolyn Katovich Hurley PhD, Robert J. Hartzman MD e Judith A. Wade BSc, pela oportunidade de revisar os capítulos que escreveram para a 20ª edição e publicá-los nesta 21ª edição. Também agradecemos Katherine I. Schexneider MD, por suas contribuições neste livro. Ela aprimorou a nova edição produzindo um livro complementar, *Review Manual to Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, também publicado pela Elsevier.

Todos os nossos estudantes, residentes e colegas, no decorrer de décadas, contribuíram enormemente para o desenvolvimento de nosso conhecimento sobre as doenças humanas e o uso de laboratórios para diagnóstico e supervisão de pacientes. Somos gratos a essas pessoas por todos os seus questionamentos e pelo estímulo que nos proporcionaram. Pelos conselhos e pelo encorajamento que obtivemos ao longo de nossas carreiras, somos especialmente gratos a Alfred Zettner MD, Cecil Hougie MD, Abraham Braude MD, James A. Rose MD, Robert P. Carty PhD, Donald West King MD, George Teebor MD, Phillip Prose MD, Fred Davey MD e Gerald Gordon MD. Sempre nos lembraremos deles e dos padrões de excelência que estabeleceram.

A miríade de alterações introduzidas no formato desta edição não teria sido possível sem os notáveis esforços profissionais de nossos editores na Elsevier: Natasha Andjelkovic, Joanne Husovski e Russell Gabbedy. Kathryn Mason, Michael Houston e Stewart Larking também participaram integralmente no desenvolvimento e implantação deste projeto. Somos eternamente gratos a eles e também a toda equipe da Elsevier. Eles transformaram nossos esforços em alegrias. Nossos agradecimentos especiais também a Anne Erickson, que criou muitas das ilustrações com uma bela estética aliada à facilidade de compreensão nas apresentações.

Agradecemos a todos os autores por terem aceitado o desafio de participar da instrução dos laboratoristas do futuro e do presente, destilando as informações essenciais das áreas de suas respectivas especialidades e criando textos de leitura agradável e competente para nossa audiência.

Acima de tudo, somos perpetuamente gratos a John Bernard Henry MD, por sua liderança e suas contribuições magníficas nas últimas sete edições deste livro. Também desejamos expressar nossa sincera gratidão pelo encorajamento e pela orientação que ele nos concedeu, pessoal e profissionalmente, em nossas carreiras.

E para finalizar a tarefa de escrever e editar esta 21ª edição, somente nos falta agradecer humildemente a todas as pessoas que contribuíram para tornar esta obra possível. A todos aqueles cujos nomes mencionamos e também àqueles que não foram citados, o nosso muito obrigado.

Richard A. McPherson MD
Matthew R. Pincus MD PhD

PARTE I

O laboratório clínico

Editada por

Mark S. Lifshitz MD, Matthew R. Pincus MD PhD,
Gregory A. Threatte MD

CAPÍTULO 1

Conceitos gerais e questões administrativas

Anthony S. Kurec MS DLM(ASCP), Mark S. Lifshitz MD

Liderança e administração	3	Segurança	8
Planejamento estratégico	4	Riscos biológicos	11
Administração de sistemas de qualidade	5	Riscos químicos	11
Administração de recursos humanos (RH)	6	Riscos ergonômicos	12
Planejamento laboratorial e modelos de serviço	6	Referências bibliográficas	12
Regulamentação, acreditação e legislação	7		

PONTOS-CHAVE

- A administração efetiva de um laboratório requer líderes para proporcionar direção e gerentes para garantir que as tarefas sejam cumpridas. Planejamento estratégico, marketing, administração de recursos humanos e de qualidade são elementos fundamentais na organização de um laboratório.
- A maioria dos erros laboratoriais ocorre nos estágios pré e pós-analítico. O Six Sigma é uma ferramenta que pode ser utilizada para reduzir a incidência de erros laboratoriais.
- Os serviços prestados pelo laboratório são disponibilizados de muitos modos e podem ser considerados em continuidade a partir dos testes rápidos, produzindo respostas imediatas, até os testes realizados para laboratórios de referência sofisticados, que podem demorar dias ou semanas para ficarem prontos.
- Laboratórios clínicos são estabelecimentos altamente regulamentados; muitas práticas laboratoriais são resultado direto da legislação federal ou estadual/local. No nível federal, as atividades laboratoriais são regulamentadas pelo Clinical Laboratory Improvement Amendments de 1988.
- Riscos biológicos, químicos, ergonômicos e incendiários não podem ser completamente eliminados do laboratório, porém podem ser contidos para evitar a exposição dos funcionários ao perigo. As estratégias de segurança incluem controles de engenharia (p. ex., implantação de itens de segurança no planejamento geral de um determinado produto), uso de equipamentos de segurança pessoal e controles da prática de trabalho (como a lavagem das mãos).

O laboratório exerce papel fundamental no serviço de saúde. Até que ponto o laboratório é essencial? Segundo estimativas, 70% de todas as decisões médicas baseiam-se em resultados laboratoriais (Silverstein, 2003), embora os gastos com testes laboratoriais respondam apenas por 3,5% do total de dólares direcionados ao serviço de saúde (IOM, 2000). O laboratório é uma indústria que movimenta 30 a 35 bilhões de dólares e oferece bens clínicos de alto valor a custos relativamente baixos.

O objetivo do laboratório é fornecer a médicos e demais profissionais da saúde informações para: (1) detectar doenças ou predisposição a doenças; (2) confirmar ou rejeitar diagnósticos; (3) estabelecer prognósticos; (4) orientar a supervisão do paciente; e (5) monitorar a eficácia da terapia (Kurec, 2000). O laboratório também exerce papel de liderança na educação e na pesquisa, no planejamento e na implementação de tecnologia da informação e no aprimoramento da qualidade. Para alcançar seus objetivos, um laboratório deve dispor de (1) conhecimentos médicos, científicos e técnicos; (2) recursos, tais como pessoal, equipamentos laboratoriais e de processamento de dados, suprimentos e instalações; e (3) capacidade de organização, administração e comunicação. O objetivo deste capítulo é proporcionar a compreensão fundamental dos conceitos gerais e das questões administrativas que compõem a base de práticas laboratoriais sólidas. Nigon (2000) e Snyder (1998) discutem esses tópicos com mais detalhes.

Liderança e administração

Uma organização somente pode ser tão boa quanto seu pessoal, e este é conduzido por líderes e gerentes. Os termos "liderança" e "administração" muitas vezes são empregados de forma intercambiável, porém representam qualidades diferentes (Tab. 1.1).

A *liderança* direciona o rumo que alguém (ou uma organização) segue, enquanto a *administração* é o "caminho" que se percorre. O velho adágio que diz "Quando não se sabe para onde se vai, qualquer caminho serve" ilustra por que a liderança deve estabelecer metas claras e objetivos estratégicos. Uma administração efetiva emprega certas habilidades para trabalhar com e por meio de outras pessoas, a fim de cumprir tarefas. Para tanto, requer uma mistura ótima de pessoas dedicadas e líderes voltados ao cumprimento de tarefas. Essas habilidades recaem sobre quatro funções administrativas primárias: (1) planejamento e tomada de decisão imediata, (2) organização, (3) liderança e (4) controle.

A liderança é um padrão de comportamento utilizado para engajar outras pessoas na realização de tarefas, dentro de um determinado prazo e de modo produtivo. Os estilos de liderança são: direcionamento, treinamento, suporte e delegação (CareerTrack, 1988). Um líder incentivador proporciona recursos físicos e humanos para que o pessoal possa desempenhar suas funções. Um líder direcionador designa papéis, faz solicitações ou apresenta outras instruções definidas ao pessoal. O primeiro tipo de abordagem proporciona flexibilidade e encoraja a resolução de problemas produtivos, enquanto a outra abordagem oferece instruções concisas e detalhadas de como realizar tarefas. Os outros estilos também são definidos por essas qualidades: a delegação proporciona pouco apoio e direcionamento, ao contrário do treinamento. Um líder pode adotar qualquer estilo de comportamento periodicamente, de acordo com a situação, mas em geral um dos estilos é preponderante.

A administração utiliza os recursos humanos, financeiros, físicos e informativos de que dispõe uma organização da maneira mais eficiente e efetiva possível (Griffin, 1987). Algumas responsabilidades administrativas básicas são listadas na Tab. 1.2. Os gerentes podem ser classificados em gerentes de primeira linha (supervisores, líderes de equipe, tecnólogos-chefes), gerentes de nível intermediário (gerente operacional, líder de divisão) e gerentes de nível superior (diretor geral, diretor executivo, diretor financeiro). Cada nível administrativo determina as atividades diárias e o conjunto de habilidades necessários para a posição. Os gerentes de nível superior concentram-se na estratégia e planejamento para os próximos 1 a 5 anos, enquanto os gerentes de primeira linha preocupam-se mais com o cumprimento das metas de trabalho diárias. Um gerente de nível superior pode ou

Tabela 1.1 Características do líder *versus* do gerente

Líder	Gerente
Administrador	Implementador
Organizador e desenvolvedor	Mantém o controle
Responde pelos riscos	Pensa a curto prazo
Inspira	Pergunta "como" e "onde"
Pensa a longo prazo	Presta atenção no lucro final
Pergunta "o quê" e "por quê"	Aceita o *status quo*
Contesta o *status quo*	É um bom soldado
Faz o que tem de ser feito	Acerta no que faz

Adaptado de Ali, 2001.

Tabela 1.2 Responsabilidades administrativas básicas

Administração operacional
Garantia da qualidade
Políticas e procedimentos
Planejamento estratégico
Benchmarking
Avaliação da produtividade
Legislação/regulamentações/concordância com HIPPA
Questões médico-legais
Educação continuada
Reuniões com a equipe de funcionários
Administração de recursos humanos
Descrições de trabalho
Recrutamento e formação da equipe
Orientação
Avaliação de competências
Registros de pessoal
Avaliação/apreciação de desempenho
Disciplina e demissões
Administração financeira
Orçamentos departamentais
Faturamento
Codificação CPT
Codificação ICD-9
Regulamentações de conformidade
Análise de custo dos testes
Manutenção do esquema de taxas
Administração de marketing
Serviço ao consumidor
Marketing de expansão
Propaganda
Desenvolvimento de site
Informação ao cliente

não possuir as habilidades técnicas que um gerente de primeira linha utiliza no dia a dia. Os gerentes de nível intermediário engajam-se em várias atividades técnicas e não técnicas.

Planejamento estratégico

Para sobreviver e até mesmo prosperar em um ambiente competitivo, um laboratório deve reavaliar com frequência suas metas e seus serviços e adaptá-los às forças de mercado (i. e., número menor de funcionários qualificados, redução orçamentária, ordens regulatórias rigorosas, redução de reembolsos e novas tecnologias sofisticadas). Para tanto, é necessário que o líder tome decisões estratégicas. Por exemplo, um laboratório autônomo pode considerar duas estratégias totalmente distintas; pode crescer reposicionando-se como um "centro" que presta serviços de referência a pequenos laboratórios locais, ou pode reduzir seu tamanho e tornar-se um estabelecimento "*stat*". A primeira estratégia busca aumentar a receita líquida, enquanto a outra tenta reduzir os custos. O processo por meio do qual se toma essas decisões é chamado de planejamento estratégico e pode ser definido como: (1) decisões acerca dos objetivos de uma organização e mudanças ou alterações de objetivos preexistentes; (2) alocação de recursos empregados para alcançar metas; e (3) estabelecimento de políticas que governam a aquisição, o uso e a disponibilização de tais recursos (Lifshitz, 1996). O planejamento estratégico, em geral, baseia-se nas projeções de longo prazo e no panorama global que pode causar impacto em todos os níveis operacionais do laboratório. Difere do planejamento tático, que é detalhado e muitas vezes envolve as operações realizadas no dia a dia para atingir metas estratégicas preestabelecidas. Por exemplo, a necessidade global de desenvolver um negócio de expansão pode levar a outras questões, como: "Deveríamos prestar mais serviços de referência internamente? Precisamos de mais instrumentos e/ou automação laboratorial? Nossas ferramentas de tecnologia da informação são adequadas? Nosso quadro de funcionários é apropriado para satisfazer as expectativas de serviço?". Há, portanto, um risco associado à determinação da estratégia. Uma decisão errada pode sobrecarregar o laboratório com custos, sistemas ou equipamentos desnecessários, dificultando ainda mais a mudança de curso em resposta às forças de mercado futuras ou às novas estratégias organizacionais.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para facilitar o processo de planejamento estratégico; estas incluem histogramas/gráficos/diagramas de dispersão, *brainstorming*, diagramas de causa e efeito (*fishbone*), história em quadrinhos, análise de Pareto e análise Delphi (Kurec, 2004a). Outro modo de avaliar os riscos associados a novas estratégias é a análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*). Em geral, os fatores ambientais internos do laboratório são classificados como *strenghts* (pontos fortes) e *weaknesses* (deficiências), e os fatores ambientais externos são *opportunities* (oportunidades) e *threats* (ameaças). Esse processo é uma ferramenta particularmente útil para o desenvolvimento de uma estratégia de marketing (Tab. 1.3) e deve ser empregado para ajudar a desenvolver um programa de marketing (Tab. 1.4).

Tabela 1.3 Análise SWOT para um novo programa de expansão hospitalar

Pontos fortes (*strengths*)
1. Uso de tecnologia/instrumentação atual
2. Capacidade técnica em excesso
3. O maior volume de testes permite reduzir os custos de cada teste
4. Forte suporte da liderança
5. Disponibilidade de recursos financeiros
Oportunidades (*opportunities*)
1. Abertura de um novo estabelecimento de assistência à saúde por médicos
2. Ordens do Ministério da Saúde para realização de testes laboratoriais em todas as crianças com menos de 2 anos de idade
3. Acesso ao departamento de marketing do hospital
4. O hospital "X" está falido; o laboratório fechará as portas
Deficiências (*weakenesses*)
1. Pequena equipe de funcionários
2. Questões de cunho moral
3. Sistema de comunicação inadequado
4. Necessidade de mais um patologista
5. Experiência limitada na prestação de serviços de SIL a múltiplos hospitais/clientes
6. Prazos de entrega insatisfatórios
Ameaças (*threats*)
1. Concorrência com outros laboratórios de hospitais locais
2. Concorrência com laboratórios de referência nacional
3. Diminuição do reembolso
4. Três hospitais locais consolidaram seus serviços, incluindo laboratórios
5. Surgimento de vários centros de atendimento a pacientes novos

Tabela 1.4 Exemplos de questões a serem consideradas no estabelecimento de um programa de marketing

Avaliação	Lembre-se dos quatro "Ps" de marketing: • produto • preço • posição (local) • promoção Quais são as necessidades do consumidor? Quem são os concorrentes? Você conta com as melhores opções de testes, equipamentos e instalações? Você tem funcionários o suficiente? Você dispõe de recursos financeiros adequados? Você sabe quanto custa realizar um teste laboratorial (análise teste-custo)?
Defina o segmento de seus clientes	Médicos, enfermeiros, dentistas, outros prestadores de assistência à saúde Outros laboratórios hospitalares, laboratórios de consultório médico (LCMs) Companhias seguradoras Identifique grupos socioeconômicos/étnicos únicos Atente-se para mudanças na população e na localização (urbana, rural, suburbana) Escolas, universidades e outras instituições de ensino Casas de repouso, agências de assistência domiciliar à saúde e clínicas Clínicas veterinárias e outros estabelecimentos de assistência à saúde animal Pesquisadores, empresas farmacêuticas, estudos clínicos
Processo	Desenvolva um plano e uma equipe de vendas/marketing Estabeleça metas Garanta a adequação da infraestrutura (serviços de comunicação, capacidades de SIL, pessoal de atendimento ao consumidor etc.) Desenvolva itens adicionais para as opções de testes disponíveis Eduque os funcionários para atender ao consumidor Dê suporte e preserve os serviços já disponíveis aos clientes Propaganda/relações públicas
Como comercializar?	Reveja as opções de testes quanto à abrangência dos serviços prestados (testes de nicho, testes esotéricos, outros serviços únicos que podem ser prestados a um grupo eclético) Anuncie Crie folhetos, manuais sobre coleta de amostra e outros materiais relacionados ao consumidor Crie um site Compareça/participe de fóruns relacionados à saúde na comunidade Identifique consumidores-alvo específicos: Outros laboratórios hospitalares, laboratórios independentes, laboratórios de referência Enfermarias de escolas/universidades, clínicas de saúde, instalações laboratoriais municipais, instalações industriais/ocupacionais (pré-emprego, triagem de drogas) Casas de repouso, estabelecimentos de assistência continuada Centros de reabilitação de dependentes de álcool/drogas, estabelecimentos correcionais Consultórios médicos (LCMs), grupos e especialistas (pediatras, dermatologistas, medicina familiar etc.)

Administração de sistemas de qualidade

Uma meta administrativa essencial consiste em garantir a qualidade dos serviços laboratoriais prestados, que, por sua vez, depende da disponibilidade de equipamentos modernos, equipe de funcionários bem treinada, ambiente fisicamente bem planejado e uma boa equipe administrativa. Nos últimos tempos, as questões envolvendo qualidade e incidência de erros médicos tornaram-se foco de grande atenção. Um estudo realizado em 1999 pelo Institute of Medicine (IM), constatou que dentre 98 mil americanos, 44 mil indivíduos morrem todo ano vitimados por erros médicos (Silverstein, 2003; Kohn, 1999). Entre esses erros, 50% consistem em falha na utilização de testes laboratoriais apropriados, e destes, 32% foram devidos à incapacidade de agir em resposta aos achados dos testes, e 55% decorreram da demora (evitável) em estabelecer um diagnóstico. A frequência de erros laboratoriais varia de 0,05 a 0,061%, embora a distribuição de erros entre os estágios dos testes seja similar, com a maior parte (32 a 75%) ocorrendo na fase pré-analítica e uma incidência bem menor (13 a 32%) na fase analítica (Bonini, 2002). Os erros pré-analíticos incluem amostras hemolisadas, insuficientes ou coaguladas, amostras com identificação errada ou sem identificação, coleta realizada com tubo coletor errado e armazenamento inadequado da amostra; os erros analíticos incluem erros de calibração e mal funcionamento de equipamentos; os erros pós-analíticos consistem em relatórios enviados ao médico errado, tempo de ida e volta longo e extravio de relatórios. Assim, fica claro que há oportunidades para aprimorar a qualidade dos serviços laboratoriais.

A Total Quality Management (TQM) e a Continuous Quality Improvement (CQI) são abordagens úteis para uma liderança e uma administração de qualidade (Juran, 1988; Deming, 1986). A TQM constitui uma abordagem de sistemas focada em equipes, processos, estatísticas e prestação de serviços/entrega de produtos, que atende ou supera as expectativas do consumidor (Brue, 2002). A CQI é um elemento da TQM, que se empenha em aprimorar as práticas continuamente, e não apenas atender aos padrões de qualidade já estabelecidos. A Tabela 1.5 compara o modo de pensar tradicional sobre qualidade com o da TQM. O racional da TQM consiste em empenhar-se na busca contínua de maneiras de reduzir os erros ("prevenção de defeitos") e, para tanto, confere aos funcionários o poder de auxiliar na resolução dos problemas, levando-os a compreender seu papel integral no contexto de um sistema maior ("responsabilidade universal").

Outra ferramenta de qualidade – o *Six Sigma* – é popular no mundo dos negócios e foi adaptada ao laboratório (Brue, 2002). Trata-se de um processo de participação ativa, cujo único mantra é "aprimorar": aprimorar o desempenho, aprimorar a qualidade, aprimorar o lucro final, aprimorar a satisfação do cliente e aprimorar a satisfação do funcionário. No Six Sigma, mede-se o número de defeitos por milhão de oportunidades (DPMO, *defects per million opportunities*). Um defeito é qualquer coisa que não atenda às exigências do consumidor; por exemplo, um erro de resultado de teste laboratorial, o atraso na comunicação do resultado ou um problema no controle de qualidade. Assim, se um laboratório analisa 1.000 relatórios e encontra 10 que foram transmitidos com atraso, isso significa que há uma taxa de defeitos de 1% ou o equivalente a 10.000 DPMO. O Six Sigma tem como meta reduzir a incidência de defeitos a aproximadamente zero. O desvio sigma, ou desvio-padrão, expressa a quantidade de variabilidade existente em produtos ou serviços prestados. Reduzindo a variabilidade é possível reduzir os defeitos. Dessa forma, 1 sigma representa 691.463 DPMO ou um rendimento (i. e., porcentual de produtos isentos de defeito) de apenas 30,854%, enquanto a meta do Six Sigma é alcançar

Tabela 1.5 Gestão da qualidade: pensamento tradicional *versus* TQM

Pensamento tradicional	Pensamento do TQM
Qualidade aceitável	Qualidade isenta de erros
Enfoque no departamento	Enfoque na organização
A qualidade é cara	A qualidade reduz os custos
Defeitos causados por funcionários	Defeitos causados pelo sistema
A administração controla o funcionário	Delegação de poder ao funcionário
Status quo	CQI
Administração intuitiva	Administração baseada em fatos
Qualidade intangível	Definição pela qualidade
Relacionamento "nós-eles"	Relacionamento "nós"
Enfoque no processo final	Processo do sistema
Sistemas reativos	Sistemas proativos

3,4 DPMO ou um rendimento de 99,9997% (Brue, 2002). A maioria das organizações opera dentro ou próximo a 4 sigma (6.210 DPMO). Colocando em perspectiva, de acordo com as diretrizes do CLIA'88, a maioria dos testes de proficiência (TP) requer uma taxa de acurácia de 80%. Isso significa 200.000 defeitos por milhão de testes ou 2,4 sigma. A taxa de acurácia relatada do TP para os laboratórios que aderiram ao CLIA foi de 97% ou 3,4 sigma (Garber, 2004). As práticas do Six Sigma podem ser aplicadas à assistência ao paciente e à segurança (Berte, 2004). Exemplos baseados nos programas Q-Probes e Q-Tracks do College of American Pathologists (CAP) mostraram uma relação com a aplicação do Six Sigma a alguns indicadores de qualidade de desempenho comuns. Nesses estudos, a variação média (50º percentil) para testar o grau de acurácia foi de 2,3% ou 23.000 DPMO; o erro de pulseira de identificação do paciente foi de 3,13% ou 31.000 DPMO; o porcentual de contaminação de cultura sanguínea foi igual a 2,83% ou 28.300 DPMO; e a taxa de discrepância foi de 5,1% ou 51.000 DPMO (Berte, 2004). A redução dos defeitos permite melhorar a qualidade da assistência, e a redução dos custos ocorre por meio da eliminação de desperdícios (p. ex., reutilização de suprimentos e materiais), etapas desnecessárias e/ou horários de funcionários (Sunyog, 2004). Segundo algumas estimativas, os gastos da empresa são reduzidos em 25 a 40% quando se obtém uma mudança de desempenho de 3 sigma para 6 sigma. A Tabela 1.6 apresenta um exemplo do Six Sigma.

Administração de recursos humanos (RH)

Recrutar, contratar, treinar e preservar funcionários qualificados têm se tornado um importante desafio para o gerente dos dias atuais. Nos últimos 20 a 30 anos, quase 70% dos cursos de tecnologia médica credenciados fecharam as portas, resultando em uma redução de 22% no número de estudantes de graduação. Em 2002, a taxa média de vagas para tecnólogos médicos era de cerca de 7% (Ward-Cook, 2003). Algumas das razões mais comuns que explicam a dificuldade de contratar e/ou preservar funcionários são salários baixos, percepção de ambiente de trabalho perigoso, carência de oportunidades, falta de reconhecimento público e profissional e estresse. Todos esses fatores dificultaram ainda mais a seleção de profissionais e criaram a necessidade da implantação de incentivos mais criativos para o recrutamento, bem como salários competitivos, benefícios abrangentes e ambiente de trabalho acolhedor. O mercado de trabalho atual é internacional, por isso é necessário que haja um nível maior de compreensão cultural, étnica e dos aspectos relacionados ao gênero, a fim de se conseguir reunir um grupo seleto de candidatos a vagas de emprego (Kurec, 2004b).

A mão de obra é responsável por 50 a 70% dos gastos de um laboratório, de modo que uma nova contratação ou uma substituição na equipe de funcionários, ou o *equivalente a tempo integral* (ETI), precisa ser bem justificada. Recomenda-se rever o nível, a experiência, a formação e as responsabilidades do trabalho referente a um determinado cargo, confrontando com quaisquer alterações relacionadas que envolvam tecnologia, habilidade requeridas ou outros fatores ambientais. O objetivo dessa medida é assegurar-se da existência de uma real necessidade do cargo em questão, como também de que as obrigações são essenciais e atuais. Outra questão a ser considerada é se a existência de uma vaga desocupada exerceria impacto negativo sobre o departamento ou o hospital. Por exemplo, uma vaga de flebotomista não ocupada pode atrasar a coleta de sangue matinal e a disponibilidade de resultados.

Uma vez completa a justificativa da revisão, deve ser elaborada uma descrição criteriosa do trabalho (Kurec, 1998). Essa descrição deve focar os papéis do profissional procurado, e não tarefas específicas, pois estas com frequência podem sofrer alterações dependendo das operações do laboratório. Uma descrição criteriosa do trabalho não apenas inclui o título, o nível e as qualificações, mas também uma clara identificação das responsabilidades, das obrigações e dos relacionamentos internos e externos. Com ela, tem-se uma orientação clara acerca das expectativas tanto do candidato à vaga oferecida quanto do empregador.

Tabela 1.6 Etapas do Six Sigma

Etapa do Six Sigma	Exemplo
Defina as metas do projeto ou outros itens passíveis de serem fornecidos que sejam cruciais à qualidade	Os resultados do departamento de emergências devem estar prontos em menos de 30 minutos contados a partir da solicitação
Quantifique o desempenho basal e as variáveis relacionadas	Desempenho basal: 50% dos resultados ficam prontos dentro de 30 min, 70% em 1 h, 80% em 2 h etc. Variáveis: contratação de funcionários a cada turno, tempo decorrido desde a requisição até o recebimento no laboratório, tempo decorrido desde o recebimento até a liberação do resultado etc.
Analise os dados empregando estatística e gráficos para identificar e quantificar a causa original	O tempo decorrido desde a requisição até o recebimento varia bastante, pois as amostras não são colocadas imediatamente no sistema de transporte de amostras e chegam ao laboratório sem estarem sinalizadas de modo adequado, como emergenciais
Melhore o desempenho desenvolvendo e implementando uma solução	As amostras provenientes do departamento de emergências são marcadas com cores exclusivas para facilitar sua identificação entre as amostras da rotina
Controle os fatores relacionados ao aprimoramento, verifique o impacto, valide os benefícios e monitore ao longo do tempo	Novo desempenho: 90% dos resultados disponíveis dentro de 30 minutos

Planejamento laboratorial e modelos de serviço

Os serviços laboratoriais são prestados de diversos modos, desde a continuação dos testes rápidos com produção de resultados imediatos, até a realização de testes altamente sofisticados de laboratórios de referência, que demoram dias ou semanas para ficar prontos. Mudanças radicais na assistência à saúde têm forçado os laboratórios a reavaliar os serviços a serem oferecidos e o modo como devem ser prestados. Em consequência, surgiram vários modelos de serviços de testes laboratoriais (Tab. 1.7). Em alguns casos, pressões financeiras têm levado os hospitais a estabelecer relações externas, como as redes de trabalho nas quais os recursos laboratoriais são centralizados. De modo similar, os laboratórios também têm mudado seu planejamento interno em uma tentativa de consolidar setores e/ou serviços. Os testes laboratoriais também têm sido forçados a se tornarem testes rápidos (TR) para reduzir o tempo de ida e volta de resultados críticos e para se tornarem mais convenientes ao paciente. Tais tipos de modificação têm estimulado mudanças organizacionais no ambiente laboratorial e em suas relações externas com outros departamentos hospitalares, provedores de assistência à saúde e à comunidade em que atua.

O *planejamento funcional de um laboratório* e sua relação com outros setores nos quais também são realizados testes em um dado estabelecimento têm se desenvolvido com o passar do tempo. O laboratório hospitalar tradicional foi planejado para contar com seções discretas de hematologia, bioquímica, microbiologia e banco de sangue. Entretanto, nos últimos tempos as fronteiras entre essas áreas têm se tornado obscuras. Em uma tentativa de reduzir os custos e responder de maneira mais rápida às necessidades clínicas, tem ocorrido um realinhamento dos serviços intralaboratoriais em paralelo a linhas altamente automatizadas, estabelecimentos "centrais" de respostas rápidas, processamento de testes manual ou semiautomatizado e laboratórios *stat* periféricos e/ou setores de testes rápidos. No passado, os locais que realizavam testes eram definidos por disciplina (p. ex., o teste para hepatite era realizado sempre no setor de sorologia); hoje em dia, os laboratórios passaram a definir o local onde os testes são realizados com base na tecnologia (os testes para hepatite são realizados em plataformas automatizadas com outros imunoensaios no setor de bioquímica). Essas tendências têm sido possíveis graças aos avanços tecnológicos no manuseio das amostras durante a fase pré-analítica (p. ex., código de barras, centrífugas automáticas, abridores), nos analisadores (p. ex., consolidação de múltiplas modalidades de análise em uma plataforma única e integrada) e na fase pós-analítica (p. ex., comunicação de resultados por meio

Tabela 1.7 Planejamento laboratorial e exemplos de modelos de serviços

Laboratório "fechado" tradicional	O laboratório hospitalar tradicional possui seções discretas, as quais correspondem a hematologia, bioquímica, microbiologia e banco de sangue, estando geralmente separadas em salas ou divisões
Laboratório "aberto"	Os diferentes serviços funcionam em uma sala grande com paredes móveis que podem ser ajustadas conforme a necessidade, com base no volume
Laboratório central	Um tipo comum de consolidação tem sido os laboratórios de hematologia e bioquímica ("bioquímica hematológica") (Bush, 1998). As vantagens incluem lidar com solicitações *stat*, melhorar o fluxo de trabalho na troca de turno e prevenir problemas de recrutamento crônico
Laboratório regional	Pequeno volume de serviços laboratoriais específicos ou caros atualmente prestados por mais de um laboratório hospitalar regional, os quais estão consolidados em um único laboratório hospitalar. Por exemplo, consolidação de todos os testes virológicos ou de PCR em um laboratório hospitalar
Laboratório de referência	Serviço laboratorial integral tradicional que lida com todos os tipos de teste, em especial testes esotéricos
Teste rápido	Teste laboratorial que é levado à cabeceira do leito do paciente. As opções de testes em geral são limitadas a poucos testes bioquímicos e hematológicos básicos (p. ex., glicose, gravidez, tempo de coagulação ativada, gases sanguíneos)
Laboratório *stat*	Laboratório de resposta rápida que por vezes se localiza no ou próximo ao departamento de emergências ou à sala cirúrgica. Fornece testes laboratoriais críticos, tais como hematócritos e gases sanguíneos
Serviços limitados	Laboratório que fornece opções limitadas de rotina (como CCS, painel químico, tempo de protrombina) e/ou serviços especializados (como testes de fertilidade) em modo *stat* ou não *stat*. Inclui laboratórios hospitalares pequenos que retêm *stats* e alguns testes de rotina, mas enviam a maior parte do trabalho a um laboratório central distante

de sistemas computadorizados de rede de trabalho, internet, autofax). Esses avanços resultaram na criação de três abordagens distintas de testes do laboratório central: plataforma única (um único analisador), célula de trabalho (dois ou mais instrumentos conectados) e automatização laboratorial total (célula de trabalho com processamento pré e pós-analítico). Essas configurações serão discutidas nos Capítulos 2 e 5.

A *regionalização* é um processo de consolidação em grande escala. Nesse modelo "centro-radial" (*hub and spoke*), um único laboratório central atua como centro e um ou mais laboratórios constituem os raios. Há necessidade de uma quantidade significativa de recursos de antemão para iniciar um laboratório regionalizado, requerimentos consideráveis de espaço, comprometimento de funcionários experientes e educação continuada da equipe de funcionários a longo prazo para lidar com essa mudança. Esse tipo de plano requer um ambiente altamente cooperativo entre todas as partes envolvidas e pode demorar anos para ser implantado por completo. Nesse modelo, dois ou mais laboratórios hospitalares estabelecem uma aliança interlaboratorial e concordam quanto a localização dos laboratórios, retenção da equipe de funcionários, instrumentos utilizados e sistemas de administração de informações. Com frequência, há um grande estabelecimento central que acomoda tanto os testes de rotina quanto os testes mais esotéricos. Os laboratórios *stat* ou de resposta rápida localizam-se em hospitais individuais para lidar com solicitações de testes urgentes. Esse modelo funciona particularmente bem em lugares onde já existe um laboratório grande e abrangente em meio a vários laboratórios menores instalados em hospitais da comunidade. Uma variação consiste no modelo que enfoca especialização e perícia laboratorial. Por exemplo, um laboratório hospitalar pode ter laboratórios de microbiologia/virologia/micologia bem estabelecidos, com funcionários experientes que sejam capazes de lidar com testes de rotina e com testes altamente específicos. Enviar todos os testes, com exceção dos testes microbiológicos mais básicos, para o "laboratório de microbiologia central" pode ter a vantagem de contar com as habilidades e os equipamentos disponíveis no laboratório. Pode haver oportunidades semelhantes para outras seções do laboratório, como citogenética, diagnóstico molecular, citologia ou histocompatibilidade. As vantagens proporcionadas por uma consolidação como esta são a padronização dos procedimentos, os equipamentos, os programas de controle de qualidade e as formas de transmissão de resultados (Zeiger, 1997). É possível obter uma redução significativa dos gastos reduzindo equipamentos redundantes, maximizando o rendimento da amostra e utilizando a equipe de modo mais efetivo. Uma consolidação laboratorial de serviços permitiu uma redução de 25% na mão de obra (Szumski, 1999); a aquisição em massa de suprimentos comuns reduz os gastos, e o estabelecimento de múltiplos acordos de compra pode ser consolidado. Os desafios para implementação e obtenção de sucesso com esse modelo incluem transporte da amostra, resistência a mudanças, questões referentes aos funcionários e questões morais, "perda de identidade" do laboratório e problemas de união, de modo que se faz necessária uma cuidadosa consideração durante o processo de planejamento.

Considerações sobre *planejamento físico* são importantes quer seja o tipo de laboratório. Deve ser considerada a localização da área de processamento de amostras, de registro de pacientes e entrada de dados, de fluxo de trabalho para realização dos testes de amostras e de armazenamento a curto e longo prazo, bem como os requerimentos de conectividade do sistema de informação do laboratório (SIL). As necessidades relativas ao espaço físico no relacionamento com outros serviços hospitalares (proximidade do departamento de emergência, unidades de tratamento intensivo e sala de operações) devem ser encaradas como um processo multidisciplinar. Robótica, tubos pneumáticos, computadores, incluindo acessos à intranet e à internet, e aparelhos de fax são ferramentas novas utilizadas em laboratórios modernos e devem ser consideradas no planejamento. As questões relacionadas a energia elétrica, controladores de temperatura/umidade, fontes de água e drenagem e circulação/ventilação de ar devem ser levadas em conta em termos de localização e quantidade suficiente. Códigos de conformidade regulamentadores devem ser cuidadosamente revistos e implementados de forma apropriada para garantir o atendimento às necessidades de segurança, ergonomia e conforto (Tab. 1.8). Para estar de acordo com as regras locais, estaduais e federais, deve-se consultar um arquiteto que tenha experiência em planejamento de laboratórios clínicos, ao considerar a transferência ou a renovação do planejamento laboratorial. Essa medida também minimiza os gastos com requisições de mudança e maximiza a funcionalidade e o fluxo de trabalho.

Regulamentação, acreditação e legislação

Os laboratórios clínicos estão entre as entidades de assistência à saúde mais rigorosamente regulamentadas; muitas práticas laboratoriais são resultado direto da legislação federal ou estadual/local (Tab. 1.9). É necessário compreender essas leis para evitar repercussões legais ou administrativas que possam limitar as operações de um laboratório ou mesmo inativá-lo por completo. Para operar (e receber reembolso pelos serviços prestados), os laboratórios devem estar licenciados, e também é possível que precisem ser credenciados. É obrigatório ter uma licença; trata-se de uma exigência federal e/ou estadual para que um laboratório possa funcionar. A acreditação é voluntária, embora em alguns estados seja um dos requisitos para obtenção da licença de funcionamento.

No âmbito federal, as atividades laboratoriais estão regulamentadas pela Clinical Laboratory Improvement Amendments de 1988 (CLIA) (CLIA'88, registro federal, 55, 1990; http://www.cms.hhs.gov/clia/). Anteriormente à CLIA'88, não havia padrões federais de regulamentação consistentes, mas apenas iniciativas estaduais esporádicas que detinham vários níveis de autoridade. A CLIA'88 foi decretada em resposta a relatos de resultados incorretos de esfregaços de PAP e preocupações gerais acerca dos padrões de qualidade laboratoriais. A CLIA'88 fornece padrões mínimos que são impostos pelo governo federal ou por representantes (Tab. 1.10) que possuem padrões "julgados" equivalentes ou mais rigorosos que os da CLIA. Para testar amostras humanas, um laboratório deve ser certificado pela CLIA, indicando que está de acordo com os padrões de pessoal, operacionais, de segurança e de qualida-

Tabela 1.8 Considerações sobre o planejamento físico do laboratório (Painter, 1993; Mortland, 1997)

1. Ao fazer uma avaliação das necessidades, determine espaço para escritórios, instalações de funcionários, armazenamento, área de reuniões/biblioteca e área para estudantes
2. Revise rotineiramente todas as áreas planas e elevações do piso para uma utilização adequada e para garantir que o espaço esteja associado à função que nele será desempenhada. Pode ser necessário implantar áreas de acesso para deficientes
3. Crie e utilize um organizador de horários
4. Exaustores e cabines de segurança biológica devem ser instalados longe das áreas de tráfego intenso e passagens de portas
5. Móveis modulares proporcionam flexibilidade de movimentação e permitem a reconfiguração do laboratório de acordo com as necessidades atuais ou previstas
6. Itens laboratoriais convencionais fixos podem desvalorizar o imóvel, ao contrário dos móveis modulares
7. Armários baixos (que ficam abaixo dos balcões do laboratório) proporcionam 20 a 30% mais espaço para armazenamento que armários suspensos
8. O controle de barulho em laboratórios abertos pode ser obtido com a instalação de um forro. A instalação de utilitários acima do forro proporciona maior flexibilidade na sua disposição
9. O espaço geralmente necessário é de 14 a 18,5 m^2 livres (excluindo-se corredores, paredes, *closets* privativos etc.) por FTE, ou 2,5 a 3,7 m^2 livres por leito de hospital
10. Recintos maiores que 9,3 m^2 devem ter duas saídas; os corredores utilizados pelos pacientes devem ter 2,4 m de largura, enquanto aqueles que não são utilizados por pacientes devem ter 1,1 m de largura
11. Deve haver uma unidade emergencial de lavagem dos olhos a 30,5 m das áreas de trabalho
12. Dimensões-padrão sugeridas para o planejamento e delineamento de um laboratório

    Largura do balcão do laboratório = 61 cm
    Distância do balcão do laboratório até a parede = 1,2 m
    Distância entre balcões de laboratório = 2,1 m
    Altura do balcão = 76,2 cm
    Altura da prateleira do teclado = 63,5 a 68,6 cm
    Corpo humano em pé = 0,37 m^2
    Corpo humano sentado = 0,56 m^2
    Espaço ocupado pelo balcão = 0,28 m^2

Tabela 1.9 Várias regulamentações laboratoriais e seus significados

1983 **Prospective Payment System (PPS, Sistema de Pagamento Prospectivo):** para pagamentos estabelecidos de pacientes do Medicare, baseado em grupos relacionados ao diagnóstico (GRDs). Os hospitais recebem uma quantia fixa por GRD, independentemente do custo real, sendo incentivados a liberar o paciente assim que for possível do ponto de vista médico. Com relação aos pacientes internos, os laboratórios tornaram-se centros de custo, em vez de centros de receita (Social Security Amendments P.I., 98-21)

1984 **Deficit Reduction Act (Ato de Redução de Déficit)** (P.I., 93-369): estabeleceu o esquema de taxas para pacientes externos, a fim de controlar os gastos; congelou o esquema de taxas da Parte B

1988 **Clinical Laboratory Improvement Act de 1988 (CLIA 88, Ato de Aprimoramento dos Laboratórios Clínicos de 1988):** recebeu emendas em 1990 e 1992; estabeleceu que todos os laboratórios devem ser certificados pelo governo federal, apresentando garantia de qualidade, pessoal e padrões de prova de proficiência conforme as exigências, com base no grau de complexidade dos testes. Até então, o governo federal apenas havia regulamentado alguns poucos laboratórios que realizavam comércio interestadual ou independente ou laboratórios hospitalares que queriam reembolso do Medicare. A CLIA aplica-se a todos os estabelecimentos nos quais os testes são realizados, incluindo consultórios médicos e clínicas

1989 **Physician Self-referral Ban (Proibição da autorrecomendação médica)** (Stark I; PL 101-239): impede que os médicos indiquem seus próprios laboratórios aos pacientes do Medicare

Ergonomic Safety and Health Program Management Guidelines (Diretrizes Administrativas do Programa de Saúde e Segurança Ergonômica): estabeleceu as diretrizes da OSHA para segurança do trabalhador

1990 **Three-Day Rule (Regra de Três Dias):** foi estabelecida pelo CMS. Determina que o pagamento por qualquer teste laboratorial realizado em até 3 dias úteis antes da admissão como paciente interno não será reembolsado, uma vez que é considerado parte da estadia hospitalar. (Omnibus Reconciliation Act); dirige o HHS para desenvolver um sistema de GRD de pacientes externos

Occupational Exposure to Hazardous Chemicals in Laboratories (Exposição Ocupacional a Riscos Químicos em Laboratórios): estabelece as diretrizes da OSHA para limitar a exposição desnecessária a riscos químicos

1992 **Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens (Exposição Ocupacional a Patógenos Transmitidos pelo Sangue):** estabelece as diretrizes da OSHA para limitar a exposição desnecessária a riscos biológicos

1996 **Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPPA, Ato de Responsabilidade e Portabilidade do Seguro Saúde):** determina o modo como a informação sobre assistência à saúde é administrada. Essa lei protege os pacientes da dispersão inadequada (oral, escrita ou eletrônica) de informações pessoais e é a base de muitos padrões de privacidade atualmente em prática

1997 **OIG Compliance Guidelines (Diretrizes de Concordância com a OIG):** destinada a laboratórios clínicos, ajuda os laboratórios a desenvolver programas que promovam uma conduta altamente ética e legal, em especial no que se refere a práticas de cobrança e fraude e abuso

2001 **CMS National Coverage Determinations (NCDs, Determinações de Cobertura Nacional do CMS):** substituiu a maioria das políticas de revisão médica locais (PRMLs) utilizadas para determinar se determinados testes laboratoriais são necessários do ponto de vista médico e, portanto, reembolsáveis. Antes dele, cada intermediário Medicare tinha suas próprias diretrizes de importância médica

2003 **Hazardous Material Regulations (Regulamentações de Materiais Perigosos):** trata do transporte de sangue e outros produtos que oferecem potencial biorrisco (DOT)

de estabelecidos pelo governo. Um aspecto da CLIA consiste na aplicação de vários padrões que se baseiam na complexidade dos testes (Tab. 1.11). Orientações detalhadas e atualizadas podem ser encontradas no site: http://www.phppo.cdc.gov/ clia/regs/toc.aspx.

Existem várias agências governamentais e organizações não governamentais que influenciam de forma direta ou indireta as operações laboratoriais. As Tabelas 1.12 e 1.13 fornecem alguns exemplos comuns, mas que não são de modo algum inclusivos. As responsabilidades assumidas por essas agências representam diretrizes e/ou mandatos federais, estaduais e profissionais destinados a proteger o público de práticas de testes laboratoriais de baixa qualidade ou da exposição desnecessária a elementos biológicos, químicos ou radioativos. Elas também garantem a qualidade de produtos do sangue e o acesso a testes laboratoriais conforme a necessidade e proporcionam um ambiente de trabalho seguro para os funcionários. As associações profissionais fornecem diretrizes que muitas vezes são aceitas como padrões de atenção da prática por agências governamentais. Por exemplo, a Tabela 1.14 mostra os limites de tempo sugeridos para realização do registro e da retenção de amostras com base nas diretrizes do CAP.

Segurança

O laboratório clínico pode potencialmente expor a equipe de funcionários a uma variedade de riscos por meio do contato com pacientes, amostras, equipamentos e tarefas da rotina diária. Tais riscos podem ser biológicos, químicos, ergonômicos e incendiários. Embora os potenciais riscos não possam ser eliminados por completo, podem ser contidos para evitar danos aos funcionários. Os laboratórios são obrigados a identificar esses riscos, implantar estratégias de segurança para contê-los e avaliar continuamente as práticas existentes para determinar se há necessidade de implantar novas práticas. As revisões de segurança

Tabela 1.10 "Reconhecimento da acreditação" pela CLIA

Estados
Nova York
Washington
Organizações
College of American Pathologists
Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations
American Association of Blood Banks
American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
Commission on Office Laboratory Accreditation
American Osteopathic Association

Tabela 1.11 Categorias incluídas e excluídas pela CLIA (Slirva, 2003)

Categorias de testes (com base no analista/operador e na complexidade da realização do teste)
Cedido (p. ex., glicose sanguínea, urina para gravidez)
Complexidade moderada
Complexidade elevada
Não classificado (por não gerar resultados)
Materiais de controle de qualidade
Calibradores
Kits de coleta (para HIV, drogas de abuso etc.)
Não regulamentados atualmente (pela CLIA)
Testes não invasivos (p. ex., bilirrubina)
Testes respiratórios (p. ex., álcool, *H. pylori*)
Testes para detecção de drogas de abuso no local de trabalho
Dispositivos de monitoramento/infusão contínua (p. ex., glicose/insulina)

frequentes, o treinamento antidesastres e o permanente estado de alerta geral dos funcionários ajudam a manter o ambiente de trabalho seguro.

Boas práticas de segurança beneficiam tanto o laboratório quanto os funcionários que nele trabalham. Lesões afetam o moral da equipe e ameaçam a saúde física e emocional da parte envolvida. As lesões são também onerosas em termos de perda de dias de trabalho e remunerações, equipamentos avariados e tratamento médico. Um indivíduo que sofreu uma lesão pode ter de ausentar-se do trabalho

Tabela 1.12 Várias agências governamentais relacionadas a laboratórios

CMS	Os Centers for Medicare and Medicaid Services, anteriormente conhecidos como HCFA, supervisionam o maior programa de assistência à saúde dos EUA, processando mais de 1 bilhão de reivindicações por ano. O Medicare (ver Cap. 12) fornece cobertura a cerca de 40 milhões de americanos com mais de 65 anos de idade, alguns com deficiências, bem como pacientes com doença renal em estágio terminal (DRET), contando com um orçamento de 309 bilhões de dólares (2004). O Medicaid cobre aproximadamente 50 milhões de indivíduos que possuem baixa renda, por meio de uma parceria estadual-federal que custeia 277 bilhões de dólares (2004). O CMS estabelece os padrões de qualidade e as taxas de reembolso a serem aplicadas aos laboratórios e que muitas vezes são utilizados por outros contribuintes de terceiros (www.cms.hhs.gov/)
DOT	O Department of Transportation tem a responsabilidade de regulamentar os materiais que oferecem biorrisco, incluindo sangue e outros produtos de origem humana. Amostras de laboratório enviadas a laboratórios de referência devem ser acondicionadas de acordo com as diretrizes estabelecidas por esse ministério (www.dot.gov/)
EPA	A Environmental Protection Agency estabelece e faz cumprir os padrões de descarte de materiais laboratoriais de risco, tais como formalina, xilol e outros agentes potencialmente carcinogênicos (www.epa.gov)
EEOC	A Equal Employment Opportunity Commission supervisiona e faz cumprir o título VIII, que trata das práticas de trabalho justas referentes ao Civil Rights Act de 1964, e ao Equal Employment Opportunity Act de 1972. A contratação de funcionários para o laboratório obedece às mesmas regras seguidas pela maioria das empresas (www.eeoc.gov/)
FDA	A Food and Drug Administration faz parte do HHS e regulamenta a produção de materiais biológicos (como testes para doadores de sangue e preparo de componentes), dispositivos de uso médico (como analisadores de laboratório) e kits de testes pelo Office of In-Vitro Diagnostic Device Evaluation and Safety. A FDA inspeciona doadores de sangue e/ou estabelecimentos produtores de componentes, independentemente de outras agências regulamentadoras e/ou organizações de acreditação (www.fda.gov/)
HHS	O US Department of Health and Human Services supervisiona o CMS, o OIG e a FDA
NARA	O National Archives and Records Administration disponibiliza inúmeros bancos de dados, incluindo acesso ao registro federal, em que as regulamentações referentes aos laboratórios são publicadas (www.gpoaccess.gov/fr/index.html)
NRC	A Nuclear Regulatory Commission cria e faz cumprir diretrizes federais que asseguram o uso e a operação adequados de instalações nucleares não militares. Os testes laboratoriais que empregam materiais radioativos (como os radioimunoensaios) devem estar de acordo com as regras estabelecidas por essa agência (www.nrc.gov/)
NIDA	O National Institute on Drug Abuse regula rigorosamente os padrões para realização e manutenção do controle de qualidade adequado dos testes de drogas de abuso (www.nida.nih.gov/)
NIOSH	O National Institute of Occupational Safety and Health integra o Department of Health and Human Services, fornecendo pesquisa, informação, educação e treinamento no setor de segurança ocupacional e saúde. O NIOSH faz recomendações referentes aos riscos de segurança, porém não tem autoridade para torná-las obrigatórias (www.cdc.gov/niosh/homepage.html)
NIH	O National Institute of Health é uma agência do Department of Health and Human Services (HHS) e é o líder mundial da pesquisa na área médica. Publica vários manuais de prática clínica, alguns dos quais são aplicáveis ao laboratório, como os manuais para diabetes e testes lipídicos (www.nih.gov)
NIST	O National Institute of Standards and Technology é um ramo do Commerce Department e tem contribuído para o desenvolvimento de muitos produtos na área de assistência à saúde. Além disso, ambas as instituições têm desenvolvido padrões para calibrações, pesagens e quantificações, bem como unidades do SI (www.nist.gov)
OIG	O Office of the Inspector General faz parte do HHS e responde por auditoria, inspeção e identificação de fraudes e abuso em programas do CMS, como os testes laboratoriais. O enfoque do OIG usualmente é o não atendimento às regulamentações de reembolso de acordo com a necessidade médica
OSHA	A Occupational Safety and Health Administration integra o Department of Labor, desenvolvendo e impondo padrões no local de trabalho para proteger a segurança e a saúde dos funcionários. As recomendações da OSHA incluem diretrizes que tratam de patógenos transmitidos pelo sangue, segurança química, flebotomias, luvas de látex, ergonomia e qualquer outra situação de potencial risco que possa ocorrer no local de trabalho (www.osha.gov)
State DOH	O State Department of Health varia na medida em que regulamenta os laboratórios Alguns estados, como Nova York, concedem licença a todos os laboratórios e contam com testes de proficiência obrigatórios e programas de inspeção de laboratório; outros não possuem nada disso. Nova York e Washington possuem "reconhecimento de acreditação" da CLIA

Tabela 1.13 Várias agências não governamentais relacionadas a laboratórios

AABB	Anteriormente conhecida como American Association of Blood Banks, a AABB é um grupo de profissionais que oferece um programa de acreditação para bancos de sangue, o qual pode substituir (contanto que sendo coordenado com) a inspeção do CAP. Possui "reconhecimento de acreditação" da CLIA (www.aabb.org)
ASCP	A American Society of Clinical Pathology é uma organização profissional e é também a maior organização de profissionais de laboratório a conceder certificação para várias especialidades (www.ascp.org)
CAP	O College of American Pathologists oferece o maior programa de exames de proficiência dos EUA, possuindo um programa de acreditação de laboratórios avaliado por pares com "reconhecimento de acreditação" da CLIA. A acreditação concedida pelo CAP é reconhecida pela JCAHO, seguindo seus padrões laboratoriais (www.cap.org)
CLSI	O Clinical and Laboratory Standards Institute, antigo NCCLS, é um grupo de profissionais que desenvolve critérios padronizados relacionados às praticas laboratoriais; as entidades de acreditação e licenciamento frequentemente adotam seus padrões, por exemplo, o formato do manual de procedimentos (www.clsi.org)
COLA	O COLA, originalmente Commission on Office Laboratory Accreditation, é uma organização sem fins lucrativos patrocinada pela American Academy of Family Physicians, American College of Physicians, American Medical Association, American Osteopathic Association e College of American Pathologists. Possui "reconhecimento de acreditação" da CLIA, e sua acreditação é reconhecida pela JCAHO. Foi originalmente organizada para prestar assistência aos laboratórios de consultório médico (LCMs), porém recentemente expandiu sua linha de atuação para a prestação de outros serviços (www.cola.org)
JCAHO	A Joint Commision on Accreditation of Healthcare Organization é uma entidade independente e sem fins lucrativos, que concede acreditação a aproximadamente 16.000 organizações e programas de assistência à saúde nos EUA, segundo um conjunto abrangente de padrões de qualidade. Possui "reconhecimento de acreditação" da CLIA e pode substituir exames federais da Medicare e da Medicaid; do mesmo modo, preenche os requisitos para licenciamento em vigor em alguns estados, bem como os requisitos gerais de muitas seguradoras. A JCAHO costuma avaliar laboratórios, como parte de avaliações gerais de estabelecimentos de assistência à saúde (www.jcaho.org/)

por tempo indeterminado e com frequência ficar impossibilitado de trabalhar com o máximo de sua eficiência até curar-se. Se a inexperiência pode ser a causa de alguns acidentes, estes também podem ser decorrentes de desatenção com riscos conhecidos, pressa, falta de cuidado, cansaço ou preocupação mental (incapacidade de direcionar a atenção ou concentrar-se no que faz).

Existem várias estratégias para conter tais riscos (Tab. 1.15). Os *controles de engenharia* são itens de segurança implantados no planejamento geral de um produto; por exemplo, um interruptor de circuito elétrico ou uma bainha de proteção cobrindo uma agulha de flebotomia. *Equipamentos de proteção pessoal* (EPP) e barreiras, como luvas e protetores de rosto, isolam fisicamente o usuário de uma fonte de risco. Os *controles da prática de trabalho* incluem procedimentos gerais e medidas preventivas que reduzem ou eliminam a exposição aos riscos, tais como o descarte separado de resíduos biológicos e a lavagem das mãos. Os programas de segurança mais efetivos empregam essas três estratégias.

Tabela 1.14 Diretrizes sugeridas para registro e retenção de amostras*

Tipo de registro/amostra	Retenção
Registros	
Requisições	2 anos
Controle de qualidade	2 anos
Manutenção de instrumentos	2 anos
Registros de doador/receptor de banco de sangue	Indefinidamente
Assinaturas/iniciais de funcionários de banco de sangue	10 anos
Controle de qualidade do banco de sangue	5 anos
Relatórios	
Relatórios do laboratório de patologia clínica	2 anos
Relatórios de autópsia forense	Indefinidamente
Relatórios de patologia cirúrgica (e medula óssea)	10 anos
Relatórios de citogenética	20 anos
Amostras	
Soro/outros líquidos corporais	48 horas
Esfregaços sanguíneos – rotina	7 dias
Lâminas de patologia/medula óssea	10 anos
Blocos de patologia	10 anos
Esfregaços microbiológicos	7 dias
Amostras de doador/receptor de banco de sangue	7 dias após a transfusão
Lâminas de citogenética	3 anos
Imagens diagnósticas de citogenética	20 anos

* College of American Pathologists (CAP), Northfield, IL (março, 2001) e/ou Diretrizes da CLIA'88 (registro federal 55, 1990; 57, 1992); verifique com outras organizações (como a AABB) ou agências regulamentadoras locais quais são os requerimentos atuais que podem diferir dos citados na tabela.

Tabela 1.15 Estratégias de prevenção de riscos no laboratório

Controles da prática de trabalho	Lavar as mãos após o contato com cada paciente Limpar as superfícies com desinfetante Evitar o uso desnecessário de agulhas e materiais perfurocortantes, bem como não os recobrir Descartar resíduos em saco de lixo vermelho Imunizar contra hepatite Realizar rodízios de trabalho, para minimização de tarefas repetitivas Fornecer orientação, treinamento e educação continuada Não comer, beber ou fumar dentro do laboratório Colocar sinalização preventiva
Controles de engenharia	Recipientes resistentes a objetos pontiagudos para descarte e transporte de agulhas e material perfurocortante Uso de agulhas seguras, com retração automática após a remoção Sacos de lixo para descarte de agentes de biorrisco Protetores contra espirros Transportadores para líquidos voláteis Baldes de segurança para centrífugas Cabines de segurança biológica e exaustores Dispositivos de pipetagem mecânica Almofadas de apoio para punho/braço para uso no computador Pias controladas por sensores ou torneiras controladas por pé/joelho/cotovelo
Barreiras e equipamentos de proteção pessoal (EPP)	Luvas isentas de látex Jalecos e roupões para uso no laboratório Máscaras com filtro de partículas Protetores para o rosto Equipamentos de proteção ocular (óculos de proteção) Estação de lavagem dos olhos Luvas resistentes a agentes químicos; luvas resistentes a temperaturas inferiores a 0°C (para uso em congeladores); luvas térmicas

Riscos biológicos

Os riscos biológicos expõem o indivíduo desprotegido a bactérias, vírus, parasitas ou outras entidades biológicas, resultando em infecção. A exposição ocorre a partir de ingestão, inoculação, contaminação por contato ou inalação de material infeccioso proveniente de pacientes ou de seus líquidos/tecidos corporais, suprimentos ou materiais com os quais entraram em contato, agulhas contaminadas ou partículas de aerossol dispersas. Há ainda a possibilidade de exposição inconsciente em meio ao público, pelo contato direto ou indireto com líquidos ou tecidos corporais infectados, equipamentos de laboratório contaminados, produtos do sangue processados de modo inadequado e resíduos inapropriadamente descartados.

A disseminação do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da tuberculose (TB) tem destacado a responsabilidade de cada organização de assistência à saúde quanto à proteção de seus funcionários, dos pacientes e do público em geral contra infecções. Em 1987, a preocupação em torno do HIV levou os Centers for Disease Control (CDC) a atualizar suas 1.983 "Diretrizes para Precauções de Isolamento em Hospitais" (Garner, 1983), com a criação das "precauções universais", que recomendam a tomada de precauções consistentes com relação ao manuseio de sangue e líquidos corporais, para todos os pacientes, quer haja ou não infecção transmitida pelo sangue (Recomendações e Relatórios dos CDC, 1989). Tais diretrizes destinam-se a minimizar o grau de exposição ocupacional. A Occupational Safety and Health Administration (OSHA) define a exposição ocupacional como "o contato razoavelmente antecipado de pele, olhos, membranas mucosas ou contato percutâneo com sangue ou outros materiais infecciosos em potencial, que pode resultar do exercício das obrigações de um funcionário" (registro federal, 29CFR, 1910.1030, 1992). O sangue e a maioria dos demais fluídos corporais de pacientes, entre eles sêmen, secreções vaginais, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido sinovial, líquido pleural, líquido amniótico, saliva, lágrimas, líquido cerebrospinal, urina e leite, podem ser considerados potencialmente infecciosos quanto à presença de HIV, HBV, HCV e demais patógenos transmitidos pelo sangue. O mesmo vale para quaisquer amostras não fixadas, órgãos ou esfregaços sanguíneos. Antes dessas exigências entrarem em vigor, as infecções associadas ao laboratório ocorriam a partir de pipetagens realizadas com a boca, consumo de alimentos no interior do laboratório, derramamento ou espirro de material sobre a pele, membranas ou ferimentos desprotegidos e agulhas. A contaminação por meio de aerossóis estava associada a alças de inoculação (durante a flambagem da alça), derramamentos em contadores de laboratório, expulsão de jatos de seringas e centrifugação de líquidos infectados (Sewell, 1995).

Enquanto muitos laboratórios exigem o uso de luvas apenas para a realização de flebotomias, a OSHA insiste em recomendar que é preciso usar luvas na prática rotineira como barreira de proteção, em especial quando o prestador de assistência de saúde apresenta ferimentos ou outros cortes abertos na pele, quando o funcionário prevê a possibilidade de contaminação, ao realizar punções na pele ou durante o treinamento de flebotomia (correspondência da OSHA, 1991). Todos os demais procedimentos de acesso de flebotomia podem requerer o uso de luvas, de acordo com a política local. Os funcionários devem lavar as mãos após a remoção das luvas, após o contato com sangue ou líquidos corporais ou entre o contato com os pacientes. As luvas não devem ser lavadas e reutilizadas, uma vez que os microrganismos que aderem às luvas são difíceis de remover (Doebbeling, 1988). Máscaras, óculos de proteção ou protetores da face devem ser utilizados para evitar a exposição a espirros de secreções na boca, nos olhos ou no nariz. Todos os equipamentos de proteção apresentam o potencial de entrar em contato com material infectado, inclusive os jalecos de uso laboratorial, e por isso devem ser removidos antes de o funcionário deixar o laboratório e jamais devem ser levados para casa ou para fora do laboratório (como na hora do almoço ou nas pausas que o funcionário faz ao longo do dia). Os jalecos utilizados no laboratório devem ser limpos no local ou manuseados profissionalmente. Comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou tocar lentes de contato são práticas proibidas nas áreas de trabalho do laboratório. É útil que todos os funcionários saibam que lugares (escritórios, salas de reunião, áreas de descanso) e quais equipamentos (telefones, teclados, copiadoras etc.) são considerados áreas de trabalho, visto que podem estar potencialmente contaminados.

A Tabela 1.16 destaca alguns dos materiais que podem ser utilizados para descontaminação. Uma solução a 10% (volume/volume com água de torneira, preparada diariamente) de alvejante comum de uso doméstico é um desinfetante muito eficaz e econômico, inativando o vírus da hepatite B (HBV) em 10 minutos e o HIV em 2 minutos (CLSI M29-A3, 2005). A pré-lavagem remove concentrações significativas de proteínas, sendo essa remoção necessária antes da realização da descontaminação propriamente dita. Além disso, todas as superfícies do laboratório devem ser constituídas de material não poroso, que pode ser limpo e descontaminado de modo fácil.

Estima-se que cerca de 600.000 a 800.000 lesões causadas por agulhas e outras lesões percutâneas ocorram a cada ano (Bachman, 2003). A OSHA fez uma revisão dos padrões de patógenos transmitidos pelo sangue para refletir a necessidade de que os prestadores de assistência de saúde (trabalhando em laboratórios) avaliem e usem dispositivos de segurança médica que proporcionem uma barreira entre o usuários e a agulha contaminada. O Needlestick Safety and Prevention Act, de 2000 (Pub. L. 106-430, 2000), revisa os padrões de patógenos de transmissão sanguínea (registro federal 29CFR 1910.1030, 1992), e solicita aos empregadores que identifiquem, avaliem e implementem dispositivos pontiagudos de uso médico mais seguros. Também proíbe a remoção de agulhas diretamente do suporte do tubo de coleta de sangue após a punção venosa, além de solicitar a manutenção de um registro de acidentes causados por dispositivos pontiagudos. A Tabela 1.17 fornece ao prestador de assistência à saúde informações referentes a lesões por picada de agulhas de seringas.

Riscos químicos

A OSHA constatou que existem mais de 32 milhões de trabalhadores expostos a 575.000 riscos químicos em potencial no ambiente de trabalho ao redor do mundo (OSHA, 1994; registro federal 29CFR 1910.1030, 1983). Estima-se que 40.000 a 50.000 operários de indústrias e 38.000 operários não industriais sofrem doenças relacionadas à exposição química a cada ano. Outros 14.000 trabalhadores não industriais sofrem lesões, e o número de ocorrências fatais é de 102 casos. A taxa de doenças crônicas relacionadas a agentes químicos é de cerca de 17.000, com mais de 25.000 casos de câncer e quase 13.000 mortes por câncer anualmente. Para minimizar a incidência de doenças e lesões ocupacionais associadas à exposição química no local de trabalho, a OSHA publicou o "Padrão de Informação sobre Riscos" (registro federal 29CFR 1910.1200, 1983) e o "Plano de Higiene Química" (registro federal 29CFR 1910.1450, 1993), solicitando que os fabricantes de produtos químicos avaliem os riscos associados aos agentes químicos que produzem e desenvolvam programas de informação para seus funcionários e demais usuários que se expõem aos riscos químicos (Tab. 1.18). Tais padrões criados pelo OSHA baseiam-se na premissa de que os trabalhadores têm o direito de saber quais são os riscos que estão correndo quando potencialmente se expõem aos agentes químicos, bem como quais são as medidas de proteção que seus empregadores devem adotar para minimizar essa exposição. Muitos estados também têm desenvolvido diretrizes e regulamentações individuais determinando que os empregadores desenvolvam e

Tabela 1.16 Agentes de descontaminação comuns

Calor (250°C por 15 minutos)
Óxido de etileno (450–500 mg/L a 55–60 °C)
Glutaraldeído a 2%
Peróxido de hidrogênio a 10%
Formalina a 10%
Hipoclorito a 5,25% (alvejante a 10%)
Formaldeído
Detergentes
Fenóis
Radiação ultravioleta
Radiação ionizante
Foto-oxidação

Tabela 1.17 Risco de infecção: informações que os prestadores de assistência à saúde devem saber

O risco de infecção depende:	Do patógeno envolvido Do tipo de exposição Do volume de sangue envolvido Da quantidade de vírus no sangue ao qual se foi exposto
Diante da exposição ao sangue, deve-se imediatamente:	Lavar o local com água e sabão Enxaguar abundantemente o nariz, a boca ou a pele com água Lavar os olhos com água limpa, solução salina ou soluções de lavagem estéreis
Qual é o risco após a exposição, em caso de:	Estar vacinado contra a hepatite B (HBV): não há riscos; indivíduos não vacinados possuem um fator de risco de 6 a 30% Exposição ao sangue contaminado com hepatite C (HCV): o risco é de 1,8% Exposição à agulha/cortes com HIV 0,3%. Exposição de olhos, nariz ou boca ao HIV: 0,1% Exposição da pele não intacta ao HIV: 0,1%; pele intacta: não há risco.
Tratamento:	HBV: todos os prestadores de assistência à saúde devem receber vacina HCV: não há nenhuma vacina disponível nem tratamento para prevenir a infecção HIV: não há vacina disponível. Há fármacos antivirais disponíveis, caso seja apropriado utilizá-los. O tratamento pós-exposição (se recomendado) deve ter início dentro de 24 horas e antes de 7 dias

Adaptado de *Exposure to blood*. CDC, Julho, 2003.

executem programas de informação sobre segurança e agentes químicos tóxicos destinados a seus trabalhadores, que sejam revistos com todos eles anualmente (p. ex., a *Right-to-Know Law*, no estado de Nova York [Cap. 551, Art. 48, 12 NYCRR Parte 820]).

Riscos ergonômicos

A OSHA apresentou suas diretrizes (registro federal 54, 29CFR 1910, 1989) para tratar dos riscos ergonômicos no ambiente de trabalho e auxiliar os empregadores no desenvolvimento de um programa de prevenção a problemas associados ao trabalho. Os distúrbios traumáticos cumulativos constituem um grupo de lesões envolvendo os sistemas musculoesquelético e/ou nervoso em resposta à realização de movimentos repetitivos, como torções, flexões, elevações ou à permanência prolongada em postura estática (Riggle, 1991). Essas lesões podem surgir a partir de fatores ambientais, tais como ações

Tabela 1.18 Plano de informação sobre riscos químicos

1. Programa de informação sobre riscos escrito
2. Manter um inventário de todos os agentes químicos, com os respectivos nomes químico e popular, caso seja apropriado
3. O fabricante deve acessar e fornecer informações sobre riscos químicos ou físicos (inflamabilidade, explosivos, aerossóis, ponto de fulgor etc.)
4. Os empregadores devem ter Fichas de Informação de Segurança de Materiais (MSDS, *Material Safety Data Sheets*)
5. As MSDS devem listar todos os componentes de uma substância com concentração superior a 1%, exceto os carcinógenos conhecidos, que devem constar quando sua concentração exceder 0,1%
6. Os empregadores devem possibilitar aos funcionários o acesso aos MSDS, mediante solicitação
7. Os empregadores devem garantir que os rótulos não estejam desfigurados e que alertas adequados sejam colocados nos locais devidos
8. Os empregadores devem fornecer informação e treinamento ("direito de saber")
9. Devem constar o limite de exposição permitido pela OSHA, o limiar ou outros valores limitantes de exposição
10. Deve ser designado um ou mais responsáveis pelo programa

constantes ou excessivamente repetitivas, pressão mecânica, vibrações ou forças compressivas sobre braços, mãos, pulsos, pescoço ou costas. O erro humano também pode ser um dos fatores causadores, quando o indivíduo ultrapassa muito além os seus limites ou quando tais limites são estabelecidos em um patamar muito elevado.

Entre os funcionários de um laboratório, os distúrbios traumáticos cumulativos em geral estão associados a movimentos repetitivos de pipetagem e uso de teclados ou descanso de punho/braços sobre superfícies pontiagudas, tais como o contador de laboratório. Essas ações podem levar à síndrome do túnel do carpo (compressão e aprisionamento do nervo desde o punho até a mão), à tendinite (inflamação do tendão) ou à tenossinovite (inflamação ou lesão da bainha sinovial) (Gile, 1994). Consciência e prevenção são elementos-chave na supervisão desses distúrbios. A prática do trabalho e os controles de engenharia, além da realização de vários exercícios com as mãos, os braços, as pernas, as costas e o pescoço podem reduzir a ocorrência desses problemas (Prinz-Lubbert, 1996). O custo para implementação de programas que ajudem os trabalhadores a compreender e evitar os riscos ergonômicos pode ser justificado em termos financeiros. Lesões nas costas constituem a segunda causa mais comum de abstenção de funcionários ao trabalho, seguido do resfriado comum, e pode significar a seus empregadores um gasto de mais de 16.000 dólares por episódio (Printz-Lubbert, 1996).

Referências bibliográficas

Ali M, Brookson S, Bruce A, et al: Managing for Excellence. London, DK Publishing, 2001, pp 86–149.

Bachman A: Evaluation of safer needles. Adv for Admin Lab 2003; 12(10):22–24.

Berte LM: Patient safety: getting there from here – quality management is the best patient safety program. Clin Leadersh Manag Rev 2004; 18(6):311–315.

Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, et al: Errors in laboratory medicine. Clin Chem 2002; 48:691–698.

Uma revisão da literatura sobre erros laboratoriais, incluindo uma análise de tipo e/ou volume de erros pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, bem como erros de transfusão.

Brue G: Six Sigma for Managers. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 1–50.

CareerTrack Seminars: The One-Minute Manager. Boulder, Blanchard Training & Development, 1988, pp 11–13.

Centers for Disease Control: Recommendations and reports: Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health care and public-safety workers. MMWR 1989; 38(No. S-6).

CLSI: Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline, 3rd ed. CLSI document M29-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

Deming EW: Out of Crisis. Cambridge, MA, MIT, Center for Advanced Engineering Study, 1986.

Doebbeling BN, Pfaller MA, Houston AK, Wenzel RP: Removal of nosocomial pathogens from the contaminated glove. Ann Intern Med 1988; 109:394.

Federal Register, 29CFR 1910.1200: Hazard Communication Standard, 1983.

Federal Register 54, 29CFR 1910: Ergonomic Safety and Health Program Management Guidelines, 1989.

Federal Register 55, 42CFR 493: Clinical Laboratory Improvement Act, 1990.

Federal Register 56, 29CFR 1910.1030: Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens, 1992.

Federal Register 57, 42CFR 493: Clinical Laboratory Improvement Act, 1992.

Federal Register 55, 29CFR 1910.1450: Occupational Exposure to Hazardous Chemicals in Laboratories, 1993.

Garber C: Six Sigma, its role in the clinical laboratory. Clin Lab News April 2004; 10–14.

Garner JS, Simmons BP: Guidelines for isolation precautions in hospitals. Infect Control 1983; 4:245.

Gile TJ: Ergonomics for the laboratory. CLMR 1994; 8(1):5–18.

Griffin RW: Management, 2nd ed. Boston, Houghton Mifflin Co., 1987, pp 5–69.

Institute of Medicine (IOM): Medicare Laboratory Payment Policy. National Academy of Sciences, 2000, pp 1–57.

Juran J: Juran on Planning for Quality. New York City, The Free Press, 1988.

Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS (eds): To Err is Human. Building a Safer Health System. Committee on Quality of Health Care in America. Institute of Medicine. Washington DC, National Academy Press, 1999.

Kurec AS: Staffing and scheduling of laboratory personnel. *In* Snyder JR, Wilkinson DS (eds): Management in Laboratory Medicine, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1998, pp 221–243.

Kurec AS: The role and function of the clinical laboratory. *In* Kurec AS, Schofield S, Watters MC (eds): The CLMA Guide to Managing a Clinical Laboratory, 3rd ed. Wayne, PA, CLMA, 2000, pp 1–20.

Kurec AS: Don't waste my time. A guide to common sense meetings. Clin Leadersh Manag Rev 2004a; 18:273–281.

Kurec AS: Employee selection. *In* Garza LS (ed): Clinical Laboratory Management. Washington, DC, ASM Press, 2004b, pp 277–290.

Lifshitz MS, De Cresce RP: Strategic planning for automation. *In* Kost GJ (ed): Clinical Automation, Robotics, and Optimization. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1996, pp 471–496.

Uma visão geral do processo de planejamento estratégico laboratorial, com ênfase especial sobre como é realizada a avaliação ambiental, como são definidos os objetivos e sobre como é feita a auditoria das operações e da tecnologia.

Mortland KK: Facility redesign for your future laboratory requirements. Clin Lab Manage Rev 1997; 11(3):145–152.

New York State Public Health Law, Chapter 551, Article 28 of the New York State Labor Laws, Part 820 Title 12 of the New York Codes, Rules and Regulations, Right-to-Know Law; 1987.

Nigon DL: Clinical Laboratory Management. New York. McGraw-Hill Companies, 2000.

Abrange os princípios fundamentais da supervisão laboratorial e fornece numerosos exemplos práticos e estudos de caso que ajudam a ilustrar os conceitos.

Occupational Safety and Health Administration Regulations CPL 2.244B, Glove Wearing, 1991.

Occupational Safety and Health Administration Regulations: Hazard Communication. 1994; 59:6126–6184.

Painter P: Laboratory Design Workshop, Clinical Laboratory Management Association Annual Meeting, 1993.

Prinz-Lubbert P, Giddens J: Working smarter with ergonomics. Adv Admin Lab 1996; 5:18–24.

Riggle M: Cumulative trauma in the workplace. Phys Ther Forum 1991; (April):11–12.

Sewell DL: Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microb Rev 1995; 8(3):389–405.

Silverstein MD: An Approach to Medical Errors and Patient Safety in Laboratory Sciences, A White Paper. Quality Institute Conference, Atlanta, April 13–15, 2003; pp 1–23.

Sliva C: Update 2003: FDA and CLIA. IND Roundtable 510(k) Workshop April 22, 2003.

Snyder J, Wilkinson DS: Management in Laboratory Medicine, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1998.

Referência abrangente que lida com todos os aspectos da supervisão laboratorial, incluindo liderança, supervisão de recursos humanos, marketing, segurança etc.

Sunyog M: Lean management and Six-Sigma yield big gains in hospital's immediate response laboratory. Clinical Leadership and Management Review 2004; 18:255–258.

Szumski R: Laboratory restructuring: the Calgary experience. Presentation: MDS Diagnostic Sector, 1999; 1–24.

Ward-Cook K, Chapman S: 2002 Wage and vacancy survey of Medical Laboratories. Lab Med 2003; 34(10):702–707.

Zeiger B, Jenkins E: Motoring for success at Henry Ford Health System: Implications for regionalization of lab services. CLMA Vantage Point 1997; 1:1–3.

CAPÍTULO 2

Otimização do fluxo de trabalho e do desempenho do laboratório

Mark S. Lifshitz MD, Robert P. De Cresce MD MBA, Irina Lutinger MPH DLM(ASCP)

Compreensão do fluxo de trabalho	14	Otimização do desempenho	21
Técnicas de coleta de dados	14	Referências bibliográficas	23
Análise do fluxo de trabalho	18		
Compreensão da tecnologia	19		

PONTOS-CHAVE

- Um processo de realização de testes requer a integração das etapas pré-analítica, analítica e pós-analítica.
- A compreensão do fluxo de trabalho é um pré-requisito fundamental para qualquer estratégia de otimização de desempenho.
- Várias técnicas devem ser utilizadas para coletar dados do fluxo de trabalho. Elas incluem: mapeamento de amostras e exames, análise do tubo, análise da estação de trabalho, entrevistas com a equipe e mapeamento das tarefas (processos).
- Embora a tecnologia seja um componente crítico em qualquer laboratório, ela é apenas uma ferramenta para se atingir um objetivo. A tecnologia em si não melhora o desempenho nem o fluxo de trabalho. O seu sucesso ou fracasso depende de como ela é implementada e se ela é realmente necessária.
- A consolidação, a padronização e a integração são estratégias fundamentais que podem otimizar o fluxo de trabalho. O gerenciamento da utilização do exame também pode mudar as necessidades operacionais globais e os padrões do fluxo de trabalho.

O laboratório clínico é uma operação complexa que deve integrar facilmente as três fases do processo de realização de testes: pré-análise, análise e pós-análise. A pré-análise refere-se a todas as atividades que são realizadas antes do exame (p. ex., solicitação do exame e coleta de amostra). O estágio de análise inclui as atividades laboratoriais que de fato produzem um resultado (p. ex., processar uma amostra em um analisador automatizado). A pós-análise inclui a liberação do laudo ao paciente e a interpretação do resultado. Coletivamente, todas as etapas laboratoriais inter-relacionadas no processo de testes descrevem seu fluxo de trabalho. Por sua vez, ele ocorre dentro de um *design* global de uma operação laboratorial descrita em suas políticas e procedimentos.

As etapas do processo de realização de testes, em geral, podem ser categorizadas de acordo com a fase de testes, papel (responsabilidade) e tecnologia laboratorial (Fig. 2.1). Observe que o processo de testes e o agrupamento de etapas variam um pouco de um serviço a outro. Dependendo do modelo do serviço laboratorial e da tecnologia utilizada, algumas etapas podem ser classificadas em uma categoria ou outra. Por exemplo, a centrifugação pode ser realizada em um consultório médico (pré-análise) ou no laboratório como parte de uma célula de trabalho totalmente automatizada (análise). Dependendo da tecnologia selecionada, um laboratório pode automatizar algumas ou muitas das etapas identificadas na Figura 2.1. A tecnologia de informação é uma "cola" essencial que une essas etapas. Uma discussão mais detalhada de cada fase de testes é apresentada nos Capítulos 3 a 8. Este capítulo explorará a inter-relação entre o fluxo de trabalho, a tecnologia e o desempenho no laboratório.

Compreensão do fluxo de trabalho

Para compreender por completo o fluxo de trabalho de um laboratório, todas as fases do processo de realização de testes devem ser auditadas. Somente então é possível determinar como otimizar o desempenho e até qual grau de soluções tecnológicas e não tecnológicas é necessário. A Tabela 2.1 apresenta algumas das questões que devem ser consideradas.

Os dados são de importância fundamental em qualquer análise de fluxo de trabalho. Embora seja bem fácil produzir dados laboratoriais, uma vez que eles são prontamente disponibilizados pelos analisadores automatizados e sistemas de informação, podem estar incompletos, inválidos ou podem não estar apresentados no formato requerido. Como os dados laboratoriais têm um papel fundamental na tomada de decisão (p. ex., determinação de qual analisador adquirir), eles têm de ser acurados. Caso contrário, tomadas de decisões errôneas podem ter um impacto negativo sobre as operações. É preciso compreender como os dados são coletados por cada um dos sistemas e saber se eles são válidos. Por exemplo, as estatísticas de um exame obtidas por meio de um analisador fornecem informações sobre quantos exames são liberados para os pacientes ou sobre o total de exames que foram realizados (com controle de qualidade, repetições etc.)? Os constituintes do painel são contados individualmente, apenas o painel é contado ou ambos são contados? Os horários de "coleta" nos relatórios que mensuram "coleta até o resultado" são precisos? Ou as amostras são marcadas como "coletadas" antes de a coleta realmente ser realizada, fazendo, em consequência, que o período entre a coleta e o resultado pareça mais longo que o real? Por fim, não existe substituto para a revisão cuidadosa dos dados para determinar se eles fazem sentido. Algumas vezes, isso requer a verificação manual de dados coletados de forma eletrônica ou a observação direta de uma área de trabalho. Por exemplo, pode ser necessário observar quando as amostras chegam ao laboratório para determinar qual o tempo decorrido até que um empregado registre o horário de recepção no computador. Ao fazer isso, pode-se determinar a acurácia do horário de recepção da amostra.

Técnicas de coleta de dados

Existem muitos tipos de dados que podem ser utilizados para a avaliação do fluxo de trabalho. Embora algumas técnicas fundamentais de análise de dados sejam descritas a seguir, elas podem ter de ser suplementadas por coletas adicionais de dados para se analisar características específicas de uma operação laboratorial. Sempre é útil (alguns diriam imperativo) certificar-se de que os dados coletados reflitam a experiência real do laboratório e não anomalias criadas por padrões incomuns do fluxo de trabalho ou dos programas ou definições do sistema de informação laboratorial (SIL).

Mapeamento da amostra e do exame

Uma técnica fundamental de coleta de dados é analisar a distribuição de amostras e exames ao longo do tempo (Figura 2.2). Dependendo do que for mapeado, o intervalo de tempo pode ser de um dia (p. ex., incrementos de horas para exames solicitados com frequência, como os de bioquímica) ou de uma semana (p. ex., incrementos de dias para exames processados algumas vezes por semana). O objetivo é identificar padrões globais de carga de trabalho para avaliar se os recursos são adequados às necessidades e se o tempo de resposta ou

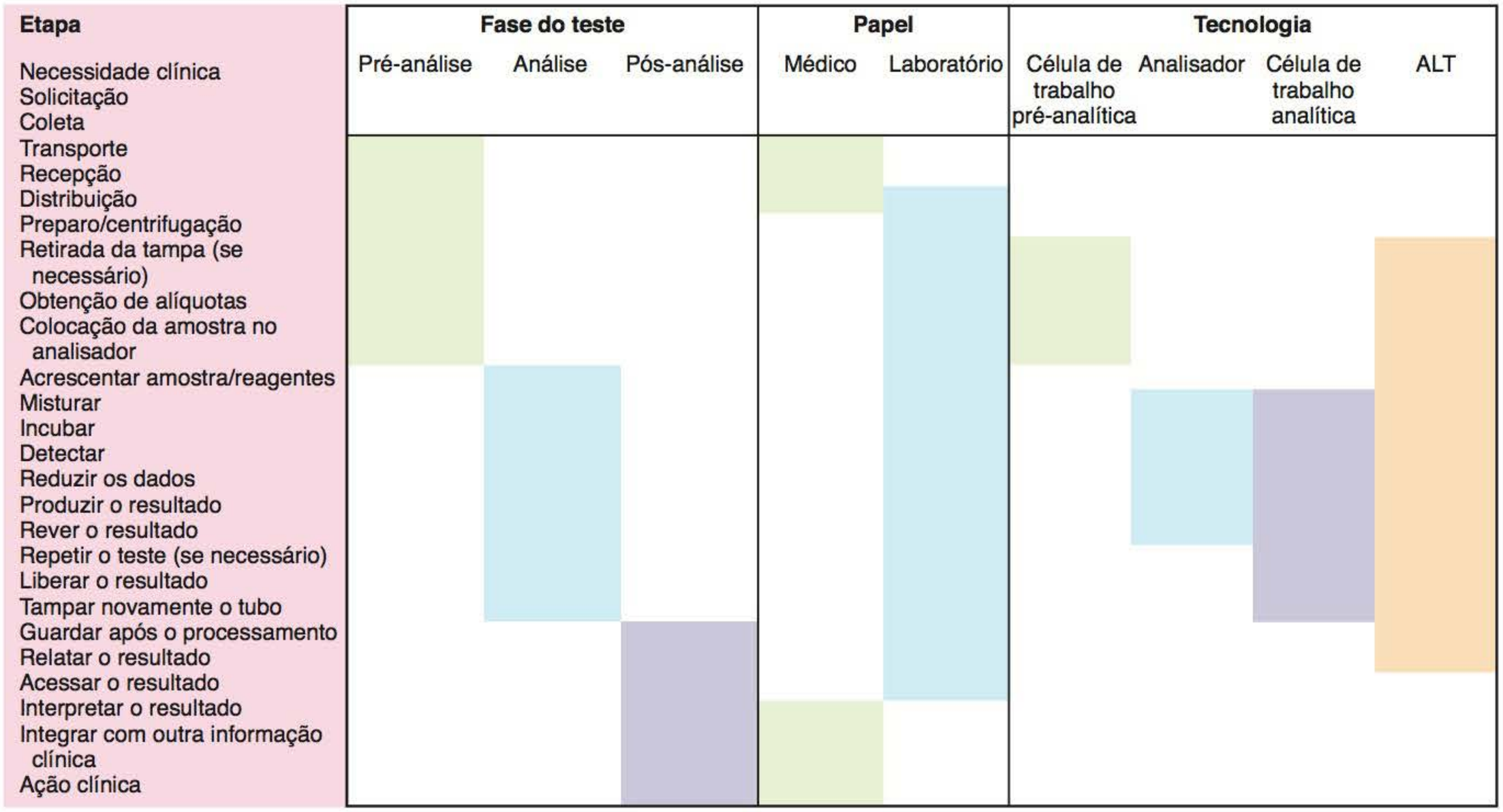


Figura 2.1 Processo de teste laboratorial. Notar que as etapas podem ser classificadas de acordo com a fase do teste, o papel (responsabilidade) ou a tecnologia laboratorial, conforme indicado pelo sombreado. ALT = automação laboratorial total.

Tabela 2.1 Questões a considerar em operações de auditoria

Solicitação de exame	Onde as solicitações são colocadas – no laboratório, na unidade de paciente ou no consultório? As requisições de pacientes internados e de pacientes ambulatoriais são manipuladas de forma diferente? O formato da solicitação é em papel ou eletrônico?
Coleta da amostra	Quem coleta as amostras – o laboratório ou o médico? Quando as amostras são obtidas – a qualquer hora ou só de manhã? As amostras são identificadas com código de barras no local de coleta ou no laboratório? Como as identificações são geradas? Há um sistema positivo de identificação de pacientes? A identificação contém toda a informação necessária para processar a amostra?
Transporte	Como as amostras são levadas – por mensageiro, meio de transmissão automática ou uma combinação de ambos? Todos os laboratórios participam? Todas as áreas de cuidados com os pacientes são servidas? Como as estatísticas são manipuladas? Qual é o impacto das estatísticas? Há um sistema separado para o setor de emergência e as unidades de terapia intensiva?
Recepção da amostra	Há uma área central de recepção? Como as amostras são distribuídas para cada laboratório? O planejamento físico das instalações proporciona um fluxo eficiente de amostras? Como são distinguidas as amostras de estatística das de rotina? Como amostras problemáticas são manipuladas? As amostras são distribuídas por estação de trabalho ou departamento?
Processamento da amostra	As amostras são centrifugadas centralmente ou em locais distribuídos? As estatísticas são manipuladas de forma diferente? As amostras são divididas em alíquotas? Caso afirmativo, onde? É separada uma amostra para cada estação de trabalho?
Testes	Quantas estações de trabalho são utilizadas? De que forma a capacidade está relacionada às necessidades? Como as amostras são armazenadas e recuperadas? Por quanto tempo as amostras são mantidas? Quando e por que as amostras são repetidas? Os critérios para repetição de amostras são apropriados?
Relatório	Como os resultados são reportados? Por meio eletrônico? Impressão remota? Como a estatística e os valores críticos são registrados? E os critérios para esse registro, são apropriados? Quantas chamadas de solicitação de relatórios o laboratório recebe e por quê? Como os testes rápidos são reportados?

outros indicadores de desempenho podem ser melhorados. É importante que a carga de trabalho mensurada reflita a experiência real. Por exemplo, se os flebotomistas marcam remotamente as amostras como "recebidas" ou se o laboratório na realidade solicita os exames no SIL, a distribuição mensurada da carga de trabalho pode não refletir com exatidão os processos subjacentes. Como parte do exercício, é importante também mapear amostras de rotina *versus* amostras de emergência e locais que podem ter necessidades especiais (p. ex., departamento de emergência). Além do mapeamento da amostra, devem ser mapeados exames-chave e o número ou "densidade" de exames por amostra. Isso é especialmente interessante no setor de bioquímica. Amostras de pacientes ambulatoriais em geral apresentam uma densidade maior de exames que as de pacientes internados, de modo que números iguais de amostras de pacientes ambulatoriais e internados podem estar associados a diferentes cargas de trabalho. Na bioquímica automatizada, o mapeamento de amostra reflete com mais fidelidade as necessidades de pessoal porque grande parte do trabalho está mais associada à manipulação e processamento de tubos do que à realização do exame propriamente dito. Em contraste, o mapeamento de exame reflete com mais fidelidade as necessidades de instrumentos, isto é, o ritmo de trabalho necessário para completar a carga de trabalho dentro de um período de tempo adequado. Ao mapear amostras e exames, relacionando-os ao tempo de resposta e à equipe, um laboratório pode identificar obstáculos de produção e alterar o fluxo de trabalho para obter um melhor resultado. Com frequência, os laboratórios descobrem que os atrasos estão mais relacionados a padrões de fluxo de trabalho não adequados às capacidades dos instrumentos do que a questões relativas a instrumentos.

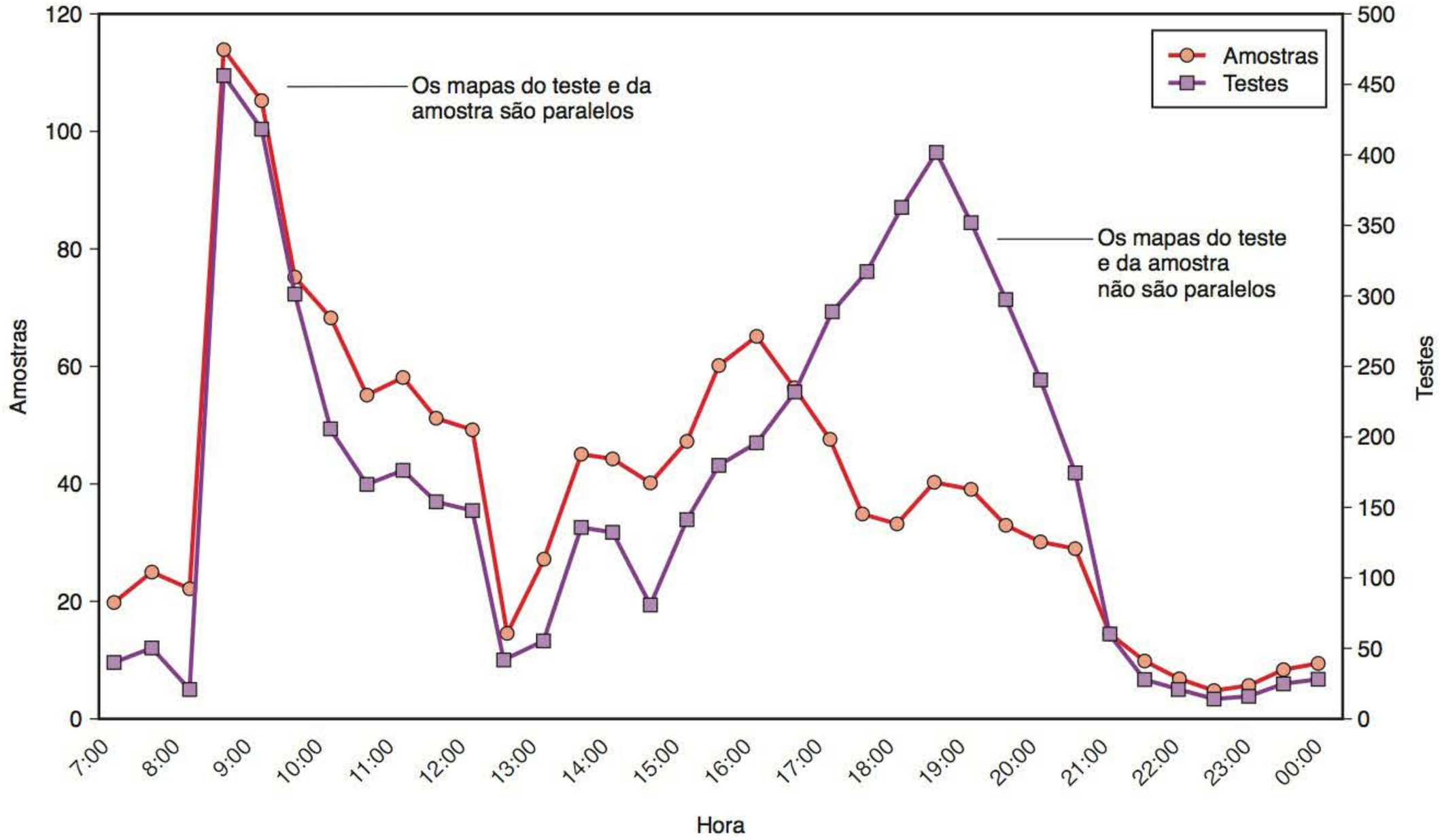


Figura 2.2 Mapeamento de amostras e do teste. Observar que o volume máximo matinal se deve aos pacientes internados, e a densidade aproximada é de 4 testes por amostra. O pico noturno deve-se em grande parte aos pacientes ambulatoriais e a densidade é um pouco maior, de cerca de 10 testes por amostra. A densidade dos testes flutua durante o dia, por isso tanto a amostra como o mapeamento do teste são necessários para avaliar com acurácia a carga de trabalho.

Análise em tubo

Parte do trabalho diário em um laboratório está relacionada ao processamento de tubos de coleta ou recipientes. Esse trabalho com tubos inclui selecionar e centrifugar, aliquotar, colocar na estante, retirar da estante, colocar e remover amostras de um analisador, recuperar tubos para exames adicionais, realizar diluições manuais ou repetições (dependendo do instrumento) e armazenar tubos. Embora o tempo para realizar uma tarefa com um tubo possa parecer insignificante, ele tem de ser repetido muitas vezes por dia, e isso pode aumentar a quantidade de tempo substancial. Por exemplo, com uma média de 10 segundos por tubo, serão necessárias 3,3 horas para selecionar 1.200 tubos por dia. Embora a automação comumente possa reduzir esse trabalho, redesenhar o fluxo de trabalho pode ser uma alternativa mais eficiente e menos onerosa. Quando um laboratório reduz o número de tubos e/ou o número de tarefas associado a cada tubo, o trabalho com tubos é reduzido, causando um impacto positivo sobre o fluxo de trabalho e as necessidades do pessoal. Reduzir o trabalho com tubos é um dos objetivos principais da consolidação de exames bioquímicos e de imunodiagnóstico em um único analisador ou célula de trabalho. Apesar de o mapeamento de amostra indicar quantos recipientes foram recebidos em um intervalo de tempo especificado, a análise de tubo ajuda a analisar com mais profundidade quantas tarefas adicionais "relacionadas ao tubo" devem ser realizadas. Isso inclui a quantidade de recipientes além dos tubos (p. ex., materiais coletados por meio de punção de polpa digital que podem exigir processamento especial ou aliquotagem) e o número de repetições de exames devidas à sinalização do instrumento e/ou normativas do laboratório (Tab. 2.2).

Tabela 2.2 Análise química em tubo

	Analisador A	**Analisador B**
Total de tubos analisados	500	500
Erro mecânico	13	15
Diluição	7	20
Coágulo/baixo volume	20	30
Total de corridas repetidas relacionadas ao instrumento	40 (32% do total de corridas repetidas)	65 (65% do total de corridas repetidas)
Verificação Δ	62	21
Valor de alerta	23	14
Total de corridas repetidas relacionadas aos critérios laboratoriais	85 (68% do total de corridas repetidas)	35 (35% do total de corridas repetidas)
Total de corridas repetidas	125	100
% de corridas repetidas	25%	20%

As "repetições" das análises químicas são causadas por fatores diferentes e podem ser fonte de perda de tempo para o técnico e/ou de atraso dos tempos de resposta. A maioria das corridas repetidas no Analisador A está relacionada aos limites excessivamente estreitos das verificações Δ, bem como a valores de alerta que sinalizam resultados de testes numerosos demais para serem revisados e repetidos pelos técnico. A maioria das corridas repetidas no Analisador B está relacionada a sinalizações dos instrumentos que se devem a uma estreita faixa linear para muitos métodos, bem como ao requisito de um grande volume de amostra por teste. Uma solução não tecnológica (i. e., alteração dos critérios laboratoriais para repetições/revisões com o intuito de diminuir o número de tubos sinalizados para repetição da corrida) beneficia o Analisador A; no entanto, apenas uma solução tecnológica (i. e., um novo analisador) pode diminuir o número de repetições de corrida no Analisador B.

Análise em estação de trabalho

Um laboratório típico é dividido em estações para organizar o trabalho e o pessoal. Algumas estações de trabalho consistem em uma variedade de tarefas ou exames que são agrupados com o objetivo de organizar o trabalho para uma ou mais equipes. Por exemplo, todos o exames bioquímicos manuais ou semiautomatizados podem ser agrupados em uma estação de trabalho, embora os testes possam realmente ser realizados em diferentes locais ou equipamentos no laboratório. Em geral, uma estação de trabalho é um local (p. ex., um analisador totalmente automatizado ou um grupo de analisadores como os contadores de células sanguíneas ou uma célula de trabalho de bioquímica). Independentemente de como um laboratório é organizado, é importante saber onde, quando e como o trabalho é realizado. Esse é o objetivo de uma análise de estação de trabalho.

Auditoria de instrumentos. Um componente fundamental de qualquer estação de trabalho são os equipamentos. Ao realizar uma auditoria de instrumentos (Tabela 2.3), pode-se compreender melhor como cada analisador é utilizado, seus custos associados e quais são as possíveis oportunidades existentes para melhorar o desempenho. As características de operação de cada instrumento devem ser detalhadas como parte desse processo. Os exemplos incluem o número máximo de amostras que podem ser processadas por hora, o número de amostras que podem ser carregadas ao mesmo tempo e o número de recipientes de reagentes e ensaios que podem ser armazenados prontos. A capacidade de processamento (exames/hora) também deve ser estudada pela realização de estudos de *timing* e revisão de vários relatórios estatísticos que podem ser extraídos do instrumento e do SIL. A maioria dos analisadores bioquímicos trata-se de sistemas baseados no exame, isto é, eles realizam um número específico de exames por hora independentemente de quantos exames foram solicitados em cada amostra. Por outro lado, alguns desses sistemas são afetados pelo *test mix* (p. ex., a proporção relativa de eletrólitos, bioquímica geral e imunoensaios), e essa é a principal razão pela qual o processamento real de um laboratório pode ser mais baixo do que o anunciado pelo fabricante. Este pode supor um *test mix* ideal que não pode ser obtido por um determinado laboratório. É importante saber como o *test mix* afeta a capacidade de processamento de um analisador e se existe uma maneira de redistribuir o trabalho para aumentar o processamento. Um instrumento considerado adequado ao ser adquirido para o *test mix* e o volume de um laboratório pode se tornar inadequado por causa de uma alteração no *test mix*. Por fim, considerações relativas ao trabalho não devem ser ignoradas – o instrumento deve ser sempre supervisionado ao ser utilizado ou ele possui capacidade de funcionar sem supervisão? Essa informação pode ser muito útil na identificação de obstáculos do processamento e pode auxiliar na reformulação do fluxo de trabalho.

Exames realizados. Uma revisão cuidadosa de exames realizados pelo laboratório deve ser feita durante a análise da estação de trabalho. Os exames realizados são adequados para o serviço considerando-se o volume e a frequência de análise? O fato de um laboratório poder realizar um exame não significa que ele deva fazê-lo. Por exemplo, se um exame for realizado apenas uma vez por semana e exigir consideravelmente o uso de equipamento, treinamento ou trabalho, pode ser mais sensato enviá-lo para um laboratório de referência onde ele é realizado com mais frequência. Algumas vezes, a melhor maneira de otimizar o tempo de resposta e reduzir o custo de um exame é não realizá-lo. Infelizmente, essa opção pode ser ignorada com facilidade quando a atenção é focada apenas sobre como melhorar a maneira como os exames existentes são realizados em vez de analisar como fornecer informações laboratoriais aos médicos em um período de tempo mais adequado.

Modo de processamento e equilíbrio da carga. Eles podem afetar tanto o custo quanto o cronograma de testes. As amostras podem ser processadas em lote ou podem ser processadas de forma contínua na medida em que elas chegam ao laboratório. Quando agrupadas em lotes, as amostras são processadas em intervalos específicos (p. ex., uma vez por turno, uma vez por dia, uma vez a cada dois dias) ou sempre que o lote atingir um determinado tamanho (p. ex., a cada 20 amostras). O processamento do lote é menos oneroso que o processamento contínuo porque os custos do preparo (controle de qualidade, trabalho etc.) são dispersos entre várias amostras (ver Tab. 12.2). No entanto, o processamento de lote retarda a liberação de resultados. Algumas vezes, o processamento de lote é uma limitação apresentada pelo equipamento utilizado. Um analisador de lote não pode ser interrompido durante a operação e, por essa razão, uma amostra que acabou de chegar não pode ser processada imediatamente se o equipamento já estiver sendo utilizado. Os analisadores mais comuns disponíveis para exames de bioquímica e imunoensaios são analisadores de acesso aleatório que processam amostras de modo contínuo. Esses analisadores podem acessar amostras e reagentes de modo aleatório e podem acomodar uma amostra para ser analisada com emergência a qualquer momento. As características desses analisadores são abordadas de modo mais amplo no Capítulo 5. O processamento contínuo é facilitado pelo equilíbrio de carga, uma técnica de distribuição de testes ao longo de um período mais extenso para se adequar melhor ao processamento do equipamento. Por exemplo, o processamento de exames ambulatoriais, os quais não exigem um tempo de resposta rápido, pode ser sequenciado no fluxo de trabalho fora do horário comercial. Isso melhora a eficiência dos testes, reduz o trabalho de testes individuais e reduz os requerimentos do processamento (e o custo financeiro) dos equipamentos. A possibilidade de realização do equilíbrio de carga somente pode ser avaliada se forem realizados um mapeamento de teste e uma análise de tubo adequados.

Tabela 2.3 Auditoria dos instrumentos

Modelo do instrumento
Fornecedor
Data de aquisição
Método de aquisição
Comprado
Arrendado
Aluguel de reagente
Custo anual do serviço
Custo anual dos suprimentos
Reagentes
Controles, calibradores
Consumíveis
Volume total de testes por ano
Amostras de pacientes
Controles e calibradores
Opções de teste
Horas operacionais
Dias
Turnos
Número de equipes treinadas
Modo operacional
Lotes *versus* contínuo
Sistema primário *versus backup*

Entrevistas

A coleta de dados só é completa se a equipe for entrevistada. Esse exercício provê uma oportunidade para a equipe participar da análise do fluxo de trabalho e da melhoria do desempenho. Ele também identifica questões que não são tão aparentes a partir da coleta de dados isolada. Por exemplo, muitos hospitais exigem uma solicitação eletrônica das unidades de tratamento. Embora isso possa eliminar as solicitações em papel, membros da equipe do laboratório ainda podem ter de adicionar exames solicitados diretamente ao laboratório (ou adicionados de modo eletrônico), processar solicitações especiais e corrigir solicitações incorretas, identificar amostras inaceitáveis ou etiquetas de código de barra colocadas inadequadamente por funcionários que não pertencem ao laboratório durante a coleta de amostras. Esse trabalho residual pode não ser transparente porque é provável que não apareça nos relatórios, registros ou documentos impressos. Portanto, "solicitações eletrônicas" ainda podem estar associadas a um considerável trabalho manual no laboratório que somente pode ser identificado por meio de entrevistas.

As entrevistas são particularmente valiosas para se compreender o que ocorre fora do laboratório. Padrões ou hábitos de solicitação de exames podem ter um impacto significativo sobre a capacidade de um laboratório de suprir as necessidades médicas. Visitas às unidades de tratamento e discussões com as equipes de enfermagem podem identificar melhorias no pré-processamento, que custam pouco para serem implementadas e produzem uma economia considerável.

A alta precoce do paciente pode ser uma tarefa desafiadora para os hospitais que estão tentando diminuir o período de permanência. Uma compreensão total do processo de alta exige a intervenção de todos os funcionários envolvidos. Uma questão que algumas vezes emerge é o tempo de coleta de amostra de pacientes que estão dependendo de um resultado laboratorial para receber alta. Para evitar atrasos na liberação de resultados para a alta de pacientes, alguns serviços desenvolvem sistemas de "emergência" elaborados para coletar, identificar e processar essas amostras, e liberar resultados nos momentos mais movimentados

do dia – o início da manhã. Algumas vezes, uma tecnologia adequada (instrumento de emergência) ou nova (dispositivo para ser utilizado no local onde o paciente é atendido) é utilizada com esse propósito. No entanto, para garantir que os resultados estejam disponíveis no prontuário médico no início da manhã, as amostras laboratoriais de pacientes podem ser coletadas na noite anterior à alta. Portanto, nem todas as soluções exigem tecnologia. Uma associação cuidadosa de reestruturação do fluxo de trabalho e de tecnologia adequada usualmente é a abordagem correta e a solução mais econômica e eficaz.

Mapeamento de tarefa

Nenhum estudo de fluxo de trabalho estará completo sem o mapeamento das tarefas ou processos envolvidos na realização de um exame (Middleton, 1996). Uma revisão rigorosa detalhará cada etapa de manipulação de uma amostra, cada ponto de decisão e atividades redundantes. O mapeamento de tarefa pode ser aplicado a qualquer segmento de um fluxo de trabalho de um laboratório, seja ele técnico ou leigo. Um conhecimento total das tarefas usualmente exige entrevistas com o pessoal, como foi analisado acima. O mapeamento de tarefa deve ser uma atividade contínua e também deve ser realizado sempre que ocorrer a adição de uma estação de trabalho, de um exame, de novas tecnologias ou quando ocorrer qualquer alteração significativa no processo laboratorial. Ao implementar uma alteração, é importante evitar etapas desnecessárias ou adicionais que são adicionadas inadvertidamente em nome da "eficiência". O mapeamento de tarefa ajuda a identificar essas etapas. O mapeamento também ajuda a comparar processos antes e após alterações (Figs. 2.3 e 2.4).

Análise do fluxo de trabalho

A análise do fluxo de trabalho assimila todos os dados discutidos previamente e os transforma em informações úteis. Essa etapa pode ser realizada de forma manual ou, como será descrito a seguir, utilizando um *software* disponível no mercado para parte da análise. Uma análise global de uma estação de trabalho deve identificar obstáculos e áreas onde são necessárias melhorias.

Como isso é feito? A maneira mais fácil e que não requer suporte de computador é seguir o caminho traçado por uma amostra ou de um grupo de amostras durante todo o processo. Isso deve ser iniciado no local onde o paciente é atendido ou próximo a ele para ver como

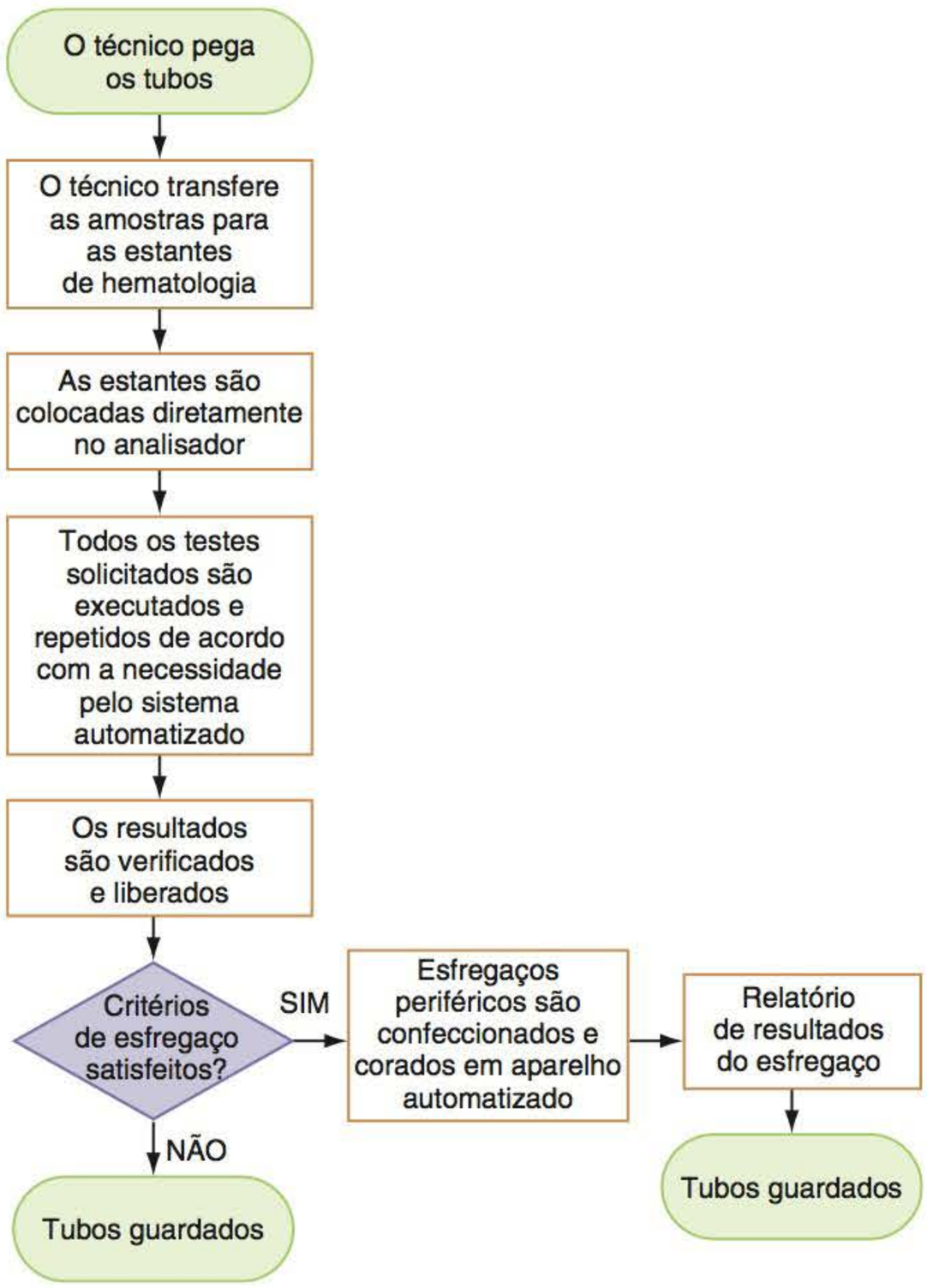


Figura 2.4 Mapeamento das tarefas: fluxo de trabalho aprimorado para a contagem celular em hematologia subsequente à implementação da célula de trabalho. Note a redução do número de etapas, em comparação ao observado na Figura 2.3.

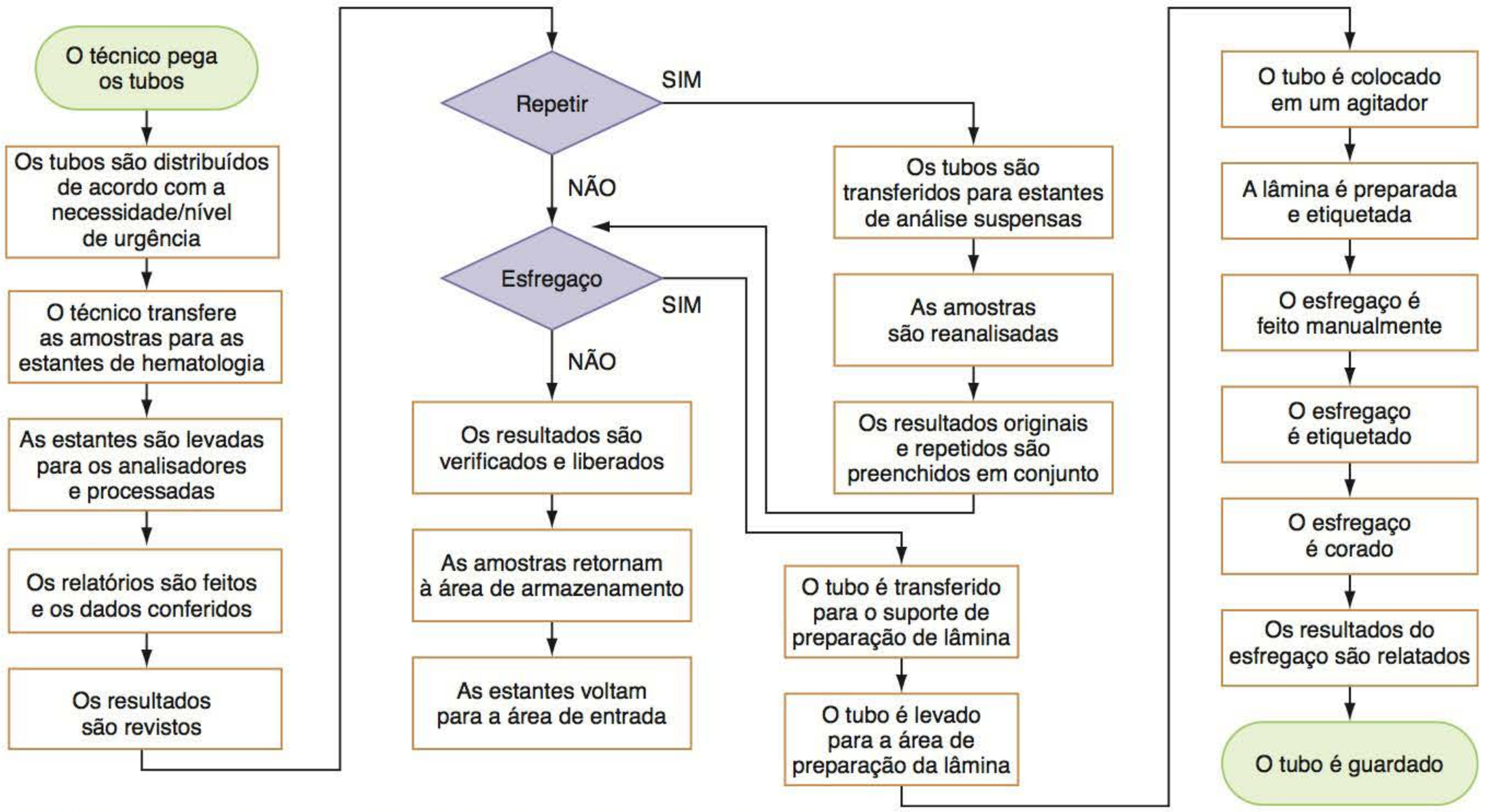


Figura 2.3 Mapeamento das tarefas: fluxo de trabalho original para contagem celular em hematologia.

os médicos solicitam exames e como se comportam desse ponto até o momento da coleta e envio de amostras ao laboratório. Um fluxograma deve ser criado para acompanhar a amostra desde a solicitação inicial até a sua chegada ao laboratório. Uma força-tarefa separada, em geral, é designada para a fase pré-laboratório porque comumente existem muitos departamentos e pessoal envolvidos. Com frequência, o laboratório não tem ou tem pouco controle sobre essa parte crítica do fluxo de trabalho, em especial quando as amostras são coletadas por pessoas que não são funcionárias do laboratório.

Em seguida, o trânsito da amostra no laboratório deve ser documentado, indicando as áreas onde o processamento do lote ocorre. Por exemplo, devem ser identificados os tempos mínimo e máximo de centrifugação para amostras adequadas (como aquelas que devem ser aliquotadas). Se forem necessários 10 minutos para carga e centrifugação das amostras, não significa que esse seja o tempo de resposta, porque uma fila de amostras pode se formar durante períodos de pico. Utilizando o mapeamento de chegada de amostra realizado na coleta de dados, um tempo de resposta pode ser designado por período do dia. Se isso for realizado de forma manual, o melhor é selecionar uma quantidade de horários principais e calcular a média, quando possível. Da mesma maneira, deve ser anotado se houve atraso no carregamento de amostras no analisador. Existem muitos outros exemplos de obstáculos físicos que devem ser identificados e quantificados. Embora nem sempre seja possível eliminar por completo os obstáculos, é possível diminuir o seu impacto por meio de novas tecnologias, modos alternativos de processamento (p. ex., acesso aleatório *versus* processamento em lote) e reestruturação do fluxo de trabalho.

Os obstáculos que não são físicos também devem ser identificados e quantificados. Um exemplo clássico é o modo de verificação de resultado. Resultados em lote para um tecnólogo revisar e aceitar é um tipo de obstáculo da mesma forma que é a espera necessária para que uma centrífuga processe uma amostra. Em contraste, a autoverificação do SIL (onde os resultados são liberados de forma automática baseados em critérios preestabelecidos) pode reduzir o tempo de resposta sem exigir uma reorganização importante do laboratório. Contudo, o grau com que a autoverificação melhora o fluxo de trabalho depende da maneira como ela é implementada e dos algoritmos definidos para qualificar um resultado. Por sua vez, isso pode depender do SIL utilizado. Essas questões são discutidas com mais detalhes no Capítulo 11.

Formulação do fluxo de trabalho

Embora as análises acima sejam críticas para se compreender o desenho do fluxo de trabalho atual e do fluxo de trabalho proposto, em geral elas fornecem um quadro um pouco estático, isto é, cada uma descreve um único elemento de dado e, com frequência, como ele se modifica ao longo do tempo. Contudo, na prática, o fluxo de trabalho é composto por muitas variáveis inter-relacionadas, e é difícil compreender (ou avaliar no laboratório) como uma alteração de uma variável afeta outra. Além disso, apesar de os estudos do fluxo de trabalho poderem ser muito benéficos, eles também fazem uso de recursos que nem todos os laboratórios possuem. Para enfrentar essa necessidade, o mercado de tecnologia desenvolveu simuladores de fluxo de trabalho. Utilizando *softwares* sofisticados de formulação de fluxo de trabalho, é possível analisar essas inter-relações complexas para prever melhor o resultado de um determinado desenho de fluxo de trabalho (Tab. 2.4). A formulação do fluxo de trabalho pode ajudar a identificar obstáculos e o impacto de alterações da equipe ou de diferentes configurações de equipamentos sobre o custo e o tempo de resposta. Ela também pode ser utilizada para compreender melhor como um determinado analisador responde a alterações no volume de exames e no *test mix*. Por exemplo, pode-se simular o impacto do aumento de volume de exames de rotina sobre um tempo de resposta de um instrumento para amostras de emergência (Mohammad, 2004). Entretanto, como em todas as análises de fluxo de trabalho, a formulação realizada pelo *software* deve se basear em técnicas acuradas de coleta de dados.

Como a maioria dos programas de simulação são produtos patenteados, eles podem não permitir a formulação de todos os instrumentos disponíveis. Apesar de isso ser uma desvantagem, a simulação do fluxo de trabalho ainda é uma ferramenta poderosa, e podem ser extraídas inferências sobre o processamento e os testes mais eficazes,

Tabela 2.4 Variáveis interrelacionadas simuladas por modelos de *software* de fluxo de trabalho

Configuração do equipamento
Projeto das instalações
Trabalho por turno e dia
Throughput
Manutenção de rotina
Inatividade
Volume de amostra (distribuição e pico de demanda)
Tipo de frasco de amostra
Política de revisão e taxas de repetição de corrida
Tamanho do lote

independentemente do instrumento modelo utilizado. Mais importante, esses programas indicam de imediato as deficiências das operações em curso de um laboratório e podem apontar para áreas específicas onde podem ser realizadas as maiores melhorias.

Compreensão da tecnologia

Nenhuma discussão sobre o fluxo de trabalho é completa sem o exame do papel da tecnologia (De Cresce, 1988). A tecnologia laboratorial refere-se amplamente a três áreas funcionais: equipamento de realização de testes (i. e., analisadores), processadores pré-analíticos e tecnologia de informação (TI). Enquanto as duas primeiras áreas são específicas ao laboratório, a tecnologia de informação não o é, e seu desenho e papel são em geral determinados por fatores externos ao laboratório. Por exemplo, a maneira como um SIL é utilizado para a recuperação de dados e elaboração de laudos (i. e., se os médicos acessam diretamente ou não o SIL para verificar os resultados) depende da existência de um sistema de informação hospitalar (SIH) que sirva a esse propósito (ver Cap. 11). Nesse caso, os dados laboratoriais são acessados por meio de um sistema secundário. Além disso, o sistema laboratorial pode ser parte de uma abordagem mais ampla ou pode ser uma solução oferecida pelo fornecedor de TI dentro de um centro de saúde e não um produto isolado a ser selecionado pelo laboratório. Sob essas circunstâncias, a tecnologia selecionada, apesar de ideal para a instituição em geral, pode não ser ideal para o laboratório. Em raros casos, alterações nos sistemas hospitalares são feitas para favorecer a eficiência de serviços auxiliares como o laboratório. Esses sistemas são direcionados principalmente ao fácil acesso a informações clínicas pelos profissionais da saúde e ao faturamento acurado pelo serviço financeiro do hospital.

O papel da tecnologia: princípios e armadilhas

A tecnologia modificou radicalmente o laboratório clínico nos últimos 20 anos e continua a ser a força impulsora por trás de muitos novos desenvolvimentos. De tempos em tempos, uma tecnologia de ponta é introduzida e revoluciona a medicina laboratorial (Tabela 2.5). Os exemplos incluem o analisador bioquímico de acesso aleatório, sistemas automatizados de imunodiagnóstico, célula de trabalho integrada de bioquímica e imunodiagnóstico, e diagnóstico molecular. Cada alteração alterou muito a maneira de funcionar dos laboratórios e o tipo de informações fornecidas aos médicos. Embora tecnologias revolucionárias ofereçam um grande benefício potencial, elas também custam mais. Ao longo do tempo, uma tecnologia revolucionária é

Tabela 2.5 Inovação tecnológica

Modifica o fluxo de trabalho fundamental
Consolida as estações de trabalho
Poupa trabalho
Melhora o serviço
Estabelece um novo padrão de desempenho
Compensa o custo

adotada por múltiplas empresas, e passa a existir competição, os preços diminuem e o seu uso torna-se disseminado entre os laboratórios. Em outras palavras, ela se torna uma tecnologia *corrente* ou *secundária*. Os serviços que primeiro adotam uma tecnologia de ponta, com frequência pagam mais e recebem menos benefício que aqueles que aguardam até ela se tornar uma tecnologia corrente. Compreendendo bem o papel da tecnologia, é possível determinar como melhor utilizá-la no laboratório clínico. As questões a seguir devem ser consideradas ao se avaliar uma tecnologia.

Ela é necessária? Embora a tecnologia seja parte fundamental de um laboratório moderno, ela não é a solução para todos os problemas. Com frequência, uma solução não tecnológica resulta em um fluxo de trabalho mais rápido, melhor e menos oneroso do que uma solução tecnológica. Saber quando introduzir uma solução não tecnológica no lugar de uma tecnológica pode ser a diferença entre uma solução eficaz e econômica e uma solução cara que não soluciona o problema inicial por completo, oferece uma funcionalidade desnecessária ou oferece uma funcionalidade necessária mas a um custo desnecessário. Por exemplo, um laboratório pode apresentar um grande movimento de coletas no período da manhã e, como consequência, criar uma reserva de fluxo de trabalho (Figura 2.5). Em vez de adquirir mais equipamentos para aumentar a capacidade durante os períodos de pico, o laboratório deveria buscar maneiras de distribuir o trabalho de forma mais homogênea durante o turno. O fundamental é evitar a liberação de grandes lotes de amostras para o laboratório. Uma solução poderia ser a reorganização do horário de coletas de sangue venoso de modo que elas sejam iniciadas mais cedo e sejam realizadas durante um período mais longo (Sunyog, 2004). Uma outra alternativa seria os flebotomistas enviarem aos poucos as amostras ao laboratório, em vez de aguardarem a coleta de um grande lote de uma ala inteira. Portanto, devem-se analisar e remodelar processos no maior grau possível antes de buscar uma solução tecnológica. Essa abordagem pode produzir uma solução barata que é mais rápida e mais fácil de ser implementada. Algumas vezes, soluções não tecnológicas, embora preferíveis, encontram-se fora do controle direto da equipe laboratorial e, como consequência, não recebem a atenção merecida. Nesse caso, uma solução tecnológica é selecionada porque ela pode ser implementada sem o suporte de outros departamentos.

Tecnologia é um meio para um fim e não um fim. A tecnologia sozinha não melhora o desempenho nem o fluxo de trabalho. Trata-se apenas de uma ferramenta para se atingir um objetivo. Em última instância, uma nova tecnologia tem sucesso ou fracassa de acordo com a maneira como ela é implementada. Por sua vez, isso depende de pessoas e da capacidade de analisar claramente como a tecnologia e o fluxo de trabalho podem ser integrados de maneira desejável em seu ambiente. O que funciona em um local pode não funcionar em outro. Algumas vezes, isso significa a modificação de práticas antigas ou horários dos funcionários. Por exemplo, se quatro analisadores bioquímicos são consolidados em dois, os funcionários terão de ser recolocados, levando-se em conta o menor número de estações de trabalho e/ou os horários de pico de testes. De modo similar, agrupar determinados exames em um novo analisador de alto processamento não aproveita toda a vantagem de sua capacidade de processamento contínuo e, em alguns casos, pode apresentar um índice de processamento menor do que o analisador que ele substituiu. Por fim, a transcrição manual de solicitações médicas de requisições de papel para um sistema de informação hospitalar ou laboratorial é menos funcional e apresenta maior possibilidade de erro que a solicitação eletrônica direta feita pelos médicos. Como a tecnologia tem de ser "customizada" para cada local, os laboratórios implementam a mesma tecnologia de diferentes maneiras e apresentam diferentes resultados. Nunca suponha que melhorias e resultados obtidos em um outro serviço ocorrerão automaticamente no seu. As implementações mais bem-sucedidas sofrem uma reavaliação total do fluxo de trabalho para avaliar qual a melhor forma de integrar a tecnologia. Ao se avaliar de modo crítico práticas existentes, pode-se evitar a perpetuação de processos ineficientes mesmo com novos equipamentos.

Compra exagerada – o pecado capital. Mais do que tudo, a compra exagerada aumenta custos que sobrecarregam uma operação sobre a vida da tecnologia. Embora seja tentador comprar em excesso "para o caso de" a capacidade aumentar (p. ex., um novo trabalho excedente), essas necessidades podem não se materializar ou podem ocorrer

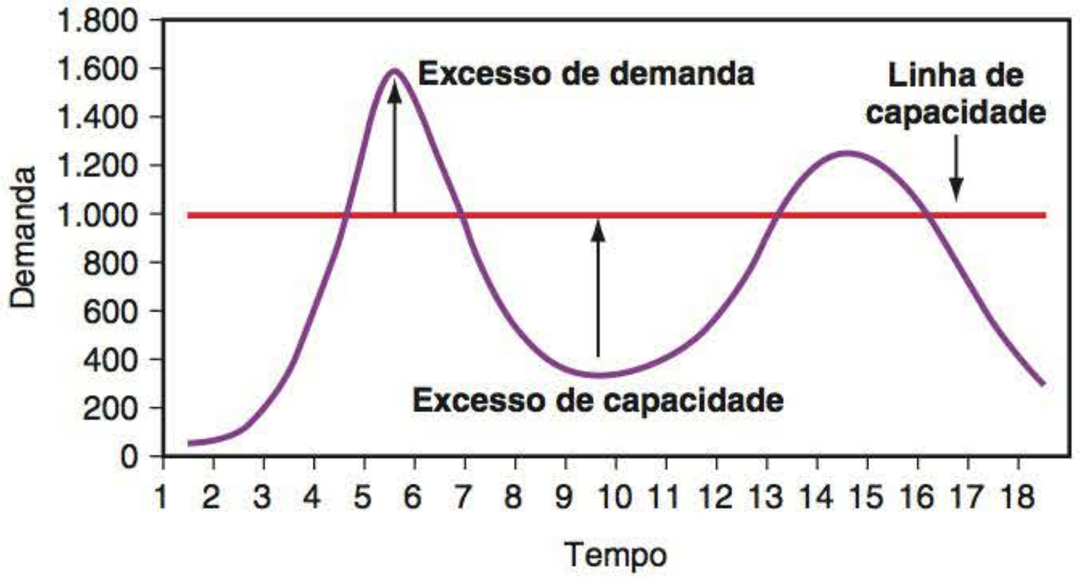


Figura 2.5 Demanda de testes *versus* capacidade instrumental. Observe que a demanda excede a capacidade durante os períodos de pico, gerando acúmulos. Em muitos estabelecimentos, os acúmulos de teste são aceitáveis. Caso não sejam clinicamente aceitáveis, o laboratório deve explorar formas de compatibilizar capacidade e demanda de modo mais uniforme (p. ex., alterando os esquemas de coleta de sangue). A nova tecnologia deve ser a última abordagem a ser considerada.

de maneira lenta ao longo do tempo e permitir uma abordagem incremental, mais efetiva e menos onerosa. Um novo instrumento no laboratório quase nunca se traduz diretamente em um maior volume de exames. A demanda do mercado para testes, em geral, é independente da capacidade de testes do laboratório, embora uma maior capacidade possa permitir um marketing mais agressivo dos serviços. Há diferentes tipos de compra exagerada. Por exemplo, um laboratório pode comprar três analisadores em vez de dois ou um analisador que realiza 1.000 exames por hora em vez de um dispositivo que processa 500 exames por hora. Como alternativa, uma solução de automação total do laboratório pode ser implementada em vez de uma solução baseada em várias células de trabalho menores ou analisadores automatizados. Em todos os casos, a compra exagerada aumenta custos. Todos os exemplos acima aumentam custos de depreciação, exigem mais serviço e manutenção, além de poder levar a uma utilização ineficaz da mão de obra e um fluxo de trabalho abaixo do desejável. Comprar mais analisadores do que o necessário também pode aumentar os gastos com reagentes porque cada analisador deve ser calibrado, controlado e correlacionado com outros dispositivos que processam o mesmo exame. O desperdício de reagentes (em razão do vencimento da data de validade) também pode aumentar se pequenas quantidades de exames forem realizadas em cada um dos analisadores.

A compra exagerada não deve ser confundida com a capacidade excessiva que é algumas vezes inevitável ao se implementar sistemas de *backup* necessários. Em última instância, é o modelo do serviço laboratorial que determina se o *backup* é necessário. Para alguns exames (p. ex., marcadores cardíacos), o laboratório pode necessitar de um sistema de *backup*, enquanto para outros (p. ex., marcadores tumorais), ele pode não necessitar. Além disso, as necessidades de um *backup* de um laboratório de emergência são diferentes das de um laboratório de referência. Um fluxo de trabalho bem desenhado pode equilibrar a necessidade de algum *backup* de um laboratório sem compra exagerada. Para um laboratório que necessita de uma capacidade de 1.000 exames/hora, isso pode significar a escolha de dois analisadores que realizam 500 exames/hora em vez de dois que processam 1.000 exames/hora. Alternativamente, pode significar a seleção de um analisador que processa 1.000 exames/hora e a utilização de um laboratório vizinho (com interface com o primeiro SIL) para *backup*. Por fim, pode significar a seleção de dois analisadores que processam 1.000 exames/hora, mas com a utilização de apenas um por vez. Em raros casos essa última solução é bem-sucedida, visto que ela duplica uma tecnologia cara e aumenta os custos de manutenção. Uma analogia simples com um veículo familiar é em geral instrutiva – raramente as pessoas adquirem dois automóveis para fazer o que um consegue fazer na maior parte do tempo. Em vez disso, elas confiam em alternativas como aluguel, transporte público ou táxis para suprir necessidades ocasionais. Em última instância, o objetivo é "comprar certo", isto é, evitar a compra exagerada ou insuficiente de tecnologia.

Você sabe o que está comprando? Existe uma diferença entre tecnologia "comprada" e tecnologia "vendida" por fornecedores. A primeira

abordagem exige uma análise pelo laboratório para identificar o que é necessário e uma compreensão geral da tecnologia que está sendo considerada, enquanto a segunda depende mais do fato de o fornecedor oferecer uma solução para o laboratório. O risco da tecnologia "vendida" é que ela pode não ser a solução ideal. A maioria dos instrumentos funciona e faz o que foi anunciado. Infelizmente, "o que eles fazem" pode não ser o que é necessário.

O tipo de tecnologia também é importante. A tecnologia atual, em geral, é mais fácil de ser compreendida e é uma estratégia menos arriscada que uma tecnologia de ponta, embora ela também possa ser menos recompensadora. Tecnologia de ponta é, por definição, uma nova tecnologia e pode ser difícil compreender totalmente se ela é adequada para um determinado laboratório, qual a melhor forma de implementá-la ou quão importante é o seu impacto financeiro.

Outras questões que devem ser levadas em conta estão relacionadas com a tecnologia em si e se ela oferece no momento todas as características exigidas por um laboratório. Um fornecedor pode promover certas melhorias ou capacidades programadas para o futuro, em especial ao comercializar analisadores. Elas podem incluir exames em desenvolvimento, melhorias do instrumento ou do *hardware* de computador, novas versões do *software* ou *upgrades* automáticos para um sistema da geração seguinte. Embora essas futuras melhorias pareçam atraentes, elas podem não se concretizar. Por essa razão, elas não devem ser uma razão primária na escolha de tecnologia. Uma tática melhor é retardar a aquisição do sistema até que ele possa oferecer ao laboratório todas as capacidades necessárias. Um outro erro potencial é superestimar a vida ou a utilidade de uma tecnologia, uma vez que isso subestimará o seu custo real. Por fim, a questão que cada laboratório deve levantar não é "a tecnologia funciona?" e sim "essa tecnologia funciona para mim?".

Otimização do desempenho

Otimizar o desempenho é o processo por meio do qual o fluxo de trabalho (incluindo o *design* do laboratório) e a tecnologia são integrados para produzir uma operação que satisfaça melhor as necessidades clínicas e os objetivos financeiros da organização: alta qualidade a baixo custo. Na prática, existem momentos em que alterações do fluxo de trabalho melhoram os níveis do serviço *e* reduzem custo. Por exemplo, a consolidação dos sistemas de bioquímica podem reduzir custos de capital e operacionais, e também melhorar o tempo médio. Outras vezes, existe um equilíbrio entre custo e qualidade. Por exemplo, apesar de a redução da equipe de flebotomistas reduzir custos, ela pode aumentar o tempo necessário para a realização da coleta de sangue no período matinal. Por sua vez, isso pode atrasar a liberação de resultados dos exames, mas pode não ser importante se os resultados não forem necessários até o final do dia. Por outro lado, se a alta de um paciente depender do resultado pela manhã, o atraso de um exame poderia aumentar o período de estadia. Em última instância, essas decisões devem ser analisadas dentro do quadro de toda a instituição, levando em conta o impacto dessas ações e seus efeitos em outros departamentos.

A otimização do desempenho é um processo contínuo que exige a avaliação e reavaliação constante do fluxo de trabalho e das necessidades. Isso requer coleta e análise de dados. A Tabela 2.6 apresenta exemplos de medidas do fluxo de trabalho cuja monitoração é útil. Em última instância, o grau com que qualquer um desses relatórios é útil depende da acurácia dos dados. Embora existam muitas abordagens diferentes para otimizar o desempenho, algumas das mais comuns são discutidas aqui e na Tabela 2.7.

Consolidação, integração e padronização são três estratégias fundamentais inter-relacionadas que assumiram uma importância crescente nos últimos anos, na medida em que os laboratórios se afiliaram por meio de uma ampla rede de serviços de saúde. Esses conceitos também são relevantes para um serviço único.

Consolidação. A realização de testes pode ser consolidada a partir de múltiplos locais ou estações de trabalhos em um único serviço, ou exames selecionados de muitos serviços podem ser centralizados em um ou mais locais. A consolidação cria maiores lotes ou processamentos de amostras; isso melhora a eficiência dos testes porque os custos fixos de controle de qualidade e calibração são distribuídos em um número maior de amostras. Por sua vez, isso reduz o custo por unidade. A consolidação pode fornecer um maior volume de exames do laboratório de referência. Uma análise "fazer *versus* comprar" pode determinar se, em termos econômicos, é factível realizar no local exames previamente enviados a um laboratório de referência (Kisner, 2003). Para melhorar o tempo de resposta, a consolidação pode fazer que seja econômica e eficaz a realização de exames com mais frequência ou a utilização de uma tecnologia mais automatizada. A consolidação de alguns exames pode não ser adequada. Por exemplo, a gasometria e outros testes rápidos no local de atendimento podem ter de ser realizados em múltiplos locais de um hospital para prover o tempo de resposta necessário para a liberação dos resultados solicitado pelos médicos. De modo similar, pode ser pouco benéfica a realização de hemograma de rotina em um laboratório central fora do local de coleta em vez de ele ser realizado no laboratório hospitalar que fornece rapidamente o resultado. Em

Tabela 2.6 Exemplos de métrica do fluxo de trabalho

Métrica	Comentários
Estudos de tempo de resposta (TAT, do inglês *turnaround time*)	
Da coleta à recepção	O tempo de coleta está correto? As amostras levam quanto tempo para chegar ao laboratório? O sistema de transporte de tubos funciona adequadamente? Os responsáveis pela captação das amostras são confiáveis?
Da recepção aos resultados	Quanto tempo o laboratório gasta para executar o teste, a partir do momento em que recebe uma amostra? Ela é mantida em uma área de recepção central antes de ser entregue ao técnico?
Da solicitação (ou coleta) ao resultado	É considerado pelo médico como tempo total de resposta. É acurado? Quanto tempo é necessário para que um resultado liberado pelo laboratório apareça no sistema de informação do hospital? Existem questões de rede de trabalho que sejam externas ao laboratório e estejam atrasando o aparecimento dos resultados?
Stat e TAT de rotina por hora	O TAT *stat* é mais demorado pela manhã, quando chegam as amostras de rotina da coleta desse período? Qual a diferença entre o TAT de rotina e o *stat*? Alguns testes são mais afetados que outros?
Estatísticas do volume mensal	
Testes "faturáveis"	Quantos testes solicitados são realizados? Qual a tendência? O volume total ou o volume de um teste específico mudou o bastante para justificar uma reavaliação do fluxo de trabalho ou da capacidade de teste? Alguns testes devem ser enviados para um laboratório de referência, em vez de serem feitos no local?
Testes "estourados"	Painéis químicos estourados em componentes individuais proporcionam uma avaliação mais acurada da "carga" geral de testes nos analisadores e do uso de reagentes, em comparação aos testes solicitados apenas. O volume mudou? Está relacionado com uma localização específica ou novo serviço?
Por localização	O volume de testes mudou nas unidades de enfermagem específicas ou ambulatórios? O volume de testes de pacientes internados e de pacientes ambulatoriais mudou?
Testes de laboratório de referência	O volume de certos testes tem aumentado? Se a resposta for afirmativa, por que e quanto? Os custos totais mensais estão mudando? (Os testes com maior custo anual nem sempre são os de maior volume.) O grau de adequação de certos testes deve ser avaliado? Faz sentido realizar qualquer desses testes no local (decisão de "comprar pronto *versus* fazer")?
Mapeamento de amostras e testes	
Tubos por hora	Na química, a manipulação dos tubos exerce impacto direto sobre a equipe de funcionários e inclui centrifugação, separação de alíquotas e armazenamento
Testes por hora por departamento ou estação de trabalho	Essa métrica é necessária para comparar a "demanda de testes" *versus* a "capacidade do instrumento" e pode ajudar a determinar a configuração ótima dos equipamentos

Tabela 2.7 Estratégias para otimizar o desempenho

Estratégia	Exemplo
Consolidar	*Uma instalação*: correr as amostras de *stat* e de rotina juntas no mesmo analisador; executar os testes de rotina e de especialidade na mesma plataforma; reduzir o número de analisadores e estações de trabalho e usar célula de trabalho, quando for conveniente. A consolidação pode reduzir o "trabalho com tubos" *Múltiplas instalações*: centralizar testes/serviços de alto custo e baixo volume selecionados em um único local (p. ex., diagnóstico molecular [carga viral do HIV], coleta de sangue de doador)
Padronizar	*Equipamento*: todo equipamento adquirido de um fornecedor gera descontos por volumes maiores, redução dos custos de reagentes e analisadores, em especial nas áreas de química e imunodiagnóstico *Método*: faixas de referência uniformes para todos os laboratórios proporcionam um ambiente de testes íntegro para pacientes internados e ambulatoriais, com comparabilidade de dados e resultados que seguem tendências entre os laboratórios. Também proporciona um sistema de *backup* sem excesso de redundância *Políticas*: simplificar manuais de procedimento e documentos em conformidade, de modo a poderem ser compartilhados *Equipe*: operações padronizadas facilitam o compartilhamento das equipes entre as instalações *LIS*: o gerenciamento do banco de dados é simplificado
Integrar	*Computador*: disponibilizar o sistema LIS em rede com outros sistemas de dados para promover um fluxo contínuo (p. ex., envio de resultados de testes rápidos dentro do LIS) *Expedição*: uso de um único serviço para distribuir amostras entre diversos locais
Aquisição estratégica	Estratégia de longo prazo: licitações competitivas para aquisição de equipamentos, suprimentos, serviços de laboratórios de referência etc., considerando as condições de pagamento, taxas de entrega, serviços com custo adicional e custo de produtos
Remarcação rápida de preços	Estratégia de curto prazo: renegociar preços com os fornecedores existentes
"Produzir *versus* comprar pronto"	Rever todos os testes enviados e o baixo volume de testes executados no local, para identificar quais devem ser "adquiridos" (i. e., enviados ou terceirados para outros laboratórios) e quais devem ser "feitos" (i. e., executados internamente), com base no custo e no tempo de resposta. Rever também os serviços, como a expedição
Revisão das políticas e tarefas do laboratório	Rever criticamente as políticas e procedimentos do laboratório com o objetivo de determinar sua relevância e o grau de adequação: os limites de verificação Δ podem ser estreitados ou eliminados para reduzir o número de testes repetidos e verificações, sem comprometer a qualidade? Os valores estabelecidos para as chamadas urgentes são clinicamente apropriados ou geram chamadas desnecessárias para os médicos? Os testes onerosos não urgentes podem ser agrupados em lotes para serem realizados duas vezes por semana, em vez de serem realizados diariamente? Os clínicos precisam contar diariamente com certos testes que só são disponibilizados algumas vezes por semana? O controle de qualidade e os procedimentos de manutenção são excessivos?
Utilizar ao máximo as soluções de TI simples e/ou existentes	O processo de autoverificação baseada em regras elimina a necessidade de o técnico liberar manualmente cada resultado (Crolla, 2003) O sistema de armazenamento de amostras em estantes elimina a maior parte do tempo gasto à procura das amostras
Treinamento cruzado	Treinar técnicos para executar testes bioquímicos e hematológicos automatizados, em vez de apenas um ou outro
Adaptar a diversidade de habilidades	Ajustar o nível de habilidade (e a compensação) da equipe para compatibilizar as tarefas executadas: em vez de técnicos, usar auxiliares de laboratório para centrifugar amostras ou colocá-las nos analisadores
Ajustar os horários da equipe	Contratar flebotomistas para trabalhar por meio período na complementação da coleta de sangue durante os horários de pico, em vez de contratá-los por tempo integral e subutilizá-los quando a coleta da manhã termina
Modificar o projeto do laboratório	Projetar um laboratório aberto, que permita a realização de todos os testes automatizados em um mesmo local e promova o treinamento cruzado da equipe
Administrar a utilização	Requerer autorização do patologista ou diretor para solicitar testes onerosos seletos de laboratórios de referência e/ou restringir o uso de vários testes exclusivamente a especialistas

contraste, pode ser benéfico consolidar entre os serviços aqueles exames que são menos sensíveis ao tempo (p. ex., marcadores tumorais) ou que exigem habilidades especiais e/ou equipamentos dedicados em cada local (p. ex., serviços de microbiologia). Para consolidar exames de múltiplos serviços com sucesso, um local central deve controlar novos custos (minimizando o número adicional de funcionários ou equipamentos para realizar os exames) e oferecer uma qualidade e um serviço comparável ou melhor que o provido (Carter, 2004). Ele também deve promover uma abordagem colaborativa para garantir que todas as necessidades dos serviços que enviam exames sejam atendidas, incluindo preocupações comuns dos médicos, por exemplo, tempo de resposta maior e capacidade limitada de acesso a informações ou de interação com um laboratório remoto. Uma consolidação bem-sucedida deve ser transparente para o médico.

Padronização. Diretivas, métodos e equipamentos padronizados beneficiam os laboratórios de várias maneiras. Benefícios diretos (p. ex., custos mais baixos) podem ser obtidos quando o laboratório negocia agressivamente com um fornecedor para suprir todos os equipamentos ou reagentes de bioquímica ou hematologia. Benefícios indiretos são consequentes de operações simplificadas resultantes da padronização que tornam mais fácil treinar os funcionários ou implementar diretivas e procedimentos. A padronização é um processo gradual que pode levar vários anos para ser completada. A transição rápida, em geral, não é possível por causa de cláusulas contratuais. A ruptura de um contrato existente, geralmente é muito onerosa e pode anular parcial ou completamente qualquer economia pretendida com um novo contrato. Algumas vezes, as exigências específicas de um local podem impedir a padronização com outros laboratórios, ou um único fornecedor não pode oferecer uma linha de produto que seja adequada para cada serviço. Nesses casos, ainda é possível reduzir os custos de forma significativa e/ou melhorar o desempenho apesar do uso de uma abordagem mais variada ou limitada.

Integração. É o processo por meio do qual serviços de um local são coordenados, compartilhados e/ou conectados àqueles de um outro local para oferecer uma operação consistente. Embora a integração seja frequentemente um subproduto da consolidação e padronização, essas duas estratégias não são um pré-requisito para uma integração bem-sucedida. Por exemplo, considere um SIL que liga vários serviços. Embora uma única operação consistente possa ser criada com um único sistema do fornecedor, a sua criação também é possível por meio de sistemas de rede de diferentes fornecedores, apesar da maior dificuldade e, possivelmente, menor funcionalidade. Outros exemplos de integração incluem o treinamento de funcionários entre diferentes seções laboratoriais ou serviços e a criação de uma interface entre os dados do laboratório de coleta de exames no local de atendimento e o sistema laboratorial principal.

Gerenciamento da utilização. Até agora, estratégias para otimizar o desempenho foram centradas em maneiras de realizar melhor o trabalho e com menor custo. Embora isso seja importante, não aborda a questão mais básica – o trabalho (i. e., o exame) é necessário? Afinal, o exame mais barato é aquele não realizado. A diminuição do volume de exames também pode alterar necessidades operacionais globais e padrões de fluxo de trabalho. Tenha em mente que o laboratório hospitalar em geral não é reembolsado (ver Cap. 12) e, como consequência, cada exame laboratorial é um custo adicional para o hospital. Portanto, a redução da utilização hospitalar tem um impacto direto sobre os custos. Em contraste, exames realizados no âmbito ambulatorial, em geral, são reembolsados pelo seguro saúde ou pelo paciente. Apesar disso, a quantia reembolsada pode não ser suficiente para cobrir o custo do exame. Isso é particularmente verdadeiro para os novos exames laboratoriais onerosos realizados por laboratórios de referência, em que o laboratório pode receber apenas US$ 0,20 a 0,30 para cada dólar despendido. Portanto, o controle seletivo de utilização ambulatorial também pode produzir um benefício financeiro. A utilização adequada de exames não significa apenas redução de utilização. Em alguns casos, exames que deveriam ser solicitados podem não sê-lo, e isso poderia ter um impacto no tratamento do paciente e no tempo de permanência.

Existem diferentes estratégias que um laboratório pode utilizar dependendo do tipo de exame (Lewandrowski, 2003). Ao longo dos anos, os laboratórios obtiveram grandes economias por meio de melhorias da produtividade. Como resultado, é muito mais fácil e menos oneroso processar um exame que custa US$ 0,10 do que determinar se cada um é adequado. Embora isso seja verdadeiro para muitos exames de alto volume (p. ex., hemograma e painéis metabólicos básicos), não é verdadeiro para muitos exames laboratoriais novos, complexos e caros realizados por laboratórios de referência (p. ex., diagnóstico do câncer e genotipagem viral). Por essa razão, é necessária uma estratégia diferente para gerenciar a utilização de exames caros realizados por laboratórios de referência da utilizada para gerenciar a realização de hemograma. Por exemplo, a utilização de um laboratório de referência pode ser gerenciada pela revisão de cada solicitação (para determinados exames) e seu custo com o médico, baseando-se em diretivas elaboradas pelos serviços médicos. Essa estratégia de evitação de gasto não apenas garante que as indicações clínicas sejam satisfeitas, mas ela também educa os médicos sobre os custos e desafia cada um a avaliar o custo-benefício de seu uso. Em contraste, exames de alto volume (p. ex., hemograma) exigem uma estratégia mais ampla que restringe ou orienta a frequência de solicitação eletronicamente por meio de várias vias clínicas ou sistemas de suporte de decisão baseada em diretivas (van Wijk, 2002). Por exemplo, um painel metabólico amplo ou básico poderia ser limitado a uma solicitação por admissão se o paciente estiver estável. Pouco pode ser economizado com a eliminação de um exame laboratorial de baixo custo de um painel de cinco outros exames. A economia mais importante ocorre quando a flebotomia é concomitantemente eliminada. Em geral, isso requer a reavaliação da frequência de solicitações de todos os serviços clínicos e modificação dos padrões da prática para reduzir o número de vezes que o sangue de um paciente é coletado. A repetição de um exame é um componente comum de sua utilização global e é onerosa (van Walraven, 2003).

Um algoritmo diagnóstico baseado no laboratório pode ajudar na tomada de decisão médica e reduzir a utilização de um exame. Com essa abordagem, um médico solicita ao laboratório que realize um perfil diagnóstico (p. ex., avaliação da função tireoidiana) em vez de solicitar exames específicos. Em consequência, o laboratório determina os exames adequados a serem processados e em qual ordem (Yang, 1996).

Referências bibliográficas

Carter E, Stubbs JR, Bennett B: A model for consolidation of clinical microbiology laboratory services within a multihospital health-care system. Clin Leadersh Manag Rev 2004; 18:211–215.

Crolla LJ, Westgard JO: Evaluation of rule-based autoverification protocols. Clin Leadersh Manag Rev 2003; 17:268–272.

De Cresce RP, Lifshitz MS: Integrating automation into the clinical laboratory. *In* Lifshitz MS, De Cresce RP (eds): Perspectives on Clinical Laboratory Automation. New York, WB Saunders Company, 1988, pp 759–774.

Visão geral sobre como analisar o fluxo de trabalho e avaliar a tecnologia, incluindo inúmeras considerações de ordem prática.

Kisner HJ: Make versus buy: a financial perspective. Clin Leadersh Manag Rev 2003; 17:328–330.

Lewandrowski K: Managing utilization of new diagnostic tests. Clin Leadersh Manag Rev 2003; 17:318–324.

Middleton S, Mountain P: Process control and on-line optimization. *In* Kost GJ: Handbook of Clinical Automation, Robotics and Optimization. New York, John Wiley & Sons, 1996, pp 515–540.

Fornece uma visão geral sobre a tarefa e o processo de mapeamento empregando diagramas de fluxo. Também discute como integrar automação, sistemas de informação e equipe com o intuito de otimizar o desempenho.

Mohammad AA, Elefano EC, Leigh D, et al: Use of computer simulation to study impact of increasing routine test volume on turnaround times of STAT samples on ci8200 integrated chemistry and immunoassay analyzer (abstract). Clin Chem 2004; 50:1952–1955.

Sunyog M: Lean management and six-sigma yield big gains in hospital's immediate response laboratory. Clin Leadersh Manag Rev 2004; 18:255–258.

Van Walraven C, Raymond M: Population-based study of repeat laboratory testing. Clin Chem 2003; 49:1997–2005.

Van Wijk MAM, van der Lei J, Mosseveld M, et al: Compliance of general practitioners with a guideline-based decision support system for ordering blood tests Clin Chem 2002; 48:55–60.

Yang JM, Laposata M, Lewandrowski KB: Algorithmic diagnosis. *In* Kost GJ: Handbook of Clinical Automation, Robotics and Optimization. New York, John Wiley & Sons, 1996, pp 911–928.

CAPÍTULO 3

Pré-análise

Herb Miller PhD MT(ASCP) CLS(NCA), Mark S. Lifshitz MD

Variáveis pré-coleta 24
Coleta de amostras 26
A solicitação do exame 26
Horário de coleta 26
Variáveis associadas à coleta 26
Rejeição de amostra 27
Visão geral da coleta de sangue 27
Anticoagulantes e aditivos 28
Dispositivos de coleta de sangue 29
Armazenamento e preservação do sangue 29
Importância de políticas e procedimentos 30
Técnicas de coleta de sangue 30
Punção arterial 30
Punção cutânea 31
Dispositivos de acesso venoso central 31
Coleta de urina e outros líquidos corporais 32
Urina 32
Outros líquidos corporais 33
Transporte de amostra 34
Processamento de amostra 34
Fase pré-centrifugação 34
Fase de centrifugação 35
Referências bibliográficas 35

PONTOS-CHAVE

- Erros e variáveis no estágio de pré-análise podem afetar os resultados de exames.
- As variáveis do paciente incluem atividade física, dieta, idade, sexo, variações circadianas, postura, estresse, obesidade, tabagismo e medicação.
- A adesão estrita à técnica adequada e a seleção do local podem minimizar variáveis da coleta, como hemólise, hemoconcentração, coágulos e outras causas de rejeição de amostra ou de resultados errôneos.
- Os recipientes de coleta de sangue são baseados em código de cor relativo ao aditivo ou preservativo, e cada recipiente é adequado apenas para exames específicos. O uso de tubos inadequados ou o enchimento de tubos na sequência incorreta podem produzir resultados errôneos.
- A equipe de coleta de sangue deve ser treinada de forma adequada em relação às questões de segurança e de confidencialidade.
- Constituintes do sangue, urina e outros líquidos corporais podem se alterar durante o transporte e o armazenamento. A extensão dessas alterações varia por composto químico.

A pré-análise refere-se a todas as etapas que devem ser realizadas antes que uma amostra possa ser analisada. Ao longo dos anos, avanços tecnológicos e procedimentos de garantia de qualidade reduziram significativamente o número de erros baseados na análise. Isso expôs o estágio de pré-análise como uma fonte importante de "erro" residual e/ou variáveis que podem afetar o resultado de exames. Os fatores pré-analíticos incluem variáveis relacionadas ao paciente (dieta, idade, sexo etc.), técnicas de coleta de amostra, preservativos de amostra e anticoagulantes, transporte, processamento e armazenamento de amostra. As fontes potenciais de erro, ou falhas nesse processo, incluem identificação errônea da amostra, momento inadequado de coleta, jejum inadequado, relação anticoagulante/sangue inadequada, mistura inadequada, solicitação ou coleta incorreta e amostras hemolisadas ou lipêmicas. A Tabela 3.1 apresenta uma lista dos 10 erros mais comuns associados à coleta de amostra.

As questões pré-analíticas causam um impacto sobre os recursos laboratoriais, os custos hospitalares e a qualidade global. Segundo algumas estimativas, erros de coleta de amostras custam aproximadamente US$ 200.000 por ano em custos de nova coleta para um hospital com cerca de 400 leitos. A técnica adequada de coleta é também essencial para diminuir a ocorrência de lesões tanto para o flebotomista quanto para o paciente. Um único tratamento pós-lesão por agulha pode custar de US$ 500 a 3.000, e a má técnica pode causar lesão no paciente (p. ex., lesão nervosa ou arterial). O CDC estima que ocorrem 385.000 lesões por agulha por ano (CDC, 2004). Muitas delas não são notificadas. Este capítulo discute o processo pré-analítico com ênfase especial sobre o impacto clínico de variáveis e causas de fracasso.

Variáveis pré-coleta

Ao preparar um paciente para flebotomia, deve-se ter cuidado para reduzir fatores relacionados a atividades que poderiam influenciar determinações laboratoriais. Eles incluem variação diurna, exercício, jejum, dieta, consumo de álcool, tabagismo, ingestão de droga e postura.

Variação diurna. Pode ser verificada ao se realizar dosagens de hormônios, ferro, fosfatase ácida e excreção urinária da maioria dos eletrólitos (p. ex., sódio, potássio e fosfato) (Dufour, 2003). A Tabela 3.2 apresenta vários exames afetados por variações diurnas, postura e estresse.

Exercício. A atividade física tem efeitos transitórios e de longa duração sobre determinações laboratoriais. Alterações transitórias podem incluir uma diminuição inicial seguida por um aumento de ácidos graxos livres. A alanina pode aumentar até 180% e o lactato, até 300%. O exercício pode elevar a creatina fosfoquinase (CPK), a transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e a lactato desidrogenase (LDH) e pode ativar a coagulação, a fibrinólise e as plaquetas (Garza, 1989). Essas alterações estão relacionadas ao aumento das atividades metabólicas com objetivo energético e, em geral, retornam aos níveis pré-exercício assim que o exercício é interrompido. Os efeitos de longa duração do exercício podem aumentar os valores de CPK, aldolase, TGO e LDH. O exercício aeróbio crônico está associado à diminuição da concentração plasmática de enzimas musculares como CPK, TGO, ALT e LDH. Diminuições da concentração sérica de gonadotrofina e de hormônios esteroides sexuais são observadas em corredores de longa distância, e o nível de prolactina encontra-se aumentado (Dufour, 2003).

Dieta. A dieta de um indivíduo pode afetar muito os resultados de exames laboratoriais. O efeito é transitório e facilmente controlado. A glicose e os triglicerídeos, absorvidos do alimento, aumentam após a refeição (Dufour, 2003). Após 48 horas de jejum, a concentração sérica de bilirrubinas pode aumentar. O jejum de 72 horas diminui a concentração plasmática de glicose em mulheres saudáveis para 45 mg/dL (2,5 mmol/L), enquanto os homens apresentam um aumento da concentração plasmática de triglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres,

Tabela 3.1 Dez erros comuns na coleta de amostra

1. Identificação errônea do paciente
2. Identificação errônea da amostra
3. Coleta de pequena quantidade/relação anticoagulante/sangue incorreta
4. Problemas de mistura/coágulos
5. Tubos errados/anticoagulante errado
6. Hemólise/lipemia
7. Hemoconcentração
8. Exposição à luz/temperaturas extremas
9. Amostras coletadas em horários inadequados/atraso no envio ao laboratório
10. Erros de processamento: centrifugação incompleta, *log-in* incorreto, armazenamento incorreto

Tabela 3.2 Exames afetados por variação diurna, postura e estresse

Cortisol	Nível máximo: entre 4 e 6 horas; nível mínimo: entre 20 e 12 horas; nível 50% mais baixo às 20 horas do que às 8 horas; aumenta com o estresse
Hormônio adenocorticotrófico (ACTH)	Nível mais baixo à noite; aumenta com o estresse
Atividade da renina plasmática	Nível mais baixo à noite; nível maior na posição em pé em comparação com a posição deitada
Aldosterona	Nível mais baixo à noite
Insulina	Nível mais baixo à noite
Hormônio do crescimento	Nível mais alto à tarde e à noite
Fosfatase ácida	Nível mais alto à tarde e à noite
Tiroxina (T_4)	Aumenta com o exercício
Prolactina	Aumenta com o estresse; nível mais elevado entre 4 e 8 horas e entre 20 e 22 horas
Ferro	Nível máximo no final da manhã; diminui até 30% durante o dia
Cálcio	Diminuição de 4% na posição deitada

sem alteração significativa na concentração plasmática de colesterol. Ao determinarem-se constituintes sanguíneos (p. ex., glicose, triglicerídeos, colesterol e eletrólitos), a coleta deve ser realizada no estado basal (Garza, 1989). A ingestão de um alimento, dependendo de seu conteúdo de gordura, pode elevar a concentração plasmática de potássio, triglicerídeos, fosfatase alcalina e ácido indolacético (5-HIAA). A pesquisa de sangue oculto nas fezes, que detecta o heme, é afetada pela ingestão de carne vermelha, peixe, ferro e raiz-forte, uma fonte de peroxidase que causa um resultado falso-positivo na reação de sangue oculto (Dufour, 2003). Alterações fisiológicas podem incluir a hiperquilomicronemia, aumentando a opacidade do soro ou do plasma e podendo interferir na leitura do equipamento.

Certos alimentos ou regimes dietéticos podem afetar os constituintes do soro ou da urina. Foi relatado que dietas vegetarianas prolongadas provocam diminuição de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipídeos totais, fosfolipídeos, colesterol e triglicerídeos. A deficiência de vitamina B_{12} também pode ocorrer, exceto se forem utilizados suplementos (Young, 2001). Uma dieta rica em carne vermelha ou rica em outras fontes proteicas pode aumentar a concentração sérica de ureia, amônia e urato. Dietas ricas em proteínas e pobres em carboidratos (p. ex., dieta do Dr. Atkins) aumentam a concentração de cetonas na urina e a concentração sérica de nitrogênio ureico sanguíneo (BUN). Alimentos com uma alta relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados podem causar diminuição do colesterol sérico, enquanto uma dieta rica em purinas causará aumento da concentração de urato. Alimentos como banana, abacaxi, tomate e abacate são ricos em serotonina. Quando ingeridos, pode ser observado um aumento da excreção urinária de ácido hidróxi-indolacético. Bebidas ricas em cafeína causam o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres e a liberação de catecolaminas da medula suprarrenal e do tecido encefálico. A ingestão de álcool aumenta a concentração plasmática de lactato, urato e triglicerídeos. Elevações da lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol, Á-glutamil transferase (Á-GT), urato e volume corpuscular médio (VCM) foram associadas ao alcoolismo crônico.

Aumentos da concentração sérica de colesterol, triglicerídeos e apolipoproteínas B estão correlacionados com a obesidade. A atividade da lactato desidrogenase sérica, a produção de colesterol e a glicose aumentam na obesidade. A concentração plasmática de insulina também aumenta, mas a tolerância à glicose diminui. Em homens obesos, a concentração de testosterona diminui (Young, 2001).

Tabagismo. Tabagistas apresentam níveis séricos elevados de carboxihemoglobina, catecolaminas e cortisol. Alterações desses hormônios geralmente acarretam diminuição do número de eosinófilos, enquanto neutrófilos, monócitos e ácido graxos livres plasmáticos aumentam. Efeitos crônicos do tabagismo causam aumentos da concentração de hemoglobina, da contagem eritrocitária, do VCM e da contagem leucocitária. Também são observados aumentos da concentração plasmática de lactato, insulina, adrenalina, hormônio do crescimento e secreção urinária de ácido 5-hidróxi indolacético. O nível de vitamina B_{12} pode diminuir de modo substancial, e foi relatado que ele é inversamente proporcional à concentração sérica de tiocianato. O tabagismo também afeta a resposta imune do organismo. Tabagistas apresentam diminuição das imunoglobulinas A, G e M e aumento da imunoglobulina G. Existem relatos de diminuição da contagem e da motilidade espermática e aumento de espermatozoides com morfologia anormal em tabagistas em comparação com não tabagistas (Young, 2001).

Estresse. O estresse mental e físico induz a produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e catecolaminas. Foi relatado que a concentração sérica de colesterol total aumenta com o estresse leve, enquanto o HDL-colesterol diminui em até 15% (Dufour, 2003). A hiperventilação afeta o equilíbrio acidobásico e aumenta a contagem leucocitária, a concentração sérica de lactato ou de ácidos graxos livres.

Postura. A postura do paciente durante a flebotomia pode ter efeito sobre vários resultados laboratoriais. A posição ortostática aumenta a pressão hidrostática, provocando redução do volume plasmático e aumento da concentração de proteínas. As concentrações séricas de albumina e cálcio podem aumentar quando um indivíduo passa da posição deitada para a posição em pé. Os elementos que são afetados por alterações posturais são albumina, proteínas totais, enzimas, cálcio, bilirrubina, colesterol, triglicerídeos e fármacos ligados a proteínas. A aplicação incorreta do garrote e do exercício de punho pode resultar em resultados errôneos de exames. O uso de garrote na coleta de sangue para determinar a concentração de lactato pode resultar em um valor falsamente elevado. A aplicação prolongada do garrote também pode aumentar a concentração sérica de enzimas, proteínas e substâncias ligadas a proteínas, incluindo colesterol, cálcio e triglicerídeos, em razão da hemoconcentração. Após o repouso ao leito no hospital, o nível de hemoglobina de um paciente pode ser inferior ao valor obtido no momento da admissão, o suficiente para levar falsamente um médico a suspeitar de hemorragia interna ou hemólise (Dufour, 2003). Os pacientes devem ser orientados a evitar modificações na dieta, consumo de álcool e realização de exercícios extenuantes 24 horas antes de submeterem-se a uma coleta de sangue para a realização de exames laboratoriais.

Idade. A idade dos pacientes tem um efeito sobre os constituintes do soro. Young define quatro grupos etários: recém-nascido, infância à puberdade, adulto e idoso (Young, 2001). No recém-nascido, grande parte da hemoglobina é tipo F, e não A, como é observado no adulto. A concentração de bilirrubinas aumenta após o nascimento e atinge o pico em aproximadamente 5 dias. Em caso de doença hemolítica do recém-nascido, o nível de bilirrubinas continua a aumentar. Isso, em geral, provoca dificuldade na diferenciação entre a icterícia fisiológica e a doença hemolítica do recém-nascido. Lactentes apresentam uma glicemia mais baixa que os adultos por causa de sua baixa reserva de glicogênio. Com o crescimento esquelético e o desenvolvimento muscular, os níveis de fosfatase alcalina sérica e creatinina também aumentam respectivamente. O nível alto de ácido úrico observado no recém-nascido diminui nos primeiros 10 anos de vida e, em seguida, aumenta, em especial nos meninos, até os 16 anos de vida (Young, 2001). A maioria dos constituintes séricos permanece constante durante a vida adulta

até o início da menopausa nas mulheres e a idade média nos homens. Um aumento de aproximadamente 2 mg/dL (0,02 mmol/L) por ano no colesterol total e no triglicerídeos até a meia-idade foi relatado. O aumento de colesterol observado em mulheres na pós-menopausa foi atribuído a uma diminuição do nível de estrogênios. O nível de ácido úrico atinge o pico em torno dos 20 anos, mas somente atinge o pico nas mulheres na meia-idade. O idoso secreta menos tri-iodotironina, paratormônio, aldosterona e cortisol. Após os 50 anos, os homens apresentam uma diminuição da taxa de secreção e da concentração de testosterona, e as mulheres apresentam um aumento de gonadotropinas hipofisárias, em especial de FSH (Young, 2001).

Sexo. Após a puberdade, em geral os homens apresentam níveis mais elevados de fosfatase alcalina, aminotransferase, creatina quinase e aldolase que as mulheres. Isso se deve à maior massa muscular dos homens. As mulheres apresentam níveis séricos mais baixos de magnésio, cálcio, albumina, hemoglobina, ferro e ferritina. A perda sanguínea menstrual contribui para o valor mais baixo de ferro (Young, 2001).

Coleta de amostras

A solicitação do exame

Em geral, exames laboratoriais são solicitados eletronicamente (p. ex., pelo computador) ou por escrito (p. ex., requisição em papel). Essa informação é comunicada por meio de uma solicitação por escrito ou por um computador. A solicitação computadorizada online é o meio com menor risco de erros para a solicitação de exames laboratoriais. O médico inicia a solicitação de um exame laboratorial preenchendo uma requisição escrita dos exames laboratoriais desejados no prontuário médico do paciente. Solicitações verbais são realizadas em situações de emergência e devem ser documentadas em uma forma padrão; após a coleta de sangue, deve ser preenchida uma solicitação laboratorial oficial ou computadorizada (Garza, 2002). A solicitação direta por parte do médico e a consulta de resultados por meio de computadores em rede com interface cooperativa são abordagens realistas que permitem um cuidado imediato e acurado do paciente. Os dados demográficos do paciente incluem nome, sexo, idade, data de nascimento, data de admissão, data de solicitação de exames, número de registro hospitalar, número do quarto, médico e número de código de farmácia do médico. Sistemas de informação laboratorial computadorizados comuns atualmente nos laboratórios são utilizados para gerarem requisições e identificação de amostras. Alguns sistemas também geram requisições com o número de tubos e tipos de tubos necessários para a coleta.

A maioria dos laboratórios facilita a solicitação de exames oferecendo um sistema de informação médica escrito ou computadorizado que lista exames disponíveis, tipo de amostra exigido, método de coleta, cor do tubo de coleta de sangue utilizado, quantidade de sangue/líquido corporal exigida, tempo de resposta, intervalos de referência, códigos do exame, custos, informações diagnósticas etc. Todas as amostras devem ser identificadas claramente. Etiquetas de código de barra pré-impressas aplicadas após a identificação adequada do paciente e após a coleta da amostra evitam erros pré-analíticos de transcrição. Com frequência, o laboratório recebe solicitações de "adições". São exames adicionais solicitados que devem ser realizados em uma amostra previamente coletada. Ocorrem problemas quando a amostra não é do tipo adequado para a realização dos exames adicionais. Em geral, isso se deve à presença ou à ausência de um determinado anticoagulante ou aditivo. Todas as solicitações adicionais devem ser documentadas.

Questões médico-legais incluem identificação adequada do paciente, identificação adequada da amostra e questões relativas ao consentimento do paciente, à privacidade do paciente e à cadeia de custódia. Os laboratórios devem ter diretivas impressas claras sobre as questões acima. Além disso, deve haver diretivas sobre o que fazer quando um paciente recusa se submeter à coleta de sangue, o que fazer se a coleta de sangue for impossível, o que fazer se um paciente não estiver disponível e como agir diante de um paciente beligerante. O Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) aborda a segurança e a privacidade dos dados relativos à saúde e protege a confidencialidade de todas as informações contidas no prontuário dos pacientes, incluindo todos os dados laboratoriais. Os funcionários devem ser treinados a respeitar as normas do HIPAA.

Horário de coleta

Algumas vezes, as amostras devem ser coletadas em um horário específico. O não seguimento do horário programado pode levar a resultados e interpretação errados da condição do paciente. Os testes mais comuns dessa categoria referem-se às coletas ASAP e *stat*. Em inglês, ASAP significa "as soon as possible" (o mais breve possível) e *stat* significa "imediatamente" (do latim *statim*). As definições exatas desses termos variam de um laboratório a outro. Amostras *stat* devem ser coletadas e analisadas de imediato. Elas têm a prioridade mais alta e em geral são solicitadas em departamentos de emergência e unidades de terapia intensiva (Strasinger, 2003). Coletas de amostras com horário programado são solicitadas por várias razões, seja para monitorar alterações da condição de um paciente, para determinar o nível de um medicamento ou para mensurar quão bem uma substância é metabolizada. Por exemplo, um médico pode desejar monitorar um marcador cardíaco para verificar se ele está aumentando ou diminuindo. Na monitoração terapêutica de um medicamento, podem ser solicitados seus níveis mínimo e máximo. A amostra para o nível mínimo reflete o nível mais baixo do medicamento no sangue e em geral é coletada 30 minutos antes da sua administração; a amostra para o nível máximo é coletada logo após a administração. O momento da coleta varia de acordo com o medicamento. Fabricantes de medicamentos informam o período de tempo que deve ser respeitado entre os horários de coleta para dosagens dos níveis mínimo e máximo. A mensuração de quão bem o organismo metaboliza a glicose inclui uma amostra pós-prandial (2 horas após a refeição) e/ou um teste de tolerância à glicose. Os resultados são comparados com os obtidos com o paciente em jejum. Em um teste de tolerância à glicose, múltiplas amostras são coletadas ao longo do tempo, uma amostra antes e várias após a administração de uma solução glicosada padronizada. Esse exame é utilizado para o diagnóstico do diabetes melito, determinando quão bem o organismo metaboliza a glicose ao longo de um determinado período de tempo.

Variáveis associadas à coleta

Em caso de dificuldade de encontrar uma veia para flebotomia ou quando uma veia é transfixada, a amostra pode hemolisar. A hemólise também pode ser causada pelo uso de uma agulha muito pequena, pelo ato de puxar o êmbolo da seringa muito rapidamente, pela transferência vigorosa do sangue para um tubo, pela agitação ou mistura vigorosa de tubos ou pela realização da coleta de sangue antes de o álcool secar no local de coleta. A hemólise está presente quando a camada de soro ou de plasma torna-se rosa. Ela pode falsamente aumentar os constituintes séricos como potássio, magnésio, ferro, lactato desidrogenase, fósforo, amônio e proteínas totais (Garza, 2002). A Tabela 3.3 apresenta alterações na concentração sérica (ou atividades) de determinados constituintes em decorrência da hemólise.

Para evitar problemas de hemoconcentração e hemodiluição, o paciente deve sentar-se em posição supina por 15 a 20 minutos antes da coleta do sangue (Young, 2001). A aplicação prolongada do garrote pode causar hemoconcentração, a qual aumenta a concentração das substâncias analisadas e dos componentes celulares. Ao utilizar tubos de coleta de sangue que contêm vários anticoagulantes/aditivos, é importante seguir a orientação adequada de coleta e misturar bem um tubo de sangue com anticoagulante após ele ser cheio. O erro na mistura de um tubo com um anticoagulante implicará a não coagulação de toda a amostra de sangue, e pequenos coágulos podem se formar. Isso pode acarretar contagem errônea de células. Se um coágulo estiver presente, ele também pode obstruir ou interferir no funcionamento de um analisador automatizado. É muito importante que o anticoagulante adequado para o exame solicitado seja utilizado. O uso de um anticoagulante errado afetará muito os resultados dos exames.

Cada tubo de coleta com um anticoagulante possui um código de cor específico do fabricante. O soro ictérico ou leitoso apresenta outros desafios na análise laboratorial. Quando o nível sérico de bilirrubinas aproxima-se de 430 mmol/L (25 mg/L), podem-se observar interferências em dosagens de albumina (procedimento com ácido 4-hidroxiazobenzeno-2-carboxílico [HABA]), colesterol (utilizando reagentes de cloreto de ferro) e proteínas totais (procedimento com biureto). Valores artificialmente induzidos ocorrem em algumas determinações laboratoriais

Tabela 3.3 Alterações nas concentrações séricas (ou nas atividades) de determinados constituintes em razão da lise de eritrócitos

Constituinte	Relação entre a concentração (ou a atividade) nos eritrócitos e a concentração (ou a atividade) no soro	Alteração da concentração (ou da atividade) no soro após lise de 1% de eritrócitos, supondo um hematócrito de 0,50 (%)
Lactato desidrogenase	160 : 1	+272,0
Aspartato aminotransferase (AST)	40 : 1	+220,0
Potássio	23 : 1	+24,4
Alanina aminotransferase (ALT)	6,7 : 1	+55,0
Glicose	0,82 : 1	−5,0
Fosfato inorgânico	0,78 : 1	+9,1
Sódio	0,11 : 1	−1,0
Cálcio	0,10 : 1	+2,9

Modificado de Caraway WT, Kammeyer CW: Chemical interference by drug and other substances with clinical laboratory test procedures. Clin Chem Acta 1972; 41:395; and Laessig RH, Hassermer DJ, Paskay TA et al: The effects of 0.1 and 1.0 percent erythrocytes and hemolysis on serum chemistry values. Am J Clin Pathol 1976; 66:639-644, com autorização.

quando o nível de triglicerídeos (opacidade) está elevado por causa da absorvência luminosa de várias partículas lipídicas. O aspecto leitoso ocorre quando o nível sérico de triglicerídeos é superior a 4,6 mmol/L (400 mg/dL). A inibição de ensaios para amilase, urato, ureia, creatina quinase, bilirrubinas e proteínas totais pode ser observada. Para corrigir leituras artificiais de absorvência, procedimentos de "neutralização" (a amostra neutra contém soro, mas não apresenta um elemento crucial para completar o exame) ou métodos de dois comprimentos de onda podem ser utilizados. Um processo de neutralização pode não ser efetivo em alguns casos de turvação, e a ultracentrifugação pode ser necessária.

Rejeição de amostra

Todas as amostras devem ser coletadas, rotuladas, transportadas e processadas de acordo com os procedimentos estabelecidos, que incluem o volume da amostra, a necessidade de manipulações especiais e o tipo de recipiente. O não cumprimento de procedimentos específicos pode levar à rejeição da amostra. Tipo inadequado de amostra, preservativo errado, hemólise, lipemia, coágulos etc. são razões de rejeição. Além de ser onerosa e consumir tempo, a rejeição da amostra pode causar prejuízo ao paciente. Por essa razão, é essencial treinar bem a equipe em todos os aspectos da coleta, do transporte e do processamento de amostras. A Tabela 3.4 apresenta uma lista de várias razões de rejeição de amostra.

Visão geral da coleta de sangue

A punção venosa é realizada com um conjunto de agulha/adaptador conectado a um tubo de ensaio de vidro/plástico de coleta a vácuo e tampa de borracha/plástico. O sangue também pode ser coletado em uma seringa e transferido para o recipiente de amostra adequado (sistema de tubo a vácuo). A seringa pode ser útil para coletar amostra da mão, do tornozelo ou de crianças pequenas. Além disso, pacientes com veias pequenas ou ruins podem apresentar colapso venoso com o uso de um sistema de tubo de coleta a vácuo. No entanto, este último sistema é recomendado para limitar a exposição do flebotomista a picadas de agulha acidentais.

As tampas possuem um código de cor para diferenciar se o tubo contém um anticoagulante ou aditivo específico ou se ele é um tubo especial quimicamente limpo (p. ex., para determinações de chumbo ou ferro) ou um tubo simples sem aditivos. A Tabela 3.5 apresenta uma lista dos anticoagulantes/aditivos mais utilizados

Tabela 3.4 Razões para rejeição de amostra

Hemólise/lipemia
Coágulos presentes em uma amostra anticoagulada
Amostra coletada com o paciente não estando em jejum quando o jejum para o exame é obrigatório
Tubo de coleta de sangue inadequado
Coleta de quantidade inadequada, volume incorreto
Condições inadequadas de transporte (gelo para gasometria)
Discrepâncias entre a requisição e a etiqueta da amostra
Amostra sem identificação ou identificada erroneamente
Amostra contaminada/recipiente com vazamento

Tabela 3.5 Cor do tubo e anticoagulante/aditivo

Cor da tampa	Anticoagulante/aditivo	Tipo de amostra/uso	Mecanismo de ação
Vermelho (vidro)	Nenhum	Soro/bioquímica e sorologia	Indisponível
Vermelho (plástico/Hemogard)	Ativador da coagulação	Soro/bioquímica e sorologia	Ativador da coagulação de sílica
Lavanda (vidro)	K_3EDTA na forma líquida	Plasma/hematologia	Quelação (ligação) do cálcio
Lavanda (plástico)	K_2EDTA/seco com *spray*	Plasma/hematologia	Quelação (ligação) do cálcio
Rosa	K_2EDTA /seco com *spray*	Plasma/banco de sangue	Quelação (ligação) do cálcio
Branco	EDTA e gel	Plasma/biologia molecular	Quelação (ligação) do cálcio
Azul-claro	Citrato de sódio	Plasma/coagulação	Quelação (ligação) do cálcio
Azul-claro	Trombina e inibidor da tripsina de soja	Plasma/coagulação	Bom para produtos da degradação da fibrina
Preto	Citrato de sódio	Plasma/VHS – hematologia	Quelação (ligação) do cálcio
Verde-claro/preto	Heparina lítica e gel	Plasma/bioquímica	Inibe a formação de trombina
Verde	Heparina sódica, heparina lítica	Plasma/bioquímica	Inibe a formação de trombina
Azul royal	Heparina sódica, Na_2EDTA	Plasma/bioquímica/toxicologia	A heparina inibe a formação de trombina Na_2EDTA liga o cálcio
Cinza	Fluoreto de sódio e iodoacetato de lítio	Plasma/glicemia	Inibe a glicólise
Amarelo	Estéril com polianetolesulfonato de sódio (SPS)	Soro/cultura de microbiologia	Ajuda na recuperação bacteriana inibindo complemento, fagócitos e certos antibióticos
Amarelo	Ácido dextrose acetato (ACD)	Soro/banco de sangue, fenotipagem HLA e teste de paternidade	Preservativo de eritrócitos
Marrom (vidro)	Heparina sódica	Plasma/dosagem de chumbo	Inibe a formação de trombina
Marrom (plástico)	K_2EDTA	Plasma/dosagem de chumbo	Quelação (ligação) do cálcio
Amarelo/cinza e laranja	Trombina	Soro/bioquímica	Ativador da coágulo
Vermelho/cinza e dourado	Gel separador do ativador da coagulação	Soro/bioquímica	Ativador de coágulo de sílica

com base no código de cor das tampas dos tubos. Os tubos apresentam vários tamanhos, por exemplo, 2, 5, 7 ou 10 mL. O uso de anticoagulantes permite a análise de amostras de sangue total ou de constituintes do plasma obtidos por centrifugação e separação do plasma. O plasma contém fibrinogênio, o qual não está presente no soro. Muitos laboratórios substituíram tubos de vidro por tubos de plástico para minimizar a exposição a riscos biológicos (p. ex., sangue) e vidro quebrado; diminuir o custo de descarte de resíduos com risco biológico; e cumprir as políticas da Occupational Safety and Health Administration (OSHA), que exigem a substituição. Essa troca do vidro pelo plástico levou a uma modificação na ordem da coleta. Historicamente, tubos com aditivos, incluindo aqueles com gel, eram coletados após o tubo citrato (tampa azul), para evitar a interferência nas mensurações da coagulação. A ordem da coleta era: tubos de hemocultura, tubos com tampa vermelha sem aditivos, tubos de coagulação (citrato) e, sequencialmente, tubos aditivos com gel, heparina, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e oxalato/fluoreto. Agora que tubos de coleta de sangue são utilizados, a ordem de coleta foi revisada (Tab. 3.6). Tubos de soro de plástico, com ou sem um ativador de coagulação ou separador gel, são coletados após o tubo citrato e antes de outros tubos com aditivos, embora uma disposição nas políticas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (H3-A5) permita a opção de coletar em tubos de vidro de soro sem aditivo antes do tubo citrato (Ernst, 2004).

Tabela 3.6 Ordem de coleta: tubo evacuado e seringa

1. Tubos de sangue-cultura (amarelo)
2. Tubo de sódio-citrato (tampa azul)
3. Tubos de soro com ou sem ativador de coágulo ou gel separador
4. Tubos com heparina com ou sem gel (tampa verde)
5. Tubos com EDTA (tampa lavanda)
6. Tubos com inibidor glicolítico (tampa cinza)

Anticoagulantes e aditivos

O EDTA é o anticoagulante de escolha para a contagem de células sanguíneas e para a morfologia celular. Ele está disponível nos tubos com tampa lavanda como um líquido ou uma forma de sal di ou tripotássico seco com *spray* (K_2EDTA em plástico, seco com *spray* e K_3EDTA na forma líquida em tubos de vidro). O K_3EDTA é um líquido e diluirá a amostra a ~1 a 2%. O K_2EDTA é seco com *spray* sobre as paredes do tubo e não dilui a amostra. Tubos com tampa rosa também contêm EDTA. O EDTA é K_2EDTA seco com *spray*. Os tubos rosas são utilizados na imuno-hematologia para a tipagem ABO, tipagem Rh e detecção de anticorpos. Esses tubos possuem um rótulo especial de *crossmatch* para informações exigidas pela American Association of Blood Banks (AABB) e aprovada pela FDA para as coletas de banco de sangue. Tubos com tampa branca também contêm EDTA e gel. Eles são mais utilizados para exames de biologia molecular. Para exames de coagulação, um tubo com tampa azul claro, contendo 0,105 ou 0,129 M (3,2 e 3,8%) de citrato de sódio, é comumente utilizado porque ele preserva os fatores de coagulação lábeis. Tubos com tampa preta também contêm citrato de sódio tamponado e, em geral, são utilizados para a velocidade de hemossedimentação (VHS) Westergren. Eles diferem dos tubos com tampa azul-clara na relação sangue:anticoagulante. Nos tubos com tampa preta, a relação é de 4:1, enquanto nos tubos com tampa azul-clara ela é de 9:1.

A heparina, um ácido mucoitina polissulfúrico, é um anticoagulante efetivo em pequenas quantidades e sem efeito significativo sobre muitas determinações. A heparina foi originalmente isolada de células hepáticas por cientistas que buscavam um anticoagulante que poderia agir com segurança em humanos. A heparina está disponível como heparina lítio (LiHep) e heparina sódica (NaHep) em tubos com tampa verde. A heparina acelera a ação da antitrombina III, neutralizando a trombina e prevenindo a formação de fibrina. A heparina apresenta uma vantagem em relação ao EDTA como anticoagulante: ela não afeta os níveis de íons (p. ex., cálcio). No entanto, ela pode interferir em alguns imunoensaios. A heparina não deve ser utilizada para exames de coagulação ou hematológicos. O plasma heparinizado é preferido para a dosagem de potássio para se evitar uma elevação decorrente da liberação de potássio das plaquetas quando o sangue coagula (Garza, 2002). A heparina lítio pode ser utilizada para a maioria dos exames bioquímicos, exceto para a dosagem de lítio e folato. Para o lítio, pode ser usado um tubo com heparina sódica com tampa azul real, Na_2EDTA. A heparina sódica não pode ser utilizada para a dosagem de sódio, mas ela é recomendada para a dosagem de oligoelementos e chumbo e para exames toxicológicos. A heparina sódica é a forma injetável usada para a terapia anticoagulante.

Tubos com tampa cinza em geral são utilizados para a dosagem de glicose porque eles contêm um preservativo ou agente antiglicolítico (p. ex., fluoreto de sódio e iodoacetato de lítio). O fluoreto de sódio previne a glicólise por 3 dias, e o iodoacetato a previne por 24 horas (Strasinger, 2003). Na septicemia bacteriana, a inibição da glicólise pelo fluoreto não é adequada nem eficaz na preservação da concentração de glicose.

Tubos com tampa vermelha não possuem aditivo, por isso o sangue coletado neles coagula. Os tubos com tampa vermelha são utilizados para a maioria dos exames bioquímicos, banco de sangue e imunologia. Tubos com separador de soro integrado estão disponíveis para isolamento do soro do sangue total. Durante a centrifugação, o sangue é forçado para o interior de um gel tixotrópico localizado na base do tubo. O gel sofre uma alteração temporária da viscosidade durante a centrifugação e aloja-se entre as células concentradas e a camada superior de soro (Strasinger, 2003). Tubos de tamanho pediátrico também estão disponíveis. As vantagens dos tubos com separador de soro são: (1) facilidade de uso, (2) menor tempo de processamento por meio da ativação do coágulo, (3) maior produção de soro, (4) liberação mínima de aerossóis potencialmente perigosos, (5) apenas uma etapa de centrifugação, (6) uso do mesmo tubo no qual a amostra do paciente foi coletada e (7) facilidade de uma única identificação. Uma vantagem única é que as amostras centrifugadas podem ser transportadas sem prejudicar a separação. Alguns tubos com separador de soro com sílica gel podem dar origem a partículas minúsculas, que podem causar problemas de fluxo durante a análise. A filtração do soro resolve o problema.

Existem alguns tubos especializados. Tubos com tampa de cor vermelha/cinza e dourada contêm um ativador de coágulo e gel separador. Esses tubos são denominados tubos separador de soro e são usados sobretudo em exames bioquímicos.

Amostras para monitoração de medicamentos não devem ser coletadas em tubos que contêm gel separador, porque alguns géis absorvem certos fármacos, provocando resultados falsamente baixos. Diminuições significativas de níveis de fenitoína, fenobarbital, lidocaína, quinidina e carbamazepina foram relatadas durante a coleta de amostras em tubos Vacutainer SST, enquanto não foram observadas alterações nos níveis de teofilina e salicilato. O armazenamento em tubos de coleta padrão Vacutainer com tampa vermelha sem gel separador não afetou a mensuração do nível dos medicamentos acima citados (Dasgupta, 1994). Estudos indicam que essa absorção é dependente do tempo e, por essa razão, a velocidade de processamento minimiza a absorção. Os géis de acrílico não apresentam problemas de absorção associados aos géis de silicone e poliéster (Garza, 2002). Estudos de tubos Vacutainer SST II indicam que a maior parte dos medicamentos mantém-se estável por 24 horas com o novo gel. Os tubos SSt II relatam que eles são efetivos na coleta de sangue para a monitoração de fármacos (Bush, 2001).

Tubos com géis não são utilizados para exames de banco de sangue ou exames imunológicos porque o gel pode interferir nas reações imunológicas (Strasinger, 2003). O tempo de coagulação para tubos que usam separador gel é de aproximadamente 30 minutos, enquanto os tubos que possuem dois ativadores de coágulo (p. ex., trombina) coagularão em 5 minutos. Tubos simples sem aditivos com tampa vermelha levam aproximadamente 60 minutos para coagular por completo (Strasinger, 2003).

Anticoagulantes podem afetar o transporte de água entre as células e o plasma e, como consequência, podem alterar o tamanho das células e a concentração de constituintes plasmáticos. Anticoagulantes oxalato podem reduzir o tamanho de eritrócitos e, por essa razão, o sangue anticoagulado com oxalato não pode ser utilizado para se mensurar

o hematócrito. A combinação amônio/oxalato de potássio não tem o mesmo efeito. O EDTA, o citrato e o cálcio causam quelação do oxalato e, como consequência, reduzem o nível de cálcio. O fluoreto, utilizado para a determinação da glicose, previne a glicólise formando um complexo iônico com o Mg^{++} e, dessa forma, inibe a enzima enolase que depende do Mg^{++} (Young, 2001). A Tabela 3.7 apresenta uma lista de anticoagulantes/aditivos e seus efeitos sobre vários exames de sangue.

Dispositivos de coleta de sangue

O sistema de coleta de sangue mais comum utiliza um vácuo para coletar sangue em um recipiente. Ele consiste em um tubo de coleta a vácuo com código de cor, uma agulha com duas pontas e um adaptador/mandril. Tubos pequenos estão disponíveis para coleta de amostras de pacientes pediátricos e geriátricos. O recipiente de coleta de sangue suporta vários tamanhos (gauge) de agulhas para coleta de sangue. O tamanho das agulhas varia de grande (16 gauge) a pequeno (23 gauge). Existem vários tipos de mandril destinados a ejetar a agulha após o uso. Políticas recentes da OSHA exigem que os adaptadores sejam descartados com a agulha utilizada (OSHA: Needlestick Safety Prevention Act, 2002). Existem introdutores pediátricos para adaptadores; eles acomodam o menor diâmetro dos tubos de coleta de sangue pediátricos. Também existe uma variedade de agulhas de segurança que cobrem a agulha após o uso ou retraem-na antes de ser descartada.

Agulhas do tipo *butterfly* podem ser utilizadas para coletar sangue de veias muito pequenas. Os tamanhos das agulhas *butterfly* são 21, 23 e 25 gauge. Essas agulhas possuem asas plásticas fixadas na extremidade que ajudam na sua inserção em uma veia pequena. O tubo é fixado à extremidade proximal da agulha, que termina com um adaptador para conexão a uma seringa ou a um recipiente de coleta a vácuo. Todo esforço deve ser feito para proteger o flebotomista contra uma picada causada por uma agulha usada ao fazer uso de uma do tipo *butterfly*.

O sangue coletado em uma seringa pode ser transferido para um tubo a vácuo. Existem dispositivos especiais de segurança para seringa com o objetivo de evitar o contato desnecessário com a amostra de sangue. Se o sangue necessitar de anticoagulação, a velocidade torna-se um fator importante, e o sangue deve ser transferido antes que comece a formação de coágulo. Após o sangue ser transferido, a amostra deve ser bem misturada no tubo com anticoagulante para evitar a formação de pequenos coágulos.

Várias peças adicionais são necessárias para o equipamento de flebotomia. Um garrote, usualmente uma faixa de látex ou um pedaço de tubo, é utilizado para ocluir a veia antes da coleta de sangue, e ele é descartado após cada flebotomia. As políticas da OSHA orientam que luvas sejam utilizadas para a realização de uma flebotomia e que sejam descartadas após o atendimento a cada paciente. As luvas estão disponíveis em vários tamanhos e são feitas de vários materiais para evitar a sensibilidade ao látex apresentada por alguns indivíduos. Outros suprimentos incluem gazes, lenços umedecidos com álcool ou iodo para desinfecção do local de punção e um Band-Aid para prevenir o sangramento após a flebotomia.

Armazenamento e preservação do sangue

Durante o armazenamento, a concentração de um constituinte sanguíneo na amostra pode mudar em decorrência de vários processos, incluindo a adsorção aos tubos de vidro ou plástico, a desnaturação proteica, a evaporação de compostos voláteis, o movimento de água para o interior das células, resultando em hemoconcentração do soro e do plasma, e a atividade metabólica contínua de leucócitos e eritrócitos. Essas alterações ocorrem, em graus variados, na temperatura ambiente e durante a refrigeração ou o congelamento. As exigências de armazenamento variam muito de acordo com a substância que deverá ser analisada.

Estudos da estabilidade demonstraram que ocorrem alterações clinicamente importantes do analito quando o soro ou o plasma permanece em contato prolongado com as células sanguíneas. Após a separação das células sanguíneas, os analitos apresentam a mesma estabilidade no plasma e no soro quando armazenados sob as mesmas condições. A concentração de glicose no soro e no plasma não separado diminui rapidamente nas primeiras 24 horas e de forma mais lenta a seguir. Essa diminuição é mais pronunciada no plasma. O nível de lactato eleva-se quando um

Tabela 3.7 Efeito de anticoagulante/aditivo sobre vários testes sanguíneos

Aditivo	Teste	Efeitos
EDTA	Fosfatase alcalina	Inibe
	Creatina quinase	Inibe
	Leucina aminopeptidase	Inibe
	Cálcio e ferro	Diminuem
	TP e TTP	Aumentam
	Sódio e potássio	Aumentam
	Agregação plaquetária	Previne
Oxalato	Fosfatase ácida	Inibe
	Fosfatase alcalina	Inibe
	Amilase	Inibe
	LDH	Inibe
	Cálcio	Diminui
	Sódio e potássio	Aumentam
	Morfologia celular	Distorce
Citrato	ALT, AST	Inibe
	Fosfatase alcalina	Inibe
	Fosfatase ácida	Estimula
	Amilase	Diminui
	Cálcio	Diminui
	Sódio e potássio	Aumentam
	Fatores da coagulação lábeis	Preservam
Heparina	Tri-iodotironina	Aumenta
	Tiroxina	Aumenta
	TP e TTP	Aumentam
	Corante de Wright	Causa fundo azul
	Lítio (somente tubos LiHep)	Aumenta
	Sódio (somente tubos NaHep)	Aumenta
Fluoretos	Fosfatase ácida	Diminui
	Fosfatase alcalina	Diminui
	Amilase	Diminui
	Creatina quinase	Diminui
	ALT e AST	Diminuem
	Morfologia celular	Distorce

aumento maior é observado no plasma em relação ao soro. O nível de cloreto e a concentração de dióxido de carbono total (tCO_2) mostram uma diminuição constante ao longo de 56 horas, com o grau de alteração mais pronunciado no plasma. Foi relatado que o K^+ é estável por até 24 horas e, em seguida, ocorre um aumento rápido. O grau de alteração é discretamente mais pronunciado no plasma. Considerando-se os parâmetros clínicos, o soro e o plasma não separados produzem aumentos significativos nos níveis de bilirrubinas totais, sódio, ureia, nitrogênio, albumina, cálcio, magnésio e proteínas totais. Essas alterações são atribuídas ao movimento de água para o interior das células após 24 horas, resultando em hemoconcentração (Boyanton, 2002). Outros estudos observaram que o potássio, o fósforo e a glicose são os analitos menos estáveis no soro não removido do coágulo em 30 minutos. Foi observada a instabilidade após 6 horas de albumina, bicarbonato, cloreto, peptídeo C, HDL-colesterol, ferro, LDL-colesterol e proteínas totais quando o soro não foi separado do coágulo (Zhang, 1998).

Quando o soro e o plasma não são removidos das células, lipídeos (p. ex., colesterol) e algumas enzimas aumentam ao longo do tempo, com uma alteração mais pronunciada no plasma que no soro. A atividade da lactato desidrogenase aumenta continuamente ao longo de 56 horas. Foi observado que transaminases e creatina quinase permanecem estáveis ao longo de 56 horas. Foi observado que a atividade da γ-GT no plasma, com ou sem contato prolongado com células, é 27% menor que no soro na primeira meia hora. No entanto, a atividade plasmática da γ-GT sofre um aumento constante com a exposição prolongada às células. A creatinina aumenta 110% no plasma e 60% no soro após 24 horas (Boyanton, 2002).

O soro e o plasma podem produzir resultados significativamente diferentes de uma análise. Por exemplo, quando os resultados da dosagem de paratormônio no soro e no plasma com EDTA de amostras congeladas em 30 minutos após a coleta são comparados, os resultados do plasma com EDTA são significativamente mais altos (> 19%) que

aqueles obtidos no soro (Omar, 2001). O efeito dos ciclos de congelamento-descongelamento sobre a estabilidade dos constituintes é uma consideração importante. Em amostras de plasma ou soro, os cristais de gelo formados causam efeitos de cisalhamento que destroem a estrutura molecular, em particular de grandes moléculas proteicas. O congelamento lento permite a formação de cristais maiores, produzindo efeitos de degradação mais sérios. Portanto, o congelamento rápido é recomendado para a estabilidade ideal.

Importância de políticas e procedimentos

É essencial que sejam estabelecidas políticas relativas à flebotomia e procedimentos específicos para a instituição e que incluem: padrões de pessoal com qualificações, código de vestimenta e procedimentos de avaliação; protocolos de segurança incluindo recomendações de imunização, precauções universais, informações sobre acidentes com agulha e objetos pontiagudos, equipamentos de proteção individual; procedimentos de solicitação de exames; identificação, confidencialidade e preparo do paciente e registro de problemas encontrados durante a coleta de sangue; seleção do local de punção e áreas que devem ser evitadas (lado de uma mastectomia, área edematosa, área queimada ou com cicatriz etc.); anticoagulante e cor do tubo; ordem da coleta; requerimentos especiais para pacientes em isolamento; e transporte de amostras. O laboratório deve ter todas as políticas do CDC, CAP, NCCLS, OSHA e JCAHO, assim como outras regulamentações governamentais pertinentes a testes laboratoriais. Todos os funcionários devem ser treinados em relação aos procedimentos de segurança, e um plano de controle escrito de exposição a agentes hematógenos deve estar disponível. No Capítulo 1 há uma análise mais completa sobre a segurança. A OSHA (OSHA: Bloodborne Pathogens Standard) concluiu que a melhor prática para a prevenção de lesões por agulha após uma flebotomia é o uso de um dispositivo com proteção contra lesão conectado ao mandril do tubo de coleta de sangue e o descarte imediato de todo o sistema após a coleta de sangue de cada paciente (OSHA, 2001). Informações sobre a prevenção da exposição podem ser encontradas na Exposure Prevention Information Network (EPINet), uma base de dados coordenada pelo International Healthcare Worker Safety Center da Universidade de Virgínia (http://www.healthsystem.virginia.edu/Internet/epinet/). Além disso, a OSHA exige que os empregadores disponibilizem recipientes resistentes à perfuração e ao vazamento, que podem ser fechados e identificados e com código de cor. Os recipientes devem possuir uma abertura que seja grande o suficiente para que o conjunto inteiro de coleta de sangue (i. e., tubo de sangue, mandril e agulha) consiga passar. Esses recipientes devem ser de fácil acesso para os funcionários, na área próxima à área de uso e, se os funcionários passam de um local a outro (p. ex., de um quarto a outro), eles devem ter à disposição um recipiente para objetos perfurantes convenientemente colocado em cada local/instalação. Os funcionários devem manter um registro de lesões por objetos pontiagudos para registrar lesões percutâneas com objetos perfurantes contaminados e, ao mesmo tempo, proteger a confidencialidade do funcionário lesado.

Técnicas de coleta de sangue

A Tabela 3.8 apresenta um sumário da técnica de coleta de sangue venoso (CLSI H3-A5, 2003).

Punção arterial

Punções arteriais são tecnicamente mais difíceis de serem realizadas que punções venosas. A maior pressão nas artérias dificulta a interrupção do sangramento, com o desenvolvimento indesejado de um hematoma. Em ordem de preferência, as artérias radial, braquial e femoral podem ser selecionadas. Locais inaceitáveis são as áreas irritadas, edematosas, próximas a uma ferida ou em uma área em que existe um *shunt* ou uma fístula arteriovenosa (AV) (McCall, 1993). O espasmo arterial é uma constrição reflexa que restringe o fluxo sanguíneo com possíveis consequências graves sobre a circulação e a perfusão tissular. A punção da artéria radial pode ser dolorosa e associada a sintomas como dor, latejamento, sensibilidade, sensação de picada e câimbra. Algumas vezes, não é prático ou possível a obtenção de sangue arterial de um paciente para a realização de uma gasometria. Nessas circunstâncias, uma outra fonte de sangue deve ser obtida, reconhecendo-se que o sangue arterial provê um resultado mais acurado. Embora seja mais fácil obter o sangue venoso, ele em geral reflete a condição ácido-básica de uma extremidade, e não do corpo como um todo.

Tabela 3.8 Técnica de punção venosa

1. Verificar se as etiquetas impressas estão de acordo com as requisições. Checar a pulseira de identificação do paciente e compará-la com as etiquetas e os formulários de requisição. Perguntar ao paciente o seu nome completo
2. Quando a amostra deve ser coletada em jejum, confirmar se a solicitação de jejum foi seguida
3. Posicionar o paciente adequadamente. Reunir equipamentos e suprimentos
4. Pedir ao paciente que cerre o punho. Selecionar uma veia adequada para punção. Limpar o local da punção venosa. Permitir a secagem da área. Aplicar um torniquete vários centímetros acima do local de punção
5. Fixar firmemente a veia
6. Penetrar a agulha na pele em um ângulo de aproximadamente 15 graus em relação ao membro superior, com o bisel da agulha virado para cima
   a. Seguir o trajeto da veia com a agulha
   b. Inserir a agulha suave e rapidamente para minimizar o desconforto do paciente
   c. Se for utilizar uma seringa, recuar o êmbolo lentamente com uma tensão homogênea enquanto o sangue flui para o interior da seringa. Não recuar o êmbolo muito rapidamente para evitar a hemólise ou o colapso da veia
   d. Se for utilizar um sistema evacuado, assim que a agulha estiver na veia, liberar o tubo ao máximo para a frente no suporte, segurando firmemente o suporte da agulha no local. Quando o tubo estiver cheio, removê-lo segurando a sua extremidade e tracionando-o delicadamente
7. Liberar o torniquete quando o sangue começar a fluir. Nunca remover a agulha sem antes remover o torniquete
8. Remover a agulha e, em seguida, aplicar uma pressão sobre o local. Sobre uma bola de algodão ou uma gaze, aplicar uma fita adesiva para interromper o sangramento e evitar a formação de hematoma
9. Misturar e inverter tubos com anticoagulante. Não sacudir o tubo. Verificar a condição do paciente. Descartar materiais contaminados em recipientes adequados (recipiente para materiais cortantes) utilizando as Precauções Universais
10. Rubricar as etiquetas e registrar o horário de coleta das amostras
11. Encaminhar tubos de sangue para a seção adequada do laboratório ou para a área central de recepção e processamento

Antes de o sangue ser coletado de uma artéria radial (no punho), deve-se realizar o teste de Allen modificado (Tab. 3.9) para determinar se a artéria ulnar pode prover uma circulação colateral para a mão após a punção da artéria radial.

As artérias radial e braquial são as preferidas para punção arterial. A artéria femoral é relativamente grande e fácil de ser puncionada, mas deve-se ter um cuidado especial em indivíduos mais velhos porque ela pode sangrar de maneira mais fácil que a artéria radial ou braquial. Como o local de sangramento é escondido pelas cobertas, ele pode passar desapercebido até o sangramento ser maciço.

A artéria radial é mais difícil de ser puncionada, mas a ocorrência de complicações é menos frequente. As principais complicações da punção arterial incluem a trombose, hemorragia e possível infecção. Quando realizada de modo correto, não são relatadas complicações importantes, com exceção de possíveis hematomas.

Técnica de punção arterial

A artéria a ser puncionada é identificada por sua pulsação e limpa com solução aquosa de isopropanol a 70% seguida por iodo. Uma punção arterial sem anestesia permite a mensuração adequada do PH e da PCO_2 em repouso, apesar de ser possível a ocorrência de um erro teórico decorrente da hiperventilação do paciente por causa da dor da punção arterial. O uso de agulha tipo *butterfly* não é recomendado. O uso de uma agulha 19 gauge em vez de uma 25 gauge não causa variação superior a 1 mmHg na PCO_2 nem na PO_2. A quantidade de anticoagulante deve ser de 0,05 mL de heparina líquida (1.000 UI/mL) para cada mililitro de sangue. O uso de muita heparina é provavelmente

Tabela 3.9 Teste de Allen modificado

1. Solicitar ao paciente que cerre o punho e ocluir as artérias ulnar (oposta ao lado do polegar) e radial (mais próxima do polegar), comprimindo-as com dois dedos
2. Pedir ao paciente que abra a mão e observar se a palma da mão tornou-se pálida
3. Liberar a pressão apenas sobre a artéria ulnar (mais distante do polegar) e observar se ocorre retorno do sangue. A palma deve se tornar perfundida com sangue. A perfusão adequada é um teste positivo que indica que o sangue arterial pode ser coletado da artéria radial. O sangue não deve ser coletado em caso de teste negativo. Consequências graves podem ocorrer se esse procedimento não for realizado e pode acarretar perda da mão ou de sua função

o erro pré-analítico mais comum na realização da gasometria (Garza, 2002). A Tabela 3.10 apresenta o procedimento de punção arterial (CLSI H11-A4, 2004).

Punção cutânea

A punção cutânea é o método de escolha para pacientes pediátricos, em especial para os lactentes. A grande quantidade de sangue necessária por meio de repetidas punções venosas pode causar anemia iatrogênica, especialmente em prematuros. A punção de veias profundas em pacientes pediátricos também pode causar, em raros casos, (1) parada cardíaca, (2) hemorragia, (3) trombose, (4) venoconstrição seguida por gangrena de uma extremidade, (5) lesão de órgãos ou tecidos puncionados acidentalmente e (6) infecção. Veias acessíveis em crianças doentes devem ser reservadas com exclusividade para a terapia parenteral. A punção cutânea é útil em adultos com (1) obesidade extrema, (2) queimaduras graves e (3) tendência à trombose. A punção cutânea é, com frequência, preferida em pacientes geriátricos, porque a pele é mais fina e menos elástica. Como resultado, é maior a possibilidade de ocorrer um hematoma em decorrência de uma punção venosa.

Em recém-nascidos, a punção cutânea é utilizada com frequência para a coleta de uma amostra para a dosagem de bilirrubinas. Exames de investigação de erros inatos do metabolismo e de tempo de sangramento também são realizados com sangue coletado por meio de punção venosa. A normalização do procedimento de tempo de sangramento que controla a pressão arterial e a profundidade do *stick* é essencial para obter informações úteis. Punções do calcanhar são mais utilizadas para a investigação de doenças metabólicas. Em populações pediátricas mais velhas, é possível coletar sangue do lobo da orelha, mas em recém-nascidos e lactentes, não é prático coletar sangue dessa região e, por essa razão, o sangue do calcanhar é mais utilizado. Uma picada profunda no calcanhar é feita na extremidade distal da eminência calcanear após um período de exposição de 5 a 10 minutos à água morna. O melhor método para a coleta de sangue para gasometria no recém-nascido ainda é o cateter de demora de artéria umbilical. A Tabela 3.11 apresenta as etapas de uma punção cutânea (CLSI H4-A5, 2004).

Dispositivos de acesso venoso central

Dispositivos de acesso venoso central permitem o acesso imediato à circulação do paciente, eliminando múltiplas flebotomias, e são particularmente úteis na terapia intensiva e em condições cirúrgicas. Cateteres de demora são inseridos de maneira cirúrgica na veia cefálica ou nas veias jugular interna, subclávia ou femoral e podem ser utilizados para coleta de sangue, administração de medicamentos, hemoderivados e nutrição parenteral total. A monitoração intra-arterial contínua e em tempo real dos gases sanguíneos e da condição acidobásica tem sido realizada com canais de fibra óptica contendo analitos químicos fluorescentes e absorventes (Smith, 1992).

Técnica de coleta por meio de acesso venoso central

Amostras de sangue coletadas por meio de cateteres podem ser contaminadas com qualquer coisa que tenha sido administrada ou infundida via cateter. A solução (em geral heparina) utilizada para manter a permeabilidade da veia também deve ser eliminada antes da coleta de sangue para análise. Uma quantidade suficiente de sangue (mínimo de 2 a 5 mL) deve ser coletada para limpar o cateter, de modo que os dados laboratoriais sejam confiáveis. Portanto, é necessário um treinamento especializado antes de utilizar um cateter para a coleta de amostras de sangue. Para se obter uma amostra de sangue por meio de um cateter de demora, primeiramente são coletados e descartados 5 mL de líquido intravenoso. Em uma seringa separada, é coletada a quantidade necessária de sangue para os exames laboratoriais solicitados. Uma técnica rigorosa de assepsia deve ser seguida para se evitar a contaminação do local e/ou do cateter. Mensurações da coagulação, por exemplo, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e tempo de trombina (TT) são muito sensíveis à interferência da heparina. Por isso, volumes ainda maiores de sangue pré-coleta devem ser removidos para que os resultados desses exames sejam aceitáveis. O volume adequado a ser descartado deve ser estabelecido por cada laboratório.

Tabela 3.10 Procedimento de punção arterial

1. Preparar a seringa para gasometria arterial de acordo com os procedimentos estabelecidos. A agulha (18–20 gauge para a artéria braquial) deve perfurar a pele em um ângulo de aproximadamente 45 a 60 graus (90 graus para a artéria femoral) de maneira lenta e deliberada. É necessário um certo grau de dorsiflexão do punho em relação à artéria radial, para a qual é utilizada uma agulha 23 a 25 gauge. A pulsação do sangue na seringa confirma que ela encherá somente pela pressão arterial. Quando o êmbolo for recuado e o ar for aspirado, remover a seringa de imediato
2. Após a coleta de amostra de sangue, rodar a seringa delicadamente, misturando o sangue e a heparina. Colocar em água gelada (ou outro agente refrigerante que manterá uma temperatura de 1–5°C) para minimizar o consumo de oxigênio dos leucócitos. Após a punção arterial, deve-se realizar uma compressão com gaze estéril sobre o local da punção durante no mínimo 2 minutos e preferivelmente 5 minutos (cronometrados). Aplicar um curativo adesivo

Tabela 3.11 Técnica de punção cutânea

1. Selecionar um local adequado para punção. Para lactentes, o mais comum é a superfície lateral ou medial do calcanhar. Em crianças maiores, a superfície palmar da extremidade do segundo, do terceiro ou do quarto dedo da mão pode ser utilizada. Outros locais de punção cutânea são a superfície plantar do hálux, a face lateral de um dedo (adjacente à unha) e o lobo da orelha. O local de punção não deve apresentar edema nem deve ter sido puncionado anteriormente
2. Aquecer o local da punção com uma toalha aquecida e úmida. A temperatura deve ser inferior a 42°C. Isso aumenta o fluxo sanguíneo através das arteríolas e capilares e resulta em um sangue arterial enriquecido
3. Limpar o local da punção com uma solução aquosa de isopropanol a 70%. Permitir a secagem da área. Não tocar a área limpa com qualquer objeto não estéril
4. Realizar a punção com uma lanceta estéril ou outro dispositivo de punção cutânea, utilizando um único movimento intencional quase perpendicular à superfície cutânea. Para a punção calcanear, segurar o calcanhar com o dedo indicador no arco e o polegar no tornozelo, próximo ao local da punção. Se utilizar uma lanceta, a lâmina não deve ser maior do que 2,4 mm para evitar a lesão do calcâneo
5. Descartar a primeira gota de sangue, removendo-a com uma gaze estéril. Regular o fluxo sanguíneo por meio de uma pressão delicada com o polegar. Não "ordenhar" o local, porque isso pode causar hemólise e introduzir líquido tissular em excesso
6. Coletar a amostra em um recipiente adequado por meio da ação capilar. Existem sistemas fechados para coleta de sangue não anticoagulado e com aditivos para análise de sangue total. Micropipetas descartáveis de extremidade aberta e orifício estreito são mais utilizadas para volumes de 200 µL. Existem micropipetas heparinizadas e não heparinizadas. Utilizar o anticoagulante adequado para o exame solicitado. Misturar a amostra quando for necessário
7. Aplicar pressão e descartar o dispositivo de punção
8. Identificar o recipiente de amostra, indicando a data, o horário de coleta e os dados do paciente
9. Indicar no relatório que os resultados dos exames provêm de punção cutânea

Algumas vezes, é solicitado ao laboratório que realize hemocultura em sangue coletado de cateteres de demora. Como os cateteres de demora ficam no local alguns dias, esse procedimento não é recomendado porque microrganismos que crescem nas paredes do cateter podem contaminar a amostra de sangue. Cateteres, como cateteres venosos centrais, são utilizados para a infusão imediata de hemoderivados e apresentam uma menor probabilidade de serem contaminados. A determinação da contaminação do cateter exige uma manipulação especial e uma análise cuidadosa de múltiplas amostras do cateter e do sangue periférico. A Tabela 3.12 apresenta a ordem de coleta por meio de cateteres.

Tabela 3.12 Ordem de coleta de cateteres

1. Coletar de 3 a 5 mL em uma seringa e descartar
2. Sangue para hemocultura
3. Sangue para tubos anticoagulados (lavanda, verde, azul-claro etc.)
4. Sangue para tubos com ativador da coagulação (vermelho, SST etc.)

Coleta de urina e outros líquidos corporais

Urina

A coleta e a preservação de urina para exame analítico devem seguir um procedimento cuidadosamente prescrito para garantir resultados válidos. Os testes laboratoriais de urina em geral está incluída em três categorias: exame bioquímico, bacteriológico e microscópico. Também existem vários tipos de coleta de amostras de urina: aleatório, jato médio, tempo marcado, 24 horas e por meio de sondagem. Amostras aleatórias podem ser coletadas em qualquer momento, mas uma amostra da primeira urina da manhã é ideal para a concentração de constituintes, porque ela em geral é mais concentrada e apresenta um pH mais baixo por causa da diminuição da respiração durante o sono. Amostras aleatórias de urina devem ser coletadas em um recipiente quimicamente limpo, seja de vidro ou de plástico. Uma amostra de segundo jato é mais desejável para exames bacteriológicos. A coleta adequada de uma amostra de jato médio exige que o paciente limpe, em primeiro lugar, a sua genitália externa com um lenço antisséptico. Em seguida, ele inicia a micção, interrompe o jato médio e descarta a primeira porção de urina. Depois, ele coleta a urina remanescente em um recipiente estéril. Este é hermeticamente fechado, identificado com o nome do paciente e a data de coleta e enviado para análise. Um *kit* de amostras de jato médio (BD Vacutainer Systems) pode ser utilizado para remover uma alíquota do recipiente de coleta estéril e transportá-la ao laboratório. O sistema consiste em um adaptador que é conectado a um tubo estéril a vácuo amarelo. O vácuo aspira a urina para o interior do tubo estéril. O adaptador deve ser tratado como um sistema de montagem de agulha e deve ser descartado em um recipiente de materiais com risco biológico. Existe um produto similar para culturas: ele usa um tubo estéril com tampa cinza contendo 6,7 mg/L de ácido bórico e 3,335 mg/L de formiato de sódio e o dispositivo adaptador descrito acima (BD Vacutainer Systems).

Amostras de tempo marcado são obtidas em intervalos designados, iniciado do "horário zero". O horário de coleta é anotado em cada recipiente subsequente. Amostras de urina para uma coleta de 24 horas são mais difíceis de serem obtidas e exigem a cooperação do paciente. A coleta incompleta é o problema mais frequente. Em alguns casos, uma quantidade excessiva de amostras é coletada. A coleta hospitalar em geral é supervisionada por enfermeiros e comumente é mais confiável que as coletas ambulatoriais. Coletas pediátricas exigem uma atenção especial para evitar a contaminação por fezes. Para evitar problemas na coleta de amostras de 24 horas, podem ser fornecidas instruções escritas e verbais ao paciente com um aviso de que o exame pode ser invalidado pela técnica incorreta de coleta. O recipiente preferido é inquebrável, de cerca de 4 L, plástico e quimicamente limpo com o preservativo correto já adicionado. É preciso lembrar o paciente que ele deve descartar a primeira amostra da manhã, anotar o horário e coletar toda micção subsequente nas 24 horas seguintes. Uma abordagem simples é instruir o paciente a iniciar e terminar com a bexiga vazia. A coleta demasiada ocorre quando a primeira amostra matinal é incluída nessa rotina. O volume total é mensurado e registrado na solicitação, a amostra inteira de 24 horas é bem misturada, e uma alíquota de 40 mL é enviada para análise.

É difícil determinar se uma coleta é completa. Se os resultados parecerem inválidos em termos clínicos, isso é causa de suspeita. Como a excreção de creatinina é baseada na massa muscular e como a massa muscular de um paciente é relativamente constante, a excreção de creatinina também é razoavelmente constante. Por essa razão, pode-se mensurar a creatinina em várias coletas em um período de 24 horas, para avaliar se a amostra coletada é adequada e manter isso como parte do prontuário médico. Em alguns casos, a coleta de amostras de tempo marcado (1 e 2 horas) pode ser suficiente dependendo do analito que estiver sendo mensurado. O urobilinogênio está sujeito à variação diurna com o nível mais elevado, sendo atingido à tarde. Em geral, quando a dosagem de urobilinogênio é solicitada, a urina é coletada entre as 14 e 16 horas.

Técnicas especiais de coleta de urina

A sondagem uretral e vesical pode causar infecção, mas ela é necessária em alguns pacientes (p. ex., para coleta de urina quando o paciente é incapaz de urinar ou de controlar a micção). A aspiração suprapúbica é realizada com seringa e agulha acima da sínfise púbica, através da parede abdominal, atingindo a bexiga cheia. Esse método é utilizado para a realização de culturas anaeróbias problemáticas. Sondas ureterais também podem ser inseridas no ureter com o auxílio de um cistoscópio. A urina da bexiga é coletada em primeiro lugar e, em seguida, é realizada uma lavagem da bexiga. Amostras de urina ureteral são úteis na diferenciação entre infecção vesical e infecção renal ou para a análise ureteral diferencial, e podem ser obtidas separadamente de cada pelve renal (identificada como direita e esquerda). A primeira urina da manhã é ideal para o exame citológico.

Armazenamento e preservação da urina

A preservação de uma amostra de urina é essencial para a manutenção da sua integridade. Amostras de urina não preservadas estão sujeitas à decomposição microbiológica e às alterações químicas inerentes. A Tabela 3.13 apresenta uma lista de alterações comuns que ocorrem quando a urina se decompõe. Para prevenir o crescimento de microrganismos, a amostra deve ser refrigerada imediatamente após a coleta e, quando necessário, deve conter o preservativo químico indicado. Para algumas determinações, a adição de um preservativo químico pode afetar o resultado do exame. Por essa razão, a refrigeração pode

Tabela 3.13 Alterações na urina em razão do retardo dos testes

Resultado	Razão
Alteração de cor	Degradação ou alteração de cromogênio ou outro constituinte da urina (p. ex., hemoglobina, melanina, ácido homogentísico, porfirinas)
Alteração do odor	Crescimento bacteriano, decomposição
Aumento da opacidade	Aumento de bactérias, formação de cristais, precipitação de material amorfo
Falso pH baixo	Glicose convertida em ácidos e alcoóis por bactérias que produzem amônia. Perda de CO_2
Falso pH alto	Degradação da ureia por bactérias formando amônia
Falso-negativo para glicose	Utilização por bactérias (glicólise)
Falso-negativo para cetonas	Volatilização da acetona. Degradação de acetoacetato por bactérias
Falso-negativo para bilirrubinas	Destruição pela luz. Oxidação em biliverdina
Falso-negativo para urobilinogênio	Destruição pela luz
Falso-positivo para nitrito	Nitrito produzido por bactérias após a coleta da amostra
Falso-negativo para nitrito	Nitrito é convertido em nitrogênio e evapora
Aumento da bacteriúria	Bactérias multiplicam-se na amostra antes da análise
Desintegração de células/cilindros	Ambiente instável, em especial na urina alcalina e/ou na urina hipotônica

ser mais adequada. Quando um preservativo é adicionado a um frasco de coleta vazio, uma etiqueta de advertência deve ser colada no frasco. Advertências são necessárias (p. ex., queimaduras genitais causadas por ácido é uma ocorrência conhecida com o uso de ácidos concentrados como preservativos). Compostos sensíveis à luz são protegidos em frascos de plástico âmbar. Somente não ocorre precipitação de cálcio e fosfatos quando a urina é acidificada de forma adequada antes da análise.

É particularmente importante usar urina concentrada e recém-coletada para identificar cilindros, eritrócitos e leucócitos, uma vez que eles sofrem decomposição quando armazenados em temperatura ambiente ou com a concentração diminuída (densidade específica < 1,015). Eles desaparecem rapidamente na urina hipotônica e alcalina. As bilirrubinas e o urobilinogênio diminuem, em especial após a exposição à luz. A glicose e as cetonas podem ser consumidas, enquanto a contaminação bacteriana e a diminuição de CO_2 aumentam o pH. A turvação precipita, e a cor muda. Idealmente, amostras devem ser enviadas ao laboratório e analisadas em 1 hora após a coleta.

A urina pode ser congelada em alíquotas que serão examinadas em uma data posterior, apenas para análise química. Quando a repetição do exame é prevista, a amostra deve ser armazenada em múltiplas alíquotas para evitar a degradação da amostra como resultado de repetidos congelamentos-aquecimentos de uma única amostra. Preservativos também podem ser adicionados, dependendo da substância a ser testada. O fluoreto de sódio pode ser adicionado à urina de 24 horas para a determinação de glicose com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano e a glicólise celular, mas não o crescimento de fungos. Aproximadamente 0,5 g de fluoreto de sódio é adicionado em um recipiente de 3 a 4 L. O fluoreto de sódio pode inibir o reagente (enzima embutida) de glicofitas. Comprimidos contendo formaldeído, mercúrio e benzoato (comprimido de 95 mg/20 mL de urina) também têm sido utilizados. No entanto, esses preservativos aumentam a densidade específica (0,002/um comprimido/20 mL). O ácido bórico em uma concentração de 1 g/dL preserva elementos urinários (p. ex., estriol e estrogênios) por até 7 dias. O ácido bórico mantém o pH em aproximadamente 6,0 e preserva bem proteínas e elementos figurados sem interferir nos exames de rotina, exceto o pH. O ácido bórico é bacteriostático, não bactericida, e não inibe o crescimento de fungos. Foi relatado que o ácido bórico interfere na análise de fármacos e hormônios (Strasinger, 2001). Para a coleta de amostra para dosagem de catecolaminas, ácido vanilmandélico (VMA) ou ácido 5-hidróxi indolacético (5-HIAA), 10 mL de HCl 6N são adicionados a um recipiente de 3 a 4 L. O HCl estabelece um pH de aproximadamente < 3,0 que é bom para os testes químicos. Contudo, o baixo pH destrói elementos figurados e aumenta a precipitação de ácido úrico. O ácido concentrado também aumenta o risco de possíveis queimaduras químicas; o paciente deve ser advertido sobre o perigo potencial, e o recipiente deve ser rotulado de maneira adequada. A Tabela 3.14 apresenta uma lista de preservativos comumente utilizados para a coleta de amostra de 24 horas. O NCCLS para urinálise, coleta, transporte e preservação de amostras de urina aprovou políticas que fornecem informações úteis sobre vários preservativos recomendados para a coleta de amostra de urina de 24 horas (NCCLS, 2001).

Tabela 3.14 Preservativos para coleta de urina de 24 horas

Preservativo	Exames
Nenhum (refrigerar)	Aminoácidos, amilase, cloreto, cobre, creatinina, ácido delta-aminolevulínico, glicose, metais pesados (arsênico, chumbo, mercúrio), histamina, imunoeletroforese, lisozima, ácido metilmalônico, microalbumina, mucopolissacarídeos, porfobilinogênio, porfirinas, potássio, proteínas, eletroforese de proteínas, sódio, ureia, ácido úrico, tolerância à xilose
10 g de ácido bórico	Aldosterona, cortisol
10 mL de HCL 6N	Cálcio, catecolaminas, citrato, cistina, 5-HIAA, ácido homovanílico, hidroxiprolina, magnésio, metanefrinas, oxalato, fósforo, ácido vanilmandélico
0,5 g de fluoreto de sódio	Glicose
Quantidades iguais de álcool a 50%, fixador de Saccomanno, SurePath ou Preserve CT	Exame citológico

Outros líquidos corporais

Líquido cerebrospinal

Punções lombares são realizadas para a coleta de líquido cerebrospinal (LCE) para a avaliação laboratorial, a fim de estabelecer-se um diagnóstico de infecção (meningite bacteriana, fúngica, micobacteriana ou amebiana), processos malignos, hemorragia subaracnoide, esclerose múltipla ou doenças desmielinizantes. O local mais comum de punção lombar é entre a terceira e a quarta ou entre a quarta e a quinta vértebra lombar. Uma complicação séria da punção lombar é a herniação da amígdala cerebelar em pacientes com hipertensão intracraniana, e ela deve ser evitada, exceto quando se espera que achados no LCE possam melhorar o tratamento ou o resultado. Pacientes com tumores medulares e paresia podem evoluir para a paralisia após uma punção lombar. Pacientes com sépsis na região lombar (infecção cutânea, celulite ou abscesso epidural) não devem ser submetidos à punção lombar, para se evitar a introdução da infecção. Outras complicações da punção lombar incluem asfixia em lactentes por causa da hiperextensão da cabeça para a frente com consequente oclusão da traqueia, parestesia, cefaleia e, raramente, hematomas. O LCE também é coletado por meio da punção cisternal. Uma agulha é inserida na subaracnoide cisternal, que serve como reservatório de LCE entre o atlas e o osso occipital na região posterior da cabeça, ou por punção cervical lateral (Kjeldsberg, 1993). Amostras também podem ser coletadas por meio de cânula ventricular *(shunt)*, quando presente.

Antes da coleta do LCE, a pressão deve ser de 90 a 180 mmHg. Ela é mensurada permitindo-se que o líquido suba em um manômetro graduado estéril. A pressão pode aumentar (> 180 mmHg) com a suspensão da respiração, compressão abdominal, insuficiência cardíaca congestiva, inflamação meníngea, obstrução de seios venosos intracranianos, massas tumorais ou edema cerebral. Quando a pressão é normal, pode ser coletada uma amostra de 20 mL. No final, a pressão deve ser de 10 a 30 mmHg. Uma diminuição acentuada da pressão após esse procedimento sugere herniação cerebelar ou compressão medular. Como consequência, não se deve coletar uma quantidade adicional de LCE. Pacientes com bloqueio medular parcial ou completo podem apresentar uma pressão baixa (< 80 mmHg), a qual pode cair para zero após a remoção de apenas 1 mL. Mais uma vez, não deve ser coletada uma quantidade adicional de LCE. Não mais do que 2 mL podem ser coletados quando a pressão for superior a 200 mmHg. Em geral, são coletadas três alíquotas em tubos estéreis separados rotulados adequadamente com nome, data e número sequencial de coleta. As políticas hospitalares indicam qual tubo deve ser enviado para qual laboratório para análise. Em geral, recomenda-se que o Tubo 1 seja enviado para o laboratório de bioquímica para dosagem de glicose e proteínas ou para o laboratório de sorologia/imunologia. O Tubo 2 é enviado para o laboratório de microbiologia para a realização de cultura e coloração de Gram. O Tubo 3 é enviado para o laboratório de hematologia para a contagem celular; ele é o que apresenta menor probabilidade de ser contaminado por uma punção hemorrágica na coleta.

Líquido sinovial

O líquido sinovial encontrado nas cavidades articulares é um ultrafiltrado do plasma que passa através de fenestrações do endotélio capilar subsinovial para o interior da cavidade sinovial. Uma vez na cavidade, ele combina-se com o ácido hialurônico, um glicosaminoglicano secretado pelas células de revestimento sinovial. O líquido sinovial difere dos outros líquidos serosos, pelo fato de conter ácido hialurônico (mucina) e poder conter cristais. O líquido sinovial é coletado pela artrocentese, uma aspiração articular utilizando uma seringa revestida com anticoagulante, usualmente 25 unidades de heparina sódica por mL de líquido sinovial. Oxalato, EDTA em pó e heparina lítio não devem ser utilizados porque eles podem produzir estruturas cristalinas semelhantes a cristais de urato monossódico. Após ser coletado, o líquido sinovial é geralmente transferido para três tubos – um estéril,

um contendo EDTA ou heparina e um tubo com tampa vermelha. Cinco a 10 mL de líquido são adicionados a cada um. O tubo estéril é enviado para o laboratório de microbiologia, o tubo anticoagulado é enviado para o laboratório de hematologia, e o tubo com tampa vermelha, após centrifugação, é utilizado para análise química. Alguns hospitais transferem o líquido sinovial para um frasco DIFCO ESP para microrganismos aeróbios e anaeróbios para exame microbiológico.

Líquido pleural, líquido pericárdico e líquido peritoneal

O líquido pleural é um ultrafiltrado do plasma sanguíneo. Ele é formado continuamente na cavidade pleural. Essa cavidade, que em geral contém de 1 a 10 mL de líquido, é formada pela pleura parietal (revestimento da parede torácica) e pela pleura visceral (revestimento dos pulmões). Cada pulmão é envolvido por essa dupla membrana de camadas mesoteliais contíguas. O líquido pleural atua como um lubrificante natural para contração e expansão dos pulmões durante a respiração. Ele é reabsorvido pelos vasos linfáticos e vênulas da pleura (Millet, 1999).

A toracocentese é um procedimento cirúrgico para drenar líquido (derrames) da cavidade torácica e é útil no diagnóstico de inflamação ou doença neoplásica pulmonar ou pleural. Pericardiocentese e peritoneocentese referem-se à coleta de líquido da cavidade pericárdica (derrame) e da cavidade peritoneal (ascite), respectivamente. Com frequência, essas cavidades contêm menos que 50 mL de líquido.

Na posição sentada ereta, com os membros superiores e a cabeça em extensão, sobre uma mesa colocada acima do leito, o paciente é preparado com um anestésico local após a limpeza adequada do sítio cirúrgico. Uma seringa de 50 mL é conectada a uma torneira e um tubo de borracha para ajudar no processo de coleta asséptica. Amostras são obtidas para exames bioquímicos, microbiológicos e citológicos e são transferidas para tubos de coleta com os aditivos adequados. Para a maioria dos exames bioquímicos, nenhum aditivo é utilizado, e é permitido que a amostra coagule. Amostras para exames bacteriológicos e citológicos podem ser coletadas em recipientes com EDTA ou heparina sódica estéril (sem preservativos). Estudos especiais para o *Mycobacterium*, bactérias anaeróbias ou vírus podem exigir processos de manipulação especiais. Procedimentos de manipulação especiais devem ser revistos antes da coleta.

Transporte de amostra

O transporte de sangue, urina, líquidos corporais e tecidos do local de coleta para o laboratório é um componente importante do processamento. Para amostras de sangue, ele representa aproximadamente um terço do tempo de resposta total (Howanitz, 1992). A agitação excessiva de amostras de sangue deve ser evitada para minimizar a hemólise. Amostras devem ser protegidas contra a exposição direta à luz, a qual causa a degradação de determinados analitos (p. ex., bilirrubinas). Para a análise de constituintes instáveis (p. ex., amônia, atividade da renina plasmática e fosfatase ácida), as amostras devem ser mantidas a 4°C imediatamente após a coleta, e devem ser transportadas em gelo. A coleta rotineira de urina é realizada em um recipiente plástico estéril e descartável de 200 mL. Coletores de urina pediátricos são bolsas de polietileno flexíveis, as quais podem ser seladas para o transporte. Todas as amostras laboratoriais devem ser transportadas de uma maneira segura e conveniente para prevenir a exposição a riscos biológicos ou a contaminação da amostra. Amostras quebradas ou com vazamento representam um risco biológico para aqueles que podem entrar em contato com elas e exigem a coleta de uma nova amostra. Isso pode retardar o tratamento do paciente e aumentar o custo.

A estabilidade dos constituintes deve ser determinada antes do transporte das amostras. Em geral, o laboratório fornece essa informação com instruções de preparo e expedição de amostras. Recipientes de poliestireno ou de outro plástico resistente a alto impacto são utilizados com frequência. Amostras que exigem refrigeração devem ser mantidas em temperatura entre 2 e 10°C e podem ser transportadas de modo adequado em um recipiente isolado. Amostras de grande volume de urina devem ser coletadas em um recipiente à prova de vazamento de 3 a 4 L. Amostras de fezes são transportadas em um recipiente de cartão e colocadas em um saco de polietileno. Para enviar uma amostra congelada, ela pode ser embalada em um recipiente de poliestireno com gelo seco e pode ser mantida congelada em temperaturas baixas, de até -70°C.

O padrão da OSHA relativo a patógenos hematogênicos (OSHA: 1910.1030) exige que amostras de sangue ou de qualquer outro material potencialmente infeccioso sejam colocadas em um recipiente que previne o vazamento durante coleta, manipulação, processamento, armazenamento, transporte e/ou expedição. Esse recipiente deve ser rotulado ou com código de cor de acordo com padrões específicos (OSHA: 1910.1030 (g) (1) (i)). Além disso, de acordo com o padrão, se ocorrer contaminação do exterior do recipiente principal ou se a amostra puder perfurar o recipiente principal, este deve ser colocado em um segundo recipiente resistente à perfuração com as mesmas características citadas anteriormente (OSHA: 1910.1030 (d) (2) (xiii)).

A rotulagem é exigida em todos os recipientes utilizados para armazenamento, transporte, expedição ou descarte de sangue ou de outros materiais potencialmente infecciosos, exceto quando indicado no padrão da OSHA. Por exemplo, se recipientes individuais de sangue ou de outros materiais potencialmente infecciosos forem colocados em um recipiente maior durante armazenamento, transporte, expedição ou descarte, e se esse recipiente maior estiver rotulado com a etiqueta "RISCO BIOLÓGICO" ou com código de cor, os recipientes individuais são isentados da exigência de rotulagem. A OSHA aceita o rótulo "SUBSTÂNCIA INFECCIOSA" do Departamento de Transporte (DOT) no lugar de "RISCO BIOLÓGICO" em embalagens em que o DOT exige seu rótulo em recipientes expedidos, mas exige o rótulo "RISCO BIOLÓGICO" em que a OSHA regula um material e o DOT não. Se o rótulo exigido pelo DOT for o único utilizado no exterior do recipiente de transporte, o rótulo exigido pela OSHA deve ser aplicado em todos os recipientes internos que contêm sangue ou outro material potencialmente infeccioso. O rótulo "RISCO BIOLÓGICO" aceito é laranja fluorescente.

Para o transporte local, sistemas de tubo pneumático são uma maneira rápida, eficiente, econômica e eficaz de transportar amostras laboratoriais até um local específico. Para uso laboratorial, amostras de sangue são colocadas em um transportador com cobertura para prevenir vazamento e coxins para garantir que elas permaneçam intactas. As vantagens de um sistema de tubo pneumático são melhoria do tempo de resposta, confiabilidade, treinamento mínimo, manutenção baixa, disponibilidade de 24 horas/dia e 7 dias/semana e melhoria da utilização do pessoal. Estudos mostraram que a maioria dos exames bioquímicos e hematológicos de rotina não é afetada substancialmente pelo transporte rápido, incluindo resultados de gasometria e da lactato desidrogenase (Hardin, 1990; Keshgegian , 1992).

Processamento de amostra

O processamento de amostras inclui três fases distintas: pré-centrifugação, centrifugação e pós-centrifugação. A apreciação contínua de todas as atividades de manipulação de amostras é um componente pré-analítico importante do controle de qualidade total. Políticas adequadas devem ser estabelecidas, e o pessoal do laboratório deve segui-las em cada fase de manipulação de amostras para garantir a geração de resultados de exames e mensurações confiáveis e clinicamente significativas.

Fase pré-centrifugação

O ideal é que todas as mensurações sejam realizadas em 45 minutos a 1 hora após a coleta. Quando isso não for possível, as amostras devem ser processadas até um ponto em que elas possam ser armazenadas para evitar alterações dos constituintes que devem ser mensurados. Com exceção da gasometria e da dosagem de amônia, o plasma ou o soro são preferidos para a maioria das determinações. Na bioquímica clínica, soro e plasma são termos intercambiáveis, exceto para algumas poucas mensurações. O soro é necessário para a eletroforese de proteínas e ensaios de imunofixação, assim como o plasma é necessário para a dosagem de fibrinogênio e outros exames da coagulação. O soro é, em geral, a amostra de escolha por causa da simplicidade de sua coleta e manipulação. Além disso, a interferência de anticoagulantes é evitada. O plasma pode ser utilizado em emergências médicas porque as amostras não têm que coagular antes da centrifugação. Com frequência, um maior volume de plasma que de soro é obtido de um determinado volume de sangue total em decorrência do processo de formação de coágulo.

O sangue deve ser mantido fechado no recipiente original até estar pronto para a separação. Para a preparação de plasma, deve-se centrifugar o sangue em 1 hora após a coleta, durante 10 minutos em uma força centrífuga relativa de 850 a 1.000 × gravidade (g), mantendo o recipiente fechado para prevenir a evaporação da água do plasma ou do soro. Deve ser dado um tempo adequado para a coagulação a fim de prevenir a formação latente de fibrina, o que pode causar obstrução de analisadores químicos automatizados. O afrouxamento do coágulo por "agitação" ou "rotação" do tubo pode causar hemólise e deve ser evitado. Quando tubos de vidro são utilizados, eles devem ser centrifugados em um receptáculo que evita a emissão de aerossol. O soro ou o plasma deve ser armazenado a 4 a 6°C se a análise tiver que ser retardada por mais de 4 horas. Um estudo recente sugere que isso pode não ser necessário (Melanson, 2004). Muitos laboratórios armazenam amostras por 7 dias para o caso de adição de um exame.

Fase de centrifugação

Uma centrífuga utiliza força centrífuga para separar fases de suspensões por densidades diferentes. Ela é mais utilizada no processamento de sangue para produzir frações de plasma ou soro. A urina e os outros líquidos corporais podem ser centrifugados para concentrar matéria particulada como sedimento para ser examinado e para minimizar a interferência em outras determinações a partir do mesmo material. As condições de centrifugação devem especificar o tempo e a força centrífuga. Ao selecionar uma centrífuga, deve-se buscar a maior força centrífuga possível e não a velocidade de rotação. A força centrífuga relativa (FCR) em unidades gravidade (g), isto é, múltiplos da força gravitacional, pode ser calculada pelo uso da seguinte fórmula:

$$FCR = 1{,}118 \times 10^{-5} \times r \times (rpm)^2$$

Nessa fórmula, $1{,}118 \times 10^{-5}$ é uma constante; *r* é o raio, expresso em centímetros, entre o eixo de rotação e o centro do tubo da centrífuga; e *rpm* é a velocidade em rotações por minuto.

A FCR também pode ser obtida a partir de um nomograma, que fornece o valor sem a necessidade de calcular a fórmula acima.

Vários princípios devem ser observados para evitar danos à centrífuga, à amostra ou ao pessoal. Tubos, transportadores ou escudos de peso, forma e tamanho iguais devem ser colocados nas posições opostas na cabeça da centrífuga para obter o equilíbrio adequado. Os tubos devem ser balanceados pelo centro de rotação, e cada balde deve ser balanceado em relação ao eixo de rotação (Seamonds, 2001). As amostras devem ser posicionadas levando em conta um arranjo geometricamente simétrico, utilizando tubos cheios de água para obter o equilíbrio.

Equipamento

Existe uma ampla variedade de centrífugas e acessórios para suprir necessidades específicas do laboratório clínico. Elas incluem centrífugas laboratoriais gerais de mesa; centrífugas de cabeça horizontal, angular ou de ângulo fixo; centrífugas de alta velocidade; modelos de chão portáteis, modelos que ficam sob o balcão; tipos refrigerados e não refrigerados; e ultracentrífugas. As ultracentrífugas são de alta velocidade e são capazes de atingir uma força centrífuga de 165.000 g. Essas centrífugas exigem câmaras de refrigeração para compensar a produção considerável de calor. As ultracentrífugas são utilizadas para eliminar quilomicrons do soro, o que é necessário para evitar a interferência em exames clínicos (Bermes, 2001). Um exemplo de centrífuga projetada para alta velocidade e tempo de resposta curto é a StatSpin Express 3 (StatSpin, 2005), uma centrífuga de mesa de alta velocidade e controlada por microprocessador destinada a separar de modo rápido o sangue em tubos a vácuo. Essa centrífuga acelera e trava muito rapidamente, diminuindo o tempo de processamento de amostras. A centrífuga opera com uma velocidade fixa de 8.500 rpm, produz uma FCR de 4.440 g e pode ser operada com um segundo ciclo rotatório de 120 ou 180.

A capacidade da centrífuga varia de acordo com o modelo e a cabeça da centrífuga. O volume da amostra (por tubo), o número de tubos que serão centrifugados, a velocidade necessária para a separação adequada e a durabilidade do equipamento devem ser levados em consideração. Para cada procedimento laboratorial que requer a operação de centrifugação, é necessária uma especificação escrita identificando o tipo de centrífuga, a temperatura, as forças g necessárias e a duração da centrifugação. A calibração da centrífuga deve ser parte do processo de garantia de qualidade. Os ajustes de velocidade devem ser calibrados usando rotações por minuto, e as FCRs devem ser calculadas utilizando a fórmula acima ou um nomograma. Qualquer alteração significativa indicará efeitos da deterioração (p. ex., uso de escovas ou problemas de sustentação). A acurácia dos *timers* também deve ser checada.

Referências bibliográficas

BD Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ 07417. Online. Available: http://www.bd.com.

Bermes EW, Young DS: General laboratory techniques, procedures, and safety. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001, pp 2–29.

Boyanton L, Blick K: Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. Clin Chem 2002; 48(12):2242–2247.

Este artigo estuda a estabilidade dos analitos existentes no soro e no plasma num período de 56 horas, em amostras que foram ou não depletadas de células. Nenhuma alteração significativa foi observada nas amostras de soro e plasma depletadas de células, num período de 30 minutos após a coleta. O artigo fornece uma excelente bibliografia histórica sobre os principais estudos realizados em torno do assunto.

Bush V, Blennerhasset J, Wells A, Dasgupta A: Stability of therapeutic drugs in serum collected in vacutainer serum separator tubes containing a new gel (SST II). Ther Drug Monit 2001; 23(3):259–262.

Caraway WT, Kammeyer CW: Chemical interference by drug and other substances with clinical laboratory test procedures. Clin Chem Acta 1972; 41:395.

Centers for Disease Control and Prevention: Workbook for Designing, Implementing, and Evaluation a Sharps Injury Prevention Program, Introduction. Division of Healthcare Quality Promotion – (DHOP Home) Privacy Policy – Accessibility. Published date: June 4, 2004; Reviewed date: July 28, 2004. Online. Available: http://www.cdc/sharpssafety/wk_overview.html.

Esta excelente publicação lançada na internet e disponibilizada para download gratuito inclui uma visão geral dos riscos e prevenção de acidentes com objetos pontiagudos, etapas organizacionais para desenvolvimento de programas de prevenção, recomendações para escolha de dispositivos de prevenção a acidentes com material pérfuro-cortante, bem como materiais educativos e para treinamento. Os apêndices contêm planilhas de trabalho úteis para todos os aspectos da lesão por material pérfuro-cortante e da documentação preventiva.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard, 5th ed. Document H3-A5. Wayne, PA, NCCLS, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard, 4th ed. Document H11-A4. Wayne, PA, NCCLS, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens; Approved Standard, 5th ed. Document H4-A5. Wayne, PA, NCCLS, 2004.

Dasgupta A, Dean R, Saldana S, et al: Absorption of therapeutic drugs by barrier gels in serum separator blood collection tubes. Volume and time dependent reduction in total and free drug concentrations. Am J Clin Path 1994; 101(4):456–461.

Dufour DR: Sources and control of preanalytical variation. *In* Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC (eds): Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 4th ed. St. Louis, Mosby, 2003, pp 64–82.

Ernst DJ, Calam R: NCCLA simplifies the order of draw: A brief history. MLO 2004; 36:26–27.

Garza D, Becan-McBride K: Phlebotomy Handbook, 2nd ed. Norwalk, CT, Appleton & Lange, 1989, pp 79–82.

Garza D, Becan-McBride K: Phlebotomy Handbook: Blood Collection Essentials, 6th ed. Upper Saddle River, Prentice Hall, 2002, pp 163, 205, 263, 341.

Este manual apresenta uma discussão completa sobre todos os aspectos relacionados à flebotomia. Foram incluídos os procedimentos de segurança, equipamentos, procedimentos passo a passo e questões sobre supervisão e de caráter legal. O material contém uma excelente discussão básica sobre o sistema circulatório ilustrada com diagramas coloridos.

Hardin G, Quick G, Ladd DJ: Emergency transport of AS-1 cell units by pneumatic tube system. J Trauma 1990; 30:346–348.

Howanitz PJ, Steindel SJ, Cembrowski GS, et al: Emergency department stat test turnaround times. A College of American Pathologists' Q-Probes study for potassium and hemoglobin. Arch Pathol Lab Med 1992; 116:122–128.

Kjeldsberg CR, Knight AK: Cerebral Spinal Fluid in Body Fluids, 3rd ed, Chicago, American Society of Clinical Pathology, 1993, p 65.

Keshgegian AA, Bull GE: Evaluation of a soft-handling computerized pneumatic tube specimen delivery system. Am J Clin Pathol 1992; 97:535–540.

Laessig RH, Hassermer DJ, Paskay TA, et al: The effects of 0.1 and 1.0 percent erythrocytes and hemolysis on serum chemistry values. Am J Clin Pathol 1976; 66:639–644.

McCall RE, Tankersley CM: Phlebotomy Essentials. Philadelphia, JB Lippincott Company, 1993, pp 202–206.

Melanson SF, Hsieh B, Flood J et al: Evaluation of add-on testing in the clinical chemistry laboratory of a large academic medical center. Arch Pathol Lab Med 2004; 128:885–889.

Miller HJ: Pleural effusions. *In* Davis B, Bishop M, Mass D (eds): Principles of Laboratory Utilization and Consultation. Philadelphia, WB Saunders, 1999.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preser-

vation of Urine Specimens: Approved Guideline, 2nd ed. GP 16-A2. Villanova, PA, NCCLS, 2001.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Online. Available: http://www.nccls.org and http://www.nccls.org/Template.cfm?section=About_NCCLS

Occupational Safety and Health Administration (OSHA): Occupational Safety Bloodborne Pathogens Standard 29 CFR 1910.1030. 2001. Online. Available: http://www.osha.gov/SLTC/bloodbornepathogens/index.html.

Occupational Safety and Health Administration (OSHA): Occupational Safety Bloodborne Needlestick Safety Prevention Act, OSHA: Revised Standards 2002.

Omar H, Chamberlin A, Walker V, Wood PJ: Immulite 2000 parathyroid hormone assay: Stability of parathyroid hormone in EDTA blood kept at room temperature for 48 hours. Ann Clin Biochem 2001; 38(Pt 5):561–563.

Seamonds B, Elizabeth AB: Basic laboratory principles and techniques. *In* Burtis, CA, Ashwood, ER (eds): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001, pp 3–44.

Smith BE, King PH, Schlain L: Clinical evaluation-continuous real-time intra-arterial blood gas monitor during anesthesia and surgery by fibro-optic sensor. Int J Clin Monitor Comput 1992; 9:45–52.

StatSpin Operator's Manual: StatSpin Express Centrifuge Model Number M500-22. 85 Morse Street, Norwood, Massachusetts 02062, USA (800), StatSpin, Inc., http://www.statspin.com, 2005.

Strasinger SK, DiLorenzo MS: Urinalysis and Body Fluids, 4th ed. Philadelphia, FA Davis, 2001, pp 23–32.

Strasinger SK, DiLorenzo MS: The Phlebotomy Workbook, 2nd ed. Philadelphia, FA Davis, 2003, pp 115, 164, 95, 96.

Este texto contém uma apresentação abrangente de todos os aspectos da flebotomia. Trata-se de um excelente guia de ensino, além de discutir equipamentos e técnicas de última ponta. O livro está dividido em três partes: flebotomia geral; informação sobre segurança e assistência de saúde, técnicas para coleta de sangue; e terminologia médica, anatomia e fisiologia. Dentro dos vários capítulos existem tabelas de resumo excelentes, bem como quadros para consulta rápida. Também fornece uma extensa descrição dos vários tubos de coleta de sangue existentes e dos anticoagulantes/conservantes neles contido, além de informações sobre fatores pré-analíticos que afetam os resultados laboratoriais.

Young MB, Bermes EW: Specimen collection and other preanalytical variables. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001, pp 30–54.

O capítulo aborda uma parte significativa dos fatores pré-analíticos mais importantes que afetam os resultados laboratoriais. O dr. Young também escreveu uma série de livros de referência que contêm informações (revisadas por pares) referentes às interações dos testes. A série foi publicada pela AACC Press, Washington DC, e inclui: Young DS, Friedman RG: Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests, 4th ed, 2001; Young DS: Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 5th ed, 2000; e Young DS: Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests, 2nd ed, 1997.

Zhang DJ, Elswick RK, Miller WG, Bailey JL: Effect of serum–clot contact time on clinical chemistry laboratory results. Clin Chem 1998; 44:1325–1333.

CAPÍTULO 4

Análise: princípios de instrumentação

Robert L. Sunheimer MS MT(ASCP)SC SLS, Gregory Threatte MD, Mark S. Lifshitz MD, Matthew R. Pincus MD PhD

Princípios de instrumentação 37
- Espectrofotometria 37
- Reflectometria 45
- Espectrometria de luminescência molecular (fluorometria) 46
- Nefelometria e turbidimetria 47
- Refratometria 48
- Osmometria 48
- Citometria de fluxo 49
- Eletroquímica 50
- Condutância 51
- Impedância 51
- Eletroforese e densitometria 51
- Focagem isoelétrica 52
- Cromatografia 52
- Espectrometria de massa 55
- Contador de cintilação 56
- Eletroforese capilar 57
- Espectroscopia por ressonância magnética nuclear 58

Métodos analíticos gerais e problemas 58
- Substâncias químicas 58
- Água 59
- Quantificação de massa 59
- Vidraria e materiais plásticos de uso laboratorial 60
- Material volumétrico de uso laboratorial 61
- Termometria 62
- Banhos de água 62
- Blocos de aquecimento, incubadoras a seco e fornos 63
- Agitação 63
- Solução aquosa 63

Referências bibliográficas 64

PONTOS-CHAVE

- Muitas determinações analíticas feitas em laboratórios clínicos são baseadas em mensurações de energia radiante, que é absorvida ou transmitida. Os dispositivos utilizados para a mensuração de energia luminosa absorvida ou transmitida são os fotômetros e espectrofotômetros.
- Os componentes básicos dos espectrofotômetros incluem: fonte de energia radiante, seletor de comprimento de onda, *cuvet holder*, fotodetector, processadores de sinal e dispositivos de leitura.
- Um refletômetro é utilizado para mensurar analitos por intermédio de medida de quantidade de luz refletida por uma amostra líquida que foi colocada sobre um suporte sólido granuloso ou fibroso.
- Nefelômetros são utilizados para detectar a luz, que é dispersa em vários ângulos, enquanto a turbidimetria mensura uma redução da transmissão de luz em razão da formação de partículas.
- Um citômetro de fluxo mensura padrões luminosos produzidos, quando partículas passam em fila única por uma fonte laser. O citômetro de fluxo é utilizado para contar e identificar células. Ele é um componente-chave de analisadores da hematologia e também se apresenta como a tecnologia utilizada para diferenciar leucócitos.
- Princípios eletroquímicos são utilizados para mensurar numerosos analitos em líquidos biológicos. As técnicas eletroquímicas específicas incluem: potenciometria, amperometria, coulometria, condutividade e voltametria de redissolução anódica.
- Os analitos mensurados por meio de técnicas eletroquímicas incluem eletrólitos, gases sanguíneos, pH, metabólitos como, por exemplo, glicose e nitrogênio ureico, cálcio ionizado, chumbo e cloro no suor.
- A cromatografia é uma técnica de separação baseada em diferentes interações de compostos da amostra com uma fase móvel e outra estacionária, em que o composto desloca-se sobre um meio de suporte.
- Espectrômetros de massa tornaram-se instrumentos clínicos importantes, especialmente em áreas emergentes (p.ex., proteômica). A espectrometria de massa (EM) baseia-se na fragmentação e na ionização de moléculas. A abundância relativa de cada um dos íons produz um espectro de massa característico da molécula-mãe. Os componentes básicos de um espectrômetro de massa incluem: uma fonte iônica, um analisador de massa e um detector de íon.

Um conhecimento básico dos princípios de instrumentação utilizados em laboratórios clínicos é essencial. Esses instrumentos devem fornecer ao médico os melhores dados possíveis e úteis do paciente. Sem um conhecimento completo dos princípios necessários associados a um analisador, os operadores não estarão bem equipados para realizar procedimentos de manutenção, calibrações nem para solucionar possíveis problemas.

O objetivo deste capítulo é apresentar ao leitor uma descrição breve e ampla dos princípios essenciais de instrumentos analíticos presentes em um laboratório clínico. Para uma revisão mais detalhada deste tópico, o leitor é aconselhado a consultar as referências relativas à instrumentação clínica no final deste capítulo.

Princípios de instrumentação

Espectrofotometria

A espectroscopia de absorção proveu aos cientistas um meio de realizar métodos qualitativos e quantitativos para mensurar analitos em líquidos corporais. Bouguer desenvolveu os princípios da espectroscopia de absorção no início do século 18. Dois outros cientistas, Lambert e Beer, continuaram a expandir os estudos dos princípios fundamentais da espectroscopia de absorção, conhecidos como lei de Beer. Antes de revisarmos as leis da espectroscopia, é prudente termos um conhecimento da luz e dos efeitos de sua interação com a matéria.

Muitos métodos espectrofotométricos utilizam ressonância magnética eletrônica (RME), a qual pode assumir várias formas, sendo que as mais reconhecíveis são a luz e o calor radiante. Outras manifestações da RME incluem raios γ e raios x, assim como micro-ondas, radiação de radiofrequência e de ultravioleta. As energias envolvidas com as regiões específicas do espectro eletromagnético e seus comprimentos de onda correspondentes mudam dramaticamente das ondas de rádio para a radiação γ.

Algumas propriedades da RME podem ser descritas por meio de um modelo de onda sinusoidal clássica. Os parâmetros associados a esse tipo de onda incluem comprimento, frequência, velocidade e amplitude, como é mostrado na Figura 4.1*A*. A radiação eletromagnética não exige meio de suporte para a sua transmissão e passa imediatamente através do vácuo.

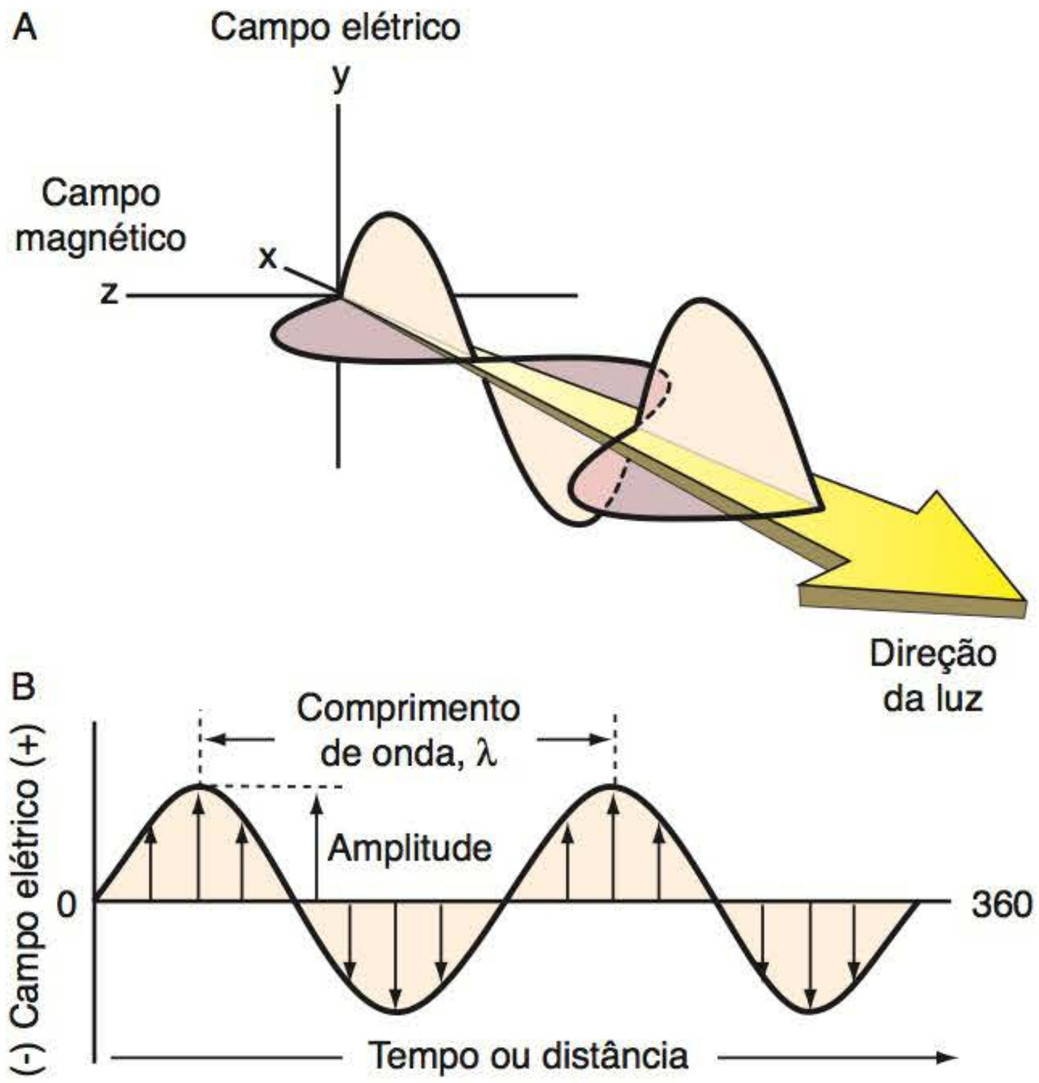


Figura 4.1 Diagrama de um feixe monocromático, plano-luz polarizada. *A*, vetores do campo magnético (eixo *y*) e elétrico (eixo *x*) em ângulo reto entre si. *B*, visão bidimensional do vetor elétrico.

O modelo de onda sinusoidal não fornece o retrato completo ao se analisar a absorção e a emissão de energia radiante. A radiação eletromagnética também existe como uma corrente de partículas distintas ou maços (feixes) de energia chamados fótons. A energia dos fótons é proporcional à frequência da radiação. Essa natureza dual da RME é considerada complementar e aplica-se ao comportamento de correntes de elétrons, prótons e outras partículas elementares.

O modelo de onda permite que representemos a RME tanto como campo elétrico quanto como magnético e pode sofrer oscilação sinusoidal em ângulos retos tanto entre si, quanto em relação à direção de propagação em ângulos. Os campos elétricos e magnéticos de um feixe monocromático de luz plana polarizada (com oscilação dos campos magnéticos ou elétricos em um único plano)* em uma direção específica de propagação são mostrados na Figura 4.1*B* (Skoog, 1998).

O vetor ou o componente elétrico da onda é mostrado em formato bidimensional. Lembre-se que um vetor possui magnitude e direção. O vetor campo elétrico em certo ponto, no tempo e no espaço, é proporcional à sua própria magnitude.

O tempo ou a distância de propagação de onda é colocado na abscissa. A maioria dos princípios do instrumento amplamente utilizados em laboratório envolve o componente elétrico de radiação e será o foco de discussão ao longo deste capítulo. Uma exceção é a ressonância magnética nuclear (RMN). Nessa técnica, o componente magnético produz o efeito desejado.

Vários parâmetros de onda serão descritos. A *amplitude* da onda sinusoidal é mostrada como comprimento do vetor eletrônico na altura máxima. Um *período*, *p*, é definido como o tempo, em segundos, necessário para a passagem da máxima ou da mínima sucessiva por um ponto fixo no espaço. O número de oscilações de onda em um segundo é denominado *frequência* (v). A unidade de frequência é hertz (Hz). Um *comprimento de onda* (*l*) é a distância linear entre qualquer dos dois pontos equivalentes em uma onda sucessiva. Uma unidade muito utilizada para o comprimento de onda do espectro visível é o nanômetro (nm, 10^{-9} m). A radiação eletromagnética do raio x ou da região γ pode ser expressa em termos de Angstrom (Å, 10^{-10} m). Por fim, devido ao seu comprimento de onda ser muito longo, a RME na região infravermelha pode ter unidades correspondentes ao micrômetro (μm, 10^{-6} m).

* *A radiação não polarizada possui ondas em muitos planos.*

Exemplo 4.1. 1 nm = 10^{-9} m = 10^{-7} cm. Outras unidades, algumas vezes utilizadas, incluem:

1 μm = 10^{-6} m = 10^{-4} cm

1 Å = 10^{-10} m = 10^{-8} cm.

Velocidade de propagação

A velocidade de propagação (v_i), em metros por segundo, é determinada pela multiplicação da frequência pelo comprimento de onda. Portanto:

$$v_i = \nu\lambda_i \qquad (4.1)$$

A frequência da luz é determinada pela fonte e não muda, enquanto a velocidade depende da composição do meio por onde ela passa. Por essa razão, a equação 4.1 indica que o comprimento de onda também depende do meio.

A velocidade da luz percorrendo o vácuo independe do comprimento de onda e encontra-se no seu máximo. Essa velocidade é representada pelo símbolo c e equivale a 2,99792 × 10^8 m/s. A equação 4.1 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$C = \nu\lambda = 3{,}0 \times 10^8 \text{ m/s} = 3{,}0 \times 10^8 \text{ m s}^{-1} = 3{,}0 \times 10^{10} \text{ cm/s} \qquad (4.2)$$

Exemplo 4.2. Qual é o comprimento de onda em nm para a RME com uma frequência de 1,58 × 10^{15} Hz?

Solução

$\lambda = c/\nu$

$$\lambda \text{ (nm)} = \frac{3{,}00 \times 10^8 \text{ m/s}}{1{,}58 \times 10^{15} \text{ Hz}}$$

λ (nm) = 190

Em qualquer meio contendo matéria, a propagação da radiação é reduzida pela interação entre o campo de RME da radiação e os elétrons ligados a átomos daquela matéria. Como a frequência radiante não varia e é fixada pela fonte, o comprimento de onda deve diminuir na medida em que a radiação passa do ar para um meio mais lento.

Energia da RME

Devemos ter atenção à seguinte preocupação relativa à segurança: dispositivos ópticos que emitem RME de alta frequência geram nível alto de energia e podem causar danos aos olhos. Os exemplos incluem as lâmpadas de deutério e xenônio.

O comprimento de onda e a frequência estão relacionados com a energia de um fóton, *E*, pela constante de Planck* *h*, 6,626 × 10^{-34} J s, e c, a velocidade da luz no vácuo (3,00 × 10^8 ms^{-1}):

$$E = h\nu = hc/\lambda \qquad (4.3)$$

em que:

E = energia de um fóton em Joules ou eV

h = constante de Planck (6,626 × 10^{-34} J s)

v = frequência em Hz (ciclos/s)

Frequentemente, as energias dos fótons são apresentadas em termos de um elétron-volt (eV). Um eV é definido como a energia adquirida por um elétron que foi acelerado por um potencial de 1 volt. Os fatores de conversão entre Joules e eV são:

1 J = 6,24 × 10^{18} eV

1 eV = 1,602 × 10^{-19} J

Para ilustrar a diferença em energias de fótons da RME, compare a energia de fótons da região ultravioleta (UV) *versus* a região visível da RME.

Exemplo 4.3. Qual a energia em Joules e eV do equivalente da RME para (a) 190 nm? (b) 520 nm?

Solução

(a)

$E = hc/\nu$

$$E = \frac{(6{,}626 \times 10^{-34} \text{ J s})\ (3{,}0 \times 10^8 \text{ m/s})}{190 \text{ nm } (10^{-9} \text{ m/nm})}$$

E = 1,046 × 10^{-18} J

Ou para converter para eV, utilize a conversão de 1 J = 6,24 × 10^{18} eV.

* *Também expresso em unidades 6,626×10-27ergs*

Logo, o número de eVs é 6,53.

(b)

$$E = hc/\nu$$

$$E = \frac{(6{,}626 \times 10^{-34}\ \text{J s})\ (3{,}0 \times 10^{8}\ \text{m/s})}{520\ \text{nm}\ (10^{-9}\ \text{m/nm})}$$

$$E = 3{,}82 \times 10^{-19}\ \text{J ou } 2{,}38\ \text{eV}$$

A relação entre frequência, comprimento de onda e energia do fóton por intermédio da RME pode ser vista na Figura 4.2. Esse gráfico ilustra, por exemplo, que fótons com energia γ muito alta apresentam comprimentos de onda muito curtos e frequências muito altas (Rubinson, 2000). O contrário ocorre em parâmetros de ondas de televisão e rádio.

Dispersão de radiação

A transmissão da radiação na matéria pode ser vista como uma retenção momentânea da energia radiante por átomos, íons ou moléculas após a reemissão da radiação em todas as direções, quando as partículas retornam ao estado original. A interferência destrutiva remove a maior parte, mas não toda, da radiação reemitida envolvendo partículas atômicas ou moleculares, que são pequenas em relação ao comprimento de onda da radiação. A exceção é a radiação que percorre em direção original ao feixe. O trajeto do feixe parece inalterado por causa da interação. Foi demonstrado que uma fração muito pequena da radiação é transmitida a todos os ângulos do trajeto original e que a intensidade dispersa dela aumenta com o tamanho da partícula.

Dispersão de Rayleigh

A dispersão por moléculas, ou agregados de moléculas, com dimensões significativamente menor que o comprimento de onda da radiação é denominada *dispersão de Rayleigh*. A intensidade é proporcional ao inverso da quarta potência do comprimento de onda, ao quadrado da polarizabilidade das partículas e às dimensões das partículas dispersas. Na dispersão de Rayleigh, os comprimentos de onda dos fótons absorvidos e emitidos são iguais. Um exemplo da dispersão de Rayleigh é a cor azul do céu, que é resultado do aumento da dispersão do comprimento de onda mais curto do espectro visível.

Efeito Tyndall

O efeito Tyndall ocorre em partículas com dimensões coloidais e pode ser observado a olho nu. Mensurações da radiação dispersa são utilizadas para se determinar o tamanho e a forma de moléculas poliméras e partículas coloidais.

Dispersão Raman

A dispersão Raman envolve a absorção de fótons produzindo estímulo vibratório. Ocorre emissão ou dispersão em comprimentos de onda mais longos. A dispersão Raman sempre varia da energia de excitação por uma diferença de energia constante.

Lei de Beer-Lambert

Se a RME monocromática (P_o) for direcionada a uma cubeta contendo amostras absorventes, a quantidade de luz (P) transmitida (T) é igual a:

$$T = P/P_o \qquad (4.4)$$

e a transmitância percentual é igual a $100T$.

Lambert provou que para a radiação monocromática, que passa por um absorvedor de concentração constante, existe uma diminuição logarítmica na potência radiante, quando o comprimento do trajeto aumenta aritmeticamente. Foi determinado que a absorbância (A) de uma solução equivale a:

$$A = \log P_o/P \qquad (4.5)$$

A relação entre transmitância, T ou transmitância percentual ($P/P_o \times 100$), e absorbância é mostrada na Figura 4.3. A absorbância e a transmitância percentual apresentam uma relação inversa:

$$A = 2 - \log \%T \qquad (4.6)$$

Exemplo 4.4. Qual é a absorbância de uma solução cuja transmitância é 10%?

Solução

$$A = 2 - \log \%T$$

$$A = 2 - \log 10\%T = 2 - 1 = 1$$

Beer seguiu com estudos sobre a relação entre potência radiante e concentração. Sua abordagem foi manter o trajeto e o comprimento da onda constantes, enquanto determinava a relação entre potência

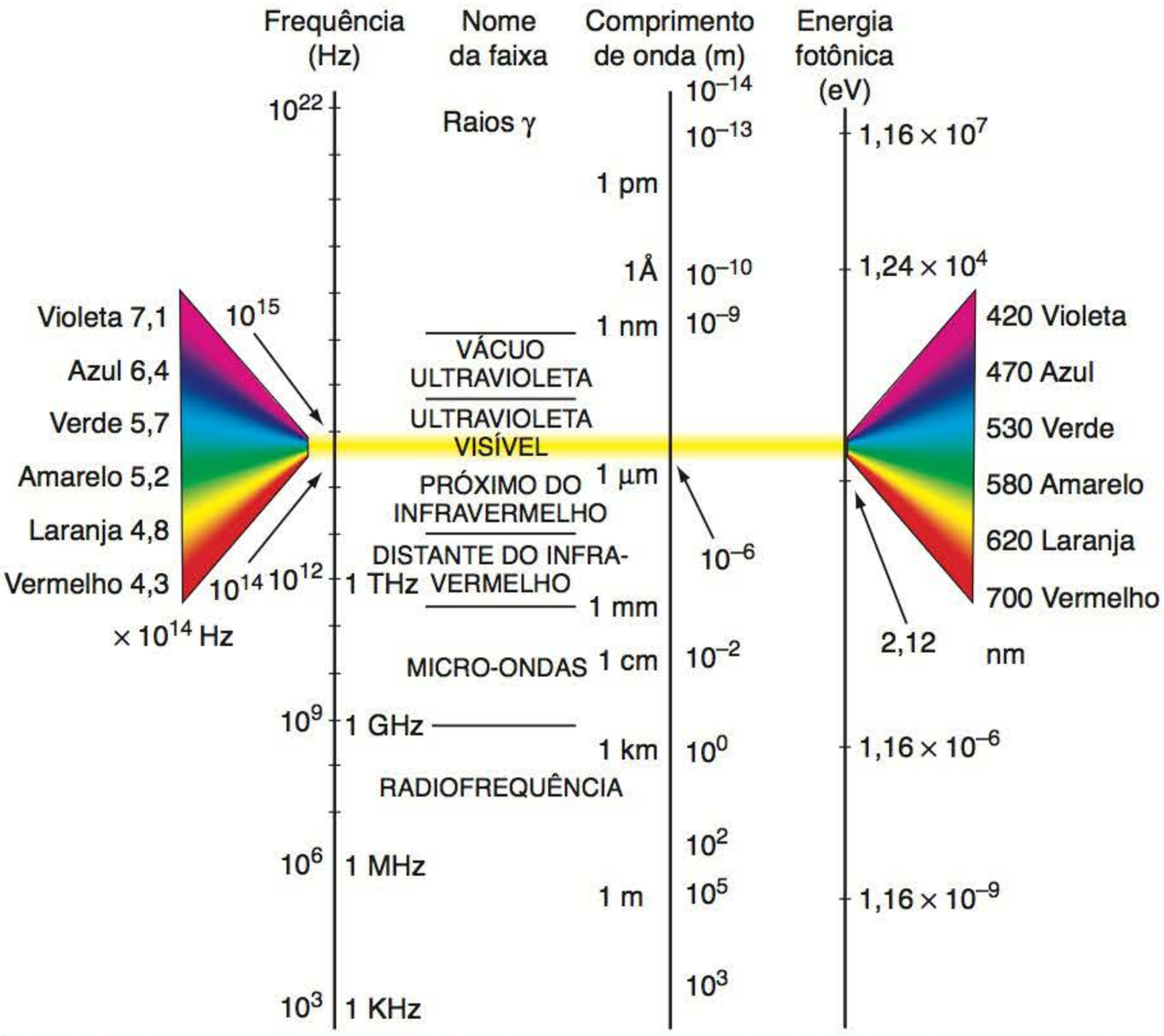


Figura 4.2 Diagrama de nomes, frequência, comprimentos de onda e energias fotônicas da ressonância magnética eletrônica. A luz visível e a ultravioleta são muito utilizadas em métodos analíticos.

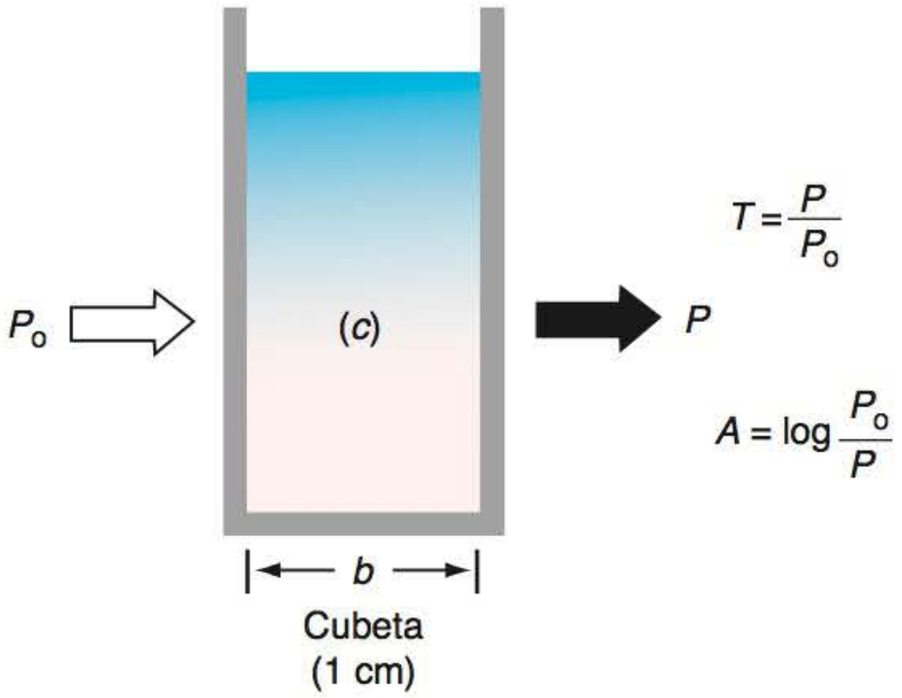


Figura 4.3 Atenuação da luz monocromática por uma solução absorvente.

radiante (P) e concentração das amostras absorventes. Baseado em trabalho prévio de Lambert, Beer descobriu que, para que haja a radiação monocromática, a absorbância é diretamente proporcional ao comprimento do trajeto (b) pelo meio e a concentração (c) das amostras absorventes. O trabalho culminou na lei de Beer-Lambert, ou simplesmente lei de Beer.

Os princípios estabelecidos são representados por:

$$A = -\log T = \log P_o/P = abc \qquad (4.7)$$

Em que a é a absortividade em L/g/cm, b é o comprimento do trajeto de 1 cm, e c é a concentração em g/L.

Quando a concentração na equação 4.7 for expressa em moles por litro e o comprimento do trajeto em centímetros, o termo aplicado é *absortividade molar* e seu símbolo é ε(épsilon) e equivale ao coeficiente de extinção ("*a*") vezes o peso molecular em gramas das amostras absorvidas.

$$A = \varepsilon bc \qquad (4.8)$$

Em que as unidades para ε é L/mol/cm.

O gráfico de absorbância *versus* concentração mostra a intercepção em zero e um traçado linear com uma inclinação a "*ab*". A espectroscopia de absorção é mais bem utilizada em soluções cujos valores de absorbância são inferiores a 2,0. Valores de absorbância superiores a 2,0 podem produzir resultados errôneos, por causa de outras interações da luz com a matéria (p. ex., variações do índice de refração de uma solução). Isso pode causar um desvio da lei de Beer acarretando uma curva no traçado linear, como é mostrado na Figura 4.4.

Desvios da lei de Beer podem ser causados por alterações em funções do instrumento ou em reações químicas. O desvio do instrumento é resultante da faixa de passagem finita do filtro ou monocromador. A lei de Beer supõe a radiação monocromática, mas essa radiação real é obtida de uma forma melhor se utilizar fontes de emissão de linha única. Se a absortividade for constante na faixa de passagem do instrumento, a lei de Beer é, então, seguida dentro de limites estritos.

Desvios à lei de Beer tornam-se aparentes em concentração mais elevada, isto é, em absorbância mais alta. Na Figura 4.4, a linha curvada inclina-se em direção ao eixo de concentração, quando a opacidade é aproximada. A falta de aderência à lei de Beer, em direção negativa é indesejável por causa do relativo aumento de erro de concentração.

O desvio da lei de Beer pode ocorrer com desvios ou alterações do equilíbrio químico ou físico envolvendo as amostras absorvidas. Alterações do pH, força iônica e temperatura da solução podem causar tais desvios.

Componentes de um espectrofotômetro

Um fotômetro ou um espectrofotômetro típico possui seis componentes básicos, seja em uma configuração de feixe único ou duplo. Os seis componentes são: (1) uma fonte estável de energia radiante; (2) um filtro que isola uma região específica do espectro eletromagnético; (3) um recipiente de amostra; (4) um detector de radiação; (5) um processador de sinal; e (6) um dispositivo de leitura. Cada componente de um fotômetro típico é mostrado na Figura 4.5.

As etapas a seguir descrevem a função de cada componente em qualquer fotômetro de absorção, que, ao detectar luz, apresenta informações ao operador.

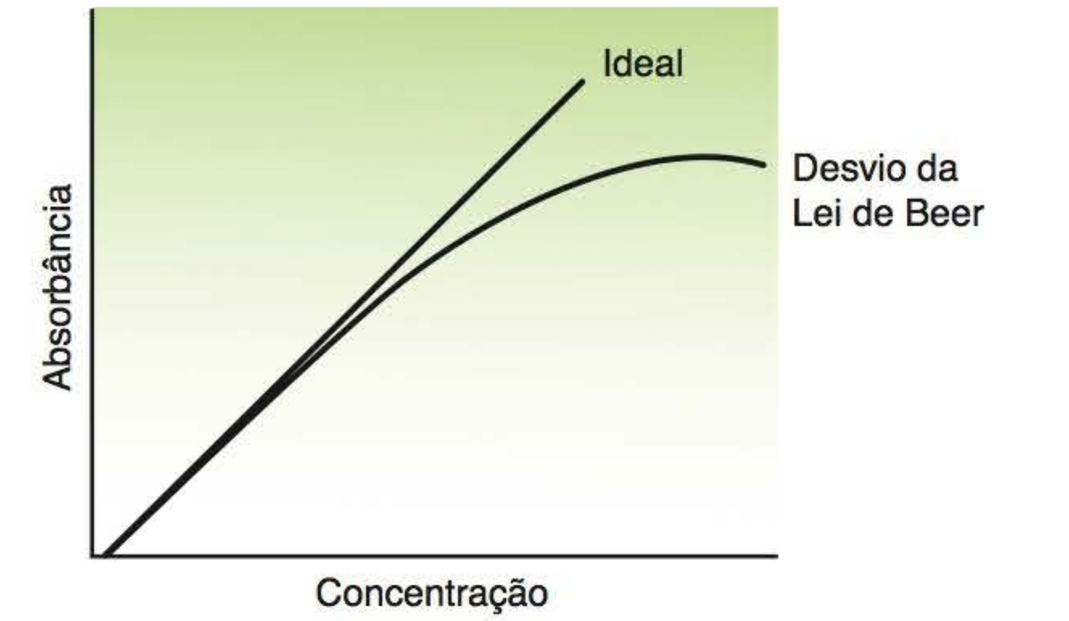


Figura 4.4 Gráfico de absorbância *versus* concentração ilustrando desvio da lei de Beer.

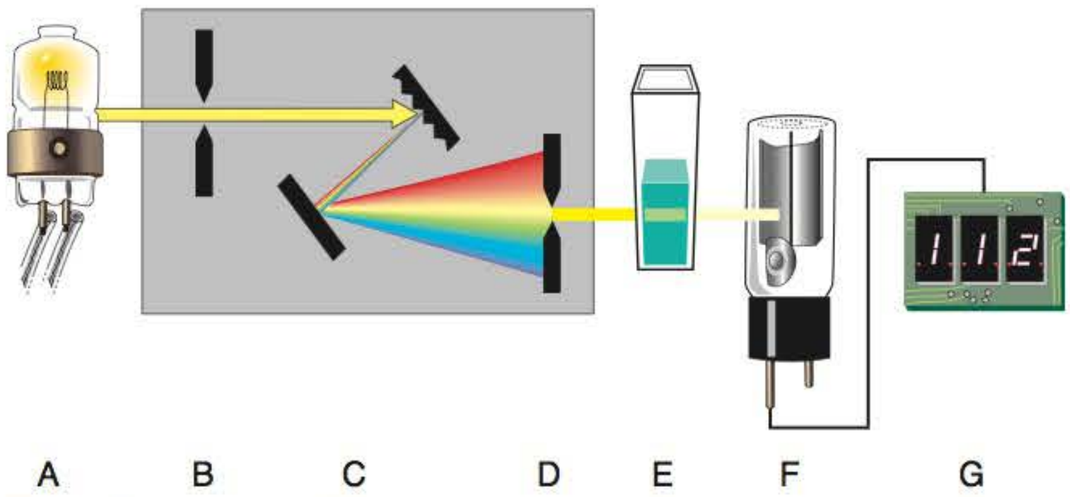


Figura 4.5 Componentes de um espectrofotômetro de feixe único. *A*, lâmpada excitante; *B*, fenda de entrada; *C*, monocromador; *D*, fenda de saída; *E*, cubeta; *F*, fotodetector; *G*, *display* LED.

1. A fonte luminosa provê a energia que a amostra modificará ou atenuará por absorção. A luz é policromática, isto é, todos os comprimentos de onda estão presentes.
2. Um seletor ou um filtro de comprimento de onda isola uma porção do espectro emitido pela fonte e a foca sobre a amostra.
3. A amostra em um recipiente adequado (p. ex., cubeta) absorve uma fração da luz incidente e transmite o restante.
4. A luz que passa através da cubeta e da amostra atinge o cátodo de um fotodetector e gera um sinal elétrico.
5. O sinal elétrico é processado eletronicamente (p. ex., amplificado, digitalizado).
6. O sinal processado é eletronicamente acoplado a uma unidade de exibição (p. ex., LED, gravador de gráfico X-Y, medidor).

Fontes de energia radiante

Fontes de energia radiante ou lâmpadas fornecem luz policromática e devem gerar energia ou potência radiante suficiente para mensurar o analito de interesse. Um suprimento de energia regulado é necessário para prover uma fonte estável e constante de voltagem para a lâmpada. As fontes de energia radiante são de dois tipos: *contínua* e *em linha*. Uma fonte continua emite radiação que, muito lentamente, muda de intensidade em função do comprimento de onda. Fontes em linha emitem um número limitado de linhas ou faixas de radiação distintas, cada uma provendo uma faixa limitada de comprimentos de onda.

Fontes contínuas têm uma grande aplicação nos laboratórios. Exemplos incluem o tungstênio, o deutério e o xenônio. Para testagens na região visível de RME, lâmpadas de tungstênio ou tungstênio-halogênio são muito utilizadas. O filamento da lâmpada de tungstênio-halogênio é mantido à temperatura mais alta que na lâmpada normal de tungstênio. Isso aproveita a relação de Wien e Sefan para prover uma fonte com um comprimento de onda máximo próximo do centro do espectro visível (mais branco) e com um débito de energia maior (mais brilhante). A introdução do gás halogênio no envelope da lâmpada neutraliza o problema de maior vaporização atômica causado

pela alta temperatura do filamento.

A lâmpada de deutério é rotineiramente utilizada para prover radiação ultravioleta (UV) em espectrômetros analíticos. A voltagem aplicada, geralmente, é de aproximadamente 100 volts, a qual fornece aos elétrons energia suficiente para excitar os átomos de deutério em um gás de baixa pressão para emitir fótons por meio da faixa UV completa.

A forte interação atômica em uma lâmpada de descarga de xenônio de alta pressão produz uma fonte de radiação constante, a qual cobre tanto a faixa UV, quanto a faixa visível. A descarga luminosa, normalmente, é pulsada durante curtos períodos com uma frequência que determina a intensidade média da luz da fonte e também o seu tempo de vida.

Em fontes de emissão atômica em linha, os elétrons movem-se entre níveis de energia atômica. Se o átomo estiver livre de qualquer interação com outros átomos, a quantidade de energia liberada pode ser muito precisa e todos os fótons compartilham um comprimento de onda claramente definido. Essa é a característica da emissão em linha cortante de uma descarga eletrônica em um gás de baixa pressão. Fontes em linha que emitem poucas linhas distintas têm um amplo uso na absorção atômica e na espectroscopia molecular e fluorescente. Lâmpadas de vapor de mercúrio e sódio produzem linhas nítidas nas regiões ultravioleta e visível e são utilizadas em vários espectrofotômetros. Para aplicações da espectroscopia de absorção atômica, a lâmpada de cátodo oco provê emissão de átomos de metal livres usando o calor de uma descarga gasosa (p. ex., no néon) para vaporizar os átomos de metal na descarga. Tipicamente, cada lâmpada é específica para determinado metal. No entanto, algumas utilizam dois, três ou mais metais, embora a emissão de cada um deles seja reduzida.

Uma fonte laser é muito útil na instrumentação analítica em virtude da alta intensidade, da largura de banda estreita e da natureza coerente de seus débitos. Os seus vários usos específicos incluem a espectroscopia de alta resolução, em estudos cinéticos de processos com tempo de vida na faixa de 10^{-9} a 10^{-12} s, na detecção e na determinação de concentrações extremamente pequenas de espécies na atmosfera e na indução de reações isotopicamente seletivas.

Seletores de comprimento de onda

Um componente crítico de todos os espectrômetros é o dispositivo utilizado para selecionar o comprimento de onda adequado. Existem vários tipos de seletores de comprimento de onda, incluindo filtros, prismas, monocromadores de rede de difração e, recentemente, monocromadores de rede de difração holográfica. A qualidade desses seletores é descrita pelo comprimento de onda nominal, pelas larguras e pelas passagens de banda espectral. O *comprimento de onda nominal* representa a dimensão de uma onda em nanômetros, em transmitância máxima. A banda espectral é a faixa de comprimentos de onda 50% acima da transmitância máxima. Algumas vezes, ela é chamada de *full width at half peak maximum* (FWHM). A faixa total de comprimentos de onda transmitidos é a *passagem de banda*. A Figura 4.6 apresenta essas características de seletores de comprimento de onda. Essa figura também mostra a diferença de seletividade de comprimento de onda entre filtros de interferência (esquerda) e de absorbância (direita), que será discutida a seguir.

Filtros

Um componente importante do espectrofotômetro é o filtro de comprimento de onda. Seu objetivo é liberar luz monocromática ou, pelo menos, uma faixa de comprimento de onda luminosa, a mais estreita possível, para a amostra ou para o fotodetector. Lembre-se, o objetivo da espectroscopia de absorção é detectar a quantidade de luz absorvida pela amostra. Isso é mensurado como absorbância e é diretamente proporcional à concentração da amostra (ver "Lei de Beer-Lambert"). A transmitância percentual é a relação entre a quantidade de luz transmitida pela amostra e a quantidade transmitida na ausência dela (p. ex., tampão ou solvente sem a amostra). Teoricamente, seria possível determinar essa relação sem qualquer filtro. No entanto, sob essas circunstâncias, a maior parte da luz que entra na amostra contida na cubeta não será absorvida. Por isso, para se determinar a absorbância, seria necessário mensurar uma pequena diferença entre dois valores altos, isto é, a quantidade de luz transmitida na ausência (controle) e na presença da amostra. Por essa razão, torna-se necessário filtrar o máximo possível a luz "alheia", para permitir mensurações acuradas de absorbância.

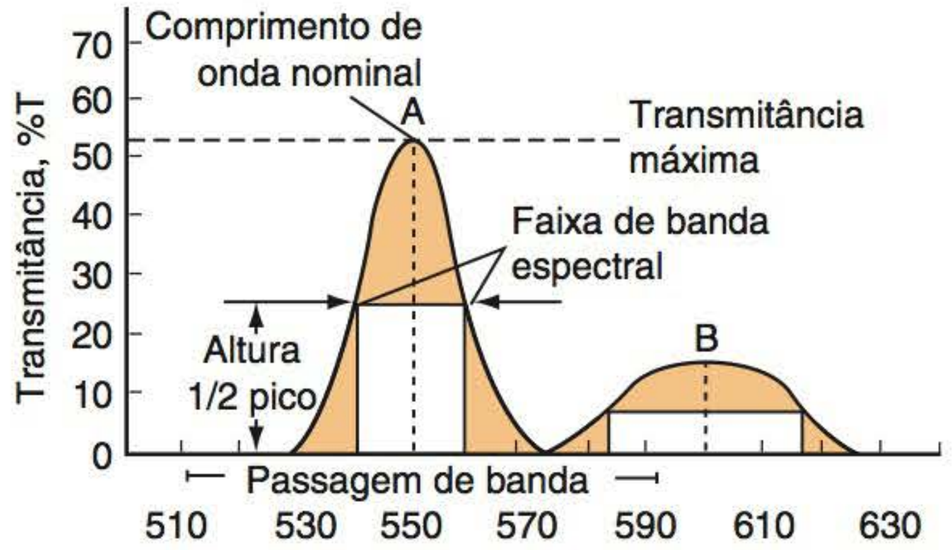


Figura 4.6 Comparação das características espectrais de dois tipos de filtro: A, filtro de interferência e B, filtro de absorção. O comprimento da faixa espectral do filtro A é muito menor que o do filtro B e, por essa razão, ele permite a passagem de um menor número de comprimentos de onda luminosa.

Existem dois métodos para se filtrar ondas luminosas. A primeira é limitar os comprimentos de onda luminosa, que entram na amostra com filtros adequados, chamados filtros pré-amostra. A segunda é permitir que a luz de vários comprimentos passe pela amostra e, em seguida, desmembrar essa luz nos comprimentos de onda que a compõem, utilizando um prisma de alta resolução, focando cada um desses comprimentos de onda em detectores específicos, essencialmente um para cada comprimento de onda que compõe a luz. Quando uma amostra absorve luz em um comprimento de onda, a relação entre a transmitância luminosa desse comprimento de onda da amostra e o de controle pode ser utilizada para se calcular a transmitância percentual e a absorbância. Esse arranjo é denominado filtragem pós-amostra.

Filtros pré-amostra (Bender, 1987). Existe, basicamente, dois tipos desses filtros: filtros de absorção e filtros de interferência. Filtros de absorção simplesmente absorvem regiões do espectro eletromagnético e permitem apenas que um domínio limitado do espectro passe pela cubeta de amostra. O tipo mais simples de filtro de absorção consiste em diferentes formas de vidro. Um tipo de vidro permite apenas a transmissão de comprimentos de onda luminosa acima de 400 nm, enquanto outro permite a transmissão apenas de luz com comprimento de onda abaixo de 600 nm. Se ambos os vidros forem dispostos em série, eles permitem a transmissão de luz com comprimentos de onda entre 400 e 600 nm, com um pico em 500 nm. Como um refinamento dessa abordagem, os espectrofotômetros mais antigos utilizam vidro colorido ou plástico transparente. Essas cores são dispostas em um círculo ou uma roda, de modo que a luz de uma faixa relativamente estreita de comprimento de onda seja transmitida quando cada setor colorido estiver no trajeto luminoso. Por exemplo, se a luz na porção verde do espectro visível for desejada, a roda é girada de modo que o filtro verde seja colocado no trajeto da luz. A banda espectral desses filtros de absorção varia de aproximadamente 30 a 50 nm (Fig. 4.6).

A banda é bem larga, mas adequada para a determinação da concentração de compostos em solução. Filtros de absorbância são menos indicados para varredura do espectro de absorção de compostos e macromoléculas individuais ou para a determinação acurada de baixas concentrações de moléculas. Para atingir esses objetivos, torna-se necessário utilizar filtros de interferência.

No filtro de interferência mais simples, a luz sobre o trajeto até a cubeta de amostra entra em uma câmara de fluoreto de magnésio revestido com microespelhos em seu interior. Como mostra a Figura 4.7*A*, a luz entra homogeneamente por portas ou fendas espaçadas na esquerda. Somente a luz que entra por cada fenda pode continuar; o resto é absorvido pela câmara. A luz que atravessa a fenda, em um ângulo em relação à horizontal, percorre a câmara e é refletida de volta para a parede oposta. Na Figura 4.7*A*, se o comprimento do trajeto *ab* for igual a *bc* e, ao mesmo tempo, não diferenciar o comprimento de onda luminosa desejado, demonstra-se por meio da teoria da óptica que a luz, cujo comprimento de onda é igual ao do trajeto ou de integrais múltiplas desse comprimento, sofrerá interferência construtiva (i. e., as ondas irão adicionar-se umas às outras exatamente) com a luz que chega nas fendas acima. Por exemplo, na Figura 4.7*A*, a luz

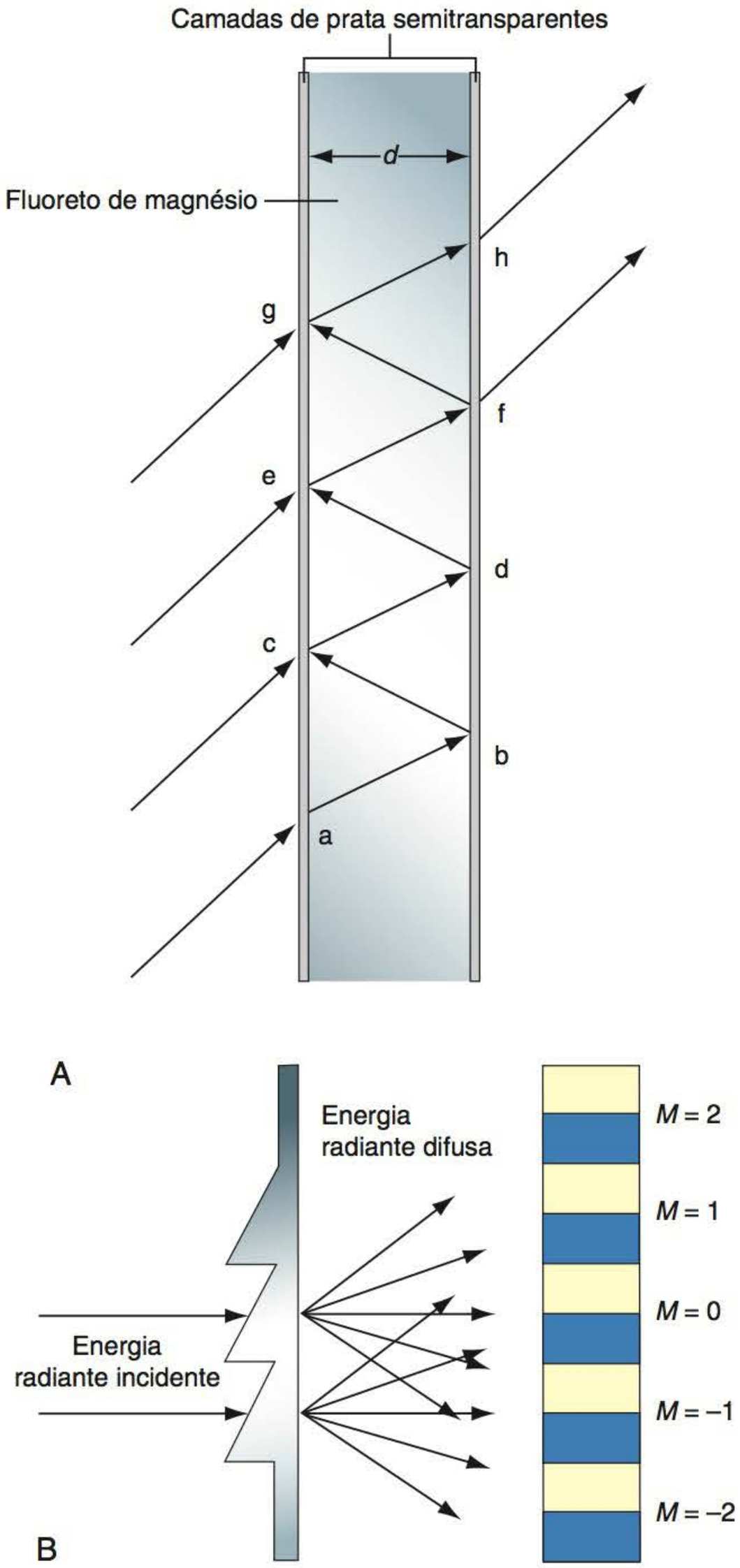


Figura 4.7 *A,* uma interferência de filtro MgF_2. A luz entra no filtro por aberturas regularmente espaçadas no mesmo ângulo de incidência em cada abertura. Indo da base da figura, a luz que entra em *a* vai até *b*, onde existe um espelho que *a* reflete até *c*. Comprimento do trajeto *ab* = *bc*. Por outro lado, quando os comprimentos são iguais ao comprimento de onda desejado (ou integrais múltiplas dele), a luz do comprimento de onda desejado que chega em *c* estará exatamente em fase com a luz da fonte luminosa daquele comprimento de onda e resultará em uma interferência construtiva. Ele estará fora de fase com outros comprimentos de onda e, consequentemente, interagirá de forma destrutiva com os mesmos. Esse processo de somação ocorre múltiplas vezes até que somente a luz do comprimento de onda desejado escape pelas aberturas de saída como em *f* e *h* (segundo Bender, 1987). *B*, um filtro de difração. Quando a luz entra por múltiplas aberturas, como na parte *A*, cada uma sendo equidistante de suas duas vizinhas, a luz de cada um dos comprimentos de onda interfere construtivamente e destrutivamente consigo mesma, dando origem a faixas de luz clara (amarelo) e escura (azul) ou bandas que podem ser observadas em uma tela. A posição e o espaçamento dessas bandas dependem somente do comprimento de onda e do ângulo de incidência. Como é mostrado na figura, quando aberturas são posicionadas, somente os pontos em que franjas claras (amarelo) ocorrem, a luz de um comprimento de onda específico passará por ela na saída.

com comprimento de onda $C = ab$, refletida de *b* a *c*, estará exatamente em fase com a luz de comprimento *C* ou integrais múltiplos de *C*, entrando na fenda em *c*; todos os outros comprimentos de onda interferirão, de modo destrutivo, na luz que entra na fenda *c*. A seguir, a luz é refletida novamente de *c* para *d* e mais uma vez para *e* onde, outra vez, ela irá unir-se (interferir de forma construtiva) apenas às ondas luminosas com o mesmo comprimento ou integrais múltiplas. Por fim, somente a luz com o comprimento de onda desejado será transmitida por intermédio da parede oposta das fendas *f* e *h*.

É importante observar que, como os integrais múltiplos de comprimentos de onda de luz incidente interferirão construtivamente na luz transmitida na câmara, mais de um comprimento de onda luminosa pode ser transmitido pela câmara. A relação quantitativa real entre os comprimentos de onda (*C*) transmitidos pela câmara, o ângulo de incidência (*q*) da luz que entra na fenda, o índice de refração (*R*) do MgF_2 (1.38) e a distância (*d*) por meio da câmara é:

$$ML = 2dR\text{sen}(q) \qquad (4.9A)$$

M é qualquer integral. Observe que a equação prevê que para qualquer distância (*d*), muitos comprimentos, de integrais múltiplas do comprimento de onda fundamental em que $M = 1$, podem ser transmitidos. Na prática, muitos desses comprimentos de onda podem ser excluídos com o uso de técnicas como, por exemplo, a colocação de filtros de vidro adequados em série na câmara de interferência.

O arranjo acima transmite com sucesso a luz monocromática em um determinado comprimento de onda. Contudo, ele não permite a varredura de comprimentos de onda para se obter o espectro de absorção de diferentes amostras. Para isso, outro arranjo similar é utilizado. Nesse caso, porém, a vantagem é tirada de outro princípio da teoria da óptica: o princípio da difração da luz. Como mostra a Figura 4.7*B*, quando é permitido que a luz monocromática entre em duas fendas sobre uma superfície da câmara, de modo bem parecido com o mostrado na Figura 4.7*A*, exceto pelo fato de não haver material (MgF_2) na câmara, as duas ondas luminosas interferem entre si, de modo que uma tela é colocada na superfície oposta da câmara, ocorrerá regiões distintas de faixas claras e escuras (Bender, 1987). As faixas luminosas são de comprimentos de onda adicionados construtivamente um ao outro e são transmitidos, enquanto as faixas escuras são decorrentes da interferência destrutiva das ondas luminosas e nenhuma delas é transmitida. A posição das faixas e a distância entre elas dependem do comprimento da onda luminosa que entra nas duas aberturas e do ângulo de incidência de ambos os feixes. Como, para um determinado ângulo de incidência, a posição de faixas claras de luz monocromática transmitida depende exclusivamente do comprimento da onda luminosa, se fendas de saída forem colocadas na superfície oposta, onde existem faixas claras de luz do comprimento de onda desejado, somente a luz desse comprimento de onda será emitido da câmara. O efeito pode ser aumentado colocando-se múltiplas aberturas de entrada em uma distância fixa (*d*) entre uma e outra como é mostrado na Figura 4.7*B*.

Agora, a luz policromática é composta por múltiplos comprimentos de onda de luz monocromática diferentes. Quando é permitido que a luz policromática passe por duas aberturas, como na Figura 4.7*B*, cada um dos comprimentos de onda interferirá de modo construtivo e destrutivo como foi descrito acima. Dois comprimentos de onda luminosa diferentes interferirão apenas destrutivamente entre si, exceto se houver integrais múltiplas de outra, como discutido acima, no caso da câmara de MgF_2. Isso permite que "aprisionemos" a luz do comprimento de onda luminosa desejado, colocando as aberturas de saída onde sabidamente as faixas claras ocorrem na superfície oposta para aquele comprimento de onda luminosa monocromática. Um fator limitador da seleção da luz verdadeiramente monocromática é o tamanho da abertura, a qual pode permitir que alguma luz "dispersa" das faixas claras adjacentes de comprimentos de onda muito próximos saia.

Como com a câmara de interferência de MgF_2 descrita acima, outra fonte de luz contaminante pode ocorrer devido à luz de comprimentos de onda que são integrais múltiplos do comprimento desejado. A relação que descreve o comprimento de onda como função da distância é similar à da câmara de MgF_2:

$$ML = d\text{sen}(q) \qquad (4.9B)$$

No entanto, aqui *d* é a distância entre duas fendas de entrada adja-

centes situadas na superfície próxima (em direção à fonte luminosa) e *não* a distância da câmara, como na câmara de MgF_2. Observe que, para uma determinada distância (d) e um ângulo de incidência (q), existem múltiplas soluções para essa equação. Por exemplo, se o comprimento de onda desejado for 800 nm, $d\text{sen}(q) = 800$. Mas, isso é para $M = 1$, $C = 800$ nm. Outras soluções são $M = 2$, $C = 400$ nm; e $M = 3$, $C = 266{,}67$ nm; e assim por diante. Como foi discutido em relação à câmara de MgF_2, esses outros comprimentos de onda podem ser filtrados com o uso de filtros de vidro ou outros filtros adequados.

Observe que o sistema apresentado na Figura 4.7*B* permite a varredura contínua do espectro de absorção de qualquer analito. Comprimentos de onda podem ser alterados de forma contínua, mas comumente fazendo uso de dispositivos eletrônicos, que alteram a posição da abertura no lado da saída da câmara ou o ângulo de incidência da luz, que entra por meio da alteração do ângulo da superfície próxima da câmara. Filtros que possuem essa capacidade são denominados monocromadores. Ambos os sistemas de interferência da Figura 4.7 apresentam faixas de banda espectral de aproximadamente 1,5% do comprimento de onda na transmitância máxima, muito menores que as dos filtros de absorção ilustrados na Figura 4.6.

Filtros pós-amostra. Uma abordagem diferente para se obter luz monocromática e uma determinação exata da absorbância é simplesmente permitir que a luz passe através da amostra não filtrada. A seguir, a luz atravessa um prisma, onde é decomposta nos comprimentos de onda que a constituem. A ação de um prisma depende da refração de radiação de seu material. O poder de dispersão depende da variação do índice de refração no comprimento de onda. Um raio de radiação que entra no prisma em um ângulo de incidência é inclinado em direção à normal (vertical à face do prisma) e, na interface prisma-ar, ele é inclinado para longe da vertical. Conforme descrito na seção sobre fotomultiplicadores abaixo, cada comprimento de onda é focado em um conjunto de fotodiodos, de modo que cada fotodiodo responde unicamente a um conjunto específico de comprimentos de onda. A quantidade de luz transmitida em presença da amostra é comparada com a observada na ausência dela. Conjuntos de fotodiodo são exemplos de dispositivos que convertem energia fotônica em corrente elétrica, em um sistema em que os fótons excitam os elétrons externos em metais para se mover na chamada faixa de condução, gerando uma corrente.

Recipientes de amostra (cubetas)

Recipientes de amostras, isto é, células ou cubetas, são utilizados e devem ser feitos de material transparente à radiação da região espectral de interesse. Para a região ultravioleta (abaixo de 350 nm), cubetas são feitas de sílica ou quartzo fundido. Vidros de silicato podem ser utilizados para a região entre 350 e 2.000 nm. Recipientes plásticos também têm utilidade para a região visível. Em geral, o comprimento de trajeto até as cubetas é de 1 cm, embora os comprimentos mais curtos sejam utilizados em sistemas automatizados. Contudo, para aumentar a sensibilidade, algumas cubetas são projetadas para terem comprimentos de trajeto mais longos (de 10 cm), aumentando a absorbância para uma determinada solução por um fator 10 (lei de Beer; equação 4.7).

Muitos espectrômetros com feixe duplo são projetados com dois receptáculos de cubetas; um para a amostra e outro para o solvente. Para a obtenção de resultados mais acurados, quando duas cubetas forem utilizadas, elas devem ser iguais opticamente. O fabricante fornece pares correspondentes, mas seu desempenho deve ser verificado antes da utilização no processamento de amostras idênticas em cada célula. Uma célula deve ser reservada para a solução da amostra e a outra para o solvente. As células devem ser rigorosamente limpas antes e após cada utilização.

Fotodetectores

É necessário determinar quanta luz passa pela da amostra na cubeta. Para realizar essa tarefa, é tirada vantagem do efeito fotoelétrico, que é a base da teoria quântica. Fótons com comprimento de onda específico excitam os elétrons da camada externa de metais em suas frequências de ressonância para estados de alta energia, nos quais eles se movem pela chamada "faixa de condução", na qual os elétrons se movem pelas camadas externas do metal e, consequentemente, produzem uma corrente. Essa corrente, cuja magnitude está diretamente relacionada à intensidade da luz incidente, pode então ser detectada e digitalizada.

Tubos fotomultiplicadores. Talvez o tipo mais comum de detector de fótons seja o fotomultiplicador. Tubos fotomultiplicadores são utilizados quando a energia radiante é muito baixa, o que é característico de baixas concentrações de analito. O princípio operacional é similar ao do fototubo, com uma diferença importante: um tubo fotomultiplicador possui múltiplos dinodos, que resultam na passagem de 10^6 a 10^7 elétrons pelo ânodo. A resposta do tubo fotomultiplicador começa quando os fótons atingem um fotocátodo. Elétrons são ejetados da superfície do fotocátodo. Um tubo fotomultiplicador possui vários eletrodos adicionais chamados dinodos, cada qual possuindo um potencial que é aproximadamente 90 V mais alto que o anterior. Ao atingir um dinodo, cada fotoelétron provoca a emissão de vários outros elétrons. Por sua vez, estes aceleram em direção a um segundo dinodo, o qual é 90 V mais positivo que o anterior, o que amplifica mais o sinal incidente. Esse processo, mostrado na Figura 4.8, continua no tubo fotomultiplicador até que todos os elétrons sejam coletados no ânodo, no qual a corrente resultante é passada para um amplificador eletrônico.

Tubos fotomultiplicadores são altamente sensíveis a radiações ultravioleta e visível. Eles também possuem um tempo de resposta muito rápido. Esses tubos apresentam limitações para mensurar radiação de baixa potência, porque a luz intensa produz dano irreversível à superfície fotoelétrica.

Célula fotovoltaica. Um método diferente de detecção de corrente fotoinduzida é a célula fotovoltaica. Trata-se de um fototransdutor básico que é utilizado para detecção e mensuração da radiação na região visível. Tipicamente, a célula possui uma sensibilidade máxima a aproximadamente 550 nm e a resposta cai para aproximadamente 10% do máximo a 350 nm e 750 nm. Ela consiste em um eletrodo chato de cobre ou de ferro, sobre o qual é depositada uma camada de material semicondutor (p. ex., selênio). A superfície externa do semicondutor é revestida por uma película metálica fina e transparente de ouro ou prata, que serve como segundo eletrodo ou eletrodo condutor. Quando a radiação de energia suficiente atinge o semicondutor, ligações covalentes são rompidas, com consequente condução de elétrons e formação de buracos. Os elétrons migram em direção à película metálica e os buracos em direção à base sobre a qual o semicondutor é depositado. Os elétrons liberados ficam livres para migrar pelo circuito externo e interagir com aqueles buracos. O resultado é uma corrente elétrica com uma magnitude proporcional ao número de fótons que atingem a superfície do semicondutor e uma corrente fotônica que é diretamente proporcional à intensidade da radiação que atinge as células.

Esses tipos de fotodetectores são rústicos, de baixo custo e não exigem fonte externa de energia elétrica. A baixa sensibilidade e a fadiga são duas desvantagens distintas dessas células. Para análises de rotina em comprimentos de onda ideais, essas células fotovoltaicas fornecem dados analíticos confiáveis.

Fototubos a vácuo. Um fototubo a vácuo possui um cátodo semicilíndrico e um fio metálico conectado ao ânodo selado a vácuo no interior de um envelope transparente. A superfície côncava do eletrodo suporta uma camada de material fotoemissor, que tende a emitir elétrons, quando irradiada. Quando um potencial é aplicado no eletrodo, os elé-

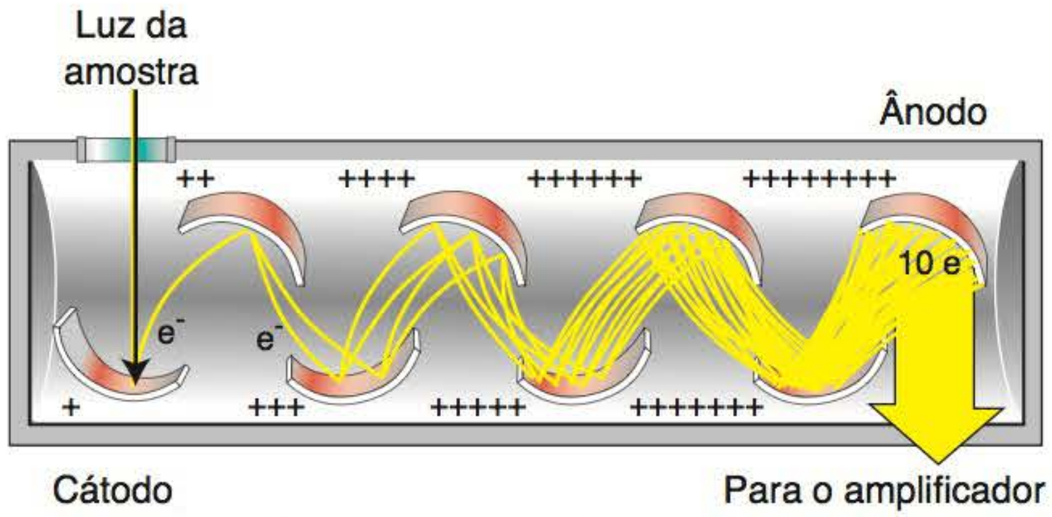


Figura 4.8 Esquema de um tubo fotomultiplicador. Neste diagrama, uma amplificação de dez vezes do sinal inicial é produzida no ânodo. (Reproduzido de Simonson MG: *In* Kaplan LA, Pesce AJ [Eds]: Nonisotopic Alternatives to Radioimmunoassay. New York, Marcel Dekker, 1981.)

trons emitidos fluem para o fio metálico conectado ao ânodo, gerando uma fotocorrente associada a células fotovoltaicas em uma determinada intensidade. Vários tipos de superfícies fotoemissoras são utilizados em produtos comerciais. Eles incluem: (1) materiais bialcalinos altamente sensíveis feitos de potássio, césio e antimônio, (2) material sensível vermelho, utilizando multiálcalis (p. ex., Na/K/Cs/Sb), (3) janelas transparentes sensíveis ao ultravioleta, e (4) substâncias com resposta sem desvio utilizando composições de Ga/As.

Transdutores com diodo de silício. Eles são mais sensíveis que os fototubos a vácuo, mas menos sensíveis que os tubos fotomultiplicadores descritos acima. Fotodiodos possuem faixas espectrais de aproximadamente 190 a 1.100 nm. Esses dispositivos contêm materiais semicondutores carregados positivamente (p) e negativamente (n), contíguos, em um chip de silício. Uma fonte de energia é conectada a esse arranjo, de modo que o seu polo positivo conecta-se ao material tipo n e o polo negativo ao tipo p. Esse arranjo resulta em uma camada de depleção, que reduz a condutância da junção para próximo de zero. Se for permitido que a radiação atinja o chip, buracos e elétrons formados na camada de depleção são varridos pelo dispositivo, para produzir uma corrente que é proporcional à energia radiante (Skoog, 1998). Esse processo é mostrado na Figura 4.9.

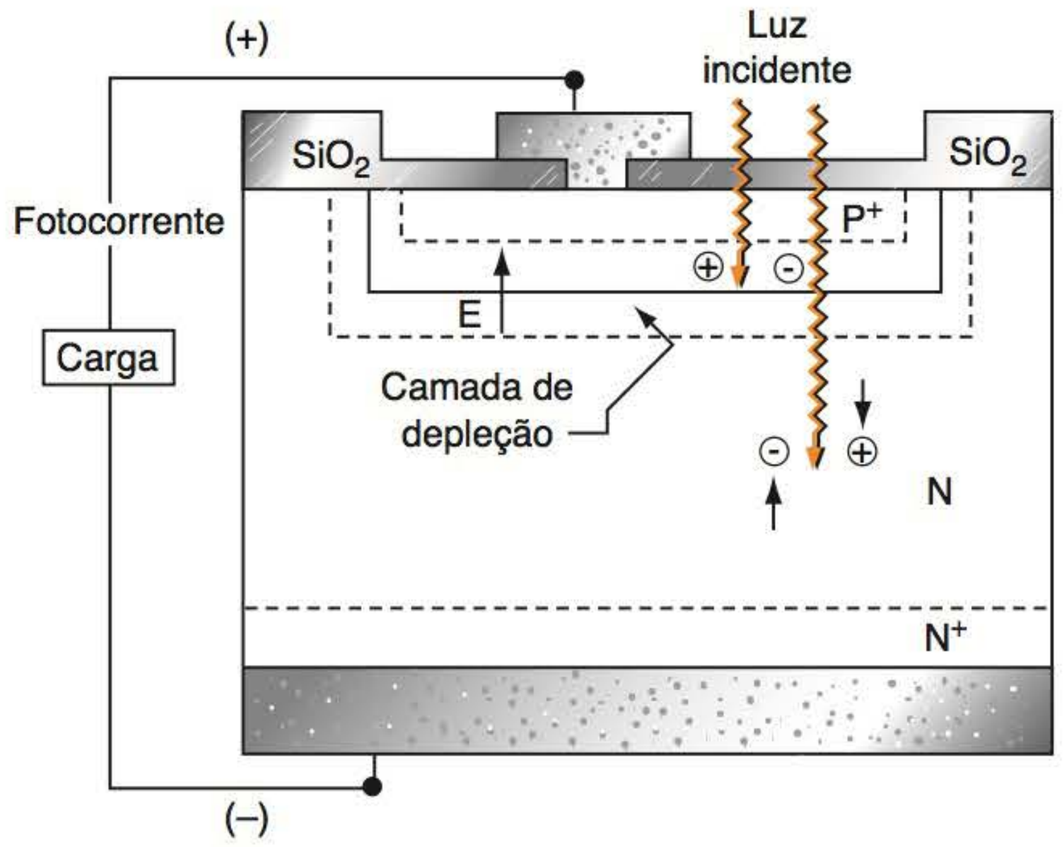


Figura 4.9 Esquema de um fotodiodo semicondutor utilizado como detector em muitos espectrômetros.

Transdutor fotoelétrico multicanal. Na discussão sobre filtros pós-amostra, foi observado que a luz não filtrada, que emerge da amostra, poderia ser decomposta em seus comprimentos de onda constituintes usando prismas. Esses diferentes comprimentos são, então, direcionados a detectores eletrônicos, de modo que a intensidade luminosa de cada comprimento de onda constituinte possa ser quantificada. Aqui, descreveremos alguns desses fotodetectores de comprimentos de onda múltiplos.

Um transdutor multicanal consiste em um conjunto de pequenos elementos fotoelétricos sensíveis dispostos linearmente ou em um padrão bidimensional em um único chip semicondutor. O chip, geralmente de silício e com dimensões de alguns poucos milímetros de largura, também contém um circuito eletrônico que torna possível a determinação do sinal de débito elétrico de cada um dos elementos fotossensíveis sequencial ou simultaneamente. O alinhamento de um transdutor multicanal ocorre, em geral, no plano focal de um espectrômetro, de modo que vários elementos do espectro disperso possam ser convertidos e mensurados de forma simultânea. Vários tipos de transdutores multicanais são utilizados atualmente e eles incluem: (1) conjuntos de fotodiodo (PDAs), (2) dispositivos de injeção de carga (CIDs) e (3) dispositivos de carga acoplada (CCDs).

Conjuntos de fotodiodos. Utilizando técnicas modernas de fabricação de microeletrônicos, atualmente é possível produzir um conjunto linear (unidimensional) de várias centenas de fotodiodos alinhados lado a lado em um único circuito integrado ou "chip" (Fig. 4.10). Cada diodo é capaz de registrar a intensidade em um ponto ao longo da linha e, em conjunto, eles fornecem um perfil linear da variação luminosa ao longo do conjunto.

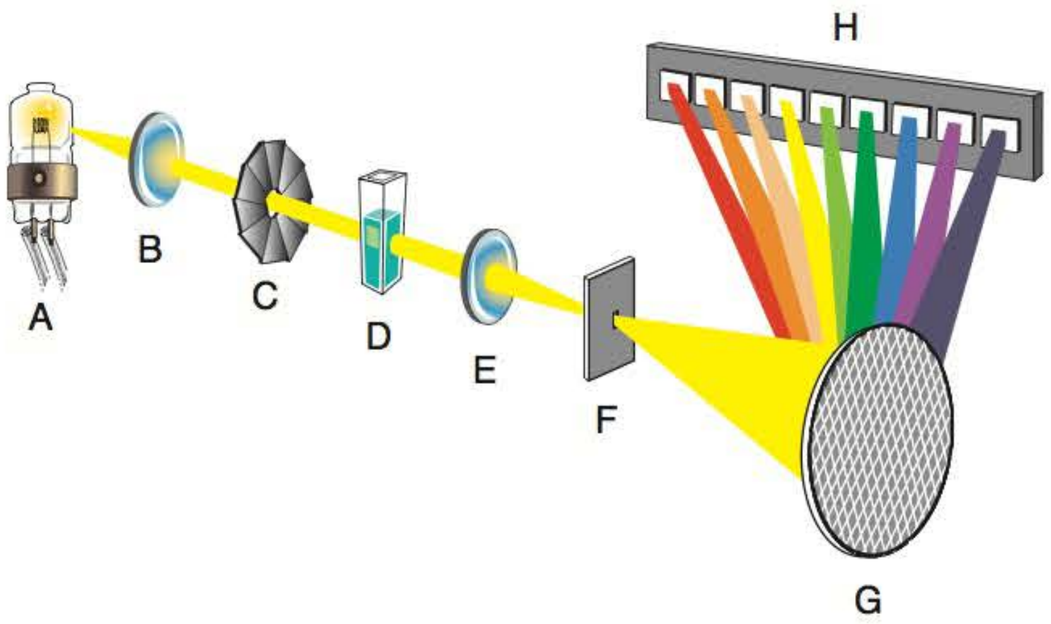


Figura 4.10 Conjunto de fotodiodo. A, lâmpada; B, lente; C, obturador; D, célula; E, lente; F, fenda; G, grade; H, conjunto de fotodiodo.

Um método multiplex é utilizado para ordenar todos os sinais recebidos do PDA (*photodiode arrays*). Ele registra cada sinal individualmente e, a seguir, alimenta os sinais de maneira sequencial em um único amplificador. O resultado do PDA é um perfil de histograma, ao longo do conjunto, da carga escoada por cada fotodiodo. Ele reflete a variação da intensidade luminosa através do conjunto. Portanto, a detecção do PDA ocorre em três estágios principais:

1. inicialização;
2. acúmulo de carga em cada pixel-tempo de integração;
3. sinais de leitura.

Em comparação com os tubos fotomultiplicadores, o PDA possui uma faixa dinâmica mais baixa e um ruído maior. Ele é mais útil como detector multicanal simultâneo (Skoog, 1998).

Dispositivos de transferência de carga. Desenvolvimentos de técnicas de detecção de estado sólido recentes produziram detectores bidimensionais muito eficazes, que operam por meio de um processo de transferência de carga, uma alternativa aos fotodiodos. O termo "dispositivo de transferência de carga" (CTD, *charge-transfer device*) é genérico, descreve um sistema de detecção no qual um fóton, ao atingir o material semicondutor do circuito integrado, libera elétrons de seu estado ligado para o móvel. A carga liberada, que consiste em elétrons negativos e buracos positivos, dirige-se e acumula-se nos eletrodos de superfície. Um conjunto desses eletrodos divide o detector em "*pixels*" sensíveis à luz separados. A carga acumulada em cada eletrodo é proporcional à intensidade luminosa integrada que incide sobre aquele pixel em particular.

Existem duas classes distintas de CTDs: dispositivos de injeção de carga (CIDs, *charge-injection devices*) e dispositivos de carga acoplada (CCDs, *charge-couple devices*). Em um CCD, todos os pacotes de carga são movidos, "em etapas", ao longo da linha do conjunto, de um *pixel* a outro, como em uma "cadeia de baldes". No final da linha, os pacotes de carga são alimentados de forma sequencial em um amplificador de baixo ruído *on-chip*, que converte a carga em um sinal de voltagem. O perfil global do sinal pelo conjunto bidimensional é registrado uma linha por vez e, consequentemente, fornece uma série de sinais de voltagem correspondentes a todos os pixels da área de detecção.

Em um CID, a carga acumulada em cada pixel pode ser mensurada de modo independente e não destrutivo com o uso de uma rede de eletrodos "detectores", os quais podem monitorar a presença da carga acumulada. Isso é um importante fator que diferencia sistemas CID dos sistemas PDA e CCD, nos quais toda a área de detecção é "lida" destrutivamente em um único processo.

Processadores de sinal e leitura

O processamento de um sinal elétrico recebido de um transdutor é realizado por um dispositivo que amplifica, corrige AC em DC (ou o inverso), altera a fase do sinal e o filtra para remover componentes indesejados. Além disso, o processador de sinal pode ter de realizar operações matemáticas (p. ex., cálculos diferenciais, integração ou conversão em um algoritmo). Vários dispositivos de leitura têm sido utilizados e incluem medidores digitais, medidores de Arsoval, gravadores, diodos emissores de luz (LEDs), tubos de raios catódicos (CRTs) e telas de cristal líquido (LCDs).

Garantia de qualidade na espectrofotometria

Existem vários parâmetros fotométricos que devem ser monitorados periodicamente pelos usuários. A monitoração desses parâmetros é considerada obrigatória pela maioria das organizações e agências reguladoras . Os parâmetros rotineiramente incluem:

- comprimento de onda ou acurácia fotométrica;
- checagem da absorbância;
- linearidade;
- dispersão luminosa.

Acurácia é a proximidade de uma mensuração de seu valor real. A acurácia do comprimento de onda implica no fotômetro mensurar o comprimento de onda ao qual ele foi ajustado. A acurácia fotométrica pode ser avaliada com muita facilidade, utilizando filtros ópticos de vidro. Dois exemplos de filtros utilizados incluem didímio e óxido de hólmio. O vidro de didímio apresenta múltiplos picos de absorção com um pico acentuado ocorrendo a 360 nm.

A checagem da absorbância é realizada utilizando filtros de vidro ou soluções que possuam valores de absorbância conhecidos para um comprimento de onda específico. O operador simplesmente mede a absorbância de cada solução em um comprimento de onda especificado e compara os resultados com os valores estabelecidos. Cada usuário deve estabelecer uma tolerância, baseada em critérios aceitos, para as mensurações.

Linearidade é definida como a capacidade de um sistema fotométrico produzir uma relação linear entre a energia radiante, que incide sobre o seu detector, e a concentração, isto é, a lei de Beer. A linearidade de um espectrômetro pode ser determinada utilizando filtros ópticos ou soluções que possuam valores de absorbância conhecidos para um determinado comprimento de onda. Mensurações da linearidade devem avaliar tanto a inclinação quanto o intercepto.

A luz dispersa é descrita como qualquer luz que incide no detector e que não é originária da fonte de luz policromática. A luz dispersa pode ter um impacto significativo sobre qualquer mensuração realizada. O efeito da luz dispersa pode ser avaliado utilizando filtros especiais de corte.

Tipos de instrumentos fotométricos

Há vários desenhos e configurações de instrumentos utilizados para a fotometria de absorção. Cada um possui uma terminologia exclusiva associada ao seu desenho. A terminologia não é universal entre os usuários, mas é apresentada aqui como um guia. Um *espectroscópio* é um instrumento óptico utilizado para identificação visual de linhas de emissão atômica. Ele possui um monocromador, usualmente um prisma ou uma rede de difração, no qual a fenda de saída é substituída por uma ocular, que pode ser movida ao longo do plano focal. O comprimento de onda de uma linha de emissão pode então ser determinado a partir do ângulo entre o feixe incidente e o disperso, quando a linha é centrada na ocular.

Um *colorímetro* utiliza o olho humano como detector. O usuário compara a cor observada da amostra desconhecida com um padrão ou com uma série de padrões coloridos de concentrações conhecidas. *Fotômetros* são compostos por uma fonte luminosa, um filtro e um transdutor fotoelétrico, assim como um processador de sinal e um leitor. Alguns fabricantes utilizam os termos colorímetro ou colorímetro fotoelétrico para o fotômetro. Esses fotômetros utilizam filtros para isolamento de comprimentos de onda específicos e em vez de redes de difração ou prismas.

Um *espectrômetro* é um instrumento que proporciona informações sobre a intensidade da radiação como função do comprimento de onda ou da frequência. Espectrofotômetros são espectrômetros equipados com uma ou mais fendas de saída e transdutores fotoeletrônicos, que permitem a determinação da relação entre a potência dos dois feixes como função do comprimento de onda, como na espectroscopia de absorção. A maioria dos espectrofotômetros utiliza um monocromador de rede de difração para decompor a luz em um espectro, como já discutido na seção sobre filtros pré-amostra.

Espectrômetros de feixe único são os tipos mais simples de espectrômetro de absorção. Esses instrumentos são destinados a realizar uma mensuração por vez, em um comprimento de onda especificado. Ao utilizar um instrumento de feixe único, a absorção máxima do analito deve ser conhecida previamente. Em seguida, o comprimento de onda é ajustado a esse valor. O material de referência (solvente incolor) é posicionado no trajeto da radiação e o instrumento é ajustado para ler 0%T, quando um obturador for colocado de modo a bloquear toda a radiação do detector, e para ler 100%T, quando o obturador for removido. Após esses ajustes, a amostra é colocada no trajeto, a absorbância é mensurada e a concentração é determinada usando a lei de Beer, uma curva de calibração para o material ou os métodos algébricos adequados.

Um espectrofotômetro de feixe duplo divide ou corta o feixe monocromático de radiação em dois componentes. Um feixe passa através da amostra e o outro passa através de uma solução de referência. Nessa ilustração, a energia radiante do feixe de referência varia conforme a fonte de energia, a transmissão do monocromador, a transmissão do material de referência e a resposta do detector, fazendo a diferença entre o feixe da amostra e o da referência uma função da amostra. O débito do feixe de referência pode ser mantido constante e a absorbância da amostra pode ser registrada diretamente como o débito elétrico do feixe da amostra.

Existem dois modelos fundamentais de espectrofotômetros de feixe duplo: (1) feixe duplo no espaço e (2) feixe duplo no tempo. Um feixe duplo no espaço utiliza dois fotodetectores, um para o feixe da amostra e outro para o feixe de referência. Os dois sinais gerados são direcionados para um amplificador diferencial, que transmite a diferença entre os sinais para o dispositivo de leitura. Um esquema do sistema de feixe duplo no espaço é mostrado na Figura 4.11.

Um instrumento de feixe duplo no tempo utiliza um fotodetector e, alternativamente, transmite a radiação monocromática através da cubeta de amostra e, a seguir, através da cubeta de referência utilizando um obturador eletromecânico (*chopper*). Obturador eletromecânico é um termo utilizado para designar um dispositivo como um espelho de setor rotatório que dissocia ou roda os feixes de radiação. Cada feixe, consistindo em um pulso de radiação separado no tempo por um intervalo escuro, é então direcionado para um detector adequado. Um esquema do sistema de feixe duplo no tempo é mostrado na Figura 4.12.

Um sistema de varredura de feixe duplo inclui um espectrofotômetro de feixe duplo e um gravador que pode fornecer um gráfico X-Y da absorbância *versus* comprimento de onda para uma determinada amostra de exame. Esse tipo de configuração é ideal para a determinação do espectro de comprimento de onda de um analito em solução. O espectrofotômetro possui uma câmara de comprimento de onda impulsionada automaticamente que pode rodar a uma velocidade predeterminada. O gravador pode ser ajustado ao comprimento de onda do monocromador para facilitar a identificação de cada pico máximo.

Reflectometria

Mensurações de analitos em líquidos biológicos utilizando a reflectometria têm sido utilizadas há décadas. Duas aplicações clínicas incluem a análise urinária com *dipstick* e a química com lâmina seca. Um reflectômetro é um fotômetro de filtro que mensura a quantidade de luz refletida por uma amostra líquida colocada sobre um suporte sólido granuloso ou fibroso.

Há dois tipos de reflectância: (1) especular e (2) difusa. A reflectância especular ocorre sobre uma superfície polida, na qual o ângulo de incidência da energia radiante é igual ao ângulo de reflexão. Superfícies

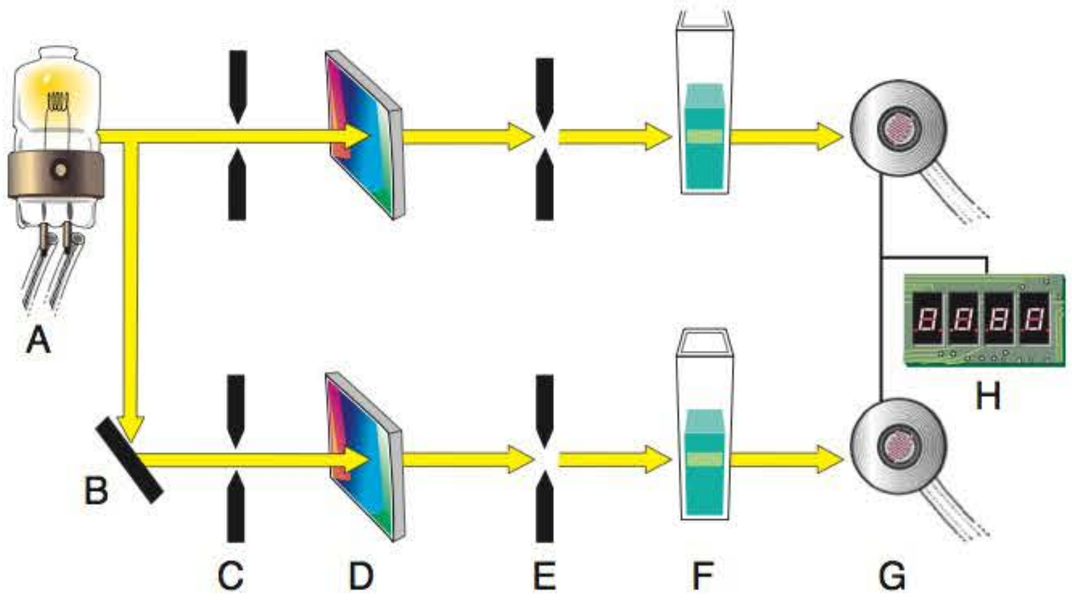


Figura 4.11 Feixe duplo no desenho espacial do espectrofotômetro. A, lâmpada excitadora; B, espelho; C, fendas de entrada; D, monocromadores; E, fendas de saída; F, cubetas; F, fotodetectores; H, diodo emissor de luz (LED, *light-emitting diode*).

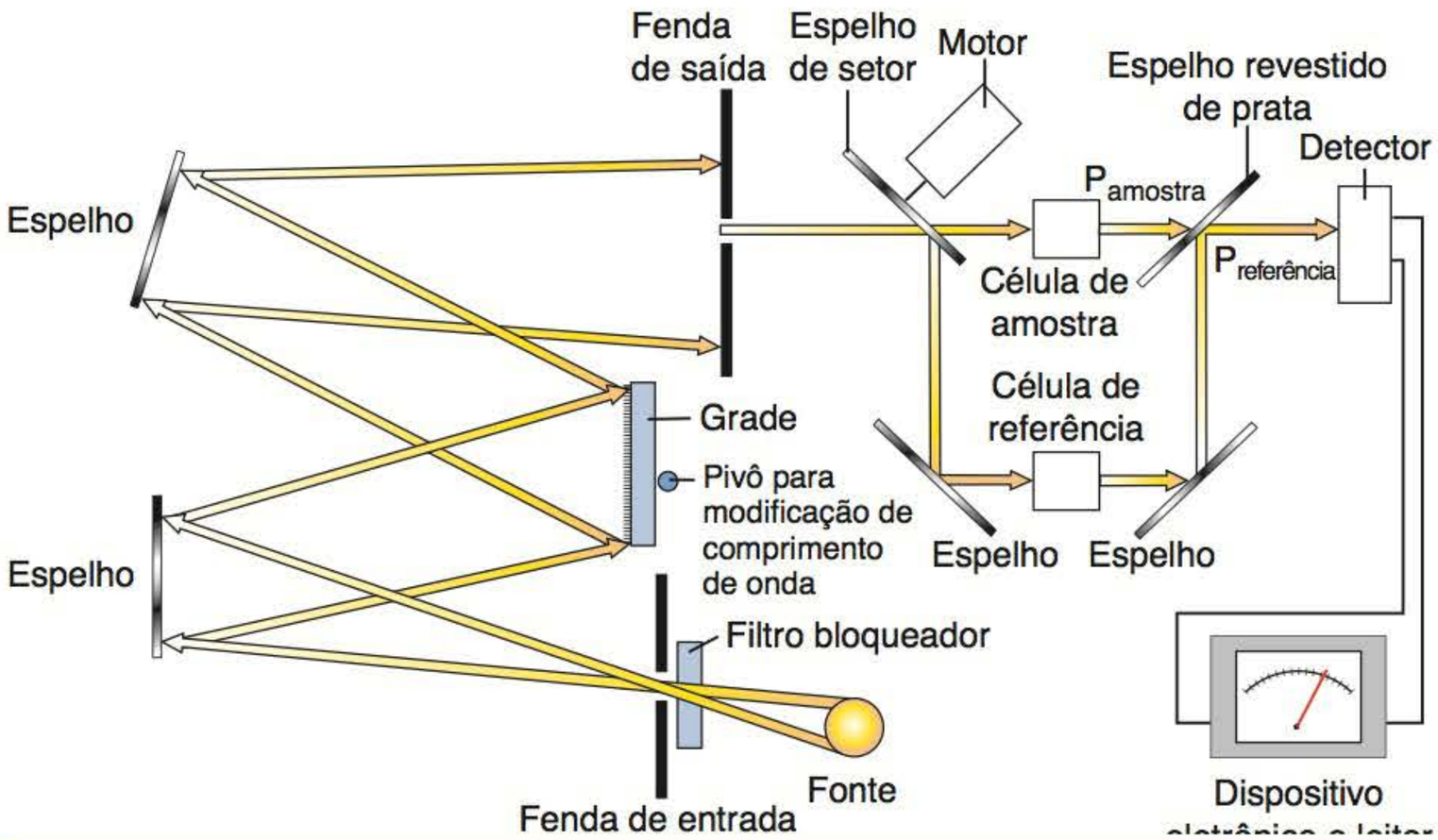


Figura 4.12 Feixe duplo no desenho temporal do espectrofotômetro.

polidas (p. ex., um espelho) são utilizadas para direcionar e controlar a energia radiante, mas não para determinar a concentração. A reflectância difusa ocorre sobre superfícies não polidas (p. ex., superfícies granulosas ou fibrosas). A energia radiante refletida tende a ir para muitas direções. A reflexão difusa ocorre nas camadas e depende das propriedades e das características das camadas em si. Uma substância colorida absorve o comprimento de onda de sua cor e reflete todos os outros comprimentos de onda em diferentes ângulos. Por essa razão, a quantidade de uma substância presente pode ser mensurada como função indireta da luz refletida.

Um reflectômetro típico, utilizado em um laboratório clínico, detecta apenas uma fração constante da luz refletida difusa. Por isso, a reflectância de uma amostra é representada por:

$$R_{(\text{reflectância difusa})} = \frac{R'_{(\text{fração da reflectância difusa da amostra})}}{R'_{(\text{fração da reflectância difusa de um padrão})}} \qquad (4.10A)$$

A quantidade de luz refletida por uma solução colocada sobre uma superfície granulosa branca está inversamente relacionada com a concentração das amostras:

$$R_{\text{densidade}} = -\log\left(\frac{R_{\text{amostra}} - R_{\text{preto}}}{R_{\text{padrão}}}\right) \times R_{\text{branco}} \qquad (4.10B)$$

Em que:

$R_{\text{densidade}}$ é a densidade da reflectância corrigida da; amostra;
R_{amostra} é a reflectância mensurada da amostra;
R_{preto} é a reflectância de uma referência preta;
R_{branco} é a reflectância de uma referência branca;
$R_{\text{padrão}}$ é a reflectância de uma solução padrão.

O valor ideal da reflectância de um padrão branco puro de material cerâmico é *um*, isto é, toda a luz é refletida. Ao contrário, o valor ideal da reflectância de um padrão preto é *zero*, isto é, toda a luz é absorvida.

A relação entre a reflectância percentual e a concentração de um analito é não linear. Vários algoritmos foram desenvolvidos para a linearização dessa relação. O algoritmo específico utilizado dependerá das características da reflexão do material que compõe o coxim ou a película, da natureza da eliminação e da geometria do instrumento.

Reflectômetros

Os componentes de um reflectômetro são muito similares aos de um fotômetro como o mostrado na Figura 4.13. Uma lâmpada de halogênio/tungstênio-quartzo serve como fonte de radiação policromática. Um monocromador (p. ex., filtro estacionário ou roda de filtro para múltiplos analitos) é utilizado para isolar o comprimento de onda de interesse. A seguir, a luz monocromática passa por uma fenda e é direcionada sobre a superfície do coxim do *dipstick* de urina ou da lâmina seca dependendo de qual instrumentação que estiver sendo utilizada. Fotodiodos de estado sólido são em geral utilizados para a

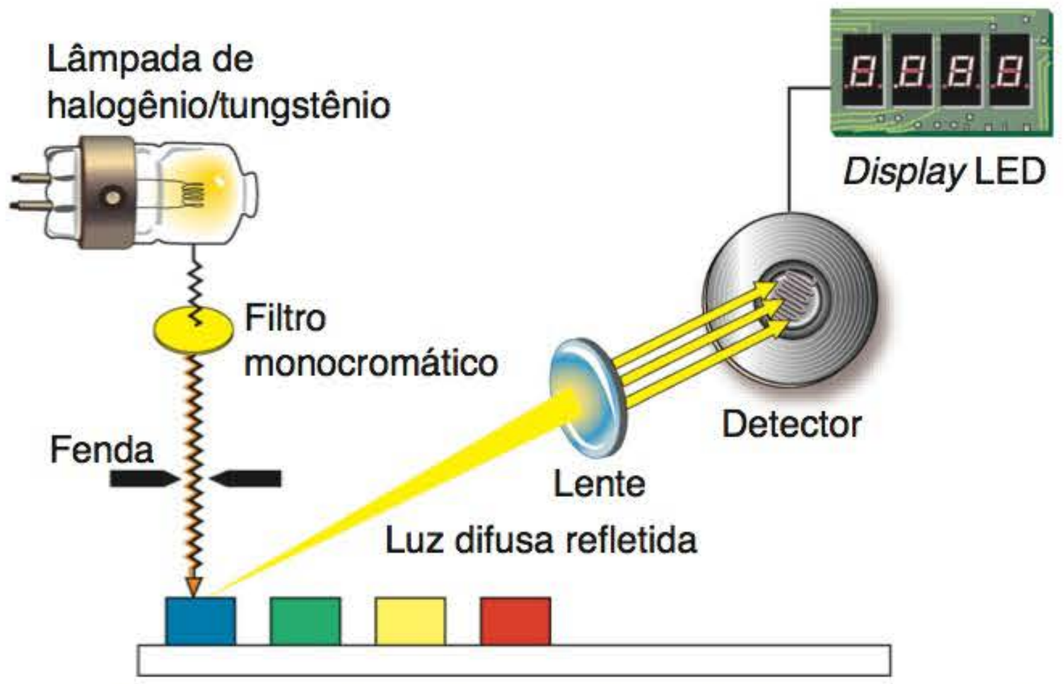


Figura 4.13 Componentes de um refletômetro típico utilizado para mensurar analitos em fitas reagentes de urina. Os diferentes blocos coloridos representam diferentes exames realizados na urinálise; o azul representa a quantificação do analito utilizando a reflectância, isto é, a reflectância da luz focada sobre a amostra e refletida em um ângulo (feixe amarelo), onde ela é detectada.

detecção da energia radiante refletida. Dispositivos ópticos especiais (p. ex., fibras ópticas ou espelhos elipsoidais) podem ser utilizados para direcionar a energia radiante para o detector. Um computador ou um microprocessador é utilizado para converter sinais de reflectância não lineares em unidades de concentração de leitura direta.

Espectrometria de luminescência molecular (fluorometria)

Princípio. A luminescência baseia-se no processo de troca de energia que ocorre quando certos compostos absorvem radiação eletromagnética, agitam-se e retornam para um nível energético inferior ou igual ao do seu nível original. Como, no estado de agitação, ocorreu uma perda de energia antes da emissão em decorrência da colisão com o solvente ou outras moléculas, o comprimento de onda da luz emitida é mais longo que o da luz excitante. A maioria das moléculas não carregadas contém números iguais de elétrons no estado fundamental. Os elétrons preenchem órbitas moleculares em pares com suas rotações em direções opostas. Nenhuma energia eletrônica pode ser detectada pela aplicação de um campo magnético nesse padrão de rotação e esse estado eletrônico é chamado estado singlete. Similarmente, se um elétron se tornar excitado pela radiação eletromagnética e sua rotação permanecer pareada com o estado fundamental, ele cria um estado singlete excitado. O tempo de duração do estado excitado é o tempo médio que a molécula permanece excitada antes da emissão

de luz. Para um estado singlete excitado, o tempo do estado excitado é da ordem de 10^{-9} a 10^{-6} s. A emissão de luz de um estado singlete excitado é denominado *fluorescência*. Quando as rotações dos elétrons no estado excitado não são pareadas, o nível de energia dos elétrons será cindido ao aplicar um campo magnético. Esse estado eletrônico é denominado estado triplete. O tempo de duração do estado triplete varia de 10^{-4} a 10 s (Willard, 1988). A emissão de luz de um estado triplete excitado é denominada *fosforescência*.

A luminescência é muito utilizada por causa de sua alta sensibilidade. A relação sinal–ruído é muito alta, isto é, o sinal pode ser comparado a um ruído de fundo próximo de zero. A alta especificidade é uma função do uso de dois espectros, os de excitação e os de emissão, e a possibilidade de se mensurar o tempo de duração do estado fluorescente. Dois compostos que são excitados no mesmo comprimento de onda e, no entanto, emitem em diferentes comprimentos de onda, são prontamente diferenciados com essa técnica.

Componentes de fluorômetros e espectrofotofluorômetros. Instrumentos destinados a mensurar a fluorescência apresentam os seguintes componentes básicos: uma fonte de luz, um monocromador de excitação (primário), uma cubeta, um monocromador de emissão (secundário) e um fotodetector (Fig. 4.14). A lâmpada excitante é uma fonte de luz de alta intensidade (p. ex., lâmpada de vapor de mercúrio ou lâmpada de arco de xenônio). Instrumentos simples utilizam lâmpadas de vapor de mercúrio, que não requerem qualquer suprimento de energia especial. Lâmpadas de vapor de mercúrio produzem linhas de ressonância distintas e intensas que não são ideais para compostos com faixas de absorção em comprimentos de onda que não coincidem com essas faixas de emissão. Para tais compostos, lâmpadas de arco de xenônio, que produzem um espectro contínuo intenso entre 300 e 1.300 nm, são as mais adequadas. Essas lâmpadas são utilizadas em quase todos espectrofluorômetros comerciais. Em mensurações da fluorescência, a luz emitida é detectada em um ângulo reto em relação à luz incidente, para eliminar a possível interferência do sinal de excitação. Fototubos ou tubos fotomultiplicadores são necessários para mensurações da fluorescência, porque os sinais, em geral, são de baixa intensidade. Fluorômetros mais novos disponíveis no mercado utilizam arranjo de diodos e CTDs, que permite o registro rápido dos espectros de excitação e emissão, e são muito úteis na cromatografia e na eletroforese.

Ensaios de fluorescência resolvida no tempo minimizam problemas inerentes a outros ensaios fluorescentes como, por exemplo, a sobreposição dos espectros de excitação ou a emissão de compostos presentes na amostra com o fluoróforo. Em geral, o marcador mais utilizado é um quelato de európio (Eu^{3+}). A energia é absorvida pelo ligante orgânico, levando a um estado excitado na medida em que os elétrons migram do estado singlete fundamental para o estado singlete excitado. A excitação pode levar a qualquer multiplete vibracional do estado excitado (S_1). Rapidamente, a molécula retorna a seu nível energético mais baixo em S_1 por um processo não radioativo. A energia é transferida para o íon metal, que se excita e, por conseguinte, emite radiação característica. A transição radioativa do Eu^{3+}, após uma transferência de energia do estado triplete, acarreta a emissão de um comprimento de onda de 613 nm. O tempo de vida da fluorescência do quelato Eu^{3+} é de 10 a 1.000 ms em comparação com nanossegundos para os fluoróforos mais comumente utilizados. Portanto, o tempo de emissão mais longo do Eu^{3+} torna o seu uso mais atrativo que o de um fluoróforo, como a fluoresceína que possui um tempo de vida de 4,5 ns. Instrumentos de fluorescência resolvida no tempo são similares ao fluorômetro típico, exceto pelo fato de utilizarem uma medida controlada pelo tempo apenas sobre uma porção dos espectros de emissão total.

Aplicações de *quimioluminescência* aumentaram dramaticamente por causa de sua maior sensibilidade em comparação com a fluorescência. A aplicação primária foi na área de imunoensaios, na qual vários compostos quimioluminescentes foram utilizados como marcadores de antígenos. A quimioluminescência difere da fluorescência e da fosforescência pelo fato da emissão de luz ser criada a partir de uma substância química ou de uma reação eletroquímica e não da absorção de energia eletromagnética. A reação química produz um composto excitado eletronicamente que emite luz, enquanto ele retorna ao seu estado fundamental ou que transfere sua energia para outro composto, o qual então produz emissão. A quimioluminescência envolve a oxidação de um composto orgânico (p. ex., dioxetano, luminol ou éster de acridínio) por um oxidante (peróxido de hidrogênio, hipoclorito ou oxigênio). Essas reações de oxidação podem ocorrer em presença de catalisadores como, por exemplo, enzimas (fosfatase alcalina, horseradish peroxidase ou microperoxidase), íons metais (complexo ftalocianina-Cu^{2+} ou Fe^{3+}) e hemina. Os produtos excitados formados na reação de oxidação produzem quimioluminescência no retorno ao estado singlete. Um luminômetro é utilizado para detectar a quimioluminescência. Ele contém um tubo fotomultiplicador, que produz um sinal de débito elétrico muito forte. Um sinal típico de um composto quimioluminescente aumenta rapidamente no tempo e atinge um máximo quando o reagente e o analito estão completamente misturados. A seguir, ocorre uma diminuição exponencial do sinal até o valor basal ser atingido.

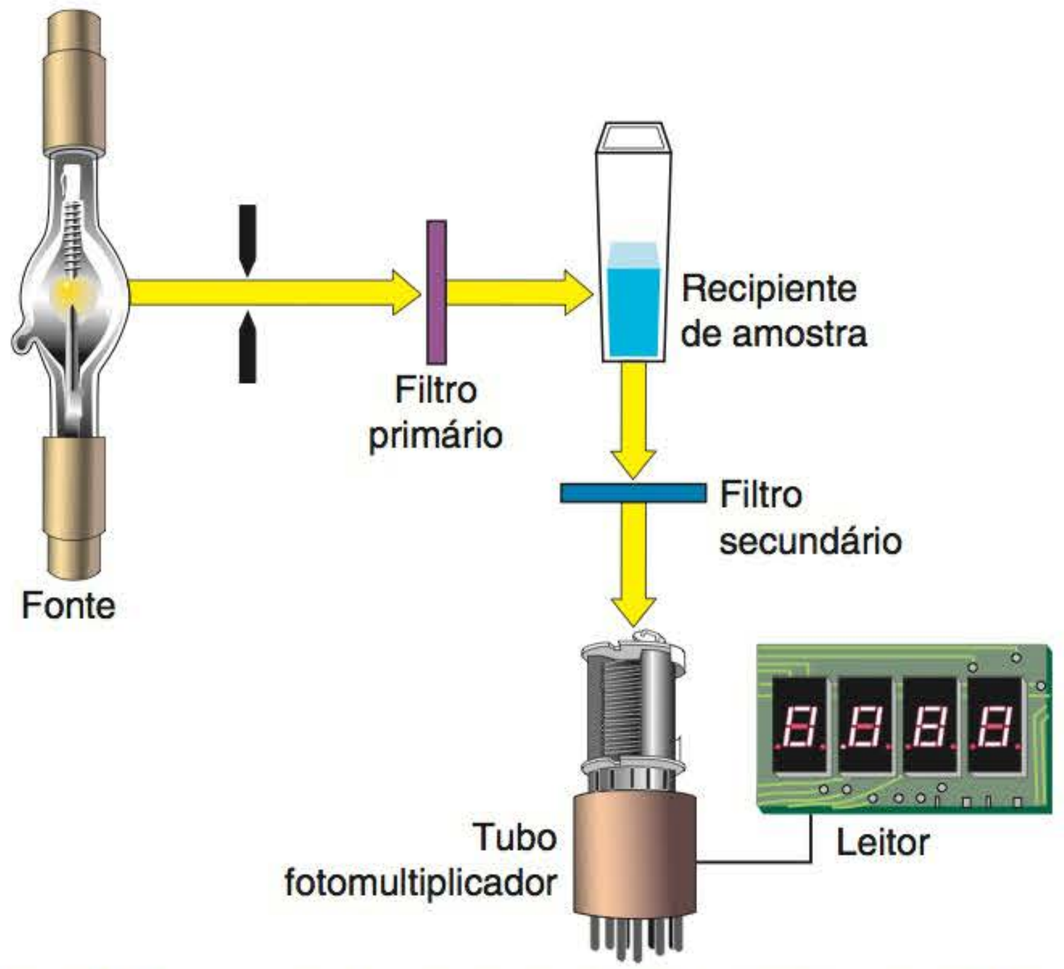


Figura 4.14 Componentes de um fluorômetro. (De Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP: Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations. Philadelphia, JB Lippincott Company, 1992, com autorização).

Nefelometria e turbidimetria

A nefelometria e a turbidimetria são utilizadas para mensurar a concentração de partículas grandes (p. ex., complexos antígeno-anticorpo, pré-albumina e outras proteínas séricas), porque o seu tamanho não pode ser mensurado por meio da espectroscopia de absorção. A nefelometria detecta a luz dispersa em vários ângulos. A luz dispersa produz um pequeno sinal, que deve ser amplificado. Em contraste, a turbidimetria mensura uma redução da transmissão de luz devida à formação de partículas. Consequentemente, ela detecta uma diminuição pequena em um grande sinal (Fig. 4.15).

Princípio. A nefelometria e a turbidimetria baseiam-se na dispersão de partículas em suspensão. Quando um feixe de luz colimado atinge uma partícula em suspensão, porções da luz são absorvidas, refletidas ou dispersas pela solução particulada. Ocorrem três tipos de dispersão de luz com base no tamanho relativo do comprimento da onda luminosa (Gauldie, 1981). Se o comprimento de onda (λ) da luz for muito maior que o diâmetro (d) da partícula ($d < 0{,}1\ \lambda$), a luz dispersa é simétrica em torno da partícula. A dispersão luminosa mínima ocorre a 90 graus em relação ao feixe incidente e foi descrita por Rayleigh (Rayleigh, 1885). Se o comprimento de onda luminosa for muito menor que o diâmetro da partícula ($d > 0{,}1\ \lambda$), a luz dispersa frontalmente em razão do *backscatter* fora de fase destrutivo, como foi descrito pela teoria de Mie. Se o comprimento de onda luminosa for aproximadamente o mesmo que o tamanho da partícula, a luz dispersará mais na direção frontal que em outras direções, como foi definido pela teoria de Rayleigh-Debye. Uma aplicação comum da nefelometria é a mensuração de reações antígeno-anticorpo. Como a maioria dos complexos antígeno-anticorpo possui um diâmetro de

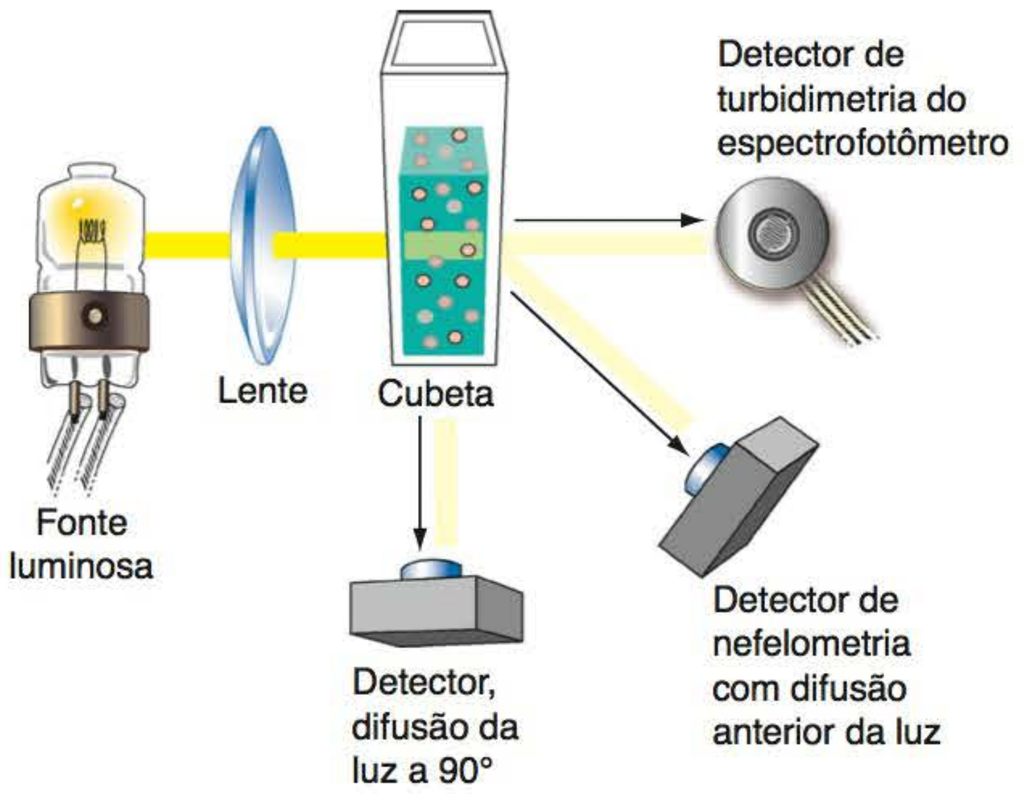


Figura 4.15 Arranjo óptico de nefelometria e turbidimetria. Observe que a nefelometria detecta (ângulo reto ou anterior) a luz difusa e a turbidimetria mensura uma redução da luz transmitida na direção anterior. (Modificado de Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP: Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations. Philadelphia, JB Lippincott Company, 1992, com autorização).

250 a 1.500 nm e os comprimentos de onda utilizados são de 320 a 650 nm, a luz é dispersa frontal (tipo Rayleigh-Debye).

Nefelômetro. Um nefelômetro típico é constituído por uma fonte luminosa, um colimador, um monocromador, uma cubeta de amostra, uma armadilha para a luz dispersa e um fotodetector. A luz dispersa por partículas é mensurada em um ângulo, em geral de 15 a 90 graus em relação ao feixe incidente sobre a cubeta (Fig. 4.15). A dispersão luminosa depende do comprimento da onda luminosa e do tamanho da partícula. Para macromoléculas com um tamanho próximo ou maior do que o comprimento da onda luminosa, a mensuração da luz dispersa frontal aumenta a sensibilidade da nefelometria. Fontes luminosas incluem: lâmpada de arco de mercúrio, lâmpada com filamento de tungstênio, diodo emissor de luz e *laser*.

Lasers produzem uma luz monocromática quase ideal com faixa estreita e emitem energia radiante que é coerente, paralela e polarizada. Um feixe de *laser* pode ser mantido como um cilindro muito fino com um diâmetro de apenas alguns micrometros. Uma lâmpada de laser de hélio-néon típica é composta por um eletrodo bombeador de hélio (cátodo) e um núcleo de *laser* de vidro oco circundado por um tubo de plasma de *laser* (ânodo). Tanto o tubo de plasma quanto o núcleo são preenchidos com os gases hélio e néon livres. A descarga elétrica entre o cátodo e o ânodo é confinada no núcleo de vidro oco, para que se mantenha concentrada para a transferência máxima de energia. Dois espelhos são posicionados nas extremidades do tubo de *laser*. Um deles é totalmente refletivo e o outro é parcialmente transparente. Quando o eletrodo é carregado, os átomos de hélio são excitados até um estado de maior energia e, a seguir, transferem essa energia para os átomos de néon por meio de colisões. Por sua vez, os átomos de néon excitados emitem fótons. Os fótons movem-se para frente e para trás entre os dois espelhos, estimulando outros átomos a emitir mais fótons, acarretando um processo de amplificação. A luz amplificada acaba emergindo como um feixe de *laser* através do espelho parcialmente transparente. Com o feixe monocromático de alta intensidade, foi observado um aumento substancial da sensibilidade com *lasers* em comparação com fontes luminosas convencionais. As desvantagens de fontes de *laser* incluem o custo, a segurança, a necessidade de resfriamento e a disponibilidade limitada de comprimentos de onda.

Turbidimetria. A mensuração da redução da transmissão de luz causada pela formação de partículas é denominada turbidimetria. A luz transmitida na direção frontal é detectada. A quantidade de luz absorvida por uma suspensão de partículas depende da concentração da amostra e do tamanho das partículas. Soluções que exigem quantificação por turbidimetria são mensuradas utilizando fotômetros ou espectrofotômetros de região visível. A maior sensibilidade foi obtida utilizando-se fotodetectores, que conseguem detectar pequenas alterações nos sinais fotônicos. A sensibilidade, comparável à da nefelometria, pode ser obtida com o uso de comprimentos de onda curtos e espectrofotômetros de alta qualidade. A turbidimetria tem muitas aplicações clínicas. Vários analisadores microbiológicos mensuram a turvação de amostras para detectar crescimento bacteriano em culturas de caldo. A turbidimetria é rotineiramente utilizada para mensurar a sensibilidade a antibióticos nessas culturas. Em analisadores da coagulação, mensurações turbidimétricas detectam a formação de coágulo nas cubetas de amostras. Ensaios turbidimétricos estão disponíveis há muito tempo para quantificar a concentração de proteínas em líquidos biológicos como, por exemplo, urina e líquido cerebrospinal (LCE).

Refratometria

A refratometria baseia-se na refração da luz. Quando a luz passa de um meio a outro, o feixe de luz muda sua direção na superfície limite se a sua velocidade no segundo meio for diferente da velocidade do primeiro. O ângulo criado pelo encurvamento da luz é denominado ângulo crítico. A capacidade de uma substância de curvar a luz é denominada *refratividade*. A refratividade de um líquido depende do comprimento de onda da luz incidente, da temperatura, da natureza do meio líquido e da concentração do soluto dissolvido no meio. Se os três primeiros fatores forem constantes, a refratividade de uma solução é uma medida indireta da concentração total do soluto. A refratometria pode ser utilizada para mensurar a concentração de proteínas, a densidade específica da urina e a análise da coluna efluente da cromatografia líquida de alto desempenho.

Osmometria

Osmometria é a mensuração da osmolalidade de uma solução aquosa como, por exemplo, soro, plasma ou urina. Quando partículas osmoticamente ativas (p. ex., glicose, nitrogênio ureico e sódio) são adicionadas a uma solução provocando aumento de sua osmolalidade, quatro outras propriedades da solução também são afetadas. Essas propriedades são a pressão osmótica, o ponto de ebulição e de congelamento e a pressão de vapor. Elas são denominadas propriedades coligativas da solução, porque podem ser relacionadas entre si e com a osmolalidade. Quando a osmolalidade de uma solução aumenta: (1) a pressão osmótica aumenta, (2) o ponto de ebulição é elevado, (3) o ponto de congelamento diminui e (4) a pressão de vapor diminui. A osmometria baseia-se em alterações da mensuração das propriedades coligativas de soluções, que ocorrem em razão de variações da concentração da partícula. É comum a osmometria da depressão do ponto de congelamento consistir no método mais utilizado para se mensurar as alterações das propriedades coligativas de uma solução. Ela baseia-se no princípio de que a adição de moléculas de soluto diminui a temperatura de congelamento da solução.

Princípio da osmometria do ponto de congelamento. O ponto de congelamento é a temperatura em que a água e o gelo estão em equilíbrio e está relacionado à concentração do soluto. Ele é descrito pela seguinte equação:

$$pT_c = K_c m \qquad (4.11)$$

Em que:

pT_c = a alteração da temperatura do ponto de congelamento
K_c = a constante do ponto de congelamento do solvente
m = a molalidade

Uma solução 1,0 mOsm apresenta uma depressão do ponto de congelamento de 0,00186°C, quando comparada ao solvente puro (em geral, a água). Por essa razão, a osmolalidade do sangue (aproximadamente 285 mOs/kg) possui um ponto de congelamento de -0,53°C.

Osmômetro de ponto de congelamento. Um osmômetro de ponto de congelamento é constituído por uma câmara de amostra, que contém um agitador e um termistor (dispositivo que detecta a temperatura) conectados a um dispositivo de leitura. A amostra é rapidamente super-resfriada, a vários graus abaixo do seu ponto de congelamento, em uma câmara de refrigeração contendo, por exemplo, etileno glicol. Em seguida, a amostra é agitada com o agitador para iniciar o congelamento. Quando ocorre a formação de cristais de gelo, a solução libera calor; isso aumenta a temperatura da amostra. A velocidade com que

esse calor de fusão é liberado do gelo formado rapidamente atinge um equilíbrio com a velocidade do calor removido pela temperatura mais baixa da câmara de amostra. Essa temperatura de equilíbrio, conhecida como ponto de congelamento da solução, permanece constante por vários minutos após ser atingida. O ponto de congelamento é detectado pelo termistor e a osmolalidade da amostra é convertida em miliosmoles por quilo de água.

Citometria de fluxo

Um citômetro de fluxo mensura múltiplas propriedades de células suspensas em um meio líquido em movimento. Quando uma partícula passa em fila única através de uma fonte de laser, ela produz um padrão luminoso característico que é mensurado por múltiplos detectores de luz dispersa (adiante e a 90 graus) e luz fluorescente (se a célula tiver sido corada com um fluorocromo). A citometria de fluxo é utilizada para contar e classificar células, assim como partículas virais, fragmentos de DNA, bactérias e contas de látex. Ela é um componente central dos contadores de células sanguíneas e a tecnologia utilizada para diferenciar leucócitos.

Na citometria de fluxo, o termo *partícula* descreve qualquer objeto que flui através do instrumento. Um *evento* é qualquer coisa interpretada pelo instrumento como sendo uma partícula. Um *evento* pode ser determinado correta ou incorretamente por um citômetro de fluxo. Foram desenvolvidos métodos para compensar a mensuração de *eventos* indesejados. Um exemplo é a correção da mensuração da passagem simultânea de suas partículas. Para serem analisadas, partículas devem estar em suspensão, como células individuais. Quando não, elas podem ser adequadas para a realização da citometria de fluxo utilizando o desmembramento mecânico ou de digestão enzimática. Restrições de tamanho também são aplicadas; células ou partículas devem possuir entre 1 e 30 μ. Citômetros de fluxo especializados são projetados para manipular partículas menores como, por exemplo, fragmentos de DNA ou bactérias.

Componentes do instrumento. O sistema mostrado na Figura 4.16 possui todas as características de um citômetro de fluxo com capacidade de classificar células. As alíquotas de suspensão celular são introduzidas na câmara de fluxo utilizando pressão de ar. Quando as células passam pela câmara de fluxo, um invólucro de baixa pressão líquido as circunda. A corrente líquida externa cria um fluxo laminar

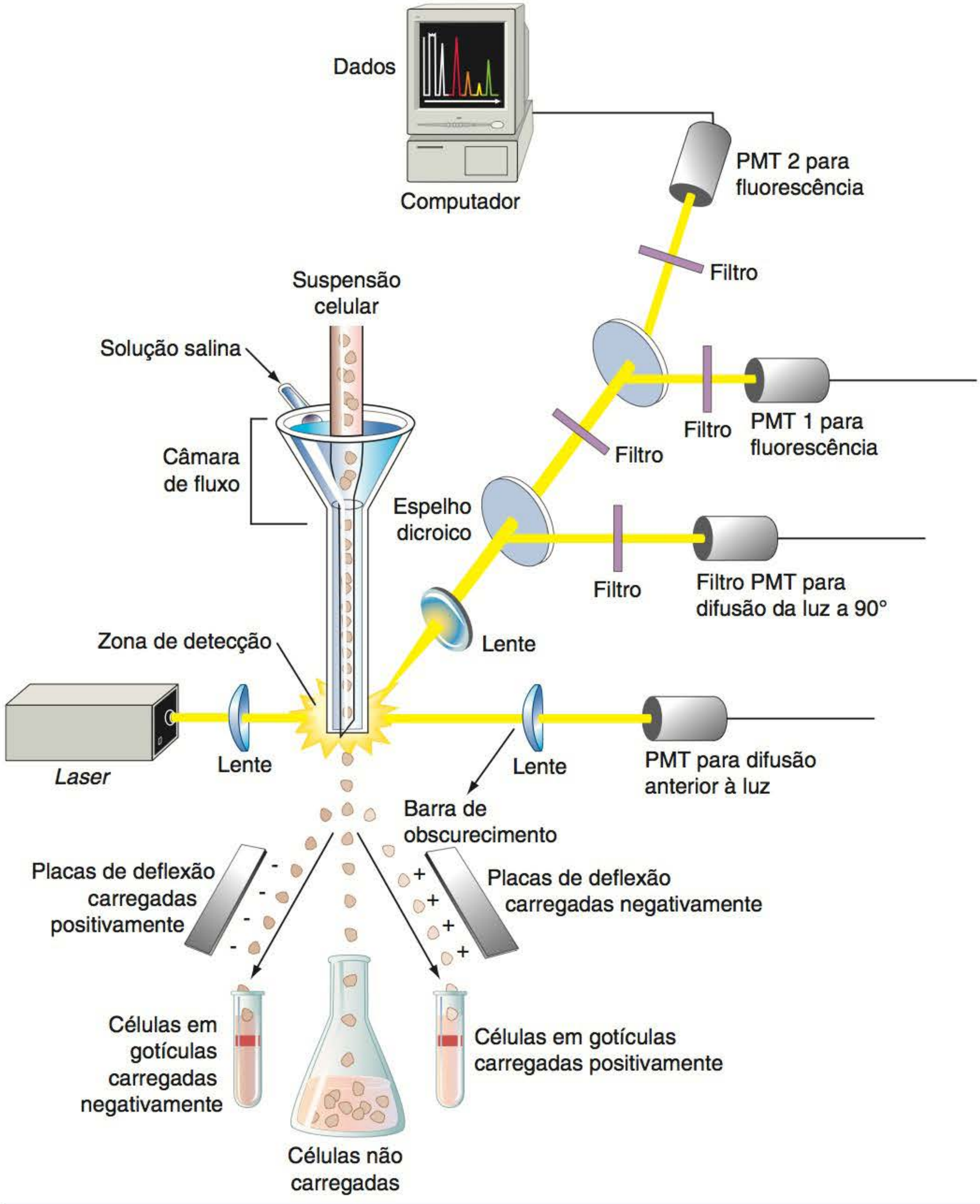


Figura 4.16 Componentes de um citômetro de fluxo e um separador de células. (Reproduzido de Ward KM, Lehman CA, Leiken AM: Clinical Laboratory Instrumentation and Automation; Principles, Applications, and Selection. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994, com autorização).

forçando a amostra para o centro e produz um alinhamento em fila única das células. Esse processo é denominado *focagem hidrodinâmica*. Um feixe de laser passa por cada célula, enquanto ela flui pela câmara. A luz dispersa frontal é proporcional ao tamanho da célula e a dispersão a 90 graus ou em ângulo reto está relacionada à granularidade celular e à irregularidade nuclear. Quando as células são marcadas com fluorocromos adequados, sinais fluorescentes proporcionais à quantidade do marcador ligado podem ser mensurados. A fluorescência verde, em geral, significa que o corante fluoresceína foi usado como marcador. A fluorescência vermelha comumente significa que um corante (p. ex., ficoeritrina) foi utilizado como marcador. Esses corantes, usualmente, fixam-se a anticorpos para identificar determinados antígenos em células ou partículas.

A luz dispersa frontal é direcionada para o fotodetector de dispersão frontal. Em ângulos retos em relação ao feixe de laser, existem espelhos que dividem a luz dispersa de ângulo reto entre os fotodetectores remanescentes (p. ex., um detector de dispersão de ângulo reto e dois detectores fluorescentes). Na lente frontal, existe uma barra de obscurecimento, que bloqueia o feixe de laser após ele passar pela corrente. Somente a luz do laser, que sofre refração ou dispersão quando atinge uma partícula na corrente, é desviada o suficiente de sua direção original para evitar a barra de obscurecimento e atinge a lente posicionada à frente e o fotodiodo posicionado atrás. Granulócitos, monócitos e linfócitos são separados de acordo com o tamanho e o padrão de granularidade. São determinados pela análise simultânea da luz dispersa frontal e em ângulo reto. Por exemplo, granulócitos com núcleos irregulares dispersam mais luz para a lateral que os linfócitos com seus núcleos esféricos. Subpopulações celulares podem ser identificadas com o uso de controle eletrônico e padrões de análise da fluorescência (baseados em marcadores utilizados para células específicas).

FACS, acrônimo de *fluorescent-activated cell sorter*, descreve a capacidade de um citômetro de fluxo para classificar células fisicamente em uma suspensão líquida. Para isso, o desenho do instrumento deve ser modificado para carregar eletricamente as células de interesse. A corrente de gotas flui pelas duas placas de carga (alta voltagem), nas quais as células de interesse são eletricamente carregadas com um pulso de voltagem. Em seguida, a corrente do fluxo entra em um campo elétrico, no qual as células carregadas são defletidas para recipientes de coleta adequados. Células indesejadas não são carregadas e nem defletidas ao passarem pelo campo.

Eletroquímica

A eletroquímica envolve a mensuração da corrente ou da voltagem gerada pela atividade de íons específicos. Técnicas analíticas incluem potenciometria, coulometria, voltametria e amperometria.

Potenciometria

A mensuração do potencial (voltagem) entre dois eletrodos em uma solução é a base de vários procedimentos de medição de concentração de analitos. Potenciais elétricos são produzidos na interface entre um metal e seus íons em uma solução. Esses potenciais também existem quando uma membrana semipermeável ao íon separa diferentes concentrações do mesmo. Para mensurar o potencial do eletrodo, uma fonte de voltagem constante é necessária como potencial de referência. O eletrodo com uma voltagem constante é denominado *eletrodo de referência*, enquanto o de mensuração é denominado *eletrodo indicador*. A concentração de íons em uma solução pode ser calculada a partir da diferença de potencial mensurada entre os dois eletrodos. O potencial celular mensurado está relacionado com a concentração molar pela equação de Nernst:

$$E = E^{o} - RT/nF \ln a_{red}/a_{ox} = E^{o} - 2{,}302\ RT/nF \log a_{red}/a_{ox} \qquad (4.12)$$

Em que:

E = potencial celular mensurado
E^{o} = potencial de redução padrão
n = número de elétrons envolvidos na reação
a_{red} = atividade de espécies reduzidas
a_{ox} = atividade de espécies oxidadas
F = faraday (96.485 C/mol)
T = temperatura absoluta
R = constante molar do gás

Substituindo a concentração molar pela atividade e o logaritmo comum pelo log natural:

$$E = E^{o} - (0{,}0592/n) \log C_{red}/C_{ox} \qquad (4.13)$$

Em que:

C_{red} = concentração de espécies reduzidas
C_{ox} = concentração de espécies oxidadas

A equação de Nernst é útil para a previsão do potencial celular eletroquímico, considerando as concentrações de espécies oxidadas e reduzidas para um determinado sistema de eletrodos.

Eletrodos de referência. Em muitas aplicações eletroanalíticas, por exemplo, medição do pH, é desejável que o potencial de meia-célula de um eletrodo seja conhecido, constante e completamente insensível à composição da solução sob estudo. Um eletrodo que se encaixa nessa descrição recebe o nome de eletrodo de referência.

Um eletrodo de referência ideal deve: (1) ser reversível e obedecer à equação de Nernst; (2) exibir um potencial que permanece constante com o passar do tempo; (3) retornar a seu potencial original após ser submetido a pequenas correntes; e (4) exibir pouca histerese, ou seja, atraso com ciclagem de temperatura. O elétron padrão de hidrogênio exibe inúmeras dessas qualidades, mas não é prático para uso em instrumentação de laboratório clínico. Assim, os eletrodos de referência calomelano e prata-cloreto de prata são amplamente utilizados para medições clínicas.

O eletrodo de calomelano (eletrodo de calomelano saturado) consiste em mercúrio em contato com uma solução que se encontra saturada com cloreto (I) de mercúrio calomelano e também contém uma concentração conhecida de cloreto de potássio. O eletrodo de prata-cloreto de prata consiste em um eletrodo de prata imerso em uma solução de cloreto de potássio que foi saturada com cloreto de prata. Os eletrodos de prata-cloreto de prata têm a vantagem de poderem ser utilizados em temperaturas superiores a 60°C, enquanto os eletrodos de calomelano, não. Por outro lado, os íons (II) de mercúrio reagem com um número menor de componentes das amostras em relação aos íons de prata (que podem reagir com proteínas, por exemplo); tais reações podem levar ao entupimento da junção entre o eletrodo e a solução do analito.

Eletrodos íon-seletivos. Um eletrodo íon-seletivo é um transdutor eletroquímico capaz de responder a um íon específico. Um eletrodo íon-seletivo é muito sensível e seletivo para o íon que ele mensura. Ele é composto por uma membrana ou outra barreira que separa uma solução e um eletrodo de referência da solução a ser analisada. A complexidade do desenho do eletrodo íon-seletivo depende da composição da membrana/barreira que determina a sua seletividade iônica. Muitos tipos de eletrodo íon-seletivo estão disponíveis, incluindo eletrodo de vidro, de membrana líquida, de membrana impregnada de precipitado, de estado sólido, de gás e de enzima.

Eletrodo de pH. Eletrodos de vidro foram os primeiros, e ainda são os mais comuns, utilizados na mensuração da atividade do íon hidrogênio (pH ou log negativo da concentração de íon hidrogênio). Um eletrodo de pH consiste em um pequeno bulbo feito de camadas de vidro hidratado e não hidratado, que contém uma solução de tampão íon cloreto. O tampão possui uma concentração conhecida de íon hidrogênio. Um eletrodo interno, usualmente de prata/cloreto de prata, serve como eletrodo de referência interno. Um eletrodo de calomel saturado é utilizado como eletro de referência externo. Uma teoria sugere que os íons sódio, na camada de vidro hidratado, são impelidos para fora. Íons sódio apresentam um grande raio iônico. Amostras contendo íons hidrogênio, os quais possuem um menor raio iônico, substituem íons sódio. O resultado é um aumento do potencial de membrana externo. Esse potencial propaga-se pela membrana fina e seca para a superfície interna hidratada do vidro. Íons cloreto da solução tampão interna respondem migrando para a camada de vidro interna. Os potenciais gerados no eletrodo de pH são reportados ao eletrodo de referência externo (de calomel saturado) e a diferença ou alteração é mostrada em unidades de pH.

Eletrodo de P_{CO_2}. O eletrodo de P_{CO_2} é um eletrodo de pH contido em um invólucro plástico. Esse invólucro é preenchido com um tampão de bicarbonato de sódio e possui uma membrana permeável a gases (Teflon ou silicone) em sua abertura. Quando o sangue total contendo CO_2 entra em contato com a membrana de Teflon, o CO_2 do sangue passa por ela e mistura-se com o tampão. Ocorre uma

reação química, mostrada a seguir, que causa uma diminuição do pH. A atividade do íon hidrogênio é mensurada por um sistema indicador de pH potenciométrico.

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \quad (4.14)$$

Coulometria

A *coulometria* mensura a quantidade de eletricidade (em coulombs) necessária para converter um analito em um estado de oxidação diferente. Por definição, um coulomb é a quantidade de eletricidade ou carga que é transportada em 1 segundo por uma corrente constante de 1 ampere. Para uma corrente constante de *I amperes* em *t segundos*, o número de coulombs (Q) é fornecido pela expressão:

$$Q = It \quad (4.15)$$

Um Faraday é a carga (em coulombs) associada a um mol de elétrons. A carga dos elétrons é de $1{,}6018 \times 10^{-19}$ C. Portanto, 1 Faraday é igual a 96.485 C/mol.

A coulometria é utilizada para mensurar íon cloreto em amostras de soro, plasma, LCR e suor. Na mensuração de cloreto com coulometria, uma corrente constante é aplicada por meio de dois eletrodos de prata, os quais liberam íons prata na amostra a uma taxa constante. Íons cloreto da amostra combinam com íons prata liberados para produzir cloreto de prato insolúvel. Um par de eletrodos indicador e de referência detecta o excesso de íons prata e interrompe a titulação. O número de íons prata liberados por ionização é exatamente igual ao de íons cloreto na amostra e pode ser calculado por meio da lei de Faraday:

$$Q = It = znF \quad (4.16)$$

Em que:

z = número de elétrons envolvidos na reação
n = número de moles de analito na amostra
F = constante de Faraday (96.485 C/mol de elétrons)

Amperometria

Amperometria é a mensuração do fluxo de corrente produzido por uma reação de oxidação-redução. Vários eletrodos de enzima imobilizados utilizam esse princípio, assim como eletrodos de P_{O2} (discutidos abaixo) e tituladores de cloreto. A mensuração de cloreto em amostras envolve o uso de dois métodos eletroquímicos: coulometria (discutida acima) e amperometria. No titulador de cloreto, um par de eletrodos de prata serve como eletrodo indicador. Quando todo o cloreto for consumido, a prata aparece em excesso, causando um aumento de corrente. Isso é denominado detecção amperométrica de ponto final.

Eletrodo de Po_2 detector de gás. O eletrodo detector de oxigênio mais amplamente utilizado (para determinar a pressão parcial de oxigênio no sangue) emprega uma célula amperométrica ou eletrolítica detectora de corrente como sistema indicador.

O eletrodo de Po_2 utiliza uma membrana permeável a gases, em geral de polipropileno, que possibilita a passagem do oxigênio dissolvido. Essa membrana também impede a passagem de outros constituintes do sangue (que podem interferir no eletrodo). Após o oxigênio atravessar a membrana, ele reage com o cátodo polarizado de platina e é reduzido conforme a reação a seguir:

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O \quad (4.17)$$

Por sua vez, isso produz uma alteração da corrente na célula. Essa alteração é diretamente proporcional à pressão parcial de oxigênio presente na amostra.

Voltametria

A *voltametria* é um método no qual um potencial é aplicado a uma célula eletroquímica e a corrente resultante é mensurada. As vantagens mais importantes da voltametria são a sensibilidade e a capacidade de mensurações de múltiplos elementos. Analitos podem ser detectados na faixa de partes por bilhão. Com a seleção cuidadosa de condições e métodos de realização de testes, vários analitos podem ser mensurados simultaneamente em um único estudo voltamétrico. A voltametria consome o mínimo de analito, ao contrário da coulometria que converte todo o analito em outro estado. A *voltametria de dissolução anódica* é uma técnica eletroquímica utilizada para mensurar metais pesados (p. ex., chumbo). Ela permite que a amostra seja pré-concentrada no eletrodo e isso permite ao método detectar níveis muito baixos de analito.

Condutância

Os princípios de condutância têm várias aplicações associadas a procedimentos laboratoriais clínicos. Os exemplos incluem a monitoração da pureza da água, a mensuração de analitos no sangue (p. ex., nitrogênio ureico) como componentes de detectores utilizados na cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa, contadores celulares e eletroforese capilar.

A condutividade eletrolítica é uma medida da capacidade de uma solução de transportar uma corrente elétrica. Soluções de eletrólitos conduzem uma corrente elétrica pela migração de íons sob a influência de um gradiente de potencial. Os íons movem-se a uma velocidade dependente de sua carga e tamanho, da viscosidade microscópica do meio e da magnitude do gradiente de potencial. Portanto, para um potencial aplicado (E) mantido constante, mas com um valor que ultrapassa o potencial de deposição do eletrólito, a corrente (I) que flui entre os eletrodos imersos no eletrólito varia inversamente com a resistência da solução eletrolítica (R). A recíproca da resistência ($1/R$) é denominada condutância (G) e é expressa em ohms recíprocos ou mhos.

Impedância

A mensuração por impedância elétrica baseia-se na alteração da resistência elétrica por uma abertura, quando uma partícula de líquido condutor passa por ela. A impedância elétrica é utilizada principalmente no laboratório de hematologia para contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Em um instrumento de impedância elétrica de Coulter, o sangue aspirado é dividido em dois volumes separados para mensurações. Um volume é misturado com diluente e liberado para o banho celular, no qual é realizada a contagem de eritrócitos e plaquetas. Quando o sangue passa pela abertura, a corrente elétrica entre os eletrodos muda cada vez que uma célula passa. Isso produz um pulso de voltagem, cuja magnitude é proporcional ao tamanho da célula. O número de pulsos está diretamente relacionado com a contagem celular. Partículas medindo entre 2 e 20 fentolitros (fL) são contadas como plaquetas, enquanto as que medem mais de 36 fL são contadas como eritrócitos. O outro volume de sangue é misturado com um diluente e um reagente citoquímico-lítico, que produz a lise apenas de eritrócitos. Uma contagem leucocitária é realizada quando as células restantes passam por uma abertura. Partículas maiores do que 35 fL são consideradas leucócitos.

Eletroforese e densitometria

Eletroforese é a separação de compostos carregados baseada em sua carga elétrica. Quando uma voltagem é aplicada a uma solução salina (usualmente, cloreto de sódio), uma corrente elétrica é produzida pelo fluxo de íons: cátions em direção ao cátodo e ânions em direção ao ânodo. A condutividade de uma solução aumenta com a sua concentração iônica total. Quanto maior for a quantidade de cargas de um composto dissolvido, mais rápido ele se moverá pela solução em direção ao eletrodo com carga oposta. Por sua vez, a carga de um composto depende do pH da solução. Separações por eletroforese, em geral, exigem altas voltagens (50–200 V DC). Por essa razão, o suprimento deve ser uma voltagem DC constante nesses níveis. A solução tampão deve ter uma força iônica cuidadosamente controlada. Um tampão diluído faz com que calor seja gerado na célula, enquanto uma força iônica alta não permite uma boa separação das frações. Meios de suporte comuns para eletroforese em laboratórios clínicos incluem géis de acetato de celulose, agarose e poliacrilamida. O volume total aplicado da amostra depende da sensibilidade do método de detecção. Para o trabalho clínico, 1 µL de soro pode ser aplicado. Após o término da eletroforese, o meio de suporte é tratado com um corante para identificar as frações separadas. Os corantes mais comuns utilizados na etapa de visualização incluem o Amido Black, Ponceau S, Fat Red 7B e Sudan Black B. Para obter um perfil quantitativo das frações separadas, a densitometria é realizada sobre um meio de suporte corado.

Um *densitômetro* mensura a absorbância do corante sobre um meio de suporte. Os componentes básicos de um densitômetro incluem uma fonte luminosa, um monocromador, um carreto móvel para varrer o meio ao longo de toda a sua área, um sistema óptico e um

fotodetector. Sinais detectados pelo fotodetector são relacionados à absorbância do corante da amostra sobre o suporte, a qual é proporcional à concentração da amostra. O meio de suporte é movido pelo feixe luminoso a uma velocidade fixa de modo que possa ser construído um gráfico representando leituras múltiplas da densidade obtidas em diferentes pontos. A maioria dos densitômetros possui um integrador incorporado para encontrar a área sob a curva de modo que todas as frações da amostra possam ser quantificadas.

Focagem isoelétrica

Proteínas são polímeros de aminoácidos que podem ser ânions ou cátions, dependendo do pH. Em um pH específico, uma proteína apresentará uma carga zero, quando a carga positiva e a negativa de seus aminoácidos se neutralizam. Nesse valor de pH, conhecido como ponto isoelétrico da proteína (pI), a proteína é isoelétrica. Técnicas de focagem isoelétrica são realizadas de modo similar ao de outros métodos de eletroforese, exceto pelo fato de que as moléculas separadas migram por um gradiente de pH. Esse gradiente de pH é criado pela adição de ácido na área anódica da célula de eletrólito e pela adição de base na área catódica (Fig. 4.17). Uma solução de anfóteros (misturas de pequenos íons anfotéricos com pIs diferentes) é colocada entre os dois eletrodos. Esses anfóteros possuem alta capacidade de tamponamento em seus pontos isoelétricos restropectivos. Os anfóteros próximos do ânodo carregam uma carga positiva, e os próximos ao cátodo, uma carga negativa. Quando uma voltagem elétrica é aplicada, cada anfótero migrará rapidamente para a área em que o pH é igual ao seu ponto isoelétrico. Com sua alta capacidade de tamponamento, os anfóteros criam zonas de pH estável para a migração mais lenta de proteínas. A vantagem das técnicas de focagem isoelétrica repousa em sua capacidade de determinar misturas de proteínas. Utilizando anfóteros de faixa estreita, poderão ser identificadas macromoléculas com pontos isoelétricos com diferença de apenas 0,02 unidades de pH. A focagem isoelétrica tem sido útil na mensuração de isoenzimas da fosfatase ácida no soro. A sua aplicação também foi estendida para a detecção de bandas de imunoglobulina monoclonal no LCR e isoenzimas da creatina quinase e fosfatase alcalina no soro.

Cromatografia

Cromatografia é um método de separação baseado nas diferentes interações de compostos da amostra na fase móvel e na estacionária enquanto os compostos percorrem um meio de suporte. Os compostos que interagem mais fortemente na fase estacionária são retidos mais tempo no meio que aqueles que favorecem a fase móvel. Técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com a sua fase móvel: cromatografia gasosa e cromatografia líquida. A Figura 4.18 mostra um cromatograma típico mostrando a concentração de cada composto detectável removido da coluna como função do tempo. O tempo de retenção (t_R) é o tempo que um composto leva para ser

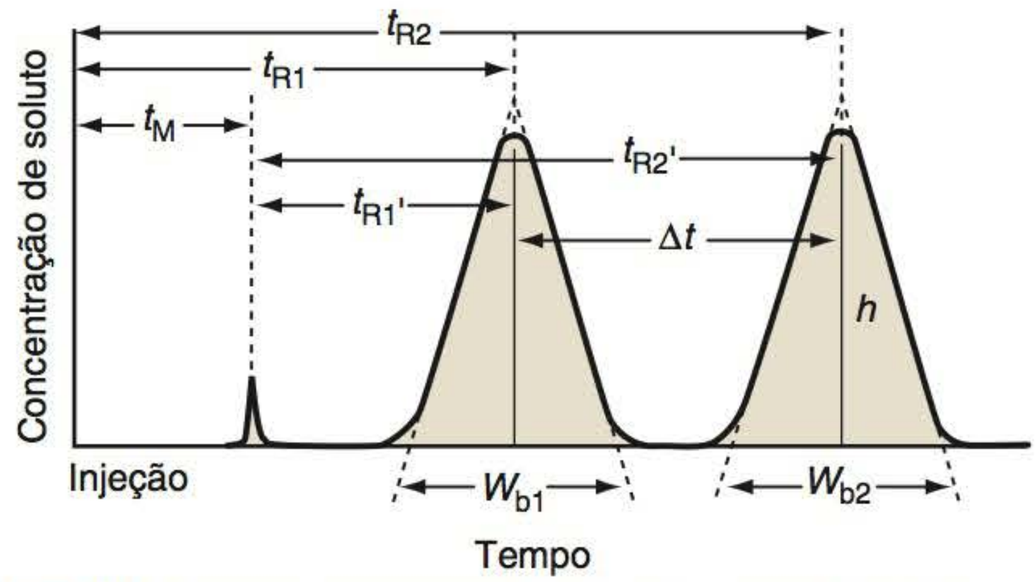


Figura 4.18 Cromatograma da separação de dois componentes. Observe que o tempo de retenção não corrigido (t_{R1} e t_{R2}) é o do momento da injeção (Inj) até o pico; o tempo corrigido ($t_{R1'}$ e $t_{R2'}$) leva em conta o tempo de retenção de um composto não retido (t_M). (Reproduzido de Ravindranath B: Principles and Practice of Chromatography. New York, John Wiley & Sons, 1989, com autorização).

Figura 4.17 Focagem isoelétrica (ver texto). (Reproduzido de Schoeff LE, Williams RH: Principles of Laboratory Instruments. St Louis, Mosby, 1993, com autorização).

separado. Esse valor é característico de um composto e está relacionado à força de sua interação na fase estacionária e na fase móvel. Consequentemente, o tempo de retenção pode ser utilizado para se determinar a identidade de um composto. Nesse exemplo, dois compostos são separados e seus tempos de retenção são representados por (t_{R1}) e (t_{R2}). Eles são tempos de retenção não corrigidos e são mensurados a partir do tempo de injeção ($t = 0$). A capacidade de uma coluna de separar dois compostos depende de vários fatores que incluem: (1) a diferença de retenção dos compostos ou o fator de capacidade (k'), (2) fator de seletividade (a) e (3) número de placas teóricas.

O valor de k' pode ser calculado pela seguinte equação:

$$k' = (t_{R1} - t_m)/t_m \text{ ou } t_{R1'}/t_m \quad (4.18)$$

Em que:

t_m = tempo de retenção de um composto não retido

$t_{R1'}$ = tempo de retenção corrigido

Outra mensuração derivada do fator de capacidade calculado é o fator de seletividade (α) ou a retenção relativa de dois solutos. Uma relação entre ambos os fatores de capacidade é utilizada para se calcular o fator de seletividade. Para mensurar a amplitude de cada pico, traçar tangentes ao longo das laterais do pico até a linha de base. W_b representa a distância entre as duas linhas intersectadas. Um outro conceito útil é o de placas teóricas. Ele descreve o processo pelo qual a amostra é transportada para baixo na coluna. Em cada "placa", a amostra equilibra-se entre a fase estacionária e a fase móvel. O analito move-se para baixo na coluna quando a fase móvel equilibrada transfere amostra de uma placa a outra. Para calcular o número de placas teóricas (N), utilizar a seguinte equação:

$$N = 16(t_R/W_b)^2 \quad (4.19)$$

Um número de placas não possui unidades e quanto maior for o valor de N para uma coluna, maior é a eficiência da separação. Os efeitos combinados da eficiência do solvente e da eficiência da coluna são expressos na resolução (R_s) da coluna:

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1})/0{,}5(W_{b1} + W_{b2}) \quad (4.20)$$

A concentração de um composto desconhecido pode ser obtida pela integração de áreas de pico ou utilizando o método de padronização interna.

Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é útil para compostos que são naturalmente voláteis ou que podem ser convertidos com facilidade para uma forma volátil. A cromatografia gasosa foi um método muito utilizado por décadas, em virtude de alta resolução, baixos limites de detecção, acurácia e tempo analítico curto. As aplicações incluem várias moléculas orgânicas, incluindo diversos fármacos (ver Cap. 23). A retenção de um composto na cromatografia gasosa é determinada por sua pressão de vapor e volatilidade, o que, por sua vez, depende de sua interação na fase estacionária. Dois tipos de fase estacionária são utilizados na cromatografia gasosa: absorvente sólida (cromatografia gás-sólido [GSC]) e líquidos revestidos em suportes sólidos (cromatografia gás-líquido [GLC]). Na GSC, o mesmo material (geralmente, albumina, sílica ou carvão ativado) atua na fase estacionária e na de suporte. Embora esse tenha sido o primeiro tipo de fase estacionária desenvolvido, ele não é muito utilizado como outros tipos, principalmente por causa da forte retenção de solutos polares e pouco voláteis pela coluna (Ravindranath, 1989). A GLC utiliza fases líquidas (p. ex., polímeros, hidrocarbonetos, fluorocarbonetos, cristais líquidos e sais orgânicos) para revestir o material de suporte sólido. A terra diatomácea calcinada graduada em faixas de tamanho adequadas é utilizada com frequência como fase estacionária, por se tratar de uma substância inorgânica estável. O uso de colunas capilares de sílica fundida onde a fase estacionária liga-se quimicamente na superfície interna da coluna tornou-se muito popular nos cromatógrafos. A vantagem desse tipo de coluna é que a fase estacionária não deixa o suporte sólido e escoa no detector. Uma camada monomolecular da fase estacionária é obtida por meio de procedimento de ligação.

Componentes de um sistema típico de cromatografia gasosa são ilustrados na Figura 4.19. O seu desenho básico consiste em cinco componentes: um cilindro de gás como uma fonte de fase móvel, um injetor de amostra, uma coluna, um detector e um computador para a coleta de dados. Esses sistemas podem ser automatizados para oferecer ao usuário uma separação mais precisa e eficiente. Gases transportadores (fase móvel), que devem ser quimicamente inertes, incluem hélio, hidrogênio e nitrogênio. Outras substâncias utilizadas como fases móveis incluem vapor e líquidos muito perigosos. São exemplos dióxido de carbono, óxido nitroso e amônia. O gás transportador deve apresentar um alto grau de pureza e o fluxo ser rigorosamente controlado, para garantir uma eficiência ideal da coluna e a reprodutibilidade dos resultados dos exames. Na cromatografia gasosa, amostras são introduzidas com o auxílio de uma seringa hipodérmica ou um verificador de amostras automatizado. Uma agulha perfura um septo elástico contido na porta injetora. Cada porta injetora é aquecida a temperaturas muito altas. Amostras são vaporizadas e varridas na coluna. Se a molécula de interesse não for suficientemente volátil para injeção direta, é necessário transformá-la em uma forma mais volátil. A maioria das reações de derivatização pertence a três grupos: sililação, alquilação e acilação. A sililação é a técnica mais comum, que substitui hidrogênios ativos nos compostos por grupos alquilsilil. Essa substituição resulta em uma forma mais volátil que também é menos polar e mais estável do ponto de vista térmico.

A retenção de compostos em uma coluna de gasometria gasosa também pode ser ajustada pela alteração da temperatura da coluna, que afeta a volatilidade dos compostos e, consequentemente, o grau de sua interação na fase estacionária. Por meio da seleção adequada da temperatura inicial e do gradiente de temperatura durante o procedimento, pode-se obter uma boa resolução de compostos fraca e fortemente retidos. Colunas de embalagem costumam apresentar um comprimento de 1 a 5 m e um diâmetro de 2 a 4 mm e são preenchidas na fase estacionária. Colunas capilares apresentam um comprimento de 5 a 100 m

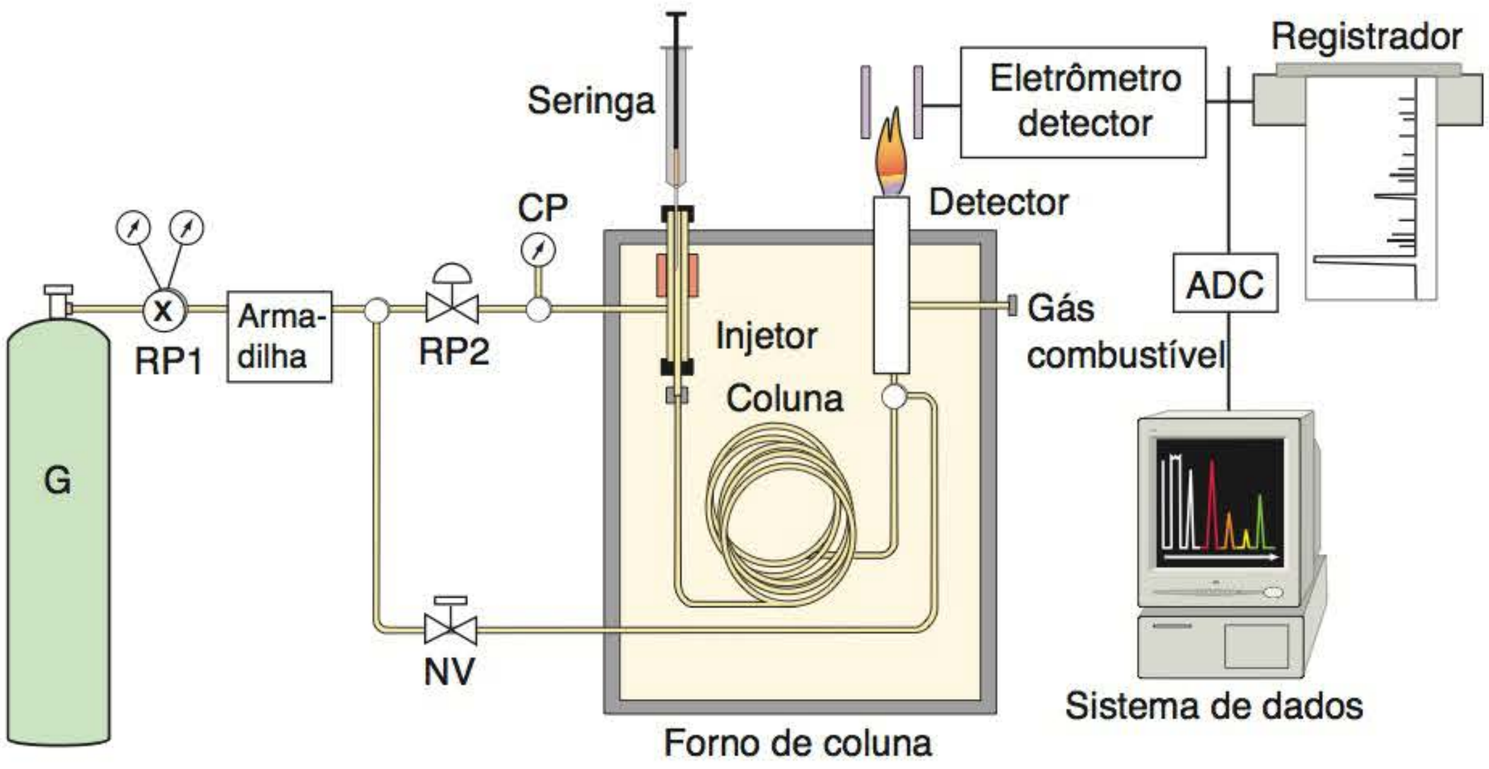


Figura 4.19 Componentes de um sistema cromatográfico. G, cilindro de gás; RP1 e RP2, reguladores; CP, controlador de pressão; V, válvula para ajuste da taxa de fluxo do gás. (Reproduzido de Ravindranath B: Principles and Practice of Cromatography. New York, John Wiley & Sons, com autorização).

e um diâmetro de 0,1 a 0,8 mm e têm uma fase estacionária localizada em sua superfície interna (Bartle, 1993). Em geral, colunas capilares apresentam maior eficiência e melhor limite de detecção. Contudo, colunas de embalagem apresentam maior capacidade de amostra, o que as torna mais úteis no trabalho de purificação. Exemplos de detectores utilizados na cromatografia gasosa incluem o de ionização de chama, o de condutividade térmica e o de espectrométrico de massa. Detectores de ionização de chama são amplamente utilizados e são capazes de detectar quase todos os compostos orgânicos, bem como muitos inorgânicos. Esse tipo de detector mensura os íons produzidos pelos compostos quando queimados em uma chama de hidrogênio-ar. Um eletrodo que produz uma corrente elétrica coleta os íons. O sinal análogo do detector é, então, convertido em resultado (Tipler, 1993).

Cromatografia líquida

A cromatografia gasosa, como técnica de separação, apresenta algumas restrições que a tornam uma alternativa adequada. Muitos compostos orgânicos são muito instáveis ou insuficientemente voláteis para serem analisados pela cromatografia gasosa sem uma derivatização química prévia. Técnicas de cromatografia líquida utilizam temperaturas mais baixas para separação e, consequentemente, produzem uma melhor separação de compostos termolábeis. Esses dois fatores permitem que a cromatografia líquida separe compostos que não podem ser separados pela cromatografia gasosa. Finalmente, é mais fácil recuperar uma amostra na cromatografia líquida que na gasosa. A fase móvel pode ser removida e a amostra pode ser mais processada e reanalisada sob diferentes condições.

Há muitas formas disponíveis de cromatografia líquida e a seleção de uma forma adequada depende de vários fatores. Esses fatores incluem tempo de análise, tipo de composto e limites de detecção. Cromatografias de papel, camada fina, troca iônica e exclusão frequentemente resultam em má eficiência e tempo de análise muito longo, por causa da baixa velocidade do fluxo na fase móvel. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) surgiu no final da década de 1960, como uma forma viável e que oferecia vantagens se comparada a outras formas de cromatografia líquida e gasosa. A HPLC utiliza suportes rígidos pequenos e bombas mecânicas especiais, que produzem alta pressão para passar a fase móvel pela coluna. Colunas de HPLC podem ser utilizadas muitas vezes sem recuperação. A resolução obtida com colunas de HPLC é superior à das outras formas de cromatografia líquida. O tempo de análise, em geral, é muito menor e a reprodutibilidade é notavelmente melhor. Todos esses atributos da HPLC a tornam um método melhor de separação em comparação com outras formas de cromatografia líquida.

Há cinco técnicas de separação comumente utilizadas na cromatografia líquida. Elas incluem adsorção, partição, troca iônica, afinidade e exclusão por tamanho. Cada uma delas é caracterizada por uma combinação única das fases estacionária e móvel. Na *cromatografia por adsorção (líquido-sólido)*, os compostos são adsorvidos em um suporte sólido (p. ex., sílica ou alumina). Embora esse tenha sido o primeiro tipo de cromatografia líquida de coluna, ele não é muito utilizado, em razão da forte retenção de muitos compostos pelo suporte, tornando difícil removê-los da coluna. A *cromatografia por partição (líquido-líquido)* separa compostos baseando-se na partição entre uma fase móvel líquida e outra estacionária líquida revestida sobre um suporte sólido. A cromatografia por partição inclui a cromatografia líquida de fase normal, a qual utiliza uma fase estacionária líquida polar, e a cromatografia líquida de fase reversa, a qual utiliza uma fase estacionária não polar. A *cromatografia por troca iônica* utiliza colunas de embalagem que possuem grupos funcionais com carga ligados a uma matriz de polímero. O mecanismo, nesse tipo de cromatografia, é a troca de íons da amostra e íons da fase móvel com o grupo com carga da fase estacionária. A *cromatografia por afinidade* utiliza ligantes bioquímicos imobilizados como fase estacionária para separar alguns solutos de outros não retidos. Esse tipo de separação utiliza a chamada ligação de chave e fechadura, presente nos sistemas biológicos. A *cromatografia por exclusão de tamanho* separa moléculas de acordo com a diferença de seu tamanho. O material de suporte apresenta certa gama de tamanhos de poro. Quando o soluto passa por ele, as moléculas pequenas podem entrar nos poros, enquanto as maiores não e serão removidas primeiro da coluna.

Em muitos aspectos, a cromatografia líquida é similar à gasosa e, por essa razão, a instrumentação também o é. Um sistema típico de cromatografia líquida consiste em uma fase móvel líquida, um injetor simples (manual ou automático), uma bomba mecânica, uma coluna, um detector e um gravador de dados (Fig. 4.20). A fase móvel líquida é bombeada de um reservatório de solvente pela coluna. Uma bomba mecânica deve prover um fluxo preciso e acurado, geralmente funcionando em altas pressões (tipicamente, até 6.000 PSI). A bomba deve possuir um volume interno baixo e ser de material que não reaja com o solvente. A injeção da amostra é conseguida com o uso de uma seringa e o depósito da amostra em uma alça. A injeção pode ser feita manual ou automaticamente com o auxílio de um mostrador automático controlado por microprocessador. A maioria das separações analíticas é realizada por coluna de embalagem. Há muitos tipos de material de embalagem disponíveis. A seleção do material adequado depende, em grande parte, do tipo de composto ou de compostos que deverão ser separados. Na cromatografia líquida, as propriedades físicas da amostra e da fase móvel são, em geral, similares. Uma é baseada na mensuração diferencial de uma propriedade física comum à amostra e à fase móvel. Os exemplos incluem detectores de índice de refração, condutividade e eletroquímicos. A outra é baseada na mensuração de uma

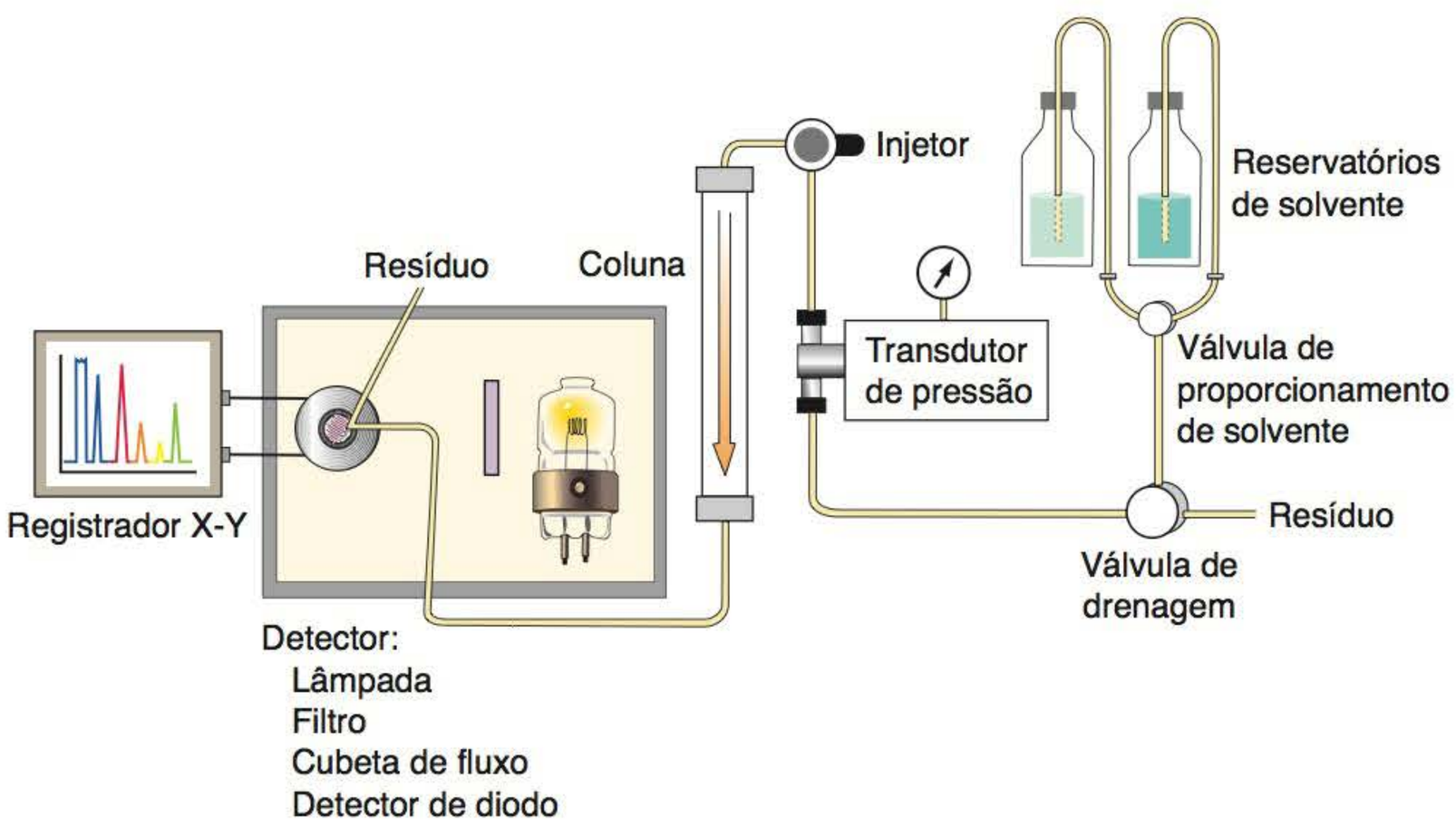


Figura 4.20 Componentes de um cromatógrafo líquido de alto desempenho.

propriedade física específica à amostra, com ou sem a fase móvel. Os exemplos incluem detectores da absorbância e fluorescentes.

Uma aplicação muito utilizada da HPLC é a separação e a quantificação da hemoglobina, em particular da HbA_1. Os sistemas disponíveis para esse tipo de análise são automatizados e completam a análise em menos de 5 minutos.

Espectrometria de massa

A espectrometria de massa baseia-se na fragmentação e na ionização de moléculas utilizando uma fonte de energia adequada. As massas de fragmentos resultantes e sua relativa abundância produzem um espectro de massa característico da molécula-mãe. Antes de um composto ser detectado e quantificado por espectrometria de massa, ele deve ser isolado por outro método, cromatografia de massa ou HPLC. Tipicamente, a espectrometria de massa envolve as seguintes etapas principais: (1) conversão da molécula-mãe em uma corrente de íons (usualmente íons positivos de carga única); (2) separação de íons pela relação massa/carga (m/z) em que m é a massa do íon em unidades de massa atômica e z é a sua carga; e (3) contagem do número de íons de cada tipo ou mensuração da corrente produzida quando os íons atingirem um transdutor. Como a maioria dos íons formados possui carga única, a m/z em geral é simplesmente a massa do íon. A espectrometria de massa também é descrita no Capítulo 23 (ver especialmente as Figs. 23.5 e 23.6).

Pesos atômicos (uma ou Da)

Os pesos atômico e molecular geralmente são expressos em termos de unidades de massa atômica (uma) ou daltons (Da). As unidades uma ou Da baseiam-se em uma escala relativa, em que a referência é o isótopo de carbono $^{12}_{6}C$, o qual apresenta uma massa de exatamente 12 Da. Por essa razão, a unidade Da é definida como 1/12 da massa de um átomo $^{12}_{6}C$ neutro. A partir dessa definição, temos:

$$1 \text{ uma} = 1 \text{ Da} = 1{,}66054 \times 10^{-27} \text{ kg/átomo } ^{12}C$$

Além disso, 1 mol de $^{12}_{6}C$ pesa 12,0000 g.

Exemplo 4.5. Quais são as massas em Da de $^{12}C^{1}H_4$ e $^{13}C^{1}H_4$?

Solução

$^{12}C^{1}H_4$

$$m = 12{,}000 \times 1 + 1{,}007825 \times 4 = 16{,}031 \text{ Da}$$

$^{13}C^{1}H_4$

$$m = 13{,}00335 \times 1 + 1{,}007825 \times 4 = 17{,}035 \text{ Da}$$

Relação massa/carga

A relação massa/carga (m/z) é obtida dividindo-se a massa atômica ou molecular de ânion (m) pelo número de cargas (z) que o íon carrega.

Exemplo 4.6.

$^{12}C^{1}H_4^{+}$

$$m/z = 16{,}035/1 = 16{,}035$$

$^{13}C^{1}H_4^{2+}$

$$m/z = 17{,}035/2 = 8{,}518$$

Muitos íons produzidos em espectrômetros de massa possuem carga única. Por essa razão, o termo relação massa/carga é comumente abreviado para o termo mais conveniente massa. Do ponto de vista do rigor, essa abreviação é incorreta, mas ela é amplamente utilizada na literatura sobre espectrometria de massa. Além disso, esse termo representa o eixo x de espectros da espectrometria de massa de moléculas plotadas contra sua abundância relativa (eixo y).

Componentes básicos

Todos os espectrômetros possuem três componentes básicos: uma fonte iônica, um analisador de massa e um detector iônico. A unidade de entrada admite amostras para o espectrômetro de massa. Quando o instrumento faz parte de um conjunto gasometria gasosa/espectrometria de massa, a unidade de entrada deve ser aquecida para manter os compostos voláteis no estado de vapor ao chegarem à unidade de fonte iônica. Ela também deve eliminar a maior parte do gás transportador, para se adaptar à condição de alto vácuo necessária para a operação da espectrometria de massa.

Unidade de fonte iônica. A unidade de fonte iônica é mantida em alta temperatura e vácuo para prover condições adequadas de ionização de moléculas de amostra vaporizadas. Existem disponíveis vários tipos de fontes energéticas para ionizar moléculas da amostra na espectrometria de massa. Uma fonte comumente utilizada é o feixe de elétrons produzido por um filamento aquecido. O processo de bombardeamento de uma amostra com elétrons é chamado *ionização por impacto de elétrons*. Outros processos de ionização incluem a *ionização química*, no qual moléculas da amostra são ionizados por um gás reagente que foi ionizado por um feixe de elétrons, e o *bombardeamento atômico rápido*, no qual uma amostra sólida é ionizada por um feixe de átomos (p. ex., argônio).

A maioria dos laboratoristas está familiarizada com o uso de espectrômetros de massa para a análise de drogas e outros compostos com peso molecular baixo. Dois exemplos são a confirmação de investigação positiva de drogas e a análise de aminoácidos. Essas técnicas requerem a união da cromatografia gasosa e a espectrometria de massa (GCMS). A abordagem convencional possui vários fatores limitantes associados. Essas limitações incluem a necessidade de separar o analito da matriz da amostra e de tornar estáveis derivados voláteis, propícios à ionização por meio do impacto de elétrons ou da ionização química. Embora essas técnicas convencionais produzam análises altamente específicas e sensíveis, elas também são tecnicamente exigentes e não apresentam a aspereza requerida pelo laboratório clínico. Contudo, o maior foco sobre análise de proteínas, diagnóstico molecular e exames genéticos fez com que ocorresse uma nova onda de espectrômetros de massa com capacidade de avaliar compostos complexos (p. ex., proteínas).

A fonte de *ionização por dessorção a laser assistida por matriz* (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization)* consiste em uma mistura sólida de analito e matriz (incluindo cromóforo orgânico) em uma placa de amostra, juntamente com uma luz laser e óptica de íons (Fig. 4.21*A*). Essa técnica é descrita com mais detalhe no Capítulo 76. Quando o cromatóforo absorve a luz laser, ele vaporiza e levanta os íons do analito da superfície em uma fase gasosa diretamente acima da placa alvo e para o interior do analisador. A técnica MALDI é considerada uma técnica de ionização *offline*, porque a amostra é purificada, depositada e seca sobre a placa de amostra antes da análise (Skoog, 1998). A *ionização por dessorção a laser de superfície melhorada* (SELDI, *surface-enhanced laser desorption ionization*) é uma técnica que mensura proteínas de amostras biológicas complexas como soro, plasma, líquidos intestinais, urina, lisados celulares e produtos de secreção celular (ver também Cap. 76). Proteínas são capturadas por adsorção, partição, interação eletrostática ou cromatografia por afinidade em uma superfície com chip proteico de fase sólida. Um laser ioniza amostras que foram cocristalizadas com uma matriz sobre uma superfície alvo. Superfícies cromatográficas com chip proteico na SELDI são projetadas exclusivamente para reter proteínas de misturas complexas de acordo com suas propriedades específicas. Após a adição de uma solução de matriz, proteínas podem ser ionizadas com um laser de nitrogênio e suas massas moleculares podem ser mensuradas por espectroscopia de massa por tempo de voo (TOF MS, *time-of-flight mass spectroscopy*) (Fig. 4.21*B*) (ver também a Fig. 23.5). Os arranjos do chip proteico são o coração da tecnologia SELDI-TOF MS e distinguem-na de outros sistemas baseados na espectroscopia de massa. Cada arranjo é composto por diferentes superfícies cromatográficas que, ao contrário da HPLC ou da cromatografia gasosa, são projetadas para reter e não remover as proteínas de interesse. Os arranjos do chip proteico possuem uma base de alumínio com vários pontos compostos por uma superfície ativa química (aniônica, catiônica, hidrofóbica, hidrofílica ou íon metal) ou bioquímica (anticorpo imobilizado, receptor, DNA, enzimas etc.). Cada superfície é destinada a reter proteínas de acordo com uma propriedade fisioquímica geral ou específica das proteínas. Superfícies quimicamente ativas retêm classes completas de proteínas e a superfície sobre a qual um agente bioquímico (p. ex., anticorpo ou outro tipo de reagente de afinidade) é acoplado é projetada para interagir especificamente com uma única proteína alvo (Skoog, 1998).

Unidade analisadora do espectrômetro de massa. O débito de uma fonte iônica é uma corrente de íons gasosos positivos e negativos que são, então, acelerados no analisador de massa que classifica os íons da molécula mãe e os íons de seus fragmentos para a sua relação massa/carga. Isso é realizado de várias maneiras diferentes. O analisador de *tempo de voo* (TOF, *time-of-flight*) consiste em um tubo de voo

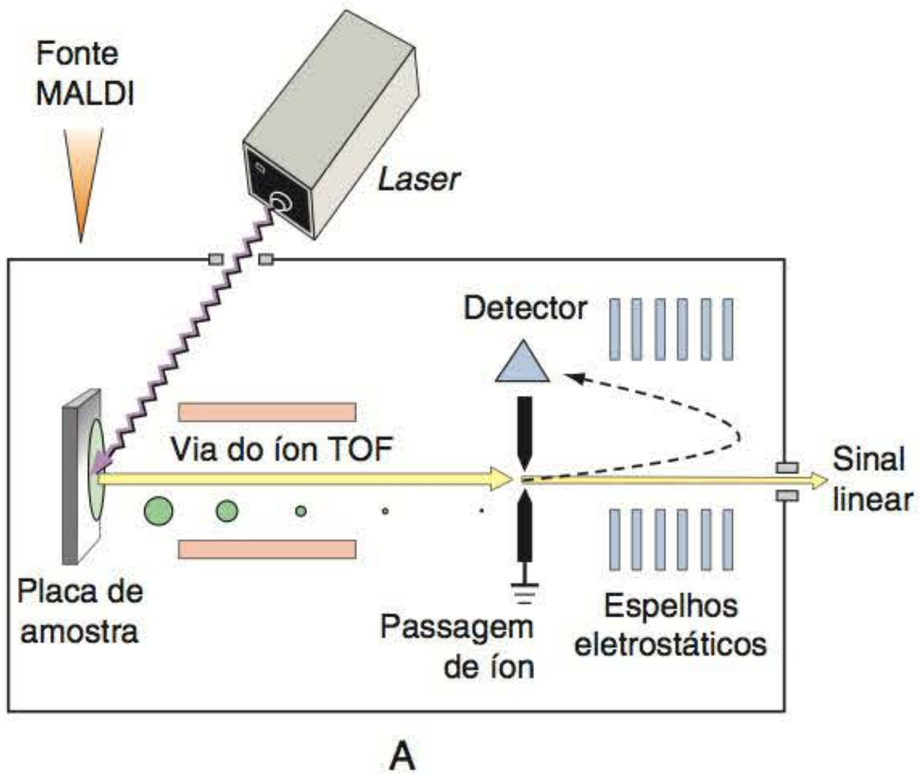


Figura 4.21 Diagrama de dois sistemas amplamente utilizados para pesquisa protônica. *A*, espectrômetro de massa por tempo de voo MALDI, e *B*, espectrômetro de massa por tempo de voo SELDI.

metálico e as relações *m/z* dos íons são determinadas pela mensuração acurada e precisa do tempo que os íons levam para percorrer a distância entre a fonte MALDI ou SELDI até o detector. Considerando que todos os íons de *m/z* diferente recebem a mesma energia cinética, íons com *m/z* baixa atingirão o detector mais rápido que íons com *m/z* alta. No *espectrômetro de massa quádruplo* (Fig. 4.22*A* e Fig. 23.5), a corrente elétrica direta e as voltagens de radiofrequência de magnitudes selecionadas são aplicadas a dois pares de bastões metálicos. Apenas íons de uma relação massa/carga específica podem passar, sem sofrer deflexão, até a extremidade dos bastões, na qual serão detectados. Todos os outros íons apresentam trajetórias instáveis ao longo do percurso e são defletidos em direção aos bastões, nunca atingindo o detector. Uma vantagem desse desenho é que esse sistema pode realizar varredura da espectrometria de massa em tandem no mesmo analisador. O *espectrômetro de massa por aprisionamento de íons* (Fig. 4.22*B*) funciona como um analisador de massa e como uma unidade de fonte iônica. Três eletrodos, em formato de anel, e duas tampas nas extremidades produzem íons na cavidade até ejetar seletivamente para o detector de íons quando a voltagem da radiofrequência de varredura do eletrodo em anel varia. Uma vantagem importante do analisador de aprisionamento de íons é a sua capacidade de obter um espectro de massa completo com concentrações muito baixas de amostra (Karasek, 1988). No *espectrômetro de massa de setor magnético*, uma voltagem muito alta acelera os íons para fora da unidade de fonte iônica e para o interior de um campo magnético. A curvatura do trajeto de saída de um íon depende da relação massa/carga, da força do campo magnético e da voltagem aplicada. O campo magnético ou a voltagem pode ser variados, para permitir que íons selecionados saiam do campo magnético.

Detector de íons. O detector de íons em espectrômetros de massa comumente é um multiplicador de elétrons ou um detector de conversão de íons/fótons. Em um *multiplicador de elétrons*, os íons atingem o primeiro dinodo do detector, o qual dispara a liberação de elétrons secundários. Uma cascata de elétrons ocorre de modo similar ao do tubo fotomultiplicador, resultando em uma amplificação de aproximadamente 1 milhão de vezes. Em um *detector de conversão de íons-fótons*, os íons atingem um fósforo que emite um fóton para cada íon correspondente. A seguir, um tubo fotomultiplicador convencional amplifica o sinal da maneira usual. A unidade de dados computadorizada controla os múltiplos parâmetros de operação dos componentes do instrumento, armazena e analisa uma vasta quantidade de dados adquiridos. As bibliotecas de referência de espectro de massa embutidas de compostos conhecidos podem ser buscadas pelo computador e comparadas com o espectro da amostra para identificação. Como é enfatizado no Capítulo 23, cada composto ou macromolécula possui um espectro de massa exclusivo, uma "impressão digital" da molécula. Um espectro de massa típico é apresentado na Figura 23.6.

Contador de cintilação

Cintilações são *flashes* luminosos que ocorrem quando raios γ ou partículas carregadas interagem com a matéria. Substâncias químicas

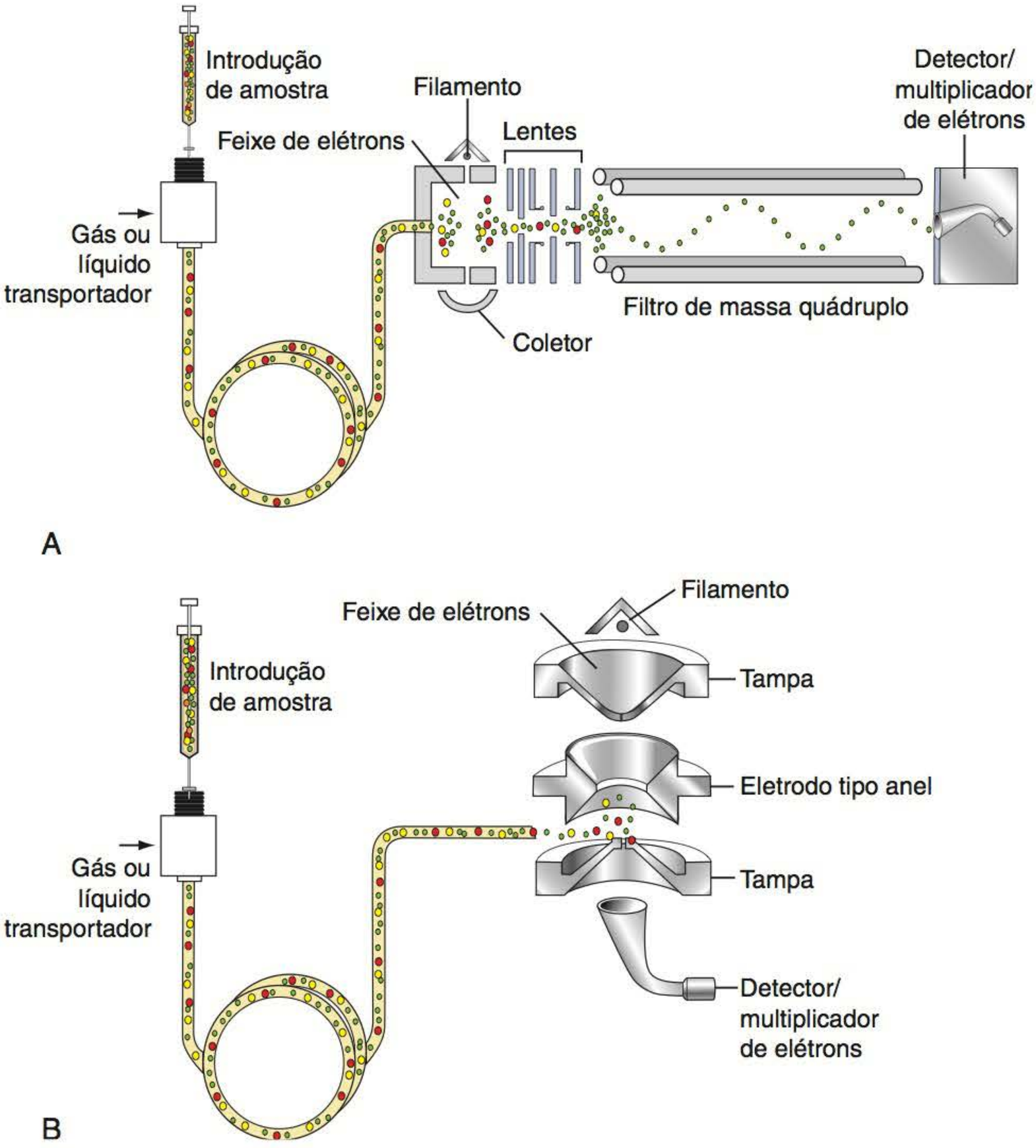


Figura 4.22 Espectrômetro de massa: *A*, tipo quadrupolo; *B*, tipo aprisionamento de íon. (Reproduzido de Schoeff LE, Williams RH: Principles of Laboratory Instruments. St Louis, Mosby, 1993, com autorização).

utilizadas para converter sua energia em energia luminosa são denominadas cintiladores. Se raios γ ou partículas ionizantes forem absorvidos em um cintilador, alguma energia absorvida por ele é emitida como um pulso de luz visível ou uma radiação próxima da UV. Um tubo fotomultiplicador detecta a luz diretamente ou por meio de uma fibra óptica de reflexão interna. Um contador de cintilação é um instrumento que detecta cintilações, utilizando um tubo fotomultiplicador, e conta os impulsos elétricos produzidos pelas cintilações. Uma aplicação para a contagem de cintilação é o radioimunoensaio (RIE). Existem dois métodos de cintilação: cintilação de cristal e cintilação líquida.

A *cintilação de cristal,* em geral, é utilizada para a detecção de radiação γ. Quando um raio γ penetra o cristal de iodeto de sódio (NaI), o qual contém 1% de tálio, ele excita os elétrons dos átomos de iodeto e eleva-os a estados energéticos mais altos. Quando os elétrons retornam ao estado inicial, a energia é emitida como radiação UV. A radiação UV é prontamente absorvida pelos átomos de tálio e emitida como fótons na faixa visível ou próxima da UV. Os fótons passam pelo cristal e são detectados por um tubo fotomultiplicador. Um analisador de altura do pulso classifica os sinais do pulso do tubo fotomultiplicador de acordo com a altura do seu pulso e permite apenas que aqueles dentro de uma faixa restrita atinjam o medidor para contagem.

A *cintilação líquida* é usada principalmente para contar radionuclídeos, que emitem partículas β. Uma amostra é suspensa em uma solução ou "coquetel" que consiste em um solvente (p. ex., tolueno), um cintilador primário (p. ex., 2-5-difeniloxazol [PPO]) e um cintilador secundário (p. ex., 2,2'-*p*-fenilenebis; 5-feniloxazol; [POPOP]). Partículas β da amostra radioativa ionizam o cintilador primário do solvente. Um cintilador secundário absorve os fótons emitidos pelo cintilador primário e reemite-os em um comprimento de onda mais longo. O cintilador secundário facilita a transmissão mais efetiva de energia das partículas β, especialmente quando uma grande quantidade de arrefecimento estiver presente. Arrefecimento é um processo que resulta em uma redução do débito de fótons da amostra. Esse fenômeno pode ser devido ao arrefecimento químico, em que impurezas da amostra competem com os cintiladores para transferência de energia, ou ao arrefecimento de cor, no qual substâncias coloridas (p. ex., hemoglobina) absorvem os fótons luminosos produzidos pela cintilação. Os fótons luminosos produzidos na amostra são detectados e amplificados pelos tubos fotomultiplicadores da mesma maneira que no contador de cintilação de cristal.

Eletroforese capilar

A eletroforese capilar representa uma alternativa para técnicas de separação. Um sistema típico de eletroforese capilar, como mostra a Figura 4.23, consiste em um capilar de sílica fundida, dois reservatórios de tampão eletrolítico, uma fonte de energia de alta voltagem e um detector ligado a uma unidade de captura de dados. A amostra é introduzida na entrada capilar. Quando uma alta voltagem é aplicada pelas extremidades do capilar, as moléculas da amostra são separadas por fluxo eletro-osmótico, resultando um fluxo volumoso dos íons positivos em excesso na superfície capilar interna em direção ao cátodo. Os íons positivos da amostra emergem precocemente na saída do capilar, porque o fluxo eletro-osmótico e o movimento iônico apresentam a mesma direção.

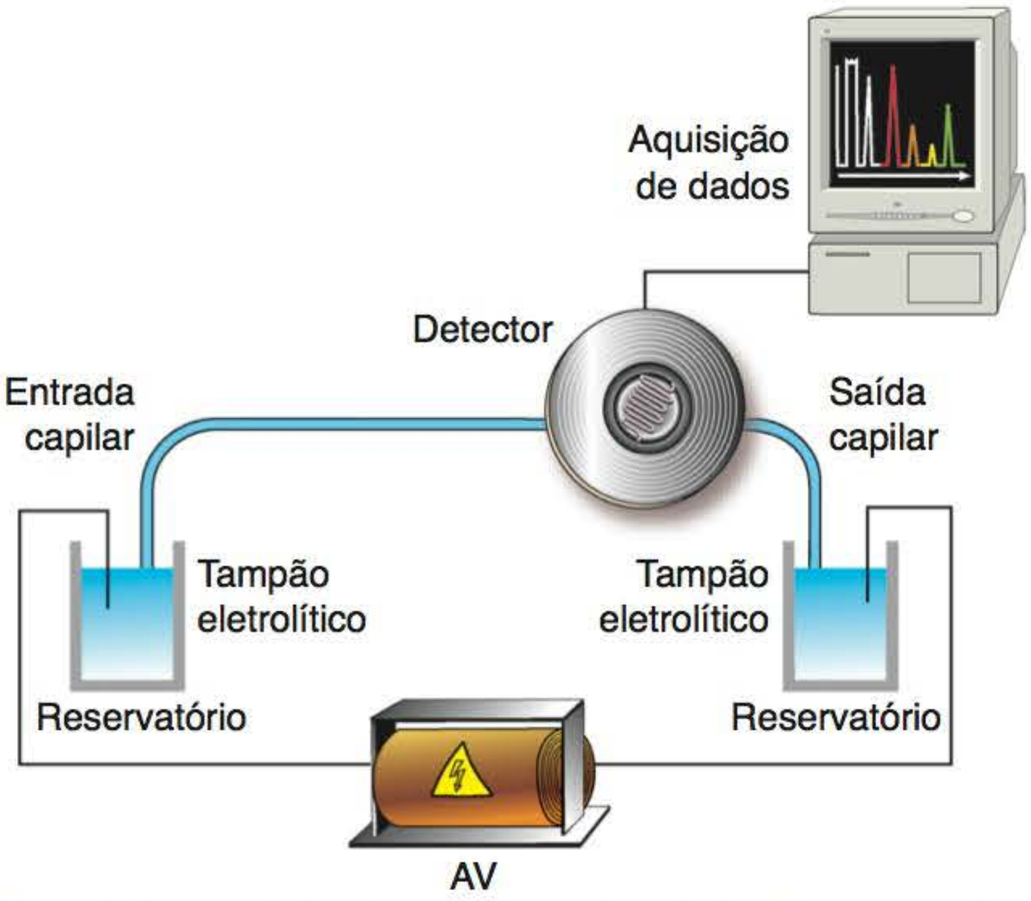


Figura 4.23 Sistema de eletroforese capilar. AV, fonte de alta voltagem. (Reproduzido de Ward KM, Lehmann CA, Leiken AM: Clinical Laboratory Instrumentation and Automation: Principles, Applications, and Selection. Philadelphia, WB Sauders Company, 1994, com autorização).

Íons negativos da amostra também se movem em direção à saída do capilar, mas a uma velocidade menor. Quando íons da amostra migram em direção à saída do capilar, diferentes tipos de detector são utilizados para detectá-los, incluindo o óptico, de condutividade, o eletroquímico, de espectroscopia de massa ou de radioatividade. As vantagens da eletroforese capilar sobre a eletroforese convencional e a HPLC são o tempo analítico curto, o poder de resolução e os volumes de microamostras (Love, 1994). Utilizando nanolitros de amostra, misturas complexas de moléculas podem ser separadas com um número teórico por placa próximo de um milhão. Separações podem ser completadas em menos de 10 minutos com a aplicação de uma alta voltagem. A aplicação de alta voltagem torna-se possível pela alta relação superfície/volume do capilar, a qual permite a eficiente transferência de calor por meio da parede capilar. As aplicações da eletroforese capilar incluem a separação de proteínas séricas e de variantes da hemoglobina.

Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear é uma técnica utilizada para a determinação da estrutura de compostos orgânicos. Diferente da espectroscopia de massa, a espectroscopia por ressonância magnética nuclear é não destrutiva. Contudo, ela exige uma amostra de maior volume que a espectometria de massa. Embora a espectroscopia por ressonância magnética nuclear seja muito utilizada como uma técnica de diagnóstico por imagem, ela foi adaptada para apenas um número limitado de análises laboratoriais clínicas, a mais popular sendo as mensurações de partículas lipoproteicas (ver Cap. 17).

A ressonância magnética nuclear é um fenômeno que ocorre quando os núcleos de certos átomos são imersos em um campo magnético estático e expostos a um segundo campo magnético oscilante, isto é, o componente magnético da radiação eletromagnética. Alguns núcleos apresentam esse fenômeno e outros não, dependendo se eles possuem uma propriedade denominada *spin*. O *spin* de um próton produz um sinal de ressonância magnética nuclear. O núcleo de um átomo de hidrogênio possui *spin* e, como átomos de hidrogênio ocorrem frequentemente, eles são úteis na determinação da estrutura.

Quando a ressonância magnética nuclear é utilizada para bombardear moléculas, os átomos de hidrogênio absorvem fótons de diferentes energias dependendo da localização do átomo de hidrogênio. Por exemplo, em compostos contendo hidrogênio e cloreto, o próton próximo de dois átomos de cloreto produz uma ressonância magnética nuclear diferente da do próton localizado próximo de um átomo de cloreto e um átomo de hidrogênio. A energia absorvida pelos núcleos que rodam em torno do eixo pode ser plotada contra a frequência da ressonância magnética nuclear aplicada para se obter um espectro de ressonância magnética nuclear da molécula.

Em mensurações de subclasses de lipoproteínas, o sinal de ressonância magnética nuclear origina nos prótons dos grupos metil terminais do lipídeo transportado nas partículas (principalmente éster de colesterol e triglicerídeos do núcleo da partícula e fosfolipídeos da camada externa da partícula). Os sinais dos diferentes lipídeos combinam-se para produzir um sinal com frequência e forma características relacionadas ao tamanho da partícula, isto é, o diâmetro da carapaça de fosfolipídeos, excluindo a influência da apolipoproteína ligada à partícula.

Os componentes de um espectrômetro por ressonância magnética nuclear são o ímã utilizado para separar o estado energético do *spin* nuclear e um transmissor, o qual fornece as radiofrequências (*rf*) ou a energia irradiante. Uma sonda contendo bobinas para acoplar a amostra com o campo de rf (*s*) e computador é utilizada para avaliar os dados.

Métodos analíticos gerais e problemas

Talvez o aspecto mais fundamental do processo analítico seja a preparação de reagentes de alta qualidade, que serão utilizados no procedimento analítico. Nesse processo, a qualidade da água, a pureza da substância química, a seleção de vidraria ou plásticos e a preparação correta de reagentes são importantes para a operação adequada do equipamento laboratorial e da performance dos procedimentos de testes. Nesta seção, vários tópicos serão apresentados. Eles estão relacionados ao processo analítico e, em última instância, terão impacto sobre os resultados do exame realizado na amostra de um paciente.

Substâncias químicas

As substâncias químicas utilizadas para preparar agentes para os testes apresentam vários graus de pureza. A seleção adequada das substâncias químicas é importante, para que os resultados desejados sejam obtidos. A gradação de qualquer substância química é altamente influenciada por sua pureza. O tipo e a quantidade de impurezas, em geral, são declarados no rótulo afixado no recipiente da substância química. Graus menos puros incluem o grau prático, o técnico e o comercial. Esses graus de substâncias químicas são inadequados para o uso na maioria dos exames quantitativos realizados em um laboratório clínico.

A maioria dos procedimentos qualitativos e quantitativos realizados em um laboratório clínico exige o uso de substâncias químicas que satisfaçam as especificações da American Chemical Society (ACS). Essas substâncias químicas são classificadas como de grau analítico ou grau do reagente. Os exemplos de outras designações de substâncias químicas para satisfazer padrões elevados de pureza incluem: grau do espectro, nano grau e grau de HPLC.

As substâncias químicas são produzidas para satisfazer as especificações definidas em The United States Parmacopoeia (USP), The National Formulary e The Food Chemical Index. As especificações definem tolerâncias a impurezas não nocivas à saúde.

A International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) desenvolveu padrões e níveis de pureza para certas substâncias químicas. Eles incluem o padrão de peso atômico (grau A), padrão definitivo (grau B), padrão primário (grau C), padrão de trabalho (grau D) e substâncias secundárias (grau E).

Uma fonte muito boa de substâncias químicas altamente purificadas, especialmente materiais de referência, é o National Institute of Standard and Testing (NIST) (Gaithesrburg, MD). O NIST define as propriedades fisioquímicas de cada composto e fornece um certificado documentando suas mensurações. Além disso, o NIST fornece Standard Reference Material (SRMs) na forma sólida, líquida ou gasosa. Os sólidos podem ser cristalinos, em pó ou liofilizados.

Existem duas organizações profissionais que podem fornecer diretivas às equipes laboratoriais sobre a seleção adequada de substâncias químicas e a preparação de reagentes. Elas são o College of American Pathologists (CAP, Northfield, IL 60093) e o Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), antigamente denominado National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (Wayne, PA 19087-1898).

Água

A água tem numerosos usos em um laboratório clínico. Ela é utilizada para preparar reagentes, como diluente para controles e calibradores, para enxaguar e limpar componentes internos de analisadores, para servir como banho de aquecimento de cubetas e para lavar e enxaguar vidraria de laboratório. Para a maioria de seus usos, a fonte de água deve ser da maior pureza possível, enquanto a água necessária para o enxágue de vidraria pode apresentar uma pureza menor.

Tipos de pureza de água

O CLSI e o CAP definiram três graus de pureza de água: I, II e III. Os critérios para cada tipo são delineados nas diretivas do CLSI (NCCLS, 1997). Ao selecionar um sistema de purificação de água, o comprador deve dar atenção rigorosa a esses critérios, de modo que sejam incluídos todos os filtros adequados e componentes necessários para produzir água do tipo I. Além disso, deve-se dar atenção especial à "água de alimentação", que em geral é a água corrente do laboratório. A água de alimentação pode conter contaminantes raros ou apresentar alto conteúdo de minerais (dureza), o que comumente requer a inclusão de componentes adicionais no sistema de processamento de água.

Purificação

Muitos laboratórios produzem ou purificam a própria água. Há vários meios disponíveis para a produção de água grau reagente. A maioria dos sistemas de filtração de água utiliza um pré-filtro para iniciar o processo. A água passa por esse pré-filtro, que aprisiona qualquer partícula de matéria, antes de enviar a água para o componente seguinte. Nesse ponto da filtração, a água pode ser destilada ou pode passar por um filtro de osmose reversa. A destilação é o processo pelo qual um líquido é vaporizado e condensado; ela é utilizada para purificar ou concentrar uma substância ou para separar uma substância volátil de outra menos volátil. A água que foi destilada não satisfaz as exigências específicas da água tipo I do CAP. A osmose reversa é um processo no qual a água é forçada por uma membrana semipermeável que atua como um filtro de moléculas. O filtro de osmose reversa remove entre 95 e 99% de compostos orgânicos, bactérias e outras matérias particuladas e aproximadamente 95% de todos os minerais ionizados. No entanto, ele não remove uma porcentagem tão grande de impurezas gasosas. A osmose reversa isoladamente não produz água do tipo I, mas se forem adicionados filtros ao sistema (p. ex., filtros de troca iônica e de particulados de carbono) como na destilação, pode-se produzir a água do tipo I.

Filtros de troca iônica removem íons para produzir água desionizada sem minerais. A desionização é conseguida por meio da passagem da água por polímeros de resina insolúveis que contêm resinas de troca aniônica ou catiônica. Essas resinas de troca substituem íons H^+ e OH^- por impurezas presentes na forma ionizada da água. Outro tipo de material utilizado é uma resina mista, que contém materiais de troca aniônica e catiônica. Os desionizadores são capazes de produzir água que possui uma resistência específica superior a 1 a 10 Mohm • cm (MΩcm).

Filtros de carbono, que contêm carvão ativado, podem ser adicionados ao sistema de purificação de água para ajudar a remover vários tipos de compostos orgânicos que ainda podem estar presentes na água. Quando esses filtros são utilizados, o CLSI/CAP considera que o produto final contém uma quantidade mínima de material orgânico.

Um filtro de matéria particulada pode ser adicionado no final do sistema. Esse filtro com um tamanho médio de poro inferior a aproximadamente 0,22 μm servirá para aprisionar qualquer matéria particulada remanescente de tamanho igual ou superior ao tamanho do poro.

Monitoração da pureza da água

Como a água é parte integrante importante da análise laboratorial, a sua pureza deve ser monitorada de maneira consistente. A frequência dos testes da água depende de muitos fatores, incluindo composição da água de alimentação, disponibilidade de pessoal para realizar os testes de água e quantidade de água que o laboratório utiliza durante um determinado período de tempo. No mínimo, a resistividade e o conteúdo bacteriano da água devem ser monitorados regularmente. Além disso, o pH, o conteúdo de sílica e as contaminações orgânicas podem ser determinadas. Dependendo dos recursos do laboratório, alguns ou todos esses parâmetros devem ser checados periodicamente.

A maioria dos sistemas de filtração de água possui disponível um medidor de resistividade em linha. Mensurações da resistividade são utilizadas para a avaliação do conteúdo iônico da água purificada. Quanto maior for a concentração iônica na água, menor o valor da resistividade. O CLSI/CAP exige que a água do tipo I possui maior resistividade do que 10 MΩ • cm.

A monitoração da contaminação bacteriana pode ser feita muito facilmente. Deve-se permitir que a água corra por no mínimo um minuto para limpar o sistema. A seguir, uma alíquota de água é coletada dependendo do procedimento utilizado e deve ser colocada em um meio adequado. Após um tempo de incubação apropriado, determinar o número de unidades formadoras de colônias presentes na placa de ágar. Os microrganismos mais encontrados na água após o término do processo de purificação são bastões Gram-negativos.

Após a instalação do sistema

A maioria dos sistemas de purificação de água destina-se ao acesso fácil à água do tipo I. Por essa razão, é aconselhável utilizar apenas água do tipo I para a maioria das aplicações de um laboratório. A água do tipo II ou III poderia ser utilizada para o enxágue de vidraria e a limpeza de superfícies exteriores. Por exemplo, a detecção de metal pesado ou a HPLC exige o uso de água especialmente preparada e, consequentemente, a água do tipo I não deve ser utilizada. A água ultrapura pode ser adquirida da *NERL Diagnostics Corporation* (East Providence, RI 02914).

Quantificação de massa

Massa é a quantidade de matéria contida em um objeto. O peso de um corpo é a aceleração gravitacional exercida sobre ele e, ao contrário da massa, varia com a altitude. O peso é igual à massa multiplicada pela gravidade. No laboratório, mensuramos a massa de um objeto.

Tipos de balanças

Há vários tipos diferentes disponíveis, dependendo do que deve ser pesado. Por exemplo, para pesar uma amostra de gordura fecal, uma balança adequada é a de precisão de carga máxima capaz de pesar com exatidão quantidades em quilogramas. A preparação de padrões para exames toxicológicos exige quantidades em microgramas e, por essa razão, uma microbalança de prato único é adequada.

Balanças de substituição com braço desigual

As balanças de substituição com braço desigual são de prato único. Elas são utilizadas com frequência em laboratórios, embora quase todas estejam sendo substituídas por balanças eletrônicas. A balança de braço desigual mecânica de prato único opera com base no princípio da remoção de pesos e não em sua adição. Um contrapeso de massa fixa é utilizado para equilibrar a massa combinada do prato e dos pesos removíveis por dois braços de peso desigual. Quando uma amostra é colocada sobre um prato de pesagem, os pesos internos em incrementos de 1 g ou 10 g são movidos um por vez pelo operador pelo giro de um conjunto de maçanetas. Isso é continuado até o sistema retornar ao equilíbrio. Nesse momento, a soma dos pesos removidos é igual ao peso do objeto.

Balança de restauração de força magnética

Outra balança muito utilizada é a balança com prato único que depende da restauração da força magnética. A força de restauração é a força necessária para colocar a balança de volta em equilíbrio. A massa desconhecida é colocada sobre o prato e o sistema fica fora de equilíbrio. O operador que ajusta os pesos internos restaura um equilíbrio parcial. O motor óptico do detector de zero indica quando o equilíbrio está próximo e produz um sinal ao motor do sensor para gerar uma corrente de restauração até o equilíbrio ser atingido.

Balanças de carga máxima

Balanças de carga máxima de prato único operam no mesmo princípio que as analíticas de prato único (i. e., pesagem por substituição). O

amortecimento é obtido por mecanismo magnético e não por liberação de ar. Essas balanças são especialmente adequadas para a pesagem rápida de grandes massas (até 10.000 g) que não exigem muita precisão analítica (p. ex., preparação de grande volume de reagente).

Balanças eletrônicas

Há vários modelos de balança eletrônica. Um deles utiliza uma célula de carga com medidor de distensão. Trata-se de um dispositivo pequeno e fino, que altera a resistência elétrica, quando distendido ou comprimido. Geralmente, vários medidores de distensão são utilizados em arranjos tipo ponte Wheatstone. Eles são colados sobre a célula de carga em um local protegido. Com grande frequência, uma célula de carga tem o formato de um feijão ou prato. Quando o feijão ou prato é deslocado, ele encurva um pouco e esse movimento mínimo é detectado por medidores de distensão. A magnitude do encurvamento pode ser de um milésimo de polegada, mas é o suficiente para o medidor de distensão mensurar.

Outro modelo de balança eletrônica opera no princípio de compensação da força eletromagnética. Uma bobina, colocada entre os polos de um eletroímã cilíndrico, é mecanicamente conectada a um prato de pesagem. A massa colocada sobre o prato produz uma força que desloca a bobina no campo magnético. Um regulador gera corrente de compensação suficiente apenas para retornar a bobina à sua posição original. Quanto mais massa for colocada sobre o prato, maior a força de deflexão e mais forte é a corrente requerida para corrigir a deflexão da bobina. O princípio de mensuração baseia-se em uma relação linear estrita entre a corrente de compensação e a força produzida pela carga colocada sobre o prato.

Há várias características adicionais que podem estar disponíveis em alguns modelos de balanças eletrônicas. Por exemplo, algumas balanças eletrônicas incluem um amortecedor de vibração eletrônico. Qualquer vibração excessiva pode ser detectada quando uma variação do ponteiro ou da oscilação do número na última decimal do mostrador digital é observada. Outra característica disponível em alguns modelos é a tara embutida. Isso permite que o peso do recipiente de pesagem seja "zerado". Além disso, balanças eletrônicas podem ter uma interface com computadores para fornecer cálculos como, por exemplo, média de peso e análise estatística de múltiplas pesagens. O *design* fundamental das balanças eletrônicas permite a pesagem mais rápida, o qual é vantajoso ao se realizar múltiplas leituras (p. ex., calibração de pipetas).

Calibração

Balanças laboratoriais exigem a calibração em intervalos regulares. O NIST afirma que não existe intervalo fixo de calibração para aplicações científicas. Intervalos de calibração devem coincidir com os requerimentos de organizações de licenciamento e acreditação laboratorial.

As classes de padrões de massa e de verificação da acurácia do peso utilizadas na calibração de balanças foram atualizadas e substituem as exigências mais antigas especificadas para pesos das classes S e S1 do National Bureau of Standards (NBS). As novas classes adequadas de padrões de massa e verificação da acurácia do peso para balanças laboratoriais incluem as classes 1 e 2 da American Society for Testing and Materials (ASTM). Consultar o ASTM E617-97 para informações específicas sobre faixa, legibilidade e incertezas aplicáveis a essas classes.

Os pesos da classe I do NIST (acurácia extrafina) estão disponíveis até 250 mg e podem ser utilizados para balanças de alta precisão (p. ex., de prato único e eletrônica) que são precisas até quatro decimais. A faixa de peso para balanças da classe II pode apresentar um excesso de 1.000 g.

Manipulação de pesos utilizados no teste da acurácia

Deve-se ter um cuidado meticuloso ao se manipular pesos das classes 1 e 2. O operador deve evitar o contato direto com os pesos utilizando luvas limpas ou ferramentas especiais de levantamento (p. ex., fórceps). O contato manual com os pesos pode causar corrosão. Os pesos não devem ser arrastados sobre qualquer superfície, incluindo o prato de pesagem de aço inoxidável. Usualmente, os pesos são enviados em uma caixa fechada e devem sempre ser armazenados nela.

Preocupações ambientais para a melhor acurácia da pesagem

Vários aspectos do meio ambiente podem impactar o desempenho de uma balança laboratorial. Eles incluem temperatura, correntes de ar, vibrações do solo, instabilidade da mesa e eletricidade estática. A minimização dos efeitos do meio ambiente sobre os procedimentos de pesagem, em geral, pode ser feita muito facilmente. Por exemplo, se houver correntes de ar no aposento, uma proteção ou uma cobertura pode ser colocada em torno da balança. Uma mesa de mármore pode ser utilizada para reduzir vibração ou instabilidade.

Especificações da balança

Existem várias especificações importantes que um operador deve conhecer sobre balanças. Elas incluem:

- capacidade – a qual representa a carga máxima que a balança pode pesar;
- acurácia – depende da menor massa que será pesada;
- linearidade – capacidade de uma balança de fornecer um resultado acurado em toda a sua faixa;
- resolução (legibilidade) – o menor incremento de peso que pode ser discernível.

Agências de acreditação laboratorial exigem a verificação da acurácia de balanças em vários intervalos de tempo. Há várias fontes disponíveis para guiar o laboratório em relação a essa exigência.

Vidraria e materiais plásticos de uso laboratorial

Tipos de vidraria

O tipo de vidraria mais comumente encontrado em mensurações de volume é o de silicato de boro. Esse vidro é caracterizado por alto grau de resistência térmica, baixo teor alcalino e ausência do grupo de elementos magnésio-cal-zinco, metais pesados, arsênico e antimônio. São nomes comerciais conhecidos: Pyrex (Corning; Corning, NY) e Kimax (Kimble; Vineland, NJ). As condições cáusticas no armazenamento de soluções alcalinas concentradas em vidro de silicato de boro irão causticar ou dissolver o vidro e destruirão a calibração. Vidraria de silicato de boro com paredes espessas (p. ex., garrafas, jarras ou provetas maiores) não devem ser aquecidos com chama direta nem placa de aquecimento. O vidro não deve ser aquecido acima de seu ponto de distorção (o do Pyrex é 515°C), porque o resfriamento rápido deforma e quebra o vidro facilmente, quando ele é novamente aquecido. No caso de vidrarias volumétricas, o aquecimento pode destruir a calibração.

Corex (Corning, NY)*, uma marca comercial, é uma vidraria especial de alumina-silicato reforçado de modo químico e não termicamente. O Corex é seis vezes mais forte que o vidro de silicato de boro (p. ex., as pipetas de Corex possuem uma força típica de 30.000 psi, enquanto as de silicato de boro possuem uma força de 2.000 a 5.000 psi) e tem uma duração 10 vezes superior à da vidraria convencional. O Corex também resiste melhor à turvação e aos riscos.

A vidraria com baixo teor actínico é um vidro de alta resistência térmica com uma cor âmbar ou vermelha adicionada como parte integral do vidro. A densidade da cor vermelha é ajustada para permitir a visibilidade adequada do conteúdo, mas ainda confere proteção máxima aos materiais sensíveis à luz (p. ex., bilirrubinas). O vidro com baixo teor actínico é comumente utilizado para armazenar material de controle e reagentes.

Tipos de plásticos

Vários tipos de plásticos são utilizados em laboratórios clínicos (p. ex., pontas de pipetas, provetas, frascos, cilindros e cubetas). São exemplos de tipos de plásticos de uso laboratorial: polipropileno, polietileno, Teflon, policarbonato e poliestireno.

Pontas de pipeta de plástico são feitas principalmente de polipropileno. Esse tipo de plástico, flexível ou rígido, é quimicamente resistente e pode ser autoclavado. Essas pontas de pipeta são translúcidas e apresentam vários tamanhos. O polipropileno também é utilizado em diferentes tipos de tubos, incluindo o de amostras e o de ensaio. Um polipropileno especialmente formulado é utilizado para procedimentos criogênicos e podem suportar temperaturas de até –190°C.

O polietileno é também amplamente utilizado na produção de plásticos, incluindo tubos de ensaio, garrafas, tubos graduados, tampas,

* *Corning Glass não fabrica mais a vidraria Corex.*

pipetas de transferência descartáveis, pipetas volumétricas e prateleiras para tubos de ensaio. O polietileno pode se ligar a ou absorver proteínas, corantes e ácido pícrico.

O policarbonato é utilizado em tubos para centrifugação, cilindros e frasco graduados. A faixa de temperatura em que ele pode ser utilizado é ampla (–100°C a +160°C). Trata-se de um plástico muito forte, mas ele não é adequado para uso com ácidos, bases e agentes oxidantes fortes. O policarbonato pode ser autoclavado, mas com limitações (consultar as instruções fornecidas pelo fabricante).

O poliestireno é um tipo de plástico rígido e transparente, que não deve ser autoclavado. Ele é utilizado em vários tipos de tubos, incluindo os graduados com tampa e os de ensaio. Tubos de poliestireno quebram e estilhaçam quando esmagados. Esse tipo de plástico não resiste à maioria de hidrocarbonetos, cetonas e alcoóis.

O Teflon é amplamente utilizado para a fabricação de barras de agitação, tubulações, frascos criogênicos e revestimento de tampa de garrafas. O Teflon é quase inerte quimicamente e é adequado para uso em temperaturas que variam de –270°C a +255°C. Esse tipo de plástico é resistente a uma grande faixa de classes de substâncias químicas, incluindo ácidos, bases, alcoóis e hidrocarbonetos.

Material volumétrico de uso laboratorial

Pipetas

Existem muitos tipos de pipetas disponíveis para uso em um laboratório clínico, cada uma com uma função específica. Elas são utilizadas para a reconstituição de controles e calibradores, a preparação de diluições de soro ou plasma e a aliquotagem de amostras. Por essa razão, é necessário um alto grau de acurácia e precisão. Existem duas categorias gerais de pipetas manuais: de transferência (volumétrica) e de mensuração. Existem três subclasses: de contenção, de liberação e de liberação/sopro.

Designação classe A

Vidrarias de Classe A, incluindo pipetas, são produzidos e calibrados para liberar o volume de líquido mais acurado. Especificações da Classe A são definidas pelo NIST. O CAP especifica que as pipetas volumétricas devem ter a acurácia certificada (Classe A) ou o volume das pipetas deve ser verificado por técnicas de calibração (p. ex., gravimétrica ou fotométrica). A letra "A" aparece em todas as pipetas que estão em conformidade com os padrões da vidraria de Classe A. As vidrarias volumétricas designadas como Classe A têm sido produzidas dentro das tolerâncias dessa classe conforme o estabelecido pela ASTM E694 (West Conshohocken, Pensilvânia) para aparelhos volumétricos. Outros padrões incluem o ASTME 542 para calibração de aparelhos volumétricos e o ASTME 288 para frascos volumétricos.

Tipos de pipetas

Pipetas destinadas à contenção são frequentemente denominadas pipetas de lavagem, porque elas devem ser cheias ou lavadas com solvente adequado após o líquido inicial ter sido drenado. Pipetas de contenção contêm uma quantidade exata de líquido, que deve ser completamente transferido para a mensuração adequada. São exemplos de pipetas de contenção: as pipetas para hemoglobina de Sahli e a de Long-Levy. Elas não satisfazem os critérios de certificação para serem classificadas como Classe A.

Pipetas de liberação são destinadas a drenar pela gravidade. Elas devem ser mantidas verticalmente e a sua ponta deve ser colocada contra a lateral do recipiente e não deve tocar o líquido presente em seu interior. O volume especificado é obtido quando a drenagem cessa. São exemplos de pipeta de liberação as pipetas de Mohr, sorológicas e de transferência volumétrica. Elas são projetadas para satisfazer as exigências para as pipetas do tipo Classe A.

Pipetas volumétricas de liberação possuem um bulbo com extremidade aberta, o qual retém o volume do líquido. Em um lado da pipeta, existe um tubo longo de vidro com uma linha indicando até onde a pipeta deve ser preenchida. A outra extremidade é cônica para a liberação suave do líquido. Essas pipetas devem drenar livremente e não podem ser agitadas ou batidas contra o recipiente. Qualquer perturbação do fluxo livre do líquido pode resultar em uma liberação inexata do líquido.

Algumas pipetas de liberação são desenhadas de modo que a maioria do conteúdo consiga drenar livremente. A seguir, o líquido remanescente é soprado. Essas pipetas não são enxaguadas. São exemplos de pipetas de sopro: a pipeta de Ostwald-Folin e as sorológicas. Pipetas de liberação/sopro são identificadas pela presença de uma ou duas bandas foscas próximas à embocadura. É vital lembrar que nunca se deve pipetar ou soprar pipetas com a boca. É sempre necessário usar um dispositivo auxiliar de pipetagem (p. ex., bulbo).

Pipetas sorológicas de vidro ou plástico são tubos longos com diâmetros uniformes. Eles possuem graduações de volume que vão até a ponta de liberação da pipeta. O último volume de líquido soprado é incluído no volume liberado. O desenho da pipeta de liberação de Mohr é diferente do da pipeta sorológica. Pipetas de Mohr não apresentam graduação na ponta. A acurácia das pipetas de Mohr é válida somente quando a pipeta é cheia. Se volumes menores forem dispensados, a acurácia diminui proporcionalmente.

Micropipetas

Os dois tipos de pipetas mais utilizados são as de deslocamento de ar e as de deslocamento positivo. Essas pipetas são capazes de liberar volumes líquidos de 1 a 1.000 µL. Algumas micropipetas são destinadas para liberar um volume fixo, enquanto outras podem liberar quantidades variáveis de amostra.

Pipetas de deslocamento de ar são dispositivos operados por pistão. Uma ponta de polipropileno de uso único e descartável é conectada ao tambor da pipeta. A ponta da pipeta é colocada no líquido a ser aspirado. Ele é aspirado e liberado por essa ponta.

Pipetas de deslocamento positivo utilizam uma ponta capilar que pode ser de vidro siliconado, vidro ou plástico. Esse tipo de pipeta é útil quando um reagente reage a plásticos. Pipetas de deslocamento positivo usam um êmbolo com ponta de Teflon que se encaixa hermeticamente no interior do capilar. Essas pontas capilares são reutilizáveis e o material remanescente é desprezível quando a pipeta é mantida adequadamente. Alguns procedimentos exigem uma etapa de lavagem ou enxágue entre amostras.

Calibração da pipeta

A monitoração do desempenho de dispositivos de pipetagem não somente é obrigatória na maioria dos estados que licenciam laboratórios que realizam exames diagnósticos como também é uma atitude sensata. A acurácia e a precisão das micropipetas devem ser verificadas antes delas serem colocadas em uso e devem ser monitoradas ao longo do ano. A frequência de verificação depende em parte da magnitude do uso e das exigências da agência de licenciamento e/ou acreditação. A manutenção adequada de pipetas de deslocamento de ar é muito importante. Esse tipo de pipeta tem um comprimento fixo de golpe, que deve ser mantido. Essas pipetas também possuem lacres, que impedem o vazamento de ar para o seu interior quando o pistão é movido. Esses lacres exigem lubrificação periódica para que a sua integridade seja mantida.

Micropipetas de deslocamento positivo devem ter sua mola checada e a ponta de Teflon substituída periodicamente. Um fio deslizante é utilizado para checar rapidamente o ajuste do êmbolo. Essa checagem não substitui aquelas programadas de precisão e acurácia.

Há vários procedimentos utilizados pelos laboratórios para a verificação da precisão e da acurácia de micropipetas. A maioria deles consome tempo, especialmente os procedimentos que requerem a pesagem de água. De qualquer modo, esse procedimento de verificação deve ser feito para se assegurar o funcionamento adequado de micropipetas laboratoriais.

O CLSI apresentou um procedimento aceitável para a determinação da acurácia e da precisão da pipeta (18-P, NCCLS, 1984). Esse procedimento gravimétrico é trabalhoso, mas é um meio de baixo custo para se respeitar as regulações estabelecidas pelas várias agências de acreditação.

Procedimentos mais caros de calibração de micropipetas incluem:

- produtos comerciais de calibração fotométrica de pipetas;
- fornecedores de serviços de calibração;
- Pipet Tracker (Labtronics Inc., Canadá).

Uma das maiores preocupações ao se considerar o custo atribuído a procedimentos de calibração de pipetas é o tempo despendido pelo técnico. Esse tempo requerido para procedimentos fotométricos gira em torno de 50 a 60% inferior ao das técnicas de pesagem manual baratas.

Frascos volumétricos

Frascos volumétricos representam um tipo especial de vidraria no laboratório. Esses frascos, geralmente, são utilizados para preparar padrões para procedimentos quantitativos. Por essa razão, a acurácia deve ser ótima. Frascos volumétricos utilizados para a preparação de padrões e outras soluções, que exigem ótima acurácia, devem satisfazer às especificações da Classe A definida pelo NIST. Essas especificações estão impressas nos frascos. Frascos volumétricos são utilizados para conter um volume exato quando o frasco é cheio até a *marca*. Uma tampa de Teflon ou vidro fosco deve ser utilizada para selar o frasco. Frascos volumétricos não devem ser utilizados para armazenar reagentes.

Calibração de vidraria volumétrica

Segundo os padrões mais rigorosos, cada vidraria volumétrica no laboratório clínico deve ser codificada e há a necessidade de manter um registro de sua calibração. Qualquer vidraria que não estiver de acordo com a tolerância da Classe A deve ser rejeitada. Para preparar uma vidraria para calibração, lavá-la e secá-la cuidadosamente utilizando procedimentos de limpeza adequados. O CLSI pode fornecer ao laboratório um procedimento adequado para calibrar frascos volumétricos.

Termometria

Termômetros e outros tipos de dispositivos detectores de temperatura são utilizados no laboratório para monitorar as temperaturas em refrigeradores, freezers, banhos de água, blocos de aquecimento e incubadoras. As aplicações especiais da termometria incluem osmometria, centrífugas refrigeradas, reagentes refrigerados, compartimentos de analisadores automatizados, compartimentos de aquecimento de analisadores automatizados e banhos de água circulante para compartimentos de cubetas de analisadores automatizados. Todas essas aplicações de monitoração de temperatura apresentam as mesmas exigências: mensurações adequadas e temperatura constante.

Procedimentos adequados de controle de qualidade devem ser realizados e documentados rotineiramente para todos os dispositivos de monitoração da temperatura. Qualquer dispositivo de detecção da temperatura cujo funcionamento não estiver dentro das tolerâncias estabelecidas deve ser substituído. Como muitos ensaios realizados no laboratório são enzimáticos, mesmo o mínimo desvio da temperatura ideal exigida para a sua realização pode acarretar resultados errados.

Tipos de termômetros

Os dois tipos de termômetros de líquido em vidro mais amplamente utilizados são o de imersão total e o de parcial. Um termômetro de imersão total requer que o bulbo e a coluna inteira de líquido sejam imersos no meio mensurado. Esses termômetros são utilizados para monitorar freezers e refrigeradores. Termômetros de imersão parcial devem ter o bulbo e a coluna imersos até a linha de imersão ou a profundidade definida no termômetro. Esse tipo de termômetro é com frequência utilizado para banhos de água e blocos de aquecimento.

Aplicações especiais de dispositivos detectores de temperatura

Termistores são utilizados em vários tipos de instrumentos encontrados em um laboratório, incluindo osmômetros de depressão do ponto de congelação. Um termistor é um transdutor que converte alterações da temperatura (calor) em resistência. Ele consiste em uma pequena esfera composta por uma mistura de óxidos metálicos fundidos, a qual é conectada a dois condutores e encapsulada em vidro. A mistura de óxidos metálicos fundidos possui um alto coeficiente de resistência à temperatura negativa. Por isso, uma pequena diminuição temperatural provoca um aumento relativamente grande na resistência do termistor.

Um termopar é um detector composto por dois materiais diferentes unidos em uma extremidade. Quando a junção dos dois metais é aquecida ou resfriada, uma voltagem é produzida e ela pode ser correlacionada com a temperatura. Há vários modelos de termopares, incluindo de fio frisado, sondas e sondas de superfície. Uma característica importante da maioria dos termopares utilizados em analisadores laboratoriais é o seu tempo de resposta rápido. O tempo de resposta de um termopar é definido como o tempo requerido por um detector para atingir 63,2% de uma alteração da temperatura sob um conjunto especificado de condições. Cinco constantes de tempo são necessárias para o detector se aproximar de 100% da etapa de alteração do valor.

As aplicações laboratoriais do termopar incluem cromatografia gasosa e líquida, mensurações de temperatura de superfície em compartimentos aquecidos de analisadores automatizados, cubetas térmicas e banhos de água circulante em analisadores químicos.

Laboratórios sem mercúrio

Há diversas iniciativas para tornar os laboratórios livres de mercúrio. Por exemplo, em junho de 1998, um acordo importante foi estabelecido entre a American Hospital Association (AHA) e a US Environmental Protection Agency (EPA) (JCAHO, 2002). Um memorando de concordância foi assinado entre as duas organizações em um esforço para diminuir ou eliminar práticas hospitalares poluidoras no período de 5 a 10 anos. Um dos objetivos é eliminar restos de mercúrio.

O mercúrio está contido em numerosos reagentes químicos utilizados pelo laboratório e, evidentemente, em termômetros de mercúrio. O custo associado ao descarte adequado de mercúrio e o impacto deste no meio ambiente torna a substituição de termômetros de mercúrio uma ideia razoável. Existem várias alternativas para a substituição de termômetros que oferecem a necessária acurácia para procedimentos laboratoriais. Elas incluem:

- termômetros contendo líquido vermelho orgânico e pressurizado com gás nitrogênio;
- termômetros contendo líquido azul biodegradável (isoamil benzoato e corante);
- termômetro com líquido vermelho enchido com querosene;
- termômetros digitais com dois metais;
- termômetros digitais com colunas de aço inoxidável.

Calibração de termômetro

A monitoração da acurácia dos termômetros é necessária para se assegurar a confiabilidade dos procedimentos que exigem regulação da temperatura. Termômetros podem ser adquiridos com um certificado para indicar a rastreabilidade de padrões fornecidos pelo NIST. Além disso, muitos termômetros disponíveis no comércio satisfazem ou excedem a tolerância da acurácia estabelecida pelo NIST e American National Standards Institutes (NY, NY)/Scientific Apparatus Makers Association (UK) (ANSI/SAMA).

Termômetros não certificados podem ser calibrados utilizando um termômetro NIST SRM ou uma célula de ponto de fusão de gálio NIST SRM 1968. O termômetro de laboratório clínico SRM 934 é calibrado para especificações da International Temperature Scale 1990 (ITS-90) a 0, 25, 30 e 37°C. Uma célula de ponto de fusão de gálio consiste em aproximadamente 25 g de gálio muito puro (99,99999%), que possui um único ponto de fusão fixo a 29,7646°C (conforme definição da ITS-90). O gálio é selado em um crucifixo inerte de plástico e envolto por um envelope de aço inoxidável (Strouse, 1997).

A acurácia de dispositivos de monitoração de temperatura deve ser verificada em intervalos de 6 ou 12 meses. Existem disponíveis diretivas e procedimentos para a monitoração adequada e tolerâncias (NCCLS padrão aprovado 12-A2, 1990).

Banhos de água

Para uso geral em laboratórios clínicos, banhos de água com temperatura constante devem oferecer um controle de temperatura variável de 5°C acima da temperatura ambiente até 100°C com controle acurado (±0,2°C). Banhos de água podem ser circulantes ou não circulantes. Os banhos de água circulantes provêm o melhor controle de temperatura. Outra consideração importante na seleção de uma temperatura constante é que o modelo seja suficientemente grande para acomodar o volume de trabalho desejado.

Manutenção

A manutenção de um banho de água com temperatura constante é melhorada com o uso de água tipo II (ou tipo I). Isso impede o acúmulo de depósitos minerais da água corrente, a qual pode afetar os elementos de detecção da temperatura e, em geral, acarreta uma má transferência de calor. Contudo, quando ocorre um acúmulo desses minerais, uma solução fraca de ácido clorídrico dissolverá os depósitos.

A limpeza frequente e a água fresca impedirão o crescimento excessivo de bactérias e algas. Além disso, uma solução de timerosal (Merthiolate) 1:1.000 pode ser adicionada para ajudar na prevenção do crescimento bacteriano. O aquecimento excessivo e o dano subsequente podem ocorrer quando o aparelho seca. Em temperaturas mais elevadas, o banho deve ser coberto tanto para manter um controle adequado da temperatura quanto para impedir a evaporação rápida.

Controle de qualidade

Um termômetro calibrado em comparação a outro certificado pelo NIST deve ser um componente em qualquer banho de água. A temperatura em cada exame deve ser observada e registrada. Essa atividade do operador garante que a temperatura do banho é de fato igual à da leitura do termômetro.

Blocos de aquecimento, incubadoras a seco e fornos

Blocos de aquecimento e incubadoras a seco são geralmente utilizados para a incubação de líquidos em temperaturas mais altas. A maioria das incubadoras é construída por uma liga de alumínio capaz de distribuir o calor de maneira uniforme. Sua eficiência de aquecimento é inferior à do banho de água circulante, mas elas mantêm uma temperatura constante com uma variação de ±0,5°C. Um termômetro certificado ou um calibrado NIST deve estar presente no bloco de aquecimento para monitorar a temperatura.

Fornos de aquecimento são utilizados em procedimentos cromatográficos para secar substâncias químicas e ajudar na extração e são utilizados para secar membrana ou géis na temperatura desejada e para o objetivo desejado. Os modelos de fornos incluem: programável, a vácuo ou laboratorial padrão. O controle da temperatura usualmente apresenta uma variação de ±1°C. O forno deve possuir um termômetro certificado ou um termômetro calibrado NIST disponível para monitorar a temperatura interior.

Agitação

A agitação é uma operação destinada a formar uma massa homogênea ou criar um sistema heterogêneo uniforme. A agitação é utilizada para tornar sólidos em solução; para fazer com que fases fiquem em contato íntimo (p. ex., procedimentos de extração); para eliminar sólidos suspensos; para homogeneizar fases líquidas; e para realizar muitas outras operações. Uma consequência séria da agitação inadequada pode ser a falha em novamente suspender completamente as proteínas que depositam durante o armazenamento de longo prazo em congelador de controles de soro, acarretando dados inválidos. Em alguns casos, a agitação excessiva causa desnaturação proteica ou hemólise. Ocorre uma fase de separação quando amostras de soro (ou plasma) aguardam um período de tempo e devem ser cuidadosamente misturadas antes da análise. A concentração de moléculas pequenas uniformes nesse sistema será heterogênea quando as proteínas depositam e tornam-se mais concentradas e, por essa razão, a concentração hídrica efetiva diminui nessa camada. Isso produz um gradiente de concentração hídrica por meio do sistema e, consequentemente, produz um gradiente de concentração de todos os componentes.

Agitadores de tubo único

Um agitador vórtex é capaz de produzir uma oscilação com velocidade variável, que resulta em um movimento de turbilhão do conteúdo líquido de um tubo de ensaio ou de ou outro recipiente. O ângulo de contato e o grau de pressão podem ser regulados para a agitação ideal. Uma agitação muito efetiva é criada pela sequência de múltiplos toques (i. e., toque e retirada do tubo do cálice oscilante de neoprene do agitador). O operador deve ter cuidado de não encher muito o recipiente ou misturar o conteúdo líquido muito rápido, porque pode ocorrer derramamento.

Agitadores de tubos múltiplos

Há vários agitadores disponíveis que manipulam quantidades variáveis de tubos e tubos com tamanhos diferentes, que apresentam diferentes tipos de movimento de mistura. Um *Thermolyne Maxi-Mix* (Sybron Corporation, Dubuque, IA) pode ser utilizado convenientemente para misturar um ou vários tubos de uma só vez. A alteração da pressão do recipiente contra a tampa substituível de espuma de borracha varia a agitação. O movimento circular sobre um disco inclinado causa a inversão contínua do conteúdo nos tubos, os quais são montados com clips na circunferência do disco rotatório. Agitadores de tubos que atuam inclinando para frente e para trás em velocidades variáveis produzem uma mistura perfeita de amostras de sangue total.

Solução aquosa

A concentração de uma solução pode ser expressa como molaridade (M), normalidade (N) e, menos frequentemente, molalidade (m). A preparação acurada de reagentes exige o conhecimento básico da química da solução, da matemática básica e das técnicas.

Molaridade

A molaridade (M) é igual ao número de moles de soluto por litro de solução (solvente). Um mol de uma substância é o número de gramas igual ao peso atômico ou molecular da substância. O peso atômico ou molecular de uma substância é a massa real da partícula química (átomo ou molécula) em relação à massa do átomo de carbono. Um mol de qualquer substância contém aproximadamente $6{,}02 \times 10^{23}$ partículas (constante de Avogrado). Por essa razão, uma solução um molar contém 1 mol de soluto por litro de solução.

Exemplo 4.7. Quantos gramas de NaCl são necessários para preparar 1 litro de uma solução 0,5 M? O peso molecular (PM) do NaCl é 58,5?

Solução

PM × M = g/L

58,5 × 0,5 = 29,25 g/L

Portanto, pesar 29,25 g de NaCl e transferi-lo para um frasco volumétrico de 1 litro. Adicionar água até a marca de 1 litro no frasco.

Milimoles

Quando pequenas concentrações são utilizadas, elas são frequentemente expressas em milimoles por litro (1.000 mmol = 1 mol). Por exemplo, para preparar 10 mL de uma solução de NaOH de 10 mmol (0,01 mol), 4 mg de NaOH são diluídos em 10 mL.

Normalidade

A normalidade (N) é igual ao número de equivalentes grama de soluto por litro de solução e depende do tipo de reação envolvida (p. ex., acidobásica, oxidação). Um peso equivalente de um elemento ou um composto é igual ao peso molecular dividido pelo número de hidrogênios ou grupos hidroxilas substituíveis (também valência):

Peso equivalente = PM/número de hidrogênios, hidroxilas ou valência substituíveis

1 N = número de equivalentes grama do soluto/L de solução

Exemplo 4.8. Qual é o peso equivalente do $Ca(OH)_2$ (PM= 74)?

Solução

Peso equivalente = 74/2 = 37

1 mol = 2 equivalentes

Exemplo 4.9. Qual é o peso equivalente de H_2SO_4 (PM= 98)?

Solução

Peso equivalente = 98/2 = 49

1 mol = 2 equivalentes

Exemplo 4.10. Quantos mililitros de H_2SO_4 concentrado (densidade específica: 1.84; percentual de pureza: 96,2%) são necessários para preparar 1 litro de uma solução 1 normal?

Solução

Etapa 1: calcular o PM do H_2SO_4 = 98/2 = 49

Etapa 2: calcular o número de gramas de H_2SO_4 em 1 litro = 98 g/L

Etapa 3: calcular o número de gramas de H_2SO_4 por mililitro de solução: SG × % do ensaio = 1, 84 × 96,2 = 1,77

Etapa 4: calcular o número de mililitros de H_2SO_4 necessários para preparar 1 litro de uma solução 1 normal:

$$\frac{1{,}77\ \text{g}}{1\ \text{mL}} = \frac{49\ \text{g}}{X\ \text{mL}}$$

X = 27,6 mL

Molalidade

No laboratório, algumas vezes mensuramos as propriedades físicas de soluções (p. ex., quando mensuramos a osmolalidade do soro ou da

urina). Em vez da molaridade, é determinada a molalidade da solução. Uma solução molal é um mol de soluto em um quilograma de solvente. Soluções molais são baseadas no peso e não no volume. Como a densidade da água na temperatura ambiente é de aproximadamente 1 grama por mililitro, 1.000 gramas de água ocupam aproximadamente 1 litro. Portanto, uma solução aquosa 1 molal é aproximadamente a mesma que uma solução 1 molar.

Exemplo 4.11. Quantos gramas de NaOH são necessários para preparar uma solução 2,00 molal?

Solução

Etapa 1: determinar o PM do NaOH = 40 g

Etapa 2: calcular o número de gramas de NaOH necessários para preparar a solução utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Molalidade} = \frac{\text{gramas de soluto/PM do soluto}}{\text{1 kg de solvente}}$$

$$2\ \text{Molal} = \frac{\text{X g de NaOH/40,00 g}}{\text{1 kg de solvente}}$$

X = 80 g de NaOH

Diluições

Procedimentos de diluição não são tão realizados como no passado em razão das melhorias dos computadores e dos instrumentos em que o sistema realiza a diluição automaticamente. Contudo, há ocasiões em que uma diluição tem que ser preparada. A seguir, apresentaremos uma breve revisão.

Um procedimento laboratorial pode envolver a adição de uma substância em outra, para reduzir a concentração de uma das substâncias. Essa mistura é denominada diluição. Geralmente, a equipe laboratorial fica confusa com a terminologia associada a diluições e relações. O termo relação é mais geral e refere-se à quantidade de uma coisa em relação a uma quantidade de outra coisa sem mais implicações. Como o termo é utilizado no laboratório, a diluição é mais específica. Ela refere-se ao número de partes de uma substância no número total de partes de mistura que a contém. A questão é como a mistura foi feita ou como ela deve ser feita. A seguir, exemplos de relações seguidas por diluições:

Relações

1. A relação soro/soro fisiológico é de 1:9.
2. A relação soro fisiológico/soro é de 9:1.
3. A relação soro/volume total é de 1:10.

Observe que o símbolo da relação é dois pontos (:).

Diluições

1. Preparar uma diluição de 1 para 10 de soro em soro fisiológico.
2. Preparar uma diluição de 1 em 10 de soro em soro fisiológico.
3. Preparar uma diluição de 1/10 de soro com soro fisiológico.

Exemplo 4.12. Preparar uma diluição de 1 mL para 10 mL de uma amostra de soro.

Solução. Pipetar 1 mL de soro e adicionar 9mL de soro fisiológico para um volume total de 10 mL.

Uma aplicação clínica pode envolver a diluição de uma amostra de soro, porque o resultado das bilirrubinas excede o limite superior de linearidade. O técnico decide preparar uma diluição de 1 para 2 da amostra e examinar a amostra diluída. Para preparar a diluição, o técnico pipeta 100 µL de soro do paciente e adiciona 100 µL de água para um volume total de 200 µL. As bilirrubinas são dosadas e um analisador imprime um valor de 12 mg/dL. Antes de liberar o resultado das bilirrubinas ao paciente, o técnico deve multiplicar por 2 (fator de diluição) o valor fornecido pelo analisador e, a seguir, fornecer o laudo com um valor de 24 mg/dL.

Ácidos, álcalis e pH

Uma molécula de ácido produz íons hidrogênio (prótons) em soluções aquosas; um álcali os aceita. Na temperatura ambiente em água pura:

$[H^+] = [OH^-] = 1 \times 10^{-7}$ molar

Em todas as soluções aquosas, tanto ácidas quanto alcalinas:

$K_w = [H^+] \times [OH^-] = 10^{-14}$

Em uma solução ácida, $[H^+]$ é maior que 1.010^{-7}. Em uma solução alcalina, $[H^+]$ é inferior a 1.010^{-7}. pH é o expoente que deve ser aplicado a 10 para se obter o valor de $1/H^+$, isto é:

$pH = \log_{10} 1/H^+$

Quando o pH é	1	H^+ é	10^{-1}	e OH^- é	10^{-13}
	2		10^{-2}		10^{-12}
	4		10^{-4}		10^{-10}
	6		10^{-6}		10^{-8}
	10		10^{-10}		10^{-4}
	13		10^{-13}		10^{-1}

Uma solução de uma unidade de pH indica uma alteração de 10 vezes na concentração de H^+.

Solução tampão

A teoria dos tampões e sua preparação poderão ser encontradas no Apêndice 1. Para os tampões mais utilizados, as quantidades de sais de ácidos e bases foram predeterminadas e podem ser encontradas em textos de referência como, por exemplo, Bates (1973), que contém uma excelente análise dos aspectos teóricos dos tampões e informações detalhadas sobre como preparar várias soluções tampões.

Referências bibliográficas

ASTM: E288-03 Standard Specification for Laboratory Glass Volumetric Flasks. ASTM International. Online. Available: http://www.astm.org.

ASTM: E542-01 Standard Practice for Calibration of Laboratory Volumetric Apparatus. ASTM International. Online. Available: http://www.astm.org.

ASTM: E694-99 Standard Specification for Laboratory Glass Volumetric Apparatus. ASTM International. Online. Available: http://www.astm.org.

Para consultar os padrões de referência ASTM, visite o site da ASTM ou entre em contato com o serviço de atendimento ao usuário da ASTM pelo e-mail service@astm.org. Para obter informações sobre o Annual Book of ASTM Standards, consulte a página Document Summary dos padrões no site da ASTM.

Bartle KD: Introduction to the theory of chromatographic separations with reference to gas chromatography. *In* Baugh PJ (ed): Gas Chromatography; A Practical Approach, 1st ed. New York, Oxford University Press, 1993, pp 9–10.

Bates RG: Determination of pH – Theory and Practice, 2nd ed. New York, John Wiley and Sons, 1973.

Bender GT: Principles of Chemical Instrumentation. Philadelphia, WB Saunders Company, 1987.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (Wayne, PA 19087-1898).

Fornece diretrizes abrangentes e procedimentos para métodos laboratoriais básicos.

Gauldie J: Principles and clinical applications of nephelometry. *In* Kaplan LA, Pesce AJ (eds): Nonisotopic Alternatives to Radioimmunoassays. New York, Marcel Dekker Inc, 1981, pp 289–291.

Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations (JCAHO): Eliminating Mercury in Hospitals. Environmental Best Practices for Health Care Facilities. US Environmental Protection Agency, November 2002.

Karasek FW, Clement RE: Basic Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Principles and Techniques. Amsterdam, Elsevier, 1988.

Love JE, Ward KM: Electrophoretic instrumentation systems. *In* Ward KM, Lehmann CA, Leiken AM (eds): Clinical Laboratory Instrumentation and Automation: Principles, Applications, and Selection. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994, pp 173–174.

NCCLS: Determining Performance of Volumetric Equipment, NCCLS Proposed Standard I8-P, Villanova, PA, NCCLS, 1984.

NCCLS: Temperature Calibration of Water Baths, Instruments, and Temperature Sensors, 2nd ed. NCCLS Approved Standard I2-A2, Villanova, PA, NCCLS, 1990.

NCCLS: Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, 3rd ed. NCCLS Approved Guideline C3-A3, Villanova, PA, NCCLS, 1997.

Ravindranath B: Principles and Practice of Chromatography. Chichester, England, Ellis Horwood, 1989, pp 89–127.

Rayleigh, Lord B: On waves propagated along the plane surface of an elastic solid. Proc London Math Soc 1885; xviv:4–11.

Rubinson KA, Rubinson JF. Contemporary Instrumental Analysis. NJ, Prentice Hall, 2000.

Schoeff LE, Williams RH: Principles of Laboratory Instruments. St Louis, Mosby, 1993.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of Instrumental Analysis, 5th ed. Philadelphia, Harcourt Brace & Company, 1998.

Fornece uma explicação abrangente sobre princípios de instrumentação para quase todos os tipos de equipamentos utilizados em laboratório clínico.

Strouse GF, Furukawa GT, Mangum BW, et al: NIST Standard Reference Materials for Use as Thermometric Fixed Points. Gaithersburg, MD, NIST, 1997.

Tipler A: Gas chromatography instrumentation, operation, and experimental considerations. *In* Baugh PJ (ed): Gas Chromatography; A Practical Approach, 1st ed. New York, Oxford University Press, 1993, pp 63–67.

Willard HH, Merritt LL, Dean JA, et al: Instrumental Methods of Analysis. Belmont, CA, Wadsworth, Inc, 1988.

CAPÍTULO 5

Análise: automação do laboratório clínico

Robert L. Sunheimer MS MT(ASCP)SC SLS, Gregory Threatte MD

Introdução 65
Análise automatizada 66
Estágio pré-analítico 66
Abordagens automatizadas do processamento de amostras 67
Estágio analítico 67
Introdução de amostra 67
Reagentes 69
Agitação 69
Incubação 69
Detecção 70
Outras características exclusivas localizadas em novos instrumentos automatizados 70
Estágio pós-analítico 70
Tipos de sistemas automatizados disponíveis para laboratórios 71
Automação laboratorial total (ALT) 71
Sistemas modulares integrados 71
Configurações de módulos automatizados 71
Consolidação da estação de trabalho 71
Células de trabalho 71
Sistemas totalmente integrados 72
Outras melhorias dos sistemas integrados automatizados 73
Perspectivas futuras 73
Referências bibliográficas 73

PONTOS-CHAVE

- Os testes laboratoriais sofreram alterações revolucionárias na última década. Atualmente, todas as testagens bioquímicas e hematológicas de rotina são automatizadas.
- Isso inclui o processamento de amostras. Todos os tubos apresentam códigos de barra. Eles podem ser colocados diretamente em autoanalisadores, que não apenas leem quais exames devem ser realizados, como podem analisar diretamente as amostras dos tubos e enviar os resultados para o sistema computadorizado do laboratório, o qual é ligado diretamente ao sistema de informação hospitalar (SIH).
- Os três estágios da realização de testes laboratoriais são: pré-analítico, analítico e pós-analítico. Vários exemplos de como esses estágios foram automatizados serão apresentados neste capítulo.
- Os fabricantes de instrumentos tentam projetar sistemas que eliminem a escassez de pessoal, ofereçam um ambiente de trabalho mais seguro para os técnicos e forneçam os menus de exames e os resultados solicitados pelos médicos.

Introdução

A automação nos laboratórios clínicos tornou-se disponível desde a metade da década de 1950, com a introdução do Technicon AutoAnalyzer para uso laboratorial. O principal estímulo para a automação foi a necessidade de criar sistemas automatizados capazes de reduzir ou eliminar as muitas tarefas manuais necessárias para a realização de procedimentos analíticos. No início, o desenvolvimento contínuo levou à consolidação da maioria das dosagens bioquímicas de alto volume em plataformas únicas e, recentemente, à sistematização bioquímica e de imunoensaio em plataformas únicas. Ao eliminar etapas manuais, a oportunidade de reduzir o erro aumentou por causa da diminuição do potencial de erro devido à fadiga ou à identificação errônea de amostras.

Na década de 1960, em paralelo a essas etapas de automação bioquímica, ocorreu um crescimento notável nos laboratórios de hematologia com a introdução de instrumentos eletrônicos automatizados de contagem celular, que modificaram drasticamente mensurações previamente realizadas com pipetas, hemocitômetros e microscópios. Após melhorar inicialmente a acurácia e a precisão na medição de eritrócitos, o desenvolvimento e as adaptações subsequentes permitiram a automação da contagem diferencial de leucócitos e a classificação de neoplasias hematopoéticas mais baseadas na citometria de fluxo.

A década de 1970 presenciou a introdução e a implantação de sistemas de informação laboratorial, automatizando o processo de fluxo de informação e eliminando a taxa de erro de transcrição de 5% esperada quando os resultados laboratoriais eram transcritos manualmente em vários formatos de registro médico. A década de 1990 testemunhou a introdução de sistemas de transporte interlaboratorial, incluindo o transporte de amostras – um transferidor que desloca amostras entre instrumentos e estações de processamento (p. ex., centrifugação, destampamento/tampamento e armazenamento), que conduziu ao conceito de automação laboratorial total.

No momento da última publicação deste livro, a indústria americana de automação laboratorial incluiu três companhias independentes de automação (LAB-InterLink Inc., Labotix Automation Inc. e AutoMed Inc.). Desde então, a AutoMed fornece suporte principalmente para a sua mais importante companhia, a MDS Inc., que controla mais de 30% do mercado laboratorial canadense. A LAB-InterLink adquiriu primeiramente a Labotix e, a seguir, declarou falência, deixando muitos clientes com sistemas caros sem suporte. Como resultado, os administradores hospitalares ficaram cada vez mais cautelosos, tornando mais difícil justificar a aquisição de novos sistemas.

Os vendedores de sistemas do mercado norte-americano estão bem alinhados com os principais fabricantes de instrumentos de diagnóstico *in vitro* ou fornecem produtos modulares, que mecanizam apenas uma porção da solução da automação. Apesar dessa falta de vendedores independentes, a necessidade de reduzir o tempo entre a coleta e o resultado, subtrair a taxa de erro e aplacar a dependência do trabalho manual torna a necessidade de automação mais forte do que nunca.

De modo geral, a extensão e a magnitude das necessidades de automação tomaram uma direção similar à de todas as outras tecnologias. Uma lista de fatores utilizada para impelir a automação é apresentada na Tabela 5.1. Neste capítulo, várias justificativas para a automação serão analisadas no contexto de como ela mudou ao longo do tempo para tornar-se o que é atualmente. Vários sistemas analíticos serão selecionados como exemplos de como os fabricantes responderam às demandas laboratoriais. A causa e o impacto das alterações nos três estágios da realização de testes laboratoriais serão apresentados. As demandas dos laboratórios são ritmadas, em parte, pela necessidade de médicos e pacientes. Isso proveu a maioria das justificativas que forçaram as alterações vistas atualmente na automação laboratorial.

Tabela 5.1 Fatores que servem para direcionar a automação laboratorial

Demandas do tempo entre a coleta e o resultado
Integridade da amostra
Escassez de pessoal
Fatores econômicos
Menos manutenção
Menos calibração
Menos tempo de inatividade
Tempo de inicialização mais rápido
Tempo de atividade ininterrupto
Capacidade de processamento
Tecnologia do computador e do *software*
Amostragem do tubo principal
Aumento do número de diferentes analitos em um sistema
Aumento do número de diferentes métodos em um sistema
Redução de erros laboratoriais
Número de amostras
Tipo de líquidos
Segurança
Questões ambientais (i. e., riscos biológicos)

Análise automatizada

A mensuração de amostras usando instrumentação automatizada sofreu um processo evolutivo desde o *Technicon AutoAnalyzer*. Ele começou com um aparelho de um canal, utilizando a análise de fluxo contínuo que mensurava um analito em um lote de amostras, isto é, uma amostra, um teste. Essas amostras eram analisadas de forma sequencial, ou seja, uma após a outra. A velocidade de processamento das amostras era de, aproximadamente, 40 a 60 por hora. A Technicon continuou a desenvolver seus sistemas, evoluindo para instrumentos de múltiplos canais (p. ex., SMAC II) com alta taxa de processamento (até 150 amostras por hora) com a produção de até 3.750 exames por hora, dependendo da configuração do exame. A grande desvantagem desse tipo de configuração de instrumento é o fato de que todos os exames eram realizados de maneira paralela. Isso resultava na mensuração de cada analito configurado no sistema de cada amostra. A inflexibilidade dos testes levou ao desenvolvimento de analisadores que permitiam testes "distintos", isto é, realizavam apenas os exames solicitados em uma amostra.

A geração seguinte incluiu as configurações de analisadores centrífugos e modulares. Analisadores centrífugos eram sistemas do tipo de lote e de testes distintos. Uma limitação importante na época era a taxa de processamento. Como os analisadores eram configurados para mensurar um analito por vez, a única maneira de melhorar o processamento era adquirir sistemas múltiplos, de modo que vários exames poderiam ser realizados simultaneamente, dependendo de quantos sistemas o laboratório havia adquirido.

A solução dos inconvenientes associados à análise centrífuga era elaborar um sistema modular que pudesse ser configurado para mensurar vários analitos em múltiplas amostras e para o processo ser controlado por computador e não por humanos. Esta é a essência dos *testes de acesso aleatório*. Instrumentos modulares permitem que o usuário adicione unidades (p. ex. módulos de ISE – *íon selective electrode* – e/ou de imunoensaio).

O resultado final da combinação do desenho modular com testes de acesso aleatório foi o aumento da taxa de processamento de amostras para centenas por hora e da taxa de processamento de exames para milhares por hora.

Estágio pré-analítico

Os três estágios da realização de testes laboratoriais são: pré-analítico, analítico e pós-analítico. A melhoria da eficiência e da produtividade durante o estágio pré-analítico dos testes laboratoriais não foi, inicialmente, o principal foco da equipe laboratorial. Da mesma forma, o estágio pós-analítico recebeu pouca atenção. Essa falta de preocupação com melhorias nesses dois estágios deveu-se, em parte, à falta de tecnologias, que foram desenvolvidas posteriormente e serviram para alterar o escopo de cada um desses estágios. Além disso, atualmente, muitas justificativas utilizadas para a automação não eram consideradas prioridades nos primórdios dos laboratórios clínicos.

O estágio pré-analítico preocupa-se, principalmente, com o processamento da amostra. Por décadas, amostras coletadas em um serviço eram enviadas ao laboratório, geralmente, por coletores de sangue. Quando colhidas fora do laboratório, o serviço de mensageiro era frequentemente utilizado. Esse serviço é um processo de carga, que exige o agendamento de um determinado ponto de retirada. Esses indivíduos representavam a primeira ligação entre o paciente e o laboratório, além de ser uma fonte de problemas que resultaram, posteriormente, em algumas alterações e inovações notáveis no processo de testes laboratoriais como um todo. Um exemplo de solução inicial para a substituição de humanos como transportadores de amostra foi a introdução dos tubos pneumáticos.

Sistemas de liberação com tubos pneumáticos foram instalados para permitir a liberação de amostras, ponto a ponto, ao laboratório e ofereciam várias vantagens quando comparados ao transporte humano. Os tubos eram enviados muito rapidamente ao laboratório e guardados em um transportador revestido por espuma, para reduzir o risco de quebra. Sistemas de tubos pneumáticos são projetados para prevenir a hemólise e evitar elevações importantes de forças *g* durante a aceleração e a desaceleração.

Os veículos elétricos de trilho podem transportar um número maior de amostras que os tubos pneumáticos. Os trilhos elétricos exigem uma estação de carga e descarga de amostras, o que pode representar um problema em locais com espaço limitado. Como os serviços de mensageiro, os trilhos elétricos permitem o agrupamento de amostras.

Posteriormente, robôs ou robôs móveis de muitos modelos foram utilizados pelos laboratórios para o transporte de amostras para dentro e fora do serviço. Usualmente, amostras são agrupadas para a retirada, e foram notificados atrasos nessa etapa.

Sistemas de manipulação mecânica ou de trilhos são utilizados em alguns serviços laboratoriais, especialmente naqueles que recebem um número muito grande de amostras. Eles são projetados para transportar amostras de forma horizontal e vertical (para outro andar).

Após a chegada das amostras à estação de processamento do laboratório, várias tarefas devem ser realizadas. Essas tarefas estão listadas na Tabela 5.2. Várias novas abordagens foram utilizadas e culminaram nos denominados "módulos pré-analíticos". Esses módulos foram disponibilizados por vários fabricantes de instrumentos. Houve várias tentativas de processar amostras com o mínimo envolvimento humano, antes do desenvolvimento dos módulos pré-analíticos. Muitos desses dispositivos ainda são utilizados.

A identificação manual de amostras exige uma quantidade substancial de tempo e provou ser uma grande fonte de erros laboratoriais. A identificação ultrapassou o tubo de amostra e incluiu tubos de drenagem, cálices de amostra e de diluição e recipientes de envio. O uso de rótulos com código de barra impresso facilitou tremendamente esse processo. Posteriormente, os computadores tornaram-se mais sofisticados e a comunicação entre eles melhorou. O sistema de rotulação com código de barra aperfeiçoou-se e o tempo de processamento reduziu os erros pré-analíticos.

A classificação ou a separação manual de amostras era necessária por causa dos diversos tipos de testes realizados. Tubos de amostras, de todos tipos e tamanhos, deveriam ser recebidos na área de processamento de um laboratório clínico e o técnico tinha de classificá-los

Tabela 5.2 Exemplos de tarefas de processamento de amostra

Identificação/etiquetagem
Classificação
Centrifugação
Abertura de amostra
Aliquotagem
Fechamento/armazenamento/recuperação de amostra

pela cor da tampa, pelo tamanho, pelos exames solicitados, pelos instrumentos necessários e pela destinação.

Nos primórdios dos laboratórios clínicos, cada tubo com tampa vermelha era centrifugado duas vezes para que a remoção do coágulo fosse ideal. Essa etapa exigia o destampamento manual dos tubos de amostras. A invenção do tubo separador de soro eliminou a necessidade dessa técnica e, nesse estágio, o destampamento deixou de ser necessário. Uma amostra teria de ser destampada para processamento de alíquotas ou drenagem em cálices, ou para ser introduzida no analisador. O destampamento de tubos apresentava riscos à saúde do técnico via dispersão de aerossol dos tubos e contato direto com o sangue.

A centrifugação do sangue em tubos de coleta exigia que o técnico carregasse manualmente transportadores de tubos e colocasse-os na centrífuga. Em seguida, os tubos seriam removidos e novamente classificados, alíquotas seriam processadas e amostras distribuídas para os seus destinos ou suas áreas-alvo. Todo esse processo era cheio de riscos à segurança, favorecia possíveis erros e, por vezes, aumentava o tempo de processamento da amostra.

Muitas amostras exigiam a divisão em alíquotas, também conhecida como divisão das amostras. As alíquotas eram utilizadas pelos operadores de instrumento e enviadas a outras seções do laboratório ou para laboratórios de referência e utilizadas em diluições. Como outras etapas do processamento manual, a aliquotagem das amostras de sangue era uma fonte potencial de riscos de erros e de aumento do tempo de processamento para a equipe laboratorial.

Quando as amostras não eram mais necessárias para testes, eram armazenadas em refrigerador ou freezer. Todas elas eram guardadas de modo organizado, para o caso de serem novamente necessárias para a repetição de exames. O armazenamento manual e a recuperação de amostras criavam grandes problemas para alguns laboratórios. Frequentemente, amostras eram perdidas, não armazenadas adequadamente ou tornavam-se difíceis de serem encontradas.

Abordagens automatizadas do processamento de amostras

Dois objetivos para a automatização do processamento de amostras são: (1) minimizar etapas, sem acrescentar valor ao processo laboratorial (p. ex., classificação de tubos) e (2) aumentar o tempo disponível das etapas que agreguem valor às tarefas executadas pelos técnicos, o que faz diferença na qualidade do resultado do exame e, em última instância, no diagnóstico.

As vantagens da automação dos testes laboratoriais incluem:

- aumento da qualidade das etapas pré-analíticas;
- redução da taxa de erro;
- redução da exposição do operador a material biológico potencialmente perigoso;
- eliminação de lesões por esforço repetitivo.

Há vários sistemas de processamento de amostra inicial disponíveis para preencher todas as lacunas associadas ao processamento manual. Os sistemas podem ser integrados ao processamento de amostra ou modulares. Alguns sistemas modulares são projetados como processadores iniciais autossuficientes.

Sistemas integrados de processamento de amostras permitem ao usuário realizar, parcial ou totalmente, as tarefas de manipulação do material. Esses sistemas processam apenas alguns tipos de amostras e seus recipientes. Essa inflexibilidade em relação aos recipientes de amostras fez com que muitos laboratórios, especialmente os hospitalares, adquirissem sistemas modulares de processamento. Cada módulo possui seu próprio computador interno, que é ligado a um sistema controlador máster. Além disso, sistemas modulares podem acomodar diferentes tipos de amostras (p. ex., sangue total, soro e plasma) com seus respectivos recipientes.

Qualquer que seja a configuração, cada sistema pré-analítico automatizado tenta fornecer ao usuário algumas ou todas as tarefas necessárias para preparar amostras para testes. Essas tarefas incluem:

- pré-classificação;
- centrifugação;
- checagem de volume;
- detecção de coágulo;
- destampamento;
- rotulação secundária de tubos;
- aliquotagem;
- classificação do destino em estantes do analisador.

O sistema autossuficiente automatiza uma porção do processamento inicial. Sistemas isolados mecanizam a classificação, o destampamento e as funções de alíquota do processamento de amostra inicial. Nesse modelo, a centrífuga não foi incluída. Quando houver necessidade de soro ou plasma, a amostra deverá ser levada à centrífuga pelo técnico. Exemplos de unidades automatizadas autossuficientes são o Roche Diagnostic PSD1, que destampa e classifica, e o Roche Diagnostic VSII, que faz aliquotagem e classifica (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Essas unidades são classificadas como *automação dirigida à tarefa*, um conceito que é caracterizado pela automação de última geração em etapas pré e pós-analíticas. Amostras são processadas por essas unidades e, a seguir, transportadas manualmente para suas respectivas estações de trabalho ou alvos. O PSD1 e o VSII foram projetados para aumentar a qualidade das etapas pré-analíticas, reduzir a exposição do operador a material biológico perigoso e eliminar lesões por esforço repetitivo.

O arquivamento e a recuperação de amostras de forma automatizada também estão disponíveis nos modelos autossuficientes. Sistemas de arquivamento de amostras automatizados utilizam códigos de barra, que são escaneados e colocados em posições e estantes numeradas. A recuperação de amostras é iniciada com a alimentação do número de acesso do paciente ou do prontuário médico na base de dados do sistema de arquivo. O número da estante e a posição ocupada são determinados e mostrados ao usuário. Alguns sistemas incluem um refrigerador para o armazenamento de amostras e o descarte automático em datas predeterminadas.

A Olympus (Olympus American Inc., Diagnostic System Group, Melville, NY) projetou um sistema de manipulação pré e pós-analítico totalmente automatizado, que pode servir como uma unidade autossuficiente ou modular a ser utilizada em configurações que sejam adequadas aos padrões de volume e fluxo de trabalho do laboratório. O OLA 2500 Lab Automation System (Fig. 5.1) apresenta várias características exclusivas. Elas incluem:

- uma estação com câmera que reconhece tipos e tamanhos de tubos e pode ser utilizada para o reconhecimento do material das amostras e também para o cálculo do volume;
- a unidade de aliquotagem utiliza pontas descartáveis para eliminar qualquer *carry-over* (contaminação) indesejado. Ela também pode gerar até seis tubos secundários a partir de um original;
- o arquivamento pode ser realizado paralelamente à classificação ou como um lote.

Sistemas modulares são projetados para automatizar o processo inteiro. O sistema modular automatizado destampa amostras, prepara alíquotas, classifica amostras mãe e filhas e transporta-as por meio de um sistema de trilhos. Um detector de amostra, ou transdutor, detecta níveis líquidos, géis separadores e amostras pequenas. O **MODULAR** PRE-ANALYTICS da Roche (Fig. 5.2) combina muitas etapas pré-analíticas, as quais são coordenadas utilizando um componente de *gerenciamento inteligente do processo*.

Estágio analítico

O estágio analítico dos testes evoluiu para um nível muito sofisticado, em razão do progresso tecnológico, das melhorias nas áreas tecnológicas e de informática e como resultado das causas de automação listadas anteriormente. As tarefas do estágio analítico dos testes laboratoriais estão listadas na Tabela 5.3.

Introdução de amostra

A amostragem automática pode ser conseguida por intermédio do uso de diferentes mecanismos físicos. Bombas peristálticas e pipetas de deslocamento líquido positivo são dois exemplos. As bombas peristálticas são um exemplo de tecnologia mais antiga, mas que ainda é utilizada em alguns instrumentos (p. ex., dosagem de eletrólitos). As pipetas de deslocamento líquido positivo, geralmente, são pipetas

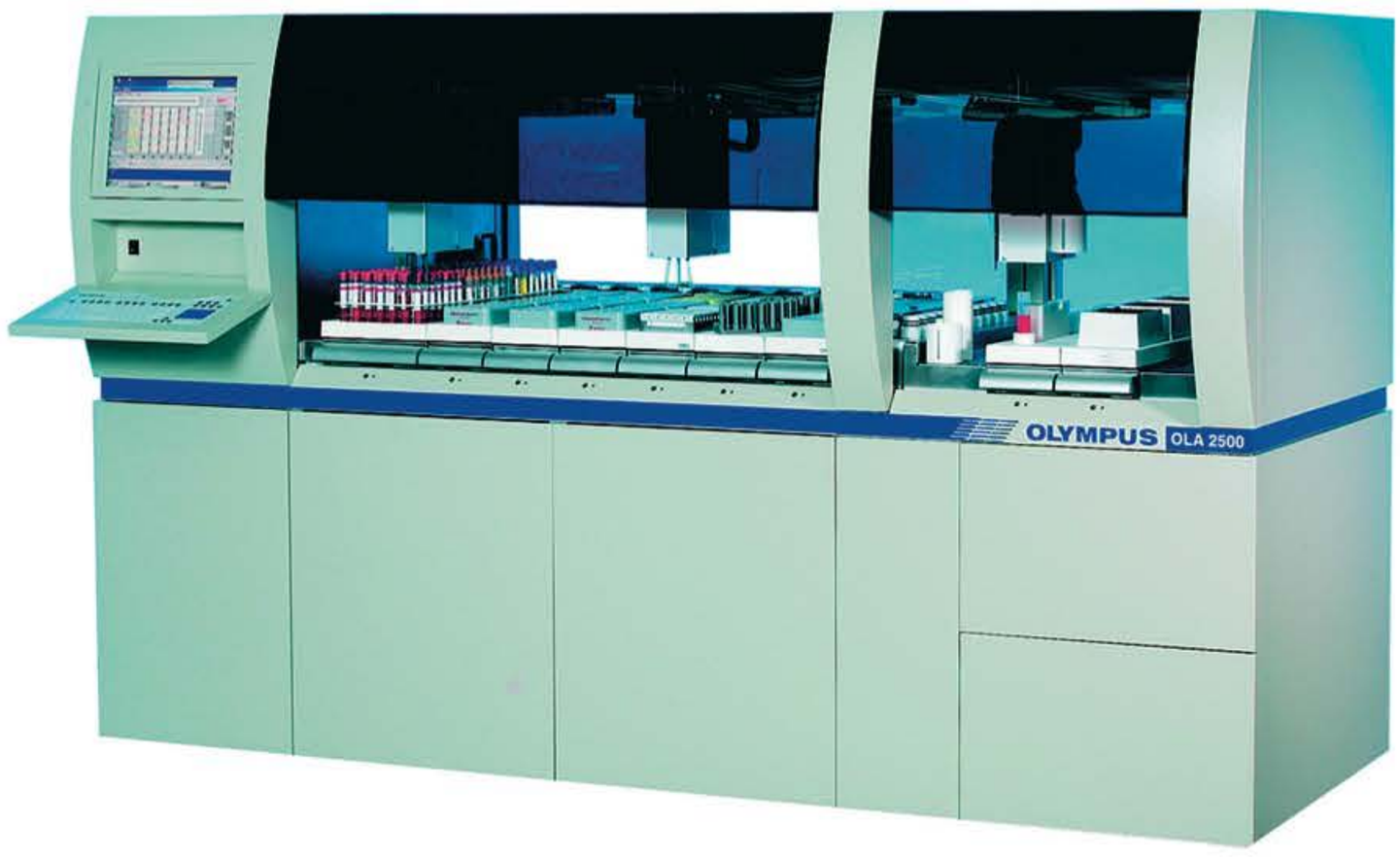


Figura 5.1 Olympus OLA 2500 Lab Automation System. Este sistema consiste em um destampador, um classificador, um arquivador e um fracionador com capacidade de processamento de 650 tubos por hora. (Com autorização da Olympus.)

Figura 5.2 Roche **MODULAR** PRE-ANALYTICS com "gerenciamento inteligente do processo" e módulos que produzem etiquetas com código de barra, centrifugam, destampam, fracionam, tampam e classificam. (Com autorização da Roche.)

simples, que transferem amostras de cálices ou tubos para o processo analítico seguinte. A maioria delas funciona: (1) liberando amostras aspiradas no recipiente de reação ou (2) expulsando amostras juntamente com o diluente.

O movimento da amostra do cálice ou do tubo de amostra até o seu destino por intermédio de uma sonda é conseguido de várias maneiras. Alguns analisadores utilizam um braço robótico que se movimenta para trás e para a frente, pegando uma amostra e depositando-a em um reservatório de reação ou sobre uma superfície de um coxim poroso. Outras estruturas podem utilizar um sistema de engrenagem que leva a sonda de amostra de um ponto a outro.

Na maioria dos analisadores, amostras são pipetadas utilizando-se uma sonda fina de aço inoxidável. A sonda pode ser necessária para perfurar uma tampa de borracha ou passar diretamente para o interior do tubo de ensaio ou do copo. Uma determinada quantidade de amostra é aspirada para o interior da sonda e esta é movida em direção de um recipiente adequado para liberação. Uma fonte potencial de problemas com esse tipo de sonda de amostra é a formação de coágulo, que subsequentemente se fixa ao aparelho. Esses coágulos podem obstruir a sonda, tornando o uso contínuo impossível. Além disso, o coágulo pode ocupar o volume da amostra e, consequentemente, causar um erro na mensuração. Por causa da natureza pegajosa do soro ou do plasma, o coágulo pode aderir à sonda de amostra e quando esta se movimenta para o destino seguinte, o coágulo inteiro e o receptáculo podem mover-se junto. Isso possibilita um mau funcionamento do instrumento e/ou um alinhamento inadequado da sonda de amostra. Vários tipos de sonda de amostra possuem um detector de coágulo e rejeitam uma amostra coagulada. Outra característica associada à amostragem é a capacidade da sonda detectar a presença de líquido. Esses detectores de nível líquido detectam a presença de uma amostra pequena e não permitem que o analisador continue a processá-la. A pipeta e o detector de nível líquido percorrem uma distância especificada no recipiente de amostra para determinar se existe ou não presença de líquido.

Outro problema associado às sondas de pipeta reutilizáveis é o *carry-over*. O *carry-over* é a contaminação de uma amostra pela amostra anterior. Essa contaminação pode causar variações graves nos resultados dos exames subsequentes. Várias modificações de instrumentos foram utilizadas para reduzir o *carry-over*. Um método utilizado é aspirar uma solução de lavagem entre cada pipetagem. Outra técnica utilizada é o fluxo retrógrado da sonda utilizando uma solução de lavagem. A solução de lavagem flui pela sonda em direção oposta à da aspiração, para dentro de um recipiente de refugo. Essa técnica tende também a minimizar o risco de empurrar ainda mais um pequeno coágulo para o interior do sistema.

Tabela 5.3 Tarefas incluídas no estágio analítico dos testes laboratorial

Introdução de amostra e transporte para a cubeta ou o copo de diluição
Adição de reagente
Mistura da amostra e do reagente
Incubação
Detecção
Cálculo
Leitura e transmissão do resultado

Muitos analisadores de amostras utilizam pontas de pipeta descartáveis de plástico para transferir amostras. Elas apresentam a vantagem de eliminar o *carry-over* associado à contaminação em uma sonda e de uma amostra a outra. Um inconveniente do uso de pontas descartáveis é o maior custo associado à realização de exames.

Reagentes

Os reagentes utilizados em analisadores automatizados exigem a atenção a várias preocupações que incluem:

- manipulação, preparação e armazenamento;
- proporção;
- distribuição.

A maioria dos laboratórios utiliza reagentes não embalados, prontos para uso e com pouca ou nenhuma preparação. Quando o reagente é liofilizado, a maioria dos analisadores distribui o diluente adequado para dissolver os reagentes em pó. Analisadores químicos, que utilizam reagentes de exame unitários (i. e., nos quais há reagente suficiente para a realização de um único exame), podem exigir algumas preparações. Para a análise em lâmina seca, em que uma fina película é impregnada com o reagente adequado, a preparação consiste em umidificá-lo com água, tampão ou amostra. Outro tipo de reagente de exame unitário é um recipiente ou um tubo de ensaio, que contém material líquido ou em pó pré-mensurado, ao qual se adiciona água, tampão ou amostra.

Reagentes em apresentação líquida ou seca são mantidos no compartimento de reagentes e um inventário completo é conservado em tempo real no computador. A maioria das metodologias utilizadas no laboratório utiliza apenas um reagente, apesar de existir vários que requerem mais de um. Quando o reagente começa a ser esgotado, o computador sinaliza ao operador que o recipiente do reagente está vazio e que um novo deve ser adicionado. A magnitude do inventário de reagentes que devem estar disponíveis no analisador depende do volume de exames realizados para um determinado analito. Compartimentos de armazenamento de reagentes *on board* são refrigerados para que se mantenha a estabilidade do produto.

A identificação de reagentes e os processos de inventário são realizados com o uso de etiquetas com código de barra. O rótulo com código de barra também pode conter informações adicionais como, por exemplo, data de expiração, número de lote e de exames que o conteúdo do recipiente pode realizar. Alguns analisadores podem acoplar um detector de nível líquido na sonda do reagente, o qual alertará o operador se existe uma quantidade suficiente de reagente para completar os exames.

Para exames de imunoensaio, o rótulo do reagente com código de barra contém informações importantes sobre calibradores. Os exemplos de informações armazenadas incluem concentração dos calibradores, respostas esperadas do detector, algoritmos da curva de calibração e tolerâncias de aceitabilidade da calibração. As informações frequentemente são designadas como *calibração máster*.

Uma categoria de classificação importante para todos os analisadores automatizados baseia-se nos reagentes. Analisadores são classificados como sistemas de reagentes *abertos* ou *fechados*. Geralmente, a distinção é uma determinante fundamental para o laboratório selecionar um analisador ou não. Um sistema de reagentes *aberto* é descrito como uma estrutura organizada em que podem ser utilizados reagentes que não são os fornecidos pelo fabricante do instrumento. Além disso, em um sistema de reagentes *aberto*, o operador pode alterar os parâmetros necessários para processar determinado exame. Esses sistemas conferem uma maior flexibilidade aos usuários e adaptam-se facilmente a novos métodos e analitos. Um sistema de reagentes *fechado* é descrito como uma estrutura em que o operador pode utilizar apenas os reagentes do fabricante. Usualmente, reagentes para sistemas de reagentes *fechados* são mais caros, mas esses sistemas podem economizar custos, porque a reconstituição ou a preparação utilizada não consomem tempo do técnico. Além disso, a possibilidade de aumento da imprecisão associada à reconstituição de reagentes em um sistema *aberto* não ocorre no *fechado*. Um problema associado ao sistema fechado é que pode não ser possível introduzir novos exames desejados.

A proporção correta de reagente(s) e de amostra deve ser constante para se obter resultados precisos e acurados. Para a realização de exame unitário, os reagentes já são repartidos em quantidades adequadas e, consequentemente, somente a amostra deve ser adicionada. Métodos que exigem a adição de reagentes não embalados podem aumentar a imprecisão, pois quando esses reagentes são utilizados, a proporção é obtida por meio de adição volumétrica.

A liberação de reagentes não embalados exige dispositivos de distribuição volumétrica automatizados. Para analisadores de acesso aleatório, dispositivos de seringa ou de *overflow* volumétrico são utilizados. Esses dispositivos tornam proporcionais reagentes e amostra em um tubo de ensaio ou em outro tipo de recipiente.

Outro mecanismo utilizado para fazer a proporção entre reagentes e amostras é a técnica de fluxo contínuo. A amostra e os reagentes são fracionados por suas taxas de fluxo relativas. Dispositivos que utilizam o fluxo contínuo incluem as bombas peristálticas. Muitos instrumentos utilizam válvulas eletrônicas para controlar o tempo de fluxo dos reagentes. A taxa de fluxo é controlada pela pressão de ar aplicada ao recipiente de reagente e pela resistência de fluxo no tubo conectado ao reservatório de reação.

Reagentes líquidos são aspirados, liberados e distribuídos em câmaras de mistura ou reservatórios de reação por bombas ou seringas de deslocamento positivo. Essas bombas são conectadas aos recipientes de reagentes utilizando tubos plásticos. Sob o comando do computador, cada bomba retira uma determinada quantidade de reagente ou de diluente do recipiente e transporta-o pelo tubo até o seu destino, no qual ele é liberado.

Dispositivos de seringa são amplamente utilizados em sistemas automatizados para a liberação de reagente e amostra. A maioria dos dispositivos é de deslocamento positivo e o volume do reagente liberado é controlado por computador. Quando a seringa é utilizada para mais de um reagente, o enxágue adequado entre os usos é essencial para reduzir o *carry-over* do reagente.

Agitação

Existem muitos exemplos de dispositivos únicos de agitação e de técnicas utilizados em sistemas automatizados. Eles incluem:

- agitação magnética;
- pás rotatórias;
- distribuição forçada;
- uso de energia ultrassônica;
- deslocamento lateral vigoroso.

Analisadores de lâmina seca não exigem a agitação de amostra e reagentes. É permitido que a amostra flua pelas camadas que contêm reagentes.

Incubação

O aquecimento de componentes ou soluções em analisadores automatizados é realizado por meio de elevação da temperatura de ar, água ou metal. Esse processo deve ser constante e acurado. Termopares e termistores eletrônicos são utilizados para monitorar e manter as temperaturas exigidas nos analisadores. Banhos de água circulante são utilizados em vários instrumentos como mecanismos de aquecimento. Por essa razão, esses analisadores requerem uma purificação de água e o sistema de liberação, geralmente externo ao analisador, representa um custo adicional que deve ser levado em consideração. Em alguns analisadores, é permitido que as cubetas ou os reservatórios de reação incubem em uma câmara contendo ar circulante. Blocos de metal aquecidos são dispositivos amplamente utilizados na incubação de soluções em cubetas, tubos de ensaio ou bolsas plásticas. O tempo de cada período de incubação é monitorado pelo sistema computadorizado do instrumento e representa um processo extremamente complexo, considerando-se o processamento desses sistemas.

Duas novas técnicas de incubação de misturas de reação foram desenvolvidas e são usadas nos analisadores químicos automatizados atuais. A Bayer Diagnostics (Tarrytown, NY) utiliza um trajeto maior até a cubeta e um banho de incubação de óleo e fluorocarbono para maximizar a acurácia do resultado, aumentando os valores da absorbância e utilizando a tecnologia de microvolume para amostras e reagentes. Essa característica é encontrada nos sistemas de bioquímica modelo ADVIA.

Beckman Coulter utiliza um módulo termelétrico Peltier em forma de anel para manter a temperatura constante durante a análise. Módulos de Peltier são pequenos dispositivos sólidos que funcionam como bombas

de calor. O anel térmico Peltier consiste em 125 cubetas de vidro de quartzo e é feito de cobre. Cada cubeta é circundada por cobre em três lados. A temperatura é mantida pelo uso de elementos de aquecimento e detecção em contato físico com o núcleo de cobre cheio de Freon 134A e é monitorada pelo conjunto de *placas controladoras de reação ao aquecedor*, montado na manivela da roda. A informação sobre a calibração é armazenada em dois circuitos integrados de memória apenas de leitura programável e possibilita apagar eletricamente (EPPROM, *electrically erasable programmable read-only memory*) a placa *controladora de reação ao aquecedor* e a *placa do aquecedor/detector*.

Detecção

A espectroscopia de absorção tem sido o principal meio de mensuração em analisadores automatizados para medir uma ampla variedade de compostos. A fotometria de reflectância foi adaptada para a análise de lâmina seca e tem sido utilizada em laboratórios químicos há décadas. Compostos fluorescentes (p. ex., fluorosceína) têm sido utilizados como geradores de sinal para mensuração de drogas, hormônios e vitaminas em vários analisadores de imunoensaio. Na última década, compostos quimioluminescentes (p. ex., acridina) substituíram os fluorescentes por causa do aumento de sensibilidade. Métodos eletroquimioluminescentes também foram incorporados em sistemas automatizados. Dosagens automatizadas de eletrólitos são realizadas utilizando eletrodos íon-seletivos. Todos esses meios de detecção serão discutidos em outras partes deste livro. Nesta seção, nós centraremos a atenção nas novas técnicas de dosagem de compostos com analisadores automatizados.

As novas técnicas de dosagem incluem não apenas a adição de novos princípios de mensuração, mas também dois ou mais detectores exclusivos em um sistema analítico. A maioria dos analisadores químicos integrados comercializados atualmente incorpora várias plataformas de mensuração. Cada plataforma requer um detector distinto. O Roche COBAS Integra 800 incorpora fotômetro, ISE, óptica FPIA (fluorescência polarizada) e óptica turbidimétrica.

O Beckman Coulter SYNCHRON LX Clinical System inclui luminômetro, fotômetro, detectores eletroquímicos e detector de infravermelho próximo (Fig. 5.3). A detecção de infravermelho é utilizada para imunoensaio de partícula de infravermelho próximo (NIPIA, *near infrared particle immunoassay*), método para mensurar a proteína C reativa (PCR) de alta sensibilidade. Um diodo que emite luz de 940 nm, que é direcionada para uma cubeta para mensurar a PCR de alta sensibilidade.

Outras características exclusivas localizadas em novos instrumentos automatizados

A maioria dos analisadores químicos utiliza uma fonte de luz policromática de alta intensidade, usualmente lâmpada de quartzo/halogênio. Alguns utilizam uma fonte luminosa de xenônio; essa lâmpada dura mais (vida média de 5 anos), porque a sua voltagem é mantida em um nível mais baixo do que o das outras lâmpadas. A lâmpada de xenônio produz uma luz policromática muito intensa que é útil para muitas e variadas análises.

Todos os analisadores químicos gerais totalmente automatizados são capazes de realizar a amostragem diretamente do tubo de coleta. A amostragem direta do tubo, juntamente com a leitura do código de barra eliminaram a necessidade de transferência de amostras para outro recipiente, reduziram erros e minimizaram a exposição do técnico a materiais biológicos potencialmente perigosos. Geralmente, os tubos são destampados antes da amostragem. No entanto, alguns sistemas (p. ex., Beckman Coulter SYNCHRON LX Clinical System) possuem uma tecnologia de penetração de tampa. O analisador utiliza uma lâmina para fazer uma incisão na tampa e a sonda de amostra a atravessa, para retirar uma alíquota de amostra. Observe que a tecnologia de penetração de tampa está disponível em todos os analisadores hematológicos de alto processamento.

A automação laboratorial pode consolidar múltiplas estações de trabalho em uma única unidade. O sistema integrado de análise química Dade Behring Dimension Xpand Plus combina o teste bioquímico abrangente e de imunoensaio de emergência em um sistema compacto único com a menor dimensão para um instrumento com suas capacidades. O Dimension Xpand Plus apresenta amplo menu com vários ensaios, fornece primeiros resultados em um curto período de tempo, possui capacidade de interrupção para a realização de exame de emergência, processa aproximadamente 400 exames por hora e é flexível em relação aos reagentes.

O Beckman Coulter SYNCHRON LX Clinical System é diferente do Dimension Xpand Plus. O sistema SYNCHRON LXi725 (Fig. 5.3) foi projetado como um sistema modular integrado autossuficiente. As amostras são colocadas em uma área de carga e lançadas para a *unidade de alíquota de tubo fechado*, similar a uma pequena esteira. Uma alíquota de cada amostra é colocada na unidade analítica de imunoensaio, para ser processada. A estante e os tubos principais são, então, liberados para exames bioquímicos gerais.

Estágio pós-analítico

O sinal elétrico gerado pelo detector, representando a concentração do analito, é direcionado para o microprocessador do analisador ou para o computador. O computador do instrumento representa um meio de realização de várias tarefas, o qual inclui o processamento do sinal, a manipulação de dados e o controle do processo.

O processamento de sinal envolve a conversão de um sinal analógico produzido pelo detector em um sinal digital, utilizável por todos

Figura 5.3 O sistema clínico Beckman Coulter SYNCHRON LXi725 possui um grande menu de exames (146 exames) e aceita análises bioquímicas definidas pelo usuário. (Com autorização de Beckman Coulter Brea CA).

os dispositivos de comunicação. O processamento de dados permitiu a automação de imunoensaios não isotópicos, porque algoritmos computadorizados podem transformar sinais padrões de entrada não lineares em gráficos de calibração linear.

O processamento de dados inclui aquisição de dados, cálculos, monitoramento e exibição de dados. Além de transformar dados em gráficos de calibração linear, os computadores podem realizar estatísticas sobre pacientes e valores de controle, correções de dados, subtrair resultados em branco e determinar regressão linear de primeira ordem da curva e da interceptação. Computadores podem monitorar os resultados do paciente comparando valores de referência. Eles também podem testar dados de controle contra protocolos de controle de qualidade estabelecidos. Monitores de computador podem exibir todos os tipos de informação, incluindo resultados do paciente, dados de controle de qualidade, checagem da manutenção e instrumentação da operação.

O computador teve um profundo impacto em todo o processo de instrumentos laboratoriais automatizados. No analisador, o computador comanda e controla o tempo de operações eletromecânicas, de modo que elas possam ser realizadas uniformemente, e repetidas e produzidas em sequência correta. Essas operações incluem, nomeando apenas algumas, ativação de dispositivos de pipetagem, movimentação de cubetas de um ponto a outro, movimentação de tubos de amostra e distribuição de reagentes.

O computador oferece um meio de comunicação entre o analisador e o operador. Computadores de instrumentos podem exibir informações possíveis de serem utilizadas pelo operador (p. ex., alertas de que algo não está funcionando corretamente ou de que uma reação específica excedeu os parâmetros definidos pelo método).

Computadores de analisadores químicos podem exibir informações gráficas, como gráficos de controle de qualidade de Levey-Jennings e curvas de calibração. Eles também podem sinalizar dados que não satisfazem alguns critérios predefinidos. O operador pode reprogramar o computador para suprir uma necessidade específica (p. ex., adição de um novo exame ou alteração de um parâmetro de operação).

Um computador tem a capacidade de ser interligado a outros, o que melhora drasticamente os esforços de automação. Computadores de instrumentos podem ser interligados via interfaces (p. ex., RS232) a sistemas de informação laboratorial, provendo um meio de transmissão de informação uni ou bidirecional. Atualmente, os computadores de instrumentos são equipados com um meio de ligação com a internet via TCP/IP (*transmission control protocol/internet protocol*). Os fabricantes de instrumentos projetaram-nos para interligar o computador do laboratório ao site do fabricante. Essa conexão ocorre em tempo real e serve para monitorar continuamente o desempenho do instrumento. Quando ocorre um problema com o analisador, o fabricante pode ver dados em tempo real, para ajudar o laboratório a resolver o problema no menor espaço de tempo possível.

Existem outras várias características disponíveis nos instrumentos mais novos que merecem ser mencionadas. Muitos sistemas possuem soluções disponíveis *on-board* no computador do analisador. Caso ocorra um problema, os técnicos podem acessar os protocolos de ajuda dos sistemas, os quais os orientam por intermédio de um procedimento passo a passo, em um esforço para solucionar o problema. Alguns desses programas de solução de problemas *on-board* são bem sofisticados e incluem vídeos e gráficos. Outra característica disponível *on-board* em alguns sistemas é um programa de treinamento. Trata-se de uma característica efetiva que serve para aumentar o treinamento de novos usuários do sistema.

Tipos de sistemas automatizados disponíveis para laboratórios

Automação laboratorial total (ALT)

A ideia de automatização total de um laboratório clínico teve sua origem no Japão e sua primeira tentativa de aplicação ocorreu no início da década de 1980. Os primeiros projetos utilizavam robôs de um braço, esteiras transportadoras e modificações dos analisadores químicos existentes para a realização do máximo de tarefas pré-analíticas e analíticas possíveis, sem intervenção humana. Cada estação de trabalho do laboratório foi acoplada a esteiras transportadoras de modo que amostras podiam ser movidas de uma estação de trabalho a outra. A pesquisa contínua e modificações desses sistemas antigos levaram ao desenvolvimento de sistemas comerciais de automação laboratorial total (ALT), destinados aos laboratórios localizados em hospitais.

Uma técnica de automação laboratorial total pode ser descrita como a combinação de vários instrumentos: consolidados, células de trabalho, células de trabalho integradas ou modulares integradas, que são acopladas a um gerenciador de amostras, a um sistema de transporte e também a um *software* de controle de processo, para automatizar uma grande porcentagem de trabalho laboratorial.

Um exemplo de ALT é o sistema da Roche Diagnostics, que inclui uma pré-análise medular e uma plataforma C (i. e., o analisador químico). A ALT da Roche é um dispositivo de trato integrado, que conecta todas as estações de trabalho do laboratório, incluindo processamento inicial, instrumentação e arquivamento, e cria uma rede inclusiva contínua, que serve para automatizar quase todas as etapas envolvidas no teste de cada amostra. A ALT pode incorporar amostras de testes para bioquímica, hematologia, coagulação e imunoquímica.

A vantagem da ALT inclui diminuição de erros de rotulação e do tempo entre coleta e resultado, e redução dos equivalentes de tempo integral. Portanto, laboratórios com alto grau de automação têm a capacidade de realizar novos exames usando parte da equipe que se tornou desnecessária com os testes automáticos.

Os maiores inconvenientes da ALT são a necessidade de investimento financeiro substancial e de aumento do espaço (Wilson, 2003). O investimento inicial pode atingir milhões de dólares e a necessidade de espaço pode ser superior a 1.220 m^2. Outro fator que requer atenção dos planejadores, por causa da natureza complexa da ALT, é a necessidade de pessoal altamente técnico para operar e solucionar problemas do sistema. Outros desafios da ALT incluem remodelação da infraestrutura, formação de equipe e interfaceamento de *softwares*. Além disso, vários desses sistemas não permitem a interrupção do fluxo de trabalho para analisar amostras de emergência (Battisto, 2004).

Sistemas modulares integrados

Nos Estados Unidos, apenas 7% dos laboratórios são considerados capazes de se beneficiar com a implantação da ALT. Um hospital com menos de 600 leitos pode não ser adequado para esse procedimento. Por essa razão, a automação modular representa uma abordagem mais atrativa para os laboratórios hospitalares e para os especializados. Por possuírem sistemas menores, exigem menor investimento de capital inicial e menos planejamento que a ALT (Sarkozi, 2003). Sistemas modulares podem ser configurados para incluírem diferentes plataformas (p. ex., hematologia e imunoquímica). Além disso, a combinação de módulos pode incluir múltiplos modelos idênticos de analisadores, módulos pré e pós-analíticos. Esses módulos são ligados a uma única plataforma de testes que faz a ligação por meio de uma esteira ou outro dispositivo conector. Módulos individuais podem ser adicionados ao sistema inteiro para refletir alterações na carga de trabalho ou nos padrões de testes.

Configurações de módulos automatizados

Consolidação da estação de trabalho

Estações de trabalho representam um ambiente único em um serviço laboratorial dedicado a um tipo de teste (p. ex., hematologia e imunoensaios). Todos os estágios de testes das amostras são realizados por uma determinada disciplina em sua respectiva estação de trabalho. Uma abordagem adotada para melhorar o fluxo de trabalho tem sido a consolidação do gerenciamento de dados da estação de trabalho. Esse desenho permite ao técnico monitorar vários analisadores (tipicamente do mesmo fabricante) de uma estação de trabalho.

Células de trabalho

Uma célula de trabalho é descrita como a combinação de um gerenciador de amostras com instrumentos ou de instrumentos consolidados de bioquímica e reagentes de imunoensaio, que oferecem um amplo espectro de exames analíticos. Células de trabalho modulares são aquelas em que os instrumentos utilizados são configurados para

formarem interface diretamente com o gerenciador de amostras. O Dade Behring StreamLAB (Fig. 5.4) é um exemplo desse tipo de célula de trabalho. O StreamLAB integra um componente pré-analítico e múltiplos componentes analíticos como, por exemplo, sistemas Dimension por intermédio de uma interface com o operador. O Dade Behring oferece um módulo opcional de centrifugação.

Sistemas totalmente integrados

A tendência dos modelos de automação é integrar vários módulos em um sistema contínuo, que permitirá ao usuário realizar exames bioquímicos fotométricos e imunoensaios, tanto homogêneos quanto heterogêneos, e exames eletroquímicos. O menu de exames de sistemas totalmente integrados ultrapassa 100 exames e inclui imunoensaios, exames bioquímicos de rotina e eletrodos íon-seletivos. Todos os sistemas modulares integrados utilizam a tecnologia de acesso aleatório, que permite a análise de diferentes tipos de exames bioquímicos.

O analisador Olympus AU5400 Integrated Chemistry-Immunoassay (Fig. 5.5) é um exemplo dessa tendência em direção à combinação de plataformas de instrumentos. Esse sistema é um verdadeiro analisador de acesso aleatório, com taxas de processamento que ultrapassam 300 exames fotométricos/hora. Para mensurações com eletrodo íon-seletivo, a taxa de processamento é de aproximadamente 600 amostras/hora. Uma vantagem distinta desses sistemas modulares é a capacidade de interligação entre dois ou mais módulos e, consequentemente, aumentar o processamento.

O ADVIA 1650 Chemistry System, sistema modular da Bayer, possui um modo de integração total com outros módulos de testes por meio do sistema de transporte de amostras automatizado ADVIA Workcell ou do ADVIA LabCell. O sistema de processamento envia, automaticamente, amostras para exames bioquímicos para o analisador bioquímico ADVIA 1650, e para imunoensaios para o ADVIA Centaur.

Outra abordagem para a automação modular integrada é exemplificada pelo **MODULAR** ANALYTICS da Roche (Fig. 5.6). O **MODULAR** ANALYTICS incorpora a maioria dos exames que outros sistemas integrados oferecem, mas ele pode aumentar o menu interligando mais um módulo (p. ex., Roche Diagnostic E170). O módulo E170 oferece 25 imunoensaios heterogêneos. Por essa razão, se o laboratório tiver integrado todos os módulos disponíveis, incluindo uma unidade de controle e a de carga central, o **MODULAR** ANALYTICS pode oferecer

Figura 5.4 O Dade Behring StreamLab Analytical Workcell liga um sistema de múltiplas dimensões por meio de uma única interface operadora e apresenta função pré e pós-analítica automatizada. (Com autorização de Dade Behring Inc, Newark Del).

Figura 5.5 O sistema Olympus AU5400 totalmente integrado e automatizado está disponível em versões com duas ou três unidades fotométricas, incluindo uma unidade com uma ou duas células ISE. A capacidade de processamento é de 300 a 800 amostras por hora, dependendo da configuração. (Com autorização da Olympus).

um menu de exames muito grande e taxas muito altas de processamento de amostras e exames.

Outras melhorias dos sistemas integrados automatizados

Conectores de instrumento

A Olympus desenvolveu uma unidade chamada AU-Connector, que permite que as análises bioquímicas e de imunoensaio sejam consolidadas em uma única estação de trabalho, sem comprometer a função ou o desempenho dos sistemas conectados. O AU-Connector utiliza o *gerenciamento inteligente de amostras* e a capacidade de classificação de tubos para manter os analisadores trabalhando com todo o potencial. O AU-Connector não utiliza dispositivo de esteira, o qual pode criar engarrafamentos adicionais no processamento e aumentar o tempo entre a coleta e o resultado.

Mediador (middleware)

O mediador permite aos laboratórios conectarem os seus sistemas de informação laboratorial existentes e a instrumentação, para facilitar o processamento automático de informações e executar tarefas não realizadas atualmente com os *hardwares* e *softwares* existentes. Pacotes de mediadores oferecem várias características e funcionalidades, incluindo:

- verificação automática de resultados de exames por meio do processamento de decisão baseada em regras;
- automação e customização do trabalho e das informações baseadas nas necessidades específicas do laboratório;
- rastreamento automático de dados e localização de amostras que requerem armazenamento;
- testes e detecção automáticas de interferência de amostras;
- provisão para testes reflexiva em tempo real;
- comparação automática dos resultados atuais com os prévios do exame de um paciente (checagem delta).

Perspectivas futuras

As necessidades de automação listadas anteriormente estão mudando continuamente, e evoluindo, e isso levará a novos modos de prestação de cuidados à saúde.

O menu de exames aumentará mais e novas tecnologias serão necessárias para dosar esses analitos. Essas novas tecnologias devem ser incorporadas aos sistemas existentes. Outra demanda que os fabricantes de sistemas devem visar é a capacidade de ligar diferentes instrumentos ou módulos a seus sistemas. Uma interface padronizada será necessária para a realização dessa ligação e o SIL também deverá ajustar seus processadores. A maior ênfase sobre a segurança do empregado e o suporte por esforços legislativos farão com que os fabricantes de instrumentos continuem a desenvolver seus produtos para reduzir a exposição do técnico. À medida que o campo da proteômica evoluir, os métodos e os instrumentos necessários para a mensuração também evoluirão. Sistemas proteômicos estão chegando ao mercado e, no momento adequado, esses tipos de testes encontrarão seu lugar nos laboratórios clínicos. Fabricantes comercializam atualmente sistemas automatizados de processamento de amostras (p. ex., Roche Diagnostic) para análise por PCR. O processamento automatizado de amostras é realizado com a utilização do MagNa Pure LC (MP, Roche Applied Science, Indianapolis, Ind). O ensaio é completado utilizando o analisador Roche COBAS. Esse analisador pode funcionar isoladamente ou ligado ao Roche Preanalytics.

Figura 5.6 Roche **MODULAR** ANALYTICS apresenta cinco módulos analisadores diferentes e 197 aplicações, produzindo uma capacidade de processamento que varia de 170 a 10.000 exames/hora. (Com autorização da Roche Diagnostics)

Referências bibliográficas

Battisto DG: Hospital clinical laboratories are in a constant state of change. Clin Leadersh Manag Rev 2004; 18(2):86–99.

Fornece informações valiosas e atualizadas para laboratórios que contemplam a introdução de modificações em suas instalações.

Kaplan L, Pesce A, Kazmierczak S: Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation, 4th ed. St Louis, Mosby, 2003.

Fornece uma quantidade substancial de informações detalhadas sobre todos os aspectos dos estágios pré-analítico, analítico e pós-analítico do teste laboratorial.

Sarkozi L, Simson E, Ramanathan L: The effects of total laboratory automation on the management of a clinical chemistry laboratory. Retrospective analysis of 36 years. Clinica Chimica Acta 2003; 329(1–2): 89–94.

Wilson LS: New benchmarks and design criteria for laboratory consolidations. Clin Leadersh Manag Rev 2003; 17(2):90–98.

Mostra os resultados de um projeto de consolidação que serve um sistema multi-hospitalar.

CAPÍTULO 6

Laboratórios de teste rápido e de consultório médico

Gregory A. Threatte MD

Regulamentação do laboratório 74
Clinical Laboratories Improvement Act (CLIA) 74
Requisitos para certificação e licenciamento 75
Diretoria do laboratório 76
Protocolo de teste rápido recomendado 77
Aderência 77
Referências bibliográficas 78

PONTOS-CHAVE

- O teste rápido refere-se ao escopo de testes laboratoriais que são realizados no local onde o paciente recebe a assistência. Incluem os realizados tanto no próprio consultório médico como em diversos locais situados fora do laboratório, tais como no setor de emergência, na sala de cirurgias e na unidade de tratamento intensivo.
- Quando realizados no consultório médico, testes simples (como o teste de urina com vareta medidora de nível e o de glicose em sangue total com medidores) são isentos de regulamentações envolvendo funcionários, testes de proficiência e exigências de garantia de qualidade rigorosas. Tais testes, segundo o Clinical Laboratories Improvement Act (CLIA), são considerados "dispensados". Nos hospitais, para a realização desses testes, há a exigência de certificação, a qual é emitida pelo hospital de origem ou pelo estabelecimento de assistência à saúde; além disso, os testes geralmente estão sujeitos a exigências mais rigorosas.
- Há exigências especiais relativas a funcionários (incluindo o diretor-geral do laboratório) nos casos em que testes de complexidade moderada são realizados por um laboratório no consultório médico.
- Os componentes essenciais de um programa hospitalar de testes rápidos incluem validação do método, treinamento de pessoal que não faz parte da equipe de funcionários do laboratório e políticas e procedimentos bem definidos para o estabelecimento de quem é o responsável por cada parte do programa. A supervisão laboratorial é obrigatória.

O teste rápido (POCT, *point-of-care test*, também conhecido como teste realizado onde o paciente está, ou teste realizado em local alternativo, ou ainda teste centralizado no paciente) é executado em vários cenários, tais como no setor de emergências, nas salas de cirurgia, nas clínicas, nas organizações mantenedoras de saúde (HMOS, *health maintenance organizations*), nos consultórios médicos ou nas casas de repouso (Kurec, 1993). O POCT leva o teste laboratorial ao local onde o paciente se encontra, em vez de simplesmente coletar amostras e enviá-las ao laboratório. Quantificações em tempo real de indicadores do estado do paciente podem ser obtidas em pouco tempo, permitindo ao prestador de assistência à saúde atender às necessidades agudas do paciente (Zagola, 1991; Woo, 1993). A "meia-vida biológica" dos dados laboratoriais para pacientes com doença crônica geralmente apresenta variações mínimas, enquanto as condições clínicas de pacientes com doença aguda são mais instáveis (Geyer, 1992). O POCT é reconhecido pela Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations e pelo Clinical Laboratories Improvement Act de 1988 (CLIA'88; registro federal 55, 42 CFR, 1990; 57, 42 CFR, 1992; 68, 42 CFR, 2003).

Nas edições anteriores deste livro, este capítulo era destinado aos laboratórios de consultório médico (LCMs). Conforme mostra a Figura 6.1*A*, o número de LCMs registrados em agosto de 2004 aumentou para 103.378, comparado aos 95.000 laboratórios mostrados por uma figura semelhante na 20ª edição. Entretanto, a Figura 6.1*B*, também obtida no banco de dados do CMS CLIA, disponível no site http://www.cms.hhs.gov/clia, mostra que, atualmente, 80% dos laboratórios registrados são do tipo "dispensados de certificação" ou do tipo que possui certificado de procedimentos de microscopia realizados pelo prestador (PPMP, *provider-performed microscopy procedures*). LCMs de grande porte têm mais probabilidade de possuírem registro tanto nas classificações de aderência como nas de acreditação, de modo semelhante aos hospitais e laboratórios comerciais, estando submetidos aos mesmos padrões, regulamentações, protocolos e procedimentos (ver Cap. 1). Este capítulo enfocará as regulamentações e os procedimentos recomendados para LCMs menores e locais em que realizam testes rápidos, onde espera-se que seja realizado um número maior de testes "dispensados" e PPMP.

Em sua análise do mercado de equipamentos para laboratórios clínicos, Breindel relata que o mercado de instrumentos para laboratórios de bioquímica provavelmente sofrerá uma queda de 2,7% na taxa de crescimento anual ajustada (AAGR, *adjusted annual growth rate*), em decorrência da contenção de gastos e da consolidação nos laboratórios centrais. Por outro lado, espera-se que os equipamentos para a realização de POCT apresentem uma AAGR de 8,1% (Breindel, 2003). Avanços tecnológicos na área médica, como os sistemas de reagentes pré-embalados, as reações e calibrações controladas por microprocessador e a miniaturização de componentes, estão conduzindo a uma moderna geração de instrumentos de laboratório, que exigem menos habilidades técnicas por parte do operador. Entre 2002 e 2003, o FDA concedeu *status* de "dispensado" a 994 sistemas de testes (CMS, 2003), sendo que atualmente há mais de 40 ensaios que podem ser incluídos nessa categoria, os quais detectam desde glicose até o antígeno tumoral do câncer de bexiga. Novos sistemas como esses funcionarão a seu modo, tanto em laboratórios de POCT como em LCMs, obscurecendo suas diferenças tecnológicas. Contudo, ainda restarão diferenças em termos de exigências regulamentadoras que deverão ser respeitadas.

Regulamentação do laboratório

Clinical Laboratories Improvement Act (CLIA)

Segundo o CLIA, um laboratório é "um estabelecimento para... análise de materiais provenientes do corpo humano, com o propósito de fornecer informações para o diagnóstico, a prevenção ou o tratamento de qualquer doença ou comprometimento, ou para a avaliação da saúde de seres humanos. Esses exames também incluem procedimentos para determinar, quantificar ou descrever a presença ou ausência de várias substâncias ou organismos no corpo" (registro federal 57, 42 CFR, 1992). Essa definição inclui prestadores de assistência à saúde que utilizem equipamentos, como varetas medidoras de nível de urina ou monitoras de glicose de cabeceira. Atualmente, dispositivos de monitoramento *in vivo* ou que permanecem externamente presos ao paciente, como, por exemplo, os de oximetria de pulso, cateteres de artéria pulmonar S_vO_2 e capnógrafos, não estão sujeitos ao CLIA. Se essa questão tiver que ser resolvida depois de encaminhada ao CLIA, haverá adequada notificação e oportunidade para o público fazer seus comentários.

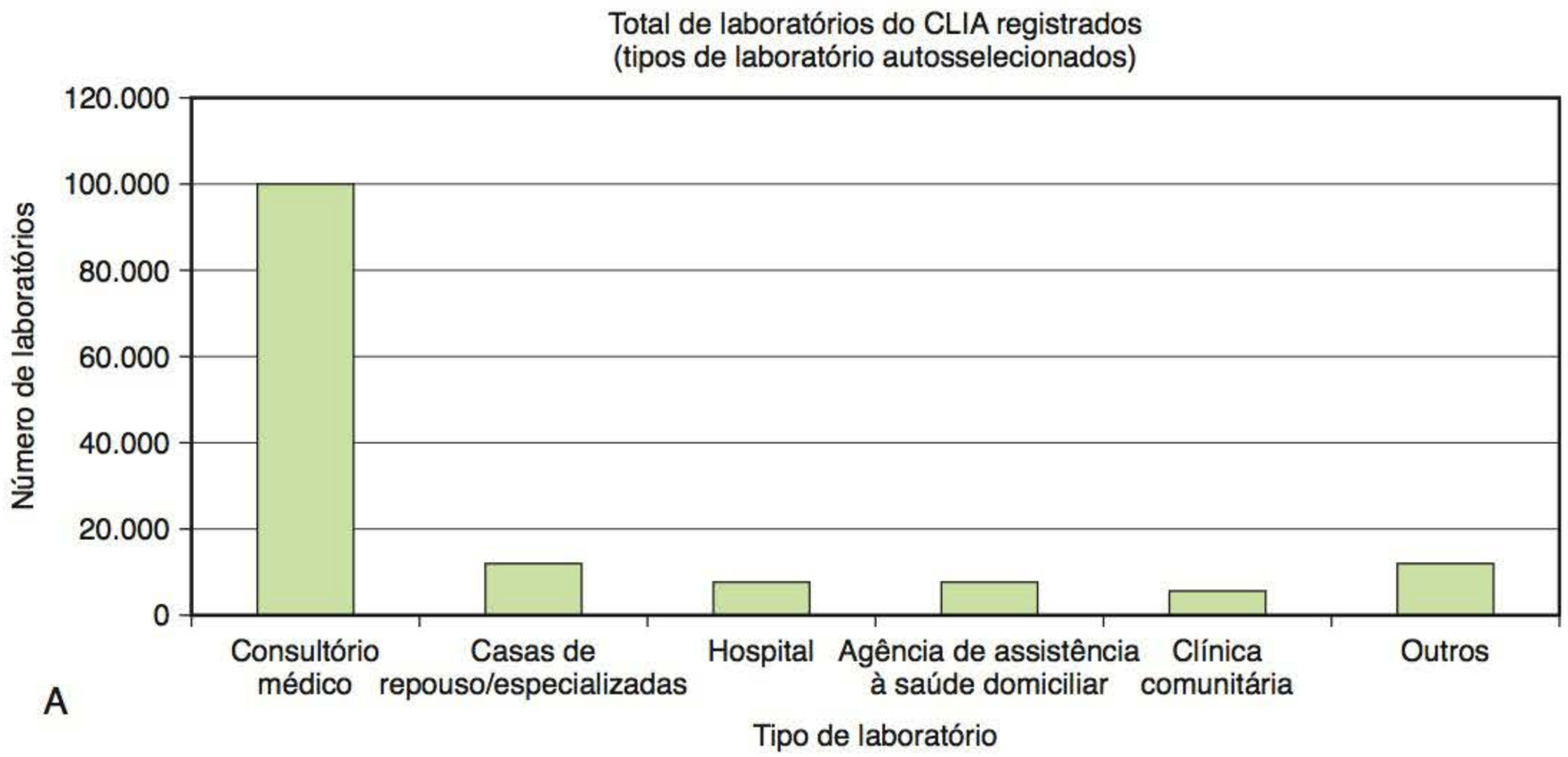


Figura 6.1 *A*, Número de LCMs, em agosto de 2004, relativo a hospitais, casas de repouso e laboratórios independentes (dados do CMS CLIA Database, agosto, 2004, em http://www.cms.hhs.gov/clia/ statregi.pdf). *B*, Proporção relativa de laboratórios registrados por tipo de certificação (dados do CMS CLIA Database, agosto, 2004, em http://www.cms.hhs.gov/clia/ statcer.pdf).

Sob essa definição, os "laboratórios" estão proibidos de solicitar ou aceitar amostras humanas para análise, a menos que a Secretary of the Departament of Health and Human Resources (HHS) emita um certificado para cada um dos procedimentos a serem realizados. Todos os laboratórios são obrigados a ter um registro junto ao governo federal e a pagar taxas de licença bianuais para ter um número válido de identificação do CLIA antes de realizar quaisquer análises laboratoriais empregadas na assistência aos pacientes. Com a evolução tecnológica, a diferença básica entre os testes realizados por laboratórios de TR e LCMs será que, no LCM, essa certificação será concedida ao laboratório, enquanto, no laboratório de TR, os testes serão conduzidos mediante certificado do hospital de origem ou do estabelecimento de prestação de assistência à saúde.

Requisitos para certificação e licenciamento

A certificação do CLIA baseia-se em padrões laboratoriais que variam de acordo com o grau de complexidade das medidas a serem realizadas. Os testes simples, estabelecidos pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como sendo aqueles que oferecem baixo risco ao paciente, mesmo quando realizados de modo errado, estão dispensados da maioria das regulamentações. Tais tipos de procedimento incluem aqueles que foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso doméstico, ou que sejam tão simples e acurados a ponto de apresentar probabilidade de erros não significativa. Todos os laboratórios devem ser certificados com base em um dos cinco tipos de certificação concedidos pelo CLIA, os quais estão listados na Tabela 6.1.

Uma abordagem de três níveis foi inicialmente implantada para classificar todos os testes laboratoriais, considerando o grau de complexidade. As três categorias são certificadas de isenção ou de testes dispensados, testes de complexidade moderada e testes de alta complexidade. Os laboratórios que realizassem apenas testes dispensados estariam isentos da obrigação de realizar testes de proficiência para seus funcionários, bem como das exigências mais rigorosas de garantia de qualidade a que estão submetidos os testes mais complexos. O HHS tem o direito de conduzir inspeções, a fim de assegurar que esses laboratórios estejam realizando apenas testes dispensados. Os testes originalmente isentos são análise de pH por urinálise com vareta medidora de nível ou reagentes em pastilha, gravidade específica, glicose, proteína, bilirrubina, hemoglobina, cetona, leucócitos, nitrito e urobilinogênio. Também estavam isentos o teste de glicose em sangue total utilizando dispositivos aprovados pelo FDA especificamente para uso doméstico; micro-hematócritos por centrifugação, teste de hemoglobina por meio do método de sulfato de cobre ou utilizan-

Tabela 6.1 Tipos de certificado do CLIA

Certificate of Waiver
Certificado concedido a um laboratório para realizar apenas testes dispensados.
Certificate of Provider-Performed Microscopy Procedures (PPMP)
Certificado concedido a um laboratório em que um médico, profissional de nível intermediário ou dentista realizam unicamente procedimentos de microscopia. Esse certificado permite que o laboratório também realize testes dispensados.
Certificate of Registration
Certificado concedido a um laboratório para permitir à entidade conduzir testes laboratoriais de complexidade moderada ou alta (ou ambos), até que a mesma seja reconhecida, por meio de inspeção, e esteja de acordo com as regulamentações do CLIA.
Certificate of Compliance
Certificado concedido ao laboratório que passou por inspeção, em que foi constatada sua conformidade com todas as exigências aplicáveis do CLIA.
Certificate of Accreditation
Certificado concedido a um laboratório com base na acreditação do mesmo por uma organização responsável aprovada pelo HCFA.

Obtida no site: http://www.cms.hhs.gov/clia/downloads/types_of_clia_certificates.pdf

do instrumentos automáticos de analito único para quantificação e leitura diretas (p. ex., HemoCue), sangue oculto nas fezes, testes de urina para gravidez empregando comparação visual de cores, testes de ovulação por visualização de cor para hormônio luteinizante humano, e taxa de sedimentação eritrocitária. Os laboratórios que realizam somente testes dispensados devem ser registrados e pagar uma taxa bianual.

É importante compreender que a lista original de testes dispensados, especificada pelo Congresso, incluía apenas os testes genéricos listados anteriormente. Adicionalmente, foi estabelecida uma cláusula que permitiu aos fabricantes adicionarem métodos precisos a essa lista, por meio de um processo de certificação mantido pelo CDC e pelo FDA. O incentivo aos fabricantes, além de atrair um mercado maior, tem levado a um rápido influxo de dispositivos e métodos que atualmente são classificados como dispensados. A lista de testes dispensados aprovada é atualizada regularmente e pode ser acessada no site http://www.cms.hhs.gov/clia/downloads/cr4136.waivetbl.pdf. Há uma lista de testes dispensados em ordem alfabética no site http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfClia/analyteswaived.cfm. Os laboratórios de consultório parecem estar mudando dos testes de complexidade moderada para os testes dispensados, principalmente por causa desse rápido aumento do número de opções de testes (Roussel, 1996; Binns, 1998; LaBeau, 1998), e as mesmas medidas são apropriadas ao campo de atuação dos LCMs.

Uma quarta categoria, de procedimentos de microscopia realizados pelo prestador (PPMP, *provider-performed microscopy procedures*), foi criada em 1993 e expandida em 1995. Essa categoria inclui os seguintes procedimentos: todos os exames de sedimento urinário; preparações a fresco para exame direto quanto a presença ou ausência de bactérias, fungos, parasitas e elementos celulares humanos; todas as preparações com hidróxido potássio (KOH); exames de oxiúros; teste da samambaia; teste direto pós-coito, exames qualitativos vaginais ou de muco cervical; esfregaços nasais para pesquisa de granulócitos; exames de fezes para pesquisa de leucócitos; e análise qualitativa de sêmen (limitada a presença ou ausência de espermatozoides e detecção de motilidade).

Apenas alguns profissionais têm permissão para realizar os procedimentos sob certificação PPMP, caso seja retida a isenção da designação de complexidade moderada. Ela inclui médicos licenciados, dentistas e profissionais de nível intermediário, como enfermeiros, enfermeiros obstetras e médicos assistentes sob supervisão de um médico; ou em clínica independente, apenas se autorizados pelo Estado em que a clínica se localiza. Com o PPMP, a amostra deve ser examinada, durante a visita do paciente, a partir de material obtido, seja do próprio paciente do prestador, seja de um paciente proveniente de um grupo de prática médica do qual o prestador faz parte, seja de um funcionário.

O instrumento primário para realizar os testes com certificação PPMP é o microscópio, seja restrito à microscopia de campo luminoso ou de contraste de fase. A amostra precisa ser lábil, caso contrário um atraso na realização do teste pode comprometer a acurácia do resultado obtido. De forma geral, não há controles disponíveis para monitorar todo o processo de realização do teste, sendo necessário limitar a manipulação ou o processamento da amostra.

Quando se trata de complexidade de grau moderado, um laboratório somente realiza testes dispensados e um ou mais testes classificados pelo FDA como sendo de complexidade moderada. Para determinar qual o nível de complexidade no qual está classificado um dado método, deve-se consultar o site da Divisão de Sistemas Laboratoriais do CDC (http://www.phppo.cdc.gov/dls/clia/testcat.asp). Os fabricantes de testes de complexidade moderada devem submeter seus sistemas de teste ao FDA para fins de classificação. Por isso, essa lista será continuamente atualizada paralelamente à lista de testes dispensados.

Os laboratórios devem submeter um formulário de requerimento ao HHS ou a seu designado detalhando o número, o tipo e as metodologias empregadas em cada quantificação ou exame, bem como as qualificações dos dirigentes, supervisores e executores de tais procedimentos. Para cada locação de laboratório deve ser preenchido um requerimento separado, exceto quando se tratar de localizações móveis, bem como agências sem fins lucrativos ou governamentais. Os certificados têm validade de 2 anos e quaisquer alterações das informações constantes no formulário devem ser comunicadas ao HHS ou entidade por ele designada, dentro do prazo de 30 dias contados a partir de qualquer mudança referente à propriedade, nome, localização ou administração. Alterações da complexidade metodológica devem ser comunicadas dentro de 6 meses contados a partir da alteração. Esse requerimento pode passar por um corpo de profissionais responsáveis aprovado ou por agência estadual, caso os padrões de confiabilidade da instituição sejam tão ou mais rigorosos quanto os do HHS e se a agência for autorizada a inspecionar o laboratório sempre que ela requerer, submetendo os registros e as informações devidas ao HHS.

Diretoria do laboratório

Laboratórios que funcionam com certificação de dispensa ou PPMP podem realizar testes dispensados sem ter que arcar com as despesas gerais de contratação de funcionários que atendam às exigências de qualificação em termos de experiência de treinamento, desempenho profissional e competência. Entretanto, se o laboratório realiza testes ou quantificações de complexidade moderada, a CLIA exige que ele seja administrado por um diretor-geral e/ou por um consultor, que tenha, ao menos, as credenciais de diretor listadas na Tabela 6.2. Esse diretor deve ser o responsável pela determinação das qualificações dos funcionários que irão realizar os testes e comunicar os resultados, bem como deverá garantir a concordância com todas as regulamentações cabíveis. Ele também é o responsável pelo desempenho analítico de todos os ensaios, devendo monitorar o grau vigente de proficiência, acurácia e precisão. Se houver na clínica mais de um indivíduo qualificado para o cargo de diretor, o laboratório é solicitado a designar um deles para ser o responsável. Deve ser comprovado que o diretor do laboratório tenha exercido a direção efetiva das operações laboratoriais e, se a direção não foi realizada no local, os responsáveis devem fazer consultoria por telefone ou delegar responsabilidades específicas ao pessoal qualificado, conforme as regulamentações. Existem cursos *on-line* disponíveis, que proporcionam a médicos a qualificação ao cargo de diretor de laboratórios de

Tabela 6.2 Requisitos para funcionários de um laboratório que realiza testes de complexidade moderada

Diretor	Responsável pela administração geral e direção do laboratório, mas sem a obrigação de permanecer no local em período integral. Experiência e formação amplas são requisitos desejáveis. Por exemplo, considera-se qualificado para o cargo um médico com experiência de 1 ano na administração ou supervisão de um laboratório não dispensado, ou 20 créditos de educação médica continuada em prática laboratorial. Do mesmo modo, é considerado qualificado alguém que tenha diploma de bacharelado e 2 anos de treinamento/experiência em laboratório, mais 2 anos de experiência em supervisão de testes não dispensados. O diretor, dependendo de sua formação e experiência, também pode estar qualificado para todos os demais cargos.
Funcionários que realizam os testes	Responsável pelo processamento de amostras, pelo desempenho dos testes e pela comunicação de resultados. O requisito mínimo para esse profissional é o diploma de segundo grau ou equivalente e treinamento nos testes realizados no laboratório.
Consultor técnico	Responsável pela fiscalização técnica e científica dos testes. O requisito mínimo para essa função é um diploma de bacharelado e 2 anos de treinamento em laboratório ou experiência com testes não dispensados.
Consultor clínico	Presta consultoria clínica. O requisito mínimo para essa função é um certificado de doutorado.

Dados do CDC Moderate Complexity Testing Overview, disponíveis no site http://www.phppo.cdc.gov/clia/moderate.aspx.

complexidade moderada, por meio da obtenção de um crédito de 20 horas de educação continuada. Tais cursos podem ser acessados no site do CMS (http://www.cms.hhs.gov/clia).

No caso dos testes rápidos, normalmente não há necessidade de uma certificação isolada, quando os ensaios são realizados sob a supervisão do diretor responsável pelos serviços prestados pelo laboratório em um estabelecimento de assistência à saúde. Os testes rápidos realizados em locais que prestam assistência à saúde, em instalações situadas em prédios contíguos de um mesmo *campus* e sob direção comum podem ser realizados mediante certificação da organização de origem. Quando ensaios e procedimentos são conduzidos em uma situação como essa, os termos dispensado e complexidade perdem o significado. O leque de opções dos testes deixa de ser restrito apenas aos testes dispensados; contudo, as inspeções tornam-se mais frequentes e, em troca, são recebidos exames mais minuciosos. Como a instituição de origem tipicamente possui um certificado que permite realizar testes de todos os níveis de complexidade, recai sobre o diretor do laboratório a responsabilidade de garantir que a metodologia utilizada no local de teste rápido esteja de acordo com as habilidades e o treinamento recebido pelos funcionários que conduzem os ensaios. Um aspecto que não é tolerado pelos inspetores consiste no que chamam "*rogue testing*". Isso ocorre quando uma clínica ou serviço estabelece um teste sem o conhecimento e a supervisão do diretor do laboratório. Com a nova metodologia investigativa utilizada pelas agências de acreditação, como a JCAHO, se um inspetor descobrir um resultado laboratorial irregular e decidir investigar, devolvendo-o ao laboratório que não está sendo adequadamente supervisionado por seu diretor, pode ser emitida uma citação para que o estabelecimento perca a credibilidade.

Protocolo de teste rápido recomendado

A Tabela 6.3 mostra as etapas que se recomenda seguir quando os testes rápidos são estabelecidos. Na primeira etapa, deve-se obter e avaliar os equipamentos. Os laboratoristas profissionais costumam ter uma boa noção das opções disponíveis no mercado. A instrumentação para testes rápidos tende a ser portátil, ter unidades duráveis com análises de fácil execução, controle de qualidade (CQ) simples, vários métodos de apresentar relatórios, baixo rendimento e maior custo por unidade. As análises fáceis e a simplicidade do CQ tornam esses métodos mais propensos a serem classificados como dispensados, sem muita necessidade de treinamento dos operadores. A intervalos regulares, é preciso realizar uma análise de correlação cruzada entre os métodos de LCM e os do laboratório central, para assegurar que as diferenças existentes entre os dispositivos do LCM e os resultados do laboratório central sejam minimizadas e não sejam confundidas com alterações no estado do paciente.

Na segunda etapa, os funcionários encarregados de realizar o teste devem ser treinados e passar por uma avaliação de competências, sendo esses processos obrigatoriamente documentados. A documentação do treinamento deve incluir tanto a data do treinamento inicial, como quaisquer avaliações adicionais em serviço e de competência. Essa documentação pode incluir o desempenho de controles e/ou amostras de proficiência como medida de avaliação de competência.

Por fim, deve-se escrever um manual com os procedimentos e as normas que deve ser disponibilizado e seguido. Tais procedimentos devem ser aderentes às etapas recomendadas pelo fabricante; devendo ser simples, fáceis de acompanhar e funcionais, não se assemelhando a uma coleção de artigos e adendos de instruções e protocolos sobre o uso de instrumentos, os quais são complexos demais para um operador inexperiente. É necessário que o manual de procedimentos contenha exemplos de requerimentos, procedimentos para coleta, identificação e processamento de amostras, metodologia de ensaio, intervalos de referência, controle de qualidade e métodos de apresentar os relatórios. Como padrão de prática laboratorial, sua função é facilitar o planejamento de um procedimento pela equipe de funcionários do laboratório.

As mostras de calibrações e o controle de qualidade devem ser executados a intervalos regulares. Essa tarefa frequentemente é a mais difícil de implementar para as equipes que não pertencem ao laboratório e que, portanto, não foram treinadas acerca da importância dos controles e das calibrações. Por esse motivo, muitos instrumentos destinados à área de testes rápidos apresentam características que bloqueiam a saída de resultados quando as calibrações e os controles não são devidamente realizados. Alguns equipamentos até mesmo bloqueiam o acesso de operadores que não receberam treinamento adequado, atribuindo-lhes um código reconhecido pelo aparelho.

Todos os resultados sobre os pacientes devem ser documentados, e as correlações com as medidas de controle de qualidade devem ser claras. Os inspetores não ficam nem um pouco satisfeitos quando encontram evidências de resultados de testes sendo utilizados 7 dias por semana e de controles sendo executados de segunda a sexta-feira apenas por uma parte da equipe. Além disso, se os analisadores do laboratório estão em uso, devem ser mantidos os registros de manutenção preventiva e qualquer outro tipo de manutenção corretiva dos mesmos. Por fim, se o LCM está funcionando sob certificação de um laboratório central, exige-se que esses testes rápidos estejam inscritos em um programa de testes de proficiência, como o do College of American Pathologists (CAP), no qual os resultados de proficiência das amostras são enviados periodicamente ao serviço de testes de proficiência. Tais resultados são comparados com os de um grupo de pares para verificar a acurácia de testes específicos.

Ações apropriadas devem ser executadas e documentadas em relação a toda a gama de resultados de CQ. Muitas vezes é melhor que a equipe de funcionários do LCM procure o laboratório central quando os controles falham, pois essa atitude cria a oportunidade de rever as etapas do procedimento e de ter a equipe de funcionários do LCM mais bem treinada. Buscar a qualidade significa mais gastos, porém a falta dela custa ainda mais caro.

Ações adequadas também devem ser documentadas com relação a todos os resultados anormais sobre os pacientes. Nesta era de redes sem fio, é preferível que os resultados do LCM sejam transmitidos ao computador e incluídos com os resultados gerados e acoplados a uma única central de dados para serem comparados. Se isso não for possível, os resultados devem ao menos ser anotados em uma tabela, em vez de deixados sem registro apropriado.

A experiência tem mostrado que um estabelecimento de testes rápidos funciona mais eficientemente quando alguém com autoridade suficiente é designado para ser o responsável pelo local. Desse modo, esse funcionário irá comunicar mais rapidamente quaisquer suspeitas de mal funcionamento de equipamentos, os controles serão mais confiáveis e haverá menor probabilidade de indivíduos não treinados tentarem realizar os testes.

Tabela 6.3 Lista de checagem do teste rápido

1. Os equipamentos, quando necessários, devem ser avaliados.
2. Os funcionários que realizam os testes devem ser treinados, suas competências devem ser avaliadas e documentadas.
3. Deve haver um manual de procedimentos sob a forma escrita, o qual deve permanecer disponível e ser seguido.
4. Amostras para calibração e controle de qualidade devem ser executadas regularmente.
5. Todos os resultados sobre os pacientes devem ser documentados, e deve ser clara a sua correlação com medidas de controle de qualidade.
6. As devidas ações devem ser executadas e registradas para todos os resultados que estiverem fora dos limites estabelecidos pelo CQ.
7. As devidas ações devem ser executadas e registradas para todos os resultados anormais sobre os pacientes.

Pela lei estabelecida pelo congresso – o CLIA'88 –, um teste regulamentado é qualquer medida utilizada no diagnóstico, no tratamento e na supervisão de um paciente.

Aderência

Além do CLIA, existem procedimentos regulamentadores adicionais que devem ser seguidos por todos os laboratórios, particularmente no cenário de pacientes externos. Em primeiro lugar, todos os testes pagos pelo Medicare devem constituir uma necessidade médica real. Testes de

triagem e outras medidas de bem-estar geralmente não são cobertas. A determinação da necessidade médica é imposta pelo Medicare, Medicaid e outras companhias seguradoras por meio do uso dos códigos da Terminologia de Procedimentos Vigente (CPT, *Current Procedural Terminology*), os quais são empregados em conjunto com outros códigos da International Classification of Desease (ICD). Nos casos em que o código CID-9 não garante o código CPT-4, o pagamento é negado. E, ainda pior, se for determinado que um laboratório adicionou códigos deliberadamente para receber um pagamento maior que o merecido ou por serviços não prestados, o estabelecimento pode ser responsabilizado por fraude, acusado de felonia e submetido ao pagamento de multas. Considera-se que os erros são cometidos deliberadamente, a menos que exista um programa de aderência no local que busque ativamente revelar erros de cobrança.

Outra armadilha em potencial são as regulamentações de Stark. As leis de Stark são assim chamadas em homenagem a seu patrocinador original, o representante Fortney Pete Stark (D-CA), e foram criadas para prevenir autopromoções desnecessárias que visem à obtenção de lucros. Pelas leis de Stark, o médico está proibido de encaminhar pacientes do Medicare para os laboratórios nos quais ele próprio (ou seus parentes próximos) tenha interesses financeiros. Uma vez que tal proibição prejudica a maioria dos LCMs, é importante distinguir quais são "os portos seguros" que admitem a legitimação da autopromoção.

Referências bibliográficas

Binns HJ, LeBailly S, Gardner HG: The physicians' office laboratory: 1988 and 1996 survey of Illinois pediatricians. Arch Pediatr Adolesc Med 1998; 152:585–592.

Resultados de pesquisa que contrasta laboratórios de consultórios médicos antes e depois da implementação do CLIA'88. Mostra as mudanças instituídas pelos consultórios como resultado da intensificação da regulamentação.

Breindel B: B-168 The U.S. Clinical Diagnostic Equipment Market. Norwalk, CT, Business Communications Company, Inc., 2003.

Artigo que detalha as tendências e projeções do mercado americano de equipamentos de diagnóstico clínico. Considera as pressões exercidas pelo controle de custos e as prováveis respostas por parte dos fabricantes de equipamentos.

CMS: Questions and Answers for CMS-2226-F (January 24, 2003 Regulation – Medicare, Medicaid, and CLIA Programs; Laboratory Requirements Relating to Quality Systems and Certain Personnel Qualifications; Final Rule). Online. Available: http://www.cms.hhs.gov/clia/default.asp and http://www.cms.hhs.gov/clia/cms2226-fqa.pdf.

Federal Register, 55, 42CFR 493; Clinical Laboratory Improvement Act, 1990.

Federal Register, 57, 42CFR 493; Clinical Laboratory Improvement Act, 1992.

Federal Register, 68, 42CFR 493; Clinical Laboratory Improvement Act, 2003.

Mudanças mais recentes no quadro regulamentar do CLIA'88.

Geyer SJ: Joining the technological evolution of healthcare. Med Lab Observ 1992; 24:2–7.

Kurec AS: Implementing point-of care. Clin Lab Sci 1993; 6:225–227.

LaBeau KM, Simon M, Steindel SJ: Clinical laboratory test menu changes in the Pacific Northwest: 1994 to 1996. Clin Chem 1998; 44:833–838.

Roussel PL: Impact of CLIA on physician office laboratories in rural Washington state. J Fam Pract 1996; 43:249–254.

Estudo que mostra o impacto do CLIA'88 sobre a prática laboratorial em consultórios rurais no estado de Washington (EUA). Demonstra que o número de laboratórios que realizam apenas testes dispensados aumentou de 1% para 34%, enquanto o número de laboratórios que realizam testes de complexidade moderada diminuiu de 76% para 53%.

Woo J, McCabe JB, Chauncey D, et al: The evaluation of a portable clinical analyzer in the emergency department. Am J Clin Pathol 1993; 100:599–605.

Zaloga GP: Monitoring versus testing technologies: Present and future. Med Lab Observ 1991; 23:20–31.

CAPÍTULO 7

Pós-análise: tomada de decisão médica

Rohan John MD, Mark S. Lifshitz MD, Jeffrey Jhang MD, Daniel Fink MD

Intervalos de referência 79
Acurácia do diagnóstico 81
Sensibilidade e especificidade no teste diagnóstico 81
Probabilidade da doença 83
Curva característica de operação do receptor (ROC) 84
Eficiência de um teste 85
Razão de probabilidade 85
Acurácia diagnóstica e necessidade clínica 86
Medicina baseada em evidência 87
Referências bibliográficas 87

PONTOS-CHAVE

- Os intervalos de referência distinguem as populações de pacientes normais das de pacientes anormais. Resultados falso-positivos e falso-negativos ocorrem quando há sobreposição entre essas duas populações.
- A habilidade de um teste em discriminar os estados de doença daqueles de ausência de doença (acurácia) é determinada pela sensibilidade e pela especificidade do teste. A sensibilidade é a probabilidade de obter resultado positivo de um indivíduo doente (taxa de resultados positivos verdadeiros). A especificidade é a probabilidade de obter resultado negativo de um indivíduo sadio (taxa de resultados negativos verdadeiros).
- Os testes de triagem requerem sensibilidade elevada para que todos os casos sejam detectados. Os testes de confirmação precisam ser altamente específicos para confirmar os diagnósticos.
- A alteração do *cutoff* do teste exerce um profundo efeito recíproco na sensibilidade e na especificidade. Um *cutoff* pode ser abaixado para incluir todos os casos (100% de sensibilidade), porém isso causará a redução da especificidade do teste (i. e., haverá aumento na incidência de resultados falso-positivos).
- As curvas características de operação do receptor (ROC, *receiver operating characteristic*) confrontam a taxa de resultados positivos-verdadeiros com a de resultados falso-positivos e representam graficamente a gama de sensibilidade e especificidade de todos os *cutoffs* do teste. Na comparação entre dois testes, o mais acurado é aquele que estiver mais próximo do quadrante esquerdo superior da curva ROC.
- A razão de probabilidade de um teste correlaciona a taxa de resultados positivos-verdadeiros à de resultados falso-positivos. Consiste na probabilidade de obter um dado resultado quando há doença, em relação às chances de obter esse mesmo resultado na ausência da doença.
- O valor preditivo representa a probabilidade de haver doença ou ausência de doença em caso de resultado positivo ou negativo, respectivamente. O valor preditivo de um teste positivo aumenta com a prevalência da doença.
- A medicina baseada em evidência consiste em um processo por meio do qual as decisões médicas podem ser tomadas com auxílio do máximo de ferramentas objetivas possível; integra as melhores e as mais modernas evidências médicas existentes nas especialidades clínicas e nas preferências do paciente.

Os testes laboratoriais são requisitados para a detecção, o diagnóstico ou o monitoramento de doenças ou de predisposição às doenças. Indivíduos assintomáticos passam por uma triagem para a detecção de doença insuspeita, enquanto pacientes sintomáticos são testados para confirmar ou identificar a doença. Depois que o laboratório gera um resultado, este deve ser interpretado de modo a possibilitar a tomada de decisão médica. Os resultados podem ser interpretados como normais ou anormais e estes, por sua vez, influenciam a decisão do médico de não interferir, se o paciente for considerado sadio, ou de submeter o paciente a mais testes para o acompanhamento ou tratamento, em caso de suspeita ou confirmação de uma doença. O Capítulo 8 discute o modo como devem ser interpretadas determinadas anormalidades laboratoriais e o significado delas em várias doenças. Entretanto, uma questão de caráter geral e mais básico com a qual se deparam os clínicos consiste em saber se um resultado "anormal" verdadeiramente reflete uma doença, bem como se um resultado "normal" necessariamente indica um estado livre de doença. Muitos clínicos usam de sua experiência para decidir intuitivamente como interpretar o resultado de um teste e se devem ou não interferir. Até certo ponto, essa decisão é guiada pelo grau de suspeita clínica da doença. Contudo, devem-se considerar também diversos outros fatores, incluindo alguns pouco compreendidos, para interpretar os resultados de forma correta e tomar decisões eficazes. Tais fatores abrangem variáveis pré-analíticas (Cap. 3), erros analíticos, variabilidade analítica e variabilidade inerente ao próprio teste, a fim de discriminar indivíduos com e sem doença. O propósito deste capítulo é discutir, de modo geral, a utilidade diagnóstica dos testes laboratoriais para a tomada de decisão médica, bem como a importância da objetividade na interpretação dos resultados nesse processo.

Intervalos de referência

Para interpretar um teste, deve-se primeiro comparar o resultado de intervalo de referência ("normal"). Embora o procedimento para estabelecer intervalos de referência seja discutido mais adiante (Cap. 9), é importante saber como eles afetam a interpretação dos testes clínicos. Um intervalo de referência costuma ser definido como a gama de valores que representa a tendência central de 95% das medidas obtidas de uma população de indivíduos sadios ou "normais".

Perceba que um intervalo de referência é uma tentativa do laboratório de isolar as populações de indivíduos "normais" e "anormais", com o objetivo de ajudar o clínico na interpretação de resultados e na tomada de decisões. Para os propósitos da discussão que se segue, os termos *normal, negativo, sadio* e *sem doença* serão considerados sinônimos, do mesmo modo que os termos *anormal, positivo* e *com doença*. Há casos em que somente um limite do intervalo de referência deve ser considerado, sendo utilizado um único *cutoff* para separar os pacientes normais dos anormais. Por exemplo, um nível de 4 ng/mL de antígeno prostático específico (PSA) poderia ser utilizado para distinguir pacientes que não necessitam mais de acompanhamento ("normais") daqueles que requerem uma biópsia ("anormais"). Em outra situação, um nível de 0,1 ng/mL de troponina I (cTnL) poderia ser empregado para distinguir pacientes com dor torácica não cardíaca, que podem ser liberados do departamento de emergências ("sem doença"), daqueles que apresentam dano miocárdico ("com doença") e devem ser hospitalizados. Note que, nessa discussão, os termos "com doença" e "sem doença" *não* se referem a qualquer doença, mas apenas a doença suspeita de ser identificada por meio de um determinado teste; por exemplo, o câncer de próstata, no caso do PSA, ou a lesão do miocárdio, no caso da troponina.

Em outras situações, um intervalo de referência apresenta dois *cutoffs* – um no limite inferior e outro no limite superior. Esse intervalo de referência distingue três populações de pacientes: pacientes anormais com valores baixos, pacientes normais e pacientes anormais com valores elevados. A maioria dos intervalos de referência cai nessa categoria. Por exemplo, o hormônio estimulante da tireoide (TSH) é utilizado para diferenciar pacientes com hipotireoidismo (valores de TSH elevados) e pacientes com hipertireoidismo (valores de TSH baixos) daqueles que apresentam funcionamento normal da tireoide (eutireoidismo).

Variabilidade aleatória. Qual é o fator que por vezes observado contribui para a ampliação do intervalo de referência ou para a diferença entre os valores obtidos consecutivamente de um mesmo paciente? Na maioria dos casos, isso se deve à variabilidade aleatória de fatores analíticos e biológicos. Ela é uma função da falta de precisão ou da reprodutibilidade do ensaio. Se a mesma amostra for analisada várias vezes, espera-se encontrar alguma variação nos resultados. Essa variabilidade é expressa através de um coeficiente de variação (CV). Existe variabilidade biológica entre indivíduos, bem como em um mesmo indivíduo. As variações *interindividuais* ocorrem porque cada indivíduo usualmente possui um único "valor definido" que corresponde ao seu valor normal. Por exemplo, o nível de creatina quinase (CK) está relacionado à massa muscular. Dessa forma, uma população inteira de indivíduos expressará intervalos de valores de CK de acordo com a massa muscular de cada um. Na prática, não se conhece individualmente cada "ponto de ajuste", porém é possível determinar qual é a gama de valores para a população e usar essa informação como guia para interpretar o resultado de um paciente em particular. A variação *intraindividual* é consequência das alterações biológicas que provocam a flutuação dos níveis de analito no decorrer do tempo. Por exemplo, os níveis séricos de estrógeno podem variar de um dia para o outro, dependendo do ciclo menstrual; o cortisol sérico apresenta variação diurna, com elevação pela manhã e queda posterior no decorrer do dia; e a vitamina D apresenta variação sazonal, com valores mais baixos durante o inverno. A maioria dos demais analitos mostra alguma variação dos níveis fisiológicos, incluindo as alterações relacionadas ao exercício ou à ingestão de alimentos. A Tabela 7.1 fornece estimativas de variações biológicas inter e intraindividuais para analitos comuns. Como esperado, a variação intraindividual geralmente é menor que a interindividual. O índice de individualidade é a razão existente entre o CV *intraindividual* e o CV *interindividual*. Um índice baixo (< 0,6) significa que os resultados obtidos de um indivíduo flutuam dentro de uma faixa estreita do intervalo de referência. Em tais casos, as alterações seriadas envolvendo um dos analitos do indivíduo podem ser mais úteis à detecção de uma doença, do que a comparação de cada uma das medidas com o intervalo de referência (Lacher, 2005). A Tabela 7.1 também mostra que o método do CV, ou grau de variabilidade analítica, usualmente é bem inferior à variabilidade biológica e, por esse motivo, afeta bem menos a variabilidade aleatória geral das medidas.

A variação aleatória também é evidente nas quantificações repetidamente realizadas a partir de um mesmo paciente, em que se observa mais variabilidade entre amostras consecutivas, do que em repetições da análise de uma única amostra. Enquanto a variação que ocorre junto à amostra é determinada pela variabilidade analítica, a variação observada entre amostras inclui variabilidade analítica e biológica. Assim, o CV_{inter} é sempre maior que o CV_{intra}. É importante entender esse conceito quando se solicita ao laboratório a repetição (duplicação) de uma quantificação da amostra (i. e., variabilidade intra-amostra), ou quando se tenta determinar se duas medidas consecutivas de uma amostra diferem entre si (i. e., variabilidade interamostras). A Tabela 7.1 mostra o CV interamostras para alguns dos analitos comumente quantificados, que também é conhecido como CV intraindividual. Observe que esse grau de variabilidade aleatória é bem maior para alguns analitos (p. ex., ALT) do que para outros (p. ex., sódio). Tenha em mente que alterações envolvendo alguns analitos podem ser clinicamente mais significativas que aquelas que afetam outros analitos. Por exemplo, uma mudança nos níveis séricos de potássio de um paciente hospitalizado pode justificar o início imediato de um tratamento. Por outro lado, até mesmo um aumento moderado nos níveis séricos de colesterol pode dispensar qualquer alteração terapêutica até a repetição do teste, na próxima visita agendada para o paciente. Para alguns analitos têm sido publicadas orientações sobre o que constitui uma diferença clinicamente significativa entre dois resultados consecutivos de amostra de paciente. Como exemplo, a Tabela 7.2 fornece essa informação para vários testes de função da tireoide (Baloch, 2003).

Tabela 7.1 Variabilidade biológica inter e intraindividual de analitos comuns

Analito	CV interindividual (%)	CV intraindividual (%)	Índice de individualidade	CV do método (%)
Ácido úrico	27,1	9,0	0,33	0,7
Alanina aminotransferase	50,2	23,7	0,47	3,2
Albumina	8,9	2,8	0,31	3,4
Anticorpo para varicela	43,2	13,7	0,32	6,7
Apolipoproteína A	17,8	7,0	0,39	4,8
Apolipoproteína B	27,6	9,5	0,34	2,7
Aspartato aminotransferase	29,1	15,1	0,52	3,4
β-caroteno	67,4	24,2	0,36	7,4
Bicarbonato	13,3	11,0	0,83	2,4
Bilirrubina total	43,9	24,6	0,56	3,0
Cálcio ionizado	3,6	2,4	0,67	1,4
Cálcio total	4,7	3,3	0,70	2,2
Capacidade de ligação ao ferro total	15,5	6,9	0,45	3,3
Cloreto	3,1	1,9	0,61	1,0
Colesterol total	22,3	8,2	0,37	2,3
Creatinina	18,7	6,8	0,36	1,0
Creatinina urinária	61,3	43,0	0,70	2,2
Ferro	41,6	29,0	0,70	3,2
Fibrinogênio plasmático	25,6	16,2	0,63	3,9
Folato	64,3	22,6	0,35	3,6
Fosfatase alcalina	33,4	4,4	0,13	6,5
Fósforo	15,8	9,2	0,58	2,0
γ-glutamil transferase	59,8	16,2	0,27	1,7
Glicoemoglobina sanguínea	9,6	1,5	0,16	3,1
Glicose plasmática	12,5	8,3	0,66	1,7
HDL-colesterol	28,3	12,4	0,44	2,5
Homocisteína	36,6	18,0	0,49	6,0
Insulina plasmática	55,9	25,2	0,45	13,0
Lactato desidrogenase	21,6	7,9	0,37	6,0
Nitrogênio ureico	32,1	18,0	0,56	3,7
Peptídeo C	65,7	28,4	0,43	7,2
Potássio	7,7	5,4	0,70	0,5
Proteína total	6,2	3,5	0,56	0,9
Selênio	13,2	5,1	0,39	4,8
Sódio	1,6	1,3	0,81	0,7
Triglicerídeos	56,8	28,8	0,51	4,7
Vitamina A	30,7	9,5	0,31	2,5
Vitamina B_{12}	41,6	13,4	0,32	6,2
Vitamina E	35,1	11,3	0,32	2,9

De: Lacher, 2005.

De modo geral, como é decidido se duas medidas consecutivas de um mesmo paciente diferem estatisticamente? Para tanto, a diferença existente entre as duas medidas deve ser maior que a variabilidade aleatória (ou variância) esperada delas. Para cada quantificação, a variabilidade aleatória rende resultados que estão dentro de 4 variâncias ou 2 desvios-padrão (DP) da média, em 95% dos casos (DP = raiz quadrada da variância). Para duas quantificações, isso equivale a 2,83 DP e é calculado adicionando-se a variância máxima (variância = DP^2) das medidas, seguida da derivação do DP. (A *variância* máxima combinada a partir de duas quantificações [em 95% dos casos] é [2 DP^2] + [2 DP^2], ou 4 variâncias + 4 variâncias = 8 variâncias; o número correspondente de

Tabela 7.2 Diferença clinicamente significativa entre dois resultados de paciente consecutivos

Analito	Alteração
T_4 total	2,2 µg/dL
T_4 livre	0,5 ng/dL
T_3 total	35 ng/dL
T_3 livre	0,1 ng/dL
TSH	0,75 mIU/L
Tiroglobulina	1,5 ng/mL

De: Baloch, 2003.

DPs é a raiz quadrada de 8 ou 2,83 DP). Note que isso é válido somente quando a repetição do teste é realizada sob as mesmas condições laboratoriais (e somente se considera o erro aleatório por causa da variabilidade analítica, e não da variabilidade biológica).

Classificação dos pacientes na tabela da verdade. Idealmente, a distribuição dos resultados de um teste realizado em pacientes normais ("sem doença") deveria ser completamente diferente da distribuição dos resultados feita com pacientes anormais ("com doença"). Nesse caso (Fig. 7.1), qualquer ponto de *cutoff* de referência entre duas distribuições poderia ser perfeitamente discriminado entre ambas as populações de pacientes, de modo que um resultado de teste refletiria com segurança a presença ou a ausência de doença. Infelizmente, testes quase perfeitos são extremamente raros. Em geral, eles não geram populações distintas de resultados de pacientes com e sem doença. Em vez disso, geram uma sequência de resultados e alguma sobreposição de valores entre pacientes com e sem doença (Fig. 7.2). Nessa área de sobreposição (em ambos os *cutoffs*, baixo e alto), o teste é incapaz de discriminar a existência ou a ausência de doença. Essa limitação é inerente a quase todos os testes laboratoriais.

Com base nos resultados obtidos dessas populações com sobreposição, os pacientes podem ser classificados em quatro grupos (Fig. 7.2 e Tab. 7.3). Pacientes corretamente classificados como "anormais" são denominados positivos-verdadeiros (PV), enquanto aqueles corretamente classificados como "normais" correspondem aos negativos-verdadeiros (NV). Observe que esses resultados verdadeiros constituem áreas não sobrepostas de ambas as populações de pacientes. Aqueles incorretamente classificados como "normais" são denominados falso-negativos (FN), e os incorretamente classificados como "anormais" são os chamados falso-positivos (FP). Os resultados falsos ocorrem por causa da sobreposição das duas populações, isto é, porque um teste é incapaz de discriminar completamente todos os pacientes anormais dos normais. Como mostra a Figura 7.3, em que um único *cutoff* é utilizado (para facilitar a ilustração) para discriminar populações com doença daquelas sem doença, variar o *cutoff* irá alterar o número de resultados verdadeiros e falsos de uma dada população. Quando um intervalo de referência possui dois *cutoffs*, como no exemplo do TSH, a sobreposição das populações em ambos os *cutoffs* (baixo e alto) produz resultados falsos. Mudar a proporção de resultados falsos, por sua vez, afetará o poder de discriminação ou a acurácia do teste.

Acurácia do diagnóstico

Acurácia é a capacidade de um teste de discriminar entre dois estados, isto é, existência e ausência de doença, sendo descrita por meio de dois parâmetros essenciais: sensibilidade e especificidade (Galen, 1975).

Sensibilidade é a capacidade do teste de detectar uma doença, sendo expressada como a proporção de indivíduos com doença para os quais o teste resulta positivo (Tab. 7.4). Assim, um dado teste que apresenta sensibilidade de 90% produzirá resultados positivos para 90% dos pacientes com doença (PV) e negativos para 10% desses mesmos pacientes (FN).

Especificidade é a capacidade do teste de detectar a ausência de uma doença, sendo definido como a proporção de indivíduos sem doença aos quais o teste resulta negativo (Tab. 7.4). Desse modo, um teste com 90% de especificidade produzirá resultados negativos para 90% dos pacientes que não apresentam doença (NV), bem como resultados positivos para 10% desses pacientes (FP).

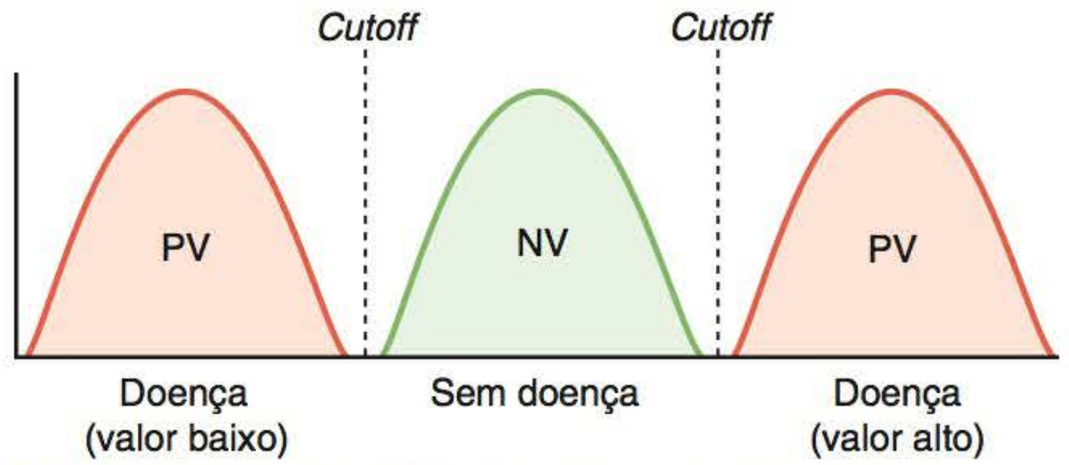


Figura 7.1 Distribuição de resultados de um teste a partir de populações não sobrepostas de pacientes com e sem doença (ver a Tab. 7.3).

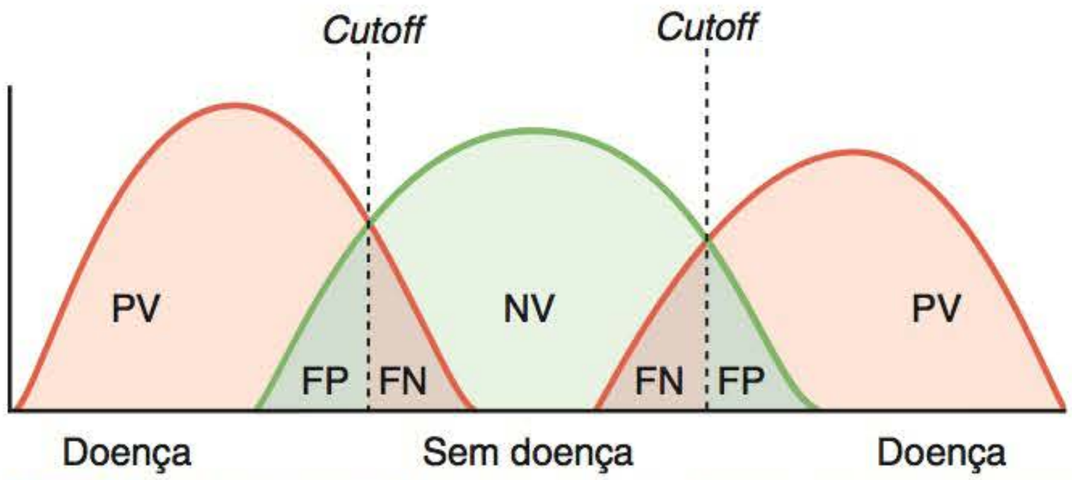


Figura 7.2 Distribuição de resultados de um teste a partir de populações sobrepostas de pacientes com e sem doença (ver a Tab. 7.3).

Tabela 7.3 Tabela-verdade: classificação de pacientes

Resultado	Doença	Sem doença	Total
Positivo PV + FP	Positivo-verdadeiro (PV)		Falso-positivo (FP)
Negativo	Falso-negativo (FN)	Negativo-verdadeiro (NV)	FN + NV
Total	PV + FN	FP + NV	PV + FP + FN + NV

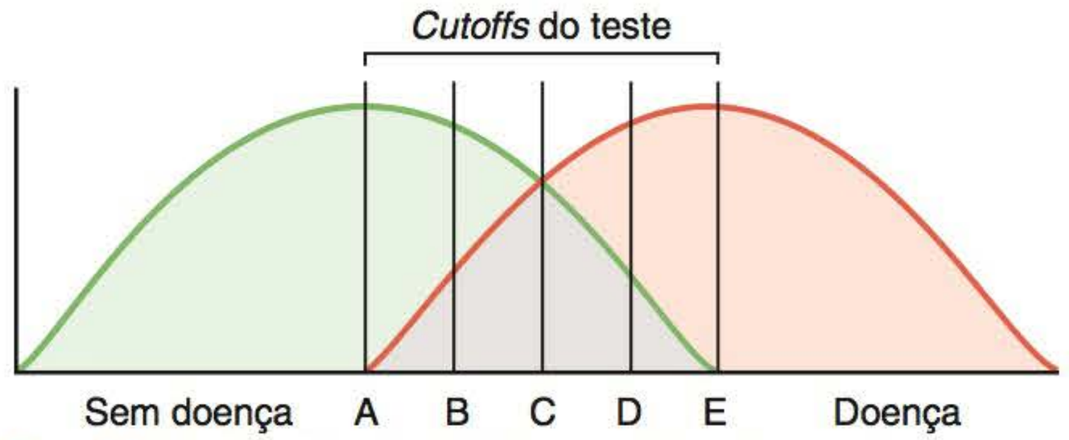


Figura 7.3 Efeito da variação do *cutoff* sobre populações sobrepostas de pacientes com e sem doença.

Um teste com mais sensibilidade identifica uma proporção maior de indivíduos com doença, enquanto um mais específico exclui uma proporção maior de indivíduos sem doença. A sensibilidade também corresponde à taxa de PV, cujo inverso (1 – sensibilidade), é a taxa de FN. Se a sensibilidade do teste for de 95%, 5 entre 100 indivíduos com doença apresentarão resultados negativos. A especificidade corresponde à taxa de NV e seu inverso (1 – especificidade) é a taxa de FP. Se a especificidade do teste for de 95%, 5 entre 100 indivíduos sem doença apresentarão resultados positivos.

Sensibilidade e especificidade no teste diagnóstico

Efeito da alteração do *cutoff* do teste. A sensibilidade e a especificidade medem até que ponto o teste identifica corretamente os indivíduos com e sem doença. Enquanto aos testes são atribuídas uma sensibilidade e uma especificidade, tais medidas variam dependendo do nível de analito (*cutoff*) estabelecido para distinguir os resultados positivos dos negativos. É importante ter isso em mente, pois com frequência a

Tabela 7.4 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo e eficiência

Definição	Exemplo
Sensibilidade (%) = [PV/(PV + FN)] × 100	O teste de marcador cardíaco fornece resultados positivos em 196 pacientes dentre 200 indivíduos com IMA. PV = 196; FN = 4 Sensibilidade (%) = 196/(196 + 4) = 98%
Especificidade (%) = [NV/(NV + FP)] × 100	O teste de marcador cardíaco fornece resultados negativos em 180 pacientes dentre 200 indivíduos sadios. NV = 180; FP = 20 Especificidade (%) = 180/(180 + 20) = 90%
VP IMA	Em uma população de 1.000 pacientes de um hospital, 50 apresentam IMA (prevalência = 50/1.000). Isto significa que 950 pacientes não sofrem de IMA. Com base nas determinações de sensibilidade e especificidade acima: PV = 50 (pacientes IMA) × 0,98 (sensibilidade) = 49 FN = 50 – 49 = 1 NV = 950 (pacientes sem IMA) × 0,90 (especificidade) = 855 FP = 950 – 855 = 95
VP de teste positivo (%) = [PV/(PV + FP)] × 100	VP (marcador cardíaco positivo) = 49/(49 + 95) = 34%
VP de teste negativo (%) = [NV/(NV + FN)] × 100	VP (marcador cardíaco negativo) = 855/(855 + 1) ≈ 100%
Eficiência (%) = [(PV + NV)/(PV + NV + FP + FN)] × 100	(49 + 855)/(49 + 1 + 855 + 95) = 90%

PV = positivo-verdadeiro; NV = negativo-verdadeiro; FP = falso-positivo; FN = falso-negativo; VP = valor preditivo; IM = infarto do miocárdio; IMA = infarto do miocárdio agudo.

sensibilidade e a especificidade são consideradas características fixas do teste, embora não as sejam. A Figura 7.3 ilustra por que alterar o *cutoff* muda a sensibilidade e a especificidade do teste, uma vez que tal alteração está relacionada à sobreposição das populações de pacientes normais e anormais. Observe que, quando o *cutoff* é abaixado (i. e., a linha do *cutoff* é movida para a esquerda), um número maior de pacientes com doença é classificado como "anormal". Assim, mover o *cutoff* de C para B aumentará a sensibilidade. Se o *cutoff* for movido para A, então, todos os indivíduos com doença apresentarão resultado de teste positivo e a sensibilidade será de 100%. Embora isso sugira que pode ser muito útil dispor de um teste cuja sensibilidade é de 100%, a maior sensibilidade tem um preço: a menor especificidade. Dessa forma, o número de indivíduos sem doença com resultado de teste positivo (falso-positivos) aumenta gradativamente de C para B e desse para A. Por outro lado, se o *cutoff* é elevado (i. e., a linha do *cutoff* é movida para a direita), um número maior de pacientes sem doença é classificado como "normal". Assim, mover o *cutoff* de C para D aumentará a especificidade. Se o *cutoff* for movido para E, então, todos os indivíduos sem doença apresentarão resultado de teste negativo e a especificidade será de 100%. A maior especificidade também tem um preço: a menor sensibilidade e um número maior de resultados falso-negativos. Assim, quando o *cutoff* é alterado, é estabelecida uma relação inversa entre sensibilidade e especificidade, resultando em uma compensação entre o número de resultados falso-positivos e falso-negativos. Logicamente, isso só ocorre porque há uma sobreposição das distribuições de resultados de indivíduos com e sem doença. Se não existissem sobreposições, não haveria resultados falsos.

Necessidade de alta sensibilidade *versus* alta especificidade. Resultados falso-positivos e falso-negativos podem conduzir a erro de diagnóstico e despesas desnecessárias com clínicas. Por exemplo, um resultado falso-positivo pode levar à hospitalização indevida de um paciente. Similarmente, um resultado falso-negativo pode resultar na alta de um paciente internado no departamento de emergências, mesmo que ele apresente um distúrbio grave. Os fabricantes tentam constantemente desenvolver novos testes que sejam capazes de discriminar melhor entre populações normais e anormais, apresentando, assim, mais sensibilidade e especificidade. Por exemplo, a cTnI é um indicador mais sensível do que a CK-MB (fração MB da CK) para distinguir pacientes normais daqueles que apresentam lesão miocárdica. A troponina também é bem mais específica que a CK-MB, uma vez que é encontrada apenas no músculo cardíaco e difere da CK-MB, que pode conferir resultados falso-positivos por causa de lesões no músculo esquelético. Entretanto, é quase impossível eliminar completamente os resultados falso-positivos de um dado teste, uma vez que há sempre alguma sobreposição do processo biológico entre indivíduos com e sem doença. Desse modo, nem sempre é possível melhorar a sensibilidade ou a especificidade de um teste sem que haja perda da especificidade ou da sensibilidade, respectivamente. Na maioria das situações, o custo de um resultado falso-positivo ou falso-negativo suplanta o de outro, e o *cutoff* que distingue o "normal" do "anormal" pode ser alterado para reduzir o mais significativo dentre os dois custos. Quando é necessário que a sensibilidade seja elevada, como no caso em que o PSA é utilizado na triagem do câncer de próstata, o *cutoff* poderia ser abaixado para incluir todos os casos em potencial. Entretanto, deve haver certo grau de equilíbrio, pois muitos indivíduos que não têm câncer (incluindo alguns casos de prostatite e hiperplasia nodular) também apresentarão resultado positivo. O *cutoff* atual de 4 ng/mL inclui a maioria dos indivíduos que têm câncer de próstata (PSA positivo-verdadeiro). Por isso, várias biópsias desnecessárias terão que ser realizadas (custo de falso-positivo) para confirmar os poucos casos de câncer. Em geral, uma sensibilidade elevada é requerida quando é extremamente importante não deixar passar nenhum caso de doença.

Por outro lado, o teste precisa ter sensibilidade elevada quando se quer confirmar um diagnóstico, ainda que a doença não admita tratamento. A suspeita clínica pode ser alta ou baixa, porém é suplantada pelo grau de seriedade da doença e requer um diagnóstico absolutamente correto. Um teste altamente específico exclui indivíduos que não apresentam doença (elimina falso-positivos). Apenas elevando o *cutoff* torna-se possível excluir indivíduos sem doença (aumentar a especificidade), embora também possa haver exclusão de alguns indivíduos com doença (Fig. 7.3). Testes altamente específicos são com frequência utilizados em combinação com os de alta sensibilidade, de modo que a menor sensibilidade que ocorre em razão da melhora da especificidade evita perder casos (falso-negativos). Assim, uma elevada sensibilidade é aplicada após a inclusão de todos aqueles que potencialmente poderiam estar doentes (bem como alguns indivíduos sem doença). Por exemplo, para detectar infecção por HIV, um teste inicial adequado seria um ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática), para pesquisa de anticorpos contra antígenos do HIV com amplo espectro de reatividade. Contudo, alguns indivíduos não portadores de HIV, que têm anticorpos com reatividade cruzada, podem apresentar resultado positivo (falso-positivos). Desse modo, um teste altamente específico, como o Western blot, pode ser utilizado em seguida para confirmar a infecção por HIV e excluir os indivíduos não portadores de HIV que inicialmente apresentaram resultado positivo, isso é, falso-positivo. Em diversas circunstâncias, como no caso dos testes confirmatórios, além da alta especificidade, também a sensibilidade é elevada. Entretanto, como são mais inconvenientes ou caros, não são empregados com os testes de triagem. A triagem de fármacos constitui outro exemplo em que são utilizados testes altamente sensíveis para a escolha dos fármacos e, em seguida, para a confirmação dos resultados positivos são realizados testes altamente específicos (como o CG/EM).

Declínio da acurácia. A acurácia diagnóstica de um teste tende a diminuir, à medida que o teste se torna mais amplamente aplicado a uma dada população. Estudos de validação iniciais são realizados com frequência em um pequeno grupo de indivíduos, em que a doença está claramente ausente ou presente. Aqueles que não têm doença muitas vezes são selecionados a partir de uma população de indivíduos que apresenta bom estado geral de saúde. Na prática, contudo, os pacientes exibem um espectro de doenças, como as precoces ou as brandas que se sobrepõem aos indivíduos sem doença, incluindo aqueles com doenças diversas, algumas das quais podem gerar resultados de teste anormais. Assim, a proporção de resultados de teste falsos muitas vezes

é maior na prática clínica do que alega o fabricante, baseado em estudos limitados realizados em indivíduos sadios.

Probabilidade da doença

Na avaliação da capacidade diagnóstica de um teste, tanto a sensibilidade como a especificidade são importantes. Por exemplo, um teste pode apresentar sensibilidade de 100% e mesmo assim não servir para discriminar pacientes com doença daqueles sem doença, isto é, pode resultar positivo em todos os casos. Um teste como esse apresentaria uma especificidade de 0%. Embora esse exemplo seja exagerado, demonstra que um resultado positivo (ou negativo) nem sempre indica a presença ou ausência de doença em um paciente. Portanto, o clínico deve estar muito bem informado sobre o teste, ou seja, quando o resultado for positivo, qual será a probabilidade de o paciente ter a doença; e quando for negativo, qual será a probabilidade de o paciente não ter a doença. Isto é o que comumente se chama de valor preditivo de um teste. Por exemplo, qual é a probabilidade de um paciente com resultado positivo de PSA estar com câncer? Ou, quais são as chances de a não detecção de cTnI excluir a possibilidade de uma lesão miocárdica? Seja qual for o resultado do teste, há sempre algum grau de incerteza em relação ao real estado do paciente. A incerteza diagnóstica é objetivamente expressada como probabilidade quantitativa da doença (Sox, 1986), uma medida da probabilidade de o paciente ter ou não a doença. Para determinar essa informação, é preciso considerar a teoria do valor preditivo, também conhecida como teorema de Bayes.

O *teorema de Bayes* aplica dados da população obtidos com o teste diretamente a um paciente individual, e calcula a probabilidade de haver doença diante de um determinado resultado de teste. A informação proveniente do resultado é incorporada à probabilidade da doença pré-teste para gerar uma probabilidade da doença pós-teste.

A *probabilidade da doença pré-teste,* ou a probabilidade *a priori,* consiste na prevalência da doença no cenário clínico do paciente. Por exemplo, a prevalência de lesão miocárdica entre indivíduos que apresentam dor torácica é maior na unidade de atendimento cardíaco (UAC) do que no departamento de emergências.

A *probabilidade da doença pós-teste,* ou a probabilidade *a posteriori,* é a probabilidade da doença após a realização do teste, sendo comumente referida como valor preditivo do teste.

Dessa forma, o teorema de Bayes descreve a relação entre as probabilidades de pré e pós-teste de haver ou não doença, utilizando a sensibilidade e a especificidade do teste. A probabilidade (pós-teste) de haver ou não doença é calculada conforme mostra a Tabela 7.4.

O *valor preditivo de um teste positivo* (algumas vezes, ainda que incorretamente, referido como valor preditivo do teste positivo) pode ser entendido como a probabilidade de um teste positivo indicar a doença. Trata-se da proporção de indivíduos com teste positivo que verdadeiramente apresentam a doença (Tab. 7.4). O *valor preditivo de um teste negativo* (algumas vezes, ainda que incorretamente, referido como valor preditivo do teste negativo) é a probabilidade de um teste negativo indicar a ausência da doença. Representa a proporção de indivíduos com teste negativo que verdadeiramente não apresentam a doença (Tab. 7.4).

É preciso compreender que, enquanto a sensibilidade e a especificidade descrevem um teste (p. ex., *qual o percentual de pacientes doentes que apresentam resultados anormais?*), o valor preditivo descreve o estado do paciente (p. ex., *quais são as chances de um resultado positivo do paciente indicar que ele tem a doença?*). O valor preditivo depende da sensibilidade, da especificidade e da prevalência da doença que está sendo testada. As Tabelas 7.5 e 7.6 ilustram como a prevalência da doença, a acurácia e o valor preditivo de um teste estão inter-relacionados (teorema de Bayes).

Valor preditivo e prevalência. O valor preditivo de um teste positivo é altamente dependente da prevalência da doença que está sendo testada. Quanto maior for a prevalência (ou a probabilidade pré-teste), maior será o valor preditivo de um teste positivo (ou probabilidade pós-teste). Considere um teste com sensibilidade de 90% e especificidade de 90% para uma doença, cuja prevalência é de 0,1%. Com base na fórmula, o valor preditivo de um resultado positivo (PV+) seria de 0,9%. Se a prevalência se elevar para 5%, o PV+ aumentará para 32%. Assim, o valor preditivo de um teste positivo eleva-se à medida que a prevalência aumenta. O efeito da prevalência sobre o valor preditivo é mostrado na Tabela 7.6. A teoria do valor preditivo quantifica um conceito que é intuitivamente óbvio: um resultado positivo apresenta mais probabilidade de refletir verdadeiramente a doença quando é proveniente de uma população de pacientes com elevada prevalência da doença.

O impacto da prevalência sobre a teoria do valor preditivo tem uma aplicação prática que permite derivar um valor preditivo maior a partir do resultado de um teste realizado sob condições de alta prevalência, comparado à situação em que a prevalência é baixa. Por exemplo, considere a quantificação dos níveis séricos de CK-MB para um paciente internado no departamento de emergências. O valor preditivo de CK-MB anormal poderia ser de apenas 10%. Por outro lado, diante de uma forte suspeita de lesão miocárdica, o paciente poderia ser transferido à UAC, na qual a repetição do teste mostraria níveis séricos de CK-MB elevados com um valor preditivo bem maior. Sob as condições limitadas da UAC, a prevalência de um infarto do miocárdio agudo (IMA) é maior. Também é possível examinar essa situação a partir da perspectiva de probabilidade pré-teste. Para que o paciente seja transferido para a UAC (em vez de permanecer no departamento de emergências), a suspeita clínica de lesão miocárdica deve ser significativamente alta. Uma vez que a probabilidade pré-teste determina a probabilidade pós-teste, a maior suspeita pré-teste traduz-se em uma maior predição da doença.

Para uma doença de baixa prevalência, até mesmo um teste altamente sensível e específico renderá um baixo valor preditivo, pois a maioria de seus resultados positivos será de falso-positivos. Por exemplo, considere uma doença, cuja prevalência é de 1 em 10.000, e um teste com sensibilidade e especificidade de 99%. O PV+ será de apenas 1%, uma vez que 99 entre 100 resultados positivos são falso-positivos. É possível notar que a acurácia dos testes para condições raras deve ser bastante alta, a fim de predizer a doença com segurança. Assim, além

Tabela 7.5 Probabilidade pós-teste (valor preditivo) do Teorema de Bayes

A probabilidade pós-teste (valor preditivo ou VP) depende da acurácia diagnóstica e da prevalência da doença	
Probabilidade pós-teste da doença (VP de um teste positivo) = (prevalência × sensibilidade)/ [(prevalência × sensibilidade) + (1 – especificidade) (1 – prevalência)]	Um teste para fator reumatoide (FR) resultou positivo em 95 pacientes dentre 100 indivíduos com artrite reumatoide (AR) (sensibilidade de 95%), porém também resultou positivo em 10 pacientes dentre 100 indivíduos sem AR (especificidade de 90%). Na prática de reumatologia, a probabilidade pré-teste para AR (prevalência) é de 5% Probabilidade pós-teste da doença = (0,05 × 0,95)/[(0,05 × 0,95) + (1 – 0,90) (1 – 0,05)] = 0,0475/(0,0475 + 0,095) = 0,33 ou 33%
Probabilidade pós-teste de ausência de doença (VP de um teste negativo) = [(1 – prevalência) (especificidade)]/[(1 – prevalência) (especificidade) + (1– sensibilidade) (prevalência)]	Para as mesmas condições de teste Probabilidade pós-teste de ausência de doença = [(1 – 0,05) x 0,9]/[(1 – 0,05) × 0,9 + (1 – 0,95) × (0,05)] = 0,855/(0,855 + 0,0025) = 0,997 ou 99,7%

Tabela 7.6 Valor preditivo de um teste positivo: efeito da prevalência e da acurácia

	Valor preditivo de teste positivo (%)	
Prevalência (%)	**Sensibilidade (90%) Especificidade (90%)**	**Sensibilidade (99%) Especificidade (99%)**
0,01	0,09	0,9
0,1	0,9	9
5	32,1	83,9
50	90,0	99

de requerer uma sensibilidade quase perfeita, os testes utilizados na triagem de doenças raras são mais úteis em casos de populações seletas, que oferecem mais probabilidade pré-teste.

Por outro lado, o valor preditivo de um teste negativo diminui à medida que a prevalência da doença aumenta. Entretanto, o efeito é pequeno, especialmente quando a sensibilidade e a especificidade são altas. A prevalência influencia extensivamente o valor preditivo de um teste negativo somente quando a prevalência inicial é elevada.

Valor preditivo e acurácia. Tenha em mente que uma melhor acurácia (i. e., sensibilidade e especificidade) aumenta o valor preditivo de um teste. A fórmula para o valor preditivo (Tab. 7.5) do teorema de Bayes mostra que a sensibilidade e a especificidade influenciam o valor preditivo. Além disso, conforme mostra a Tabela 7.6, o valor preditivo de um teste positivo aumenta com o aumento da prevalência e uma melhor acurácia. A especificidade exerce impacto maior sobre o valor preditivo de um teste positivo, enquanto a sensibilidade é o fator determinante do valor preditivo de um teste negativo. Também é possível apreciar essa relação na Tabela 7.4, em que se observa que o número de falso-positivos influencia diretamente o valor preditivo de um teste positivo, enquanto o número de falso-negativos exerce o mesmo efeito sobre um teste negativo.

Quando se muda o *cutoff*, a acurácia (i. e., a proporção de resultados falsos) e o valor preditivo também mudam. Considere um teste do D-dímero para exclusão de trombose venosa em pacientes que chegam ao departamento de urgências. Na população de referência, um valor maior que 400 U/mL é considerado anormal e indicativo de trombose. Para um paciente do departamento de emergências, que esteja apresentando sintomas sugestivos de trombose, um valor de D-dímero ainda menor será tão preditivo quanto um valor > 400 U/mL em uma população geral. (Lembre-se de que a probabilidade pós-teste depende da probabilidade pré-teste). Considere que um *cutoff* de 400 U/mL não corresponde a uma sensibilidade de 100% e exclui alguns pacientes que apresentam trombose, rendendo, assim, falso-negativos. Como não se pode arriscar negligenciar um possível caso de trombose, poderia ser estabelecido um valor de 200 U/mL para diminuir a proporção de falso-negativos e aumentar consideravelmente o valor preditivo de um teste negativo. Um teste negativo poderia, então, ser utilizado para excluir a possibilidade de trombose e destacar a necessidade de estudos adicionais mais caros, como um ultrassom da perna.

Curva característica de operação do receptor (ROC)

Com base na discussão anterior, fica claro que a sensibilidade e a especificidade estão inversamente correlacionadas e que são alteradas pelo *cutoff* de um teste. Assim, a pergunta óbvia com a qual se depara o laboratorista é "Que *cutoff* deve ser utilizado e há alguma preferência?". A ROC ajuda a responder a essa questão.

A análise ROC baseia-se na teoria de detecção de sinal, desenvolvida no contexto da detecção de sinal eletrônico ou de radar, para discriminar um sinal de um ruído. Os *operadores* de radar utilizavam certas *características* para decifrar o significado das imagens *recebidas* na tela do radar. *Curvas* eram, então, criadas para representar a acurácia do sinal gerado.

A representação gráfica de ROC é uma medida completa da acurácia de um teste, a capacidade do teste de discriminar entre duas respostas alternativas – com doença e sem doença (Zweig, 1993). Como extensão da sensibilidade e da especificidade, a curva é uma representação gráfica das sensibilidades e das especificidades variáveis que podem resultar da variação do *cutoff* de um teste. Uma única sensibilidade e especificidade proporcionam apenas uma única visão (com base em um determinado *cutoff*) da capacidade do teste de discriminar entre ausência e presença de doença. Por meio da simples alteração do *cutoff*, é possível determinar muitas combinações diferentes de sensibilidade e especificidade para um teste em particular. Em alguns casos, uma sensibilidade maior poderia ser preferível e poderia se saber a especificidade no novo *cutoff*. Por outro lado, o *cutoff* poderia ser elevado para reduzir o número de falso-positivos e poderia se conhecer a nova sensibilidade do teste. A vantagem da curva de ROC consiste na representação de todo o espectro de pares sensibilidade-especificidade empregando todas as possibilidades de *cutoff*. Repare que cada valor de sensibilidade está acoplado a um único valor de especificidade.

A curva ROC é gerada pela representação da sensibilidade (eixo *y*) *versus* 1 – especificidade (eixo *x*), ou da taxa de positivo-verdadeiros *versus* taxa de falso-positivos, respectivamente (Fig. 7.4). Cada ponto da curva ROC representa a sensibilidade e a especificidade para um possível *cutoff* diagnóstico. A curva mostra claramente a inevitável compensação observada entre a sensibilidade e a especificidade, à medida que se varia o *cutoff*. Quando a sensibilidade aumenta, a especificidade diminui. Na Figura 7.4, o ponto A tem maior sensibilidade, porém menor especificidade, enquanto o ponto E apresenta maior especificidade e menor sensibilidade. Esses valores correspondem às mudanças de *cutoff* observadas na Figura 7.3. O ponto E na curva ROC corresponde ao *cutoff* mais alto observado na Figura 7.3, enquanto o ponto A corresponde ao *cutoff* mais baixo. O ponto central (C) fornece a melhor combinação de sensibilidade e especificidade na curva ROC.

Um teste que discrimina perfeitamente entre a presença e a ausência de doença estará localizado no quadrante esquerdo superior. Nesse ponto, a taxa de positivos-verdadeiros (ou sensibilidade) é de 100%, e a taxa de falso-positivos é igual a zero (ou 100% de especificidade). Um teste sem capacidade de discriminação localiza-se na linha diagonal (45º). As curvas ROC da maioria dos testes localizam-se entre essas duas linhas. Quanto mais elevado estiver o ponto Y, menor será o número de falso-negativos; e quanto mais afastado estiver o ponto X, maior será o número de falso-positivos. As curvas ROC constituem um meio de comparar facilmente o desempenho de dois ou mais testes. Assim, uma curva situada mais proximamente ao quadrante esquerdo superior está associada a um teste mais acurado. Na Figura 7.5, o Teste 1 proporciona maior acurácia diagnóstica do que o Teste 2, uma vez que o Teste 1 apresenta sensibilidade maior que o Teste 2 em cada um dos pontos da curva. Visualmente, dois testes podem ser facilmente contrastados por suas posições relativas.

Em uma curva isolada, o ponto que está mais próximo do quadrante esquerdo superior representa o *cutoff* de maior acurácia diagnóstica. A seleção de um *cutoff* depende da opção mais desejável: uma sensibilidade maior ou uma especificidade maior. Na prática, o *cutoff* com sensibilidade e especificidade máximas geralmente é selecionado como limite da decisão. Como ocorre com outras medidas da acurácia diagnóstica, a prevalência da doença não afeta a curva.

Algumas vezes, as curvas de dois testes se cruzam (Fig. 7.6), indicando que um deles é superior a altas sensibilidades e que o outro é superior a especificidades elevadas. O melhor teste, então, é aquele que está mais de acordo com as necessidades clínicas. Os testes de triagem devem ter sensibilidade muito alta. No exemplo (Fig. 7.6), o Teste B é o melhor teste de triagem. A uma sensibilidade de 97%, ele apresenta uma taxa de falso-positivos menor do que o Teste A (28% contra 40%). Testes de confirmação (diagnósticos definitivos) precisam ter alta especificidade. O A é o melhor teste de confirmação. A uma taxa de falso-positivos de 2% (especificidade de 98%), o Teste A apresenta maior sensibilidade que o B (59% contra 47%).

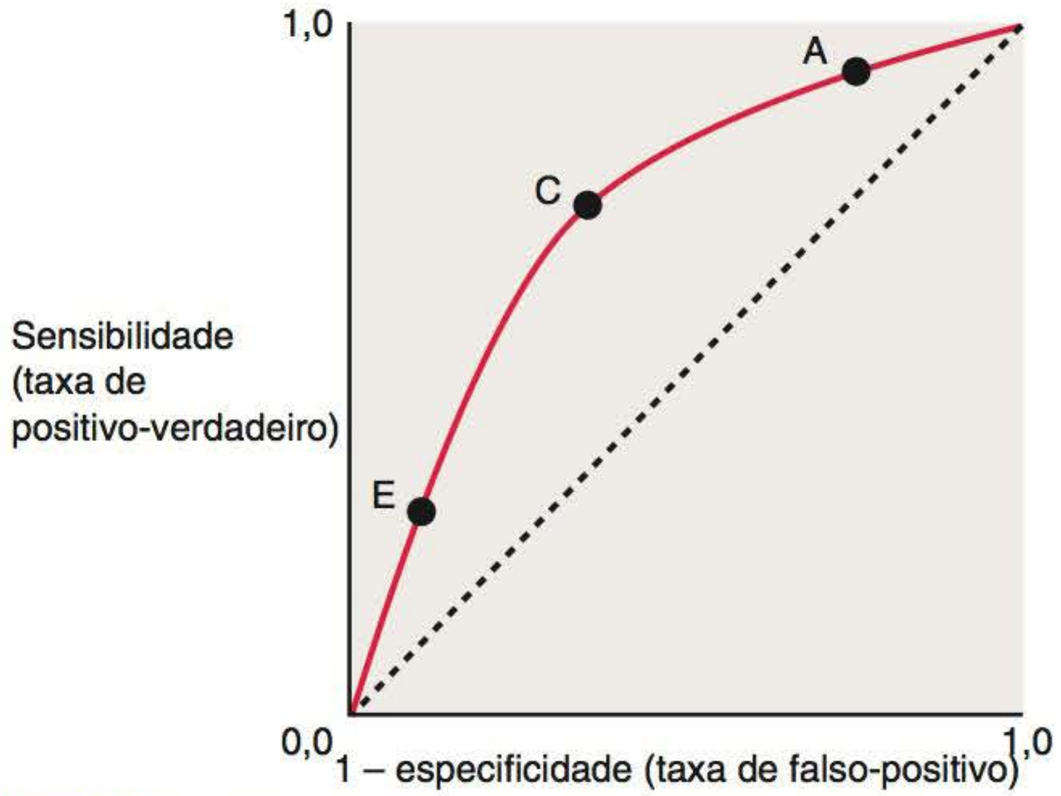


Figura 7.4 Curva ROC: efeito da variação do valor de *cutoff* no isolamento das condições de doença e de ausência de doença (ver também a Fig. 7.3).

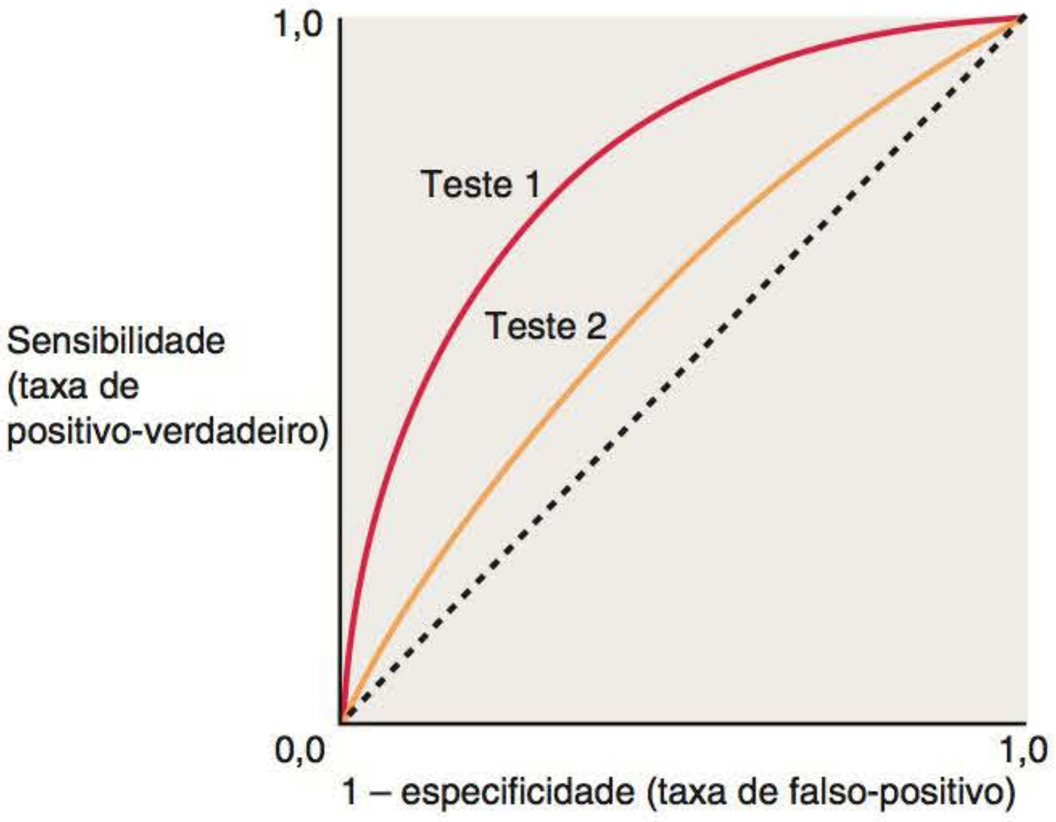


Figura 7.5 Curvas ROC para dois testes. Note que o Teste 1 é sempre superior ao Teste 2, visto que apresenta mais sensibilidade que esse (i. e., está sempre acima e à esquerda do Teste 2).

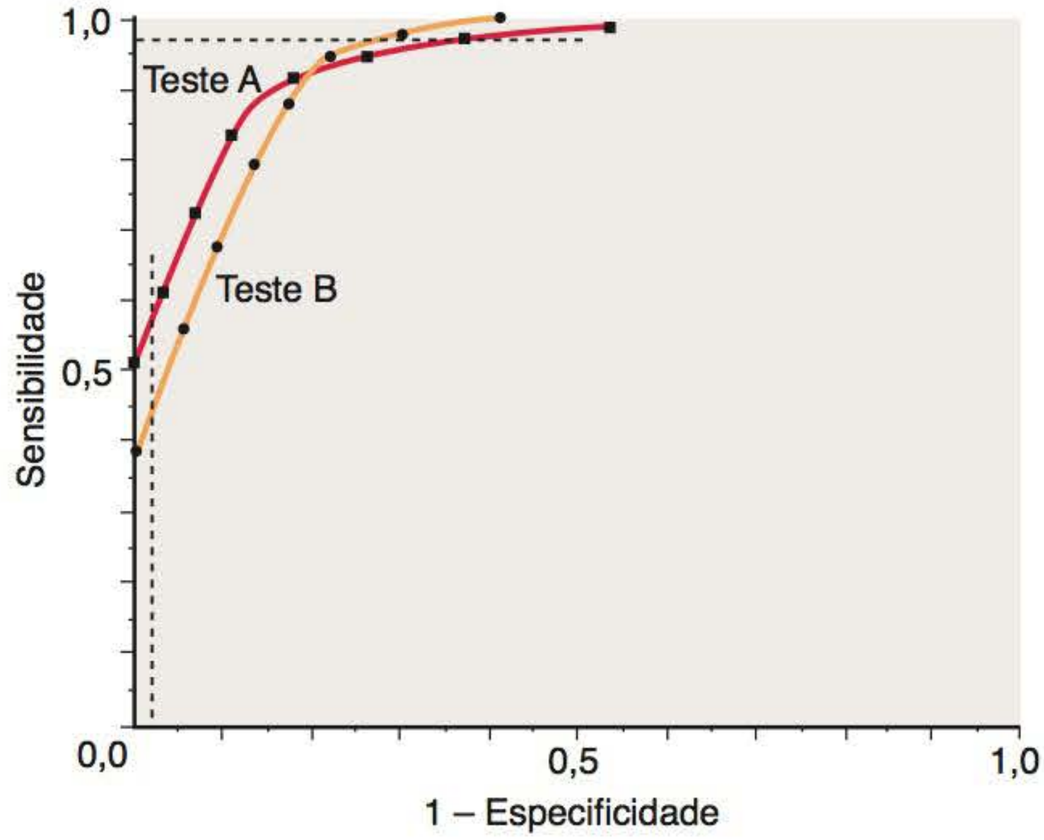


Figura 7.6 Curvas ROC para dois testes. Note que as curvas se cruzam. Leia o texto para a interpretação do gráfico.

A área abaixo da curva ROC representa um número único que descreve a acurácia geral de um teste. Trata-se de uma descrição quantitativa do grau de proximidade entre a curva e o quadrante esquerdo superior e representa a acurácia de um teste ao longo de toda a amplitude de sensibilidade e especificidade, não apenas para um determinado *cutoff* ou parte do gráfico. Uma área igual a 1 representa um teste perfeito, enquanto uma área igual a 0,5 (em que a curva é a diagonal de 45º) representa um teste sem capacidade de discriminação. O valor matemático da área é fornecido por programas de computador que empregam métodos estatísticos para comparar dois testes.

A curva ROC deve ser estudada visualmente, para determinar o ponto que fornece o grau de sensibilidade e especificidade mais adequado às decisões clínicas. Quando as curvas se cruzam (Fig. 7.6), considera-se que ambas apresentam acurácias diferentes em regiões distintas do gráfico.

A área sob a curva tem implicações preditivas diretas. Um valor de 0,9 significa que, em 90% dos casos, dois indivíduos tomados ao acaso (um sadio e outro doente) são corretamente classificados pelo teste. Com relação à acurácia do teste, uma área > 0,9 é considerada excelente, uma área < 0,7 é considerada insatisfatória e um valor intermediário é considerado bom ou regular.

Eficiência de um teste

A eficiência é a capacidade do teste identificar corretamente um resultado verdadeiro, em outras palavras, positivos-verdadeiros e negativos-verdadeiros. É expressada como percentual de resultados verdadeiros (Tab. 7.4), ou como a proporção de positivos-verdadeiros e negativos-verdadeiros entre todos os resultados. Enquanto a sensibilidade e a especificidade referem-se à capacidade do teste de distinguir entre presença e ausência de doença, a eficiência mede a capacidade de detectar todos os resultados verdadeiros. Assim, positivos-verdadeiros e negativos-verdadeiros são tratados da mesma forma, exatamente como os falso-positivos e falso-negativos recebem o mesmo peso. Na prática, um dos resultados falsos (FP ou FN) frequentemente é mais importante do que outro, do ponto de vista clínico, e a eficiência não considera esse aspecto. Desse modo, um teste introduzido para identificar todos os pacientes com uma determinada doença pode ser altamente eficiente, contudo é possível que não atenda a todas as necessidades clínicas, uma vez que a taxa de falso-negativos é muito alta.

Há casos em que é preferível selecionar um *cutoff* que corresponda à maior eficiência, e essa relação pode ser visualizada em um gráfico de eficiência *versus cutoff*. Repare que o *cutoff* pode ser escolhido com o objetivo de reduzir o número de falso-positivos ou falso-negativos, dependendo de qual seja o mais importante.

Assim com o valor preditivo, a eficiência do teste é influenciada pela prevalência da doença. Por essa razão, a eficiência deve ser interpretada com cautela quando a prevalência é muito baixa ou muito alta. Diante de prevalências extremas (muito superior ou muito inferior a 50%), mas principalmente quando a prevalência é muito baixa, o *cutoff* pode ser mudado para que não haja nenhum resultado falso em nenhuma categoria. Dessa forma, um teste considerado altamente eficiente pode ser pouco sensível ou pouco específico.

Razões prováveis

Ao interpretar resultados, o clínico não só considera se o resultado de um teste é normal ou anormal, como também quão alto ou baixo é o seu valor em relação ao limite de referência. Por exemplo, uma concentração de ALT igual a 60 U/L (com um limite superior de 55 U/L) geralmente recebe tratamento diferente daquele dispensado a uma concentração de ALT de 2.000 U/L, visto que o primeiro caso é bem menos indicativo de doença hepática que o segundo. A taxa de probabilidade quantifica o que o clínico talvez saiba intuitivamente – quanto mais distante estiver um resultado do limite de referência, maior é a probabilidade de uma indicação de doença.

A taxa de probabilidade (TP) é a razão entre duas probabilidades: a de ocorrer um resultado de teste quando a doença existe (verdadeiro-positivo) dividida pela probabilidade de ocorrer o mesmo resultado na ausência de doença (falso-positivo). Em outras palavras, o cálculo informa quais são as chances (ou a probabilidade) de ocorrer um resultado de teste para um paciente com doença, em oposição a um paciente sadio. Quanto maior for a taxa de probabilidade de um teste positivo, mais útil é a informação fornecida pelo teste positivo. Por exemplo, considere a quantificação dos níveis séricos de lipase na detecção de pancreatite aguda. Os valores de lipase poderiam estar elevados (acima do *cutoff* de 200 U/L) em 90 pacientes de um total de 100 indivíduos com pancreatite aguda, porém, de modo semelhante, também poderia estar elevado em 10 pacientes de um total de 100 indivíduos apresentando dor abdominal de causas diversas. A taxa de probabilidade seria igual a 9, indicando uma probabilidade 9 vezes maior de encontrar níveis de lipase anormais em indivíduos com pancreatite, em comparação aos indivíduos sem a doença; ou uma probabilidade de um número 9 vezes maior de indivíduos com pancreatite apresentarem aumento dos níveis de lipase, comparado ao número de indivíduos com outras doenças abdominais. A taxa de probabilidade refere-se à possibilidade de ocorrer um dado resultado de teste, quando se considera uma determinada doença. Isso não é o mesmo que uma probabilidade 9 vezes maior de pancreatite mediante níveis de lipase anormais. Esse último seria o valor preditivo de um teste lipase-positivo.

A TP pode ser derivada a partir da sensibilidade e especificidade (Tab. 7.7). Assim como as demais medidas de acurácia de um teste, a TP é uma avaliação do *status* do teste ou de seu desempenho, e não do estado da doença no paciente submetido ao teste. A TP também não é influenciada pela prevalência da doença, podendo ser calculada para múltiplos níveis de resultados de teste. Assim, o grau de anormalidade

Tabela 7.7 Taxa de probabilidade (TP)

Definição	
Probabilidade de ocorrer um resultado de teste em indivíduos com doença/ probabilidade de ocorrer o mesmo resultado de teste em indivíduos sem doença	
Exemplo	
TP de teste positivo = sensibilidade/ (1 – especificidade)	Considerando a Tabela 7.5, utilizando o teste de FR, que resulta positivo em 95 pacientes dos 100 indivíduos com AR (sensibilidade de 95%), e também em 10 pacientes dos 100 indivíduos sem AR (especificidade de 90%)
	TP de teste positivo = (95/100)/(10/100) = 9,5
TP de teste negativo = (1 – sensibilidade)/ especificidade	O mesmo teste de FR, que resulta negativo em 90 pacientes dos 100 indivíduos sem AR e também em 5 pacientes dos 100 indivíduos com AR
	TP de teste negativo = (5/100)/(90/100) = 0,06

de um resultado pode ser considerado e as decisões médicas podem ser tomadas em um ponto em que há um número menor de resultados falso-negativos e positivos.

A TP também pode ser derivada a partir da curva ROC. A inclinação da curva ROC – sensibilidade/ (1 – especificidade) – em qualquer valor de *cutoff* gera a TP de um teste positivo naquele valor. Na Tabela 7.7, observa-se que a TP corresponde à divisão da taxa de positivos-verdadeiros (sensibilidade) pela taxa de falso-positivos (1 – especificidade). Ao longo de uma extensão maior da curva, a TP corresponde à mudança da sensibilidade dividida pela mudança da especificidade. Como ocorre com a área abaixo da curva, o uso da TP derivada sem a apreciação da curva real pode conduzir ao erro. Uma TP elevada pode não implicar necessariamente um teste útil, pois um teste pode apresentar TP elevada ainda que seja muito pouco sensível.

Outro modo mais prático de entender a TP é a partir do ponto de vista da probabilidade pré e pós-teste. A TP e a probabilidade pré-teste (prevalência) podem ser utilizadas para calcular a probabilidade pós-teste (valor preditivo). Isso é ilustrado pelos exemplos da Tabela 7.8. Para um teste positivo, qualquer TP > 1 aumentará a probabilidade pós-teste. Quanto maior for a TP, maior será a diferença existente entre as probabilidades pré e pós-teste. Independentemente da prevalência, uma TP elevada aumenta a possibilidade de um resultado de teste positivo predizer uma doença. Ocorre o contrário com um resultado de teste negativo, para o qual uma TP < 1 diminuirá a probabilidade pós-teste. Quanto menor for a TP, maior será a diferença existente entre as probabilidades pré e pós-teste. Assim, os testes que podem ser úteis à prática clínica são aqueles em que um resultado positivo apresenta uma TP elevada e um resultado negativo, uma TP baixa.

Tabela 7.8 Taxa de probabilidade (TP) e probabilidade da doença

A TP e a probabilidade pré-teste (prevalência) podem ser utilizadas para calcular a probabilidade pós-teste (valor preditivo). Isso pode ser melhor compreendido quando se expressa a probabilidade em termos de chances

Definições	
Chances = probabilidade/ (1 – probabilidade)	Etapa 1: a probabilidade pré-teste é convertida em chances de pré-teste para calcular as chances de pós-teste da doença ou da ausência de doença (ver exemplos)
Chances de pós-teste = chances de pré-teste × TP	Etapa 2: calculam-se as chances de pós-teste. Note que a TP de um resultado positivo ou negativo aumenta, de mesmo modo que as chances de o resultado predizer doença ou ausência de doença, respectivamente
Probabilidade = chances/ (1 + chances)	Etapa 3: as chances são convertidas novamente em probabilidade para calcular a probabilidade pós-teste (valor preditivo) de um teste positivo ou negativo
Exemplo 1	
Considerando a Tabela 7.5, a probabilidade pré-teste para AR é igual a 5% em uma dada clínica de reumatologia. A partir da Tabela 7.7, observa-se que a TP de um teste de FR positivo é 9,5. Repare que a probabilidade da doença aumenta de 5% (pré-teste) para 33% (pós-teste) por causa do resultado de teste positivo	
Chances de pré-teste da doença = probabilidade pré-teste/ (1 – probabilidade pré-teste)	Chances de pré-teste = 0,05/0,95 = 0,053 a 1
Chances de pós-teste da doença = probabilidade pré-teste × TP de teste positivo	Chances de pós-teste = 0,053 × 9,5 = 0,5 a 1
Probabilidade pós-teste = chances/(1 – chances)	Probabilidade pós-teste = 0,5/1,5 = 0,33 ou 33%
Exemplo 2	
Considerando a Tabela 7.7, a TP de um teste de FR *negativo* é igual a 0,06. Enquanto a probabilidade de doença aumenta de 5% (pré-teste) para 33% (pós-teste), devido ao resultado de teste positivo (exemplo 1), a probabilidade de doença diminui de 5% (pré-teste) para 0,3% (pós-teste) por causa do resultado de teste negativo	
Chances de pré-teste da doença = probabilidade pré-teste/ (1 – probabilidade pré-teste)	Chances de pré-teste = 0,05/0,95 = 0,053 a 1
Chances de pós-teste da doença = probabilidade pré-teste × TP de teste negativo	Chances de pós-teste = 0,053 × 0,06 = 0,003 a 1
Probabilidade pós-teste = chances/(1 – chances)	Probabilidade pós-teste = 0,003/1,003 = 0,003 ou 0,3%

Acurácia diagnóstica e necessidade clínica

Para ajudar os clínicos a predizer doenças, o laboratório clínico deve fornecer testes com acurácia diagnóstica adequada. Um teste que não discrimina satisfatoriamente entre presença e ausência de doença provavelmente não apresenta poder preditivo. O laboratório pode alterar a sensibilidade ou a especificidade de um teste para atingir metas clínicas. De um modo geral, testes de triagem devem ser altamente sensíveis para evitar a exclusão de indivíduos com doença. É o que ocorre na avaliação de bebês para detecção de hipotireoidismo neonatal, ou no exame para infarto do miocárdio realizado em indivíduos adultos com dor torácica, no departamento de emergências. Em ambas as situações, a suspeita da doença talvez não seja forte, porém seu grau de seriedade e a disponibilidade de intervenções terapêuticas determinam que nenhum caso deve ser perdido. Essa abordagem pode gerar muitos gastos com resultados falso-positivos desnecessários, ainda que inevitavelmente. Um teste com alta sensibilidade também é utilizado para excluir doenças, uma vez que possui alto valor preditivo para um teste negativo.

Os testes de confirmação, como os de HIV, devem ser altamente específicos. Isso é particularmente válido quando há pouca evidência clínica para sustentar a presença de uma doença, ou quando é necessário garantir um diagnóstico, por tratar-se de uma doença séria e porque um resultado falso-positivo teria um alto custo.

A acurácia diagnóstica do teste aliada à prevalência determinam a probabilidade da doença (valor preditivo de um teste positivo). Uma melhor acurácia diagnóstica leva a um melhor poder preditivo. Além disso, o valor preditivo de um teste positivo melhora quando a prevalência (ou probabilidade pré-teste) é alta. A elevação dos níveis de PSA em um paciente idoso do sexo masculino, que apresenta aumento do tamanho da próstata, reflete uma probabilidade de câncer maior do que na população masculina em geral. Como consequência, no caso de uma doença rara, a maioria dos resultados positivos será de falso-positivos.

A probabilidade pré-teste da doença (prevalência) afeta a probabilidade pós-teste, mas também influencia a interpretação do teste. Assim, um teste positivo exerce efeito maior quando a probabilidade pré-teste é baixa, enquanto o efeito de um teste negativo é maior quando a probabilidade pré-teste é alta. Se há forte suspeita em relação a um dado diagnóstico clínico, um teste positivo não acrescentará muitas informações à avaliação clínica. Além disso, se a probabilidade pré-teste for muito alta, até mesmo um teste negativo poderá ter

pouco efeito sobre a supervisão do paciente, a menos que a sensibilidade do teste seja de 100%. O maior benefício que um teste pode proporcionar é obtido nos casos de incerteza moderada em relação à doença, isso é, quando a probabilidade pré-teste é intermediária. Um benefício semelhante também é obtido quando a probabilidade pré-teste se aproxima do ponto de decisão médica, de tal modo que o teste influenciará consideravelmente o curso da ação.

Medicina baseada em evidência

Historicamente, as decisões médicas têm se apoiado fortemente na experiência clínica, na opinião de especialistas, bem como em outras fontes de informação subjetivas ou não controladas. Essa realidade também se aplica à medicina laboratorial, em que com frequência há uma fundamentação inadequada das evidências que sustentam as práticas existentes (Price, 2000, 2003). Por exemplo, o motivo pelo qual um teste é requisitado pode não ser claramente compreendido – isso é, que pergunta clínica o teste tenta responder? De maneira alternativa, talvez não haja nenhuma informação sobre a possibilidade de ou quando um teste influencia o resultado do paciente, como morbidade, mortalidade, relação custo-benefício, satisfação do paciente, risco e desconforto (Bruns, 2001). Por exemplo, o teste rápido melhora o diagnóstico e a liberação do paciente do departamento de emergências? (Kendall, 1998; Price, 2003; Bruns, 2001; Westgard, 2004; Trenti, 2003). Estudos sobre efetividade clínica no laboratório são difíceis de encontrar, pois são caros e de planejamento complicado (McQueen, 2001; Price, 2003). Além disso, a consulta laboratorial muitas vezes baseia-se na tradição de experiência clínica e laboratorial, considerando bem menos uma abordagem sistemática para determinação da melhor evidência disponível (Price, 2003; Gyatt, 1992).

Contrastando com as abordagens tradicionais, a medicina baseada em evidência (MBE) é um processo por meio do qual as decisões médicas podem ser tomadas utilizando-se o máximo de ferramentas objetivas possível. A MBE é uma prática sistemática que integra a mais moderna e a melhor das evidências ao conhecimento clínico e às preferências do paciente durante a tomada de decisão médica (Sackett, 2000). A MBE enfatiza a análise crítica de informações provenientes da literatura, bem como o desenvolvimento de conhecimento para a prática médica (Sackett, 1983; Elstein, 2004, 1980; Sackett, 1991; Ludmerer, 2004). A MBE incentiva o cultivo do aprendizado contínuo e o compartilhamento do conhecimento médico em todos os níveis de treinamento, do estudante de medicina ao médico profissional (Ludmerer, 2004). Desde a sua introdução, a MBE tem crescido para se tornar uma ferramenta essencial disponível a todos os prestadores de assistência à saúde.

A prática da medicina baseada em evidência tem cinco etapas (Price, 2000, 2003; Sackett, 2000): (1) elaborar uma pergunta clínica com base no encontro com um paciente; (2) adquirir informação buscando recursos; (3) analisar e avaliar criticamente a informação e buscar uma conclusão que responda à pergunta clínica; (4) aplicar a informação aos pacientes individualmente; (5) verificar a efetividade e monitorar a literatura.

O encontro clínico de um paciente com um prestador de assistência à saúde geralmente resulta em um questionamento que necessita da realização de um ou mais testes laboratoriais – seja para triagem, diagnóstico, prognóstico ou monitoramento de tratamento (McQueen, 2001). A pergunta desenvolvida deve ser específica a uma decisão que deve ser tomada para o paciente envolvido. Essa pergunta compara uma intervenção, como a requisição de um teste diagnóstico, com a prática aceita. A pergunta clínica pode ser descrita em quatro partes e resumida pela sigla PICO (Elstein, 2004; Sackett, 2000): problema (P, *problem*): qual é o problema de interesse especificamente para o paciente?; intervenção (I, *intervention*): que intervenção está sendo considerada?; comparação (C, *comparison*): a que alternativas é possível comparar a intervenção?; resultado (O, *outcome*): existe um resultado clínico quantificável que possa ser medido?

Por exemplo, um homem de 55 anos de idade, que voltou recentemente de uma viagem da Europa, queixa-se de um inchaço na perna direita. No exame constatou-se que a região estava quente, avermelhada e inchada. A pergunta clínica pode ser resumida da seguinte forma: *problema*: o teste de D-dímero é um bom "teste de exclusão" para trombose de veia profunda, considerando-se que o paciente é um homem de meia-idade que apresenta fator de risco para trombose (como a duração da viagem)?; *intervenção*: teste de D-dímero; *comparação*: ultrassom venoso ou venografia como método de referência; *resultado*: valor preditivo do teste de D-dímero na "exclusão" de trombose de veia profunda.

Um segundo exemplo poderia ser: um homem de 58 anos de idade, que apresenta fibrilação atrial, chega ao departamento de emergências com sangramento gastrintestinal por overdose de warfarina. *Problema*: a vitamina K é efetiva na correção de coagulopatias causadas por overdose de warfarina; *intervenção*: administração de vitamina K; *comparação*: plasma fresco congelado pode ser um tratamento alternativo; *resultado*: correção do sangramento e do tempo de protrombina.

A estratégia utilizada para responder a essas perguntas deve ser determinada antes de iniciar a busca de recursos, a fim de evitar a introdução de viés de seleção. As fontes de informação incluem livros-texto, periódicos, livros-texto eletrônicos e resumos de periódicos. Os livros-texto, embora possam fornecer uma introdução à patofisiologia da doença, não contêm as melhores evidências em voga. Os artigos de periódicos fornecem informação mais atualizada que os livros-texto, porém tornam-se igualmente ultrapassados com o tempo, depois de terem sido escritos, aceitos e publicados. Os estudos clínicos randomizados com controle (RCTs, *Randomized Clinical Controlled Trials*) com duplo-cego constituem a informação mais valiosa dos artigos de periódicos, pois são menos tendenciosos. Entretanto, os RCTs são muito dependentes dos métodos empregados na realização do duplo-cego e no tratamento dos indivíduos (Lijmer, 1999).

Artigos secundários e metanálises (uma técnica estatística para integrar resultados de múltiplos estudos) resumem as melhores evidências atuais, além de fornecer orientações sobre a prática. O *Centre for Evidence-Based Medicine* (Centro de Medicina Baseada em Evidência; http://www.uptodate.com/) e o *Best Clinical Evidence* (Godlee, 2004) são fontes de informações resumidas. A série de periódicos *Evidence-Based Medicine* (ebm.bmjjournals.com) também é uma excelente fonte de resumos atualizados. Apesar de conveniente, um resumo de artigo deve ser avaliado com cautela, visto que um "especialista" pode introduzir distorções relacionadas a quais estudos são acessados e ao valor atribuído a determinados artigos em particular. As ferramentas para tomada de decisão médica ajudam a analisar, de forma crítica, e a resumir cada uma das etapas do processo (Guyatt, 2002).

Referências bibliográficas

Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al: Guidelines Committee, National Academy of Clinical Biochemistry. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Thyroid 2003; 13(1):3–126.

Bruns DE: Laboratory related outcomes in healthcare. Clin Chem 2001; 47(8):1547–1552.

Elstein AS, Frazier HS, Neuhauser D, et al: Clinical Decision Analysis, 1st ed. Philadelphia, WB Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., 1980.

Elstein AS: On the origins and development of evidence-based medicine and medical decision-making. Inflamm Res 2004; 53(Suppl 2):S184–S189.

Galen RS, Gambino SR: Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1975.

Este livro serve de introdução para compreender a interpretação de um teste laboratorial. Os aspectos básicos da acurácia do teste diagnóstico e do valor preditivo dos testes são bem destacados.

Godlee FE: Clinical Evidence Concise, 11th ed. Richmond, VA, BMJ Publishing Group, 2004.

Guyatt G, Cairns J: Evidence-based medicine: A new approach to teaching the practice of medicine. JAMA 1992; 268(17):2420–2425.

Guyatt G, Rennie D: User's Guide to the Medical Literature: A Manual for Evidence-Based Clinical Practice, 4th ed. Chicago, IL, American Medical Association, 2002.

Kendall JB, Reeves B, Clancy M: Point of care testing: Randomized controlled trial of clinical outcome. BMJ 1998; 316:1053–1057.

Lacher DA, Hughes JP, Carroll MD: Estimate of biological variation of laboratory analytes based on the Third National Health and Nutrition Examination survey. Clin Chem 2005; 51(2):450–452.

Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, et al: Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. JAMA 1999; 282(11):1061–1066.

Ludmerer KM: Learner centered medical education. NEJM 2004; 351(12):1163–1164.

McQueen MJ: Overview of evidence-based medicine: Challenges for evidence-based laboratory medicine. Clin Chem 2001; 47(8):1536–1546.

Visão geral da prática de MBE, relacionada ao laboratório, incluindo exemplos e fontes úteis.

Price CP: Evidence-based laboratory medicine: Supporting decision-making. Clin Chem 2000; 46(8):1041–1050.

Price CP: Application of the principles of evidence-based medicine to laboratory medicine. Clin Chim Acta 2003; 333:147–154.

Sackett DL: Interpretation of diagnostic data: How to do it with pictures. Can Med Assoc J 1983; 129:429-432.

Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, et al: Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine. Boston/Toronto/London, Little and Brown, 1991.

Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, et al: Evidence-Based Medicine: How to Practice and Teach EBM. 2nd ed. London, Churchill Livingstone, 2000.

Introdução abrangente e de fácil leitura, que aborda todas as facetas do MBE incluindo diversos exemplos.

Sox HC Jr: Probability theory in the use of diagnostic tests. An introduction to critical study of the literature. Ann Intern Med 1986; 104:60–66.

O artigo fornece uma compreensão acerca da expressão da incerteza diagnóstica como probabilidade de doença. Também são discutidos aspectos relacionados à acurácia diagnóstica e à influência da probabilidade pré-teste na interpretação pós-teste.

Trenti T: Evidence-based laboratory medicine as a tool for continuous laboratory improvement. Clin Chim Acta 2003; 333:155–167.

Westgard JO, Darcy T: The truth about quality: medical usefulness and analytic reliability of laboratory tests. Clin Chim Acta 2004; 346(1): 3–11.

Zweig MH, Campbell G: Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem 1993; 39:561–577.

Trata-se de um artigo que aborda em profundidade o conceito, uso e aplicação das curvas ROC no teste clínico. Como parte da discussão, é feita uma comparação com outras medidas de acurácia de teste.

CAPÍTULO 8

Interpretação de resultados laboratoriais

Matthew R. Pincus MD PhD, Naif Z. Abraham Jr. MD PhD

Interpretação e correlação de valores laboratoriais anormais 89
- Considerações gerais 89
- Princípios fundamentais da interpretação de valores 90

Anormalidades no perfil hematológico 90
- Anemias 90
- Anormalidades quantitativas de leucócitos 93
- Distúrbios da coagulação 94

Anormalidades em bioquímica clínica: patologia bioquímica 95
- Anormalidades eletrolíticas 95
- Doença renal (Schnerman) 97
- Anormalidades nos gases do sangue 98
- Anormalidades na glicose 100
- Testes de função hepática 100
- Testes de função cardíaca 101
- Testes de função pancreática 102
- Marcadores de condições inflamatórias 102
- Testes de função endócrina 102

Exemplos de casos clínicos com correlações clinicopatológicas 103

Referências bibliográficas 105

PONTOS-CHAVE

- Na grande maioria dos casos, diagnósticos diferenciais acurados podem ser estabelecidos a partir de um estudo sistemático dos perfis laboratoriais de pacientes.
- Existem, basicamente, quatro tipos de anemia: anemia ferropriva, anemia de doenças crônicas, anemia hemolítica e anemia macrocítica/por deficiência nutricional. Elas podem ser prontamente diferenciadas entre si tanto pelo perfil hematológico como por exames laboratoriais simples.
- As dosagens de sódio e potássio e a osmolaridade urinários permitem que as causas de hipo ou hipernatremia sejam imediatamente determinadas.
- Provas de função hepática podem diferenciar seis hepatopatias diferentes: hepatite, cirrose, doença biliar, lesões expansivas do fígado, congestão passiva e insuficiência hepática fulminante.
- A insuficiência renal pode ser prontamente diagnosticada a partir da observação do aumento do nitrogênio ureico sanguíneo (BUN, *blood urea nitrogen*) e da creatinina. É possível identificar o local da insuficiência renal (i. e., glomerular ou tubular) a partir da relação osmolalidade sérica/osmolalidade urinária.
- Os gases do sangue permitem determinar as causas de acidose ou alcalose metabólica *versus* acidose ou alcalose respiratória. Existe uma importante relação entre a pressão parcial de oxigênio e o dióxido de carbono, de modo que, em doenças respiratórias, altos níveis de dióxido de carbono bloqueiam a oxigenação do sangue venoso, levando a uma crise respiratória.
- A elevação dos níveis séricos da troponina conduz ao diagnóstico de infarto do miocárdio (IM), ou, mais raramente, de angina instável.
- Elevações de vários analitos séricos, como a proteína C–reativa (PCR), indicam doença inflamatória. Elevações da amilase e da lipase séricas indicam pancreatite aguda.
- Dois tipos de endocrinopatias são discutidos: da tireoide e das adrenais. Níveis séricos de T4 (ou melhor, de T4 livre) e do hormônio tireoestimulante (TSH) podem ser utilizados para o diagnóstico do hipo ou hipertireoidismo primário ou secundário. Níveis séricos de cortisol e de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) podem ser utilizados para o diagnóstico do hipo ou hiperadrenalismo primário ou secundário.

Interpretação e correlação de valores laboratoriais anormais

Considerações gerais

O principal objetivo da realização de determinações de analitos no laboratório clínico é auxiliar no diagnóstico e no tratamento de pacientes com doenças e de indivíduos sob avaliação da saúde. A esse respeito, frequentemente recorre-se ao patologista clínico, tendo-o como consultor, para explicar valores laboratoriais anormais, especialmente aqueles que parecem não estar correlacionados, e recomendar, ou mesmo solicitar, exames laboratoriais que possam levar ao diagnóstico correto no *work-up* de pacientes, para determinados problemas médicos. Além disso, a avaliação de resultados de exames laboratoriais pelo patologista clínico pode não apenas revelar a ocorrência (infrequente) de erros laboratoriais, mas também ajudar na seleção de exames adequados e custo efetivos de uma ampla variedade de opções de exames cada vez mais complexos (Witte, 1997; Dighe, 2001; Bonini, 2002).

Para a avaliação de resultados de exames, o computador do laboratório constitui um auxílio valioso. Virtualmente, todos os sistemas realizam checagem diária de valores que estejam significativamente fora dos intervalos de referência estabelecidos ao paciente, ou que apresentem alterações importantes em um período de 24 horas. Em geral, eles são relatados como "checagem delta falha". Assim, pacientes com achados laboratoriais significativamente anormais podem ser identificados.

Este capítulo apresenta uma abordagem para a interpretação de valores laboratoriais que permite aos laboratoristas ajudar no estabelecimento de diagnósticos clínicos e auxiliar no seu tratamento. Esta é uma discussão abrangente e que, possivelmente, não cobrirá todas as doenças imagináveis que o paciente possa apresentar. Em vez disso, esta apresentação preocupa-se com as maneiras gerais de interpretar valores anormais e analisa as causas mais comuns desses achados, de modo que o leitor tenha base para interpretar valores anormais.

Talvez o leitor prefira ler as seções *Bioquímica* (parte II) e *Hematologia* (parte IV) deste livro antes desta, a qual fornece uma visão geral dessas duas áreas diagnósticas vitais. Alternativamente, o leitor pode decidir ler este capítulo primeiro para ter uma visão geral, antes dos vários capítulos sobre Bioquímica e Hematologia, nas partes II e IV, respectivamente.

Antes de embarcar em uma discussão sobre condições específicas que dão origem a valores anormais, certos preceitos devem ser sempre seguidos, sumariados da seguinte maneira:

1. nunca confiar em um único valor (fora da faixa de referência) para estabelecer um diagnóstico. É fundamental que seja estabelecida uma *tendência* de valores. Por exemplo, um valor de sódio de 130 mEq/L não indica, necessariamente, hiponatremia. Esse valor anormal, de forma isolada, pode ser espúrio e refletir fatores como uma técnica de flebotomia inadequada, variabilidade laboratorial etc. Entretanto, uma série de valores baixos de sódio em amostras sucessivas de soro de um determinado paciente indica essa condição. Por isso, é fundamental acompanhar as tendências de determinados valores;
2. regra de Osler. Especialmente quando o paciente tem menos de 60 anos, tentar atribuir todos os achados laboratoriais anormais a uma única causa. Somente quando não for possível correlacionar todos os achados anormais, a possibilidade de múltiplos diagnósticos deve ser cogitada.

Anormalidades no perfil hematológico

Frequentemente, em relatórios laboratoriais, a primeira seção contém o perfil hematológico, incluindo a contagem celular (CBC). Discussões abrangentes sobre a hematopatologia clínica são apresentadas na parte IV. Aqui, discutiremos padrões muito básicos de anormalidades para fornecer uma base de referência global para a interpretação de valores e para a solicitação de exames adicionais. Embora esta parte do livro se ocupe da bioquímica ou patologia química, discutimos o perfil hematológico porque a interpretação de resultados hematopatológicos depende de resultados de determinações quantitativas realizadas na bioquímica.

Anemias

A anemia, um distúrbio hematológico comum, é definida fisiopatologicamente como uma diminuição da capacidade de transporte de oxigênio do sangue. Toda a capacidade de transporte de oxigênio deve-se à ligação do oxigênio à hemoglobina contida unicamente nos eritrócitos. Como a anemia pode causar hipóxia tissular, ela comumente produz sintomas como desmaio, fadiga, palidez e dificuldade respiratória.

Na prática, o melhor indicador para essa condição é a contagem ou número baixo de eritrócitos por volume de sangue total. Embora a faixa de referência para a contagem eritrocitária varie com a idade, o sexo e a população, ela engloba valores de aproximadamente 4 a 6 × 10^6 eritrócitos por milímetro cúbico (mm^3) ou microlitro. Essa faixa pode mudar um pouco de acordo com população. A contagem eritrocitária abaixo do limite inferior da faixa de referência é um indicativo de anemia. Além disso, os eritrócitos ocupam uma faixa bem definida em termos de porcentagem do volume que eles ocupam no sangue total ou hematócrito. Geralmente, a faixa de valores normais do hematócrito para adultos é de 36 a 45% (os valores normais para as mulheres, em geral, são ligeiramente mais baixos que para os homens). Ademais, a concentração total de hemoglobina no sangue é de aproximadamente 12 a 15 g/dL, ou aproximadamente 33 a 36 g/dL nos eritrócitos (concentração de hemoglobina corpuscular média). Os valores normais também dependem da idade do paciente e da altitude de sua residência. Normalmente, o hematócrito é cerca de três vezes o valor da concentração de hemoglobina, a qual, por sua vez, é cerca de três vezes o valor da contagem eritrocitária.

Quando a anemia é diagnosticada, é obrigatório que a sua causa seja determinada. Uma anamnese e um exame físico excelentes são necessários para a seleção adequada do exame, diagnóstico, o melhor tratamento e o cuidado para o paciente. Além disso, uma revisão da lâmina de esfregaço de sangue periférico para verificação da morfologia dos eritrócitos e leucócitos geralmente é útil.

Para estreitar ainda mais o diagnóstico diferencial e facilitar a seleção adequada de exames, alguns esquemas de classificação de anemia foram desenvolvidos, não existindo um único esquema ideal disponível. Uma abordagem particularmente útil usa o Volume Corpuscular Médio (VCM) associado à amplitude da distribuição de eritrócitos (RDW, *Red cell Distribution Width*) e a contagem de reticulócitos (reticulocitose percentual) ou Índice de Produção de Reticulócitos (IPR). Em conjunto, esses índices ajudam a formar uma hipótese de trabalho para a causa subjacente da anemia.

A determinação eletrônica do VCM, diretamente dos dados de distribuição de eritrócitos, permite a classificação com base no tamanho dos eritrócitos, como macrocíticos (VCM geralmente > 100 μm^3 [100 fL]), microcíticos (VCM geralmente < 80 μm^3 [80 fL]) ou normocíticos (VCM geralmente entre 80 a 100 μm^3 [fL]). A RDW (por cento) é um parâmetro que também ajuda a classificar uma anemia e reflete a variação do tamanho dos eritrócitos (anisocitose). Geralmente, a RDW varia entre 12 e 17 e depende da idade, do sexo e do grupo étnico do paciente. Ela pode ser útil na diferenciação de causas de microcitose, uma vez que a anemia ferropriva de moderada a grave está associada a um aumento da RDW, enquanto a talassemia e a anemia de doença crônica estão associadas a uma RDW normal.

A reticulocitose no sangue periférico é uma medida da resposta da medula óssea frente a uma anemia. Uma mensuração similar, o IPR, corrige a contagem de reticulócitos em relação à: (1) proporção de reticulócitos presentes em um paciente sem anemia; (2) liberação prematura de reticulócitos na circulação periférica. A resposta da medula óssea à anemia pode ser adequada (hiperproliferativa) com um IPR > 3, geralmente indicando a hiperproliferação de eritrócitos na medula. No entanto, a anemia pode decorrer da produção defeituosa de eritrócitos ou de insuficiência medular (hipoproliferativa), geralmente indicada por um IPR < 2. Por essa razão, embora esses índices eritrocitários não sejam patognomônicos da causa de um tipo particular de anemia, a combinação do VCM, RDW e IPR, examinados em conjunto, geralmente estreitam de modo significativo o diagnóstico diferencial e facilitam a seleção dos exames. A Tabela 8.1 apresenta exemplos comuns de anemia e seu diagnóstico usando esses índices eritrocitários, bem como outras anormalidades analíticas úteis.

Anemia microcítica

Anemias microcíticas comuns incluem a anemia ferropriva e as talassemias. Algumas hemoglobinopatias e a anemia de doença crônica também podem ser microcíticas. Em nossa discussão, centraremos a atenção na *anemia ferropriva* e na *anemia de doença crônica*, um diagnóstico diferencial comum para pacientes com anemia microcítica. Ambas as anemias parecem ser distúrbios envolvendo o metabolismo do ferro.

Na anemia ferropriva ocorre uma deficiência primária de ferro disponível para os eritrócitos (geralmente em razão da perda sanguínea, mas outras causas incluem a deficiência dietética, a má absorção e a gestação). A perda crônica de sangue sempre deve ser muito bem investigada, porque está comumente associada a processos malignos. No entanto, a anemia de doença crônica parece resultar de um defeito da utilização/metabolismo do ferro, e está associada a distúrbios crônicos não hematológicos, como infecções crônicas, distúrbios do tecido conjuntivo, processos malignos e distúrbios renais, tireoidianos e hipofisários.

Para diferenciar a anemia ferropriva da anemia de doença crônica, junto da RDW, várias mensurações laboratoriais diferentes são muito úteis. O diagnóstico geralmente é estabelecido com a realização de exames laboratoriais adicionais do soro ou sangue total. Entretanto, como a anemia ferropriva é sempre acompanhada de perda de ferro, que é armazenado ligado à proteína ferritina nos macrófagos da medula óssea, o diagnóstico, em princípio, sempre pode ser feito por meio de uma biópsia da medula óssea com um corante de ferro que mostra a ausência de ferro medular. Evidentemente, esse procedimento é invasivo e deve ser realizado somente como último recurso.

Níveis séricos de ferritina. Normalmente, existe um equilíbrio entre a ferritina intracelular e a extracelular. Quanto mais baixa for a quantidade de ferro armazenada, mais baixa será a concentração intracelular de ferritina e, consequentemente, mais baixa será a concentração extracelular de ferritina. O nível de ferritina extracelular pode ser mensurado diretamente determinando-se o nível sérico de ferritina, que é feito de maneira rápida e acurada em alíquotas de soro, usando o método ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), descrito no Capítulo 43. Portanto, de maneira geral, o nível sérico de ferritina

Tabela 8.1 Tipos comuns de anemias e *work-ups* diagnósticos*

Anemia	Causa	Anormalidade comum de analitos
1. Hipoproliferativa, microcítica	Deficiência de ferro	Ferritina baixa Aumento da IBC Ferro sérico diminuído Proporção Fe/TIBC diminuída Geralmente, RDW aumentada
2. Hipoproliferativa, microcítica	Anemia de doença crônica	Geralmente, ferritina normal IBC normal Ferro sérico diminuído Relação Fe/TIBC normal Geralmente, RDW normal
3. Hiperproliferativa, normocítica	Anemia hemolítica	Esquizocitose Aumento de reticulócitos Haptoglobina baixa Carboxi-hemoglobina elevada LDH elevada Bilirrubina indireta elevada Geralmente, RDW aumentado
4. Hipoproliferativa, normocítica	Anemia aplástica	Leucopenia Trombocitopenia Medula óssea hipocelular Geralmente, RDW normal
5. Hipoproliferativa, normocítica	Insuficiência renal	Aumento de BUN e creatinina Eritropoetina baixa Células espiculadas podem estar presentes Geralmente, RDW normal
6. Hipoproliferativa, macrocítica		
A. Megaloblástica	Deficiência de B_{12} e/ou folato	B_{12} e/ou folato baixo Leucócitos polimorfonucleares hiperlobulados Macro-ovalócitos RDW aumentada
B. Não megaloblástica	Hipotireoidismo	TSH elevado RDW normal

* Ferritina, haptoglobina, LDH, bilirrubinas, BUN, creatinina, eritropoetina, TSH e T_4 são expressos em concentrações. Todos esses analitos são mensurados no soro.

IBC = capacidade de ligação de ferro; TIBC = capacidade total de ligação de ferro; RDW = amplitude da distribuição de eritrócitos; Fe = ferro; LDH = lactato desidrogenase; BUN = nitrogênio ureico sanguíneo; TSH = hormônio tireoestimulante.

fornece uma excelente mensuração não invasiva dos estoques de ferro disponíveis. Como na anemia de doença crônica os estoques de ferro são abundantes, o nível sérico de ferritina é caracteristicamente normal a elevado. Em contraste, na anemia ferropriva, na qual os estoques de ferro estão esgotados, o nível sérico de ferritina caracteristicamente diminui. Portanto, o nível sérico de ferritina é um ensaio que pode ser utilizado na diferenciação entre a anemia ferropriva e a anemia de doença crônica.

Uma advertência em relação ao uso de valores de ferritina sérica para obter esta diferenciação é o fato de ela também ser um reagente da fase aguda. Reagentes da fase aguda são proteínas (discutidas no Cap. 19) que aumentam em resposta a um processo agudo, usualmente uma condição inflamatória aguda. Então, se um paciente apresenta uma infecção aguda, o nível sérico de ferritina pode estar falsamente elevado. O resultado pode ser um nível de ferritina no intervalo de referência. Geralmente, na anemia ferropriva acompanhada por um processo agudo, esse nível encontra-se no limite inferior da faixa de referência.

Uso de ferro sérico e capacidade de ligação do ferro. Além do nível de ferritina, pode ser realizada a mensuração de ferro sérico e da capacidade de ligação do ferro. Em média, o ferro sérico está, evidentemente, reduzido na anemia ferropriva e normal, ou algumas vezes baixo, na anemia de doença crônica. A capacidade de ligação do ferro é uma mensuração direta da proteína transferrina, a qual transporta o ferro como Fe^{2+} do intestino para os locais de armazenamento na medula óssea. Na anemia ferropriva, o ferro sérico está reduzido e a capacidade de ligação do ferro aumenta.

Contudo, tanto o ferro sérico como a transferrina estão sujeitos a grandes flutuações por causa de fatores como uma dieta e nem sempre refletem de maneira confiável os estoques de ferro. Além disso, a transferrina é uma betaproteína, isto é, ela migra na região β da eletroforese de proteínas séricas e é um reagente da fase aguda. Portanto seu nível sérico pode se alterar (geralmente diminui, como um "reagente negativo da fase aguda") em condições inflamatórias. Existe uma considerável sobreposição entre o nível sérico de ferro e a capacidade de ligação do ferro na anemia ferropriva e na anemia de doença crônica. Uma mensuração um pouco mais confiável da anemia ferropriva é a *relação* entre ferro sérico e capacidade total de ligação de ferro (TIBC, *Total Iron-Binding Capacity*). Essa relação é de aproximadamente 1:3 para os indivíduos normais, enquanto na anemia ferropriva, ela diminui significativamente para valores em torno de 1:5, ou menos. Novamente, existe uma sobreposição considerável nessa relação para pacientes com anemia ferropriva e na anemia de doença crônica, de modo que os valores devem ser sempre interpretados com cuidado.

Uso da amplitude da distribuição de eritrócitos. Finalmente, o uso de procedimentos automatizados para a determinação de contagens e índices celulares permite-nos obter o tamanho médio dos eritrócitos e as distribuições de tamanho. Na anemia ferropriva, existe uma dispersão acentuada de volumes (tamanhos) celulares de modo que a RDW aumenta, enquanto ela comumente permanece nos limites normais na anemia de doença crônica. A faixa normal da RDW é de 12 a 17%. Infelizmente, os desvios-padrão para indivíduos normais e para pacientes com anemia ferropriva ou anemia de doença crônica podem se sobrepor de maneira significativa, tendendo a limitar a validade do uso da RDW exclusivamente para distinguir essas duas condições.

Os principais achados laboratoriais que distinguem a anemia ferropriva da anemia de doença crônica estão resumidos nas entradas 1 e 2 da Tabela 8.1. Observe que a maioria dos principais exames utilizados para diferenciar essas duas condições é realizada no laboratório de bioquímica. Isso enfatiza a forte interdependência desses dois serviços na obtenção de um diagnóstico definitivo por meio de mensurações laboratoriais.

Anemia normocítica

Causas comuns de anemia normocítica incluem hemorragia aguda, anemia hemolítica, hipoplasia medular, nefropatia e anemia de doença crônica. Pode parecer paradoxal que a hemorragia aguda se manifeste como uma anemia normocítica, já que ela envolve uma grande perda de sangue, associada à perda de reservas de ferro. No entanto, a depleção de ferro leva tempo para ocorrer. Em um quadro agudo, uma importante perda sanguínea manifesta-se como anemia normocítica.

Anemias normocíticas hiperproliferativas

Anemias normocíticas hiperproliferativas, associadas a um *aumento* da contagem de reticulócitos, incluem a *anemia hemolítica* e a *anemia associada à perda sanguínea aguda*, enquanto *anemias hipoproliferativas*, associadas a uma *diminuição* da contagem de reticulócitos, incluem causas como a aplasia / hipoplasia de medula óssea, nefropatia e anemia de doença crônica. Como mencionado anteriormente, a anamnese, o exame físico e o exame de lâmina de esfregaço de sangue periférico do paciente são úteis no estabelecimento de um diagnóstico diferencial. Nesta seção, centralizaremos a atenção sobre as causas mais comuns de anemia normocítica: anemia hemolítica, anemia aplástica e anemia associada à nefropatia.

Anemia hemolítica. A hemólise é definida como a destruição da membrana dos eritrócitos, provocando liberação de hemoglobina. Isso pode ocorrer lentamente, como um processo fisiológico normal, ou pode ser acelerado em condições patológicas. Existem muitas causas subjacentes diversos para a diminuição da sobrevida/aumento da destruição dos eritrócitos. Elas incluem defeitos da membrana (p. ex., esferocitose hereditária), defeitos enzimáticos (p. ex., deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase [G6PD]), hemoglobinopatias (p. ex., doença falciforme ou β-talassemia), destruição imune (p. ex., anemia hemolítica autoimune ou reação transfusional hemolítica) e

destruição não imune. Esta inclui a destruição decorrente de agentes infecciosos, agentes/drogas tóxicos, agentes físicos, hiperesplenismo e aquelas anemias classificadas como *anemias hemolíticas microangiopáticas* – um grupo de anemias resultantes da destruição mecânica de eritrócitos, causada por fatores como a deposição de fibrina no interior dos vasos sanguíneos, próteses valvares cardíacas etc.

Mensurações laboratoriais específicas, que confirmam imediatamente o diagnóstico de anemia hemolítica, são baseadas nos eventos naturais subsequentes à hemólise. Após a ruptura da membrana do eritrócito, a hemoglobina é expulsa e liga-se à porção α-2 da proteína haptoglobina. O complexo hemoglobina-haptoglobina é catabolizado por macrófagos que engolfam tais complexos por meio da endocitose mediada por receptor. Portanto, um excelente exame laboratorial para a anemia hemolítica é o *baixo* valor da haptoglobina. Para esse propósito, existem disponíveis ensaios ELISA extremamente sensíveis e rápidos para a haptoglobina.

Quando a hemoglobina é expulsa, grandes quantidades dela são oxidadas em meta-hemoglobina. A porção heme dissocia-se e, posteriormente, é oxidada em bilirrubina. A primeira etapa desse processo é a abertura oxidativa do anel de porfirina do heme com a liberação concomitante de monóxido de carbono (CO). O CO pode ser facilmente mensurado por meio de técnicas de cromatografia gasosa ou, mais convenientemente, pela cooximetria, baseada na espectrofotometria (Cap. 4), como carboxiemoglobina. Níveis elevados de CO em anemias normocrômicas normocíticas são um excelente indicador de anemia hemolítica.

Como há um aumento da produção de bilirrubina, a qual não é conjugada (Cap. 21), ocorrerá pelo menos uma elevação transitória do nível sérico de bilirrubina indireta. Essa elevação, em presença de função hepática normal, será modesta, em geral na faixa de aproximadamente 2 a 2,5 mg/dL. (O limite superior da faixa normal é em torno de 1,2 mg/dL).

Como mencionado anteriormente, a contagem de reticulócitos será elevada (aumento da policromasia na lâmina de esfregaço de sangue) com hiperplasia eritroide presente na medula óssea, indicativa do aumento de produção de eritrócitos. A lâmina de esfregaço de sangue periférico pode apresentar evidências do tipo particular de lesão eritrocitária com o tipo particular de anemia hemolítica (p. ex., células falciformes na doença falciforme ou esquizócitos/células em forma de capacete na anemia hemolítica microangiopática). Também ocorre uma diferença significativa no tamanho (anisocitose) e na forma (poiquilocitose) dos eritrócitos em decorrência da presença de células lesadas e/ou jovens. Por causa das alterações comumente acentuadas do tamanho e/ou forma, a RDW usualmente está elevada. Alguns eritrócitos nucleados também podem ser identificados.

O plasma e a urina podem conter hemoglobina livre ou seus produtos de degradação. A hemoglobina livre pode estar agudamente presente no plasma (hemoglobinemia) ou na urina (hemoglobinúria), enquanto a hemossiderina pode estar presente na urina (hemossiderinúria) em episódios mais crônicos de hemólise. A lactato desidrogenase (LDH), uma enzima presente no interior do eritrócito, em geral aumenta, e é um achado relativamente sensível, embora inespecífico. Além disso, por ser o principal íon intracelular, o íon potássio aumenta no soro. Finalmente, um teste de antiglobulina direto/teste de Coombs direto pode ser utilizado para detectar imunoglobulina ligada à superfície do eritrócito. Um teste positivo sugere que um autoanticorpo ou um aloanticorpo pode ser responsável pela anemia. O diagnóstico final dependerá, em última instância, dos resultados de exames específicos para etiologias específicas (p. ex., teste de antiglobulina direto positivo para um mecanismo imune, ou pesquisa de G6PD positiva para a deficiência de G6PD). A seleção desses exames dependerá da avaliação clínica e dos dados laboratoriais preliminares.

A entrada 3 da Tabela 8.1 apresenta um resumo dos achados laboratoriais que são diagnósticos de anemia hemolítica. Observe que praticamente todos os exames diagnósticos quantitativos para anemia hemolítica (i. e., hemoglobina sérica e urinária, haptoglobina, carboxiemoglobina, bilirrubina indireta e LDH) são realizados no laboratório de bioquímica, enfatizando novamente a forte interdependência entre ele e o laboratório de hematologia.

Anemia hemolítica microangiopática. Como previamente mencionado, fragmentos de eritrócitos (esquizócitos) podem estar presentes em lâminas de esfregaço de sangue periférico em decorrência da destruição mecânica (prótese valvar cardíaca) ou térmica (queimaduras graves). A ruptura mecânica de eritrócitos no interior da microvasculatura também pode ocorrer por dano físico aos eritrócitos na microvasculatura da medula óssea. Isso pode ocorrer em razão das lesões expansivas (p. ex., tumores metastáticos, leucemia ou linfoma), da mielofibrose ou do depósito intravascular de filamentos de fibrina sobre a superfície das células endoteliais. Como os eritrócitos são lesados e destruídos, esse processo leva à chamada anemia hemolítica microangiopática (i. e., lesões na microvasculatura).

Além de lesões expansivas, outras causas desse tipo de anemia incluem doenças nas quais ocorre depósito de fibrina sobre a superfície endotelial, provocando o cisalhamento e a fragmentação de eritrócitos recém-sintetizados, como na Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD). A anemia hemolítica microangiopática também pode ser causada por outras doenças que possuem um componente imunológico, isto é, anticorpos contra componentes das células endoteliais ou contra outras estruturas da microvasculatura, resultando na deposição de complexos imunes com ou sem depósito de fibrina. Essas condições incluem a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) e a síndrome hemolítico-urêmica. Como essas duas condições envolvem a microvasculatura em geral, outros tecidos são frequentemente afetados. Dessa forma, tanto na síndrome hemolítico-urêmica como na PTT, ocorre lesão da microvasculatura renal, acarretando insuficiência renal, que está associada ao aumento do nitrogênio ureico sanguíneo (BUN, *blood urea nitrogen*) e da creatinina, como será descrito na seção *Anormalidades bioquímicas*. Na PTT também há o envolvimento da circulação cerebral, dando origem a alterações comportamentais e outras sequelas neurológicas, e além disso, as plaquetas também são afetadas, dando origem à trombocitopenia.

A anemia hemolítica microangiopática também pode ocorrer com outros distúrbios imunes como, por exemplo, distúrbios do tecido conjuntivo como o lúpus eritematoso sistêmico, no qual, novamente, a lesão endotelial causada pela ligação de complexos imunes e complemento produz depósito de fibrina sobre a superfície endotelial.

É importante notar que, como a anemia hemolítica microangiopática é resultado da destruição traumática de eritrócitos recém-formados na microvasculatura onde precursores de eritrócitos e leucócitos estão sendo formados, frequentemente esses precursores são liberados na circulação. Por essa razão, todos os achados de anemia hemolítica estão presentes, além de ser observado um número significante de células precursoras no sangue periférico (p. ex., eritrócitos nucleados, mielócitos e metamielócitos), um padrão denominado quadro leucoeritroblástico.

Como será discutido a seguir, na CIVD e, ocasionalmente, na PTT, os achados laboratoriais incluem trombocitopenia, aumentos do tempo de protrombina (TP), do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), do tempo de trombina (TT), dos produtos de degradação da fibrina e dos níveis de dímero D, mas diminuição dos níveis de fibrinogênio; também estão elevados os níveis do BUN e de creatinina.

Anemias normocíticas hipoproliferativas

Hipoplasia da medula óssea/anemia aplástica. É uma anemia *hipoproliferativa* com VCM e RDW, em geral, dentro dos limites normais e que afeta tipicamente todos os elementos do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e plaquetas – ver abaixo). Leucócitos e eritrócitos imaturos geralmente não estão presentes em lâminas de esfregaço de sangue periférico. É comum realizar biópsia de medula óssea para se obter o diagnóstico e ela normalmente mostra uma medula óssea hipoplásica/aplástica com depleção severa de todos os precursores hematopoéticos medulares. A anemia aplástica pode ser primária/herdada ou secundária/adquirida; esta pode ser decorrente de substâncias tóxicas, infecção, radiação ou disfunção imune. O ferro sérico pode estar elevado em razão da ausência de eritropoiese. Os achados hematológicos típicos nessa condição estão sumariados na entrada 4 da Tabela 8.1. É importante observar que nenhum dos exames séricos quantitativos diagnósticos para anemia hemolítica (p. ex., aumento de haptoglobina, carboxiemoglobina e bilirrubina indireta) é positivo nessa condição.

Síndrome mielodisplásica. Outra condição menos comum, mas, de qualquer modo, importante causa de anemia normocítica hipoproliferativa, é a síndrome mielodisplásica (SMD). Esta síndrome, que com frequência manifesta-se como uma anemia normocítica, embora possa

se manifestar ocasionalmente como anemia moderadamente macrocítica ou microcítica, é refratária ao tratamento (p. ex., transfusões de concentrado de eritrócitos). Ela pode se manifestar simplesmente como uma anemia refratária, em seus estágios iniciais, e considera-se que ela evolui para a anemia refratária com sideroblastos em anel e, em última instância, para os chamados estágios "pré-leucêmicos", em particular uma anemia refratária com um excesso de blastos (geralmente nas linhagens mieloide e linfoide) e um excesso de blastos em transformação. A SMD, a princípio, também pode se apresentar como uma citopenia refratária que envolve as três linhagens de células hematopoéticas (eritroide, granulocítica e megacariocítica). Como pode ser deduzido desta última observação, a SMD parece ser um distúrbio clonal de célula-tronco que é caracterizado pela hematopoiese ineficaz. Uma discussão mais detalhada sobre essa doença fascinante pode ser encontrada no Capítulo 32.

Anemia da insuficiência renal. Outra anemia normocítica hipoproliferativa é a anemia da insuficiência renal crônica. A perda da função excretora renal produz um aumento de BUN e creatinina (discutido a seguir) e também um aumento de subprodutos metabólicos. A uremia resultante parece ser responsável por alterações na forma do eritrócito, com células espiculadas (equinócitos) e células elipsoides comumente presentes em lâminas de esfregaço de sangue periférico. A identificação de células espiculadas em lâminas de esfregaço de sangue periférico durante a evolução da doença pode indicar o desenvolvimento de disfunção renal. Além da diminuição da função excretora, ocorre uma diminuição da capacidade renal de produzir eritropoetina, acarretando um comprometimento da eritropoiese, de modo que a resposta medular à hipóxia torna-se inadequada. O que diferencia essa condição da anemia aplástica (entrada 4 da Tab. 8.1) é que as contagens leucocitária e plaquetária usualmente permanecem nos limites normais. Os achados típicos nessa condição são apresentados na entrada 5 da Tabela 8.1. Novamente, como na hipoplasia medular/anemia aplástica (entrada 4, Tab. 8.1), nenhum dos exames séricos quantitativos diagnósticos para anemia hemolítica (p. ex., aumentos de haptoglobina, carboxiemoglobina e bilirrubina indireta) é positivo nessa condição.

Anemia macrocítica

A anemia macrocítica pode ser diagnosticada por meio do hemograma com baixa contagem eritrocitária e alto volume corpuscular médio (VCM), frequentemente excedendo 100 fL. De longe, a causa mais comum de anemia macrocítica é a deficiência nutricional, isto é, deficiência de vitamina B_{12} e/ou de folato. Acredita-se que a falta de um desses fatores altera a síntese de DNA, mas não a de RNA, de modo que o núcleo e o citoplasma da célula não amadurecem mais em sincronia. Morfologicamente, o citoplasma da célula amadurece enquanto o núcleo permanece imaturo e a célula parece megaloblástica. Essa falta de sincronia produz neutrófilos hipersegmentados (núcleos com cinco lobos em mais de 5% dos neutrófilos ou qualquer neutrófilo com seis ou mais lobos) e células ovais grandes, chamadas macro-ovalócitos, ambos estão presentes em lâminas de esfregaço de sangue de pacientes com anemia megaloblástica. Além disso, a RDW geralmente está aumentada e a contagem de reticulócitos está diminuída.

Quando uma anemia macrocítica é diagnosticada, os primeiros analitos séricos cujas concentrações devem ser determinadas são a vitamina B_{12} e o folato. São realizados ensaios ELISA, que são rápidos e acurados. Quando ambos estiverem na faixa de referência, devem ser realizados exames da função tireoidiana porque o hipotireoidismo é uma causa de macrocitose. Como será discutido na seção sobre provas de função endócrina, a elevação do hormônio tireoestimulante (TSH) com nível sérico baixo ou normal de tiroxina (T_4) confirma o diagnóstico de hipotireoidismo primário. Como determinados fármacos, particularmente a azatimidina (AZT), utilizada no tratamento da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), são sabidamente indutores da anemia macrocítica, é importante verificar se o paciente está sendo tratado com esse tipo de medicamento.

Nessa fase da contagem sanguínea completa automatizada, também é possível que as formas precursoras de eritrócitos (p. ex., eritrócitos nucleados) sejam contadas como eritrócitos maduros. Por essa razão, em um paciente com anemia "macrocítica", com níveis normais de vitamina B_{12}, folato e hormônios tireoidianos, é importante checar as contagens de reticulócitos e de eritrócitos nucleados para determinar se eles estão significativamente elevados. Em caso positivo, a possibilidade de uma anemia hemolítica deve ser considerada. Consequentemente, o *work-up* diagnóstico de anemia hemolítica descrita na seção anterior deve ser instituído.

Outras possíveis causas de anemia macrocítica incluem condições pós-hemorrágicas (diferenciadas pela elevação da contagem de reticulócitos e policromasia); alcoolismo (associado à deficiência de folato), hepatopatia e mielodisplasia. Observe novamente que os exames definitivos para determinação da causa da anemia macrocítica, isto é, dosagens de vitamina B_{12} e folato e provas de função tireoidiana, são geralmente realizados na seção de bioquímica.

Os principais achados laboratoriais para a anemia macrocítica estão resumidos nas entradas 6A e 6B da Tabela 8.1. Observe que as anemias macrocíticas estão divididas em megaloblástica (entrada 6A; típica da deficiência de vitamina B_{12} e folato) e não megaloblástica (entrada 6B; típica do hipotireoidismo). Se a anemia é megaloblástica ou não, só pode ser determinado pela biópsia de medula óssea. Esse procedimento não é necessário na maioria dos casos porque a causa da macrocitose pode ser determinada pelos exames descritos acima.

A Tabela 8.1 resume alguns dos achados pertinentes e determinações específicas utilizadas para diferenciar e diagnosticar anemias comuns previamente discutidas. Observe que essa tabela é um guia sobre quais exames específicos devem ser solicitados e, consequentemente, quais não devem sê-lo. Por exemplo, deve-se investigar em uma anemia microcítica o nível de ferritina, TIBC e relação Fe/TIBC, mas geralmente não há necessidade de serem solicitados os níveis de vitamina B_{12} e de folato. Por outro lado, não há necessidade de solicitar a dosagem de ferritina, TIBC etc., para uma anemia macrocítica; ao contrário, devem ser solicitados os níveis de vitamina B_{12} e de folato.

Anormalidades quantitativas de leucócitos

A contagem leucocitária inclui vários tipos de células nucleadas comumente circulantes: granulócitos (principalmente neutrófilos, basófilos e eosinófilos maduros), linfócitos e monócitos. Deve-se observar que as concentrações absolutas (não as porcentagens) dessas células são importantes na interpretação da contagem leucocitária. Um aumento acima do nível fisiológico normal na contagem leucocitária, denominado leucocitose, pode envolver primariamente qualquer uma dessas células, dependendo de qual tipo delas estiver principalmente elevada (i. e., neutrofilia, basofilia, eosinofilia, monocitose e linfocitose). Da mesma maneira, uma diminuição na contagem leucocitária, denominada leucopenia, pode ser decorrente de uma única série celular (i. e., neutropenia, monocitopenia e linfocitopenia). Diminuições absolutas de eosinófilos e basófilos são difíceis de serem identificadas, por causa do pequeno número normalmente presente. Certos diagnósticos diferenciais estão comumente associados a determinadas alterações da contagem leucocitária (p. ex., infecção e/ou inflamação com neutrofilia; reações alérgicas e infecções parasitárias com eosinofilia). Além disso, elevações podem ser decorrentes de um processo benigno (p. ex., infecção) ou maligno (p. ex., leucemia). Ocasionalmente, células plasmáticas podem ser encontradas no sangue periférico. Aqui, observaremos vários padrões quantitativos e suas correlações com achados bioquímicos anormais.

Novamente, a anamnese e os achados físicos são importantes no diagnóstico e tratamento do paciente. Além disso, o hemograma e a contagem leucocitária diferencial são achados laboratoriais importantes utilizados, em conjunção à impressão clínica, para a formulação do diagnóstico diferencial. Em adultos, a faixa de referência para a contagem leucocitária é de aproximadamente 4.000 a 7.000 leucócitos/mm^3; cerca de dois terços dos leucócitos são neutrófilos e um pouco menos de um terço são linfócitos.

Infecção: a causa mais comum de contagem leucocitária elevada

Uma contagem leucocitária elevada, entre 10.000 a 20.000 μL, comumente indica um processo infeccioso/reativo. Em geral, a *neutrofilia* está associada à infecção (bacteriana, fúngica, viral), condições inflamatórias (trauma, cirurgia), certos fármacos (p. ex., corticosteroides) e também condições mieloproliferativas. Exceções à neutrofilia obser-

vada em infecções bacterianas são a tuberculose, a brucelose e a coqueluche, em que as células predominantes são linfócitos, e infecções, principalmente em neonatos, por *Listeria monocytogenes*, nas quais a resposta monocítica é predominante.

A *eosinofilia* está comumente associada a reações alérgicas, infecções parasitárias e processos hematológicos malignos (Brigden, 1997; Rothenberg, 1998; Brito-Babapulle, 2003). A *basofilia* também está comumente associada a processos hematológicos malignos (p. ex., leucemia mieloide crônica ou LMC), mas pode ser vista em algumas condições inflamatórias e reações alérgicas. A *linfocitose* está comumente associada a infecções virais agudas (p. ex., mononucleose infecciosa), infecções crônicas (p. ex., tuberculose, brucelose e coqueluche) e também a doenças hematológicas e à estimulação imune. A *monocitose* está comumente associada a doenças hematológicas (p. ex., leucemia mielomonocítica aguda) e também a alguns processos infecciosos (p. ex., tuberculose, riquetsiose e listeriose).

Contagem leucocitária elevada decorrente de reação leucemoide

Em pacientes que não apresentam leucemia, contagens leucocitárias muito altas (geralmente superiores a 50×10^9/L) podem produzir uma lâmina de esfregaço de sangue periférico com aparência similar à da leucemia. Isso é denominado *reação leucemoide*, cujo tipo mais comum de reação é o granulocítico, embora também possam ocorrer reações linfocíticas. O tipo granulocítico geralmente revela a presença de neutrófilos reativos no sangue periférico, com um desvio à esquerda (i. e., formas imaturas como bastonetes, metamielócitos e mielócitos). Nor-malmente, alterações do aspecto citoplasmático das células (p. ex., granulações tóxicas e produção de corpúsculos de Döhle) (Cap. 32) também estão presentes. As causas de reação do tipo granulocítico incluem infecções bacterianas (p. ex., difteria), processos malignos (p. ex., doença de Hodgkin) e condições reativas (p. ex., granulocitose de rebote).

Embora essas alterações sejam úteis, a proteína C reativa (PCR), uma proteína plasmática da fase aguda, aumenta e diminui rapidamente no início e na resolução da inflamação. A PCR parece ser um indicador mais precoce e mais sensível da inflamação e da infecção agudas (Seebach, 1997) e, atualmente, pode ser rapidamente mensurada pelos analisadores atuais.

A reação leucemoide deve ser diferenciada da LMC e de outras condições mieloproliferativas. É importante notar que *a enzima fosfatase alcalina do neutrófilo estará normal ou elevada na reação leucemoide granulocítica, mas baixa na LMC.*

Contagem leucocitária elevada em razão da leucemia mieloide crônica (LMC)

Atualmente, o diagnóstico definitivo da LMC baseia-se na demonstração do cromossomo *Philadelphia* (i. e., translocação *BCR/c-abl* entre os cromossomos 9 e 22) por meio da citogenética ou de técnicas moleculares (p. ex., ver Silver, 2003; George, 2003; Sattler, 2003). A detecção de anormalidades moleculares ou citogenéticas também tem importância diagnóstica (e pode ser prognóstica) em outras doenças hematológicas, incluindo a leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de célula T/linfoma e mielodisplasia (Glassman, 1997). Hoje em dia é corrente o uso de técnicas moleculares para a detecção de estágios muito iniciais da doença, assim como para detectar doença residual mínima, isto é, a doença que pode estar aparente apenas no nível molecular. Por exemplo, a reação em cadeia de polimerase quantitativa pode ser utilizada para monitorar os níveis de translocação *BCR/c-abl* em pacientes com LMC sendo tratados com o inibidor de cinase Gleevec (Hughes, 2003).

Contagem leucocitária elevada em razão da leucemia linfocítica crônica (LLC)

Quando os linfócitos parecem normais, mas em quantidade significativamente elevada em um paciente mais velho, a possibilidade de LLC deve ser considerada. Mais uma vez, técnicas moleculares como, por exemplo, citometria de fluxo e análise citogenética/hibridização *in situ* por fluorescência (Oscier, 2004; Shanafelt, 2004) podem ajudar no estabelecimento do diagnóstico. Na LLC, linfócitos B neoplásicos serão encontrados para expressar um antígeno de diferenciação do leucócito humano incomum (mas característico), designado CD5, que é típico desta doença. Outros antígenos CD também podem ser detectados pela citometria de fluxo e tornarem-se úteis para a resolução de outros problemas diagnósticos hematológicos.

Leucocitose em razão de leucemias agudas

Tanto a leucemia mieloide aguda como a linfoide apresentam, em geral, uma contagem leucocitária acentuadamente elevada. Na leucemia linfoblástica, numerosos linfoblastos são observados no esfregaço de sangue periférico. As leucemias mieloides podem apresentar-se sob várias formas, incluindo mieloblástica, promielocítica, monoblástica/monocítica, mielomonocítica, eritroblástica e megacarioblástica. Novamente, a citometria de fluxo, imunofenotipagem, a cariotipagem e a análise molecular podem ajudar no estabelecimento do diagnóstico, assim como na definição do prognóstico (Winton, 2004). Essas técnicas são analisadas de maneira mais detalhada no Capítulo 32. Aqui, é indicado que blastos de qualquer tipo em um esfregaço de sangue periférico levantam uma forte possibilidade diagnóstica de leucemia aguda.

Contagem leucocitária baixa

Anemia aplástica. A contagem leucocitária baixa, quando acompanhada por hipoplasia medular e dois ou três dos seguintes achados – anemia (com contagem de reticulócitos corrigida < 1%), neutropenia (contagem de neutrófilos < 500/μL) e trombocitopenia (contagem de plaquetas < 20.000/μL) – pode ser parte de uma pancitopenia generalizada secundária à insuficiência medular (Guinan, 1997; Marsh, 2003). Também conhecida como anemia aplástica, essa condição pode ser primária/herdada ou adquirida/secundária. As causas conhecidas do tipo adquirido incluem drogas/toxinas, infecções (incluindo hepatite), radiação e disfunção imune (Gordon-Smith, 2002). O estudo citogenético pode ser utilizado para descartar a mielodisplasia; quando não ele for bem-sucedido, técnicas moleculares como, por exemplo, a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH, *Fluorescent in Situ Hybridization*), podem ser necessárias para a análise cromossômica (Guinan,1997). Os tipos primários/herdados podem não estar presentes ao nascimento (i. e., congênitos) e o diagnóstico desse tipo de insuficiência medular depende muito da avaliação clínica em conjunto com a avaliação laboratorial adequada (Alter, 1999, 2002).

Sépsis por Gram-negativo como causa de leucopenia. A leucopenia também pode ser observada em outras condições, incluindo a sépsis por Gram-negativo. Curiosamente, a sépsis por Gram-negativo com baixa contagem leucocitária é frequentemente acompanhada por um padrão colestático do fígado (i. e., uma alteração leve de bilirrubinas e de fosfatase alcalina).

Distúrbios da coagulação

Este tópico, vasto e complexo, é discutido na parte V. Para nossa revisão, centramos a atenção em quatro parâmetros hematológicos que podem ser importantes em correlação aos resultados de exames em determinações químicas: contagem de plaquetas, tempo de sangramento (TS), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que reflete a função do sistema de coagulação intrínseco, e o tempo de protrombina (TP), que reflete a função do sistema de coagulação extrínseco. Diminuições da contagem de plaquetas e/ou alterações da agregação plaquetária podem levar a tempos de sangramento anormais. Aumentos do TP e/ou do TTPA geralmente não estão associados a tempos de sangramento anormais, exceto, principalmente, na deficiência de fator VIII, com deficiência concomitante do fator de von Willebrand, que é necessário para a agregação plaquetária.

Historicamente, o TS era utilizado como teste de investigação da função plaquetária. Atualmente, deve-se observar que o TS não é encarado como marcador da exatidão ou da predição do sangramento (DeCaterina, 1994; Gerwitz, 1996), e é raramente utilizado para *work-up* de alterações da função plaquetária (Kottke-Marchant, 2002).

É preciso lembrar que o anticoagulante *heparina*, que acelera a inativação da trombina e de outros fatores da coagulação (como o fator Xa), *bloqueia preferencialmente o sistema intrínseco, acarretando prolongamento do TTPA*, mas não aumentos importantes do TP. Por outro lado, o antagonista da vitamina K, *coumadin*, preferencialmente *bloqueia o fator VII* no sistema extrínseco, acarretando *aumento do TP, mas não do TTPA*.

Quando o TP ou o TTPA aumenta, na ausência de tratamento com heparina ou *coumadin*, e a contagem de plaquetas é normal, é importante realizar estudos mistos do plasma do paciente com plasma normal para determinar se o tempo de coagulação normaliza, isto é, se existe deficiência de um fator. Uma causa frequente de deficiência de fator é a insuficiência hepática, discutida a seguir e no Capítulo 21. Por essa razão, provas de função hepática devem ser checadas nesses casos. Se estudos mistos não corrigirem completamente o tempo de coagulação prolongado, deve-se suspeitar da presença de inibidores da coagulação (p. ex., anticoagulante lúpico ou anticorpos antifator).

Quando a contagem de plaquetas diminui e o TTPA e o TP aumentam, o diagnóstico de coagulação intravascular disseminada (CIVD) deve ser aventado. Esse diagnóstico é confirmado pela elevação dos produtos de degradação da fibrina e, mais especificamente, do dímero D, analisado no Capítulo 39, o fragmento D-D da fibrina, resultante da ação proteolítica da plasmina sobre o coágulo de fibrina que se forma durante a coagulação intravascular. O dímero D é detectado em um ensaio que utiliza um anticorpo monoclonal muito específico para esse produto reticulado de degradação da fibrina. A CIVD é uma condição extremamente perigosa e deve ser rapidamente diagnosticada.

Nessa condição, ocorre uma ativação anormal de *ambas* as cascatas da coagulação e um consumo de plaquetas. Essa ativação pode ser causada pela sépsis por Gram-negativo (endotoxinas bacterianas podem causar a ativação das cascatas), câncer, condições inflamatórias crônicas (p. ex., colagenoses), leucemia (especialmente a leucemia promielocítica aguda), complicações gestacionais, complicações de transfusão sanguínea, insuficiência hepática e traumas (p. ex., queimaduras, afogamento, lesões do SNC etc.). A CIVD provoca a formação de microêmbolos, que podem resultar em infarto ou em isquemia tissular disseminada com alterações concomitantes de exames como, por exemplo, aumento de enzimas hepáticas, aumento do BUN e de creatinina (sugestivos de insuficiência renal) e mesmo aumento de enzimas cardíacas (p. ex., creatina fosfoquinase – CK) e fração MB específica do coração) indicativas de lesão miocárdica. Portanto, a contagem de plaquetas baixa, o aumento do TTPA e do TP, junto de anormalidades bioquímicas sugestivas de disfunção multissistêmica, sugerem fortemente a CIVD. A terapia com anticoagulante deve ser rapidamente instituída para bloquear o avanço da embolização e da destruição tissular.

Anormalidades em bioquímica clínica: patologia bioquímica

Anormalidades eletrolíticas

A Figura 8.1 resume os mecanismos básicos por meio dos quais os rins controlam o equilíbrio hidroeletrolítico. Do ponto de vista funcional, deve-se ter em mente que o *objetivo dos rins é conservar líquidos ou concentrar a urina.* O mecanismo por meio do qual se dá a conservação de líquidos é o aumento do alto gradiente de cloreto de sódio no espaço intersticial entre os ramos ascendente e descendente da alça de Henle, utilizando o mecanismo multiplicador de contracorrente. Nesse mecanismo, o cloreto de sódio é expulso para o espaço intersticial, de modo que a concentração de NaCl torna-se maior em direção à ponta da alça de Henle. O ramo ascendente da alça é impermeável à água, assim como os túbulos contornados distais e os ductos coletores. No entanto, sob o efeito do hormônio antidiurético (ADH), os ductos coletores tornam-se permeáveis à água, permitindo que ela flua para o espaço intersticial e penetre na *vasa recta*. Toda a força impulsionadora para esse processo é a alta concentração de NaCl no interstício. Qualquer interferência no multiplicador de contracorrente bloqueará a reabsorção de água, porque os gradientes iônicos são eliminados.

Como também mostra a Figura 8.1, o íon sódio, do qual 70% são reabsorvidos nos túbulos contornados proximais, pode ser ainda mais reabsorvido nos túbulos contornados distais e ductos coletores sob o efeito da aldosterona da zona glomerulosa do córtex adrenal. Esse hormônio promove a troca de sódio 1:1 por íon potássio ou de hidrogênio. Os níveis de sódio no soro dependem quase completamente da interação entre a aldosterona e o ADH. Com essas considerações simples em mente, as causas mais comuns de hiponatremia e de hipernatremia serão resumidas com uma explicação de como identificá-las.

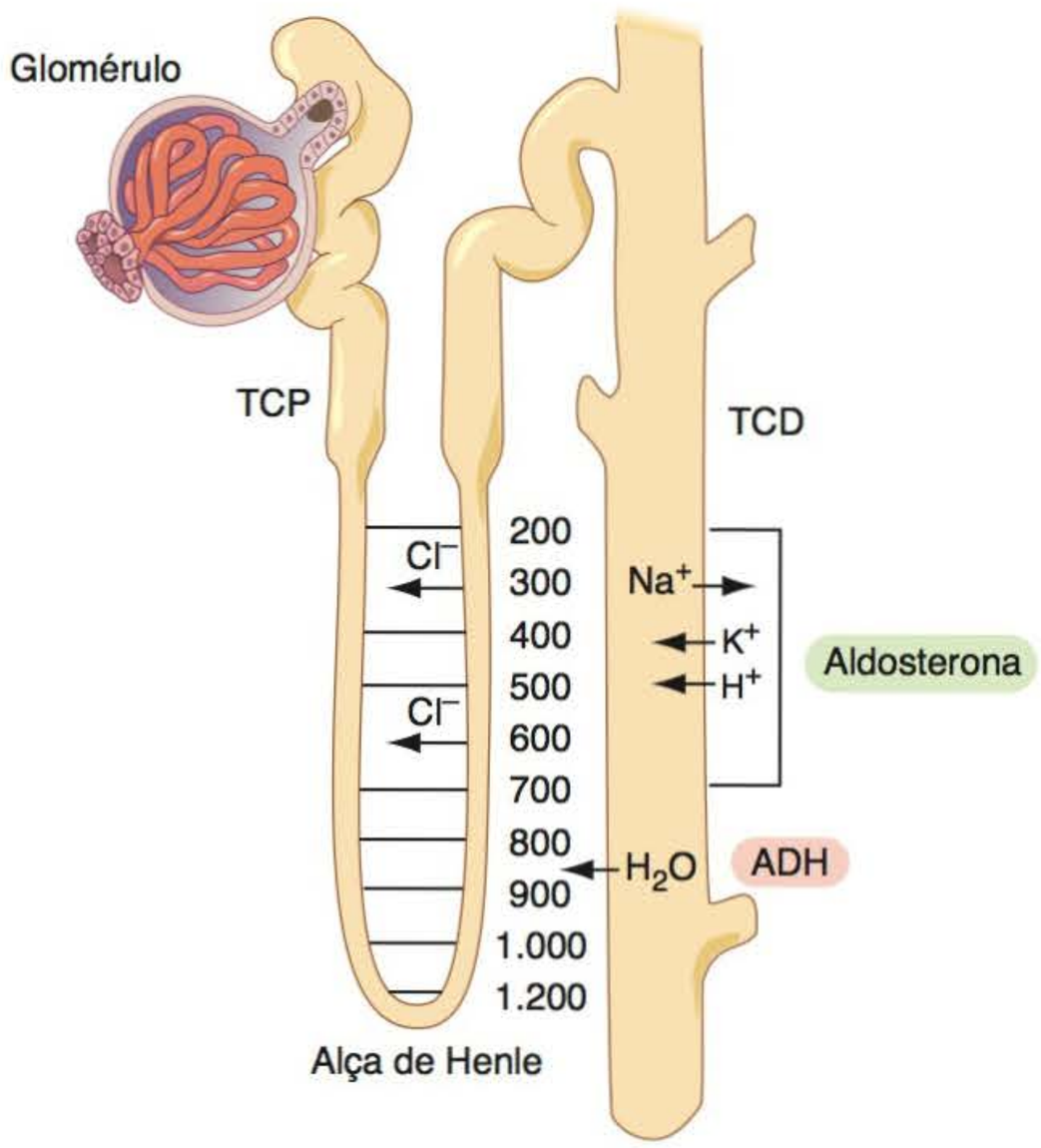


Figura 8.1 Representação esquemática de um néfron mostrando o mecanismo fundamental de conservação de água e sal pelos rins. A filtração ocorre no glomérulo (lado superior esquerdo, mostrando capilares em vermelho) e o filtrado passa através do túbulo contornado proximal (TCP), onde aproximadamente 70% do sódio total filtrado é reabsorvido. Na alça de Henle, o mecanismo multiplicador de contracorrente é ativo. O íon cloreto (Cl^-) é expulso do ramo ascendente para o espaço intersticial (mostrado na parte média superior da figura). O íon sódio acompanha passivamente. As células do ramo ascendente da alça de Henle são impermeáveis à água e as células do ramo descendente são impermeáveis aos íons cloreto. O resultado desse sistema é que uma alta concentração de NaCl é produzida na ponta da alça. Os números ao lado da alça de Henle representam a osmolalidade em diferentes níveis ao longo dela. Nos humanos, ela atinge um máximo de 1.200 mOsm, como é mostrado na figura. No alto da alça (onde ocorre a marca de 300 mOsm), o filtrado torna-se isotônico e, a seguir, hipotônico, em razão da expulsão contínua de íon cloreto. O interstício hipertônico permite que a água se difunda dos ductos coletores desde que o hormônio antidiurético (ADH, identificado e destacado na figura) seja secretado. Uma quantidade maior de íon sódio pode ser conservada no tubo contornado distal (TCD) desde que a aldosterona (identificada e destacada) seja secretada, resultando em uma troca de um para um de Na^+ por K^+ e H^+.

Hiponatremia

As quatro causas mais comuns de hiponatremia são apresentadas na Tabela 8.2, junto de a uma quinta e rara causa, a síndrome de Bartter. Uma sexta causa, metabólica, o diabetes melito, também é apresentada nessa tabela. Em todas as formas de hiponatremia, a concentração de íon cloreto geralmente também está baixa, porque o cloreto é o principal contra-íon do sódio.

Princípio básico

Todas as anormalidades do sódio sérico devem ser acompanhadas pela urinálise no paciente submetido à restrição líquida. Essa urinálise deve incluir a dosagem de sódio e a osmolalidade urinárias. Para as condições 1 e 2 na Tabela 8.2, o sódio sérico tende a se corrigir ao longo de um período de 24 horas quando o paciente é submetido à restrição líquida.

Hiper-hidratação. Nessa condição, cuja causa mais comum é o consumo de grandes quantidades de água ou líquidos hipotônicos (p. ex., polidipsia psicogênica), o nível sérico de sódio diminui para menos de 135 mEq/L. Como a água consumida é excretada pelos rins, a urina também dilui esse íon. De fato, *a osmolalidade urinária será baixa, isto é, < 300 mOsm.* Frequentemente, acompanhando a hiponatremia na hiper-hidratação, encontramos *valores baixos do hematócrito e do BUN*, discutidos na sequência. Essa tríade de achados sugere fortemente a hiper-hidratação como causa. A urinálise em pacientes submetidos à restrição líquida revelará um nível de sódio urinário < 25 mEq/L e osmolalidade baixa. O potássio também pode estar baixo, apesar de ele

Tabela 8.2 Causas comuns de hiponatremia e padrões eletrolíticos séricos e urinários com função renal normal*

Causa	Na sérico	Na urinário	Osmolalidade urinária	K sérico	Na urinário em 24 horas
1. Hiper-hidratação	Baixo	Baixo	Baixa	Normal ou baixo	Baixo
2. Diuréticos	Baixo	Baixo	Baixa	Baixo	Alto
3. SIADH†	Baixo	Alto	Alta	Normal ou baixo	Alto
4. Insuficiência adrenal	Baixo	Levemente elevado	Normal	Alto	Alto
5. Síndrome de Bartter	Baixo	Baixo	Baixa	Baixo	Alto
6. Hiperosmolaridade diabética‡	Baixo	Normal	Normal	Alto	Normal

* Todos os valores de Na e K são concentrações, exceto para o Na urinário de 24 horas, o qual corresponde ao número total de miliequivalentes de Na excretados em 24 horas na urina.

† Secreção de níveis inadequados de ADH.

‡ Nesta condição, a glicemia é acentuadamente elevada.

comumente permanecer na faixa de referência. Como, nessa condição, a água é excretada principalmente na urina, a excreção total de sódio em 24 horas será baixa (causa número 1 na Tabela 8.2).

Uso e/ou abuso de diuréticos. Diuréticos de alça bloqueiam a bomba de cloreto na alça de Henle e, consequentemente, bloqueiam a formação de gradientes iônicos via multiplicador de contracorrente, necessário para a conservação de água, ocorrendo, assim, perda de água. Além disso, como o sódio não é mais retido por acompanhar o cloreto na alça, ele também é eliminado do soro. Ao contrário do que ocorre na hiper-hidratação (entrada 2 da Tab. 8.2), a excreção de sódio em 24 horas é alta. O padrão assemelha-se ao da hiper-hidratação (diluição sérica e urinária), exceto pelo fato de os diuréticos de alça provocarem uma depleção severa de potássio, a não ser que o diurético seja combinado a um diurético poupador de potássio como o triantereno. A combinação de hiponatremia e hipocalemia com uma alta excreção de sódio e de potássio em 24 horas indica o uso de diurético. Evidentemente, a anamnese geralmente também revelará o uso de diuréticos.

Síndrome da secreção inadequada de ADH (SIADH) (entrada 3 da Tab. 8.2). Nesta condição, secundária a trauma craniano, convulsões, outras doenças do SNC e a neoplasias (principalmente os cânceres de pulmão, mama e ovário) que secretam hormônios similares ao ADH, o sódio sérico diminui por causa da retenção excessiva de água nos ductos coletores. Isso acarreta depleção de água nos túbulos renais e, consequentemente, concentração da urina. Por essa razão, embora o soro apresente diluição de sódio (hipotônico), a urina é concentrada a níveis > 40 mEq/L e a osmolalidade urinária ultrapassa 300 mOsm enquanto a osmolalidade sérica é < 280 mOsm. Esse padrão é claramente diagnóstico de SIADH.

Déficit de aldosterona (entrada 4 da Tab. 8.2). Essa condição é secundária à doença de Addison e ao hipoadrenalismo relacionado à AIDS. Sem aldosterona, a troca Na^+-K^+ e Na^+-H^+ nos túbulos contornados distais e nos ductos coletores não ocorre. Por essa razão, a concentração sérica de sódio diminui, enquanto a de potássio aumenta, e ocorre uma acidose metabólica leve. O sódio urinário aumenta, mas não a níveis tão altos como os observados na SIADH e a osmolalidade urinária também não é tão elevada como na SIADH.

Síndrome de Bartter (entrada 5 da Tab. 8.2). Essa condição assemelha-se ao uso de diurético, exceto pelo fato de a hiponatremia não ser corrigida com a restrição líquida. A causa dessa condição rara é desconhecida, mas gradientes de cloreto de sódio não conseguem se formar na alça de Henle. Isso resulta na retenção do íon cloreto que não fica disponível para o mecanismo de contracorrente. Portanto, os gradientes iônicos que normalmente se formam na alça de Henle não existem. Nessa condição, há uma hiponatremia persistente, hipocalemia e uma alta excreção de sódio e potássio em 24 horas.

Estado hiperosmolar diabético. Em pacientes com diabetes melito, quando apresentam um estado hiperosmolar (i. e., glicemia acentuadamente elevada, em torno de 700 mg/dL), a hiperosmolaridade do soro provoca efluxo de água celular, com consequente *diluição osmótica do sódio sérico*. Grosso modo, para *cada aumento de 100 mg/dL da glicemia, ocorre uma diminuição de 1,6 mEq/L na concentração sérica de* Na^+. Como o transporte de glicose para o interior das células é acompanhado pelo transporte concomitante de potássio para o interior das células, níveis baixos de insulina também causam aumento do potássio sérico. Portanto, o efeito do *estado hiperosmolar diabético é um baixo nível sérico de sódio e um alto nível sérico de potássio*. Ele assemelha-se ao *hipoaldosteronismo* (causa 4 na Tab. 8.1), mas a presença de níveis anormalmente altos de glicose indica a possibilidade de diabetes melito como causa.

Pseudo-hiponatremia

Esta condição geralmente é causada pela presença de lipídeos em excesso no soro. Os íons sódio são dissolvidos em lipídeos, os quais podem ocupar um volume considerável do soro. Quando a quantidade absoluta de sódio em um determinado volume de soro é determinada, usando-se métodos de determinação de sódio como a *fotometria de chama*, esse valor é dividido pelo volume da amostra para se obter a concentração. No entanto, parte desse volume é de lipídeos que não contêm sódio. Por essa razão, um valor falsamente baixo de sódio pode ser obtido. Esse artefato foi eliminado com o uso de eletrodos íon-seletivos que determinam diretamente a concentração de sódio e não dependem do conhecimento do volume do soro.

Hipernatremia

A Tabela 8.3 apresenta as três causas básicas de hipernatremia. Observe que cada uma delas é a contraparte de uma causa de hiponatremia. São elas:

Desidratação. Pode ser causada pelo excesso de perda renal com uma depuração positiva alta de água livre (i. e., perda de água maior que de NaCl), sudorese excessiva e baixa ingestão hídrica. O sódio sérico encontra-se elevado, assim como o hematócrito (podendo mascarar uma anemia verdadeira), e o sódio urinário também está alto por causa do aumento da excreção renal de NaCl.

Diabetes insípido. O diabetes insípido pode ser central (neurogênico) (i. e., em razão da diminuição de secreção de vasopressina) ou nefrogênico (i. e., decorrente da diminuição de resposta renal). Funcionalmente, essa condição é o inverso da SIADH, ou seja, a retenção hídrica nos túbulos não é adequada. Embora esta condição não seja totalmente compreendida, podendo ser multifatorial, a pesquisa atual sugere

Tabela 8.3 Causas comuns de hipernatremia e padrões eletrolíticos séricos e urinários com função renal normal*

Causa	Na sérico	Na urinário	Osmolalidade urinária	K sérico	Na urinário em 24 horas
1. Desidratação	Alto	Alto	Alta	Normal	Varia
2. Diabetes insípido	Alto	Baixo	Baixa	Normal	Baixo
3. Doença ou síndrome de Cushing	Alto	Baixo	Normal	Baixo	Baixo

* Todos os valores de Na e K são concentrações, exceto para o Na urinário de 24 horas, o qual corresponde ao número total de miliequivalentes de Na excretados em 24 horas na urina.

que mutações e/ou alterações da expressão proteica de "moléculas do canal de água" (aquaporinas renais) e/ou do receptor de vasopressina V2 dos túbulos coletores renais podem estar envolvidos tanto na perda patológica de água – como no diabetes insípido nefrogênico – quanto na retenção patológica de água, como na SIADH (Schrier, 2003; Brown, 2003; Nguyen, 2003; Nielsen, 2002). O padrão é o nível sérico de sódio elevado e diluição do sódio urinário em razão dos níveis funcionalmente inadequados de ADH.

Hiperaldosteronismo. Esta condição pode ser decorrente da hiperplasia adrenal, síndrome de Cushing e doença de Cushing. O nível de aldosterona circulante é inadequadamente alto, causando reabsorção excessiva de sódio e excreção de íons K^+ e H^+. O paciente apresentará hipernatremia e hipocalemia e exibirá uma alcalose metabólica leve.

Hipocalemia

Muitas das causas de hipocalemia sobrepõem-se às da hiponatremia, incluindo a hiper-hidratação, uso de diuréticos de alça, SIADH e síndrome de Bartter, como foi discutido anteriormente. Além dessas causas, que se sobrepõem às da hiponatremia, existem as seguintes condições que levam unicamente à hipocalemia:

1. infusão de insulina em diabéticos. Causa grandes influxos de potássio para o interior das células, reduzindo sua concentração no soro;
2. alcalose. Os eritrócitos são excelentes tampões; são capazes de trocar íon potássio por íon hidrogênio, portanto, na acidose, íons H^+ entram nos eritrócitos em troca de íons K^+, *por outro lado, na alcalose, íons H^+ deixam os eritrócitos (para neutralizar o excesso de base) enquanto íons K^+ entram nos eritrócitos*;
3. vômito. A Principal perda é de H^+ e K^+ do estômago.

Hipercalemia

Entre as principais causas estão as que também acarretam hipernatremia como desidratação e diabetes insípido, e, também, as seguintes: acidose e diabetes melito (como discutido anteriormente) e hemólise. Qualquer tipo de lesão celular (p. ex., rabdomiólise) e especialmente a hemólise de eritrócitos podem causar hipercalemia. Na hemólise, todo K^+ intracelular é liberado no plasma. Outro analito, que está concentrado nos eritrócitos, que aumenta com o K^+ na hemólise é a LDH. Elevações concomitantes de potássio e LDH no soro devem ser consideradas indicadores de hemólise, seja artificialmente, após uma amostra de sangue ter sido coletada do paciente, ou, menos comumente, a hemólise ser causada por uma condição hemolítica subjacente.

Doença renal (Schnerman, 1998)

Existem quatro analitos que auxiliam no diagnóstico dessa condição: BUN, creatinina, cálcio e fosfato. É curioso que nem o BUN nem a creatinina têm qualquer relação inerente com a função renal, mas ambos, fortuitamente, são ótimos indicadores da condição renal.

BUN

BUN significa nitrogênio ureico sanguíneo. A fórmula da ureia é $H_2N\text{-}CO\text{-}NH_2$. Existem dois moles de nitrogênio por mol de ureia. Este é o produto final do metabolismo de NH_3 no fígado, como é discutido no Capítulo 21. A ureia excretada pelos túbulos renais em uma taxa que é aproximadamente proporcional à taxa de filtração glomerular (TFG). Observe que a ureia *retida*, ou seja, a ureia plasmática ou sérica ou BUN, é quase *inversamente* proporcional à TFG, isto é:

$$\text{BUN} \propto 1/\text{TFG} \tag{8.1}$$

Creatinina

A creatinina é secretada, mas também é reabsorvida em uma extensão aproximadamente igual, de maneira que o efeito final é que a quantidade filtrada é a quantidade excretada. A quantidade total de creatinina filtrada é sua concentração urinária, U_{cr} × volume de urina, V, durante um determinado tempo. O plasma total que liberou essa quantidade de creatinina para os glomérulos é a quantidade total de creatinina filtrada dividida pela concentração plasmática, P_{cr}. Essa quantidade também é a depuração de creatinina, C_{cr}. Assim, a TFG é:

$$\text{TFG} = C_{cr} = U_{cr} \times V/P_{cr} \tag{8.2}$$

Suponhamos que o BUN está anormalmente alto (faixa de referência = 10 mg/mL a 20 mg/mL). Existem duas razões possíveis para isso. A primeira é *pré-renal*, na qual o fluxo plasmático renal está diminuído por causa de lesões como, por exemplo, estenose da artéria renal, trombose de veia renal etc. Isso causa uma redução da TFG. Pela equação 8.1, o BUN aumentará. No entanto, o nível sérico de creatinina (P_{cr} na equação 8.2), faixa de referência 0,5 mg/dL a 1 mg/dL, geralmente permanece nos limites normais, ou pode estar levemente elevado porque, conforme a equação 8.2, a TFG baixa causa diminuição do fluxo urinário (V na equação 8.2). Geralmente, P_{cr} e U_{cr} permanecem nos limites normais. Portanto, haverá um aumento desproporcional de BUN em relação à creatinina. A relação BUN/creatinina é de 10 a 20:1, e na doença pré-renal ela aumenta bem acima de 20:1.

A segunda causa de elevação do BUN é a doença *renal* verdadeira, na qual também haverá um aumento do BUN em razão da baixa TFG. No entanto, aqui, a filtração de creatinina será comprometida, de modo que ocorrerá um aumento correspondente no nível sérico. Logo, na doença renal verdadeira, o BUN e a creatinina aumentam juntos, mantendo a relação BUN/creatinina em 10-20:1 (Newman, 1999). Esse padrão também ocorre na chamada doença *pós-renal*, isto é, uropatia obstrutiva em decorrência da litíase renal ou ureteral (nefro ou urolitíase), aumento da próstata em razão da hipertrofia prostática benigna ou do câncer de próstata, infecção do trato urinário, estase vesical, carcinomas uroteliais etc.

Identificação da lesão. Suponha que um paciente apresente um BUN de, digamos, 60 mg/dL e uma creatinina de 3,5 mg/dL. A insuficiência renal verdadeira pode, consequentemente, ser diagnosticada. Considere, agora, que o rim possui dois compartimentos, um de filtração (glomérulos) e um de concentração (túbulos renais). Se há insuficiência renal, onde está a lesão: no compartimento de filtração ou no de concentração?

Como discutido anteriormente, a função renal é *conservar* líquidos ou concentrar a urina. Por essa razão, se o paciente estiver submetido a uma dieta com restrição líquida, a osmolalidade da urina (Uosm) deve ser significativamente mais alta que a osmolalidade do plasma (Posm). De fato, Uosm/Posm é > 1,2 nos indivíduos normais. Se uma amostra de urina de 24 horas for coletada do paciente mencionado (submetido a uma dieta com restrição líquida) para medir a Uosm, podemos determinar o local da lesão. Se a Uosm/Posm for < 1,2, a urina não está sendo concentrada e, consequentemente, *deve* haver lesão tubular. Por outro lado, se a relação for normal, por exclusão, a lesão deve ser glomerular. As causas de lesão glomerular são muitas, e entre elas estão: glomerulonefrite, pielonefrite, diabetes e infarto. Lesões tubulares também apresentam muitas causas, incluindo pielonefrite, diabetes, necrose papilar, necrose tubular aguda (NTA), infarto, choque, isquemia etc. É notável que, de uma amostra de sangue de apenas 100 μL e de várias alíquotas de urina, podemos não apenas determinar a presença de insuficiência renal, mas também localizar a lesão, e de maneira praticamente não invasiva.

Cálcio e fosfato

Os rins têm um papel importante na regulação do nível de cálcio. Na insuficiência renal, o nível de cálcio tende a cair, enquanto, em correspondência, o nível de fosfato tende a aumentar. O tópico sobre o metabolismo de cálcio e fósforo é analisado detalhadamente no contexto da avaliação da função endócrina (Cap. 24). Aqui, analisamos dois analitos com objetivos diagnósticos.

Lembre-se de que o cálcio é o cátion mais abundante no corpo, e sua maior parte está armazenada nos ossos como hidroxifosfato de cálcio em hidroxiapatita. O cálcio forma complexos com fosfato em várias formas diferentes, dependendo do estado de ionização do fosfato, isto é:

$$H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H^+ \tag{8.3}$$

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^+ \tag{8.4}$$

$$HPO_4^{2-} \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H^+ \tag{8.5}$$

As formas de fosfato de cálcio mais insolúveis são aquelas com mais fosfato básico (i. e., aquelas da equação 8.5). Desse modo, condições alcalinas promovem o depósito de cálcio nos ossos, enquanto condições ácidas promovem a liberação de cálcio dos ossos. Consequentemente, a alcalose promove a hipocalcemia enquanto a acidose promove a hipercalcemia.

Observe, também, que existe um equilíbrio entre o fosfato de cálcio solúvel e o fosfato de cálcio insolúvel nos ossos. Esse equilíbrio pode ser representado como:

$$Ca + P \rightleftharpoons (CaP) \text{ insolúvel} \quad (8.6)$$

O lado esquerdo são todos os sais de fosfato de cálcio solúveis, e o direito, as formas insolúveis do sal. A constante de equilíbrio, K_{sp}, para esse equilíbrio é:

$$K_{sp} = (Ca) \times (P)/(CaP) \text{ insolúvel} \quad (8.7)$$

Como o (CaP) insolúvel está em concentração constante, o produto do Ca solúvel × P solúvel é uma constante, chamada constante de solubilidade. Desse modo, há uma relação *inversa* entre o Ca e o P. Condições de hipocalcemia quase sempre são acompanhadas por hiperfosfatemia e vice-versa.

Do cálcio solúvel, no numerador da equação 8.7, existem duas formas, o cálcio ligado à albumina e globulina na forma de quelato e o chamado cálcio ionizado ou não quelado. Biologicamente, o cálcio ativo encontra-se na forma ionizada. Por essa razão, o nível sérico de cálcio ionizado é considerado a melhor mensuração de hipo, normo ou hipercalcemia.

Os rins são vitais no metabolismo do cálcio e regulam seu nível de duas maneiras: o paratormônio estimula os túbulos renais a *excretarem* fosfato. Pela equação 8.7, o nível sérico de cálcio deve aumentar. Além disso, os rins são vitais para a formação de vitamina D ativa na síntese de 1,25-di-hidroxi-colecalciferol, necessário para a absorção de cálcio nos intestinos.

Na doença renal, em que há insuficiência tubular, a excreção de fosfato é inibida por causa da não responsividade dos túbulos ao paratormônio. Por essa razão, o nível de fosfato aumenta, enquanto o de cálcio diminui. Além disso, a produção de vitamina D ativa cai, diminuindo o cálcio absorvido. A *hipocalcemia e a hiperfosfatemia*, frente a elevações do BUN e creatinina, indicativas de doença renal, são fortes indícios de *insuficiência tubular*.

Outras causas de hipocalcemia. Além da alcalose e da insuficiência renal, a hipocalcemia pode ser causada pelo hipoparatireoidismo, levando também à hiperfosfatemia. Raramente, como nos carcinomas medulares de tireoide e em outros tumores de células APUD (sigla em inglês que significa *captação e descarboxilação de precursor de amina*), a elaboração de calcitonina, um hormônio bem conhecido que reduz o cálcio, pode levar à diminuição do nível sérico de cálcio. Essas causas podem ser englobadas no acrônimo CHAR (Calcitonina, Hipoparatireoidismo, Alcalose, insuficiência Renal).

Causas de hipercalcemia. Além da acidose, as possíveis causas dessa condição podem ser resumidas pelo acrônimo CHIMPS de Bakerman (Bakerman, 1994). CHIMPS indica: Câncer, Hipertireoidismo, causas Iatrogênicas, Mieloma múltiplo, hiperParatireoidismo, Sarcoidose.

Anormalidades nos gases do sangue

Discutimos os efeitos da acidose e da alcalose sobre o nível sérico de cálcio. Contudo, o diagnóstico real de acidose ou da alcalose depende da mensuração do pH do sangue arterial. O tópico gases do sangue é discutido no Capítulo 14. Aqui, centramos a atenção sobre como interpretar resultados anormais e como correlacioná-los a outros achados laboratoriais.

As determinações de gases do sangue são mensurações quantitativas do pH do sangue arterial, P_{CO_2}, bicarbonato, P_{O_2}, saturação de oxigênio e excesso de base. Três dessas mensurações são interdependentes, isto é, a P_{CO_2}, o bicarbonato e o pH, segundo a equação de Henderson-Hasselbach:

$$pH = 6{,}1 + \log[(HCO_3^-)/(H_2CO_3)] \quad (8.8)$$

Como a concentração de H_2CO_3 no sangue é diretamente proporcional à P_{CO_2}, isto é, em temperatura ambiente $H_2CO_3 = 0{,}03 \times P_{CO_2}$, a equação 8.8 pode ser escrita como:

$$pH = 6{,}1 + \log[(HCO_3^-)/(0{,}03 \times Pco_2)] \quad (8.9)$$

Observe que, se o bicarbonato, no numerador da equação 8.9, for consumido como na acidose metabólica, a frequência respiratória aumentará e, consequentemente, ocorrerá diminuição da P_{CO_2}, provocando diminuição do denominador, resultando em compensação. Quando a P_{CO_2} aumenta na acidose respiratória, os rins retêm bicarbonato de modo que *tanto* o numerador *como* o denominador aumentam para manter a relação relativamente constante.

Na interpretação dos resultados gases do sangue, o primeiro valor a ser observado é o do pH. Independentemente dos valores do bicarbonato e da P_{CO_2}, se o pH é inferior a 7,4, o paciente apresenta acidose; se é superior a 7,4, alcalose; se igual a 7,4, não apresenta nem acidose nem alcalose. Após o diagnóstico de acidose ou alcalose ser estabelecido, o bicarbonato ou a P_{CO_2} podem ser utilizados para decidir se ela é de origem metabólica ou respiratória.

A Tabela 8.4 apresenta um resumo das quatro condições básicas anormais: acidose metabólica e respiratória e alcalose metabólica e respiratória. Na acidose metabólica, o problema primário é a produção de ácido como, por exemplo, na cetoacidose diabética, a acidose lática (p. ex., sépsis por Gram-negativo) e insuficiência renal. Esse ácido é tamponado pelo bicarbonato, que é consequentemente consumido. Para compensar a perda de bicarbonato, a frequência respiratória aumenta para diminuir a P_{CO_2}. Portanto, um pH baixo, combinado a um bicarbonato baixo e a uma P_{CO_2} baixa indicam acidose metabólica, como é mostrado na condição 1 da tabela. Como é mostrado na condição 2, condição oposta, alcalose metabólica acarreta reversão dos níveis mostrados na condição 1. A causa mais comum de alcalose metabólica é o vômito, com perda de HCl do estômago e aumento concomitante de bicarbonato.

Quando o CO_2 é retido anormalmente pelos pulmões, como na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), o denominador da equação 8.9 aumenta, provocando queda do pH sanguíneo. Para compensar, os rins retêm bicarbonato e, consequentemente, provocam aumento do numerador dessa equação. Quando o pH sanguíneo encontra-se abaixo de 7,4 e o CO_2 e o bicarbonato estão *aumentados* (condição 3 na Tab. 8.4), a acidose é de origem respiratória. Observe a condição oposta à alcalose respiratória, na condição 4 dessa Tabela. Além da DPOC, as principais causas de acidose respiratória incluem doenças, como a miastenia grave, nas quais há paralisia parcial dos músculos acessórios da respiração; pneumonia; e doenças do sistema nervoso central, que afetam áreas do tronco encefálico, envolvidas no controle respiratório. A alcalose respiratória é causada principalmente por hiperventilação, frequentemente de origem psicogênica. Aqui, a P_{CO_2} é reduzida por causa da velocidade da respiração.

O pH sanguíneo pode afetar os níveis de eletrólitos no soro. Na acidose, além do tamponamento pelo bicarbonato, os eritrócitos também podem tamponar íons H^+ em excesso, trocando-os por íons K^+ intracelulares. O efeito final é uma hipercalemia leve. Uma hipocalemia concomitante ocorre na alcalose. É preciso lembrar também que a acidose pode causar hipercalcemia leve, já a alcalose pode causar hipocalcemia leve e afeta especialmente a fração de cálcio ionizado.

Hiato aniônico

Todos os íons sódio devem ser neutralizados por contraíons, a maior parte dos quais está presente no sangue, sendo constituídos por íons cloreto e bicarbonato e, em menor grau, pelos grupos fosfato, sulfato e carboxilato de proteínas. O nível sérico normal de sódio é de aproximadamente 140 mEq/L, o de cloreto é de cerca de 100 mEq/L e o de bicarbonato é de aproximadamente 24 mEq/L. O hiato aniônico é definido como $Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$, sendo, nos indivíduos normais, em torno de 16. Esses 16 mEq/L realmente incluem outros contraíons que neutralizam o sódio, mas que não são mensurados no soro.

Tabela 8.4 Padrões de pH, P_{CO_2} e bicarbonato em diferentes condições

Condição	pH	Bicarbonato	P_{CO_2}	Causas comuns
1. Acidose metabólica	< 7,40	Baixo	Baixo	Cetoacidose diabética; acidose lática
2. Alcalose metabólica	> 7,40	Alto	Alto	Vômito
3. Acidose respiratória	< 7,40	Alto	Alto	DPOC; paralisia de músculos respiratórios
4. Alcalose respiratória	> 7,40	Baixo	Baixo	Ansiedade; dor aguda

DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica.

Quando um indivíduo apresenta acidose metabólica, na qual o aumento da concentração de íon H^+ é acompanhado por um aumento correspondente de íons Cl^-, o ácido será tamponado pelo bicarbonato (convertido em H_2CO_3). O valor do bicarbonato consequentemente diminui, mas haverá um aumento de 1:1 de íon cloreto. Por essa razão, não haverá alteração no hiato aniônico. Quando a acidose metabólica é decorrente da presença de um ácido cujo contraíon não é Cl^-, como o ácido acetoacético (na acidose diabética) ou o ácido lático (na sépsis ou na hipoperfusão), o bicarbonato diminui, como acima, mas não ocorre aumento correspondente de Cl^-. Consequentemente, ocorre um aumento do hiato aniônico que pode atingir valores de 25 mEq/L a 30 mEq/L. A presença de um hiato aniônico maior significa a presença de acidose metabólica, em razão de um ácido que não contém cloreto.

Hiatos aniônicos baixos. Hiatos aniônicos baixos *consistentes*, geralmente na faixa de 1 mEq/L a 3 mEq/L, indicam a presença de altos níveis de proteína básica, frequentemente uma proteína de mieloma. A proteína básica contém íons amônio, cujo contraíon é o cloreto. Atualmente, o íon "invisível" é o amônio, embora haja um aumento mensurável de íon cloreto. Isso tende a diminuir o hiato aniônico. Hiatos aniônicos persistentemente baixos representam um sinal sério de possível processo maligno, isto é, mieloma.

Oxigenação

Os gases do sangue também fornecem uma excelente mensuração da perfusão tissular por meio da mensuração da P_{O_2} e da saturação de oxigênio da hemoglobina. Os valores normais da P_{O_2} devem estar entre 90 mmHg e 100 mmHg, enquanto a saturação de O_2 deve ser de 100%. Valores baixos de um ou de ambos os parâmetros indicam uma patologia subjacente. As principais causas de valores baixos desses parâmetros são infarto do miocárdio, embolia pulmonar, doença intersticial pulmonar grave (p. ex., pneumonia intersticial) e anoxia tissular secundária à hipoperfusão, como na septicemia e na insuficiência cardíaca congestiva grave. Na embolia pulmonar, ocorre bloqueio da circulação pulmonar pelo êmbolo, apesar da ventilação adequada, dando origem a desigualdades ventilação/perfusão.

Hipercarbia como causa de hipóxia. Outra causa importante de hipóxia no sangue arterial é a retenção de CO_2 como, por exemplo, na DPOC. Isso ocorre porque, na medida em que o CO_2 aumenta nos alvéolos, reduz o volume de O_2 no espaço aéreo. Em valores de P_{CO_2} acima de 50 mmHg, o efeito da P_{O_2} alveolar, representado como P_{AO_2}, torna-se importante, como é ilustrado na Figura 8.2. O oxigênio, ao contrário do CO_2 não é solúvel em água ou nas membranas, de modo que há uma diferença de pressão de aproximadamente 10 mmHg a 15 mmHg entre o O_2 alveolar e o arterial (representado como P_{aO_2}), chamado gradiente A-a. Portanto a P_{aO_2} é ainda mais baixa que a P_{AO_2} diminuída. É importante lembrar que o oxigênio total inspirado, chamado P_{IO_2}, é *particionado* entre o saco alveolar e o sangue arterial. Essa relação pode ser expressa da seguinte forma:

$$P_IO_2 = P_AO_2 + P_aO_2 \quad (8.10)$$

Para cada mol de O_2 consumido, aproximadamente 0,8 mol de CO_2 é produzido. A relação entre o CO_2 produzido e o O_2 consumido é chamada de quociente respiratório, ou QR. A P_{aO_2} pode ser expressa como P_aCO_2/QR. De modo geral, a equação 8.10 pode ser reescrita cômoda seguinte maneira:

$$P_AO_2 = P_IO_2 - P_aCO_2/RQ \quad (8.11)$$

Para um RQ de 0,8:

$$P_AO_2 = P_IO_2 - 1.25 \times P_aCO_2 \quad (8.12)$$

Essa equação afirma que, para cada incremento na P_{aCO_2}, haverá uma redução maior que um para um na P_{AO_2}. Isso resulta em um déficit severo de oxigênio.

A figura 8.3 mostra a curva de dissociação oxigênio-hemoglobina. Observe que é uma curva sigmoidal, por causa da natureza alostérica da ligação do oxigênio à hemoglobina. Para valores de P_{O_2} entre 70 mmHg e 100 mmHg, a saturação da hemoglobina é próxima de 100%. No entanto, para valores de $P_{O_2} < 70$ mmHg, ocorre uma queda acentuada na fração de saturação, de modo que pequenas quedas da P_{O_2} levam a grandes diminuições do percentual de saturação. Compõe esse efeito a diminuição desproporcional da P_{O_2} sempre que a P_{CO_2} aumenta, como foi descrito previamente.

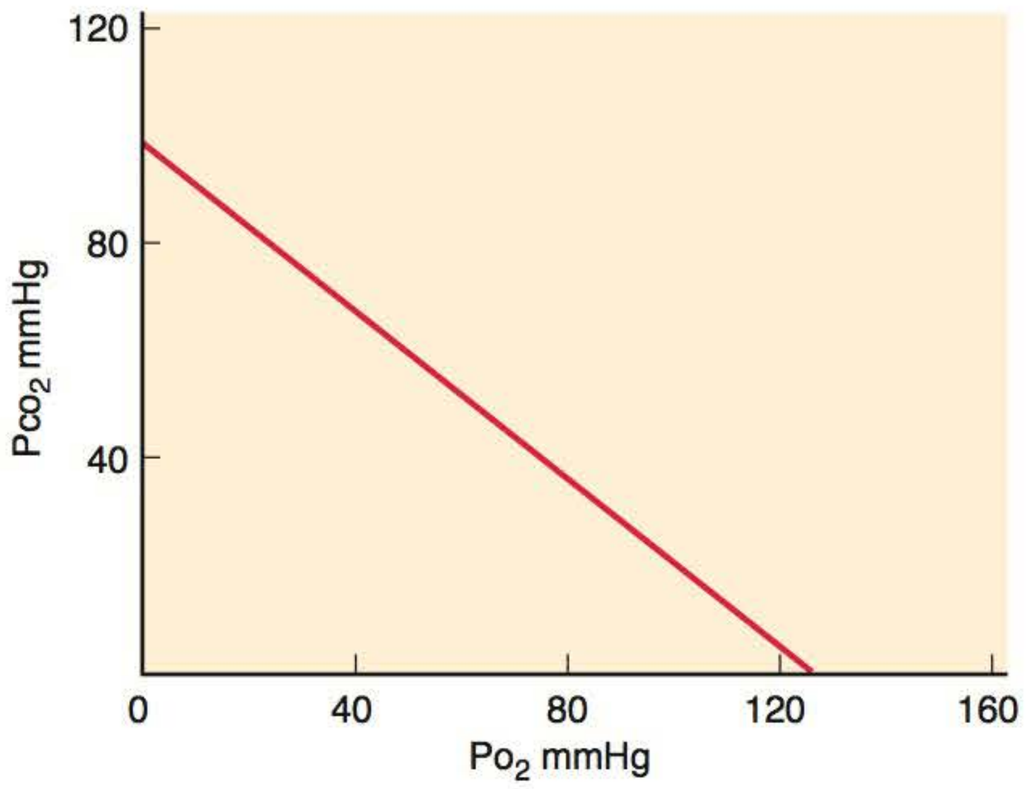


Figura 8.2 Efeito do aumento da P_{CO_2} sobre a P_{O_2} no alvéolo e no sangue arterial. A figura demonstra que, quando a P_{CO_2} aumenta, ocorre uma diminuição maior que um para um da P_{O_2}.

Embora esses eventos deletérios ocorram, a perfusão tissular diminui severamente por causa da diminuição da saturação de oxigênio do sangue arterial. O resultado é a acidose tissular (principalmente em decorrência do ácido lático, resultado do metabolismo anaeróbio). A acidose desvia a dissociação oxigênio-hemoglobina para a direita, como mostra a Figura 8.3, causando uma saturação ainda menor para determinada P_{O_2}, provocando maior diminuição da perfusão tissular e maior acidose tissular. Esse ciclo vicioso pode ser corrigido colocando-se o paciente em um respirador, para aumentar a expiração de CO_2.

O padrão de gases do sangue para esse tipo de paciente será um baixo pH do sangue arterial, PO_2 baixa, saturação de oxigênio baixa, P_{CO_2} alta e bicarbonato baixo. Esse padrão não é típico dos quatro padrões básicos apresentados na Tabela 8.4 porque, no topo de uma acidose respiratória básica (alta P_{CO_2}), há uma acidose lática metabólica tissular sobreposta, que causa um nível baixo de bicarbonato. Esses

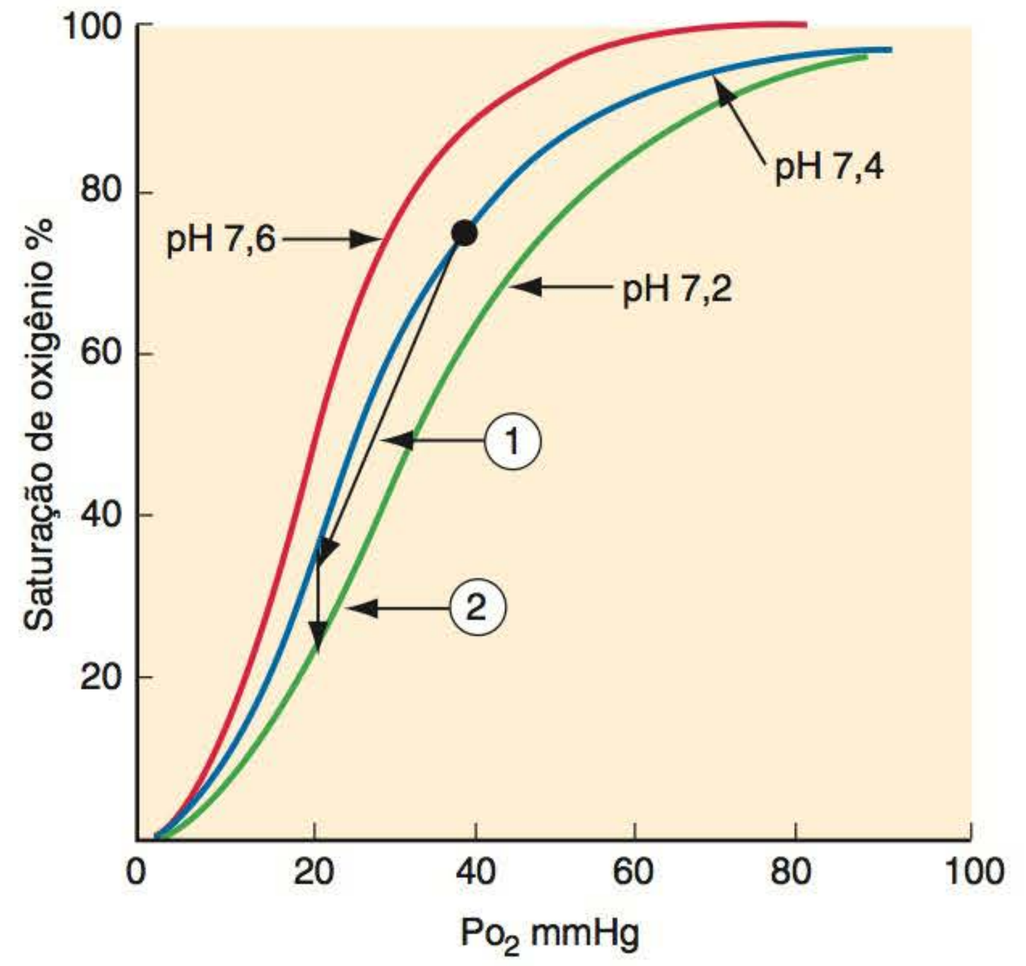


Figura 8.3 Efeitos da diminuição da P_{O_2} na zona alostérica da curva de dissociação oxigênio-hemoglobina. Na curva do pH 7,4 (média), quando a P_{O_2} cai de 80 para 60 mmHg, o efeito sobre a saturação de oxigênio é pequeno. Contudo, uma queda de 40 para 20 mmHg acarreta uma queda maior da saturação de oxigênio, de aproximadamente 80% para 30% (seta 1 na figura). Com essa saturação de oxigênio baixa, ocorre uma acidose lática tissular acentuada em razão do metabolismo anaeróbio. A acidose maior causa uma queda no pH sanguíneo, para 7,2, desviando a dissociação oxigênio-hemoglobina para a direita (curva do pH 7,2). Agora, para uma P_{O_2} de 20 mmHg, a saturação de oxigênio cai ainda mais (seta 2 na figura), para aproximadamente 20%, estabelecendo um ciclo vicioso.

achados, junto da P_{O_2} baixa, indicam a necessidade imediata de ventilação assistida para o paciente.

Ao contrário das duas condições, infarto do miocárdio e embolia pulmonar, o tratamento do estado de hipercarbia aguda *não* é administrar oxigênio, *exceto* se o paciente estiver sendo ventilado adequadamente. A hipercarbia leva à inibição induzida pelo CO_2 dos centros respiratórios localizados na ponte e na medula oblonga do tronco encefálico. De fato, o único impulso respiratório é a hipóxia, induzida pela hipercarbia, fazendo com que os quimiorreceptores, localizados no arco aórtico, enviem sinais para o centro respiratório do encéfalo, para a manutenção da respiração. *A administração de oxigênio aos pacientes nesse estado, sem ventilação, pode causar interrupção da respiração e morte súbita do paciente.*

Anormalidades na glicose

O intervalo de referência para a glicemia de jejum é geralmente entre 70 a 100 mg/dL. Como descrito no Capítulo 16, as duas anormalidades básicas que podem ocorrer com o nível sérico de glicose são a hiperglicemia, quase sempre associada ao diabetes melito e à hipoglicemia, em decorrência de causas iatrogênicas (overdose de insulina no paciente diabético) ou de outras causas subjacentes (p. ex., hipoglicemia reacional decorrente da "hipersensibilidade" à insulina, insulinoma etc.). Para diagnosticar hiperglicemia é vital determinar se o paciente apresenta (1) glicemia de jejum superior ou igual a 126 mg/dL, ou (2) glicemia superior ou igual a 200 mg/dL e sintomas clássicos de diabetes, ou (3) glicemia superior ou igual a 200 mg/dL, duas horas após carga durante um teste oral de tolerância à glicose, (Sacks, 1999). Qualquer um dos achados acima é diagnóstico, se puder ser confirmado com a repetição do exame no dia posterior (Sacks, 1999).

No teste de tolerância à glicose, descrito no Capítulo 16, são acompanhados os níveis de glicose no sangue e na urina de um paciente após administração de uma quantidade bem definida de glicose, via oral, depois de jejum noturno de 12 horas. Normalmente, a glicemia aumenta e, em seguida, cai em aproximadamente duas horas. Entretanto, quando a glicemia permanece elevada, o diagnóstico de diabetes melito pode ser feito. Além disso, se for detectada glicose na urina, em qualquer ponto, uma evidência dessa condição também é obtida, embora a ausência de glicose na urina não descarte o diabetes melito.

Glicemias elevadas também causam glicosilação da hemoglobina. O nível de hemoglobina glicosilada muda lentamente ao longo do tempo e, por essa razão, constitui um indicador estável e confiável da glicemia em um período de 2 a 3 meses. O nível de hemoglobina glicosilada superior a 7% é considerado indicativo de diabetes melito e a eficácia do tratamento é aferida pela redução do nível sérico para menos de 7. De todos os métodos diagnósticos e, especialmente, para monitoração do tratamento do diabetes melito, a dosagem da hemoglobina glicosilada talvez seja o mais acurado, e deve ser mensurado em conjunto com a dosagem da glicemia (Blincko, 2001; Krishnamurti, 2001; Kilpatrick, 2004).

Outros achados laboratoriais anormais no diabetes melito

Como discutido anteriormente, na seção sobre eletrólitos, sob a influência da insulina, sempre que a glicose é transportada para o interior da célula, ela é acompanhada por potássio. No diabetes, na ausência de insulina, a glicose sanguínea se eleva, assim como o potássio. Em razão do aumento do metabolismo de gorduras, ocorre um aumento de ácido acetoacético, levando a uma acidose metabólica. No diabetes, em que a glicemia é excepcionalmente elevada (i. e., > 300 mg/dL), a osmolalidade sérica torna-se perigosamente alta e pode causar coma hiperosmolar não cetótico. Nessa condição, a água dos eritrócitos (e leucócitos) saem das células para o espaço intravascular, tendendo a diluir os analitos, como o sódio. Por essa razão, o paciente com coma hiperosmolar não cetótico pode apresentar soro hiperosmolar, hiperglicemia, hipercalemia e hiponatremia. Em condições de cetose, o paciente apresentará, também, acidose metabólica e um grande hiato aniônico.

Na *hipoglicemia*, o nível sérico de glicose < 60 mg/dL em uma série de amostras aleatórias de soro em jejum indica essa condição. O teste de tolerância à glicose revela que, após um aumento acentuado inicial da glicemia, ocorre uma queda anormalmente rápida para níveis substancialmente inferiores a 60 mg/dL. Quando houver suspeita de hipoglicemia, é aconselhável submeter o paciente a um teste de tolerância à glicose de 5 horas, porque o "declive" hipoglicêmico é comumente observado somente após 3 horas. O teste de tolerância à glicose em pacientes com suspeita de hipoglicemia deve ser realizado com grande cautela, pois o procedimento pode causar uma hipoglicemia reacional grave, acarretando perda da consciência, ou mesmo choque.

Provas de função hepática

A função hepática é discutida detalhadamente no Capítulo 21, no qual é apresentada uma descrição detalhada dos diferentes padrões das provas de função hepática. O leitor achará praticamente impossível memorizar esses padrões sem um conhecimento básico dos princípios subjacentes. Podemos reduzir as anormalidades mais comuns dos exames de função hepática a um conjunto de seis condições apresentadas resumidamente na Tabela 8.5. Os princípios para esses padrões são explicados a seguir.

1. Todas as *lesões agudas e/ou necróticas* do fígado causam, primariamente, um aumento acentuado nos níveis de aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A lesão celular e a necrose também podem aumentar outras enzimas, como a lactato desidrogenase (LDH). Elas incluem a hepatite aguda (p. ex., infecciosa ou induzida por substâncias químicas), infarto e trauma. O trato biliar sempre é afetado, de modo que a bilirrubina direta aumenta em razão da interferência no fluxo biliar. Por causa da lesão do trato biliar, a enzima fosfatase alcalina aumenta juntamente com a γ-glutamil-transferase (γ-GT) e a 5'-nucleotidase < (5'-N). A lesão dos hepatócitos provoca perda da conjugação da bilirrubina transportada, de modo que a bilirrubina indireta (não conjugada) também aumenta.
   Como, geralmente, na hepatite, muito menos de 80% do fígado é destruído, ocorrerá regeneração total, restando tecido suficiente para garantir níveis adequados de síntese proteica e fixação da amônia como ureia. Por esse motivo, os níveis totais de proteína, albumina e amônia permanecem normais. Esses resultados típicos estão resumidos na condição 1 da Tabela 8.5.

Tabela 8.5 Seis padrões básicos das provas de função hepática

Condição	AST	ALT	LDH	FA	PT	Albumina	Bilirrubinas	Amônia
1. Hepatite	Alta	Alta	Alto	Alta	Normal	Normal	Altas	Normal
2. Cirrose	Normal	Normal	Normal	Normal ou discretamente alta	Baixa	Baixa	Altas	Alta
3. Obstrução biliar	Normal	Normal	Normal	Alta	Normal	Normal	Altas	Normal
4. Lesão expansiva	Normal ou alta	Normal ou alta	Alto	Alta	Normal	Normal	Normais ou altas	Normal
5. Congestão passiva	Discretamente alta	Discretamente alta	Discretamente alto	Normal ou discretamente alta	Normal	Normal	Normais ou discretamente altas	Normal
6. Insuficiência fulminante	Muito alta	Alta	Alto	Alta	Baixa	Baixa	Altas	Alta

AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; LDH = lactato desidrogenase; FA = fosfatase alcalina; PT = proteína total.

2. A *cirrose hepática* apresenta duas características principais: fibrose, que impede a regeneração do tecido hepático, não importando onde tenha ocorrido; e nódulos de tecido de regeneração hepática, os quais são as únicas fontes de qualquer tipo de função hepatocítica. Por essa razão, na cirrose, ocorre o padrão quase *reverso* daquele observado na condição 1, na Tabela 8.5, para a hepatite. Como na cirrose pan-hepática ocorre destruição de mais de 80% do tecido hepático, sem regeneração do tecido lesado, os níveis das aminotransferases AST/ALT e do LDH (todos dos nódulos de regeneração) tendem a ser normais ou baixos, ou, ocasionalmente, levemente elevados. No entanto, as proteínas totais e a albumina são anormalmente baixas e o nível de amônia é elevado. Como há quantidade insuficiente de tecido hepático viável remanescente, e porque a fibrose destrói os colangíolos, tanto a bilirrubina indireta como a direta tendem a aumentar. Esses achados estão resumidos na condição 2 da Tabela 8.5.
3. A *obstrução biliar aguda*, causada por cálculos na árvore biliar ou por neoplasias que bloqueiam a excreção de bile, provoca aumento da bilirrubina direta e da fosfatase alcalina do trato biliar, assim como das enzimas γ-GT e 5'-N (ver Tabela). Todas as outras provas de função hepática são normais. Consequentemente, para a obstrução biliar simples, o padrão é o mostrado na condição 3 da Tabela 8.5.
4. *Lesões expansivas* do fígado são caracterizadas, por razões não bem compreendidas, por elevações isoladas das enzimas fosfatase alcalina e LDH. Esse padrão é mostrado na condição 4 da Tabela 8.5. Sua causa mais comum é o carcinoma metastático do fígado.
5. A *congestão passiva* do fígado é caracterizada pela elevação discreta de aminotransferases (AST/ALT) e LDH e, em casos mais graves, por aumentos de bilirrubina total e fosfatase alcalina. Esse padrão também é observado na mononucleose infecciosa, em que o aumento de bilirrubina pode ser acentuado. O padrão geral da congestão passiva é mostrado na condição 5 da Tabela 8.5.
6. A *insuficiência hepática aguda fulminante*, discutida no Capítulo 21, pode decorrer de várias causas, incluindo a síndrome de Reye e a hepatite C (Gill, 2001; Shiodt, 2003). Essa condição é a *insuficiência hepática total*, cujo padrão global (Sunheimer, 1994) é mostrado na condição 6 da Tabela 8.5, e aparece como uma *combinação* de hepatite e cirrose. Aqui, a AST e a ALT atingem valores excepcionalmente altos, com frequência superiores a 10.000 UI/L. Ao mesmo tempo, as proteínas totais e a albumina diminuem de maneira acentuada, e o nível de amônia é anormalmente elevado, causando encefalopatia hepática. Também estão elevadas a LDH, a fosfatase alcalina e as bilirrubinas. Além do aumento acentuado da AST e da ALT, combinado à hiperamonemia, ocorre um aumento desproporcional característico de AST em relação à ALT, confirmando ainda mais o diagnóstico. É vital reconhecer esse padrão porque a condição subjacente é uma emergência médica, que deve ser tratada imediatamente.

Correlações entre as provas de função hepática e outros achados laboratoriais

Na insuficiência hepática grave, secundária à cirrose ou à insuficiência hepática fulminante, não é incomum observarmos anormalidades eletrolíticas nas provas de função renal e no perfil da coagulação. Pacientes com as condições 2 ou 6 da Tabela 8.5 geralmente apresentam ascite com acentuada perda de líquido do terceiro espaço. Isso acarreta aumento dos níveis de ADH e aldosterona para reter água intravascular. Dependendo de qual nível "vencer", o paciente pode apresentar hipo ou hipernatremia.

A insuficiência hepática grave também pode causar síndrome hepatorrenal, isto é, disfunção renal secundária à insuficiência hepática. Essa doença é caracterizada pelos padrões típicos, mostrados nas condições 2 e 6 da Tabela 8.5. Como discutido anteriormente, a insuficiência renal causa aumento do BUN e da creatinina com uma relação de 10-20:1, que são os indicadores da insuficiência . A relação Uosm/Posm é < 1,2:1, indicando disfunção tubular.

Coagulopatias graves com aumento do TTPA e do TP podem ser observadas por causa da ausência de produção de fatores da coagulação. Não raramente, a CIVD acompanha a insuficiência hepática. Essa condição deve ser diferenciada da baixa produção de fatores da coagulação combinada à hepatoesplenomegalia decorrente da hipertensão portal, como na cirrose. A esplenomegalia pode causar sequestro de plaquetas, de modo que o padrão global pode assemelhar-se à CIVD, mas não ser uma CIVD verdadeira. Para estabelecer o diagnóstico de CIVD, deve haver aumento nos níveis de dímero D e de produtos de degradação da fibrina. Além disso, na insuficiência hepática grave, eritrócitos anormais, chamados células-alvo, podem ser observados no esfregaço de sangue periférico.

Pacientes com cirrose e insuficiência hepática aguda fulminante tendem a ser imunocomprometidos. Muitos deles apresentam função defeituosa das células T, mas produzem excesso de imunoglobulina (não eficaz). Por essa razão, tais pacientes tendem a apresentar um nível sérico baixo de albumina, em decorrência da diminuição de sua síntese, mas aumento de imunoglobulinas séricas.

Provas de função cardíaca

Diagnóstico de infarto do miocárdio (IM) e de síndrome coronariana aguda

Esse tópico será discutido ao longo do Capítulo 18. Como o infarto agudo do miocárdio (IAM) exige um diagnóstico rápido e acurado, especialmente agora que existem novas opções terapêuticas com agentes trombolíticos, o laboratório clínico tem sido requisitado para fornecer exames séricos que possibilitem o diagnóstico em um estágio inicial. Até recentemente, o diagnóstico laboratorial baseava-se em determinações seriadas da fração MB da creatina fosfoquinase (CK-MB). A confirmação do diagnóstico era obtida pela chamada "relação inversa" (*flipped ratio*) das isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH) 24 a 36 horas após o evento agudo inicial e/ou pela observação da evolução característica de elevações das três enzimas: creatina fosfoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e LDH.

Essas abordagens foram substituídas, principalmente, por dois outros analitos, a mioglobina e, especialmente, a troponina, que possuem capacidades diagnósticas mais rápidas e específicas. A mioglobina é uma proteína de ligação/transporte de oxigênio encontrada nos músculos cardíaco e esquelético. Seu tamanho, relativamente pequeno, e sua função permitem a liberação precoce das células irreversivelmente lesadas. No entanto, os métodos atuais de mensuração não conseguem distinguir o tecido de origem da mioglobina e, por essa razão, seu uso está limitado à investigação de possível IAM. Um resultado positivo sugere a necessidade de mais *work-up* para IAM.

A troponina é um complexo proteico regulador no tecido muscular. Ela compreende três subunidades denominadas troponina I, troponina T e troponina C. Diferentes genes codificam a troponina I no músculo esquelético e no músculo cardíaco, dando origem a isoformas que apresentam sequências significativamente diferentes. Além disso, a troponina I cardíaca contém um resíduo adicional do aminoácido 31 em seu terminal N. Imunoensaios rápidos e acurados para troponina T e troponina I cardíaca foram desenvolvidos (Moss, 1999; Apple, 1999). No IAM, a troponina I cardíaca aumenta em 4 a 8 horas após o início da dor torácica, atingindo um pico em aproximadamente 12 a 16 horas, e permanece elevada por 5 a 9 dias. Valores iguais ou superiores a 1,5 ng/dL são considerados sugestivos de IAM.

Como o nível de troponina aumenta de maneira relativamente rápida e permanece elevado durante um tempo prolongado, a determinação de troponina substituiu a chamada "relação inversa" das duas isoenzimas de LDH, LDH1 e LDH2. A relação LDH1:LDH2 aumenta para mais de 0,75 e, com frequência, ultrapassa 1, ocorrendo apenas cerca de 36 horas após o início dos sintomas.

A troponina T não possui diferenças de sequência tecido-específicas. Contudo, provou-se que ela é eficaz no diagnóstico do IAM. Um problema com o uso da troponina T é que ela pode estar elevada em pacientes com doença renal (Diris, 2004) embora isso não afete o uso da troponina T na previsão do prognóstico de pacientes com síndrome coronariana aguda (Aviles, 2002). De modo geral, ambas as determinações de troponina apresentam sensibilidade e especificidade superiores a 90%, e o nível sérico elevado de troponina, 12 horas após o início da dor torácica, apresenta 100% de sensibilidade no diagnóstico do IAM.

Deve-se observar que a CK-MB continua sendo útil no diagnóstico do IAM. Trata-se de uma isozima da CK, a qual possui três isoenzimas compostas por duas cadeias (chamadas M e B): MM, MB e BB. A fração MB é, predominantemente, encontrada no músculo cardíaco (Roberts, 1997). Para diagnosticar o IAM a partir do nível sérico da CK-MB, é importante que seja demonstrada uma elevação na *concentração* de CK-MB e na *relação* CK-MB/CK total (também chamada índice cardíaco) (Thompson, 1988; Woo, 1992). Como existe uma pequena quantidade de CK-MB no músculo esquelético, doenças do músculo esquelético que provocam grande aumento do nível de CK-MM também causam um aumento muito elevado da concentração sérica *absoluta*, o que pode levar a resultados falso-positivos para a CK-MB. Além disso, para aumentar a sensibilidade e a especificidade da CK-MB no diagnóstico do IAM, observou-se que é necessária a realização de determinações *seriadas* da fração MB (em intervalos de 3-4 horas ao longo de um período de 12 a 16 horas), que mostram uma elevação progressiva que atinge um pico e é seguida por uma queda a níveis baixos. Esse padrão é praticamente 100% diagnóstico de IM (Lott, 1984; Wu, 1999). É importante notar que a CK-MB geralmente aumenta em 4-6 horas e, algumas vezes, apenas 2 horas após o início da dor torácica, atingindo um pico em 12 horas. Por essa razão, as dosagens de mioglobina e de CK-MB têm sido recomendadas (Wu, 1999; Alpert, 2000; Fromm, 2001; Lewandrowski, 2002) como marcadores precoces do IAM, porque ambas são liberadas logo após um IAM, com a mioglobina e, algumas vezes, com aumento da CK-MB em 1 a 2 horas após o início do quadro.

Contudo, o aumento dos níveis de troponina T e, especialmente, da troponina I é mais específico para a lesão cardíaca que a elevação do nível de CK-MB. Assim como a CK-MB, elas aumentam em 4 a 6 horas e, algumas vezes, em 2 horas após o início da dor torácica. Além disso, níveis elevados de troponina isolados são diagnóstico de IAM e de angina instável, e não exigem determinações de acompanhamento ou cálculo de índices cardíacos para confirmar esses diagnósticos, o que torna a troponina mais efetiva do ponto de vista diagnóstico e mais custo-efetiva que a CK-MB. Como um bônus adicional, a troponina, ao contrário da CK-MB, também serve como marcador para a angina instável. Por isso, muitos centros médicos a utilizam como o marcador preferido para o IM.

Os protocolos atuais para o diagnóstico laboratorial de IAM variam. Em alguns centros médicos, a troponina I, ou a troponina T, é utilizada de maneira exclusiva, enquanto, em outros, tanto a troponina como a CK-MB são utilizadas em conjunto. Baseados nas recomendações iniciais de uma conferência sobre padrões na prática laboratorial (Wu, 1999), relativas ao diagnóstico laboratorial do IAM para pacientes com dor torácica e alterações eletrocardiográficas não diagnósticas, muitos centros utilizam um marcador precoce de lesão miocárdica (p. ex., CK-MB ou mioglobina) junto a um marcador definitivo, isto é, a troponina (alta especificidade e sensibilidade) para a lesão cardíaca. Para pacientes com achados clínicos diagnósticos de IAM antes de o tratamento ter sido iniciado, a troponina e/ou a CK-MB podem ser solicitadas para documentar o infarto, monitorar a extensão da doença, detectar possível reinfarto e monitorar a eficácia terapêutica. Além disso, a troponina e/ou a CK-MB podem ser utilizadas para a detecção perioperatória de IAM durante procedimentos cirúrgicos.

Diagnóstico de insuficiência cardíaca congestiva

Até recentemente, esta condição era diagnosticada exclusivamente com base na sintomatologia e/ou como resultado de procedimentos, como a ecocardiografia. No entanto, um novo biomarcador foi descoberto, o peptídeo natriurético tipo B (BNP), o qual foi aprovado como teste definitivo para essa condição e parece ser um excelente marcador para a insuficiência cardíaca no estágio inicial. Esse exame também pode ser importante do ponto de vista diagnóstico e prognóstico em pacientes com dispneia aguda e dor torácica. O diagnóstico diferencial nesses pacientes inclui a dispneia causada por insuficiência cardíaca crônica (cujos sinais e sintomas geralmente são inespecíficos) *versus* outras causas de dispneia aguda (p. ex., pneumonia, carcinoma, efusão, asma). O nível normal (i. e., um valor preditivo alto negativo para esse exame) parece ser útil para a exclusão de uma etiologia cardíaca nesses pacientes. O nível de BNP também pode ser um preditor independente de arritmia, acidente vascular cerebral (AVC) e morte (Clerico, 2004; Ishii, 2003; Mueller, 2004; Prahash, 2004; Winter, 2004).

Provas de função pancreática

Elevações da amilase e da lipase pancreáticas séricas são marcadores definitivos de doença pancreática. A causa mais comum de tais aumentos no nível sérico dessas enzimas é a pancreatite. Na pancreatite aguda, ambas as enzimas estão elevadas. Como a amilase também é produzida pelas glândulas salivares, ela é ligeiramente menos específica que a lipase como marcador de pancreatite. Elevações desta última são definitivas para a doença pancreática.

Marcadores de condições inflamatórias

Como foi discutido anteriormente, na seção de hematologia, aumentos da contagem leucocitária, especialmente com predominância de neutrófilos, indicam infecção aguda. Na maioria das condições inflamatórias agudas, como observado previamente, proteínas reagentes da fase aguda também estão aumentadas. Essas proteínas manifestam-se nas regiões α (incluindo a α-1-antitripsina e a α-2-macroglobulina) e β (incluindo a ferritina e a PCR) da eletroforese de proteínas séricas. A esse respeito, determinações quantitativas de PCR são muito úteis no reconhecimento de condições inflamatórias agudas.

Recentemente, anticorpos específicos contra a PCR permitiram mensurações altamente sensíveis da PCR (denominada PCR de alta sensibilidade) em concentrações menores que as previamente mensuráveis (Roberts, 2000). Atualmente, níveis elevados de PCR de alta sensibilidade parecem servir como um marcador precoce de inflamação e podem ser úteis na avaliação do risco cardiovascular de AVC e IM (Abrams, 2003; Ridker, 2003; Libby, 2004).

O fibrinogênio, também um reagente da fase aguda, pode aumentar. Frequentemente, a contagem de plaquetas tende a aumentar e as plaquetas, em si, têm sido consideradas "reagentes da fase aguda". Além disso, tanto em condições inflamatórias agudas como crônicas, os eritrócitos podem apresentar um aumento de mobilidade. Por essa razão, ocorre um aumento na velocidade de hemossedimentação (VHS).

Finalmente, uma causa comum de inflamação aguda é a gota, ou seja, hiperuricemia ou elevação do nível sérico de ácido úrico. Cristais de ácido úrico causam uma condição de artrite aguda grave (gota). Níveis séricos de ácido úrico > 7,5 mg/dL são indicativos dessa condição. Achados menos constantes são a presença de cristais de ácido úrico no sedimento urinário (Cap. 27) ou no líquido sinovial (Cap. 28).

Provas de função endócrina

Observamos que o funcionamento anormal da tireoide e do córtex adrenal pode dar origem a achados laboratoriais anormais importantes. Por exemplo, o hipotireoidismo pode dar origem à anemia macrocítica, enquanto o hipoadrenalismo origina distúrbios eletrolíticos, isto é, hiponatremia, hipercalemia e acidose. O hiperadrenalismo produz o efeito oposto, isto é, hipernatremia, hipocalemia e alcalose. Portanto, é importante confirmar a disfunção dessas glândulas endócrinas. O tópico importante das provas de função endócrina é discutido no Capítulo 24. Aqui, apresentaremos princípios simples para o diagnóstico laboratorial e a identificação do local de origem das disfunções tireoidiana e adrenal.

Função tireoidiana

As provas de função de tireoidiana são os exames mais comumente solicitados para avaliação da função endócrina. É importante observar que em uma população hospitalar (em oposição à população ambulatorial), exames de avaliação da função tireoidiana podem ser enganosos do ponto de vista diagnóstico. Isso se deve a respostas ao estresse endócrino (assim como a medicamentos), que podem afetar os níveis hormonais (Van den Berghe, 2003). A glândula tireoide sintetiza hormônio tireoidiano (tetraiodotironina ou T_4, com quatro iodos), o qual exige a captação de iodo pela glândula. Essa atividade é fortemente estimulada pelo hormônio peptídeo hipofisário TSH (hormônio tireoestimulante). Na periferia, o T_4 é convertido em T_3 (três iodos). De importância primordial, *o nível elevado de T_4 leva à inibição da secreção de TSH, enquanto o nível baixo de T_4 provoca elevação de TSH.* No *hipertireoidismo primário (doença tireoidiana primária)*, o *excesso de T_4* é secretado pela *glândula tireoide*, a fonte do problema. Como consequência, o TSH diminui e o T_4 aumenta. Contudo, se houver uma lesão primária hipofisária, como hiperplasia ou adenoma, o TSH

é hipersecretado. Como o TSH encontra-se elevado, a secreção de T_4 é elevada. Isso é denominado *hipertireoidismo secundário (secundário à doença hipofisária)*.

Por outro lado, quando o *TSH hipofisário está reduzindo (problema hipofisário), o T_4 diminui,* sendo denominado *hipotireoidismo secundário.* Quando a secreção de T_4 pela tireoide está baixa, causando *hipotireoidismo primário, o TSH aumenta.* O mais importante é que, frequentemente, no hipotireoidismo subclínico, o T_4 pode se encontrar na faixa de referência, mas o TSH, elevado. Em pacientes ambulatoriais, o TSH elevado em presença de baixo nível de T_4 é diagnóstico de hipotireoidismo primário.

Função adrenal

Conforme discutido em profundidade no Capítulo 24, a glândula adrenal é anatomicamente subdividida em duas glândulas endócrinas: o córtex adrenal e a medula adrenal. Hormônios corticais adrenais são hormônios esteroides de três tipos básicos: mineralocorticoides, como a aldosterona, que regula os íons sódio e potássio nos túbulos contornados distais (discutido anteriormente); os glicocorticoides, como o cortisol, que são neoglicogênicos; e os hormônios sexuais, isto é, os estrogênios e androgênios. A medula adrenal é uma glândula neuroendócrina que secreta epinefrina e norepinefrina, que atuam sobre o sistema nervoso simpático. A dosagem mais comumente solicitada para a mensuração da função adrenal cortical é a de *cortisol*. A secreção de cortisol pelo córtex adrenal é estimulada pelo hormônio hipofisário ACTH (hormônio adrenocorticotrópico). A secreção de ACTH é estimulada pelo hormônio hipotalâmico CRH (hormônio liberador de corticotrofina). Seu nível sérico encontra-se sob controle diurno, de modo que o nível sérico máximo de ACTH atingido é de 200 pg/mL, pela manhã (em torno de 7 horas da manhã), enquanto ele declina ao valor mais baixo (em torno de 100 pg/mL) à meia-noite. A secreção de cortisol acompanha a secreção de ACTH, de modo que seu nível sérico máximo é atingido entre 8 e 9 horas da manhã. O cortisol inibe a secreção de ACTH pela hipófise, tanto por meio do bloqueio direto da secreção hipofisária de ACTH como pela inibição da secreção hipotalâmica de CRH.

Por essa razão, quando o córtex adrenal hipersecreta cortisol, em decorrência de condições como hiperplasia, adenoma ou carcinoma adrenal, o nível sérico de cortisol aumenta e bloqueia a secreção de ACTH. Essa condição é denominada *hiperadrenalismo primário.* O nível sérico de cortisol é elevado, mas o nível de ACTH diminui.

Por outro lado, assim como na secreção do hormônio tireoidiano, quando o nível de ACTH está elevado por um tumor hipofisário secretor de ACTH (doença de Cushing) ou uma secreção ectópica de ACTH, como em um tumor não hipofisário (síndrome de Cushing), o nível de cortisol também aumenta e dá origem ao *hiperadrenalismo secundário.* Tanto o cortisol como o ACTH estão elevados nessa condição; nos casos de doença ou síndrome de Cushing, a variação diurna do ACTH sérico está ausente.

Além da dosagem do cortisol sérico, é frequentemente desejável que seja dosado o nível do cortisol livre urinário em casos de hipercortisolemia. Em geral, quase todo o cortisol está ligado a proteínas séricas, principalmente à transcortina, enquanto, nos estados de hipercortisolemia, o cortisol excede a capacidade da transcortina de ligar-se a ele e, consequentemente, de ser filtrado pelos rins. A faixa de referência para o cortisol sérico matinal é de cerca de 10 a 25 μg/dL, e a para o cortisol livre urinário está em torno de 24 a 108 μg por 24 horas, para homens saudáveis.

Em casos de *hipercortisolismo*, especialmente quando o nível de ACTH pode permanecer na faixa de referência ou cujo valor é alto, mas limítrofe, ou baixo, a realização do *teste de supressão com dexametasona* é normalmente desejável. A dexametasona é um potente glicocorticoide que suprime fortemente a secreção hipofisária normal de ACTH. Isso pode ser conseguido com uma baixa dose de dexametasona, se ela causar diminuição do nível sérico de cortisol e baixo valor do nível de cortisol livre urinário, é mais provável que a função hipofisária esteja normal e que as adrenais estejam hipersecretando cortisol, isto é, *hiperadrenalismo primário*. Esse teste também pode ser utilizado para diferenciar a possível causa do hiperadrenalismo primário, isto é, hiperplasia *versus* adenoma ou carcinoma. Uma dose alta de dexametasona geralmente reduz o nível sérico de cortisol na hiperplasia adrenal, enquanto não tem efeito em casos de adenoma ou carcinoma adrenal.

Por outro lado, na *insuficiência hipofisária* o nível sérico de ACTH diminui, assim como o nível sérico de cortisol, porque a secreção de ACTH pelas adrenais diminui. Essa condição é denominada *hipoadrenalismo secundário.* Quando a *função adrenal está comprometida (insuficiência adrenal primária*), o nível sérico de cortisol diminui, resultando em menor inibição da secreção hipofisária de ACTH e, consequentemente, em elevação do nível sérico de ACTH. Essa condição é denominada *hipoadrenalismo primário* ou *doença de Addison.*

Exemplos de casos clínicos com correlações clinicopatológicas

Considerando o panorama já apresentado de muitas características proeminentes das causas dos achados laboratoriais anormais mais comuns, os resultados laboratoriais de diversos pacientes são, agora, apresentados para ilustrar como os níveis de analitos mudam em diferentes doenças, e como essas concentrações de analitos são utilizadas para diagnosticar essas condições.

Caso A. Homem branco, 64 anos, foi encontrado inconsciente em sua casa após sofrer um AVC e foi levado a um serviço de emergência. Seu hematócrito era de 44%, mas a contagem eritrocitária era de 4,3 milhões/μL (abaixo do limite normal de 4,6 milhões/μL) com um VCM de 104 fL. Uma série de dosagens do sódio sérico apresentou valores entre 164 e 175 mEq/L. O BUN, no momento da admissão, era de 33 mg/dL e a creatinina era de 1,5 mg/dL. A osmolalidade sérica total era de 357 mOsm (limite superior ao normal de 290 mOsm) enquanto a osmolalidade urinária era de 1.008 mOsm (limite superior ao normal de 1.000 mOsm) e a dosagem aleatória do sódio urinário era de 228 mEq/L.

As provas de função hepática revelaram uma AST ligeiramente elevada, de 41 UI/L (limite superior ao normal de 39 UI/L); LDH elevada, mas diminuindo continuamente (valor no momento da admissão de 426 UI/L; acima do limite normal de 200 IU/L); g-GT de 72 UI/L (limite superior ao normal de 43 UI/L); proteínas totais de 7,8 g/dL (normal), mas um valor baixo de albumina de 2,8 g/dL (normal de 3,5–5 g/dL). A lipase estava moderadamente elevada, 127 UI/L (limite superior ao normal de 60 UI/L). As pesquisas de sangue oculto nas fezes e de *Clostridium difficile* foram positivas, a urina foi positiva para nitrito (indicativo de bacteriúria) e acentuadamente positiva para a hemoglobina, eritrócitos e leucócitos.

Após a infusão de solução salina hipotônica, o hematócrito diminuiu para 34%, mas subiu em seguida para 38% com um VCM persistentemente elevado. O sódio e o BUN diminuíram, mas permaneceram na faixa de referência.

Avaliação. O diagnóstico básico da condição desse paciente é a hipernatremia. Ele estava desidratado, como mostrou a concentração sérica de sódio, acentuadamente elevada (valor médio de 169 mEq/L), hematócrito normal alto e BUN elevado. Observe que o diagnóstico de desidratação foi confirmado pelo achado de altas concentrações séricas *e* urinária (228 mEq/L) de sódio e uma osmolalidade urinária alta de 1.008 mOsm (Tabela 8.3).

A contagem eritrocitária estava baixa, o que parece contradizer o hematócrito normal alto. Essa aparente discrepância pode ser explicada pela macrocitose, fazendo com que cada eritrócito ocupe um volume maior que o normal. No entanto, o número total de células estava diminuído. A baixa contagem eritrocitária indica uma anemia verdadeira. A macrocitose foi causada por uma deficiência nutricional (vitamina B_{12}). Todos esses achados podem ser atribuídos à má nutrição e ao consumo insuficiente de líquidos, um achado comum entre idosos, especialmente nessa vítima de AVC.

Observe que o BUN e a creatinina encontravam-se levemente elevados, em um padrão com uma relação > 20:1, sugerindo etiologia pré-renal (baixa perfusão). Os túbulos renais certamente estavam funcionando bem, o que foi evidenciado pela alta relação entre osmolalidade urinária/osmolalidade sérica (1.008/357 = 2,8, superior a 1,2:1). A hipoperfusão também pode ter causado as anormalidades leves encontradas em algumas das provas de função hepática e a elevada lipase pancreática.

Note também que as proteínas totais estavam normais apesar de a albumina, a proteína sérica mais abundante, estar baixa. Possivelmente, por causa de duas doenças infecciosas identificadas nos exames de urina e fezes, o paciente pode ter produzido níveis elevados de imunoglobulinas.

Acompanhando o AVC, o paciente apresentou uma úlcera péptica, denominada úlcera de Cushing, sabidamente associada a essa condição. Daí a presença de sangue oculto nas fezes do paciente. Sabe-se que o *C. difficile* infecta pacientes com doença debilitante crônica. A infecção do trato urinário foi responsável pela alta contagem eritrocitária na urina do paciente.

O caso seguinte ilustra um distúrbio eletrolítico mais complexo.

Caso B. Homem branco, 31 anos, com diabetes melito tipo I confirmado, doença renal em estágio final secundária a nefropatia diabética e história de alcoolismo. Foi admitido com dor abdominal aguda na região média do epigástrio, com glicemia de 736 mg/dL, que subiu até 933 mg/dL; sódio sérico de 134 mEq/L, que diminuiu para 124 mEq/L; potássio de 7,1 mEq/L; BUN de 64 mg/dL; e creatinina de 18 mg/dL. Esses valores foram confirmados e foi observado que eles seguiam uma tendência consistente. A osmolalidade sérica era de 316 mOsm. Os resultados de gases do sangue foram: pH de 7,58, P_{O2} de 121 mmHg, saturação de O_2 de 99%, P_{CO_2} de 20 mmHg e bicarbonato de 20 mEq/L. O hiato aniônico subiu em um dia de 13 (limite superior ao normal) para 20. A lipase sérica era de 469 UI/L (limite máximo normal de 60 UI/L). O paciente não apresentava débito urinário e foi submetido a diálise peritoneal.

Avaliação. O paciente diabético, evidentemente, encontrava-se em estado hiperosmolar em razão da glicemia anormalmente elevada. O baixo nível de sódio e o alto nível de potássio séricos pareciam ser decorrentes da baixa concentração de aldosterona circulante ou da insuficiência tubular renal. Contudo, o paciente não apresentava débito urinário, de modo que não estava ocorrendo filtração. A doença renal em estágio final é refletida nos valores do BUN e, especialmente, da creatinina (18 mg/dL). A relação BUN/creatinina de aproximadamente 4 confirmou o diagnóstico de insuficiência renal verdadeira.

Como observado na discussão sobre glicose, no diabetes melito com glicemia elevada ocorre efluxo de água celular que provoca diluição dos analitos séricos, como o sódio. Sempre que a glicose é transportada para o interior das células sob influência da insulina, ela é acompanhada por potássio. Consequentemente, o nível baixo de insulina acarreta hipercalemia. Esse mecanismo foi eficaz nesse paciente, embora o hiato aniônico tenha aumentado após a admissão, o qual, no momento da admissão, era normal. Portanto, o paciente apresentava um estado hiperosmolar não cetótico, porém tornou-se cetótico posteriormente.

A admissão do quadro inicial de gases no sangue sugeria alcalose respiratória, pois o pH do sangue arterial era de 7,57 (alcalose), mas a P_{CO2} estava baixa (20 mmHg), assim como o bicarbonato (20 mEq/L) (condição 4 na Tabela 8.4). Esse é um achado incomum em um paciente com diabetes melito, no qual, frequentemente acidose metabólica é mais observada.

Uma explicação para esse achado pode ser encontrada na lipase sérica, que estava acentuadamente elevada, indicando pancreatite, um achado comum em pacientes com história de alcoolismo. A dor epigástrica intensa provocou aumento da frequência respiratória (no momento da admissão era de 25/min) desencadeando uma *diminuição* da P_{CO2}, a qual foi parcialmente compensada por uma redução do bicarbonato.

O tratamento desse paciente com diálise, hidratação e insulina corrigiu os achados laboratoriais anormais e o paciente foi retirado da diálise crônica.

O caso seguinte apresenta distúrbios múltiplos, incluindo os eletrolíticos, todos relacionados à insuficiência hepática.

Caso C. Mulher branca, 38 anos, com antecedente de múltiplos procedimentos cirúrgicos abdominais ao longo de um período de sete anos, consumo abusivo esporádico de álcool, pancreatite e uma história de tabagismo com consumo de 30 maços por ano. Foi levada ao serviço de emergência em choque e com dor abdominal aguda. Os valores laboratoriais importantes incluíam: contagem leucocitária de $12{,}1 \times 10^3/\mu L$, contagem eritrocitária de $3{,}07 \times 10^6/\mu L$, hematócrito de 34,6% e índices eritrocitários que revelaram macrocitose e hipocromia (concentração de hemoglobina corpuscular média baixa). Os níveis de vitamina B_{12} e o folato estavam normais. O esfregaço de sangue periférico demonstrou um padrão leucoeritroblástico. A glicemia estava baixa (38 mg/dL); o valor das proteínas totais era de 4,3 g/dL e o da albumina, de 1,5 g/dL. O nível de lactato estava elevado, assim como a fosfatase alcalina a 241 UI/L (superior ao limite normal de 129 IU/L); a bilirrubina estava moderadamente elevada a 1,6 mg/dL (acima do limite normal de 1,2 mg/dL). A amônia sérica estava elevada, 146 micromolares (superior ao limite normal, de 30 micromolares). A investigação para hepatite A, B e C foi negativa. Múltiplas culturas de sangue, urina e orofaringe foram negativas. A laparotomia exploradora revelou aderências abdominais e coléstase. No período pós-operatório, a paciente apresentou encefalopatia. A função hepática se deteriorou, conforme evidenciado por elevações drásticas da AST e da ALT dos níveis normais para 1.660 UI/L e 545 UI/L, respectivamente; da LDH para 2.190 UI/L; das bilirrubinas para 14,5 mg/dL; e da amônia para 177 micromolares. Uma cintilografia do baço e do fígado realizada no quinto dia de hospitalização não revelou captação do radiofármaco no fígado, consistente com insuficiência hepática funcional. O sódio sérico, normal na admissão, aumentou, em 5 dias, para 166 mEq/L, junto do nível de cloreto, que subiu para 123 mEq/L, um padrão que persistiu durante a internação, apesar da infusão intravenosa agressiva de solução salina hipotônica. O potássio sérico permaneceu constante, < 3,5 mEq/L. O BUN e a creatinina aumentaram e atingiram níveis anormalmente altos, com uma relação < 20:1, sugerindo insuficiência renal. A aldosterona plasmática estava elevada, com 13,2 ng/dL (superior ao limite normal de 8,5 ng/dL). A contagem de plaquetas caiu rapidamente, ao passo que o TTPA e o TP aumentaram e atingiram valores de pelo menos duas vezes os controles correspondentes normais, enquanto o nível de produtos de degradação da fibrina tornou-se anormalmente elevado. A condição da paciente piorou e ela faleceu no oitavo dia de internação.

Avaliação. Apesar do quadro complexo da paciente, seu problema fundamental eram as provas de função hepática, dramaticamente anormais. Observe como houve uma elevação aguda de aminotransferases (transaminases) com a relação AST/ALT significativamente acima de 1. Houve elevação concomitante de bilirrubinas e LDH. Ao mesmo tempo, os níveis de proteínas totais e albumina estavam anormalmente baixos. O nível de amônia aumentou rapidamente (apesar das altas doses de lactulose). O padrão é o de insuficiência hepática fulminante, mostrado na condição 6 da Tabela 8.5. Essa condição é uma emergência médica e está associada à encefalopatia fatal e à coagulação intravascular disseminada (CIVD) grave, evidenciada pela baixa contagem de plaquetas, aumento dos níveis de TP, TTPA e produtos de degradação da fibrina. Tal condição pode causar infartos multissistêmicos, resultando em falência múltipla de órgãos.

O sangue periférico da paciente apresentou macrocitose, mas, concomitantemente, um quadro leucoeritroblástico. Esse padrão sugere que a macrocitose tenha sido causada por um aumento do número de formas precursoras de eritrócitos. Essa condição, provavelmente, foi causada pela CIVD, que causa anemia hemolítica microangiopática com um quadro leucoeritroblástico. É possível que, com uma contagem leucocitária persistentemente elevada e um alto nível de lactato, a sépsis por Gram-negativo, afetando a medula óssea, também possa ter contribuído para o quadro leucoeritroblástico. Embora as culturas tenham sido consistentemente negativas, a paciente foi tratada com antibióticos de amplo espectro, cujos efeitos podem ter bloqueado o crescimento de microrganismos na cultura. Como observado previamente, pacientes com insuficiência hepática decorrente de cirrose ou insuficiência hepática fulminante aguda geralmente apresentam imunocomprometimento.

Tanto na cirrose generalizada como na insuficiência hepática fulminante ocorre perda grave de líquido do terceiro espaço com, invariavelmente, ocorrência de ascite. Observamos previamente que, para reter volume vascular, tanto a aldosterona como o ADH aumentam. Parece que a aldosterona aumenta até níveis acentuadamente elevados, provocando retenção anormal de sódio e perda de potássio.

A insuficiência renal quase sempre acompanha a cirrose e a insuficiência hepática fulminante aguda, geralmente manifestando-se pela síndrome hepatorrenal. Na insuficiência hepática fulminante, uma outra causa possível é a neurose tubular aguda (NTA).

Referências bibliográficas

Abrams J: C-reactive protein, inflammation, and coronary risk: An update. Cardiol Clin 2003; 21:327–331.

Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP, et al: Myocardial infarction redefined – A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol 2000; 36:959–969.

Alter BP: Bone marrow failure syndromes. Clin Lab Med 1999; 19:113–133.

Alter BP: Bone marrow failure syndromes in children. Pediatr Clin N Am 2002; 49:973–988.

Apple FS, Henderson AR: Cardiac function. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1999, pp 1178–1203.

Aviles RJ, Askari AT, Lindahl B, et al: Troponin T levels in patients with acute coronary syndromes, with or without renal dysfunction. N Engl J Med 2002; 346:2047–2052.

Bakerman S, Strausbauch P: ABC's of Interpretive Laboratory Data, 2nd ed. Myrtle Beach, SC, Interpretive Laboratory Data, 1994.

Trata-se de uma excelente revisão não só sobre o uso do teste laboratorial como também sobre a metodologia subjacente.

Blincko S, Edwards R: Current issues in glycated haemoglobin measurement. Clin Lab 2001; 47:377–385.

Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F: Errors in laboratory medicine. Clin Chem 2002; 48:691–698.

Importante revisão sobre erros laboratoriais e como identificá-los.

Brigden M, Graydon C: Eosinophilia detected by automated blood cell counting in ambulatory North American outpatients: Incidence and clinical significance. Arch Pathol Lab Med 1997; 121:963–967.

Brito-Babapulle F: The eosinophilias, including the idiopathic hypereosinophilic syndrome. Br J Haematol 2003; 121:203–223.

Brown D: The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. Am J Physiol Renal Physiol 2003; 284:F893–F901.

Clerico A, Emdin M: Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: A review. Clin Chem 2004; 50:33–50.

Revisão atualizada sobre o uso do BNP no diagnóstico da insuficiência cardíaca congestiva. É especialmente relevante, se considerarmos a ampla atenção que esse analito tem recebido.

DeCaterina R, Lanza M, Manca G, Strata GB, et al: Bleeding time and bleeding: An analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding. Blood 1994; 84:3363–3370.

Dighe AS, Soderberg BL, Laposata M: Narrative interpretations for the clinical laboratory evaluations: An overview. Am J Clin Pathol 2001; 116(Suppl 1):S123–S128.

Diris JH, Hackeng CM, Kooman JP, et al: Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. Circulation 2004; 109:23–25.

Fromm Jr RE, Roberts R: Sensitivity and specificity of new serum markers for mild cardionecrosis. Curr Probl Cardiol 2001; 26:246–284.

George TI, Arber DA: Pathology of the myeloproliferative diseases. Hematol Oncol Clin North Am 2003; 17:1101–1127.

Gerwirtz AS, Miller ML, Keys TF: The clinical usefulness of the preoperative bleeding time. Arch Pathol Lab Med 1996; 120:353–356.

Gill RQ, Sterling RK: Acute liver failure. J Clin Gastroenterol 2001; 33:191–198.

Glassman AB: Cytogenetics: An evolving role in the diagnosis and treatment of cancer. Clin Lab Med 1997; 17:21–37.

Gordon-Smith EC, Marsh JC, Gibson FM: Views on the pathophysiology of aplastic anemia. Int J Hematol 2002; 76(Suppl 2):163–166.

Guinan EC: Clinical aspects of aplastic anemia. Hematol Oncol Clin North Am 1997; 11:1025–1044.

Hughes T, Branford S: Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. Semin Hematol 2003; 40(Suppl 2):62–68.

Ishii J, Cui W, Kitagawa F, et al: Prognostic value of combination of cardiac troponin T and B-type natriuretic peptide after initiation of treatment in patients with chronic heart failure. Clin Chem 2003; 49:2020–2026.

Kilpatrick ES: HbA_{1c} measurement. J Clin Pathol 2004; 57:344–345.

Kottke-Marchant K, Corcoran G: The laboratory diagnosis of platelet disorders: An algorithmic approach. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:133–146.

Krishnamurti U, Steffes MW: Glycohemoglobin: A primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. Clin Chem 2001; 47:1157–1165.

Lewandrowski K, Chen A, Januzzi J: Cardiac markers for myocardial infarction. Am J Clin Pathol 2002; 118(Suppl 1):S93–S99.

Trata-se de uma excelente revisão sobre os diferentes biomarcadores de infarto do miocárdio e de sua utilidade no diagnóstico dessa condição.

Libby P, Ridker PM: Inflammation and atherosclerosis: Role of C-reactive protein in risk assessment. Am J Med 2004; 116(Suppl 6A):9S–16S.

Lott JA: Serum enzyme determinations in the diagnosis of acute myocardial infarction: An update. Hum Pathol 1984; 15:706–716.

Marsh JC, Ball SE, Darbyshire P, et al: Guidelines for the diagnosis and management of acquired aplastic anemia. Br J Haematol 2003; 123:782–801.

Moss DW, Henderson AR: Clinical enzymology. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999, pp 617–721.

Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, et al: Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. N Engl J Med 2004; 350:647–654.

Newman DJ, Price CP: Renal function and nitrogen metabolites. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed, Philadelphia, WB Saunders, 1999, pp 1204–1270.

Excelente discussão sobre a avaliação laboratorial da função renal utilizando BUN e creatinina, e sobre como os rins regulam os metabólitos contendo nitrogênio.

Nielsen S, Froklar J, Marples D, et al: Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine. Physiol Rev 2002; 82:205–244.

Nguyen MK, Nielsen S, Kurtz I: Molecular pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus. Clin Exp Nephrol 2003; 7:9–17.

Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al: Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. Br J Haematol 2004; 125: 294–317.

Prahash A, Lynch T: B-type natriuretic peptide: A diagnostic, prognostic, and therapeutic tool in heart failure. Am J Crit Care 2004; 13:46–53.

Ridker PM: High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: Rationale for screening and primary prevention. Am J Cardiol 2003; 92(Suppl):17K–22K.

Roberts R: Rapid MB CK subform assay and the early diagnosis of myocardial infarction. Clin Lab Med 1997; 17:669–683.

Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, et al: Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: Implications for clinical and epidemiological applications. Clin Chem 2000; 46:461–468.

Rothenberg ME: Eosinophilia. N Engl J Med 1998; 338:1592–1600.

Sacks DB: Carbohydrates. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed, Philadelphia, WB Saunders, 1999, pp 750–808.

Sattler M, Griffin JD: Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. Semin Hematol 2003; 40(Suppl 2):4–10.

Schiodt FV, Lee WM: Fulminant liver disease. Clin Liver Dis 2003; 7: 331–349.

Schnermann JB, Sayegh SI: Kidney Physiology. New York, Lippincott-Raven, 1998.

Schrier RW, Cadnapaphornchai MA: Renal aquaporin water channels: From molecules to human disease. Prog Biophys Mol Biol 2003; 81:117–131.

Seebach JD, Morant R, Ruegg R, et al: The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammation and infectious disease. Am J Clin Pathol 1997; 107:582–591.

Shanafelt TD, Call TG: Current approach to diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. Mayo Clin Proc 2004; 79: 388–398.

Silver RT: Chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2003; 17:1159–1173.

Sunheimer R, Capaldo G, Kashanian F, et al: Serum analyte pattern characteristic of fulminant hepatic failure. Ann Clin Lab Sci 1994; 24:101–109.

Este artigo resume os padrões de analitos séricos da função hepática, cuja ocorrência foi descoberta nessa doença rara e fatal. O artigo correlaciona os padrões de analito aos achados patológicos teciduais.

Thompson WG, Mahr RG, Yohannan W, Pincus MR: Use of creatine kinase MB isoenzyme for diagnosing myocardial infarction when total creatine kinase activity is high. Clin Chem 1988; 34:2208–2210.

Van den Berghe G: Endocrine evaluation of patients with critical illness. Endocrinol Metab Clin N Am 2003; 32:385–410.

Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al: Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. N Engl J Med 2004; 350:655–663.

Winter WE, Elin RJ: The role and assessment of ventricular peptides in heart failure. Clin Lab Med 2004; 24:235–274.

Winton EF, Langston AA: Update in acute leukemia 2003: A risk adapted approach to acute myeloblastic leukemia in adults. Semin Oncol 2004; 31(Suppl 4):80–86.

Witte DL, VanNess SA, Angstadt DS, et al: Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results: How many? Clin Chem 1997; 43:1352–1356.

Woo J, Zaman S, Patel L: The diagnostic value of specific CK-MB assay in acute myocardial infarction. *In* Miyai K, Kanno T, Ishikawa E (eds): Progress in Clinical Biochemistry, London, Elsevier, 1992, pp 243–246.

Wu AH, Apple FS, Gibler WB, et al: National Academy of Clinical Biochemistry standards of laboratory practice: Recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. Clin Chem 1999; 45:1104–1121.

CAPÍTULO 9

Estatística laboratorial

Richard A. McPherson MD

Introdução 106
Definições 106
Variáveis 107
Preparo para análise de dados 107
Estatística descritiva 108
- Tendência central 108
- Distribuição gaussiana (normal) 108
- Dispersão 108
- Medidas não paramétricas 109

Estatística comparativa 109
- Teste *t*-Student 109
- Testes não paramétricos 111

Análise de dados discretos: testes de proporções 111
- Teste de Qui-quadrado 111

Avaliação de tendência e estatística de correlação 111
- Regressão linear 111
- Comparações de métodos 112
- Análise de variância 113
- Análise de covariância 113

Validação de método e controle de processo 113
- Limites de referência 113
- Acurácia 114
- Precisão 114
- Sensibilidade analítica 114
- Especificidade analítica 114
- Aceitabilidade de um método 114

Referências bibliográficas 114

PONTOS-CHAVE

- Para a análise estatística, as variáveis nominais podem assumir apenas um número limitado de valores (categorias), enquanto as variáveis contínuas são empregadas para descrever dados quantitativos.
- As variáveis independentes são consideradas "dados de entrada" (causa), enquanto as variáveis dependentes constituem "dados de saída" (efeito).
- As distribuições de dados contínuos são descritas por meio de uma medida de tendência central (p. ex., média ou mediana) e de dispersão (desvio-padrão). As distribuições gaussianas derivam de uma fórmula matemática e, portanto, são paramétricas. Uma aplicação comum da estatística descritiva é a determinação dos limites de referência.
- Testes estatísticos, como aqueles que comparam diferentes grupos de pontos de dados, podem ser paramétricos (i. e., podem assumir distribuições gaussianas, a exemplo do Teste *t*-Student) ou não paramétricos (i. e., quando não fazem suposição de distribuições; um exemplo é o teste baseado na ordem de postos).
- Intervalos de confiança são preferíveis à estimativa por ponto para expressar o grau de certeza do cálculo de qualquer parâmetro estatístico.
- Os dados nominais são convenientemente analisados com proporções, utilizando-se o teste do Qui-quadrado.
- O efeito de múltiplos fatores em um sistema-modelo pode ser avaliado por meio da análise de variância (ANOVA).
- A análise de regressão entre duas variáveis contínuas usualmente é realizada por meio do ajuste de quadrados mínimos a uma linha reta. As análises de regressão são comumente aplicadas na comparação de diferentes métodos analíticos para validação em laboratórios clínicos.

Introdução

A quantificação de informações em resumos e comparações significativas constitui o domínio da análise estatística. Em uma análise, a primeira tarefa consiste em fornecer uma descrição da magnitude das observações e do grau de proximidade existente entre as diferentes quantificações. A estatística descritiva fornece um quadro consistente para cálculos ou estimativas da tendência central de dados contínuos expressa familiarmente em média, mediana e moda. A variação apresentada pelos dados geralmente é descrita por meio do cálculo matemático de variâncias e desvios-padrão (DP), ou por intermédio da simples localização de pontos de dados dentro de uma faixa de percentis (p. ex., limite interquartil). Essas abordagens representam um fenômeno que faz parte do dia a dia dos laboratórios clínicos, no monitoramento de todos os ensaios quantitativos. Os limites de referência são inicialmente estabelecidos com essas técnicas. Os métodos de controle de qualidade para os testes de acurácia de precisão e proficiência são igualmente baseados nesses princípios. Para dados que não são contínuos, mas que assumem apenas dois ou poucos valores discretos (p. ex., positivo ou negativo), a análise pode ser realizada contando-se o número em cada categoria e verificando-se a proporção de todos os valores por categoria.

Ao comparar dados, a típica pergunta que surge é se um grupo difere do outro. Tais comparações geralmente são realizadas empregando-se o teste *t*-Student ou a análise de variância, conforme sejam comparados dois ou mais grupos de dados contínuos. Se os dados forem discretos, a comparação será realizada empregando a análise de Qui-quadrado. Quando os dados podem assumir uma gama de valores distintos, torna-se conveniente estabelecer uma correlação entre dois conjuntos de dados diferentes com um ajuste em linha reta. Iniciantes em análise estatística frequentemente perguntam: "Que teste estatístico é o melhor?". A escolha do teste a ser utilizado depende bastante de os dados serem contínuos ou discretos, bem como de os dados contínuos seguirem determinadas distribuições. Contudo, a estatística baseia-se na conversão, de modo que o investigador deve tentar diligentemente entender a importância das diferenças existentes entre os testes, como também se as possíveis descobertas e conclusões refletem, de forma satisfatória, a natureza e a importância da pergunta que está sendo levantada. Em contraste com o investigador, que está interessado em encontrar o teste certo para os dados que já coletou, o estatístico preocupa-se mais em ajudar o investigador a planejar o experimento e a coleta de dados, de modo que os testes estatísticos apresentem maior validade. Este capítulo apresenta uma carga significativa de exemplos comuns de laboratório clínico, aos quais são aplicados testes estatísticos específicos para demonstrar algumas opções úteis.

Definições

Variáveis: tudo o que se mede, conta ou delineia de algum modo é denominado variável porque assume valores que variam. Usualmente, considera-se que as variáveis podem ser classificadas em uma das seguintes escalas:

- *Escala nominal:* em que a variável pode assumir apenas um número limitado de valores, geralmente chamados de categorias (ou caracteres). São exemplos de variáveis nominais o gênero (masculino ou feminino), os fatores de risco (fumante ou não fumante) etc.
- *Escala ordinal:* em que a variável assume valores específicos que apresentam algum grau de ordem inerente, como magnitude, sem que haja, contudo, distâncias equivalentes entre as categorias (p. ex., traços 1+, 2+ etc. de proteínas na urina).
- *Escala intervalar:* em que uma variável assume valores dentro de uma faixa quantitativa com diferenças definidas entre os pontos. Por convenção, trata-se a maioria das medidas laboratoriais numéricas como variáveis contínuas, ainda que sejam reportadas como variáveis discretas (p. ex., valores de glicose de 123 ou 124 mg/dL, e não 123,857... mg/dL).

Coeficiente de variação (CV): é o DP de um conjunto de pontos de dados dividido pela média do resultado, expresso tanto em percentual como em fração decimal.
Intervalo de confiança (IC): intervalo computado para incluir um parâmetro, como a média com uma determinada probabilidade (p. ex., 90, 95 ou 99%).
Graus de liberdade (gl): é um parâmetro relacionado ao tamanho da amostra (n). O gl indica o número de quantidades livres passível de variação, sendo usualmente igual a n – 1 para aplicações como o teste t. Para o teste do Qui-quadrado, é igual ao número de linhas subtraído uma vez do número de colunas menos um. O gl é empregado no cálculo de p para um teste estatístico.
Distribuição gaussiana normal: trata-se de uma dispersão de dados em que os elementos são distribuídos de forma simétrica ao redor da média, com a maioria dos valores próxima ao centro. É explicitamente descrita por uma equação matemática e, desse modo, constitui uma distribuição paramétrica. A dispersão aleatória ou a seleção ao acaso de uma população, com frequência, resulta em uma distribuição gaussiana normal. Esse tipo de distribuição, muitas vezes, é um critério para a aplicação inteiramente válida de muitos testes paramétricos.
Regressão linear: é o processo matemático utilizado para calcular a reta que melhor se ajusta à relação observada entre duas variáveis medidas a partir dos mesmos itens. A regressão linear simples ou de quadrados mínimos fornece o melhor ajuste para conjuntos de dados x e y, minimizando a somatória das diferenças ao quadrado do eixo y (distância vertical) existentes entre cada ponto de dados (x,y) e a reta. Essa abordagem assume que os dados do eixo x são praticamente perfeitos ou isentos de erro. Uma distribuição irregular dos pontos de dados ao longo de uma faixa inteira pode alterar significativamente a segurança da regressão linear. A regressão linear de Deming não considera que os dados do eixo x estejam livres de erro e, em vez disso, utiliza a soma ponderada do quadrado das diferenças entre os pontos de dados dos eixos x e y em relação à reta. O coeficiente de correlação (r) descreve o grau de adequação da reta aos dados (r varia de –1 a 1).
Z*Média:* é a soma de todos os resultados dividida pelo número de resultados. Também relacionada à média, a mediana corresponde ao valor situado exatamente no meio da distribuição de pontos de dados, que a divide nas metades superior e inferior (também denominada 50º percentil); a moda é outra medida relacionada à média, que corresponde ao valor mais comum. A média, a mediana e a moda são medidas de tendência central.
Estatística paramétrica: representa as medidas estatísticas que são calculadas considerando-se que os pontos de dados seguem uma distribuição gaussiana. Incluem parâmetros como média, variância e desvio-padrão.
Estatística não paramétrica: baseia-se em postos ou na ordem dos dados.
Hipótese nula (H_o): propõe que não serão encontradas diferenças a partir de uma comparação. A hipótese alternativa, ao contrário, afirma que há diferenças. Quando o valor crítico de uma estatística é excedido, a hipótese nula é rejeitada e, assim, a aceitação da hipótese alternativa é favorecida.
Nível de significância (p ou α): é a probabilidade de que a diferença existente entre os grupos ocorra unicamente ao acaso e, por convenção, deve ser inferior a 0,05.
Poder estatístico (1 – β): é a probabilidade de que uma diferença existente entre os grupos seja detectada pelo estudo e, em geral, deve ser maior ou igual a 80%.
Desvio-padrão: é a raiz quadrada da soma das diferenças entre cada um dos pontos de dados e a média, elevada ao quadrado, dividida por n – 1 para as amostras (no caso das populações, a soma é dividida por n). O DP é uma medida preditiva da dispersão dos dados em relação à média, segundo uma distribuição gaussiana normal.
Índice de desvio padrão (IDP): é a diferença existente entre o valor de um ponto de dado e o valor da média, dividida pelo DP do grupo. A transformação z consiste na expressão de um resultado a partir da média em unidades de DP. O valor Z é a probabilidade de um resultado ser z DPs em relação à média. O IDP costuma ser utilizado para descrever o desempenho em um teste de proficiência para um laboratório individual, comparado à avaliação por pares.
Teste t-Student: constitui um teste estatístico empregado para comparar as médias entre dois grupos amostrais. O teste pode ser pareado (p. ex., duas medidas separadas dos mesmos indivíduos realizadas antes e após uma determinada intervenção) ou não pareado. Os valores *t* e gl geram um nível de significância estatística (p).
Erro de tipo I (erro alfa, α): consiste no erro de rejeitar indevidamente a hipótese nula e considerar que dois grupos são estatisticamente diferentes, sem que o sejam de fato.
Erro de tipo II (erro beta, β): consiste em aceitar de forma indevida a hipótese nula e considerar que dois grupos, estatisticamente distintos, não difiram entre si.

Variáveis

As perguntas estatísticas frequentemente são apresentadas em termos de dados de entrada *versus* dados de saída, causa e efeito ou correlação existente entre duas ou mais variáveis. Os dados de entrada, ou causas, são considerados *variáveis independentes*, visto que já foram determinados e não são influenciados por outros fatores. São exemplos de variáveis independentes o gênero, a temperatura, o tempo etc. Em contraste, as *variáveis dependentes* são aquelas que podem sofrer alteração em resposta à variável independente. Alguns exemplos de variáveis dependentes são a concentração de glicose no sangue, as atividades enzimáticas, a presença ou a ausência de malignidade etc. Obviamente, é possível mudar de ideia e trocar aquilo que se considera variável dependente e o que seria uma variável independente, caso a pergunta do experimento seja modificada. Para fins de representação gráfica, a variável independente é representada no eixo horizontal (*x*), ou eixo das abcissas, enquanto as variáveis independentes são representadas ao longo do eixo vertical (*y*), ou eixo das ordenadas. Com uma única variável independente (p. ex., tempo) no eixo *x*, é possível assinalar mais de uma variável dependente no eixo *y* para demonstrar a existência de diferentes relações simultaneamente. A relação observada entre uma variável independente e as variáveis dependentes é utilizada para prever resultados futuros associados às variáveis dependentes, com base nos valores assumidos pela variável independente.

Preparo para análise de dados

Atualmente, a maioria dos cálculos estatísticos é realizada de maneira automática por programas de computador, os quais contam com inúmeras opções sofisticadas de análise e de representação gráfica dos dados. Preparar os dados para submetê-los a essas análises automáticas sempre requer convertê-los a um formato que seja legível para o programa. Esse processo pode implicar tanto a transferência automática de um conjunto de dados eletrônicos para o *software* estatístico como a entrada manual dos dados a partir de planilhas. A entrada manual dos dados obviamente apresenta muitas oportunidades para se cometer error tipográficos, contudo, até a transferência automática dos dados está sujeita à inserção de dados errados, especialmente quando se traduzem conjuntos de dados mais antigos armazenados em um meio que

pode ter sido corrompido (p. ex., fitas magnéticas que são reexaminadas depois de décadas). Mesmo a conversão de dados enfileirados a colunas ou linhas de pontos de dados pode resultar no posicionamento errado de alguns valores. Consequentemente, recomenda-se sempre examinar a acurácia do conjunto de dados antes de iniciar a análise estatística. Esse exame pode ser feito por meio da revisão comparada de cada entrada ou entrada dupla de cada um dos valores acompanhada da comparação automática das discrepâncias, embora ambas as abordagens sejam inviáveis nos casos em que o conjunto de dados é composto por centenas, milhares ou um número ainda maior de valores. Por último, o exame visual dos valores representados graficamente fornece uma ideia da possível existência de erros de entrada de dados. Por exemplo, a entrada incorreta de um valor igual a 50,0 para a concentração de potássio (em vez de 5,0) poderá ser identificada imediatamente por intermédio da varredura de todos os valores de um gráfico. O indivíduo que se prepara para realizar análises estatísticas deve executar esse teste visual, a fim de identificar e corrigir os erros mais óbvios, bem como procurar quaisquer erros sistemáticos que também possam advir da transferência e da entrada de dados.

Estatística descritiva

Quando múltiplos pontos de dados são obtidos, é útil providenciar um resumo que facilite a sua compreensão, em vez de simplesmente listar todos os valores. Os métodos empregados para resumir dados são denominados *estatística descritiva*, visto que descrevem a magnitude dos resultados e o modo como os pontos de dados diferem entre si. No caso das variáveis categóricas, essa descrição pode ser uma simples contagem de valores discretos (p. ex., quantos homens e mulheres tiraram sangue em uma clínica). Para as variáveis contínuas, é convencional empregar alguma medida de *tendência central* em torno da qual os pontos de dados se agrupam e medir o quanto esses pontos estão *dispersos* entre si (p. ex., qual é a idade dos pacientes que tiraram sangue).

Tendência central

A medida de tendência central mais conhecida é, talvez, a *média*, ou o valor médio, que é calculada somando-se todos os pontos de dados individuais e dividindo-se a soma resultante pelo número total de pontos de dados, sendo expressa como:

$$\text{Média} = \bar{x} = (x_1 + x_2 + \ldots x_n) \div n = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \qquad (9.1)$$

Como essa técnica deriva a média a partir de uma fórmula definida, é denominada um *método paramétrico*. Uma medida alternativa da tendência central é a *mediana*, que divide todos os pontos de dados exatamente na metade, sendo uma das metades superior e a outra inferior. A mediana é também chamada de 50º percentil. Como não é calculada a partir de uma fórmula, uma vez que é obtida por meio da contagem direta dos pontos de dados, é denominada um *método não paramétrico*. A terceira medida de tendência central mais utilizada é a *moda*, que é o valor mais comum, isso é, o valor da variável que corresponde ao maior número de pontos de dados. A moda não é uma medida muito útil para descrever ou comparar conjuntos de dados, entretanto possibilita compreender quando um determinado conjunto de dados consiste de duas ou mais populações diferentes, caso em que há mais de uma moda. Se existirem duas populações separadas, diz-se que a população é bimodal, e assim por diante. Em geral, os métodos paramétricos constituem boas opções de cálculos para aplicação de diversos testes estatísticos que utilizam fórmulas específicas. A vantagem dos métodos não paramétricos, por sua vez, consiste no fato de sua aplicação não assumir nem requerer que os pontos de dados sigam uma determinada distribuição. Os métodos paramétricos podem ser aplicados a conjuntos de dados que se desviam das distribuições escolhidas; contudo, se tais desvios forem extremos, os cálculos e as conclusões obtidas talvez não sejam totalmente confiáveis.

Distribuição gaussiana (normal)

A distribuição gaussiana (também chamada normal) consiste de uma curva simétrica, em forma de sino, centralizada em torno da média (Fig. 9.1). É descrita pela seguinte fórmula matemática:

$$P(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\varpi}} e^{-\left(\frac{(x-\bar{x})^2}{2\sigma^2}\right)} \qquad (9.2)$$

Em que σ é o desvio-padrão da população gaussiana ideal (Dawson-Saunders, 1994). Corresponde à distância da média ao valor de x em que a curva apresenta um ponto de inflexão.

A área localizada abaixo dessa curva, junto a ± 1 σ em torno da média, é aproximadamente 68,2% da área total, de modo que 68,2% dos pontos de dados em uma distribuição gaussiana devem estar dentro de um intervalo de ± 1 σ ao redor da média. Similarmente, 95,5% dos pontos de dados estarão junto a ± 2 σ em torno da média, e 99,7% estarão dentro de um intervalo de ± 3 σ ao redor da média.

Dispersão

Uma medida paramétrica comum (baseada na distribuição gaussiana) da dispersão dos pontos de dados em torno da média de uma população, observando-se o desvio padrão, pode ser matematicamente calculada como:

$$\text{Desvio padrão} = \text{DP} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (9.3)$$

A grandeza no interior da raiz quadrada é denominada *variância*. O uso do desvio-padrão considera que os dados estão distribuídos segundo uma curva em forma de sino, a qual pode ser descrita matematicamente por meio da fórmula da distribuição gaussiana normal. Enquanto os dados apresentarem distribuição normal, o desvio padrão poderá ser considerado uma boa estimativa do grau de dispersão.

Dois termos adicionais derivam do desvio-padrão. Um deles é o *coeficiente de variação (CV)*, que é calculado dividindo-se o DP pela média. O CV frequentemente é expresso em percentual, embora também possa ser expresso como fração decimal menor que 1. Assim, em uma situação em que a média é igual a 25 e o DP vale 5, o CV será igual a 20% ou 0,20. O outro termo é o *índice de desvio-padrão (IDP)*, que representa a distância de um ponto de dados individual em relação à média dividida pelo DP. O principal emprego do IDP ocorre em aplicações semelhantes aos testes de proficiência, nas quais o desempenho de qualquer laboratório é padronizado de acordo com a dispersão dos dados no desempenho de todos os laboratórios.

Uma aplicação laboratorial clínica comum da distribuição normal é o cálculo dos 95% de valores centrais obtidos a partir de uma população sadia, quando se tenta estabelecer um limite de referência para dado analito. Esse limite certamente pode ser calculado com facilidade, como sendo a média ± 2 DP para uma população que segue uma distribuição gaussiana normal. Um exemplo seria o cálculo dos 95% de valores centrais da contagem de leucócitos sanguíneos (LS) em um grupo composto por 85 estudantes de medicina sadios (Fig. 9.2). A representação em gráfico de barras, a grosso modo, segue um padrão em forma de sino e é simétrica, embora exista uma discreta assimetria que provavelmente pode ser desprezada. A média é igual a $6{,}60 \times 10^9$ células/L, com um DP de $1{,}457 \times 10^9$ células/L, sendo que o limite de 95% é igual a $3{,}69 - 9{,}52 \times 10^9$ células/L. Trata-se de um grupo de indivíduos pequeno, se comparado ao que poderia ser utilizado para calcular os limites de referência na situação real, contudo é capaz de mostrar

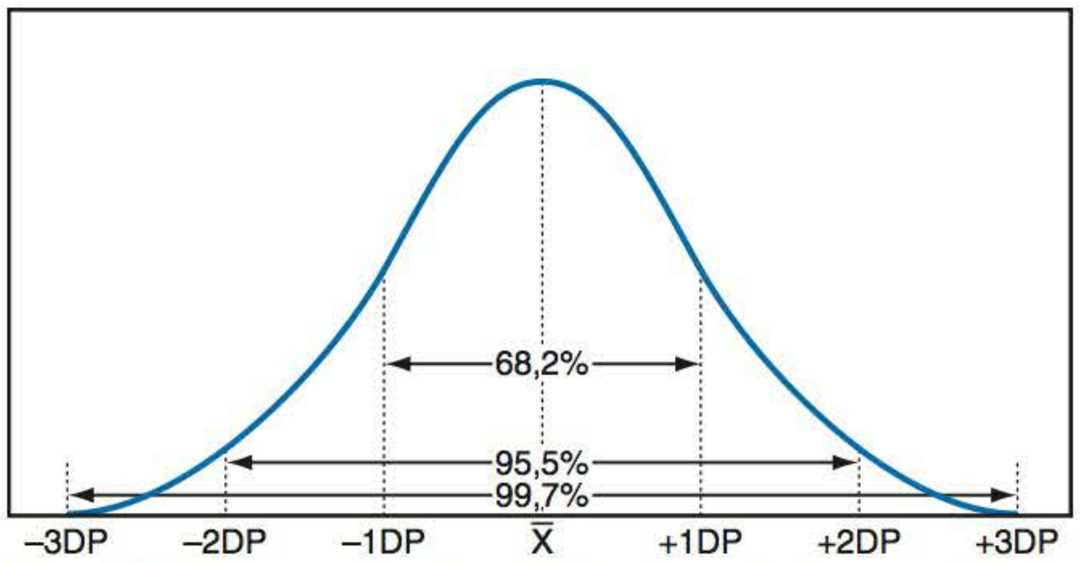


Figura 9.1 Distribuição gaussiana (normal) idealizada, mostrando as áreas abaixo da curva que correspondem à média ± 1, 2 e 3 desvios-padrão.

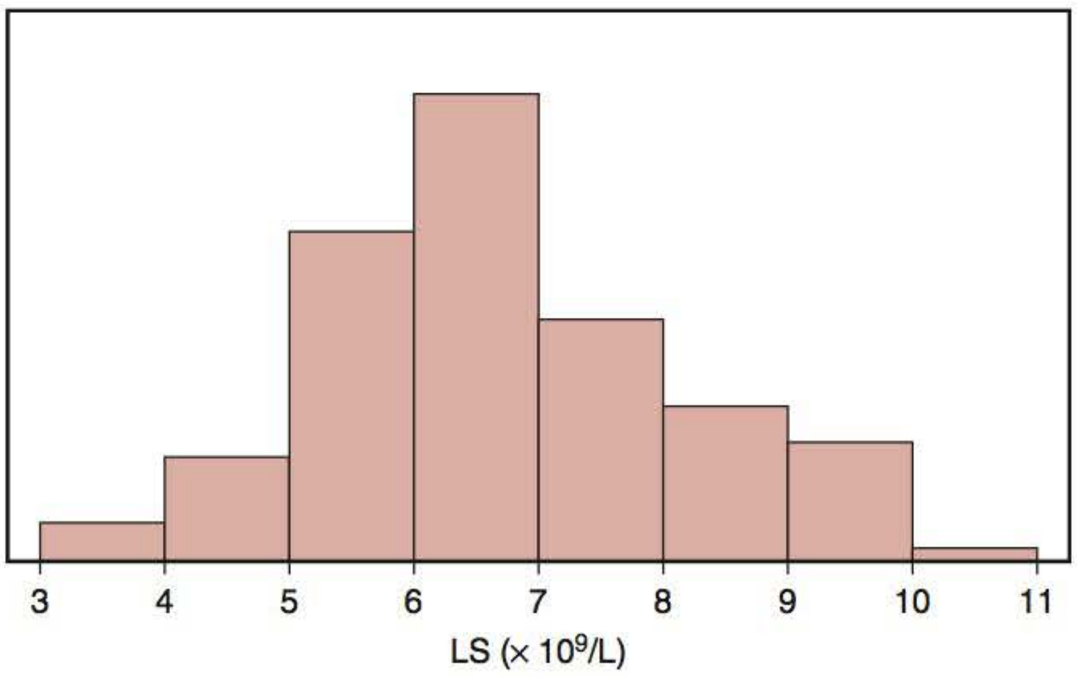


Figura 9.2 Distribuição de leucócitos no sangue de 85 indivíduos sadios.

alguns indivíduos apresentando contagem de LS acima do limite de referência, bem como indivíduos com contagens abaixo desse limite. Desse modo, essa estimativa dos 95% centrais parece ser adequada.

Outra forma de raciocinar acerca desses cálculos seria considerar que os indivíduos testados representam apenas uma amostra de todos os indivíduos em relação aos quais se pretende generalizar esses achados (Daniel, 1999). A média realmente observada provavelmente seria algo diferente se outro grupo de 85 indivíduos sadios fosse testado. Com base nos valores observados e na sua dispersão, é possível estabelecer um intervalo de confiança ao redor da média, de modo a permitir que se tenha um percentual de certeza desejado de que a verdadeira média de LSs de todos os indivíduos sadios esteja situada dentro desse limite. O intervalo de confiança é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Intervalo de confiança} = \bar{x} \pm z \frac{SD}{\sqrt{n}} \tag{9.4}$$

Em que o fator crítico z deriva da transformação do problema em uma distribuição normal padrão. A grandeza $\frac{SD}{\sqrt{n}}$ é denominada *erro padrão da média*. No exemplo, considere que o intervalo de confiança seja de 95%, para o qual $z = 1{,}96$. O intervalo de confiança ao redor da média será de $6{,}60 \pm 1{,}96 \times \frac{1{,}457}{\sqrt{85}}$ ou $6{,}295 - 6{,}914 \times 10^9$ células/L.

Observe que esse limite é o intervalo de confiança de 95% unicamente para a média, enquanto os cálculos anteriores geraram os 95% centrais de todos os pontos de dados. Os intervalos de confiança são utilizados para dar uma noção da amplitude da estimativa de algum parâmetro. É possível aumentar a acurácia, utilizando-se intervalos de confiança de 99% (i. e., para ter uma certeza de 99% de que a média verdadeira estará contida no intervalo). Nesse caso, considerar-se-ia que $z = 2{,}575$ e o intervalo de confiança de 99% seria maior: $6{,}60 \pm 2{,}575 \times \frac{1{,}457}{\sqrt{85}}$ ou $6{,}193 - 7{,}007 \times 10^9$ células/L.

Medidas não paramétricas

A mediana da contagem de LSs para esse grupo de indivíduos sadios é igual a $6{,}4 \times 10^9$ células/L, a qual, grosso modo, tem o mesmo valor da média. Para que uma distribuição seja perfeitamente gaussiana normal, os valores da média, da mediana e da moda devem ser exatamente os mesmos. Delinear o limite a partir do percentil 2,5 até o percentil 97,5 também é uma forma de estimar o limite central de 95% (no exemplo da contagem de LSs, é igual a $3{,}94 - 9{,}89 \times 10^9$ células/L, que é o limite exato específico para essa população). Trata-se de uma estimativa não paramétrica do limite, visto que não emprega um cálculo e somente separa os pontos de dados de acordo com sua ordem. Muitas aplicações da mediana utilizam pontos de dados do limite central de 50%, partindo do percentil de 25% até o percentil de 75% (também denominado limite interquartil) para descrever a tendência central por meio de um método não paramétrico.

Em certos casos, o método paramétrico da média ± 2 DP gera uma estimativa errada do intervalo central de 95%. Um exemplo de situação em que isso ocorre seria a distribuição da atividade de alanina aminotransferase (ALT) no sangue de indivíduos aparentemente sadios (Fig. 9.3). Nessa população, a média é igual a 30,1 U, o DP é igual a 12,69 U e o limite de referência calculado (média ± 2 DP) corresponde ao intervalo 4,73–55,48 U. Esse limite não é adequado porque o menor valor que realmente se observou no grupo era muito maior (12 U). A estimativa do limite inferior (4,73 U) é baixa demais. De modo semelhante, a estimativa do limite superior (55,48 U) também é muito baixa e exclui cerca de 10% dos pontos de dados, em vez de apenas 2,5%. Outra evidência de que o método paramétrico não funciona nessa situação é o valor da mediana (27 U), que difere um pouco da média. O motivo dessa discrepância torna-se aparente quando se observa a distribuição, a qual é *desviada* para a direita, apresentando muitos valores fora do limite superior. Nesse caso, uma estimativa muito mais útil do limite central de 95% pode ser obtida simplesmente a partir do intervalo que vai do percentil 2,5 ao 97,5, o qual corresponde a 15,2 a 68,0 U. Essa forma de distribuição da ALT por vezes é denominada *logarítmica-normal*, visto que pode ser convertida em distribuição normal por meio do emprego de valores logarítmicos da ALT. A *média geométrica* é calculada a partir dos dados após a transformação logarítmica.

Estatística comparativa

Uma das perguntas que mais se tenta responder por métodos estatísticos é se um grupo difere de outro quanto a uma determinada característica. A questão é resumida a uma comparação da tendência central de um grupo *versus* a do outro grupo, bem como da dispersão que cada grupo apresenta em torno de valores centrais. Se a dispersão dos dados for extrema, as diferenças calculadas entre os valores das médias dos dois grupos talvez não sejam importantes, mas sim o resultado da adição dos valores extremos. De outra perspectiva, essas comparações podem ser consideradas quanto à proporção sinal/ruído. Havendo pouco ruído (dispersão dos dados), a diferença de sinal de cada grupo é mais confiável.

Teste *t*-Student

O método mais comumente utilizado para comparar variáveis contínuas entre grupos é provavelmente o teste *t-Student* (Dawson-Saunders, 1994). O pseudônimo "Student" foi adotado por William Gosset, um estaticista que trabalhava na Cervejaria Guinness, o qual desejava manter escondido das empresas concorrentes o trabalho que desenvolvera para otimizar a produtividade. O teste *t* baseia-se no cálculo paramétrico da estatística *t*, segundo a fórmula:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SD_{12}\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \tag{9.5}$$

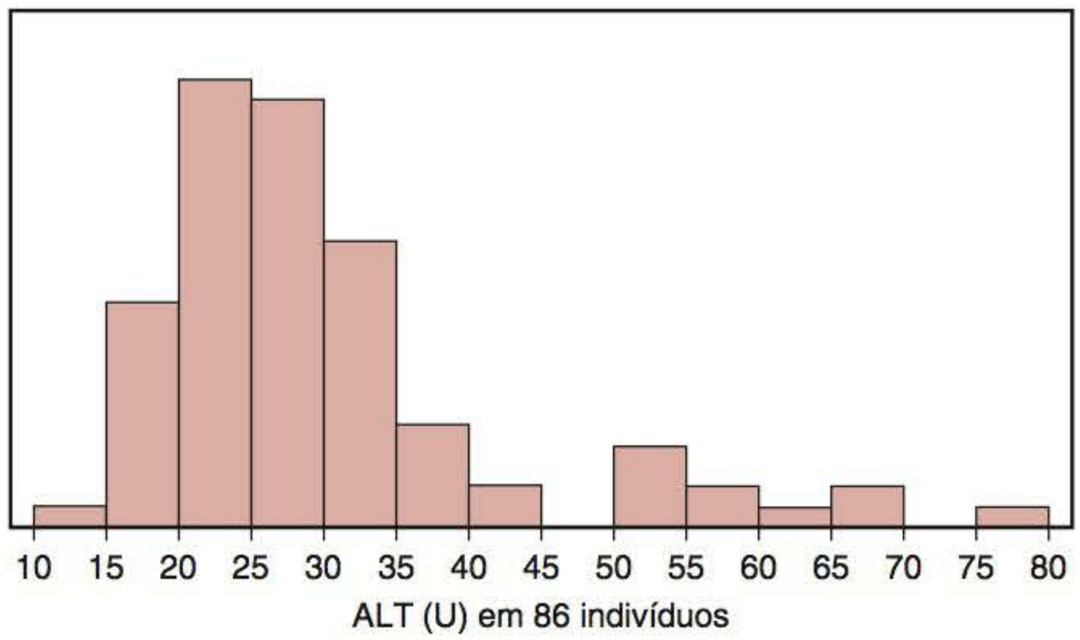


Figura 9.3 Distribuição de alanina aminotransferase no soro de 86 indivíduos sadios.

Em que: $\bar{x}_1$ é a média do grupo 1
n_1 é o número de valores do grupo 1
$\bar{x}_2$ é a média do grupo 2
n_2 é o número de valores do grupo 2
DP_{12} é o desvio-padrão dos grupos 1 e 2 combinados

Felizmente, com o atual avanço tecnológico, o cálculo da estatística *t* é feito por computador, de modo que o analista tem a responsabilidade de garantir a acurácia da entrada de dados e a correta escolha dos testes estatísticos, bem como sua validade para a situação em análise.

Existem algumas considerações específicas sobre os conjuntos de dados que também são necessárias à aplicabilidade. Por exemplo, cada grupo deve ter números de pontos de dados suficientes, que permitam estabelecer comparações válidas de números aproximadamente iguais em cada grupo. O espalhamento dos pontos de dados deve ser equivalente (sendo em geral avaliado quanto ao grau de equivalência das variâncias entre os grupos). A escolha dos pontos de dados deve ser realizada de modo independente; por exemplo, seria inadequado incluir o mesmo paciente duas vezes no mesmo grupo. A questão da independência normalmente é tratada de modo experimental, por meio da seleção aleatória dos tópicos ou dos pacientes. A aleatorização dos tratamentos é um processo rigoroso para pesquisas importantes, como as triagens clínicas. Para o uso laboratorial, é mais provável que os dados sejam obtidos de pacientes que comparecem pessoalmente ao hospital ou à clínica para submeterem-se a testes que de uma amostragem feita ao acaso a partir de toda a população de uma cidade ou de um país. Quanto mais aleatório for o processo de seleção, maior será a probabilidade de os resultados serem generalizados a uma população-alvo mais ampla, para a qual se deseja fazer a inferência.

A pergunta estatística considerada é reduzida a duas hipóteses mutuamente exclusivas, que incluem todas as situações possíveis. A hipótese nula (H_o) estabelece que não há diferença significativa entre as médias. A hipótese alternativa (H_{alt}), ao contrário, afirma que há diferença significativa entre as médias. Se a estatística *t* assume um valor suficientemente alto, pode-se rejeitar a hipótese nula e, como consequência, deve-se aceitar a hipótese alternativa de que as médias diferem de modo significativo entre si. Se o valor de *t* for baixo, não se pode rejeitar a hipótese nula, mas também não é possível aceitá-la. Essa decisão assemelha-se ao veredito de uma triagem, em que os possíveis resultados são "culpado" ou "inocente". A inocência do réu jamais será provada, assim como a hipótese nula nunca será estabelecida. Ao final, a hipótese nula pode acabar sendo considerada a opção correta (em particular, se a hipótese alternativa passar a parecer improvável), contudo, o teste realizado rigorosamente não leva à mesma conclusão.

Considere a distribuição dos valores de hemoglobina no sangue total de 36 homens sadios e 49 mulheres sadias (Fig. 9.4*A* e *B*). A inspeção visual dos gráficos de barra que representam os dados da hemoglobina (Hb) mostra que as mulheres geralmente apresentam valores mais baixos (média = 13,2 g/dL, DP = 0,80 g/dL) que os homens (média = 15,1 g/dL, DP = 0,96 g/dL). Apenas uma parcela dos homens e das mulheres apresenta sobreposição quanto aos valores de hemoglobina. Nesse exemplo, $t = 9{,}898$. Um outro fator que deve ser considerado são os graus de liberdade, que são obtidos subtraindo-se o número total de pontos de dados de 2, ou seja, $gl = n_1 + n_2 - 2 = 36 + 49 - 2 = 83$.

Significância

O valor da estatística *t* é avaliado quanto à significância de acordo com o número de graus de liberdade. Uma abordagem da avaliação consiste em consultar o valor de *t* para o qual determinado grau de liberdade produz uma probabilidade (*p*), que é adotada como significância, utilizando-se uma tabela de valores. Frequentemente, isso é calculado de forma automática por um *software* de computador. Em geral, *p* deve ser menor ou igual a 0,05 para que haja significância estatística. Quando *p* é igual a 0,05 (também denominado α), significa que a diferença observada entre os dois grupos pode ter ocorrido uma vez em 20 oportunidades, com um determinado grau de espalhamento dos dados. O valor de α também é considerado como o risco de considerar-se falsamente a existência de uma diferença significativa, quando esta de fato inexiste (erro de tipo I). Embora adotar um valor de $\alpha = 0{,}05$ seja meramente uma convenção arbitrária, trata-se de uma prática já costumeira dos revisores e dos protocolos de estudos

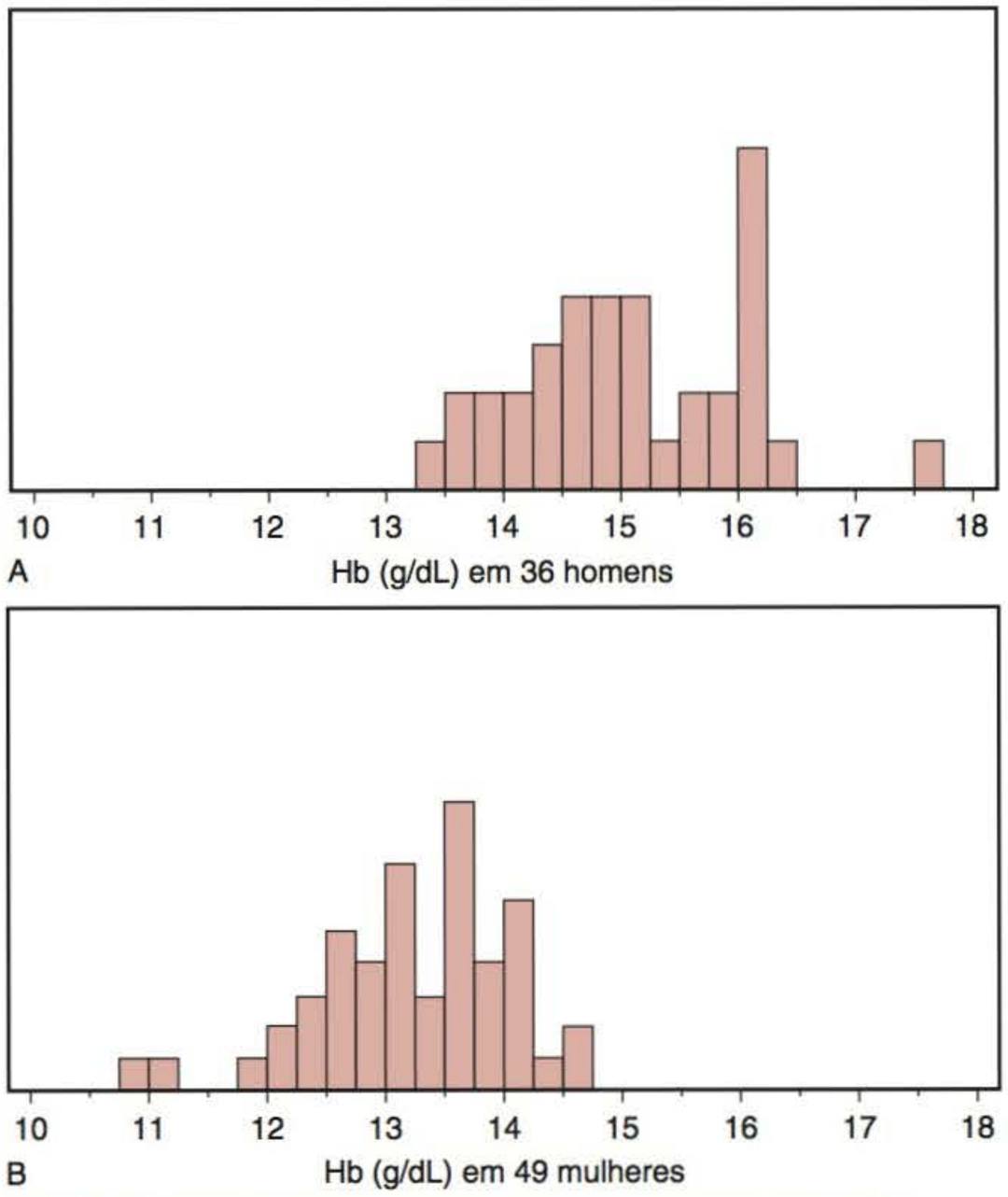


Figura 9.4 Distribuição da hemoglobina no sangue de *A*, homens sadios, e *B*, mulheres sadias.

de avaliação. Logicamente, se *p* for muito inferior a este valor, como 0,01 ou 0,001, a significância estatística de uma diferença entre as médias dos grupos é muito mais confiável.

Mesmo que a diferença observada entre os grupos possa apresentar um *p* extraordinariamente impressionante ($p = 0{,}001$ significa que o resultado ocorreu uma vez em 1.000 oportunidades), cabe ao investigador concluir se a observação é *clinicamente significativa*. A significância estatística de qualquer diferença sempre pode ser amplificada, não importa o quanto seja irrelevante para a tomada de decisão, simplesmente aumentando-se um número de pontos de dados (ver a fórmula para o cálculo de *t*: equação 9.5).

Um problema em potencial apresenta-se quando um grande número de comparações é realizado em estudos que não estabelecem claramente uma hipótese e, em vez disso, exploram os dados quaisquer que sejam os motivos que levaram ao exame. Nesse caso, o nível de significância mínimo deve ser ajustado para refletir o grande número de testes que teoricamente poderiam revelar "resultados significativos" ao acaso. Afinal, se for adotado $p = 0{,}05$, então, ao realizar 20 comparações diferentes, em média uma delas deve encontrar de modo regular uma diferença estatisticamente significativa. A correção de Bonferroni é realizada para diminuir o risco de que a descoberta seja falsa. O processo consiste em dividir o valor de *p* usualmente aceito pelo número de comparações realizadas. Assim, para cinco comparações distintas, a correção seria $p = 0{,}05/5 = 0{,}01$, como limiar de aceitação para a significância.

No exemplo particular em que os valores de hemoglobina são comparados entre homens e mulheres, o *p* é menor que 0,0001. Desse modo, a hipótese nula pode ser rejeitada e conclui-se que há uma diferença significativa entre os grupos. A maioria dos estaticistas não reporta esse nível de significância, contentando-se em revelar que o valor de *p* adotado era menor que 0,001. Outra condição a ser indicada é se o teste realizado era bi ou unilateral, ou seja, se a pergunta do teste consistia em saber se um grupo simplesmente diferia do outro (bilateral) ou se um dos grupos era apenas superior ao outro (unilateral). A maioria dos periódicos exige o emprego de testes *t* bilaterais, por serem mais rigorosos.

Tamanho da amostra

Suponha que dois grupos submetidos à comparação apresentaram uma diferença que não foi considerada estatisticamente significativa, por apresentarem $p = 0{,}06$. Um modo de alcançar a significância estatística é aumentar o número de indivíduos estudados. Este deve ser o procedimento a ser adotado, se a diferença permanecer a mesma, pois o valor de *t* aumentará com um *n* maior. Um estudo-piloto pode ser realizado em uma triagem clínica, com o objetivo de estabelecer, grosso modo, qual é a diferença existente entre os grupos e qual é o grau de dispersão dos dados. Essas informações são, então, aplicadas a uma fórmula para calcular o *tamanho da amostra* necessário para trazer os resultados à significância estatística. O cálculo do tamanho da amostra também considera outro fator, denominado fator β, que representa o risco de perder um efeito verdadeiro ao acaso (erro de tipo II). O *poder do estudo* é igual a $1 - \beta$. Quando se estabelece que $\beta = 0{,}20$, o poder do estudo é igual a 0,80, significando que o número de indivíduos calculado para ser utilizado produzirá um resultado estatisticamente significante em 80% dos casos, com a diferença entre os grupos e a dispersão de dados especificadas.

O teste *t* utilizado nesse exemplo era *não pareado*, uma vez que a comparação foi realizada entre diferentes indivíduos. Se o delineamento experimental tivesse incluído uma comparação de valores obtidos dos mesmos indivíduos antes e após um determinado tratamento, então, teria sido apropriado empregar um teste *t pareado*. Um teste pareado é uma ferramenta matemática potencialmente mais poderosa, porque considera somente as alterações que ocorrem entre os valores obtidos de cada indivíduo, sem ser influenciada pela variação dos valores de fundo observada entre indivíduos diferentes.

Testes não paramétricos

Se o pressuposto acerca da normalidade dos dados não é válido, outros testes não paramétricos podem ser utilizados para comparar as distribuições entre os grupos. O *teste de Wilcoxon de postos com sinais* é uma dessas opções. Por meio desse método, a cada um dos valores de ambos os grupos é atribuído um posto numérico, de acordo com sua magnitude. Em caso de vínculos com um mesmo valor, a ambos é atribuído o mesmo posto intermediário (p. ex., se a 4ª e a 5ª posições estiverem vinculadas, a ambas será atribuído o posto 4,5). Em cada um dos grupos, todos os postos são somados e divididos pelo número de pontos de dados existentes em cada grupo. Em seguida, a diferença existente entre as pontuações dos postos é correlacionada a uma probabilidade. Essa técnica é facilmente realizada por *softwares* de computador e pode ser bastante útil quando um conjunto de dados não atende aos pressupostos necessários para que um método paramétrico possa ser empregado.

Análise de dados discretos: testes de proporções

A análise de dados discretos assume uma forma diferente da análise de variáveis contínuas, que podem ser expressas como distribuições. Quando se trata de dados discretos, as respostas são tipicamente dicotômicas: algo que tanto pode estar presente como ausente, o sexo do paciente pode ser masculino ou feminino, o paciente viveu ou morreu. Considere o exemplo fictício de uma intervenção apresentando baixa taxa de contaminação na coleta para culturas sanguíneas (trata-se de um problema universal encontrado em todos os laboratórios, contudo esses dados são apenas hipotéticos). Antes da intervenção, informações basais obtidas ao longo de um período de 2 meses mostraram que 53 culturas estavam contaminadas e 978 não apresentavam contaminação. Após um treinamento e a implementação de um novo processo de coleta, as informações obtidas ao longo de um segundo período de 2 meses revelaram que 32 culturas estavam contaminadas e 891 culturas não apresentavam contaminação. Esses dados nominais foram convenientemente organizados em uma tabela 2 × 2, denominada tabela de contingência dos valores observados (Tab. 9.1). Os dados representavam contagens simples de uma ou outra categoria. A pergunta formulada consistia em saber se a proporção de culturas contaminadas diferiu significativamente nos dois períodos em que os dados foram obtidos.

Teste de Qui-quadrado

Nesse caso, o teste estatístico a ser empregado é o teste de Qui-quadrado que utiliza a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}} \tag{9.6}$$

Em que os valores observados são listados acima e os valores esperados são calculados a partir da ordenação geral das contagens (Dawson-Saunders, 1994). Nesse exemplo, o número esperado de culturas contaminadas durante o período basal é igual ao número total de culturas realizadas durante o período (53 + 978 = 1031), multiplicado pela proporção de culturas contaminadas em ambos os períodos juntos (proporção calculada como: [53 + 32]/[53 + 978 + 32 + 891] = 0,0435), ou 1031 × 0,0435 = 44,8. O cálculo dos demais valores esperados é realizado de modo semelhante, resultando na tabela de contingência dos valores esperados (Tab. 9.2). Em seguida, o cálculo do valor de χ^2 é feito somando-se os quadrados das diferenças (este procedimento converte todas as diferenças em valores positivos) existentes entre os valores esperados e observados e dividindo-se o resultado pelo valor esperado em cada célula da tabela. Neste exemplo:

$$\chi^2 = \frac{(53 - 44{,}8)^2}{44{,}8} + \frac{(978 - 986{,}2)^2}{986{,}2} + \frac{(32 - 40{,}2)^2}{40{,}2} + \frac{(891 - 882{,}8)^2}{882{,}8}$$

$$= 3{,}3 \tag{9.6A}$$

Com um grau de liberdade ([número de linhas – 1] [número de colunas – 1]), o valor de *p* é igual a 0,07, o que não está de acordo com o limiar universal mínimo de 0,05 para significância estatística. Pode-se afirmar que foi observada uma tendência à redução da contaminação após a intervenção, embora não tenha sido estatisticamente significativa. É importante lembrar que, para um teste de χ^2 ser válido, cada célula da tabela deve ter no mínimo 5 observações.

Avaliação de tendência e estatística de correlação

A relação existente entre uma variável independente e uma variável dependente é demonstrada por meio da representação gráfica dessas variáveis em um diagrama ou um gráfico de dispersão, em que a variável independente (entrada) é distribuída ao longo do eixo *x* e a variável dependente (saída), no eixo *y*. Se não houver relação entre ambas, os dados dispersam-se aleatoriamente sobre o gráfico. Por outro lado, se houver uma relação, ela poderá ser descrita matematicamente encontrando-se a reta que melhor se ajusta a todos os pontos de dados. Essa reta pode ser calculada por meio da abordagem dos quadrados mínimos, na qual as distâncias verticais de cada ponto até a reta calculada são minimizadas para a população de valores inteira. Esse método estatístico é conhecido como *regressão linear* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

Regressão linear

A equação geral da reta é:

$$y = a + bx \tag{9.7}$$

Tabela 9.1 Valores de contaminação observados em culturas sanguíneas

Resultado	Período basal	Pós-treinamento
Número de culturas contaminadas	53	32
Número de culturas não contaminadas	978	891

Tabela 9.2 Valores de contaminação esperados em culturas sanguíneas

Resultado	Período basal	Pós-treinamento
Número de culturas contaminadas	44,8	40,2
Número de culturas não contaminadas	986,2	882,8

Em que o declive *b* indica o modo como o valor de *y* muda quando *x* muda. Quando *b* = 1, a relação de troca existente entre *x* e *y* é de um para um. A posição de interceptação *a* indica o grau de deslocamento ou de inclinação da relação existente entre *x* e *y* por ação de um fator constante. O cálculo é facilmente realizado por qualquer um dos vários *softwares* estatísticos disponíveis, além de fornecer informação sobre a adequação da reta. Essa abordagem é comumente utilizada quando se pretende comparar um método (A) com um novo método (B) em relação a um mesmo analito (Fig. 9.5*A*). Esse exemplo mostra a existência de uma forte correlação entre os métodos A e B, visto que os pontos de dados encontram-se muito próximos da reta, a qual é descrita pela equação: *método B* = 0,62 + 0,99 x *método A*. O declive de 0,99 é quase perfeito, enquanto a posição de interceptação em 0,62 é bem pequena na escala de valores possíveis. De fato, os limites do intervalo de confiança de 95% de *b* são -0,47 e 1,72. Portanto, o valor 0 está incluído, indicando que a posição de interceptação não difere significativamente de 0.

As distâncias verticais (eixo *y*) de cada ponto de dados até a reta que melhor se adequa ao caso são chamadas de *resíduos*. Os melhores ajustes de reta estão associados a valores relativamente constantes de resíduos ao longo de todo o intervalo de valores. Se os resíduos se tornarem maiores em uma das extremidades do gráfico, então o grau de adequação da reta será menor nessa parte do intervalo. O *erro padrão da regressão* (também chamado de *erro padrão da estimativa*), denotado por S_{yx}, é utilizado para estimar a variação esperada quando a regressão é repetida com outra amostra de pontos de dados. O S_{yx} é calculado por meio da raiz quadrada da soma dos resíduos ao quadrado, dividida por $n - 2$. É importante que os pontos de dados das amostras do paciente estejam distribuídos ao longo de todo o intervalo analítico, para que a comparação mais válida dos métodos seja imparcial, com representação de valores superiores e inferiores em qualquer região do intervalo (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

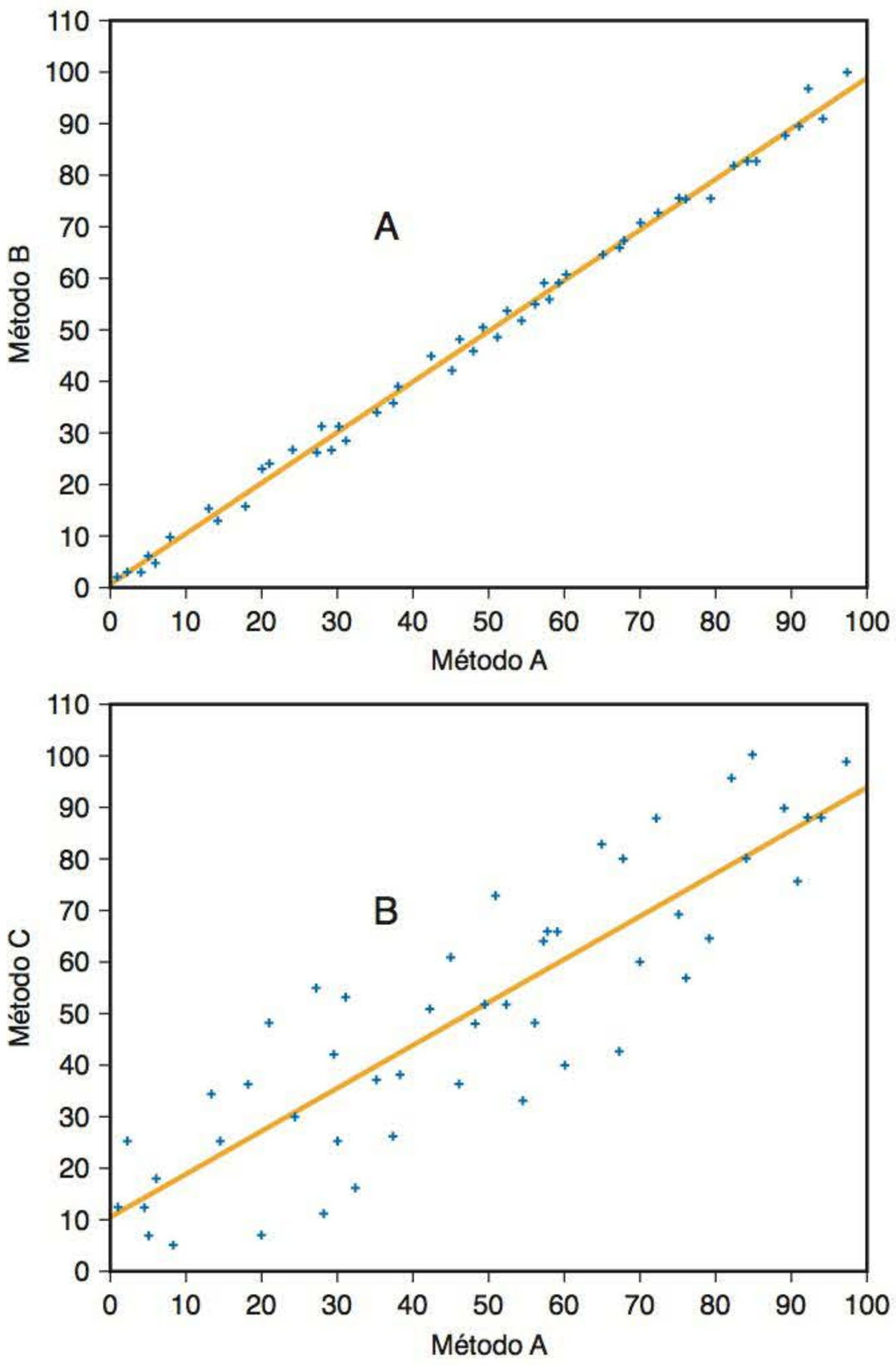


Figura 9.5 *A:* análise de regressão entre os métodos A e B; forte correlação; *B*: análise de regressão entre os métodos A e C; correlação mais fraca.

Na prática laboratorial, a análise de regressão ou correlação é frequentemente utilizada para comparar o desempenho de um novo método com o de um método antigo. Nessa situação, o método antigo pode apresentar uma precisão inferior à do método novo e, por isso, não seria apropriado fundamentar o julgamento apenas na comparação do novo método com o antigo, em termos de definição do "padrão-ouro". Uma abordagem comum, nesse caso, é a análise de regressão de Deming, assim nomeada em homenagem a W. Edwards Deming (1900–1993), um matemático que influenciou os princípios de aprimoramento da qualidade. Na regressão de Deming, a melhor reta é obtida por meio da minimização da soma dos quadrados de ambas as distâncias *x* e *y*, dos pontos de dados até a reta (Cornbleet, 1979). Além disso, a regressão de Deming aplica um fator de peso (λ) que incorpora as variâncias relativas dos dados *z* e *y*. O resultado pesa mais a favor do conjunto de dados, apresentando maior precisão.

A relação existente entre o método A e o método B pode ser descrita ainda pelo *coeficiente de correlação (r)*, cujo valor varia de –1 a +1. Um valor igual a 0 indica inexistência de relação, enquanto um valor igual a 1 aponta a existência de uma relação perfeita (o valor –1 também indica uma relação perfeita, porém inversa). Os demais valores situados entre –1 e +1 indicam relações intermediárias. O quadrado do coeficiente de correlação é denominado coeficiente de determinação (r^2), o qual descreve o grau de variação observado na variável dependente que é devido à relação existente entre as duas variáveis. Neste exemplo, $r = 0{,}9976$ e $r^2 = 0{,}9952$, sendo ambos valores muito altos que indicam a existência de uma relação extremamente forte entre os métodos A e B, a qual é responsável por 99,52% de toda a variação observada. O valor de *p* nessa correlação é inferior a 0,0001.

Em contraste com a ótima correlação entre os métodos A e B, o desempenho do método C *versus* o do método A (Fig. 9.5*B*) não é nem um pouco bom. Por meio de um simples exame visual, observa-se que os pontos de dados estão mais dispersos em relação à reta, a qual está mais deslocada para cima. Com $r = 0{,}8757$, um valor um pouco inferior ao encontrado na comparação entre os métodos A e B, há ainda uma forte correlação, com *p* menor que 0,0001. Sendo $r^2 = 0{,}7668$, 76,68% da variação observada pode ser atribuída à relação existente entre os métodos C e A. A equação para essa reta é: *método C* = 10,2 + 0,84 × *método A*, de modo que a alteração dos valores observada quando se utiliza o método C, em comparação ao método A, é discretamente menor (declive de 0,84). Há também, com o método C, um significativo resíduo para cima (interceptação em 10,2 com limites de intervalo de confiança de 95% em 2,8 e 17,6).

Comparações de métodos

Esses dois exemplos mostram relações um pouco diferentes, embora ambas sejam estatisticamente significativas. É uma decisão pessoal avaliar se o desempenho de um método permite sua aplicação. A comparação entre os métodos A e B é notavelmente forte, tanto em termos de análise visual como de análise estatística, de modo que se pode afirmar com segurança que ambos os métodos são equivalentes para fins de substituição de um pelo outro na prática clínica. Por outro lado, a comparação entre os métodos A e C é mais confusa, pois há um número maior de dados dispersos. A menor curva sugere que os dois métodos não se comportam de modo equivalente em relação ao analito e, além disso, indica a existência de resíduo positivo com o método C. Diante das expectativas de excelente precisão e acurácia dos aparelhos modernos, o método C provavelmente seria rejeitado, caso o método B fosse uma alternativa disponível. Ainda assim, o nível de correlação observado entre os métodos A e C pode ser muito apreciado por pesquisadores que estejam tentando fazer uma pergunta diferente ao relacionar causa e efeito entre processos biológicos, que apresentem elevados níveis de variação inerentes.

Um exemplo especial de análise de regressão, denominado *regressão logística*, é empregado quando o resultado é uma variável dicotômica ou binária para variáveis contínuas independentes (preditivas).

Análise de variância

Quando se deseja comparar as médias de mais de dois grupos diferentes, o processo é denominado *análise de variância (ANOVA)* (Dawson-Saunders, 1994). Essa análise pode ser considerada uma extensão do teste *t* para um número de amostras independentes superior a três. A hipótese nula, nessa situação, é a de que as médias de todos os grupos são iguais. Já a hipótese alternativa afirma que nem todas as médias são iguais (algumas podem ser, mas há outras que são diferentes). O teste estatístico é a razão *F* das médias ao quadrado entre todos os grupos (MS_A) e a média de erro ao quadrado (MS_E):

$$\text{Razão } F = \frac{MS_A}{MS_E} \tag{9.8}$$

Essa análise compara a variância das médias do grupo com a média de todos os dados (numerador) e a variância individual dos pontos de dados junto a cada um dos grupos (denominador). Se as médias do grupo diferirem entre si (sinal) mais do que a variação junto aos grupos (ruído), então a razão *F* excederá um valor crítico de significância.

Um exemplo de ANOVA consiste na comparação dos valores de albumina sérica de pacientes provenientes de dois locais de internação diferentes, uma clínica de ambulatórios e uma clínica de saúde universitária (Fig. 9.6). Foram registradas 100 amostras consecutivas provenientes de cada local. A linha horizontal mostra a média geral de todos os 400 valores (3,17 g/dL). Em cada grupo, os losangos indicam as médias dos grupos (linha média) e os intervalos de confiança de 95% para essas médias (vértices superior e inferior). A razão *F* é igual a 279, e *p* é menor que 0,0001. Portanto, a hipótese nula pode ser rejeitada, concluindo-se que ao menos uma das médias é diferente. Essa abordagem é mais conservativa e realista que a comparação de cada grupo com cada um dos demais por meio da utilização de uma série de testes *t* distintos (com 4 grupos, poderiam ser realizadas 6 comparações). O problema de um número tão grande de comparações é a possibilidade de "acidentalmente encontrar uma significância" que não é verdadeira. Estendendo-se a ANOVA, podem ser realizadas comparações das médias dos grupos por meio de procedimentos como o teste de Tukey para diferenças verdadeiramente significativas (HSD, *honestly significant difference*). Neste exemplo, o teste de Tukey HSD indica que IP1 e IP2 não diferem significativamente entre si, mas CA e CU diferem dos demais grupos. Nessa etapa, o investigador é livre para elaborar as potenciais causas das diferenças observadas, sem acrescentar significância estatística às diferenças individuais.

Para que a ANOVA seja matematicamente válida, algumas exigências devem ser atendidas:

- os dados devem ser coletados por amostragem aleatória, sendo que todas as observações devem ser independentes umas das outras;
- os dados de cada grupo devem seguir uma distribuição normal;
- cada grupo deve ter o mesmo número de pontos de dados;
- os grupos apresentam variâncias iguais.

Se esse conjunto de requisitos não puder ser atendido, existem outros métodos disponíveis para realizar comparações. O teste de Mann-Whitney pode ser empregado para comparação de medianas. Os testes de Wilcoxon e Kruskal-Wallis para soma de postos constituem alternativas não paramétricas. Esse exemplo, utilizando valores de albumina sérica, apresenta variâncias maiores nos grupos de pacientes internados do que no grupo de pacientes de ambulatório. Desse modo, uma análise não paramétrica seria mais adequada (o teste de Wilcoxon também demonstrou a existência de diferenças significativas entre os grupos, no exemplo). Esse caso trata de uma única variável, do mesmo modo como as análises de *one-way* ANOVA. Para os casos que lidam com duas variáveis, o procedimento pode ser estendido para *two-way* ANOVA.

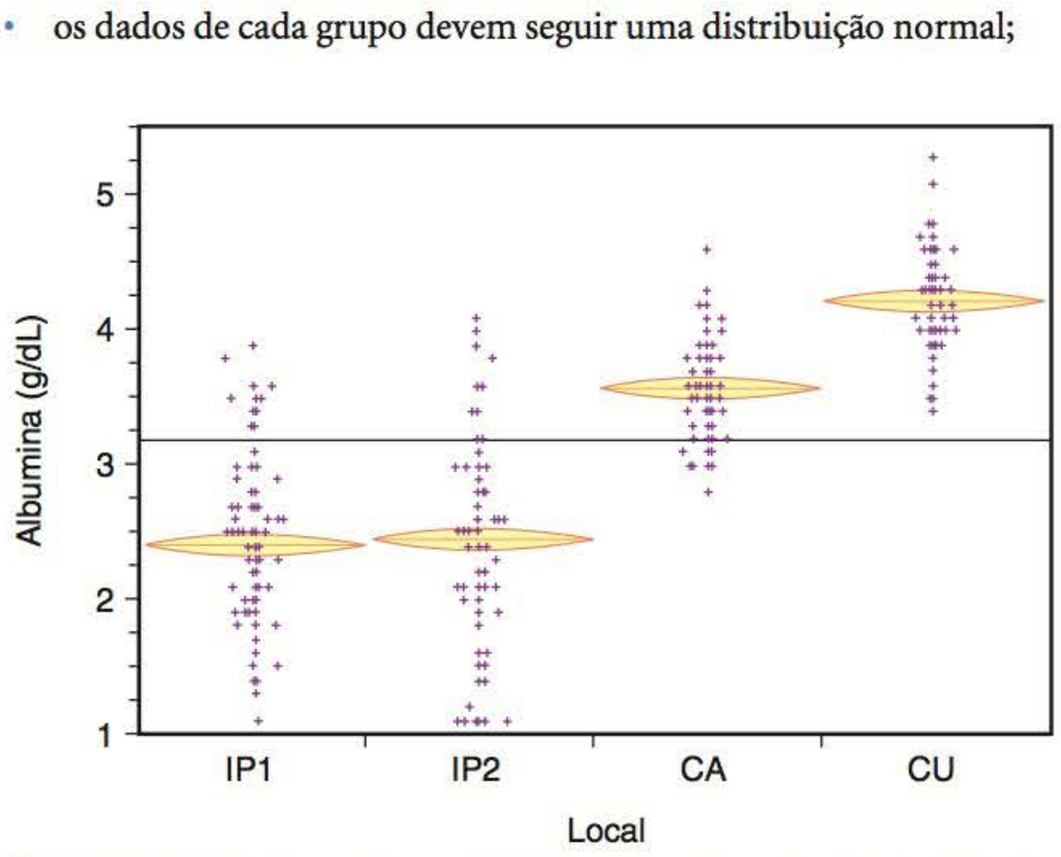


Figura 9.6 Análise de variância. Albumina sérica em pacientes de diferentes localidades (IP1, IP2, estabelecimentos de internação 1 e 2; CA, clínica ambulatorial; CU, clínica de saúde universitária).

Análise de covariância

Em algumas situações, o modo como a comparação é estabelecida, por seleção de indivíduos em grupos distintos, pode criar um efeito confuso a partir de outra variável, além da variável de interesse primário. Nesse caso, é elucidante realizar uma *análise de covariância (ANCOVA)* para considerar a potencial influência de uma covariável.

Como um exemplo de ANCOVA, considere a comparação de quantificações da concentração sérica de cálcio em 61 homens e 41 mulheres, todos adultos sadios, para estabelecer a necessidade de limites de referência de cálcio diferentes para homens e mulheres. Uma simples *one-way* ANOVA, similar à da Figura 9.6, apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0{,}0045$) entre as médias da concentração de cálcio entre os grupos (homens = 9,3 mg/dL e mulheres = 9,1 mg/dL). (Essa ANOVA com apenas dois grupos equivale a um teste *t* não pareado.) Essa descoberta, bem como estudos anteriores, mostrou-se consistente, concluindo-se, portanto, que provavelmente é adequado ter limites de referência de cálcio sérico específicos para cada sexo. Contudo, do ponto de vista fisiológico, essa conclusão faria algum sentido? Sabe-se também que a concentração sérica de albumina influencia os níveis de cálcio totais, uma vez que a albumina se liga ao cálcio. Uma análise de regressão linear desses indivíduos confirmou essa relação. Os efeitos do gênero e da covariável albumina sobre os níveis séricos de cálcio foram, então, separados por uma ANCOVA. Nesse exemplo, o efeito do gênero sobre o cálcio foi totalmente representado pelo efeito da albumina sérica sobre o cálcio e pela diferente distribuição da albumina em homens e mulheres. A ANCOVA pode ser esclarecedora para descobrir e eliminar, por meio de análise estatística, as covariáveis que talvez não sejam conhecidas nem planejadas durante o delineamento experimental. A ANCOVA é discutida em maior profundidade em textos mais avançados sobre estatística (Matthews, 1988).

Validação de método e controle de processo

A análise estatística integra a validação de novos métodos laboratoriais, bem como o monitoramento de processos analíticos e de fluxo de trabalho em laboratórios clínicos (Lott, 1998).

Limites de referência

Os exemplos ilustrados nas Figuras 9.2, 9.3 e 9.4 mostram algumas das questões com as quais nos deparamos ao estabelecer limites de referência empregando estatística descritiva. O objetivo básico é determinar um intervalo de valores, no qual a maioria dos indivíduos sadios esteja situada e que, ao mesmo tempo, exclua os indivíduos com doença. A abordagem mais simples é utilizar os 95% de pontos de dados centrais obtidos de indivíduos sadios, calculando-se a média ± 2 DP, independentemente de a distribuição ser normal ou em forma de sino, como ocorre na contagem de LSs da Figura 9.2. Essa abordagem paramétrica não é capaz de fornecer um limite de referência completo quando os dados estão distorcidos, como ocorre com ALT da Figura 9.3. Nesse caso, os 95% centrais podem ser determinados de modo não paramétrico, empregando-se a faixa de percentis 2,5 a 97,5. Essa faixa de percentis exclui cerca de 2,5% dos valores nas extremidades superior e inferior. Na verdade, a distribuição da ALT nos indivíduos sadios

parece ser composta de duas subpopulações. Como consequência, basear o limite de referência apenas nas faixas de valores observados em indivíduos aparentemente sadios talvez não seja a melhor abordagem. De fato, algumas novas recomendações referentes à ALT estabelecem um limite superior bem mais baixo que aquele sugerido pelos estudos populacionais amplos. As novas diretrizes tentam eliminar indivíduos que possam ter alterações hepáticas assintomáticas discretas, como esteatose (Prati, 2002). Essa abordagem é similar à estratégia utilizada para determinar os níveis desejáveis ou saudáveis de colesterol e frações lipídicas (National Cholesterol Education Program, 2002), bem como de glicose (Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Futuramente, as recomendações de outros grupos de consenso ou de organizações profissionais provavelmente serão ainda mais ativas, no que diz respeito ao estabelecimento dos limites desejáveis de outros analitos, em substituição dos limites de referência baseados na população.

Por fim, subgrupos de indivíduos sadios devem ser reconhecidos por limites de referência separados sempre que as principais diferenças estiverem associadas a fatores como idade ou gênero (Fig. 9.4).

Acurácia

O desempenho de um novo método pode ser avaliado quanto à acurácia (p. ex., a capacidade de detectar e quantificar corretamente um analito) por meio da experimentação de amostras obtidas de paciente ou de material de inspeção interlaboratorial com valores conhecidos. O exemplo em que foi encontrada uma forte correlação entre métodos (Fig. 9.5*A*) indica que o analito apresenta uma reação de quase um para um para cada método (declive ~1), essencialmente sem resíduos (interceptação ~0). Ao contrário, a correlação descrita na Figura 9.5*B* apresenta um declive diferente de 1, indicando que o analito se comporta de modo diferente em relação a cada um dos métodos. Uma explicação para a ocorrência desse tipo de discrepância é observada quando marcadores tumorais são quantificados por meio de dois imunoensaios, empregando diferentes anticorpos para epitopos potencialmente distintos. Um resíduo, como aquele encontrado na comparação entre os métodos C e A (Fig. 9.5*B*), também sugere a existência de uma diferença metodológica básica, a qual influencia a acurácia, ainda que possa ser compensada, de forma previsível, com um ajuste de calibração.

A acurácia de qualquer ensaio depende consideravelmente dos calibradores, da constituição original destes, da sua estabilidade no decorrer do tempo e da comparação com calibradores de outras marcas comerciais (ver Cap. 10). O ideal é que um ensaio seja calibrado com padrões internacionais, como os padrões da Organização Mundial da Saúde ou de outros grupos profissionais. Quando se utiliza calibradores com tal rastreabilidade e unidades de medida padronizadas, torna-se possível utilizar valores de diferentes ensaios de modo intercambiante para o mesmo paciente, ou para comparar resultados em diferentes grupos de pacientes que estejam sendo monitorados com métodos distintos.

Após a implantação de um método, inspeções de proficiência periódicas que testam amostras desconhecidas costumam ser reportadas em termos de IDP fora da média para todos os laboratórios. Por exemplo, se a média das quantificações de creatinina é 11 mg/dL para todos os participantes, com um DP igual a 2 mg/dL, um laboratório que reporte um valor de 8 mg/dL teria um IDP igual a –1,5 [(8 – 11)/2].

Precisão

A reprodutibilidade de um ensaio é convenientemente expressa pelo CV. O CV permite que o DP observado seja normatizado pela magnitude do sinal que está sendo medido. É preciso lembrar que os ensaios tipicamente apresentam CVs diferentes para as diferentes faixas de valores dos analitos. Portanto, uma boa prática consiste em determinar os CVs do ensaio em valores de analito altos, baixos e de faixa intermediária.

Sensibilidade analítica

O valor mais baixo que um ensaio é capaz de detectar com segurança é denominado *sensibilidade analítica*. Uma abordagem comum para fazer esse julgamento consiste em medir um padrão zero várias vezes (p. ex., 10 vezes) e calcular o DP do sinal detectado, ou ruído. Em seguida, deve ser estabelecido o limiar de detecção mais baixo e seguro entre 3 e 4 vezes o DP. Essa abordagem frequentemente é individualizada para cada laboratório. Essa característica é também chamada de limite de detecção. O outro uso do termo sensibilidade analítica refere-se à mudança na resposta de um ensaio em relação a uma determinada alteração na quantidade ou na concentração do analito (Giacomo, 1984). Nesse sentido, um ensaio altamente sensível possui a característica de detectar prontamente pequenas alterações de um analito em concentrações situadas na faixa intermediária de quantificações.

Especificidade analítica

Os principais interferentes das quantificações laboratoriais são hemólise, icterícia e lipemia, devidas tanto à interferência nas absorções óticas (ou dispersão da luz), como às interações químicas reais (p. ex., atividade de peroxidase da hemoglobina em muitos imunoensaios que utilizam peroxidase de raiz forte como indicador). Além desses interferentes endógenos, fármacos também podem interagir em vários ensaios químicos ou imunológicos. A magnitude dessas interações (ou a falta delas) é tipicamente registrada pela adição de grandes quantidades de substâncias conhecidas a amostras de soro que são testadas para recuperação de um dado analito sérico.

Aceitabilidade de um método

A decisão final de aceitar a validade de um determinado método depende de uma combinação de fatores. Os testes estatísticos mostram que o novo método apresenta o desempenho analítico necessário, com boa acurácia e precisão? O novo método fornece informação médica útil que não poderia ser obtida de outro modo? A execução do novo método é viável (fácil de realizar, baixo custo, rapidez)? O erro máximo do método novo está dentro dos limites de aceitação médica? A decisão final é um julgamento profissional que deve considerar todos esses aspectos.

Referências bibliográficas

Cornbleet PJ, Gochman N: Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis. Clin Chem 1979; 25:432–438.

Daniel WW: Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences, 7th ed. New York, John Wiley & Sons, 1999.

Este livro aborda com maior rigor o uso da análise estatística na medicina e em ciências da vida.

Dawson-Saunders B, Trapp RG: Basic & Clinical Biostatistics, 2nd ed. Norwalk, Appleton & Lange, 1994.

Este livro de leitura bastante agradável fornece excelentes descrições de procedimentos estatísticos aplicados a múltiplos exemplos em ciências da vida e na medicina.

Giacomo P: International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology. Geneva, International Organization for Standardization, 1984, pp 4–40.

Lott JA: Process control and method evaluation. *In* Snyder JR, Wilkinson DS (eds): Management in Laboratory Medicine, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1998, pp 293–325.

Este livro é uma fonte abrangente de consulta para todos os aspectos da supervisão no laboratório clínico.

Matthews DE, Farewell VT: Using and Understanding Medical Statistics, 2nd edition. Basel, Switzerland, Karger, 1988.

National Cholesterol Education Program: Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Final Report. National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, NIH, 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. Document EP9-A2 [ISBN 1-56238-472-4] Wayne, PA, NCCLS, 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Document EP6-A [ISBN 1-56238-498-8] Wayne, PA, NCCLS, 2003.

O presente texto, assim como as diretrizes da NCCLS, foi desenvolvido por meio de um processo de consenso envolvendo representantes internacionais da indústria, do governo e usuários de laboratório, com o objetivo de gerar recomendações aplicáveis ao nível mundial. A partir de 10 de janeiro de 2005, a NCCLS foi renomeada e passou a se chamar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Prati D, Taioli E, Zanella A, et al: Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. Ann Inn Med 2002; 137:1–10.

Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2003; 26(Suppl 1):S5–S20.

CAPÍTULO 10

Controle de qualidade

W. Greg Miller PhD

Introdução 115
Variabilidade analítica e calibração 115
Visão geral do controle do processo estatístico 115
Implantação do controle do processo estatístico 116
- Seleção dos materiais de controle de qualidade (CQ) 116
- Frequência da avaliação dos materiais de CQ 117
- Estabelecimento do valor-alvo de CQ e do DP que representam condição operacional para quantificações estáveis 118
- Estabelecimento de regras para avaliação de resultados de CQ 119
- Ação corretiva diante de resultado de CQ que indica problema de quantificação 121
- Verificação dos parâmetros de avaliação de CQ diante da mudança de lote de reagentes 121
- Verificação do desempenho do método diante do uso de um novo lote de calibrador de métodos 123

Aspectos da calibração no controle de qualidade 123
Utilização de dados do paciente em procedimentos de controle de qualidade 125
- Checagem delta com resultado prévio para o paciente 125
- Verificação da consistência entre mais de um instrumento ou método 125
- Utilização de dados do paciente para controle do processo estatístico 126

Teste de proficiência 126
- Ausência de comutabilidade de materiais de TP e gradação de grupos por pares 127
- Relatório de resultados de TP quando o método é ajustado para concordar com outro 127
- Interpretação dos resultados de TP 128
- Programas de TP baseados na acurácia 128

Referências bibliográficas 129

PONTOS-CHAVE

- Amostras de controle de qualidade são analisadas segundo um esquema regular, para verificar se o procedimento está sendo adequadamente realizado pelo laboratório.
- A interpretação dos resultados do controle de qualidade baseia-se em critérios que são sensíveis a distorções, imprecisões e tendências.
- Diante de um evento de erro de resultado de controle qualidade, toma-se uma medida corretiva para resolver o problema metodológico e repetem-se todos os resultados de pacientes, emitidos desde o tempo em que vigorava o último resultado de CQ aceitável.
- Devido às limitações de comutabilidade, as amostras de CQ não devem ser utilizadas para verificar se dois métodos produzem os mesmos resultados para as amostras dos pacientes.
- O teste de proficiência comprova, por meio de avaliação externa, que o laboratório está realizando adequadamente um dado método, em conformidade com as especificações do fabricante.

Introdução

O propósito de um teste de laboratório clínico é avaliar a condição patofisiológica de cada paciente, de modo a auxiliar o diagnóstico e/ou monitorar a terapia. A fim de ser válido para a tomada de decisão clínica, um resultado de teste laboratorial deve apresentar erro total suficientemente insignificante que lhe permita refletir a condição biológica em questão. O erro total de um resultado é influenciado pelos seguintes fatores:

- variabilidade biológica/fisiológica do indivíduo;
- variabilidade pré-analítica na coleta, no transporte, no processamento e no armazenamento da amostra;
- variabilidade analítica do desempenho do teste;
- substâncias interferentes, como fármacos ou compostos metabólicos.

Este capítulo trata do controle de qualidade do processo de quantificação analítica, o qual garante que a variabilidade analítica atenda às exigências de acurácia e precisão estabelecidas para os procedimentos de quantificação e consideradas adequadas à assistência prestada ao paciente. O controle de qualidade (também chamado de controle do processo estatístico) é um processo de amostragem estatística de um método quantitativo, com o intuito de verificar se este está sendo executado de acordo com as especificações preestabelecidas.

Variabilidade analítica e calibração

A Figura 10.1 ilustra o significado de acurácia e imprecisão de uma quantificação. Nessa figura, o eixo horizontal representa o valor numérico de um resultado individual, enquanto o eixo vertical representa o número de repetições de quantificação da mesma amostra. A linha vermelha mostra a dispersão dos resultados individuais de repetições de um ensaio realizado com a mesma amostra, que consiste na imprecisão (ou distorção ao acaso) da quantificação. A impressão frequentemente segue uma distribuição gaussiana (normal) e é descrita pelo desvio-padrão (DP). Note que os resultados próximos ao valor médio (média) são mais frequentes do que aqueles que se distanciam mais da média. A diferença entre o valor médio e o valor que verdadeiramente representa um analito na amostra é a distorção sistemática (ou acurácia) do método. A acurácia é estabelecida por meio da calibração e pode ser afetada por interferências devidas à inespecificidade do método para o analito.

A Figura 10.2 mostra que o método de calibração pode reduzir a distorção sistemática a zero (dentro dos limites de tolerância). Observe que a calibração não afeta a imprecisão. Todos os métodos possuem um grau de imprecisão inerente. Os resultados individuais de pacientes, obtidos a partir de um método corretamente calibrado, apresentarão variabilidade de acordo com o grau de imprecisão inerente ao método. O principal propósito do controle de qualidade é amostrar estatisticamente o processo de quantificação para verificar se o método continua dentro das especificações consistentes com as distorções e imprecisões aceitáveis.

Visão geral do controle do processo estatístico

O controle do processo estatístico amostra o procedimento de quantificação, testando materiais de CQ para os quais o resultado correto já é conhecido. Se o resultado obtido para um dado material de CQ estiver dentro dos limites aceitáveis do valor conhecido, considera-se que o procedimento quantitativo analisado está operando conforme o esperado e que os resultados gerados para as amostras de pacientes apresentam grande probabilidade de estarem corretos. Se, por

outro lado, os resultados de CQ estiverem fora dos limites aceitáveis, os resultados de pacientes não são comunicados e torna-se necessário adotar medidas corretivas. Boas práticas de laboratório requerem a verificação de que o método esteja operando corretamente ao quantificar amostras e gerar resultados de pacientes.

A Figura 10.3 resume o controle do processo estatístico e enfatiza seu papel como componente de um sistema integrado de gestão da qualidade. Os elementos essenciais do controle do processo estatístico consistem na amostragem do sistema quantitativo utilizando amostras de CQ para as quais se conhece o resultado esperado. Se os resultados de CQ indicam um processo quantitativo estável, os resultados de pacientes apresentam uma boa probabilidade de estarem corretos. Se os resultados de CQ não são aprovados pelos critérios de avaliação, os resultados de pacientes não são confiáveis para o uso clínico. Nesse caso, medidas corretivas devem ser tomadas com relação ao ensaio realizado com as amostras de pacientes.

O controle do processo estatístico é parte do componente analítico do sistema geral de gestão de qualidade. Esse sistema integra as boas práticas laboratoriais, visando garantir resultados corretos para a assistência ao paciente. Funcionários bem treinados e competentes são indispensáveis em todos os aspectos da medicina laboratorial, incluindo o controle de qualidade. Procedimentos operacionais padronizados (POP) por escrito são necessários a todos os aspectos operacionais do laboratório, incluindo os componentes pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. Para o controle do processo estatístico, o POP deve tratar de todos os pontos relacionados ao programa, incluindo a seleção de materiais de CQ, a frequência com que um processo quantitativo deve ser amostrado, como determinar parâmetros estatísticos para descrever o desempenho metodológico, os critérios de aceitação para os resultados de CQ, as ações corretivas a serem tomadas diante de problemas, bem como a documentação e revisão de processos. No POP deve constar quem é o funcionário autorizado a estabelecer limites aceitáveis para o controle do processo, como também as regras interpretativas para liberação de resultados, quem deve revisar os parâmetros de desempenho, incluindo os resultados de estatística de controle de qualidade, e quem pode autorizar exceções ou modificar a política ou os procedimentos do controle de qualidade.

A Figura 10.4 apresenta um gráfico de Levey-Jennings (Levey, 1950), também conhecido como gráfico de Shewhart (Shewhart, 1931). Trata-se da representação mais comum para fins de avaliação de resultados de CQ. Esse formato mostra sequencialmente cada um dos resultados de CQ ao longo do tempo e permite uma rápida avaliação visual do desempenho do método. A média representa o valor-alvo de um resultado, enquanto as linhas de DP representam a imprecisão esperada para o método. Considerando-se uma distribuição gaussiana (normal) da imprecisão, os resultados seguem a distribuição esperada, estando dispersos de maneira uniforme em torno da média e também mais frequentemente próximos desse valor médio que dos extremos da distribuição. Entretanto, um pequeno número de resultados é maior que 2 DP, sendo que dois resultados excedem discretamente 3 DP. Para muitos ensaios repetidos, o número de resultados esperados pelos intervalos de DP são:

- ± 1 SD = 68,3% das observações;
- ± 2 SD = 95,4% das observações;
- ± 3 SD = 99,7% das observações.

A interpretação de um resultado de CQ individual baseia-se na probabilidade de que esse resultado faça parte da distribuição esperada de resultados para o método, quando este é corretamente executado. Posteriormente, serão discutidas com mais detalhes as regras interpretativas para avaliação dos resultados de CQ.

Implantação do controle do processo estatístico

Seleção dos materiais de controle de qualidade (CQ)

Geralmente, são necessárias duas concentrações para adequação do controle de um processo. Para métodos quantitativos, deve-se optar pelo fornecimento das concentrações do analito pelos materiais de CQ, as quais monitoram a faixa de quantificação analítica do método. É importante assegurar que o desempenho do método seja estável

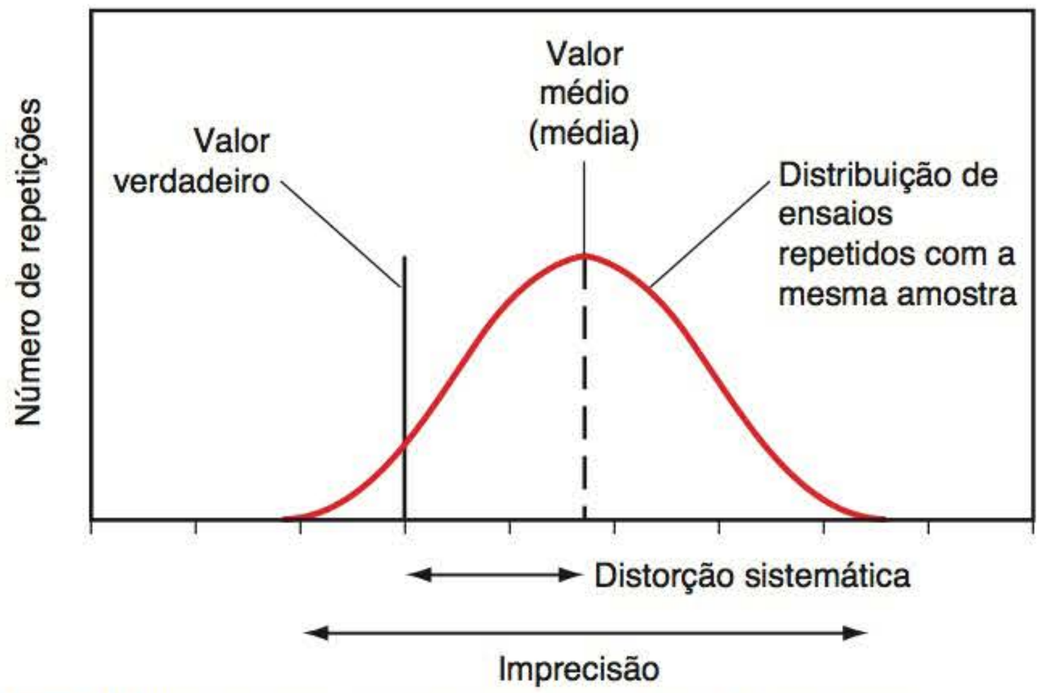


Figura 10.1 Ilustração da imprecisão e da distorção sistemática (acurácia).

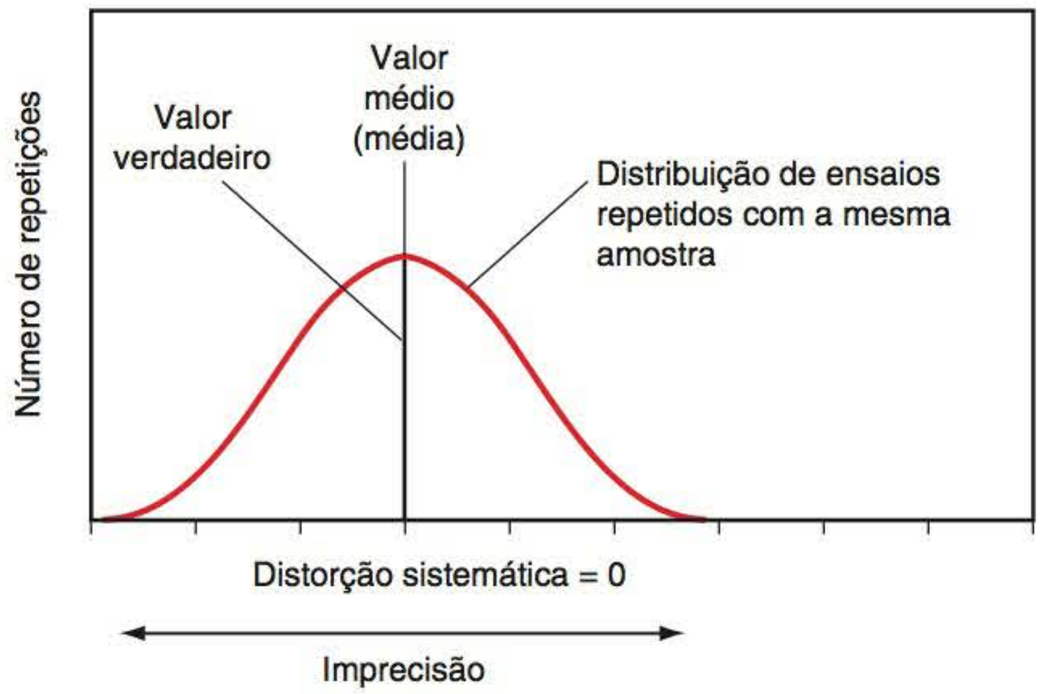


Figura 10.2 Calibração para correção de distorção sistemática.

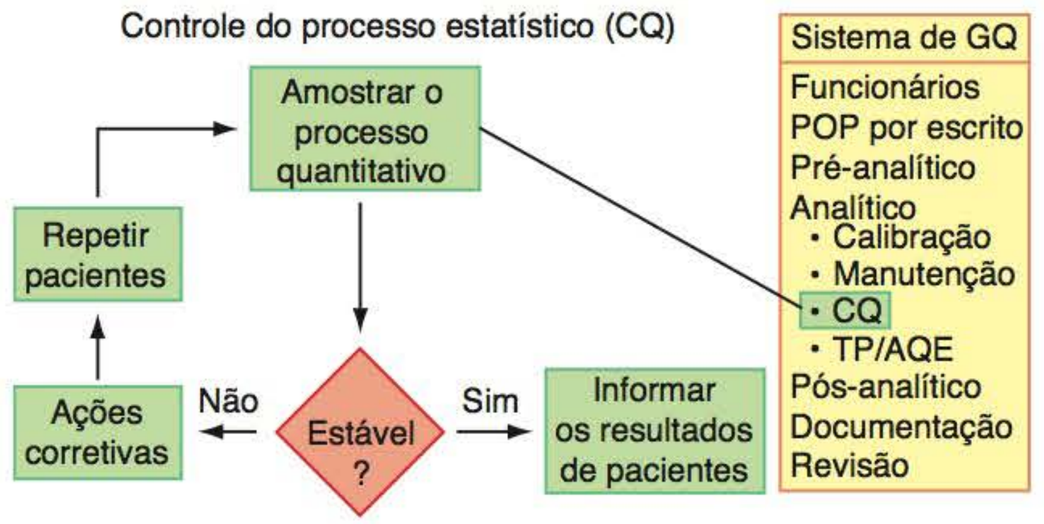


Figura 10.3 Visão geral do controle do processo estatístico (CQ) e sua integração a um sistema de gestão da qualidade (GQ). (Reproduzido com permissão de Miller, W.G.: Quality control. *In* Clarke W.A., Dufour D.R.: (eds): Contemporary practice in clinical chemistry, Washington DC, AACC Press, 2006.)

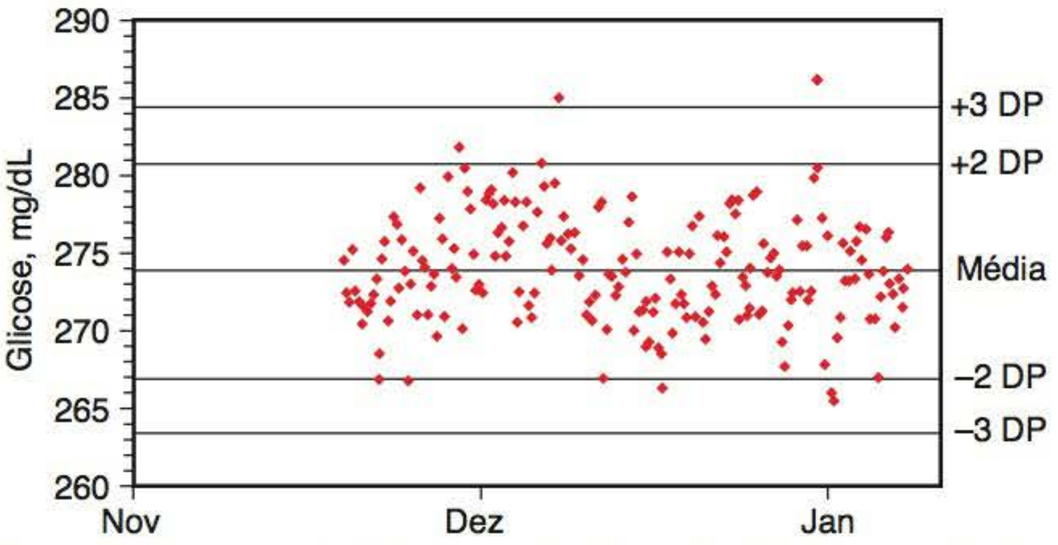


Figura 10.4 Representação gráfica de Levey-Jennings (Shewhart) dos resultados de CQ (*N* = 199) para um único lote de material de CQ utilizado ao longo de 49 dias.

próximo aos limites do ensaio. A maioria dos ensaios quantitativos apresenta uma resposta linear ao longo do intervalo de quantificação analítica, permitindo confiar que o desempenho será aceitável ao longo desse intervalo se os resultados próximos aos limites do ensaio forem igualmente aceitáveis. No caso de uma resposta metodológica não linear, talvez seja necessário utilizar controles adicionais em concentrações intermediárias. Concentrações fundamentais para decisões clínicas, como fármacos terapêuticos, TSH, PSA, podem também assegurar o monitoramento do CQ. No caso dos analitos que apresentam precisão insatisfatória a concentrações baixas/normais, como a troponina I ou a bilirrubina, a concentração deve ser escolhida de modo a proporcionar um DP adequado à avaliação prática. Para procedimentos de extração ou pré-tratamento, ao menos um controle deve ser capaz de detectar defeitos que ocorram na etapa de extração ou de pré-tratamento.

O presente capítulo focaliza principalmente os procedimentos de CQ para métodos quantitativos. Contudo, os princípios podem ser adaptados para métodos mais qualitativos por meio de subsídios para a falta de resultados numéricos. Para testes que se baseiam na interpretação qualitativa de medidas quantitativas (p. ex., drogas de abuso), é desejável monitorar de perto as concentrações limiares, a fim de garantir uma discriminação adequada das respostas positivas e negativas. Similarmente, para outros testes qualitativos (p. ex., gonadotrofina coriônica humana), também é necessário dispor de controles positivo e negativo. É uma boa prática usar um controle positivo que esteja relativamente próximo ao limiar, para exercer um controle adequado e discriminar entre positivos e negativos. Para procedimentos qualitativos com respostas classificatórias (p. ex., urinálise com vareta medidora de nível), são necessários um controle negativo e, ao menos, um positivo, cujo valor pertença à região de respostas classificadas como intermediárias. No caso dos testes qualitativos que se baseiam em outras propriedades (p. ex., procedimentos eletroforéticos), para garantir que o procedimento de CQ discriminará apropriadamente as condições normais das patológicas, é necessária a adequação da coloração, imunofluorescência, identificação do organismo etc.

Os materiais de CQ selecionados devem ser industrializados, assegurando um produto estável que possa ser utilizado por mais tempo, de preferência por 1 ano ou mais, no caso de analitos estáveis. O uso de um único lote por período prolongado proporciona critérios de interpretação confiáveis que permitirão identificar com eficácia qualquer problema pertinente ao ensaio, evitando falsos alertas decorrentes da definição insatisfatória dos limites esperados para os resultados de CQ, bem como minimizar as limitações da interpretação dos resultados após mudanças de lote de reagentes e calibradores.

Existem limitações inerentes aos materiais de CQ atualmente disponíveis para uso. Uma dessas limitações é a de que o material de CQ não costuma ser comutável com amostras clínicas puras. Um material de CQ comutável (ou outro material de referência, como um calibrador de método ou material de TP) é aquele que reage em um sistema quantitativo para gerar um resultado que seria comparável ao esperado para uma amostra de paciente pura, contendo a mesma quantidade de analito. Em geral, os materiais de CQ não são comutáveis com amostras de pacientes puras, uma vez que a matriz do soro ou de outros líquidos biológicos costuma estar alterada em relação à amostra pura do paciente (Miller, 2003). A alteração de matriz se deve ao processamento do líquido biológico durante a fabricação do produto e ao uso de produtos humanos parcialmente purificados e de analitos aditivos não humanos para alcançar as concentrações desejadas, além de diversos processos de estabilização que provocam alterações em proteínas, células e outros componentes. Não se pode prever o impacto da alteração de matriz sobre a recuperação de um analito num sistema de ensaio, sendo diferente em cada lote de materiais de CQ cada método analítico e em diversos lotes de reagente utilizados em um mesmo método analítico.

Uma segunda limitação dos materiais de CQ é a deterioração do analito durante o armazenamento. A estabilidade do analito costuma ser excelente durante o tempo em que permanece guardado sem ser violado, sob refrigeração ou congelado. Entretanto, uma lenta deterioração eventualmente limita a vida de prateleira de um produto, podendo introduzir gradualmente uma flutuação nos dados de monitoramento. Após a reconstituição ou abertura do frasco e exposição ao ar, a estabilidade do analito pode ser uma importante fonte de variabilidade nos resultados de CQ, podendo variar substancialmente entre os analitos existentes em um mesmo frasco. As variáveis relacionadas ao usuário e que devem ser controladas são o tempo de permanência à temperatura ambiente e o tempo de permanência sem a tampa com potencial de evaporação. Após a abertura, deve ser determinado um prazo de validade para cada material de CQ, o qual deve ser diferente para os diversos analitos empregados no mesmo controle. No caso de materiais de CQ reconstituídos com diluente, a variabilidade de frasco a frasco pode ser minimizada pela padronização do procedimento de pipetagem; por exemplo, sempre que for prático, estabeleça a utilização da mesma pipeta ou do dispositivo de adição de diluente (de preferência, um dispositivo automático) e designe o mesmo funcionário para o preparo dos controles.

Outra limitação reside na possibilidade de as concentrações de analitos nos controles de constituintes múltiplos não alcançarem níveis excelentes em todos os ensaios. Essa limitação se deve a considerações acerca da solubilidade e potenciais interações entre diferentes constituintes, particularmente em concentrações maiores. Pode ser necessário empregar material de CQ suplementar para monitorar adequadamente a faixa de quantificação analítica.

Frequência da avaliação dos materiais de CQ

A frequência com que as amostras de CQ devem ser analisadas é uma função de vários parâmetros:

- estabilidade analítica do método;
- o limite de tolerância de erros em que a assistência do paciente não é afetada;
- o número de amostras de paciente quantificado em um determinado período;
- a necessidade de verificar e documentar o grau de confiabilidade dos resultados clínicos no momento em que são.

A estabilidade do sistema de quantificações é fundamental para a frequência com que uma amostra de CQ precisa ser testada. Quanto mais estável for o sistema, menor será a frequência com que a avaliação do controle de processo estatístico deve ser realizada. A mínima prática laboratorial, de acordo com a seção 493.1256 de regulamentações do CLIA-EUA (Department of Health and Human Services, 2003), consiste em testar os controles pelo menos uma vez a cada 24 horas, ou mais frequentemente se for especificado pelo fabricante do método, ou se o laboratório determinar a necessidade de ensaios de CQ mais frequentes para assegurar as características de desempenho de um método. Alguns tipos de testes apresentam exigências mais rigorosas. Por exemplo, a seção 493.1267 do CLIA-EUA estabelece para o ensaio de quantificação de gases sanguíneos que analise no mínimo um controle a cada 8 horas, incluindo os níveis elevado e baixo no decorrer de 24 horas; adicionalmente, um controle deve ser analisado com cada amostra de paciente, a menos que o instrumento faça uma calibração automática a cada 30 minutos (no mínimo). Os métodos que possuem procedimentos de controle automáticos internos (autônomos) podem realizar testes de materiais de CQ externos com menor frequência.

A necessidade de verificar a aceitabilidade clínica dos resultados pode sustentar uma amostragem mais frequente do controle de processo do que se basear estritamente nas características de estabilidade do método ou nas exigências regulatórias mínimas. A amostragem mais frequente do CQ é adequada para evitar a descoberta de um problema metodológico depois de o médico ter tomado uma atitude com base nos resultados laboratoriais que recebeu. Por exemplo, uma amostragem de CQ que é realizada a cada 24 horas e seria executada às 9 horas todas as manhãs. Se os resultados de CQ apresentarem algum problema metodológico, a condição de erro deve ter surgido em um momento qualquer durante as últimas 24 horas. Assim, se o problema ocorreu às 15 horas do dia anterior, isso significa que resultados fora de controle foram reportados durante as 18 horas subsequentes e é necessário considerar as implicações médicas da emissão de tais resultados. O custo de um erro médico, ou simplesmente da repetição da análise das amostras duvidosas do paciente, talvez seja mais caro que um esquema de amostragem de CQ frequente, pois este poderia ter detectado prontamente a condição problemática.

Estabelecimento do valor-alvo de CQ e do DP que representam condição operacional para quantificações estáveis

Os valores-alvo de CQ e os limites de desempenho aceitáveis são estabelecidos para otimizar a probabilidade de detectar um defeito quantitativo, que pode ser grande o bastante para afetar a assistência clínica e, ao mesmo tempo, minimizar a frequência de "falsos alertas" decorrentes das limitações estatísticas dos critérios utilizados para avaliar os resultados de CQ. O sistema quantitativo deve ser corretamente calibrado e operar dentro das especificações de desempenho aceitáveis, antes da determinação dos parâmetros estatísticos a serem empregados para estabelecer as regras interpretativas do CQ. Algumas fontes de variabilidade quantitativa estão listadas na Tabela 10.1. A variabilidade quantitativa inclui fontes com frequências de intervalos curtos, muitas das quais podem ser descritas com distribuições de erro gaussianas, bem como fontes intermitentes e de intervalo mais longo, as quais podem causar flutuações cíclicas ao longo de vários dias ou semanas, distorções graduais durante semanas ou meses e mudanças mais bruscas nos resultados. Os critérios de aceitação para os resultados de CQ devem considerar adequadamente todas as fontes de variabilidade dos resultados esperados, quando o sistema quantitativo opera dentro das especificações.

Um material de CQ deve contar com um valor-alvo confiável para um dado analito. Para tanto, é necessário realizar uma amostragem estatística adequada tanto do material de CQ como das típicas fontes de variabilidade quantitativa durante um determinado período, quando o método está corretamente calibrado e exibe o grau de imprecisão esperado associado a uma condição de quantificação estável. O objetivo de planejamento experimental é incluir todas as fontes de variabilidade no processo quantitativo, a fim de garantir que a média seja representativa. Essa meta, contudo, raramente é alcançada, devido aos componentes da variabilidade a longo prazo e à incapacidade prática de considerar todas as influências no momento da atribuição do valor-alvo. O protocolo mínimo geralmente aceito para a atribuição do valor-alvo consiste em utilizar a média obtida na realização de, no mínimo, 20 ensaios com o material de CQ, em 20 dias diferentes (CLSI, 2006). Observe que é preferível utilizar apenas uma unidade do material de CQ pelo período em que se espera que ainda vá durar um frasco já aberto, a fim de considerar os efeitos exercidos pela estabilidade do analito a abrir uma unidade nova para cada dia de teste. Se um protocolo de 20 dias não for viável, é possível estabelecer valores-alvo temporários utilizando um número menor de dados. Contudo, é necessário atualizá-los assim que mais repetições de resultados estiverem disponíveis. Quando couber, mais de um método de calibração deve ser representado na amostragem de 20 dias, a fim de incluir adequadamente a variabilidade associada ao processo de calibração.

Alguns materiais de CQ são fornecidos pelo fabricante do método, com valores-alvo e limites preestabelecidos que podem ser utilizados para confirmar se o método está de acordo com as especificações do fabricante. Tais valores podem ser inicialmente utilizados pelo laboratório. Recomenda-se que tanto o valor-alvo como o DP sejam reavaliados e ajustados pelo laboratório, depois que um número apropriado de repetições de resultado for obtido, uma vez que as regras interpretativas do CQ empregadas no laboratório devem refletir o desempenho do método no próprio laboratório. Os limites de aceitabilidade sugeridos pelo fabricante podem refletir fontes de variabilidade, tais como a variação entre instrumentos, lotes de reagentes e lotes de calibradores, as quais podem ser maiores que a variabilidade esperada para um método utilizado em um laboratório individual. Os materiais de CQ com valores-alvo estabelecidos são disponibilizados por fabricantes de terceiros (i. e., fabricantes não afiliados ao fabricante do método). É preciso ter cautela com materiais de CQ produzidos por fabricantes de terceiros que apresentam valores-alvo preestabelecidos, pois tais valores, assim como o DP, podem ter sido atribuídos por meio da utilização de protocolos que não refletem adequadamente o desempenho do método, de modo que a não comutabilidade pode limitar a aplicabilidade desses valores para alguns métodos.

Uma vez que o valor-alvo tenha sido atribuído a um dado material de CQ, deve ser estabelecido um desvio-padrão (DP) que represente a imprecisão típica do método, quando este opera dentro de suas especificações. Um DP é um modo convencional de expressar a variabilidade do método, mesmo que os componentes da variabilidade dos resultados de CQ não sigam uma distribuição gaussiana, uma vez que os pacotes estatísticos que acompanham os instrumentos e os sistemas computadorizados são destinados a analisar os dados de CQ com base na média e no DP. Um DP baseado nos dados de atribuição de valor-alvo obtidos ao longo de 20 dias, ou em um resumo mensal de 30 dias, apresenta elevado grau de incerteza (tipicamente, igual a 30% para N = 20; CLSI, 2006), sendo muito pouco provável que inclua todas as fontes de variabilidade que se espera observar ao longo de um intervalo de tempo maior.

Nos casos em que o método é conhecido por experiência anterior, recomenda-se determinar o DP para um desempenho da quantificação estável a partir de um DP cumulativo sobre um período de 6 a 12 meses, a fim de garantir a representação de todas as fontes de variação. A Figura 10.5 ilustra a flutuação em DP, quando calculada para intervalos mensais, em comparação ao valor relativamente estável observado para o DP cumulativo após um período de 6 meses. Observe que o DP cumulativo não é uma média de valores mensais. Diferentes fontes de variabilidade a longo prazo, as quais se manifestam em diferentes momentos durante o uso de método, podem não estar representadas em um DP mensal. Entretanto, o DP cumulativo inclui as contribuições de todas as fontes de variabilidade, à medida em que ocorrem e são refletidas nos resultados de CQ individuais. Consequentemente, o

Tabela 10.1 Fontes comuns de variabilidade quantitativa

Fonte	Intervalo de tempo para que ocorra flutuação	Provável distribuição estatística
Volume pipetado	Curto	Gaussiana
Controle de temperatura do instrumento	Curto ou longo	Gaussiana ou outra
Ruído eletrônico no sistema de quantificação	Curto	Gaussiana
Ciclos de calibração	Curto ou longo	Gaussiana ou deslocamento (etapa periódica)
Deterioração do reagente durante o armazenamento	Longo	Flutuação
Deterioração do reagente após a abertura	Intermediário	Cíclica; flutuação/etapa periódica
Deterioração do calibrador durante o armazenamento	Longo	Flutuação
Deterioração do calibrador após a abertura	Intermediário	Cíclica; flutuação/etapa periódica
Deterioração do material de controle durante o armazenamento	Longo	Flutuação
Deterioração do material de controle após a abertura	Intermediário	Cíclica; flutuação/etapa periódica
Temperatura e umidade do ambiente	Variável	Variável
Alterações do reagente	Intermediário a longo	Deslocamento (etapa aleatória)
Alterações do calibrador	Intermediário a longo	Deslocamento (etapa aleatória)
Manutenção do instrumento	Variável	Gaussiana, cíclica ou deslocamento (etapa periódica)
Deterioração dos componentes do instrumento	Variável	Variável

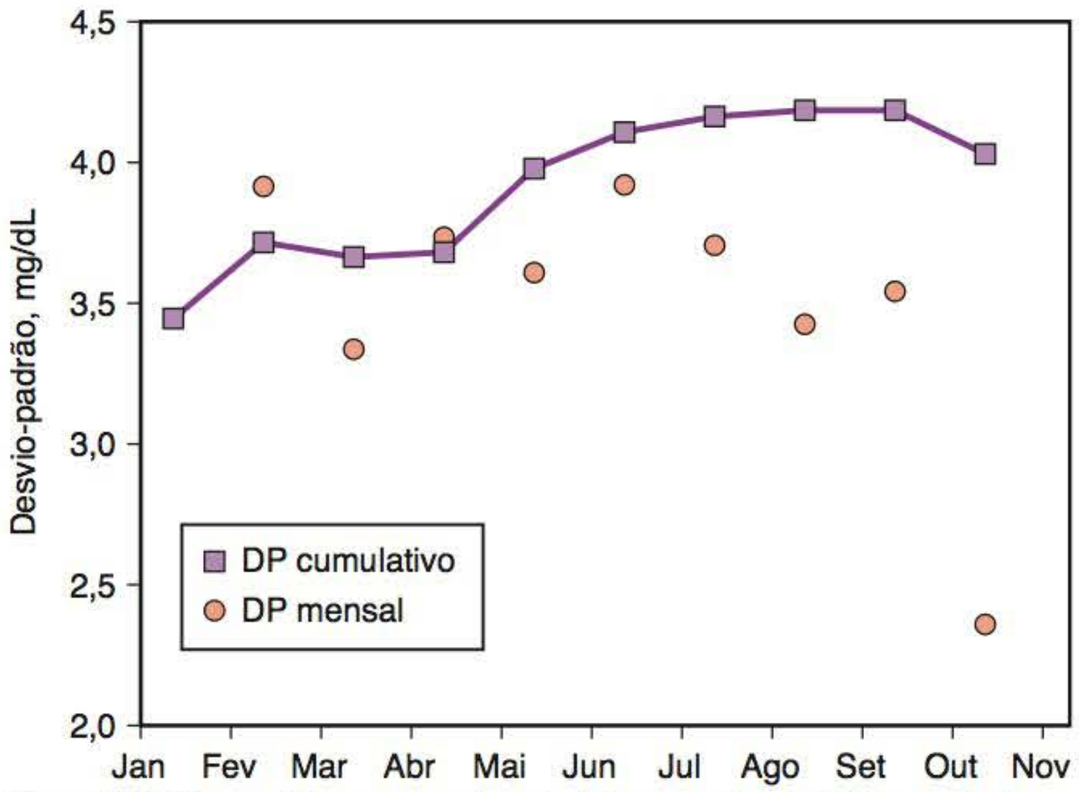


Figura 10.5 DP cumulativo *versus* valores isolados mensais calculados a partir dos dados da Figura 10.7.

DP cumulativo geralmente será maior que os valores mensais e deve representar melhor o grau de variabilidade metodológica real. Se for subestimada a imprecisão que se espera observar durante a operação normal estável, o intervalo aceitável para os resultados de CQ será pequeno demais e a taxa de alertas falsos será inaceitavelmente alta. Havendo superestimação do grau de imprecisão para condições estáveis, então o intervalo será grande demais e um considerável erro quantitativo pode não ser detectado.

É importante incluir todos os resultados de CQ no cálculo do DP. Um resultado de CQ válido é aquele que foi, ou deveria ter sido, utilizado para verificar o desempenho aceitável de um ensaio e reportar resultados de pacientes. Somente os resultados de CQ que foram, ou deveriam ter sido, responsáveis pela não liberação de resultados de pacientes devem ser excluídos (com registro) dos cálculos de resumos. Se houver edição seletiva de resultados de CQ, o método do DP será inadequadamente pequeno, podendo gerar também pequenos limites de avaliação inadequados e aumento do número de alertas falsos, com concomitante redução da efetividade do controle do processo estatístico.

Quando um método é estabelecido em um dado laboratório e um novo lote de material de CQ está sendo introduzido, o valor-alvo para esse novo lote é utilizado com o DP cumulativo do lote anterior, a fim de estabelecer limites aceitáveis para o novo lote de material de CQ. Essa prática é inadequada, pois na maioria dos casos a imprecisão quantitativa é uma propriedade do método e o instrumento utilizado provavelmente não muda com um lote diferente de material de CQ. Se os valores-alvo de ambos os lotes, antigo e novo, diferirem substancialmente, um grau de imprecisão diferente poderá ser observado, tornando-se necessário um ajuste no DP à medida que forem se acumulando mais experiências realizadas com o novo lote de material.

Se for introduzido um novo método para o qual não há nenhuma informação histórica acerca do desempenho, o DP para um desempenho estável deve ser estabelecido utilizando-se os dados disponíveis do método de validação e da atribuição do valor-alvo para materiais de CQ. O fabricante do método pode fornecer informação adicional sobre o desempenho metodológico esperado. Outra fonte de informações adicionais são os programas de teste de desempenho metodológico no CQ interlaboratorial e/ou testes de proficiência. Nesse caso, o DP inicial e os critérios de avaliação deverão ser monitorados de perto, como também será necessário fazer ajustes, à medida que novas experiências forem permitindo ao desvio cumulativo refletir a imprecisão de todas as fontes que é inerente às quantificações.

Estabelecimento de regras para avaliação de resultados de CQ

A escolha dos critérios para interpretação dos resultados de CQ baseia-se na probabilidade de detectar uma condição de erro analítico importante com uma taxa aceitável de alertas falsos. As características de desempenho do controle de processo desejado devem ser estabelecidas para cada analito, antes da escolha das regras adequadas para a avaliação de CQ.

O modo convencional de expressar as regras interpretativas de CQ é por meio da abreviação da nomenclatura popularizada entre os laboratórios clínicos por Westgard (Westgard, 1981), a qual é resumida na Tabela 10.2. Repare que os intervalos de DP fracional são permissivos, como no exemplo $2_{2,5S}$. Outras técnicas, como a soma cumulativa ou as médias móveis ponderadas exponencialmente, também são utilizadas para monitorar tendências de distorção no decorrer de longos períodos (Ryan, 1989).

Os gráficos da função poder foram desenvolvidos (Westgard, 1979) para expressar a probabilidade de uma regra interpretativa de CQ detectar um erro analítico. O modelo estatístico de Westgard considera que os erros seguem distribuições gaussianas (normais) e, embora existam distribuições não gaussianas de erros nos sistemas quantitativos, tem fornecido diretrizes úteis para selecionar as regras de interpretação dos resultados de CQ. Outros relatos na literatura, que também tratam dos critérios de seleção dessas regras, utilizaram modelos estatísticos e considerações diferentes acerca da distribuição dos erros (Parvin, 1997 a,b; Westgard, 1992; Linnet, 1989).

A Figura 10.6 mostra um gráfico da função poder que representa a probabilidade de detectar um erro quantitativo (eixo *y*), o qual é a probabilidade de que uma determinada regra interpretativa seja violada *versus* uma distorção sistemática de magnitude desconhecida apresentada por um resultado (eixo *x*). Quando se avalia regras interpretativas, uma prática comum consiste em expressar a magnitude de um erro em múltiplos de DP para o método (i. e., intervalos de DP – IDP). Por exemplo, a regra 1_{2S} é violada se um único resultado de CQ for > 2 DP do valor-alvo. A Figura 10.6 mostra que, para a regra 1_{2S}, um resultado que apresenta distorção sistemática de 1 DP (eixo *x*) possui uma probabilidade de 0,35 (eixo *y*) de exceder um total de 2 DP do valor-alvo (1 DP da distorção + 1 DP da imprecisão dos resultados). Assim, a regra interpretativa 1_{2S} apresenta uma probabilidade de 35% de detectar um erro sistemático da ordem de 1 DP de magnitude. As três linhas observadas na Figura 10.6 representam as probabilidades de diferentes regras interpretativas detectarem distorções sistemáticas de várias ordens de magnitude. Gráficos similares podem ser determinados para outras regras interpretativas, tanto para distorção sistemática como para erros de imprecisão.

Tabela 10.2 Abreviação da nomenclatura para expressar as regras de CQ baseadas na distribuição gaussiana (normal) da imprecisão

Regra	Significado	Falha que detecta
1_{2S}	Uma observação excede 2 DP do valor-alvo	Imprecisão ou distorção sistemática
1_{3S}	Uma observação excede 3 DP do valor-alvo	Imprecisão ou distorção sistemática
2_{2S}	Duas observações sequenciais, ou observações para duas amostras de CQ na mesma análise, excedem 2 DP do valor-alvo, na mesma direção	Distorção sistemática
$2_{2,5S}$	Duas observações sequenciais, ou observações para duas amostras de CQ na mesma análise, excedem 2,5 DP do valor-alvo, na mesma direção	Distorção sistemática
R_{4S}	A faixa entre duas observações na mesma análise excede 4 DP	Imprecisão
10_m	10 observações sequenciais estão no mesmo lado do valor-alvo (média)	Distorção sistemática, tendência
8_{1S}	8 observações sequenciais para o mesmo material excedem 1 DP na mesma direção do valor-alvo	Distorção sistemática, tendência

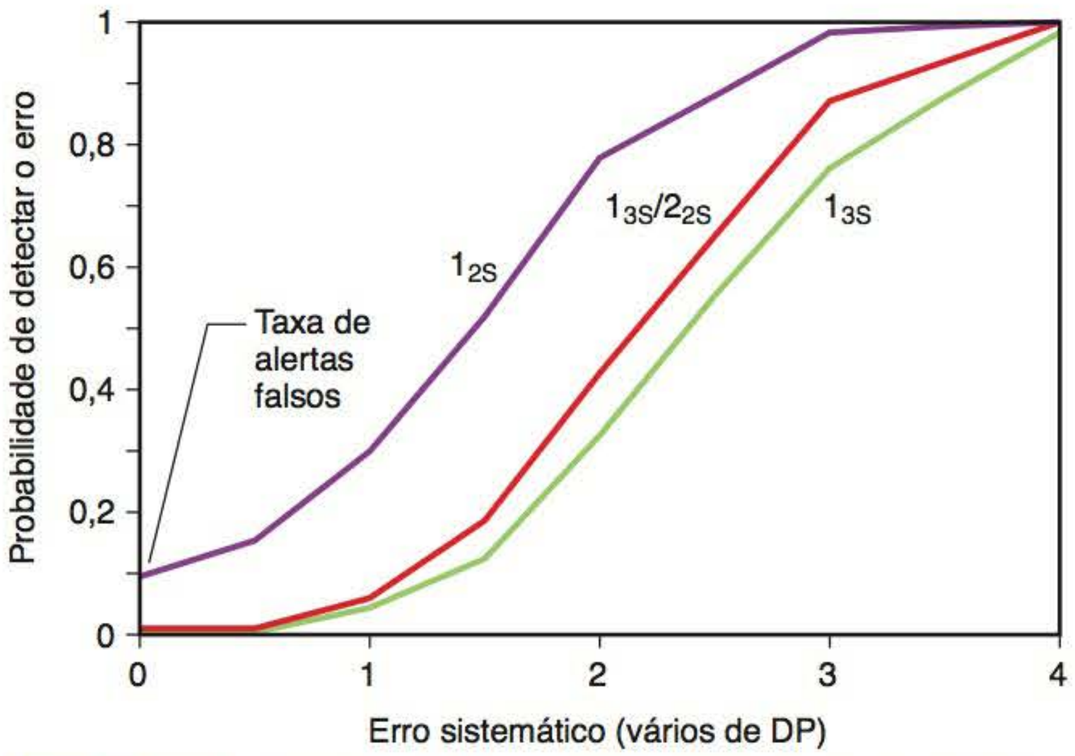


Figura 10.6 Gráfico da função poder da capacidade de detecção de erro sistemático de diferentes regras interpretativas de CQ, utilizando dois controles na mesma análise. O erro sistemático é expresso em número de DP do valor-alvo. (Após Westgard, 1979; com permissão.)

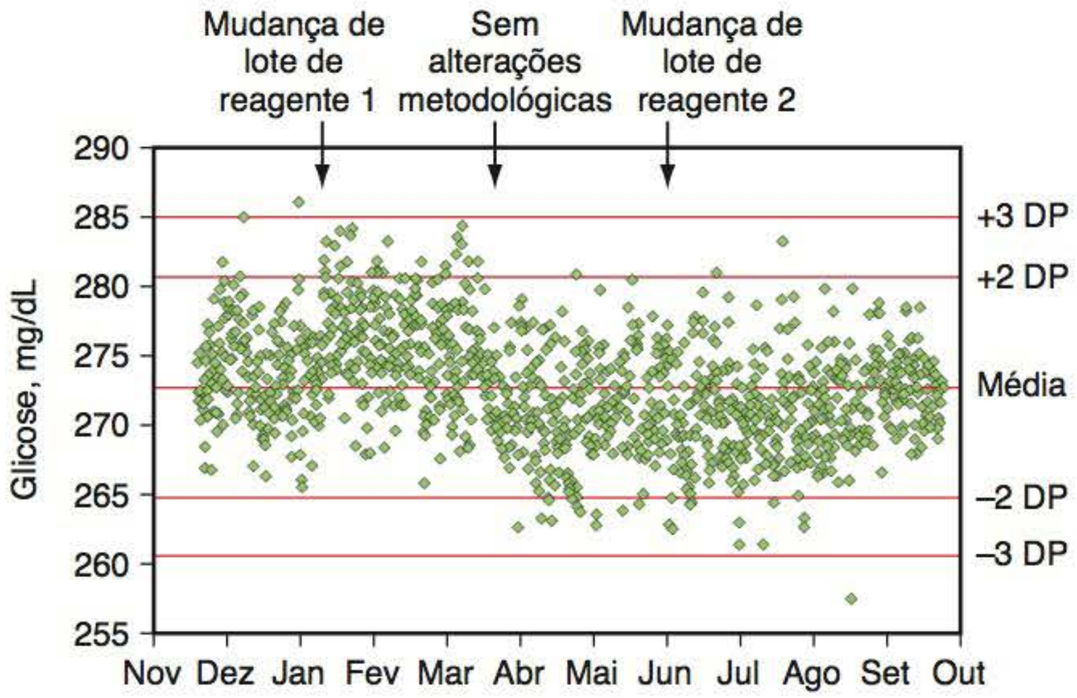


Figura 10.7 Representação gráfica de Levey-Jennings (Shewhart) dos resultados de CQ ($N = 1232$) para um único lote de material de CQ utilizado ao longo de 10 meses. (Reproduzido com permissão de Miller, W.G.: Quality control. *In* Clarke W.A., Dufour D.R.: (eds): Contemporary practice in clinical chemistry, Washington DC, AACC Press, 2006.)

Observe, ainda na Figura 10.6, que nenhuma dessas regras interpretativas apresenta uma probabilidade de 100% de detectar uma distorção sistemática, até que o erro se torne relativamente grande. A regra 1_{2S} apresenta uma boa probabilidade de detectar erros (p. ex., uma probabilidade de quase 90% de detectar uma distorção de 2,5 DP), porém uma elevada taxa de alertas falsos é indicada pela interceptação do eixo y (note que a linha indicativa mostra que, devido à imprecisão, há uma probabilidade de 10% de indicar uma condição de erro quando a distorção é igual a zero). Por causa dessa elevada taxa de alertas falsos, o uso da regra 1_{2S} não é recomendado. A regra 1_{3S} apresenta uma baixa taxa de alertas falsos, mas também possui uma probabilidade menor de detectar um erro (p. ex., probabilidade de 55% de detectar uma distorção de 2,5 DP). Sendo assim, recomenda-se aprimorar a eficiência das regras interpretativas de CQ por meio da combinação de duas ou mais regras, as quais devem ser aplicadas simultaneamente como critério multirregras. Por exemplo, a multirregra $1_{3S}/2_{2S}$ identifica uma condição de erro se um controle exceder ± 3 DP do valor-alvo, ou se dois controles excederem ± 2 DP na mesma direção, a partir do valor-alvo. Segundo a Figura 10.6, a multirregra $1_{3S}/2_{2S}$ apresenta uma taxa de alertas falsos semelhante à da regra 1_{3S}, porém exibe maior probabilidade de detectar um erro (p. ex., probabilidade de 65% de detectar uma distorção de 2,5 DP e probabilidade de 90% de detectar uma distorção de 3,2 DP). Nesse exemplo de multirregra, o componente 1_{3S} é sensível à imprecisão ou a grandes distorções sistemáticas, enquanto o componente 2_{2S} é sensível à distorção sistemática.

Um dos desafios que se apresenta à seleção de regras interpretativas para resultados de CQ é que diferentes tipos de variabilidade (listados na Tabela 10.1) ocorrem na maioria dos sistemas de testes automatizados e introduzem flutuações duradouras cíclicas e graduais no desempenho. Tais tipos de variabilidade não são adequadamente descritos pelos modelos gaussianos de seleção de regras. Como quase todos os *softwares* de CQ utilizados nos instrumentos e sistemas computadorizados do laboratório baseiam-se na interpretação de IDP, é necessário estimar um DP que aproxime a variabilidade a longo prazo, tanto das influências gaussianas como das não gaussianas. Dessa forma, os dados coletados ao longo de um período de tempo significativo são importantes na determinação de um DP que represente uma variabilidade típica, quando o método apresenta estabilidade e opera corretamente.

A Figura 10.7 mostra os resultados de um único lote de material de CQ utilizado durante 10 meses para um método de glicose automatizado. A estabilidade e o desempenho do método da glicose ao longo dos 10 meses foram considerados aceitáveis para uso clínico. Os dados para os primeiros 49 dias são os mesmos da Figura 10.5 e representam a experiência inicial com este lote de material de CQ. O exame desses dados mostra várias flutuações que não podem ser descritas por um modelo estatístico gaussiano. A primeira mudança de lote de reagente causou uma alteração gradual para valores mais altos. A segunda mudança de lote de reagentes não afetou os resultados de CQ. Entre os meses de março e abril, houve uma transição para valores inferiores, a qual não se deveu a nenhum evento de manutenção ou calibração. Ao longo de todo o período, houve intervalos com duração de meses em que a imprecisão ora melhorou, ora piorou em relação a outros períodos (Fig. 10.5). Se os critérios de aceitação se baseassem no DP do período inicial, as flutuações a longo prazo subsequentes teriam produzido um grande número de alertas falsos e levado à necessidade de grande quantidade de esforços e recursos para resolução de problemas que seriam, na realidade, a variabilidade inerente à tecnologia do método, quando este estivesse estável e operando conforme as expectativas.

Frequentemente, utiliza-se uma abordagem empírica para estabelecer as regras interpretativas que englobam adequadamente a variabilidade metodológica observada e permitem ao diretor do laboratório fundamentar os critérios nas exigências clínicas relativas ao desempenho do teste. A Tabela 10.3 fornece um exemplo de multirregra desenvolvida empiricamente com base nos dados da Figura 10.7. Essa multirregra foi selecionada com base na decisão de que o desempenho metodológico a longo prazo era aceitável em termos de exigências clínicas e os critérios de aceitação combinados devem identificar potenciais problemas do método com uma taxa de alertas falsos < 1%. Essa multirregra apresentou 0,6% de alertas falsos ao ser aplicada aos dados apresentados na Figura 10.7, utilizando a média calculada para o período de novembro a janeiro como valor-alvo e o DP cumulativo do período de 10 meses para representar a imprecisão geral. Se uma regra 2_{2s} tivesse sido utilizada, em vez da regra $2_{2,5S}$ (no exemplo, por meio das análises), a taxa de alertas falsos teria aumentado de 0,6% para 1,8%. Uma regra $8_{1,5S}$ foi empregada para proporcionar a detecção de tendências de distorção, por não ter apresentado nenhum alerta falso, em comparação à taxa de 0,5% apresentada pela regra 8_{1S}, e porque seu DP foi suficientemente pequeno para considerar que uma tendência de distorção dessa magnitude, para a duração desse período, não afetaria adversamente a interpretação clínica dos resultados dos pacientes. Uma regra que avalia resultados sequenciais de um lado da média pode apresentar uma elevada taxa de alertas falsos, quando as distribuições de erros do método não são gaussianas. Por exemplo, a aplicação de uma regra 10_m para os dados exibidos na Figura 10.7 teria resultado em uma taxa de alertas falsos igual a 10,6%. Muitos analisadores modernos

Tabela 10.3 Multirregras empíricas para os dados de CQ da Figura 10.7

Componentes multirregras	Tipo de variabilidade detectada
1_{3S}	Imprecisão ou distorção
$2_{2,5S}$	Distorção
R_{4S}	Imprecisão
$8_{1,5S}$	Tendências de distorção

são bastante estáveis e podem produzir resultados de CQ localizados em um dos lados da média no decorrer de longos períodos; contudo, a magnitude da diferença do valor-alvo é pequena e talvez não implique problemas metodológicos nem problemas de interpretação clínica de resultados de pacientes.

Na prática, é frequentemente necessário empregar o julgamento empírico para estabelecer as regras de CQ que melhor se adequam aos dados observados no decorrer de um período suficientemente longo para proporcionar a representação apropriada da variabilidade observada, quando o método opera de forma correta. É preciso ter cautela ao selecionar regras interpretativas de CQ baseadas somente em modelos gaussianos de imprecisão, uma vez que tais regras podem não acomodar todos os tipos de variabilidade observados em muitos sistemas analíticos. Seja qual for a abordagem estatística adotada, a utilização combinada de múltiplas regras permite aprimorar o equilíbrio entre alertas falsos e probabilidade de detectar um erro. Ao estabelecer regras para interpretar resultados de CQ, é importante lembrar que o controle do processo estatístico é capaz apenas de verificar se um sistema quantitativo está produzindo resultados consoantes com a variabilidade esperada de um sistema corretamente calibrado, que esteja operando de modo estável. As regras de CQ se destinam a detectar alterações na calibração e na imprecisão, que sejam significativas o bastante, a ponto de requererem correção antes da transmissão dos resultados do paciente.

No processo de revisão de parâmetros estatísticos para CQ, é possível especificar que a variabilidade de um método é demasiada para atender às exigências médicas. Caso o método apresente estabilidade operacional, a variabilidade observada é uma limitação inerente à tecnologia em uso. Sendo assim, as únicas soluções disponíveis são aprimorar o desempenho do método ou utilizar outro. Se o desempenho de um método não puder ser aprimorado e não houver outro melhor disponível, o laboratório deve aceitar as limitações metodológicas e comunicá-las aos prestadores de assistência de saúde que atendem aos pacientes. É importante, nessa circunstância, não tornar os limites ou as regras interpretativas de CQ artificialmente rigorosos. Tal abordagem incorreta, em vez de aprimorar o desempenho do método, aumentará a taxa de alertas falsos, diminuindo a eficiência e a praticidade do processo de CQ estatístico.

Ação corretiva diante de resultado de CQ que indica problema de quantificação

Um alerta de CQ ocorre quando um resultado não segue uma regra de avaliação, que indica a existência de um problema analítico. Um alerta de CQ significa que há grande probabilidade de que um ensaio esteja produzindo resultados não confiáveis na assistência ao paciente. Quando essa condição ocorre, é necessário tomar medidas corretivas para investigar a causa do alerta de CQ. A Figura 10.8 mostra uma sequência de resolução de problemas generalizada. Não se recomenda repetir a quantificação de CQ, visto que, com as regras de controle designadas de forma apropriada, é mais provável que se trate de um problema no sistema quantitativo que de um resultado de CQ estatisticamente estranho. Contudo, materiais de CQ podem sofrer deterioração depois de abertos, seja por causa do manuseio ou armazenamento inadequado, seja porque os analitos são instáveis. Assim, a repetição da quantificação de uma nova amostra de material de CQ pode estabelecer que o alerta foi causado pela deterioração desse material, e não por um problema metodológico. Nessa situação, se o alerta de CQ for resolvido, o teste das amostras do paciente pode ser abreviado. Uma medida cautelosa consiste em considerar uma tendência em desenvolvimento. Se o resultado da repetição estiver muito próximo aos limites de aceitabilidade, isso pode significar a existência de um impediente que precisa ser investigado o quanto antes. É muito importante incluir uma regra de CQ que detecte tendências, como a regra $8_{1,5S}$ (no exemplo da Tab. 10.3), uma média móvel ponderada exponencialmente ou uma soma cumulativa na sequência multirregra.

Quando a repetição de uma nova amostra de CQ não resolver a situação de alerta, o instrumento e os regentes utilizados devem ser inspecionados quanto à deterioração de componentes, problemas mecânicos etc. Depois que o problema for identificado e corrigido, os controles devem ser testados quanto ao grau de correção e devem ser repetidas quaisquer amostras de pacientes que tenham sido afetadas. Em muitos

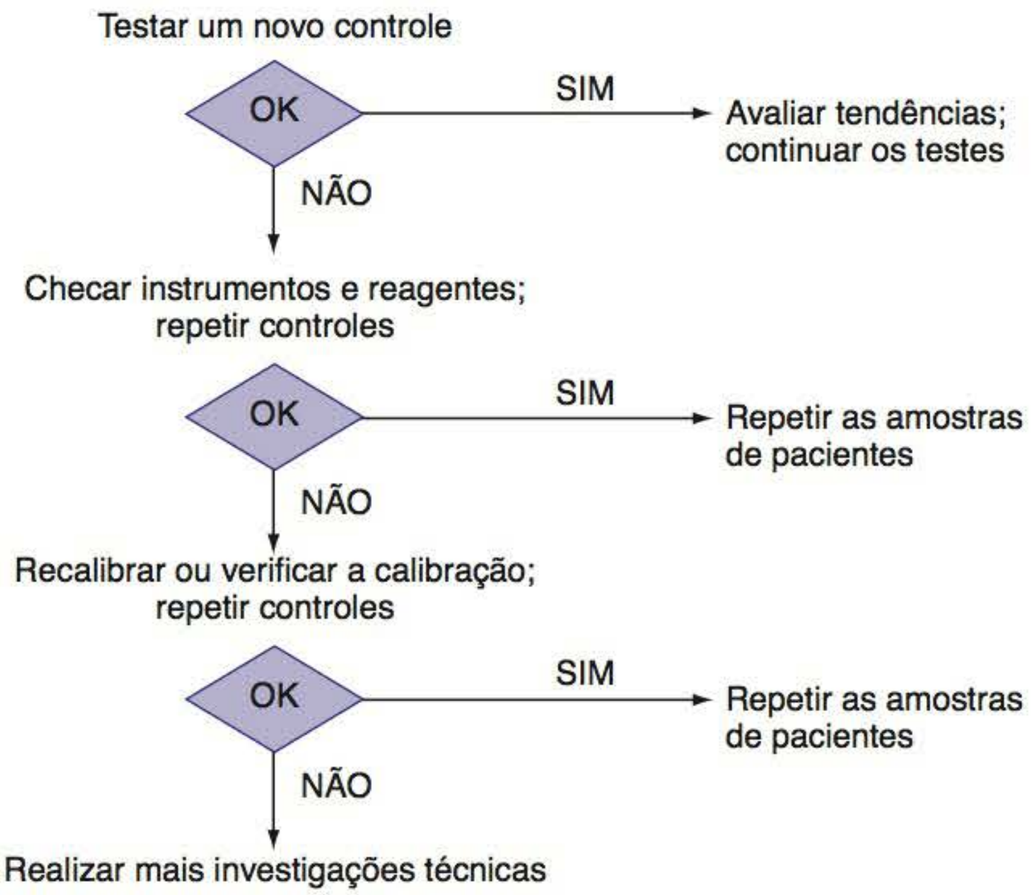


Figura 10.8 Sequência generalizada de resolução de problemas após um alerta de CQ. (Reimpresso com permissão de Miller, W.G.: Quality control. *In* Clarke W.A., Dufour D.R.: (eds): Contemporary practice in clinical chemistry, Washington DC, AACC Press, 2006.)

casos, será necessário fazer uma recalibração (ou verificação da calibração), confirmar se o desempenho do método está correto por meio do teste dos controles e, então, repetir as amostras de pacientes.

Em alguns casos, o volume da amostra de paciente pode ser inadequado (quantidade não suficiente – QNS) para repetir o teste. Diante dessa situação, não se pode comunicar nenhum resultado, a menos que seja registrado que o impacto do defeito metodológico sobre os resultados originais foi pequeno o bastante para afetar a interpretação clínica. Um protocolo para avaliação do impacto clínico do problema metodológico consiste em repetir aquelas amostras que apresentam volume adequado. As amostras repetidas devem representar a faixa de concentração das amostras QNS e o tempo decorrido desde a obtenção dos últimos resultados aceitáveis, além de incluir um número significativo de amostras que foram originalmente testadas enquanto o método operava sob condições instáveis. Se a repetição dos resultados desse grupo de amostras estiver de acordo com os critérios exigidos para a repetição de amostras de pacientes, os resultados originais das amostras QNS poderão ser reportados. Caso contrário, os resultados originais das amostras QNS serão considerados errados e não será possível reportar nenhum resultado. O diretor geral do laboratório deve estabelecer critérios aceitáveis para determinar se dois conjuntos de resultados concordam adequadamente, a ponto de permitir a comunicação dos resultados originais de tais amostras, cujo volume era inadequado para repetir os testes. Como exemplo, a Tabela 10.4 lista os critérios empíricos utilizados com essa finalidade no laboratório do autor. Os critérios de aceitabilidade de testes repetidos baseiam-se nas características do método, na população atendida e nas exigências clínicas dos serviços médicos.

Verificação dos parâmetros de avaliação de CQ diante da mudança de lote de reagentes

A mudança dos lotes de reagentes pode exercer um impacto inesperado sobre os resultados de CQ. É necessário realizar uma cuidadosa avaliação dos valores-alvo de CQ da passagem de lotes. Como a interação de matriz entre um material de CQ e um reagente pode mudar com um lote de reagentes diferente, os resultados de CQ podem não constituir um indicador confiável do desempenho de um método para amostras de pacientes, após a mudança de lote de um dado reagente. No exemplo da Figura 10.9, os valores de CQ para um controle de alto nível foram alterados após a mudança para um novo lote de reagentes; contudo não houve alteração nos resultados para o controle de baixo nível.

Está bem documentado que os materiais de CQ, bem como os materiais de testes de proficiência preparados de modo semelhante, apresen-

Tabela 10.4 Exemplos de critérios empíricos para concordância de resultado de teste de paciente entre ensaios repetidos e para concordância de uma única amostra de paciente quantificada em diversos instrumentos (para analitos bioquímicos selecionados)

Analito	Critério de aceitação (diferença entre resultados)
Ácido úrico	0,4 mg/dL
Albumina	0,4 g/dL
ALP	10 U/L ou 10%*
ALT	10 U/L ou 10%*
Amilase	15 U/L ou 10%
AST	10 U/L ou 10%*
Bilirrubina, total	0,3 mg/dL ou 10%*
Cálcio, total	0,5 mg/dL
CK	10 U/L ou 10%
Cloreto	4 mmol/L
CO_2	4 mmol/L
Colesterol	5%
Creatinina	0,2 mg/dL ou 10%*
Ferro	10 µg/dL ou 10%
Fósforo	0,4 mg/dL
GGT	10 U/L ou 10%
Glicose	6 mg/dL ou 5%*
Lactato	0,32 mmol/L
LDH	10 U/L ou 10%
Magnésio	0,3 mg/dL
Nitrogênio ureico (BUN)	3 mg/dL ou 10%*
Potássio	0,3 mmol/L
Proteína, total	0,4 g/dL
Sódio	4 mmol/L
Triglicérides	10%

* O que for maior.

tam interações de matriz imprevisíveis quando métodos diferentes são empregados e, potencialmente, com o uso de lotes distintos de reagentes para um mesmo método (Miller, 2003). Por essa razão, não é possível determinar se a alteração de CQ observada na Figura 10.9 foi causada por um erro de calibração com o novo lote de reagentes utilizado, ou se foi devida a uma diferença na interação de matriz entre o material de CQ e o lote de reagentes novo *versus* o lote de reagentes antigo. Note que a concordância dos resultados de CQ diante de outras concentrações de material de CQ também pode ter sido um artefato causado por uma interação de matriz diferente, mascarando um potencial erro de calibração ("falso-negativo"). Consequentemente, recomenda-se utilizar amostras de pacientes puras para verificar a consistência dos resultados entre lotes de reagentes novos e antigos.

A Figura 10.10 mostra os resultados de ensaios realizados com amostras de pacientes puras, empregando tanto lotes de reagentes antigos como lotes de reagentes novos, representados na Figura 10.9, ambos calibrados de acordo com as especificações do fabricante do método. Os resultados de pacientes se estendem sobre a faixa de quantificações analíticas e apresentam valores quase idênticos, conforme indicado pelo declive igual a 1 e pela pequena interceptação de –3 mg/dL, segundo a análise de regressão de Deming (Cornbleet, 1979; Linnet, 1993). A análise de regressão é comumente utilizada para comparar resultados obtidos com o uso de dois lotes de reagentes distintos para o mesmo método, ou com o emprego de dois métodos diferentes. Esses dados verificam se a calibração do novo lote de reagentes concorda com a do lote anterior, e se os resultados de pacientes atuais podem ser diretamente comparados com os resultados anteriores. Os dados também confirmam se a troca de valor-alvo de CQ (observada na Fig. 10.9) foi devida a uma diferença na interação de matriz do novo lote de reagentes.

Não há diretrizes bem estabelecidas para o número de amostras de pacientes a ser utilizado nesse tipo de comparação, quando os lotes de

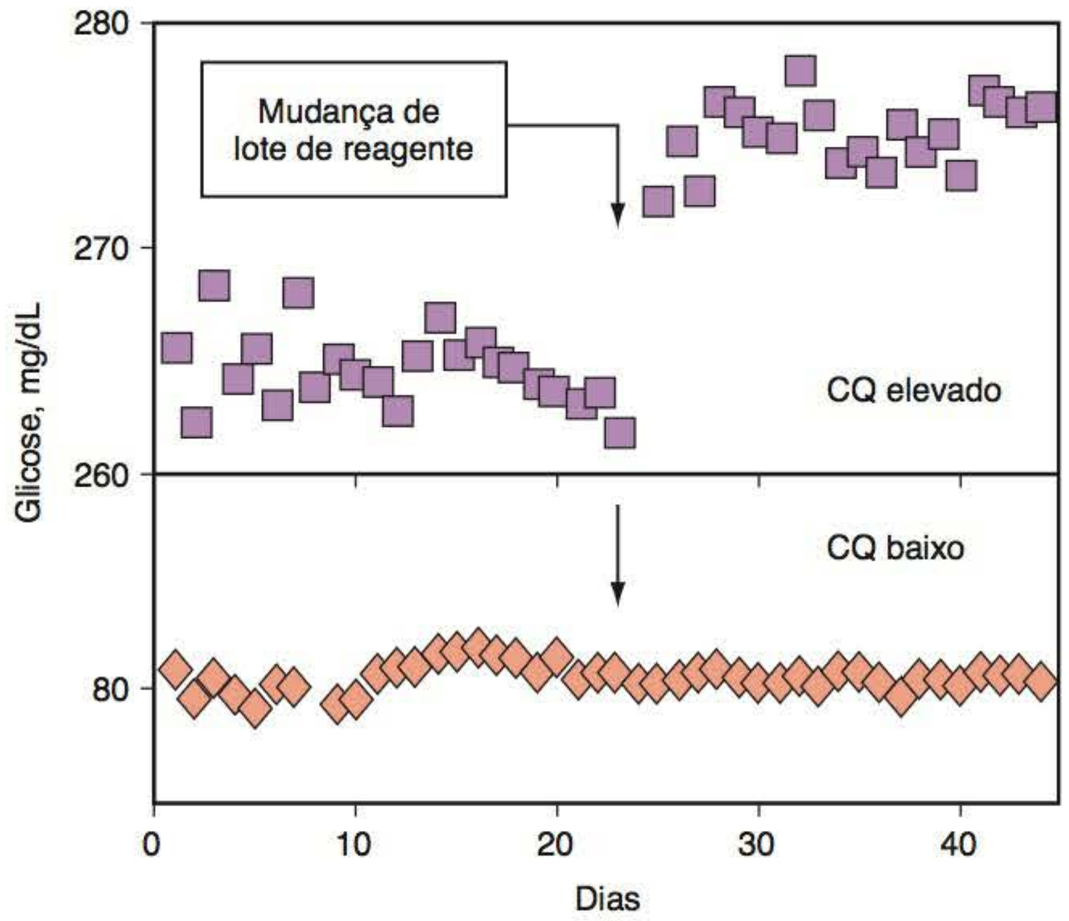


Figura 10.9 Representação gráfica de Levey-Jennings (Shewhart) mostrando o impacto de uma mudança de lote de reagente na interação de matriz com materiais de CQ. (Reimpresso com permissão de Miller, W.G.: Quality control. *In* Clarke W.A., Dufour D.R.: (eds): Contemporary practice in clinical chemistry, Washington DC, AACC Press, 2006.)

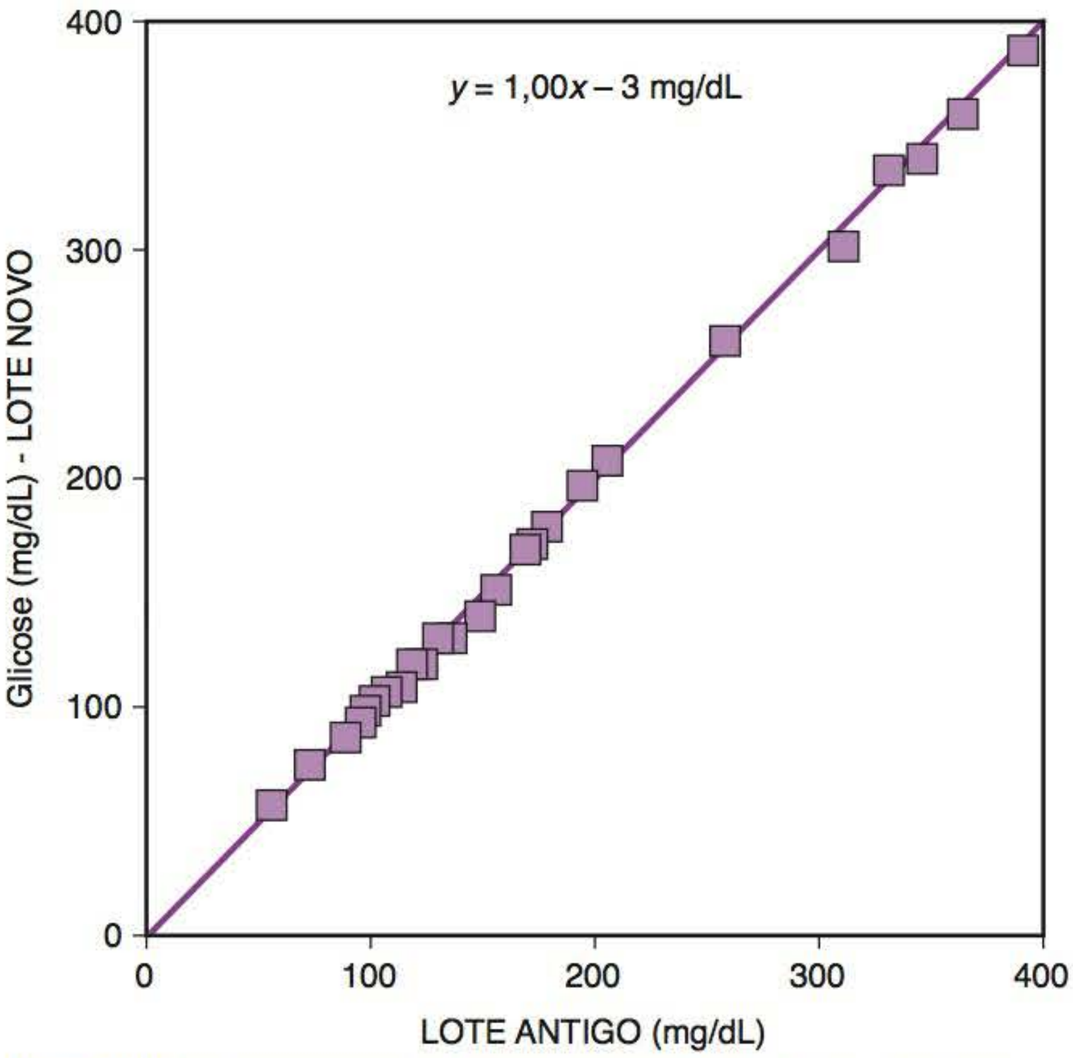


Figura 10.10 Análise de regressão de Deming dos resultados de uma amostra de paciente, comparando o novo lote de reagente com o antigo.

reagentes mudam. A diretriz EP9 do Clinical and Laboratory Standards Institute, anteriormente conhecido como NCCLS, recomenda um mínimo de 40 amostras de pacientes para comparação do desempenho de dois métodos (CLSI, 2002a). Este número se destina à validação de um novo método, e não à verificação prática das mudanças de lotes de reagentes. O laboratório deve utilizar um número de amostras de pacientes que seja suficiente para representar a faixa quantitativa analítica do ensaio e estabelecer critérios de aceitação consistentes com o número de amostras empregado e as exigências clínicas para o método. A Tabela 10.5 lista os critérios de aceitação empírica utilizados pelo laboratório do autor para avaliar a concordância entre os resultados de 10 amostras de pacientes ensaiadas tanto com o lote de reagentes novo como com o lote de reagente antigo. De forma ideal, o declive deveria

Tabela 10.5 Exemplo de critérios empíricos de aceitação para parâmetros da regressão de Deming para concordância entre resultados de aproximadamente 10 amostras de pacientes

Analito	% de declive (diferença de 1)	Interceptação *y* (±)
Ácido úrico	5%	0,3 mg/dL
Albumina	5%	0,3 g/dL
ALP	6%	20 U/L
ALT	6%	10 U/L
Amilase	6%	20 U/L
AST	6%	10 U/L
Bilirrubina, total	7%	0,2 mg/dL
Cálcio, total	10%	1 mg/dL
CK	6%	25 U/L
Cloreto	10%	15 mmol/L
CO_2	10%	3 mmol/L
Colesterol	3%	10 mg/dL
Creatinina	5%	0,15 mg/dL
Ferro	5%	7 µg/dL
Fósforo	5%	0,4 mg/dL
GGT	6%	10 U/L
Glicose	5%	5 mg/dL
Lactato	5%	0,3 mg/dL
LDH	6%	25 U/L
Magnésio	10%	0,2 mg/dL
Nitrogênio ureico (BUN)	5%	2 mg/dL
Potássio	6%	0,3 mmol/L
Proteína, total	5%	0,3 g/dL
Sódio	10%	15 mmol/L
Triglicérides	10%	25 mg/dL

ser igual a 1 e a interceptação, zero. Entretanto, os critérios precisam refletir intervalos de confiança relativamente amplos, associados a um pequeno número de observações.

A Figura 10.11 ilustra o procedimento recomendado para verificar o desempenho metodológico diante da mudança de lotes de reagentes e para confirmar ou ajustar o valor-alvo para um material de CQ quando se observa uma interação de matriz diferente com um novo lote de reagentes. A primeira etapa consiste em verificar se a calibração de um novo lote de reagentes produz resultados para amostras de pacientes puras que sejam consistentes com os resultados obtidos com o lote antigo. Se um problema for identificado, a calibração desse lote novo deve ser investigada e corrigida. Uma vez que os resultados dos pacientes sejam aceitáveis, a segunda etapa é iniciada, avaliando-se os resultados do material de CQ para determinar se o valor-alvo está correto para ser utilizado com o novo lote de reagente(s). Se o valor-alvo tiver mudado, deve ser ajustado para refletir o valor correto a ser utilizado com o novo lote. Ao realizar esse ajuste, o laboratório compensará a interação de matriz alterada do material de CQ com um lote diferente de reagente(s). Os resultados das amostras de paciente puras, e não os resultados de CQ, constituem a base para verificar se a calibração atual do método está consistente com a que foi feita com o lote de reagentes anterior.

O DP utilizado para avaliar os resultados de CQ dificilmente mudarão, quando um novo lote de reagente(s) for posto em uso. O DP representa a variabilidade esperada quando um método é estável e opera de acordo com as especificações. Na maioria dos casos, a variabilidade de um método se mantém a mesma, seja qual for o lote de reagente(s); contudo, pode haver exceções ocasionais que irão requerer o ajuste do DP. O material de CQ não costuma mudar; entretanto, a distorção de matriz entre o material de CQ e o(s) novo(s) reagente(s) pode ser diferente daquela observada com o lote de reagente(s) anterior. Sendo assim, quando necessário, o ajuste do valor-alvo de CQ mantém a variabilidade esperada centralizada ao redor do novo valor-alvo de CQ, de modo que as regras interpretativas de CQ continuarão sendo válidas.

Verificação do desempenho do método diante do uso de um novo lote de calibrador de métodos

No exemplo ilustrado pela Figura 10.12, um novo lote de calibrador de métodos causou um aumento de 20% nos valores dos resultados de CQ. Quando um novo lote de calibradores é utilizado, sem que os reagentes sejam mudados, não ocorre alteração na interação de matriz entre o material de CQ e os reagentes. Nesse caso, os resultados de CQ fornecem uma indicação segura do *status* da calibração com o novo calibrador. Se os resultados de CQ indicarem o aparecimento de uma distorção após a adoção do novo lote de calibradores, o problema terá de ser corrigido a fim de garantir resultados consistentes para as amostras de pacientes.

Alguns métodos são empacotados sob a forma de *kits*, que incluem reagentes, calibradores e materiais de CQ. Nesse caso, os resultados de CQ podem falhar na identificação de uma alteração de calibração, sendo necessário ensaiar amostras de pacientes puras com ambos os *kits*, o antigo e o novo, a fim de verificar a consistência dos resultados de pacientes. Recomenda-se evitar, sempre que possível, a mudança de lotes de material de CQ concomitantemente à mudança de lotes de reagentes ou calibradores.

Aspectos da calibração no controle de qualidade

A calibração do sistema quantitativo analítico é um componente essencial à obtenção de resultados de qualidade. O principal motivo para se executar o controle do processo estatístico é verificar se a

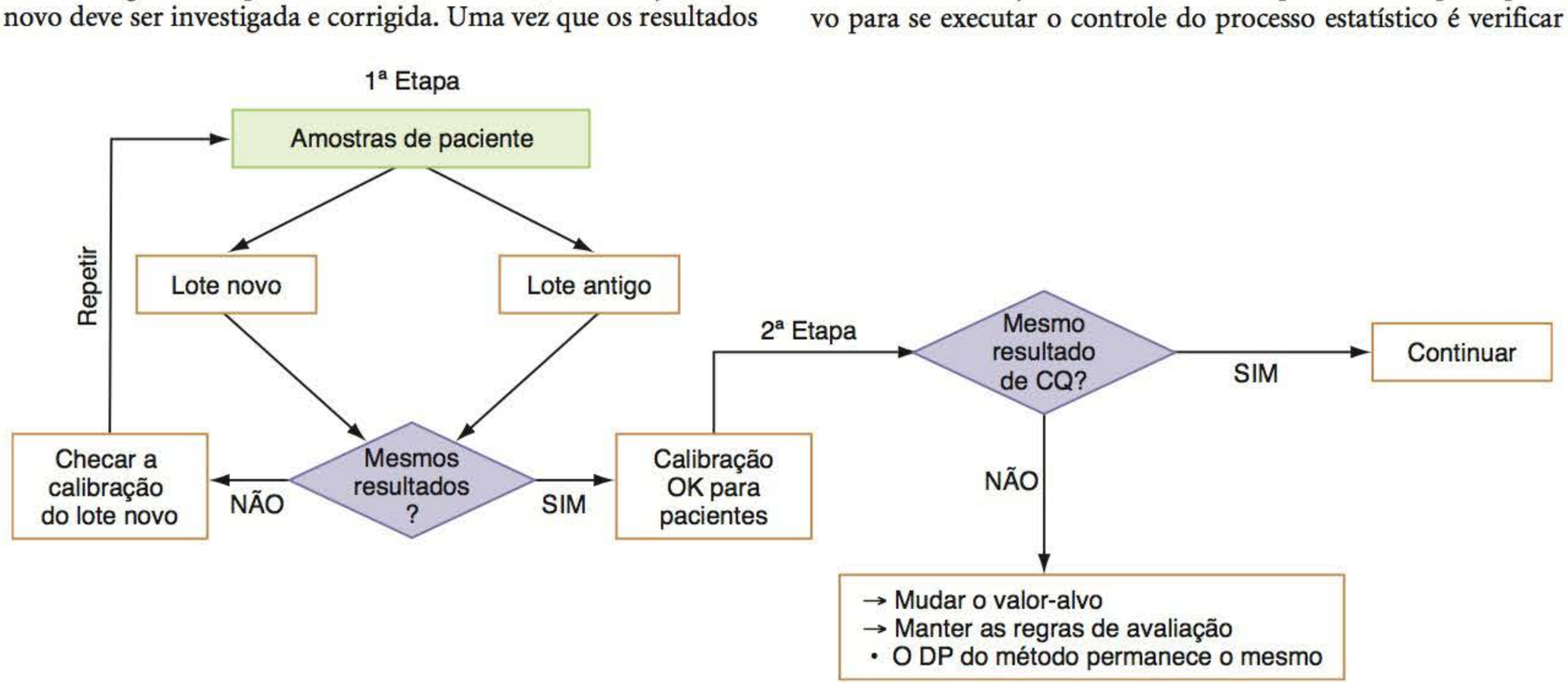


Figura 10.11 Estratégia para avaliação do potencial impacto da matriz sobre os materiais de CQ após uma mudança de lote de reagente.

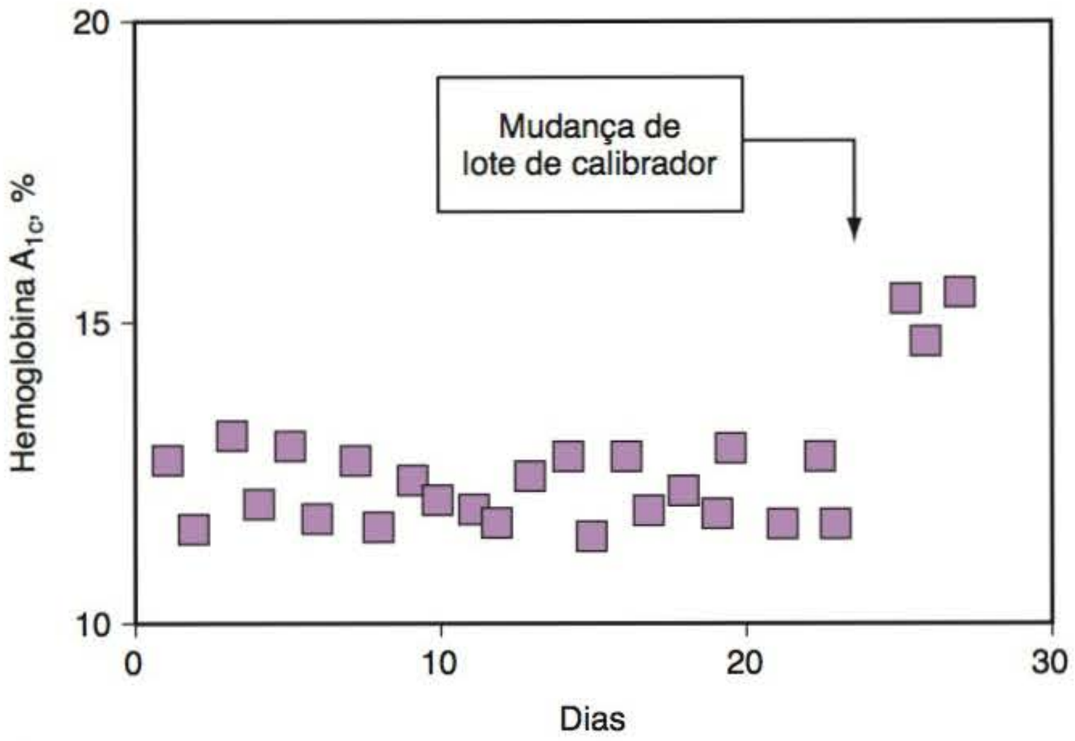


Figura 10.12 Gráfico de Levey-Jennings (Shewhart) mostrando o impacto de uma mudança de lote de calibrador sobre os resultados de CQ.

calibração e a variabilidade do sistema analítico permanecem dentro dos limites esperados para um desempenho metodológico estável. Técnicas específicas de calibração são diferentes para cada método e não serão abordadas nesta seção. Contudo, alguns princípios gerais para a implantação de procedimentos de calibração, bem como para verificação da uniformidade da calibração entre múltiplos métodos, podem contribuir para a estabilidade e a confiabilidade dos resultados laboratoriais.

A calibração dos métodos é mais frequentemente realizada pelo laboratório, utilizando materiais de calibração fornecidos pelo fabricante do método ou do instrumento. Em alguns casos (p. ex., dispositivos de teste rápido), os métodos são calibrados durante o processo de fabricação, e o laboratório apenas verifica essa calibração. Seja qual for a situação, a rastreabilidade da acurácia de resultados à ordem mais elevada de sistema de referência é fornecida pelo fabricante do método. O material de calibração do fabricante do método e os valores-alvo atribuídos são destinados a produzir resultados acurados para as amostras de pacientes puras que são ensaiadas utilizando-se o método do fabricante. Um calibrador de um produto do fabricante não é comutável com outros métodos, sendo que os laboratórios não devem utilizar materiais de calibração destinados a um determinado método para nenhum outro método diferente. O uso de um calibrador para um método ao qual ele não foi especificamente projetado pode levar a erros de calibração e gerar resultados de paciente incorretos.

Em alguns casos, materiais de referência nacional e internacional podem ser utilizados para calibração de métodos de rotina. Porém, na maioria das vezes, tais materiais de referência se destinam ao uso em procedimentos quantitativos de referência de ordem elevada e podem não ser adequados ao uso direto para métodos de rotina. Os laboratórios não devem utilizar esse tipo de material diretamente para calibrar um método (ou verificar a calibração de um método de rotina), a menos que tenha sido verificada a comutabilidade especificamente desse método com amostras de pacientes puras. Se o material de referência não for comutável, o método de rotina poderá ser incorretamente calibrado e gerar resultados falsos de pacientes (Koch, 1988; Naito, 1993; Thienpont, 2003; Miller, 2003).

A boa estabilidade de longa duração para os resultados de pacientes é alcançada se a recalibração for realizada somente quando houver alteração da relação entre a resposta do sistema quantitativo e a concentração da amostra. Quando a resposta do sistema analítico não apresenta mudanças, executar uma recalibração introduz imprecisão ao desempenho geral do método a longo prazo. Essa imprecisão ocorre porque a nova calibração produzirá uma relação discretamente diferente entre a resposta do sistema analítico e a concentração da amostra. A dimensão da alteração será governada pelo ônus do erro inerente ao sistema de teste. A seção 493.1255 de regulamentações do CLIA-EUA estabelece que a calibração ou a verificação da calibração seja realizada no mínimo a cada 6 meses, podendo ser realizada com maior frequência mediante recomendação do fabricante do método (Department of Health and Human Services, 2003). A recalibração deve ser realizada de acordo com a necessidade imposta pela flutuação da estabilidade do método, a qual pode ser detectada por meio dos resultados de CQ ou de outros parâmetros de monitoramento, mudanças de lotes de reagente ou após um procedimento significativo de manutenção do instrumento. Quando não for observada nenhuma alteração dos parâmetros de desempenho metodológico, recomenda-se verificar a validade da calibração em uso, em vez de executar uma recalibração.

A Figura 10.13*A* mostra a calibração de um método que estabelece uma relação entre o sinal de quantificação e o valor quantitativo do analito nos materiais de calibração. Essa relação é utilizada para converter o sinal de quantificação da amostra de um paciente em um valor que possa ser expresso para o analito. A Figura 10.13*B* mostra que a verificação da calibração de um método pode ser realizada com o intuito de confirmar se a calibração não sofreu alteração. Um procedimento comum para verificação da calibração consiste em testar os materiais de calibração do método, considerando-os "desconhecidos". A recuperação dos valores-alvo indica que a calibração do sistema quantitativo não mudou, e que não se justifica realizar uma recalibração, uma vez que a mesma relação existente entre o sinal e o valor quantitativo do analito nos calibradores acabaria sendo restabelecida. Cabe ao laboratório estabelecer critérios de concordância com o valor-alvo do calibrador. Devem ser considerados critérios conservativos de concordância, tais como ± 1 DP ou ± 1,5 DP do valor-alvo, para evitar uma interpretação equivocada do *status* da calibração.

Outra abordagem para verificar a calibração é testar os materiais fornecidos por alguns fabricantes de métodos de rotina, que são especificamente destinados a tal propósito. É importante reconhecer que os materiais desses fabricantes de métodos geralmente apresentam características de matriz e valores-alvo que restringem seu uso apenas aos métodos especificamente referidos nas instruções que acompanham o *kit*, portanto, não podendo ser utilizados com nenhum outro método do fabricante. Os materiais de verificação de calibração podem ter valores-alvo que lhes foram atribuídos, os quais são específicos para os lotes de reagentes mencionados, ou podem apresentar valores que foram certificados pelo fabricante como sendo adequados a todos os lotes de reagentes. Como discutido anteriormente, materiais de referência nacional ou internacional somente podem ser utilizados para verificar a calibração se forem comprovadamente comutáveis com amostras clínicas puras para os métodos de campo de rotina de interesse. O certificado de análise do material de referência deve ser revisado quanto à documentação de comutabilidade.

Materiais de CQ de terceiros não costumam ser apropriados para verificação da calibração. Tais materiais não costumam ser validados

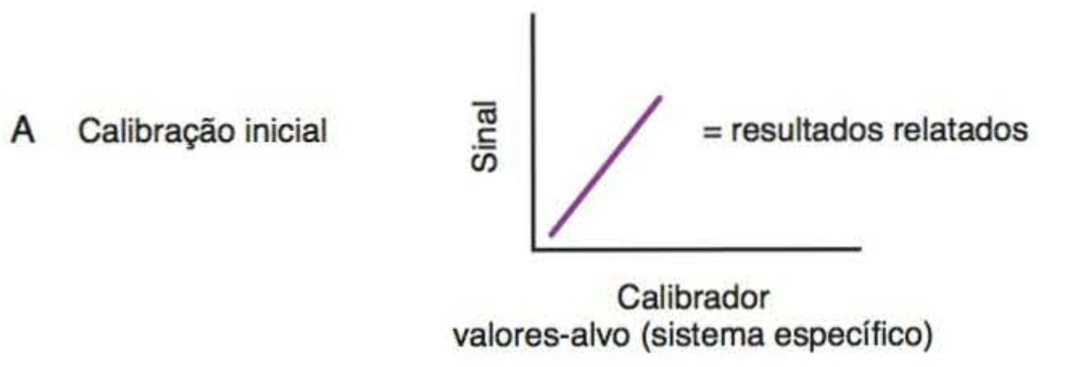


Figura 10.13 *A*, calibração, e *B*, verificação da calibração, utilizando a recuperação dos calibradores do método ou outros materiais do sistema específico certificados para verificação da calibração, respectivamente.

para comutabilidade entre diferentes métodos de rotina, portanto, não possuem valores-alvo rastreáveis para sistemas de referência.

Outra abordagem para verificar a calibração consiste em realizar a comparação de um método, empregando amostras de pacientes puras quantificadas por outro método calibrado de forma correta.

Utilização de dados do paciente em procedimentos de controle de qualidade

Os resultados obtidos a partir das amostras de pacientes são utilizados de quatro modos principais, com o intuito de dar suporte aos processos de CQ realizados no laboratório:

- para checagem delta, com um resultado de paciente anterior;
- para verificar a consistência dos resultados de pacientes, diante da mudança de lotes de reagente ou de calibrador para um método;
- para verificar a consistência dos resultados de pacientes, quando um analito é quantificado utilizando-se mais de um instrumento ou método no sistema de assistência à saúde;
- no esquema de controle do processo estatístico, que emprega a média (ou mediana) dos resultados do paciente para monitorar o desempenho metodológico.

O segundo item foi descrito nas seções anteriores, que trataram da mudança de lotes de reagentes ou calibradores. Devido à falta de comutabilidade da maioria dos materiais de CQ, é altamente recomendável analisar amostras de pacientes específicas, a fim de determinar se são obtidos os mesmos resultados observados antes da mudança de lote de reagentes.

Checagem delta com resultado prévio para o paciente

Alguns tipos de erros de laboratório podem ser identificados quando se compara o resultado de um teste de paciente atual a um resultado anterior para quantificação de um mesmo analito. Essa comparação é chamada "checagem delta". Confusões de amostras e amostras alteradas por meio de diluições com líquido i.v. são exemplos de erros que podem ser detectados por uma checagem delta. O resultado anterior deve pertencer a uma época específica no passado, de modo a não ter sofrido alterações fisiológicas com o passar do tempo. Essa limitação restringe os analitos que podem ser monitorados efetivamente pela checagem delta. A diferença entre os resultados deve ser suficientemente grande para evitar um número excessivo de alertas falsos; entretanto, à medida que o limiar de diferença se torna maior, também aumenta o número de potenciais problemas que acabam escapando à detecção. Kazmierczak (2003) revisou a checagem delta e outros procedimentos de controle de qualidade baseados em dados de paciente.

Verificação da consistência entre mais de um instrumento ou método

Outro uso comum dos resultados de paciente em um processo de CQ consiste na verificação da consistência desses resultados, quando um analito é quantificado utilizando mais de um instrumento ou método no mesmo sistema de prestação de assistência à saúde. A boa medicina laboratorial exige que vários instrumentos ou métodos empregados na análise de um único analito sejam calibrados, de modo a produzir os mesmos resultados para o paciente sempre que possível. Para tanto, pode ser necessário modificar as definições da calibração de um sistema de quantificação para concordar com os resultados de outro sistema. Esta estratégia permite a utilização de um limite de referência comum, confere continuidade aos resultados obtidos nos encontros em diferentes locais e evita confusão clínica com relação à interpretação dos resultados laboratoriais. A seção 493.1281 do CLIA-EUA estabelece que a relação entre os resultados dos testes executados com diferentes métodos, ou realizados em diversos locais, seja avaliada duas vezes por ano (Department of Health and Human Services, 2003).

Conforme ilustra a Figura 10.14, alíquotas de amostras de paciente puras são quantificadas utilizando-se dois ou mais métodos (ou instrumentos) para confirmar a concordância, ou para ajustar a calibração de diferentes métodos visando alcançar a concordância de resultados das amostras de pacientes. Um planejamento analítico

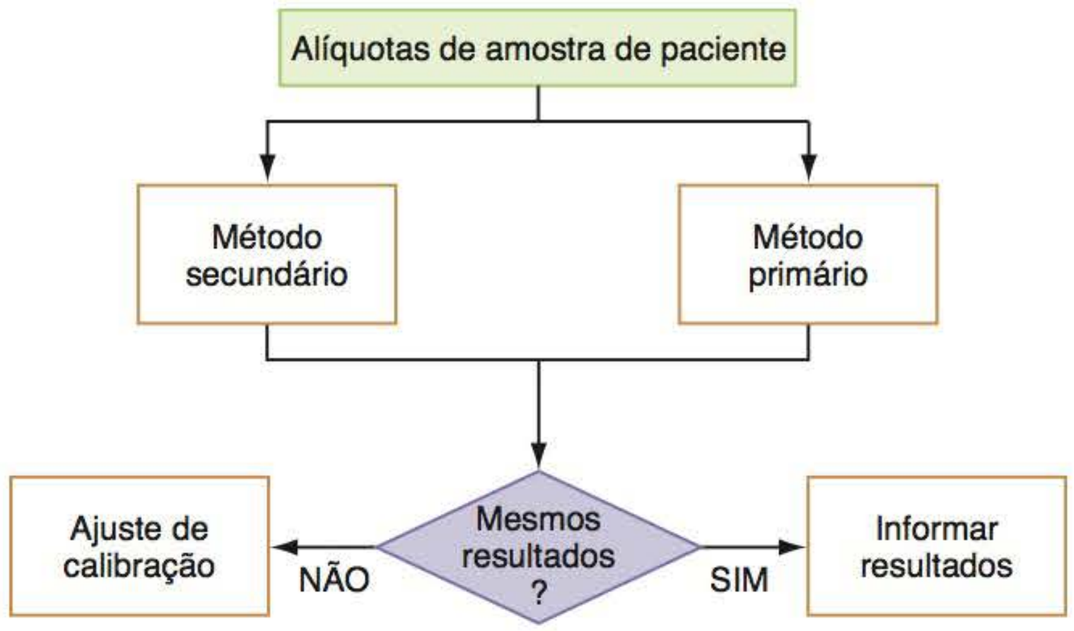


Figura 10.14 Processo de avaliação da concordância entre métodos e de ajuste de calibração (quando necessário) para obtenção de resultados equivalentes com o uso de métodos distintos.

como este costuma ser chamado de *round robin* (escalonamento). Um método/instrumento é escolhido para representar o método primário em relação ao qual os demais serão ajustados para alcançar resultados equivalentes. O método primário deve ser escolhido com base na qualidade e no grau de confiabilidade dos resultados, considerando-se: a rastreabilidade de sua calibração por padrões nacionais ou internacionais; a estabilidade de seu desempenho; a especificidade para o analito; e a suscetibilidade a substâncias interferentes. Uma abordagem alternativa para avaliar a concordância entre um número maior de métodos/instrumentos em um grupo de *round robin* consiste em utilizar a média de todos os métodos. Cada método é avaliado quanto à concordância com a média e são também realizados ajustes de calibração a quaisquer métodos/instrumentos, conforme a necessidade, para produzir resultados equivalentes entre os grupos.

Como já mencionado, para avaliar a consistência após uma mudança de lotes, não existem diretrizes bem estabelecidas determinando o número de amostras a ser utilizado para verificar a consistência dos resultados obtidos com as amostras de pacientes. O laboratório terá que determinar a frequência da avaliação e o número de amostras com base na estabilidade dos métodos, bem como a frequência das trocas de lotes de calibradores e reagentes e as exigências clínicas para o sistema de prestação de assistência à saúde. Algumas práticas comuns são dividir uma ou mais amostras de pacientes individuais, ou um pequeno grupo de várias amostras, semanalmente para métodos que trabalham com grandes volumes, mensal ou trimestralmente para métodos que lidam com volumes menores ou que sejam bastante estáveis, ou ainda o mínimo regulatório de 6 meses. Recomenda-se utilizar um número maior de amostras, caso o monitoramento seja realizado menos frequentemente. Ao estabelecer os critérios de interpretação, o laboratório deve considerar que o poder estatístico é limitado para a quantidade de resultados disponíveis e utilizar técnicas de monitoramento de tendências. Por exemplo, se uma amostra de paciente é testada semanalmente, o critério de avaliação da concordância terá que aceitar a imprecisão esperada dos métodos utilizados e apoiar-se mais na persistência de uma tendência para identificar um método que seja realizado de modo diferente dos demais métodos empregados para o grupo. A Tabela 10.4 fornece exemplos dos critérios empíricos utilizados no laboratório do autor para avaliação de concordância, com base em uma única amostra de paciente testada semanalmente com vários instrumentos. Um resultado que não atenda aos critérios não é ensaiado, a menos que a situação persista por 2 semanas ou mais, ou que a diferença observada seja grande.

Os resultados dos materiais de CQ não devem ser utilizados com o propósito de verificar a consistência dos resultados de amostras de pacientes que foram testadas com diferentes instrumentos ou métodos. Esta limitação se deve a ocorrência da falta de comutabilidade apresentada pelos materiais de CQ entre métodos distintos. Mesmo quando são utilizados mais de um instrumento/método que provêm do mesmo fabricante, os resultados de CQ devem ser empregados com cautela, pois pode haver diferenças quanto aos valores quantificados

para os materiais de CQ com o uso de diferentes lotes de reagente, ou por causa das diferenças de detalhes das quantificações entre modelos instrumentais distintos. Portanto, para a verificação da concordância entre muitos instrumentos, recomenda-se utilizar amostras de paciente.

Utilização de dados do paciente para controle do processo estatístico

Um uso adicional dos resultados de pacientes no processo de CQ estatístico consiste em empregar a média (ou mediana) dos resultados de pacientes para monitorar o desempenho metodológico. Para um número suficientemente grande de resultados, o valor médio (ou a mediana) costuma ser estável o bastante para ser utilizado como indicador da consistência de método ao longo do tempo. Essa abordagem pode ser empregada periodicamente, extraindo-se dados no decorrer de um determinado período (p. ex., 3 a 12 meses), calculando-se a média e o DP para a distribuição dos resultados, e comparando-se um período a outro para determinar se houve alguma mudança. Esse tipo de avaliação periódica é capaz de identificar alterações na estabilidade da calibração ou a imprecisão geral de um método. A média e o DP podem também ser comparados quanto à consistência entre vários métodos para um mesmo analito.

A seleção de populações de pacientes para amostragem deve considerar a homogeneidade fisiológica dos resultados. Os fatores importantes a serem considerados são parâmetros que provavelmente influenciam o limite de referência: condição de doença, paciente pediátrico *versus* adulto, gênero e diferenças étnicas. A Figura 10.15 mostra um exemplo do potencial impacto de uma amostra não homogênea de pacientes utilizada para distribuição dos resultados de albumina de internos de um hospital de clínica geral, em comparação aos dados obtidos de pacientes ambulatoriais de uma clínica de saúde universitária. Os histogramas diferem bastante, uma vez que ambos os grupos são diferentes quanto ao grau de severidade da doença e também quanto ao posicionamento para coleta de sangue (decúbito *versus* supino), o qual influencia o volume de água vascular e a concentração de albumina.

Têm sido descritas abordagens automatizadas para determinar a média (ou mediana) de grupos de resultados de paciente sequenciais para uso como parâmetro de controle de processo contínuo. Tais métodos são chamados de técnica da "média de normais" (MDN) ou técnica da "média móvel", sendo apropriados para o uso com ensaios de grandes volumes, tanto na bioquímica como na hematologia (Westgard, 1996; Smith, 1996; Cembrowski, 1984; Ye, 2000; Kazmierczak, 2003). Em geral, tais abordagens avaliam resultados de paciente sequenciais ao longo de intervalos de tempo, que podem ser desde várias horas até um ou mais dias. Tipicamente, os pacientes são agrupados segundo a idade, o gênero e a raça com o propósito de obter subgrupos homogêneos, além disso, os resultados podem sofrer cortes para remoção de valores extremos, de modo que os resultados remanescentes reflitam mais verdadeiramente os pacientes sem a influência de condições patológicas sobre um analito em particular. A média (ou o parâmetro estatístico adotado) de um grupo de resultados é rastreada para monitorar o desempenho do método. Procedimentos estatísticos, como a soma cumulativa ou a média móvel ponderada exponencialmente, são utilizados para monitorar as tendências no *status* da calibração do método (Ryan, 1989). Essas abordagens podem ser muito úteis para suplementar as tradicionais técnicas de amostragem de CQ empregadas no monitoramento da estabilidade metodológica e monitorar a uniformidade da calibração entre múltiplos métodos em um sistema laboratorial. Os algoritmos de controle de processo que se baseiam no resultado do paciente são úteis para condições de grande volume, porém não têm sido amplamente adotados, devido à falta de consenso para sua utilização, bem como à falta de suporte informatizado por parte dos fabricantes de instrumentos e dos representantes de sistemas de informação laboratorial.

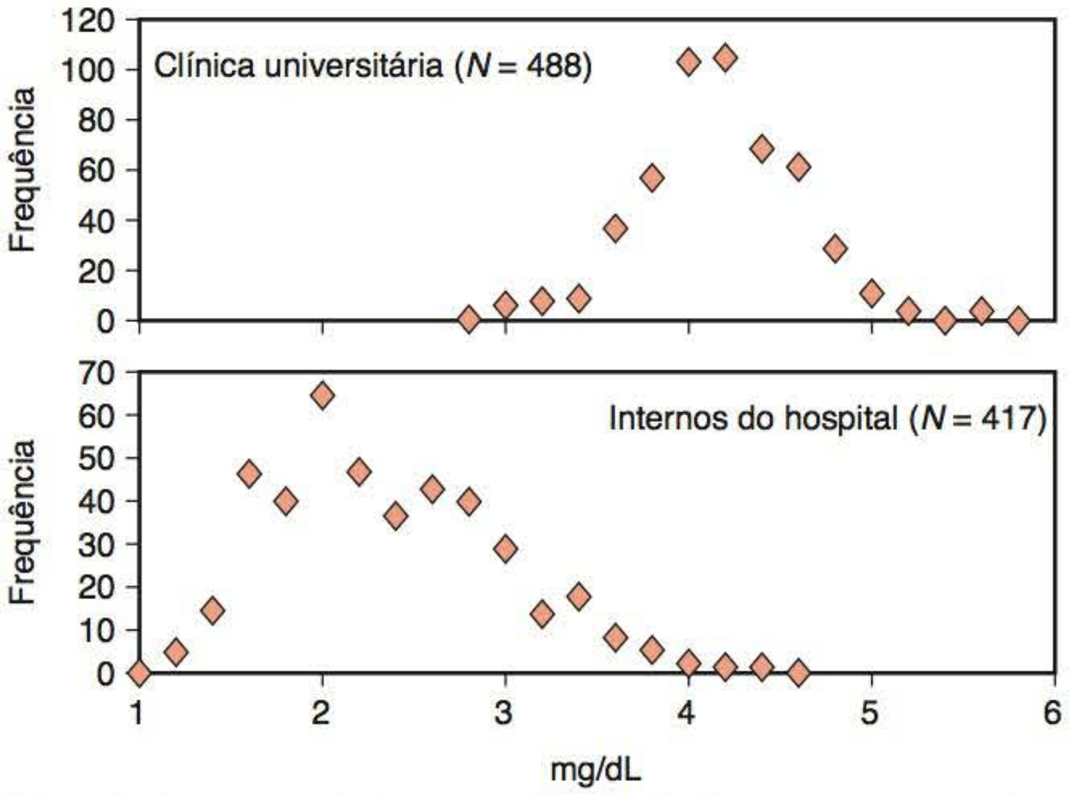


Figura 10.15 Histograma da distribuição de resultados de paciente sequenciais de albumina, provenientes de uma clínica ambulatorial universitária e da unidade de internação de um hospital geral.

Teste de proficiência

O processo de avaliação externa do desempenho de um método é referido como teste de proficiência (TP) ou avaliação de qualidade externa (AQE). O TP permite ao laboratório verificar se seus resultados estão consistentes com os de outros laboratórios que utilizam os mesmos métodos (ou métodos similares) para analisar um determinado analito e, assim, confirmar se está empregando o método corretamente. Os prestadores de TP fazem circular um conjunto de amostras entre um grupo de laboratórios. Cada laboratório deve incluir as amostras do TP às amostras de pacientes no processo de testes usual. Os resultados obtidos para as mostras do TP são transmitidos ao prestador de TP para avaliação.

A Tabela 10.6 exemplifica um típico relatório de avaliação enviado a um laboratório participante. Cada resultado informado é comparado com a média dos resultados de todos os laboratórios, empregando-se o mesmo método (denominado grupo de pares). O relatório também inclui o DP para a distribuição dos resultados por grupo de pares, o número de laboratórios no grupo de pares e o IDP, que expressa o resultado informado como sendo o número de DP da média. Os limites de aceitabilidade são estabelecidos por meio de regulamentação em diversos países, ou também podem ser estabelecidos pelo prestador do TP para os testes que não apresentam critérios regulamentares. Os critérios de avaliação podem ser um número de DP da média, um percentual fixo da média ou uma concentração fixa a partir do valor médio. Na Tabela 10.6, os critérios de aceitabilidade do cálcio são ± 1 mg/dL em torno da média, enquanto os critérios estabelecidos para o ferro são ± 20% da média.

Tabela 10.6 Relatório de avaliação de participante de um teste de proficiência

Data da expedição: 13/10/2003
Data da avaliação: 21/11/2003

							Limite de aceitabilidade	
Método de unidades do teste	**Amostra**	**Resultado informado**	**Média**	**DP**	***N* de labs**	**IDP**	**Inferior**	**Superior**
Cálcio	1	9,6	9,92	0,23	587	-1,4	8,9	11,0
mg/dL	2	8,8	8,86	0,26	592	-0,2	7,8	9,9
Arsenazo	3	7,5	7,65	0,23	587	-0,7	6,6	8,7
Coloração	4	8,2	8,43	0,23	590	-1,0	7,4	9,5
Vitros 950	5	10,8	18,87	0,25	589	-0,3	9,8	11,9
Ferro	1	190	192,5	7,0	397	-0,4	154	232
µg/dL	2	65	65,0	3,4	394	0,0	51	78
Piridil	3	74	69,2	3,2	395	+1,5	55	83
Corantes azo	4	**124**	**107,9**	**4,6**	**395**	**+3,5**	**86**	**130**
Vitros 950	5	277	260,9	8,8	396	+1,8	208	314

A avaliação por grupo de pares permite ao laboratório verificar se está utilizando um método em conformidade com as especificações do fabricante e produzindo resultados de paciente consistentes com os de outros laboratórios que estejam utilizando o mesmo método. Na Tabela 10.6, os resultados referentes ao cálcio apresentam boa concordância com a média estabelecida pelo grupo de pares (IDP varia de –0,2 a –1,4). Entretanto, os resultados referentes ao ferro apresentam maior variabilidade, inclusive com um dos resultados sendo + 3,5 IDP. Embora esse resultado da concentração de ferro atenda aos critérios de aceitabilidade, recomenda-se que o método utilizado seja investigado, visto que seu IDP indica uma elevada probabilidade de haver um problema metodológico precisando de correção (ver Interpretação dos resultados do TP a seguir).

Muitos fabricantes de materiais de CQ também fornecem um serviço de análise de dados com métodos de grupo de pares e calculam estatísticas de grupo para avaliação de desempenho. Assim como na avaliação do TP, esse tipo de análise de dados de CQ interlaboratorial permite que o laboratório verifique se está gerando resultados de paciente consistentes com aqueles fornecidos por outros laboratórios que estejam utilizando o mesmo método.

O TP é um importante componente do programa de gestão da qualidade. Em muitos países, existem regulamentações que exigem a realização do TP e especificam critérios de avaliação para um desempenho aceitável. Os critérios de avaliação do TP são projetados para avaliar o erro total de uma única quantificação. Os limites de aceitabilidade para o TP incluem os componentes de distorção e imprecisão esperados em um dado laboratório, somados a outros componentes de erro que são únicos às amostras do TP, tais como: variação na calibração entre laboratórios; imprecisão de preenchimento dos frascos do material de TP; variação da estabilidade do material de TP, seja durante o armazenamento/transporte, seja após a reconstituição ou abertura no laboratório; e interação de matriz diferente com diversos lotes de reagente junto a um grupo de pares. Como consequência, os limites de aceitabilidade para as amostras de TP tendem a ser maiores do que seria esperado para um erro total clinicamente aceitável de amostras puras de pacientes.

Não há TP para alguns analitos, ou porque o teste é novo no laboratório clínico, ou porque a estabilidade do analito dificulta sua inclusão no material do TP. Em tais situações, o laboratório deve utilizar uma abordagem alternativa para verificar periodicamente se o método está apresentando desempenho aceitável. O Clinical and Laboratory Standards Institute possui um arquivo de diretrizes que fornece várias abordagens para verificar o desempenho metodológico quando não há um TP disponível (CLSI, 2002 b).

Ausência de comutabilidade de materiais de TP e gradação de grupos por pares

A avaliação por grupo de pares é utilizada no TP, devido às limitações provocadas pela falta de comutabilidade dos materiais geralmente empregados como amostras de TP. Como discutido anteriormente, nas seções de "Seleção dos materiais de controle de qualidade" e "Verificação dos parâmetros de avaliação de CQ diante da mudança de lote de reagentes", o processo de fabricação dos materiais de CQ e TP frequentemente introduz alterações no soro ou nos constituintes de matriz de outros líquidos, de tal modo que a quantificação de uma resposta se torna diferente daquela que se observa com uma amostra de paciente pura (Miller, 2003). A interferência de matriz é única para cada combinação de método e materiais de TP (ou CQ, ou referência) processada, podendo diferir quantitativamente para diferentes combinações de método/materiais utilizadas para um mesmo analito. Vários investigadores relataram uma incidência superior a 60% de materiais não comutáveis para muitos analitos diferentes (Ross, 1998; Miller, 1993, 2003, 2005).

A Figura 10.16 ilustra o efeito de materiais não comutáveis na interpretação dos resultados de TP. Nesse exemplo, um *pool* de soros de pacientes puros e as amostras de TP foram ensaiados em um analisador duPont Dimension, utilizando método de referência de Abell-Kendall para determinação de colesterol (Naito, 1993). O método de Abell-Kendall é conhecido por não ser afetado por alterações induzidas pela matriz nas amostras do TP (Ellerbe, 1990). As amostras de paciente

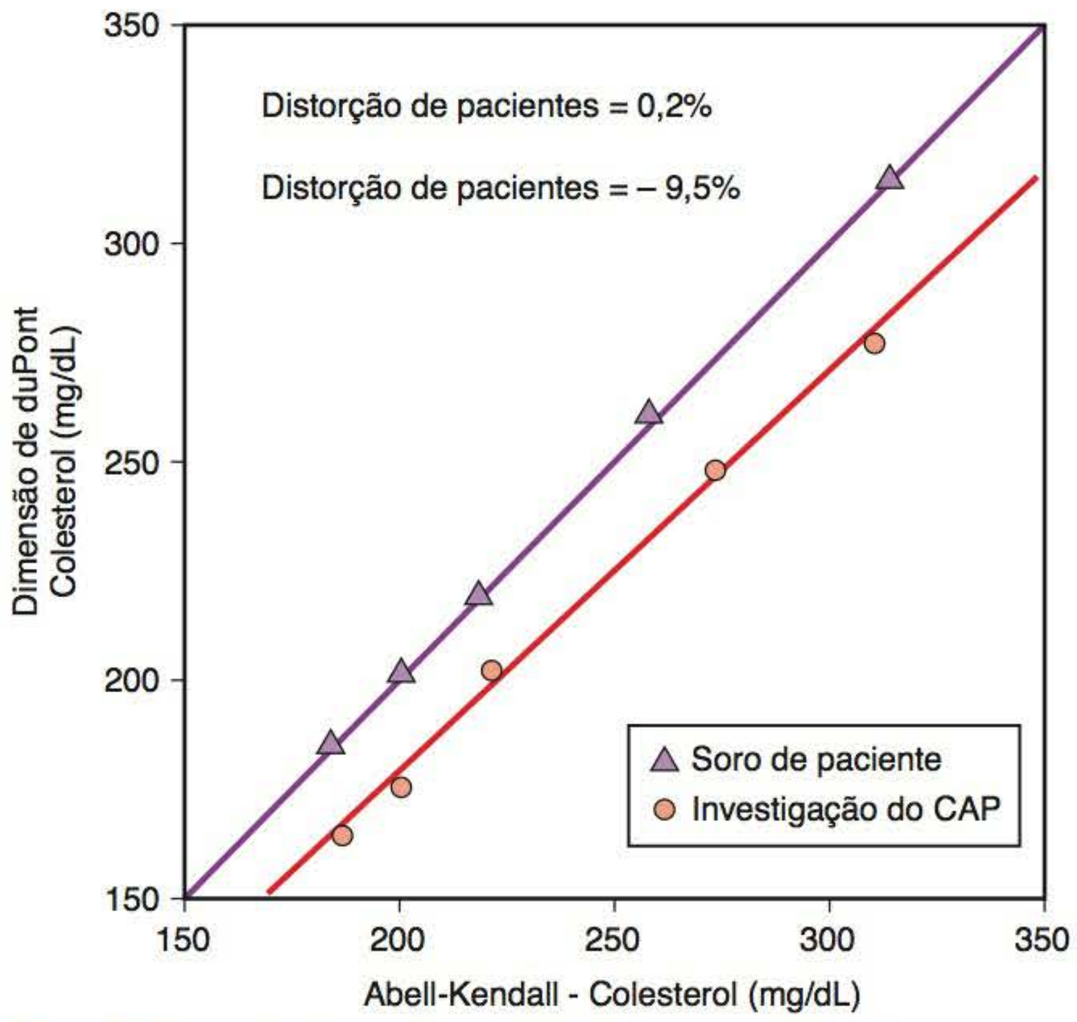


Figura 10.16 Exemplo de falta de comutabilidade entre materiais de TP e amostras de paciente puras para um método específico. (Após Naito, 1993; com permissão.)

mostraram excelente concordância entre os dois métodos (distorção média = 0,2%). Entretanto, os materiais de TP apresentaram um distorção negativa maior (-9,5%) frente a esse método. Essa distorção aparente observada nas amostras de TP foi devida à falta de comutabilidade dessas amostras entre o método de duPont e o método de referência. Se a acurácia do método de rotina *versus* método de referência fosse erroneamente avaliada, e a calibração fosse ajustada de modo incorreto com base nos resultados do TP, os resultados obtidos com as amostras de paciente puras seriam falsos. Os resultados do TP continuaram válidos para o julgamento do desempenho dos laboratórios que utilizaram o método de duPont, uma vez que a interferência de matriz foi uniforme nesse grupo de pares. Dessa forma, se um único resultado de laboratório concordar com os resultados do grupo de pares, esse laboratório pode concluir que seu método está operando conforme as expectativas. Contudo, a acurácia do método de duPont para amostras de paciente não poderia ser avaliada com base nos resultados do TP. Seria necessário realizar uma avaliação separada, dividindo as amostras de paciente puras entre o método de campo e o método de referência, a fim de avaliar a acurácia para as amostras de pacientes.

Relatório de resultados de TP quando o método é ajustado para concordar com outro

Uma boa prática laboratorial (de acordo com a seção 493.1281 de regulamentações do CLIA-EUA; Department of Health and Human Services, 2003) consiste em ajustar a calibração de diferentes métodos para um mesmo analito, utilizado em um dado sistema de prestação de assistência à saúde, de modo que os resultados das amostras de pacientes sejam sempre os mesmos, independente do método empregado. Nessa situação, é importante informar corretamente os resultados do TP, permitindo que sejam avaliados de forma adequada em relação ao valor-alvo do grupo de pares. Este valor-alvo reflete a calibração metodológica estabelecida pelo fabricante do método. Para que o resultado individual do TP de um laboratório seja avaliado em relação à média do grupo de pares, esse resultado deve ser comunicado ao prestador de TP, isento de qualquer ajuste de calibração efetuado por usuários, de modo que o resultado informado seja consistente com a calibração originalmente feita pelo fabricante. O modo mais conveniente de remover um ajuste de calibração é primeiro ensaiar as amostras do TP com o ajuste do método de calibração no sistema de quantificações, como seria o processo de teste usual das amostras de paciente. Depois do ensaio, os resultados de TP são ajustados "ao contrário" por meio da

remoção matemática dos ajustes de calibração. Para os propósitos do ensaio, o instrumento não deve ser recalibrado com um novo conjunto de calibradores, visto que essa prática violaria as regulamentações que exigem que o material de TP seja testado no mesmo modo que as amostras de paciente.

Por exemplo, um laboratório comparou os resultados da quantificação de glicose de uma amostra de paciente pura, obtidos empregando-se o método A, no laboratório principal, ou o método B, em um laboratório-satélite. O método B, que forneceu resultados consistentemente 10% mais altos, foi ajustado para concordar com o método A. Para tanto, introduziu-se um fator de 0,9 ao instrumento operante com o método B, de modo que esse fator foi automaticamente multiplicado a cada resultado obtido. Como consequência, tais resultados sofreram uma diminuição de 10% em seu valor. Ao reportar os resultados de TP gerados com o método B, será necessário remover o fator 0,9 para compará-los à média dos resultados do grupo de pares, que foram obtidos por todos os laboratórios usando o mesmo método B. Para remover esse fator, o resultado de TP informado deve ser multiplicado por 1,1. Em consequência, seu valor numérico aumenta em 10% e retorna ao valor inicialmente quantificado pelo instrumento, cuja calibração foi feita de acordo com o procedimento definido pelo fabricante. Esse processo permite que o resultado de TP quantificado através do método B seja adequadamente avaliado por meio da comparação com seu grupo de pares. Ele permite que a amostra de TP seja ensaiada do mesmo modo que as amostras de paciente, e que o resultado numérico informado ao prestador de TP reflita o resultado verdadeiramente quantificado quando são empregadas as condições de calibração recomendadas pelo fabricante.

Interpretação dos resultados de TP

Os resultados de TP de um laboratório individual podem confirmar se os resultados do método estão de acordo com os de outros laboratórios, que estejam utilizando o mesmo método ou princípio de quantificação. Esta condição verifica se o laboratório está utilizando um método corretamente e em conformidade com as especificações do fabricante.

Se um resultado de TP inaceitável for identificado, torna-se necessário investigar as possíveis causas que levaram a sua produção e tomar as devidas medidas corretivas. Mesmo quando um resultado de TP obedece aos critérios de aceitabilidade, uma boa prática laboratorial é verificar os resultados de TP maiores que aproximadamente 2,5 IDP da média do grupo de pares. Quando o IDP é igual a 2,5, há uma probabilidade de apenas 0,6% de que o resultado siga a esperada distribuição do grupo de pares; consequentemente, há grandes chances de haver um problema metodológico que precisa de correção. Além disso, resultado(s) de TP que se aproxima(m) do limite de falha em mais de um evento de TP, ainda que tenha(m) passado pelos critérios de aceitabilidade, deve(m) dar início a uma revisão à procura de problemas sistemáticos apresentados pelo método. Essas práticas permitem a identificação de potenciais problemas, antes que a situação se torne mais séria.

A Tabela 10.7 lista causas comuns de falhas do TP. O manuseio e a informação realizados de modo incorreto são potencialmente únicos aos eventos de TP, e podem não refletir o mesmo processo utilizado para os resultados de pacientes no laboratório. Todavia, tais situações refletem o grau de atenção aos detalhes que é necessário dispensar, a fim de realizar testes laboratoriais de boa qualidade. Ocasionalmente, o material de TP pode apresentar defeitos que levam ao desempenho inadequado de todos ou apenas de alguns subgrupos de métodos. Nesse caso, o prestador do TP deverá identificar a situação e não avaliar os participantes quanto à amostra em questão.

A investigação de resultados de TP inaceitáveis, bem como qualquer medida corretiva adotada, devem ser documentadas e revistas pelo supervisor adequado (usualmente, o diretor geral do laboratório). Os resultados do TP são sempre recebidos após várias semanas da execução dos testes. Consequentemente, é necessário revisar o controle de qualidade, as anotações referentes aos reagentes e os registros de calibração e manutenção relativos à data do teste e às semanas ou aos meses anteriores dele. Se a revisão desses registros indicar condições operacionais estáveis, e se a revisão do manuseio e da documentação dos materiais de TP não identificarem uma causa para o resultado de TP falso, é possível concluir que a falha do TP foi um evento devido ao acaso. As etapas investigativas, a revisão dos dados e as conclusões dessa revisão devem ser documentadas por escrito no relatório referente ao resultado de TP considerado inaceitável.

Tabela 10.7 Exemplos de causas de falhas de TP

Condição	Exemplos
Problema técnico com o método	Problema de calibração Manutenção inadequada, causando aumento da imprecisão Deterioração dos reagentes Deterioração de outros componentes Controle inadequado do ambiente no laboratório
Procedimento incorreto	Processo de diluição incorreto Cálculo de resultado incorreto Evaporação da amostra
Manuseio incorreto da amostra de TP	Reconstituição incorreta Mistura incorreta Condições de armazenamento inadequadas
Relatório inadequado do resultado de TP	Falha ao converter as unidades de medida nas unidades de medida exigidas para o relatório de TP Falha ao identificar corretamente o método utilizado Transcrição de erro para o relatório
Problema com o material de TP	Analito instável no material de TP Substância interferente no material de TP Amostra indevidamente manuseada durante o transporte para o laboratório

Depois de Hoeltge, 1987.

Os prestadores de TP devem igualmente incluir um resumo de relatório, contendo a média e o DP de todos os grupos de pares representados pelos resultados dos participantes, sendo que relatórios similares são disponibilizados por programas de CQ interlaboratoriais. Embora os resumos de relatório sejam bastante úteis, devem ser interpretados sabendo-se das limitações apresentadas pelas amostras não comutáveis. A média e o DP dos grupos de pares são úteis para avaliar a uniformidade dos resultados entre os laboratórios que pertencem a um mesmo grupo de pares, a fim de confirmar se um laboratório individual está utilizando corretamente um dado método, conforme as especificações do fabricante e também para avaliar a consistência do desempenho metodológico de um laboratório em relação ao grupo de pares no decorrer de longos períodos de tempo, desde um evento de TP até o próximo (monitoramento de tendência). A informação dos resumos igualmente permite avaliar a imprecisão de vários grupos de métodos, sendo que o número de usuários de cada um desses grupos identifica quais são os métodos em uso comum.

A falta de comutabilidade frequentemente observada nos materiais de TP torna incorreto o uso dos resumos de relatório de TP na comparação de um resultado de um determinado laboratório individual à média do grupo de pares de um grupo de métodos diferente, na comparação dos valores médios de um grupo de pares do método entre si, ou ainda para comparar um valor individual de um grupo de pares do método a um valor atribuído por um procedimento quantitativo de referência. A limitação imposta pela falta de comutabilidade também impede a avaliação da acurácia (fidelidade) de um grupo de pares do método para amostras de paciente, e invalida o uso dos resultados do TP (ou do CQ) para inferir concordância aos resultados de paciente entre diferentes métodos com relação a um mesmo analito.

Programas de TP baseados na acurácia

Em casos especiais, os prestadores de TP utilizam amostras comutáveis nos programas de TP. Essas amostras tipicamente têm sido preparadas com *pools* de amostras clínicas puras com mínimo processamento e conteúdo de aditivos, a fim de evitar alterações de matriz nas amostras. Para obter amostras contendo níveis anormais de analitos, podem

ser identificados doadores com condições patológicas conhecidas, ou as unidades de sangue e soro obtidas a partir de uma população generalizada podem ser submetidas a uma pré-triagem em busca de determinados analitos. Quando é possível preparar amostras de TP comutáveis, então os resultados de todos os laboratórios passam a refletir os resultados que se esperaria encontrar se as amostras de pacientes puras fossem enviadas a cada um dos diferentes laboratórios. Desse modo, a concordância entre os laboratórios (chamada de harmonização) e entre métodos diferentes pode ser corretamente avaliada. A concordância entre o resultado individual de um laboratório e o resultado de uma quantificação de referência (acurácia), bem como a concordância entre a média de um grupo do método e o resultado da quantificação de referência (denominada fidelidade) podem ser avaliadas quando há um procedimento quantitativo de referência disponível para o analito.

Por exemplo, a investigação da glicoemoglobina realizada pelo College of American Pathologists, adota, há muitos anos, um *pool* de sangue total recém-coletado tanto de doadores normais como de doadores diabéticos. Os valores-alvo para o sangue total são atribuídos por procedimentos quantitativos de referência para hemoglobina A_{1C}. Nessa investigação, é possível avaliar a acurácia dos resultados laboratoriais individuais e a fidelidade das médias do grupo do método, porque os materiais de TP são comutáveis com as amostras de paciente puras. A fidelidade do grupo do método pode ser utilizada pelos respectivos fabricantes do método para monitorar a efetividade de seus processos de calibração.

Os programas de TP ocasionalmente incluem uma amostra comutável para avaliar laboratórios individuais e grupos de método quanto à concordância com os procedimentos quantitativos de referência e para harmonização dos resultados entre laboratórios e grupos de método (Miller, 2003, 2005; Palmer-Toy, 2005; Steele, 2005). Tem sido desafiador preparar materiais comutáveis para uso em amplos programas de TP. O Clinical and Laboratory Standards Institute possui protocolos de consenso para validar a comutabilidade (CLSI, 2001, 2005) e também foram publicadas outras abordagens para validação (Baadenhuijsen, 2002; Franzini, 1993; Rej, 1993; Bretaudiere, 1981).

Referências bibliográficas

Baadenhuijsen H, Steigstra H, Cobbaert C, et al: Commutability assessment of potential reference materials using a multicenter split-patient-sample between-field-methods (twin-study) design: study within the framework of the Dutch project 'Calibration 2000,' Clin Chem 2002; 48:1520–1525.

Bretaudiere J-P, Dumont G, Rej R, Bailly M: Suitability of control materials. General principles and methods of investigation. Clin Chem 1981; 27:798–805.

Cembrowski GS, Chandler EP, Westgard JO: Assessment of 'average of normals' quality control procedures and guidelines for implementation. Am J Clin Pathol 1984; 81:492–499.

CLSI: Preparation and Validation of Commutable Frozen Human Serum Pools as Secondary Reference Materials for Cholesterol Measurement Procedures; Approved Guideline C37-A. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999.

CLSI: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline EP9-A2. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002a.

CLSI: Assessment of Laboratory Tests When Proficiency Testing is Not Available; Approved Guideline GP29-A. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002b.

CLSI: Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline, 2nd ed. EP14-A2. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline C24-A3. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

Documento de consenso que descreve os princípios e diretrizes de implementação para um sistema de controle de qualidade estatística.

Cornbleet PJ, Gochman N: Incorrect least-squares regression coefficients in method comparison analysis. Clin Chem 1979; 25:432–438.

Department of Health and Human Services, 42 CFR Part 493, Medicare, Medicaid, and CLIA Programs; Laboratory Requirements Relating to Quality Systems and Certain Personnel Qualifications; Final Rule. USA Federal Register 68(16):3639–3714, 24 January 2003.

Clinical Laboratory Improvement Amendments de 1988; regra final que contém as exigências regulamentares para práticas de qualidade adotadas nos laboratórios dos EUA.

Ellerbe P, Myers GL, Cooper GR, et al: Comparison of results for cholesterol in human serum obtained by the reference method and by the definitive method of the National Reference System for Cholesterol. Clin Chem 1990; 36:370–375.

Franzini C: Commutability of reference materials in clinical chemistry. J Int Fed Clin Chem 1993; 5:169–173.

Hoeltge GA, Duckworth JK: Review of proficiency testing performance of laboratories accredited by the College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:1011–1014.

Kazmierczak SC: Laboratory quality control: using patient data to assess analytical performance. Clin Chem Lab Med 2003; 41:617–627.

Revisão dos pontos fortes e das limitações do CQ baseado em amostra, bem como da utilidade de diversas práticas de CQ baseadas em dados de pacientes.

Koch DD, Hassemer DJ, Wiebe DA, Laessig RH: Testing cholesterol accuracy: performance of several common laboratory instruments. JAMA 1988; 260:2552–2557.

Levey S, Jennings ER: The use of control charts in the clinical laboratory. Am J Clin Pathol 1950; 20:1059–1066.

Linnet K: Choosing quality-control systems to detect maximum clinically allowable errors. Clin Chem 1989; 35:284–288.

Linnet K: Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. Clin Chem 1993; 39:424–432.

Miller WG, Kaufman H, McLendon WW: College of American Pathologists Conference XXIII: matrix effects and accuracy assessment in clinical chemistry. Arch Pathol Lab Med 1993; 117(4):343–436.

Miller WG: Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. Clin Chim Acta 2003; 327:25–37.

Revisão sobre aspectos de comutabilidade para materiais de CQ e TP, impacto da não comutabilidade sobre o uso e interpretação de resultados, e exemplos de resultados obtidos utilizando materiais comutáveis para CQ e TP.

Miller WG, Myers GL, Ashwood ER, et al: Creatinine measurement: state of the art in accuracy and interlaboratory harmonization. Arch Pathol Lab Med 2005; 129:297–304.

Relato acerca do valor acrescentado pelo uso de material de TP comutável, e do impacto do uso de materiais não comutáveis sobre a interpretação dos resultados do TP.

Naito HK, Kwak YS, Hartfiel JL, et al: Matrix effects on proficiency testing materials: impact on accuracy of cholesterol measurement in laboratories in the nation's largest hospital system. Arch Pathol Lab Med 1993; 117:345–351.

Palmer-Toy DE, Wang E, Winter WE, et al: Comparison of pooled fresh frozen serum to proficiency testing material in College of American Pathologists surveys: cortisol and immunoglobulin E. Arch Pathol Lab Med 2005; 129(3):305–309.

Parvin CA: Quality-control (QC) performance measures and the QC planning process. Clin Chem 1997a; 43:602–607.

Parvin CA, Gronowski AM: Effect of analytical run length on quality-control (QC) performance and the QC planning process. Clin Chem 1997b; 43:2149–2154.

Rej R: Accurate enzyme activity measurements. Two decades of development in the commutability of enzyme quality control materials. Arch Pathol Lab Med 1993; 117:352–364.

Ross JW, Miller WG, Myers GL, Praestgaard J: The accuracy of laboratory measurements in clinical chemistry. A study of 11 routine chemistry analytes in the College of American Pathologists Chemistry Survey with fresh frozen serum, definitive methods, and reference methods. Arch Pathol Lab Med 1998; 122:587–608.

Ryan TP: Statistical Methods for Quality Control. New York, Wiley, 1989.

Shewhart WA: Economic control of quality of manufactured product. New York, Van Nostrand, 1931.

Smith FA, Kroft SH: Exponentially adjusted moving mean procedure for quality control. An optimized patient sample control procedure. Am J Clin Pathol 1996; 105:44–51.

Steele BW, Wang E, Klee GG, et al: Analytical bias of thyroid function tests: Analysis of a College of American Pathologists fresh frozen serum pool by 3900 clinical laboratories. Arch Pathol Lab Med 2005; 129(3):310–317.

Thienpont LM, Stockl D, Friedecky B, et al: Trueness verification in European external quality assessment schemes: time to care about the quality of the samples. Scand J Clin Lab Invest 2003; 63:195–201.

Westgard JO, Groth T: Power functions for statistical control rules. Clin Chem 1979; 25:863–869.

Westgard JO: Charts of operational process specifications ('OP-Specs charts') for assessing the precision, accuracy, and quality control needed to satisfy proficiency testing criteria. Clin Chem 1992; 38:1226–1233.

Westgard JO, Barry PL, Hunt MR: A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem 1981; 27:493–501.

Artigo inicial que descreve a abordagem das "Regras de Westgard" comumente empregada na interpretação de resultados de CQ.

Westgard JO, Smith FA, Mountain PJ, Boss S: Design and assessment of average of normals (AON) patient data algorithms to maximize run lengths for automatic process control. Clin Chem 1996; 42:1683–1688.

Ye JJ, Ingels SC, Parvin CA: Performance evaluation and planning for patient-based quality control procedures. Am J Clin Pathol 2000; 113(2):240–248.

CAPÍTULO 11

Informática laboratorial clínica

Mark S. Lifshitz MD, Gary E. Blank PhD, Katherine Schexneider MD

Fluxo de informação 130
- Registro/identificação do paciente (ID) 131
- Solicitação de exames 133
- Coleta e identificação de amostra 134
- Realização de exames e liberação de resultados 134
- Relatório 135

O sistema de informação laboratorial (SIL) 136
- O que é isso? 136
- Seleção, implementação e gerenciamento do SIL 137

Padrões de comunicação e suas aplicações 138
- *Health Level Seven* (HL7) 139
- LOINC 140
- Outros padrões 140

Referências bibliográficas 141

PONTOS-CHAVE

- O sistema de informação laboratorial (SIL) é tipicamente parte de uma rede de sistema hospitalar ou de cuidados da saúde de gerenciamento clínico, de registro e de pacientes e sistemas financeiros que trocam informações entre si.
- Um registro eletrônico abrangente de um paciente deve englobar várias questões, incluindo como estabelecer identificação positiva do paciente, manter a confidencialidade e sincronizar dados entre sistemas disparates.
- O sistema de informação laboratorial suporta fluxo de trabalho e fluxo de informação em todas as etapas do processo de realização de testes laboratoriais, incluindo registro do paciente, solicitação de exames, coleta de amostras, testes e relatórios.
- A informática tem um papel fundamental no auxílio aos médicos para gerenciar solicitações de exames (p. ex., diretivas clínicas e sistemas de suporte a decisões) e resultados (p. ex., alertas clínicos, relatórios interpretativos e testes reflexos). Juntas, essas abordagens maximizam a utilidade do laboratório para os médicos.
- Protocolos de comunicação têm sido desenvolvidos para padronizar trocas de dados entre várias aplicações. O *Health Level Seven* (HL7) é o padrão de comunicação mais prevalente nos cuidados à saúde. O *Logical Observation Identifier Names and Codes* (LOINC) é um padrão de nomenclatura que fornece um conjunto de nomes universais e códigos para a identificação de resultados de exames laboratoriais. Ele pode ser utilizado para identificar um exame numa mensagem HL7.

A informática laboratorial clínica foi definida como "o aspecto da prática da patologia com foco no gerenciamento (geração, coleta, organização, comunicação e apresentação) de informações e sistemas no suporte da tomada de decisão relativa aos cuidados do paciente, à educação e à pesquisa (Balis, 1993). Ela constitui uma porção em contínuo crescimento da prática da patologia clínica. A informática permeia cada aspecto da operação laboratorial clínica e todas as etapas dos estágios pré-analítico, analítico e pós-analítico.

O laboratório clínico sempre foi uma das áreas que mais manipulam dados de um hospital e, por essa razão, foi um dos primeiros departamentos a informatizar a manipulação e a geração de exames. Durante anos, os laboratórios utilizaram sistemas de informação para se comunicar com analisadores laboratoriais e sistemas externos ao laboratório (p. ex., sistema de informação hospitalar [SIH] ou sistemas de faturamento). Em algumas situações, o sistema de informática laboratorial era o único sistema clínico utilizado para os médicos solicitarem exames e consultarem resultados. Nos últimos anos, ocorreram alterações radicais. O sistema de informática laboratorial não é mais um sistema autônomo ou um sistema que se comunica com um ou dois sistemas externos. Atualmente, o sistema de informática laboratorial faz parte de uma rede hospitalar ou de empresa (sistema de cuidados da saúde) de sistemas clínicos, de registro, de gerenciamento de pacientes e de faturamento. O laboratório troca informações com esses sistemas e deve se apoiar neles para enviar informações acuradas sobre os pacientes (p. ex., solicitações de exames). Como retorno, o sistema de informação laboratorial (SIL) fornece resultados laboratoriais aos médicos. A capacidade de satisfazer às necessidades clínicas depende de quão bem o sistema de informática laboratorial está integrado com outros sistemas de informações (p. ex., quão rápido o laboratório pode produzir um resultado). Por sua vez, isso depende de dois elementos: *hardware*, isto é, o suporte principal de comunicação e a velocidade de transmissão de dados; e *software*, isto é, o sistema de informática laboratorial e aplicações externas, em especial como os arquivos de bases de dados são construídos e quão acuradamente eles trocam informações. A Tabela 11.1 resume as funções fundamentais de muitos dos sistemas externos que trocam dados com o sistema de informática laboratorial, e a Figura 11.1 apresenta uma visão geral dos serviços e dos locais que interagem com o sistema de informática laboratorial.

A informática clínica inclui todos os aspectos da tecnologia de informação, incluindo *hardware*, *software* e comunicação. Uma revisão detalhada de cada faceta da informática foge do objetivo desta discussão. O objetivo deste capítulo é analisar como a informática é aplicada no laboratório clínico, com uma ênfase especial no fluxo de informações, nos desenvolvimentos e nas tendências fundamentais.

Fluxo de informação

No mundo ideal, todas as informações de um paciente deveriam ser mantidas num formato eletrônico e circular sem interrupção de um sistema a outro. Embora a informática esteja se dirigindo para um prontuário médico eletrônico abrangente (nacional), muitas questões devem ser resolvidas para que esse objetivo seja atingido. Em primeiro lugar, uma convenção para identificação de um paciente, a qual garanta que todas as informações sejam corretamente associadas a ele. Isso é uma questão fundamental de segurança do paciente. Outras questões referem-se à confidencialidade do paciente (com a permissão do paciente para acessar registros médicos) e à sincronização de informações entre diferentes sistemas dentro de uma empresa de saúde (Aller, 2001).

A seguir, apresentamos uma visão geral do fluxo de informação: as várias etapas do processamento e da troca de informações e as questões fundamentais pertinentes a cada uma delas. Observe que o fluxo de informação e o fluxo de trabalho estão intimamente relacionados – um tem impacto sobre o outro. A principal função do sistema de informática laboratorial é suportar essas duas atividades interconectadas. A Tabela 11.2 fornece um exemplo de como o sistema de

Tabela 11.1 Sistemas de informação e aplicações que se comunicam com o laboratório

Sistema	Função
Sistema de informação hospitalar	Sistema clínico que contém informações de pacientes (laboratório, radiologia, medicamentos etc.) de uma ou mais admissões. Frequentemente utilizado em conjunção com documentos em papel (anamnese e gráficos), embora ele possa ser integrado com o prontuário médico eletrônico
Prontuário médico eletrônico	Popular em serviços ambulatoriais. O prontuário eletrônico é utilizado para registrar histórico, achados físicos e outros, agendamento de consultas ou de acompanhamento e revisão clínica de dados (p. ex., resultados laboratoriais)
Repositório de dados da empresa	Ferramenta clínica que contém informações longitudinais dos pacientes coletadas de todos os sistemas para pacientes hospitalares e ambulatoriais. Utilizado para a visualização de dados de pacientes, e não para gerenciar pacientes ou solicitar exames
Depósito de dados da empresa	Trata-se de uma ferramenta de pesquisa, e não de uma ferramenta clínica. Fornece uma visão de muitos pacientes diferentes (em geral, de forma anônima), permitindo o reconhecimento de padrões globais e, potencialmente, o desenvolvimento de novos conhecimentos sobre a doença
Registro de pacientes da empresa	Sistema de registro central empresarial (ou hospitalar) que designa um identificador *master* para o paciente e coleta informações demográficas dos pacientes que são enviadas automaticamente para vários sistemas a jusante (p. ex., SIH ou SIL). Essa abordagem garante que todos os dados de registro dos pacientes sejam padronizados entre aplicações (p. ex., o nome do paciente é escrito da mesma maneira e permite o acesso a informações longitudinais deste)
Necessidade médica ambulatorial	Programa que checa a necessidade médica de solicitações de exames (ver Cap. 12). Ele pode ser um sistema autônomo com interface com um SIL ou com o sistema financeiro/de faturamento; ou ele pode ser uma característica criada na aplicação de entrada de solicitação do SIL ou do sistema financeiro/de faturamento
Financeiro/faturamento	O SIL pode transmitir valores de exames ou resultados de exames realizados (que são traduzidos em valores pelo sistema de faturamento) em lote ou em tempo real
Laboratório de referência	Solicitações e resultados laboratoriais podem ser interfaceados com laboratórios não empresariais
Agências governamentais	O sistema de resultado eletrônico de laboratório clínico utiliza o HL7/LOINC para transmitir automaticamente informações sobre doenças de notificação compulsória do SIL para os serviços estaduais ou federais de saúde. Esse é um componente importante do programa de vigilância nacional do bioterrorismo (ver Cap. 13)
Outros *links* de comunicação	Servidores que realizam testes rápidos, clientes comerciais (médicos e clínicas) e outros serviços laboratoriais da rede do sistema de saúde

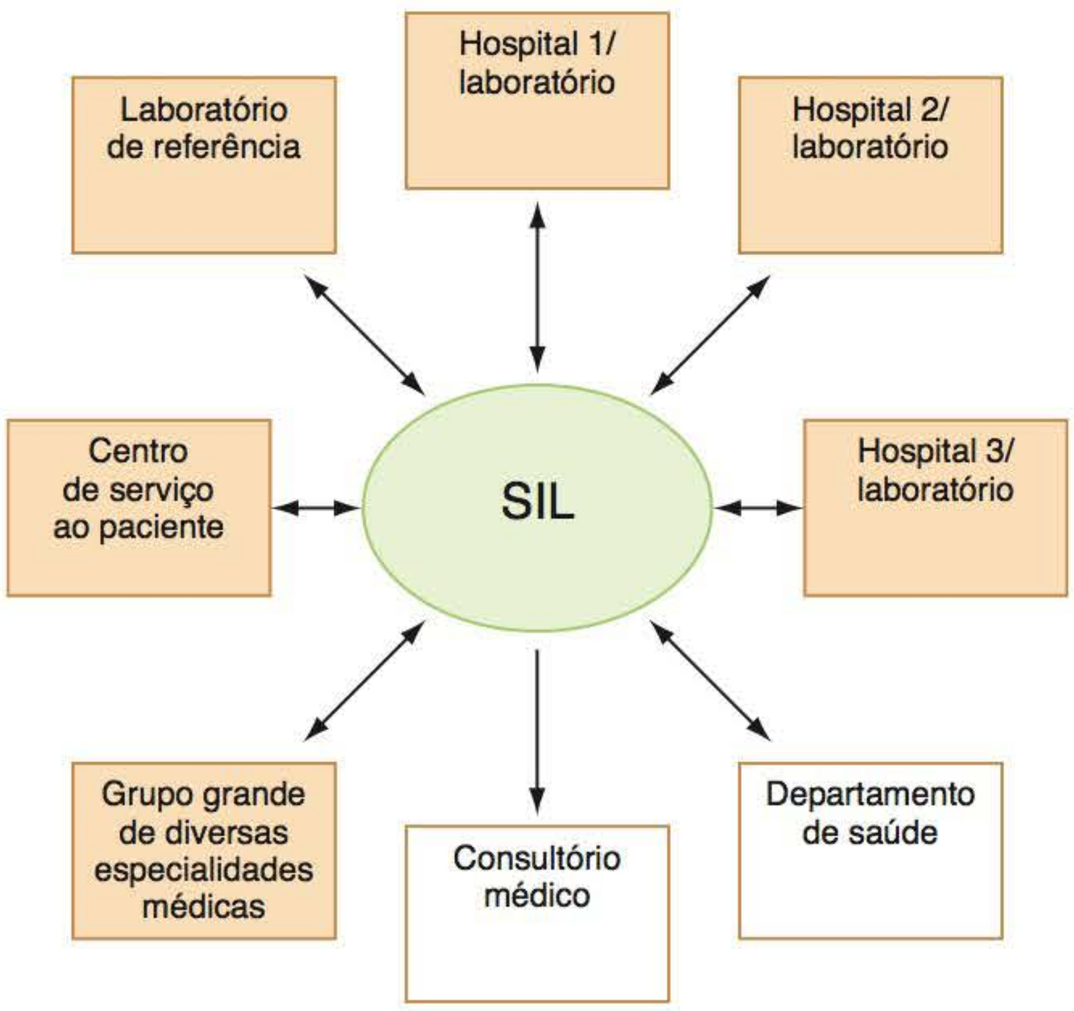


Figura 11.1 Visão geral: exemplo de serviços e locais que interagem com o sistema de informação laboratorial (SIL) bidirecionalmente (para a troca de solicitações e resultados – sombreado em roxo) ou unidirecionalmente (apenas para a recepção de resultados – sombreado em amarelo).

informática laboratorial é utilizado para prover serviços laboratoriais hospitalares. Lembre-se de que o fluxo de informação (Figs. 11.2 e 11.3) varia de um serviço a outro e que as abordagens e questões discutidas neste capítulo podem não ser aplicáveis a todos os cenários.

Registro/identificação do paciente (ID)

Um número permanente e único de identificação do paciente é o elemento organizacional básico em um sistema de informação clínica centrado no paciente. O processo de registro designa um identificador único, cria um registro do paciente e define dados demográficos que são utilizados em cada comparecimento do paciente. Ele também inclui informações como médico, localização do paciente, diagnóstico e data do serviço, as quais podem variar a cada uso do laboratório (p. ex., cada vez que o sangue é coletado em um serviço ambulatorial ou hospitalar). O sistema de informática laboratorial designa uma diferente solicitação para cada uso laboratorial.

Identificação do paciente. Os itens de identificação do paciente incluem *nome do paciente*, *número do seguro social*, *idade*, *data de nascimento*, *sexo*, etnia, endereço, número de telefone, *número de registro médico*, *índice master de pacientes* (ver abaixo) e informações de identificação de seguro e faturamento. Em geral, os itens em itálico são considerados identificadores fundamentais do paciente, que podem ser utilizados para identificar positivamente um paciente e diferenciá-lo de outro. Isso é especialmente importante ao se decidir se dois registros de paciente pertencem ao mesmo paciente (e devem ser unificados) ou a pacientes diferentes. A ligação do registro é de fundamental importância num banco de sangue (onde é necessário buscar exames anteriores e registros de transfusão), patologia cirúrgica, hematopatologia e citologia. Nesses serviços, é particularmente importante coletar a data de nascimento e o sexo (e, sempre que possível, o número do seguro social), além do nome do paciente. A ligação acurada é frequentemente impossível de ser obtida apenas com o nome do paciente.

Um número de identificação do paciente pode incluir o número do seguro social ou um único número indexado, gerado e exclusivo do sistema de registro. Deve ser feito o máximo de esforço a fim de manter uma referência comum para os registros de um paciente e reutilizar o número de identificação para as visitas periódicas. Os sistemas de saúde com várias instituições estão buscando a introdução de um índice master de pacientes (ou master de empresa), um número gerado para o sistema de saúde e utilizado em todos os módulos de sistema de informação clínica por todos os serviços associados. Um importante benefício do índice master de pacientes é que ele pode unificar todos os registros de um paciente, mesmo quando cada um é identificado por um número diferente de registro médico. Outro benefício de um índice master de pacientes é que ele pode ser utilizado em conjunção com um sistema de saúde *front-end* (de etapa inicial) – sistema de registro amplo para manter os dados dos pacientes centralizados para vários sistemas de informação e eliminar a necessidade de cada sistema (laboratório, radiologia e consultório) manter seus próprios

Tabela 11.2 Etapas fundamentais do fluxo de informação laboratorial para um paciente hospitalizado

Etapa	Descrição
Registro do paciente	O registro do paciente (p. ex., número de identificação, nome, sexo, idade, endereço etc.) deve ser criado no SIL antes de os exames serem solicitados. Em geral, o sistema recebe automaticamente esses dados do sistema de registro hospitalar (quando o paciente é admitido)
Solicitação de exames	O médico solicita que o sangue para exames de um paciente seja coletado como parte da rotina de coleta do período matinal. A solicitação é armazenada no SIH e enviada eletronicamente para o SIL
Coleta de amostra	Antes da coleta de sangue matinal, o SIL imprime uma lista de todos os pacientes que devem ter material coletado e o número adequado de etiquetas com código de barras para cada solicitação. Cada código de barras possui o número de identificação do paciente, o tipo de recipiente de amostra (p. ex., tubo com tampa vermelha) e a estação de trabalho do laboratório (que pode ser utilizada para a classificação do tubo quando ele chegar ao laboratório). Outra abordagem, cada vez mais popular, é a de que os cuidadores ou enfermeiros coletem a amostra de sangue. Imediatamente antes da coleta, etiquetas com código de barras podem ser impressas (sob demanda) no posto de enfermagem em uma impressora conectada ao SIH
Recepção de amostra	Quando amostras chegam ao laboratório, a sua condição deve ser atualizada no SIH, de "coletada" para "recebida". Isso pode ser feito por meio da leitura do número de identificação no código de barras do recipiente de amostra. Após a amostra ser recebida, o SIL transmite a solicitação de exame para o analisador que irá realizá-lo
Processamento de amostra	A amostra é carregada no analisador, e o código de barras é lido. Ao receber a solicitação de exame do SIL, o analisador sabe quais exames deverão ser realizados. Não há necessidade de lista de trabalho. Para exames realizados manualmente, o técnico imprime uma lista de trabalho do sistema. A lista de trabalho contém uma lista de pacientes e os exames solicitados para cada um. Ao lado de cada exame existe um espaço para o registro do resultado
Revisão de resultados	O analisador produz os resultados e os envia para o SIL. Esses resultados somente são visíveis para o técnico porque eles ainda não foram liberados para que todos possam visualizá-los. O SIL pode ser programado para sinalizar certos resultados (p. ex., valores importantes), de modo que o técnico possa identificar facilmente quais devem ser repetidos ou avaliados mais profundamente
Liberação de resultados	O técnico libera os resultados. Resultados não sinalizados são revistos e liberados ao mesmo tempo. O SIL também pode ser programado para revisar e liberar automaticamente resultados normais ou aqueles que se encontram dentro de uma determinada faixa. Essa última abordagem reduz o número de exames que um técnico deve revisar. Na liberação, os resultados são enviados de forma automática para o SIH
Relatório de resultados	O médico pode visualizar os resultados no SIH. Quando necessário, relatórios são impressos do SIL

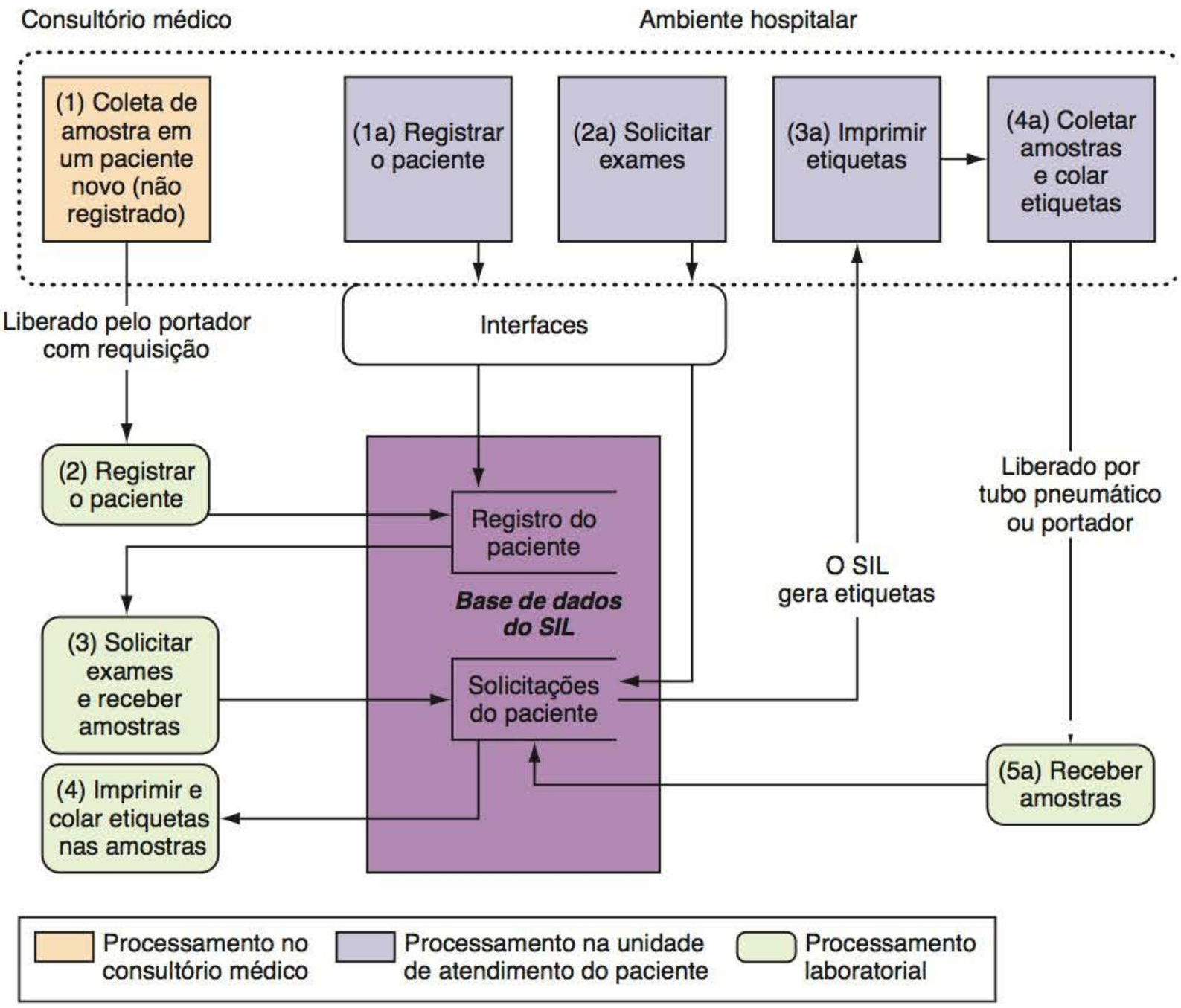


Figura 11.2 Função do sistema de informação laboratorial (SIL) no registro e no processamento da solicitação.

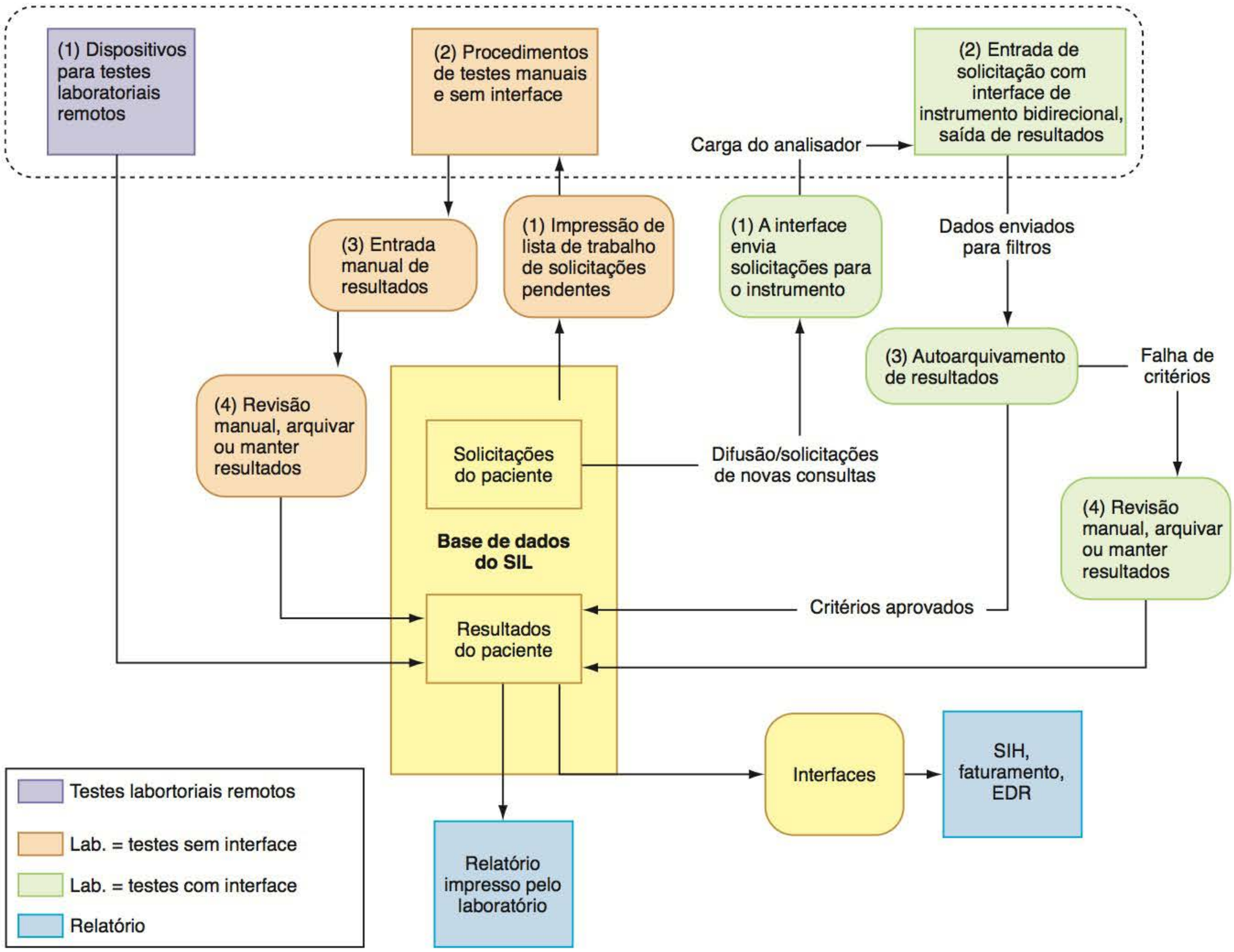


Figura 11.3 Papel do sistema de informação laboratorial (SIL) no processamento de resultados. Observe as três abordagens de processamento de resultados: entrada manual de dados, instrumentos interfaceados (*online*) e testes laboratoriais remotos. (As etapas do fluxo de trabalho são numeradas para cada abordagem).

dados de pacientes. Dessa maneira, os dados dos pacientes (p. ex., endereço ou seguro social) podem ser atualizados centralmente. Isso não somente elimina a repetição do trabalho, mas aumenta a acurácia pelo fato de o nome do paciente, por exemplo, aparecer da mesma maneira em cada sistema. O índice master de pacientes não evita que cada sistema a jusante utilize outro número identificador do paciente porque ele pode fazer automaticamente a ligação com cada um desses identificadores adicionais. Portanto, o laboratório pode designar ao paciente seu número próprio que está ligado ao índice master de pacientes. Embora haja a necessidade, não existe uma perspectiva imediata de um número de identificação nacional que poderia ligar os registros médicos de um paciente que estão atualmente dispersos em muitos médicos e serviços.

Identificação positiva do paciente. Um número exclusivo designado para um paciente é de uso limitado se não conseguirmos identificar o paciente positivamente. Por essa razão, vários métodos (p. ex., pulseiras com código de barras) foram desenvolvidos para identificar pacientes em ambiente hospitalar. O sistema de Radiofrequency Identification (RFID) é uma nova tecnologia que provê uma identificação sem participação humana e isenta de erro. Ele consiste numa etiqueta de paciente e num leitor ou *scanner* computadorizado. O rótulo ou etiqueta "inteligente" contém informações legíveis, um código de barras e um *chip* de circuito integrado com memória. Uma pequena quantidade de energia de radiofrequência ("sinal de excitação") é liberada do *scanner*, energizando a etiqueta de RFID, a qual emite um sinal de radiofrequência ("sinal de retorno"), transmitindo a identidade do paciente. Embora várias questões (p. ex., criptografia de dados e padronização de protocolo) não tenham sido solucionadas, a tecnologia RFID oferece vários benefícios: operação passiva e armazenamento dinâmico de dados, características que favorecem seu uso na coleta e no rastreamento de amostra, testes à beira do leito, gerenciamento de drogas e controle de infecção.

Solicitação de exames

Após a identificação do paciente, é procedida a geração de solicitações de exames, indicando quando as amostras foram ou serão coletadas, quem coletou, horário da coleta, condição do paciente (posição, peso e estado psicológico), tipo de amostra (fonte de uma cultura, como ferida ou escarro), exigências de notificação (p. ex., comunicado para repetição de exames) ou atributos de gerenciamento clínico (como dosagem de fármacos – nível máximo ou mínimo – e tempos para estudos de desafios fisiológicos). As solicitações devem ser geradas (por meio eletrônico ou em papel) diretamente pelo médico. Caso contrário, solicitações devem ser transcritas por não médicos, e isso pode levar a erros de transcrição.

Geração eletrônica de solicitação de exames. É ideal que o médico de testes rápidos faça as solicitações ao laboratório de modo eletrônico. O maior impacto disso é a redução de erros de solicitação (que poderiam ocorrer com o uso de solicitações em papel). Além disso, a interação em tempo real com um sistema de informação pode promover a utilização adequada do exame através do uso de vias clínicas (conjunto de solicitações médicas ou algoritmos baseados no diagnóstico do paciente). Os computadores são muito úteis e efetivos para algumas aplicações (recuperação de informações, cálculos e transmissão de dados), enquanto os humanos são mais efetivos para outras

(julgamento e raciocínio a partir de dados incompletos). Sistemas de suporte a estruturas de decisão e previsão baseadas em regras podem aumentar a qualidade do tratamento, embora ainda dependam do julgamento humano. Por exemplo, quando é prescrito um fármaco que pode comprometer a função renal, o nível de BUN/creatinina pode ser exibido. Se os valores estiverem altos, outro medicamento pode ser considerado. O suporte de decisão (preditivo) durante as atividades de solicitação pode variar de anotações, lembrando à equipe quais ações devem ser implementadas em conjunção com a solicitação (p. ex., o paciente deve estar em jejum ou a solicitação requer a aprovação do patologista) para bloquear uma solicitação inaceitável porque o exame está sendo solicitado com frequência. Solicitações também podem ser submetidas à referência cruzada com outros sistemas auxiliares (p. ex., farmácia) para identificar se a solicitação do nível de um fármaco é o máximo ou o mínimo baseado na última dosagem do paciente. No ambiente ambulatorial, o sistema pode realizar a checagem da necessidade médica (ver Cap. 12) e questionar o médico se existem ou não códigos diagnósticos adicionais aplicáveis ao paciente. Essas interações eletrônicas somente são efetivas quando os médicos que podem responder em tempo real geram as solicitações. Solicitações em ambiente hospitalar são geradas com frequência no SIH e, em seguida, transmitidas para o laboratório. Solicitações ambulatoriais eletrônicas são geradas no computador do consultório médico que se comunica com o laboratório, ou são geradas via programa baseado na *web*, que envia a solicitação ao laboratório.

Solicitações eletrônicas podem ser geradas individualmente a partir da seleção de exames de um *menu* suspenso de todos os exames ou de *menus* de conjuntos de solicitações comuns que podem ser customizados por especialidade médica. Um catálogo eletrônico de serviços pode fornecer exigências para coleta e informações sobre o método do exame, utilidade diagnóstica e interpretação. O catálogo eletrônico está evoluindo rapidamente para um documento eletrônico *online*.

Geração manual de solicitação (requisição em papel). Em alguns hospitais e laboratórios próximos, exames laboratoriais são solicitados em requisições em papel, as quais são enviadas fisicamente para o laboratório. Solicitações de exames podem ser feitas através de abreviaturas (p. ex., CBC, CEA, Na) ou por códigos numéricos. Códigos alfabéticos têm um significado mais claro e podem ser mais fáceis de serem lembrados, mas os códigos numéricos são mais fáceis de serem preenchidos, menos ambíguos, podem incluir um dígito controlador e são mais fáceis de serem gerenciados nos sistemas de faturamento. As requisições em papel devem ser pré-impressas com o nome e o endereço do médico e devem conter os exames mais frequentemente solicitados. O objetivo é minimizar o número de exames que devem ser escritos à mão num formulário e, como consequência, que podem ser interpretados incorretamente.

Coleta e identificação de amostra

Tipicamente, solicitações de exames são classificadas em duas categorias: (1) solicitações ao laboratório para a obtenção de uma amostra e (2) solicitações acompanhadas por uma amostra. No hospital, solicitações de exames recebidas com antecedência são alimentadas no SIH e transmitidas para o SIL, no qual elas são agrupadas em lotes de flebotomia de rotina. Um pouco antes do horário programado de coleta, etiquetas são impressas. Elas identificam o paciente e as amostras (i. e., tipos de recipientes) a serem coletadas. Geralmente, são etiquetas com código de barras (ver abaixo) e também incluem volumes da amostra/alíquota e instruções especiais de manipulação. As etiquetas de coleta são impressas na ordem na qual o flebotomista deve realizar a coleta nos pacientes – primeiro, amostras de exames de urgência e, em seguida, as outras na sequência da localização (por andar e número do leito). Como alternativa, toda a sequência de trabalho do flebotomista pode ser armazenada num dispositivo portátil (ver abaixo), e etiquetas podem ser geradas à beira do leito quando uma amostra é coletada de cada paciente. A indicação de amostra coletada, não coletada ou parcialmente coletada é alimentada no SIL.

Quando solicitações forem recebidas com amostras (i. e., quando amostras não forem coletadas pelo laboratório), os recipientes de amostras podem ou não já estar identificados com um código de barras do SIL, dependendo da disponibilidade da impressão do código de barras no local de atendimento dos pacientes. Tubos sem etiquetas do SIL devem ser reetiquetados no laboratório, e isso apresenta o risco de uma etiqueta errada ser aplicada em um tubo do paciente.

Dispositivos portáteis de coleta. A tecnologia atual permite que procedimentos de coleta sejam realizados à beira do leito. Usando a transmissão por radiofrequência, pequenos dispositivos portáteis podem ser atualizados continuamente com solicitações de exames e mesmo impressão de etiquetas de código de barras do SIL em tempo real. Isso apresenta vários benefícios: controle do procedimento de coleta em tempo real, incluindo o horário da coleta e os comentários sobre ela (p. ex., dificuldade de coleta, coleta não realizada etc.); menos erros de etiquetagem porque as etiquetas somente são impressas conforme a necessidade à beira do leito; risco de confirmação positiva do paciente, como a leitura do código de barras da pulseira do paciente de modo que o dispositivo portátil possa imprimir etiquetas automaticamente; e a capacidade de modificar solicitações para o tempo de coleta real. Esta última elimina o problema de "exames adicionais", uma circunstância na qual não existe etiqueta para uma amostra que foi adicionada após o laboratório já ter impresso e distribuído as etiquetas da solicitação de exames para aquele paciente.

Identificação da amostra. Todas as amostras devem ser identificadas, preferivelmente com um código de barras que contenha o número da solicitação (o qual é geralmente o mesmo para todas as amostras de uma coleta de um determinado paciente). Um número adicional (denominado o número do recipiente ou de acesso, dependendo da nomenclatura utilizada pelo fabricante do SIL) também é impresso na etiqueta. Ele pode ser designado para um grupo de amostras (p. ex., todos os recipientes com amostras para exames bioquímicos solicitados) ou para uma única amostra, dependendo de como a base de dados do SIL for definida. Na primeira abordagem, o SIL não consegue diferenciar dois tubos de bioquímica com tampa vermelha, apesar de um poder ser utilizado para um painel bioquímico e o outro para um exame a ser realizado por um laboratório de referência. Na segunda abordagem, o SIL pode diferenciar os dois tubos e pode determinar se um ou ambos foram coletados. Para minimizar erros de etiquetagem, o código de barras deve ser afixado na amostra no local de coleta, não no laboratório. O formato do código de barras e a orientação da etiqueta determinam a compatibilidade com sistemas de manipulação automatizada de amostras. Além disso, sistemas robóticos exigem que cada amostra de um paciente possua um código exclusivo. Aplicações típicas na saúde utilizam a simbologia de código 39, mas exigências de um padrão nacional estão fazendo com que as organizações convertam para o código 128. A Tabela 11.3 apresenta uma lista de atributos de várias simbologias de código de barras encontradas em ambientes de cuidados da saúde. Detalhes do tamanho, da localização e da orientação da etiqueta em um tubo de amostra são discutidos no documento AUTO2-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000).

Realização de exames e liberação de resultados

A testagem em alto volume geralmente é realizada em analisadores que se comunicam de modo bidirecional com o SIL. Além de um número de acesso, a solicitação também pode incluir data/horário da coleta e dados do paciente (p. ex., nome, data de nascimento e sexo). Quando as amostras passam a constar no SIL como "recebidas", o computador automaticamente transmite as solicitações para

Tabela 11.3 Simbologias do código de barras utilizadas na área da saúde

Simbologia	Atributos
Código 128	Conjunto completo de caracteres de dígitos, letras (maiúsculas e minúsculas) e símbolos ASCII; dígito controlador inerente; pode ser lido bidirecionalmente
Código 39	Todos os dígitos e letras (somente maiúsculas), alguns símbolos; alta segurança; baixa densidade; pode ser lido bidirecionalmente
Codabar	Todos os dígitos, letras e símbolos limitados; baixa segurança
Interleaved 2 of 5	Somente dígitos

o instrumento. Como alternativa, utilizando o modo *host query*, o instrumento lê o número de acesso no código de barras da amostra e pergunta ao SIL quais exames devem ser realizados naquela amostra. Periodicamente, uma "lista de exames pendentes" pode ser checada na tela da estação de trabalho para verificar se nenhuma amostra foi esquecida. Analisadores bioquímicos geralmente funcionam dessa maneira.

Alguns analisadores comunicam-se de modo unidirecional com o SIL. Isso significa que eles não recebem automaticamente uma solicitação do SIL, mas enviam os resultados a ele. Nesse caso, um técnico gera as solicitações manualmente no analisador ou, no caso de um contador de células sanguíneas, uma solicitação não é necessária porque cada amostra é processada para o mesmo exame (p. ex., hemograma completo). Alguns instrumentos (como refratômetros) ou métodos manuais não possuem interface com o SIL. Nesses casos, deve ser preparada uma lista de tarefas que inclua controles e padrões, além das amostras. A lista de tarefas indica onde posicionar cada amostra e/ou quais exames realizar. Os resultados são alimentados manualmente no SIL.

Quando resultados são alimentados no computador do laboratório, seja manualmente através do teclado ou automaticamente através da interface do instrumento, o computador realiza várias checagens de validação. Os resultados que devem ser numéricos são checados; o número exigido de decimais é verificado. Faixas de referência, específicas para a idade e o sexo do paciente (e, quando disponíveis, outros fatores como medicamentos e diagnóstico), são comparadas com o resultado. Para laboratórios que realizam exames veterinários, faixas de referência específicas para cada espécie são necessárias. Valores essenciais (*panic values*) são sinalizados pelo SIL, identificando resultados que devem ser comunicados (usualmente por telefone) imediatamente ao médico e devem ser documentados como tal no SIL. Os resultados também são comparados com resultados anteriores do paciente para determinar se ocorreu uma alteração significativa (o chamado "*delta check*"). Um sinalizador de *delta check* pode ser a primeira indicação de uma mistura de amostra do paciente ou pode refletir uma alteração na condição fisiológica. Comentários codificados são checados para se assegurar que o código está listado no dicionário adequado. Alguns resultados são processados através de cálculos definidos pelo laboratório. Por exemplo, O LDL-colesterol é automaticamente calculado a partir dos valores de colesterol, triglicerídeos e HLD-colesterol. Algoritmos podem ser utilizados para gerar comentários interpretativos. Por exemplo, o SIL pode produzir um comentário diferente dependendo de quais exames são positivos num painel de hepatite B. Certos resultados podem fazer com que um exame seja automaticamente solicitado na mesma amostra (p. ex., um exame rápido de reagina plasmática positivo pode gerar um exame de FTA-ABS confirmatório) para acelerar o processo diagnóstico, melhorar o tratamento do paciente e reduzir testagens desnecessárias (p. ex., fazer com que o computador solicite a dosagem de bilirrubina direta somente quando a bilirrubina total estiver elevada).

Protocolos de autovalidação podem ser utilizados para a liberação (ou "postagem") automática de resultados recebidos do analisador sem revisão do técnico. Por exemplo, o SIL pode ser programado para liberar todos os exames que estiverem dentro da faixa de referência. Dessa maneira, o médico pode ver os resultados assim que o analisador completá-los. Valores de controle de qualidade são checados contra limites definidos para cada método de exame, número de lote e nível de controle, e algoritmos complexos multirregras podem ser imediatamente aplicados (ver Cap. 10). Uma das vantagens mais importantes de um SIL é que ele fecha o circuito entre a solicitação do exame e a entrada do resultado. Uma solicitação sem um resultado correspondente aparece na lista de exames incompletos, levando o técnico a procurar a discrepância e resolvê-la.

Relatório

Avanços na tecnologia de comunicação forneceram muitos métodos inovadores para a comunicação de resultados laboratoriais ao médico, além do tradicional relatório impresso, incluindo terminais de busca/visualização, mensagem de voz, ativação de *bip*, fax, e-mail, aplicações baseadas na *web* e ligações sem fio com estações de trabalho portáteis. Relatórios impressos podem ser formatados de diferentes maneiras para apresentar apenas os resultados mais recentes, resultados de uma única amostra ou resultados cumulativos que incluem todos os resultados desde a admissão do paciente ou de outro intervalo de tempo. Os resultados laboratoriais podem ser transmitidos eletronicamente para vários sistemas clínicos, incluindo o SIH, o repositório de dados da empresa ou o prontuário médico eletrônico (ver Tab. 11.1 e Fig. 11.5). Geralmente, esses sistemas permitem ao usuário personalizar a maneira com que os resultados são apresentados. Bases de dados fornecem uma visão entre diferentes pacientes e permitem o reconhecimento de padrões gerais e podem permitir o desenvolvimento de novos conhecimentos sobre doenças (Elevitch, 1999). O relatório laboratorial também possui um papel médico-legal e deve satisfazer a todas as regulamentações aplicáveis aos prontuários médicos.

Relatórios interpretativos são um componente essencial da prática laboratorial e podem ser utilizados para transformar dados laboratoriais em informações úteis na clínica. O SIL pode ser utilizado para transmitir comentários do patologista; pode produzir automaticamente interpretações nos relatórios baseadas num algoritmo predefinido; ou pode servir como um sistema especializado complexo, sugerindo comentários interpretativos para o patologista. Todo o potencial desses sistemas na garantia da qualidade médica será percebido somente quando uma ação clínica for implementada e, em seguida, registrada em sistemas de informação, permitindo ao computador verificar se um resultado laboratorial patognomônico resultou verdadeiramente numa intervenção terapêutica adequada. Avanços recentes na tecnologia de navegação na *web* facilitam enormemente a visualização de resultados laboratoriais no consultório médico ou em computadores pessoais, melhorando a eficiência.

Outro benefício importante de um SIL é que ele pode ser utilizado, isoladamente ou em conjunção com outros sistemas (p. ex., SIH), para gerar alertas clínicos. Em sua forma mais básica, um alerta clínico é um valor laboratorial que é sinalizado como alto ou baixo no relatório. No entanto, um único conjunto de alertas clínicos não leva em conta a condição subjacente de um paciente, isto é, o que é "normal" pode diferir muito de um paciente a outro. Por essa razão, um nível elevado de creatinina num paciente com doença renal em estágio final pode ser qualificado como um "valor de alerta", embora ele possa ser "normal" para aquele paciente. Para solucionar esse problema, alguns sistemas permitem que alertas clínicos sejam customizados pelo médico ou pela especialidade para identificar mais acuradamente pacientes que possam apresentar resultados que são graves devido às suas condições. Também foram elaborados algoritmos sofisticados para reconhecer alterações patológicas importantes ao longo do tempo em pacientes que normalmente apresentam resultados laboratoriais anormais (Fritsche, 2002).

Acesso *World Wide Web* (www) aos resultados de pacientes. *Intranets* ou *webs* confidenciais privadas são ferramentas versáteis e poderosas para a disseminação de dados laboratoriais. Elas baseiam-se no conteúdo dinâmico da *web*. Com a sua capacidade multimídia intrínseca, a tecnologia *web* pode formatar dados de várias maneiras, utilizando a linguagem de marcação de hipertexto (HTML, *hypertext markup language*). A HTML pode gerar novo conteúdo automaticamente em resposta a comandos do usuário e, portanto, é capaz de automatizar a geração de relatório e facilitar a customização de busca de dados (Yearworth, 1998; Lowe, 1996). Conteúdo dinâmico significa que relatórios clínicos customizados podem ser "criados automaticamente e em tempo real" e representa um padrão de cuidado com valor agregado que o laboratório pode oferecer aos seus clientes. O desafio principal da tecnologia de *intranet* é como realizar a integração completa e segura com redes externas que servem aos médicos e a outros serviços.

O sistema de informação laboratorial (SIL)

O que é isso?

Em sua essência, o SIL é um grupo de dados estruturado utilizando uma das várias arquiteturas de base de dados. Uma abordagem comum é a base de dados relacional, um grupo de dados organizados em um conjunto de tabelas a partir das quais dados podem ser aces-

sados e agrupados de muitas maneiras diferentes sem que as tabelas de base de dados tenham de ser reorganizadas. A interface padrão do usuário e do aplicativo de uma base de dados relacional é a linguagem de consulta estruturada (SQL, *structured query language*). Comunicações SQL são utilizadas tanto para pesquisas estruturadas para informações a partir de uma base de dados relacional quanto para coleta de dados para relatórios. Além de ser relativamente fácil de ser criada e acessada, uma base de dados relacional apresenta uma importante vantagem: a de ser facilmente expandida. Após uma base de dados original ser criada, uma nova categoria de dados pode ser adicionada sem a necessidade de se modificar todas as aplicações existentes.

Uma base de dados relacional é um conjunto de tabelas (conceitualmente similar a uma planilha) contendo dados organizados em categorias predefinidas. Cada tabela (algumas vezes denominada relação) contém uma ou mais categorias de dados em colunas. Cada linha contém um único tipo de dado para as categorias definidas pelas colunas (Tab. 11.4). Por exemplo, a tabela "Registro do paciente" pode ter colunas separadas para o número de identificação do paciente, o nome do paciente, o sobrenome do paciente, a data de nascimento etc. A tabela "Solicitação de exames" pode ter uma coluna para o número de identificação do paciente, a data da solicitação, o nome do médico e o número do exame para cada item solicitado. Uma terceira tabela pode ter uma lista de exames com colunas separadas para o número do exame, o nome do exame e o tipo de amostra. Observe que cada uma dessas tabelas contém, pelo menos, um elemento-chave de dados que o relaciona com outra tabela. Utilizando essa abordagem, dados de várias tabelas podem ser extraídos e visualizados de uma só vez. Por exemplo, a tela de entrada de solicitação pode apresentar dados do paciente juntamente com informações sobre a solicitação e o número de identificação do paciente.

Ao criar uma base de dados relacional, pode-se definir a faixa de valores possíveis numa coluna de dados e aplicar restrições aos valores dos dados. Por exemplo, pode-se limitar o número de exames que podem ser solicitados por visita do paciente, exigir cinco caracteres no campo de código de endereçamento postal ou permitir apenas dois dígitos e um decimal no campo de resultado da dosagem de cálcio. Ao criar essas limitações, pode-se assegurar se os dados inseridos são válidos.

Uma base de dados típica do sistema de informação contém muitas tabelas inter-relacionadas diferentes que devem ser preenchidas pelo laboratorista. Por exemplo, existem tabelas para nomes de exames e faixas de referência, assim como existe uma para informações sobre os clientes. A funcionalidade de um SIL e seu impacto sobre o fluxo de trabalho estão diretamente relacionados com a maneira com que esses arquivos são criados. Portanto, é extremamente importante compreender como essas tabelas estão inter-relacionadas para otimizar o fluxo de trabalho.

Tabela 11.4 Estrutura de base de dados que podem ser relacionados

Dados de registro do paciente

Identificação do paciente	Nome	Sobrenome	Idade	Sexo
P1234	John	Smith	33	M
P3456	Mary	White	58	F

Dados da solicitação do exame

Solicitação	Identificação do paciente	Data	Médico	Exame
O34782	P1234	04/12/2005	Jones	Hemoglobina
O34783	P3456	04/12/2005	White	Hematócrito

Dados do resultado do exame

Solicitação	Exame	
O34782	Hemoglobina	15
O34783	Hematócrito	33

Dados da faixa de referência

Exame	Homem adulto	Mulher adulta	Criança	Unidades
Hemoglobina	14–18	12–16	11–16	g/dL
Hematócrito	42–52	37–47	31–43	%

Embora cada tabela apresente dados únicos, ela também contém, pelo menos, um item relacionado com a outra tabela. Dados combinados são sombreados com a mesma cor. Portanto, os dados das quatro tabelas podem ser extraídos para produzir um único relatório que contém nome e número de identificação do paciente, solicitação, médico, exame, resultados e faixas de referência.

Funções especiais do SIL

Um SIL de um laboratório clínico típico consiste numa variedade de módulos: laboratório geral (p. ex., coleta e processamento de amostras, bioquímica, hematologia, sorologia), microbiologia e banco de sangue. Na prática, alguns laboratórios utilizam um sistema de banco de sangue separado. Um SIL serve para muitas funções, algumas das quais estão listadas na Tabela 11.5. Além de suporte às etapas do fluxo de informação delineadas acima, o SIL possui funções especializadas para gerenciamento e para certas seções laboratoriais.

Microbiologia

A seção de microbiologia do laboratório requer um gerenciamento de dados único. O microbiologista deve ter um método que seja eficiente para a entrada de nomes de organismos e sensibilidades antimicrobianas e que seja capaz de transmitir informações complexas através das interfaces do instrumento. Uma única amostra pode resultar no isolamento de diversos organismos, cada qual apresentando um ou mais conjuntos de características bioquímicas (para uso interno) e resultados de sensibilidade (para relatório externo). O relatório de sensibilidade é frequentemente formatado para influenciar a prática clínica. Por exemplo, antimicrobianos caros e tóxicos podem ser omitidos do relatório quando o organismo for sensível a agentes baratos e seguros ou, pelo menos, os fármacos eficazes baratas podem ser listadas em primeiro lugar. Relatórios epidemiológicos, padrões de sensibilidade antimicrobiana e outros sumários especializados também são necessários. O SIL pode ser utilizado automaticamente e transmite eletronicamente relatórios de doenças transmissíveis para os serviços de saúde pública (White, 1999) (ver "Padrões de comunicação e suas aplicações").

Tabela 11.5 Funções do SIL

Pré-análise	Registro do paciente (quando não recebido do sistema externo)
	Solicitação de exames
	Requisições personalizadas (p. ex., clientes fora do alcance)
	Listas de coleta através de flebotomia
	Etiquetas de coleta com código de barras e etiquetas de alíquotas
	Sistema de rastreamento/armazenamento de amostras
Análise	Lista de trabalho do instrumento (via interface e *download* automático)
	Lista manual de trabalho
	Entrada manual de resultados
	Entrada automatizada de resultados via interface
	Validação de resultados e liberação manual ou automática
	Controle de qualidade
Pós-análise	Relatórios do paciente baseados na requisição (final ou parcial)
	Relatórios cumulativos do paciente
	Relatório corrigido
	Resultados de pesquisa
	Relatório eletrônico para sistemas externos interfaceados (p. ex., SIH, faturamento)
Gerenciamento	Lista pendente (incompleta)
	Relatórios do tempo despendido entre a coleta e o resultado
	Estatística da carga de trabalho
	Relatório *ad hoc*
	Ferramentas de monitoração da integridade do SIH e do instrumento

Controle de infecção. Ao correlacionar dados do paciente (incluindo localização do hospital com resultados da microbiologia), o laboratório pode ajudar a detectar infecções nosocomiais (Wright, 2004). A vigilância automatizada tem sido utilizada para detectar epidemias (Stern, 1999) e fornecer relatório de doenças aos serviços de saúde pública (Backer, 2001; Effler, 1999), e espera-se que ela tenha um papel fundamental na detecção de episódios de bioterrorismo (Lazarus, 2001). A notificação em tempo real pode fornecer relatórios de pacientes que necessitam de isolamento, de organismos identificados e dos padrões de sua sensibilidade antimicrobiana ao pessoal da unidade onde o paciente se encontra e ao pessoal do controle de infecção. Um programa de vigilância estende-se através de sistemas de informação laboratorial de várias instituições, promove padrões consistentes de cuidados da saúde para pacientes que recebem serviços interinstitucionais, atenua a exposição na entrada em serviços correlatos e pode reduzir o tempo e a necessidade de análises de vigilância.

Banco de sangue

O SIL de banco de sangue especifica quais dispositivos necessitam de aprovação da Food and Drug Administration (FDA) para implantação, e uma atenção particular deve ser dada a qualquer alteração relacionada ao *software*, à validação do sistema e às exigências regulatórias da FDA. Isso inclui interfaces com instrumentos das seções de bioquímica e de sorologia que processam exames de investigação de doadores (hepatite, vírus da imunodeficiência humana [HIV] e outros exames para doenças infecciosas). O banco de sangue deve rastrear não apenas amostras de pacientes, mas também hemocomponentes e a compatibilidade entre eles. Inventários de hemocomponentes e hemoderivados devem ser mantidos, com uma atenção especial para a data de validade e as características especiais de cada unidade (p. ex., tipagem especial de antígeno). Unidades especiais para determinados pacientes, incluindo unidades autólogas, dirigidas e fenotipadas, impuseram novas exigências de manutenção de registro e de checagem cruzada. Antes de o sangue ser liberado, uma etiqueta deve ser fixada à unidade, confirmando a identidade do paciente para o qual esse sangue será destinado. Na liberação, devem ser mantidos registros da reinspeção da unidade, quem ficou responsável pela unidade etc. O histórico do paciente deve ser mantido por longos períodos, particularmente sobre pacientes com problemas, para se evitar infusão de sangue incompatível num paciente que apresenta anticorpos inesperados com concentração abaixo do nível de detecção. Os centros de doação apresentam exigências adicionais, incluindo a manutenção de uma base de dados de doadores e listas de suspensão permanente, o processamento e os testes de unidades do doador e a realização de inventários, entre outros. Como no laboratório de microbiologia, a equipe de patologia clínica do banco de sangue trabalha com um sistema de dados complexo e deve estar familiarizada com a maneira de o SIL suportar suas operações.

Exames realizados no local de atendimento (testes rápidos)

Os dados de testes rápidos (TR) podem ser transmitidos para um SIL via *upload* iniciado manualmente. Interfaces ponto a ponto entre o SIL e estações de trabalho são proibitivamente onerosas e de manutenção complicada. Uma alternativa com melhor relação qualidade/preço utiliza uma única interface para um servidor localizado entre duas estações de trabalho diferentes de TRs de fabricantes distintos. Dispositivos podem comunicar-se com o servidor via conexão de rede com fio ou sem fio. Todas as trocas de dados com o SIL são mediadas através do servidor, e os custos do interfaceamento são reduzidos, uma vez que um número menor de interfaces é necessário para múltiplas conexões com os sistemas de TRs. Essa via comum de dados permite que um usuário tenha acesso a dados de múltiplos dispositivos e simplifica a supervisão laboratorial e a revisão do controle de qualidade. Vários fabricantes oferecem soluções de informação que aceitam dados de diferentes tipos de dispositivos de TRs ou podem mesmo permitir que o usuário alimente resultados de TRs (p. ex., exames de urina com fita reagente). O objetivo é centralizar todos os TRs.

Ferramentas de gerenciamento

A base de dados do laboratório e outras bases de dados computadorizadas do hospital são ferramentas poderosas para a garantia da qualidade médica, uma vez que elas fornecem ao patologista ou ao administrador relatórios detalhados e acurados das atividades laboratoriais. O SIL pode realizar coletas de sua base de dados para fornecer informações sobre a sequência de eventos com o horário marcado, o que ocorreu em cada amostra e em cada etapa do processamento. Ele pode rastrear problemas médicos ou internos do laboratório e gerar dados referentes às etapas de realização do exame (por exame, turno, técnico e local da solicitação), à distribuição da carga de trabalho laboratorial (incluindo mapeamento de exames e amostras) e a várias outras atividades. Dados extraídos do SIL podem ser utilizados para se analisar o fluxo de trabalho e melhorar o desempenho (ver Cap. 2). Registros da carga de trabalho, avaliação da produtividade e relatórios de índices de gerenciamento (p. ex., Laboratory Management Index Program, College of American Pathologists, Northfield, IL) são ferramentas de gerenciamento valiosas. Esses relatórios podem ser utilizados para rastreamento interno, tendências longitudinais e marcas de referência: comparação do desempenho fiscal do laboratório com outros laboratórios (ver Cap. 12). Ocasionalmente, a equipe do laboratório deverá elaborar relatórios *ad hoc* (p. ex., informar todos os pacientes com nível de sódio superior a 150, idade entre 62 e 75 anos e que estejam internados no setor de oncologia). Essa capacidade de consulta *ad hoc* deve pesquisar todos os campos nos arquivos da base de dados e formatar o resultado para que seja carregado num computador pessoal. As funções do SIL garantem que cada membro da equipe tenha acesso apenas às funções adequadas para sua atividade, seu treinamento e nível de licenciamento. Além disso, elas fornecem uma sequência de eventos adequada para a documentação de questionamentos legais, incluindo cada indivíduo envolvido na recepção, no processamento, nos resultados, nos relatórios, na investigação e no serviço de atendimento ao cliente. *Softwares* de garantia de qualidade foram desenvolvidos para avaliar a adequação do uso laboratorial e de seu custo, efetividade baseada na condição do paciente (gravidade), em resultados e dados detalhados no prontuário médico eletrônico (Connelly, 1997).

Faturamento

Em muitas instituições, o SIL produz transações de faturamento para cada exame realizado. Elas podem ser geradas durante a solicitação do exame, da coleta, da recepção da amostra ou da geração do resultado. Para garantir a observância regulatória, sistemas de faturamento devem ser capazes de capturar acuradamente exames que forem adicionados ou removidos da solicitação inicial. Interfaces de faturamento operam em modo de lote (enviando um lote diário de todas as transações) ou de forma dinâmica, na medida em que a carga é qualificada. Esta última abordagem minimiza o atraso no processamento. Regulações de faturamento laboratorial são muito complexas (ver Cap. 12). Em alguns casos, a melhoria da acurácia do faturamento e da flexibilidade pode justificar a aquisição de um SIL.

Seleção, implementação e gerenciamento do SIL

A instalação de um novo SIL geralmente ocorre como parte da migração de um sistema hospitalar ou de saúde para uma plataforma de uma única empresa ou por causa de alterações antecipadas importantes no volume de serviço ou na complexidade que não podem ser supridas pelo sistema atual. Em geral, atualizações do SIL estão relacionadas com novas versões de *softwares* ou nova tecnologia, e sua implementação pode ser tão desafiadora quanto a instalação de um sistema totalmente novo.

Seleção. A seleção de um SIL pode ser um processo difícil. Uma maneira é começar com uma análise de lacunas, um estudo das diferenças entre as capacidades de um sistema existente. Numa análise de lacunas, as características do *software* do sistema são divididas em necessidades existentes, novas e futuras e, por sua vez, elas podem ser pesadas como suficientes ou insuficientes para suprir as demandas de flexibilidade e desempenho da organização. A avaliação requer uma abordagem multidisciplinar, que envolva o laboratório, a tecnologia de informação e os departamentos de usuários finais. Embora a análise de lacunas possa identificar soluções aceitáveis, a decisão de implementar uma solução deverá levar em consideração o orçamento, o pessoal e os projetos

concorrentes. Tipicamente, a análise de lacunas é seguida por visitas aos locais, as quais fornecem mais informações para a linha de tempo do projeto e os recursos necessários previstos para a implantação. As visitas aos locais são a ferramenta mais valiosa no processo de seleção quando os locais espelham sua própria configuração ou o plano de negócio projetado. Elas devem explorar áreas fundamentais, como o desempenho do sistema, as despesas gerais da equipe, a flexibilidade do sistema, a estabilidade do sistema e a responsividade do vendedor.

Implementação. A equipe laboratorial que gerencia a implementação do SIL deve ter um conhecimento prático de diretivas, procedimentos e fluxo de trabalho e saber como definir a base de dados do sistema para a obtenção de um desempenho ideal. A parte mais desafiadora de qualquer implementação é determinar como estruturar o SIL e seus muitos elementos de dados inter-relacionados. Algumas vezes, isso requer a experimentação de diferentes abordagens (e uma minibase de dados de exames, clientes etc.) para apreciar completamente a implicação de um *design* comparado a outro.

A seguir, dados são coletados, como nomes de exames, faixas de referência, nome do médico e de outros clientes etc. Geralmente, a coleta de dados e a decisão de como criar a base de dados são processos mais demorados que a alimentação de dados. Após a base de dados ser construída e o novo fluxo de trabalho ter sido estabelecido, a equipe é treinada. Para minimizar a necessidade de equipe de suporte, o "treinamento do treinador" funciona de forma efetiva. Nesse caso, supervisores ou técnicos líderes são treinados e instruem a equipe. O SIL é um componente fundamental do complexo de informação hospitalar e merece uma equipe de suporte dedicada e conhecedora da operação do laboratório para implantar e manter o serviço.

Validação. O programa de gerenciamento de qualidade do laboratório exige que todos os processos novos e modificados sejam amplamente testados e documentados. Por essa razão, todas as alterações realizadas no SIL devem ser validadas, independentemente do fato de elas serem maiores (p.ex., novo sistema ou atualização do sistema existente, nova interface com o SIH) ou menores (p. ex., novo instrumento com interface com o SIL, novo exame codificado). As alterações devem ser migradas do desenvolvimento ("área de teste") para a produção ("área ativa") através de um procedimento de controle de alteração. Considerando o papel central do SIL no laboratório e os muitos projetos de melhoria do processo que ocorrem no laboratório, o teste de validação tornou-se uma tarefa contínua e, algumas vezes, muito trabalhosa. Os auditores controlam alterações locais e exigências de documentação de órgãos de licenciamento. No entanto, não existe substituto para a revisão ativa da documentação, a fim de determinar se os critérios de desempenho foram satisfatórios. Por exemplo, quando uma nova interface é estabelecida a fim de transmitir resultados laboratoriais para o SIH, alguém deve analisar o relatório impresso deste sistema para validar se a informação é acurada, compreensível e aparece na seção adequada do relatório.

Gerenciamento. O laboratório deve preparar, executar, atualizar rotineiramente e testar um plano de recuperação de um desastre. A Figura 11.4 compara várias estratégias de recuperação de desastre, no que diz respeito ao custo e à disponibilidade do sistema. Cada organização deve determinar até qual grau, se houver, ela pode tolerar o tempo de recuperação ("*downtime*") e elaborar uma estratégia para suprir as necessidades. Por exemplo, um laboratório hospitalar pode precisar de um sistema mais "seguro contra falhas" que um laboratório ambulatorial ou de referência especializado que não opera 24 horas por dia. Um plano de recuperação de falhas é necessário para documentar os procedimentos e as atividades associados à perda de potencial do SIL. Esse plano deve ser atualizado periodicamente e testado para assegurar que as operações laboratoriais possam continuar em caso de falha do SIL.

O HIPAA (Health Insurance Portability and Accountability Act) exige confidencialidade rigorosa do paciente e, por sua vez, que o gerenciamento garanta a integridade e a segurança dos dados do SIL. Para atingir esses objetivos, deve-se controlar o acesso e manter a confidencialidade do paciente. Isso é conseguido de várias maneiras, incluindo a definição de proteção com senha, que restringe o acesso de um usuário apenas às funções do SIL relacionadas à sua atividade; o acesso para pesquisa de dados do paciente; a limitação do número de usuários autorizados para modificar a base de dados; e a manutenção de sistemas de segurança para proteger contra o acesso a linhas telefônicas e à rede por *hackers*. Uma alteração errônea da base de dados pode afetar significativamente a operação laboratorial (p. ex., tubo de coleta errado) ou a interpretação clínica de resultados de exames (p. ex., faixa de referência incorreta). Por essa razão, deve existir um procedimento para revisar todas as modificações da base de dados antes e após elas serem movidas para a área de produção. Além disso, devem ser revisados periodicamente os relatórios laboratoriais para se detectar qualquer alteração não prevista.

Padrões de comunicação e suas aplicações

Sistemas de informação laboratorial devem trocar dados com muitos outros sistemas de informação. Cada sistema armazena suas informações de um modo único que suporta sua função especial (p. ex., faturamento, registro, SIH etc.). Historicamente, cada vez que dados tiveram de ser trocados entre dois sistemas disparates, uma interface personalizada separada teve de ser desenvolvida para cada um dos sistemas. Essa interface "ponto a ponto" (p. ex., SIL – SIH) demandava tempo, era complexa e de manutenção cara. Para solucionar essa questão, protocolos de comunicação foram desenvolvidos para padronizar trocas de dados em vez de aplicações. Esses padrões apresentam dois benefícios importantes: (1) simplificam e diminuem o tempo para o desenvolvimento de interfaces; e (2) reduzem o número de interfaces ao eliminar a troca de dados "ponto a ponto" e ao substituí-la por um mecanismo de interface (Fig. 11.5). O mecanismo de interface é um "controlador de tráfego" de dados; é um sistema computadorizado eficiente que serve como uma central para trocar e "rotear" dados entre vários sistemas de informação. Ele também pode manipular dados a fim de garantir que eles estejam no formato correto para cada sistema. Considere o exemplo a seguir. Sem padrões de comunicação e um mecanismo de interface, um hospital teria de desenvolver várias interfaces para transmitir resultados laboratoriais: SIL – SIH, SIL – faturamento e SIL – EDR. Cada interface teria de ser desenvolvida e mantida separadamente, e cada novo sistema de informação exigiria uma outra interface. Com um mecanismo de interface, existe apenas uma interface com o laboratório: SIL – mecanismo de interface. Quando um novo sistema de informação é adicionado, ele também pode receber resultados laboratoriais do mecanismo de interface sem que haja necessidade, por parte do laboratório, de desenvolver uma nova interface.

Existem diferentes padrões de comunicação para ajustar as várias etapas da transmissão de dados. Por exemplo, para que um técnico visualize dados no SIL que foram transferidos por um analisador, os dados devem ser movidos sequencialmente através de vários dispositivos que controlam a sua atividade: analisador, dispositivo servidor do terminal de rede, *switch* (ou *hub*) de rede, SIL, rede e computador pessoal. O desenvolvimento da transmissão de dados através dessas etapas seria muito laborioso sem protocolos-padrão de comunicação de dados.

Usuários, vendedores e consultores adotam voluntariamente protocolos-padrão de comunicação. Alguns dos protocolos mais populares

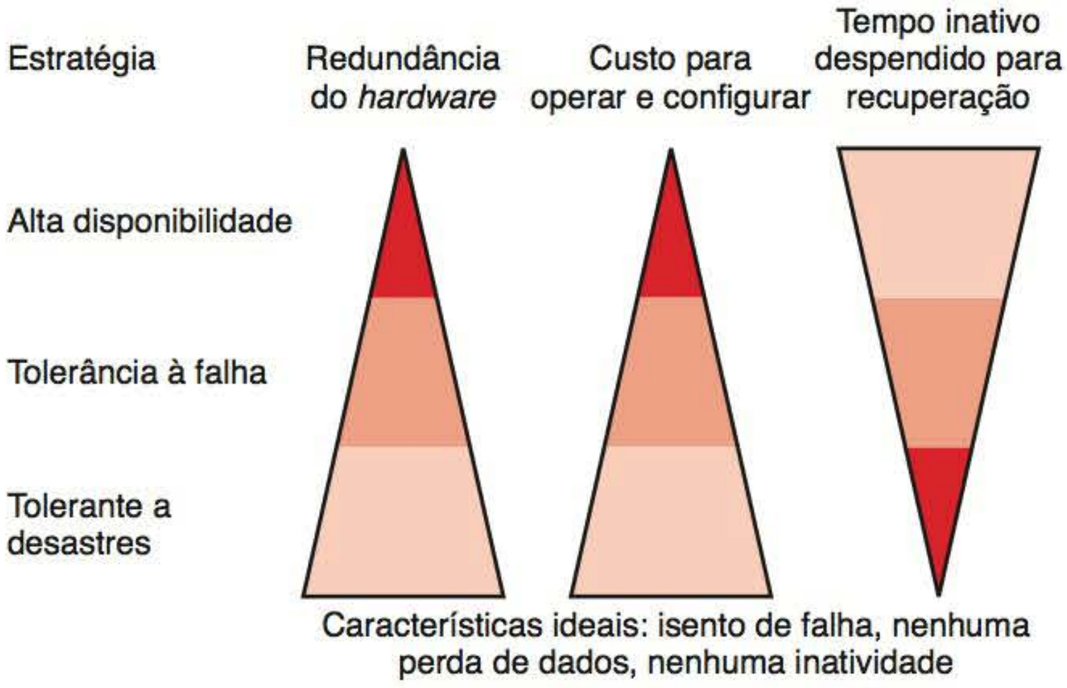


Figura 11.4 Estratégia de recuperação de desastres.

incluem o HL7 (Health Level 7), utilizado para o interfaceamento de dados laboratoriais ao nível de aplicação (p. ex., SIH – SIL), o ASTM (American Society for Testing and Materials), frequentemente utilizado para o interfaceamento de dados laboratoriais entre analisadores e sistemas de informação laboratorial, e o TCP/IP (uma combinação de Transmission Control Protocol e Internet Protocol), utilizado para conectar sistemas de informações a dispositivos de rede, outros sistemas de informação, mecanismos de interface, analisadores, computadores pessoais e impressoras. Para o propósito de troca de dados, registros podem ser formatados numa variedade de estilos. Eles estão ilustrados na Tabela 11.6.

Health Level Seven (HL7)

A indústria da saúde criou vários padrões para facilitar a troca de informações entre aplicações computadorizadas para pacientes ambulatoriais e pacientes internados, como registro do paciente (p. ex., admissão, alta e transferência), sistemas de informação clínica (p. ex., SIH), faturamento, laboratório clínico e radiologia. O mais prevalente desses padrões é o Health Level Seven (HL7). Consulte o site http://www.hl7.org. Trata-se também do nome da organização que desenvolveu e continua a modificar esse padrão. O modelo Open System Interconnection (OSI) da International Organization for Standardization (ISO) é um padrão de rede que define como os dados são movidos de uma aplicação para outra num computador diferente. O OSI separa a troca de dados em sete etapas ou níveis, cada um deles relacionado ao *software* ou ao *hardware*. A última etapa ou nível mais alto é o sete (Level Seven), que aborda três questões relacionadas ao *software*: definição do dado a ser trocado, programação do momento das trocas e comunicação de erros entre aplicações. O HL7 define os padrões para a troca de dados nível 7 da saúde. O HL7 geralmente é utilizado para estabelecer uma interface entre o SIL e o SIH ou de um laboratório de referência. Ele também é utilizado com o LOINC (ver abaixo) para relatar eletronicamente vários dados de doenças de notificação obrigatória para departamentos estaduais e órgãos federais da saúde.

Definição dos dados que serão trocados. O HL7 compila dados em mensagens que são construídas de acordo com padrões específicos. Existem dois tipos de mensagens. Uma mensagem exibida contém informações que o remetente formata somente para exibição ou impressão. Como a mensagem não é subdividida em campos distintos, o sistema recebedor não consegue capturar a informação ou manipular os dados. Em contraste, uma mensagem orientada ao registro consiste em elementos distintos que podem ser capturados pelo sistema recebedor e manipulados em seus próprios relatórios. Cada mensagem é subdividida em segmentos, e cada segmento é dividido em campos. Cada transação ou evento é definido pelo formato de sua mensagem. Por exemplo, existem mensagens separadas para solicitação de exames, resultados laboratoriais, consulta de resultados, admissão, alta e transferência. A Figura 11.6 mostra como uma mensagem de resultado laboratorial HL7 é dividida em segmentos e campos de dados.

Programação da troca de dados e rastreamento de erros. Eventos disparadores determinam quando uma mensagem é enviada. Uma mensagem pode ser enviada ou agrupada com outras mensagens e enviada de uma só vez. Por exemplo, um resultado laboratorial pode ser enviado para o SIL assim que ele se torna disponível.

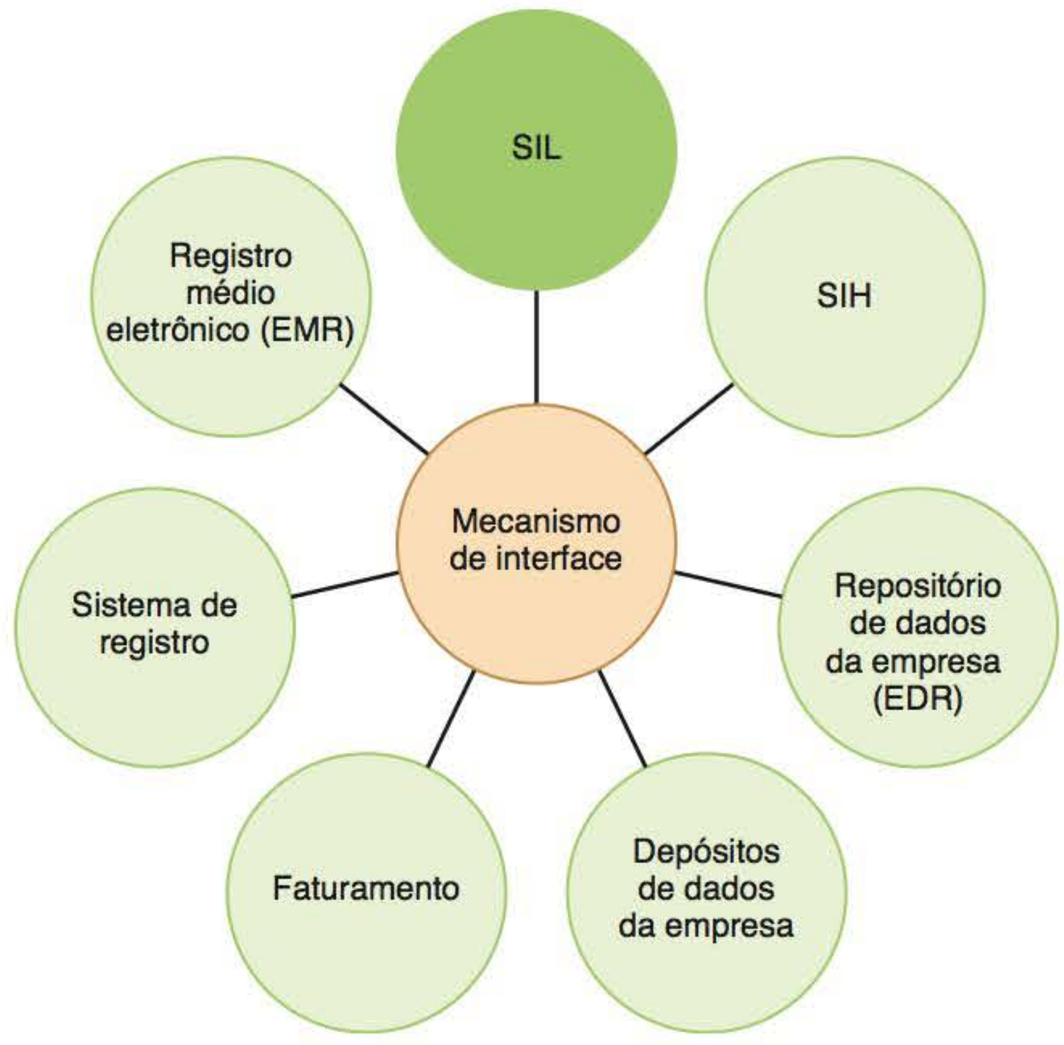


Figura 11.5 O sistema de informação laboratorial (SIL) troca informações com outros sistemas através de um mecanismo de interface (ver texto). Observe que o sistema recebe dados sobre o paciente e a admissão/alta/transferência (do sistema de registro) e solicitações eletrônicas de exames de pacientes hospitalizados (do sistema de informação hospitalar [SIH]) e de pacientes ambulatoriais (do prontuário médico eletrônico). Ele também envia resultados para vários sistemas.

Por outro lado, mensagens de faturamento de exames laboratoriais podem ser agrupadas antes de serem enviadas para o sistema financeiro uma vez ao dia. O HL7 também pode definir se uma mensagem é uma resposta a uma consulta ou uma atualização não solicitada. Por exemplo, cada vez que um exame é solicitado no sistema clínico, uma mensagem de solicitação laboratorial (atualização não solicitada) pode ser enviada para o sistema laboratorial. O HL7 também define como mensagens de erro são comunicadas. Quando a informação é trocada entre dois sistemas, o sistema receptor deve validar que ela possui todas as informações necessárias e enviar uma mensagem para o primeiro sistema, indicando que a transmissão foi bem-sucedida ou que ocorreu um erro e estão faltando dados.

LOINC

LOINC é o acrônimo de Logical Observation Identifier Names and Codes. Estritamente falando, não se trata de um padrão de comunicação, e sim de um padrão de nomenclatura (McDonald, 2003). A popularidade do LOINC vem aumentando, em particular onde existe uma necessidade de troca de dados em nível nacional. Ele foi adotado por grandes laboratórios de referência, hospitais e várias agências governamentais. Fornece um conjunto de nomes e códigos universais para identificação de resultados de exames laboratoriais e clínicos. O objetivo é facilitar a troca e o agrupamento de resultados, como hemoglobi-

Tabela 11.6 Formatos de registro de dados comumente utilizados na transmissão de dados do sistema de informação laboratorial (SIL)

Tipo de registro (formato *flat file*)	Aplicação comum	Atributos
Comprimento fixo, tipo coluna	Importação para processadores de texto ou planilhas	Um registro por transação, conteúdo e solicitação fixos
Comprimento variável, delimitado por vírgula	Importação para processadores de texto ou planilhas	Um registro por transação, menor que o tipo coluna, conteúdo e solicitação fixos
Centrado no registro	Instrumento (ASTM) ou interface do sistema de informação hospitalar (HL7)	Diversos registros necessários para uma transação, inadequado para geração de relatórios *ad hoc*. Solicitação fixa em um registro
Centrado no campo	Instrumento ou interface do sistema de informação hospitalar (XML)	Flexibilidade máxima no conteúdo da transação e na solicitação, inadequado para a geração de relatórios *ad hoc*

na sérica ou potássio sérico, para tratamento clínico, gerenciamento de resultados e pesquisa. Por exemplo, serviços estaduais de saúde podem compilar mais prontamente informações sobre doenças transmissíveis quando cada laboratório envia informações de forma eletrônica, utilizando o mesmo código LOINC em vez de muitos nomes ou códigos diferentes para descrever cada código.

Existem mais de 25.000 códigos LOINC relacionados ao laboratório (http://www.regenstrief.org/loinc). Cada registro LOINC inclui campos para especificação de várias características (Tabs. 11.7 e 11.8). Para auxiliar serviços locais no mapeamento de seus códigos locais de exames aos do LOINC, um programa de mapeamento chamado Regenstrief LOINC Mapping Assistant (RELMA) está disponível gratuitamente (http://www.regenstrief.org/loinc). Embora os códigos LOINC tenham sido desenvolvidos, no início, para observações de um único exame (p. ex., resultados do potássio sérico), eles também podem ser utilizados para a solicitação do exame. A base de dados do LOINC também contém vários painéis comuns padronizados (p. ex., gasometria, hemograma e contagem diferencial). Alguns fabricantes de instrumentos começaram a fornecer códigos LOINC como parte do resultado que é enviado para o SIL. Isso diminui o trabalho de mapeamento que, caso contrário, teria de ser realizado pelo laboratório.

O LOINC e o HL7 se complementam. A base de dados do LOINC destina-se a fornecer o código do exame para o campo identificador (OBX-3) das mensagens de resultado laboratorial do HL7 (Fig. 11.7) e mensagens DICOM (ver abaixo).

Observe que a mensagem de resultado HL7 contém campos separados para o relatório de vários dados de resultados. Além do campo OBX-3, que identifica o exame, existem campos separados para o valor do resultado, da unidade de medida, dos sinalizadores etc.

Tabela 11.7 Partes de um nome LOINC

Parte	Exemplo
Componente (analito)	Potássio, hemoglobina, antígeno da hepatite C
Propriedade mensurada	Concentração de massa, atividade enzimática
Tempo	Período de tempo (p. ex., 24 horas)
Sistema (amostra, órgão)	Urina, soro, sangue total
Escala	Quantitativa, ordinal (1+, 2+), qualitativo (turva), nominal (*E. coli*)
Método (se necessário)	Radioimunoensaio (RIE) (somente utilizado para diferenciar métodos que produzem resultados diferentes clinicamente significativos)

Tabela 11.8 Exemplos de LOINC

Código	Componente	Propriedade	Tempo	Amostra	Escala
2951-2	Sódio	SCNC	PT	SER/PLAS	QN
3665-7	Nível mínimo de gentamicina	MCNC	PT	SER	QN

Nome LOINC	Siginificado do nome
SODIUM:SCNC:PT:SER/PLAS:QN	Sódio: concentração da substância: período aleatório: soro/plasma: quantitativo
GENTAMICIN^TROUGH: MCNC:PT:SER:QN	Nível mínimo de gentamicina: concentração de massa: período aleatório: soro: quantitativo

Nota: dois-pontos separam cada parte do nome LOINC e ^ separa as subpartes.

Outros padrões

O padrão Clinical Context Object Workgroup (CCOW) (http://www.ccow-info.com), baseado na arquitetura de gerenciamento do contexto (CMA, *context management architecture*), permite que informações em aplicações da saúde separadas sejam sincronizadas, de modo que cada aplicação refira-se de modo automático e contínuo ao mesmo paciente, exame ou evento. Por essa razão, podemos ver os dados laboratoriais atuais de um paciente internado no SIL e, em seguida, alternar para o repositório de dados eletrônicos para ver os dados laboratoriais ambulatoriais do ano anterior do mesmo paciente (sem ter de selecionar novamente o paciente). Esse padrão pode ser utilizado com um único procedimento de acesso que permite ao usuário acessar várias aplicações. Isso aumenta a segurança e a conveniência por causa da utilização de um único nome de usuário e de uma única senha. De modo geral, o CCOW é um meio seguro de se implantar a interoperabilidade entre tecnologias novas e antigas e diversos fabricantes.

O Digital Image Communications in Medicine (DICOM) (http://www.hl7.org/standards/dicom.htm) é o padrão mundial emergente para troca de imagens médicas e informações relacionadas através de plataformas. O Visible Light Supplement 15 é uma extensão do DICOM, destinado à patologia e à medicina laboratorial que especifica uma estrutura de codificação diagnóstica para imagens macro e microscópicas e dados associados. Um módulo adicional relacionado à patologia, Structured Reporting Supplement, incorpora a medicina laboratorial e os conceitos específicos da patologia, como números de acesso, faixas de referência e códigos internacionais da nomenclatura sistematizada da medicina (SNOMED) (http://www.snomed.at/) no repertório DICOM. Ele destina-se a complementar o padrão de luz visível, o qual codifica informações como especificações do dispositivo de captura, magnificação, descrições macro e microscópicas e informações diagnósticas. Esses dois suplementos destinam-se a atuar juntos para fornecer um formato de dados completamente interoperáveis da troca contínua de informações entre sistemas de informação laboratorial díspares.

Um padrão de convergência da informática provê uma via para a verdadeira interoperabilidade do prontuário médico eletrônico do paciente. Por exemplo, o HL7, o DICOM e o LOINC são padrões

Transação

```
MSH|^~\&|LIS|HC1|OCF|OCF|20040906000031||ORU^R01|13|P|2.2|
PID|||123456789^^^HC1||PATIENT^NEW^||19561016|M|^^|||||||0000012692642 49^^^HC1|195529345|
PV1||IP|4G^G0422-06||||51900^PHYSICIAN^FIRST^^^^^^MPACCOMM|15160^DOCTOR^SECOND^^
^^^^MPACCOMM|||||||||IP|||||||||||||||||||||||200409040000||
ORC|RE||P286688|||||||51900^GOOD^DO^^^^^^MPACCOMM||||^|
OBR|1||12579528|GASAP^Arterial Blood Gas(ICU) ^GASAP|||200409052355||||||200409052356|^^
|51900^DOCTOR^ORDER^^^^^^MPACCOMM||||X14004||||PI|F||^^^^R|^~^~^|^12579528|||||
OBX|1|NM|PHAP^pH-Arterial^PHAP|1|7.39||7.35–7.45|||F|||200409052359|NICUL^NEW ICU LAB ||
...
OBX|6|NM|FIO2P^Fraction of Inspired O2^FIO2P|1|100|%||||F|||200409052357|NICUL^NEW ICU LAB ||
```

Figura 11.6 Transação de resultado HL7 de uma solicitação de gasometria arterial. Observe que a mensagem é dividida em segmentos: *Message Header* (MSH); *Patient Identification* (PID); *Patient Visit* (PV1); *Common Order* (ORC); *Order* (OBR); e *Result* (OBX). A gasometria apresenta seis resultados. Cada um é incluído num OBX separado, embora somente o primeiro e o sexto sejam apresentados aqui.

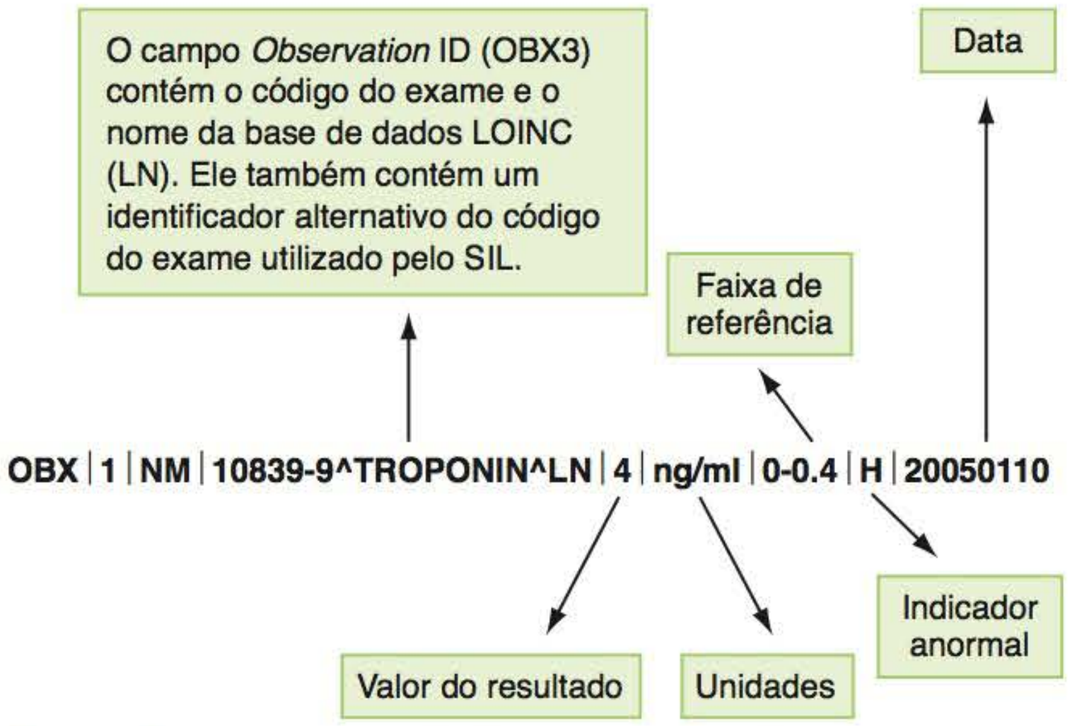


Figura 11.7 Como o LOINC é utilizado em uma mensagem de resultado HL7.

inter-relacionados para dados da saúde. Similarmente, para dados pesquisáveis, o XML (*extensible markup language*) apresenta uma grande promessa de se tornar o padrão, através do qual informações textuais são codificadas num formato que pode ser pesquisado (Dolin, 1998; Sokolowski, 1999). O XML descreve os dados que o HTML mostra. Com a criação do prontuário médico eletrônico unificado, podemos atingir a capacidade de troca mundial de todas as categorias de informações médicas. O aplicativo que poderá permitir essa troca, o SNOMED-RT, um produto do College of American Pathologists, visa ser um dicionário multilínguas que abrange a terminologia médica. Como o vocabulário do SNOMED está sendo traduzido para muitos idiomas, talvez ele acabe sendo utilizado com os padrões acima para converter registros médicos completos de um idioma a outro.

Referências bibliográficas

Aller RD: Connectivity from source to action. Clin Chemistry 2001; 47(8):1521–1525.

Backer HD, Bissel SR, Vugia DJ: Disease reporting from an automated laboratory-based reporting system to a state health department via local county health departments. Public Health Rep 2001; 116:257–265.

Balis UJ: Informatics training in U.S. pathology residency programs. Results of a survey. Am J Clin Pathol 1993; 100(Suppl 1):S44–S47.

Connelly DP: Outcomes and informatics. Arch Pathol Lab Med 1997; 121: 1176–1182.

Dolin RH, Rishel W, Biron PV, et al: SGML and XML as interchange formats for HL7 messages. Proc AMIA Symp 1998; :720–724.

Effler P, Ching-Lee M, Bogard A, et al: Statewide system of electronic notifiable disease reporting from clinical laboratories: comparing automated reporting with conventional methods. JAMA 1999; 282:1845–1850.

Elevitch FR: Prospecting for gold in the data mine. Clin Lab Med 1999; 19:373–384.

Fritsche L, Schlaefer A, Klemens B, et al: Recognition of critical situations from time series of laboratory results by case-based reasoning. J Am Med Inform Assoc 2002; 9:520–528.

Lazarus R, Kleinman KP, Dasevsky I, et al: Using automated medical records for rapid identification of illness syndromes (syndromic surveillance): the example of lower respiratory infection. BMC Public Health 2001; 1:9.

Lowe HJ, Antipov I, Walker WK, et al: WebReport: A World Wide Web based clinical multimedia reporting system. Proc AMIA Annu Fall Symp 1996; 314–318.

McDonald CJ, Huff SM, Suico JG, et al: LOINC, a universal standard for identifying laboratory observations: a 5-year update. Clinical Chemistry 2003; 49:624–633.

Trata-se de uma excelente visão geral (e muito bem escrita) sobre LOINC, incluindo seu propósito e estrutura. Também inclui exemplos úteis que explicam o código LOINC.

NCCLS: Laboratory Automation: Bar Codes for Specimen Container Identification; Approved Standard. Document AUTO2-A [ISBN 1-56238-414-7, ISSN 0273-3099] Wayne, PA, NCCLS, 2000.

Sokolowski R, Dudeck J: XML and its impact on content and structure in electronic health care documents [in process citation]. Proc AMIA Symp 1999: 147–151.

Stern, L, Lightfoot D: Automated outbreak detection: a quantitative retrospective analysis. Epidemiol Infect 1999; 122:103–110.

White MD: Evaluation of vocabularies for electronic laboratory reporting to public health agencies. J Am Med Inform Assoc 1999; 6:185–194.

Wright MO, Perencevich EN, Novak C, et al: Preliminary assessment of an automated surveillance system for infection control. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25:325–332.

Yearworth M, Battle S: Workflow management for multimedia information in clinical laboratories. Comput Meth Progr Biomed 1998; 55:1–9.

CAPÍTULO 12

Administração financeira

Mark L. Jaros MBA MT(ASCP), Mark S. Lifshitz MD, Robert P. De Cresce MD MBA MPH

Visão geral da indústria 142
Definição e identificação de despesas 143
Receita 144
Pagadores e reembolso 145
Seguro privado 145
Contribuintes do governo 146
Sistemas de codificação de reembolso 147
A importância de um código correto acurado 147
Reembolso Medicare 147
Desempenho e monitoramento financeiro 149
Estimativa orçamentária 149
Análise de variância 150
Relatório e declaração financeira 150
Medidas de *benchmarking* e produtividade 151
Avaliação de um projeto orçamentário 151
Tempo de *payback* 152
Ponto de equilíbrio 152
Retorno do investimento (RDI) 152
Valor atual líquido (VAL) 152
Taxa interna de retorno 153
Interpretação dos cálculos financeiros 153
Métodos de aquisição de capital 153
Criação de valor financeiro/conclusões 154
Referências bibliográficas 154

PONTOS-CHAVE

- Os custos podem ser descritos de diferentes maneiras, dependendo de estarem diretamente relacionados às operações laboratoriais (diretas/indiretas), mudarem proporcionalmente com o volume de testes (variável/fixo), serem referentes aos funcionários (salariais/não salariais) ou estarem relacionados à vida útil de suprimentos ou equipamentos (operante/capital). O custo por resultado comunicável é um indicador fundamental.
- Nos Estados Unidos, o reembolso por serviços laboratoriais é concedido principalmente por pagadores terceirizados, como o Medicare (governo) e companhias prestadoras de assistência (não governamentais/seguradoras particulares), sendo que os pagamentos quase sempre são inferiores às despesas.
- Os custos dos testes laboratoriais de pacientes internos geralmente não são reembolsados, pois considera-se que fazem parte da taxa de diária (i. e., taxa de reembolso de diária hospitalar) ou da taxa cobrada por grupo diagnóstico (DRG, *diagnostic-group related*; i. e., uma taxa estabelecida para a estadia hospitalar completa, independentemente de sua duração). Assim, o teste laboratorial para pacientes internos é considerado um "centro de custos". Ao contrário, as taxas cobradas pelos testes laboratoriais de pacientes externos (ambulatoriais) são reembolsadas à parte, de modo que tais testes são considerados "centros de receita".
- Para fins de reembolso, os códigos CPT (Current Procedure Terminology) descrevem testes, enquanto os códigos do ICD-9 (International Classification of Disease – 9th revision) descrevem diagnósticos clínicos. As exigências das necessidades médicas podem restringir o reembolso somente aos testes associados a diagnósticos pré-definidos específicos.
- A realização da estimativa orçamentária é o processo de planejamento, previsão, controle e monitoramento dos recursos financeiros de uma organização.
- Uma variedade de ferramentas financeiras é empregada na avaliação de um projeto orçamentário, como a aquisição de um analisador químico, por exemplo. Essas ferramentas estimam quanto tempo será necessário para recuperar o capital investido (*payback*), qual será o rendimento (em dólares correntes) proporcionado pelo investimento (valor atual líquido) e sua taxa de retorno (taxa interna de retorno).
- Os equipamentos do laboratório podem ser adquiridos de diversas maneiras, incluindo compra e arrendamento. Cada caso apresenta vantagens e desvantagens.

Toda organização, independentemente dos produtos ou serviços que fornece, deve preocupar-se com a administração, fiscalização e contabilidade de seus recursos financeiros. Para manter-se como entidade viável, uma organização não pode somente reaver os custos operacionais, mas deve também apresentar uma receita líquida positiva que lhe permita fazer novos investimentos em si mesma, a fim de permanecer competitiva. O laboratório não constitui exceção. Para obter sucesso na administração financeira de um laboratório, o diretor/gerente deve ser capaz de identificar e classificar os custos, compreender as relações existentes entre receita e reembolso, estar familiarizado com o processo de elaboração de orçamentos e utilizar indicadores financeiros e informações para tomar decisões de repercussão. A credibilidade de administradores e colegas demanda que o diretor/gerente deve estar confortável e confiante ao explicar questões financeiras ou justificar a necessidade de recursos extras.

Visão geral da indústria

A maioria das indústrias nos Estados Unidos está submetida à competição de mercado livre tradicional. Entretanto, este princípio não se aplica à assistência à saúde, uma vez que, entre os inúmeros usuários, são poucos os que pagam diretamente por esse tipo de serviço. A maioria possui benefício de algum seguro-saúde e isto, combinado ao crescente número de indivíduos sem nenhum tipo de cobertura ou precariamente assegurados, tem conduzido a um sistema que presta serviços mesmo sem remuneração adequada. A maioria dos direitos médicos é paga por um "terceiro", como o governo (Medicare, Medicaid) ou uma companhia seguradora particular. Assim, há sempre mais alguém, além do paciente, pagando o médico (Snyder, 1998).

A indústria da assistência à saúde é uma das maiores indústrias dos Estados Unidos, e continua sendo um setor em expansão do produto interno bruto (PIB), passando de 5,1% (27 bilhões de dólares) em 1960 para 14,9% (1,5 trilhões de dólares) em 2002 (CMS, 2004). Os hospitais continuam sendo a força motriz por trás do aumento dos custos da assistência à saúde. A maioria dos hospitais americanos são entidades sem fins lucrativos, isentas da cobrança de impostos. Embora a classificação "sem fins lucrativos" implique a inexistência de lucros, na verdade significa que os rendimentos da instituição não são divididos entre seus donos ou acionistas; em vez disso, todo o saldo positivo é reinvestido na própria organização. Historicamente, o *status* de "sem fins lucrativos" faz com que os administradores do hospital sejam menos conscientes em relação aos lucros, comparados aos colegas administradores de outros negócios. Contudo, os hospitais atuais têm atravessado

um momento difícil apenas cobrindo os custos operacionais, devido ao encolhimento dos reembolsos e aos custos cada vez maiores dos suprimentos e da mão de obra. Contando com poucos recursos para reinvestir capital em equipamentos, construção de prédios, instalações e tecnologia, os hospitais têm procurado agressivamente novos meios de gerar lucros para investimentos futuros.

Definição e identificação de despesas

Uma despesa (custo) é o dinheiro empregado na aquisição de suprimentos, mão de obra e despesas gerais requeridas por um dado produto ou serviço. É importante conhecer os custos para estabelecer adequadamente os preços dos testes e demais serviços prestados, determinar quando e como oferecer novos testes e optar pela expansão do negócio ou a assinatura de contrato assistencial. As despesas podem ser classificadas de diversos modos (ver Tab. 12.1).

Despesas diretas são as que podem ser facilmente projetadas de forma direta para um produto final. No cenário laboratorial, o produto final corresponde a um teste passível de cobrança. São considerados os reagentes, material de consumo e horas de trabalho do tecnólogo. Por outro lado, as *despesas indiretas* não estão relacionadas a um teste cobrado, mas são necessárias para a sua execução. Muitas vezes, as despesas indiretas são referidas como despesas gerais. Alguns exemplos são o teste de proficiência e as despesas com serviços de utilidade pública.

Despesas variáveis são aquelas que mudam proporcionalmente com o volume de testes. À medida que o volume de testes aumenta, as despesas com reagentes também sobem. Se um dado reagente representa um custo de 1 dólar por teste realizado, quando 1.000 testes forem realizados, o custo com o mesmo reagente será de 1.000 dólares; quando 20.000 testes forem realizados, os gastos com esse reagente subirão para 20.000 dólares. As *despesas fixas* são aquelas que, ao contrário, não sofrem alterações de acordo com o volume de testes realizados. Assim, se um dado laboratório paga 5.000 dólares pelo aluguel do estabelecimento, esta despesa permanecerá a mesma se forem realizados 1.000 ou 20.000 testes em um mês (Fig. 12.1). Como as despesas fixas não variam com a atividade, a meta é alcançar a máxima produtividade a partir das despesas fixas visando a obtenção de economias de escala. Quanto maior for a produção, menor será a *despesa fixa por atividade*. No cenário anterior, se um dado laboratório tivesse produzido 1.000 testes a um custo de 5 dólares o teste, ao produzir 20.000 testes, o custo por teste cairia para 0,25 centavos de dólar. Observe que até mesmo algumas despesas fixas possuem um componente variável. Por exemplo, se um instrumento tem capacidade para realizar 20.000 testes por mês e a demanda ultrapassar esse limite, será necessário adquirir outro instrumento e, assim, as despesas fixas por teste aumentarão. As despesas fixas que mudam com incrementos de volume são denominadas *despesas escalonadas*.

As *despesas salariais* devem ser consideradas de modo diferente das *despesas não salariais*. As despesas salariais estão associadas a benefícios extras. Os gastos com salários representam cerca de 50 a 70% do orçamento do laboratório. Esses gastos geralmente são fixos e, portanto, é importante esforçar-se para obter economias de escala. Os proventos de um funcionário que recebe por hora ou que é assalariado não correspondem totalmente às despesas trabalhistas. Benefícios extras, como seguro social, seguro-saúde, reembolso de matrícula, planos de pensão e seguro de vida, podem representar uma despesa adicional de 16 a 28% acima da base salarial (Travers, 1997). Além disso, o custo trabalhista total não se limita apenas ao salário e aos benefícios extras. Existem despesas associadas à contratação, entrevista e processo seletivo. Uma vez contratado o funcionário, incorrem gastos com orientação, treinamento e crescimento/desenvolvimento contínuo.

Despesas operacionais são gastos que decorrem da fabricação de um produto ou prestação de um serviço. Muitos itens são produzidos ou utilizados uma única vez e, em seguida, perdem seu valor. Exemplos de despesas operacionais com itens de utilização única são gastos com reagentes, eletricidade, pipetas descartáveis e despesas salariais com a realização de um determinado teste. Outros itens, como equipamento analítico, computadores e planta física do laboratório, possuem uma vida útil maior que apenas um único ciclo de produção, sendo considerados capitais. Para que um item seja classificado como *capital*, deve obedecer a três critérios: duração, preço e utilidade. Para atender ao critério da duração, o item precisa ter uma vida útil maior que 1 ano. Com relação ao quesito preço, a instituição deve designar uma quantia

Tabela 12.1 Classificação de despesas

	Direta	Indireta	Variável	Fixa	Salarial	Não salarial	Operacional	Capital
Reagentes	■		■			■	■	
Teste de proficiência		■		■		■	■	
Serviço de análise		■		■		■	■	
Analisador		■		■		■		■
Equipe de testes	■			■	■		■	
Equipe administrativa		■		■	■		■	
Aluguel		■		■		■	■	

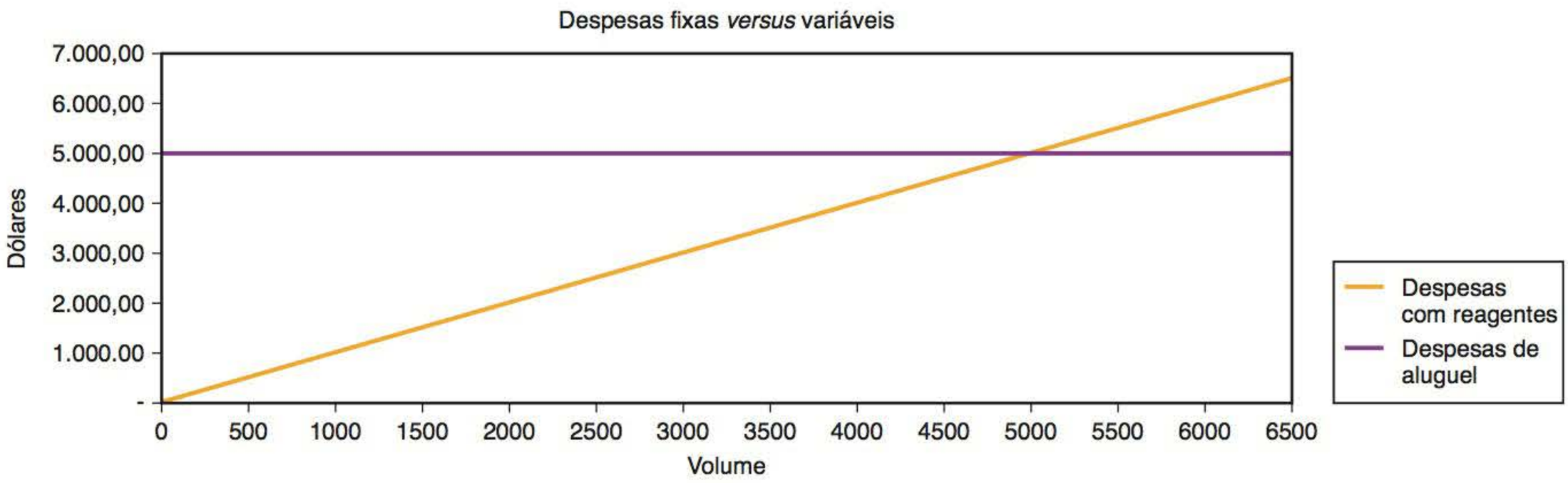


Figura 12.1 Despesas fixas *versus* variáveis. Despesas fixas, como aluguel, permanecem constantes. Despesas variáveis, como reagentes, são proporcionais ao volume de testes.

mínima em dólares (usualmente, 1.000 a 5.000 dólares) que, uma vez excedida, qualifica um item como capital. Por fim, quanto à utilidade da aquisição, um item considerado capital deve ser adquirido para substituir um equipamento não operacional, utilizando modelos mais seguros e eficientes, e para implantar novo equipamento de suporte a novos produtos ou serviços. O equipamento capital perde seu valor com o passar do tempo. A perda de valor anual de um item capital é chamada de *depreciação* e constitui um gasto anual, isto é, uma despesa com capital que é deduzida da receita da empresa. A depreciação não representa uma despesa em caixa, ou seja, não se "paga por ela" a cada ano, mas não deixa de ser uma despesa real, visto que representa o "desgaste" de um ativo que foi adquirido com dinheiro e que eventualmente precisará ser substituído. Um analisador que ainda não foi totalmente depreciado, tem "valor contábil". Note que as despesas operacionais e as despesas com capital são orçadas separadamente (ver a seguir).

As despesas geradas pela realização de um teste podem ser derivadas de diversas formas. O *microcusteio* estabelece quais serão os gastos totais com mão de obra direta e suprimentos necessários à realização do teste, sendo o ponto de partida para determinar a despesa total e o preço final a ser cobrado por teste realizado. A maioria dos testes do laboratório clínico é realizada em lotes ou "corridas" contínuas de muitas amostras em um ou mais turnos. Uma corrida pode ser composta por um grupo de testes realizados uma ou várias vezes a cada turno ou no decorrer de um período de 24 horas. Em uma corrida, estão inclusos todas as despesas com controle de qualidade e calibração necessárias à produção dos resultados de pacientes. Ao realizar o microcusteio de um teste, é importante considerar o modo como esse teste é conduzido, visto que as despesas com mão de obra e suprimentos variam de acordo com o fluxo de trabalho e a política do laboratório referente ao controle de qualidade e repetição de testes. A *despesa por resultado comunicável* (DRC) distribui as despesas diretas totais de uma corrida aos resultados de paciente "comunicáveis" gerados por essa mesma corrida. O teste de eficiência é definido pela proporção número total de resultados de paciente comunicáveis/número total de resultados do teste. Assim, quanto mais repetições forem realizadas e mais controles forem adicionados, menor é a eficiência e maior é a DRC. À medida que a eficiência do teste aumenta, a DRC diminui. A *despesa de incrementação* representa o gasto gerado pela produção de um teste adicional que, tipicamente, não requer pagamento de salário nem capital extra. Por exemplo, a despesa de incrementação da realização de um teste bioquímico usualmente refere-se ao gasto com reagentes utilizados no teste adicional, considerando que não há despesas geradas pela coleta da amostra. Outros gastos associados, como horas de trabalho do tecnólogo, equipamento, controle de qualidade etc., constituem despesas fixas que incorrem independentemente do teste adicional. A despesa de incrementação costuma ser o menor gasto possível que se tem com a produção de um resultado, sendo melhor empregada como parâmetro para avaliar o modo como se torna oneroso adicionar pequenos incrementos ao volume de testes. À medida que esse volume aumenta, o laboratório passa a necessitar de mais funcionários e equipamentos, de modo que estas despesas têm que ser incluídas na análise de custeio de incrementação. O custeio de incrementação é especialmente útil quando se tenta determinar se a expansão do trabalho é ou não rentável. A *despesa total acumulada* gerada pela realização de um teste inclui todas as despesas diretas e indiretas. A alocação de despesas indiretas usualmente é feita com auxílio de uma fórmula, e objetiva aplicar tais despesas com base na correlação mais forte existente entre a despesa indireta e aquilo que está sendo aplicado. Por exemplo, os serviços de utilidade pública poderiam se basear na metragem quadrada departamental, enquanto as despesas de recursos humanos poderiam se basear no número de funcionários do departamento. Decisões do tipo *produzir vs. comprar* devem ser consideradas quando a despesa total acumulada de um teste for maior que o preço oferecido por um comerciante ou laboratório de referência. Se for mais caro realizar um teste do que encomendá-lo a outro fornecedor, deve ser considerada a possibilidade de terceirizar esse teste. Ao analisar as decisões do tipo produzir *vs.* comprar, o custo é o único fator a ser considerado. O tempo de resposta, a metodologia e a confiabilidade de um potencial fornecedor alternativo também devem ser considerados. O preço cobrado por um teste tem de ser reajustado com base na despesa total acumulada para que gere lucros. A *margem de contribuição* é o equilíbrio remanescente depois que as despesas totais acumuladas são deduzidas do preço cobrado por um teste. A Tabela 12.2 lista vários modos de determinar o custo de um teste e de como estabelecer o preço a ser cobrado para realizá-lo.

O *custo total de propriedade* (CTP) para um laboratório representa o custo do ciclo de vida dos ativos de seu capital. O CTP se concentra na soma de todas as despesas referentes à aquisição e manutenção de todos os ativos para um determinado serviço ou produto, em oposição ao capital inicial ou às despesas operacionais. No laboratório, o CTP inclui a aquisição, estabelecimento (construção, treinamento), suporte (pedidos de suprimentos, providenciar devoluções de pedidos), manutenção contínua (tempo ocioso programado ou não), atendimento e gastos operacionais (reagentes, controles, repetição de testes, controle de inventário, testes de proficiência, testes de pessoal, pessoal de supervisão) de uma bancada específica, bem como os testes de instrumentação associados. Trata-se de uma ferramenta útil na determinação de decisões do tipo produzir *vs.* adquirir, mas estabelecer um CTP preciso pode ser muito difícil.

Receita

A receita é o preço total dos serviços prestados ou dos produtos vendidos. É o dinheiro que um negócio deve receber pelos serviços e produtos que fornece. Na assistência à saúde, a receita não deve ser confundida com reembolso nem dinheiro arrecadado. A *receita bruta advinda de pacientes* representa os encargos totais diante das taxas determinadas pelo

Tabela 12.2 Análise de custos dos testes*

Teste: antígeno específico da próstata

A. Microcusteio: corrida de um teste comunicável no instrumento

Mão de obra direta

Determinar o tempo total de "prática" (em minutos) necessário para executar uma "corrida" de teste de paciente. Considerar que a mão de obra custa 20 dólares/hora

	Minutos	Despesa
Preparo da amostra	5	
Preparo de reagentes	10	
Preparo do instrumento	10	
Estabelecer os parâmetros no computador e/ou na planilha de trabalho	5	
Registro do resultado/CQ/manutenção	10	
Limpeza	10	
Total da mão de obra direta	50	$16,67

Suprimentos diretos

Listar todos os itens de material de consumo necessários à realização do teste. Observe que são necessários 4 testes (1 amostra e 3 controles) para produzir um único resultado de paciente comunicável. Os gastos com calibração devem ser adicionados, caso sejam necessários, a cada corrida

	Custo unitário	Unidades	Despesa
Reagente ($ 700 o kit/100 testes)	$7	4	$28,00
Pipetas descartáveis ($ 10/100 pipetas)	$0,10	4	$0,40
Frascos de reagente descartáveis ($ 10/200 frascos)	$0,05	4	$0,20
Material de controle baixo, intermediário e alto (0,05 ml/teste a $ 20/ml)	$1	3	$3,00
Total de suprimentos diretos			$31,60
Total de despesas diretas			$48,27
Custo por resultado comunicável (custo direto total/resultados comunicáveis)	$48,27/1		$48,27
Eficiência do teste (resultados comunicáveis de paciente/testes)	1 resultado/ 4 testes		25%

(*continua*)

Tabela 12.2 Análise de custos dos testes* *(continuação)*

Teste: antígeno específico da próstata

B. Microcusteio: corrida de 15 testes comunicáveis no instrumento

Mão de obra direta

Para correr um grupo de testes nos analisadores automáticos, usar as despesas diretas de mão de obra do microcusteio. Para o teste manual do grupo, os custos de mão de obra devem ser aplicados a cada grupo; estudos de tempo de mão de obra adicionais podem ser necessários para produzir resultados corretos

	Minutos	Despesas
Total da mão de obra direta por grupo (a mesma do microcusteio, neste exemplo)	50	$16,67

Suprimentos diretos

Observação: 18 testes (15 amostras e 3 controles) são necessários para produzir 15 resultados comunicáveis. As despesas fixas (controles) estão distribuídas por mais de uma amostra, ao contrário do primeiro exemplo

	Custo unitário	Unidades	Despesa
Reagente ($ 700 o kit/100 testes)	$7	18	$126,00
Pipetas descartáveis ($ 10/100 pipetas)	$0,10	18	$1,80
Frascos de reagente descartáveis ($ 10/200 frascos)	$0,05	18	$0,90
Material de controle baixo, intermediário e alto (0,05 ml/teste a $ 20/ml)	$1	3	$3,00
Total de suprimentos diretos			$131,70
Total de despesas diretas			$148,37
Custo por resultado comunicável (custo direto total/resultados comunicáveis)	$148,37/15		$9,89
Eficiência do teste (resultados de paciente comunicáveis/testes)	15 resultados/ 18 testes		83%

C. Despesas de incrementação: custo de mais um teste

	Unidades	Despesa
Reagente ($ 700 o kit/100 testes)	1	$7
Pipetas descartáveis ($ 10/100 pipetas)	1	$0,10
Frascos de reagente descartáveis ($ 10/200 frascos)	1	$0,05
Total		$7,15

	Custo unitário	Unidades	Despesa

D. Despesa total acumulada

Despesa direta (custo por resultado comunicável para uma corrida de tamanho padrão) obtida do exemplo B	$9,89
Despesa indireta (estimada por um hospital padrão como sendo de 2,5 despesas diretas)	$24,73
Despesa total acumulada	$34.62

E. Margem de contribuição

Exemplo de cobrança de testes laboratoriais a preços com 20% de remarcação

Despesa total acumulada + remarcação de 20% (preço do teste tabelado)	$34,62 × 1,2	$41,54
Despesa total acumulada obtida do exemplo D		($34,62)
Margem de contribuição		$6,92

* Esta análise destina-se apenas a fins ilustrativos.

estabelecimento (preço tabelado) para prestação de assistência a pacientes internos e externos, antes das deduções na receita. A *receita líquida advinda de pacientes* é a receita bruta advinda de pacientes internos e externos subtraída de todas as devidas deduções. As *deduções* da receita incluem ajustes contratuais, providências para débitos indevidos, caridade e outros ajustes e subsídios que reduzem a receita bruta de pacientes. Os *ajustes contratuais* representam a diferença entre o faturamento total a taxas estabelecidas e os valores recebidos ou a receber de pagadores terceirizados, de acordo com contratos formais. Por exemplo, se o preço tabelado de um teste é 10 dólares, porém a companhia de seguros compromete-se a pagar apenas 6 dólares, o ajuste contratual é de 4 dólares (Harmening, 2003). Se todas as deduções e acordos contratuais estiverem corretos, a receita líquida de pacientes deve ser igual ao dinheiro arrecadado (no exemplo citado, 6 dólares).

Na assistência à saúde, é importante distinguir entre assistência ao paciente interno e assistência ao paciente externo, pois o reembolso é realizado de modo diferente em cada caso. As taxas cobradas pelos testes laboratoriais de pacientes internos usualmente não são reembolsadas separadamente; considera-se que essas taxas estão incluídas na taxa de diária (i. e., taxa de reembolso de diária hospitalar) ou na DRG (i. e., uma taxa estabelecida para a estadia hospitalar completa, independentemente de sua duração). Assim, o teste laboratorial para pacientes internos é considerado um "centro de custos". Paga-se ao hospital a mesma taxa, independentemente do número de testes fornecidos. Ao contrário, os testes laboratoriais de pacientes externos constituem centros de receita, pois cada teste é reembolsado separadamente, usualmente por um pagador terceirizado (Tab. 12.3). Dessa forma, observa-se uma falta de incentivo à realização de testes de pacientes internos, ao mesmo tempo em que os testes para pacientes externos são estimulados.

Pagadores e reembolso

Antigamente, na América do Norte, os hospitais serviam a um propósito diferente do atual. O médico costumava ir até a casa do paciente para prestar-lhe assistência e os cuidados eram prestados por familiares do paciente, parteiras e serviçais. Os hospitais antigos eram criados para abrigar adultos idosos, moribundos, órfãos, doentes mentais e mendigos, e também para proteger os cidadãos da comunidade contra doenças contagiosas e insanos perigosos. Muitos dos atuais hospitais de condados, municípios ou de ordem religiosa eram, no passado, uma combinação de asilo e hospitais de isolamento (Sultz, 2004).

A transformação dos hospitais, de instituições de caridade a complexas organizações técnicas, deu-se em decorrência da aprovação do Hill-Burton Hospital Construction Act de 1946 e do crescimento do seguro hospitalar privado. O ato possibilitou que os estados passassem a receber verba do governo federal para planejar e construir novas instalações. A primeira política de seguro-saúde privada foi criada por um grupo de professores e o Baylor Hospital, na cidade de Dallas, estado do Texas, com o objetivo de proporcionar a cobertura de certas despesas hospitalares. O acordo criou o modelo para desenvolvimento daquilo que se tornou o Blue Cross Insurance. O desenvolvimento do seguro-saúde para promoção do reembolso da assistência médica de rotina teve implicações gigantescas. O conceito original de qualquer seguro consiste em assegurar proteção contra o baixo risco de uma ocorrência rara, como morte prematura ou acidentes. Os seguros-saúde dos dias de hoje proporcionam a cobertura de serviços de rotina previsíveis, bem como de doenças e lesões imprevistas (Sultz, 2004).

Seguro privado

O seguro-saúde particular recai em duas categorias principais: indenizações e assistência. Os planos de indenização, também conhecidos como taxa por serviço, são planos de seguro tradicionais que dão ao paciente absoluta liberdade para escolher médicos e instalações de atendimento. As companhias de seguro exigem que os pacientes paguem uma franquia anual, usualmente de 300 a 500 dólares por pessoa. Após o pagamento dessa franquia, a seguradora paga uma taxa de cosseguro de uma taxa usual e costumeira (UCC, *Usual and Customary Charge*). A UCC é estabelecida pelo pagador e pode ser inferior ao valor cobrado, sendo que, nesse caso, cabe ao paciente pagar a diferença. Geralmente, o cosseguro representa 70/30% ou 80/20%; a seguradora paga o maior percentual e o segurado, o menor. Até a década de 1980, os planos de indenização eram o ponto de apoio do mundo do seguro-saúde. Atualmente, a prestação de assistência assumiu esse papel. Alguns empregadores ainda oferecem planos de indenização, apesar do pagamento de elevados prêmios, para proporcionar a seus funcionários a liberdade de escolher os serviços médicos.

Como alternativa ao seguro de indenização de saúde, a prestação de assistência foi introduzida em 1973, com a aprovação do Health

Tabela 12.3 Comparação de reembolso para PSA* por tipo de pagador

	Preço tabelado (US$)	Termos de reembolso	Quantia paga (US$)	Subsídios contratuais (US$)
Paciente interno				
Assistência (HMO)	41,54	Não há reembolso separado para testes laboratoriais, uma vez que estão inclusos na contratação da taxa de diária	0	N/A
Medicare	41,54	Não há reembolso separado para testes laboratoriais, uma vez que estão inclusos na taxa do DRG	0	N/A
Paciente externo				
Indenização de seguro	41,54	A taxa usual e costumeira (UCC) é de US$ 38,00; o seguro paga 80% da UCC	30,40	11,14
Assistência (PPO)	41,54	O contrato paga 110% do valor de tabela do Medicare ($25,70 para PSA)	28,27	13,27
Assistência (HMO)	41,54	Não há reembolso separado para testes laboratoriais, devido ao contrato de capitação; o laboratório recebe pagamento por mês independentemente do uso	N/A	N/A
Medicare	41,54	Tabela de preços do Medicare	25,70	15,84

* Os valores de reembolso são meramente ilustrativos e não correspondem aos valores reembolsados pelo Medicare.

Maintenance Organization Act. Essa lei incentivou e instituiu o desenvolvimento das organizações de manutenção da saúde (HMOs, Health Maintenance Organizations), como estratégia para conter as crescentes despesas com assistência à saúde. Os HMOs utilizaram aspectos da prestação de assistência que acoplavam o reembolso da assistência à saúde à prestação de serviços, e proporcionavam aos pagadores um significativo controle econômico sobre como, onde e quais serviços eram prestados. As características comumente observadas na prestação de assistência são: seleção de médicos e hospitais específicos para atender aos membros, necessidade de referências do supervisor de caso para a prestação dos serviços das especialidades ou de internação, e compartilhamento do risco financeiro por meio do estabelecimento de acordos de capitação e taxas de diária (Sultz, 2004).

Os acordos de capitação custeiam o serviço do prestador (p. ex., médicos) mediante o pagamento de uma quantia fixa em dólares por membro por mês (PMPM). Por esse pagamento, o prestador concorda em cobrir totalmente o plano de assistência aos membros. Por exemplo, se o laboratório assina um acordo de capitação aceitando o pagamento de 1,50 dólares PMPM para atender às necessidades de teste de pacientes externos de 2.000 membros de HMO, este laboratório irá receber 3.000 dólares por mês ou 36.000 dólares ao ano. Se o custo da realização dos testes ultrapassar 36.000 dólares/ano, este laboratório terá prejuízo financeiro. A contrário, se os gastos para realizar os testes forem inferiores aos 36.000 dólares anuais, o laboratório terá lucros. Em um acordo de capitação para testes, o laboratório assume o risco de gastar mais do que tem a receber. Para administrar esse risco, é essencial garantir o acesso à utilização dos testes pelos membros do plano e avaliar corretamente as despesas laboratoriais.

As taxas cobradas *per diem* ou diárias são negociadas com os hospitais, visando a proporcionar toda a assistência e serviços necessários aos membros supervisionados que requeiram cuidados de internação. O reembolso de qualquer teste laboratorial durante a internação está incluído na taxa de diária. Como ocorre na capitação, se os custos da prestação dos serviços de internação ultrapassarem o valor coberto pelas diárias, o hospital arca com o risco financeiro.

Em alguns casos, os serviços prestados são negociados separadamente, ou seja, não são incluídos como parte da capitação nem na taxa de diária. Esta prática é chamada de "*carve out*" (serviços não inclusos). Testes herméticos e caros (análise cromossômica, certos tipos de teste molecular) devem ser considerados como serviços não inclusos nos acordos de capitação de testes para pacientes externos. Para tais serviços é mais apropriado definir um preço específico. Além disso, ao excluir esses testes da capitação, evita-se enormes prejuízos em decorrência de uma alta demanda por serviços caros.

Contribuintes do governo

Medicare é o seguro-saúde federal para indivíduos com idade a partir de 65 anos, indivíduos permanentemente incapacitados e indivíduos que apresentam doença renal em estágio terminal, desde que cumpram um período de espera estabelecido. O Medicare foi fundado em 1965, pelo Título XVIII do Social Security Act. É administrado pelos Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS), uma divisão do Ministério de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (HHS). A cobertura é fornecida conforme suas Partes A, B e C, e as solicitações são processadas pelos contratantes aprovados pelos CMS. Tais contratantes costumam ser seguradoras particulares que atuam como intermediárias fiscais (em geral, processando solicitações referentes à Parte A) e portadoras (em geral, processando solicitações referentes à Parte B). Para qualificar-se para o recebimento de reembolso Medicare/Medicaid, o laboratório deve possuir uma certificação (Washington G-2, 2004) do CLIA (Clinical Laboratory Improvements Amendments de 1988).

A Parte A do Medicare cobre a hospitalização de pacientes internos, cuidados paliativos, assistência de enfermaria especializada e assistência à saúde domiciliar. A cobertura é automática para aqueles que são elegíveis. Anteriormente ao Tax Equity and Fiscal Responsability Act (TEFRA) de 1982, a hospitalização de pacientes internos era reembolsada segundo um sistema de custos retrospectivo. Este sistema ressarcia os hospitais por todos os gastos incorridos durante a estadia do paciente. Depois da aprovação do TEFRA, o sistema passou a ser um sistema de pagamento prospectivo (SPP), o qual efetua o reembolso do hospital com base no pagamento dos serviços prestados ao paciente para diagnósticos semelhantes. Com este sistema de pagamento por grupo de diagnósticos relacionados (DRG), os hospitais são reembolsados pelo mesmo DRG, independentemente de quantas unidades de serviços sejam prestadas. Assim, os hospitais podem lucrar ou ter prejuízo por cada internação, conforme as despesas sejam inferiores ou superiores ao pagamento por DRG. O objetivo do TEFRA, ao estabelecer o reembolso por DRG, era forçar os hospitais a conter os custos, reduzindo o tempo de internação (TDI, tempo de internação) e eliminando serviços desnecessários e/ou utilizados em excesso (Washington G-2, 2004).

A Parte B do Medicare cobre os testes laboratoriais de pacientes externos, serviços de médicos profissionais, bem como outros serviços e dispositivos de atendimento médico. Essa cobertura não é automática. Os beneficiários elegíveis devem se inscrever para ter direito à cobertura da Parte B e pagar prêmios. Os beneficiários devem pagar uma franquia anual e mais 20% de copagamento por todos os serviços cobertos pela Parte B, exceto pelos testes laboratoriais que já são integralmente cobertos mediante a observância das exigências (ver a seguir).

A tabela de taxas da Parte B é importante para o reembolso, uma vez que representa um valor basal utilizado por pagadores não governamentais para estabelecer suas próprias taxas. Por exemplo, uma agência seguradora privada pode estabelecer que sua tabela de taxas seja equivalente a 110% da tabela de taxas da Parte B.

A Parte C do Medicare é uma alternativa ao programa tradicional de taxa por serviços da Parte B. Destina-se a reduzir os "custos de

prejuízo" do paciente, por meio do fornecimento de serviços pelas HMOs, entre outros modelos de serviços. A Parte C do Medicare é conhecida como *Medicare+Choice* e não se encontra disponível em todos os estados (Washington G-2, 2004).

Medicaid é um programa do governo federal americano que oferece cobertura de assistência à saúde para famílias selecionadas que possuem baixa renda. Foi aprovado em 1965, como programa patrocinado pelo governo federal/estadual destinado a pagar as despesas médicas de famílias que dispunham de poucos recursos financeiros. Os indivíduos elegíveis incluem idosos, deficientes e aqueles que possuem crianças dependentes. Embora o Medicaid seja um programa federal, encontra-se sob a jurisdição individual de cada estado. Isto significa que cada estado determina quem é elegível, a gama de serviços oferecidos e como será realizado o reembolso. Um conceito errado comum é considerar que o Medicaid cobre as despesas de assistência à saúde de todos os indivíduos com baixa renda. O Medicaid não paga a assistência médica a todos os indivíduos dessa classe e, para receber essa assistência, o interessado deve atender aos critérios de elegibilidade.

Sistemas de codificação de reembolso

Para ser paga, a solicitação médica deve descrever a condição clínica do paciente (ou diagnóstico) e listar os serviços (ou testes) que lhe foram prestados. Esta informação é transmitida por meio de um sistema de codificação padronizado, reconhecido por todos os pagadores, tanto do governo, como particulares: os códigos do Healthcare Finance Administration Common Procedural Coding System (HCPCS) descrevem o teste ou serviço; e os códigos da International Classification of Disease – 9th revision with Clinical Modifications (ICD-9-CM) descrevem a condição ou o diagnóstico do paciente. Estes padrões permitem que os dados sejam corretamente transmitidos entre médicos, pacientes e pagadores terceirizados.

O HCPCS foi desenvolvido em 1983 e consiste em dois níveis de códigos. O nível I corresponde ao sistema de codificação da Current Procedural Terminology (CPT) e é utilizado para identificar praticamente todos os testes laboratoriais clínicos e a maioria dos serviços médicos. Os códigos CPT são atribuídos pela American Medical Association (AMA) e revisados e atualizados anualmente para manter-se em dia com as alterações ocorridas no campo tecnológico e da prática médica. Cada código CPT é composto por cinco dígitos e uma descrição do teste ou serviço (CPT, 2003). Por exemplo, o código CPT para o teste de antígeno específico da próstata (PSA) é 84153.

O nível II é representado pelos HCPCS/National Codes (HCPCS) atribuídos pelo governo. O CPT não contém todos os códigos necessários para informar os serviços prestados ou descrever as circunstâncias especiais que se aplicam ao Medicare. O Healthcare Financing Administration (HCFA), predecessor do CMS, desenvolveu este segundo nível de códigos exatamente para preencher essa lacuna. Os códigos do HCPCS de Nível II são iniciados por uma única letra (A a V) seguida de quatro dígitos. Estes códigos são atualizados anualmente pelo CMS. Um exemplo de código de nível II é o antígeno específico da próstata utilizado na triagem de câncer, G0103 (CMS, 2004). Observe que o CMS trata esse teste de modo diferente da codificação PSA CPT anteriormente descrita, ainda que os testes sejam idênticos para o laboratório. Isto permite que o CMS atribua critérios diferentes para reembolso, de acordo com o motivo que justificou a solicitação do teste.

A CID-9 foi originalmente desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como um sistema de classificação para reportar estatísticas de mortalidade e morbidade aos médicos ao redor do mundo. A CID-9-CM é uma revisão clinicamente modificada da CID-9 da OMS realizada nos Estados Unidos. Esta modificação é mantida e atualizada pelo National Center for Health Statistics. Tais modificações auxiliam prestadores de assistência à saúde a indexar registros de pacientes, recuperar dados de casos para estudos clínicos e submeter solicitações de serviços de assistência à saúde (Physician ICD-9-CM, 2001).

A importância de um código correto acurado

A correta codificação é importante por três motivos. Em primeiro lugar, porque é preciso pagar alguém pelos serviços prestados. Códigos insuficientes ou incorretos resultam em reembolsos indevidamente inferiores. O segundo motivo consiste no fato de que não se deve receber um reembolso maior que o devido. A codificação por serviços não fornecidos ou a atribuição de um código que assinala reembolso a mais (essa prática é conhecida como *upcoding*) é ilegal e, portanto, constitui fraude. Em terceiro lugar, é preciso estar de acordo com as regulamentações de *Necessidade Médica* estabelecidas pelo CMS para pacientes do Medicare. Estas políticas definem as circunstâncias em que um teste é considerado "necessário do ponto de vista médico" e, assim, reembolsável. Alguns testes somente são considerados "necessários do ponto de vista médico", se estiverem associados a diagnósticos específicos. Assim, o reembolso depende de o código de diagnóstico ou condição médica (código CID-9) sustentar o código do teste (código HCPCS). Por exemplo, como um "neoplasma de próstata maligno" sustenta a necessidade médica de realizar um teste de PSA, então o Medicare certamente deve custear esse teste. Ao contrário, a "insuficiência congestiva cardíaca" não é considerada uma justificativa de necessidade médica para realização de um teste de PSA e, consequentemente, esse teste não deve ser reembolsado. Repare que o médico (ou outro prestador de assistência) pode solicitar qualquer teste para um paciente, mesmo que não haja "necessidade médica", sendo que apenas não haverá reembolso.

A maioria das tabelas de taxas é estabelecida por um contratante da Medicare (fiscal intermediário ou portador). Historicamente, cada contratante estabelece diretrizes separadas para determinar quais testes estão sujeitos aos códigos de necessidade médica. Estas *políticas de revisão médica locais* (PRML) diferem de um portador a outro, dificultando bastante submeter e processar solicitações. Em alguns casos, um código de diagnóstico que um portador considera válido para um teste não é considerado necessário do ponto de vista médico por outro portador. Em uma tentativa de padronizar todas as diretrizes para reembolso utilizadas pelos portadores para testes laboratoriais de pacientes externos específicos, 23 testes receberam a denominação de *decisões de cobertura nacional* (NCD, *national converage decisions*). Essas diretrizes de necessidade médica aplicam-se a todos os portadores existentes no país. A Tabela 12.4 lista os testes NCD (CMS, 2004).

A codificação, em qualquer nível, deve ser a mais específica possível. A National Correct Coding Initiative (NCCI) destaca práticas de codificação correta baseadas nos códigos definidos no manual CPT da AMA. A maioria das análises ou testes possui um código CPT específico, como no caso do PSA. Entretanto, há casos em que um novo teste não tem seu próprio código. Quando isso ocorre, o teste deve ser identificado pelo método utilizado para realizar a análise (como 82486-Cromatografia, ou 83519-Imunoensaio, RIA). Um código de método usualmente é reembolsado a uma taxa inferior que o código de CPT específico de um teste.

Testes que são realizados juntos, isto é, como um painel, devem ser codificados corretamente. Existem nove painéis aprovados pela AMA (ver Tab. 12.5). Quando um destes painéis é realizado, deve ser codificado com um código de painel único, e não com os códigos CPT individuais de cada teste que compõe o painel. O reembolso de painéis é bem menor do que a soma total de reembolsos de cada teste. A codificação individual de cada teste componente, ao contrário do código do painel, é considerada uma "desvinculação" e constitui prática de cobrança fraudulenta (CMS, 2004).

Os serviços de médicos patologistas profissionais (como interpretação de testes, revisão de lâminas etc.) não estão incluídos na tabela de taxas do laboratório. Estes serviços são pagos segundo a tabela de taxas para médicos do Medicare, a qual emprega uma escala de valores relativos baseada em recursos (EVRBR) para determinar o pagamento segundo a unidade de valor relativo (UVR) do serviço prestado. Essas quantias são ajustadas de modo a refletir fatores econômicos locais. Diferentemente da tabela de taxas do laboratório, estes serviços profissionais estão sujeitos à franquia anual e ao copagamento de 20% (Washington G-2, 2004).

Reembolso Medicare

O Medicare é o maior programa de seguro dos Estados Unidos. Em muitos hospitais, esse programa responde por 25 a 40% de toda a receita. O reembolso dos serviços prestados aos pacientes externos é diferente dos serviços prestados aos pacientes internos.

Medicare para pacientes internos. Os DRGs constituem um sistema de classificação utilizado para reembolsar as despesas hospitalares de

Tabela 12.4 NCD para testes laboratoriais (CMS, 2004)

Categoria geral do teste	Códigos CPT inclusos
α-fetoproteína	82105
Antígeno carcinoembrionário	82378
Antígeno específico da próstata	84153
Antígeno tumoral por imunoensaio CA 125	86304
Antígeno tumoral por imunoensaio CA 19-9	86301
Antígeno tumoral por imunoensaio CA 15-3/CA 27.29	86300
Contagens sanguíneas	85004, 85007, 85008, 85013, 85014, 85018, 85025, 85027, 85032, 85045, 85049
Cultura de urina, bacteriológica	87086, 87088, 87184, 87186
Ensaio farmacológico terapêutico de digoxina	80162
Estudos de ferro sérico	82728, 83540, 83550, 84466
γ-glutamil transferase	82977
Gonadotrofina coriônica humana (GCH)	84702
Hemoglobina glicosilada/proteína glicosilada	82985, 83036
Ligações cruzadas de colágeno, qualquer método	82523
Lipídeos	80061, 82465, 83715, 83716, 83718, 83721, 84478
Painel de hepatite/painel de hepatite aguda	80074
Tempo de protrombina	85610
Tempo de tromboplastina parcial	85730
Teste da tireoide	84436, 84439, 84443, 84479
Teste de glicose sanguínea	
Teste de sangue oculto nas fezes (TSPF)	82270 82947, 82948, 82962
Teste (diagnóstico) para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)	86689, 86701, 86702, 86703, 87390, 87391, 87534, 87535, 87637, 87538
Teste (prognóstico, incluindo monitoramento) para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)	87536, 87539

Tabela 12.5 Painéis da AMA orientados de acordo com a doença ou o órgão (CPT, 2003)

CPT	Painel	Componentes necessários	
80048	Painel metabólico básico	Cálcio	(82310)
		Dióxido de carbono	(82374)
		Cloreto	(82435)
		Creatinina	(82565)
		Glicose	(82947)
		Potássio	(84132)
		Sódio	(84295)
		Nitrogênio ureico (BUN)	(84520)
80050	Painel geral de saúde	Painel metabólico completo	(80053)
		Contagem sanguínea completa (CCS)	(85025) ou (85027) e (85004)
		OU	
		Contagem sanguínea completa (CCS)	(85027) e (85007) ou (85009)
		Hormônio estimulador da tireoide	(84443)
80051	Painel de eletrólitos	Dióxido de carbono	(82374)
		Cloreto	(82435)
		Potássio	(84132)
		Sódio	(84295)

(*continua*)

Tabela 12.5 Painéis da AMA orientados de acordo com a doença ou o órgão (CPT, 2003) (*continuação*)

CPT	Painel	Componentes necessários	
80053	Painel metabólico abrangente	Albumina	(82040)
		Bilirrubina total	(82247)
		Cálcio	(82310)
		Dióxido de carbono	(82374)
		Cloreto	(82435)
		Creatinina	(82565)
		Glicose	(82947)
		Fosfatase alcalina	(84075)
		Potássio	(84132)
		Proteína total	(84155)
		Sódio	(84295)
		Alanina aminotransferase	(84460)
		Aspartato aminotransferase	(84450)
		Nitrogênio ureico (BUN)	(84520)
80055	Painel obstétrico	Contagem sanguínea completa (CCS)	(85025) ou (85027) e (85004)
		OU	
		Contagem sanguínea completa (CCS)	(85027) e (85007) ou (85009)
		Antígeno de superfície da hepatite B	(87340)
		Anticorpo, rubéola	(86762)
		Teste de sífilis, qualitativo	(86592)
		Triagem de anticorpo, CSV eritrócito	(86850)
		Tipagem sanguínea, ABO	(86900)
		Tipagem sanguínea, Rh	(86901)
80061	Painel lipídico	Colesterol total	(85465)
		Colesterol HDL	(83718)
		Triglicerídeos	(84478)
80069	Painel de função renal	Albumina	(82040)
		Cálcio	(82310)
		Dióxido de carbono	(82374)
		Cloreto	(82435)
		Creatinina	(82565)
		Glicose	(82947)
		Fósforo inorgânico	(84100)
		Potássio	(84132)
		Sódio	(84295)
		Nitrogênio ureico (BUN)	(84520)
80074	Painel de hepatite aguda	Anticorpos para hepatite A, IgM	(86709)
		Anticorpos centrais para hepatite B, IgM	(86705)
		Antígeno de superfície da hepatite B	(87340)
		Anticorpos para hepatite C	(86803)
80076	Painel de função hepática	Albumina	(82040)
		Bilirrubina total	(82247)
		Bilirrubina direta	(82248)
		Fosfatase alcalina	(84075)
		Proteína total	(84155)
		Alanina aminotransferase	(84460)
		Aspartato aminotransferase	(84450)

pacientes internos (Parte A) para membros do Medicare. Enquanto os gastos associados aos testes laboratoriais de pacientes internos estão incluídos no DRG, os serviços médicos não são cobertos (Parte B). Depois que um paciente do Medicare recebe alta do hospital, seus registros médicos são revisados pelos codificadores da administração de informações de saúde, e recebem os devidos códigos da ICD-9 e do HCPCS para um ou mais diagnósticos e procedimentos realizados durante o período de internação. Tais códigos, somados à informação demográfica do paciente, são agrupados por "árvores de decisão" (este processo é informatizado) em um DRG específico. Atualmente, existem mais de 500 DRGs. O CMS atribui um peso a cada DRG, com base no grau de seriedade do diagnóstico, tipos de procedimentos realizados, número de testes laboratoriais, volume e tipos de fármacos administrados e a existência de complicações ou comorbidades. O CMS atribui a cada hospital uma taxa específica,

calculada de acordo com o tipo de estabelecimento (hospital comunitário *versus* hospital-escola), cenário (região urbana *versus* meio rural) e localização (costa oeste *versus* centro-oeste). Para determinar o reembolso pela internação, multiplica-se a taxa estabelecida pelo CMS a ser paga para o DRG pela taxa atribuída pelo próprio hospital. Esse reembolso é pago integralmente pela hospitalização do paciente Medicare. Se as despesas hospitalares ultrapassarem o valor reembolsado, o hospital deve arcar com a diferença. O paciente não pode ser cobrado pelos serviços da Parte A que não foram reembolsados (Washington G-2, 2004).

Medicare para pacientes ambulatoriais. Após a sanção dos DRGs, o reembolso de cada um dos serviços prestados para pacientes externos continuou sendo realizado individualmente por muitos anos (Harmening, 2003). Entretanto, o sistema de reembolsos mudou quando o CMS passou a implementar o sistema de pagamento prospectivo para pacientes externos (OPPS, *outpatient prospective payment system*), com a introdução da Ambulatory Payment Classification (APC), em 2000. Segundo esse sistema, virtualmente todos os serviços hospitalares para pacientes externos (como ED e visitas clínicas, tratamento oncológico, cirurgias etc.) fornecidos aos pacientes filiados ao Medicare passaram a ser reembolsados prospectivamente, de acordo com uma taxa atualizada, semelhante aos DRGs. Os testes laboratoriais não estão incluídos na APC e ainda são reembolsados individualmente, com base na tabela de taxas do CMS, exceto em alguns casos (Varnadoe, 1996).

Há casos em que o Medicare não cobre testes laboratoriais (Tab. 12.6). Nessa situação, se um laboratório não conta com o pagamento do Medicare por testes que não estão de acordo com as exigências de necessidade médica, deve informar o paciente antes de prestar o serviço. A *notificação prévia do beneficiário* (NPB) é utilizada para documentar que o beneficiário foi advertido da possibilidade de o teste estar fora da cobertura do Medicare, a(s) razão(ões) de uma possível recusa e a decisão do paciente de pagar pelo teste, caso o Medicare não faça o reembolso, ou de recusar-se a fazer o teste. O uso da NPB tornou-se obrigatório em 1º de janeiro de 2003 (Washington G-2, 2004).

A *72 hours rule* (regra de 72 horas) é uma norma importante a ser considerada pelos hospitais, cujos laboratórios realizam testes para pacientes externos filiados ao Medicare. Esta regra estabelece que o hospital não pode cobrar uma solicitação de paciente externo (Parte B) por testes laboratoriais realizados dentro de um período de 72 horas a partir da admissão do paciente para internação. Os testes para paciente externo realizados em até 72 horas antes da admissão devem ser incluídos na solicitação de paciente interno, de modo a serem reembolsados segundo o DRG designado para o caso da internação. Os laboratórios hospitalares devem identificar os serviços destinados a pacientes externos do Medicare que são afetados por esta regra, e certificarem-se de não cobrá-los separadamente. Um laboratório independente (não hospitalar) não está sujeito à regra de 72 horas (CMS, 2004). Assim, os testes de pré-admissão realizados em até 2 dias antes da hospitalização somente são reembolsados se não forem fornecidos pelo laboratório do hospital onde o paciente está sendo internado, e sim por um laboratório independente.

Estimativa orçamentária

A estimativa orçamentária é o processo de planejamento, previsão, controle e monitoramento das reservas financeiras de uma organização. O *orçamento operacional fornece a meta* de receita e despesas diárias a ser alcançada no próximo ano.

Diferentes estratégias de planejamento orçamentário são utilizadas com base no tipo e na sazonalidade do negócio; contudo, todas empregam um método para prever e projetar o que deverá ocorrer no próximo ciclo de orçamento. As projeções são elaboradas visando aos acréscimos e reduções que se espera observar na receita e nas despesas, baseando-se em informações históricas e ajustes inflacionários, perda de negócios, novos empreendimentos, novas linhas de produtos etc. O laboratório tipicamente utiliza uma *pro forma* orçamentária. É fornecida uma *pro forma* ou "conjunto de formulários predeterminado" da expectativa de receita e despesas anuais, considerando vários projetos e suposições, incluindo o volume de testes. Utiliza-se cálculos de custos, proporções e percentuais reais para extrapolar os dados históricos e prever o orçamento futuro. A Tabela 12.7 fornece um exemplo de uma *pro forma* orçamentária.

Em contraste com a *pro forma* orçamentária, que emprega dados basais obtidos ao longo de um ano para desenvolver os dados sobre o ano seguinte, um *orçamento base zero* não conta com dados basais. Esse tipo de orçamento requer a avaliação anual da administração sobre todos os serviços e produtos para determinar quais devem ser financiados ou eliminados. O gerente de cada departamento deve justificar seu orçamento como se todas as suas atividades fossem realizadas pela primeira vez. O orçamento base zero considera que nenhum programa está autorizado a ter seu orçamento automaticamente aprovado, devendo comprovar o mérito financeiro frente aos demais programas da organização. Tais programas são classificados e financiados de acordo com a prioridade do mérito, considerando os fundos disponíveis da organização. Os laboratórios utilizam a abordagem de base zero para propor novos serviços (p. ex., um programa de doação de sangue, um centro de coleta de sangue de pacientes externos etc.), seções laboratoriais (p. ex., micologia) ou testes (ensaio de PCR) (Travers, 1997).

O *capital orçamentário* é empregado para financiar projetos orçamentários, tais como a aquisição de um instrumento ou de um sistema de informação, ou o remodelamento laboratorial. Estes projetos podem custar milhares ou milhões de dólares e demandam vários anos de planejamento e implementação. Os projetos propostos pelo laboratório competem por uma verba (em dólares) limitada com outros projetos propostos pelos demais departamentos do hospital. Cada um é avaliado (ver a seguir) e classificado com base em uma variedade de fatores financeiros e clínicos. O orçamento operacional deve estar associado ao capital orçamentário, para o qual se destinam as receitas geradas pelas operações utilizadas no financiamento dos itens e projetos orçamentários. Os orçamentos operacionais devem gerar um superávit de receitas para financiar projetos

Tabela 12.6 National NCD para testes laboratoriais (CMS, 2004)

Categoria	Cobertura Medicare	NPB necessária?
Testes de PMRL ou NCD	Pago pelo prestador, de acordo com a tabela de preços para paciente externo, se for considerado necessidade médica	Não, a menos que não seja considerado "necessário do ponto de vista médico"
Testes FDA ou testes "caseiros", não incluídos anteriormente	Pago pelo prestador, de acordo com a tabela de preços para paciente externo, se for considerado necessidade médica	Não, a menos que não seja considerado "necessário do ponto de vista médico"
Testes de uso estritamente investigativo ou testes de pesquisa (i. e., não FDA)	Não coberto, sem pagamento	Sim
Triagem de saúde ou bem-estar	Não coberto, exceto em raros casos: cobertura para esfregaços de PAP a cada 2 anos para todas as mulheres, e a cada ano para aquelas com risco de câncer elevado ou que apresentaram esfregaço anormal; cobertura anual de PSA para todos os homens com mais de 50 anos	Sim, a menos que seja uma das exceções admissíveis

Tabela 12.8 Centro de custos: microbiologia

		Mês corrente			Acumulado no ano		
		Receita (US$)					
Número da conta	**Nome da conta**	**Real**	**Orçamento**	**Variância**	**Real**	**Orçamento**	**Variância**
20100	Receita de paciente interno	1.414.245,00	1.403.172,00	11.073,00	2.892.427,00	2.764.597,00	127.830,00
20200	Receita de paciente externo	906.343,00	894.405,00	11.938,00	1.699.418,00	1.748.169,00	(48.751,00)
RECEITA TOTAL		2.320.588,00	2.297.577,00	23.011,00	4.591.845,00	4.512.766,00	79.079,00
		Despesas (US$)					
40100	Salário, administração	22.045,00	21.811,00	234,00	43.310,00	43.622,00	(312,00)
40200	Salário, técnico	85.161,00	105.410,00	(20.249,00)	170.437,00	210.820,00	(40.383,00)
40201	Horas extras	3.385,00	3.907,00	(522,00)	6.713,00	7.814,00	(1.101,00)
Total de despesas salariais		110.591,00	131.128,00	(20.537,00)	220.460,00	262.256,00	(41.796,00)
41580	Suprimentos de laboratório	109.961,00	96.114,00	13.847,00	193.102,00	188.461,00	4.641,00
41590	Suprimentos médico-cirúrgicos	1.682,00	1.715,00	(33,00)	3.964,00	3.362,00	602,00
41890	Contratos de serviço	75,00	355,00	(280,00)	150,00	710,00	(560,00)
42010	Equipamento mínimo	1.112,00	1.083,00	29,00	2.568,00	2.166,00	402,00
45300	Despesas de envio	14.973,00	13.750,00	1.223,00	28.812,00	27.500,00	1.312,00
46300	Despesas de acreditação	–	100,00	(100,00)	–	200,00	(200,00)
Total de despesas não salariais		127.803,00	113.117,00	14.686,00	228.596,00	222.399,00	6.197,00
TOTAL DE DESPESAS		238.394,00	244.245,00	(5.851,00)	449.056,00	484.655,00	(35.599,00)

de verbas no período. O excesso de verbas em um dado período pode ser reinvestido na própria organização, empregado para pagar débitos adicionais ou para uso emergencial na liquidação facilitada de títulos. Se a verba líquida em caixa for negativa em um determinado período, a organização deve apenas quitar suas obrigações utilizando as verbas de reserva economizadas em períodos anteriores. Se essa tendência não for revertida, a organização eventualmente irá operar sem verbas.

Medidas de *benchmarking* e produtividade

O *benchmarking* (medida de desempenho) e as medidas de produtividade caminham de mãos dadas. Não é recomendável coletar dados de produtividade sem compará-los a um padrão e sem avaliá-los quanto às tendências ao longo do tempo. O *benchmarking* é a quantificação dos produtos ou serviços da empresa contraposta a padrões específicos para comparação e aprimoramento (Wallace, 1998). O *benchmarking* pode ser interno ou externo.

O *benchmarking* interno determina a tendência da produtividade da organização no decorrer do tempo. A produtividade consiste na relação existente entre insumos (mão de obra e suprimentos) e produção (produto ou serviço) (Travers, 1997). Usualmente, é expresso como uma proporção entre o produto ou serviço e os vários insumos utilizados para a produção da mercadoria ou serviço. Ver na Tabela 12.9 as proporções de produtividade comumente empregadas em laboratórios. O objetivo de estabelecer uma tendência interna para a produtividade é determinar se os padrões internos estão sendo seguidos, excedidos ou ignorados. Se ajustes forem introduzidos ao fluxo de trabalho ou ao quadro de funcionários, os dados do próximo período de *benchmarking* podem ser utilizados para determinar se tais ajustes foram a provável causa de melhoras ou de uma queda na produtividade.

O *benchmarking* externo compara a produtividade de um laboratório à de outros laboratórios. Seu objetivo consiste em identificar aqueles que apresentam os melhores desempenhos numa determinada área. Tais laboratórios podem ser contatados para descobrir quais processos ou recursos empregam para alcançar um nível elevado de produtividade. Esta informação pode guiar um laboratório no sentido de implementar modificações semelhantes, que possam resultar em aumento da produtividade. Organizações profissionais, como o College of American Pathologists (CAP) ou o University Healthcare Consortium (UHC) oferecem programas de *benchmarking* externo específicos para laboratórios. É preciso sempre ter cautela ao interpretar as informações de um *benchmarking* externo. Embora os laboratórios clínicos sejam semelhantes, não existem dois laboratórios idênticos e, apesar dos melhores esforços, alguns dados são coletados e reportados de modo distinto. Fatores que fogem ao controle de um laboratório podem impedi-lo de alcançar uma produtividade tão elevada quanto a de seus pares. A disponibilidade de mão de obra, a combinação de doenças e acuidade dos pacientes, o acesso à tecnologia e a automação exercerão, cada um, seu efeito sobre o grau de produtividade do laboratório, bem como sobre o quanto essa produtividade ainda pode melhorar.

Avaliação de um projeto orçamentário

O hospital, por possuir orçamento limitado, não pode financiar todos os projetos. Desse modo, é preciso estabelecer prioridades com base em uma variedade de fatores, tais como a necessidade clínica e o impacto financeiro. Seja a verba emprestada ou não para o financiamento, esses projetos ou investimentos devem ser autossuficientes e até mesmo gerar superávits para financiar outros projetos. As próximas seções discutem diferentes formas de avaliar um projeto orçamentário, visando a responder a pergunta: "Trata-se de um bom investimento?". A Tabela 12.10 mostra uma comparação desses métodos.

Tabela 12.9 Medidas de produtividade comuns para laboratório clínico

Medida de produtividade	Meta*	1º trimestre	2º trimestre
Testes cobráveis/ ETI pago	> 3.680	3.798	3.500
Testes cobráveis/ ETI trabalhado	> 4.000	4.128	4.080
ETI trabalhado/ETI pago	> 92%	95,2%	90%
Custo de mão de obra/teste cobrável	< US$ 5,00	US$ 4,68	US$ 5,01
Custo de suprimento/teste cobrável	< US$ 1,00	US$ 0,99	US$ 1,01
Horas extras/tempo de trabalho contínuo	< 3%	2,7%	3,5%

ETI = equivalente por tempo integral ou 2.080 horas pagas em 1 ano; ETI pago = todos os salários pagos (tempo de benefício + tempo trabalhado).

* A meta é meramente ilustrativa. Não deve ser considerada como padrão laboratorial.

Tabela 12.10 Avaliação financeira de um novo analisador automático

	Fornecido	
Investimento (custo do analisador)		US$ 200.000,00
Taxa de desconto (taxa de inflação ou taxa de juros de empréstimo)		10%
Vida útil do analisador	5 anos	
Despesa anual de depreciação	US$ 200.000,00/5 anos	US$ 40.000,00
Receita anual	100.000 testes a US$ 5,00 o teste	US$ 500.000,00
Despesa anual de mão de obra	100.000 testes a US$ 2,50 o teste	US$ 250.000,00
Despesa anual com suprimentos	100.000 testes a US$ 2,00 o teste	US$ 200.000,00
Receita líquida anual (receita anual – despesa anual)	US$ 500.000,00 – (US$ 250.000,00 + US$ 200.000,00)	US$ 50.000,00
Receita líquida por teste (receita do teste – despesa do teste)	US$ 5,00 – (US$ 2,50 + US$ 2,00)	US$ 0,50
	Cálculos	
PERÍODO DE *PAYBACK* = investimento/receita líquida anual	US$ 200.000,00/US$ 50.000,00	4 anos
PONTO DE EQUILÍBRIO		
Por ano = depreciação/receita líquida por teste	US$ 40.000,00/US$ 0,50	80.000 testes
Vida do analisador = investimento/(receita líquida por teste)	US$ 200.000,00/US$ 0,50	400.000 testes
RETORNO DO INVESTIMENTO (RDI) = receita líquida anual/investimento	US$ 50.000,00/US$ 200.000,00	25% ao ano
VALOR ATUAL LÍQUIDO (VAL) = valor atual da soma das receitas líquidas (fluxo de caixa) futuras menos o investimento. Note: os juros do valor atual (JVA) para cada ano, com base no desconto de 10%, são multiplicados pela receita líquida para determinar o valor atual. O JVA é disponibilizado por qualquer fonte de dados financeiros. O VAL também pode ser calculado com uma calculadora financeira		
Investimento do dia	(US$ 200.000,00)	
Receita líquida do ano 1 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,9091 = US$ 45.455,00	
Receita líquida do ano 2 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,8264 = US$ 41.320,00	
Receita líquida do ano 3 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,7513 = US$ 37.565,00	
Receita líquida do ano 4 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,6830 = US$ 34.150,00	
Receita líquida do ano 5 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,6209 = US$ 31.045,00	
Valor atual da soma das futuras receitas líquidas	US$ 189.535,00	
VAL		(US$ 10.465,00)
TAXA INTERNA DE RETORNO (TIR) = taxa de juros descontada com a qual o VAL = 0. Note: utilizando uma calculadora financeira para determinar a TIR, insere-se os dados de fluxo de caixa e subtrai-se a taxa de juros		
Investimento do dia	(US$ 200.000,00)	
Receita líquida do ano 1 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,9265 = US$ 46.326,00	
Receita líquida do ano 2 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,8585 = US$ 42.923,00	
Receita líquida do ano 3 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,7954 = US$ 39.769,00	
Receita líquida do ano 4 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,7369 = US$ 36.847,00	
Receita líquida do ano 5 × JVA	US$ 50.000,00 × 0,6828 = US$ 34.140,00	
Valor atual da soma das futuras receitas líquidas	US$ 200.000,00	
VAL	US$ 0,00	
TIR		8%

Tempo de *payback*

O período de *payback* costuma ser utilizado na avaliação de um projeto orçamentário. O *payback* (recuperação de investimento) representa o tempo necessário para que a receita líquida de um investimento cubra os custos do investimento inicial (Brigham, 1998).

Como os equipamentos ou a tecnologia do laboratório podem se tornar obsoletos em um espaço de tempo muito curto, é importante recuperar o quanto antes os gastos realizados com esse investimento. Uma vez que o investimento inicial tenha sido recuperado, a receita líquida (receita – despesas) obtida a partir do mesmo representa um saldo positivo para a organização. Quanto mais cedo for alcançado o período de *payback* de um projeto orçamentário, mais rapidamente a organização é beneficiada pelo investimento.

Ponto de equilíbrio

O ponto de equilíbrio do projeto orçamentário é alcançado quando o volume das vendas chega a um ponto em que a receita total se iguala às despesas totais (fixas e variáveis) e, portanto, o lucro é zero. Antes que o ponto de equilíbrio seja atingido, o projeto opera com perdas; depois que o ponto de equilíbrio é ultrapassado, o projeto passa a gerar lucros (Brigham, 1998). A exemplo do tempo de *payback*, quanto mais rapidamente for atingido o ponto de equilíbrio, melhor será para a organização.

Retorno do investimento (RDI)*

A taxa de retorno de um projeto orçamentário é a proporção entre a renda líquida gerada e o investimento total dirigido ao projeto (Travers, 1997). O RDI é um padrão utilizado na avaliação da sabedoria com que a administração emprega a verba de seu orçamento, seja das próprias reservas de caixa, seja de transações de empréstimos. Quanto maior a taxa de retorno, melhor é a forma como o orçamento é utilizado. O RDI é o modo formal de expressar a frase: "use melhor seu dinheiro".

Valor atual líquido (VAL)*

O dinheiro sofre desvalorização no decorrer do tempo. Atualmente, 10.000 dólares valem mais do que valerão daqui a 3 anos. Este conceito é conhecido como valor temporal do dinheiro. O período de *payback* e os cálculos de retorno de investimento não consideram o valor temporal do dinheiro, partindo do princípio de que o valor do fluxo de caixa permanecerá sempre constante. Para tratar dessa falha, calcula-se o valor

*Nota: calculadoras financeiras e pacotes de *softwares* financeiros são programados para calcular RDI, VAL e TIR. O VAL e o TIR são cálculos muito complexos, que requerem etapas múltiplas e uso de tabelas de desconto. Não é recomendado fazer esses cálculos manualmente.

atual líquido para determinar se os fluxos de caixa de um projeto (i. e., a verba que será gerada futuramente) serão suficientes para compensar o investimento original, considerando que o dinheiro sofre desvalorização com o passar do tempo. Assim, as verbas recebidas no futuro deverão ser *descontadas* (i. e., deverão ter seu valor reduzido), para que se possa determinar quanto valem atualmente (em dólares). A taxa de desconto usualmente corresponde à taxa de inflação (quando a verba não é emprestada para financiar o projeto) ou à taxa de juros do empréstimo contraído para bancar o projeto. O *valor atual líquido* (VAL) é definido como o valor atual dos fluxos de caixa futuros, do qual é descontada uma taxa de juros, e que é empregado no financiamento do projeto orçamentário (Brigham, 1998).

Quando o VAL assume um valor positivo, isto significa que o projeto irá gerar verba suficiente para pagar o investimento inicial. Ao contrário, se o VAL assumir um valor negativo, o custo do projeto não será recuperado e/ou os fluxos de caixa futuros serão insuficientes para cobrir os juros do empréstimo.

Taxa interna de retorno*

A taxa interna de retorno também implica descontos sobre o fluxo de caixa no valor atual. Essa taxa determina a taxa de retorno atual do investimento. A *taxa interna de retorno* (TIR) representa a taxa de desconto em que o valor atualmente esperado de entrada de verbas do projeto se iguala ao valor atual de suas despesas, ou seja, a taxa de desconto em que o VAL é igual a zero.

É necessário identificar o TIR para garantir que seja maior do que os custos do empréstimo contraído para o financiamento do projeto. Quanto maior for o TIR, mais rapidamente o projeto irá alcançar independência financeira. Hospitais e corporações utilizam o TIR como forma de classificar projetos.

Interpretação dos cálculos financeiros

Enquanto os cálculos precedentes constituem ferramentas importantes, uma organização deve tomar suas decisões orçamentárias baseando-se estritamente no resultado de equações. Assim como em todas as atividades de estimativa orçamentária, as suposições contam com o elemento desconhecido. Prever os fluxos de caixa futuros visando a reposição da instrumentação costuma ser mais confiável do que fazer essa previsão para a implantação de novas linhas de produtos ou tecnologias. Atribuir uma expectativa de vida útil a um componente de bens de capital é igualmente uma estimativa educada. Um bom conhecimento em relação àquilo que se pode prever com segurança determinará o crédito a ser dispensado aos cálculos.

Ao avaliar o exemplo mostrado na Tabela 12.10, se forem considerados apenas o período de *payback*, a análise de ponto de equilíbrio e o RDI, o projeto poderá parecer aceitável. O VAL é desfavorável e o TIR é bem inferior ao RDI, uma vez que as despesas de orçamento são altas (10%). Será que isso implica não levar o projeto adiante? Não necessariamente. Dependendo de outros aspectos, talvez seja estabelecido que um dado analisador bioquímico novo é absolutamente essencial para dar suporte à missão da organização.

Há ainda outros inconvenientes com relação a estes cálculos. Como já mencionado, alguns cálculos consideram o valor temporal do dinheiro e outros, não. É muito importante considerar o valor temporal do dinheiro quando as despesas orçamentárias são altas (como no exemplo da Tab. 12.10) ou durante os períodos de inflação alta. Os cálculos de taxa de retorno fornecem um percentual, porém a soma em dólares real representada não é imediatamente aparente. Um projeto orçamentário que resulta em um RDI de 15% poderia inicialmente parecer melhor do que outro cujo RDI fosse igual a 10%. Contudo, o tamanho dos projetos pode diferir consideravelmente. Por exemplo, no primeiro, um investimento inicial de 10.000 dólares poderia produzir uma receita líquida de 1.500 dólares, enquanto para o outro projeto, um investimento inicial de 200.000 dólares gera uma receita líquida de 20.000 dólares. Nenhum desses cálculos financeiros deve ser considerado isoladamente, mas sim utilizados conjuntamente para auxiliar a análise dos projetos orçamentários.

*Nota: calculadoras financeiras e pacotes de *softwares* financeiros são programados para calcular RDI, VAL e TIR. O VAL e o TIR são cálculos muito complexos, que requerem etapas múltiplas e uso de tabelas de desconto. Não é recomendado fazer esses cálculos manualmente.

Métodos de aquisição de capital

Ao avaliar um projeto orçamentário, o método utilizado para aquisição de equipamentos é também uma importante consideração. A Tabela 12.11 mostra um resumo das vantagens e desvantagens dos métodos de aquisição: compra, arrendamento e locação. Exatamente porque não há um único cálculo financeiro que seja o melhor, ao avaliar um projeto, também não há um único método de aquisição que seja o melhor. A escolha do método depende das necessidades individuais, características e filosofia financeira da organização.

É fácil compreender o conceito de comprar o equipamento necessário. Por outro lado, será este o melhor modo de empregar a verba da organização? Se a verba (dinheiro) necessária ao financiamento do projeto atualmente está sendo empregada em uma seguridade que esteja rendendo juros superiores aos da taxa cobrada para contrair empréstimos, faz sentido emprestar o dinheiro necessário, do ponto de vista financeiro. Ao contrário, se a verba rende juros inferiores aos juros de um empréstimo, faz sentido utilizar a verba da empresa.

Uma vez comprado, o equipamento passa a fazer parte dos ativos da organização e está sujeito à depreciação por um método que seja adequado ao mesmo tipo de componente. As despesas de depreciação são notificadas na declaração de renda, porém provavelmente não serão incluídas nos relatórios orçamentários operacionais mensais (depende da organização listar a depreciação nos relatórios orçamentários mensais). Os custos operacionais do equipamento serão referentes aos suprimentos, manutenção e mão de obra de suporte.

Existem muitas variações e termos contratuais diferentes que poderiam ser associados a um acordo de arrendamento. Mais do nunca, é preciso certificar-se de ler atentamente todas as partes importantes do contrato do contrato de arrendamento de equipamentos. Todavia, não importa o quão complicado sejam os termos do contrato, há somente dois tipos de arrendamento.

Um *arrendamento operacional* (também denominado arrendamento "verdadeiro") concede à organização (arrendatário) o direito à plena utilização do equipamento por um período de tempo predeterminado. Esse período costuma ser de 1 a 3 anos, porém é sempre inferior ao tempo de vida útil do equipamento. Uma cláusula de rescisão deve estar incluída no contrato. A manutenção do equipamento faz parte do arrendamento operacional. O arrendatário não tem direito de propriedade durante ou após o período de arrendamento. Nenhuma equidade fica estabelecida durante a vigência do termo. O proprietário (arrendador) retém o direito de plena propriedade do equipamento e assume todas as responsabilidades sobre o mesmo. O contrato de arrendamento pode ou não conter uma opção que permite ao arrendatário comprar o equipamento ao final do prazo. No entanto, trata-se apenas de uma opção e não deve ser interpretada erroneamente como estabelecimento de equidade durante a vigência do contrato. Caso haja uma opção de compra, usualmente adota-se o valor de mercado do equipamento em vigor ao final do período de arrendamento. Se o arrendatário original decidir não consolidar a compra do equipamento, o arrendador poderá renovar seu arrendamento para o mesmo arrendatário original ou arrendá-lo para outra organização, visto que o equipamento ainda apresentará vida útil (Brigham, 1998).

Tabela 12.11 Opções de aquisição de capital

	Vantagens	Desvantagens
Compra	Propriedade	Risco de obsoletismo; despesa oportunista
Arrendamento operacional (verdadeiro)	Obsoletismo restrito; financiamento flexível; cancelável	Sem propriedade; despesas com juros/financiamento
Arrendamento financeiro	Propriedade; financiamento flexível	Não é cancelável; despesas com juros/financiamento
Aluguel	Obsoletismo restrito; flexibilidade da duração do tempo de uso	Custo elevado; sem propriedade

O outro tipo de arrendamento é o arrendamento *financeiro* (também denominado arrendamento de capital ou arrendamento-compra). Nesse caso, o arrendatário eventualmente ganha a propriedade do equipamento. O período de arrendamento corresponde ao tempo de vida econômica do equipamento. Ao receber os pagamentos do arrendamento, o arrendador recupera os custos que teve com o equipamento acrescidos do fator de juros, a fim de garantir retorno de seus investimentos. Um arrendamento financeiro não pode ser cancelado e a manutenção do equipamento não está incluída (Brigham, 1998).

Alugar um equipamento não é o mesmo que arrendá-lo. As principais diferenças são: o aluguel não oferece a opção de compra posterior; a duração do aluguel não é especificamente predeterminada; o acordo pode ser terminado a qualquer momento; a manutenção e os reparos são responsabilidades do proprietário do equipamento, e não do locatário (Travers, 1997). Um contrato de aluguel de reagente é um termo impróprio, pois trata-se de um arrendamento. Tais contratos exigem que o arrendatário compre os reagentes, que são específicos para um equipamento componente em particular. Cobra-se um preço equivalente à aquisição de uma determinada quantidade de reagentes, como forma de cobertura pelo "aluguel" do equipamento. A cobrança desse valor é um pagamento por arrendamento que cobre as despesas orçamentárias. A possibilidade de comprar ou não o equipamento ao final do contrato de aluguel dos reagentes determina se tal contrato era referente a um arrendamento financeiro. A recente legislação fiscal exige que os vendedores definam claramente a proporção de pagamentos anuais destinados ao capital de arrendamento. Esta medida simplifica a análise de contratos de arrendamento concorrentes.

Criação de valor financeiro/conclusões

Fiscalizar as finanças de qualquer organização não é tarefa fácil. No caso do laboratório clínico, esta fiscalização é especialmente difícil, pois a manutenção de sua competitividade necessita da oferta de tecnologias de última geração, que muitas vezes são complexas, caras e rapidamente tornam-se obsoletas. Aliado a isso, os rígidos critérios de codificação para submissão de solicitações que estão associadas a taxas fixas de reembolsos predeterminadas deixam pouca oportunidade para que o laboratório cubra suas despesas e gere muito menos lucros.

A equação de lucros líquidos é definida pela diferença: receita menossubtraída pelas despesas. Portanto, o único modo de aumentar o lucro líquido é aumentar a receita líquida ou reduzir as despesas. Em um ambiente assistencial, aumentar o número de pacientes atendidos (e a receita bruta) não contribui muito para aumentar o lucro líquido, uma vez que as despesas variáveis aumentam proporcionalmente ao aumento do volume de testes. Para que um aumento na receita bruta exerça um impacto positivo sobre o lucro líquido, a receita recém-gerada deve estar intimamente relacionada àquilo que é cobrado e coletado. A melhor forma de conseguir isso é fornecer aos clientes testes que sejam pagos com base em uma tabela de preços, em vez do DRG, APC, diárias ou capitação. Muitos laboratórios, na tentativa de seguir essa estratégia, oferecem programas de expansão comercial ou de referência. Os mercados-alvo do negócio da expansão são consultórios médicos, clínicas e outros laboratórios ou hospitais. Se um laboratório conta com capacidade excessiva para realização de testes e pode realizar testes adicionais sem incrementar as despesas fixas, o aumento gerado nessa receita deve aumentar o lucro líquido. Logicamente, também se considera que os preços cobrados cobrem os gastos decorrentes da expansão dos testes. Tendo em vista que a expansão do volume requer a adição de despesas fixas (mais mão de obra, equipamentos, espaço etc.), é preciso avaliar cuidadosamente esse novo volume de testes, a fim de garantir que o aumento da receita seja capaz de cobrir os novos gastos.

A redução de despesas parece ser mais frequentemente a regra, quando se tenta aumentar os lucros líquidos em um ambiente de prestação de assistência. Cortar o máximo possível as despesas fixas é o modo mais efetivo para alcançar essa meta. Se por um lado é muito importante negociar preços favoráveis de suprimentos e reagentes, bem como de outros itens que representem despesas variáveis, por outro a redução do custo por unidade em vários centavos de dólar ou até em vários dólares não exercerá um impacto tão grande quanto a eliminação de despesas fixas desnecessárias ou subutilizadas. Para realizar reduções substanciais das despesas de uma organização, é essencial obter economias de escala por meio da eficiência e do aproveitamento máximo de tais gastos.

Uma administração financeira eficaz requer um planejamento cuidadoso, análise e pensamento crítico no momento de tomar decisões acerca do melhor modo de adquirir capital de equipamento, atribuir preços e reduzir despesas. Manter-se ao nível das exigências dos vários pagadores garante que o laboratório seja reembolsado adequadamente pelos serviços que presta. Quando aplicadas com senso comum, essas ferramentas e conhecimento de base promoverão o sucesso financeiro das operações do laboratório clínico.

Referências bibliográficas

Brigham EF, Houston JF: Fundamentals of Financial Management, 8th ed. Philadelphia, PA, The Dryden Press, Harcourt Brace College Publishers, 1998.
Introdução ao livro-texto sobre finanças escrito para estudantes de gradução de administração.

Center for Medicare and Medicaid Services (CMS): Medicare's National Level II Codes HCPCS, 17th ed. Dover, DE, American Medical Association, 2004.

Center for Medicare and Medicaid Services. Online. Available: http://www.cms.hhs.gov/statistics/nhe/, March 24, 2004.

CPT: Current Procedural Terminology, Standard Edition. Chicago, IL, American Medical Association, 2003.

Harmening DM: Laboratory Management Principles and Processes. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, Inc., 2003.
Livro-texto projetado para equilibrar teoria e aplicações práticas de supervisão laboratorial. Physician ICD-9-CM. Salt Lake City, UT, Medicode, 2001.

Snyder JS, Wilkinson DS: Management in Laboratory Medicine, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1998.
Livro-texto desenvolvido para a preparação de estudantes de tecnologia médica e residentes de patologia ao longo dos níveis intermediários de supervisão.

Sultz HA, Young KM: Health Care USA Understanding Its Organization and Delivery, 4th ed. Boston, Jones and Bartlett, 2004.
Texto que descreve os papéis variáveis dos componentes do sistema de assistência de saúde, além das forças técnicas, econômicas, políticas e sociais responsáveis por estas alterações.

Travers EM: Clinical Laboratory Management. Baltimore, Williams & Wilkins, 1997.
Livro-texto abrangente e básico, destinado ao treinamento de profissionais da assistência de saúde para o exercício de funções de supervisão de laboratório clínico.

Varnadoe LA: Medical Laboratory Management and Supervision. Philadelphia, PA, FA Davis Company, 1996.
Texto dirigido a profissionais de laboratório que possuem conhecimentos sobre operações clínicas laboratoriais, mas que não possuem conhecimentos prévios sobre os aspectos administrativos e de supervisão.

Wallace MA, Klosinski DD: Clinical Laboratory Science Education & Management. Philadelphia, PA, WB Saunders Company, 1998.
Livro-texto que apresenta os princípios básicos do ensino e da supervisão para aplicação prática no campo da medicina laboratorial.

Washington G-2 Reports: 2004 MEDICARE Reimbursement Manual for Laboratory and Pathology Services, 2004.

CAPÍTULO 13

Terrorismo biológico, químico e nuclear: o papel do laboratório

Philip M. Tierno Jr PhD, Mark S. Lifshitz MD

Bioterrorismo 155
- Introdução 155
- Papel do laboratório de nível A 156
- Agentes biológicos/doenças 157

Terrorismo químico 165
- História e conhecimentos teóricos 165
- Papel do laboratório de nível A: terrorismo químico 166

Terrorismo nuclear 167
- História e conhecimentos teóricos sobre armas nucleares 167
- Papel do laboratório de nível A: terrorismo nuclear 168

Referências bibliográficas 168

PONTOS-CHAVE

- Os laboratórios de nível A, também conhecidos como laboratórios-sentinelas, podem ser os primeiros a identificar um organismo ou um grupo de isolados incomum capaz de indicar um evento de bioterrorismo.
- A responsabilidade de um laboratório de nível A consiste em "excluir" agentes biológicos suspeitos, em vez de realizar uma identificação completa ou análises altamente complexas.
- As amostras suspeitas devem ser manuseadas com segurança e nos termos da lei (considerando a cadeia de custódia).
- Protocolos específicos (e critérios de identificação presumível) devem ser aplicados a cada agente biológico.
- A categoria de agentes biológicos A (o mais alto nível de prioridade) compreende os agentes facilmente disseminados, que podem causar elevada mortalidade e desencadear pânico na população. Nessa categoria, estão bactérias (antraz, peste, tularemia), vírus (varíola, vírus da febre hemorrágica) e agentes que atuam por meio de toxinas (botulismo).
- O principal papel dos laboratórios de nível A é dar suporte na supervisão dos pacientes hospitalizados, que foram vitimados por um ataque de terrorismo químico.

Bioterrorismo

Introdução

No dia 11 de setembro de 2001, após os inimagináveis ataques terroristas às cidades de Nova York e Washington DC, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Center for Disease Control and Prevention – CDC) recomendaram aos profissionais da saúde que aumentassem a vigilância com relação à ocorrência de quaisquer doenças (ou grupo de doenças) incomuns, alegando que estas poderiam ser indicadores-sentinelas de um ataque de bioterrorismo. Como previsto, casos de antraz foram detectados em vários estados, justificando, assim, as suspeitas dos CDCs de que um evento de bioterrorismo ocorria livremente. Com o passar dos anos, tornou-se claro que a guerra bacteriológica é igualmente atraente a unidades subsidiárias e organizações terroristas, bem como a indivíduos descontentes com a situação do país. Esse tipo de terrorismo exerce o maior impacto possível com o mínimo de dinheiro e sua execução é relativamente fácil. Além disso, oferece o bônus do dramático efeito psicológico sobre a população. Comparadas às armas nucleares ou armamentos convencionais, as armas biológicas são relativamente baratas e fáceis de produzir. Para qualquer indivíduo que possua conhecimentos rudimentares de microbiologia e os materiais necessários, produzir agentes biológicos mortais em quantidade suficiente exige técnicas pouco mais complexas que aquelas empregadas na fabricação de cerveja. Os microrganismos envolvidos, com frequência, podem ser obtidos diretamente da natureza, como o bacilo do antraz, que é encontrado em abundância no solo na maior parte do planeta, ou que podem ser facilmente adquiridos de outras fontes, como as indústrias farmacêuticas e agrárias do país ou as instituições acadêmicas. A ricina tóxica, por exemplo, que ataca o sistema nervoso central, pode ser extraída da mamona do mesmo modo como o óleo de rícino.

O Ministério da Defesa dos Estados Unidos e o CDC publicaram uma lista das armas biológicas mais comuns (NATO, 1996). Elas são classificadas em três categorias: a primeira inclui bactérias mortais (p. ex., antraz e peste); a segunda engloba os vírus (p. ex., vírus causadores da varíola, encefalite e febres hemorrágicas, como Ebola, Lassa e febre do Vale de Rift); e, na terceira categoria, estão as toxinas que atacam o sistema nervoso central (p. ex., botulínica, toxinas de fungos e ricina).

Uma estratégia nacional efetiva para detectar, prevenir e limitar o bioterrorismo deve considerar os seguintes aspectos:

- há necessidade de um plano coordenado que conecte todos os programas antibioterrorismo federais, estaduais e municipais. Todos os serviços emergenciais devem ser treinados e equipados adequadamente para lidar com qualquer evento de guerra bacteriológica ou bioterrorismo;
- militares, fiscais do cumprimento da lei e profissionais da área médica/saúde, especialmente o pessoal de atendimento emergencial, devem ser vacinados sempre que possível, a fim de que possam desempenhar suas missões com eficácia;
- é necessário pesquisar e desenvolver novas gerações de vacinas (subpartículas), agentes bloqueadores e anticorpos para prevenir e tratar as doenças causadas pelas armas biológicas;
- programas de vacinação para o público em geral devem ser instituídos para proteger contra possíveis ameaças de armas biológicas;
- o público deve ser mantido informado acerca da guerra bacteriológica, sendo necessário instruir as pessoas a comunicar às autoridades locais quaisquer atividades estranhas em andamento nas vizinhanças. "Vigias contra bioterrorismo" poderiam ser introduzidos no modelo de "vigias de segurança de bairro;
- todos os médicos e prestadores de assistência à saúde devem estar familiarizados com os sintomas e com as formas de tratamento de todas as doenças causadas pelos agentes da guerra bacteriológica. Todos os hospitais e estabelecimentos de atendimento médico devem desenvolver planos de prontidão emergenciais e estabelecer políticas para desastres, a fim de lidar com qualquer evento de bioterrorismo ou outro tipo de desastre. Tais planos devem incluir o desenvolvimento de um plano de resposta e prontidão para laboratório clínico;
- um programa de vigilância epidemiológica nacional deve conectar todos os estabelecimentos médicos ao CDC ou outra agência federal, estadual ou local, de modo a identificar grupos de casos

(eventos-sentinelas). Grupos pequenos podem apontar uma prática terrorista antes que ocorra um acontecimento de proporções maiores.

A tônica de todas essas ações é a vigilância. Cedo ou tarde, qualquer complacência ou excesso de confiança certamente se mostrará fatal. O mínimo necessário é que todos permaneçam alertas à possibilidade de epidemias animais ou humanas e continuem buscando melhores meios para responder a tais situações, sejam elas naturais ou não (Tierno, 2004).

Este capítulo explica como um laboratório de nível A responde a um evento de bioterrorismo, segundo um plano de prontidão emergencial mais amplo destinado a um estabelecimento de saúde. Foram excluídos alguns potenciais agentes de bioterrorismo, como *Salmonella, Shigella, E. coli* 0157, *Campylobacter, Vibrio* etc., pois tratam-se de agentes bem conhecidos e mantidos em cultura em laboratórios de nível A (ver parte VII, Microbiologia Médica). Em vez disso, o enfoque se volta a vários potenciais agentes de bioterrorismo que são menos familiares esses laboratórios.

Papel do laboratório de nível A

A Laboratory Response Network (LRN) é um novo sistema de testes e referência laboratorial que se formou como fruto da CDC's Health Alert Network (HAN). Seu propósito consiste em preparar e fornecer uma resposta coordenada e rápida ao bioterrorismo e outras emergências de saúde pública. A LRN engloba quatro tipos de laboratório, os quais são designados pelas letras A, B, C e D.

Questões envolvendo segurança

Laboratórios de nível A devem sempre operar de acordo com as exigências de biossegurança de nível 2 (BSN-2), incluindo as regulamentações, as políticas e os procedimentos para manuseio de patógenos transmissíveis pelo sangue (Tab. 13.1). Ao lidar com qualquer potencial patógeno, todos os laboratórios de nível A devem utilizar práticas de BSN-3 para todas as manipulações de cultura que possam gerar aerossol. Os laboratórios de nível B operam segundo as exigências de BSN-2 e *sempre* executam práticas de BSN-3. Os laboratórios de nível C seguem todas as normas de BSN-3 e são certificados como estabelecimentos de BSN-3. Seus funcionários são especialmente treinados para lidar com agentes altamente patogênicos e potencialmente letais.

É extremamente importante respeitar as boas práticas de segurança laboratorial. Por exemplo, funcionários que processam culturas de células virais expõem-se ao risco de contaminação por agentes de bioterrorismo pouco suspeitos, como os vírus da varíola ou de febres hemorrágicas (agentes BSN-4). Para minimizar a exposição, os funcionários devem por em prática medidas de precaução universais e usar Cabines de Proteção Biológica (CPBs) ao trabalhar com as culturas (Gilchrist, 2000; NCCLS, 2001; CDC, 2001).

Designações laboratoriais

Estabelecimentos de nível A, também chamados de laboratórios-sentinelas, identificam organismos incomuns que podem ser altamente suspeitos e, portanto, os primeiros a indicar a ocorrência de um evento bioterrorista. Alternativamente, o laboratório de nível A pode comunicar a existência de um grupo de isolados de um mesmo organismo em inúmeros pacientes e em circunstâncias pouco comuns, indicando, desse modo, um evento. A maioria dos laboratórios clínicos pertence a essa categoria. A principal responsabilidade do laboratório de nível A consiste em "excluir" agentes suspeitos de bioterrorismo, em vez de realizar identificações completas ou análises altamente complexas. Uma vez que tenha comunicado uma descoberta a um laboratório público estadual ou municipal, o laboratório de nível A deve receber instruções para enviar o microrganismo a um laboratório de nível B ou C, em que serão empregados métodos avançados de confirmação. Por exemplo, se há suspeita de que o agente encontrado é o *Bacillus anthracis*, mas o laboratório de nível A é incapaz de excluir a hipótese, o microrganismo deve ser enviado para um laboratório de nível B ou C para ser investigado.

Os laboratórios de nível D são ainda mais avançados e podem ajudar a desenvolver e avaliar novos testes que serão futuramente utilizados em laboratórios de níveis B e C. Os laboratórios de nível D podem tipificar agentes de bioterrorismo já confirmados ou realizar testes moleculares mais sofisticados para analisar as cepas. Podem também arquivar esses organismos para serem utilizados em estudos futuros ou como referência (Gilchrist, 2000; NCCLS, 2001; CDC, 2001).

Tabela 13.1 Práticas dos níveis de biossegurança (BSN)

Práticas do BSN-1: para trabalho com agentes que representam risco mínimo
Restrição ou limitação do acesso durante o trabalho
É proibido comer, beber e fumar
É proibido pipetar com a boca
Cautela com agulhas e perfurocortantes
Práticas do BSN-2: para agentes que representam risco moderado
Práticas de BSN-1 adicionadas de:
Uso de CPB de classe II
Tipo A1: 30% de exaustão de ar no recinto
Tipo A2: 30% de exaustão de ar para fora
Tipo B1: 70% de exaustão de ar para fora
Tipo B2: 100% de exaustão de ar para fora
Uso de recipientes à prova de vazamento
Práticas do BSN-3: para agentes que representam risco sério ou potencialmente letal
Práticas de BSN-2 adicionadas de:
Uso de CPB de classe II com 100% de exaustão de ar para fora, utilizando dupla filtração HEPA ou HEPA com incineração. A cabine é hermeticamente fechada e vedada, e usam-se luvas de borracha para realizar as operações
Uso de Equipamento de Proteção Pessoal (EPP)

Ao concluir que não pode "excluir" um dado agente, o laboratório de nível A costuma adotar a política de notificar o oficial de controle de infecções ou o epidemiologista do hospital que, por sua vez, transmitem a informação ao departamento de saúde local. O laboratório deve estar preparado para seguir as instruções de envio do agente suspeito, segundo as Diretrizes para Materiais Infecciosos fornecidas pelo Ministério do Transporte ou pela International Air Transport Association. Não cabe ao laboratório de nível A declarar que um evento de bioterrorismo está em andamento. Essa é uma responsabilidade das autoridades estaduais ou federais.

Como usualmente tornam-se evidências em casos legais, as amostras ambientais requerem a supervisão de toda sua cadeia de custódia, sendo esta uma tarefa dos laboratórios de nível B e C. Tais amostras ambientais também podem representar uma ameaça aos pacientes no cenário hospitalar. Por isso, em hipótese nenhuma, o laboratório de nível A deve aceitar ou processar amostras provenientes do meio ambiente. Cabe ao FBI supervisionar a investigação de amostras ambientais que são encaminhadas aos laboratórios de nível B e C.

Questões legais

O laboratório de nível A pode atuar em investigações criminais. Diante da suspeita ou da certeza de que uma dada amostra representa ameaça biológica, é importante preservar material, placas, culturas etc. originais. Se o laboratório foi contatado pelo FBI ou por outras agências de fiscalização legal, deve comunicar as autoridades de saúde estaduais, bem como o oficial de controle de infecções ou o epidemiologista do hospital. Qualquer informação relevante à análise de potenciais evidências *não pode* ser liberada à divulgação pública, devendo ser transmitida *apenas* aos fiscais da lei e às autoridades de saúde apropriadas.

A *cadeia de custódia* é um documento legal que descreve o modo como a evidência é manuseada desde o momento em que foi adquirida e no decorrer de todos os exames e armazenamento subsequentes. O laboratório deve possuir um documento de política de custódia por escrito e deve designar um funcionário para ser o "zelador de evidências", cuja função é controlar o armazenamento de evidências e registrar o acesso às mesmas em um formulário de cadeia de custódia. Esse registro deve permanecer guardado a sete chaves. O LRN sugere que o laboratório emita um "recibo de propriedade" toda vez que receber uma evidência. Esse recibo deve conter um único identificador, a qualidade e a quantidade de cada item, uma descrição de cada item e o máximo de informação possível acerca do sujeito etc. (Gilchrist, 2000; CDC/NIH, 2001; NCCLS, 2001).

Agentes biológicos/doenças

O CDC e outras agências governamentais listam os agentes biológicos/doenças em três categorias (A, B e C), de acordo com a prioridade do risco e a capacidade de disseminação na população. Alguns exemplos representativos de cada categoria estão listados nas Tabelas 13.2, 13.3 e 13.4 (Gilchrist, 2000; USAMRIID, 2001; Tierno, 2002). A Tabela 13.5 resume aspectos referentes ao diagnóstico e tratamento de doenças causadas por agentes de bioterrorismo discutidos anteriormente. O papel do laboratório de nível A é descrito nas Tabelas 13.6 a 13.14, para cada um dos agentes discutidos a seguir.

Antraz (Tab. 13.6)

História e conhecimentos teóricos

O *Bacillus anthracis*, agente etiológico do antraz, é uma bactéria Gram-positiva com formato de bastonete que produz um esporo. Normalmente, essas bactérias crescem de forma vegetativa, porém esporulam diante de condições de crescimento adversas e conseguem sobreviver. As formas vegetativas são relativamente fáceis de matar com germicidas, como álcool ou peróxido, ou mesmo por aquecimento. No entanto, os esporos são muito resistentes, tanto a agentes químicos como ao calor, e sobrevivem por décadas. Essa característica é essencial, visto que são os esporos que causam infecção. Na natureza, o antraz está usualmente associado a animais de pastoreio, como ovelhas, cabras e gado, bem como a animais selvagens, que adquirem os esporos ao se alimentarem da vegetação ou da carne de animais infectados. O *B. anthracis* está presente no solo por todo o planeta. Nos Estados Unidos, é encontrado principalmente nas antigas trilhas de gado do Texas, Louisiana, Mississipi, Arkansas, Novo México, Oklahoma e em alguns estados do Centro-oeste. Entretanto, o antraz é uma infecção rara nos EUA, em razão do controle das populações de animais por meio de programas de vacinação. Os esporos surgem quando o pH de um solo orgânico rico torna-se maior que 6 e as chuvas eliminam as condições de seca. Os animais herbívoros, ao se contaminarem, podem transmitir a infecção ao homem por meio do contato direto com suas partes, como pelos, lã, couro cru, ossos etc. Certas ocupações oferecem maior risco de infecção por antraz, como tratadores de animais, lavradores e veterinários. Cerca de 90% de todos os casos de antraz humano foram observados em trabalhadores de tecelagem, que lidavam com pelos de cabra importados. Existem três vias de infecção humana: (1) a pele (cutânea), por meio de arranhões ou escoriações; (2) pela inalação dos esporos; e (3) por meio da ingestão de carnes contaminadas mal cozidas ou de produtos derivados delas. A origem do termo "antraz" é grega, que significa "carvão", sendo que a doença foi assim nomeada por causa da formação de uma crosta negra (escara) na pele das vítimas infectadas pelo micróbio da forma cutânea de antraz. Pelo mesmo motivo, a doença por vezes é denominada "carbúnculo negro" (Tierno, 2002).

O antraz é, isoladamente, a maior ameaça da guerra bacteriológica, dada a facilidade com que seus esporos são cultivados, ainda que a produção de esporos transformados em armas não seja tão simples. Algumas vezes, a mídia refere-se a categorias de antraz: "antraz-arma" *versus* "antraz não arma". Os critérios que distinguem essas categorias são o tamanho do esporo (pequeno; usualmente de 1 μm a 3 μm), ausência de aglutinação (usualmente obtida por meio da adição de um polímero que evita a tendência natural dos esporos à aglutinação), a quantidade de esporos e a entrega por meio de um sistema de distribuição eficiente. Segundo essa descrição, a onda de antraz que se espalhou pelos EUA no outono de 2001 apresentou classificação próxima à de "arma", visto que atendia a dois dos quatro critérios de caracterização. Os esporos eram pequenos e apresentavam boa dispersão pelo ar, contudo suas partículas estavam presentes em quantidades limitadas e foram entregues via correio. Se uma quantidade suficiente do produto tivesse sido produzida e entregada de modo eficaz, teria sido considerada "antraz-arma".

Na natureza, os esporos existentes no solo encontram-se aglutinados, e essa característica dificulta bastante a contaminação de um indivíduo pela inalação natural do antraz. Um terrorista, para transformar os esporos do antraz em arma, tem que impedir a aglutinação das partículas e depois entregá-las transformadas em quantidade suficiente. Certamente, ambas as tarefas são muito difíceis. Mesmo um avião de pulverização agrícola teria de ser consideravelmente adaptado para distribuir esporos de modo eficiente. Para constituírem armas eficazes, os esporos do antraz devem permanecer no ar em concentração elevada o suficiente para serem profundamente inalados para dentro dos pulmões. Com base nos dados disponíveis, aparentemente, o número de esporos necessários varia de 8 a 40 mil. Alguns poucos estudos sugerem que a inalação de uma pequena concentração de esporos (cerca de 500, ao longo de 8 horas) não foi capaz de promover a doença em trabalhadores de tecelagem que lidavam com pelos de cabra. Embora existam três tipos de infecção causada pelo *B. anthracis* (cutânea, pulmonar e gastrintestinal [GI]), um terrorista deve interessar-se principalmente pela infecção adquirida pela inalação do micróbio, em razão da taxa de mortalidade elevada associada. Na natureza, contudo, aproximadamente 95% dos casos humanos de antraz consistem de infecções cutâneas (Lew, 2000; Tierno, 2002).

Tabela 13.2 Agentes da categoria A

Prioridade maior para agentes que representam risco de segurança nacional	
Características	**Agentes**
Facilmente disseminados e/ou transmitidos de um indivíduo a outro	Antraz (*Bacillus anthracis*) Botulismo (*Clostridium botulinum*)
Podem conduzir a taxas de mortalidade elevadas, causando grande impacto na saúde pública	Peste (*Yersinia pestis*) Varíola (*Variola major*)
Pode causar pânico na população	Tularemia (*Francisella tularensis*) Febres hemorrágicas virais – filovírus (i.e., Ebola, Marburg) e arenavírus (i.e., Lassa, Machupo)

Tabela 13.3 Agentes da categoria B

Características	Agentes
Disseminação moderadamente fácil	Brucelose (espécies de *Brucella*)
Morbidade moderada e mortalidade baixa	Toxina épsilon de *Clostridium perfringens*
Podem requerer capacidade diagnóstica aprimorada (CDC)	Riscos à segurança alimentar (i. e., *Salmonella* sp, *Escherichia coli* 0157:H7, *Shigella* sp) Mormo (*Burkholderia malleri*) Melioidose (*Burkholderia pseudomallei*) Psitacose (*Chlamydia psittaci*) Febre Q (*Coxiella burnetii*) Toxina ricina de (*Ricinus communis*) (mamona) Enterotoxina estafilocócica B Febre tifoide (*Rickettsia prowazekii*) Encefalite viral (alfavírus: encefalite equina venezuelana, encefalites equinas oriental e ocidental) Riscos à segurança da água (i. e., *Vibrio cholerae, Cryptosporidium parvum*)

Tabela 13.4 Agentes da categoria C

Características	Agentes
Disponibilidade	Hantavírus
Produção e disseminação fáceis	Vírus Nipah
Potencial de morbidade e de mortalidade elevado	Outros patógenos emergentes que poderiam ser modificados por engenharia genética para disseminação em massa
Potencial impacto significativo na saúde	

Tabela 13.5 Agentes de bioterrorismo: diagnóstico e tratamento

Agente	Diagnóstico	Testes e amostras	Tratamento
Antraz	Avaliação clínica e achados laboratoriais	*Cultura*: sangue, líquido cerebrospinal (LCE), feridas (definitivas) *Cultura nasal*: determina o grau de extensão da disseminação dos esporos na população *Imuno-histoquímica (IHQ)*: tecido *PCR*: pode confirmar o diagnóstico, caso a cultura resulte negativa *Sorologia*: ELISA, IFA	Antibióticos, incluindo penicilina, quinolonas e tetraciclina. A inalação do antraz deve ser tratada por 60 dias. Antibióticos (30 dias) e vacinas (3 doses em 0, 14 e 28 dias) podem ser combinados. O regime de vacinação completo compreende 6 doses em 0, 2 e 4 semanas e 6, 12 e 18 meses, seguidas de reforços anuais
Peste	Avaliação clínica e achados laboratoriais	*Cultura*: escarro, sangue, linfa *FA direta*: secreções respiratórias *Sorologia*: teste para antígeno F1-V (proteína de fusão)	Antibióticos, incluindo tetraciclina; quinolonas, estreptomicina, gentamicina e cloranfenicol por 10 a 14 dias. Profilaxia: medicação durante 7 dias. Uma vacina contendo o microrganismo morto por formalina é administrada em 0, 1 e 4 a 7 meses. Os reforços devem ser recebidos a cada 1 a 2 anos
Brucelose	Dificuldade para realizar diversas exclusões; necessidade da ajuda de um laboratório	*Cultura*: nasal, escarro, amostras respiratórias (também pode-se utilizar PCR); a cultura de sangue é o teste definitivo *Sorologia*: IFA, ELISA e microaglutinação (padrão-ouro) para detectar anticorpos	Combinação de antibióticos (6 semanas): doxiciclina e rifampina ou quinolona e rifampina. A profilaxia requer 3 semanas. Há inúmeras vacinas disponíveis (com microrganismos mortos ou atenuados) cuja eficácia ainda não foi comprovada
Tularemia	Dificuldade para realizar diversas exclusões; necessidade da ajuda de um laboratório. Principais sintomas: pneumonia com tosse não produtiva	Os testes laboratoriais em geral não são úteis *Cultura*: a bactéria não cresce em meio comum e requer ágar sangue-cisteína ou ágar chocolate *Detecção de AG capsular ou PCR*: sangue total não coagulado *FA direta e PCR*: nasal, amostras respiratórias induzidas *IHQ*: tecidos podem ser úteis em alguns casos *Sorologia*: ELISA para Ac	Tratamento: antibióticos, como gentamicina, estreptomicina e ciprofloxacina. Profilaxia: doxiciclina. A vacina contém o microrganismo vivo atenuado
Botulismo	Avaliação clínica; testes laboratoriais de rotina não têm valor; testes para a toxina podem ser úteis se ela estiver presente no soro	*PCR e teste para toxina*: usar secreções respiratórias nasais induzidas e sangue	Tratamento de suporte. É possível administrar a antitoxina em um período de até 24 horas após a exposição: antitoxinas trivalentes ou pentavalentes. Também há uma vacina constituída pelo toxoide pentavalente
Varíola	Achados clínicos (exantemas)	*Cultura de células ou de embrião de galinha*: lesões de pele são a fonte ideal; *swabs* nasais, secreções respiratórias e amostras de soro também podem ser cultivadas *Microscopia eletrônica*: identifica o vírus *PCR*: usar as mesmas amostras citadas para a cultura *Precipitação em ágar gel*: lesões da pele *Sorologia*: existem testes disponíveis	A imunoglobulina para vacínia (IGV) deve ser utilizada com a vacina de vacínia, caso a exposição tenha ocorrido há mais de 3 dias. Caso contrário, somente a vacina de vacínia deve ser administrada por meio de escarificação. O cidovir é uma promessa para o tratamento
EEV	Dificuldade para realizar diversas exclusões; necessidade da ajuda de um laboratório	*PCR ou cultura em células/camundongos lactentes*: nasal, secreções respiratórias induzidas e soro *Sorologia*: ELISA, IFA e inibição de hemaglutinação; detecção de Ac	Alguns fármacos mostram-se promissores. No momento, não há terapia específica. O tratamento é orientado no sentido de aliviar os sintomas. Algumas vacinas mostram-se promissoras (i. e., TC-84)
FHV	Avaliação clínica; o principal achado é o comprometimento vascular, i. e., petéquias, sangramento, hipotensão postural, edema etc.	*Geral:* leucopenia, trombocitopenia; elevação de AST *Sorologia*: ELISA, IFA e PCR; detecção de diferentes FHVs	Supervisão da hipotensão e da perda de líquidos. São necessários cuidados de suporte agressivos. A ribavirina e a terapia com imunoglobulinas são promissoras. Várias vacinas estão sendo desenvolvidas

Os esporos do antraz podem sobreviver no interior de macrófagos, eventualmente sob a forma vegetativa, e multiplicar-se a ponto de causar o rompimento da célula, com consequente liberação de bacilos na circulação sanguínea. Essas bactérias produzem quatro fatores de virulência, sendo que três deles são toxinas causadoras de sintomas sistêmicos: a toxina antigênica protetora, o fator letal e o fator de edema. Por fim, é produzida uma cápsula que as protege da ação destrutiva dos leucócitos do corpo. A instalação dos sintomas sistêmicos configura a inutilização dos antibióticos, pois estes não exercem efeito sobre as toxinas circulantes (Tierno, 2002).

Características clínicas

Antraz inalatório. Trata-se da forma bifásica da doença. A fase *inicial* caracteriza-se pela manifestação de sintomas semelhantes aos de uma gripe moderada (p. ex., mal-estar, fadiga, febre baixa) seguida de um período de aparente bem-estar, que dura cerca de 1 dia. Logo em seguida, instala-se uma fase *aguda*, que, eventualmente, conduz a sintomas mais graves (p. ex., angústia respiratória aguda). O período de incubação pode variar de 1 a 5 dias, dependendo do número de esporos inalado, mas também pode durar até 60 dias. Choque e morte costumam ocorrer em 24 a 36 horas após o início da angústia respiratória. A taxa de fatalidade da inalação do antraz aproxima-se dos 90%, mesmo com uma terapia antibiótica. Entretanto, esse quadro provavelmente mudará para melhor graças à disponibilidade de novos antibióticos e de melhores unidades de tratamento intensivo. O antraz pulmonar não é transmitido por contato, de um indivíduo a outro.

Antraz cutâneo. A forma cutânea do antraz é observada depois que os esporos são introduzidos sob a pele por inoculação ou contaminação de uma lesão preexistente ou de uma ruptura na pele. O período de incubação é de 2 a 7 dias (raramente, 1 dia), porém ocorre mais frequentemente em 2 a 5 dias. A lesão surge como uma espinha pequena e indolor sobre a pele exposta, progredindo para vesículas e eventual ulceração, que desenvolve, no centro, uma crosta (escara) enegrecida (dentro de 2 a 6 dias). Embora o antraz cutâneo não tratado possa estar associado a uma taxa de fatalidade de cerca de 20%, raramente resulta em morte (1%) se o paciente for adequadamente tratado com antibióticos. Enquanto o antraz não é transmitido de um indivíduo a outro, é possível que lesões secundárias se desenvolvam mediante exposição direta às secreções das vesículas.

Tabela 13.6 *Bacillus anthracis:* papel do laboratório de nível A

Identificar, por meio de suposições, com base nos critérios abaixo apresentados e, em seguida, encaminhar as culturas a laboratórios de nível B ou C para a identificação final	
Esfregaços diretos	Amostras, como sangue, LCE e pele (escara), mostram bastonetes Gram-positivos isolados ou formando cadeias. Em geral, não se observam esporos
Esfregaços de material de cultura	Grandes bacilos Gram-positivos (1–1,5 μm × 3–5 μm), que podem ser Gram-variáveis após 72 horas; os esporos podem ser encontrados na cultura, especialmente sob atmosfera livre de CO_2, porém não estão inchados e são terminais ou subterminais
Colônias em placas de ágar-sangue de ovelha (SBA)	Colônias que apresentam crescimento rápido, medem de 2 a 5 mm (de uma dia para o outro, a 35°C), não hemolíticas, não pigmentadas, superfície seca com aspecto de "vidro fosco" e bordas irregulares, apresentando projeções em forma vírgula ("cabeça de medusa"). A colônia apresenta uma consistência pegajosa (firme) quando perturbada com uma alça
Outros critérios	Imobilidade, catalase positiva, urease negativa, nitrato positivo, bacilo encapsulado que pode ser lisado por bacteriófagos γ (a tipagem com bacteriófagos γ costuma ser feita em laboratórios de nível B ou C)

Antraz GI. Esta forma de antraz é observada quando o indivíduo ingere carne contaminada, particularmente se estiver crua ou mal cozida, proveniente de animais infectados; até o momento, entretanto, não foi descrito nenhum caso nos EUA. O período de incubação é de 2 a 7 dias. Existem dois tipos de antraz GI, os quais são caracterizados por diferentes sintomas: intestinal (p. ex., náusea, vômitos e diarreia) e orofaríngeo (p. ex., inchaço cervical e dificuldade para deglutir). Choque e toxemia podem caracterizar ambas as formas da doença, especialmente nos estágios terminais. A taxa de fatalidade é de 25 a 60%.

As três formas de antraz (pulmonar, cutânea e GI) podem ser complicadas por meningites, observadas em cerca de 5% dos casos (Lew, 2000).

Considerações práticas

- Lavar as mãos é a única medida protetora mais importante. Os esporos são efetivamente removidos com auxílio de água e sabão.
- Qualquer produto suspeito de estar contaminado por esporos deve passar por um processo de higienização com uma solução de água sanitária diluída a 10%. O produto deve permanecer em contato com a solução por, pelo menos, 30 minutos e, em seguida, ser lavado. Se há suspeita de que a carga de esporos é grande, deve ser utilizada uma solução de água sanitária concentrada para fazer a descontaminação.
- Máscaras respiratórias N95 protegem contra a inalação de esporos contidos em aerossol.
- Qualquer área de corte, arranhão ou escoriação na pele deve ser coberta com um curativo contendo tintura de iodo a 1%. Se o corte (ou escoriação) não for muito extenso, aplique a tintura de iodo diretamente em sua superfície. O iodo possui uma incrível ação antisséptica e pode ser esporicida. Nenhum ferimento deve ser considerado tão pequeno que não requeira cuidados.
- Casas que possuem condicionador de ar central com filtro de alta eficiência para particulados (HEPA, *high efficiency particulated air*) terão removidos mais de 99,97% das partículas com 0,3 μm, ou maiores, presentes no ar. Como tendem a se aglutinar, os esporos do antraz costumam ser retidos por esses sistemas de filtro HEPA. Alternativamente, um purificador de ar adaptado com filtro HEPA também serve para manter o ambiente livre de esporos.

Peste bubônica (Tab. 13.7)

História e conhecimentos teóricos

A "morte negra" ou "peste", que assolou a Europa no século XIV, foi responsável pela morte de mais de 25 milhões de pessoas ou 25% da população. Esse período é chamado de "a segunda" pandemia. A primeira das três pandemias teve início no ano de 541 e perdurou até o século VIII, causando cerca de 40 milhões de mortes. A terceira e última pandemia iniciou-se na China, na década de 1860, e disseminou-se para África, Europa e Américas. A peste é uma zoonose que infecta principalmente roedores e é causada pela bactéria *Yersinia pestis*, sendo transmitida pela pulga do rato (*Xenopsylla cheopis*, a pulga oriental, ou *Pulex irritans*, a pulga humana). No passado, as epidemias surgiam em decorrência do contato do homem com as pulgas de roedores infectados. As grandes pragas eram transmitidas por ratos ao homem que vivia em áreas urbanas abarrotadas, cujas condições sanitárias eram extremamente precárias. O homem acaba entrando incidentalmente no ciclo usual (roedor-pulga-roedor). Nos EUA, os casos de peste humana que ocorrem de forma mais natural (cerca de 12 por ano) concentram-se nos Estados do Centro-oeste e do Pacífico (Perry, 1997; Tierno, 2002).

Em um cenário de guerra bacteriológica, o bacilo da peste pode ser transmitido por pulgas contaminadas, que atuam como vetores e causam peste bubônica, ou, mais provavelmente, por meio de aerossol, causando a peste pneumônica. Na natureza, uma pulga de rato regurgita a bactéria ao morder seu hospedeiro. Gatos também são suscetíveis e podem transmitir a peste pneumônica ao homem. Diferentemente do antraz, que não é transmissível de um indivíduo a outro, a peste pneumônica pode ser transmitida pelas grandes partículas de aerossol produzidas quando um paciente tosse.

A *Yersinia pestis* pode ser destruída pelos leucócitos polimorfonucleares, mas são capazes de sobreviver nos monócitos, onde produzem uma cápsula para resistir à fagocitose. Essas bactérias podem alcançar rapidamente o sistema linfático e a circulação sanguínea, disseminando-se para todos os órgãos, causando hemorragia e necrose.

São necessários menos de 100 microrganismos para produzir uma infecção em humano. Estudos mostram que as bactérias podem permanecer vivas por até 1 ano no solo ou por até 270 dias em tecidos sadios. A bactéria é morta mediante exposição ao calor (15 minutos a 72°C) e após várias horas de exposição à luz solar (Tierno, 2002).

Tabela 13.7 *Yersinia pestis*: papel do laboratório de nível A

Identificar, por meio de suposições, com base nos critérios abaixo apresentados e, em seguida, encaminhar as culturas a laboratórios de nível B ou C para a identificação final	
Esfregaços diretos	É mais provável observar um padrão de coloração bipolar ("pino de segurança") para as amostras clínicas (sangue, escarro, aspirados etc.) do que para as culturas. A bipolaridade pode ser melhor visualizada utilizando-se as colorações de Wayson ou Wright-Giemsa. É preciso lembrar que o padrão de coloração bipolar nem sempre é observado e não é exclusivo da *Y. pestis*
Esfregaços de material de cultura	Bastonetes Gram-negativos dilatados (1–2 μm × 0,5 μm) isolados ou compondo pequenas cadeias
Colônias em placas de SBA	Crescimento a 35°C (mais rápido à temperatura ambiente), por 24 horas, sob a forma de colônias cinza-esbranquiçadas, não hemolíticas, transparentes e minúsculas. Contudo, as colônias incubadas por 48 horas apresentam diâmetro de 1 a 2 μm e tornam-se amareladas com o tempo de cultura. O crescimento é observado com ou sem CO_2 na atmosfera. As colônias podem apresentar uma superfície reluzente, com aspecto de "ovos fritos" ou "chapa de cobre martelada". Em meio MacConkey, crescem como colônias diminutas que não fermentam lactose durante 24 horas de cultura; após 48 horas, observa-se um discreto aumento de tamanho
Outros critérios	A bactéria não é móvel entre 35 e 37°C nem à temperatura ambiente (a *Y. pestis* é o único microrganismo da família *Yersinia* que não apresenta motilidade à temperatura ambiente). É oxidase e urease negativa; catalase positiva; cresce em meio floculento, sendo descrita como "estalactite"; e forma acúmulos localizados nas laterais e no fundo do tubo

Características clínicas

A peste apresenta três formas clínicas: bubônica, caracterizada por inchaço dos linfonodos (bubos); pneumônica, com extenso envolvimento dos pulmões; e septicêmica, na qual a corrente sanguínea é infectada pela *Yersinia pestis*. A taxa de mortalidade dos casos de peste pneumônica não tratados é de 100%, enquanto para os casos de peste bubônica essa taxa é de 50%.

Peste bubônica. O período de incubação, de 2 a 10 dias, caracteriza-se por mal-estar, febre alta e sensibilidade dos linfonodos (bubos), que estão aumentados e, eventualmente, necrosados. Pode ocorrer septicemia e disseminação da bactéria para o sistema nervoso central, para os pulmões (levando à forma pneumônica da doença, que passa a ser transmissível de indivíduo a indivíduo) e, enfim, para o restante do corpo, podendo causar a morte do paciente.

Peste pneumônica. O período de 1 a 3 dias de incubação é menor que o da peste bubônica. Os sintomas observados são febre alta, tosse, dor no peito e escarro sanguinolento; a pneumonia pode conduzir ao colapso respiratório e circulatório (Perry, 1997).

Considerações práticas

- Pacientes com peste pneumônica transmitem a infecção por meio de grandes partículas de aerossol (maiores que 5 μm) geradas quando o indivíduo tosse, fala ou espirra. O uso de uma simples máscara cirúrgica pode proteger trabalhadores e familiares no convívio com o paciente. É necessário "precaver-se contra as partículas" durante os 3 dias inteiros da terapia antibiótica, sendo que, após esse período, o paciente deixa de ser contagioso.
- Uma vez que as "partículas" alcançam uma distância aproximada de 1 a 1,5 m a partir do paciente, os sistemas de condicionamento de ar centrais não precisam ser adaptados com filtros HEPA, isto é, não há necessidade de manter o ar livre de bactérias e partículas.
- Em caso de epidemia, é importante controlar a população de pulgas, ratos e outros animais, como gatos. Inseticidas e repelentes são amplamente disponibilizados.
- Lavar as mãos constitui medida essencial da estratégia de prevenção.
- Como a *Y. pestis* não produz esporos, é possível descontaminar as superfícies com uma simples solução de água sanitária a 10%. A pele pode ser descontaminada utilizando-se qualquer produto à base de sabão com ação germicida. Álcoois higienizadores para as mãos (como o Purell) também podem ser eficazes.
- As roupas devem ser lavadas com sabão germicida e água quente (68,3°C), mesmo quando é improvável a exposição a aerossol contendo bactérias a partir de roupas contaminadas.
- Recomenda-se manter uma certa distância (1 a 1,5 m) de indivíduos com crise de tosse ou que estejam produzindo escarro, com ou sem sangue.

Brucelose (Tab. 13.8)

História e conhecimentos teóricos

A brucelose é uma zoonose cujos agentes etiológicos são *Brucella melitensis, B. suis, B. abortus* e *B. canis*. Essas bactérias normalmente causam doença em animais domésticos, como cabras, ovelhas e camelos (*B. melitensis*), gado bovino (*B. abortus*) e suínos (*B. suis*). O patógeno primário de cães, *B. canis*, raramente causa doença no homem. A infecção natural humana ocorre por meio da inalação de aerossol contendo bactéria, ingestão de carne crua ou leite não pasteurizado que estejam contaminados, introdução direta da bactéria na pele (escoriações) ou, ainda, pelo contato com superfícies conjuntivas. A forma humana da doença ocorre a nível mundial e apresenta várias denominações: febre ondulante, febre de Malta, doença de Bang, febre de Gibraltar e febre do Mediterrâneo. Nos países desenvolvidos, a infecção humana está associada às indústrias frigoríficas e de laticínios. Diversos estudos relatam que a brucelose humana é subdiagnosticada e subnotificada. Segundo estimativas, para cada caso registrado, 25 a 30 casos permanecem desconhecidos. Como agente de guerra bacteriológica, as bactérias causadoras da brucelose provavelmente poderiam ser disseminadas por meio de aerossol. Esses microrganismos são intracelulares e, como conseguem escapar da fagocitose, podem ser transportados do tecido linfoide para a circulação sanguínea e serem depositados em inúmeros órgãos. Dentro dos fagócitos, multiplicam-se e, eventualmente, matam suas células hospedeiras, liberando uma nova safra de bactérias. O padrão de febre "ondulante" observado nessa doença corresponde ao momento em que as bactérias são liberadas na circulação sanguínea e provocam o fenômeno. À medida que as bactérias são eliminadas, a febre regride e reaparece somente quando outra safra é liberada. É comum haver recaídas. As espécies de *Brucella* apresentam dois tipos de colônias morfologicamente distintos: "liso" e "rugoso". A forma lisa é mais patogênica, em razão da presença de uma cápsula que protege a bactéria contra a fagocitose e, consequentemente, a destruição. *B. melitensis* e *B. suis* são mais virulentas que as outras duas espécies, apresentando melhor sobrevida no meio intracelular. Por outro lado, *B. abortus* e *B. canis* promovem uma infecção de início insidioso, mas causam doença e complicações de febre mais brandas (Shapiro, 1998, 1999; Tierno, 2002).

Tabela 13.8 Espécie de *Brucella*: papel do laboratório de nível A

Identificar, por meio de suposições, com base nos critérios abaixo apresentados. Encaminhar as culturas a laboratórios de nível B ou C para a identificação final e/ou confirmação, embora a maioria dos laboratórios de nível A seja capaz de identificar completamente as espécies de *Brucella*	
Esfregaços diretos	Na maioria dos casos, são obtidas amostras de sangue e/ou medula óssea. Os microrganismos coram-se fracamente, sendo observados como pequenos cocobacilos Gram-negativos (0,5–0,7 μm × 0,6–1,5 μm) principalmente isolados, com aspecto de grãos de "areia fina"
Esfregaços de material de cultura	Igual à descrição anterior
Colônias em placas de SBA e ágar-chocolate (CA)	Usualmente, não são visíveis ou são minúsculos na cultura de 24 horas; após 48 horas, as colônias são muito pequenas, não pigmentadas, lisas e com borda íntegra. Não são hemolíticas em cultura de SBA. O crescimento de algumas variedades é intensificado pela tensão de CO_2. Algumas variedades crescem em meio MacConkey, enquanto o meio Thayer-Martin pode ser utilizado como meio seletivo. As culturas sanguíneas são mantidas por 21 dias, quando se trata de caso suspeito
Outros critérios	Os cocobacilos são positivos para catalase, urease e oxidase (*B. canis* é variável). Não apresentam motilidade e não requerem fatores X nem V. A brucelose é uma das infecções adquiridas em laboratório mais comumente reportadas. Sistemas automatizados não são úteis nem recomendados para fazer a identificação. *É preciso lembrar que cheirar uma cultura de bactérias de* Brucella sp. *pode resultar em infecção*

Características clínicas

O período de incubação pode ser de 1 a 8 semanas, embora costume ser de 3 a 4 semanas. O início é insidioso e o paciente apresenta mal-estar, febre, calafrios, sudorese, dor de cabeça, fadiga, mialgias e artralgias. A febre usualmente sobe durante o período vespertino e cai à noite, sendo acompanhada de sudorese muito intensa (o paciente fica encharcado de suor). Os linfonodos, o baço e o fígado podem apresentar inchaço. A febre "ondulante" pode se estender ao longo de semanas, meses ou até anos. Contudo, há muitos dias em que o paciente não apresenta febre e sente-se relativamente bem, com apenas mais um ciclo de subida e descida da febre. Por vezes, os pacientes são diagnosticados como apresentando uma febre de origem desconhecida. A tosse é observada em 20% dos casos, enquanto o exame de raios X resulta normal. A taxa de mortalidade é de cerca de 6% na infecção por *B. melitensis*, sendo igual a 1% com as demais espécies. A maioria das mortes está associada à endocardite ou à meningite. Sintomas GI ocorrem em adultos em até 70% dos casos, sendo menos frequentes em crianças.

Considerações práticas

- Embora as espécies de *Brucella* apresentem período de incubação longo e início lento da doença, a típica síndrome da "febre ondulante" ajuda a determinar o diagnóstico e, assim, começar o tratamento.

- As bactérias causadoras da brucelose apresentam uma taxa de fatalidade tão baixa (especialmente com a adoção de terapia antibiótica adequada) que não são muito efetivas como arma biológica.
- A brucelose não pode ser transmitida de um indivíduo a outro, de modo que não é necessário isolar o paciente. Entretanto, recomenda-se prevenir o contato diante da existência de uma lesão drenante.
- As espécies de *Brucellae* não produzem esporos e, por isso, são prontamente destruídas por qualquer germicida. O processo de pasteurização (a 68,3°C) mata as bactérias presentes em qualquer alimento contaminado.
- Como a brucelose é contraída por meio do contato ocular (i. e., quando se esfrega ou toca os olhos), a estratégia de proteção requer que as mãos sejam lavadas com sabão germicida ou higienizadas com produtos à base de álcool.

Tularemia (Tab. 13.9)

História e conhecimentos teóricos

O agente etiológico da tularemia (também conhecida como "febre dos coelhos") é a *Francisella tularensis*. Tratam-se de bacilos gram-negativos incapazes de se mover, que não produzem esporos. O homem adquire essa zoonose por meio do contato com animais, normalmente pela inoculação na pele ou nas membranas mucosas de sangue e líquidos teciduais provenientes de animais infectados ou por meio de picadas de carrapatos, mosquitos ou moscas, igualmente infectadas. Uma forma menos comum de adquirir a infecção é pela inalação de poeira contaminada ou ingestão de alimentos e água contaminados. Um bioterrorista provavelmente optaria por disseminar a bactéria de *Francisella* por aerossol, devido à possibilidade de causar *tularemia tifoide (sistêmica)*, cuja taxa de fatalidade é superior a 10%.

Sendo a bactéria altamente contagiosa, a infecção pode ser produzida pela inalação de apenas 25 microrganismos ou pela inoculação subcutânea de 10 bactérias. Até mesmo rupturas mínimas da pele podem servir de porta de entrada à infecção. As bactérias são tão contagiosas que inúmeros casos de tularemia resultam de acidentes de laboratório, ocorridos durante o processamento de amostras infectadas, tanto na clínica como no laboratório de pesquisa. A distribuição da *Francisella* é mundial. Nos EUA, a doença tem sido reportada principalmente nos Estados do Sul e do Centro-sul.

A *F. tularensis* produz uma cápsula que lhe permite escapar da destruição imediata por ação dos fagócitos existentes no corpo humano. É capaz de sobreviver como parasita intracelular nas células do sistema linfático.

Características clínicas

Existem seis síndromes principais associadas à tularemia, as quais diferem entre si quanto ao modo de infecção.

1. *Tularemia úlcero-glandular* (70 a 85% dos casos): observa-se a formação de uma úlcera característica, usualmente resultante da picada de um carrapato, bem como inchaço dos linfonodos, febre, calafrios, dor de cabeça, sudorese e tosse.
2. *Tularemia glandular* (5 a 12% dos casos): caracteriza-se por febre e inchaço dos linfonodos, sem nenhuma lesão óbvia.
3. *Tularemia tifoide* (7 a 14% dos casos): apresenta início agudo com febre, calafrios, dor de cabeça, vômitos e diarreia. Usualmente, não há lesões na pele nem inchaço dos linfonodos, contudo está associada a uma pneumonia primária ou secundária. Esta é a forma da doença que apresenta maior taxa de mortalidade, sendo também a forma mais provavelmente utilizada para fins de bioterrorismo.
4. *Tularemia óculo-glandular* (1 a 2% dos casos): apresenta conjuntivite severa e inchaço dos linfonodos, comumente como resultado da presença do microrganismo na membrana conjuntiva.
5. *Tularemia orofaríngea*: acomete pacientes que possuem uma lesão primária na orofaringe. Indivíduos com essa doença apresentam dor de cabeça severa e tonsilite bilateral ou dor de garganta do tipo estreptocócica. O inchaço persistente dos linfonodos cervicais aparece depois de 1 a 2 semanas.

Tabela 13.9 *Francisella tularensis*: papel do laboratório de nível A

Identificar, por meio de suposições, com base nos critérios abaixo apresentados e, em seguida, encaminhar as culturas a laboratórios de nível B ou C para a identificação final

Esfregaços diretos	Pode ser difícil interpretar a observação de esfregaços de amostras de sangue, biópsia, raspagens ou aspirados tratados com a coloração de Gram, uma vez que as bactérias são muito pequenas e pleomórficas, sendo que a maioria dos cocobacilos Gram-negativos fracamente corados são vistos como células isoladas
Esfregaços de material de cultura	Bactérias muito pequenas (0,2–0,5 µm × 0,7–1,0 µm), que se coram fracamente, são pleomórficas, e cocobacilos Gram-negativos. São menores que *Haemophilus influenzae* e *Brucella spp.* Esse tamanho caracteristicamente diminuto deve ser motivo de suspeita
Colônias em placas de SBA, CA e ágar-sangue cisteína (BCA) cysteine (BCA)	Crescimento pobre e lento em SBA, sob a forma de colônias (1 a 2 mm) cinza-esbranquiçadas e não hemolíticas após um período de incubação de 48 a 72 horas. Quando cultivadas em meios CA e BCA, as colônias são discretamente maiores (1 a 3 mm) e apresentam coloração que varia do cinza esbranquiçado ao azul acinzentado, apresentando bordas íntegras e superfície lisa e achatada. As colônias não se desenvolvem bem em subculturas com meio SBA (geralmente perdem a viabilidade). As subculturas devem utilizar ágar CA, BCA ou Thayer-Martin. O crescimento das colônias dispensa CO_2 e não há crescimento em culturas elaboradas com ágar MacConkey ou EMB
Outros critérios	A *F. tularensis* não é móvel e é negativa para oxidase e urease; a reação para catalase pode ser fracamente positiva ou negativa. Os fatores X e V não são necessários. Em meio tioglicolato, as bactérias apresentam crescimento lento e formam uma banda densa próxima ao topo do tubo, a qual eventualmente se difunde para baixo com o passar do tempo

6. *Tularemia pneumônica* (8 a 13% dos casos): trata-se, primariamente, de uma complicação das outras formas da doença, em especial da tularemia tifoide. Também é adquirida por meio da inalação de aerossol infeccioso ou como resultado da disseminação de parasitas transmitidos pelo sangue. Os linfonodos pulmonares aumentam de tamanho. Há casos em que a pneumonia não é evidente (Wong, 1999).

Em todas as síndromes de tularemia, os linfonodos podem permanecer aumentados por um longo período e, eventualmente, tornarem-se necróticos e drenantes. A febre (normalmente, baixa) é acompanhada de mal-estar, dor de cabeça e dor nos linfonodos regionais.

Considerações práticas

- A estratégia protetora mais importante consiste na lavagem das mãos com sabão germicida ou higienização com produtos à base de álcool. Um ataque de bioterrorismo provavelmente se daria por meio da disseminação da bactéria em aerossol, contaminando o ambiente ao redor e propiciando uma exposição secundária com envolvimento da pele e das mucosas por contato direto. Germicidas simples, como a água sanitária, destroem as bactérias presentes em superfícies contaminadas.
- Como não há produção de esporos, mas somente formas vegetativas, as bactérias podem ser facilmente eliminadas com aquecimento (62,8°C durante 30 minutos). A taxa de fatalidade relativamente baixa não a torna uma arma biológica eficiente. Os pacientes infectados melhoram rapidamente (10 a 14 dias) quando são tratados adequadamente com antibióticos.
- Uma vez que a tularemia pode ser transmitida por contato com animais de estimação da vizinhança, como cães e gatos, é importante observar qualquer mudança de hábitos ou no estado de saúde desses animais. Tais alterações podem funcionar como eventos-sentinelas que, tal como um "canário na mina", apontam um desastre iminente.

- As bactérias de *Francisella* raramente são transmitidas por meio dos alimentos e da água, mas é importante estar alerta para essa possibilidade. Cozinhar os alimentos torna a bactéria inofensiva, assim como ferver ou filtrar a água.

Toxinas botulínicas (Tab. 13.10)

História e conhecimentos teóricos

As bactérias do gênero *Clostridium* são bacilos anaeróbicos e gram-positivos, que produzem esporos e toxinas. As espécies mais patogênicas são *C. perfringens* (agente etiológico da gangrena), *C. tetani* (agente etiológico do tétano) e *C. botulinum* (agente etiológico do botulismo). Tais doenças resultam da exposição às toxinas proteicas produzidas pela bactéria, dentre as quais a mais poderosa é a toxina botulínica. Ao todo, existem sete toxinas produzidas por *C. botulinum* (A, B, C, D, E, F e G), sendo que a doença humana é causada pelos tipos A, B, E e F. Essas toxinas se ligam às vesículas sinápticas dos nervos colinérgicos, inibindo a liberação de acetilcolinesterase nas terminações nervosas periféricas (incluindo as junções neuromusculares). Em consequência, os pacientes desenvolvem paralisia descendente flácida aguda. Ao bloquearem a neurotransmissão, as toxinas causam paresias e fraqueza musculoesquelética, que constituem as características clínicas comumente observadas. As toxinas de *Clostridium botulinum* estão entre as substâncias mais tóxicas ao homem conhecidas. A dose letal é de apenas 10^{-6} g (Tierno, 2002; Angulo, 1998).

Várias formas de botulismo são humanas, sendo o tipo clássico o *botulismo transmitido por alimentos*, que tipicamente acomete indivíduos adultos e é causado pela ingestão de alimentos contaminados com a toxina. O *C. botulinum* multiplica-se e produz sua toxina nos alimentos, principalmente comidas enlatadas (alcalinas), que são consumidas sem cozimento, bem como alimentos defumados e embalados a vácuo. Sob condições anaeróbicas, os esporos de *C. botulinum* se desenvolvem em formas de vida vegetativa produtoras de toxinas. O *botulismo da ferida*, a forma mais rara da doença, ocorre quando a bactéria ganha acesso ao sítio de uma ferida e produz toxinas *in vivo*. O *botulismo infantil*, a forma mais comum, é observado quando uma criança consome alimentos contaminados com *C. botulinum*, em vez da toxina pré-formada. No intestino da criança, ocorre a síntese da toxina de novo e o subsequente envenenamento. Alguns pacientes aparentemente não dispõem de uma fonte de alimentos ou de uma ferida, sendo denominados pacientes de "classificação indeterminada".

Para fins de bioterrorismo, a toxina botulínica pode ser purificada a partir de grandes reservatórios de *C. botulinum*. Sua distribuição seria realizada por meio de aerossol, causando sintomas similares aos do botulismo transmitido por alimentos. Outra abordagem seria sabotar os suprimentos alimentares, contaminando-os com a toxina, ainda que este não seja um meio de disseminação efetivo (USAMRIID, 2001; Tierno, 2002). Todos sabem que as toxinas botulínicas podem ser transformadas em arma biológica, visto que, em agosto de 1991, diante de uma equipe de inspeção americana, o governo iraquiano admitiu ter realizado pesquisas com tais toxinas antes da Guerra do Golfo Pérsico. É possível transformar em arma qualquer uma das sete toxinas botulínicas conhecidas, uma vez que todas apresentarão o mesmo efeito.

Características clínicas

Os sintomas clínicos costumam surgir em 18 a 24 horas após a ingestão ou a inalação da toxina, embora também possam demorar vários dias para se manifestar. Inicialmente, o paciente apresenta visão dupla, falta de coordenação da musculatura ocular, incapacidade de deglutir, dificuldades para falar, fraqueza generalizada e tontura. Em seguida, observa-se o progressivo enfraquecimento descendente dos membros e fraqueza dos músculos respiratórios. Não há febre, sendo completamente preservados o estado de alerta e de orientação do paciente. O exame neurológico mostra fraqueza muscular da língua, da laringe, dos músculos respiratórios e dos membros. Pouco antes de morrer, em decorrência de uma paralisia respiratória ou de insuficiência cardíaca, o paciente ainda se mantém totalmente consciente. A taxa de mortalidade é elevada. Os pacientes que conseguem se recuperar não desenvolvem anticorpos antitoxina no sangue. É provável que ocorra supressão da produção de anticorpos por ação das toxinas, do mesmo modo que na síndrome do choque tóxico causada pela toxina-1 do *Staphylococcus aureus*. Em crianças, os sinais de paralisia são chamados de síndrome do "bebê flácido" (Tierno, 2002).

Tabela 13.10 Exposição à toxina botulínica: papel do laboratório de nível A

As amostras devem ser encaminhadas imediatamente a um laboratório de saúde pública para serem avaliadas e comparadas a referenciais, mesmo que não haja suspeita de atividade criminal. Os laboratórios de nível A não devem manipular amostras, realizar culturas, identificar ou realizar ensaios para toxinas. O laboratório de nível A tem a responsabilidade de alertar a equipe médica quanto à seleção, ao acondicionamento e ao transporte de amostras, bem como de notificar o laboratório de destino acerca das amostras provenientes de casos suspeitos

	Amostra	Transporte
Amostras de alimento suspeitas	25–50 g de alimento devem ser encaminhados nas embalagens originais, que devem ser colocadas em sistemas vedados e à prova de vazamento	4°C
Swabs nasais	Em caso de suspeita de conversão em aerossol, deve-se coletar *swabs* nasais para realização de testes de toxinas e/ou análise de PCR	Temperatura ambiente
Fezes, enema líquido	Coletar 25–50 g de fezes em frascos estéreis à prova de vazamento	4°C
Soro	Coletar cerca de 10 mL para realização de testes sorológicos	4°C
Outros	Coletar em *swabs* amostras ambientais e/ou de outras fontes	4°C

Nota: tratamento similar deve ser dispensado à responsabilidade do laboratório de nível A em relação a outras toxinas suspeitas, como toxinas estafilocócicas, micotoxinas, saxitoxinas, ricina etc.

Considerações práticas

- Existem antitoxinas e vacinas disponíveis para tratamento e profilaxia.
- A toxina botulínica é *menos* tóxica e letal quando distribuída por inalação que quando por transmissão alimentar.
- Água e sabão podem ser bastante eficazes na remoção da maioria das toxinas da pele, das roupas e dos equipamentos, de modo que a descontaminação da toxina *não* é tão crítica quanto a do microrganismo infeccioso. Uma solução bem diluída de água sanitária (1 parte de água sanitária em 9 partes de água) inativa efetivamente a maioria das toxinas proteicas.
- O uso de uma máscara cirúrgica N95 confere proteção adequada contra aerossóis contendo bactéria. Entretanto, é importante ajustar bem a máscara ao rosto, pois até mesmo uma pequena abertura pode permitir exposição significativa. Embora a máscara não se ajuste adequadamente ao rosto de indivíduos barbados, seu uso permitirá reduzir a exposição.
- Como a toxina botulínica não penetra na pele, vestir roupas especiais de proteção não é tão importante como seria no caso de outros agentes, incluindo substâncias químicas.

Varíola (Tab. 13.11)

História e conhecimentos teóricos

A varíola merece a distinção de ser, isoladamente, a doença com o maior número de registros de morte ao longo da história. Estima-se que esse vírus tenha matado cerca de 500 milhões de pessoas.

O vírus da varíola pertence ao gênero *Orthopoxvirus*. Existem duas variantes de varíola: principal (*major*), que está associada a uma taxa de mortalidade mais alta (15 a 40%); e secundária (*minor*), em que a doença produzida é uma forma mais branda e cuja taxa de mortalidade é de apenas 1%. O vírus da varíola corresponde ao tipo humano do poxvírus. Existem outros poxvírus que naturalmente infectam animais, mas que também podem causar infecção humana incidental (zoonose). Tais vírus compartilham antígenos comuns com o vírus da

Tabela 13.11 Varíola: papel do laboratório de nível A

A varíola corresponde ao nível mais elevado de emergência. As amostras devem ser encaminhadas imediatamente a um laboratório de saúde pública. O vírus é altamente infeccioso; a manipulação deve ser evitada e, caso seja necessário, devem ser adotadas as práticas de BSN-3. A responsabilidade do laboratório de nível A limita-se a alertar a equipe médica quanto à seleção, ao acondicionamento e ao transporte de amostras, bem como contatar o laboratório de referência. Os laboratórios de nível A não devem realizar culturas, amostragem ou ensaios com amostras suspeitas de estarem contaminadas com o vírus. O diagnóstico clínico é confirmado por técnicas executadas no laboratório de nível D

	Amostra	Transporte	Armazenamento
Biópsia	Colocar (de modo asséptico) 2 a 4 fragmentos de tecido em frascos estéreis, à prova de vazamento e resistentes ao congelamento	≤ 6 h/4°C	–20 a –70°C
Crostas	Colocar (de modo asséptico) raspagens/material diverso em frascos estéreis, à prova de vazamento e resistentes ao congelamento	≤ 6 h/4°C	–20 a –70°C
Líquido de vesículas	Coletar líquidos a partir de diferentes lesões em *swabs* separados e estéreis. Sempre incluir material obtido da base de cada vesícula	≤ 6 h/4°C	–20 a –70°C

varíola e, por isso, podem ser utilizados como vacina para o homem. Assim, o vírus da vacínia tem sido historicamente o vírus animal escolhido para a produção de vacinas. À medida que a incidência da varíola foi diminuindo, foram surgindo mais complicações relacionadas às vacinações que casos de doença. Algumas dessas complicações eram graves, incluindo encefalite e reações fatais em paciente imunocomprometidos submetidos à vacinação, às vezes inadvertidamente. Os vírus da vacínia disseminam-se facilmente entre indivíduos imunocomprometidos não vacinados que mantêm contato muito próximo. Essa ainda seria uma preocupação, não fosse a implementação de um massivo programa de vacinação nacional. Se tal programa ainda estivesse para ser implementado, haveria um enorme grupo de indivíduos imunocomprometidos que simplesmente não seriam candidatos à vacinação (Tierno, 2002).

Em 1967, a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu uma campanha mundial para erradicação da varíola. Naquela época, essa doença era endêmica em 33 países, e cerca de 15 milhões de casos eram registrados por ano. Em 1979, a varíola foi erradicada. Atualmente, o vírus da varíola ainda é mantido em dois laboratórios, um nos EUA e outro na Rússia. O destino dessas fontes é motivo de discussão. A destruição dos estoques do vírus impedirá a realização de novas pesquisas diante de uma epidemia. Assim como a peste, a varíola é uma doença muito contagiosa. Considera-se que a dose infectiva de um aerossol seja baixa e, provavelmente, varie entre 10 e 100 microrganismos (Tierno, 2002).

Como o vírus da varíola poderia ser transformado em arma biológica? Esse vírus pode ser disseminado de dois modos: aerossol e contato. Uma vez que a varíola é altamente contagiosa e dissemina-se efetivamente pelo ar, um sistema de distribuição por aerossol representa a maior a ameaça, promovendo a exposição da maior parte da população. Contudo, a exemplo do antraz, trata-se de uma tarefa difícil. O vírus da varíola também pode ser transmitido por contato direto. Uma possibilidade seria a autocontaminação de um grupo de voluntários que, então, interagiriam com a população em geral para infectar as pessoas no decorrer de alguns dias ou semanas, à medida que fossem entrando em contato com elas. Caso uma epidemia de varíola seja detectada em uma determinada área, o CDC e outras autoridades da saúde são capazes de conter o surto por meio da vacinação imediata de toda a população em torno do(s) caso(s) índice(s) (caso referencial). A imunização pós-exposição com a vacina do vírus da varíola (vírus da vacínia) é efetiva e recomendada, somente se for administrada dentro de 3 dias após a exposição. Entretanto, mesmo se esse prazo for ultrapassado, a vacinação e as imunoglobulinas para vacínia conferem proteção. É necessário estabelecer um círculo de imunidade ao redor dos casos índices. Este é precisamente o método utilizado para erradicar a varíola a nível mundial e deve ser unicamente motivo de otimismo.

Características clínicas

A porta de entrada do corpo humano para o vírus da varíola são as membranas mucosas do trato respiratório superior. Esse vírus é transmitido por partículas respiratórias grandes ou pequenas, bem como pelo contato com lesões cutâneas ou secreções. Os pacientes são considerados mais contagiosos quando tossem ativamente. O período de incubação típico é de 12 horas, podendo variar entre 10 e 12 dias. A doença clínica inicia-se com a manifestação de sintomas vagos durante 2 a 3 dias. Tais sintomas são mal-estar, febre, dor de cabeça, calafrios e dor nas costas. A febre pode durar de 1 a 5 cinco dias. Depois que essa febre passa, observa-se o aparecimento de exantema (erupção na pele), o qual evolui para estágio papular, pustulento e de crosta. O último estágio ocorre de 2 a 4 semanas após o surgimento da lesão inicial e resulta na formação de uma cicatriz rosada. O aparecimento das lesões nas áreas afetadas, sempre no mesmo estado, constitui uma importante característica da varíola, diferenciando-a da catapora, na qual as lesões não aparecem ao mesmo tempo e ocorrem em grupos. As lesões produzidas na varíola estão centrifugamente distribuídas (mais numerosas na face e nos membros, em comparação ao tronco), diferente do padrão de distribuição observado na catapora. Portanto, o exantema da varíola é bastante característico e é útil como ferramenta diagnóstica. A taxa de fatalidade é de 15 a 40% entre os pacientes não vacinados, sendo inferior a 1% entre indivíduos vacinados.

Pacientes com varíola são contagiosos assim que surge uma erupção cutânea, permanecendo nesse estado até que as crostas se soltem das lesões, após cerca de 3 semanas. Há uma forma rara de varíola denominada "varíola hemorrágica", muito patogênica, e que apresenta uma taxa de mortalidade bastante elevada.

Considerações práticas

- Diante de uma epidemia de varíola, a população deve se preparar para permanecer dentro de suas casas por dias ou semanas, a fim de reduzir o contato com indivíduos contaminados. Essa medida conterá a epidemia. A despensa de casa deve estar abastecida com suprimento de alimentos adequado.
- Em geral, as partículas respiratórias tornam-se contagiosas antes das lesões cutâneas. Nos hospitais, é necessário adotar medidas de prevenção tanto contra a contaminação por via aérea como por contato, a fim de evitar o contágio. Ao contrário das medidas de precaução contra a peste, o uso de uma simples máscara cirúrgica não basta para conferir proteção. Recomenda-se utilizar uma máscara respiratória especial, a N95 (certificada por apresentar uma eficiência de filtração de cerca de 95%), a qual deve ser utilizada justamente por causa do elevado grau de proteção que proporciona. Pacientes com varíola devem ser postos em quarentena a partir do aparecimento da primeira erupção na pele e assim devem permanecer até que as crostas se soltem das lesões (aproximadamente 3 semanas).
- Caso um familiar contraia varíola, todas as suas roupas, roupas de cama e demais pertences com os quais tenha tido contato devem ser descontaminados com um germicida, como uma solução de água sanitária a 10%, exposição ao vapor ou aquecimento.
- É essencial lavar as mãos com sabão germicida após qualquer contato com um paciente infectado pelo vírus da varíola ou após a exposição ao ambiente em que ele se encontra.

Encefalite equina venezuelana (EEV) (Tab. 13.12)

História e conhecimentos teóricos

A EEV é clinicamente indistinguível das demais encefalites virais, como encefalite de St. Louis, encefalites equinas oriental e ocidental, encefalite japonesa tipo B, encefalite do extremo oriente russo e, até mesmo, a encefalite causada pelo vírus *West Nile*. Dessa forma, a primeira questão a ser considerada é: por que os demais agentes não estão no topo da lista de potenciais armas biológicas? Muitos desses agentes

Tabela 13.12 EEV ou outras encefalites: papel do laboratório de nível A

As amostras devem ser encaminhadas imediatamente a um laboratório de saúde pública para serem avaliadas e comparadas a referenciais. O laboratório de nível A tem a responsabilidade de alertar a equipe médica quanto à seleção, ao acondicionamento e ao transporte de amostras, bem como de contatar o laboratório de referência

	Amostra	Transporte	Armazenamento
Soro	Para cultura, PCR ou sorologia (ELISA, IH, FA etc.)	< 6 h/4°C	–20 a –70°C
LCE	Para cultura, PCR ou sorologias	< 6 h/4°C	–20 a –70°C
Nasal, respiratório (incluindo amostras induzidas)	Para cultura e PCR	< 6 h/4°C	–20 a –70°C
Outros	Biópsia, autópsia, fezes etc. para exame patológico, cultura, análise de hematologia/bioquímica etc.	< 6 h/4°C	–20 a –70°C

até podem estar, contudo apresentam taxas de ataque (número de pessoas que provavelmente contrairia a doença após serem expostas ao agente) bem inferiores às do EEV. A taxa de ataque do vírus da EEV é de 100% (praticamente imbatível) e essa foi a razão que levou o governo dos EUA a transformar esse vírus em arma biológica nas décadas de 1950 e 1960, antes de finalizar seu programa ofensivo de guerra bacteriológica. Todavia, o vírus do EEV ainda constitui uma arma biológica em potencial e um provável vírus substituto à disseminação de um número maior de patógenos. Mesmo assim, a responsabilidade do laboratório de nível A é semelhante em relação a todos os vírus causadores de encefalite, entre os quais o vírus da EEV (USAMRIID, 2001; Tierno, 2002). Esse vírus pode ser transformado em arma tanto sob a forma líquida como na forma seca, para dispersão em aerossol. Sua transmissão pode ser realizada de três modos: (1) por mosquitos, ainda que a incidência natural de EEV seja baixa; (2) por aerossol, tanto sob a forma líquida como na forma seca; e (3) por transmissão secundária de um indivíduo a outro (embora não tenha sido demonstrada de modo conclusivo).

Na natureza, a EEV é uma doença viral transmitida por mosquitos, a qual é neurotrófica e causa encefalite em equinos, bem como uma notável doença febril em seres humanos. Mais de 50% dos equinos que são infectados desenvolvem encefalite, enquanto 100% dos humanos expostos ao vírus desenvolvem uma doença semelhante à gripe (*influenza*). Na doença naturalmente adquirida, somente 2 a 4% dos pacientes desenvolvem sinais de envolvimento do sistema nervoso central, sendo que menos de 1% vai a óbito (Tierno, 2002).

Nos EUA, a EEV é uma doença rara. Sua primeira ocorrência foi registrada na Venezuela, em 1936. A EEV prevalece nas Américas do Sul e Central, em Trinidad e Tobago, México e Panamá. No caso da encefalite causada pelo vírus *West Nile*, um animal-sentinela (aves) indicou a presença da doença antes que a infecção humana tivesse sido efetivada. No caso da EEV, os animais-sentinelas teriam sido os cavalos; entretanto, como tais animais são vacinados por seus criadores, não houve nenhum sistema que indicasse de antemão a ocorrência de um ataque do vírus causador da doença. Por outro lado, como a EEV foi erradicada dos EUA, qualquer indivíduo apresentando a doença poderia representar um provável sinal de bioterrorismo (Tierno, 2002).

O vírus da EEV é um alfavírus transmitido por artrópodes que tem sido associado à doença humana de maneira incidental. Existem oito tipos de vírus sorologicamente distintos, mas apenas dois são patógenos importantes para o homem: as variantes A/B e C (Tierno, 2002). A maioria dos vírus causadores de encefalite é destruída por aquecimento e facilmente morta pela ação de desinfetantes comuns.

Características clínicas

O período de incubação é de 1 a 5 dias, após os quais rapidamente iniciam-se os sintomas de febre (usualmente alta), dor de cabeça, tontura, letargia, depressão, anorexia, calafrios, mialgia, fotofobia, náusea, vômitos, tosse, dor de garganta e, às vezes, diarreia. A EEV é indistinguível de outros vírus causadores de encefalite. A fase aguda da doença dura cerca de 1 a 3 dias e é seguida de um período prolongado (até 2 semanas) de letargia. A recuperação completa costuma ocorrer depois de 2 semanas. Estima-se que a inoculação de 10 a 100 vírus seja suficiente para promover infecção. Nas epidemias que ocorrem naturalmente, menos de 5% dos pacientes apresentam manifestação neurológica caracterizada por convulsões, coma e paralisia.

Considerações práticas

- A EEV é pouco letal e, na maioria das vítimas, pode manifestar-se apenas como uma doença semelhante à gripe. Observe: os bioterroristas podem utilizar qualquer vírus causador de encefalite como arma biológica alternativa tornada mais patogênica por meio da engenharia genética.
- Em caso de epidemia, a população de mosquitos deve ser controlada de modo semelhante à abordagem utilizada para o vírus *West Nile*.
- A lavagem das mãos pode prevenir a rara transmissão do vírus de um indivíduo a outro (por meio da disseminação por contato).
- Germicidas simples, como uma solução de água sanitária a 10% ou Lisol, e aquecimento (73,9°C) destroem facilmente o vírus da EEV.
- Roupas contaminadas podem ser lavadas com qualquer tipo de sabão.

Febre da Crimeia-Congo e outras febres hemorrágicas (Tab. 13.13)

História e conhecimentos teóricos

A febre hemorrágica da Crimeia-Congo (FHCC) é uma das muitas doenças referidas como febres hemorrágicas virais (FHVs). Os agentes virais causadores dessas doenças e seus respectivos modos de transmissão natural estão listados na Tabela 13.14. Qualquer um desses vírus hemorrágicos (exceto o agente etiológico da dengue, que é

Tabela 13.13 Febre hemorrágica da Crimeia-Congo e outras febres hemorrágicas: papel do laboratório de nível A

As amostras devem ser encaminhadas imediatamente a um laboratório de saúde pública para serem avaliadas e comparadas a referenciais. Alguns vírus são altamente infecciosos; a manipulação deve ser evitada e, caso seja necessário, devem ser adotadas as práticas de BSN-3. A responsabilidade do laboratório de nível A limita-se a alertar a equipe médica quanto à seleção, ao acondicionamento e ao transporte de amostras, bem como contatar o laboratório de referência

	Amostra	Transporte	Armazenamento
Soro	Para cultura, PCR ou sorologia (ELISA, IH, FA etc.)	< 6 h/4°C	–20 a –70°C
Outros	Biópsia, autópsia etc. para exame patológico, cultura, análise de hematologia/bioquímica etc.	< 6 h/4°C	–20 a –70°C

Tabela 13.14 Modos de transmissão da FHV

Agente da FHV	Modos de transmissão naturais
Ebola	Contato
Marburg	Contato
Febre de Lassa	Contato
Argentina (Junin)	Contato e aerossol
Boliviana (Machupo)	Contato e aerossol
Crimeia-Congo	Carrapatos e contato
Hantavírus	Contato e aerossol
Febre do Vale de Rift	Mosquito e aerossol
Dengue	Mosquito
Febre amarela	Mosquito

apenas transmissível por mosquito) pode ser transformado em arma biológica disseminada via aerossol (USAMRIID, 2001; Tierno, 2002). Em geral, é muito difícil transformar em arma os agentes causadores de FHVs, dada a inexistência de um estado de portador real.

A FHCC é transmitida por carrapatos, e vários relatos descrevem sua disseminação de um indivíduo a outro em hospitais. Cerca de 1 a 10 partículas virais são o bastante para causar infecção (USAMRIID, 2001). A Febre do Vale de Rift (FVR) é transmitida por mosquitos ou aerossóis. Há uma vacina de vírus inativado disponível para prevenção, e o vírus da FVR é suscetível a ribavarina, um fármaco antiviral. Os vírus Ebola e Marburg são transmitidos por contato direto com sangue, secreções, órgãos ou sêmen provenientes de pacientes infectados. As febres hemorrágicas argentina, boliviana e causadas por hantavírus são disseminadas por meio das fezes secas de roedores (USAMRIID, 2001).

Características clínicas

A síndrome clínica geral associada à infecção por cada um dos vírus anteriormente mencionados é semelhante, denominada "febre hemorrágica viral" ou FHV. Os sintomas mais comumente observados são febre, mialgia, baixa pressão sanguínea, rubor e equimoses em qualquer parte do corpo. Tipicamente, o início da FHCC ocorre 3 a 12 dias após exposição ou inalação de um aerossol. É possível que seja observado um extensivo sangramento GI e amplas áreas de equimose. Outros sintomas são dor de cabeça, dor nas costas, náusea, vômitos, delírio, icterícia e hepatomegalia. A mortalidade na FHCC é de 15 a 30%, porém algumas febres hemorrágicas, como a do vírus Ebola, podem apresentar taxas de mortalidade que giram em torno de 90% (Tierno, 2002).

Considerações práticas

- Qualquer indivíduo que possivelmente tenha sido exposto a sangue, líquidos corporais, secreções ou excrementos provenientes de paciente com suspeita de FHV deve lavar imediata e vigorosamente a superfície da pele com água e sabão; recomenda-se, de preferência, tomar uma ducha.
- Em hospitais, devem ser instituídas medidas preventivas contra o contágio. O uso de máscaras N95 é recomendado para garantir maior proteção. Pacientes infectados devem ser mantidos em quarentena enquanto durar a doença.
- Qualquer indivíduo que esteja cuidando (ou que faça uma visita durante o período de convalescência) de um paciente acometido por uma FHV deve praticar técnicas de "barreira de enfermagem" (em outras palavras, sua proteção completa contra o paciente infectado, por meio da utilização de avental, luvas, máscara, protetor ocular, chapéu, botas etc.), uma vez que há evidências indicando que partículas grandes, ou mesmo fômites (objetos inanimados), podem servir de mediadores para a transmissão viral.
- Qualquer contaminação de membranas mucosas deve ser imediatamente diluída com água em abundância. Quando contaminados, os olhos podem ser irrigados com solução salina ou produtos como o Visine.
- A descontaminação de superfícies, equipamentos e outros artigos pode ser realizada com Clorox (solução a 10%).
- Após a morte do paciente, seu corpo deve ser lacrado com material à prova de vazamentos e enterrado ou cremado imediatamente.
- Roupas extremamente sujas devem ser descartadas ou lavadas com água sanitária ou sabão que contenha um germicida potente.

Terrorismo químico

História e conhecimentos teóricos

As armas químicas foram utilizadas pela primeira vez na guerra moderna durante a Primeira Guerra Mundial. Em 22 de abril de 1915, nos arredores da vila belga de Ypres, as tropas alemãs liberaram cerca de 60 toneladas de gás cloro na atmosfera, a partir de 6 mil cilindros de gás pressurizado. O vento se encarregou de dispersar as nuvens de gás sobre as forças aliadas. Um segundo ataque foi empreendido 2 dias depois. Como resultado, 10 mil mortes foram contabilizadas ao final do episódio. Um gás novo e ainda mais letal, o fosgênio, foi introduzido pelos alemães no fim do mesmo ano. Esse gás era 10 vezes mais efetivo que o gás cloro. Ambos os gases são considerados armas químicas que atuam sobre os pulmões e, por isso, são chamados de "agentes pulmonares". Tais gases danificam as membranas que isolam os sacos alveolares (alvéolos) dos capilares sanguíneos. Em consequência, há extravasamento de líquidos (plasma) para o interior dos alvéolos, e o acúmulo resultante impede as trocas gasosas. A vítima usualmente se torna incapaz de respirar oxigênio em volume suficiente e acaba morrendo sufocada, após agonizar durante 2 a 24 horas. Inicialmente, as vítimas apresentam falta de ar acompanhada de crises de tosse, que podem ser bastante severas. Antes da morte, observa-se produção de grandes quantidades de expectoração espumosa com tonalidade que varia do amarelo (cloro) ao transparente (fosgênio). Há também uma significativa irritação dos olhos e do nariz, além de ardência na garganta (Byrnes, 2003).

Na época em que introduziram o fosgênio, os alemães estavam se tornando peritos na produção de vários tipos de armas químicas, bem como no desenvolvimento de meios para disseminá-las. A Grã-Bretanha seguiu seus passos rapidamente, com o intuito de utilizar armas químicas contra as tropas alemãs. Era necessário grande habilidade para lançar armas gasosas, pois os ventos mudam de direção e, além disso, se os gases fossem lançados inadequadamente acabariam atingindo as próprias tropas que os estavam utilizando. Tais erros ocorriam com frequência, especialmente nas primeiras vezes em que os gases foram empregados. No verão de 1917, os alemães introduziram um novo tipo de gás, o mostarda. Esse gás é uma arma química pertencente a um grupo de agentes denominados "agentes vesicantes". Como o nome diz, um dos efeitos causados por essas substâncias é a formação de bolhas na pele e nos órgãos internos. Pele, olhos, pulmões, trato GI, membranas mucosas, medula óssea e outros órgãos podem ser severamente danificados.

Forçadas a se defender, as tropas passaram a usar máscaras, trajes e capas para se proteger contra os gases, e todo esse equipamento reduziu a eficiência dos soldados para lutar no campo de batalha. Mesmo assim, ao final da guerra, mais de 110 mil toneladas de armas químicas haviam sido lançadas por ambos os lados, e o número de vítimas ultrapassava 1 milhão, incluindo cerca de 100 mil mortos.

Protocolo de Genebra

Devido às mortes agonizantes e aos horrendos sofrimentos infligidos pelas armas químicas durante a Primeira Guerra Mundial, esforços foram realizados no sentido de banir seu uso após a guerra. A Liga das Nações reuniu-se em Genebra e criou um protocolo para eliminar as armas químicas em tempos de guerra. O Protocol for the Prohibition of the Use in War of Asphyxiating, Poisonous, or Other Gases, and of Bacteriological Methods of Warfare foi assinado por 38 países em 1925 (Byrnes, 2003). Esse documento, contudo, apresentava muitas lacunas e não previa a punição dos países que violassem o pacto. Surpreendentemente, durante a Segunda Guerra Mundial, não foram utilizadas armas químicas no campo de batalha, ainda que os alemães tenham desenvolvido os "agentes nervosos", incluindo tabun, sarin e soman. Os agentes nervosos constituem uma classe particularmente poderosa de armas químicas que compartilham algumas propriedades interessantes. O mecanismo de ação de substâncias como o sarin consiste em interromper a comunicação do sistema nervoso com os órgãos que estimula. Em outras palavras, o nervo permanece normal, porém a transmissão do impulso nervoso para o músculo ou outros órgãos é comprometida e usualmente resulta em hiperatividade. Esse estado interfere nas funções básicas do organismo e a vítima morre em 1 a 10 minutos após ter inalado o gás. Agentes nervosos líquidos são caracteristicamente mais pesados que a água. Seus vapores são igualmente mais pesados que o ar e, assim, tendem a descer na direção do solo ou do chão das construções. Embora os vapores de agentes nervosos atuem sobre as vítimas muito rapidamente, a gama de seus efeitos é variável e depende do grau de exposição. Inicialmente, a exposição a tais substâncias afetará as vias aéreas e as partes da face que entram em contato com o gás (olhos, nariz e boca). As pupilas se contraem (focalização), os olhos ficam avermelhados e a visão torna-se embaçada. Alguns indivíduos também apresentam dor nos olhos, dor de cabeça, náusea e vômitos. A rinorreia pode representar uma característica importante, assim como a salivação excessiva. Quando o agente

nervoso é inalado, as vias aéreas se contraem e há indução de ataques de tosse ou falta de ar. Se o agente for inalado em quantidade suficiente, pode haver perda repentina da consciência, seguida de convulsões. Em poucos minutos, a vítima para de respirar e torna-se flácida. Mesmo uma pequena quantidade de um agente como o sarin é capaz de produzir fasciculações (espasmos musculares). Náusea e vômitos podem seguir-se à exposição. Em caso de exposições maiores, é possível que ocorra defecação e micção espontâneas (Byrnes, 2003).

Muitas das novas armas químicas classificadas como "agentes nervosos" foram desenvolvidas a partir de inseticidas e/ou pesticidas comuns. (Na verdade, sempre que aplicam inseticida em seus jardins, as pessoas estão utilizando formas mais fracas de agentes nervosos. Por exemplo, inseticidas como o malation ou o servin, entre dúzias de outros, são agentes nervosos. Tais inseticidas atuam exatamente do mesmo modo que o sarin ou outros agentes nervosos mais potentes, embora requeiram doses e tempo de exposição bem maiores para exercer efeitos similares.) No início dos anos 1950, a Grã-Bretanha fez uma descoberta considerada sem precedentes: um novo agente nervoso cuja capacidade letal apresentava magnitude muito maior que a de qualquer uma das substâncias conhecidas até o momento. Esse novo agente foi nomeado com seu codinome – VX. O VX não só era mais letal, como também mais duradouro (pois permanecia sob a forma líquida por mais de 24 horas) e podia entrar no corpo por inalação ou diretamente através da pele. A penetração por via cutânea era possível porque o agente não era volátil e persistia. Os EUA atuaram em colaboração com a Grã-Bretanha no desenvolvimento desse projeto, eventualmente encarregando-se da produção do VX em larga escala. A produção e a estocagem desse agente estendeu-se pela década de 1960, até que houve a liberação acidental de VX em uma das instalações produtoras, em Dugway, Utah, resultando na morte de mais de 6 mil ovelhas. Todavia, o agente laranja foi provavelmente o agente químico americano mais abominável, utilizado primariamente durante a Guerra do Vietnã, nos anos 60. Sendo um herbicida, era utilizado para desfolhar a vegetação que dava cobertura aos inimigos no campo de batalha. O agente laranja continha várias concentrações de dioxina (tetraclorodibenzeno-dioxina), que, posteriormente, foi considerada tão perigosa que a EPA, em 1986, proibiu totalmente seu uso. Estudos realizados em animais associaram a substância química à ocorrência de linfomas não Hodgkin, sarcomas e carcinomas, entre inúmeras outras doenças (Byrnes, 2003).

Convenção de 1972 sobre a proibição das armas biológicas e químicas

No decorrer das últimas décadas, esforços têm sido realizados no sentido de limitar ou banir o uso de armas tóxicas (químicas e biológicas). Em 1972, mais de 140 países, incluindo os EUA, firmaram a Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Biologic and Toxic Weapons and Their Destruction que, teoricamente, limitava a continuação do desenvolvimento ou uso de armas biológicas ou químicas (Byrnes, 2003). Infelizmente, esse acordo foi violado inúmeras vezes. Citando dois exemplos relativamente recentes da tendência atual, em 1988, a Líbia construiu instalações produtoras de armas químicas alegando tratar-se de uma indústria farmacêutica. Episódios como esse ocorrem com frequência e contam com a cooperação de companhias que vendem tecnologias ditas "de uso duplo" a países como Iraque e Líbia. Uma instalação produtora de pesticidas pode ser prontamente transformada e passar a produzir armas químicas. O Iraque utilizou gás mostarda em sua longa campanha contra o Irã e tem utilizado gás mostarda e agentes nervosos tóxicos contra a própria população dissidente de curdos iraquianos. Os anos 80 assistiram o uso das armas químicas nos campos de batalha de Afeganistão, Camboja, Irã, Iraque e Laos (Tierno, 2002; Byrnes, 2003).

Em março de 1995, um culto religioso japonês, denominado Aum Shinriyko, soltou gás sarin no sistema de metrô de Tóquio (Tierno, 2002). Milhares de pessoas ficaram feridas e houve 11 mortos. Esse uso recente das armas químicas contra a população civil ressalta a relativa disponibilidade e facilidade de uso de tais armas, chamando a atenção do público e dos governos.

Transformação de agentes químicos em armas e subsequente distribuição

Todo agente químico precisa ser transformado em arma antes de ser lançado sobre o alvo. Em geral, o processo de transformação em arma envolve inúmeras etapas. Primeiramente, o agente deve ser produzido em quantidade suficiente, estocado temporariamente e estabilizado para que não sofra evaporação nem degradação. São adicionados espessantes para aumentar a viscosidade dos agentes líquidos e é necessário dispor de um veículo (agente carreador) que melhore a dispersão da substância química. O agente químico, então, é inserido em um dispositivo de distribuição apropriado, como um explosivo, munições pneumáticas ou mecânicas, ou aparelhos de disseminação. Seja qual for a abordagem, a meta é transformar o agente químico em aerossóis de partículas de 1 a 7 μm. Para tanto, pode ser utilizado um sistema de distribuição bastante sofisticado, como os equipamentos de munição que normalmente são disponibilizados apenas ao governo, ou dispositivos tão simples quanto os geradores de aerossóis, como um *spray* desodorante para axilas ou borrifadores utilizados em jardinagem, os quais igualmente atuam como sistemas de distribuição efetivos. Vale ressaltar que esses dispositivos desprovidos de requinte estão facilmente ao alcance das massas. Há ainda inúmeros outros fatores que poderiam afetar a transformação de compostos químicos em armas, bem como a distribuição das armas químicas, como:

- *temperatura (solo e ar)*: em geral, temperaturas elevadas aceleram a evaporação;
- *umidade*: teores de umidade elevados aumentam o tamanho das partículas e reduzem sua eficácia;
- *precipitação*: a chuva forte pode diluir e dispersar uma arma química, enquanto a neve aumenta sua persistência;
- *velocidade do vento*: influencia na dispersão de vapores, aerossóis e líquidos, afetando a área-alvo;
- *natureza das construções*: construções podem absorver ou adsorver agentes químicos; do mesmo modo, as construções podem oferecer proteção;
- *natureza do terreno*: florestas e colinas podem aumentar bastante a turbulência de nuvens de compostos químicos de baixa altitude.

Categorias de armas químicas

Existem, literalmente, centenas de agentes químicos e gases venenosos que podem ser utilizados em um ataque, além de outros compostos potencialmente novos, que ainda estão em fase de desenvolvimento, com emprego de métodos de engenharia genética (descritos a seguir) recentemente descritos. As agências do governo classificam as armas químicas em várias categorias (Tab. 13.15).

Papel do laboratório de nível A: terrorismo químico

É desnecessário salientar que detectar a tempo os agentes químicos de ação relativamente rápida que um terrorista pode usar, como os agentes nervosos (i. e., sarin e VX), é crítico não apenas para o paciente (acidente), mas também para os atendentes de primeiros socorros ou da unidade de materiais perigosos (HAZMAT, *hazardous materials*) que respondem ao evento. Após um ataque terrorista, a rápida detecção do tipo de agente envolvido, bem como de sua concentração, possibilita o tratamento efetivo das vítimas, incluindo a escolha de antídotos adequados. Também torna-se possível proporcionar a devida proteção com o intuito de garantir a segurança do público em geral. Dessa forma, embora possa parecer óbvio, a entidade mais indicada para detectar tais agentes não é o laboratório clínico, e sim o bailiado da unidade de primeiros socorros ou da equipe do HAZMAT. Essas equipes utilizam uma ampla variedade de equipamentos comercialmente disponibilizados, que são fabricados para detectar compostos químicos perigosos rapidamente, incluindo agentes utilizados para terrorismo químico. Do mesmo modo, os militares fornecem inúmeros dispositivos que podem ser empregados na detecção desses agentes químicos, bem como de seus vapores. O detector de vapores mais portátil que existe é o Monitor de Agentes Químicos (MAQ). Esse aparelho utiliza espectroscopia

Tabela 13.15 Armas químicas

Categoria	Exemplos	Comentários
Agentes nervosos	Sarin, tabun, soman, VX, malation, sevin	Interferem na transmissão da mensagem proveniente do nervo em direção ao órgão ou músculo
Agentes sanguíneos	Cianeto de hidrogênio, cloreto de cianeto	Usualmente, são absorvidos após serem inalados; uma vez na corrente sanguínea, causam danos letais ao atuarem sobre a enzima citocromo-oxidase, responsável pela respiração celular. A privação de oxigênio ocorre porque as células não conseguem utilizá-lo (ver Cap.23)
Agentes vesicantes	Mostardas nitrogenadas e sulfuradas	Promovem a formação de bolhas na pele, bem como nos órgãos e nos tecidos internos. Como resultado, os tecidos são destruídos. Também causam mutações em massa, ao promoverem ligações cruzadas no DNA e no RNA
Metais pesados	Arsênico	Os elementos metálicos formam compostos venenosos e desintegram os processos metabólicos celulares
Agentes pulmonares	Gás cloro, fosgênio	Causam danos às membranas dos pulmões, provocando a saída e o acúmulo de líquidos, com consequente deprivação de oxigênio e, eventualmente, sufocação
Dioxinas	Tetraclorodibenzeno-dioxina	Estão associados ao aparecimento de linfomas, sarcomas, carcinomas, cloracne e uma infinidade de outras doenças (uma importante complicação a longo prazo é o diabetes tipo II)
Agentes incapacitantes ou psicotomiméticos	Benzilato de quinuclinidil, fenciclidina	Causam distúrbios pseudopsicóticos, comprometem a capacidade de tomar decisões e provocam desorientação, sendo que qualquer um desses efeitos isoladamente é incapacitante. Doses elevadas podem causar a morte da vítima por parada respiratória
Ácidos e bases corrosivas	Ácido sulfúrico, hidróxido de sódio	Promovem queimaduras graves e destruição tecidual nas áreas expostas

de mobilidade iônica para detectar agentes nervosos, vesicantes e sanguíneos. Os detectores de líquidos mais rápidos e simples são também produtos de fabricação militar, conhecidos como papéis M8 e M9, que podem ser utilizados para detectar agente mostarda ou agentes nervosos. Tratam-se dos dispositivos de triagem mais rápidos disponíveis, sendo que podem apresentar reações falso-positivas em alguns casos (Byrnes, 2003). Entretanto, os tubos colorimétricos são o meio de detecção mais comumente utilizado pelas equipes do HAZMAT. Sua capacidade analítica é ampla e usualmente são incluídos testes para gás cloro e fosgênio (agentes pulmonares), cianeto (agente sanguíneo) e organofosfatos (agentes nervosos). Ademais, as equipes do HAZMAT possuem uma grande variedade de algumas das mais recentes tecnologias pós-9/11, as quais os capacitam detectar virtualmente **todos** os agentes químicos necessários com relativa rapidez (Byrnes, 2003).

Podendo exercer papel secundário, os laboratórios clínicos de nível A ainda são capazes de dar algum suporte à detecção dos agentes químicos utilizados em um dado ataque ou da presença de seus produtos de degradação nas vítimas, sendo úteis na triagem ou no tratamento dos pacientes que chegam ao hospital. Para fins práticos, é possível dividir em quatro categorias principais os potenciais agentes químicos, cuja detecção pode ser oferecida pelo laboratório de acordo com seu repertório analítico: agentes nervosos, agentes sanguíneos (cianeto), agentes vesicantes (provocam a formação de bolhas) e agentes pulmonares.

Os laboratórios de bioquímica mais modernos atualmente dispõem da capacidade de fornecer alguns dados analíticos específicos e úteis para dar suporte às vítimas hospitalizadas em decorrência de ataques químicos. Por exemplo, vários analisadores químicos automáticos conseguem medir o aumento da atividade de colinesterase, e essa informação pode servir de marca registrada dos pacientes que foram expostos a agentes nervosos. Tal informação é utilizada para quantificar o progresso e o grau de recuperação de indivíduos vitimados por agentes nervosos. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa tem sido empregada para detectar metabólitos de agentes vesicantes, como gás mostarda ou Lewisite (Byrnes, 2003), sendo útil para medir o progresso da recuperação dos pacientes na fase de pós-exposição. Infelizmente, no caso de indivíduos expostos a agentes pulmonares, como gás cloro ou fosgênio, o papel do laboratório limita-se ao monitoramento de suporte, ou seja, realizar análise de gases sanguíneos (para medir a PO_2). Essa limitação também se aplica aos pacientes expostos a agentes sanguíneos, como o cianeto. O cianeto gasoso exerce seu efeito letal em questão de segundos e, por isso, indivíduos que ingerem cianeto precisam tomar o antídoto imediatamente para prevenir a anóxia e a parada respiratória. Portanto, a equipe do HAZMAT possui os melhores meios para analisar e identificar tais agentes para, em seguida, fornecer antídotos a pacientes envenenados ainda no cenário do acidente, bem antes de chegarem ao hospital.

Em resumo, os laboratórios de nível A exercem principalmente um papel de apoio na supervisão de pacientes hospitalizados, que foram vitimados em ataques de terrorismo químico.

Terrorismo nuclear

História e conhecimentos teóricos sobre armas nucleares

Em 1895, Ernest Roentgen descobriu radiações penetrantes que produziam fluorescência e as chamou de raios X. No ano seguinte, Henri Becquerel constatou que tais radiações (posteriormente classificadas como raios α, β e γ) eram emitidas pelo urânio. Em 1905, Albert Einstein formulou sua famosa equação: $E = mc^2$ ao concluir que a matéria pode ser convertida em energia. Essas descobertas forneceram a rede de conhecimentos científicos para eventualmente atrelar a energia nuclear, embora isto não tenha ocorrido até a Segunda Guerra Mundial. Em 1942, a cidade americana de Los Alamos, no estado do Novo México, foi escolhida para abrigar a sede do laboratório de pesquisas físicas e planejamento de bombas atômicas. Em cerca de 30 meses, o "Projeto Manhattan" (nome atribuído ao programa que resultou na produção das primeiras bombas atômicas) tinha alcançado sua meta de produzir uma arma nuclear. Em 1945, a Alemanha havia se rendido, porém o Japão continuava sua campanha na guerra. Em 26 de julho desse mesmo ano, foi emitida a Declaração de Potsdam, na qual os líderes Harry Truman (EUA), Chiang Kai-Shek (China) e Winston Churchill (Grã-Bretanha) aconselhavam o governo japonês a proclamar a rendição incondicional de todas as tropas japonesas, advertindo-o das consequências de uma decisão contrária. O governo japonês rejeitou a declaração em 29 de julho de 1945 (Byrnes, 2003). Na manhã de 6 de agosto, uma aeronave americana chamada *Enola Gay* sobrevoou a cidade japonesa de Hiroshima e lançou a *Little Boy* – uma bomba enriquecida com urânio (15 kT). Alguns dias depois, a *Fat Man* foi lançada sobre outra cidade japonesa, Nagasaki. Tinha início a era nuclear.

A potencial ameaça de terrorismo nuclear

Desde o final da Segunda Guerra Mundial, os EUA fabricaram mais de 70 mil armas nucleares, embora muitas tenham sido retiradas de uso. As armas modernas são maiores (1.000 kT ou 1 MT) e muito mais destrutivas que a bomba de 15 kT lançada sobre Hiroshima. Embora a "Guerra Fria" com a Rússia tenha oficialmente terminado e esforços estejam sendo empreendidos para reduzir o número de armas nuclea-

res, outros países possuem ou estão desenvolvendo potencial nuclear. Há uma certa preocupação quanto à possibilidade de tais armas irem parar nas mãos de terroristas ou de serem utilizadas por nações hostis. Ao mesmo tempo em que há possibilidade de terroristas ganharem acesso a armas nucleares de destruição em massa, é bem mais provável que eles venham a construir *"bombas sujas"* – uma combinação de explosivos convencionais e material radioativo. É relativamente simples produzir e detonar as "bombas sujas", cujo principal propósito não é matar pessoas, mas criar e espalhar pânico e terror psicológico. A quantidade de radioatividade gerada por uma "bomba suja" depende do material radioativo empregado em sua fabricação. Entretanto, até mesmo uma pequena quantidade de material radioativo proveniente de um dispositivo como esse tem potencial de gerar gastos com descontaminação relativamente vultosos.

Papel do laboratório de nível A: terrorismo nuclear

O laboratório clínico não se envolve ativamente na detecção de contaminações por radiação. É mais provável que essa tarefa seja realizada pela unidade de emergências do hospital, que dispõe de um ou mais detectores manuais de radiação, como o Ludlum Modelo 3/ Modelo 44-9 combo Geiger-Mueller, que consegue detectar radionuclídeos de emissão α, β e γ. As equipes de rotina do HAZMAT e das unidades de atendimento de primeiros socorros contam com tal aparato e são as prováveis entidades que primeiramente identificam ou detectam um evento nuclear. Os laboratórios clínicos de bioquímica e hematologia meramente dão suporte a pacientes que necessitem de hospitalização.

Referências bibliográficas

Angulo FJ, St Louis ME: Botulism. *In* Evans AS, Brachman PS (eds): Bacterial Infections of Humans. New York, Plenum, 1998, pp 131–153.

Byrnes ME, King DA, Tierno PM: Nuclear Chemical and Biological Terrorism. Boca Raton, CRC Press, 2003.
Este texto fornece uma revisão abrangente sobre as diversas armas de destruição em massa, bem como conselhos sólidos e ações simples que podem ser tomadas por respondedores emergenciais ou pelo público em geral para diminuir os riscos e evitar o pânico diante de um eventual ataque terrorista.

CDC: NYC DOH response to terrorist attack September 11, 2001. MMWR, 2001; 50:941–948.

CDC/NIH: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2nd ed. Wayne, NCCLS, 2001.

Gilchrist MJR, McKinney WP, Miller JM, Weisfeld AS: Cumitech 33, Laboratory Safety, Management and Diagnosis of Biological Agents Associated with Bioterrorism. Washington DC, ASM Press, 2000.

Lew DP: *Bacillus anthracis. In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia, Churchill Livingston, 2000, pp 2215–2220.

NATO: Handbook of Medical Aspects of NBC Defensive Operations, Amed P-6(B) Part II Biological. Depts of the Army, Navy and Air Force, 1996.

NCCLS: Protection of Laboratory Workers from Instrument Hazards. Villanova, NCCLS, 2001.

Perry RD, Fetherson JD: *Yersinia pestis* – the etologic agent of plague. Clin Microl Rev 1997; 10:35–66.

Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL: Botulism in the United States: A clinical and epidemiologic review. Ann Intern Med 1998; 129:221–228.

Shapiro DS, Wong JD: Brucella. *In* Murray PR (ed): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington DC, ASM Press, 1999, pp 625–631.

Tierno PM: Protect Yourself Against Bioterrorism. New York, Pocket Books, 2002.
Este guia de bolso para bioterrorismo fornece informações concisas sobre os 18 agentes biológicos mais comuns, incluindo background, *história e aspectos clínicos, Discute informações sobre supervisão pré e pós-exposição, bem como numerosas estratégias de resposta protetora.*

Tierno PM: The Secret Life of Germs, 2nd ed. New York, Simon and Schuster, 2004.

USAMRIID: Medical Management of Biological Casualties Handbook, 4th ed. Fort Detrick, United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases, 2001.
Trata-se do handbook *resumido do Exército dos Estados Unidos de contramedidas médicas efetivas contra os agentes bacterianos, virais e tóxicos mais provalmente utilizados como armas biológicas de bioterrorismo. É designado como publicação de referência para consulta imediata, bem como para revisão, mas não se trata de uma fonte de informações completa.*

VanPelt C, Verduin CM, Goessens WHF, et al: Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical laboratory: comparison of conventional and molecular methods. J Clin Microbiol 1999; 37:2158–2164.

Wong JD, Shapiro DS: Francisella. *In* Murray PR (ed): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington DC, ASM Press, 1999, pp 647–651.

PARTE II

Bioquímica clínica

Editado por

Matthew R. Pincus MD PhD, Mark S. Lifshitz MD

CAPÍTULO 14

Avaliação da função renal, da água, dos eletrólitos e do equilíbrio acidobásico

Man S. Oh MD

Introdução 171
Volumes e osmolalidade de líquidos corporais 171
Volume de líquidos corporais 172
Composição de líquidos corporais 172
Composição extracelular 172
Composição intracelular 172
Determinação da osmolalidade do plasma 173
Tonicidade 174
Osmolalidade e gravidade específica 174
Regulação do volume extracelular 174
Determinação da função renal 176
Conceito de depuração 176
Determinação da taxa de filtração glomerular 176
Taxa de filtração glomerular (TFG), fluxo plasmático renal (FPR) e fração de filtração (FF) 179
Excreção fracionada (EF) 180
Índice de insuficiência renal (IIR) 180
Reabsorção fracionada (RF) 180
Depuração de água livre e depuração de água livre negativa 180
Distúrbios da concentração de potássio 180
Controle do fluxo transcelular de potássio 180
Controle da excreção renal de potássio 181
Atividade de renina plasmática (ARP), concentração de aldosterona plasmática (AP) e anormalidades do metabolismo de potássio 181
Causas e patogênese da hipocalemia 182
Diagnóstico diferencial da hipocalemia 183
Causas e patogênese da hipercalemia 183
Diagnóstico diferencial da hipercalemia 184
Distúrbios do metabolismo de água, sódio e hormônio antidiurético (ADH) 184
Regulação da sede e liberação de ADH 184
Concentração e diluição da urina 184
Poliúria 186
Causas e patogênese da hiponatremia 186
Causas e patogênese da hipernatremia 187
Distúrbios acidobásicos 188
Sistema de tamponamento de bicarbonato e CO_2 188
Definição de ácido e base 188
Equilíbrio acidobásico corporal 188
Acidose metabólica 189
Alcalose metabólica 192
Acidose respiratória 192
Alcalose respiratória 193
Distúrbios acidobásicos mistos 193
Referências bibliográficas 194

PONTOS-CHAVE

- É essencial à manutenção da vida que os volumes e a composição de eletrólitos permaneçam normais nos diversos compartimentos de líquidos corporais.
- A manutenção da normalidade dos volumes e da composição de eletrólitos requer participação de vários mecanismos de controle, sendo que o rim desempenha papel particularmente importante.
- O rim é o órgão mais importante para a manutenção do estado normal do volume e da composição de líquidos do organismo, de modo que a discussão inicial tratará da fisiologia renal normal e dos vários testes projetados para detectar anormalidades da função desse órgão.
- A função mais importante do rim consiste em eliminar os produtos residuais do metabolismo, e a melhor representação desse papel é indicada pela taxa de filtração glomerular (TFG). Portanto, uma parte considerável da discussão será voltada para os métodos de determinação da TFG, bem como para os vários testes laboratoriais que refletem o nível de TFG.
- Os dois marcadores de adequação da TFG mais utilizados são as concentrações plasmáticas de creatinina e de nitrogênio ureico. As quantificações bioquímicas de ambos os marcadores serão bastante abordadas ao longo da discussão.
- Entre os parâmetros importantes da composição normal de líquidos corporais estão as concentrações de prótons, sódio e potássio.
- A seção que trata dos distúrbios de potássio discute os mecanismos, causas e tratamento da elevação ou redução anormal das concentrações desse eletrólito no líquido extracelular.
- A seção que trata dos distúrbios de sódio discute os mecanismos, causas e tratamento da elevação ou redução anormal das concentrações desse eletrólito no líquido extracelular.
- A seção que trata dos distúrbios acidobásicos discute os mecanismos, causas e tratamento da elevação (i. e., acidose) ou redução (i. e., alcalose) anormal das concentrações de prótons no líquido extracelular.

Introdução

Os testes laboratoriais para avaliação dos distúrbios dos *status* renal, hídrico, eletrolítico e acidobásico constituem os procedimentos mais comumente realizados em laboratórios de bioquímica clínica; tomados em conjunto, os testes de triagem para tais determinações frequentemente são agrupados em um painel metabólico básico. Distúrbios do equilíbrio acidobásico e eletrolítico constituem complicações constantemente observadas no tratamento de diversas condições. A doença renal é uma das principais sequelas de distúrbios comuns, tais como diabetes e hipertensão. A interpretação adequada dos testes laboratoriais destinados à avaliação de distúrbios renais, eletrolíticos e acidobásicos requer uma compreensão acerca da fisiologia e patofisiologia desses sistemas. Para o entendimento desses distúrbios, é essencial conhecer a função renal e o modo como os rins regulam o volume extracelular.

Volumes e osmolalidade de líquidos corporais

Os líquidos corporais constituem uma solução aquosa que contém eletrólitos e partículas não eletrolíticas, e é constituída pelos compartimentos intra e extracelular. O compartimento intracelular não é um compartimento único. Cada célula possui seu próprio ambiente isolado e comunica-se com as demais células somente através do líquido intersticial e do plasma. Consequentemente, as células dos vários tecidos diferem entre si quanto ao conteúdo e à concentração de solutos. Como as membranas celulares são permeáveis à água graças à presença ubíqua das aquaporinas (canais de passagem da água), o equilíbrio osmótico pode ser mantido, de modo que a osmolalidade de todas as células permanece a mesma e está em equilíbrio com a osmolalidade extracelular (Agre, 2002; Nielsen, 2002; Goodman, 2002).

A operação das funções metabólicas normais do corpo requer a manutenção de uma ótima força iônica em seu ambiente, principalmente do

líquido intracelular, onde ocorre a maioria das atividades metabólicas. Os mecanismos homeostáticos do organismo trabalham para proporcionar esse ambiente. Como as principais atividades metabólicas não acontecem no líquido extracelular, uma alteração substancial em sua força iônica não acarreta necessariamente efeitos adversos ao funcionamento do corpo. O principal papel do líquido extracelular é atuar como canal de ligação entre as células e entre os órgãos. O plasma representa a via de trânsito rápido, enquanto o líquido intersticial serve de zona de suprimentos lenta. A capacidade do líquido extracelular de atuar como meio de ligação eficiente requer a manutenção de um ótimo volume extracelular, particularmente do volume vascular. Uma função adicional importante do líquido extracelular consiste na regulação do volume intracelular e de sua força iônica. Por causa do equilíbrio osmótico existente entre as células e o líquido extracelular, qualquer alteração da osmolalidade extracelular é seguida de uma modificação idêntica na osmolalidade intracelular que, por sua vez, costuma ser acompanhada de uma mudança recíproca do volume celular (Carroll, 1989).

Embora as células e órgãos possam ser supridos com substrato e aliviados dos produtos metabólicos por meio de uma circulação bem mais lenta, a circulação normal é necessária ao fornecimento de oxigênio em quantidade suficiente para atender às exigências metabólicas do organismo. O volume plasmático normal é um pré-requisito para a manutenção da circulação normal. Uma vez que o plasma encontra-se em equilíbrio com o líquido intersticial, a manutenção do volume vascular normal requer volume extracelular igualmente normal. Se o volume extracelular estiver abaixo do normal, a perfusão dos órgãos será comprometida, enquanto um volume extracelular acima do normal provocará congestão vascular e edema pulmonar.

Volume de líquidos corporais

O conteúdo de água total do corpo pode ser determinado pela diluição de várias substâncias, entre as quais deutério, trítio e antipirina. Em adultos hospitalizados, que não apresentam distúrbios de líquidos nem eletrolíticos, o conteúdo de água total quantificado com antipirina equivale a cerca de 54% do peso corporal (Carroll, 1989). O conteúdo de água fracionada é maior em bebês e crianças, diminuindo progressivamente com a idade. O conteúdo de água depende igualmente do conteúdo de gordura corporal. Mulheres e indivíduos obesos, em razão do maior conteúdo de gordura que possuem, tendem a apresentar menor volume de água associado a um determinado peso. Considerando que 54% do peso corporal (em kg) corresponde ao conteúdo de água do corpo, e sendo 1 kg igual a 2,2 lb, uma redução útil para se calcular o conteúdo de água total corporal é:

$$\text{Água corporal total (L)} = \text{peso corporal (lb)} / 4 \qquad (14.1)$$

No caso de indivíduos obesos, subtrai-se 10% do conteúdo de água total calculado. Ao contrário, para indivíduos magros, adiciona-se 10%. Quando se trata de um indivíduo muito obeso, o porcentual a ser subtraído é 20%. Mulheres possuem um conteúdo de água total aproximadamente 10% inferior ao observado em homens com o mesmo peso corporal. O volume extracelular é medido diretamente, enquanto o volume intracelular é estimado como sendo a diferença entre o conteúdo de água total do organismo e o volume extracelular. A quantificação do conteúdo de água total é confiável, porém, o mesmo não se pode afirmar para o volume extracelular, em razão da inexistência de um marcador ideal. Marcadores como sódio, cloreto e brometo apresentam certo grau de penetração nas células, enquanto marcadores como manitol, inulina e sucrose não penetram determinadas partes do meio extracelular. Assim, dependendo do tipo de marcador utilizado, o volume de líquido extracelular pode apresentar uma variação de 27 a 53% do conteúdo de água total corporal (Carroll, 1989).

O volume extracelular determinado com cloreto e expresso como porcentual do conteúdo de água total corporal apresenta uma variação de 42 a 53%, sendo maior em indivíduos mais velhos e em mulheres. O volume extracelular quantificado com inulina ou sulfato é menor, cerca de 30 a 33% do conteúdo de água total corporal (Carroll, 1989). Para fins de discussão, neste capítulo, será considerado que o volume extracelular corresponde a 40% do conteúdo de água total do organismo. O volume extracelular é dividido em três frações: volume intersticial (volume ocupado pelo espaço entre as células, equivalente a 28% do conteúdo de água total corporal), volume plasmático (8%) e volume de água transcelular (4%) (Tab. 14.1). A água transcelular inclui o líquido luminal do trato gastrintestinal, os líquidos existentes no sistema nervoso central, o líquido presente nos olhos, bem como os líquidos lubrificantes das superfícies mucosas.

Composição de líquidos corporais

Composição extracelular

As concentrações plasmáticas de eletrólitos são facilmente quantificadas e seus valores são bem conhecidos. Tais concentrações aumentam cerca de 7% ao serem expressas no conteúdo de água plasmático, uma vez que os sólidos representam aproximadamente 7% do plasma. Dessa forma, a concentração plasmática de sódio é 140 mEq/L; contudo, a concentração de sódio na água plasmática é de cerca de 150 mEq/L. As concentrações de eletrólitos no líquido intersticial diferem das concentrações plasmáticas, por causa da diferença existente entre as concentrações de proteína em ambos os locais. As diferenças de concentração de eletrólitos entre o plasma e o interstício podem ser previstas pelo equilíbrio de Donnan (Tab. 14.2) (Oh, 1995). Diante de concentrações normais de proteínas no plasma, as concentrações de cátions difundíveis são cerca de 4% maiores na água plasmática do que na água intersticial, enquanto as concentrações de ânions difundíveis são cerca de 4% menores no plasma do que no líquido intersticial. No líquido intersticial, as concentrações de cálcio e magnésio são inferiores aos valores previstos pelo equilíbrio de Donnan, pois tais íons encontram-se substancialmente ligados às proteínas.

Parte do espaço intersticial é ocupada por uma substância pavimentar constituída de glicosaminoglicanas, das quais a mais abundante é a hialurona (ácido hialurônico). Esse espaço exclui a distribuição de proteínas. Na parte restante, as proteínas difundem-se livremente e comunicam-se com os linfáticos. A primeira parte do espaço intersticial é uma fase em gel, enquanto a outra parte é uma fase livre. A elastina se interpõe junto ao espaço intersticial, conferindo a propriedade elástica apresentada pelo tecido intersticial. Essa elasticidade é necessária à geração de uma pressão negativa normal no espaço intersticial, bem como de uma pressão positiva durante o desenvolvimento de edemas (Reed, 1992; Aukland, 1993; Burton, 1988).

Composição intracelular

Enquanto os principais solutos do líquido extracelular são o sódio, cloreto e bicarbonato, os solutos dominantes na célula são o potássio, magnésio, fosfato e as proteínas. As concentrações intracelulares de sódio e cloreto não podem ser determinadas acuradamente, sendo estimadas subtraindo-se a quantidade extracelular do valor tecidual total. Uma vez que as concentrações de eletrólitos no líquido intracelular são altas, um pequeno erro na determinação do volume de água extracelular causará um grande erro na estimação da concentração intracelular desses íons. A concentração de bicarbonato é calculada a partir do pH celular, sendo que a concentração desse íon mostrada na Tabela 14.2 considera que a média do pH celular vale 7,0.

A composição eletrolítica do líquido intracelular não é idêntica em todos os tecidos. Por exemplo, a concentração de cloreto no músculo é bem pequena (cerca de 3 mEq/L), porém, é bem maior nos eritrócitos

Tabela 14.1 Volumes dos compartimentos de líquidos corporais*

Volume intracelular	24 L (60%)
Volume extracelular	16 L (40%)
Volume intersticial	11,2 L (28%)
Volume plasmático	3,2 L (8%)
Volume transcelular	1,6 L (4%)

* Considerando um homem normal, pesando 73 kg (160 lb), cujo conteúdo de água corporal total é de (40 L).

Tabela 14.2 Concentrações de eletrólitos nos líquidos extra e intracelular

	Plasma		Líquido intersticial		Água contida no plasma		Água contida na célula (músculo)	
	(mEq/L)	(mmol/L)	(mEq/L)	(mmol/L)	(mEq/L)	(mmol/L)	(mEq/L)	(mmol/L)
Na^+	140	140	145,3	145,3	149,8	149,8	13	13
K^+	4,5	4,5	4,7	4,7	4,8	4,8	140	140
Ca^{2+}	5,0	2,5	2,8	2,8	5,3	5,3	1×10^{-7}	$0,5 \times 10^{-7}$
Mg^{2+}	1,7	0,85	1,0	0,5	1,8	0,9	7,0	3,5
Cl^-	104	104	114,7	114,7	111,4	111,4	3	3
HCO_3^-	24	24	26,5	26,5	25,7	25,7	10	10
SO_4^{2-}	1,0	0,5	1,2	0,6	1,1	0,55	–	–
P	2,1	1,2*	2,3	1,3*	2,2	1,2*	107	57†
Proteína	15	1	8	0,5	16	1	40	2,5‡
Ânions orgânicos	5	5§	5,6	5,6§	5,3	5,3§	–	–

* O cálculo considera que o pH do líquido extracelular é 7,4, e o pK do $H_2PO_4^-$ é 6,8.

† A concentração molal do fosfato é calculada considerando-se que o pK dos fosfatos inorgânicos é 6,1, e o pH intracelular é 7,0.

‡ O cálculo considera que cada mmol de proteína tem, em média, 15 mEq, porém a natureza das proteínas celulares não está esclarecida.

§ Considera-se que todos os ânions inorgânicos sejam univalentes.

(cerca de 75 mEq/L). A concentração de potássio na célula muscular é de aproximadamente 140 mEq/L, contudo, é de apenas 118 mEq/L nas plaquetas. A concentração de sódio no músculo e nos eritrócitos é de cerca de 13 mEq/L, sendo de 34 mEq/L nos leucócitos. O principal fosfato encontrado nos eritrócitos é o 2,3-DPG, enquanto o ATP e o fosfato de creatinina são os principais fosfatos encontrados no músculo. Como o músculo representa a massa magra do corpo, costuma-se utilizar a concentração eletrolítica das células musculares para representar a concentração intracelular de eletrólitos. Tendo em vista que uma parte substancial dos ânions no interior da célula consiste de íons polivalentes, como fosfato e proteína, a concentração iônica total (em mEq/L) é maior no interior da célula do que fora dela, de modo a preservar o equilíbrio osmótico com o líquido extracelular.

Determinação da osmolalidade do plasma

A osmolaridade refere-se ao número de moles de soluto existentes em 1 L de solução. A osmolalidade, por sua vez, diz respeito ao número de moles de soluto existentes em 1 kg de água (solvente). A osmolalidade é o termo preferido, uma vez que as quantificações, tanto da osmolaridade quanto da osmolalidade, baseiam-se em propriedades coligativas. Uma propriedade coligativa é uma propriedade física fundamentada no número de partículas dissolvidas em um dado número de moléculas de água, como, por exemplo, o ponto de congelamento, ponto de ebulição e a pressão de vapor.* Entretanto, os termos "osmolalidade" e "osmolaridade" frequentemente são utilizados de modo intercambiável, uma vez que as alterações do volume de água associadas à temperatura não são significativas. É preciso observar, contudo, que 1 kg de água ocupa exatamente 1 L a 4°C.

Um mol de NaCl em solução contém 2 osmols, pois o NaCl encontra-se dissociado em Na^+ e Cl^-. Um mol de D-glicose em solução contém 1 osmol, visto que a glicose não sofre dissociação. Um mol de Na_3PO_4 em solução contém 4 osmols, pois há dissociação em 3 íons Na^+ e um íon PO_4^{3-}. Para calcular a osmolalidade de uma solução cujo soluto dissocia-se em mais de uma partícula, emprega-se a seguinte equação:

$$M \times a = \text{Osm/L}$$

M é a molaridade; *a* é o número de partículas em que uma molécula da substância se dissocia.

Quando aumenta a concentração osmolal do líquido extracelular em decorrência do acúmulo de solutos que são restritos ao líquido extracelular (osmols efetivos), tais como glicose, manitol e sódio, o equilíbrio osmótico é restabelecido à medida que água se move da célula para o líquido extracelular (LEC), elevando a osmolalidade intracelular ao mesmo nível da osmolalidade extracelular (Hill, 1990a; Oh, 1995; Weisberg, 1978). Quando a osmolalidade aumenta em razão do acúmulo de solutos que podem entrar livremente na célula (osmols não efetivos), como ureia e álcool, o equilíbrio osmótico é alcançado por meio da entrada desses solutos na célula. Considerando que a maioria dos solutos normalmente encontrada no LEC constitui osmols efetivos, a perda de água extracelular (p. ex., perdas insensíveis) aumentará a osmolalidade efetiva e, assim, causará saída de água das células. Por outro lado, a redução da osmolalidade extracelular, seja pela perda de solutos extracelulares, seja pela retenção de água, reduz a osmolalidade efetiva pelas mesmas razões e, portanto, provoca a entrada de água nas células.

A osmolalidade sérica ou plasmática pode ser quantificada diretamente com auxílio de um osmômetro, descrito no Capítulo 4, ou estimada como a soma da concentração de todos os solutos no plasma. Como o osmômetro não faz distinção entre osmols efetivos e não efetivos, somente é possível estimar a osmolalidade. De fato, a ureia representa apenas osmols não efetivos em concentração significativa no plasma (5 mOsm/L). No plasma normal, então, a osmolalidade total aproxima-se da osmolalidade efetiva. A osmolalidade plasmática é estimada do seguinte modo:

$$\text{Osmolalidade sérica} = \{Na^+ \text{ sérico (mEq/L)} \times 2\} + \{\text{Glicose (mg/dL)}/18\} + \{\text{Ureia (mg/dL)}/2{,}8\} \quad (14.2)$$

Em concentrações séricas normais de glicose e ureia, a osmolalidade praticamente se iguala a Na^+ sérico × 2, pois os erros opostos entre si se anulam mutuamente. As osmolalidades do sódio e dos ânions acompanhantes são superestimadas desprezando-se o coeficiente osmótico e considerando-se que todos os ânions séricos sejam univalentes. Por outro lado, a osmolalidade é subestimada ignorando-se os cátions e outros solutos, e considerando-se a concentração plasmática de sódio em vez da concentração de sódio na água. É preciso notar que, para as contribuições da ureia e da glicose à osmolalidade sérica, seus valores (em mg/dL) são divididos por um décimo (2,8 e 18, respectivamente) de seus pesos moleculares (28 e 180), uma vez que a osmolalidade é expressa em mOsm/L, e não em mOsm/dL.

Muitos dos solutos que podem se acumular anormalmente no corpo são ânions de ácidos, tais como salicilato, glicolato, formiato, lactato e β-hidroxibutirato. Essas substâncias não devem ser consideradas na estimativa da osmolalidade plasmática, visto serem consideravelmente equilibradas pelo sódio e, assim, já estarem inclusas no valor quando o sódio plasmático é multiplicado por 2. Solutos não eletrolíticos que se acumulam anormalmente no soro, como etanol, etilenoglicol, metanol e manitol, farão com que a osmolalidade exceda à osmolalidade calculada, produzindo uma diferença osmolal (Gennari, 1984; Kruse, 1994). Essa diferença osmolal é uma pista clínica útil da presença das

* A massa molecular de água representa o número de moléculas de água mais acuradamente do que o volume, pois o volume muda com a temperatura (ainda que pouco), enquanto a massa molecular permanece inalterada.

substâncias tóxicas anteriormente citadas. O acúmulo de aminoácidos neutros e catiônicos também promove uma diferença osmolal sérica.

Efeito da hiperglicemia sobre o Na^+ sérico

A permeabilidade de uma membrana a um determinado soluto varia de acordo com o tipo celular. Por exemplo, a glicose não se acumula no músculo. Essa molécula não entra livremente na célula muscular e, quando consegue entrar com ajuda da insulina, é rapidamente metabolizada. Portanto, a glicose representa um osmol efetivo para a célula muscular, de modo que um quadro de hiperglicemia a fará perder água. Por outro lado, a glicose constitui um osmol não efetivo para os eritrócitos e também para a maioria das células cerebrais, pois é capaz de entrar livremente em tais células. A glicose geralmente é classificada como osmol efetivo, principalmente porque as células musculares representam a maior massa celular do corpo, conforme já mencionado neste capítulo. O acúmulo de glicose ou manitol no LEC é causa bem conhecida de hiponatremia, visto que, como discutido no Capítulo 8, a glicose é osmoticamente ativa e induz a movimentação da água a partir das células para o LEC, onde dilui a concentração de eletrólitos. A movimentação de líquido afeta as concentrações de todos os eletrólitos extracelulares, porém, seu efeito absoluto é mais forte sobre o sódio sérico, cuja concentração é elevada. A relação existente entre alteração do conteúdo de sódio sérico e alteração da concentração de glicose em indivíduos adultos e normais é de cerca de 1,5 mEq de Na^+/L para cada 100 mg de glicose/dL. Essa relação é válida, contudo, somente quando o volume de distribuição da glicose está em torno de 40 a 50% do conteúdo de água total corporal. O volume de distribuição da glicose se refere a um volume teórico, no qual a glicose estaria eventualmente distribuída quando nenhuma parte da glicose administrada é excretada nem metabolizada. Por exemplo, se 10 g (10.000 mg) de glicose são administradas a um indivíduo, supondo que sua concentração sérica devesse aumentar 1.000 mg/L (100 mg/dL; considerando que nada do que foi administrado tenha sido excretado nem metabolizado), o volume de distribuição seria igual a 10 L. Normalmente, o volume de distribuição da glicose é discretamente maior que o volume extracelular, porque algumas células, como os eritrócitos e hepatócitos, permitem sua difusão livre, de modo que sua concentração em tais células se iguala à concentração plasmática. À medida que aumenta o volume de distribuição da glicose em relação ao conteúdo de água total corporal, o efeito da glicose sobre o sódio sérico diminui progressivamente. De modo análogo, a redução do volume de distribuição da glicose promove efeito contrário. A alteração do sódio sérico promovida pela hiperglicemia pode ser estimada, empregando-se a seguinte fórmula (Oh, 1995):

$$\Delta Na^+ \text{ (mEq/L)} = (5{,}6 - 5{,}6a)/2 \qquad (14.3)$$

Em que ΔNa^+ representa uma redução do Na^+ sérico (em mEq/L) para cada aumento de 100 mg de glicose/dL; "*a*" corresponde à fração do volume de distribuição de glicose em relação ao conteúdo de água total corporal.

Nas condições em que se observa marcante expansão do volume extracelular, como na insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e outros estados em que há formação de edema, o volume de distribuição da glicose representa uma fração bem maior do conteúdo de água total corporal. Desse modo, seria pouco provável que a hiperglicemia causasse uma queda na concentração sérica de sódio. Por exemplo, quando o volume de distribuição da glicose representa 80% do conteúdo de água total (0,8), a diminuição do Na+ sérico para cada aumento de 100 mg de glicose/dL seria de apenas 0,56 mEq/L: $[(5{,}6 - (5{,}6 \times 0{,}8)]/2 = 0{,}56$. Quando o volume de glicose constitui 20% do conteúdo de água total corporal, ΔNa^+ seria igual a 2,2 mEq/L para cada aumento de 100 mg de glicose/dL.

Tonicidade

A tonicidade de uma solução se refere ao efeito de uma dada solução sobre o volume celular. Uma solução hipertônica é capaz de retrair as células, enquanto uma hipotônica provoca o inchaço celular. Soluções isotônicas são aquelas que não induzem nenhuma mudança no volume celular. Em geral, uma solução salina a 0,9% (154 mM de cloreto de sódio) é isotônica. Quando o termo "tonicidade" é aplicado a um líquido *in vitro*, como a urina, pode ser utilizado praticamente de modo intercambiável com a osmolalidade. Assim, a urina que contém uma elevada concentração de ureia é denominada hipertônica (Pradella, 1988).

Osmolalidade e gravidade específica

A gravidade específica de uma solução corresponde à massa dessa solução dividida pelo seu volume. Enquanto a osmolalidade de um líquido depende da concentração osmolal de seu soluto, a gravidade específica é determinada pelo peso do soluto em relação ao volume de solução que desloca. As proteínas plasmáticas pouco contribuem para a osmolalidade, em consequência da sua baixa concentração molal, porém constituem o principal fator determinante da gravidade específica do plasma. No caso da urina, a gravidade específica e a osmolalidade usualmente mudam em paralelo, mas proteinúria e glicosúria graves promovem grande discrepância entre ambas (Carroll, 1989).

Regulação do volume extracelular

Como será discutido a seguir, o volume extracelular depende principalmente da concentração de sódio, cuja regulação é realizada por dois hormônios: hormônio antidiurético (ADH), que promove retenção de água, e aldosterona, que retém sódio e, assim, provoca a retenção de água, como discutido no Capítulo 8. Uma vez que a concentração de sódio extracelular é mantida dentro de uma faixa bastante estreita por meio da regulação da liberação de ADH, o volume extracelular depende principalmente de seu conteúdo de sódio. Na maioria das situações clínicas, o volume extracelular apresenta boa correlação com o volume vascular, que, por sua vez, apresenta correlação positiva com o volume vascular efetivo. Esse volume vascular efetivo representa um volume imaginário que reflete o débito cardíaco em relação à demanda tecidual de oxigênio (Oh, 1995).

O volume vascular efetivo, mais do que o volume extracelular ou o volume vascular, é o principal determinante da quantidade de LEC retida. A localização e o tipo dos sensores que detectam as alterações do volume vascular efetivo não são bem conhecidas. A maioria dos fisiologistas considera que os barorreceptores, encontrados em locais como os átrios cardíacos e arcos aórticos, sejam os responsáveis por enviar ao sistema nervoso central os sinais indutores de aumentos/diminuições dos níveis de ADH, e de alteração do tônus simpático. Entretanto, a preponderância das evidências argumenta contra a utilidade de tais receptores em estados crônicos de alteração do volume vascular efetivo. Por exemplo, em um paciente hipertenso com insuficiência cardíaca congestiva, tanto os barorreceptores atriais de baixa pressão como os arteriais de alta pressão percebem quando o volume está acima do normal. Mesmo assim, as respostas neuro-humorais (p. ex., elevação dos níveis de ADH, de catecolaminas e das concentrações de renina e angiotensina) observadas em tais estados sugerem a existência de um volume vascular efetivo. O rim certamente responde de modo adequado, promovendo a redução da excreção urinária de sódio e cloreto. Essas respostas fisiológicas diante de um volume vascular efetivo baixo conduz, às vezes, à retenção de sal patológica. Exemplificando, há retenção de sal na ICC, apesar da marcante expansão dos volumes extracelular e vascular, porque o volume vascular efetivo está diminuído.

Teoricamente, existem dois modos de alterar o conteúdo de sal do organismo: modificar a ingestão ou o débito renal de sal. Não há um mecanismo bem desenvolvido que influencie a ingestão de sal em resposta a alterações do volume vascular efetivo. Sendo assim, consegue-se alterar o conteúdo de sal do organismo principalmente por meio do débito renal de sal. É possível modificar esse débito por meio de fatores físicos e humorais. Os fatores físicos que influenciam a regulação renal do conteúdo de sal alteram a taxa de filtração glomerular (TFG), bem como atuam na pressão oncótica dos capilares peritubulares e na pressão hidrostática. Quando os demais fatores que influenciam o débito renal de sal não sofrem alterações, quanto maior a TFG, maior a quantidade de sódio filtrada e excretada. Em geral, contudo, a reabsorção tubular é mais importante do que a filtração glomerular na regulação da excreção renal de sódio. Na insuficiência renal avançada, a TFG pode estar reduzida a 10% da taxa normal, entretanto, os pacientes com insuficiência renal continuam excretando a quantidade de sódio usualmente ingerida, como qualquer indivíduo sadio.

A reabsorção tubular de sódio é regulada por fatores humorais e físicos. As influências dos fatores físicos sobre a reabsorção de sódio limita-se principalmente ao túbulo proximal renal, onde uma grande quantidade de sódio é passivamente reabsorvida, através da via paracelular (entre as células). A pressão hidrostática aumentada nos capilares peritubulares retarda o processo de reabsorção passiva paracelular, enquanto promove a difusão passiva de líquidos de volta para o interior do lúmen tubular. O aumento da pressão oncótica, por outro lado, exerce efeitos opostos. Por exemplo, na insuficiência cardíaca congestiva, a pressão hidrostática peritubular é reduzida, em razão do aumento da resistência vascular renal causado pela constrição das arteríolas aferentes e eferentes. A constrição das arteríolas aferentes tenderia a reduzir a pressão hidrostática nos capilares glomerulares. Entretanto, a pressão glomerular não cede significativamente, porque a constrição das arteríolas eferentes é ainda mais forte que a das arteríolas aferentes. A manutenção da pressão de filtração glomerular ajuda a minimizar uma queda da TFG diante de estados de depleção volumétrica. O resultado é o aumento da fração de filtração (a razão entre a TFG e o fluxo plasmático renal), aumentando a concentração de proteínas plasmáticas no sangue que deixa os capilares glomerulares através das arteríolas eferentes a uma extensão maior do que a usual. Como as arteríolas eferentes se transformam em capilares peritubulares, a pressão oncótica desse capilar deve estar acima do normal. A pressão hidrostática inferior ao normal e a pressão oncótica anormalmente maior no capilar sanguíneo peritubular, durante os estados de depleção volumétrica, tendem a favorecer a reabsorção de sal e água através da via paracelular do túbulo proximal, o segmento tubular em que a reabsorção de sal pela via paracelular desempenha importante papel no transporte tubular renal de sal geral. Normalmente, a pressão oncótica plasmática nos capilares peritubulares é cerca de 20% maior do que a do plasma do sangue periférico, uma vez que a fração de filtração é igual a 0,2. Nos estados de depleção volumétrica, o valor pode ser 25 a 30% mais alto que o do plasma periférico.

Os fatores humorais que influenciam a reabsorção tubular do sódio incluem a angiotensina II, aldosterona e catecolaminas. A angiotensina II aumenta diretamente a reabsorção de sódio nos túbulos proximais, ao atuar sobre o cotransportador de sódio-hidrogênio 3 (NHE-3, *sodium-hydrogen exchanger-3*), e também atua indiretamente, aumentando a secreção de aldosterona. Esse aumento da secreção de aldosterona aumenta a reabsorção de sódio no ducto coletor cortical. As catecolaminas influenciam a reabsorção de sódio principalmente ao atuarem sobre o fluxo sanguíneo renal; contudo, podem exercer algum efeito tubular sobre o néfron proximal.

O ADH exerce papel modesto na regulação do volume extracelular, em virtude da notável importância da osmolalidade como principal regulador da secreção de ADH. Por esse motivo, *o conteúdo de sal do organismo é o principal determinante do volume extracelular*. Quando o sódio é retido, um volume de água proporcional também é retido, de modo a manter a osmolalidade sérica normal. Em caso de hiponatremia, a secreção de ADH somente ocorrerá se a depleção do volume vascular efetivo for significativamente grande. Diante de tais condições, o volume extracelular teoricamente pode aumentar na ausência de retenção de sódio. Todavia, a massiva retenção de água sem retenção de sódio irá causar apenas um modesto aumento do volume extracelular. Por exemplo, se um indivíduo, cujo conteúdo de água corporal total é igual a 40 L, ganhar 10 L de água sem apresentar alteração no conteúdo de sódio (p. ex., em decorrência de uma secreção inadequada de ADH, ou em um indivíduo com insuficiência renal aguda), seus níveis séricos de sódio deverão cair de 140 mEq/L para 112 mEq/L [140 × (40/50) = 112], um valor que pode significar morbidade severa ou até mesmo sua morte. Neste caso, haveria um aumento do volume extracelular de apenas 4 L, uma vez que a quantidade de água retida (60%) acabaria entrando nas células. Por outro lado, o mesmo volume de líquido retido com o sal permaneceria quase exclusivamente no mesmo espaço extracelular. Em outras palavras, a quantidade de água que pode ser retida sem sal é limitada por uma hiponatremia severa e fatal. Esse é o motivo pelo qual um aumento massivo do volume extracelular, como aquele observado na insuficiência cardíaca congestiva, torna-se possível somente diante de uma significativa retenção de sódio. A Figura 14.1 mostra a nomenclatura dos sítios no néfron.

A fonte de energia definitiva para a reabsorção de sódio em vários segmentos do néfron é a ATPase de Na^+–K^+, que se localiza na membrana basolateral e transporta 3 íons de Na^+ para fora da célula ao mesmo tempo em que entram 2 íons de K^+ no meio intracelular. A resultante redução da concentração intracelular de sódio e o potencial elétrico celular negativo permitem a difusão passiva do Na^+ para dentro da célula, através da membrana luminal. Os quatro sítios principais de reabsorção do sódio existentes no néfron utilizam quatro

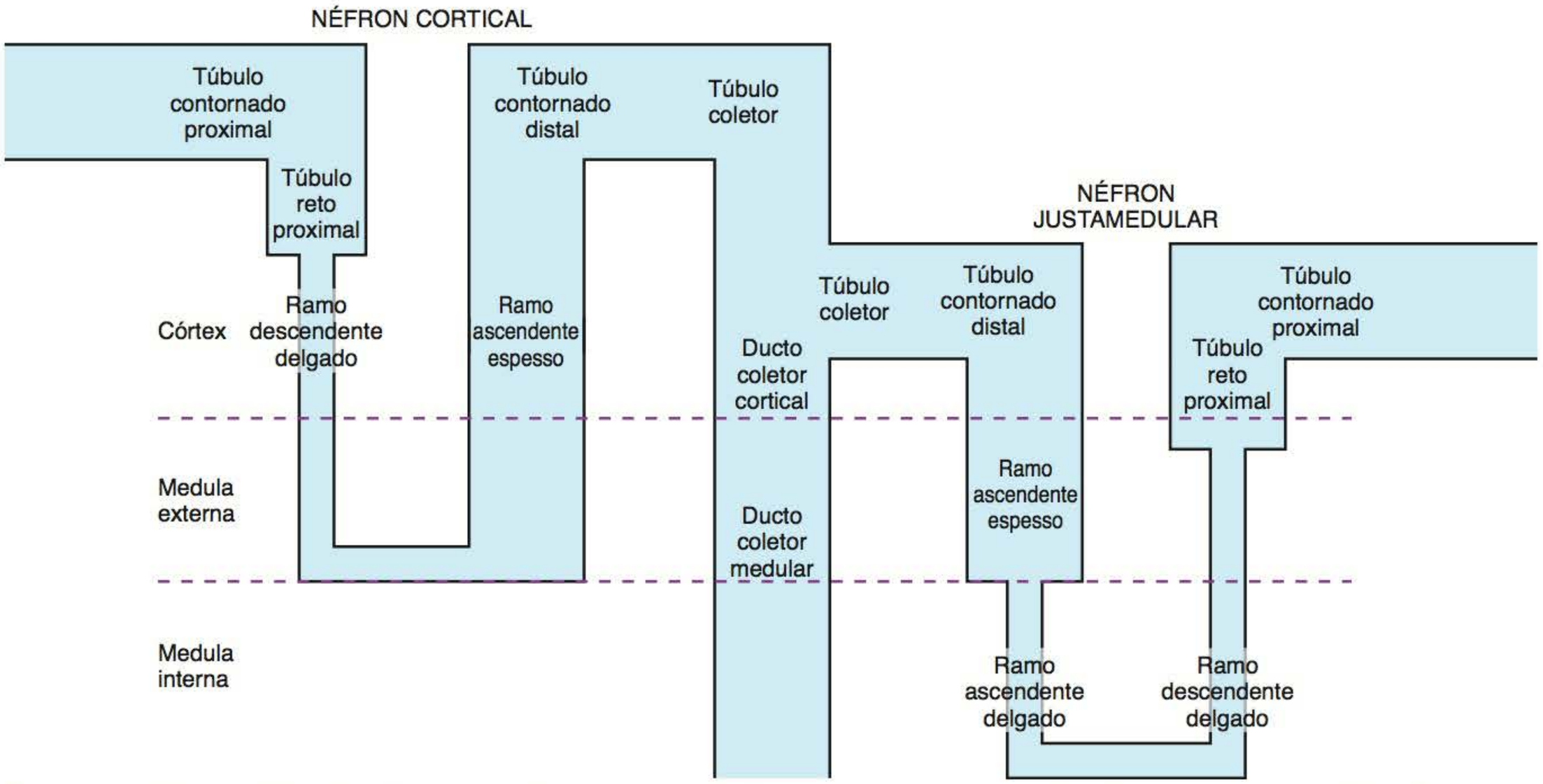


Figura 14.1 Distribuição e subdivisão dos néfrons. Existem dois tipos principais de néfron: corticais e justamedulares. A alça néfrica em sua porção cortical não adentra a medula interna e não possui ramo ascendente delgado. O néfron justamedular apresenta o ramo ascendente delgado da alça néfrica, o qual reside na medula interna. Ambos os néfrons são subdivididos em 8 ou 9 segmentos.

mecanismos diferentes de entrada de sódio (Fig. 14.2). Uma variedade de fatores humorais tem sido implicada, por meio de provas ou sugestões, na regulação do débito renal de sal. Entre esses fatores, a aldosterona, catecolaminas, angiotensina II e, talvez, o ADH e as prostaglandinas comprovadamente exercem efeitos fisiológicos (Oh, 1995; Biggi, 1995).

Controle não renal da água e do equilíbrio eletrolítico

Perda insensível de água a partir da pele. Perde-se água a partir da pele principalmente como forma de eliminar calor. A perda de água cutânea sem suor é denominada perspiração insensível. O suor contém cerca de 50 mEq/L de sódio e 5 mEq/L de potássio. Como o principal propósito da perda de água a partir da pele é a dissipação de calor, essa perda de água depende principalmente da quantidade de calor gerada pelo corpo:

Perda de água através da pele = 30 mL/100 calorias (14.4)

Perda respiratória de água. O conteúdo de água existente no ar inspirado é inferior ao do ar expirado. Desse modo, perde-se água durante a ventilação normal. Como o volume ventilatório é determinado pela produção de CO_2 que, por sua vez, é determinada pelo gasto calórico, a perda de água respiratória também depende do gasto calórico em condições ambientais normais:

Perda respiratória de água = 13 mL/100 calorias a PCO_2 normal (14.5)

Por coincidência, a quantidade de água perdida na respiração normal é quase igual à produção metabólica de água. Assim, ao calcular o equilíbrio hídrico, a perda de água respiratória deve ser desprezada na quantificação da perda de água insensível, visto que o ganho metabólico de água é igualmente desconsiderado. A perda de água respiratória aumenta na hiperventilação ou em estados febris, tornando-se desproporcional à produção metabólica de água (Carroll, 1989).

Perda de água pelo trato gastrintestinal. A atividade líquida do trato GI ao nível do jejuno consiste na secreção de água e eletrólitos. A atividade líquida a partir do jejuno até o cólon é a reabsorção. A maior parte do conteúdo líquido que entra no intestino delgado é nele absorvida, sendo o remanescente absorvido no cólon, de modo que apenas cerca de 100 mL de água são diariamente excretados com as fezes. O conteúdo do trato GI é isotônico em relação ao plasma e, assim, qualquer líquido que entre nesse trato se torna isotônico também. Então, se a água for ingerida e vomitada, o corpo perde solutos.

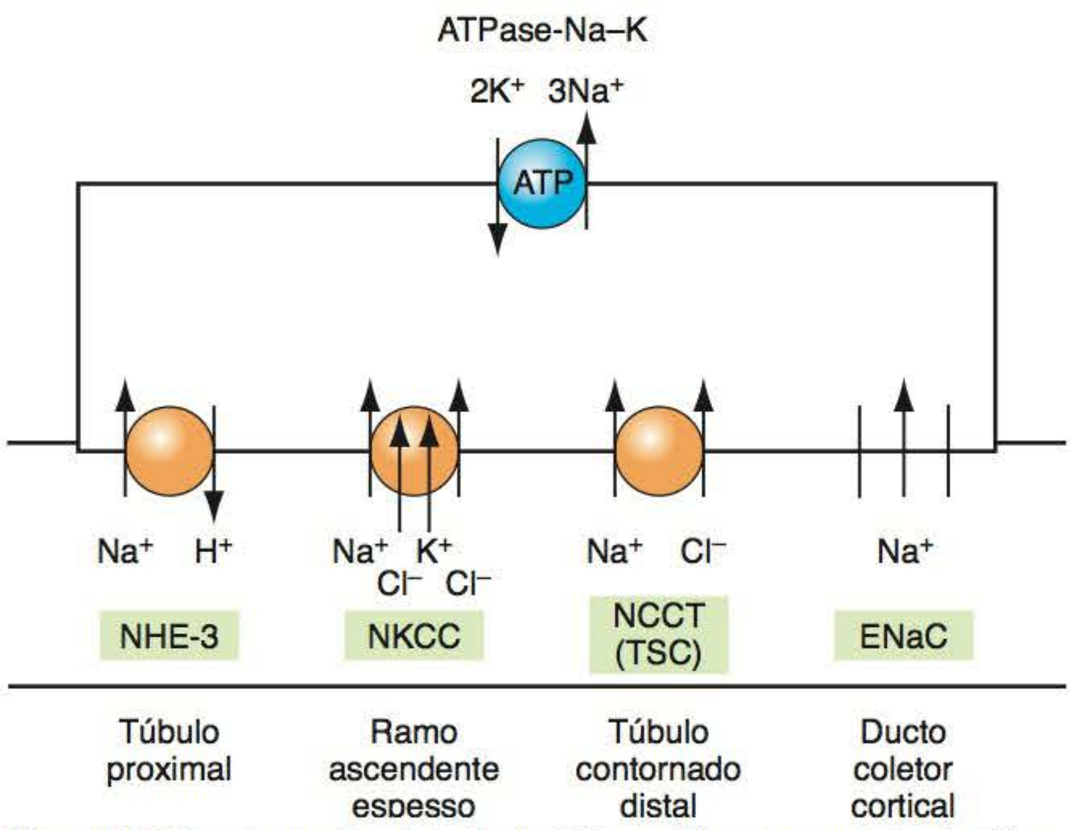


Figura 14.2 Mecanismos de reabsorção de sódio em diferentes segmentos do néfron. A principal fonte de energia para a reabsorção de sódio em todos os segmentos do néfron é a ATPase de Na^+–K^+ basolateral, que transporta 3 Na^+ para fora em troca de 2 K^+ para dentro da célula, criando uma baixa concentração de sódio intracelular e um potencial celular negativo. Essas duas condições permitem a difusão passiva de Na^+ para dentro da célula através da membrana luminal. No túbulo proximal, a entrada de Na^+ é acompanhada da saída de H^+ através do cotransportador de sódio-hidrogênio 3 (NHE-3). No ramo ascendente espesso da alça, o Na^+ entra com o K^+ e 2 Cl^- através do cotransportador de sódio-potássio-cloreto (NKCC, *sodium-potassium-chloride cotransporter*). No túbulo contornado distal, o sódio entra com o cloreto através do cotransportador de sódio-cloreto (NCCT, *sodium-chloride cotransporter*) e, por fim, no ducto coletor cortical o sódio entra através do canal epitelial de sódio (ENaC). TSC é a designação de *thiazide-sensitive cotransporter* (cotransportador tiazida-sensível).

Determinação da função renal

Conceito de depuração

A depuração renal relaciona a taxa de excreção urinária de um material à sua concentração plasmática. É definida como sendo o volume de plasma que, teoricamente, deveria ser "depurado" da substância para se obter a quantidade dessa substância que foi excretada através da urina em um determinado período (14). Para calcular a depuração, primeiramente é necessário conhecer a quantidade de substância excretada via urina, a qual é calculada a partir da concentração (U_x) e do volume de urina (V). Em seguida, deve-se determinar a concentração plasmática dessa substância (P_x). Por exemplo, se um indivíduo excretou 1.500 mg de creatinina em um único dia, precisará depurar 150 L de plasma para excretar essa quantidade de creatina, caso a concentração plasmática seja de 10 mg/L (1 mg/dL). Assim, a depuração de creatinina (C_{creat}) seria igual a 150 L/dia. Se a concentração plasmática de creatinina fosse 100 mg/L (10 mg/dL), somente 15 L de plasma deveriam ser depurados para que as mesmas 1.500 mg de creatinina fossem excretadas. Nesse caso, o C_{creat} seria igual a 15 L/dia. Usualmente, a depuração é expressão em mL/min, porém, podem ser utilizadas quaisquer unidades de volume e tempo. Assim, uma depuração de 150 L/dia é igual a 6,25 L/hora e 104 mL/min. A equação formal para determinação da depuração renal é:

$$C_x = (U_x V)/P \quad (14.6)$$

C_x é a depuração de uma substância x; U_x e P_x são as concentrações da substância na urina e no plasma, respectivamente. V é o volume de urina por unidade de tempo.

Ao estimar a depuração, devem ser utilizadas unidades de concentração e volume consistentes. Exemplificando, se a concentração urinária de creatinina é 70 mg/dL e o volume de urina é 2.000 mL/dia, a creatinina urinária também deve ser expressa em mg/mL, e não em mg/dL. Desse modo, a quantidade total de creatinina excretada será igual a: 0,7 mg/mL × 2.000 mL/dia = 1.400 mg/dia.

A depuração expressa em mL/24 horas pode ser convertida em depuração (mL/min), dividindo-se o valor por 1.440, uma vez que 24 horas equivalem a 1.440 minutos.

Fórmulas rápidas para calcular a depuração

Quando se calcula a depuração de 24 horas expressa em mL/min, a excreção urinária de creatinina pode ser expressa em g/24 horas, em vez de mg/24 horas. Do mesmo modo, a creatinina plasmática pode ser expressa em mg/dL, em vez de mg/mL. O uso incorreto dessas unidades pode ser retificado, multiplicando-se o resultado final por 1.000 (quando se usa g, em vez de mg) e, em seguida, por 100 (ao usar mg/dL, em vez de mg/mL). Uma outra correção requer a divisão do valor obtido por 1.440 para converter um valor de depuração de 24 horas em um valor expresso em mL/min (Carroll, 1989), como no exemplo a seguir:

$$C_x = U_x V \text{ (g/24 horas)}/P_x \text{ (mg/dL)} \times 100.000 \times 1/1440 \quad (14.7)$$

Uma vez que 100.000/1.440 = 70:

$$C_x \text{ (mL/min)} = U_x \text{ (g/dia)} \times 70/P_x \text{ (mg/dL)} \quad (14.8)$$

Determinação da taxa de filtração glomerular

Em geral, a TFG é considerada o melhor indicador global do nível de função renal (Smith, 1951). Têm sido utilizadas duas abordagens distintas para determinar a TFG. Uma delas consiste em empregar uma substância endógena, enquanto a outra utiliza uma substância exógena. Seja qual for o marcador biológico utilizado na determinação da TFG, é importante que ele seja minimamente reabsorvido e secretado através dos túbulos renais.

Quantificação da TFG com substâncias exógenas

A depuração da inulina é amplamente adotada como padrão-ouro para quantificar a TFG (14). A depuração da inulina em adultos jovens sadios apresenta uma média de valores igual a 127 mL/min/1,73 m^2 em homens, e 118 mL/min/1,73 m^2 em mulheres. A TFG declina com o avanço da idade. Após os 20 a 30 anos, a TFG diminui para aproximadamente 1 mL/min/1,73 m^2 por ano. O clássico método da depuração de inulina requer uma infusão endovenosa e coletas periódicas de urina ao longo de várias horas. A inulina é cara e não se encontra prontamente disponível. Como consequência, foram introduzidas inúmeras quantificações alternativas para estimar a TFG (Price, 2000; Gaspari, 1997). A depuração urinária de marcadores exógenos radioativos, como ^{125}I-iotalamato e ^{99m}Tc-DTPA (ácido dietilenotriamina pentacético) proporcionam boas medidas da TFG (Biggi, 1995; Brochner-Mortensen, 1969; Christensen, 1986; Fleming, 1991). A depuração plasmática de substâncias exógenas, como iohexol e ^{51}Cr-EDTA, também tem sido utilizada na estimação da TFG; além disso, trata-se de um método que apresenta a vantagem de dispensar a coleta de urina (Krutzen, 1984; Russel, 1985; Agarwal, 2003). Todavia, os métodos de depuração plasmática não são tão acurados quanto os que requerem coleta de urina. A TFG também tem sido quantificada utilizando-se iotalamato não marcado para amostras de urina e sangue, com a óbvia vantagem de dispensar o uso de materiais radioativos.

Quantificação da TFG com substâncias endógenas

As substâncias endógenas amplamente empregadas para determinar a TFG incluem o nitrogênio ureico, creatinina e cistatina C. Os dois primeiros são muito utilizados na prática clínica, principalmente por causa da pronta disponibilidade.

Creatinina como medida de função renal

A creatinina é uma substância endógena, cujo peso molecular é 113 Da. É produzida por células musculares, a partir da creatina e do fosfato de creatina, por meio de um processo de desidratação não enzimático. Sua taxa de produção é proporcionada pela massa muscular (Oh, 1993). Outra fonte adicional de creatinina é a creatina contida na carne ingerida. *In vitro*, a taxa de conversão da creatina em creatinina que ocorre na carne depende da temperatura e da acidez. Temperaturas elevadas e pH baixo aumentam a conversão. A creatinina é o marcador para TFG mais amplamente utilizado e tal preferência decorre de vários motivos. Em primeiro lugar, é uma substância endógena cuja taxa de produção é relativamente constante. Em segundo lugar, a creatinina não se liga a proteínas plasmáticas e, por isso, é livremente filtrada pelos glomérulos. Não sofre reabsorção nos túbulos renais, sendo apenas uma pequena quantidade secretada ao nível tubular.

Por outro lado, na depuração da creatinina, a estimação da taxa de excreção pode evitar os inconvenientes de ter que realizar coleta de urina e da dúvida quanto à conclusão da análise. Quando a função renal está normal e estável, a excreção de creatinina é quase igual à sua produção, que depende principalmente da massa muscular (Oh, 1993). A massa muscular varia conforme o sexo, idade e peso corporal. A taxa de produção da creatinina é estimada pela idade (*I*):

Produção de creatinina (mg/kg/dia):
28 - 0,2*A* (homens) (14.9*A*)

Produção de creatinina (mg/kg/dia):
23,8 - 0,17*A* (mulheres) (14.9*B*)

Em pacientes obesos e em pacientes debilitados, as fórmulas 14.9 (A e B) superestimam a produção de creatinina. Normalmente, a excreção urinária de creatinina é discretamente menor que sua produção, pois uma parte é quebrada por bactérias intestinais. A discrepância aumenta progressivamente com a diminuição da função renal, porque a depuração não renal da creatinina (que é de cerca de 0,04 L/kg/dia) permanece constante (Oh, 1993). Normalmente, um homem pesando 70 kg apresenta uma depuração extrarrenal de creatinina de 2,8 L/dia ou 2 mL/min, inferior a 2% da depuração renal normal. Entretanto, com uma depuração renal de 4 mL/min, uma depuração extrarrenal de 2 mL/min representaria um terço da depuração plasmática total de creatinina.

O uso da creatinina como medida da TFG também apresenta várias desvantagens. A primeira delas é que, embora a taxa de produção seja razoavelmente constante, é observada uma variação individual considerável, dependendo principalmente da massa muscular (Oh, 1993). Diante de uma severa debilitação muscular, a produção de creatinina pode estar reduzida a menos de 25% do valor previsto para o peso corporal. A segunda desvantagem consiste no fato de que a creatinina também deriva da carne da dieta, sendo que a quantidade de carne ingerida pode influenciar substancialmente a produção diária total. Em terceiro, a quantificação da creatinina é feita mais comumente pelo método do picrato alcalino (ver adiante), e o número de cromógenos – endógenos e exógenos – interfere na quantificação realizada por essa técnica. Finalmente, a creatinina é parcialmente secretada nos túbulos proximais, através da via orgânica de cátions, mas a secreção tubular é bloqueada por vários fármacos, incluindo a cimetidina, trimetoprim, pirimetamina e salicilato (Hilbrands, 1991; Van Acker, 1992). A extensão da secreção tubular varia para cada indivíduo, sendo essa variação ainda maior na presença de uma disfunção renal. A secreção tubular pode chegar a 50% da quantidade excretada na urina diante de uma insuficiência renal avançada. Com o intuito de destacar os erros devidos à secreção tubular, a depuração da creatinina também tem sido obtida por meio da administração simultânea de cimetidina, que inibe a secreção tubular da creatinina. Contudo, a supressão da secreção de creatinina pela cimetidina é incompleta e igualmente conduz a amplas variações individuais.

Quantificação da creatinina

O método mais amplamente empregado para quantificar a creatinina fundamenta-se na reação de Jaffe, descrita há mais de 100 anos, com base na reação da creatinina com picrato (Spencer, 1986; Weber, 1991). A solução alcalina intensifica a reação, justificando a denominação "método do picrato alcalino". O método de Hare envolve o isolamento da creatinina por absorção no reagente de Lloyd, e descarte do plasma contendo cromógenos interferentes (Abdul-Karim, 1986). É difícil manipular esse método, além de ser frequentemente confuso. A reação de Jaffe foi igualmente adaptada para ser utilizada em analisadores.

A creatinina também pode ser quantificada enzimaticamente, utilizando-se a creatinina amido-hidrolase ou creatinina imino-hidrolase (Suzuki, 1984; Fossati, 1994). A creatinina é hidrolisada a amônia e *N*-metil-hidantoína por ação da imino-hidrolase. A amônia, então, combina-se ao 2-oxoglutarato (α-cetoglutarato) e NADH, em presença da glutamato desidrogenase, para render glutamato e NAD^+. O consumo de NADH, medido como uma diminuição da absorção a 340 nm, indica a concentração de creatinina. Esta também pode ser quantificada por meio da conversão em creatina, por ação da creatinina amido-hidrolase. Nesse caso, a creatinina é hidrolisada por uma imino-hidrolase e uma sarcosina oxidase, resultando na produção de peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase de raiz forte, o 2,4-diclorofenolsulfonato é convertido a um polímero incolor pelo peróxido de hidrogênio, e a concentração desse polímero é medida a 510 nm.

Várias substâncias, como cetonas, glicose, frutose, proteína, ureia e ácido ascórbico, igualmente reagem com o picrato e, assim, produzem falsos aumentos na concentração de creatinina (Spencer, 1986; Weber, 1991; Kroll, 1983; Molitch, 1980; Watkins, 1967). A interferência da glicose na quantificação da creatinina torna-se significativa quando a concentração de glicose é muito elevada, como ocorre na cetoacidose diabética ou no coma hiperglicêmico (Sjoland, 2003). A concentração de glicose é extremamente alta no dialisado peritoneal, sendo necessário efetuar uma correção para o elevado nível dessa substância quando a concentração de creatinina é medida no efluente de dialisados peritoneais. A magnitude da interferência da glicose na quantificação da creatinina foi demonstrada não só pela concentração de glicose, mas também pela concentração da própria creatinina. A interferência da glicose não é observada apenas nos métodos enzimáticos. A bilirrubina e a hemoglobina também interferem no método do picrato alcalino, resultando na geração de valores falsamente baixos (Schoenmakers, 1993). Antibióticos da classe das cefalosporinas também interferem positivamente no método do picrato alcalino, resultando na produção de valores falsamente elevados (Swain, 1977; Kroll, 1983).

Sem a remoção dos cromógenos não creatinina, o limite superior normal medido pela reação de Jaffe é 1,6 a 1,9 mg/dL para adultos. O limite superior normal para a creatinina sérica medido após a remoção dos cromógenos costuma ser igual a 1,2 a 1,4 mg/dL. Os valores para

mulheres são 0,1 a 0,2 mg/dL a menos. Quando a creatinina sérica está muito elevada, a contribuição dos cromógenos não creatinina para a reação total é proporcionalmente menor. Com a função renal normal, os cromógenos não creatinina compõem 14% (em uma faixa de 4,5–22,3%) do total. Contudo, na disfunção renal avançada, tais substâncias representam apenas cerca de 5%.

Depuração de creatinina intensificada pela cimetidina

A secreção tubular de creatinina resulta em valores falsamente elevados de depuração de creatinina, em especial na insuficiência renal, sendo que quantificações da depuração de creatinina diante da inibição da secreção tubular por ação da cimetidina melhoram consideravelmente a estimativa da TFG da depuração em pacientes que apresentam comprometimento renal de grau brando a moderado (Hilbrands, 1991; Van Acker, 1992). Entretanto, a secreção tubular de creatinina não é completamente bloqueada pela cimetidina, de modo que o método ainda acaba superestimando a TFG.

Fórmulas para estimar a depuração de creatinina como estimativa da TFG

A percepção de que a realização de uma coleta adequada de urina é um dos principais obstáculos a impedir que a depuração de creatinina seja considerada uma medida da TFG fez com que esforços passassem a ser empreendidos para tentar transformar matematicamente a creatinina sérica, de modo a poder usá-la na estimação da TFG. Em parte, por causa de sua conveniência, esses métodos são amplamente empregados na prática clínica. As duas fórmulas mais utilizadas são a fórmula de Cockcroft e Gault, e a fórmula de MDRD (fórmula de Levey).

Fórmula de Cockcroft e Gault (mL/min) (Cockcroft, 1976)

$$(140 - \text{idade}) \times (\text{PCI})/(72 \times \text{SCr}) \qquad (14.10)$$

Em caso de paciente do sexo feminino, multiplicar tudo por 0,85. O PCI é o peso corporal ideal, enquanto o SCr é a concentração sérica de creatinina. O PCI é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Homens: PCI} = 50\ \text{kg} + 2{,}3\ \text{kg (para cada polegada acima de 1,5 m)} \qquad (14.11A)$$

$$\text{Mulheres: PCI} = 45{,}5\ \text{kg} + 2{,}3\ \text{kg (para cada polegada acima de 1,5 m)} \qquad (14.11B)$$

A fórmula de Cockcroft e Gault (Cockcroft, 1976) reduz a variabilidade das estimativas de TFG feitas a partir da creatinina sérica, causada pela diferença referente à produção de creatinina em decorrência das diferenças de massa muscular associadas ao sexo e à idade. Entretanto, como não considera as diferenças referentes à produção de creatinina que são devidas à variação da massa muscular em decorrência dos estados patológicos, essa fórmula sistematicamente superestima a TFG em indivíduos que apresentam pouca massa muscular em relação ao peso corporal, tais como obesos, pacientes edemaciados ou cronicamente debilitados. Além disso, também são desprezadas as variações causadas pela eliminação extrarrenal e secreção tubular.

No estudo da Modification of Diet in Renal Disease (MDRD), Levey et al. mediram a TFG por meio da determinação de I^{125}-iodotalamato para derivar a fórmula de estimação da TFG, considerando seis variáveis: idade, raça, sexo, nitrogênio ureico sérico, creatinina sérica e concentração de albumina sérica (Levey, 1999). Subsequentemente, em 2000, os mesmos investigadores produziram uma fórmula MDRD simplificada com base em quatro variáveis: creatinina sérica, idade, raça e sexo. Poucos indivíduos diabéticos foram incluídos nos estudos originais e, quando estas fórmulas foram testadas em pacientes diabéticos, constatou-se que não eram acuradas. Além disso, o uso de logaritmos na fórmula impede seu uso rotineiro na prática clínica.

Fórmula de MDRD (mL/min/1,73 m^3)

$$\text{TFG} = 170 \times \text{Cr}^{-0{,}999} \times (\text{idade})^{-0{,}176} \times 0{,}762\ (\text{se for mulher}) \times 1{,}180\ (\text{se for negro}) \times \text{BUN}^{-0{,}170} \times (\text{Alb})^{0{,}318} \qquad (14.12A)$$

E a fórmula MDRD simplificada (mL/min/1,73 m^3) baseada em quatro variáveis (creatinina sérica, idade, raça e sexo) (Levey, 2002):

$$\text{TFG} = 186{,}3 \times \text{Cr}^{-1{,}154} \times (\text{idade})^{-0{,}203} \times 1{,}212\ (\text{se for negro}) \times 0{,}742\ (\text{se for mulher}) \qquad (14.12B)$$

Cr = creatinina sérica (mg/dL); BUN = nitrogênio ureico sanguíneo (mg/dL); Alb = albumina sérica (g/dL). Enquanto a fórmula de Cockcroft e Gault inclui o peso corporal, a fórmula MDRD exclui esse fator, uma vez que o resultado é posteriormente expresso em mL/min/1,73 m^3, em vez de ser um valor absoluto, como o resultado da outra fórmula. A seguir, são listadas as fórmulas utilizadas com maior frequência para calcular a depuração de creatinina em crianças (Schwartz, 1976; Counahan, 1976; Leger, 2002; Pierrat, 2003):

Fórmula Schwartz

$$\text{TFG} = 0{,}55 \times \text{altura (cm)}/\text{creatinina sérica (mg/dL)} \qquad (14.13A)$$

$$\text{TFG} = 43 \times \text{altura (cm)}/\text{creatinina sérica (µmol/L)} \qquad (14.13B)$$

Fórmula de Counahan Barrett modificada

$$\text{TFG} = 40 \times \text{altura (cm)}/\text{creatinina sérica (µmol/L)} \qquad (14.14)$$

Tem sido repetidamente demonstrado que a TFG estimada por meio dessas fórmulas não é muito acurada. Contudo, os valores de depuração de creatinina estimados com tais fórmulas ainda são mais acurados do que aqueles obtidos por meio da quantificação direta. Isto se deve principalmente à coleta inadequada das amostras de urina e às variações da concentração plasmática de creatinina observadas nos últimos. Consequentemente, as diretrizes da Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) recomendam que a depuração da creatinina seja calculada com as fórmulas, em vez das medidas diretas (Levey, 1999).

Ureia como medida da função renal

A ureia é o principal resíduo nitrogenado produzido no corpo. Seu peso molecular é 60 Da. Entretanto, é costume expressar a concentração de ureia apenas considerando seu conteúdo de nitrogênio. Por esse motivo, são bem mais amplamente empregados os termos "nitrogênio ureico sérico" ou "nitrogênio ureico urinário". Como observado anteriormente na seção que trata da osmolalidade, uma molécula de ureia contém dois átomos de nitrogênio e, portanto, o peso molecular do nitrogênio ureico é 28 Da.

A ureia sérica é bastante utilizada como medida de disfunção renal, porém, não possui grande valor como medida da TFG em razão da diversos fatores. Primeiramente, a concentração sérica de ureia não depende apenas da função renal, mas também da taxa de produção de ureia, a qual é bastante dependente da ingestão proteica. A taxa de ingestão proteica varia muito entre os indivíduos. A ureia é livremente filtrada no glomérulo, mas também substancialmente reabsorvida no túbulo proximal e no ducto coletor medular interno (Oh, 1997). A quantidade reabsorvida no túbulo proximal é muito variável, dependendo do *status* do volume vascular efetivo. Além disso, a quantidade reabsorvida no ducto coletor medular interno depende da taxa de fluxo urinário. Apesar desses inconvenientes, o nitrogênio ureico sérico ainda é amplamente utilizado como medida de disfunção renal. Diante da função renal normal, sem depleção volumétrica, a depuração de ureia equivale a cerca de 50% da depuração da creatinina. Contudo, quando há uma severa depleção volumétrica, sua depuração pode cair para até 10% da depuração da creatinina. À medida que a insuficiência renal progride, a depuração da ureia se aproxima da paridade com a depuração de creatinina.

Quantificação de ureia

Essencialmente, existem três métodos de quantificação da ureia. O padrão-ouro, utilizado somente como método referencial por causa de seu custo elevado, é a diluição isotópica por espectrometria de massa (Kessler, 1999). Em laboratórios clínicos, a ureia é quantificada pelo método colorimétrico, com base na reação da ureia com diacetil-monoxima, ou por métodos enzimáticos (Barbour, 1992; Natelson, 1951; Passey, 1980). No primeiro caso, a ureia reage diretamente com diacetil-monoxima sob condições fortemente acídicas, dando origem a um produto de condensação amarelado. A reação é intensificada pela presença de íons férricos e tiosemicarbazida. A intensidade da resultante cor vermelha é medida a 540 nm.

Em todos os métodos enzimáticos, a reação inicial é a hidrólise da ureia por ação da urease, resultando na produção de amônia e CO_2. Esses produtos são quantificados por meio de vários métodos, a fim de calcular a concentração de ureia contida na amostra original. A quantificação de amônia é a mais frequentemente utilizada. Em um desses métodos, a amônia produzida pela urease converte glutamato e ATP à glutamina e ADP, respectivamente. O ADP produzido é consumido em reações sequencialmente catalisadas pela piruvato quinase e piruvato oxidase, para gerar peróxido de hidrogênio (Lespinas, 1989). Em seguida, o peróxido de hidrogênio é quantificado, servindo de

estimativa indireta da concentração de ureia. Em outro método enzimático, como no método empregado para a creatinina e descrito na seção anterior, a amônia produzida na hidrólise da ureia reage com α-cetoglutarato e NADH, resultando na formação de ácido glutâmico e NAD^+, respectivamente, por ação da glutamato desidrogenase (Fawcett, 1960). A quantidade de NADH consumida é medida fotometricamente para determinar a concentração de ureia. Outro método, que emprega a urease, constitui o método do indofenol. Neste, o amônio produzido por ação da urease reage com hipoclorito e forma monocloramina (Higashi, 2000). Na presença de fenol e excesso de hipoclorito, a monocloramina produz um composto azulado – o indofenol –, cuja concentração é determinada por espectrofotometria a 630 nm. Por fim, há ainda outro método enzimático em que o CO_2 produzido pela urease é quantificado por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica.

Cistatina C

A cistatina C é uma proteína composta por 122 aminoácidos, cujo peso molecular é 13.000 Da. Trata-se de um inibidor de cisteína-proteases. É produzida por todas as células nucleadas, sendo que sua taxa de produção torna-se relativamente constante a partir dos 4 meses de idade, assim permanecendo até os 70 anos, e é proporcional à TFG (Massey, 2004; Laterza, 2002; Ylinen, 1999). Sua taxa de produção não está associada à massa muscular, sexo nem raça. Em razão de seu pequeno tamanho (considerando que é uma proteína) e à carga líquida positiva, a cistatina C é livremente filtrada no glomérulo na mesma concentração em que se encontra no plasma. É totalmente reabsorvida nos túbulos proximais e, na ausência de defeitos em tais túbulos, não é excretada na urina. Portanto, o aparecimento de cistatina C significa que existe dano nos túbulos proximais renais. Há evidências indicando que os glicocorticoides reduzem a produção de cistatina C (Risch, 2001), e essa redução pode resultar na superestimação da função renal em pacientes que receberam transplante de rim, visto que tais indivíduos são regularmente tratados com glicocorticoides. Diversos estudos compararam os níveis séricos de creatinina e cistatina C para obter uma indicação da função renal, e o consenso é de que a cistatina C é o melhor parâmetro. Entretanto, essa proteína não é amplamente utilizada na clínica, pois requer quantificações difíceis e caras (Massey, 2004). É importante notar que a depuração da cistatina renal não pode ser medida, porque trata-se de uma substância que é totalmente reabsorvida e, portanto, não está presente na urina. Por esse motivo, as alterações da concentração sérica de cistatina C são utilizadas como estimativa indireta da TFG.

Depuração de ureia e proporção ureia/creatinina no soro

Na ausência de disfunção renal e desidratação severa, a depuração de ureia equivale a cerca de 50% da depuração da creatinina e, assim, a cerca de 50% da TFG, uma vez que 50% da ureia filtrada é reabsorvida. A maior parte da reabsorção de ureia ocorre nos túbulos proximais, ou seja, o correspondente a cerca de 40% da carga filtrada. Entre os sítios distais do néfron, o ducto coletor medular interno reabsorve extensivamente a ureia segundo um gradiente de concentração, enquanto a urina é concentrada. Um pouco da ureia reabsorvida a partir da medula interna retorna ao túbulo na delgada ramificação descendente; esse retorno representa uma reciclagem intrarrenal da ureia e ocorre principalmente na alça néfrica curta. Outra parte da ureia reabsorvida a partir do ducto coletor medular interno é transportada para longe da medula através dos vasos retos ascendentes. A quantidade de ureia que passa por esse processo equivale a cerca de 10% da carga filtrada, quando o fluxo urinário é normal, porém, pode aumentar consideravelmente quando a urina está bastante concentrada (Lyman, 1986).

Ocorre uma redução marcante da depuração de ureia mediante o aumento acentuado e sua reabsorção proximal, por causa da redução do volume vascular efetivo. No túbulo proximal, a reabsorção de ureia é passiva e depende da existência de um gradiente de concentração favorável. Esse gradiente é criado pela reabsorção de água nesse mesmo local. Normalmente, cerca de 2/3 da água filtrada são reabsorvidos no túbulo proximal, como resultado da reabsorção de sal (principalmente, cloreto de sódio). A perda de 2/3 da água no túbulo aumenta a concentração de ureia no trio tubular, criando um gradiente favorável à difusão da ureia para fora do túbulo. Quando a reabsorção de água corresponde a 90% da carga filtrada, a concentração de ureia deve aumentar para 10 vezes a concentração plasmática. A depleção volumétrica e a redução do fluxo plasmático renal sem depleção de volume, por exemplo, diante de uma estenose da artéria renal, também podem reduzir a TFG e, consequentemente, reduzem a depuração tanto da creatinina quanto da ureia. Dessa forma, a depleção volumétrica reduz a depuração de creatinina apenas por meio da redução da filtração, e reduz a depuração de ureia tanto pela diminuição da filtração, como pelo aumento da reabsorção. Portanto, na depleção volumétrica, a depuração de ureia diminui mais do que a depuração de creatinina. Na situação normal, a proporção de nitrogênio ureico plasmático e creatinina plasmática é aproximadamente igual a 10:1. Contudo, quando há depleção volumétrica, essa proporção usualmente é maior que 20:1. A predição do *status* volumétrico por meio da proporção ureia/creatinina assume que a produção de ambas as substâncias é constante; no entanto, isso nem sempre é verdade. Glicocorticoides e uma dieta rica em proteínas aumentam a produção de ureia, enquanto a desnutrição proteica crônica a diminui. A produção de creatinina também varia consideravelmente. Um definhamento muscular marcante pode reduzir sua produção a níveis inferiores a um terço da produção normal. Atualmente, a principal causa de uma elevada proporção BUN/creatinina em pacientes hospitalizados não é a desidratação, mas a ingestão adequada de proteínas (muitas vezes, via tubo de alimentação) por pacientes que apresentam severa debilidade muscular. Assim, a excreção fracionada de ureia (ver a seguir) constitui um índice mais confiável do *status* volumétrico do que a proporção ureia/creatinina plasmática (Carvounis, 2002). Os mecanismos pelos quais o volume vascular efetivo aumenta a reabsorção proximal de sal e água já foram explicados anteriormente, na seção sobre controle do volume extracelular.

Taxa de filtração glomerular (TFG), fluxo plasmático renal (FPR) e fração de filtração (FF)

Conforme discutido na seção anterior, como a insulina é livremente filtrada no glomérulo, sem ser reabsorvida nem secretada através dos túbulos, sua depuração é equivalente à TFG. Esta é a taxa (mL/min) de plasma filtrado pelo glomérulo a partir do sangue que passa pelo sistema tubular. A depuração de paramino-hipurato (PAH) quantifica outro aspecto da função renal. À medida que ocorre, qualquer PAH que não seja filtrado no glomérulo é quase totalmente secretado no túbulo proximal, permitindo, assim, que a depuração dessa substância seja uma medida do fluxo plasmático renal, que é o volume de plasma total perfundindo os capilares glomerulares. A fração de filtração é o volume de plasma filtrado como fração do volume de plasma total perfundindo os capilares glomerulares (Smith, 1951). Como a depuração da inulina representa a TFG e a depuração de PAH indica o volume de plasma que perfunde os capilares glomerulares:

$$\text{Fração de filtração (FF)} = C_{IN}/C_{PAH} \qquad (14.15)$$

Em que C_{IN} é a depuração da inulina, e C_{PAH} é a depuração do PAH.

Em homens, a FF normalmente é igual a 0,2. Como discutido anteriormente na seção sobre regulação do volume extracelular, quando o volume vascular efetivo diminui, (p. ex., na insuficiência cardíaca), a perfusão renal também diminui. A TFG, contudo, sofre uma queda menor, porque a pressão no capilar glomerular é mantida pelo aumento do tônus arteriolar eferente. O resultado é um aumento da FF. Esse aumento da FF, ou seja, o aumento da filtração glomerular diante de certo fluxo plasmático, aumenta a concentração plasmática de proteínas, ao concentrar os constituintes plasmáticos não filtráveis. Consequentemente, aumenta a pressão oncótica do sangue nos capilares peritubulares, resultando no aumento da movimentação de líquidos do interstício tubular para os capilares. Este efeito ajuda a aumentar a reabsorção de líquidos a partir do túbulo proximal para o espaço intersticial. De modo semelhante, sendo um esforço para manter elevada a pressão no capilar glomerular, o tônus aumentado das arteríolas eferentes tende a reduzir a pressão hidrostática nos capilares peritubulares. Esse efeito também contribui para aumentar a reabsorção de sal no túbulo proximal.

A FF diminui com a expansão do volume vascular, porque o aumento do fluxo plasmático renal é maior que o aumento da TFG. As alterações observadas nas pressões oncótica e hidrostática no sangue dos capilares peritubulares, bem como seus efeitos sobre a reabsorção proximal de sal e água, são opostas àquelas observadas nas condições de volume vascular efetivo reduzido descritas anteriormente (Oh, 1995).

Excreção fracionada (EF)

A excreção fracionada (EF) é a quantidade de substância excretada pela urina, expressa como fração da carga filtrada da mesma substância.

$$F_x = P_x \times \text{TFG} \quad (14.16)$$

em que F_x é a quantidade de uma substância *x* filtrada.

$$F_x = P_x \times C_{creat} \text{ (considerar que TFG} = C_{creat}) = P_x \times (U_{creat} V/P_{creat}) \quad (14.17)$$

$$E_x = V \times U_x, \quad (14.18)$$

em que E_x é a quantidade excretada pela urina, e U_x é a concentração urinária da substância *x*.

Portanto:

$$\text{EF} = [(V \times U_x)]/[P_x \times (V \times U_{creat}/P_{creat})] \quad (14.19)$$

Quando V é eliminado em ambos os lados da equação, esta é simplificada:

$$\text{FE} = (U_x/P_x)/(U_{creat}/P_{creat}) \quad (14.20)$$

ou

$$\text{EF} = (U_x/P_x) \times (P_{creat}/U_{creat}) \quad (14.21)$$

Assim, a quantificação da EF pode ser obtida a partir de um pequeno volume de amostra de urina. Quando a depuração da substância eliminada na urina é inferior à da creatinina, a EF dessa substância é inferior a 1. Ao multiplicar a EF por 100, o resultado é expresso em %EF. A EF do sódio é utilizada com frequência para distinguir necrose tubular aguda de azotemia pré-renal, sendo que um valor abaixo de 0,01 (inferior a 1%) sugere azotemia pré-renal, e um valor acima de 0,01 é sugestivo de necrose tubular aguda.

Índice de insuficiência renal (IIR)

O índice de insuficiência renal (IIR) é outra fórmula utilizada para diferenciar o diagnóstico de insuficiência renal aguda. É expressa como $U_{Na^+}/(U_{creat}/P_{creat})$. O IIR é distinguido da EF de sódio pela remoção da concentração plasmática de Na^+ da fórmula. Portanto, o valor do IIR será 140 vezes o valor da EF do Na^+ quando a concentração sérica de Na^+ for igual a 140 mEq/L. A EF do Na^+ pode ser expressa em porcentual:

$$\text{FE}_{Na^+} \times 1{,}4 = \text{IIR} \quad (14.22)$$

Atenção: tanto a EF de Na^+ como o IIR são utilizados apenas no diagnóstico diferencial de insuficiência renal aguda com oligúria. Por exemplo, diante de uma ingestão de sal regular, a EF de Na^+ usual é inferior a 0,01, mas não se considera a existência de azotemia pré-renal.

Reabsorção fracionada (RF)

A reabsorção fracionada (RF) é a quantidade de substância reabsorvida expressa como fração da carga filtrada. É estimada a partir da EF, segundo a fórmula:

$$\text{RF} = 1 - \text{EF} \quad (14.23)$$

Depuração de água livre e depuração de água livre negativa

A água livre é o volume de água eliminado em excesso, além do volume necessário para manter a urina isotônica em relação ao plasma. Em outras palavras, é o volume de água que deveria ser removido para tornar a urina isotônica. Como todas as demais depurações, a depuração de água livre é expressa em volume por unidade de tempo, usualmente mL/min. Para determinar a depuração de água livre, é preciso determinar a quantidade de soluto total contida na urina (mOsm), a qual é medida a partir da osmolalidade e volume urinário ($U_{osm} \times V$). Em seguida, deve ser determinada a quantidade de água necessária para manter a quantidade de soluto calculada na mesma osmolalidade do plasma, ou seja, a depuração osmolar. A depuração de água livre consiste na diferença existente entre depuração osmolar e volume de urina (Carroll, 1989).

$$\text{Depuração osmolar } (C_{osm}) = (U_{osm} \times V)/P_{osm} \quad (14.24)$$

$$\text{Depuração de água livre } (C_{H_2O}) = V - C_{osm} \quad (14.25)$$

Ou:

$$C_{H_2O} = V - (U_{osm} \times V/P_{osm}) \quad (14.26)$$

Se a urina estiver mais concentrada do que o plasma, de certo modo significa que água livre foi removida da urina isotônica e, por isso, emprega-se o termo "depuração de água livre negativa". Em outras palavras, trata-se da quantidade de água que deveria ser adicionada à urina para torná-la isotônica.

$$\text{Depuração de água livre negativa } (Tc_{H_2O}) = C_{osm} - V \quad (14.27)$$

Diante de uma função renal normal, os rins usualmente concentram a urina. Desse modo, U_{osm} é maior que P_{osm}, resultando em uma C_{H2O} negativa. Por outro lado, diuréticos de alça bloqueiam a reabsorção de cloreto de sódio na alça néfrica, interferindo tanto na concentração, quanto na diluição da urina, de modo a torná-la quase isotônica e com pouca água livre ou com água livre negativa.

Essa discussão trata dos mecanismos gerais pelos quais os rins controlam o volume extracelular, e também do modo como são empregadas as quantificações de substâncias químicas específicas (como BUN e creatinina), presentes no soro e na urina, para medir a função renal. Os rins regulam o volume extracelular ao exercerem a regulação das concentrações dos íons que ficam retidos no sangue. Distúrbios da função renal frequentemente conduzem a desequilíbrios eletrolíticos, enquanto os distúrbios envolvendo eletrólitos muitas vezes são passíveis de correção, ao menos parcial, por rins cuja função esteja normal. Diante disso, as causas dos distúrbios eletrolíticos serão discutidas a seguir.

Distúrbios da concentração de potássio

O conteúdo de K^+ total em indivíduos adultos hospitalizados é de aproximadamente 43 mEq/kg de peso corporal, sendo que apenas 2% desse valor é encontrado no líquido extracelular. Quando as concentrações do potássio que atravessa as membranas celulares estão em equilíbrio eletroquímico, o gradiente de K^+ não só determina, como também é previsto pelo potencial de membrana (E_m), segundo a equação de Nernst (Veech, 1995; Goldman, 1943):

$$E_m \text{ (mV)} = -61 \log (K^+ \text{ intracelular}/K^+ \text{ extracelular}) \quad (14.28)$$

A proporção normal K^+ intracelular/K^+ extracelular vale em torno de 30 e, assim, o E_m normal é – 90 mV. O potencial de membrana tende a aumentar em casos de hipocalemia, do mesmo modo que tende a diminuir em estados de hipercalemia. Na hipocalemia, o K^+ intra ou extracelular tende a diminuir, porém, sua concentração extracelular tende a cair proporcionalmente mais do que a concentração intracelular. Desse modo, a proporção K^+ intracelular/K^+ extracelular tende a aumentar. Na hipercalemina, o potencial de membrana tende a diminuir, uma vez que o aumento do nível de K^+ extracelular é proporcionalmente maior que o de K^+ intracelular.

Controle do fluxo transcelular de potássio

Os gradientes elétricos transmembrana promovem a difusão de K^+ e de Na^+ para fora e para dentro das células, respectivamente. Uma vez que a bomba de Na^+–K^+, responsável pela reversão desse processo, é estimulada pela insulina e catecolaminas (por meio de receptores β-2-adrenérgicos), alterações dos níveis desses hormônios podem afetar o transporte e os níveis séricos de K^+ (Meister, 1993; Feraille, 1999; Sweeney, 1998; Goguen, 1993). As células podem atuar como tampões. Na acidose, as células capturam íons H^+ em troca da expulsão de íons K^+. Na alcalose, ao contrário, as células expulsam íons H^+ em troca da captação de íons K^+. A Figura 14.3 apresenta um resumo dessas ações. O efeito da acidose e da alcalose sobre fluxo transcelular de K^+ não depende apenas do pH, mas também do tipo de ânion que se acumula.

Em geral, a acidose metabólica causa maior efluxo de K^+ do que a acidose respiratória. A acidose metabólica causada por ácidos inorgânicos (p. ex., ácido sulfúrico e ácido hidroclorídrico) promovem maior efluxo de K^+ do que os ácidos orgânicos (p. ex., ácido lático e cetoácidos). Esse efeito se deve ao acúmulo substancial de ânions orgânicos na célula, bem como no LEC, enquanto os ânions inorgânicos se acumulam principalmente no LEC. A acidose provoca o efluxo de K^+ da célula, em decorrência da troca desse íon por H^+. Um fator

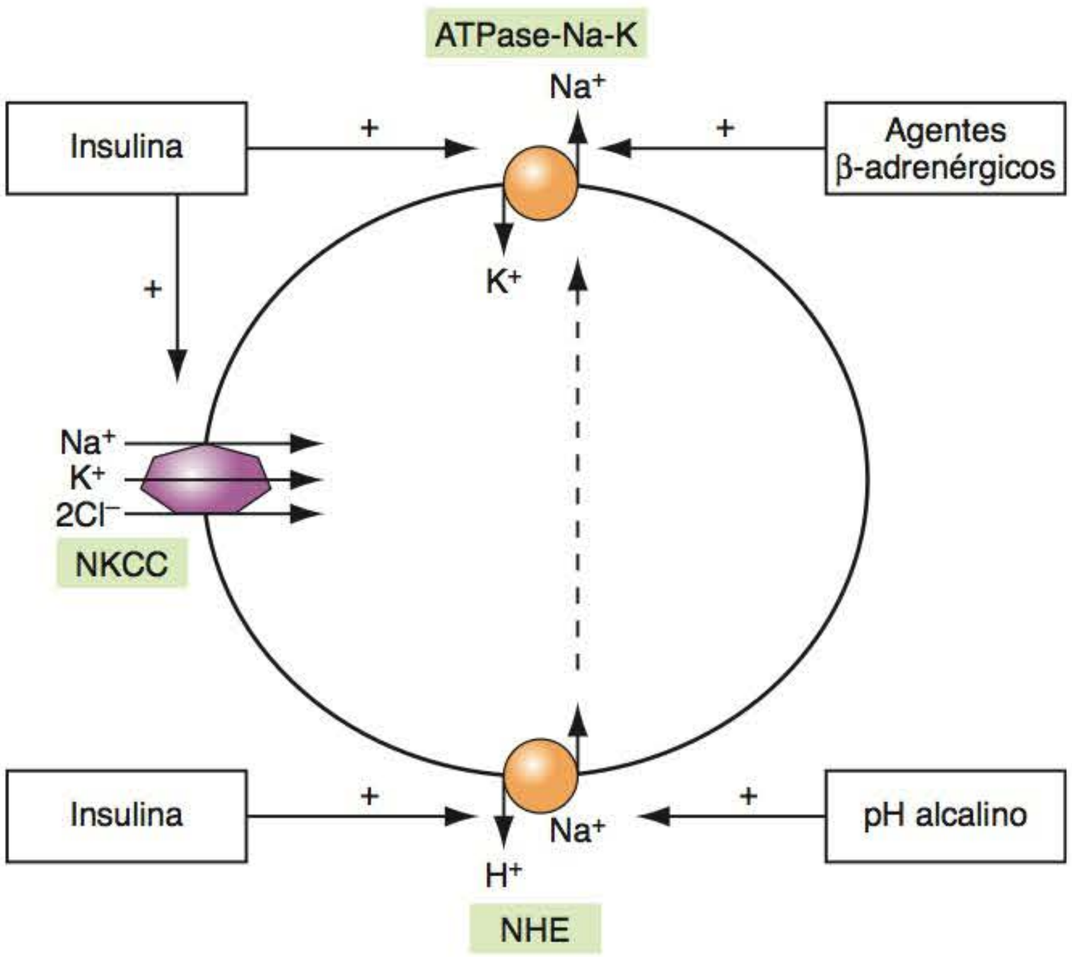


Figura 14.3 Controle da movimentação transcelular de potássio. O potássio entra na célula através da ATPase de Na^+–K^+ (estimulada por agentes β-adrenérgicos ou insulina), ou do NKCC (estimulado pela insulina). A estimulação de qualquer um desses transportadores aumenta a movimentação intracelular de potássio. A estimulação do NHE pela elevação do pH extracelular ou pela insulina aumenta a concentração intracelular de sódio, que por sua vez estimula a ATPase de Na^+–K^+. NKCC = cotransportador Na-K-Cl; NHE = cotransportador de Na-H.

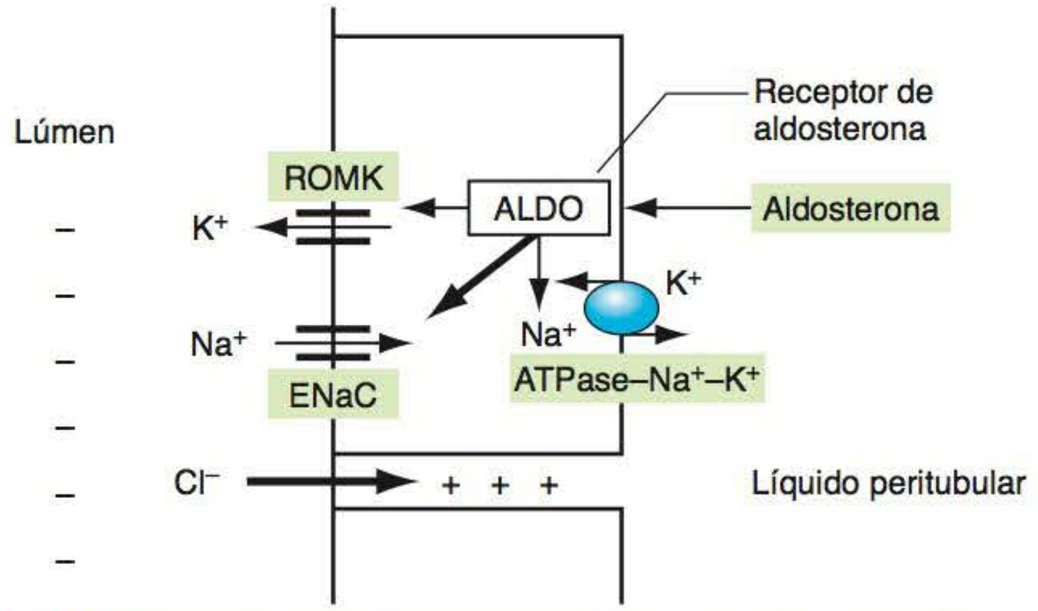


Figura 14.4 Controle da secreção de potássio no ducto coletor cortical. O sódio entra na célula a partir do líquido luminal, por meio do ENaC, e é transportado para fora da célula por meio da ATPase de Na^+–K^+ localizada na membrana basolateral. Esses processos criam um potencial elétrico luminal mais negativo do que o potencial elétrico do líquido peritubular. O desequilíbrio de carga elétrica criado pela reabsorção de sódio é parcialmente contrabalanceado pela reabsorção paracelular de cloreto e pela entrada de potássio no lúmen por meio do ROMK, um canal de potássio. ENaC = canal epitelial de Na^+; ROMK = canal de K^+ medular externo renal.

modificador parece ser o acúmulo de ânions no meio intracelular. Na acidose orgânica, uma grande parte do H^+ que entra na célula é equilibrada por ânions orgânicos e, assim, o efluxo de K^+ é impedido. Na acidose respiratória, o bicarbonato é o ânion que se acumula dentro da célula para equilibrar a entrada de H^+ (Perez, 1981). A alcalose tende a diminuir os níveis séricos de K^+, uma vez que, como observado anteriormente, os íon H^+ deixam as células em troca da entrada de K^+. Do mesmo modo como ocorre na acidose, o influxo de K^+ varia com o tipo de alcalose. Na alcalose respiratória, com a consequente PCO_2 mais baixa e o bicarbonato menos compensador, conforme será discutido adiante, provavelmente por causa de uma queda da concentração celular de bicarbonato, o influxo de K^+ não é tão intenso quanto o que ocorre na alcalose metabólica. Quando o pH se mantém normal, em decorrência de um aumento da concentração de bicarbonato e da PCO_2, os íons K^+ tendem a se mover para dentro das células. O acúmulo intracelular de bicarbonato deve ser acompanhado de Na^+ e K^+. De modo similar, quando o pH permanece normal com uma concentração de bicarbonato proporcionalmente baixa e uma PCO_2 baixa, o K^+ tende a se mover para fora da célula.

Controle da excreção renal de potássio

Cerca de 90% da ingestão diária de K^+ (60-100 mEq) é eliminada com a urina e 10%, com as fezes. A maior parte do potássio filtrado no glomérulo (70–80%) é reabsorvida no túbulo proximal, por meio de mecanismos passivos e ativos. Na porção ascendente da alça néfrica, o K^+ é reabsorvido com Na^+ e Cl^-; a concentração de K^+ no início do túbulo contornado distal é de aproximadamente 1 mEq/L e o volume de líquido é de quase 25 L. Sendo assim, o K^+ excretado pela urina é em grande parte aquele que foi secretado no ducto coletor cortical, por ação dos mecanismos mostrados na Figura 14.4. A ATPase de Na^+–K^+, localizada na face basolateral do ducto coletor cortical, bombeia K^+ para dentro da célula, ao mesmo tempo em que bombeia o Na^+ para fora. O Na^+ existente no lúmen entra na célula através dos canais epiteliais de Na^+ (ENaC, *Epithelial Na^+ Channels*), fornecendo um suprimento contínuo desse íon. Essa é a etapa mais crítica da reabsorção de Na^+, que é indispensável para a secreção de potássio no ducto coletor cortical. A aldosterona é o principal regulador da expressão dos ENaC na membrana luminal e, por isso, é também o principal determinante da excreção renal de potássio. O potencial luminal negativo que se desenvolve como resultado da reabsorção de sódio promove a reabsorção de cloreto via canais paracelulares. Como a reabsorção de Na^+ não é acompanhada íon a íon pela reabsorção de cloreto, o desequilíbrio de cargas é corrigido pela secreção de K^+ através de um canal de K^+ especializado – o canal de K^+ medular externo renal (ROMK, *Renal Outer Medullary K Channel*). A aldosterona aumenta a secreção de K^+ ao intensificar a entrada passiva de Na^+ a partir do lúmen para dentro da célula, promovendo o aumento da expressão de ENaC na membrana luminal. O consequente aumento da concentração celular de sódio estimula indiretamente a atividade da ATPase de Na^+–K^+ e do ROMKs. A concentração peritubular de K^+ e o pH também influenciam a secreção de K^+ ao exercerem efeitos sobre a atividade da ATPase de Na^+–K^+. Níveis séricos de K^+ elevados e pH alcalino estimulam a atividade enzimática, enquanto baixas concentrações séricas de K^+ e pH acídico têm efeito inibitório.

Quando o Na^+ é acompanhado de ânions aos quais os túbulos apresentam permeabilidade inferior à do cloreto, há um aumento da negatividade luminal que resulta na intensificação da secreção de K^+. Exemplos de tais ânions são sulfato, bicarbonato e antibióticos aniônicos, tais como penicilina e carbenecilina. No líquido contido nos túbulos, os íons bicarbonato aumentam a secreção de K^+, não somente em consequência de serem íons pouco reabsorvíveis, mas por promoverem o aumento da atividade de ROMK. Em pacientes que vomitam, um aumento na excreção renal de K^+, resultando em eliminação de H^+ com aumento dos níveis de bicarbonato no soro e, por fim, também na urina, pode ser explicado por esse mecanismo. O ADH também aumenta a atividade dos canais de K^+ luminais. A secreção de K^+ é intensificada por um fluxo urinário rápido, que mantém baixa a concentração luminal de K^+. Esse mecanismo poderia explicar o declínio do K^+ renal observado durante a diurese osmótica. Quanto mais Na^+ chegar aos néfrons distais, maior poderá ser sua absorção e mais K^+ será excretado "em troca". A maior quantidade de Na^+ destinada ao ducto coletor também aumentará a excreção renal de K^+, ao atuar sobre o fluxo urinário (Giebsch, 1998; Halperin, 1998; Giebisch, 2002). Um fluxo urinário maior proporciona uma maior secreção de potássio no líquido luminal, ao mesmo tempo em que reduz a retrodifusão do potássio para dentro das células tubulares, uma vez que a concentração luminal seria inferior para uma dada quantidade de potássio secretada (Oh, 2003).

Atividade de renina plasmática (ARP), concentração de aldosterona plasmática (AP) e anormalidades do metabolismo de potássio

Tendo em vista que as anormalidades na ARP e na AP são frequentemente causa e consequência de anormalidades do metabolismo de K^+, é importante compreender as relações em que estão envolvidas (Bock, 1992; Hollenberg, 2000; Laragh, 1995; Hall, 1991). Os princípios gerais são:

- a supressão da ARP será causada pela expansão do volume arterial, provocada por um aumento primário dos níveis de aldosterona (aldosteronismo primário) ou por ação de outros mineralocorticoides. Quando outros mineralocorticoides, exceto a aldosterona, estão presentes em excesso, induzem retenção de sal e água, e a resultante expansão volumétrica leva à supressão tanto da ARP como da AP;
- um aumento da ARP sempre acarretará um aumento da AP (aldosteronismo secundário), a menos que esse aumento da ARP seja consequente a um defeito primário na secreção de aldosterona. A ARP pode ser aumentada por:
  - depleção volumétrica secundária à perda de sal renal ou extrarrenal;
  - anomalia na secreção de aldosterona, como um reninoma (hemangiopericitoma de arteríola aferente), hipertensão maligna, estenose da artéria renal;
  - aumento da produção de substrato de renina, por exemplo, diante do uso de contraceptivos orais.

A elevação dos níveis séricos de K^+ pode estimular diretamente o córtex suprarrenal a liberar aldosterona. Se a deficiência de renina for primária, os níveis de aldosterona sempre estarão baixos, como se observa no hipoaldosteronismo hiporreninêmico.

Causas e patogênese da hipocalemia

Existem três mecanismos pelos quais a hipocalemia se manifesta: movimentação intracelular, redução da ingestão e aumento da perda. Como a concentração intracelular de K^+ excede bastante a concentração extracelular, a movimentação do K^+ para dentro da célula pode causar uma severa hipocalemia sem que ocorra nenhuma alteração significativa de sua concentração intracelular (Clemessy, 1995; Matsumura, 2000; Rakhmanina, 1998; Jordan, 1999; Ogawa, 1999; Cannon, 2002; Jurkat-Rott, 2000; Bradberry, 1995; Steen, 1981). Alcalose, insulina e β-2-agonistas podem causar hipocalemia por meio de uma significativa estimulação da atividade da ATPase de Na^+–K^+ (Matsumura, 2000).

A movimentação intracelular de potássio é causa de hipocalemia na paralisia periódica hipocalêmica, sendo que alguns pacientes apresentam atividade defectiva dos canais de Ca^{2+} di-hidropiridina-responsivos ou dos canais de Na^+ voltagem-dependentes, embora o mecanismo exato da hipocalemia permaneça desconhecido (Jurkat-Rott, 2000; Bradberry, 1995). No envenenamento com bário, o K^+ se acumula dentro da célula e o indivíduo desenvolve hipocalemia, em decorrência da inibição dos canais de K^+ por ação do bário. Como resultado, há supressão do efluxo desse íon para o meio extracelular em razão da sua contínua captação pela ATPase de Na^+–K^+. O K^+ se acumula no interior da célula com outros ânions, à medida em que a massa celular aumenta durante o período de recuperação nutricional, uma vez que o K^+ é o principal cátion intracelular.

Uma ingestão de K^+ insuficiente raramente causa hipocalemia por si só, pois é sempre acompanhada de uma ingestão hipocalórica, que promove catabolismo e liberação de K^+ a partir dos tecidos (Steen, 1981). Vômitos e diarreia são causas comuns de hipocalemia (Steen, 1981). A diarreia provoca perda direta de K^+ através das fezes, enquanto, no vômito, a hipocalemia resulta principalmente da perda urinária de K^+, e não com o vômito, visto que este provoca alcalose metabólica e a subsequente excreção renal de bicarbonato conduz ao declínio do K^+ renal.

A perda renal de K^+ sem dúvida é a causa mais comum de hipocalemia. Com raras exceções, a hipocalemia decorrente do aumento do declínio de potássio renal pode ser atribuída a uma maior atividade de aldosterona ou outros mineralocorticoides. A aldosterona aumentada pode representar um distúrbio primário (p. ex., no hiperaldosteronismo primário) ou ser consequente a um aumento da secreção de renina (p. ex., hiperaldosteronismo secundário). Mesmo diante da elevação da aldosterona, o declínio do K^+ renal somente ocorre se essa elevação for acompanhada da devida chegada de Na^+ distalmente (Torpy, 1998; Stowasser, 1995; Abdelhamid, 1995; Vargas-Poussou, 2002; Finer, 2003; Kunchaparty, 1999; Seyberth, 1985; Krozowski, 1999; Heilmann, 1999). No aldosteronismo primário, a distribuição distal de Na^+ é intensificada por causa do aumento da reabsorção de NaCl no ducto coletor distal, decorrente da ação inibitória da aldosterona sobre a reabsorção de sal no túbulo proximal e na alça néfrica. No hiperaldosteronismo secundário, a hipocalemia ocorre somente em condições que são seguidas de um aumento da distribuição de Na^+ distal. Exemplos de hiperaldosteronismo secundário que resultam em hipocalemia incluem hipertensão maligna e defeitos congênitos no transporte renal de sal (p. ex., síndrome de Bartter e síndrome de Gitelman). É importante salientar que, na ausência de perda extrarrenal de sal, a excreção renal e a ingestão de sal se igualam, mesmo que haja aumento ou deficiência de aldosterona, uma vez que é impossível haver desequilíbrio prolongado entre ingestão e eliminação; sem um eventual equilíbrio, um indivíduo pode não sobreviver a um volume excessivo ou a uma depleção volumétrica. Contudo, quando a reabsorção de sal está aumentada no sítio ativo de mineralocorticoides (i. e., ducto coletor cortical), a quantidade de sal que chega a esse local deve aumentar se acaso a eliminação e a ingestão dele eventualmente forem iguais. Quando o equilíbrio é alcançado, uma quantidade maior de sal é distribuída para esse sítio e uma quantidade maior de sal é reabsorvida, de modo que o conteúdo normal que se iguala à ingestão é excretado. O equilíbrio definitivo apenas é possível quando a quantidade do que se entra no corpo é igual à que dele sai. Esse é o mecanismo pelo qual a distribuição de sal ao sítio da aldosterona está aumentada no hiperaldosteronismo primário, bem como em todos os casos de hiperaldosteronismo secundário associados à hipocalemia.

A síndrome de Bartter, uma rara condição autossômica recessiva em que há perda de potássio, é causada por um defeito de reabsorção do NaCl no ramo ascendente espesso da alça néfrica (Miyamura, 2003; Finer, 2003; Kunchaparty, 1999; Seyberth, 1985; Schultheis, 1998). Por outro lado, na síndrome de Gitelman observa-se um defeito na reabsorção de NaCl no túbulo contornado distal (Schultheis, 1998). Em tais condições, a reabsorção defeituosa do Na^+ no túbulo proximal para o sítio efetivo da aldosterona resulta em aumento da chegada de Na^+ no ducto coletor distal e, assim, em hipocalemia. A insuficiência cardíaca não conduz à hipocalemia, apesar do hiperaldosteronismo secundário, a menos que a distribuição de Na^+ distal seja intensificada por uma terapia diurética.

Outras substâncias diferentes da aldosterona, mas que possuem atividade mineralocorticoide incluem corticosterona, deoxicorticosterona

Tabela 14.3 Causas de hipocalemia

Movimentação intracelular
Alcalose
Paralisia periódica
β-2-agonistas
Envenenamento por bário
Insulina
Estado de recuperação nutricional
Ingestão insuficiente
Perda GI:
Vômitos
Diarreia
Drenagem intestinal
Abuso de laxantes
Perda renal excessiva
Aldosteronismo primário (adenoma ou hiperplasia suprarrenal); ARP suprimida
Aldosteronismo secundário (o aumento dos níveis de aldosterona é secundário ao aumento dos níveis de renina)
Hipertensão maligna, estenose da artéria renal, reninoma
Diuréticos
Síndrome de Bartter, síndrome de Gitelman
Excesso de mineralocorticoides, com exceção da aldosterona (p. ex., síndrome de Cushing, tumor produtor de ACTH, alcaçuz)
Acidose metabólica crônica
Distribuição de ânions pouco reabsorvidos ao túbulo distal (p. ex., bicarbonato, ânions da cetona, carbenecilina)
Causas diversas: deficiência de magnésio, leucemia aguda, síndrome de Liddle

(DOC) e mineralocorticoide sintéticos, como 9-α-fludrocortisona (Florinef). A ingestão de alcaçuz aumenta a atividade mineralocorticoide. Esse efeito ocorre porque o alcaçuz inibe a enzima 11-β-hidroxiesteroide desidrogenase, inibindo a quebra de cortisol e permitindo a elevação dos níveis intracelulares do hormônio (que normalmente apresenta potente atividade mineralocorticoide, porém encontra-se em concentrações negligíveis nas células do ducto coletor cortical por ser rapidamente quebrado pela enzima) (Krozowski, 1999; Heilmann, 1999).

As raras causas de declínio renal do K^+ que não vêm acompanhadas do aumento da atividade mineralocorticoide incluem a síndrome de Liddle e a acidose metabólica crônica. A síndrome de Liddle é um distúrbio congênito caracterizado pelo aumento da atividade de ENaC no ducto coletor, na ausência de aumento dos níveis de aldosterona, resultando em aumento da reabsorção de sódio e da secreção de potássio. A secreção de aldosterona é reduzida, porque a retenção de sal consequente ao aumento da atividade de ENaC leva à supressão fisiológica da secreção de renina (Warnock, 2001).

Na acidose metabólica crônica, a hipocalemia provavelmente se desenvolve porque a reduzida reabsorção proximal de NaCl permite a chegada de mais sal no néfron distal. A estimulação direta da secreção de aldosterona pela acidose metabólica constitui mecanismo adicional, que contribui para a hipocalemia.

Diagnóstico diferencial da hipocalemia

No diagnóstico diferencial, o primeiro passo consiste em medir a excreção urinária de K^+. Se o resultado obtido for baixo (< 20 mEq/dia ou < 0,01 mEq/mg de creatinina), a causa deve ser baixa ingestão, perda extrarrenal de K^+ ou movimentação intracelular. O desenvolvimento superagudo de hipocalemia geralmente indica o mecanismo de movimentação intracelular. A causa mais comum de perda extrarrenal é a diarreia, que pode ser suspeita por meio do levantamento da história do paciente e com a constatação de um intervalo aniônico urinário baixo ou negativo ($Na^+_{urina} + K^+_{urina} - Cl^-_{urina}$); um intervalo aniônico urinário normal situa-se em torno de 40 mmol/24 horas. A movimentação intracelular é sugerida pela história do paciente e pelos achados clínicos. Se a excreção urinária estiver normal ou aumentada (K^+_{urina} > 30 mEq/dia ou 0,02 mEq/mg de creatinina), a causa deve ser perda renal. Uma vez levantada a suspeita da causa renal, o próximo passo deverá ser a quantificação de ARP e dos níveis plasmáticos de aldosterona.

Uma ARP elevada e níveis de aldosterona também elevados sugerem hiperaldosteronismo secundário, que inclui terapia diurética, estenose da artéria renal, hipertensão maligna, tumores produtores de renina e defeitos hereditários no transporte renal de sal (síndrome de Bartter e síndrome de Gitelman). A pressão sanguínea deve estar normal em indivíduos que possuem síndrome de Bartter ou de Gitelman, do mesmo modo que em um indivíduo normotenso sob terapia diurética. A pressão sanguínea deve estar alta em todas as demais condições, incluindo indivíduos hipertensos sob terapia diurética. Uma ARP baixa e níveis plasmáticos de aldosterona elevados são indicativos de hiperaldosteronismo, que é causado por adenomas suprarrenais ou hiperplasia bilateral. Se a ARP e a aldosterona plasmática estiverem baixas, as condições prováveis são a síndrome de Liddle, estados de aparente excesso de mineralocorticoides (tanto hereditário, como induzido por fármacos) e deficiências de 11-hidroxilase e 17-hidroxilase. A redução da excreção renal de K^+ será obtida com o uso de espirolactona em todas as condições mencionadas, exceto na síndrome de Liddle, que responde a bloqueadores de ENaC, como triamtereno e amilorida (Oh, 2003).

Causas e patogênese da hipercalemia

A hipercalemia pode ser causada por três mecanismos distintos: (a) movimentação de K^+ das células para o meio extracelular (Wasserman, 1997; Perazella, 1999; McIvor, 1985, 1987; Emser, 1982), (b) aumento da ingestão de K^+ e (c) redução da excreção renal de K^+ (Tab. 14.4). Paralisia periódica familiar hipercalêmica, administração de succinilcolina a indivíduos com paralisia (Delphin, 1987; Cooperman, 1970; Gronert, 1975; Larach, 1987), administração de aminoácidos catiônicos (como arginina e lisina) e de ácido ε-aminocaproico (que provavelmente se transforma em aminoácido catiônico), rabdomiólise ou hemólise, e acidose aguda são todos agentes causadores de hipercalemia que atuam por meio da movimentação de K^+ extracelular. A rabdomiólise e a hemólise causam hipercalemia somente quando são acompanhadas de insuficiência renal. Embora não seja tão previsível pela detecção de acidose orgânica quanto o é pela detecção de acidose inorgânica em condições experimentais, a hipercalemia é comum na cetoacidose diabética e na acidose lática induzida por fenformina. Sua ocorrência mais frequente na acidose orgânica clínica pode ser explicada pela duração mais prolongada do quadro de acidose e pela presença de outros fatores, tais como desidratação e insuficiência renal, bem como deficiência de insulina na cetoacidose diabética (Perez, 1981).

Tabela 14.4 Causas de hipercalemia

Pseudo-hipercalemia
Trombocitose, leucocitose severa, uso de torniquete com exercício de punho, hemólise *in vitro*
Hipercalemia verdadeira
Decorrente de movimentação extracelular:
Acidose aguda (especialmente, acidose inorgânica)
Estados catabólicos, paralisia periódica, succinilcolina
Aminoácidos catiônicos
Exercícios, com o uso simultâneo de β-bloqueador
Intoxicação por digitálicos
Decorrente de ingestão excessiva: rara, caso a excreção renal de K^+ esteja normal
Diminuição da excreção renal:
Hipoaldosteronismo: doença de Addison; hipoaldosteronismo seletivo (hipoaldosteronismo hiporreninêmico, heparina, deficiências congênitas de enzima suprarrenal, inibidores da enzima conversora de angiotensina)
Ausência de resposta tubular à aldosterona (pseudo-hipoaldosteronismo de tipos I e II): congênita, nefropatia perdedora de sal
Diuréticos poupadores de potássio
Medicamentos antirrejeição: ciclosporina, tacrólimo
Desidratação severa

A hipercalemia também pode ocorrer em casos de intoxicação severa com digitálicos, por meio da movimentação extracelular de potássio, à medida que o digitálico inibe a bomba da ATPase de Na^+–K^+. O rim apresenta uma capacidade tão grande de excretar potássio que a hipercalemia raramente ocorre isolada, apenas com base no aumento da ingestão desse íon. Dessa forma, a hipercalemia quase sempre se deve ao comprometimento da excreção renal. Existem três mecanismos principais de diminuição da excreção renal de potássio: redução dos níveis ou da responsividade à aldosterona, insuficiência renal e diminuição da distribuição distal de Na^+. A deficiência de aldosterona pode constituir parte de uma deficiência generalizada de hormônios suprarrenais (p. ex., doença de Addison), ou pode representar um processo seletivo (p. ex., o hipoaldosteronismo hiporreninêmico é a causa mais comum de todos os estados de deficiência de aldosterona, e sem dúvida é a causa mais comum de hipercalemia crônica entre pacientes não submetidos à diálise (Oh, 1974; Phelps, 1980a). O hipoaldosteronismo seletivo também pode ocorrer durante a terapia com heparina, que inibe a produção de esteroides na zona glomerulosa (Phelps, 1980b). Em pacientes que apresentam secreção reduzida de aldosterona, qualquer agente que limite o suprimento de renina ou angiotensina II é capaz de provocar hipercalemia. Por exemplo, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE, *angiotensin-converting enzyme*), agentes anti-inflamatórios não esteroidais e β-bloqueadores. Esses últimos podem intensificar a tendência à hipercalemia, interferindo no transporte de potássio para dentro das células. A falta de responsividade dos túbulos renais à aldosterona (pseudo-hipoaldosteronismo) pode ser congênita, porém mais frequentemente costuma ser um defeito adquirido. Esse defeito pode envolver apenas a secreção de potássio (pseudo-hipoaldosteronismo de tipo II) ou a reabsorção de sódio adicionada à secreção de potássio (pseudo-hipoaldosteronismo de tipo I) (Wilson, 2001, 2003; Sebastian, 1981; Brautbar, 1978). Esse último defeito parece ser representado pela maioria dos casos denominados "nefrites com perda de sal". Uma severa depleção volumétrica pode causar hipercalemia, apesar do hiperaldosteronismo secundário, porque a depleção volumétrica provoca marcante redução da distribuição de sódio ao ducto coletor cortical.

A pseudo-hipercalemia é definida como um aumento da concentração de potássio observado somente em vasos sanguíneos locais ou *in vitro*,

desprovido de consequências fisiológicas (Stewart, 1979, 1985; Kim, 1990; Zaltzman, 1982; Bellevue, 1975; Iolascon, 1999; Hayward, 1999; Delaunay, 1999; Don, 1990). O uso prolongado de um torniquete acompanhado de exercícios para o punho pode aumentar os níveis séricos de potássio para até 1 mEq/L. Trombocitose e leucocitose severa causam pseudo-hipercalemia pela liberação de potássio de plaquetas e leucócitos, respectivamente, durante a coagulação sanguínea (Tab. 14.4).

Diagnóstico diferencial da hipercalemia

No diagnóstico diferencial da hipercalemia, o primeiro passo é a exclusão da hipótese de pseudo-hipercalemia. Nesta, o exame de ECG não aponta a existência de anormalidades características da hipercalemia, porém, a ausência de alterações no ECG não elimina a possibilidade de uma hipercalemia verdadeira, uma vez que tais alterações costumam ser raras na hipercalemia crônica. A hipótese de pseudo-hipercalemia deve ser levantada diante das condições que sabidamente a causam, tais como trombocitose ou hemólise *in vitro* (soro rosado). Na pseudo-hipercalemia causada por trombocitose, tanto o K^+ sérico como o plasmático devem ser obtidos simultaneamente. Uma vez excluída a pseudo-hipercalemia, o próximo passo consiste em identificar, entre três possibilidades, qual a causa da hipercalemia: aumento da ingestão de K^+, movimentação de K^+ para fora da célula ou comprometimento da excreção renal. A quantificação da concentração de K^+ em uma amostra de urina de 24 horas permite distinguir o aumento da ingestão de K^+ das demais causas em potencial. Embora a hipercalemia decorrente da movimentação de K^+ a partir da célula resulte em maior excreção urinária de K^+, muitas vezes esse aumento da excreção urinária não ocorre, visto que o comprometimento dessa função frequentemente contribui para a hipercalemia. Portanto, a obtenção cuidadosa da história dietética do paciente será suficiente para excluir a hipótese de hipercalemia causada por ingestão de K^+ aumentada, a menos que o paciente esteja tentando deliberadamente enganar o médico.

A hipercalemia crônica quase sempre se deve ao comprometimento da excreção renal e, para determinar essa causa, raramente é necessário quantificar a concentração de K+ na urina acumulada em 24 horas. Entre as causas renais de hipercalemia, a insuficiência renal aguda é a mais comumente associada à hipercalemia aguda, e pode ser explicitada por meio da determinação da creatinina e do BUN séricos. Para o diagnóstico diferencial da hipercalemia crônica decorrente de distúrbios renais, em primeiro lugar, se deve medir a atividade de renina plasmática, aldosterona plasmática e excreção urinária de Na^+ e K^+. Concentrações urinárias muito baixas de Na^+ e K^+ na ausência de poliúria sugerem a ação normal da aldosterona, porém, indicam que a excreção de K^+ está comprometida, em razão da reduzida disponibilidade de Na^+ e da marcante redução do fluxo no ducto coletor. Uma reabsorção proximal de Na^+ extremamente aumentada em decorrência de uma redução do volume vascular efetivo, como ocorre na insuficiência cardíaca congestiva, pode causar hipercalemia por meio desse mecanismo. Se a concentração urinária de Na^+ estiver adequada (> 20 mEq/L), devem ser medidas a atividade de renina plasmática e a aldosterona.

Uma baixa ARP e níveis baixos de aldosterona sugerem hipoaldosteronismo hiporreninêmico, enquanto uma ARP elevada e níveis baixos de aldosterona indicam a existência de um defeito primário na secreção de aldosterona, como na doença de Addison, na terapia com heparina e no defeito de biossíntese de aldosterona. Quando ambas, ARP e aldosterona, estão aumentadas, as causas prováveis são o pseudoaldosteronismo, bem como uma distribuição de Na^+ muito baixa para o ducto coletor cortical ou uso de fármacos que comprometem a função de ENaC ou a ação da aldosterona, como os diuréticos poupadores de potássio (p. ex., amilorida, triamtereno, espirolactona e certos antibióticos, como trimetoprim e pentamidina) (Oh, 2003).

Distúrbios do metabolismo de água, sódio e hormônio antidiurético (ADH)

Regulação da sede e liberação de ADH

Um aumento da osmolalidade efetiva provoca a retração das células osmorreceptoras hipotalâmicas, que, em seguida, estimulam o centro da sede no córtex cerebral, bem como a produção de hormônio antidiurético (ADH) nos núcleos supraótico e paraventricular. Inversamente, um declínio da osmolalidade faz com que as células osmorreceptoras fiquem inchadas, resultando na inibição da produção do ADH. O ADH produzido no hipotálamo é transportado através de longos axônios e secretado a partir da neuro-hipófise (McKinley, 1998; Ibata, 1999). A estimulação e inibição das células osmorreceptoras afeta tanto a produção hipotalâmica como a secreção hipofisária do hormônio.

A regulação da secreção do ADH por meio de uma osmolalidade efetiva é extremamente sensível. Uma elevação de apenas 2 a 3% da osmolalidade efetiva é capaz de estimular uma secreção hormonal suficiente para resultar na concentração máxima da urina. Um declínio de apenas 2 a 3% da osmolalidade plasmática, por outro lado, resulta na produção de uma urina maximamente diluída (< 100 mOsm/L) (Bourque, 1997; Olsson, 1983).

A liberação de ADH também é regulada por fatores não osmóticos. Um baixo volume vascular efetivo provoca sede e liberação de ADH, enquanto um volume vascular efetivo elevado exerce o efeito oposto (Wells, 1998; Aguilera, 2000; Nielsen, 2002; Schrier, 1979). Tais efeitos são mediados por barorreceptores e alguns fatores humorais liberados em resposta à redução do fluxo sanguíneo. As α-catecolaminas são supressoras, enquanto as β-catecolaminas aumentam a produção de ADH. As prostaglandinas inibem o efeito do ADH sobre os rins. A angiotensina II estimula a sede e a liberação de ADH. A falta de glicocorticoides potencializa a ação do ADH sobre o rim e também aumenta a liberação do hormônio. O estresse físico e emocional, como o que é gerado diante de uma cirurgia importante, aumenta a produção de ADH possivelmente, em parte, por estimulação emética que constitui uma das complicações mais comuns das principais cirurgias e que é atribuída aos efeitos da anestesia e do trauma cirúrgico. Diversos fármacos afetam a liberação ou ação do ADH. Por exemplo, o etanol inibe a produção de ADH. Lítio e demeclociclina inibem o efeito do ADH sobre os rins, enquanto a clorpropamida aumenta sua ação. Alguns fármacos podem atuar promovendo estimulação emética, que é um dos estímulos fisiológicos mais potentes para a liberação do ADH. A urina pode se tornar osmoticamente concentrada na ausência do hormônio, caso o volume vascular efetivo esteja muito baixo. A combinação de uma TFG reduzida ao aumento da reabsorção proximal do filtrado resulta em uma redução tão intensa do fluxo urinário para o ducto coletor que nem mesmo a limitada permeabilidade da membrana é capaz de proporcionar a remoção de quantidades suficientes de água para concentrar a urina.

Existem três classes de receptores de ADH: os receptores V1 promovem a elevação do tônus vasomotor e exercem certos efeitos metabólicos; os receptores V2 estão associados à antidiurese; e os receptores V3 estimulam a secreção de ACTH na adeno-hipófise (Ma, 1999; Mouri, 1993). O efeito antidiurético do ADH é mediado por sua ação sobre o ducto coletor renal, no sentido de aumentar a permeabilidade à água, bem como sobre o ramo ascendente espesso medular da alça néfrica, para estimular a reabsorção de sal. A vasopressinase, que normalmente quebra o ADH, pode ter seus níveis aumentados durante a gravidez e ocasionalmente causa poliúria (Molitch, 1998). O DDAVP é um análogo sintético da arginina vasopressina, que resiste à ação da vasopressinase e, assim, exerce efeito prolongado, sendo útil em casos de poliúria na gravidez.

Concentração e diluição da urina

Diariamente, cerca de 180 L de água são filtrados. Desse volume, 120L são reabsorvidos no túbulo proximal e 35 L, no ramo descendente da alça néfrica. Cerca de 25 L de urina diluída chegam até o ducto coletor com uma osmolalidade de aproximadamente 60 a 80 mOsm/L. Devido à expressão condicional da aquaporina 2 na membrana luminal dos ductos coletores (tanto no ducto coletor cortical, como no medular), que depende da ação do ADH, não ocorre reabsorção de água nos ductos coletores na ausência desse hormônio. Entretanto, uma pequena quantidade de água (cerca de 5 L, durante a diurese hídrica) é reabsorvida na porção terminal do ducto coletor medular interno, mesmo diante da completa ausência de ADH. Parece que as aquaporinas são constitutivamente expressas nesta parte do néfron. Durante a máxima diurese hídrica, os efeitos combinados de uma reabsorção de sal adicional no ducto coletor e de uma reabsorção de água adicional

no ducto coletor medular interno permitem a excreção de cerca de 20 L de urina diluída, com uma osmolalidade de aproximadamente 40 mOsm/L. É preciso notar que, durante a diurese hídrica, a máxima produção de urina depende em grande parte da ingestão de sal, uma vez que jamais pode exceder a quantidade de urina que chega ao ramo ascendente da alça néfrica. Mesmo com uma discreta restrição à ingestão de sal (p. ex., 2 g por dia), a discreta depleção volumétrica resultante aumenta a reabsorção de sal e água no túbulo proximal de modo suficiente para reduzir a 12 a 15 L diários o volume distribuído ao ramo ascendente da alça néfrica. Assim, no indivíduo submetido à restrição de sal, a produção de urina máxima final durante a diurese hídrica pode ser superior a 10 a 12 L.

Diante da máxima concentração de ADH, a urina pode ser concentrada a até 1.200 mOsm/L, à medida que a água é reabsorvida nos ductos coletores cortical e medular, com produção diária de um volume de 0,5 L de urina (Fig. 14.5). No túbulo proximal, a reabsorção de água passiva não é acompanhada da reabsorção de sal, mas ocorre em resposta à reabsorção de sal que tem lugar no ramo ascendente da alça. No momento em que entra no sítio efetivo do ADH (i. e., no ducto coletor cortical), a urina apresenta a mesma osmolalidade baixa que tinha durante a diurese hídrica e a antidiurese, que é de cerca de 60 mOsm/L.

A osmolalidade da urina é reduzida pela contínua reabsorção de sal sem reabsorção de água concomitante nos ramos ascendentes delgado e espesso da alça néfrica, no túbulo contornado distal e no túbulo conector. Esses segmentos do néfron não expressam aquaporinas e, portanto, não respondem ao ADH. A concentração da urina é conseguida por meio da reabsorção transcelular de água no ducto coletor. Primeiramente, a água entra na célula a partir da membrana luminal e, em seguida, a deixa através da membrana basolateral. A difusão da água através de qualquer membrana requer a expressão de aquaporinas que, em alguns casos, depende da ação do ADH. A aquaporina 3 é constitutivamente expressa na membrana basolateral do ducto coletor cortical. A aquaporina 4 é constitutivamente expressa na membrana basolateral do ducto coletor medular. A entrada de água no ducto coletor, a partir do lúmen, e nas células requer a expressão de aquaporina 2 na membrana luminal, sendo este um mecanismo mediado pelo ADH.

Para que a osmolalidade da urina aumente a partir de um valor muito baixo (no início do ducto coletor cortical) até alcançar um valor isotônico (na junção corticomedular), é necessário haver ADH e responsividade tubular ao ADH, uma vez que o interstício do córtex é sempre isotônico. Entretanto, a reabsorção de água no ducto coletor medular não só requer a ação do ADH, como também necessita da hipertonicidade do interstício medular. A manutenção da hipertonicidade medular é conseguida por meio do mecanismo de multiplicação de contracorrente. Em resumo, o líquido intersticial medular se torna progressivamente hipertônico a partir da junção corticomedular em direção à extremidade, onde atinge um nível de aproximadamente 1.200 mOsm/L. A hipertonicidade medular na área medular externa é alcançada por meio da reabsorção ativa de sal no ramo ascendente espesso da alça néfrica, sendo que essa reabsorção não é acompanhada de reabsorção da água. Na medula interna, onde a reabsorção de sal ocorre passivamente através do ramo ascendente delgado da alça de Henle (a medula interna não engloba o ramo ascendente espesso), a reabsorção de sal sem reabsorção concomitante de água é auxiliada pela reciclagem de ureia a partir do ducto coletor medular. O mecanismo por meio do qual a ureia contribui para concentrar a urina ainda é motivo de grande debate e está além do escopo da presente discussão. O fato de a osmolalidade intersticial final da medula ser bem maior que a osmolalidade inicial do líquido que nela entra é atribuído ao mecanismo de contracorrente. Esse mecanismo se torna possível pela existência de duas condições: (1) a reabsorção de sal seletiva a partir dos ramos ascendentes da alça de Henle na ausência de reabsorção de água, bem como a reabsorção de água a partir do ramo descendente da alça sem reabsorção de sal concomitante; e (2) a disposição em contracorrente dos ramos descendente e ascendente da alça néfrica, dando laçadas ao redor dos túbulos na extremidade da alça (Hogg, 1986, 1978; Pallone, 2003; de Rouffignac, 1987; Oh, 1997; Sands, 1996; Burg, 1995; Schmidt-Nielsen, 1977; Knepper, 1983; Greger, 1983).

Para que o líquido intersticial medular se torne mais concentrado do que o plasma, apesar da difusão da água para fora do ramo descendente da alça néfrica, a quantidade de sal transportada para fora do ramo ascendente deve ser proporcionalmente maior do que a quantidade de água transportada para fora do ramo descendente. Evidência disso é a osmolalidade hipotônica do líquido no ramo ascendente espesso da alça na junção corticomedular. O propósito fisiológico da difusão da água para fora do ramo descendente é aumentar a concentração

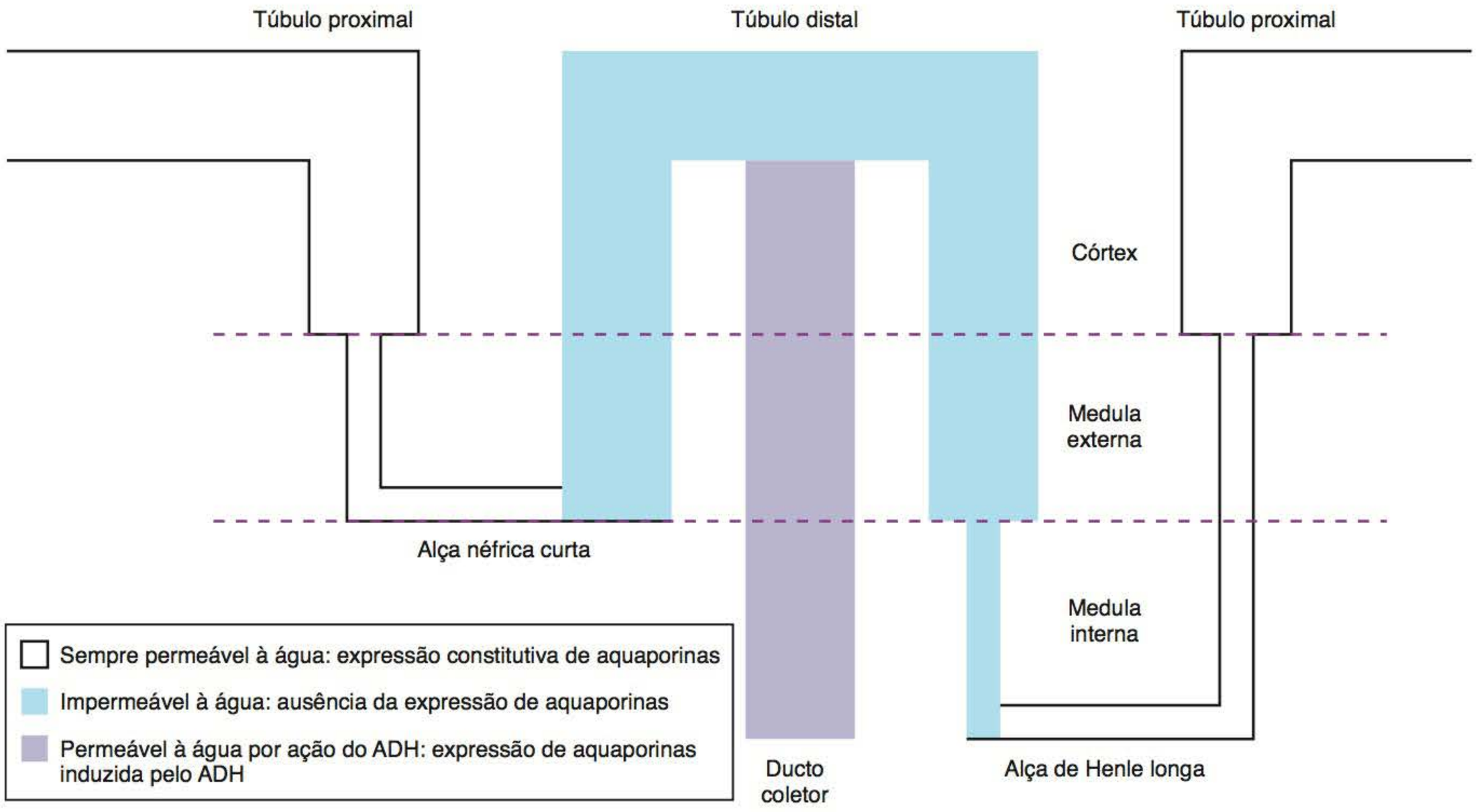


Figura 14.5 Transporte de água em vários sítios do néfron. O túbulo proximal e o ramo descendente delgado da alça de Henle sempre apresentam permeabilidade à água, em razão da expressão constitutiva das aquaporinas nesses locais. Os ramos ascendentes delgado e espesso da alça néfrica, o túbulo contornado distal e o túbulo conector não apresentam expressão de aquaporinas e, assim, são sempre impermeáveis à água. O ducto coletor se torna permeável à água sob efeito do ADH.

de NaCl do líquido luminal a níveis similares ao do líquido intersticial, de modo que, quando a alça de Henle tomba na ponta e faz uma volta por cima, a concentração de sódio do líquido luminal presente no ramo ascendente seja similar (ainda que um pouco menor) à do líquido intersticial. Do contrário, a reabsorção de sódio irá cessar assim que a concentração de sódio no interstício for 1,5 vezes maior que a do líquido luminal, uma vez que cerca de metade da reabsorção de sódio que ocorre passivamente nesse local, por meio de vias paralelas, bem como a energia necessária à reabsorção passiva, consiste no potencial luminoso discretamente positivo (cerca de + 10 mV).

Poliúria

A poliúria é arbitrariamente definida como volume de urina que excede 2,5 L por dia. Existem dois tipos de poliúria: diurese osmótica e diurese hídrica (Carroll, 1989).

Diurese osmótica

A diurese osmótica é definida como a produção urinária aumentada em decorrência de uma taxa de excreção de soluto excessiva; o nível comumente aceito de excreção de soluto para a diurese osmótica é uma taxa cujo excesso é de 60 mOsm/h ou 1.440 mOsm/dia, em indivíduos adultos (Carroll, 1989). A osmolalidade da urina usualmente é maior do que a plasmática, porém, pode ser inferior quando coexiste com a diurese hídrica. Os solutos que normalmente são os responsáveis pela diurese osmótica incluem glicose, ureia, manitol, meio radiopaco e NaCl.

Diurese hídrica

A diurese hídrica caracteriza-se pela excreção de um grande volume de urina diluída. A poliúria é causada por uma menor reabsorção de água no ducto coletor. Os motivos que levam a essa redução são a falta de ADH (Vokes, 1988; Leggett, 1999; Siggaard, 1999; Rutishauser, 1999; Ito, 1997; Halperin, 2001) ou a ausência de resposta a esse hormônio (diabetes insípido nefrogênico). O diabetes insípido (DI) nefrogênico pode ser congênito ou adquirido. O DI nefrogênico congênito é causado por um defeito no receptor de ADH ou na aquaporina (Weir, 1992; Lam, 2000; Nielsen, 2002; Spruce, 1984; Canada, 2003; Marples, 1995).

A falta de ADH, que pode ser congênita ou adquirida (Levine, 1987; Vokes, 1988; Leggett, 1999; Siggaard, 1999; Rutishauser, 1999; Ito, 1997), é causada tanto por um defeito primário (diabetes insípido central), como por uma supressão fisiológica dada pela baixa osmolalidade sérica (polidipsia primária, diabetes insípido dipsogênico) (Levine, 1987; Rendell, 1978; Hariprasad, 1980). A deficiência de ADH pode ser branda, moderada ou severa. Quando a deficiência de ADH é parcial, a osmolalidade da urina pode aproximar-se bastante do normal. Em uma situação rara, o ADH é produzido, mas não é liberado em resposta à elevação da osmolalidade dos líquidos corporais em razão de um defeito envolvendo as células osmorreceptoras, como no caso de lesões hipotalâmicas (Leggett, 1999; Siggaard, 1999; Rutishauser, 1999; Ito, 1997). Em tais circunstâncias, o hormônio pode ser liberado em resposta à hipovolemia ou a fármacos. Durante a gravidez, a deficiência de ADH pode ser causada pela produção excessiva de vasopressina (DI gestacional) (Molitch, 1998). As causas da poliúria são listadas na Tabela 14.5.

A polidipsia primária é definida como o aumento da ingestão de água não determinado pela estimulação fisiológica da sede, ou seja, na ausência de hiperosmolalidade ou depleção volumétrica (Rendell, 1980; Hariprassad, 1980; Levine, 1987). A origem da polidipsia primária usualmente é psicogênica, daí o termo "polidipsia psicogênica" (Leadbetter, 1994). Em contraste, pacientes com diabetes insípido ou pacientes diabéticos com glicosúria severa apresentam a forma secundária da polidipsia. Esta é devida à estimulação da sede em resposta à hiperosmolalidade. Na polidipsia primária, o aumento da produção de urina decorre da supressão fisiológica da secreção de ADH e, por isso, os níveis séricos de Na^+ costumam estar abaixo do normal. Por outro lado, os níveis séricos de sódio em pacientes com DI central ou nefrogênica encontram-se acima da faixa normal. Ocasionalmente, o sódio sérico está francamente baixo na polidipsia primária severa, indicando que a capacidade de absorção de água do trato GI excede a capacidade renal normal de excretar água.

Tabela 14.5 Causas de poliúria por diurese hídrica

Falta de ADH
DI central: congênito ou adquirido (degeneração celular idiopática, tumores e granulomas, cirurgia, trauma, infarto e infecção da hipófise ou do hipotálamo)
DI dipsogênico (supressão por ingestão de água excessiva): psicogênico, doença cerebral orgânica, iatrogênico
DI gestacional: vasopressinase em excesso
Incapacidade renal de responder ao ADH (DI nefrogênico)
DI nefrogênico congênito: defeito no receptor de ADH, defeito na expressão de aquaporina
Insuficiência renal crônica
DI nefrogênico adquirido: toxicidade por lítio, toxicidade por demeclociclina, toxicidade por metoxiflurano, amiloidose, nefropatia de cadeia leve, hipercalcemia, hipocalemia, uropatia obstrutiva

Causas e patogênese da hiponatremia

A hiponatremia – o distúrbio de eletrólitos mais comum – é definida como uma redução da concentração plasmática de sódio a valores inferiores a 135 mEq/L. Em geral, a preocupação clínica surge quando a concentração atinge níveis inferiores a 130 mEq/L.

O termo "pseudo-hiponatremia", conforme discutido no Capítulo 8, aplica-se a uma falsa redução da concentração sérica de sódio em decorrência de um erro sistemático de quantificação. Sua causa mais comum, ainda que não amplamente conhecida, é a hemólise *in vitro*, uma causa bem conhecida de pseudo-hipercalemia (Oh, 2003). Uma vez que a lise celular não altera a osmolalidade plasmática, qualquer elevação dos níveis séricos de potássio deve corresponder a uma diminuição recíproca dos níveis séricos de sódio. Entretanto, a redução dos níveis de Na^+ no soro em decorrência da hemólise é algo maior do que o aumento dos níveis séricos de K^+, segundo um fator de 1,3, uma vez que a hemoglobina liberada dos eritrócitos provoca redução adicional dos níveis de Na^+, semelhante ao que ocorre na hiperproteinemia. O motivo para que esse erro ocorra é o fato de a hemoglobina ser principalmente uma proteína e exercer o mesmo efeito observado na hiperproteinemia para o deslocamento da água plasmática. Esse erro adicional é observado apenas quando as amostras são diluídas antes da quantificação da concentração sérica de sódio, exatamente como a pseudo-hiponatremia da hiperlipidemia e a hiperproteinemia. Outras causas de pseudo-hiponatremia incluem hiperlipidemia, hiperproteinemia e maior viscosidade plasmática (Weisberg, 1989; Milionis, 2002). Na pseudo-hiponatremia, o erro de quantificação resulta da diluição da amostra. Quantificações dos níveis séricos de sódio utilizando fotômetro de chama podem resultar nesse tipo de erro, visto que analisa amostras sempre diluídas. O mesmo erro também ocorre quando se utiliza o método de eletrodo íon-específico, caso a amostra seja diluída (método indireto). Na pseudo-hiponatremia, a osmolalidade plasmática, que costuma ser medida sem diluição, é normal. Contudo, uma baixa concentração plasmática de sódio diante da osmolalidade plasmática normal não necessariamente aponta pseudo-hiponatremia. Uma hiponatremia verdadeira pode ser acompanhada de uma osmolalidade plasmática normal por causa de hiperglicemia, azotemia ou presença de álcool. Nos estados hipergamaglobulinêmicos, como no mieloma múltiplo, o sódio sérico pode apresentar-se falsamente baixo em decorrência do deslocamento de água do soro pelas γ-globulinas. Contudo, a concentração de sódio também pode estar realmente baixa porque as alterações de carga catiônica das γ-globulinas deslocam o sódio para manter a neutralidade elétrica.

A hiponatremia induzida pela hiperglicemia aguda não é uma pseudo-hiponatremia, visto que a concentração de sódio no LEC é verdadeiramente baixa. Isso ocorre como resultado da movimentação de água a partir da célula, causada pela hiperglicemia. O sódio sérico sofre uma queda de 1,5 mEq/L para cada aumento de 100 mg/dL nos níveis séricos de glicose, como discutido anteriormente (Oh, 2003).

Os mecanismos imediatos responsáveis pela redução da concentração de sódio extracelular são: (1) movimentação da água a partir da célula, causada pelo acúmulo de solutos extracelulares, como glicose, e de

outros sais, exceto sais sódicos (Agraharkar, 1997; Akan, 1996; Agarwal, 1994); (2) retenção do excesso de água no corpo; (3) perda de sódio (Gowrishankar, 1998; Sonnenblick, 1993); e (4) movimentação do sódio para dentro das células. A resposta fisiológica apropriada à hipotonicidade consiste na supressão da liberação de ADH, a qual leva à rápida excreção do excesso de água e correção da hiponatremia. A persistência da hiponatremia, portanto, aponta a existência de uma falha nesse mecanismo compensatório. Na maioria dos casos, a hiponatremia é mantida porque o rim não consegue produzir diurese hídrica, porém há casos em que a causa é a ingestão de água em excesso, além dos limites de compensação renal normal. As razões que fazem com que o rim se torne incapaz de eliminar água são: (1) insuficiência renal, (2) diminuição da distribuição de filtrado glomerular ao néfron distal, e (3) presença inadequada de ADH.

O mecanismo por trás do comprometimento da excreção de água na insuficiência renal é óbvio e não necessita de mais explicações. A reduzida distribuição distal de filtrado resulta da baixa TFG e do aumento da reabsorção proximal de sal e água, sendo que tais estados são mais comumente causados pela depleção volumétrica.

Na maioria dos casos de hiponatremia, o principal motivo para a queda dos níveis séricos de sódio é a retenção anormal de água, que pode ser ingerida tanto sob a forma de água pura, como de líquidos hipotônicos. Entretanto, em certos cenários clínicos, é possível que ocorra retenção de água mesmo com a administração de líquidos isotônicos. Este último fenômeno é observado quando a urina eliminada contém sódio e potássio em concentrações que excedem a soma das concentrações séricas dos dois íons. Exemplificando, se a urina contém 140 mEq de Na^{+}/L e 100 mEq de K^{+}/L, a concentração combinada dos íons seria igual a 240 mEq/L, a qual é claramente hipertônica. A excreção de urina hipertônica em termos de concentração de sódio e potássio ocorre nos casos em que há aumento da excreção urinária de sódio na presença de ADH, como em indivíduos com SIADH (ver adiante), que recebem uma infusão de solução salina normal, ou em indivíduos tratados com diuréticos de tiazida. A excreção dessa urina causará hiponatremia, mesmo sem que haja uma retenção líquida de água. A perda de potássio exerce mesmo efeito sobre os níveis séricos de sódio que uma perda de sódio sérico. É preciso notar que o desenvolvimento de hiponatremia com excreção de urina hipertônica ocorre somente quando a hipertonicidade da urina é provocada pela eliminação aumentada de sódio ou de potássio. Por motivos óbvios, a urina hipertônica produzida pelo aumento da excreção de ureia não levaria à hiponatremia. O requerimento fisiológico para a excreção de urina hipertônica é a elevação dos níveis de ADH na presença de uma marcante diurese de sódio (Halperin, 2001). São exemplos clínicos: (a) um paciente que recebe uma grande quantidade de líquido isotônico no período pós-operatório imediato; (b) um paciente com a condição denominada secreção inadequada de hormônio antidiurético (SIADH, *Secretion of Inappropriate Antidiuretic Hormone*), tratado com líquidos isotônicos; e (c) um paciente que recebe diurético de tiazida (Gowrishankar, 1998; Sonnenblick, 1993). A diluição normal da urina requer a distribuição de quantidades adequadas de líquido ao segmento diluidor, bem como a reabsorção de soluto sem água nesse mesmo local. O aumento da tonicidade de líquidos corporais provoca a liberação de ADH, que permite a reabsorção da água no ducto coletor, ajudando a restaurar a tonicidade dos líquidos corporais. A resposta é considerada apropriada, quando o ADH é liberado em resposta à hipertonicidade de líquidos corporais. Contudo, a liberação do ADH em caso de hiponatremia também é considerada apropriada, caso o volume vascular efetivo esteja diminuído. O termo "secreção inadequada de hormônio antidiurético" (SIADH) é, portanto, reservado à designação da secreção de ADH que ocorre mesmo em caso de hiponatremia ou de um volume vascular efetivo normal ou aumentado. As causas da SIADH incluem tumores, doenças pulmonares (p. ex., tuberculose e pneumonia), doenças do sistema nervoso central, fármacos etc. (Tab. 14.6) (Bartter, 1967; Ajaelo, 1998; Fallon, 1998; Gold, 1983; Hensen, 1995; North, 2000; Arlt, 1997; Johnson, 1997; Argani, 1997; Ferlito, 1997; Friedmann, 1993). Em estados clínicos associados à redução do volume vascular efetivo, tais como insuficiência cardíaca congestiva e cirrose hepática, a hiponatremia é causada por uma combinação da diminuição da distribuição de líquidos ao néfron distal e aumento da secreção de ADH. A restrição de sal e o uso de diuréticos aumentam o grau de severidade da hiponatremia. No mixedema, pode haver secreção de ADH mesmo diante da hiponatremia (Macaron, 1978) e de estados de deficiência de glicocorticoides. Todavia, ainda não foi esclarecido se a secreção de ADH em tais condições é ou não apropriada. Finalmente, a forma branda de hiponatremia pode ser causada pela "redefinição dos centros reguladores da osmolalidade" em um nível de osmolalidade mais baixo que o usual. Em tais casos, a diluição da urina ocorre normalmente quando a osmolalidade plasmática é trazida para níveis bem inferiores ao nível zero. A reiniciação dos centros reguladores da osmolalidade é uma forma de SAIDH, visto que a secreção de ADH é inadequada nos níveis de hiponatremia, sem que haja evidências de redução do volume vascular. Pacientes com doenças incapacitantes crônicas, como a tuberculose pulmonar, muitas vezes manifestam esse fenômeno (Hill, 1990a). Algumas autoridades acreditam na existência de uma síndrome cerebral perdedora de sal, a qual é definida pela perda renal de sal causada pela liberação de substâncias humorais em resposta a distúrbios cerebrais, como a hemorragia subaracnóidea aguda. Considera-se que tais pacientes manifestam uma depleção volumétrica que resulta em hiponatremia. Entretanto, uma análise cuidadosa dos dados existentes não sustenta a existência dessa entidade, sendo que os casos classificados como síndrome cerebral perdedora de sal provavelmente representam casos de secreção de ADH inadequada (Oh, 1999).

Causas e patogênese da hipernatremia

A hipernatremia é definida como o aumento da concentração de sódio na água contida no plasma. Geralmente, é diagnosticada diante de níveis de sódio > 145 mEq/L. Enquanto a hiponatremia nem sempre é acompanhada de hipo-osmolalidade, a hipernatremia sempre está associada a um aumento da osmolalidade plasmática efetiva e, portanto, à redução do volume celular. Entretanto, na hipernatremia, o volume extracelular pode apresentar-se normal, diminuído ou aumentado.

A hipernatremia é causada pela perda de água, ganho de sódio ou ambos (Tab. 14.7). A perda de água pode ser devida ao aumento da perda ou redução da ingestão, enquanto o ganho de sódio decorre da ingestão aumentada ou da redução da excreção renal. É possível haver maior perda de água através dos rins (p. ex., no diabetes insípido ou na

Tabela14.6 Classificação da hiponatremia conforme a patogênese

Por perda de Na^{+}
Diuréticos da tiazida em presença de ADH
Infusão de solução salina em presença de ADH
Por retenção de água
Ingestão de água excessiva: polidipsia primária
Insuficiência renal avançada
Secreção de ADH adequada: estados em que há formação de edema (ICC, síndrome nefrítica, ascite). Estados em que há depleção de sal (perda GI, terapia diurética, deficiência de aldosterona, hipotireoidismo)
Secreção de ADH inadequada
Tumores: cânceres de pulmão, pâncreas, duodeno, ureter, bexiga, próstata, linfoma, timoma, mesotelioma, sarcoma de Ewing
Causas intratorácicas: pneumonia bacteriana e viral, tuberculose, abscesso pulmonar, aspergilose, asma, respiração com pressão positiva, pneumotórax, fibrose cística
Anomalias do SNC: encefalite, meningite, tumores e abscessos cerebrais, trauma na cabeça, hematoma subdural, acidentes cerebrovasculares, síndrome de Guillain-Barré, porfíria intermitente aguda, atrofia cerebral, esquizofrenia, hidrocéfalo, psicose aguda, esclerose múltipla, trombose da veia cavernosa, cerebrite lúpica, síndrome de Shy-Drager, febre maculosa das Montanhas Rochosas, delírio tremens, distúrbio convulsivo
Fármacos: arginina vasopressina e seus análogos, sulfonilureias, antidepressivos tricíclicos, clofibrato, carbamazepina, alcaloides da Vinca, ciclofosfamida, inibidores da recaptação seletiva de serotonina, opiáceos, fenotiazinas, haloperidol
Estresse cirúrgico e emocional
Emese
Causas endócrinas: deficiência de glicocorticoide e mixedema

Tabela14.7 Causas de hipernatremia

Ingestão de água reduzida
Distúrbio da sede decorrente de alteração do estado mental ou de defeito no centro da sede
Incapacidade de beber água
Falta de acesso à água
Perda de água aumentada (a ingestão de água deve estar comprometida)
Perda GI: vômitos, diarreia osmótica
Perda cutânea: sudorese e febre
Perda respiratória: hiperventilação e febre
Perda renal: DI, diurese osmótica
Aumento do conteúdo de sódio do organismo (a ingestão de água deve estar comprometida)
Ingestão aumentada
Salina hipertônica ou infusão de bicarbonato de sódio
Ingestão de água do mar
Retenção renal de sal; usualmente, em resposta a um déficit primário de água

diarreia osmótica), trato GI (p. ex., sucção gástrica ou diarreia osmótica) ou pele. A ingestão reduzida de água é mais comum nos pacientes em comatose ou naqueles que apresentam distúrbio no mecanismo regulador da sede. Causas menos frequentes de redução da ingestão de água são vômitos contínuos, falta de acesso à água e obstrução mecânica decorrente de certas condições, como um tumor esofágico. Em um indivíduo cuja percepção da sede é normal, que tem capacidade de beber água e que dispõe de fontes de água, o ganho de sódio não resulta da hipernatremia, visto que uma quantidade de água proporcional é retida para manter normal a osmolalidade de líquidos corporais. Enquanto a defesa fisiológica contra a hiponatremia consiste no aumento da excreção renal de água, a defesa fisiológica contra a hipernatremia é o aumento da ingestão de água em resposta à sede. Como esse é um mecanismo de defesa bastante efetivo e sensível contra a hipernatremia, é virtualmente impossível elevar os níveis séricos de sódio em mais que alguns mEq/L, se o mecanismo de ingestão de água permanecer intacto. Por isso, em um paciente com hipernatremia, sempre haverá motivos para a reduzida ingestão de água, tais como um defeito no mecanismo regulador da sede, incapacidade de beber água e indisponibilidade de água. O excesso de ganho de sódio que conduz à hipernatremia geralmente é iatrogênico (p. ex., a partir da infusão de uma solução salina hipertônica, invasão acidental da circulação materna durante um aborto com solução hipertônica, ou administração de bicarbonado de sódio hipertônico durante uma ressuscitação cardiopulmonar, ou tratamento de acidose lática). A redução da excreção renal de sódio levando a ganho de sódio e hipernatremia usualmente se dá em resposta à desidratação causada por um déficit de água primário. A depleção de água, devida a diabetes insípido, diurese osmótica ou ingestão de água insuficiente, conduz a uma retenção de sódio secundária por meio da ativação volume-sensível de mecanismos de retenção de sódio em indivíduos que continuam a ingerir ou que recebem sódio. Consequentemente, na hipernatremia crônica, o papel da retenção de sódio é mais importante do que o da perda de água (Carroll, 1989; Oh, 2003).

Examinando o *status* volumétrico do paciente, é possível determinar se a hipernatremia se deve à retenção de sódio ou à perda de água. Por exemplo, se um paciente com concentração sérica de sódio igual a 170 mEq/L não apresenta nenhuma evidência de desidratação, a hipernatremia não é inteiramente causada pela perda de água. Para aumentar a concentração sérica de sódio para 170 mEq/L com base apenas no déficit de água, o indivíduo teria que perder mais de 20% do conteúdo de água total do corpo.

Distúrbios acidobásicos

Sistema de tamponamento de bicarbonato e CO_2

Todos os tampões existentes no corpo encontram-se em equilíbrio com prótons (H^+) e, portanto, com o pH, conforme mostrado na equação a seguir (Ramsay, 1965):

$$pH = pK + \log A^-/HA \quad (14.29)$$

onde, A^- é uma base conjugada de um ácido HA.

Como HCO_3^- e CO_2 são os principais tampões do organismo, o pH é tipicamente expresso em função da proporção desses íons, conforme discutido no Capítulo 8, e mostrado pela equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = 6{,}1 + \log HCO_3^-/Pco_2 \times 0{,}03 \quad (14.30)$$

6,1 é o pK do sistema de tampões HCO_3^- e CO_2, e 0,03 é o coeficiente de solubilidade do CO_2.

A equação pode ser simplificada, combinando-se as duas constantes, pK e coeficiente de solubilidade de CO_2: $pH = 6{,}1 + \log HCO_3^-/PCO_2 \times 0{,}03 = 6{,}1 + \log 1/0{,}03 + \log HCO_3^-/PCO_2 = 7{,}62 + \log HCO_3^-/PCO_2$ (Carroll, 1989). Portanto:

$$pH = 7{,}62 - \log Pco_2/HCO_3^- = 7{,}62 + \log HCO_3^- - \log Pco_2 \quad (14.31)$$

Quando o H^+ é expresso em nM, em vez de um valor logarítmico negativo (pH), PCO_2 pode ser relacionada ao HCO_3^- em uma equação:

$$H\ (nM) = 24 \times Pco_2\ (mmHg)/HCO_3^-\ (mM) \quad (14.32)$$

A equação de Henderson-Hasselbalch indica que o pH depende da proporção HCO_3^-/PCO_2. O pH aumenta quando a proporção aumenta (alcalose), e diminui quando a proporção também diminui (acidose). A proporção pode ser aumentada por um aumento da concentração de HCO_3^- (alcalose metabólica) ou por uma diminuição da PCO_2 (alcalose respiratória). A proporção pode ser reduzida por uma diminuição da concentração de HCO_3^- (acidose metabólica) ou por um aumento da PCO_2 (acidose respiratória).

Definição de ácido e base

Definição de Arrhenius.

Quando dissolvidos em água, o ácido é uma substância que aumenta a concentração de íons hidrogênio (H^+) e a base é uma substância que aumenta a concentração de íons hidroxila (OH^-).

Definição de Bronsted-Lorry.

Em uma reação, o ácido é uma substância que doa próton, enquanto a base é uma substância que aceita o próton.

Definição de Lewis.

O ácido é uma molécula ou íon que aceita um par de elétrons para formar uma ligação covalente, e a base é uma molécula que doa um par de elétrons para uma ligação covalente.

A definição de Bronsted-Lorry é a mais amplamente aceita e, do ponto de vista clínico, a mais relevante.

Equilíbrio acidobásico corporal

A acidose metabólica ocorre devida ao aumento da produção líquida ou à redução da excreção líquida de ácidos. Como uma típica dieta moderna resulta na produção de tais substâncias, a função normal dos rins consiste em excretar ácidos para manter o equilíbrio acidobásico. Por esse motivo, a compreensão adequada dos distúrbios envolvendo esse equilíbrio requer o conhecimento das fontes geradoras e dos mecanismos de eliminação dos ácidos.

Produção líquida de ácidos

Em uma típica dieta americana, a produção diária de ácidos não voláteis é de cerca de 90 mEq/dia. Os principais ácidos produzidos são o ácido sulfúrico (cerca de 40 mEq/dia), originado no metabolismo de aminoácidos contendo enxofre (p. ex., metionina e cisteína), e os ácidos orgânicos de metabolismo incompleto (cerca de 50 mEq/dia) (Oh, 1992). A fonte de ácido sulfúrico são as proteínas, porém o conteúdo de enxofre varia bastante de acordo com o tipo de proteína ingerida (Lemann, 1959). Em geral, quando o conteúdo de enxofre é expresso em mEq/100 g de proteína, as proteínas de origem animal (p. ex., carne, peixe, leite e ovos) apresentam maiores quantidades de sulfato para uma determinada quantidade de proteína, em comparação às proteínas de origem vegetal (p. ex., cereais, feijão e castanhas). O conteúdo de enxofre é muito maior nas frutas, vegetais e batatas, porém, esses grupos alimentares não são fontes importantes de proteína nas quantidades usualmente ingeridas. O conteúdo total de

ácidos/álcalis depende não só do conteúdo de enxofre, mas também do conteúdo de álcalis dos alimentos, representado principalmente por sais de ácidos inorgânicos. Quando ambos os fatores são considerados, o leite apresenta um valor líquido de álcalis, enquanto a carne e o peixe apresentam um valor líquido de ácidos. Como um todo, frutas e vegetais contêm grande quantidade líquida de álcalis, uma vez que possuem grande conteúdo de ânions orgânicos. A quantidade total de ácidos orgânicos produzida normalmente é muito mais que 50 mEq/dia, porém, os ácidos orgânicos produzidos no corpo são metabolizados. Somente uma pequena parte é perdida na urina, sob a forma de ânions orgânicos que escapam ao metabolismo (p. ex., citrato) ou como produto metabólico final (p. ex., urato). Nas típicas dietas americanas, a quantidade de álcalis absorvidos a partir do trato GI é de cerca de 30 mEq/dia (Lemann, 1959; Oh, 1992). Assim, a produção líquida de ácidos diária pode ser estimada como:

$$\text{Produção líquida de ácidos} = (\text{sulfato urinário} + \text{ânions orgânicos urinários}) - (\text{quantidade líquida de álcalis absorvida a partir do trato GI}) \quad (14.33)$$

A determinação do conteúdo líquido de álcalis (ou ácidos) da dieta baseia-se nos destinos metabólicos das substâncias químicas presentes nos alimentos após a absorção pelo corpo, em vez de seus estados *in vitro*. Exemplificando, o ácido cítrico presente nos alimentos é considerado neutro por ser metabolizado a CO_2 e água no organismo. Por outro lado, o citrato de potássio é considerado álcali por ser convertido a bicarbonato de potássio após sofrer metabolização. De modo semelhante, o cloreto de arginina é um ácido, visto que o metabolismo da arginina no corpo deve resultar na formação de HCl (Lemann, 1959). Assim, o valor líquido de álcalis da dieta é determinado mais precisamente pela quantidade total de cátions não combustíveis (Na^+, K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+}) em relação à quantidade total de ânions não combustíveis (Cl^- e P):

$$\text{Conteúdo líquido de álcalis} = (Na^+ + K^+ + Ca^{2+} + Mg^{2+}) - (Cl^- + 1{,}8P) \quad (14.34)$$

Todas as unidades são expressas como mEq/dia, exceto para o P, que é expresso como mmol/dia multiplicado por 1,8, uma vez que a valência do fosfato depende do pH e sua valência média é igual a 1,8 em pH 7,4. Somente os seis íons mencionados são considerados na equação, uma vez que os demais íons não combustíveis são encontrados em quantidades negligíveis nos alimentos normais. O sulfato não é incluído por ser formado no corpo somente após o metabolismo de aminoácidos que contêm enxofre. A quantidade de álcalis absorvidos a partir dos alimentos não é a mesma quantidade neles contida, pois a absorção de íons divalentes não combustíveis (Ca^{2+}, Mg^{2+} e P) é incompleta. Portanto, tradicionalmente, a quantificação da absorção líquida de álcalis pelo trato GI requer análise do alimento e também das fezes, necessitando de uma coleta prolongada das fezes (Oh, 1992; Relman, 1961). A absorção líquida de álcalis GI é expressa como:

$$\text{Absorção líquida de álcalis GI} = \text{conteúdo líquido de álcalis do alimento} - \text{conteúdo líquido de álcalis das fezes} \quad (14.35)$$

A análise do alimento para determinação do conteúdo líquido de álcalis é embaraçosa e a análise das fezes é ainda pior. Tais análises tipicamente requerem a internação do paciente em uma unidade metabólica especial. Um novo método foi desenvolvido para quantificar a absorção líquida de álcalis pelo trato GI. Nesse método (Oh, 1989), são quantificados os eletrólitos presentes na urina, em vez dos eletrólitos contidos nos alimentos e nas fezes. O método baseia-se no princípio de que os íons não combustíveis absorvidos a partir do trato GI são eventualmente eliminados na urina e, por isso, as quantidades individuais dos eletrólitos nela excretados seriam iguais àquelas absorvidas pelo trato GI. Sendo assim:

$$\text{Absorção líquida de álcalis GI} = \text{urina}\,(Na^+ + K^+ + Ca^{2+} + Mg^{2+}) - \text{urina}\,(Cl^- + 1{,}8P) \quad (14.36)$$

A urina de 24 horas pode ser coletada de pacientes ambulatoriais (não internos), enquanto se alimentam de suas dietas usuais. A quantidade líquida de álcalis absorvida a partir de uma típica dieta americana de 30 mEq/dia, conforme estabelecido anteriormente, foi medida por meio da análise do conteúdo de eletrólitos da urina, empregando a fórmula (14-36) (Oh, 1992).

Excreção líquida de ácidos

A função renal mais importante na homeostasia acidobásica é a excreção de ácidos, que equivale à geração de álcalis. Os ácidos são excretados na forma de NH_4^+ e ácidos tituláveis. Outra função renal importante é a eliminação de HCO_3^-. Geralmente, a principal função da excreção renal de HCO_3^- consiste na prevenção da alcalose metabólica, porém, uma pequena quantidade de bicarbonato normalmente é eliminada na urina (cerca de 10 mEq/dia). Desse modo, a excreção líquida de ácidos, que equivale à produção renal líquida de álcalis, pode ser determinada subtraindo-se a excreção de HCO_3^- da excreção de ácidos (Lemann, 1959).

$$\text{Excreção líquida de ácidos} = \text{excreção de ácidos} - \text{excreção de } HCO_3^- = NH_4^+ + \text{ácidos tituláveis} - HCO_3^- \quad (14.37)$$

Normalmente, cerca de dois terços da excreção de ácidos ocorrem sob a forma de NH_4^+; contudo, a excreção de NH_4^+ pode aumentar até 10 vezes na acidose. A excreção de ácidos tituláveis costuma ser modesta, por causa da limitada quantidade de tampão que gera esses ácidos (i. e., fosfato, creatinina e urato), porém, também pode aumentar significativamente em certos estados doentios, como ocorre com o β-hidroxibutirato na cetoacidose diabética. A manutenção do equilíbrio acidobásico exige que a produção líquida seja igual à excreção líquida de ácidos. A acidose metabólica se desenvolve quando a produção líquida excede a excreção líquida de ácidos, enquanto a alcalose metabólica se instala quando a excreção líquida excede a produção líquida de ácidos.

Acidose metabólica

Classificação

Todas as acidoses metabólicas resultam da redução do conteúdo de bicarbonato do corpo, a não ser em duas situações: na acidose resultante da diluição dos líquidos corporais pela administração de uma grande quantidade de solução salina (acidose por diluição), e na acidose decorrente da movimentação de H^+ a partir da célula. A redução do conteúdo de bicarbonato pode ser causada por um aumento primário da produção de ácidos (*acidose extrarrenal*) ou por uma redução primária da excreção líquida de ácidos (*acidose renal*) (Tab. 14.8). Segundo essa classificação, a perda não renal de bicarbonato ou de álcali precursor é considerada um componente da produção de ácidos aumentada. Na acidose extrarrenal, a excreção líquida de ácidos é marcantemente aumentada, à medida que o rim compensa a acidose. Por outro lado, a excreção líquida de ácidos pode ser restaurada a níveis normais na acidose renal crônica, visto que a acidose estimula a excreção renal de H^+. Diante de um pH acídico, uma excreção líquida de ácidos normal sugere a existência de um defeito na excreção renal de ácidos e, portanto, acidose renal. Se a capacidade de excreção renal de ácidos está normal, deverá ser supernormal diante de um pH acídico.

Tabela 14.8 Causas de acidose metabólica de acordo com a excreção ácida líquida

Acidose renal: redução absoluta ou relativa da excreção ácida líquida
Acidose urêmica
Acidose tubular renal:
Acidose tubular renal distal (tipo I)
Acidose tubular renal proximal (tipo II)
Deficiência ou ausência de resposta à aldosterona (tipo IV)
Acidose extrarrenal: aumento da excreção ácida líquida
Perda GI de bicarbonato
Ingestão de ácidos ou de seus precursores: cloreto de amônio, súlfur
Ácidos precursores ou toxinas: salicilato, etilenoglicol, metanol, tolueno, acetaminofeno, paraldeído
Acidose orgânica
Acidose L-lática
Acidose D-lática
Cetoacidose

Acidose renal

A acidose renal é também classificada em dois tipos: acidose urêmica e acidose renal tubular (ATR). Na acidose urêmica, a reduzida excreção líquida de ácidos resulta da diminuição da massa dos néfrons (i. e., insuficiência renal), enquanto, na acidose renal tubular, é resultante de uma disfunção tubular específica. Como o desenvolvimento de acidose renal depende da taxa de excreção líquida renal de ácidos, bem como da taxa de produção líquida de ácidos, a qual varia conforme a dieta, o nível de insuficiência renal no qual a acidose urêmica se desenvolve depende da ingestão de ácidos dietéticos. Com a dieta usual, a acidose urêmica pode se desenvolver quando a TFG cai abaixo de 20% em relação ao normal (Bommer, 1996; Oh, 1992).

Existem três tipos de ATR: I, II e IV. A ATR de tipo I, também chamada ATR clássica ou distal, caracteriza-se pela incapacidade de reduzir o pH urinário para menos de 5,5. Uma vez que a acidificação da urina a um pH muito baixo ocorre no ducto coletor, é provável que este seja o sítio defeituoso e, como faz parte do néfron distal, justifica a denominação "ATR distal". Uma vez que a secreção de H+ no ducto coletor está um tanto comprometida também na ATR de tipo IV, alguns autores consideram ambos os tipos, I e IV, como formas de ATR distal. Além disso, a maioria das autoridades emprega os termos "ATR de tipo I" e "ATR distal" como sinônimos. A ATR de tipo I pode se desenvolver como distúrbio primário ou secundário à toxicidade farmacológica, doenças túbulo-intersticiais ou outras doenças renais (Rodriguez Soriano, 2002).

Na ATR de tipo II, também denominada ATR proximal, a reabsorção proximal de bicarbonato é defeituosa e caracteriza-se pela redução do limiar renal de bicarbonato. A urina pode não conter bicarbonato e estar normalmente acidificada, quando os níveis séricos desse íon se tornam baixos. A maioria dos pacientes com ATR proximal apresenta evidências de disfunção tubular proximal generalizada (i. e., síndrome de Fanconi), a qual se manifesta por meio de bicarbonatúria, aminoacidúria, glicosúria, fosfatúria e uricosúria. Desses sintomas, a glicosúria renal (glicosúria em presença de níveis sanguíneos de glicose normais) é o mais útil no diagnóstico da síndrome de Fanconi. A ATR de tipo II pode ser um distúrbio primário ou secundário a uma disfunção renal genética ou adquirida. A hipocalemia é um achado característico da ATR tanto de tipo I como de tipo II, porém, tende a ser mais grave no tipo I. A ATR de tipo III – termo utilizado para descrever uma forma híbrida dos tipos I e II – caiu em desuso.

A ATR de tipo IV é causada por uma deficiência de aldosterona ou pela ausência de resposta tubular renal a ela, resultando no comprometimento da secreção de K^+ nos túbulos renais e, assim, em hipercalemia. Embora a reduzida secreção de H^+ no ducto coletor exerça seu papel, o principal mecanismo envolvido na acidose da ATR de tipo IV é o comprometimento hipercalemia-induzido da produção de amônia no túbulo proximal. Esse tipo de ATR é bem mais comum que os demais, e sua causa mais frequente é o hipoaldosteronismo hiporreninêmico.

Acidose orgânica

Entre as causas externas de acidose, a superprodução de ácidos endógenos, especialmente do ácido lático e cetoácidos, constitui o mecanismo mais importante. Somente uma superprodução marcante, com um excesso de 1.000 mEq de ácido lático/dia, é capaz de causar a acidose, em razão da enorme capacidade de metabolização dos ácidos orgânicos. Quando tais ácidos reagem com o bicarbonato, há formação de ânions orgânicos e CO_2. A retenção de ânions orgânicos resulta em acidose metabólica com aumento do intervalo aniônico, conforme será definido posteriormente. A excreção renal desses ânions resulta em acidose hiperclorêmica com intervalo aniônico normal. Os ânions orgânicos que permanecem retidos são potencialmente íons bicarbonato e, quando são metabolizados, o bicarbonato é regenerado. Dessa forma, a perda de ânions orgânicos através da urina equivale à perda de bicarbonato. Se um ânion orgânico produzido permanece inteiramente retido, a subsequente metabolização resultará em uma recuperação incompleta dos álcalis perdidos. Caracteristicamente, na acidose orgânica, o início e recuperação são rápidos.

Acidose lática. O ácido lático é produzido a partir do ácido pirúvico, por ação da enzima LDH e do cofator NADH. O metabolismo do ácido lático requer sua conversão de volta ao ácido pirúvico, utilizando a mesma enzima e NAD^+ como cofator. Por esse motivo, a produção e a metabolização do ácido lático são reciprocamente influenciadas pelos mesmos fatores. O aumento da concentração de ácido pirúvico e da proporção $NADH/NAD^+$ aumentam a produção de ácido lático e, ao mesmo tempo, reduzem sua metabolização. Em consequência, na maioria dos casos de acidose lática, a produção de ácido lático está elevada e seu metabolismo encontra-se diminuído. Sem dúvida, a causa mais comum de acidose lática é a hipóxia tecidual (acidose lática de tipo A), a qual resulta do choque circulatório, anemia severa, insuficiência cardíaca severa, edema pulmonar agudo, parada cardíaca, envenenamento por monóxido de carbono, ataques, exercício muscular vigoroso etc. (Carroll, 1989; Oh, 2003; Arenas-Pinto, 2003). No alcoolismo agudo e na doença hepática severa, a acidose lática é causada pelo comprometimento da utilização do ácido lático (Luft, 2001). A acidose lática que ocorre na ausência de hipóxia tecidual é denominada acidose lática de tipo B (Tab. 14.9).

Acidose D-lática. A acidose lática (a menos que especificado) se refere à acidose causada pelo ácido D-lático, que é um isômero normalmente produzido no corpo humano, porque a enzima LDH, responsável pela produção do ácido lático, é também um L-isômero. O acúmulo de ácido D-lático, que decorre da produção do ácido pelas bactérias existentes no cólon, causa acidose D-lática. Esta é caracterizada por uma severa acidose e por manifestações neurológicas. Os pacientes afetados se comportam como se estivessem intoxicados por álcool, apesar dos níveis sanguíneos de etanol normais. O mecanismo envolvido na acidose D-lática consiste na superprodução de ácido D-lático pelas bactérias. O requisito necessário à superprodução desse ácido no cólon é a distribuição local de uma grande quantidade de substrato (i. e., síndrome da má absorção e proliferação colônica de bactérias formadoras de D-LDH (Uribarri, 1998; Oh, 1979). O tratamento da acidose D-lática consiste na administração oral de antibióticos.

Cetoacidose. Cetoácidos, ácido acetoacético e ácido β-hidrobutírico são produzidos no fígado a partir de ácidos graxos livres (AGL), sendo metabolizados em tecidos extra-hepáticos. A produção aumentada de cetoácidos é o principal mecanismo de acúmulo dessa substância, embora a diminuição de sua utilização pelo cérebro em pacientes em estado de coma seja capaz de acelerar o processo de acúmulo. O aumento da produção requer a disponibilidade de uma elevada concentração de AGL, bem como da conversão hepática a cetoácidos. A deficiência de insulina é responsável pelo aumento da mobilização de AGL a partir do tecido adiposo e, assim como o excesso de glucagon, estimula a conversão dos AGL a cetoácidos no fígado. A etapa inicial na produção de cetoácidos a partir dos AGL consiste na entrada destes na mitocôndria, de forma dependente de acilcarnitina transferase. Essa etapa é estimulada pelo excesso de glucagon. A etapa seguinte consiste no metabolismo dos AGL a acetil CoA e, finalmente, a cetoácidos. O desvio da acetil CoA para ressíntese de ácidos graxos requer a participação da enzima acetil CoA carboxilase, sendo que a inibição dessa enzima em decorrência de uma deficiência de insulina, excesso de glucagon e excesso de hormônios induzidos pelo estresse contribui ainda mais para aumentar a síntese de cetoácidos.

Tabela 14.9 Causas de acidose L-lática

Acidose lática de tipo A: por hipóxia tecidual
Choque circulatório
Hipoxemia severa
Insuficiência cardíaca
Anemia severa
Crise de grande mal
Acidose lática de tipo B: sem hipóxia tecidual
Alcoolismo agudo
Fármacos e toxinas (p. ex., fenformina, fármacos antirretrovirais)
Diabetes melito
Leucemia
Deficiência de tiamina ou riboflavina
Idiopática

O diagnóstico clínico da cetoacidose geralmente é feito pelo *Acetest*, que detecta acetoacetato (AA), mas não detecta β-hidroxibutirato (BB). Embora o BB seja o ácido predominante na acidose típica (a proporção BB/AA costuma ser de aproximadamente 2,5–3,0), a reação que ocorre no *Acetest* representa uma boa estimativa da concentração total de cetoácidos, enquanto a proporção estiver dentro da faixa usual. Quando a proporção BB/AA aumenta de modo acentuado, o *Acetest* pode se tornar negativo ou manter-se discretamente positivo, apesar da grande quantidade de cetoácidos total sob a forma de BB. Essa condição é denominada acidose por β-hidroxibutirato e é comumente observada na cetoacidose alcoólica (Delaney, 2000; Oh, 1977).

Hiato aniônico sérico (AG)

O hiato aniônico sérico é estimado como: $Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$ ou $(Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)$. Uma vez que a concentração sérica de potássio normal representa quantitativamente um componente mínimo dos eletrólitos presentes no soro, a flutuação dessa concentração exerce pouco efeito sobre o resultado geral. Sendo assim, a primeira equação, entre as duas citadas, é mais comumente utilizada para estimar o hiato aniônico. O valor normal é aproximadamente 12 mEq/L (8–16 mEq/L). Embora o termo "hiato aniônico" implique na existência de uma diferença entre as concentrações séricas de cátions e ânions, a concentração total de cátions é exatamente igual à concentração total de ânions. O hiato aniônico, $Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$, é igual a 12 mEq/L porque a concentração total de ânions não quantificados (i. e., de todos os ânions, com exceção do cloreto e do bicarbonato) vale cerca de 23 mEq/L, enquanto a de cátions não quantificados (i. e., de todos os cátions, com exceção do sódio) é igual a 11 mEq/L.

Considere-se uma concentração sérica total de cátions = Na^+ + cátions não quantificados (CNQ), e uma concentração sérica total de ânions = $Cl^- + HCO_3^-$ + ânions não quantificados (ANQ). Como a concentração sérica total de cátions = concentração sérica total de ânions, Na^+ + CNQ = $(Cl^- + HCO_3^-)$ + ANQ. Portanto, $Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$ = ANQ – CNQ. Sendo o hiato aniônico = $Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$, esse intervalo também será igual a ANQ – CNQ (Fig. 14.6) (Oh, 1977).

Está claro que uma alteração no hiato aniônico deve envolver alterações nos ANQ ou nos CNQ, ou um erro laboratorial envolvendo as quantificações de Na^+, Cl^- ou HCO_3^-. O hiato aniônico pode ser aumentado por ANQ ou reduzido por CNQ ou por um erro laboratorial, resultando em um falso aumento dos níveis séricos de Na^+ ou em uma falsa diminuição dos níveis séricos de Cl^- ou HCO_3^-. O AG pode ser reduzido por uma diminuição dos ANQ, por um aumento dos CNQ ou por um erro laboratorial, resultando em uma falsa diminuição dos níveis séricos de Na^+ ou em um falso aumento dos níveis séricos de Cl^- ou HCO_3^-. A equação também prevê que uma alteração em ANQ talvez não acarrete uma alteração do AG, caso o CNQ também sofra uma modificação na mesma extensão e direção.

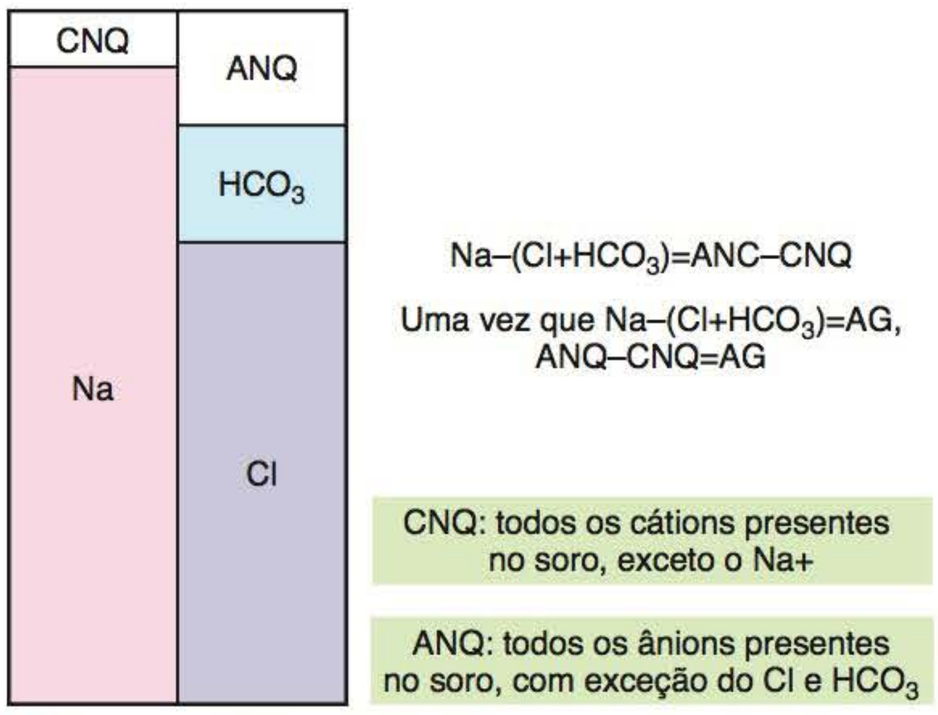


Figura 14.6 A anatomia do hiato aniônico (AG, *anion gap*). Quando os CNQ são definidos como todos os cátions presentes no soro, exceto o Na, e os ANQ são todos os ânions presentes no soro, com exceção do Cl ou do HCO_3, o AG sérico pode ser definido como ANQ - CNQ.

É mais frequente observar uma diminuição do AG decorrente de uma diminuição da concentração sérica de albumina, enquanto o aumento do AG se deve mais comumente ao acúmulo de ânions de ácidos, tais como sulfatos, lactato ou cetona. Embora o brometo seja um ânion não quantificado, a intoxicação causada por esse íon é acompanhada de um baixo AG sérico, visto que o brometo causa um falso aumento dos níveis séricos de Cl^-. Uma alteração na concentração sérica de Na^+ geralmente não provoca alteração no AG, pois os níveis séricos de Cl^- costumam mudar na mesma direção. Pelo mesmo motivo, as concentrações de HCO_3^- não podem ser utilizadas para prever uma alteração do AG. Exemplificando, quando a concentração sérica de HCO_3^- aumenta durante a alcalose metabólica, a concentração de Cl^- quase invariavelmente diminui reciprocamente, de modo a manter a neutralidade elétrica. Assim, o AG permanece o mesmo. Quando a concentração de HCO_3^- diminui, a concentração de Cl^- pode permanecer a mesma ou aumentar. Se houver reposição de HCO_3^- por outro ânion, a concentração de Cl^- não muda e, portanto, observa-se uma acidose normoclorêmica com AG aumentado. A acidose orgânica e a acidose urêmica constituem exemplos. Quando a concentração de bicarbonato diminui sem que nenhum outro ânion a reponha, a neutralidade elétrica é mantida pela elevação da concentração de Cl^-: assim, tem-se uma acidose hiperclorêmica com AG normal. A correta interpretação do hiato aniônico sérico requer o conhecimento da existência de condições que influenciam esse AG, mesmo que talvez não exerçam efeito direto sobre a acidose metabólica. Exemplificando, se um indivíduo com hipoalbuminemia desenvolve acidose lática, o AG poderá permanecer normal, pois os baixos níveis de albumina e o acúmulo de lactato exercem efeitos opostos sobre o AG.

Diagnóstico diferencial

Uma abordagem de diagnóstico diferencial da acidose metabólica consiste em calcular o AG sérico. Um AG sérico aumentado sugere acidose orgânica, acidose urêmica e acidose devida a certos tipos de toxina (Tab. 14.10). Um AG normal indica acidose tubular renal e acidose devida à perda de bicarbonato por diarreia. A maioria dos casos de acidose urêmica é acompanhada de um AG normal. O AG aumentado somente é observado na insuficiência renal aguda ou crônica avançada. Além disso, a maioria dos pacientes com cetoacidose passa por uma fase de acidose hiperclorêmica (AG normal) durante a recuperação.

Outra abordagem de diagnóstico diferencial da acidose metabólica consiste em classificar a acidose em renal ou extrarrenal. As três causas principais da acidose extrarrenal são acidose orgânica, perda de bicarbonato por diarreia e acidose devida a toxinas exógenas. A existência de uma acidose orgânica costuma ser evidenciada pelos achados clínicos (p. ex., evidência de hipóxia tecidual na acidose lática ou hiperglicemia e cetonemia na cetoacidose). A diarreia é a causa de acidose metabólica da qual se suspeita, antes de qualquer outra, pela história, sendo frequentemente confundida por ser difícil determinar seu grau de severidade. A quantificação do AG urinário é útil para determinar o grau de severidade da diarreia. Esse AG, que é medido

Tabela 14.10 Classificação da acidose metabólica por hiato aniônico

Acidose metabólica com hiato aniônico aumentado (acidose normoclorêmica)
Cetoacidose
Acidose L-lática
Acidose D-lática
Acidose β-hidroxibutírica
Acidose urêmica
Ingestão de toxinas: salicilato, metanol, etilenoglicol, tolueno, acetaminofeno
Acidose metabólica com hiato aniônico normal (acidose hiperclorêmica)
Acidose tubular renal
Acidose urêmica (precoce)
Acidose subsequente à alcalose respiratória
Perda intestinal de bicarbonato
Administração de ácido contendo cloreto: HCl, NH_4Cl
Cetoacidose durante a fase de recuperação

como $(Na^+ + K^+) - Cl^-$ da urina, mostra-se reduzido ou negativo em caso de diarreia grave. Um AG urinário baixo em caso de diarreia é explicado pela perda preferencial de $Na^+ + K^+$ com Cl^- em excesso, uma vez que o líquido da diarreia contém mais $Na^+ + K^+$ do que Cl^-, já que alguns cátions são equilibrados pelo bicarbonato. Em outros tipos de acidose metabólica, o AG urinário não sofre alteração, pois não há perda extrarrenal de nenhum eletrólito componente desse intervalo (Oh, 2002a). A história de ingestão de fármacos e o início agudo sugerem acidose por toxinas exógenas.

Excluída a possibilidade de acidose extrarrenal, a acidose renal é a única alternativa diagnóstica. Um dos dois tipos de acidose renal – a acidose urêmica – pode ser prontamente diagnosticada pela quantificação dos níveis séricos de creatinina e BUN. Se a acidose renal foi confirmada mas a acidose urêmica foi excluída, o diagnóstico deve ser acidose tubular renal. Entre os três tipos de ATR, o tipo IV é suspeito diante da existência de hipercalemia. A hipocalemia pode sugerir tanto o tipo I como o tipo II. Um pH urinário abaixo de 5,5 exclui a possibilidade de ATR de tipo I. Se o pH urinário estiver acima de 5,5, esse pH deve ser determinado após a administração oral de 40 mg de furosemida ou 10 mg de torsemida. Desses dois fármacos, a torsemida apresenta maior sensibilidade e especificidade. Se o pH urinário permanecer acima de 5,5, o provável diagnóstico é a ATR de tipo I. Evidências da síndrome de Fanconi (a melhor evidência é a glicosúria renal) sugerem ATR de tipo II.

Compensação da acidose metabólica

A compensação da acidose metabólica é alcançada por uma hiperventilação que resulta em diminuição da PCO_2. A compensação é moderadamente efetiva, sendo máxima dentro de 12 a 24 horas. A fórmula que prevê o esperado aumento da PCO_2 ($\varnothing PCO_2$) é:

$$\Delta Pco_2 = \Delta HCO_3^- \times 1{,}2 \pm 2 \quad (\Delta HCO_3^- \text{ é uma dada alteração na concentração sérica de } HCO_3^-) \qquad (14.38)$$

Alcalose metabólica

Causas e patogênese

A uma concentração sérica de bicarbonato normal, o bicarbonato filtrado no glomérulo é virtual e totalmente reabsorvido. À medida que a concentração sérica de bicarbonato aumenta para níveis acima do normal, a reabsorção de bicarbonato se torna incompleta e instala-se a bicarbonatúria. Um aumento discreto dos níveis séricos de bicarbonato para mais de 24 mEq/L provoca uma marcante bicarbonatúria. Portanto, quando o controle tubular renal do bicarbonato e a TFG estão normais, torna-se extremamente difícil manter a concentração plasmática de bicarbonato elevada, a menos que uma enorme quantidade de bicarbonato seja fornecida. Por isso, a manutenção da alcalose metabólica requer duas condições: um mecanismo para aumentar e outro para manter elevada a concentração plasmática de bicarbonato. A concentração de bicarbonato pode ser elevada pela administração de álcalis, perda gástrica de HCl por vômitos ou sucção nasogástrica, ou pela geração de bicarbonato a nível renal (Tab. 14.11). A concentração plasmática de bicarbonato é mantida elevada em caso de insuficiência renal avançada, ou quando o limiar renal de bicarbonato aumenta (Palmer, 1997). Esse limiar aumenta em decorrência de dois fenômenos: a depleção volumétrica e a depleção de K^+. A alcalose metabólica corrigida pela administração de líquidos contendo cloreto (p. ex., solução de NaCl ou KCl) é chamada alcalose metabólica cloreto-responsiva, sendo observada, por exemplo, na alcalose induzida por vômito. Pacientes com esse tipo de alcalose tipicamente apresentam depleção volumétrica (Oh, 2002b). Entretanto, nas condições que levam à formação de edema, a administração de Cl^- pode não proporcionar a melhora da alcalose metabólica, mesmo que o mecanismo do elevação do limiar renal de bicarbonato seja a depleção volumétrica. O hormônio da paratireoide (PTH) normalmente interfere na reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal e, assim, os níveis de bicarbonato nos túbulos renais tendem a aumentar no hipoparatireoidismo.

Compensação

A compensação da acidose metabólica é alcançada por uma hipoventilação que resulta em aumento da PCO_2. Em parte, como é inevitável que ocorra hipoxemia diante de uma hipoventilação na ausência de suplementação com oxigênio, essa compensação é a menos efetiva entre os quatro tipos de distúrbio acidobásico. A fórmula que prevê o esperado aumento da PCO_2 (ΔPCO_2) é:

$$\Delta Pco_2 = \Delta HCO_3^- \times 0{,}7 \pm 5 \quad (\Delta HCO_3^- \text{ é uma dada alteração na concentração sérica de } HCO_3^-) \qquad (14.39)$$

A compensação é máxima dentro de 12 a 24 horas. Observações mostraram que, seja qual for o grau de severidade da alcalose metabólica, a PCO_2 raramente excede 60 mmHg, a menos que coexista um distúrbio respiratório independente agravante.

Tabela 14.11 Mecanismos e causas do aumento da concentração de bicarbonato extracelular

Perda de HCl a partir do estômago (p. ex., sucção gástrica, vômitos)
Administração de bicarbonato ou de seus precursores (p. ex., lactato de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio)
Movimentação de H^+ para dentro da célula (p. ex., depleção de K^+)
Contração rápida do volume extracelular sem perda de bicarbonato (p. ex., alcalose de contração decorrente do uso de diuréticos de alça)
Aumento da excreção renal de ácidos (p. ex., terapia diurética, estado em que há elevação dos níveis de aldosterona, depleção de potássio, PCO_2 elevada, hipoparatireoidismo secundário)

Acidose respiratória

Causas e patogênese

As causas costumam ser bastante aparentes e incluem doenças envolvendo os pulmões (mais comuns), músculo respiratório, nervo respiratório, caixa torácica e vias aéreas, bem como supressão do centro respiratório em decorrência de derrame, fármacos (p. ex., fenobarbital) ou hipotireoidismo severo (Tab. 14.12).

Compensação

A resposta compensatória normal à acidose respiratória consiste em elevar a concentração de HCO_3^-, em uma tentativa de minimizar a redução do pH. Essa compensação se dá em duas etapas distintas: tamponamento tecidual de CO_2 e aumento da excreção renal do ácido.

Tamponamento tecidual

Esta fase da compensação é extremamente rápida, demorando apenas 1 segundo. Envolve a seguinte reação química:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3 \qquad (14.40)$$

$$H_2CO_3 + \text{tampão K} \longrightarrow \text{tampão H} + KHCO_3 \qquad (14.41)$$

O tampão K não é um tampão de HCO_3^- e a reação segue para a direita, em razão da elevação da PCO_2. Como o LEC possui poucos tampões que não sejam de HCO_3^-, a maioria desse tamponamento ocorre na própria célula. A elevada concentração de HCO_3^- celular provoca uma movimentação extracelular do HCO_3^- em troca de Cl^-. A relação entre um aumento da PCO_2 (ΔPCO_2) e a elevação dos níveis séricos de HCO_3^- (ΔHCO_3^-) na acidose respiratória aguda é mostrada a seguir:

$$\Delta HCO_3^- \text{ (mEq/L)} = \Delta Pco_2 \text{ (mmHg)} \times 0{,}07 \pm 1{,}5 \qquad (14.42)$$

Compensação renal

A compensação renal da acidose respiratória é tardia, porém, pro-

Tabela 14.12 Causas da acidose respiratória

Doenças pulmonares: doença pulmonar obstrutiva, doença pulmonar intersticial avançada, asma aguda
Deformação torácica ou obstrução das vias aéreas
Doenças envolvendo o músculo e o nervo respiratórios: miastenia grave, paralisia por hipocalemia, botulismo, esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Guillain-Barré
Depressão do centro respiratório: intoxicação por barbitúricos, derrame, hipotireoidismo

move um aumento bem maior da concentração de HCO_3^-. A elevada concentração de HCO_3^- é alcançada pelo aumento da excreção líquida de ácidos, principalmente na forma de NH_4^+. São necessários 5 dias para atingir a compensação máxima, porém, 90% do processo já está completo em 3 dias. A excreção aumentada de NH_4^+ é acompanhada de Cl^-. À medida que novos íons de HCO_3^- são retidos, o Cl^- é perdido. Esse fenômeno ocorre, portanto, quando a acidose respiratória é corrigida, havendo necessidade de que a excreção de HCO_3^- seja acompanhada da retenção de Cl^-, o que se torna possível somente quando há captação de Cl^-. Durante a fase de recuperação da acidose respiratória crônica, a restrição da ingestão de NaCl permite que os níveis de HCO_3^- permaneçam elevados.

A relação entre um aumento da PCO_2 (ΔPCO_2) e a elevação dos níveis de HCO_3^- (ΔHCO_3^-) na acidose respiratória maximamente compensada crônica é representada pela seguinte equação:

$$\Delta HCO_3^- \text{ (mEq/L)} = \Delta Pco_2 \text{ (mmHg)} \times 0{,}4 \pm 3 \qquad (14.43)$$

Alcalose respiratória

Causas e patogênese

Com exceção da alcalose induzida por respirador e da hiperventilação voluntária, a alcalose respiratória é sempre o resultado da estimulação do centro respiratório. As duas causas mais comuns de alcalose respiratória são a estimulação hipóxica do centro respiratório e a estimulação via receptores pulmonares, provocada por várias lesões pulmonares, tais como pneumonia, congestão pulmonar e embolismo pulmonar. Certos fármacos (p. ex., salicilato e progesterona) estimulam diretamente o centro respiratório (Saaresranta, 1999; Bayliss, 1992). A alcalose respiratória é comum na sepse por bactérias Gram-negativas, envolvendo um mecanismo que permanece desconhecido. O pH sanguíneo tende a ser extremamente elevado quando a alcalose respiratória é causada pela estimulação psicogênica do centro respiratório, pois essa condição costuma ser superaguda e, assim, não deixa tempo suficiente para a compensação. As causas da alcalose respiratória estão listadas na Tabela 14.13.

Compensação

Há dois tipos de compensação que abaixam os níveis plasmáticos de HCO_3^- e minimizam o aumento do pH sanguíneo na alcalose respiratória: o tamponamento tecidual e a compensação renal.

Tamponamento tecidual

A compensação por tamponamento tecidual de HCO_3^- é completada em apenas 1 segundo, através das seguintes reações químicas (Carroll, 1989):

$$\text{tampão H} + HCO_3^- \rightarrow H_2CO_3 + \text{tampão} \qquad (14.44)$$

$$H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O \qquad (14.45)$$

As reações ocorrem para a direita, pois o CO_2 é perdido por hiperventilação. A magnitude da redução do conteúdo de HCO_3^- depende da quantidade de tampões celulares ácidos (tampão H) que reagem com o HCO_3^-. À medida que o HCO_3^- é consumido na reação com o tampão, o HCO_3^- extracelular entra na célula em troca de Cl^- celular, que, por sua vez, sai da célula para o meio extracelular. Um mecanismo adicional de tamponamento tecidual permanece aumentando a produção de ácido lático e de outros ácidos orgânicos. A produção aumentada de ácido lático pode ser, em parte, explicada pelo efeito estimulatório do pH alcalino sobre a fosfofrutoquinase, uma enzima limitante do processo de glicólise. A magnitude da redução da concentração plasmática de HCO_3^- por meio da compensação aguda pode ser prevista pela seguinte equação:

$$\Delta HCO_3^- \text{ (mEq/L)} = \Delta Pco_2 \text{ (mmHg)} \times 0{,}2 \pm 2{,}5 \qquad (14.46)$$

(ΔHCO_3^- (mEq/L) é a redução esperada da concentração plasmática de HCO_3^- para uma dada redução da PCO_2 (ΔPCO_2) em mmHg.

Tabela 14.13 Causas da alcalose respiratória

Doenças pulmonares: qualquer patologia intrapulmonar, como pneumonia, fibrose pulmonar, congestão pulmonar, embolismo pulmonar
Hipoxemia
Lesões no SNC
Sepse por bactérias Gram-negativas
Fármacos: salicilato, progesterona

Compensação renal

A compensação renal da alcalose respiratória é alcançada pela redução da excreção líquida de ácidos (Carroll, 1989; Oh, 2003). Inicialmente, essa redução se dá por meio do aumento da excreção de HCO_3^-; posteriormente, passa a ser determinada por uma redução da excreção de NH_4^+ e de ácidos tituláveis. A equação a seguir permite prever a magnitude da redução da concentração plasmática de HCO_3^- em decorrência da compensação renal:

$$\Delta HCO_3^- \text{ (mEq/L)} = \Delta Pco_2 \text{ (mmHg)} \times 0{,}5 \pm 2{,}5 \qquad (14.47)$$

O ΔHCO_3^- (mEq/L) é a redução esperada da concentração plasmática de HCO_3^- para uma dada redução da PCO_2 (ΔPCO_2) em mmHg.

Entre os quatro tipos de distúrbios acidobásicos, a compensação é mais efetiva na alcalose respiratória. Após a compensação, há casos em que o pH retorna aos níveis da normalidade. O processo é finalizado dentro de 2 a 3 dias. Quando uma compensação completa é alcançada, é preciso procurar evidências de uma possível acidose metabólica agravante.

Distúrbios acidobásicos mistos

O termo distúrbio acidobásico misto se refere à condição clínica em que dois ou mais distúrbios acidobásicos primários coexistem. Em geral, manifestam-se como um distúrbio óbvio que parece estar associado a uma compensação inadequada (excessiva ou insuficiente). A "inadequação" do processo compensatório é resultado de um distúrbio primário isolado. Os níveis adequados de compensação para distúrbios acidobásicos primários foram determinados por meio da análise de dados provenientes de um grande número de pacientes, sendo expressos sob a forma de equações que são mostradas na Tabela 14.14. Quando os dois distúrbios influenciam o pH sanguíneo de modo oposto, o pH do sangue será determinado pelo distúrbio dominante. Caso os distúrbios anulem mutuamente seus efeitos, o pH sanguíneo pode permanecer normal. Diante da existência de qualquer grau de compensação para tais distúrbios, a PCO_2 e o HCO_3^- mudam na mesma direção, ou seja, ou ambos se elevam, ou ambos diminuem. Se a PCO_2 e o HCO_3^- mudam em direções opostas, de modo que a PCO_2 se eleva e o HCO_3^- diminui ou vice-versa, certamente se instalará um distúrbio acidobásico misto. A adequação da compensação pode ser determinada consultando-se a Tabela 14.14. É possível que a compensação seja excessiva, insuficiente ou adequada. Do mesmo modo, também pode ser elaborada uma ideia aproximada acerca da adequação da compensação, a partir do grau de desvio do pH, sem consultar a fórmula empregada na compensação normal.

Em geral, a compensação é mais efetiva na alcalose respiratória (o pH frequentemente é normalizado), seguida da acidose respiratória (o pH pode vir a se tornar normal) e, por último, da acidose metabólica. A compensação é menos efetiva na alcalose metabólica, provavelmente porque a hipoxemia – que é uma consequência inevitável da hipoventilação – estimula a ventilação. Se o paciente apresenta PCO_2 e HCO_3^- reduzidos e pH normal, o diagnóstico mais provável é uma alcalose respiratória compensada, em vez de uma acidose metabólica

Tabela 14.14 Fórmulas preditivas de compensação acidobásicas normal

Acidose metabólica: $\Delta PCO_2 = \Delta HCO_3^- \times 1{,}2 \pm 2$
Alcalose metabólica:* $\Delta PCO_2 = \Delta HCO_3^- \times 0{,}7 \pm 5$
Acidose respiratória aguda: $\Delta HCO_3^- = \Delta PCO_2 \times 0{,}07 \pm 1{,}5$
Acidose respiratória crônica: $\Delta HCO_3^- = \Delta PCO_2 \times 0{,}4 \pm 3$
Alcalose respiratória aguda: $\Delta HCO_3^- = \Delta PCO_2 \times 0{,}2 \pm 2{,}5$
Alcalose respiratória crônica: $\Delta HCO_3^- = \Delta PCO_2 \times 0{,}5 \pm 2{,}5$

ΔHCO_3^- e ΔPco_2 representam a diferença entre os valores normais e reais.

* Não importa o quanto a concentração sérica de HCO_3^- se eleve, a Pco_2 raramente sobe acima de 60 mmHg na alcalose metabólica.

compensada (Carroll, 1989; Oh, 2003).

Referências bibliográficas

Abdelhamid S, Lewicka S, Vecsei P, et al: A new subset of mineralocorticoid hypertension with excess of 21-deoxyaldosterone and Kelly's-M1 steroid: clinical and morphological findings. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:737–744.

Abdul-Karim RW, Harris JE, Beydoun SN, Cuenca VG: Endogenous creatinine clearance during pregnancy. II. Variations in normal standards based on methodology. Obstet Gynecol 1978; 51:431–432.

Agarwal RA: Am J Kidney Dis 2003; 41:752–759.

Agarwal R, Emmett M: The post-transurethral resection of prostate syndrome: therapeutic proposals. Am J Kidney Dis 1994; 24:108–111.

Agraharkar M, Agraharkar A: Posthysteroscopic hyponatremia: evidence for a multifactorial cause. Am J Kidney Dis 1997; 30:717–719.

Agre P, King LS, Yasui M, et al: Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. J Physiol 2002; 542:3–16.

Aguilera G, Rabadan-Diehl C: Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat. Exp Physiol 2000; 85:19S–26S.

Akan H, Sargin S, Turkseven F, et al: Comparison of three different irrigation fluids used in transurethral prostatectomy based on plasma volume expansion and metabolic effects. Br J Urol 1996; 78:224–227.

Ajaelo I, Koenig K, Snoey E: Severe hyponatremia and inappropriate antidiuretic hormone secretion following ecstasy use. Acad Emerg Med 1998; 5:839–840.

Arenas-Pinto A, Grant AD, Edwards S, Weller IV: Lactic acidosis in HIV infected patients: a systematic review of published cases. Sex Transm Infect 2003; 79:340–343.

Argani P, Erlandson RA, Rosai J: Thymic neuroblastoma in adults: report of three cases with special emphasis on its association with the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. Am J Clin Pathol 1997; 108:537–543.

Arlt W, Dahia PL, Callies F, et al: Ectopic ACTH production by a bronchial carcinoid tumour responsive to desmopressin in vivo and in vitro. Clin Endocrinol (Oxf) 1997; 47:623–627.

Aukland K, Reed RK: Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. Physiol Rev 1993; 73:1–78.

Barbour HM, Welch C: Development and evaluation of a kinetic diacetyl monoxime method for urine urea. Ann Clin Biochem 1992; 29:101–104.

Bartter FC, Schwartz WB: The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. Am J Med 1967; 42:790–799.

Bayliss DA, Millhorn DE: Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. J Appl Physiol 1992; 73:393–404.

Bellevue R, Dosik H, Spergel G, Gussoff BD: Pseudohyperkalemia and extreme leukocytosis. J Lab Clin Med 1975; 85:660–664.

Biggi A, Vigletti A, Farinelli MC, et al: Estimation of glomerular filtration rate using chromium-51 ethylene diamine tetra-acetic acid and technetium-99m diethylene triamine penta-acetic acid. Eur J Nuc Med 1995; 22:532–536.

Bock HA, Hermle M, Brunner FP, Thiel G: Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. Kidney Int 1992; 41:275–280.

Bommer J, Keller C, Gehlen F, Hergesell O: Acidosis in uremic patients. Clin Nephrol 1996; 46:280–285.

Bourque CW, Oliet SH: Osmoreceptors in the central nervous system. Annu Rev Physiol 1997; 59:601–619.

Bradberry SM, Vale JA: Disturbances of potassium homeostasis in poisoning. J Toxicol Clin Toxicol 1995; 33:295–310.

Brautbar N, Levi J, Rosler A, et al: Familial hyperkalemia, hypertension, and hyporeninemia with normal aldosterone levels. A tubular defect in potassium handling. Arch Intern Med 1978; 138:607–610.

Brochner-Mortensen J, Giese J, Rossing N: Renal inulin clearance versus total plasma clearance of 51Cr-EDTA. Scand J Clin Lab Invest 1969; 23;301–305.

Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. Am J Physiol 1995; 268:F983–F989

Burton RF: The protein content of extracellular fluids and its relevance to the study of ionic regulation: net charge and colloid osmotic pressure. Comp Biochem Physiol A 1988; 90:11–16.

Canada TW, Weavind LM, Augustin KM: Possible liposomal amphotericin B-induced nephrogenic diabetes insipidus. Ann Pharmacother 2003; 37:70–73.

Cannon SC: An expanding view for the molecular basis of familial periodic paralysis. Neuromuscul Disord 2002; 12:533–543.

Carroll HJ, Oh MS: Water, Electrolyte, and Acid–Base Metabolism. Philadelphia, Lippincott Co., 1989.

Carvounis CP, Nisar S, Guro-Razuman S: Significance of the fractional excretion of urea in the differential diagnosis of acute renal failure. Kidney Int 2002; 62:2223–2229.

Christensen AB, Groth S: Determination of 99mTc-DTPA clearance by a single plasma sample method. Clinical Physiol 1986; 6:579–588.

Clemessy JL, Favier C, Borron SW, et al: Hypokalaemia related to acute chloroquine ingestion. Lancet 1995; 346:877–880.

Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976; 16:31–41.

Cooperman LH: Succinylcholine-induced hyperkalemia in neuromuscular disease. JAMA 1970; 213:1867–1871.

Counahan R, Chantler C, Ghazali S, et al: Estimation of glomerular filtration rate from plasma creatinine concentration in children. Arch Dis Child 1976; 51:875–878.

Delaney MF, Zisman A, Kettyle WM: Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar nonketotic syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am 2000; 29:683–705.

Delaunay J, Stewart G, Iolascon A: Hereditary dehydrated and overhydrated stomatocytosis: recent advances. Curr Opin Hematol 1999; 6:110–114.

Delphin E, Jackson D, Rothstein P: Use of succinylcholine during elective pediatric anesthesia should be reevaluated. Anesth Analg 1987; 66:1190–1192.

de Rouffignac C, Jamison RL: (eds): Kidney Int 1987; 31:501–672.

Don BR, Sebastian A, Cheitlin M, et al: Pseudohyperkalemia caused by fist clenching during phlebotomy. N Engl J Med 1990; 322:1290–1292.

Emser W: Hypermagnesemic periodic paralysis: treatment with digitalis and lithium carbonate. Arch Neurol 1982; 39:727–730.

Fallon JK, Kicman AT, Hutt AJ, et al: Low-dose MDMA ('ecstasy') induces vasopressin secretion. Lancet 1998; 351:1784.

Fawcett JK, Scott JE: A rapid and precise method for the determination of urea. J Clin Pathol 1960; 13:156–159.

Feraille E, Carranza ML, Gonin S, et al: Insulin-induced stimulation of Na+,K(+)-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. Mol Biol Cell 1999; 10:2847–2859.

Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO: Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion associated with head neck cancers: review of the literature. Ann Otol Rhinol Laryngol 1997; 106:878–883.

Finer G, Shalev H, Birk OS, et al: Transient neonatal hyperkalemia in the antenatal (ROMK defective) Bartter syndrome. J Pediatr 2003; 142:318–323.

Fleming JS, Wilkinson J, Oliver RM, et al: Comparison of radionuclide estimation of glomerular filtration rate using technetium 99m diethylenetriaminepentaacetic acid and chromium 51 ethylenediaminetetraacetic acid. Eur J Nuc Med 1991; 18:391–395.

Fossati P, Ponti M, Passoni G, et al: A step forward in enzymatic measurement of creatinine. Clin Chem 1994; 40:130–137.

Friedmann AS, Memoli VA, North WG: Vasopressin and oxytocin production by non-neuroendocrine lung carcinomas: an apparent low incidence of gene expression. Cancer Lett 1993 75:79–85.

Gaspari F, Perico N, Remuzzi G: Measurement of glomerular filtration rate. Kidney Int 1997; 63(Suppl):S151–S154.

Gennari FJ: Current concepts. Serum osmolality. Uses and limitations. N Engl J Med 1984; 310:102–105.

Giebisch G: Renal potassium transport: mechanisms and regulation. Am J Physiol 1998; 274:F817–F833.

Giebisch GH: A trail of research on potassium. Kidney Int 2002; 62:1498–1512.

Goguen JM, Halperin ML: Can insulin administration cause an acute metabolic acidosis in vivo? An experimental study in dogs. Diabetologia 1993; 36:813–816.

Gold PW, Robertson GL, Ballenger JC, et al: Carbamazepine diminishes the sensitivity of the plasma arginine vasopressin response to osmotic stimulation. J Clin Endocrinol Metab 1983; 57:952–957.

Goldman DE: J Gen Phyiol 1943; 27:37–60.

Goodman BE: Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transporters. Adv Physiol Educ 2002; 26:146–57.

Gowrishankar M, Lin SH, Mallie JP, et al: Acute hyponatremia in the perioperative period: insights into its pathophysiology and recommendations for management. Clin Nephrol 1998; 50:352–360.

Greger R, Schlatter E, Lang F: Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. Pflugers Arch 1983; 396:308–314.

Gronert GA, Theye RA: Pathophysiology of hyperkalemia induced by succinylcholine. Anesthesiol 1975; 43:89–99.

Hall JE: The renin-angiotensin system: renal actions and blood pressure regulation. Compr Ther 1991; 17:8–17.

Halperin ML, Kamel KS: Potassium. Lancet 1998; 352:135–140.

Halperin ML, Bichet DG, Oh MS: Integrative physiology of basal water permeability in the distal nephron: implications for the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. Clin Nephrol 2001; 56:339–345.

Hariprasad MK, Eisinger RP, Nadler IM, et al: Hyponatremia in psychogenic polydipsia. Arch Intern Med 1980; 140:1639–1642.

Hayward LJ, Sandoval GM, Cannon SC: Defective slow inactivation of sodium channels contributes to familial periodic paralysis. Neurology 1999; 52:1447–1453.

Heilmann P, Heide J, Hundertmark S, Schoneshofer M: Administration of glycyrrhetinic acid: significant correlation between serum levels and the cortisol/cortisone-ratio in serum and urine. Exp Clin Endocrinol Diab 1999; 107:370–378.

Higashi I, Morizono T: Artifactually low serum urea caused by antibodies to bacteria urease. Clin Chem 2000; 46:297–299.

Hilbrands LB, Artz MA, Wetzels JF, Koene RA: Cimetidine improves the reliability of creatinine as a marker of glomerular filtration. Kidney Int 1991; 40:1171–1176.

Hill AR, Uribarri J, Mann J, Berl T: Altered water metabolism in tuberculosis: role of vasopressin. Am J Med 1990a; 88:357–364.

Hill LL: Body composition, normal electrolyte concentrations, and the maintenance of normal volume, tonicity, and acid–base metabolism. Pediatr Clin North Am 1990b; 37:241–256.

Hensen J, Haenelt M, Gross P: Water retention after oral chlorpropamide is associated with an increase in renal papillary arginine vasopressin receptors. Eur J Endocrinol 1995; 132;459–464.

Hogg RJ, Kokko JP: Comparison between the electrical potential profile and the chloride gradients in the thin limbs of Henle's loop in rats. Kidney Int 1978; 14:428.

Hogg RJ, Kokko JP: Urine concentrating and diluting mechanisms in mammalian kidneys. *In* Brenner, BM, Rector, FC (eds): The Kidney. Philadelphia, WB Saunders Co, 1986, Ch. 8, pp 251–279.

Hollenberg NK: Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system. Hypertension 2000; 35:150–154.

Ibata Y, Okamura H, Tanaka M, et al: Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. Front Neuroendocrinol 1999; 20:241–268.

Iolascon A, Stewart GW, Ajetunmobi JF, et al: Familial pseudohyperkalemia maps to the same locus as dehydrated hereditary stomatocytosis (hereditary xerocytosis). Blood 1999; 93:3120–3123.

Ito M, Jameson JL, Ito M: Molecular basis of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. Cellular toxicity caused by the accumulation of

mutant vasopressin precursors within the endoplasmic reticulum. J Clin Invest 1997 15(99):1897–1905.
Johnson BE, Chute JP, Rushin J, et al: A prospective study of patients with lung cancer and hyponatremia of malignancy. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156:1669–1678.
Jordan P, Brookes JG, Nikolic G, Le Couteur DG: Hydroxychloroquine overdose: toxicokinetics and management. J Toxicol Clin Toxicol 1999; 37:861–864.
Jurkat-Rott K, Mitrovic N, Hang C, et al: Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current. Proc Natl Acad Sci USA 2000 15(97):9549–9554.
Kessler A, Siekmann L: Measurement of urea in human serum by isotope dilution mass spectrometry: a reference procedure. Clin Chem 1999; 45:1523–1529.
Kim HJ, Chung CH, Moon CO, et al: Determinants of magnitude of pseudohyperkalemia in thrombocytosis. Korean J Intern Med 1990; 5:97–100.
Knepper MA: Urea transport in isolated thick ascending limbs and collecting ducts from rats. Am J Physiol 1983; 245:F634–F639.
Kroll MH, Hagengruber C, Elin RJ: Reaction of picrate with creatinine and cepha antibiotics. Clin Chem 1984; 30:1664–1666.
Krozowski Z, Li KX, Koyama K, et al: The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. J Steroid Biochem Mol Biol 1999; 69:391–401.
Kruse JA, Cadnapaphornchai P: The serum osmole gap. Crit Care 1994; 9(3):185–197.
Krutzen E, Back SE: Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: a method for the assessment of glomerular filtration rate. J Lab Clin Med 1984; 104:955–961.
Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, et al: Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. Am J Physiol 1999; 277:F643–F649.
Lam GS, Asplin JR, Halperin ML: Does a high concentration of calcium in the urine cause an important renal concentrating defect in human subjects? Clin Sci (Lond) 2000; 98:313–319.
Larach MG, Rosenberg H, Gronert GA, Allen GC: Hyperkalemic cardiac arrest during anesthesia in infants and children with occult myopathies. Clin Pediatr 1997; 36:9–16.
Laragh JH: Renin-angiotensin-aldosterone system for blood pressure and electrolyte homeostasis and its involvement in hypertension, in congestive heart failure and in associated cardiovascular damage (myocardial infarction and stroke). J Hum Hypertens 1995; 9;385–390.
Laterza OF, Price CP, Scott MG: Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? Clin Chem 2002; 48:699–707.
Leadbetter RA, Shutty MS Jr: Differential effects of neuroleptic and clozapine on polydipsia and intermittent hyponatremia. J Clin Psych 1994; 55(Suppl B):110–113.
Leger F, Bouissou F, Coulais Y, et al: Estimation of glomerular filtration rate in children. Pediatr Nephrol 2002; 17:903–907.
Leggett DA, Hill PT, Anderson RJ: 'Stalkitis' in a pregnant 32-year-old woman: a rare cause of diabetes insipidus. Australas Radiol 1999; 43:104–107.
Lemann J Jr, Relman AS: The relation of sulfur metabolism to acid-base balance and electrolyte excretion: the effects of DL-methionine in normal man. J Clin Invest 1959; 38:2215–2223.
Lespinas F, Dupuy G, Revol F, Aubry C: Enzymic urea assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. Clin Chem 1989; 35:654–658.
Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999; 130:461–470.
Levey AS, Greene T, Tusek JW, et al: A simplified equation to predict GFR from serum creatinine (Abstract). J Am Soc Nephrol 2000; 11:A0828.
Levine S, McManus BM, Blackbourne BD, Roberts WC: Fatal water intoxication, schizophrenia, and diuretic therapy for systemic hypertension. Am J Med 1987; 82:153–155.
Litchfield WR, New MI, Coolidge C, et al: Evaluation of the dexamethasone suppression test for the diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism. J Clin Endocrinol Metabol 1997; 82:3570–3573.
Luft FC: Lactic acidosis update for critical care clinicians. J Am Soc Nephrol 2001; 12(Suppl 17):S15–S19.
Lyman JL: Blood urea nitrogen and creatinine. Emerg Med Clin North Am 1986; 4:223–233.
Ma XM, Aguilera G: Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. Endocrinol 1999; 140:5642–5650.
Macaron C, Famuyiwa O: Hyponatremia of hypothyroidism. Appropriate suppression of antidiuretic hormone levels. Arch Intern Med 1978; 138:820–822.
McIvor ME, Cummings CC: Sodium fluoride produces a K^+ efflux by increasing intracellular Ca^{2+} through Na^+–Ca^{2+} exchange. Toxicol Lett 1987; 38:169–176.
McIvor ME, Cummings CC, Mower MM, et al: The manipulation of potassium efflux during fluoride intoxication: implications for therapy. Toxicol 1985; 37:233–239.
McKinley MJ, Allen AM, Burns P, et al: Interaction of circulating hormones with the brain: the roles of the subfornical organ and the organum vasculosum of the lamina terminalis. Clin Exp Pharmacol Physiol 1998; 25(Suppl):S61–S67.
Marples D, Christensen S, Christensen EI, et al: Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. J Clin Invest 1995; 95:1838–1845.
Massey D: Commentary: clinical diagnostic use of cystatin C. J Clin Lab Anal 2004; 18:55–60.
Matsumura M, Nakashima A, Tofuku Y: Electrolyte disorders following massive insulin overdose in a patient with type 2 diabetes. Intern Med 2000; 39:55–57.
Meister B, Aperia A: Molecular mechanisms involved in catecholamine regulation of sodium transport. Semin Nephrol 1993; 13: 41–49.
Milionis HJ, Liamis GL, Elisaf MS: The hyponatremic patient: a systematic approach to laboratory diagnosis. CMAJ 2002; 166:1056–1062.
Miyamura N, Matsumoto K, Taguchi T, et al: Atypical Bartter syndrome with sensorineural deafness with G47R mutation of the beta-subunit for ClC-Ka and ClC-Kb chloride channels, barttin. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:781–786.
Molitch ME: Pituitary diseases in pregnancy. Semin Perinatol 1998; 22:457–470.
Molitch ME, Rodman E, Hirsch CA, Dubinsky E: Spurious serum creatinine elevations in ketoacidosis. Ann Intern Med 1980; 93:280–281.
Mouri T, Itoi K, Takahashi K, et al: Colocalization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. Neuroendocrinol 1993; 57:34–39.
Natelson S, Scott ML, Beffa C: A rapid method for the estimation of urea in biologic fluids. Am J Clin Pathol 1951; 21:275–281.
Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, et al: Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. Physiol Rev 2002; 82:205–244.
North WG: Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. Exp Physiol 2000; 85;27S–40S.
Ogawa T, Kamikubo K: Hypokalemic periodic paralysis associated with hypophosphatemia in a patient with hyperinsulinemia. Am J Med Sci 1999; 318:69–72.
Oh MS: A new method for estimating G-I absorption of alkali. Kidney Int 1989; 36:915–917.
Oh MS: Does serum creatinine rise faster in rhabdomyolysis? Nephron 1993; 63:255–257.
Oh MS: Acid–Base Electrolytes. New York, Ohco, LLC, 2003.
Este livro-texto escrito por um único autor contém grande quantidade de informações sobre todos os aspectos dos distúrbios de eletrólitos e do equilíbrio acidobásico, incluindo informação sobre fisiologia básica do rim, discutida em profundidade, bem como o papel do rim no equilíbrio do líquidos corporais.
Oh MS, Carroll HJ: The anion gap. N Engl J Med 1977; 297:814–817.
Oh MS, Carroll HJ: Whole body acid-base balance. Contrb Nephrol 1992; 100:89–104.
Este artigo apresenta uma extensa discussão sobre todos os aspectos do equilíbrio acidobásico.
Oh MS, Carroll HJ: *In* Arieff AI, DeFronzo RA (eds): Fluid, Electrolyte, and Acid–base Disorders, 2nd ed. New York, Churchill Livingstone, 1995.
Oh MS, Carroll HJ: Cerebral salt-wasting syndrome. We need better proof of its existence. Nephron 1999; 82:110–114.
Oh MS, Carroll HJ: Value and determinants of urine anion gap. Nephron 2002a; 90:252–255.
Oh MS, Carroll HJ: Mechanism of chloride deficit in the maintenance of metabolic alkalosis. Nephron 2002b; 91:379–382.
Oh MS, Carroll HJ, Clemmons JE, et al: A mechanism for hyporeninemic hypoaldosteronism in chronic renal disease. Metabolism 1974; 23:1157–1166.
Oh MS, Halperin ML: The mechanism of urine concentration in the inner medulla. Nephron 1997; 75:384–393.
Oh MS, Phelps KR, Traube M, et al: D-lactic acidosis in a man with the short-bowel syndrome. N Engl J Med 1979; 301:249–252.
Olsson K: Central control of vasopressin release and thirst. Acta Paediatr Scand 1983; 305(Suppl):36–39.
Pallone TL, Turner MR, Edwards A, Jamison RL: Countercurrent exchange in the renal medulla. Am J Physiol 2003; 284:R1153–R1175.
Palmer BF, Alpern RJ: Metabolic alkalosis. J Am Soc Nephrol 1997; 8:1462–1469.
Passey RB, Gillum RL, Fuller JB, et al: Evaluation of three methods for the measurement of urea nitrogen in serum as used on six instruments. Am J Clin Pathol 1980; 73:362–368.
Perazella MA, Biswas P: Acute hyperkalemia associated with intravenous epsilon-aminocaproic acid therapy. Am J Kidney Dis 1999; 33:782–785.
Perez GO, Oster JR, Vaamonde CA: Serum potassium concentration in acidemic states. Nephron 1981; 27:233–243.
Phelps KR, Lieberman RL, Oh MS, Carroll HJ: Pathophysiology of the syndrome of hyporeninemic hypoaldosteronism. Metabol 1980b; 29:186–199.
Phelps KR, Oh MS, Carroll HJ: Heparin-induced hyperkalemia: report of a case. Nephron 1980a; 25:254–258.
Pierrat A, Gravier E, Saunders C, et al: Predicting GFR in children and adults: a comparison of the Cockcroft-Gault, Schwartz, and modification of diet in renal disease formulas. Kidney Int 2003; 64:1425–1436.
Pradella M, Dorizzi RM, Rigolin F: Relative density of urine: methods and clinical significance. Crit Rev Clin Lab Sci 1988; 26:195–242.
Price CP, Finney H: Developments in the assessment of glomerular filtration rate. Clin Chim Acta 2000; 297:55–66.
Rakhmanina NY, Kearns GL, Farrar HC 3rd: Hypokalemia in an asthmatic child from abuse of albuterol metered dose inhaler. Pediatr Emerg Care 1998; 14:145–147.
Ramsay AG: Clinical application of the Henderson-Hasselbalch equation. Appl Ther 1965; 7:730–736.
Reed RK, Laurent UB: Turnover of hyaluronan in the microcirculation. Am Rev Respir Dis 1992; 146:S37–S39.
Relman AS, Lennon EJ, Lemann J Jr: Endogenous production of fixed acid and the measurement of the net balance of acid in normal subjects. J Clin Invest 1961; 40:1621–1630.
Rendell M, McGrane D, Cuesta M: Fatal compulsive water drinking. JAMA 1978; 240:2557–2559.
Risch L, Herklotz R, Blumberg A, et al: Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. Clin Chem 2001; 47:2055–2059.
Rodriguez Soriano J: Renal tubular acidosis: the clinical entity. J Am Soc Nephrol 2002; 13:2160–2170.
Russel C: J Nucl Med 1985; 25:1243–1247.
Rutishauser J, Kopp P, Gaskill MB, et al: A novel mutation (R97C) in the neurophysin moiety of prepro-vasopressin-neurophysin II associated with autosomal-dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. Mol Genet Metab 1999; 67:89–92.
Saaresranta T, Polo-Kantola P, Irjala K, et al: Respiratory insufficiency in postmenopausal women: sustained improvement of gas exchange with short-term medroxyprogesterone acetate. Chest 1999; 115:1581–

1587.
Sands JM, Kokko JP: Current concepts of the countercurrent multiplication system. Kidney Int 1996; 57(Suppl):S93–S99.
Schmidt-Nielsen B: Excretion in mammals: role of the renal pelvis in the modification of the urinary concentration and composition. Fed Proc 1977; 36:2493–2503.
Schoenmakers CH, Kuller T, Lindemans J, Blijenberg BG: Automated enzymatic methods for creatinine measurement with special attention to bilirubin interference. Eur J Clin Chem 1993; 31:861–868.
Schrier RW, Berl T, Anderson RJ: Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. Am J Physiol 1979; 236:F321–F332.
Schultheis PJ, Lorenz JN, Meneton P, et al: Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na^+-Cl^- cotransporter of the distal convoluted tubule. J Biol Chem 1998 273:29150–29515.
Schwartz GJ, Haycock GB, Edelman CM, Spitzer A: A simple measure of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. Pediatrics 1976; 58:259–263.
Sebastian A, Rector FC Jr, Schambelan M: Mineralocorticoid-resistant renal hyperkalemia without salt wasting (type II pseudohypoaldosteronism): role of increased renal chloride reabsorption. Kidney Int 1981; 19:716–727.
Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, et al: Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. J Pediatr 1985; 107:694–701.
Siggaard C, Rittig S, Corydon TJ, et al: Clinical and molecular evidence of abnormal processing and trafficking of the vasopressin preprohormone in a large kindred with familial neurohypophyseal diabetes insipidus due to a signal peptide mutation. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:2933–2934.
Sjoland JA, Marcher KS: Creatinine concentration measurement in glucose based peritoneal dialysate. Scand J Clin Lab Invest 2003; 63:203–206.
Smith HW: The Kidney: Structure and Function in Health and Disease. New York: Oxford University Press, 1951, pp 231–238.
Sonnenblick M, Friedlander Y, Rosin AJ: Diuretic-induced severe hyponatremia. Review and analysis of 129 reported patients. Chest 1993; 103:601–660.
Spencer K: Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. Ann Clin Biochem 1986; 23:1–25.
Spruce BA, Baylis PH, Kerr DN, Morley AR: Idiopathic hypergammaglobulinaemia associated with nephrogenic diabetes insipidus and distal renal tubular acidosis. Postgrad Med J 1984; 60:493–494.
Steen B: Hypokalemia—clinical spectrum and etiology. Acta Med Scand 1981; 647(Suppl):61–66.
Stewart GW, Ellory JC: A family with mild hereditary xerocytosis showing high membrane cation permeability at low temperatures. Clin Sci 1985; 69:309–319.
Stewart GW, Corrall RJ, Fyffe JA, et al: Familial pseudohyperkalaemia. A new syndrome. Lancet 1979; 2:175–177.
Stowasser M, Bachmann AW, Jonsson JR, et al: Clinical, biochemical and genetic approaches to the detection of familial hyperaldosteronism type I. J Hypertens 1995; 13:1610–1613.
Suzuki M, Yoshida M: A new enzymatic serum creatinine measurement based on an endogenous creatine-eliminating system. Clin Chim Acta 1984; 143:147–155.
Swain RR, Biggs SL: Positive interference with the Jaffe reaction by cephalosporin antibiotics. Clin Chem 1977; 23:1340–1342.
Sweeney G, Klip A: Regulation of the Na^+/K^+-ATPase by insulin: why and how? Mol Cell Biochem 1998; 182:121–133.
Torpy DJ, Gordon RD, Lin JP, et al: Familial hyperaldosteronism type II: description of a large kindred and exclusion of the aldosterone synthase (CYP11B2) gene. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:3214–3218.
Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ: D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. Medicine (Baltimore) 1998; 77:73–82.
Van Acker BA, Koomen GC, Koopman MG, et al: Creatinine clearance during cimetidine administration for measurement of glomerular filtration rate. Lancet 1992; 340:1326–1329.
Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, et al: Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. J Am Soc Nephrol 2002; 13:2259–2266.
Veech RL, Kashiwaya Y, King MT: The resting membrane potential of cells are measures of electrical work, not of ionic currents. Integr Physiol Behav Sci 1995; 30:283–307.
Vokes TJ, Gaskill MB, Robertson GL: Antibodies to vasopressin in patients with diabetes insipidus. Implications for diagnosis and therapy. Ann Intern Med 1988; 108:190–195.
Warnock DG: Liddle's syndrome: genetics and mechanisms of Na^+ channel defects. Contrib Nephrol 2001; 136:1–10.
Wasserman K, Stringer WW, Casaburi R, Zhang YY: Mechanism of the exercise hyperkalemia: an alternate hypothesis. J Appl Physiol 1997; 83:631–643.
Watkins PJ: The effect of ketone bodies on the determination of creatinine. Clin Chim Acta 1967; 18:191–196.
Weber JA, van Zanten AP: Interferences in current methods for measurements of creatinine. Clin Chem 1991; 37:695–700.
Weir B: Pituitary tumors and aneurysms: case report and review of the literature. Neurosurg 1992; 30:585–591.
Weisberg HF: Osmotic pressure of the serum proteins. Ann Clin Lab Sci 1978; 8:155–164.
Weisberg LS: Pseudohyponatremia: a reappraisal. Am J Med 1989; 86:315–318.
Wells T: Vesicular osmometers, vasopressin secretion and aquaporin-4: a new mechanism for osmoreception? Mol Cell Endocrinol 1998 15; 136:103–107.
Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, et al: Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science 2001; 293:1107–1112.
Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, et al: Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:680–684.
Ylinen EA, Ala-Houhala M, Harmoinen AP, Knip M: Cystatin C as a marker for glomerular filtration rate in pediatric patients. Pediatr Nephrol 1999; 13:506–509.
Zaltzman M, Bezwoda WR: Hyperkalaemia in prolymphocytic leukaemia – a sometimes spurious result. A case report. S Afr Med J 1982; 6; 61:209–210.

CAPÍTULO 15

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Katrin M. Klemm MD, Michael J. Klein MD

Metabolismo mineral e ósseo 197
Cálcio 197
Fósforo 199
Magnésio 200
Hormônios reguladores do metabolismo mineral 201
Distúrbios do metabolismo mineral 204
Hipercalcemia 204
Hipocalcemia 207
Hiperfosfatemia 207
Hipofosfatemia 208
Hipermagnesemia 208
Hipomagnesemia 209
Marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo 209
Marcadores da reabsorção óssea 209
Marcadores da formação óssea 210
Doença óssea metabólica 211
Osteoporose 211
Osteomalacia e raquitismo 212
Osteodistrofia renal 212
Doença de Paget 213
Referências bibliográficas 213

PONTOS-CHAVE

- As concentrações plasmáticas de cálcio, fosfato e magnésio dependem do equilíbrio líquido entre deposição e reabsorção mineral ósseas, absorção intestinal e excreção renal. Os principais hormônios reguladores desses processos são o hormônio da paratireoide (PTH), a calcitonina e a 1,25-di-hidroxivitamina D.
- As causas mais comuns de hipercalcemia são o hiperparatireoidismo primário (níveis de PTH elevados) e os neoplasmas malignos (baixos níveis de PTH e, normalmente, altos níveis de peptídeo relacionado ao PTH). Tais condições são observadas em 80 a 90% de todos os pacientes com hipercalcemia.
- As causas mais comuns de hipocalcemia são a insuficiência renal crônica, a hipomagnesemia, o pseudo-hipoparatireoidismo (PHP), deficiência de vitamina D e pancreatite aguda.
- O PTH biointacto quantifica o PTH biologicamente ativo, sendo útil no caso de pacientes com função renal comprometida, nos quais o acúmulo de vários metabólitos causa interferência nos testes de PTH tradicionais.
- Em pacientes submetidos à cirurgia para o tratamento de hiperparatireoidismo primário, as quantificações de PTH durante o intraoperatório são úteis para assegurar que o tecido anormal tenha sido totalmente removido.
- A osteoporose é a mais comum das doenças metabólicas ósseas e caracteriza-se pela diminuição da matriz óssea orgânica. A quantificação seriada dos marcadores da reabsorção óssea pode predizer a resposta inicial à terapia.
- Osteomalácia é a incapacidade de mineralizar a matriz orgânica recém-formada (osteoide) no esqueleto maduro.

Metabolismo mineral e ósseo

O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo que sofre um processo de remodelamento contínuo ao longo da vida do indivíduo. Essa mudança é necessária tanto para manter a integridade estrutural do esqueleto, como para que ele exerça as funções metabólicas de depósito de cálcio e fósforo. O remodelamento do esqueleto pode ser desencadeado por alterações de força mecânica ou microlesões, bem como pela resposta hormonal a alterações dos níveis de cálcio e fósforo circulantes. O esqueleto também serve como linha secundária de defesa contra a acidose, sendo capaz de liberar tampões em forma de fosfatos inorgânicos (Raisz, 1999).

Existem dois tipos de ossos: o cortical ou compacto e o esponjoso ou trabecular (Figs. 15.1*A* e *B*). O osso cortical exerce papel importante nas funções esqueléticas de sustentação, proteção e mecânicas. As diáfises dos ossos longos e o envelope externo de todos os ossos do corpo são corticais. Eles constituem cerca de 80% da massa esquelética, com 90% do volume correspondendo aos ossos e os 10% restantes, aos espaços (canais vasculares, lacunas de osteócitos e canalículos). O osso esponjoso constitui 20% da massa esquelética, sendo que 25% de seu volume são ossos e 75% são espaços. É encontrado nas extremidades dos ossos tubulares longos e curtos, dentro de ossos carpais e tarsais, e também nas cavidades medulares dos corpos vertebrais e dos ossos achatados. Encontra-se disposto em placas verticais altamente perfuradas, que são interconectadas por suportes horizontais, e assemelha-se a um favo de mel. Serve de repositório para células hematopoéticas e proporciona uma ampla superfície para trocas minerais de curta duração (Watta, 1999). Tanto os ossos compactos como os esponjosos são compostos principalmente de minerais inorgânicos (cálcio e fósforo) e de matriz orgânica. Aproximadamente 90 a 95% dessa matriz é constituída de colágeno de tipo I, enquanto os 5 a 10% restantes correspondem a proteínas não colágenas, tais como osteocalcina, osteopontina, osteoconectina, trombospondina, sialoproteínas e outras proteínas ainda pouco caracterizadas. Os osteoclastos reabsorvem ativamente o osso, produzindo íons de hidrogênio para mobilização de minerais e enzimas proteolíticas destinadas à hidrólise da matriz orgânica. Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica e controlam a mineralização da matriz recém-sintetizada (Endres, 1999).

A concentração plasmática de cálcio, fosfato e magnésio depende do equilíbrio líquido entre deposição e reabsorção mineral óssea, absorção intestinal e excreção renal. Os principais hormônios reguladores desse processo são o PTH, a calcitocina e a 1,25-di-hidroxivitamina D. O metabolismo ósseo reflete em grande parte a uma tentativa do organismo para manter os níveis séricos de cálcio e fósforo.

Cálcio

Fisiologia

Distribuição. O cálcio é o quinto elemento mais comum, e o cátion, o mais prevalente no corpo humano. Um adulto sadio contém cerca de 1 a 1,3 kg de cálcio, sendo que 99% dessa massa encontra-se na forma de hidroxiapatita no esqueleto. O restante (1%) está contido no LEC e nos tecidos moles. Menos de 1% do conteúdo de cálcio do esqueleto compõe os líquidos ósseos e realiza trocas com LEC livremente (Mundy, 1999).

O cálcio sérico (no plasma) pode ser encontrado sob três formas distintas: (1) cálcio livre ou ionizado, que representa a forma

fisiologicamente ativa e corresponde a aproximadamente 50% da concentração sérica de cálcio total; (2) cálcio complexado, que se liga fortemente a uma variedade de ânions, incluindo bicarbonato, lactato, fosfato e citrato, representando cerca de 10% do total; e (3) cálcio ligado a proteínas plasmáticas, que representa aproximadamente 40% da concentração sérica total. Tanto o cálcio ionizado como seus complexos são livremente dialisáveis. Considerando a fração ligada a proteínas, em cerca de 80%, o cálcio está associado à albumina.

Uma vez que se liga aos sítios de carga elétrica negativa das moléculas proteicas, o cálcio compete com os íons de hidrogênio pelos sítios de ligação existentes na albumina e nas outras proteínas às quais se liga, sendo que essa ligação é dependente do pH. Embora os níveis séricos de cálcio permaneçam constantes, a distribuição relativa das três formas é alterada como resultado das alterações do pH no LEC. A alcalose aumenta a ligação às proteínas, com subsequente diminuição da concentração de cálcio livre, enquanto a acidose exerce efeito oposto, diminuindo a ligação às proteínas e aumentando os níveis de cálcio livre. Uma vez que o cálcio tenha se ligado às proteínas, sua concentração total também será alterada pela concentração das proteínas plasmáticas.

Função. Além de sua importância evidente na mineralização do esqueleto, o cálcio desempenha um papel vital em processos fisiológicos básicos, como coagulação sanguínea, neurotransmissão, capacidade de tamponamento plasmática, atividade enzimática e manutenção do tônus muscular normal, bem como da excitabilidade dos músculos esquelético e cardíaco. O cálcio também está envolvido na síntese glandular e na regulação das glândulas exócrinas e endócrinas, como também na preservação da integridade e da permeabilidade da membrana celular, particularmente em termos de troca de sódio e potássio.

Nos EUA a maioria dos indivíduos adultos ingere com a dieta cerca de 15 a 20 mmol de cálcio/dia (600–800 mg/dia), em média, principalmente derivados do leite e de outros produtos consumidos diariamente. A National Osteoporosis Foundation recomenda que todos os adultos tenham uma ingestão diária de pelo menos 1.200 mg de cálcio elemental obtidos por meio de dieta e de suplementos. Mulheres que estejam amamentando ou em fase pós-menopausa (sem terapia com estrógenos exógenos) devem ingerir ao menos 1.500 mg de cálcio/dia (Lewiecki, 2004).

Figura 15.1 *A*, Osso compacto, osso longo, corte transversal. Nesse homem de 30 anos de idade, o osso compacto do córtex do fêmur apresenta-se contínuo e sólido, enquanto os espaços vasculares não estão totalmente visíveis. *In vivo*, a cavidade medular está preenchida com medula gordurosa. *B*, Osso esponjoso, corte longitudinal. O osso esponjoso apresenta arranjo em forma de placas verticais altamente perfuradas e interconectadas por delicados esteios horizontais (suportes). A maior parte de seu volume parece ser um espaço vazio, uma vez que a medula foi removida.

O cálcio é absorvido no duodeno e na porção superior do jejuno, via transporte ativo. Em adultos, menos da metade do cálcio proveniente da dieta é absorvível. Entretanto, a absorção dele aumenta durante os períodos de crescimento rápido das crianças, na gravidez e durante a lactação. Com o avanço da idade, a absorção de cálcio declina e seu maior estímulo é a vitamina D (ver adiante), sendo também aumentada por ação do hormônio do crescimento (GH), pelo meio acídico intestinal e pelo aumento da ingestão de proteínas dietéticas. A proporção cálcio/fósforo do conteúdo intestinal é igualmente importante, visto que uma proporção maior que 2:1 resulta na formação de fosfatos de cálcio insolúveis e tende a inibir a absorção de cálcio. O ácido fítico, derivado de vários cereais em grãos, também pode formar compostos insolúveis com o cálcio, do mesmo modo que o oxalato e os ácidos graxos presentes na dieta. Cortisol e conteúdo intestinal excessivamente alcalino inibema absorção de cálcio.

As estimativas da excreção diária de cálcio através do suor variam bastante – 15 mg a mais de 100 mg. A perda pode exceder consideravelmente essa faixa em condições ambientais extremadas. A principal perda líquida de cálcio ocorre via excreção urinária, com uma variação de 2,5 a 10 mmol/dia (100–200 mg/dia). Em indivíduos normais, amplas variações da ingestão de cálcio dietético exercem pouco efeito sobre o cálcio urinário. A excreção de cálcio pela urina é aumentada pela hipercalemia, deprivação de fosfato, acidose e glicocorticoides. O PTH, certos diuréticos e provavelmente a vitamina D diminuem a excreção urinária de cálcio. A fisiologia do cálcio, os hormônios que a regulam e a alteração da homeostasia envolvendo esse mineral foram extensivamente revisadas (Boden, 1990).

Homeostasia do cálcio. A concentração de cálcio ionizado do LEC é mantida constante dentro de um faixa estreita de aproximadamente 1,25 μmol/L (Fig. 15.2). Essa concentração é o principal determinante das influências hormonais que afetam os níveis de cálcio do LEC. Tais efeitos, em alguns casos, são produzidos em detrimento da integridade óssea. O ajuste da concentração de cálcio ionizado do LEC é realizado especialmente pela ação do PTH e da 1,25-di-

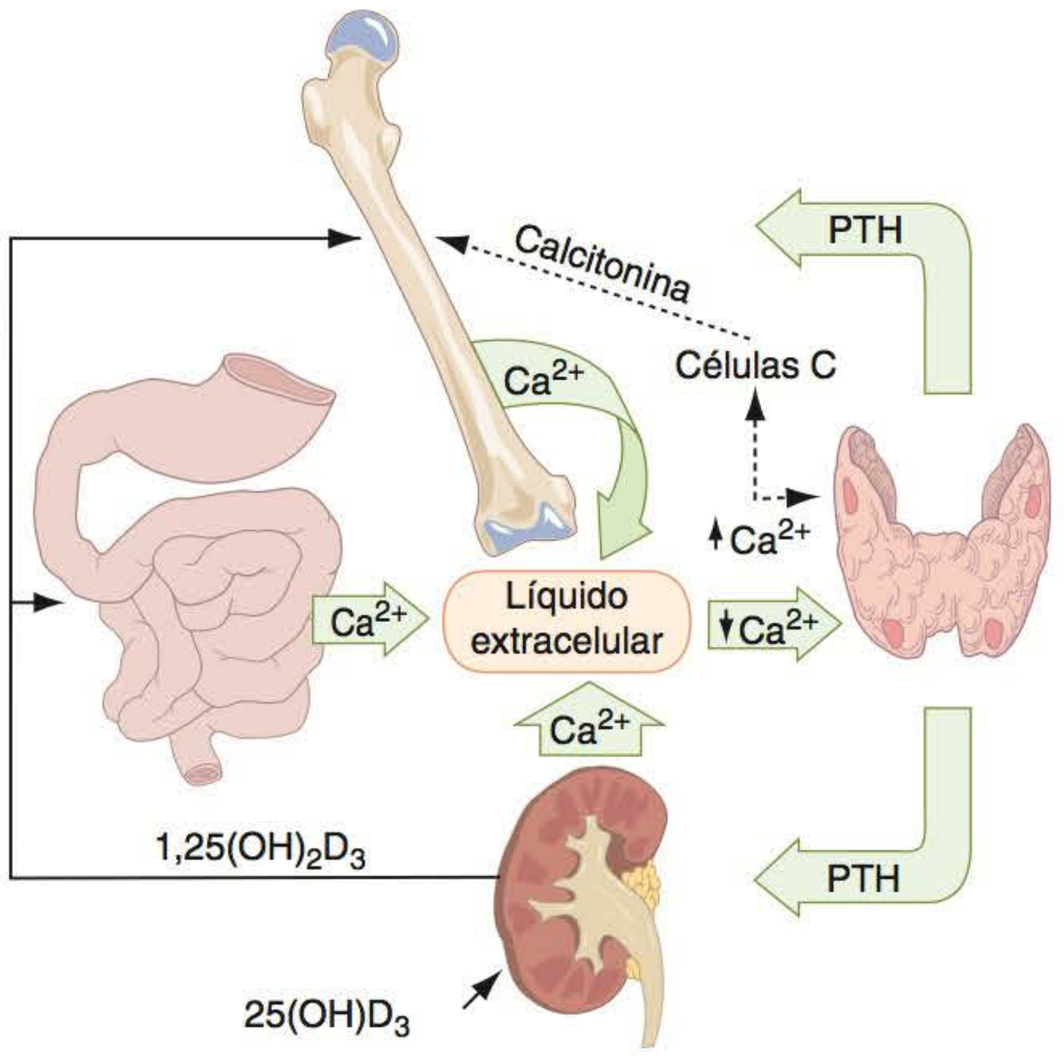


Figura 15.2 Homeostase do cálcio. As setas sólidas e as setas largas indicam os efeitos do aumento dos níveis séricos de cálcio; as setas tracejadas indicam efeitos negativos que reduzem os níveis séricos de cálcio.

-hidroxivitamina D_3 ativa $1,25(OH)_2D_3$, enquanto a calcitonina desempenha um papel menor, ainda que significativo. Os principais órgãos-alvo desses hormônios são os ossos, rins e intestinos. Quando a concentração de cálcio ionizado diminui, as glândulas paratireoides percebem a alteração através da proteína sensora de cálcio associada à membrana, e imediatamente secretam o PTH. Embora não exerça um efeito direto sobre os osteoclastos, o PTH estimula os osteoblastos e seus precursores a produzir o ligante do receptor ativador do fator nuclear κB (RANKL, *receptor activator of nuclear factor κB ligand*). Sendo um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), esse ligante ativa o receptor RANK expresso nos osteoclastos e seus precursores. Como consequência, há formação e ativação de osteoclastos, com o aumento da sobrevida dessas células por meio da supressão da apoptose (Hsu, 1999). Isso explica por que a formação e a reabsorção ósseas estão acopladas à fisiologia óssea normal. A reabsorção da matriz óssea promove a liberação de cálcio e de fosfato no LEC. Ao mesmo tempo, o PTH também atua sobre os rins, estimulando o aumento da excreção urinária de fosfato e alguma reabsorção de cálcio no néfron distal, trazendo a concentração de cálcio ionizado de volta ao normal. Uma ação suficiente da $1,25(OH)_2D_3$ parece ser essencial para que essas etapas funcionem adequadamente. O rim é quase exclusivamente responsável pela ativação da vitamina D (Kurokawa, 1999). É possível que a calcitonina participe do processo regulatório, embora sua importância nos seres humanos seja controvérsia. Outros hormônios que afetam o metabolismo do cálcio, ainda que suas secreções não sejam influenciadas por alterações dos níveis plasmáticos de cálcio e fosfato, incluem o hormônio da tireoide (TH), GH, glicocorticoides suprarrenais e esteroides gonadais.

Técnicas analíticas

As quantificações de cálcio total incluem o cálcio ligado a proteínas e o ionizado. Alternativamente, o cálcio ionizado pode ser quantificado de maneira isolada. É mais fácil realizar a quantificação de cálcio total no laboratório, porém o resultado obtido deve ser interpretado no contexto clínico. Por exemplo, pacientes com malignidades costumam exibir hipoalbuminemia – uma condição que pode resultar em níveis de cálcio total falsamente baixos. Diante dessa situação, os níveis de cálcio total (expressos em mg/dl) podem ser corrigidos pela seguinte equação:

Cálcio total (mg/dl) corrigido para hipoalbuminemia = cálcio total (quantificado) + [(albumina normal) – (albumina do paciente) × 0,8]

Em geral, uma concentração de albumina igual a aproximadamente 4,4 é utilizada como valor normal na fórmula mencionada. Esse valor corrigido representa uma avaliação mais acurada do *status* de cálcio do paciente. Como a albumina é a principal proteína ligadora de cálcio, sua variação é clinicamente significativa. Somente um pequeno percentual de cálcio se liga a outras proteínas, como as gamaglobulinas. Assim, estados clínicos semelhantes à hipogamaglobulinemia provavelmente não resultam em alterações drásticas dos níveis de cálcio total.

Cálcio total e ionizado. Embora diversos procedimentos relacionados ao cálcio tenham sido descritos, somente três métodos são comumente empregados: (1) análise colorimétrica com indicadores metalocrômicos; (2) espectrometria de absorção atômica (EAA); e (3) potenciometria indireta.

O cálcio total é mais amplamente determinado por espectrofotometria de complexos coloridos, em que várias colorações ou indicadores metalocrômicos se ligam ao cálcio. A complexona de ortocresolftaleína (CPC, *orthocresolphthalein complexone*) e o arsenazo III são os indicadores mais amplamente utilizados. Em solução alcalina, a CPC reage com o cálcio e dá origem a uma cor vermelha, cuja intensidade é medida próximo a 580 nm. A interferência dos íons de magnésio é reduzida pela adição de 8-hidroxiquinolina. O arsenazo III reage com o cálcio e forma um complexo cálcio-indicador, que usualmente é quantificado próximo a 650 nm. O reagente estável apresenta alta especificidade pelo cálcio em pH levemente acídico.

A EAA é o método de referência para a determinação dos níveis séricos de cálcio. Apesar de sua maior acurácia e precisão em comparação a outros métodos, são escassos os laboratórios que continuam usando esse método para a quantificação rotineira de cálcio total. Esse fato talvez seja observado porque os laboratórios que analisam um grande número de amostras contam com métodos automatizados ainda indisponíveis para a EAA. Além disso, para tais laboratórios, é difícil providenciar o nível de manutenção exigido pelos equipamentos de EAA.

Na potenciometria, um eletrodo seletivo para cálcio analisa a amostra que, por sua vez, também é analisada contra um eletrodo seletivo para sódio, de modo que as concentrações de cálcio são proporcionais à diferença de potencial existente entre ambos os eletrodos.

Instrumentos dotados de eletrodos com seletividade para cálcio fornecem determinações acuradas, precisas e automáticas do cálcio livre (ionizado). Os eletrodos seletivos para cálcio ionizado (ISEs, *ion-selective electrodes*) consistem de uma membrana cálcio-seletiva contendo uma solução padrão interna de $CaCl_2$, AgCl e outros íons, e um eletrodo de referência.

Intervalo de referência

Em adultos normais, o intervalo de referência para o cálcio total varia de 8,8 a 10,3 mg/dL (2,20–2,58 mmol/L). O soro é a amostra preferida para a quantificação de cálcio total, embora o plasma heparinizado também seja aceitável. Citrato, oxalato e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) provocam interferências nos métodos mais comumente empregados. Outros fatores que também parecem interferir nos métodos colorimétricos são hemólise, icterícia, lipemia, paraproteínas e magnésio.

O intervalo de referência para o *cálcio ionizado (livre)*, em adultos normais, é 4,6 a 5,3 mg/dL (1,16–1,32 mmol/L). Para a quantificação podem ser utilizadas amostras de sangue total, plasma heparinizado ou soro, mediante coleta em condições anaeróbicas e transporte no gelo. Esse material deve ser armazenado a 4°C para evitar perda de CO_2 e glicólise, bem como para estabilizar o pH (considerando que as alterações de pH afetam a fração de cálcio ionizado). É importante utilizar técnicas corretas de coleta para garantir resultados de cálcio ionizado acurados. Por exemplo, se um torniquete for aplicado por tempo prolongado demais, poderá acarretar a queda do pH no sítio de coleta e produzir uma falsa elevação dos níveis da molécula analisada.

O intervalo de referência do *cálcio urinário* varia de acordo com a dieta. Indivíduos que consomem uma dieta regular excretam até 300 mg/dia (7,49 mmol/dia). As amostras de urina devem ser coletadas mediante a devida acidificação, para evitar a precipitação de sais de cálcio.

Fósforo

Fisiologia

Distribuição. Em adultos normais, o conteúdo de fósforo total do organismo é aproximadamente igual a 700–800 g. Cerca de 80 a 85% faz parte da composição do esqueleto, enquanto os 15% restantes estão contidos no LEC, sob a forma de fosfato inorgânico, e no interior das células dos tecidos moles, como fosfatos orgânicos (p. ex., fosfolipídios, ácidos nucleicos), principalmente hidroxiapatita e fosfato de cálcio.

No sangue, o fosfato orgânico é encontrado primariamente nos eritrócitos, sendo que a maioria do fosfato plasmático é inorgânica. Em torno de dois terços do fósforo sanguíneo é orgânico, enquanto apenas 3 a 4 mg/dL de um total de 12 mg/dL corresponde à forma inorgânica. No soro, o fosfato inorgânico está presente como ânions de fosfato divalentes (HPO_3^{2-}) e monovalentes ($H_2PO_4^-$), sendo que ambos constituem tampões importantes. A proporção $H_2PO_4^-$: HPO_4^{2-} depende do pH e varia entre 1:1 (acidose), 1:4 (pH 7,4) e 1:9 (alcalose). Aproximadamente 10% do fósforo sérico está ligado a proteínas; 35% formam complexos com sódio, cálcio e magnésio; e os 55% restantes ocorrem na forma livre. Somente o fósforo inorgânico é quantificado na rotina clínica.

Função. Além de seu papel no esqueleto, o fosfato é importante para as funções intra e extracelulares. O fosfato é um valioso componente de ácidos nucleicos, na medida em que tanto o DNA como o RNA representam fosfodiesterases complexas. Além disso, o fósforo faz parte de fosfolípideos e fosfoproteínas. Ele forma compostos altamente energéticos (ATP) e cofatores (NADP), e está envolvido no metabolismo intermediário e em vários sistemas enzimáticos (adenilato ciclase). O fósforo é essencial à contratilidade muscular normal, função neuroló-

gica, transporte de eletrólitos e transporte de oxigênio pela hemoglobina (2,3-DPG).

Homeostasia do fósforo. A maior parte do fosfato sanguíneo é proveniente da dieta, contudo, uma pequena quantidade deriva do metabolismo ósseo. O fósforo está presente em virtualmente todos os alimentos. Em adultos, a ingestão média a partir da dieta é de aproximadamente 800 a 1.400 mg, em sua maioria obtidos de alimentos ingeridos diariamente, cereais, ovos e carne. Cerca de 60 a 80% do fosfato ingerido é absorvido no intestino, principalmente via transporte passivo. Entretanto, há também a participação de um processo ativo, que dependente de energia e é estimulado pela $1,25(OH)_2D_3$. O fósforo é livremente filtrado no glomérulo. Mais de 80% do fósforo filtrado é reabsorvido no túbulo proximal e uma pequena parcela, no túbulo distal. A reabsorção proximal se dá por transporte passivo acoplado ao sódio (cotransporte de Na-P), em um processo regulado principalmente pela ingestão de fósforo e pelo PTH. A restrição do fósforo aumenta a sua reabsorção, enquanto a ingestão a diminui. O PTH induz fosfatúria ao inibir o cotransporte de Na-P, em sua maior parte, no túbulo proximal. O hormônio se liga a receptores específicos existentes na membrana basolateral e, como resultado, desencadeia duas vias de ativação: a via da adenilato ciclase/AMP cíclico/proteína quinase A e a da fosfolipase C/cálcio/proteína quinase C. As duas vias estão envolvidas na inibição do cotransporte de Na-P (Bellorin-Font, 1990).

Enquanto o PTH abaixa os níveis séricos de fosfato, a administração de vitamina D e GH exerce efeito contrário. A vitamina D aumenta a absorção intestinal e a reabsorção renal de fósforo. O GH é o principal regulador do crescimento esquelético, sendo que sua presença na circulação sanguínea reduz a excreção renal de fosfatos e aumenta, assim, os níveis séricos dessa molécula.

Técnicas analíticas

Os métodos mais comumente utilizados para determinar o conteúdo de fosfatos inorgânicos baseiam-se na reação do fosfato com molibdato de amônio, com consequente formação do complexo fosfomolibdato. A quantificação direta por UV dos complexos incolores não reduzidos pela determinação da absorbância a 340 nm, conforme originalmente descrito por Daly e Ertinghausen em 1972, foi adaptada para ser realizada por analisadores mais automatizados. Como alternativa, o complexo fosfomolibdato pode ser reduzido por uma variedade de agentes (p. ex., ácido aminonaftossulfônico, ácido ascórbico, sulfato de metil-*p*-aminofenol, sulfato ferroso) para produzir azul de molibdênio, cuja intensidade é medida a 600–700 nm. A formação do complexo fosfomolibdato depende do pH e a taxa de sua formação é influenciada pela concentração proteica. As quantificações de complexos não reduzidos apresentam a vantagem de serem simples, rápidas e estáveis. Também foi descrito um método enzimático, em que o fósforo passa por sucessivas reações enzimáticas catalisadas por glicogênio fosforilase, fosfoglicomutase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*). O NADPH produzido pode ser quantificado por fluorometria ou espectrofotometria. A reação ocorre em pH neutro, de modo a permitir a quantificação de fósforo inorgânico na presença de fosfato orgânico instável.

É preferível utilizar amostras de soro porque a maioria dos anticoagulantes, exceto a heparina, interfere nos resultados e conduz a valores falsamente baixos. Os níveis de fósforo são aumentados pelo armazenamento prolongado com as células à temperatura ambiente. Amostras hemolisadas são inaceitáveis, pois os eritrócitos contêm níveis elevados de ésteres orgânicos, que são hidrolisados a fosfato inorgânico durante o armazenamento e, assim, levam à detecção de níveis aumentados da molécula.

Intervalo de referência

Em adultos normais, os níveis séricos de fósforo variam entre 2,8 a 4,5 mg/dL (0,89–1,44 mmol/L). Níveis elevados de fósforo ocorrem em crianças em fase de crescimento (4,0–7,0 mg/dL ou 1,29–2,26 mmol/L). O fosfato sérico é melhor medido em amostras colhidas pela manhã, em jejum, devido a uma variação diurna, com níveis maiores à tarde e à noite e redução no soro fosfato após as refeições. Os níveis são influenciados por dietas, refeições e exercícios.

Magnésio

Fisiologia

Distribuição. O magnésio ocupa o quarto lugar como cátion mais abundante no organismo, depois do cálcio, sódio e potássio. No meio intracelular, contudo, vem em segundo lugar como cátion mais prevalente. Em adultos, o conteúdo de magnésio normal corporal é de aproximadamente 1.000 mmol ou 22,66 g, sendo que 50 a 60% desse total encontra-se nos ossos e o restante (40–50%), nos tecidos moles. Um terço do conteúdo de magnésio esquelético é passível de troca e provavelmente serve de reservatório para manter a concentração extracelular de magnésio em níveis normais.

Somente 1% do conteúdo de magnésio corporal total (MCT) encontra-se no LEC. No soro cerca de 55% do magnésio está na forma ionizada ou livre (Mg^{2+}), 30% associada a proteínas (principalmente, albumina) e 15% forma complexos com fosfato, citrato e outros ânions. Sua concentração no líquido intersticial é de aproximadamente 0,5 mmol/L. No LCE, 55% do conteúdo de magnésio encontra-se na forma livre ou ionizada, enquanto os 45% restantes estão complexados a outros compostos (Elin, 1988).

Em torno de 99% do MCT é encontrado na matriz óssea ou no meio intracelular. Cerca de 60% desse total encontra-se na matriz óssea e o restante está no músculo esquelético e nas células do sangue ou de outros tecidos. A concentração intracelular de magnésio é de aproximadamente 1 a 3 mmol/L (2,4–7,3 mg/dL). No interior da célula, o magnésio está compartimentalizado e a grande maioria se liga a proteínas e moléculas negativamente carregadas. Cerca de 80% do magnésio presente no citosol está ligado a moléculas de ATP. Quantidades significativas de magnésio são encontradas no núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático. A forma livre do magnésio representa 0,5 a 5% do conteúdo de magnésio celular total e constitui a fração que provavelmente é importante como cofator para suporte à atividade enzimática.

Função. O magnésio é essencial ao funcionamento de mais de 300 enzimas celulares, incluindo aquelas relacionadas à transferência de grupos fosfato, todas as reações que requerem ATP e cada uma das etapas relacionadas à replicação e transcrição do DNA, bem como à translação do mRNA. Esse cátion também é necessário ao metabolismo energético celular e exerce papel importante na estabilização da membrana, condução nervosa, transporte de íons e atividade dos canais de cálcio. Além disso, a atuação do magnésio é essencial na manutenção da concentração intracelular de potássio, por meio da regulação da movimentação do potássio por meio das membranas das células miocárdicas. Assim, a deficiência de magnésio pode resultar em uma variedade de anormalidades metabólicas e consequências clínicas, incluindo anomalias refratárias envolvendo eletrólitos plasmáticos (em especial, a depressão dos níveis de potássio) e arritmias cardíacas, mais frequentemente observadas após estresse (p. ex., uma cirurgia no coração) (Weisinger, 1998).

Homeostasia do magnésio. O conteúdo de magnésio corporal total depende principalmente da absorção GI e da excreção renal. A sua ingestão dietética média flutua entre 300 a 350 mg/dia, sendo que a absorção intestinal é inversamente proporcional à quantidade ingerida. Os fatores controladores da absorção intestinal do magnésio ainda são pouco compreendidos.

O rim é o principal órgão envolvido na regulação do magnésio. A excreção renal dessa molécula é de aproximadamente 120 a 140 mg/24 horas, para um indivíduo com dieta normal. Em torno de 70 a 80% do magnésio plasmático é filtrado através da membrana glomerular. A reabsorção tubular de Mg^{2+} difere daquela dos demais íons, por causa do papel limitado do túbulo proximal e, também, porque 60 a 70% de sua reabsorção ocorre no ramo ascendente espesso da alça de Henle (Quamme, 1989). Os túbulos distais são os principais sítios de reabsorção, ainda que apenas 10% do Mg^{2+} filtrado seja reabsorvido nesse local. Muitos fatores, tanto hormonais como não hormonais (p. ex., PTH, calcitonina, glucagon e vasopressina, além da restrição ao magnésio, alterações acidobásicas e depleção de potássio), influenciam a reabsorção na alça de Henle e também no túbulo distal. Entretanto, o principal agente regulador dessa reabsorção é a própria concentração plasmática de Mg^{2+}. Uma concentração de Mg^{2+} aumentada inibe o transporte na alça, enquanto a diminuição da concentração estimula esse transporte, independentemente de haver ou não depleção de magnésio. Os mecanismos parecem ser regulados por um receptor

Ca^{2+}/Mg^{2+}-sensitivo, localizado na face capilar das células do ramo ascendente espesso da alça, as quais são sensíveis às alterações do conteúdo de Mg^{2+} (Quamme, 1997). Outros fatores que também podem ter algum papel na regulação do magnésio são a concentração de cálcio e a taxa de reabsorção de cloreto de sódio.

Na deficiência de magnésio, a diminuição dos níveis séricos dessa molécula leva à redução de sua excreção urinária. Posteriormente, os estoques ósseos de magnésio são afetados, à medida que se desenvolve o processo de equilíbrio envolvendo tais estoques, no decorrer de várias semanas.

Uma vez que o soro é composto por cerca de apenas 1% de todo o conteúdo de magnésio corporal, é possível que os níveis séricos não reflitam acuradamente os estoques totais. Em geral, níveis séricos reduzidos indicam deficiência, enquanto níveis elevados de magnésio no soro indicam estoques adequados. Entretanto, o resultado mais comum – níveis normais – deve ser interpretado com cautela, pois não exclui a possibilidade de uma deficiência subjacente. Costuma-se considerar que a avaliação mais acurada do *status* do magnésio é o teste de sobrecarga, em que o magnésio é administrado por via endovenosa. Indivíduos com deficiência de magnésio retêm uma proporção maior da carga e apresentam menor excreção urinária em comparação com os indivíduos normais (Papazachariou, 2000). Contudo, esse teste não é comumente realizado por ser difícil administrá-lo.

Técnicas analíticas

Magnésio total. Comparado ao plasma, o soro é preferível para a quantificação de magnésio, porque os anticoagulantes interferem na maioria dos procedimentos. Os níveis séricos de magnésio usualmente são medidos por fotometria. O método de referência para a determinação do conteúdo de magnésio total é a EAA. A maioria dos laboratórios clínicos utiliza um método fotométrico acoplado a um analisador automático. Tais métodos empregam colorações ou indicadores metalocrômicos que mudam de cor mediante a ligação seletiva com o magnésio presente na amostra. Alguns dos cromóforos utilizados são calmagita, azul de metiltimol, formazanas e magon. No método fotométrico da calmagita, um dos mais comumente utilizados, a calmagita forma um complexo colorido com o magnésio em solução alcalina. Esse complexo permanece estável por mais de 30 minutos e sua absorbância a 520 nm é diretamente proporcional à concentração de magnésio presente na alíquota da amostra.

Magnésio ionizado (livre)

O conteúdo de magnésio ionizado pode ser quantificado por ISEs, que foram incorporados a vários analisadores clínicos comercialmente disponíveis (Huijgen, 1999). Os ISEs utilizam ionóforos transportadores neutros com seletividade para Mg^{2+}. Todavia, além do Mg^{2+}, esses ISEs também quantificam Ca^{2+} e, portanto, requerem uma correção quimiométrica para o cálculo da verdadeira concentração de magnésio livre da amostra. Estudos demonstraram a existência de diferenças significativas de quantificação de magnésio ionizado realizada com analisadores distintos, as quais foram atribuídas à interferência do cálcio livre existente na amostra, bem como a um grau insuficiente de especificidade e à falta de padronização dos calibradores (Hristova, 1995; Cecco, 1997). A introdução de novos aprimoramentos à metodologia que emprega ISEs para quantificação de magnésio ionizado irá melhorar seu desempenho e aumentar o leque de determinações de Mg^{2+} disponíveis no laboratório clínico.

Assim como ocorre com o cálcio, as quantificações de magnésio ionizado são afetadas pelo pH. A taxa de variação das medidas de magnésio ionizado não é tão significativa quanto a que está associada às determinações de cálcio ionizado. As alterações do conteúdo de magnésio em relação às alterações de pH são muito semelhantes às do conteúdo de cálcio ionizado, ainda que não tão bem caracterizadas. Os níveis de magnésio ionizado diminuem com a elevação do pH, mas aumentam com a queda do pH (Wang, 2002).

Intervalo de referência

Em adultos normais, o intervalo de referência para o conteúdo sérico de *magnésio total* varia de 0,75 a 0,95 mmol/L (1,7–2,2 mg/dL ou 1,5–1,9 mEq/L). Aparentemente não ocorrem diferenças relacionadas ao sexo e à idade. O conteúdo de magnésio dos eritrócitos é cerca de três vezes o conteúdo sérico. A concentração de magnésio no LEC é igual a 2–2,7 mg/dL (1–1,4 mmol/L). O intervalo de referência para o *magnésio ionizado* depende do analisador utilizado em sua quantificação e varia de 0,44 a 0,60 mmol/L (Hristova, 1995).

Hormônios reguladores do metabolismo mineral

Os três principais hormônios reguladores do metabolismo mineral e ósseo são o PTH, a 1,25-di-hidroxivitamina D [$1,25(OH)_2D_3$] e a calcitonina. O PTH e a $1,25(OH)_2D_3$ são os principais hormônios efetores, enquanto a calcitonina exerce papel menos proeminente no ciclo que mantém o metabolismo mineral. Além disso, os efeitos metabólicos da calcitonina ainda não são bem conhecidos.

Paratormônio

Fisiologia

Síntese. O PTH é sintetizado e secretado pelas células principais da glândula paratireoide. O PTH intacto é constituído por uma cadeia única de polipeptídeos, composta por 84 aminoácidos, cuja massa molecular é igual a 9.500 Da, que deriva de um precursor maior – o pré-pró-PTH – que é formado por 115 aminoácidos. Esse precursor sofre duas clivagens sucessivas em suas sequências aminoterminais. Um precursor intermediário (pró-PTH) é produzido na primeira clivagem e, na segunda, o próprio PTH é produzido. Qualquer molécula de pró-PTH que atinja a circulação sanguínea é imediatamente convertida em PTH e em outros produtos.

Secreção. Múltiplos fatores controlam a liberação do PTH a partir das glândulas paratireoides, contudo, apenas alguns poucos sabidamente possuem importância fisiológica. A secreção de PTH é regulada pelo cálcio ionizado, em uma escala temporal de segundos, e representa uma alça de retroalimentação (*feedback*) negativa simples. Sinais extracelulares são detectados por um receptor sensível ao cálcio, localizado na membrana plasmática das células da glândula paratireoide. A estimulação desse receptor causa supressão da secreção de PTH, ao ativar o receptor e desencadear uma via de sinalização intracelular (inositol trifosfato e diacilglicerol). Esse receptor está presente nas glândulas paratireoides, nas células secretoras de calcitonina da tireoide, no cérebro e nos rins. Trata-se de um receptor acoplado à proteína G e, quando mutado, é encontrado nos distúrbios de hipercalcemia hipocalciúrica familiar, hiperparatireoidismo neonatal severo e hipocalcemia autossômica dominante (Mundy, 1999).

Também foi demonstrado que o magnésio ionizado influencia a secreção de PTH. Pacientes hipocalcêmicos que apresentam baixos níveis séricos de magnésio frequentemente necessitam da administração de magnésio para elevação dos níveis séricos de PTH, antes da restauração dos níveis de cálcio a valores satisfatórios. Uma hipomagnesemia severa crônica, como a observada no alcoolismo, foi associada ao comprometimento da secreção do PTH, enquanto a diminuição aguda da concentração sérica de magnésio pode levar ao aumento dos níveis de PTH.

Outros fatores controladores do PTH incluem a ação reguladora da vitamina D e do cálcio extracelular sobre a transcrição genética do hormônio e a massa de células principais da paratireoide. A 1,25-di-hidroxivitamina D_3 promove a supressão crônica da síntese de PTH ao interagir com os receptores da vitamina existentes na glândula paratireoide.

Função. A função fisiológica primária do PTH é manter constante a concentração de cálcio ionizado do LEC. Para tanto, atuam os seguintes mecanismos: (1) estimulação da reabsorção óssea osteoclástica e liberação de cálcio e fosfato a partir dos ossos; (2) estimulação da reabsorção de cálcio e inibição da reabsorção de fosfato nos túbulos renais; e (3) estimulação da produção renal de $1,25(OH)_2D_3$, resultando o aumento da absorção intestinal de cálcio e fosfato. A região aminoterminal da molécula de PTH se liga ao receptor do hormônio, que modula a adenilato ciclase e a fosfolipase C. Mutações ativadoras desse receptor podem causar a hipercalcemia e a desorganização epifisária observadas na condrodisplasia de Jansen (Bastepe, 2004).

O efeito das ações do PTH sobre os ossos, rins e, indiretamente, sobre o intestino incluem elevação das concentrações séricas de cálcio total e cálcio ionizado, bem como a diminuição dos níveis séricos de fosfato. Os seus efeitos imediatos sobre o rim são aumentar o fluxo plasmático renal e causar a diurese. No túbulo contornado distal, promove o

aumento da reabsorção de cálcio e de cloreto em troca da excreção urinária de fosfato. Tais efeitos são mediados pela ativação da adenilato ciclase renal. Como resultado, ocorre o aumento das concentrações urinárias de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e de fosfato, com uma discreta acidose hiperclorêmica secundária. Quando não há doença, o aumento dos níveis séricos de cálcio reduz a secreção de PTH pela alça de retroalimentação negativa, mantendo, assim, a homeostasia do cálcio. Se a alça de retroalimentação negativa for interrompida em decorrência de uma anomalia funcional da glândula paratireoide que seja suficiente para elevar anormalmente os níveis de cálcio, a capacidade dos túbulos distais de reabsorver cálcio é excedida e instala-se uma hipercalcinúria.

Heterogeneidade. O metabolismo do PTH é complexo e produz vários fragmentos com reatividade biológica e imunológica variável. O PTH intacto constitui a forma biologicamente ativa e a sua meia-vida na circulação é inferior a 4 minutos. O rim e o fígado eliminam rapidamente o PTH intacto. No fígado, a molécula intacta de PTH é quebrada em pequenos fragmentos e peptídeos menores que são liberados na circulação. Os fragmentos inativos que contêm a região carboxiterminal permanecem circulantes por mais tempo que a molécula intacta do hormônio, principalmente por serem eliminados exclusivamente através da filtração glomerular (Mundy, 1999).

Técnicas analíticas

Historicamente, os imunoensaios para PTH foram desenvolvidos para quantificar as regiões intermediária, N-terminal e C-terminal da molécula do hormônio. Entretanto, esses ensaios apresentavam reação cruzada com sequências de aminoácidos encontradas tanto na região intermediária como nos fragmentos carboxil da molécula intacta e quantificavam majoritariamente os fragmentos inativos, uma vez que a concentração desses era maior que a de moléculas intactas. Como o rim elimina fragmentos de PTH, os resultados fornecidos por tais ensaios era de difícil interpretação, especialmente no caso de pacientes com função renal comprometida. Os níveis de PTH intacto são determinados pelos *ensaios imunométricos (sanduíche) não competitivos*. Dependendo do tipo de sistema de detecção utilizado, essas análises podem ser classificadas em: *imunorradiométricos* (IRMA), quando marcadores radioativos são empregados, e *imunoquimioluminométricos*, quando utilizam compostos quimioluminescentes para marcação. A maioria dos sistemas automatizados emprega ensaios imunoquimioluminométricos. Essas análises imunométricas apresentam diversas vantagens em relação aos ensaios mais antigos: (1) maior sensibilidade e especificidade proporcionadas pelo uso de anticorpos em uma sequência-específica e purificada por afinidade; (2) análise de uma faixa de concentração mais ampla; (3) tempo de incubação reduzido; e (4) dispensam o uso de compostos radioativos.

Intervalo de referência

Em adultos normais, o intervalo de referência para PTH intacto é 10 a 65 pg/mL (ng/L), quando se utiliza um método imunométrico de dois sítios. Estudos demonstraram que a molécula intacta de PTH é secretada de modo episódico ou pulsátil, segundo um ciclo circadiano geral caracterizado pela elevação noturna de seus níveis. O soro é a melhor fonte de amostras para a quantificação da concentração de PTH. O armazenamento prolongado das alíquotas de amostra pode levar à detecção de concentrações falsamente reduzidas.

PTH biointacto

Fisiologia

Os testes tradicionais para PTH intacto detectam e quantificam tanto a molécula biologicamente intacta de 84 aminoácidos (1–84), como os metabólitos minimamente ativos ou inativos do hormônio. Lembre-se de que a molécula intacta e biologicamente ativa do PTH é clivada em questão de minutos e rende muitos metabólitos que apresentam meia-vida mais longa e concentração bem maior na circulação em determinado momento. Um desses produtos de clivagem, o fragmento 7–84 da quebra do PTH, é um antagonista fraco da atividade do hormônio e pode realmente diminuir os níveis séricos de cálcio do paciente. Por isso, é importante distinguir a molécula intacta de PTH dos produtos de sua quebra no caso de pacientes que apresentam insuficiência renal crônica (Brossard, 2000). Em pacientes urêmicos, observa-se um acúmulo de metabólitos, incluindo o fragmento 7–84, em decorrência da diminuição da depuração renal. Esse acúmulo pode dar a impressão de aumento dos níveis de PTH (Quarles, 1992).

Avanços recentes disponibilizaram um teste que detecta apenas a forma biologicamente ativa (intacta) do PTH. Esse teste de terceira geração elimina as interferências causadas pelos metabólitos e tem grande utilidade clínica para pacientes com função renal comprometida. O teste para PTH biointacto quantifica especificamente a molécula (1–84), empregando um ensaio quimioluminescente de dois sítios. Em comparação aos testes de segunda geração para PTH intacto ativo, essa análise apresenta especificidade muito maior, porém o seu custo e a sua disponibilidade a tornam um teste de segunda linha utilizado principalmente no acompanhamento do *status* metabólico ósseo de pacientes com insuficiência renal.

As faixas normais adotadas para esse teste mostram uma variação sazonal, parcialmente devida aos reduzidos níveis de 25(OH)D observados na população sadia durante o inverno. Os valores normais para esse teste oscilam entre 8 a 50 pg/mL (Nichols Advantage, 2004).

PTH intraoperatório

Historicamente, a cirurgia da paratireoide consiste em uma exploração cervical bilateral, que tenta identificar as glândulas dilatadas. Nos últimos anos, a prática clínica tem se afastado desse procedimento tão oneroso e invasivo que frequentemente requer a internação do paciente de um dia para o outro, para realização de uma paratireoidectomia minimamente invasiva com ou sem utilização de uma sonda gama portátil. Esse procedimento consiste na administração pré-operatória de tecnécio-99m sestamibi, 2 horas antes da realização de uma varredura da paratireoide. O adenoma da glândula paratireoide, com o característico aumento do número de mitocôndrias citoplasmáticas, absorve seletivamente grandes quantidades dessa substância radioativa que, então, possibilita a identificação do(s) adenoma(s) com auxílio de uma sonda gama portátil. Esse método de identificação de glândulas aumentadas permite a remoção somente da glândula paratireoide hiperfuncional em casos de adenoma de paratireoide. Os casos de hiperplasia de paratireoide ainda requerem exploração cervical bilateral. Dependendo do tamanho das glândulas dilatadas, pode ou não ser possível identificá-las na varredura pré-operatória (Goldstein, 2000; Sofferman, 1998; Sokoll, 2000).

Uma vez identificada a glândula paratireoide hiperfuncional na varredura com sestamibi, constatando-se o envolvimento de apenas uma das glândulas, o paciente é conduzido à sala de cirurgias para a realização de uma paratireoidectomia minimamente invasiva. Essa abordagem tem reduzido os custos cirúrgicos e hospitalares, bem como o tempo de internação (Goldstein, 1991).

Antes do início da operação, os valores basais de PTH são determinados. Após a incisão, a dissecação da glândula paratireoide radioativamente marcada é conduzida com o auxílio de uma sonda gama. Uma vez identificada, a glândula é removida e, após a remoção, o cirurgião deve aguardar cerca de 10 a 20 minutos para, então, obter os valores de PTH pós-remoção da paratireoide. Esses valores devem ser 50 a 75% menores do que aqueles obtidos no pré-operatório (ou devem apresentar uma tendência "significativa" à normalidade) de pacientes com níveis de PTH acentuadamente elevados antes da operação. A queda da concentração de PTH garante ao cirurgião que a glândula adenomatosa foi removida. Caso não seja observada nem mesmo uma redução mínima dos níveis de PTH em relação aos valores pré-operatórios, o cirurgião é obrigado a retomar a exploração cervical à procura de outras glândulas anormais. Em tais circunstâncias o processo subjacente sugerido pode ser tanto a presença de adenomas múltiplos como hiperplasia. O teste intraoperatório para PTH é recomendado para pacientes submetidos a cirurgias para tratamento de hiperparatireoidismo primário, hiperparatireoidismo reativado e pré-cirurgia para a localização venosa/tumoral na sala de angiografia (Sokoll, 2004).

Técnicas analíticas

A técnica intraoperatória para PTH usualmente requer que o sangue seja coletado em tubo contendo EDTA (plasma) ou em tubo de coleta com tampa vermelha (soro). A amostra é mantida a baixas temperaturas para minimizar quebras e, em seguida, submetida a um rápido teste de

detecção PTH. Os ensaios imunoquimioluminométricos fornecem resultados rapidamente em decorrência da modificação de alguns parâmetros do teste-padrão. Especificamente, aumenta-se a temperatura de incubação, o sistema da reação é mantido sob agitação contínua e são introduzidas alterações na amostra e no volume dos reagentes para acelerar as reações antígeno-anticorpo. O resultado final é um teste mais rápido, ainda que mais caro, menos sensível e mais impreciso do que o ensaio padrão. Essas análises apresentam boa correlação com os testes padrão e são absolutamente aceitáveis para medir quedas significativas da concentração de PTH no decorrer da cirurgia.

Peptídeo relacionado ao paratormônio

Fisiologia

O peptídeo relacionado ao paratormônio (PTH-rP, *parathyroid hormone related peptide*) foi descoberto em tumores derivados do pulmão, mama, rim e outros tecidos sólidos. Desde então, tem sido descrito como um hormônio de atuação parácrina e autócrina. O PTH-rP é composto por 141 aminoácidos e mostra considerável homologia com o PTH nos 13 primeiros aminoácidos. É produto de um grande gene localizado no cromossomo 12, o qual é singênico ao gene do PTH, localizado no cromossomo 11. Esse peptídeo compartilha o mesmo receptor com o PTH. As suas ações incluem a ligação e ativação do receptor do PTH, consequentemente simulando os efeitos biológicos do hormônio sobre o osso, rim e intestino. Assim como o PTH, o PTH-rP aumenta a reabsorção óssea ao estimular os osteoclastos, além de promover a reabsorção tubular renal de cálcio. Como efeito líquido há elevação dos níveis séricos de cálcio. Atualmente, é bem sabido que o PTH-rP é produzido por aproximadamente 50% das células de câncer de mama, e a sua produção pode ser aumentada por fatores derivados dos ossos, como o fator transformador do crescimento-β (TGF-β, *transforming growth factor*-β (Yin, 1999). Outros tumores malignos também fabricam esse peptídeo. O PTH-rP tem sido implicado como agente responsável pela hipercalcemia humoral em pacientes com malignidades.

A elevação dos níveis de PTH-rP foi observada em 50 a 90% dos pacientes que apresentam hipercalcemia associada à malignidade. O aumento da concentração do peptídeo é igualmente detectado em casos de carcinoma de células escamosas do pulmão, esôfago, cérvix e pele, além de outras malignidades (p. ex., carcinomas de células da ilhota, linfomas de células B e T, mieloma múltiplo). Os níveis de PTH-rP são normais em pacientes com hiperparatireoidismo primário, hipoparatireoidismo, insuficiência renal crônica e outras condições que envolvam hipercalcemia.

Algumas hiperplasias benignas também podem fabricar esse peptídeo, tais como hipertrofia massiva da glândula mamária, tumores secretores de VIP, feocromocitomas e alterações da mama associadas à lactação (Strewler, 1997).

Um estudo recente demonstrou que o PTH-rP apresenta potencial terapêutico para o tratamento da osteoporose pós-menopáusica; o PTH-rP aumentou a densidade mineral óssea em cerca de 5% – uma taxa de excede os ganhos proporcionados pelas abordagens terapêuticas atualmente em uso (Horwitz, 2003).

Técnica analítica e intervalo de referência

O PTH-rP é quantificado através de um ensaio imumétrico (usualmente, IRMA), em que anticorpos específicos para diferentes sequências da molécula de PTH-rP são empregados como anticorpos de captura e anticorpos sinalizadores marcados com isótopo radioativos. O limite de detecção desses ensaios varia entre 0,1 a 1 pmol/L (Endres, 1999). O intervalo de referência para o PTH-rP depende do método utilizado. Em indivíduos normais, a faixa de concentração do peptídeo varia de níveis indetectáveis até 2 pmol/L, enquanto os pacientes com hipercalcemia humoral secundária à malignidade apresentam uma concentração média de peptídeo igual a 22,2 pmol/L.

Calcitonina

Fisiologia

Síntese e metabolismo. A calcitonina é sintetizada e secretada pelas células C especializadas (células parafoliculares) da glândula tireoide, podendo atuar nos ossos, rins e trato GI. A calcitonina imunorreativa é derivada de um precursor maior, enquanto a forma monomérica constitui a única entidade biologicamente ativa. O monômero da calcitonina é um peptídeo composto por 32 aminoácidos, cuja massa molecular vale 3.500 Da. A concentração de cálcio ionizado é o fator regulador mais importante da secreção de sua secreção. Elevações da concentração de cálcio ionizado conduzem ao aumento da secreção de calcitonina. Outros potentes secretagogos são o peptídeo GI e a gastrina, em particular (Care, 1971). Esse último pode explicar a ocorrência de um discreto aumento pós-prandial dos níveis de calcitonina.

O receptor da calcitonina é estruturalmente similar aos receptores de PTH/PTH-rP e de secretinas. Apresenta várias isoformas e sua expressão parece ser influenciada pelas concentrações ambientais da própria calcitonina (Mundy, 1999). A calcitonina é metabolizada em questão de minutos depois da secreção, principalmente no rim.

Papel fisiológico e uso clínico. Embora a calcitonina seja considerada o principal fator regulador do cálcio, por causa de suas propriedades depressoras de cálcio e fósforo, o seu papel fisiológico preciso ainda necessita ser esclarecido. Ela inibe diretamente a reabsorção óssea osteoclástica ao se ligar aos osteoclastos, sendo que o efeito dessa ligação é observado minutos após a sua administração. A inibição é passageira e provavelmente tem papel irrelevante na homeostase geral do cálcio, embora possa ser importante no controle a curto prazo das cargas dessa molécula. A calcitonina também inibe a ação do PTH e da vitamina D. Enquanto alguns estudos clínicos sugerem que os níveis séricos de cálcio aparentemente não são afetados em pacientes submetidos à tireoidectomia, há outros estudos demonstrando que um carcinoma medular de tireoide e o excesso de calcitonina podem causar uma acentuada hipocalcemia. No rim, a calcitonina aumenta a depuração de cálcio e fosfato. No trato GI, os mecanismos por trás de sua ação ainda precisam ser elucidados.

Além da avaliação da calcitonina em circunstâncias de anomalias ósseas, os testes para detecção desse peptídeo constituem suplemento importante à avaliação do paciente com doença nodular da tireoide, sendo frequentemente realizados na esperança de identificar pacientes que apresentem carcinoma medular da tireoide ainda em estágio inicial, o qual pode ser observado em casos de MEN II (*multiple endocrine neoplasia, type II* – neoplasia endócrina múltipla de tipo II). Nas ocorrências de carcinoma medular da tireoide, o sucesso terapêutico depende da identificação precoce da doença. Elevações discretas dos níveis de calcitonina com subsequente exploração cirúrgica da tireoide permitem a identificação dessa lesão ainda no estágio inicial (não palpável) de seu desenvolvimento. É bem sabido que a eficácia terapêutica é insatisfatória nos casos em que são identificados tumores bem desenvolvidos, palpáveis, quando muitos pacientes já apresentam a forma metastática da doença (Rieu, 1995; Horvit, 1997).

As aplicações terapêuticas da calcitonina têm sido exploradas e incluem seu uso no tratamento da osteoporose e da doença de Paget. Nesse último caso, os estágios iniciais da doença são caracterizados pelo aumento da reabsorção óssea.

Técnica analítica e intervalo de referência

No passado, os níveis séricos de calcitonina eram quantificados primariamente por radioimunoensaio (RIA). Contudo, diferenças relativas à especificidade e sensibilidade do teste, matriz e efeitos sorológicos inespecíficos, além da heterogeneidade da calcitonina circulante contribuíam para a obtenção de resultados contraditórios e valores de referência discrepantes referentes ao hormônio. Atualmente, estão disponíveis inúmeros testes altamente sensíveis (limite de detecção mínimo de até 2 pg/mL), empregando métodos imunométricos de dois sítios (eletroimunoensaios [EIAs] e ensaios imunorradiométricos [IRMAs]) para a detecção da calcitonina sérica. Esses testes são considerados o modo mais confiável para quantificar os níveis séricos de calcitonina.

Em adultos normais, o intervalo de referência para a calcitonina sérica é abaixo de 25 pg/mL para homens, e abaixo de 20 pg/mL para mulheres. Sexo, idade, crescimento, gravidez, lactação e ingestão de alimentos são fatores cujos efeitos sobre os níveis do peptídeo têm sido demonstrados.

Vitamina D e metabólitos

Fisiologia

Síntese e metabolismo. O hormônio esteroide $1,25(OH)_2D_3$ é o maior metabólito com atividade biológica da família de esteróis da vitamina D. O precursor dessa vitamina (colecalciferol ou vitamina D_3) tanto

pode ser ingerido através da dieta, como sintetizado na pele a partir de 7-desidrocolesterol (pró-vitamina D_3) mediante exposição à luz solar. Nenhuma dessas formas de vitamina D possui atividade biológica significativa. Ambas precisam ser metabolizadas para se transformar na forma ativa hormonal. Essa ativação se dá em duas etapas, sendo que a primeira ocorre no fígado e a segunda, nos rins. O colecalciferol se liga a uma globulina-α_1 específica e é transportado para o fígado. Neste, a vitamina D é hidroxilada para produzir 25-hidroxivitamina D (calcidiol), um metabólito com atividade biológica limitada. Uma vez que a regulação hepática dessa etapa é fraca, os níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D refletem a quantidade de vitamina D, tanto ingerida como sintetizada na pele. Em seguida, a 25-hidroxivitamina D se liga à proteína ligadora de vitamina D e é transportada para o rim, onde sobre nova hidroxilação por ação da 1-α-hidroxilase, nas mitocôndrias das células tubulares proximais. Como resultado, há formação de $1,25(OH)_2D_3$ (calcitriol). A hidroxilação renal da 25-hidroxivitamina D é o principal ponto de controle do metabolismo da vitamina D, em uma etapa regulada pelos níveis séricos de fosfato, cálcio e PTH circulante. O PTH e a depleção de fosfato atuam de modo independente, induzindo atividade de 1-α-hidroxilase para aumentar a produção de $1,25(OH)_2D_3$. O PTH parece ser um estímulo mais potente para esse efeito. Níveis sanguíneos de cálcio diminuídos estimulam as glândulas paratireoides a secretar PTH. Este, por sua vez, aumenta a produção de $1,25(OH)_2D_3$ nos túbulos proximais renais. Contrariamente, uma elevação dos níveis de cálcio no sague inibe a secreção de PTH. Como resultado, a produção de $1,25(OH)_2D_3$ é reduzida. Os únicos sítios extrarrenais que também são importantes para a produção da $1,25(OH)_2D_3$ são a placenta e o tecido granulomatoso. Nos seres humanos, a meia-vida da $1,25(OH)_2D_3$ na circulação é aproximadamente 5 horas. A vitamina é excretada sob a forma de metabólitos urinários e fecais (Mundy, 1999). Vários outros metabólitos da vitamina D são produzidos no rim, e foi demonstrado que a maioria deles é biologicamente inerte. De todos esse metabólitos, o mais notável é a 24,25-hidroxivitamina D_3, que é produzida por ação da enzima 24-α-hidroxilase nos rins. Essa enzima é ativada quando os níveis de PTH estão baixos ou diante da elevação dos níveis de fosfato inorgânico (Fig. 15.3).

Papel fisiológico. A $1,25(OH)_2D_3$ ligada à proteína ligadora de vitamina D é transportada até o intestino, onde a forma livre é captada pelas células e transportada até um receptor proteico nuclear específico. Embora o receptor se ligue a várias formas de vitamina D, sua afinidade pela 1,25-di-hidroxivitamina D_3 é aproximadamente 1.000 vezes maior que sua afinidade pela 25-di-hidroxivitamina D_3. É essa afinidade que explica por que a 1,25-di-hidroxivitamina D_3 é a que tem maior atividade biológica. Em consequência dessa interação no intestino, a proteína ligadora de cálcio é sintetizada. Nos ossos, há produção de osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina. No intestino, o efeito líquido da $1,25(OH)_2D_3$ consiste no transporte de cálcio e fosfato a partir do lúmen do intestino delgado para a circulação, por meio da estimulação da expressão de proteínas transportadoras de cálcio. Desse modo, as concentrações plasmáticas de cálcio e fosfato aumentam. Também aumenta a reabsorção óssea e são intensificados os efeitos do PTH sobre o néfron, no sentido de promover a reabsorção de cálcio nos túbulos renais. A $1,25(OH)_2D_3$ é um poderoso agente diferenciador de precursores de osteoclastos comprometidos, provocando a sua maturação para formação de células multinucleadas que são capazes de realizar a reabsorção óssea. Tais vias permitem que a $1,25(OH)_2D_3$ disponibilize um suprimento de cálcio e fosfato nas superfícies ósseas para a formação de ossos mineralizados normais (Mundy, 1999).

A demonstração de que os sítios de ação da $1,25(OH)_2D_3$ não se limitam a seus tecidos-alvo – intestino, ossos e rim – expandiu a função terapêutica da vitamina D. A administração do hormônio vitamina D mostrou-se efetiva no monitoramento terapêutico e na prevenção das formas de osteoporose pós-menopáusica e associada à idade. Há evidências de que, além de suas propriedades calciotrópicas, a vitamina D também pode ser um hormônio do desenvolvimento.

Técnicas analíticas

Entre os mais de 35 metabólitos das vitaminas D_2 e D_3, apenas a quantificação de 25(OH)D e $1,25(OH)_2D$ tem importância clínica. A 25(OH)D é um marcador melhor do que a vitamina D na avaliação do *status* dessa vitamina, por causa do maior tempo de meia-vida (2–3 semanas *versus* 5–8 horas, respectivamente) (Papapoulos, 1982), da flutuação mais limitada diante da exposição à luz solar e da ingestão dietética, pela maior concentração e facilidade para a quantificação. A determinação de $1,25(OH)_2D_3$ é útil na detecção de certos estados de produção hormonal inadequada ou excessiva na avaliação de hipercalcemia, hipercalciúria e hipocalcemia, bem como em distúrbios ósseos e minerais. Como ambas as vitaminas, D_2 e D_3, são metabolizadas a compostos de atividades biológicas semelhantes – porém distintas –, para o propósito da clínica, os testes devem quantificar $25(OH)D_2$ e $25(OH)D_3$ ou $1,25(OH)_2D_2$ e $1,25(OH)_2D_3$, respectivamente. No momento, a maioria dos testes destinados aos metabólitos da vitamina D emprega radioimunoensaio ou imunoensaio de quimioluminescência.

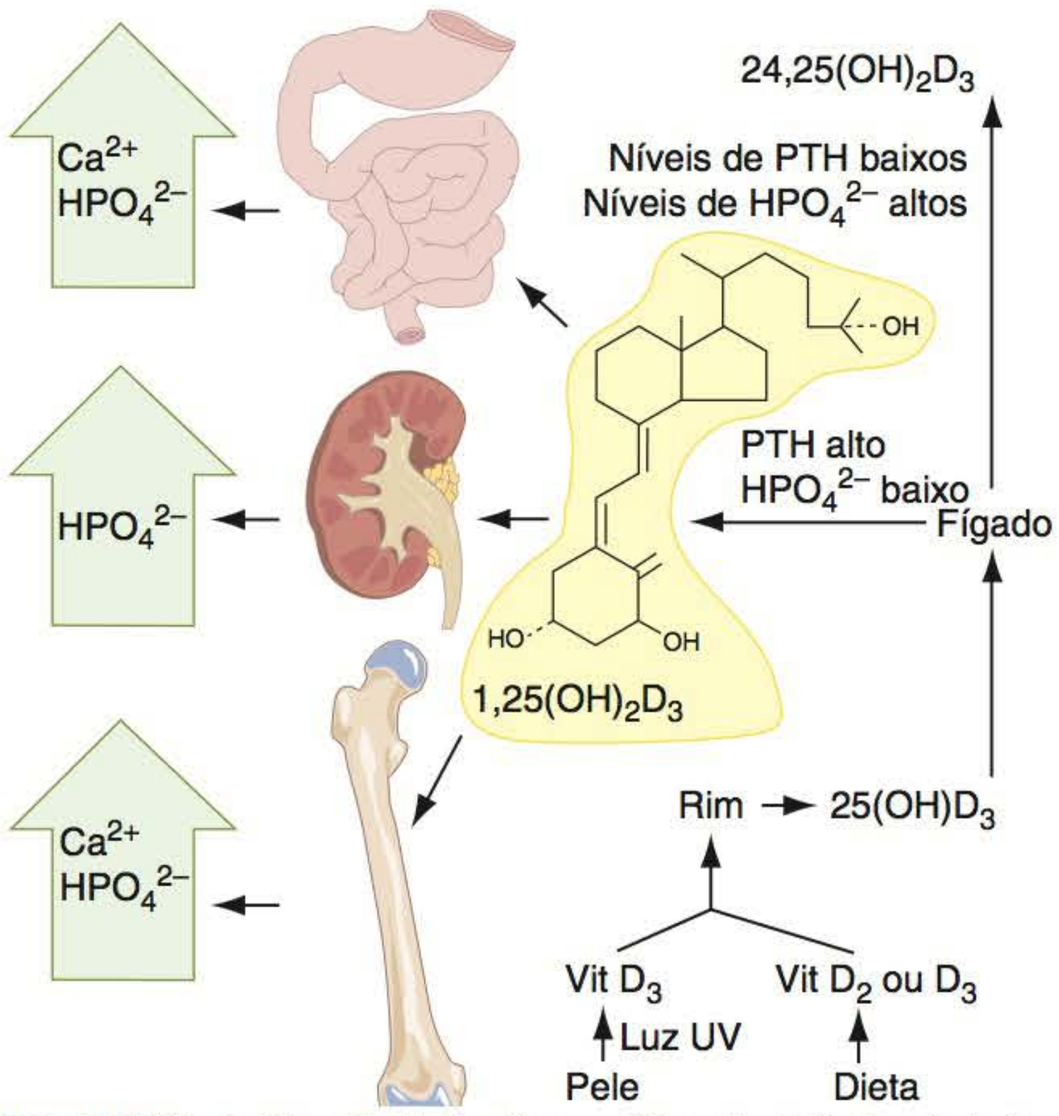


Figura 15.3 Vias de síntese de vitamina D e seus efeitos sobre órgãos terminais. As setas verdes largas indicam aumentos dos níveis de cálcio e fosfato induzidos pela vitamina D (di-hidroxicolecalciferol).

Intervalo de referência

O intervalo de referência para a 25(OH)D presente no soro é aproximadamente 10 a 50 ng/mL (25–125 nmol/L). Para a $1,25(OH)_2D$, esse intervalo é 15 a 60 pg/mL (36–144 pmol/L) (Endres, 1999). Os níveis de 25(OH)D são influenciados pela exposição à luz solar, latitude, pigmentação da pele, uso de protetor solar e função hepática. Os níveis dessa molécula também exibem variação sazonal: durante o inverno, são 40 a 50% menores do que o observado no verão, em decorrência da reduzida exposição à radiação UV. As concentrações de metabólitos da vitamina D também variam de acordo com a idade e aumentam durante a gravidez.

Distúrbios do metabolismo mineral

Hipercalcemia

Níveis séricos de cálcio aumentados estão associados à anorexia, náusea, vômitos, constipação, hipotonia, depressão, ondas T de alta voltagem no eletrocardiograma (ECG) e, ocasionalmente, letargia e coma. Uma hipercalcemia persistente ou um produto de atividade iônica de cálcio-fósforo persistentemente elevado pode causar deposições ectópicas de cálcio nos tecidos por todo o corpo. Esse fenômeno pode tomar a forma de paredes de vasos sanguíneos ectopicamente calcificadas associadas ao aparecimento de lesões necróticas na pele, uma anomalia denominada calcifilaxia. Também pode provocar o aparecimento de calcificações em tecidos viáveis (calcificação metastática), particularmente naqueles que desenvolvem gradientes

de pH com relativa alcalose localizada (p. ex., paredes dos alvéolos pulmonares, pirâmides medulares renais e mucosa gástrica profunda). As causas mais comuns de hipercalcemia são o hiperparatireoidismo primário e os neoplasmas malignos que acometem cerca de 80 a 90% dos pacientes com hipercalcemia. As causas menos frequentes são insuficiência renal, diuréticos, intoxicação por vitaminas A e D, terapia com lítio, síndrome do leite-alcáli, imobilização, hipertireoidismo e outras endocrinopatias não relacionadas à paratireoide, bem como hipercalcemia hipercalciúrica familiar (Tab. 15.1).

O *hiperparatireoidismo primário* (PHPT, *primary hyperparathyroidism*) caracteriza-se pela excessiva secreção de PTH na ausência de um estímulo fisiológico apropriado e na ausência de resposta à alça de retroalimentação negativa de hipercalcemia. Como resultado, instala-se um distúrbio generalizado envolvendo o cálcio, fosfato e metabolismo ósseo. Aproximadamente 100 mil casos de PHPT ocorrem a cada ano nos EUA, sendo que a incidência aumenta com a idade. A doença é duas vezes mais frequente entre as mulheres do que entre os homens. A maioria dos casos é decorrente de adenomas de paratireoide isolados. Outras causas incluem adenomas de paratireoide múltiplos, hiperplasia e, raramente, carcinoma de paratireoide. Na PHPT, a hipercalcemia está caracteristicamente associada a níveis reduzidos de fosfato sérico, em consequência da diurese de fosfato induzida pelo PTH, sendo frequentemente acompanhada de uma acidose discreta associada à diminuição da reabsorção renal de bicarbonato. A hipercalcemia é atribuída às seguintes ações do PTH: (1) ação direta sobre o osso, provocando o aumento da reabsorção; (2) ativação da reabsorção tubular renal; e (3) estimulação de aumento da biossíntese de $1,25(OH)_2D_3$, que resulta no aumento da absorção intestinal de cálcio (Boden, 1990). Pelo menos metade dos pacientes com PHPT é assintomática. Os pacientes sintomáticos usualmente apresentam nefrolitíase recorrente, constipação crônica, depressão mental, disfunção neuromuscular, pancreatite crônica recorrente, úlcera péptica e, menos frequentemente, osteopenia sem causa conhecida ou prematura (Deftos, 1993). A única manifestação óssea da PHPT é a osteíte fibrosa cística generalizada. Ela se caracteriza por uma radiotransparência esquelética difusa com presença de lesões ósseas císticas focais, reabsorção óssea subperióstea mais pronunciada nos dedos e deformações ósseas observadas em chapas de raios X. Histologicamente, observa-se fibrose paratrabecular e hipervascularização da medula, acompanhada de aumento do número de osteoclastos, com aparecimento de recorte trabecular (lacunas de Howship) em decorrência da acelerada reabsorção óssea (Figs. 15.4*A* e *B*). Conforme a doença avança, ocorre uma substituição gradual da cavidade medular por tecido fibroso. O processo torna-se ainda mais pronunciado nos ossos compactos, onde grandes agregados de osteoclastos realizam uma reabsorção em forma de cunha que amplia os canais de Havers (cones perfurantes). As fraturas que se desenvolvem ao longo dos ossos alterados tendem a apresentar cicatrização insuficiente, resultando na formação de espaços ocupados por lesões preenchidas com tecido fibroso, células gigantes multinucleadas, hemorragia e deposição de hemossiderina. Tais formações às vezes são referidas como "tumores marrons", ainda que não sejam neoplásticas. Atualmente, é bastante raro haver osteíte fibrosa cística generalizada, pois a triagem de cálcio e fosfato séricos costumam revelar a hiperfunção da paratireoide muito antes do desenvolvimento de sinais e sintomas pelo paciente.

A PHPT também pode ser herdada como um caractere autossômico dominante e estar presente como componente de uma neoplasia endócrina múltipla (MEN, *multiple endocrine neoplasia*). A MEN 1 consiste em hiperparatireoidismo e tumores da glândula pituitária e do pâncreas. Por vezes, encontra-se associada à síndrome de Zollunger-Ellison, que é caracterizada por tumores de células das ilhotas pancreáticas, hipersecreção de gastrina e úlcera péptica. A MEN 2A apresenta hiperparatireoidismo, feocromocitoma e carcinoma medular da tireoide. Estudos identificaram os defeitos moleculares presentes no hiperparatireoidismo. Um *locus* genético no cromossomo 11 foi associado à MEN 1. Esse mesmo *locus* parece ter sido perdido em cerca de 25% dos casos de adenomas de paratireoide isolados, implicando o mesmo defeito responsável pela MEN 1 como causador da doença esporádica.

O *hiperparatireoidismo secundário* ocorre quando o indivíduo apresenta resistência às ações do PTH, como na insuficiência renal, deficiência de vitamina D (osteomalacia) e no PHP. Como consequência, a

Tabela 15.1 Causas de hipercalcemia

Mediadas pelo PTH
Hiperparatireoidismo primário (mais comum):
Esporádico
Neoplasia endócrina múltipla (tipos I e II)
Hipercalcemia hipocalciúrica familiar
Secreção ectópica de PTH por neoplasmas (rara)?
Não mediadas pelo PTH
Associada à malignidade (mais comum)
Mediada pela vitamina D:
Intoxicação por vitamina D
Produção aumentada de $1,25(OH)_2D$
Outras endocrinopatias:
Tirotoxicose
Hipoadrenalismo
Imobilização com renovação óssea aumentada
Síndrome do leite-álcali
Sarcoidose
Mieloma múltiplo

Figura 15.4 Doença óssea da hiperparatireoide (osteíte fibrosa cística). *A*, a radiografia da mão revela uma reabsorção cortical recortada na lateral radial (esquerda) das falanges e radiotransparência dos tufos falangianos terminais. *B*, biópsia de osso compacto com doença óssea da hiperparatireoide avançada, demonstrando a conversão do osso compacto em osso esponjoso, com reabsorção interna dos sistemas de Havers por cones perfurantes (CP) osteoclásticos e fibrose paratrabecular (100 ×).

glândula paratireoide sofre hiperplasia e produz PTH em excesso. A patogênese apresenta certa variação, dependendo da natureza e do grau de severidade da doença renal. Entretanto, a diminuição da excreção renal de fosfato decorrente do comprometimento da filtração glomerular é fator proeminente. Em tais pacientes, observa-se uma tendência inicial à hipocalcemia, uma vez que, à medida que os níveis de fosfato sobem, os níveis de cálcio abaixam. Essa relação inversa é criada pelo produto de atividade iônica constante de fosfato e cálcio. Além da insuficiência renal crônica, a produção renal de $1,25(OH)_2D$ está diminuída. Em consequência, os níveis reduzidos de $1,25(OH)_2D$ provocam a diminuição da resposta esquelética ao PTH, bem como a diminuição da absorção intestinal de cálcio, contribuindo para a hipocalcemia. Por causa da redução dos níveis séricos de cálcio iônico, observa-se uma alça de retroalimentação positiva para aumentar a secreção de PTH, resultando na hiperplasia da glândula paratireoide. As manifestações clínicas iniciais incluem níveis séricos de cálcio baixos ou normais e hiperfosfatemia. Mais tarde, nos casos com hiperparatireoidismo secundário severo, há o desenvolvimento de hipercalcemia e hiperfosfatemia. Além disso, há dor óssea, calcificações ectópicas e prurido. A complexa doença óssea que ocorre no hiperparatireoidismo secundário e na insuficiência renal costuma ser denominada osteodistrofia renal (Fig. 15.5), sendo discutida em maior profundidade a seguir. O hiperparatireoidismo autônomo pode sobrevir, em alguns casos, diante da estimulação crônica da paratireoide. Trata-se de uma ocorrência típica em pacientes com insuficiência renal crônica ou outra doença em que haja diminuição crônica dos níveis séricos de cálcio ionizado e estimulação a longo prazo da secreção de PTH. Essa estimulação crônica da paratireoide resulta no aumento de sua massa glandular e em hiperplasia difusa. Se os níveis aumentados do PTH não forem abaixados por uma hipercalcemia, seja diante de um consumo contínuo de cálcio, seja durante a correção dos níveis de cálcio (p. ex., após um transplante renal), há casos em que a síndrome clínica é referida como *hiperparatireoidismo terciário*. Pacientes com essa síndrome podem apresentar adenomas, hiperplasia ou até carcinomas da glândula paratireoide. Tais pacientes demonstram ainda uma tendência a desenvolver calcificações metastáticas, pois os níveis transitoriamente elevados de cálcio e fosfato podem ultrapassar o produto de atividade iônica e causar a precipitação do excesso.

Tumores malignos são a causa mais frequente de hipercalcemia na população de pacientes internados em hospitais. A *hipercalcemia associada à malignidade* pode ser dividida em casos com e sem metástases ósseas. Lesões ósseas radiotransparentes indicativas de doença metastática são frequentemente observadas em pacientes com malignidades hematológicas (mieloma múltiplo, linfomas e leucemias) e carcinomas de pulmão, rim ou da tireoide. Vários mecanismos possíveis foram implicados no desenvolvimento da hipercalcemia associada à malignidade, incluindo lise tumoral direta, secreção de fator ativador de osteoclasto por células tumorais e secreção de linfocinas potencializadoras da atividade de osteoclastos (p. ex., interleucina-1 e TNF). O exame convencional de raios X dos ossos e a varredura óssea são capazes de detectar a maioria das metástases ósseas. A hipercalcemia sem metástases ósseas é também conhecida como *hipercalcemia humoral de processos malignos* (HHM, *humoral hypercalcemia of malignancy*). Nesse caso, o diagnóstico geralmente é mais difícil, visto que o tumor primário pode estar oculto. Diversos tipos de tumores foram associados a essa síndrome, incluindo carcinoma renal, hepatocelular, de cabeça e pescoço, pulmonar e tumores de células das ilhotas pancreáticas. A causa mais comum de HHM é a secreção de PTH-rP pelas células tumorais. O diagnóstico é altamente sugestivo quando é detectada uma elevada excreção urinária de cAMP (tipicamente observada no hiperparatireoidismo) e, ao mesmo tempo, níveis de PTH reduzidos ou normais.

A *intoxicação por vitamina D* é outra causa de hipercalcemia e usualmente resulta da ingestão excessiva de suplementos vitamínicos durante um período prolongado. O excesso de vitamina D aumenta a absorção intestinal e a reabsorção óssea de cálcio, além de hipercalciúria. Embora haja supressão do PTH, o frequente desenvolvimento de insuficiência renal pode dificultar a exclusão de hiperparatireoidismo. A 25(OH)D foi implicada como principal metabólito responsável pela síndrome. O diagnóstico é sustentado por uma cuidadosa obtenção da história do paciente, quantificação dos níveis de 25(OH)D e a ocorrência de uma resposta imediata à administração de esteroides. Clinicamente, as manifestações da intoxicação por vitamina D são fraqueza, irritabilidade, náuseas, vômitos e diarreia. A calcificação de tecidos moles é uma característica comum, uma vez que os níveis séricos de fósforo tendem a se elevar. A intoxicação pode persistir durante meses, porque a vitamina D é armazenada no tecido adiposo.

A hipercalcemia associada a *distúrbios granulomatosos* é comumente observada em pacientes com sarcoidose, sendo menos frequente em pacientes com tuberculose, granulomas induzidos por silicone e doenças causadas por fungos, como a coccidioidomicose e a candidíase. Insuficiência renal, calcificação de tecidos moles, nefrolitíase e hipercalcemia severa são potenciais manifestações. Diferentes mecanismos foram implicados no desenvolvimento da hipercalcemia, incluindo maior sensibilidade à vitamina D, maior concentração de metabólitos da vitamina D e produção descontrolada de $1,25(OH)_2D$ por macrófagos no tecido granulomatoso.

A *síndrome do leite-álcali* foi descrita pela primeira vez em pacientes com úlcera péptica que consumiam grande quantidade de leite e álcalis absorvíveis (p. ex., carbonato de cálcio). Recentemente, foi relatada uma elevação da incidência dessa síndrome, a qual pode ser consequência da disseminação do uso de preparações à base de carbonato de cálcio para tratamento e profilaxia da osteoporose. As manifestações apresentadas pelos indivíduos acometidos são hipercalemia, hipocalcinúria, alcalose, azotemia e calcificações nos tecidos moles.

O teste laboratorial empregado no diagnóstico diferencial de hipercalcemia inclui quantificações dos níveis séricos de cálcio total e ionizado, cálcio urinário, níveis séricos e urinários de fósforo, fosfatase alcalina, albumina, PTH intacto e PTH-rP, além de cAMP na urina. A determinação dos níveis de vários outros analitos pode fornecer informações valiosas em casos específicos (p. ex., GH, cortisol, teste de supressão de cortisona, cateterização venosa seletiva com quantificação da concentração de PTH local, e quantificações dos níveis de metabólitos da vitamina D). A correta interpretação dos dados laboratoriais relevantes muitas vezes requer estudos especiais adicionais, que complementem a história obtida e os dados do exame físico. Pode ser indicada a realização de testes de função renal e análises do equilíbrio acidobásico. Em determinados casos, torna-se inestimável o valor do exame histopatológico de amostras de biópsia de osso obtidas de sítios apropriados.

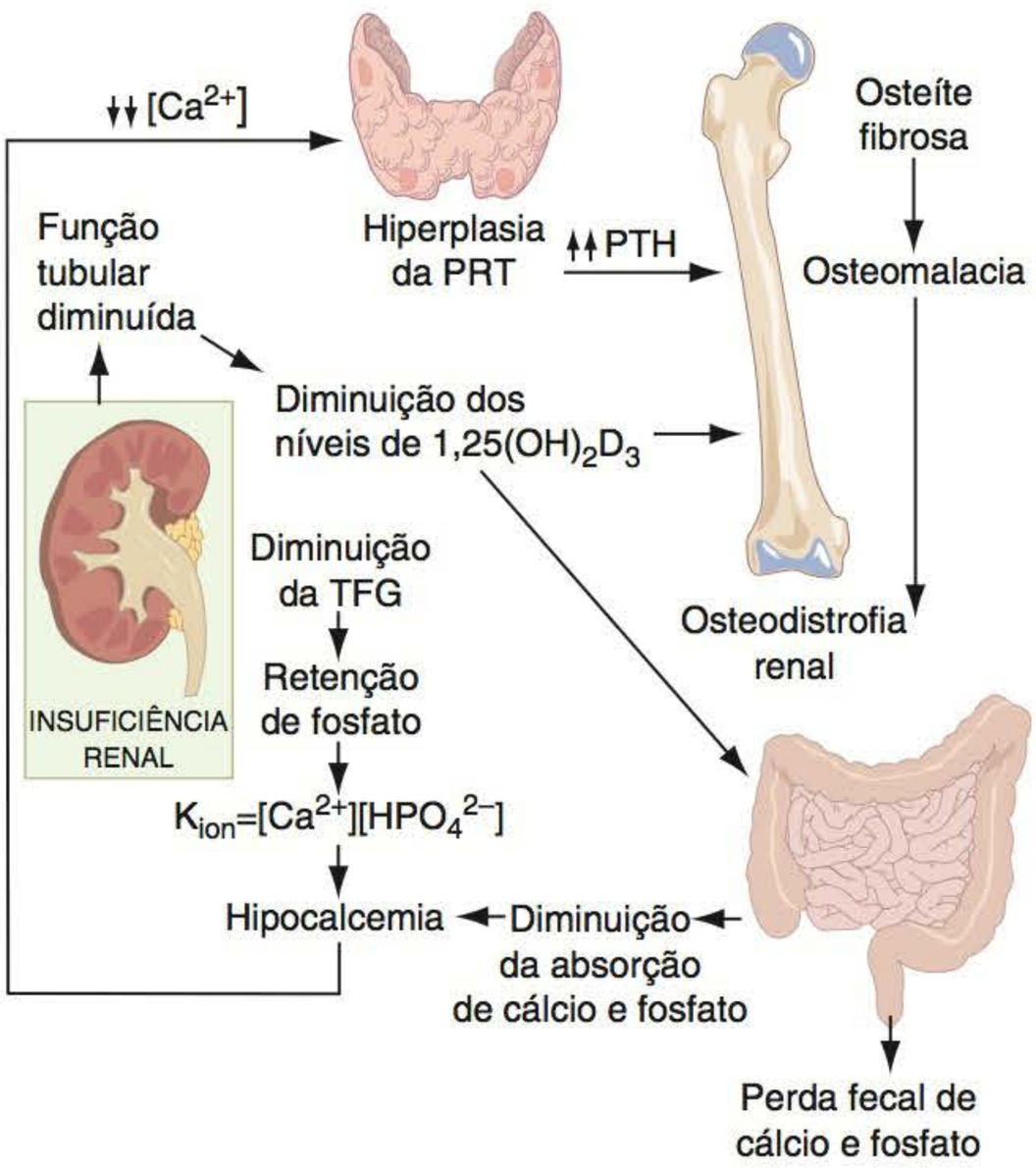


Figura 15.5 Relações que conduzem à osteodistrofia renal na insuficiência renal crônica.

Hipocalcemia

A hipocalcemia crônica apresenta manifestações neuromusculares e neurológicas, incluindo espasmos musculares, espasmo carpopedal, parestesias periféricas e periorais, arritmias cardíacas, prolongamento do intervalo QT e das ondas de baixa voltagem no ECG, além de, nos casos mais graves, espasmos de laringe e convulsões. Há a possibilidade de ocorrer parada respiratória. Uma hipocalemia severa eventualmente resultará em tetania. São muitas as causas da hipocalemia, as quais podem ser calcificadas em várias categorias principais: (1) deficiências de produção ou secreção de PTH; (2) resistência à ação do PTH; (3) deficiência de vitamina D ou de seus metabólitos; e (4) deficiências de mineralização óssea com metabolismo normal de PTH e vitamina D (Tab. 15.2). As causas mais comuns de hipocalemia são insuficiência renal crônica, hipomagnesemia, hipoparatireoidismo, PHP, deficiência de vitamina D e pancreatite aguda. Menos frequente, a baixa concentração plasmática de cálcio pode ser observada em indivíduos criticamente doentes, com sepse, queimaduras e insuficiência renal aguda. É possível detectar uma hipocalcemia transiente após a administração de inúmeros fármacos, como heparina, glucagon e protamina, como também após a realização de transfusões massivas de produtos sanguíneos citratados.

O *hipoparatireoidismo*, hereditário ou adquirido, é caracterizado pela ausência ou diminuição da produção de PTH pelas glândulas paratireoides, que conduz à queda da concentração plasmática de cálcio e correspondente hiperfosfatemia. Pacientes com esse distúrbio também apresentam níveis nulos ou reduzidos de $1,25(OH)_2D$. No passado, o hipoparatireoidismo secundário a cirurgias cervicais e tireoidectomias, em particular, costumava ser mais comum que a forma hereditária. Com o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas, todavia, sua incidência diminuiu dramaticamente. O hipoparatireoidismo hereditário pode ocorrer isoladamente com um padrão de herança variável (hipoparatireoidismo idiopático), associado ao desenvolvimento defeituoso do timo e das glândulas paratireoides (síndrome de DiGeorge ou disgenesia branquial), ou como parte de uma complexa síndrome autoimune hereditária, envolvendo insuficiência suprarrenal, ovariana e paratireoideana, usualmente referida como deficiência poliglandular autoimune. O hipoparatireoidismo hereditário muitas vezes se manifesta na primeira década de vida. Além da ausência ou dos baixos níveis de PTH e da hipocalcemia, certas manifestações cutâneas ocorrem frequentemente (p. ex., alopécia e candidíase).

Tabela 15.2 Causas de hipocalcemia

Mediadas pelo PTH
Deficiência de PTH:
Permanente:
Adquirida:
Pós-cirúrgica
Hereditária:
Hipoparatireoidismo idiopático
Síndrome de DiGeorge (disgenesia branquial)
Síndromes poliglandulares autoimunes
Reversíveis:
Hipomagnesemia severa
Hipercalcemia de longa duração
Resistência ao PTH:
Pseudo-hipoparatireoidismo
Mediadas pela vitamina D
Deficiência de vitamina D
Deficiência de 25(OH)D
Deficiência de $1,25(OH)_2$:
Inibição reversível da 1-hidroxilase
Defeitos renais intrínsecos (insuficiência renal crônica, tubulopatias, síndrome de Fanconi)
Resposta defeituosa a $1,25(OH)_2D$
Mutações envolvendo o receptor da vitamina D

O *pseudo-hipoparatireoidismo* (PHP), também conhecido como osteodistrofia hereditária de Albright, é um raro distúrbio genético em que a ineficácia da ação do PTH prevalece sobre a incapacidade da paratireoide produzir o hormônio. Clinicamente, o PHP apresenta algumas das características do hipoparatireoidismo, tais como calcificações extraósseas, sintomas extrapiramidais e sinais como movimentos coreoatetóticos e distonia, alterações crônicas nas unhas da mão e no cabelo, cataratas lenticulares e o aumento da pressão intracraniana com papiledema. Os níveis séricos de cálcio estão deprimidos, apesar da elevada concentração de PTH, sugerindo resistência à ação desse hormônio. Além disso, enquanto a infusão de PTH em pacientes com hipoparatireoidismo geralmente resulta em notável aumento dos níveis urinários de cAMP e fosfatúria, os pacientes com PHP costumam responder com produção de cAMP e excreção urinária de fosfato subnormal. A causa disso é um defeito na proteína G estimulatória da adenilato ciclase, a qual é necessária à ação do PTH.

A hipocalcemia associada à hipomagnesemia está correlacionada tanto à liberação deficiente de PTH pelas paratireoides, como ao comprometimento da responsividade à ação desse hormônio.

Quando associada à hipovitaminose D, a hipocalcemia pode resultar de uma produção inadequada de vitamina D_3 na pele, suplementação dietética insuficiente, incapacidade do intestino delgado absorver quantidades adequadas de vitamina a partir dos alimentos e resistência aos efeitos da vitamina D. Este último caso pode ocorrer em consequência da deficiência ou defeito dos receptores para $1,25(OH)_2D$, ou ao uso de fármacos antagonistas de vitamina D. A hipovitaminose D está associada a distúrbios do metabolismo mineral e da secreção de PTH, bem como a defeitos de mineralização do esqueleto, como o raquitismo em crianças e a osteomalacia em adultos (ver adiante). A diminuição dos níveis de vitamina D leva a uma absorção intestinal de cálcio insuficiente e à hipocalcemia, seguidas do aumento da secreção de PTH (hiperparatireoidismo secundário). A elevação dos níveis de PTH estimula a liberação de cálcio a partir dos ossos e reduz a depuração renal dessa molécula, aumentando, assim, seus níveis na circulação. Caso a hipovitaminose D persista, uma severa hipocalcemia poderá se instalar.

Foi descrito um distúrbio hereditário, caracterizado pela produção defeituosa de $1,25(OH)_2D$ nos rins. Nessa síndrome, conhecida como *raquitismo por deficiência de pseudovitamina D* ou *raquitismo dependente de vitamina D do tipo I*, observa-se uma deficiência da atividade de 25(OH)D-1α-hidroxilase, que resulta em baixa produção e redução dos níveis de $1,25(OH)_2D$ na circulação, porém, com resposta normal a doses fisiológicas de calcitriol. No raquitismo dependente de vitamina D do tipo II, ocorrem mutações que comprometem a função do receptor de $1,25(OH)_2D$ por meio da introdução de uma modificação na ligação do hormônio a seu receptor. Em consequência, sobem os níveis circulantes de $1,25(OH)_2D$. Embora a administração de doses elevadas de calcitriol aumente ainda mais os níveis de $1,25(OH)_2D$, não ocorre nenhuma resposta fisiológica. Outra doença hereditária associada ao comprometimento do metabolismo da vitamina D é o raquitismo hipofosfatêmico ligado ao cromossomo X. Tal condição caracteriza-se por um defeito funcional da 25(OH)D-1α-hidroxilase, hipofosfatemia e níveis séricos normais ou reduzidos de $1,25(OH)_2D$. A Figura 15.6 resume as etiologias mais comuns da alteração anormal dos níveis de cálcio com os seus respectivos diagnósticos diferenciais.

As Tabelas 15.3 e 15.4 mostram os valores laboratoriais séricos de cálcio, fosfato, vitamina D, entre outros, para estados metabólicos alterados.

Hiperfosfatemia

A hiperfosfatemia usualmente é causada pela diminuição da excreção renal em casos de insuficiência renal aguda e crônica; aumento da ingestão com administração excessiva por via oral, retal ou endovenosa; ou aumento da carga extracelular decorrente da movimentação transcelular na acidose. As causas menos comuns são o aumento da reabsorção tubular em caso de hipoparatireoidismo; PHP; e o aumento da carga extracelular decorrente de lise celular em casos de rabdomiolise, hemólise intravascular, leucemia e terapia citotóxica. É possível, ainda, observar uma hiperfosfatemia secundária ao excesso de medicação com vitamina D, bem como a produção de vitamina D determinada por doenças granulomatosas, como sarcoidose e tuberculose.

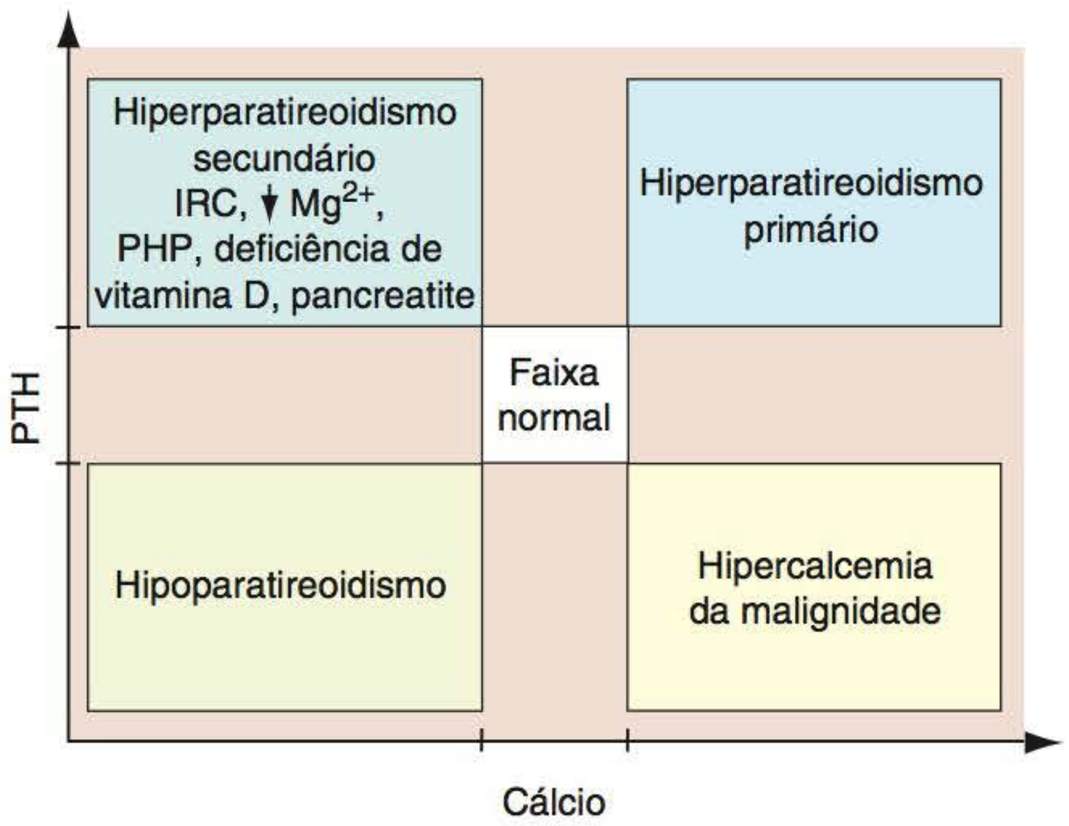


Figura 15.6 Gráfico de correlação das alterações dos níveis séricos de cálcio e de PTH com as doenças que mais frequentemente provocam tais alterações.

Tabela 15.3 Níveis séricos de cálcio, fosfato e vitamina D em vários distúrbios

Distúrbio	Cálcio	25(OH)D	1,25(OH)D	Fosfato
Intoxicação por 25(OH)D	Alto	Alto	Baixo, normal	Normal, alto
Hiperparatireoidismo primário	Alto	Normal	Normal, alto	Baixo
Hiperparatireoidismo secundário	Baixo	Baixo, normal, alto	Baixo, normal, alto	Baixo, normal, alto
Hiperparatireoidismo terciário	Normal, alto*	Baixo, normal, alto	Baixo, normal, alto	Baixo, normal, alto
Malignidade	Alto	Normal	Baixo, normal	Baixo
Deficiência de vitamina D	Baixo	Baixo	Baixo, normal, alto	Baixo
Insuficiência renal	Baixo	Normal	Baixo	Alto
Hiperfosfatemia	Baixo	Normal	Baixo	Alto
Raquitismo por vitamina D de tipos I e II	Baixo	Normal, alto	Baixo, normal, alto	Baixo
Doenças granulomatosas (sarcoidose/TB)	Alto	Baixo, normal, alto	Alto	Normal, alto
Osteoporose pós-menopáusica	Normal	Normal	Normal	Normal
Osteoporose senil	Normal	Normal	Normal	Normal
Osteomalacia	Baixo, normal	Baixo, normal	Baixo	Baixo, normal, alto

* Os níveis de cálcio podem permanecer normais diante de uma deficiência de $1,25(OH)_2D_3$ concomitante.

Não há nenhum sintoma diretamente resultante da hiperfosfatemia. Por outro lado, quando os níveis elevados se mantêm por tempo prolongado, observa-se um aumento da mineralização e o fosfato de cálcio pode se depositar em sítios anormais. A calcificação ectópica é uma complicação frequente em pacientes com insuficiência renal crônica, que estejam recebendo suplementos de vitamina D, quando a correção da hiperfosfatemia é inadequada (Weisinger, 1998).

Hipofosfatemia

A hipofosfatemia é observada em 0,25 a 2,15% das admissões hospitalares. O abuso de álcool constitui a causa mais comum de hipofosfatemia severa, provavelmente por causa da baixa ingestão de alimentos, vômitos, uso de antiácidos e fosfatúria marcante. Também pode ser causada pela ingestão de grandes quantidades de antiácidos não absorvíveis que ligam-se ao fosfato. A hipofosfatemia é induzida por numerosos mecanismos, incluindo redistribuição interna, aumento da excreção urinária, diminuição da absorção intestinal ou uma combinação de todas essas anomalias. A causa mais comum é a movimentação do fósforo a partir do LEC para o meio intracelular, a qual pode ser observada na alcalose respiratória aguda associada à sepse, envenenamento por salicilatos, abstinência de álcool, termoplegia, coma hepático, aumento dos níveis de insulina durante a administração de glicose, recuperação de uma cetoacidose diabética e em pacientes submetidos à realimentação ou desnutridos. O aumento da excreção urinária comumente é secundário ao hiperparatireoidismo, defeitos tubulares renais (p. ex., síndrome de Fanconi e hipofosfatemia familiar), raquitismo resistente à vitamina D ligado ao cromossomo X, aldosteronismo, administração de glicocorticoides e mineralocorticoides e terapia diurética. A hipofosfatemia decorrente de perdas urinárias é observada em casos de diurese osmótica, expansão volumétrica aguda e em até 30% dos pacientes com neoplasias malignas, tais como certos tipos de leucemia e linfoma. Na hipofosfatemia oncogênica com osteomalacia, os tumores mesenquimais (benignos ou malignos) produzem hiperfosfatúria por um mecanismo no qual foi implicado o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-23, *fibroblast growth factor 23*) (Nelson, 2003; Folpe, 2004). A perda intestinal aumentada se deve à ocorrência de vômitos, diarreia e ao uso de antiácidos ligadores de fosfato. A diminuição da absorção intestinal ocorre em casos de desnutrição, deficiência de vitamina D e esteatorreia (Tab. 15.5).

É comum ocorrer hipofosfatemia sintomática diante da queda dos níveis plasmáticos de fósforo a valores inferiores a 0,32 mmol/L. As manifestações clínicas observadas são fraqueza proximal, anorexia, tontura, miopatia, disfagia, íleo paralítico, insuficiência respiratória decorrente do enfraquecimento dos músculos respiratórios, comprometimento da contratilidade cardíaca causado pela depleção de ATP nas células miocárdicas e encefalopatia metabólica.

Hipermagnesemia

A hipermagnesemia (i. e., concentração plasmática de $Mg^{2+} > 0,9$ mmol/L) é rara e usualmente iatrogênica. Idosos e indivíduos com distúrbios intestinais ou insuficiência renal correm maior risco de desenvolver a condição. As manifestações clínicas da hipermagnesemia são hipotensão, bradicardia, depressão respiratória, estado mental deprimido e anormalidades no ECG (Weisinger, 1998).

Tabela 15.4 Valores laboratoriais em vários estados de alteração do metabolismo do cálcio

	Hiperparatireoidismo primário	Hipercalcemia humoral da malignidade	Hiperparatireoidismo secundário	Hiperparatireoidismo terciário	Hipercalcemia hipocalciúrica familiar
Cálcio urinário	Alto	Alto	Normal, alto	Normal, alto	Baixo
Fosfato sérico	Baixo	Baixo	Baixo, normal, alto	Baixo, normal, alto	Baixo
Fosfato urinário	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
1,25(OH)D	Normal, alto	Baixo, normal	Baixo, normal, alto	Baixo, normal, alto	Normal, alto
PTH intacto	Alto	Baixo	Alto	Alto	Alto
PTHr proteína	Normal	Alto	Normal	Normal	Normal

Tabela 15.5 Causas de anormalidade dos níveis de fosfato

Elevação
Hipoparatireoidismo e pseudo-hipoparatireoidismo
Insuficiência renal
Hipervitaminose D
Citólise
Obstrução pilórica
Diminuição
Consumo abusivo de álcool
Hiperparatireoidismo primário
Alcalose respiratória aguda
Mixedema
Esteroides exógenos/endógenos
Terapia diurética
Defeitos tubulares renais
Fosfatúria oncogênica
Coma diabético

Tabela 15.6 Causas de hipomagnesemia

Diminuição da ingestão/absorção
Desnutrição proteicocalórica
Inanição
Alcoolismo
Terapia endovenosa prolongada
Suplementação parenteral inadequada
Má absorção (p. ex., espru celíaco)
Imaturidade intestinal neonatal
Perdas GI excessivas:
Sucção gástrica prolongada
Uso de laxantes
Fístula intestinal ou biliar
Diarreia severa
Perdas renais excessivas
Uso de diuréticos
Necrose tubular aguda – fase diurética
Insuficiência renal aguda – diurese
Aldosteronismo primário
Hipercalcemia
Acidose tubular renal
Debilitação renal idiopática
Insuficiência renal crônica com debilitação
Diversas
Idiopática
Pancreatite aguda
Porfiria com SIADH
Transfusões múltiplas com sangue citratado
Endócrina:
Hipertireoidismo
Hiperparatireoidismo
Diabetes melito com cetoacidose diabética
Hiperaldosteronismo
Medicamentos (p. ex., cisplatina, ciclosporina, gentamicina, ticarcilina etc.)

Hipomagnesemia

A deficiência de magnésio é encontrada em aproximadamente 11% dos pacientes hospitalizados. A causa mais comum é a perda de magnésio a partir do trato GI ou do rim. A depleção via trato GI ocorre em casos de diarreia aguda e crônica, má absorção, esteatorreia após extensa resseção intestinal e em pacientes que apresentam hipomagnesemia intestinal primária – um raro erro inato do metabolismo. A perda excessiva de Mg^{2+} a partir dos rins frequentemente constitui a base da depleção de magnésio, uma vez que a reabsorção tubular de sódio permanece a mesma (sendo que o transporte passivo de magnésio acompanha o de sódio) ou porque há algum defeito primário na reabsorção tubular de Mg^{2+}. Os fatores que podem acarretar perdas de Mg^{2+} através da urina são uso de diuréticos da tiazida e de alça, aumento da excreção de sódio e expansão volumétrica (terapia líquida parenteral), hipercalcemia e hipercalciúria (hipertireoidismo ou malignidade), fármacos nefrotóxicos (antibióticos aminoglicosídicos, cisplatina, anfotericina B, ciclosporina). O diabetes melito constitui causa comum de hipomagnesemia, provavelmente secundária à glicosúria e à diurese osmótica. Outra causa importante e bastante usual de deficiência de magnésio é o consumo de álcool, que responde por cerca de 30% dos casos envolvendo pacientes alcoolizados que são admitidos ao hospital. A manutenção de um estresse ou estresses extensivos, incluindo aqueles causados por vários procedimentos cirúrgicos e doenças agudas, são fatores que podem estar associados à depressão dos níveis séricos de magnésio (Tab. 15.6).

Os sinais e sintomas da depleção de magnésio usualmente não aparecem até que os níveis extracelulares caiam a 0,5 mmol/L ou menos. As manifestações decorrentes de perdas significativas de magnésio devem-se em grande parte à hipocalcemia associada, e incluem uma hiperexcitabilidade neuromuscular caracterizada por espasmos caporpedais, ataques, fraqueza muscular, depressão, psicose, anormalidades metabólicas (intolerância a carboidratos, hiperinsulinemia) e arritmias cardíacas.

Marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo

O esqueleto sofre um processo de remodelamento constante que é essencial à saúde dos ossos. O remodelamento ósseo não ocorre isoladamente e inicia-se com a reabsorção do osso antigo pelos osteoclastos. Em seguida, os osteoblastos formam um novo osso. A perda óssea passa a ocorrer a partir da meia idade ou até mais precocemente, porque a reabsorção excede a formação. Esse fenômeno foi identificado há mais de 50 anos pelo Dr. Alton Fuller – o pai da doença óssea metabólica. Ele percebeu que mulheres menopaúsicas apresentavam elevados níveis urinários de cálcio e deduziu que se tratava do reflexo de um equilíbrio de cálcio negativo, que posteriormente poderia resultar no aparecimento de fraturas osteoporóticas. A deficiência de estrógenos, assim como diversas doenças e condições, acentua a reabsorção óssea (Watts, 1999).

Existem três procedimentos diagnósticos principais disponíveis para o monitoramento da renovação óssea e avaliação da doença óssea metabólica: técnicas de análise de imagem de ossos, biópsia óssea e utilização de marcadores bioquímicos da renovação óssea. Enquanto a medida da densidade óssea constitui importante ferramenta diagnóstica na osteoporose, o teste dificilmente detecta aumentos da renovação óssea logo nos estágios iniciais do processo ou monitora alterações agudas. Do mesmo modo, a densitometria óssea apenas fornece uma medida acumulada da matriz óssea mineralizada, sem definir distribuições anormais resultantes de perda óssea. A biópsia de osso consegue definir a distribuição da massa óssea e pode solucionar dúvidas acerca da mineralização que não são esclarecidas pela densitometria óssea. Entretanto, a biópsia óssea é um procedimento invasivo e, na ausência de defeitos de mineralização, proporciona um vislumbre relativamente estático de processos longos e lentos. Portanto, não é útil na supervisão clínica de rotina da osteoporose. Nessa doença, a perda óssea líquida é causada apenas por um discreto desequilíbrio da reabsorção em relação à formação de ossos. Por esse motivo, normalmente são utilizados marcadores convencionais, como cálcio e PTH. Em contraste, os marcadores de renovação óssea são mais sensíveis a alterações mínimas e podem ser empregados na detecção e no monitoramento da progressão de doenças ósseas metabólicas. A avaliação laboratorial de tais marcadores tem sido alvo de muita atenção nos últimos anos (Ju, 1997; Souberbielle, 1999).

Marcadores da reabsorção óssea

O tecido ósseo possui três componentes: uma matriz orgânica (denominada osteoide), minerais ósseos e células ósseas. Os marcadores de

reabsorção óssea abrangem constituintes da matriz óssea, incluindo cálcio e produtos da degradação do colágeno (tais como hidroxiprolina, ligações cruzadas de piridínio e telopeptídeos), além de produtos celulares (fosfatase ácida resistente ao tartarato [TRAP, *tartrate-resistant acid phosphatase*]). O cálcio urinário é afetado pela dieta e pela função renal e, assim, não é sensível nem específico para ser adequadamente utilizado na avaliação do remodelamento ósseo (Watts, 1999). A TRAP, uma enzima lisossômica encontrada nos osteoclastos, não é considerada um parâmetro útil para testes. A quantificação dos aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina glicosilada (galactosil e glicosil-galactosil) não é específica para o colágeno esquelético e, de acordo com análises de histomorfometria óssea e cinética de cálcio, apresenta pouca correlação com a reabsorção óssea. Os testes mais úteis são as determinações de ligações cruzadas de piridínio e de telopeptídeos em ligação cruzada.

Ligações cruzadas de piridínio (piridinolina e desoxipiridinolina)

As fibrilas de colágeno são constituídas por muitos aminoácidos em ligação cruzada que efetivamente estabilizam a molécula de colágeno madura. Esses aminoácidos são a piridinolina (Pyr), um polímero em ligação cruzada composto por três resíduos de hidroxilisina, e a desoxipiridinolina (Dpyr), que é formada a partir de dois resíduos de hidroxilisina e um resíduo de lisina. Essas ligações cruzadas são encontradas no colágeno de tipos I, II e III e, embora não estejam presentes exclusivamente nos ossos, apresentam uma proporção que é única a tais estruturas. Essa propriedade faz dos aminoácidos candidatos ideais ao uso como marcadores de quebra óssea. No colágeno encontrado na maioria dos demais tecidos, a proporção Pyr: Dpyr é de 10:1, enquanto nos ossos é de 3 a 3,5:1. Essa diferença significa que a Dpyr é mais abundante nos ossos e na doença óssea metabólica. A Dpyr é essencialmente específica para o osso, visto ser encontrada em quantidades relativamente significativas nesse local, e demonstrou uma boa correlação com a renovação óssea (Robbins, 1995). Outra característica que contribui para tornar a avaliação das ligações de piridínio uma ferramenta ideal é que nenhuma delas é metabolizada, quando liberada, ou absorvida a partir da dieta. São todas excretadas através da urina na forma livre (40%) e na forma ligada ao peptídeo (60%). Uma vez que as moléculas de ligação cruzada são encontradas somente no colágeno maduro, sua excreção pela urina reflete a quebra dessas moléculas de colágeno, de modo que não representam a quebra de moléculas de colágeno ósseo recém-sintetizadas (Watts, 1999). A excreção de Pyr e Dpyr aumenta após a menopausa e pode ser utilizada para estudar o efeito da terapia de reposição hormonal sobre a renovação óssea (Fledelius, 1994). As aplicações clínicas da quantificação dessas substâncias incluem identificação de indivíduos sob risco de perda óssea, avaliação de doença óssea metabólica, predição de metástases ósseas em pacientes com câncer e monitoramento da terapia antirreabsortiva. Pyr e Dpyr são quantificados na urina por cromatografia líquida de alto desempenho (ou de alta pressão) (HPLC, *high pressure liquid chromatography*) ou através de imunoensaios. É preciso ter cautela com a marcante variação diurna observada na concentração urinária de piridinolinas, cujos picos ocorrem tarde da noite e bem cedo, pela manhã. Enquanto a coleta da urina de 24 horas evita esse aspecto e não requer a correção da concentração de creatinina, uma amostra de urina coletada pela manhã, com o indivíduo em jejum, e corrigida quanto à concentração de creatinina, constitui um marcador mais sensível de renovação óssea (Bettica, 1992).

Telopeptídeos em ligação cruzada

Durante a reabsorção óssea, apenas 40% das ligações cruzadas são liberadas na forma de ligações cruzadas de piridinolinas livres. Os 60% restantes correspondem a ligações cruzadas acopladas a peptídeos (Risteli, 1993). O colágeno de tipo I possui dois sítios em que há ligações cruzadas acopladas. Esses sítios são denominados telopeptídeos, uma vez que se encontram na região amino e carboxiterminal da molécula de colágeno. Quando o colágeno é degradado, os telopeptídeos são liberados na circulação e, em seguida, excretados na urina. Os aminotelopeptídeos (NTx) e carboxitelopeptídeos (CTx) são excretados na urina e podem ser quantificados por imunoensaios.

Os telopeptídeos em ligação cruzada têm sido utilizados para estimar os riscos relativos de fratura de quadril em mulheres pós-menopáusicas, e mostraram-se promissores na predição de tais complicações da osteoporose (Chapurlat, 2000; Swaminathan, 2001).

Enquanto os níveis basais de telopeptídeos em ligação cruzada não necessariamente estão correlacionados à densidade mineral óssea basal, sua quantificação seriada mostrou-se útil na predição da resposta inicial à terapia (Fink, 2000). Estudos demonstraram reduções de 50 a 60% da concentração urinária de CTx e NTx em um período de 3 a 6 meses de terapia antirreabsortiva (Eatell, 2003), bem como a correlação dessas reduções com a predição da resposta de massa óssea a longo prazo (Ravn, 2003).

Marcadores da formação óssea

Os marcadores da formação óssea são a fosfatase alcalina e mais três produtos de síntese da matriz óssea, incluindo osteocalcina e peptídeos de extensão amino e carboxiterminal de pró-colágeno I.

Fosfatase alcalina (ver Cap. 20)

A fosfatase alcalina óssea (ALP-B), uma enzima acoplada à membrana celular do osteoclasto, é liberada na circulação por ação da fosfatidilinositol glicanase e formação de vesículas a partir da membrana. Estudos demonstraram que a medida da atividade de ALP-B nos osteoclastos e nos ossos é proporcional à formação de colágeno. Sendo assim, essa atividade pode representar um índice da taxa de formação óssea. O soro humano contém uma mistura variável de isoenzimas ALP provenientes do fígado, intestino, rim e ossos. Durante a gravidez, a fosfatase alcalina pode derivar da placenta (Farley, 1994). Certos tumores malignos também podem produzir uma isozima de ALP que é estável ao calor. A função da ALP é desconhecida, entretanto, tem sido postulado que seu papel provavelmente tem a ver com a mineralização de ossos recém-formados. A quantificação dos níveis séricos totais de ALP é útil para acompanhar a atividade de doenças em que a concentração de isoenzimas eleva-se excepcionalmente, como ocorre na doença de Paget ou em osteossarcomas.

As duas principais isoenzimas da APL circulantes – óssea e hepática – são difíceis de serem distinguidas, uma vez que constituem produtos de um mesmo gene e diferem apenas quanto à glicosilação pós-translacional. O isolamento da ALP esquelética pode ser conseguido por meio da inativação por aquecimento, precipitação por aglutinação de germe de trigo, eletroforese, focalização isoelétrica e ensaios imunorradiométricos de dois sítios. Atualmente, o imunoensaio é o método de escolha, por causa do elevado grau de especificidade e do nível de precisão satisfatório.

Osteocalcina

A osteocalcina é a principal proteína não colágena da matriz óssea. É um polipeptídeo composto por 49 aminoácidos, rico em ácido glutâmico. A sua função ainda é pouco compreendida, contudo sabe-se que pode atuar como sítio de deposição de cristais de hidroxiapatita. Durante a síntese da matriz óssea, uma certa quantidade de osteocalcina é liberada na circulação e é rapidamente depurada pelos rins. A osteocalcina pode ser quantificada por meio de imunoensaio em amostras de plasma ou soro. Entretanto, os testes para osteocalcina não estão padronizados, porque os diferentes anticorpos que utiliza reconhecem fragmentos distintos. Os anticorpos que reconhecem a molécula intacta e o grande fragmento aminoterminal intermediário aparentemente são os que fornecem a melhor informação clínica (Watts, 1999). Estudos recentes demonstraram que a vitamina K, embora não afete a concentração de osteocalcina, influencia a carboxilação dessa proteína. Foi sugerido que a osteocalcina subcarboxilada constitui um melhor indicador na previsão de certos resultados, como uma fratura, por exemplo (Vergnaud, 1997). A osteocalcina é metabolizada principalmente no rim e, em menor extensão, no fígado. Sua meia-vida na circulação é de cerca de 5 minutos. Os níveis de osteocalcina aumentam diante de uma elevada taxa de renovação óssea, como a observada no hiperparatireoidismo, acromegalia e doença de Paget. A sua concentração diminui no hipoparatireoidismo, hipotireoidismo e em pacientes sob terapia com glicocorticoides. Os intervalos de referência para osteocalcina são de aproximadamente 1,1 a 11 ng/mL (homem adulto) e 0,7 a 6,5 ng/mL (mulher adulta).

Doença óssea metabólica

A doença óssea metabólica pode ser definida como uma doença metabólica geral que afeta totalmente o esqueleto. Sendo generalizada, por definição envolve cada osso do corpo. Consequentemente, uma biópsia de qualquer osso deve refletir algum grau de alteração metabólica. Enquanto são muito poucas as doenças metabólicas em que há aumento da densidade óssea (p. ex., fluorose, toxicidade por vitamina A), a grande maioria das doenças metabólicas ósseas constitui problemas clínicos que acarretam a diminuição da densidade óssea. Como resultado, os ossos podem apresentar a diminuição da matriz orgânica com mineralização normal (p. ex., osteoporose), redução do conteúdo mineral sem diminuição significativa da matriz orgânica (p. ex., osteomalacia), ou diminuição tanto da matriz orgânica como do conteúdo mineral (p. ex., osteodistrofia renal).

Osteoporose

A osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum (Tab. 15.7). Trata-se de um distúrbio esquelético sistêmico caracterizado pela diminuição da matriz orgânica óssea, bem como deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com subsequente aumento da fragilidade do osso e suscetibilidade a fraturas (Ferrari, 1999). Enquanto sua expressão pode se manifestar pela baixa densidade mineral óssea, a qual pode ser detectada por absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA, *dual-energy X-ray absorptiometry*), a anomalia absolutamente não reflete uma mineralização anormal, visto que os minerais encontram-se tanto na estrutura como no conteúdo. Em vez disso, a massa óssea total diminui primariamente na osteoporose, em consequência da diminuição do conteúdo de colágeno ósseo.

A massa e a resistência óssea estão relacionadas à densidade volumétrica, ao tamanho do osso, à microarquitetura e à qualidade intrínseca ao tecido. Esses fatores são propensos a sofrer alterações durante o crescimento e a perda óssea, com modificações seletivas de acordo com a localização no esqueleto. Mulheres brancas e asiáticas em pós-menopausa, magras ou de pequena estatura e com história familiar positiva apresentam grande risco de desenvolver a doença. Outros fatores de risco incluem fumo, álcool em excesso, estilo de vida sedentário e consumo muito baixo de cálcio. Fortes evidências indicam que fatores genéticos e associados ao estilo de vida constituem determinantes importantes do pico de massa óssea.

À medida que o osso se torna menos denso, sua radiotransparência aumenta. Esse aspecto pode ser causado pela diminuição do conteúdo de colágeno e/ou de minerais. Coletivamente, a condição é denominada *osteopenia* – um termo radiográfico que não discrimina os diferentes tipos de doença óssea metabólica. A finalidade desse termo não deve ser confundida com o uso que lhe é atribuído nos estudos de densitometria, onde "osteopenia" se refere a uma perda significativa de densidade óssea, cujo valor corresponde a aproximadamente um desvio-padrão abaixo do valor de definição da osteoporose. A perda radiológica de massa óssea se deve à perda de osso compacto e esponjoso, porém os problemas esqueléticos mais comumente associados à osteoporose aparecem com a perda de osso esponjoso. Tal fato se deve tanto ao arranjo de cada tipo de osso, como à real massa óssea reduzida.

Tabela 15.7 Deficiências na matriz óssea orgânica

Osteoporose primária
Idiopática (crianças e adultos jovens)
Pós-menopáusica
Senil
Osteoporose secundária
Hiperparatireoidismo
Hiperadrenocorticismo
Hipogonadismo
Tirotoxicose
Imobilização
Deficiência de cálcio
Administração de heparina por tempo prolongado
Diversas (alcoolismo, desnutrição, doença hepática, artrite reumatoide, má absorção)
Distúrbios do tecido conjuntivo
Osteogênese imperfeita
Síndrome de Ehlers-Danlos
Síndrome de Marfan

Enquanto o córtex ósseo forma um anel contínuo, a resistência da diáfise de um osso longo é proporcional ao cubo da distância que vai do centro da cavidade medular ao lado externo do córtex. A sua rigidez é proporcional a essa mesma distância elevada à quarta potência. Considerando que a reabsorção do osso compacto envolve principalmente o endósteo e é promovida pelos osteoclastos, isso significa que, à medida que os ossos compactos se tornam mais osteoporóticos, suas diáfises se tornam cada vez mais ocas. O processo de escavação das diáfises é mais ou menos compensado por uma ossificação membranosa da superfície cortical. Consequentemente, quando a cavidade medular é ampliada por osteoclasia endosteal, o diâmetro do córtex também aumenta. Esse alargamento implica o aumento do raio (distância do ponto médio medular até o lado externo do córtex). Como a resistência do osso intacto é proporcional ao cubo desse raio, uma pequena ampliação do osso apositivo pode compensar biomecanicamente uma grande perda de osso endosteal (Fig. 15.7).

O osso esponjoso (trabecular), por outro lado, é afetado mais precocemente pela osteoporose, não só porque sua massa é menor, mas por causa de sua arquitetura. Seu arranjo consiste em finas placas paralelas, altamente perfuradas e orientadas na vertical, que são sustentadas lateralmente por esteios ainda mais delgados dispostos na horizontal. Apenas 25% do compartimento de ossos esponjosos, em termos de volume, é constituído por osso. O restante corresponde a espaços intertrabeculares preenchidos com gordura e medula (ver Fig. 15.1*B*). Em comparação ao córtex, a proporção entre a superfície e o volume é bastante elevada nesse osso, proporcionando a todas as células ósseas o livre acesso às delicadas superfícies das trabéculas. Em consequência, sua reabsorção ocorre mais rapidamente do que no osso cortical. Além disso, caso a taxa de reabsorção osteoclástica seja a mesma em todas as partes que o compõem, os esteios horizontais que sustentam e reforçam as placas verticais podem ser perdidos mais cedo, pois a princípio sua massa óssea é significativamente menor que a das placas verticais. A reabsorção dessas estruturas de apoio horizontais contribui proporcionalmente mais para a morbidade da osteoporose, do que a perda difusa de massa óssea. À medida que os esteios desaparecem, as trabéculas verticais formam segmentos em linha vertical cada vez mais longos, os quais ficam sujeitos a forças de arqueamento progressivamente maiores (Fig. 15.8). O aumento do comprimento de cada um desses segmentos trabeculares alongados verticais os torna mais suscetíveis a fraturas por fadiga, à razão do quadrado do fator de incremento do comprimento. Assim, se o comprimento desprotegido de uma placa vertical aumenta duas vezes, torna-se quatro vezes mais suscetível a fraturas. Não surpreende que o indivíduo apresente dor, deformações esqueléticas e fraturas como sequelas comuns. A osteoporose pode ser etiologicamente classificada nos tipos primário e secundário. Na primária, são observadas típicas associações complexas e idade do paciente, porém a etiologia exata da perda óssea permanece desconhecida. O tipo mais comum de osteoporose primária é a osteoporose pós-menopáusica, que ocorre em condições de queda dos níveis hormonais, apresenta perda de massa óssea máxima na primeira década da menopausa e aparentemente está associada ao aumento da atividade osteoclástica. A sua principal manifestação é a perda de osso esponjoso. A osteoporose chamada "senil" manifesta-se depois de uma década (ou mais) do aparecimento da forma pós-menopáusica e está associada ao declínio do número de osteoblastos proporcionalmente à demanda pela atividade dos mesmos. A forma senil afeta principalmente o osso compacto (Manolagas, 1995). A osteoporose idiopática juvenil ocorre próximo à puberdade e está associada ao aumento da atividade osteoclástica. Diferente da variedades pós-menopáusica e senil, costuma ser autolimitada e permite a recuperação de uma boa parte da massa óssea esquelética.

Na osteoporose secundária, a causa da perda de massa óssea é conhecida e, às vezes, pode ser prevenida ou revertida. As etiologias incluem hiperparatireoidismo e outras endocrinopatias, lesões que ocupam o espaço medular e elevam a pressão no interior da cavidade

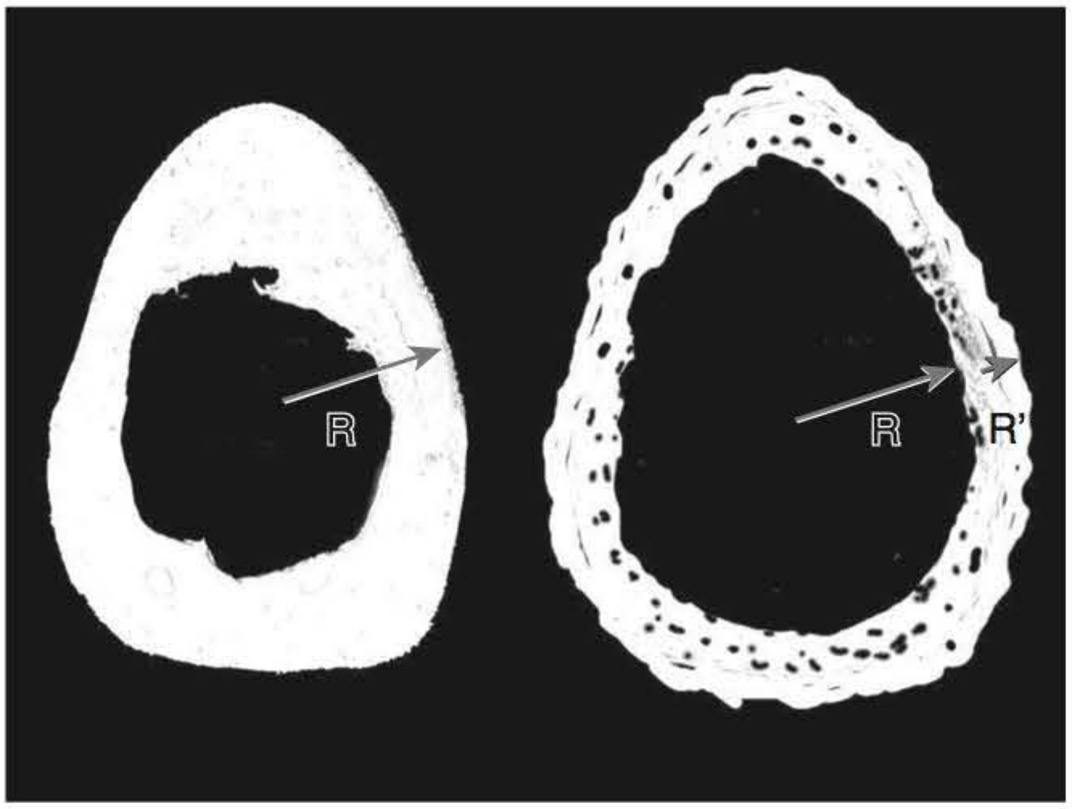


Figura 15.7 Comparação esquemática do córtex femoral entre dois homens, um de 30 anos de idade (esquerda) e outro de 75 anos (direita). Note que a resistência proporcional da diáfise óssea é maior no córtex da direita.

Figura 15.8 Osteoporose de vértebra lombar. Há uma perda óssea generalizada. As placas verticais se tornaram mais perfuradas, e o número de suportes transversais horizontais diminuiu acentuadamente em relação ao número de placas verticais (comparar com a Fig. 15.1*B*).

medular, deficiência de cálcio, má absorção, administração de esteroides ou heparina e imobilização.

Certos distúrbios do tecido conjuntivo, tais como osteogênese imperfeita, síndrome de Marfan e síndrome de Ehlers-Danlos, também resultam em osteoporose estrutural ou funcional.

Osteomalacia e raquitismo

Trata-se de dois distúrbios de calcificação. A osteomalacia consiste na falha da mineralização da matriz orgânica recém-formada (osteoide) no esqueleto maduro. A formação do osteoide prossegue, contudo os ossos gradualmente se tornam mais moles, à medida que a proporção entre osteoide e osso mineralizado aumenta ao longo do tempo. Conforme a doença avança, o indivíduo pode apresentar fraqueza, dor e deformidades esqueléticas, além de fraturas. O exame radiográfico revela uma diminuição generalizada da radiodensidade esquelética. O fato de o esqueleto se tornar menos radiodenso não permite discriminar entre a perda absoluta de mineralização e a perda de matriz orgânica mineralizada (osteoporose).

O raquitismo, uma doença da infância, é a designação para a osteomalacia que ocorre antes da cessação do crescimento, ou seja, antes do fechamento das placas epifisárias dos ossos longos. No raquitismo, as deformidades esqueléticas são acentuadas em consequência do supercrescimento compensatório da cartilagem epifisária, da qual amplas faixas permanecem sem serem mineralizadas nem reabsorvidas. Nos casos mais severos, a observada diminuição do crescimento pode estar associada a deformidades evidentes, como inchaço das junções costocondrais das costelas (rosário raquítico), um esterno protuberante, depressão costodiafragmática (sulco de Harrison), fechamento tardio da fontanela anterior com formação de protuberância (bossa) frontal e visível alargamento das metáfises dos ossos longos.

A mineralização ótima requer: (1) suprimento adequado de íons de cálcio e fosfato; (2) pH apropriado (~7,6); (3) matriz óssea de composição bioquímica e taxa de síntese normais; e (4) controle dos inibidores do processo de mineralização. As principais categorias de doenças causadoras de osteomalacia ou raquitismo são os estados de deficiência de vitamina D, a depleção de fosfato, acidose sistêmica e inibidoras da mineralização.

A deficiência de vitamina D é particularmente importante durante a infância e pode ser causada pela ingestão dietética inadequada, má absorção intestinal, diminuição da síntese de metabólitos ativos, aumento do catabolismo ou aumento da resistência periférica à ação da vitamina. A deficiência dietética é bastante rara nos EUA, por causa do consumo amplamente disseminado de leite fortificado, pão e suplementos vitamínicos. Quando a deficiência de vitamina D acomete indivíduos adultos, usualmente é uma consequência de má absorção. Como essa vitamina é lipossolúvel, sua absorção é comprometida pela doença celíaca (espru não tropical), doença biliar e pancreática ou esteatorreia por causas variadas. Uma resistência sistêmica à vitamina D pode ter importância fundamental nos casos de osteomalacia que acompanham uma doença renal crônica. Por outro lado, a resistência hereditária a $1,25(OH)_2D_3$ – frequentemente denominada raquitismo dependente de vitamina D de tipo II – é um distúrbio raro causado por uma variedade de defeitos envolvendo o receptor da vitamina.

Osteodistrofia renal

A osteodistrofia renal se refere ao espectro de anomalias ósseas observado em pacientes com doença renal em estágio terminal (ESRD, *end-stage renal disease*): predominantemente, osteíte fibrosa cística, osteomalacia ou uma combinação de ambas (ver Hiperparatireoidismo secundário – Fig. 15.5). A osteíte fibrosa cística caracteriza-se por um aumento da renovação óssea decorrente de hiperparatireoidismo secundário – uma condição em que há diminuição dos níveis de $1,25(OH)_2D_3$ e cálcio ionizado. (Em geral, a dissolução óssea é acelerada e a formação de osso diminui.) A osteomalacia é caracterizada pela mineralização inadequada dos ossos, resultando no acúmulo de osteoides superficiais (osso sem mineralização). Os osteoclastos não penetram (reabsorvem) nas áreas de acúmulo, pois somente são atraídos para superfícies mineralizadas. Assim, os osteoclastos cavam cones perfurantes através das superfícies mineralizadas disponíveis, adentrando os núcleos mineralizados das trabéculas antigas. Esse fenômeno é histologicamente referido como "reabsorção por tunelização", por causa do modo utilizado pelos osteoclastos para acessar o osso mineralizado (Fig. 15.9).

Na osteomalacia que acomete pacientes com ESRD, o processo defeituoso de mineralização pode ser atribuído aos baixos níveis séricos de cálcio, ao acúmulo de alumínio no osso ou, ainda, a outros fatores

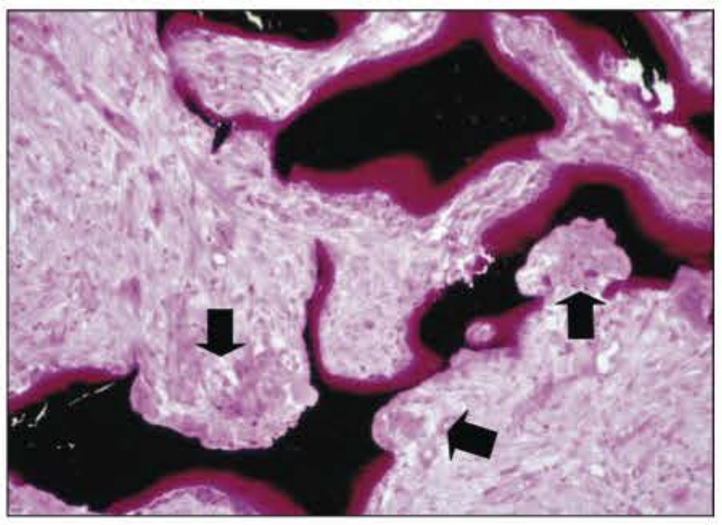


Figura 15.9 Osteotrofia renal com hiperparatireoidismo e osteomalacia. Esta secção descalcificada foi corada pelo método de Von Kossa, que cora de preto os ossos mineralizados e de alizarina vermelha o osteoide formado. As espessas áreas avermelhadas representam linhas de junção de osteoides recém-formados, resultantes de insuficiência renal (ver Fig. 15.10*A*). As setas sólidas pretas apontam os cones perfurantes da tunelização osteoclástica no interior da substância mineralizada das trabéculas ósseas. Observe que essas superfícies de reabsorção recortadas ocorrem somente nas áreas escuras. Os osteoclastos estão ausentes nas áreas lisas avermelhadas (250 ×).

não explicados. Pacientes com insuficiência renal submetidos ao tratamento oral com substâncias ligadoras de fosfato contendo alumínio (para controle de hiperfosfatemia), ou aqueles que se submetem à hemodiálise utilizando dialisados contendo alumínio estão sujeitos ao desenvolvimento de osteomalacia. Isso ocorre porque o íon alumínio interfere no processo normal de formação da treliça de hidroxiapatita. Biópsias de osso descalcificado coradas para detecção de alumínio são capazes de distinguir esse tipo de osteomalacia dos demais tipos mais usuais da doença (Fig. 15.10*A* e *B*).

Doença de Paget

A doença óssea de Paget (osteíte deformante) é um distúrbio crônico envolvendo os ossos, que pode ser uni ou multifocal. Embora assemelhe-se a uma doença metabólica, uma vez que os ossos afetados tornam-se estrutural e funcionalmente anormais, não se trata de uma verdadeira doença metabólica por haver ossos que não são envolvidos e permanecem normais. A sua causa permanece desconhecida. Entretanto, há suspeita de que a sua origem seja viral, pois foram identificadas partículas similares ao paramixovírus no núcleo dos osteoclastos de ossos afetados. Há casos em que é identificada uma história familiar da doença. Seja qual for a etiologia, observa-se o desacoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos, com predominância da atividade osteoclástica no início da doença e, no estágio final, predominância da atividade osteoblástica. Os osteoclastos frequentemente apresentam tamanho aumentado e aspecto bizarro, com 50 ou mais núcleos. As trabéculas apresentam recortes denteados e erosões, com múltiplas lacunas de Howship, fibrose paratrabecular e hipervascularização medular. O quadro histológico inicial lembra o da osteíte fibrosa do hiperparatireoidismo. À medida que ocorre produção osteoblástica de osso novo, as lacunas de Howship são preenchidas com pedaços irregulares de osso maduro e imaturo. Os contornos das delimitações originais da reabsorção osteoclástica são preservados em forma de linhas de cemento invertidas e irregularmente dispostas, de modo que o osso resultante assemelha-se a um mosaico de telhas. O osso formado nesse processo é estruturalmente fraco, suscetível tanto a deformações como fraturas. Pacientes com extensas lesões ósseas e doença cardíaca subjacente podem desenvolver, como complicação, uma insuficiência cardíaca de alto débito. Cerca de 1% dos pacientes eventualmente desenvolve sarcomas ósseos, usualmente com diferenciação osteossarcomatosa. Os achados laboratoriais, até certo ponto, são interessantes. Embora os níveis séricos de cálcio e as concentrações de fósforo inorgânico sejam tipicamente normais, há ocasiões em que podem se tornar elevadas. De fato, os níveis séricos de cálcio podem subir bastante, se for imobilizada uma extensa área afetada pela doença de Paget. Uma vez iniciada a atividade osteoblástica, há elevação dos níveis de fosfatase alcalina, a qual pode, então, ser utilizada no acompanhamento da atividade da fase de síntese óssea da doença. Os níveis de fosfatase alcalina aumentam ainda mais, caso o paciente com doença de Paget desenvolva osteossarcoma. A excreção urinária de cálcio e fósforo permanece normal ou aumenta, enquanto a excreção de hidroxiprolina costuma estar significativamente aumentada. Com frequência, a doença de Paget responde tanto clínica quanto patologicamente à administração terapêutica de calcitonina.

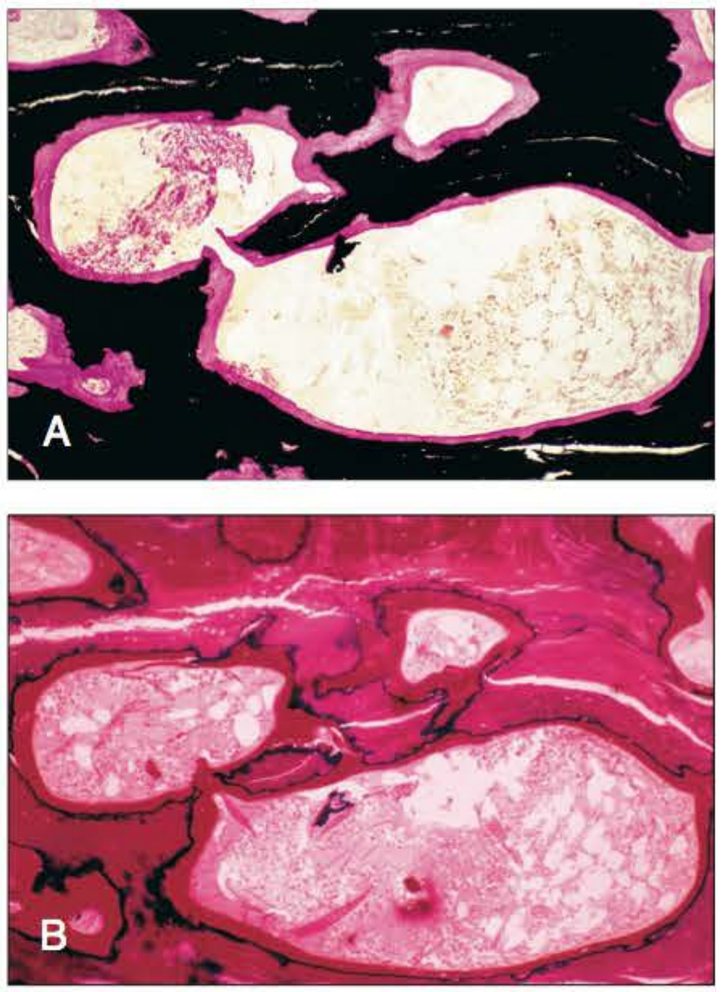


Figura 15.10 Osteomalacia na osteodistrofia renal. *A*, a coloração de Von Kossa mostra o osso previamente formado corado em preto; o osteoide recém-sintetizado e desmineralizado foi corado de vermelho magenta. Observe que todas as superfícies estão cobertas por espessas linhas de junção de osteoide coradas em magenta (125 ×). *B*, o mesmo campo da mesma biópsia corado com solocromo azurine para detecção de alumínio. Note que as linhas demarcadoras entre as áreas coradas de preto e de vermelho aparecem em azul escuro. Essa coloração se deve à presença do alumínio derivado das substâncias ligadoras de fosfato dietéticas. O alumínio foi incorporado à matriz óssea de hidroxiapatita e interfere no processo de mineralização (125 ×).

Referências bibliográficas

Bastepe M, Raas-Rothschild A, Silver J, et al: A form of Jansen's metaphyseal chondrodysplasia with limited metabolic and skeletal abnormalities is caused by a novel activating parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(7):3595–3600.

Bellorin-Font E, Starosta R, Milanes CL, et al: Effect of acidosis on PTH-dependent renal adenylate cyclase in phosphorus deprivation: Role of G proteins. Am J Physiol 1990; 258:F1640–F1649.

Bettica P, Moro L, Robins SP, et al: Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. Clin Chem 1992; 38:2313–2318.

Boden SD, Kaplan FS: Calcium homeostasis. Orthop Clin North Am 1990; 21:31.

Brossard JH, et al: Influence of glomerular filtration on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays. Clin Chem 2000; 46:697–703.

Care AD, Bruce JB, Boelkins LJ, et al: Role of pancreozymin-cholecystokinin and structurally related compounds as calcitonin secretogogues. Endocrinology 1971; 89(1):262–271.

Cecco SA, Hristova EN, Rehak NN, et al: Clinically important intermethod differences for physiologically abnormal ionized magnesium results. Am J Clin Pathol 1997; 108:564–569.

Chapurlat RD, Garnero P, Brart G, et al: Serum type I collagen breakdown product (SerumCTX) predicts hip fracture risk in elderly women: The EPIDOS study. Bone 2000; 27:283–286.

Deftos LJ, Parethemore JG, Stabile BE: Management of primary hyperparathyroidism. Annu Rev Med 1993; 44:19.

Eatell R, et al: Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. Journal of Bone and Mineral Research 2003; 18(6):1051–1056.

Elin RJ: Magnesium metabolism in health and disease. Dis Mon 1988; 34:161.

Endres DB, Rude RK: Mineral and bone metabolism. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1999, pp 1395–1457.

Farley JR, Hall SL, Ilacas D, et al: Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat germ agglutinin precipitation, heat inactivation, and two-site immunoradiometric assay. Clin Chem 1994; 40:1749–1756.

Ferrari S, Rizzoli R, Bonjour JP: Genetic aspects of osteoporosis. Curr Opin Rheumatol 1999; 11:294–300.

Fink et al: Differences in the capacity of several biochemical markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. Osteoporosis International 2000; 11(4):295–303.

Fledelius C, Riis BJ, Overgaard K, Christiansen C: The diagnostic validity of urinary free pyridinolines to identify women at risk of osteoporosis. Calcif Tissue Int 1994; 54(5):381–384.

Folpe AL, Fanburg-Smith JC, Billings SD, et al: Most osteomalacia-associated mesenchymal tumors are a single histopathologic entity: an analysis of 32 cases and a comprehensive review of the literature. Am J Surg Pathol 2004; 28(1):1–30

Goldstein RE, Blevins L, Delbeke D, Martin WH: Efficacy of minimally invasive radioguided parathyroidectomy on efficacy, length of stay, and costs in the management of primary hyperparathyroidism. Ann Surg 1991; 15:716–723.

Goldstein RE, Blevins L, Delbeke D, et al: Effect of minimally invasive radioguided parathyroidectomy on efficacy, length of stay, and costs in the management of primary hyperparathyroidism. Ann Surg 2000; 231(5):732–742.

Horvit PK, Gagel RF: The goitrous patient with an elevated serum calcitonin – what to do? J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(2):335–337.

Horwitz MJ, et al: Short-term high dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(2):569–575.

Hristova EN, Cecco S, Niemela JE, et al: Analyzer-dependent differences in results for ionized calcium, ionized magnesium, sodium, and pH. Clin Chem 1995; 41:1649–1653.

Huijgen HJ, Sanders R, Cecco SA, et al: Serum ionized magnesium: Comparison of results obtained with three ion-selective analyzers. Clin Chem Lab Med 1999; 37:465–470.

Hsu H. et al: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:3540–3545.

Ju HSJ, Leung S, Brown B, et al: Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. Clin Chem 1997; 43:1570–1576.

Kurokawa K, Fukagawa M: Introduction to renal osteodystrophy: Calcium metabolism in health and uremia. Am J Med Sci 1999; 317:355–356.

Lewiecki EM: Management of osteoporosis. Clin and Molec Allergy 2004; 2:9.

Manolagas SC, Jilka RL: Mechanisms of disease: Bone marrow, cytokines, and bone remodeling – emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med 1995; 332:305.

Mundy GR, Guise TA: Hormonal control of calcium homeostasis. Clin Chem 1999; 45:1347–1352.

Visão geral sobre a fisiologia e patofisiologia do cálcio, incluindo os papeis do PTH, vitamina D, peptídeo relacionado ao PTH e calcitocina. Também apresenta as defesas fisiológicas atuantes contra a hipercalcemia e a hipocalemia.

Nelson AE, Bligh RC, Mirams M, et al: Clinical case seminar: Fibroblast growth factor 23: a new clinical marker for oncogenic osteomalacia. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(9):4088–4094.

Nichols Advantage BIO-INTACT PTH assay directional insert, ADS document 7040, 2004.

Papapoulos SE, et al: The effect of renal function on changes in circulating concentrations of 1,25 dihydroxycholecalciferol after an oral dose. Clin Sci 1982; 62(4):427–429.

Papazachariou IM, Martinez-Isla A, Efthimiou E, et al: Magnesium deficiency in patients with chronic pancreatitis identified by an intravenous loading test. Clinica Chimica Acta 2000; 302(1–2):145–154.

Quamme GA: Control of magnesium transport in the thick ascending limb. Am J Physiol 1989; 256:F197–F210.

Quamme GA: Renal magnesium handling: New insights in understanding old problems. Kidney Int 1997; 52:1180–1195.

Quarles LD, et al: Intact parathyroid hormone overestimates the presence and severity of parathyroid mediated osseous abnormalities in uremia. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:145–150.

Raisz LG: Physiology and pathophysiology of bone remodeling. Clin Chem 1999; 45:1353–1358.

Ravn P, et al: Biochemical markers for prediction of 4-year response in bone mass during bisphosphonate treatment for prevention of postmenopausal osteoporosis. Bone 2003; 33(1):150–158

Rieu M, Lame MC, Richard A, et al: Prevalence of sporadic medullary thyroid carcinoma: the importance of routine measurement of serum calcitonin in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. Clin Endocrinol 1995; 42:453–460.

Risteli L, Risteli J: Biochemical markers of bone metabolism. Ann Med 1993; 25:385–393.

Robins SP: Collagen crosslinks in metabolic bone disease. Acta Orthop Scand 1995; 66(Suppl 266):171–175.

Sofferman RA, Standage J, Tang ME: Minimal-access parathyroid surgery using intraoperative parathyroid hormone assay. Laryngoscope 1998; 108:1497–1503.

Sokoll LJ, Drew H, Udelsman R: Intraoperative parathyroid hormone analysis: A study of 200 consecutive cases. Clin Chem 2000; 46: 1662–1668.

Sokoll L, Remaley A, Sena S, et al: National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines. Evidence-Based Practice for POCT. Intraoperative PTH. Draft 2 October 15, 2004.

Esta revisão abrangente baseada em evidências propõe diretrizes de prática para todos os aspectos intraoperatórios relacionados ao PTH, incluindo indicações clínicas, tempo de coleta, método, localização do teste e impacto financeiro. As diretrizes são organizadas em um formato claro de perguntaas e respostas.

Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C: Bone markers in clinical practice. Curr Opin Rheumatol 1999; 11:312–319.

Strewler GJ: Hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone-related protein. *In* Clark OH, Duh Q-Y (eds), Textbook of Endocrine Surgery. Philadelphia, WB Saunders Company, 1997, pp 426–431.

Swaminathan R: Biochemical markers of bone turnover. Clinica Chimica Acta 2001; 313:95–105.

Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, et al: Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: The EPIDOS study. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:719–724.

Watts NB: Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. Clin Chem 1999; 45:1359–1368.

Trata-se de uma revisão completa sobre marcadores de reabsorção e formação óssea, incluindo aspectos referentes à variabilidade biológica, variabilidade dos ensaios e usos clínicos. Este último aspecto é apresentado em um formato útil de perguntas e respostas clínicas, do tipo "O paciente está respondendo ao tratamento?"

Wang S, McDonnell EH, Sedor FA, Toffaletti JG: pH effects on measurements of ionized calcium and ionized magnesium in blood, Arch Pathol Lab Med 2002; 126(8):947–950.

Weisinger JR, Bellorin-Font E: Magnesium and phosphorus. Lancet 1998; 352:391–396.

Yin JJ, Chirgwin JM, Dallas M, et al: Blockage of TGFβ signaling inhibits PTH-rP secretion by breast cancer cells and the development of bone metastasis. J Clin Invest 1999; 103:197–206.

CAPÍTULO 16

Carboidratos

Mukhtar I. Khan MD, Ruth S. Weinstock MD PhD

Introdução 215
Função do pâncreas endócrino 216
Insulina 216
Glucagon 217
Incretinas 218
Somatostatina 218
Quantificação de glicose 218
Considerações sobre a amostra 218
Métodos de quantificação da glicose 218
Diabetes melito 219
Introdução 219
Diabetes de tipo 1 221
Diabetes de tipo 2 222
Medidas de controle glicêmico 223
Teste de cetonas 224
Hipoglicemia 224
Distúrbios hipoglicêmicos 224
Erros inatos do metabolismo de carboidratos 227
Defeitos do metabolismo de galactose 227
Defeitos do metabolismo de frutose 227
Acidose lática 227
Referências bibliográficas 230

PONTOS-CHAVE

- O diagnóstico de diabetes requer a detecção de uma concentração plasmática de glicose em jejum ≥126 mg/dL (7,0 mmol/L) em pelo menos duas ocasiões, ou de eventuais níveis plasmáticos de glicose (ou níveis determinados 2 horas após a sobrecarga de glicose) ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). Normalmente, a concentração plasmática de glicose em jejum é < 100 mg/dL (5,6 mmol/L) e os níveis de glicose 2 horas após a sobrecarga são < 140 mg/dL (7,8 mmol/L).
- Os testes de tolerância à glicose oral devem ser realizados para diagnosticar o diabetes gestacional.
- Os valores de glicose do sangue capilar total obtidos com o auxílio de dispositivos de teste rápido são úteis para a detecção de hiper- e hipoglicemia em indivíduos com diabetes, além de ajudar a monitorar e a administrar a terapia. Porém, não devem ser utilizados para o diagnóstico de diabetes nem de distúrbios hipoglicêmicos. Para esses casos é essencial que os dados obtidos sejam confirmados por meio de medidas laboratoriais dos níveis de glicose plasmática, uma vez que os métodos empregados nos laboratórios são mais acurados.
- Os níveis de HbA_{1c} devem ser avaliados a cada 3–6 meses em indivíduos com diabetes, para o monitoramento do controle glicêmico, utilizando um método certificado rastreável pelo método de referência do Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). O grau de confiabilidade e acurácia diminuem com menores sobrevida e média de idade das hemácias, ou pela necessidade de transfusões, conforme se observa em certas hemoglobinopatias, condições hemolíticas e casos de uremia.
- As tiras e os comprimidos comumente empregados no teste de cetonas utilizam nitroprussiato, que não detecta β-hidroxibutirato. Uma vez que os níveis de β-hidroxibutirato estão elevados na cetoacidose diabética (DKA), diabetic ketoacidosis e são reduzidos com o tratamento, enquanto os níveis de ácido acetoacético e acetona se elevam com o tratamento, as tiras não servem para monitorar a terapia. O cálculo do intervalo aniônico é comumente empregado para monitorar a recuperação de indivíduos com DKA. Atualmente, há métodos enzimáticos disponíveis para quantificar β-hidroxibutirato.
- Autoanticorpos circulantes (GAD65, ICA512, IA-2, IAA) podem estar presentes antes e durante a instalação do diabetes autoimune de tipo 1. Esses testes não devem ser empregados na triagem de rotina de indivíduos assintomáticos não diabéticos, exceto em caso de pesquisas. Quando realizados, devem ser utilizados aqueles que apresentaram o melhor desempenho no *Diabetes Antibody Standardization Program* (Programa de Padronização de Anticorpos para Diabetes).
- É aconselhável reavaliar indivíduos com sintomas hipoglicêmicos decorrentes de níveis plasmáticos de glicose ≤ 50 mg/dL (2,8 mmol/L) que não estejam recebendo medicação para o tratamento de diabetes. Para estabelecer o diagnóstico, recomenda-se obter uma cuidadosa história farmacológica e médica, bem como determinar os níveis de insulina, peptídeo C, pró-insulina, autoanticorpos para insulina, β-hidroxibutirato e fármacos (sulfonilureias, repaglinida, nateglinida).
- As doenças de armazenamento de glicogênio que afetam primariamente o fígado normalmente se manifestam com hipoglicemia e hepatomegalia, enquanto aquelas que afetam os músculos comumente causam câimbras musculares, fraqueza, fadiga e intolerância ao exercício.

Introdução

Os carboidratos são os principais constituintes dos sistemas fisiológicos. São compostos orgânicos formados por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio $[C_x(H_2O)_y]$ que, com lipídios e proteínas, fornecem energia e contribuem para a estrutura dos organismos. Os carboidratos complexos são digeridos em açúcares simples, principalmente glicose, que é utilizada primariamente como fonte de energia ou estocada sob a forma de glicogênio. As hexoses (carboidratos contendo seis átomos de carbono) mais importantes da dieta são a D-glicose, D-galactose e D-frutose, contudo o principal açúcar presente na circulação sanguínea a glicose. A lactose (glicose + galactose) e a sucrose (glicose + frutose) são dissacarídeos importantes. Além de necessários à realização de funções celulares específicas (como é o caso da ribose, em relação aos ácidos nucleicos), os carboidratos podem modificar as proteínas e, consequentemente, suas funções por meio da glicosilação. São quantificados no sangue total, soro ou plasma. Além disso, a quantificação de carboidratos na urina, LCE e outros líquidos do corpo são clinicamente importantes. Essas medidas são discutidas na Parte III.

A concentração de glicose no sangue normalmente é mantida dentro de uma faixa estreita de valores por ação de muitos hormônios. Dentre esses, o mais significativo é a insulina, cuja produção se dá no pâncreas endócrino. O diabetes melito é a doença mais comum envolvendo o metabolismo de carboidratos. A maioria dos indivíduos com diabetes apresenta o tipo 1 (destruição das células β com absoluta deficiência de insulina) ou o tipo 2 (resistência à insulina e defeito na secreção desse hormônio). As medidas de controle glicêmico assumem papel cada vez mais importante no diabetes, uma vez que o desenvolvimento e a progressão de complicações micro e macrovasculares

estão associados à glicemia. O conteúdo do presente capítulo irá revisar os aspectos do metabolismo de carboidratos considerados mais críticos na prática médica.

Função do pâncreas endócrino

O pâncreas atua como órgão, ao mesmo tempo, endócrino e exócrino no controle do metabolismo de carboidratos. Como a glândula exócrina, produz e secreta a amilase responsável pela quebra dos carboidratos complexos ingeridos. Uma digestão adicional leva à produção dos monossacarídeos, que são as unidades absorvíveis. Uma vez absorvidos, os monossacarídeos emitem sinais para o pâncreas endócrino, que regula os hormônios envolvidos na homeostasia energética. Os nutrientes também estimulam as células enteroendócrinas do trato GI a secretarem incretinas – hormônios peptídicos que afetam a função pancreática, o esvaziamento gástrico e a motilidade intestinal.

O pâncreas endócrino secreta quatro hormônios através de diferentes células que residem nas ilhotas de Langerhans. A insulina é produzida pelas células β, o glucagon, pelas células α, a somastotatina, pelas células Δ e o polipeptídeo pancreático (PP), pelas células PP ou F. Nos tecidos sensíveis, como o músculo esquelético, as gorduras e o fígado, a insulina estimula a captação de glicose e a formação de glicogênio, bem como inibe a produção de glicose. O glucagon atua primariamente no fígado, onde estimula a produção de glicose e, com o passar do tempo, a cetogênese. A somastotatina, por outro lado, inibe a secreção tanto de insulina e glucagon como de inúmeros outros hormônios. A ingestão de nutrientes constitui maior estímulo à secreção de PP, cuja importância fisiológica ainda não foi esclarecida, mas que parece reduzir o apetite e a ingestão de alimentos. Nos raros casos descritos de células tumorais de ilhota pancreática que produzem PP em excesso, ou na hiperplasia por PP, há alguns pacientes assintomáticos. Contudo, há casos em que os pacientes apresentam síndrome de diarreia aquosa (Bellows, 1998; Pasieka, 1999; Tomita, 1980).

A proporção insulina/glucagon é importante na regulação do metabolismo de carboidratos. O anabolismo é favorecido quando há relativo aumento dessa proporção, como se observa no estado pós-prandial. O catabolismo é beneficiado pela relativa diminuição da proporção, como ocorre no jejum. A somastotatina, o aporte neural, os peptídeos intestinais e a concentração de glicose e de outros metabólitos são todos fatores que influenciam essa proporção. Sua regulação é estreitamente voltada à manutenção da concentração sanguínea de glicose dentro dos limites normais.

Além dos hormônios mencionados, a célula β pancreática secreta uma proteína composta por 37 aminoácidos denominada polipeptídeo amiloide da ilhota (IAPP, *islet amyloid polypeptide*), ou amilina. Descrita pela primeira vez em 1987, a amilina está colocalizada e é cossecretada com a insulina em resposta à estimulação dos nutrientes. É capaz de inibir a secreção de insulina, retardar o esvaziamento gástrico e inibir a secreção pós-prandial de glucagon. Suas formas oligoméricas estão associadas ao aumento da apoptose das células α. A IAPP é sintetizada inicialmente como um peptídeo precursor maior, que é processado nas células β. Níveis elevados de IAPP foram detectados em estados hiperinsulinêmicos e de resistência à insulina, como no comprometimento da tolerância à glicose e no diabetes precoce de tipo 2. Por outro lado, níveis diminuídos foram observados no diabetes de tipo 1. Depósitos de amiloide – um material fibroso derivado da IAPP – são encontrados nas ilhotas no diabetes de tipo 2. Os níveis desse peptídeo também podem estar aumentados no câncer de próstata. Embora não sejam utilizados testes para amilina na prática clínica, estão sendo desenvolvidas triagens clínicas com análogos para casos de diabetes. Com isso, espera-se que esses análogos melhorem o controle glicêmico através da limitação das excursões de glicose pós-prandiais (Nyholm, 2001). Recentemente, um análogo sintético da amilina – o acetato de pramlintida – foi disponibilizado sob a forma de injeção administrada antes das principais refeições, para pacientes diabéticos dependentes de insulina.

Insulina

A insulina é um peptídeo-hormônio com massa molecular de aproximadamente 5.800 Da. É secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans, no pâncreas. Apresenta duas cadeias, A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos), que são unidas por duas ligações dissulfeto. A insulina é inicialmente sintetizada como uma cadeia única e mais longa de peptídeo de hormônio precursor – a pré-insulina. A pró-insulina (~ 9.000 Da), que é o precursor imediato, é processada em insulina nos grânulos de secreção das células β, por meio da remoção enzimática do segmento peptídico de 31 aminoácidos que conecta as cadeias A e B, conhecido como peptídeo C (Figs. 16.1 e 16.2). Esse processamento proteolítico é catalisado pelas pró-proteínas convertases PC2 e PC1/PC3. Essas enzimas primeiramente convertem a pró-insulina em metabólitos intermediários – as pró-insulinas de clivagem 32/33 e 65/66. Esses, após a clivagem pela carboxipeptidase H, sofrem novamente a ação das convertases e se transformam nas pró-insulinas de clivagem des-31/32 e des-64/65. Em adultos, pequenas concentrações de pró-insulina intacta e esses intermediários de conversão metabolicamente ativos, especialmente a pró-insulina de clivagem des-31/32, são cossecretados com a insulina. Crianças sadias e recém-nascidos prematuros, quando comparadas aos adultos, apresentam níveis maiores de pró-insulina e pró-insulina de clivagem 32/33. Em alguns radioimunoensaios, a pró-insulina e seus metabólitos podem exibir reação cruzada com a insulina. Esse fenômeno pode ser significativo, especialmente porque a meia-vida da pró-insulina é pelo menos três vezes maior que a da insulina. Em estudos conduzidos *in vivo*, observou-se que a atividade da pró-insulina corresponde a 10–15% da atividade biológica da insulina.

Níveis de pró-insulina elevados (pró-insulina intacta e parcialmente processada) são detectados no diabetes de tipo 2 e estão associados à diminuição da capacidade secretora de insulina das células β (Roder, 1998). No diabetes pré-tipo 1, igualmente, foi detectado um aumento dos níveis de pró-insulina. Nesse caso, as células β apresentam a diminuição da função, talvez em consequência de danos causados pelas citocinas produzidas por imunócitos infiltrantes (Hostens, 1999). Os insulinomas são condições menos comumente associadas à elevação dos níveis de pró-insulina. A hiperpró-insulinemia familiar é um distúrbio raro provocado por mutações no gene da pró-insulina. Em famílias japonesas afetadas essa anomalia genética está associada ao comprometimento da tolerância à glicose ou ao diabetes de tipo 2, contudo numa família caucasiana em que três gerações apresentaram hiperpró-insulinemia e pró-insulina mutante (Arg65-His), a tolerância à glicose manteve-se normal (Roder, 1996).

O peptídeo C e a insulina são secretados em quantidades equimolares dentro da veia Porta, porém a proporção sérica de ambas varia entre 5:1 e 15:1. No sangue, a concentração molar do peptídeo C é

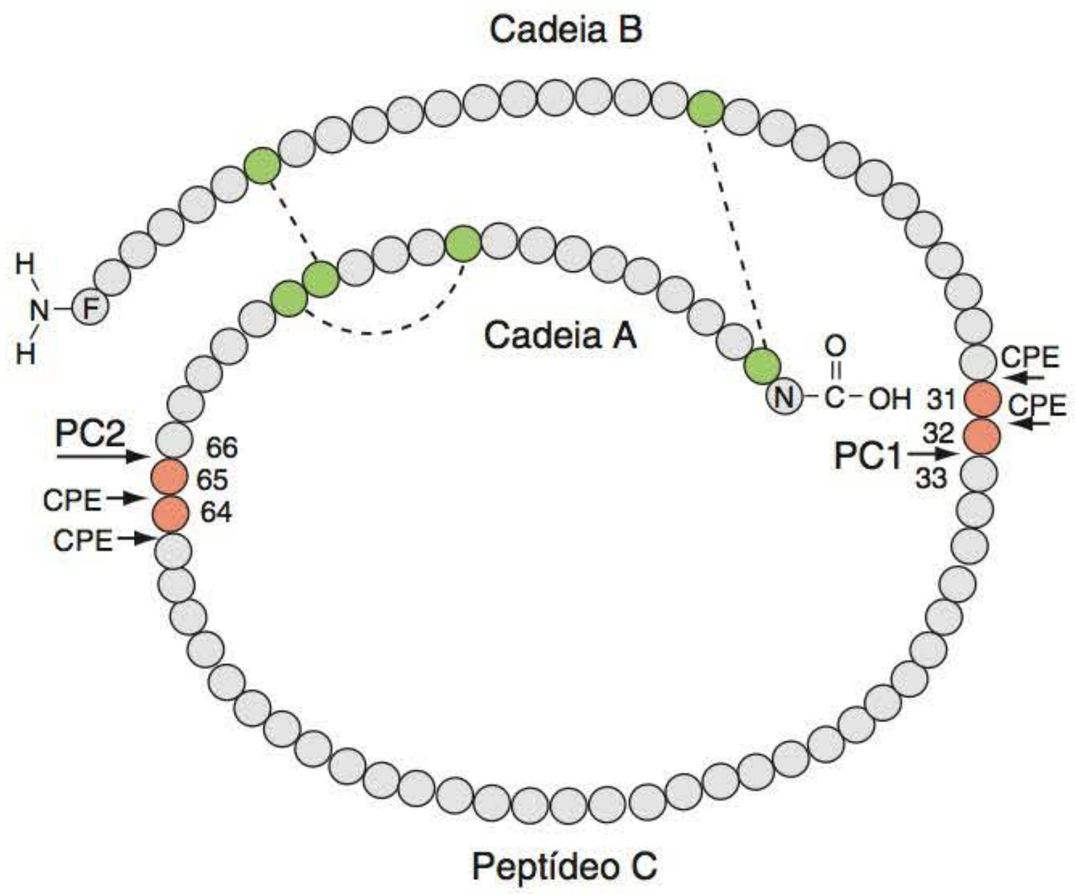


Figura 16.1 Pró-insulina humana, com sítios de clivagem para pró-proteína convertases PC1 e PC2 e para carboxipeptidase H (CPE). Os círculos em laranja representam os pares de aminoácidos básicos utilizados para processamento proteolítico; os círculos em verde representam os resíduos de cisteína que participam das ligações dissulfeto. (Diagnosis and classification of diabetes melito. Copyright©2004 American Diabetes Association. From Diabetes Care, Vol. 27, 2004; S5–S10. Reproduzido com permissão de *The American Diabetes Association*.)

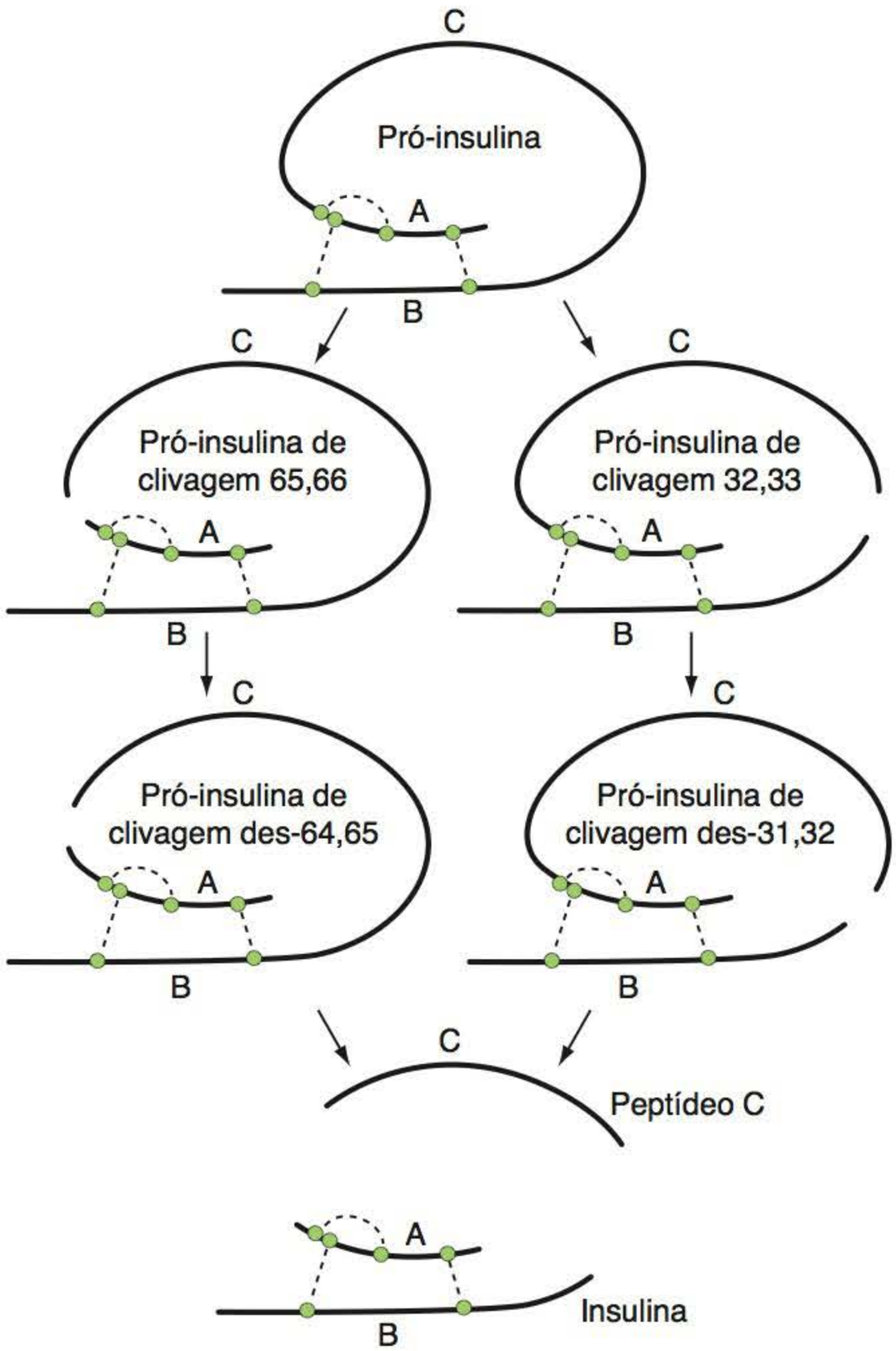


Figura 16.2 Processamento da pró-insulina em insulina. Os círculos em verde representam os resíduos de cisteína que participam das ligações dissulfeto. Direitos de reprodução de John Wiley and Sons Ltd.; reproduzido com permissão (Temple, 1992).

maior do que a da insulina, principalmente por causa da depuração hepática da última. Cerca de 50% da insulina é rapidamente removida ao passar inicialmente pelo fígado, enquanto a excreção hepática do peptídeo C é negligível. Na cirrose, observa-se hiperinsulinemia em decorrência da diminuição da depuração hepática de insulina. Em indivíduos sadios, a meia-vida tanto do peptídeo C como da pró-insulina é de aproximadamente 30 minutos, sendo que a insulina apresenta meia-vida de 4 a 9 minutos. Em indivíduos normais em jejum, a proporção molar de peptídeo C e a insulina é de 5:1. Ainda restam dúvidas quanto à existência de alguma atividade biologicamente significativa do peptídeo C (Wojcikowski, 1990; Ido, 1997).

O estado doentio se instala quando as concentrações de insulina tornam-se inadequadas diante de determinados níveis sanguíneos de glicose. A deficiência da insulina, seja absoluta ou relativa, conduz ao diabetes melito. Os níveis séricos de insulina e glicose devem ser medidos concomitantemente, uma vez que a secreção de insulina é regulada primariamente pela glicose. Enquanto uma concentração elevada de insulina diante de níveis baixos de glicose sugere secreção ou administração inapropriada do hormônio, é possível detectar aumento dos níveis de insulina em indivíduos resistentes que necessitam secretar mais insulina para manter os níveis sanguíneos de glicose normais.

A secreção excessiva e descontrolada de insulina provoca hipoglicemia. Esse distúrbio é observado na presença de tumores secretores o hormônio, especialmente insulinomas. Em tais circunstâncias, os níveis séricos de glicose do paciente estão diminuídos (< 50 mg/dL), enquanto os níveis de insulina e pró-insulina encontram-se elevados e há manifestação de sintomas hipoglicêmicos (p. ex., tremores, palpitações, diaforese, confusão). Os níveis de peptídeo C são determinados em estados hipoglicêmicos para ajudar a identificar a etiologia da hipoglicemia. *Pacientes com insulinoma apresentam níveis séricos elevados de insulina e peptídeo C, enquanto a hipoglicemia a partir da insulina injetada ou exógena caracteriza-se pela elevação dos níveis de insulina e diminuição dos níveis de peptídeo C.* As preparações de insulina comercialmente disponíveis são isentas de peptídeo C e pró-insulina. Considerando que o peptídeo C é menos estável do que a insulina, as amostras séricas devem ser rapidamente separadas e congeladas.

Na população com diabetes melito, os níveis de peptídeo C são basais e, após a estimulação com glucagon, podem ser determinados através de imunoensaios para ajudar a classificar a etiologia do diabetes e fornecer informações relacionadas à capacidade secretória das células β. O peptídeo C e a glicose podem ser quantificados após um período de jejum de 8 horas, bem como 90 minutos após a estimulação oral por uma refeição mista (Sustacal, Mead Johnson) (DCCT, 1993). Esses testes usualmente não são realizados na prática clínica, porém são adotados nas pesquisas. Níveis baixos de peptídeo C são característicos da deficiência absoluta de insulina do diabetes de tipo 1. A quantificação desse peptídeo também pode ser útil nas avaliações de acompanhamento pós-pancreatectomia e pós-transplante pancreático. Contrastando com a insulina, tanto o peptídeo C como a pró-insulina são primariamente degradados nos rins e, portanto, encontram-se em níveis elevados na insuficiência renal.

Atualmente, existem muitos imunoensaios comerciais para a detecção de insulina, peptídeo C e pró-insulina disponíveis. A American Diabetes Association Task Force on Standardization of the Insulin Assay revisou 17 testes de detecção de insulina e encontrou significativa variabilidade (Robbins, 1996). Foi recomendado, então, que todos os testes fossem padronizados segundo um único método referencial. Os fabricantes foram incentivados a publicar informações sobre o desempenho dos ensaios, incluindo acurácia, recuperação, precisão, especificidade, linearidade e proporção entre menor concentração quantificável estatisticamente diferente de zero e limites de quantificação (LOD/LOQ, *lowest measurable concentration statistically different from zero/limits of quantitation*). Do mesmo modo, foi incentivada a certificação laboratorial. Nos EU, o College of American Pathologists oferece um programa externo de avaliação da qualidade destinado às quantificações de insulina e peptídeo C (College of American Pathologists, Northfield Headquarters, 325; Waukegan Road, Northfield, Illinois 60093-2750).

Caso a amostra esteja hemolisada, as determinações de insulina sérica podem apresentar valores falsamente baixos. Uma enzima degradadora de insulina encontrada nos eritrócitos, bem como nas células de outros tecidos, é responsável por esse problema. As quantificações de peptídeo C e de pró-insulina parecem ser menos afetadas pela hemólise. Anticorpos para insulina também provocam interferências nos imunoensaios e, inclusive, há relatos de resultados com níveis falsamente elevados ou diminuídos.

Glucagon

O pró-glucagon é sintetizado nas células α do pâncreas e nas células L do intestino delgado distal. Por meio do processamento diferencial, a família de produtos do gene do glucagon é formada. As concentrações plasmáticas de glucagon durante o jejum normalmente são de 25 a 50 pg/mL. O glucagon pancreático estimula a produção de glicose, sendo também um importante regulador dos processos hepáticos de glicogenólise, gliconeogênese e cetogênese. No diabetes de tipo 1, uma progressiva deficiência de glucagon se desenvolve com o passar do tempo. Essa deficiência resulta em mais flutuações glicêmicas e dificuldade de recuperação a partir do estado hipoglicêmico.

Raramente, na prática clínica, é realizada a quantificação dos níveis séricos de glucagon. Os glucagonomas são um tipo raro de tumor que envolvem as células das ilhotas, que passam a produzir o hormônio em excesso. Em termos clínicos, esses tumores se manifestam com típicas erupções eritematosas migratórias necrotizantes, estomatite, glossite, perda de peso, anemia e uma forma branda de diabetes melito. Usualmente estão associados a níveis de glucagon de jejum superiores a

120 pg/mL, entretanto, tais níveis podem variar entre 900 e 7.800 pg/mL. O processamento de pró-glucagon torna-se comprometido e podem ser observadas formas de alto peso molecular. Pacientes com tumores neuroendócrinos multifuncionais apresentam elevação discreta dos níveis sanguíneos de glucagon. O mesmo ocorre na cirrose, diabetes, síndrome de Cushing, pancreatite, acromegalia e insuficiência renal. Na hiperglucagonemia familiar – um distúrbio autossômico dominante – os níveis do hormônio estão elevados na ausência de tumor, sendo que a história familiar auxilia na determinação do diagnóstico.

Incretinas

A ingestão oral de nutrientes estimula a liberação intestinal das incretinas. Seu efeito, descrito pela primeira vez há mais de 40 anos, consiste no aumento e na antecipação da resposta de insulina à administração oral de glicose, comparada à resposta à administração endovenosa. As incretinas mais importantes na regulação da secreção de insulina são o peptídeo análogo do glucagon 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) e o peptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP, *glucose-dependent insulinotropic peptide*), ambos integrantes da superfamília do glucagon. O GIP, inicialmente denominado polipeptídeo inibitório gástrico, exerce alguns efeitos sobre as células β em modelos experimentais animais, porém doses fisiológicas não afetam a liberação de glucagon nem o esvaziamento gástrico.

No intestino, o GLP-1 é formado a partir do pró-glucagon e atua principalmente como incretina, estimulando rapidamente a secreção de insulina em resposta à refeição. Outros efeitos incluem a supressão da secreção de glucagon e lipase, inibição do esvaziamento gástrico e estimulação da secreção de somatostatina. O GLP-1 pode reduzir o apetite e afetar a obtenção de energia (Flint, 1998). Estudos *in vitro* e *in vivo*, realizados em animais, demonstraram que o GLP-1 inibe a apoptose de células β, bem como estimula a proliferação e neogênese dessas células a partir de células precursoras ductais (Drucker, 2003a). No diabetes melito de tipo 2, há redução dos níveis plasmáticos de GLP-1 estimulados pela ingestão da refeição (Toft-Nielsen, 2001). A forma ativa mais comum da GLP-1 – GLP-1 (7–37) – possui meia-vida de apenas 2 a 3 minutos, pois as aminopeptidases circulantes a clivam rapidamente em GLP-1 (9–37) inativa. Essa forma inativa representa 80% da GLP-1 circulante. Ambas as formas de GLP-1 apresentam meia-vida curta e são eliminadas pelo rim. A dipeptidil peptidase-4 (DPP-4, *dipeptidyl peptidase-4*), uma serina peptidase encontrada na superfície das células endoteliais, inativa a GLP-1 removendo-lhe dois aminoácidos da região N-terminal. Inibidores de DPP-4 atualmente estão sendo estudados em triagens clínicas no tratamento do diabetes, assim como os análogos de GLP-1 de longa duração (Drucker, 2003b). O exenatide, um agonista do receptor da GLP-1, foi disponibilizado recentemente para uso injetável em pacientes com diabetes de tipo 2.

Somatostatina

A somatostatina – um tetradecapeptídeo contendo uma ligação dissulfeto – foi isolado pela primeira vez do hipotálamo. Originalmente, foi considerado um hormônio hipotalâmico inibidor da secreção de GH, entretanto sua detecção nas ilhotas de Langerhans impulsionou novas investigações acerca de sua função no pâncreas endócrino. Subsequentemente, a somatostatina também foi detectada no trato GI. A sua ação consiste em inibir os hormônios da pituitária (GH e tireotrofina), trato GI (gastrina, secretina, peptídeo vasointestinal) e pâncreas (insulina, glucagon). Também possui funções neuroendócrinas (p. ex., inibição da secreção de ácidos gástricos, tempo de esvaziamento gástrico e liberação de enzimas pancreáticas). O primeiro peptídeo da somatostatina a ser isolado continha 14 aminoácidos e foi denominado somatostatina-14. Na sequência, foi isolada a somatostatina-28, que continha uma extensão N-terminal e cuja ação inibidora era mais potente do que a dos demais hormônios produzidos nas ilhotas.

No pâncreas, a somatostatina é produzida pelas células Δ, que correspondem a 5–10% das células das ilhotas pancreáticas. Os somatostatinomas – tumores raros de células das ilhotas – secretam níveis elevados do hormônio. A elevação dos níveis de somatostatina também é detectada no câncer pulmonar de células pequenas, câncer medular da tireoide e feocromocitoma. O seu tempo de meia-vida é bem curto e não é comum quantificá-la na prática clínica. O octreotide e o lanreotide – análogos de longa duração – ligam-se primariamente ao receptor de somatostatina de subtipo 2 (SSTR2, *somatostatin receptor subtype 2*) e são utilizadas no tratamento de tumores neuroendócrinos, bem como de outros distúrbios envolvendo o pâncreas e o trato GI. A cintilografia com octreotide também tem sido empregada no diagnóstico, na localização e na predição de tumores para garantir o sucesso do tratamento com análogos da somatostatina.

Quantificação de glicose

Considerações sobre a amostra

A determinação dos níveis de glicose é crítica tanto ao diagnóstico como à supervisão das doenças que afetam o metabolismo de carboidratos. A glicose é quantificada em amostras de sangue total, plasma, soro, LCE, líquido pleural e urina para diversos fins diagnósticos e de monitoramento (ver também Caps. 27 e 28). Além disso, os dispositivos modernos conseguem determinar a concentração de glicose em amostras de líquido intersticial, permitindo seu monitoramento contínuo em indivíduos com diabetes. O modo e o momento em que as amostras são coletadas e manipuladas, bem como o sítio de coleta afetam a interpretação clínica do resultado analítico.

O plasma venoso é a amostra clínica padrão utilizada para as quantificações. A glicose é metabolizada a uma taxa de 7 mg/dL/h (0,4 mmol/L/h) à temperatura ambiente, com uma queda aproximada de 2 mg/dL/h a 4°C (Weissman, 1958). A taxa de metabolismo aumenta em caso de contaminação por bactérias ou leucocitose. Uma amostra de soro é considerada apropriada para a análise de glicose mediante processamento por 30 minutos para a separação do componente celular. Contudo, se o soro tiver que permanecer em contato com as células por mais de 30 minutos, deve ser adicionado à amostra um conservante, como o fluoreto de sódio, que inibe a glicólise. Mesmo assim, quando a amostra analisada é isenta de contaminação bacteriana e de leucocitose, um atraso de até 90 minutos na separação do soro de seu componente celular ainda permite a obtenção de resultados clinicamente aceitáveis. Se a amostra for mantida sob refrigeração, a adição de 2 mg de fluoreto de sódio/mL de sangue total previne a glicólise por até 48 horas (Chan, 1989). A refrigeração permite que a glicose se mantenha estável no soro/plasma por até 48 horas. No entanto, se o tempo de armazenamento for prolongado, nem mesmo o congelamento da amostra a –20°C impedirá a queda significativa e progressiva da concentração de glicose.

Métodos de quantificação da glicose

A maioria das quantificações de glicose emprega métodos enzimáticos, que proporcionam especificidade e podem ser compactados para fornecer testes rápidos. Atualmente, três sistemas de enzimas estão em uso: glicose desidrogenase, glicose oxidase e hexoquinase. Essas reações geram uma corrente elétrica ou um produto, cuja concentração pode ser determinada por espectrofotometria, de modo proporcional à concentração inicial de glicose. Os ensaios podem determinar a taxa inicial de alteração – nesse caso, a velocidade da reação enzimática depende da concentração inicial de glicose – ou o ponto terminal (*end point*).

Quando a quantificação emprega o método da glicose desidrogenase, a glicose é reduzida e há produção tanto de um cromóforo (cuja intensidade da coloração é medida por espectrofotometria; Equação 16.1) como de uma corrente elétrica (Equação 16.2) (Kost, 1998).

$$\alpha\text{-D-glicose} \rightarrow (\text{mutoarotase}) \rightarrow \beta\text{-D-glicose} \quad (16.1)$$

$$\beta\text{-D-glicose} + \text{NAD} \rightarrow (\text{glicose desidrogenase}) \rightarrow \text{D-gliconolactona} + \text{NADH}$$

$$\text{MTT} + \text{NADH} \rightarrow (\text{diaforase}) \rightarrow \text{MTTH (cor azul)} + \text{NAD}$$

$$\text{Glicose} + \text{Pirroloquinolina quinona (PQQ)} \rightarrow (\text{glicose desidrogenase}) \rightarrow \text{Gliconolactona} + \text{PQQH}_2 \quad (16.2)$$

$$\text{PQQH}_2 + 2[\text{Fe(CN)}_6]^{3-} \rightarrow \text{PQQ} + 2[\text{Fe(CN)}_6]^{4-} + 2\text{H}^+$$

$$2[\text{Fe(CN)}_6]^{4-} \rightarrow 2[\text{Fe(CN)}_6]^{3-} + 2e^-$$

A glicose oxidase, uma flavoenzima, catalisa as reações mostradas a seguir. A reação envolvendo a peroxidase pode ser medida por espectrofotometria (Equação 16.3), podendo ser inibida por concentrações elevadas de ácido úrico, ácido ascórbico, bilirrubina, glutationa, creatinina, L-cisteína, L-dopa, dopamina, metildopa e ácido cítrico (Zaloga, 1997). Além disso, a reação envolvendo a glicose oxidase pode ser acoplada ao par ferricianeto/ferricianeto para a produção de uma corrente elétrica, conforme mostrado a seguir (Equação 16.4). Esse sistema depende da pressão parcial de O_2, uma vez que o oxigênio competirá na reação para formar peróxido de hidrogênio e, assim, quanto maior for a pressão parcial de O_2, menor será a concentração de glicose eletricamente medida (Kurahashi, 1997). A glicose oxidase pode igualmente ser utilizada em outro sistema elétrico, representado pela Equação 16.5.

β-D-glicose + O_2 → (glicose oxidase) → D-gliconolactona + H_2O_2 (16.3)
gliconolactona + H_2O → ácido glicônico
H_2O_2 + aceptor de oxigênio cromogênico (orto-diansidina, 4-aminofenazona, orto-tolidina) Æ (peroxidase) Æ cromógeno colorido + H_2O

β-D-glicose + 2$[Fe(CN)_6]^{3-}$ + H_2O → (glicose oxidase) → D-ácido glicônico + 2$[Fe(CN)_6]^{4-}$ + 2H^+ (16.4)
2$[Fe(CN)_6]^{4-}$ → 2$[Fe(CN)_6]^{3-}$ + 2e^-

β-D-glicose + O_2 → (glicose oxidase) → D-gliconolactona + H_2O_2 (16.5)
H_2O_2 → 2H^+ + O_2 + 2e^-

O ensaio que utiliza o sistema de hexoquinase geralmente é aceito como método de referência para a quantificação da glicose. A reação é mostrada a seguir (Equação 16.6). A concentração de glicose é proporcional à taxa de produção de NAD(P)H, que pode ser determinada por espectrofotometria. Dependendo da fonte de glicose-6-fosfato (G-6-P) desidrogenase, a enzima pode requerer especificidade para NADP ou, no caso de algumas fontes, também poderá utilizar NAD. Amostras hemolisadas podem representar um problema, uma vez que o conteúdo liberado dos eritrócitos tem a possibilidade de interferir na relação estequiométrica entre a glicose e NAD(P)H acumulado.

Glicose + MgATP → (hexoquinase) → glicose-6-fosfato (G-6-P) + MgADP (16.6)
G-6-P + NA(P)$^+$ → (glicose-6-fosfato desidrogenase) → 6-fosfogliconolactona + NAD(P)H + H^+

Glicose em sangue total. As amostras para determinação dos níveis de glicose no sangue total podem ser analisadas por dispositivos de teste rápido. Esses aparelhos de monitoramento são utilizados em casa, no consultório médico ou na cabeceira do leito hospitalar para o monitoramento de hipo e hiperglicemia. A maioria desses aparelhos é calibrada para fornecer resultados representativos dos níveis plasmáticos, podendo reportar valores tanto plasmáticos como do sangue total. As leituras referentes aos níveis de glicose detectados no sangue total tendem a ser 10–15% menores, quando comparadas às leituras obtidas do plasma. Entretanto, esse percentual varia com base no hematócrito, na técnica da análise empregada e no momento da amostragem (jejum *versus* pós-sobrecarga de glicose). O sangue capilar é a fonte das amostras analisadas pela maioria desses dispositivos de quantificação da concentração de glicose do sangue total. Os níveis de glicose são semelhantes no sangue capilar e no arterial, contudo podem ser acentuadamente diferentes em amostras de sangue venoso, dependendo do momento de coleta em relação à ingestão de alimentos. Por exemplo, no período pós-prandial, amostras de sangue capilar apresentam níveis de glicose mais altos do que amostras de sangue venoso. Os testes de glicose capilar que empregam aparelhos de teste rápido não devem ser utilizados no diagnóstico do diabetes ou de distúrbios hipoglicêmicos. Para estabelecer tais diagnósticos é essencial realizar quantificações laboratoriais que confirmem os valores de glicose plasmática medidos, pois os métodos utilizados no laboratório clínico são mais acurados.

Os dispositivos domésticos para o monitoramento da glicemia ajudam os indivíduos com diabetes a ter mais controle sobre a doença. Há uma grande variedade de aparelhos disponíveis que permitem a essas pessoas medir a glicemia em casa. É importante que os pacientes sejam adequadamente treinados a utilizar os medidores da maneira correta, para evitar os erros operacionais que, segundo estudos, são cometidos por 12% dos usuários (Schrot, 1999). Alguns erros que podem contribuir para leituras incorretas a partir de certos medidores consistem na aplicação de um volume de sangue insuficiente, sugar o dedo para obter amostra suficiente de sangue, usar tiras de teste com data de validade ultrapassada, fatores ambientais (umidade, calor, altitude), uso de medidor com problemas de funcionamento ou sujo, hipertrigliceridemia, hipotensão e quantificações fora dos limites do hematócrito ou da faixa de temperatura adequada. Alguns dispositivos de monitoramento da glicemia são influenciados por níveis elevados de salicilato, acetaminofeno, levodopa, ácido úrico, bilirrubina, lipídeos ou baixos níveis de oxigênio, enquanto outros podem ser sensíveis a toques na área onde ocorre a reação. A maioria deles fornece resultados inacurados diante de níveis muito altos ou baixos de glicose.

As características desejáveis dos monitores de glicemia de uso doméstico, à parte dos aspectos relacionados ao desempenho (precisão e acurácia), são as seguintes: facilidade de utilização, necessidade de pequeno volume de sangue, requerimentos mínimos de manutenção, impressão legível dos resultados, execução rápida do teste, alarmes adequados, mínima interferência de substâncias e capacidades de memória e transferência de dados. Alguns medidores modernos permitem a realização do teste alternativamente em outras partes do corpo (p. ex., antebraço, porção superior do braço, coxa), contudo os resultados desses testes podem apresentar menor acurácia diante de oscilações rápidas dos níveis de glicose. Há também aqueles que incorporam um registro operacional eletrônico, no qual são arquivados o evento, a dose de insulina e a ingestão de carboidratos do usuário. Esses dados podem ser transferidos a um computador para serem exibidos de diversos modos, como registro operacional, gráficos, quadros ou resumo de estatísticas.

Dispositivos de quantificação dos níveis intersticiais de glicose. Os aparelhos quantificadores de glicose no interstício foram desenvolvidos para o monitoramento dos níveis de glicose de pacientes diabéticos. A maioria desses aparelhos dispõe de métodos eletroquímicos para quantificar automática e frequentemente os níveis de glicose no líquido intersticial da derme ou do tecido adiposo subcutâneo, requerendo repetidas calibrações com as concentrações de glicose do plasma e do sangue total. A verificação dos resultados obtidos com tais medidores fornece dados sobre os padrões de glicose encontrados em um determinado período, que pode ser de horas ou dias. Essas "análises de tendência" dos níveis de glicose podem revelar dados úteis que auxiliam na modificação dos tratamentos, como a ocorrência inesperada de uma hipoglicemia noturna ou de uma hiperglicemia pós-prandial (Kaufman, 2002).

A concentração intersticial de glicose se mantém em lento (5–30 min) equilíbrio com os níveis de glicose no sangue capilar e, consequentemente, difere da glicemia, exceto em sistemas estáveis (Zierler, 1999; Cheyne, 2002). Em particular, nos momentos em que os níveis de glicose mudam rapidamente, como após a ingestão de alimentos ou na recuperação de um estado hipoglicêmico, as leituras obtidas do líquido intersticial apresentam um atraso em relação aos níveis de glicose detectados pelo método da picada no dedo. Como apresentam acurácia e precisão inferiores àquelas dos monitores de glicemia domésticos, os aparelhos portáteis de monitoramento contínuo de glicose atualmente disponíveis se prestam a complementar – mas não substituem – os monitores convencionais. As leituras individuais de glicemia obtidas pelo método da picada no dedo devem ser utilizadas primariamente para direcionar a terapia. Estão sendo desenvolvidas novas tecnologias para o monitoramento não invasivo da glicemia, tais como espectroscopia de impedância, espectroscopia de emissão térmica, espectroscopia próxima ao infravermelho, elipsometria, obtenção de imagem por ressonância magnética e métodos que empregam ondas magnéticas.

Diabetes melito

Introdução

O diabetes melito é um grupo de doenças em que os níveis sanguíneos de glicose encontram-se elevados, em decorrênia de uma secreção deficiente ou de uma ação anormal da insulina. O diabetes é o

conjunto mais comum de distúrbios do metabolismo de carboidratos, que afetou em 2002 cerca de 18 milhões de americanos acima dos 20 anos de idade. A prevalência do diabetes tem aumentado e há uma estimativa prevista de que 33% dos homens e 39% das mulheres nascidas nos EUA em 2000 venham a ser diagnosticados com a doença ao longo de suas vidas (Narayan, 2003). Essa doença crônica é responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade, além de despesas consideráveis. O diabetes é a principal causa de doenças renais em estágio terminal tratadas, sendo a causa mais comum de amputações não traumáticas e a causa número um de novos casos de cegueira em adultos entre 20 e 74 anos de idade. A lesão de nervos, conhecida como neuropatia diabética, ocorre em 60 a 70% das pessoas com diabetes. A maioria das mortes associadas a essa doença, contudo, está relacionada ao risco aumentado de desenvolver doença aterosclerótica. Indivíduos com diabetes apresentam uma propensão 2 a 4 vezes maior ao desenvolvimento de doenças cardíacas e cerebrovasculares, em comparação àqueles que não apresentam tal distúrbio. Em 2002, os EU estimaram despesas da ordem de 132 bilhões de dólares decorrentes da doença, sendo que 92 bilhões de dólares foram destinados a despesas diretas e 40 bilhões de dólares, a despesas indiretas (American Diabetes Association, 2003).

Em 1997, o Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus revisou os critérios utilizados para diagnosticar o diabetes e, recentemente, a American Diabetes Association introduziu algumas modificações (American Diabetes Association, 2004a). A detecção de níveis plasmáticos de glicose em jejum ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L), em pelo menos duas ocasiões, é diagnóstica de diabetes (Tab. 16.1). Esse teste deve ser realizado após um período de jejum de 8 horas. Sintomas de hiperglicemia (p. ex., poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso injustificada) diante de níveis plasmáticos casuais de glicose ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) são igualmente suficientes para estabelecer o diagnóstico de diabetes. O termo "pré-diabetes" designa condições em que a homeostasia da glicose está anormal, porém os níveis séricos de glicose não estão altos o bastante para classificar o distúrbio como diabetes. Desse grupo fazem parte indivíduos com comprometimento dos níveis de glicose de jejum e da tolerância à glicose. Estima-se que existam 41 milhões de americanos com pré-diabetes. Tais indivíduos também são mais propensos a desenvolverem doenças cárdio- e cerebrovasculares.

Em geral, a realização de testes de tolerância à glicose oral não é recomendada para uso na rotina clínica como método de diagnóstico do diabetes. Caso seja utilizada, é preciso seguir o procedimento descrito pela Organização Mundial da Saúde (OMS; 1985), que utiliza uma sobrecarga de 75 g de glicose. A dose recomendada para crianças é 1,75 g de glicose/kg até 75 g. A única exceção a esse critério é o diagnóstico de diabetes gestacional (Tab. 16.2), em que a intolerância à glicose se desenvolve em aproximadamente 7% das mulheres grávidas (American Diabetes Association, 2004b). Para detectar o diabetes gestacional na população de alto risco, deve ser realizado um teste de tolerância à glicose oral (TTGO) empregando a abordagem de "etapa única". A abordagem de "duas etapas" é recomendada para mulheres que apresentam risco mediano. Nesse caso, um teste de triagem inicial é conduzido e, caso sejam detectados níveis de glicose elevados, realiza-se o TTGO.

Antes de começar o TTGO, a paciente deve ingerir ao menos 150 g de carboidratos/dia durante os 3 dias que antecedem o teste, sem nenhuma limitação da atividade física. Após um período de 8 a 14 horas de jejum, o teste pode ser realizado. Enquanto o procedimento é conduzido, a paciente fica impedida de comer, beber chá, café e álcool ou fumar, além de ter que permanecer sentada. As amostras de sangue venoso devem ser coletadas preferencialmente em tubos de tampa cinza, que contêm fluoreto e um anticoagulante.

Os níveis de hemoglobina A_{1C} (HbA_{1c}) – úteis ao monitoramento do controle glicêmico – não devem ser utilizados para diagnosticar o diabetes. O motivo é a falta de padronização dos ensaios que empregam a proteína em alguns laboratórios, portanto, podendo fornecer resultados que não se correlacionam precisamente com os níveis de glicose de jejum e pós-prandial de 2 horas (American Diabetes Association, 2004a).

Nos EUA, aproximadamente 64 milhões de indivíduos adultos apresentavam a síndrome metabólica em 2000, e esse número continua aumentando (Ford, 2004). Nesse país, a crescente prevalência da síndrome metabólica entre os adolescentes causa grande preocupação aos norte-americanos. Cerca de 2 milhões de adolescentes estão afetados e mais de 30% da população de adolescentes que estão acima do peso apresentam o fenótipo da doença (Duncan, 2004). A síndrome metabólica associa-se ao risco aumentado de desenvolver doença cardiovascular e diabetes. De acordo com o terceiro relatório do National Cholesterol Education Program Expert on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, os critérios que definem a síndrome são: (1) comprometimento dos níveis de glicose de jejum; (2) pressão sanguínea ≥ 130/85 mmHg; (3) circunferência da cintura > 102 cm em homens, e > 88 cm em mulheres; (4) níveis séricos de triglicérides ≥ 150 mg/dL (1,695 mmol/L); e (5) níveis de HDL

Tabela 16.2 Diagnóstico do diabetes melito gestacional

Teste de triagem inicial para avaliação de mulheres que apresentam risco moderado	
Níveis plasmáticos de glicose de 1 h (após sobrecarga de 50 g de glicose)	**Determinação do diabetes gestacional**
> 130 mg/dL (7,2 mmol/L)	90%
> 140 mg/dL (7,8 mmol/L)	80%

Testes de tolerância à glicose oral (TTGO) para avaliação de mulheres que apresentam risco alto e moderado e resultados anormais em testes de triagem

	Glicose plasmática TTGO de 100 g		Glicose plasmática TTGO de 75 g	
	mg/dL	**mmol/L**	**mg/dL**	**mmol/L**
Jejum	≥ 95	≥ 5,3	≥ 95	≥ 5,3
1 hora	≥ 180	≥ 10,0	≥ 180	≥ 10,0
2 horas	≥ 155	≥ 8,6	≥ 155	≥ 8,6
3 horas	≥ 140	≥ 7,8		

Diabetes gestacional diagnosticado quando ≥ 2 níveis plasmáticos de glicose são excedidos (American Diabetes Association, 2004b).

Tabela 16.1 Diagnóstico de pré-diabetes e diabetes melito

	Glicose plasmática de jejum		Níveis plasmáticos de glicose de 2 h (após sobrecarga de 75 g de glicose)	
	mg/dL	**mmol/L**	**mg/dL**	**mmol/L**
Normal	< 100	< 5,6	< 140	< 7,8
Pré-diabetes				
Comprometimento da glicose de jejum	100–125	5,6–6,9		
Comprometimento da tolerância à glicose			140–199	7,8–11,0
Diabetes melito	≥ 126	≥ 7,0	≥ 200	≥ 11,1

De American Diabetes Association, 2004a.

colesterol < 40 mg/dL (1,036 mmol/L) em homens, e < 50 mg/dL (1,295 mmol/L) em mulheres. Os indivíduos afetados comumente são resistentes à insulina e suas partículas de LDL colesterol são menores, mais densas e mais aterogênicas.

A classificação do diabetes foi revisada em 1997 e pode ser observada na Tabela 16.3, com mínimas alterações (American Diabetes Association, 2004a). Suas formas mais comuns são os tipos 1 e 2 (Tab. 16.4). O diabetes de tipo 1, caracterizado pela absoluta deficiência de insulina e pela destruição das células β, costumava ser chamado de diabetes juvenil ou diabetes insulino-dependente, porém tais termos caíram em desuso. Apesar dessa doença ser mais frequentemente diagnosticada na população jovem, seu início pode ocorrer em qualquer idade. Uma vez que indivíduos com outras formas de diabetes também são submetidos à terapia com insulina, o termo "insulino-dependente" pode gerar confusão e, portanto, deve ser evitado. O tipo 2, caracterizado pela resistência à insulina e por um defeito na secreção do hormônio, era referido como diabetes de início na vida adulta ou diabetes não insulino-dependente. Esses termos também caíram em desuso. Embora o início do diabetes de tipo 2 seja mais comum em adultos com idade mais avançada, também pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade, inclusive crianças. O uso da terapia à base de insulina por muitos dos pacientes com essa forma da doença foi o motivo que levou ao abandono da denominação "diabetes não insulino-dependente". Os fatores causais mais raramente observados são defeitos genéticos envolvendo a função das células β e a ação da insulina, doenças pancreáticas, endocrinopatias (p. ex., síndrome de Cushing, acromegalia e feocromocitoma) e certos fármacos, agentes químicos e infecções (Tab. 16.3).

Diabetes de tipo 1

O diabetes melito de tipo 1 representa cerca de 10% de todos os casos da doença. É comum a destruição autoimune das células β nas ilhotas pancreáticas, levando à absoluta deficiência da produção de insulina. A suscetibilidade genética ao desenvolvimento do diabetes de tipo 1, ao menos parcialmente, está relacionada à herança de genes envolvidos na resposta imune específica, que estão associados ao sistema HLA-DR/DQ, localizados no cromossomo 6, bem como à herança de outros genes e marcadores genéticos. Sendo assim, foi estabelecida a hipótese da ocorrência de um evento precipitador, como uma infecção viral, a exposição a uma toxina ou outra influência ambiental. Tal evento desencadearia a destruição autoimune das células β. A hiperglicemia se instala somente após a destruição da maior parte das células β. Antes e durante o início dessa doença, é comum haver anticorpos que atuam como marcadores da destruição das células β. Tais anticorpos reconhecem antígenos para os quais existem autoanticorpos recombinantes disponíveis: anticorpos para a isoforma de 65 kDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), autoanticorpos para insulina (IAA) e autoanticorpos para o antígeno 512 da célula de ilhota (ICA512). Os autoanticorpos ICA512 reconhecem partes do antígeno IA-2 da tirosina fosfatase. A tirosina fosfatase IA-2β (fogrina) é um antígeno à parte, contudo parcialmente homólogo ao antígeno IA-2. Os ensaios para a detecção de autoanticorpos ICA512 (e IA-2) são utilizados com mais frequência do que aqueles destinados à detecção de autoanticorpos IA-2β, uma vez que esses anticorpos geralmente reagem com o antígeno IA-2. Embora a presença de anticorpos possa ser útil para diferenciar o tipo 1 das demais formas de diabetes ainda no início da doença, a ausência de tais anticorpos não exclui seu diagnóstico.

Os indivíduos mais propensos a desenvolver diabetes de tipo 1 apresentam títulos elevados de múltiplos autoanticorpos. Seja em estudos familiais, seja em estudos populacionais, a detecção de pelo menos dois autoanticorpos é associada ao risco aumentado de desenvolver essa forma da doença (Maclaren, 1999, 2003). O GAD65 apresenta mais sensibilidade (91%) isoladamente como marcador de triagem, na detecção de indivíduos com positividade para múltiplos anticorpos (Krischer, 2003). Os IAA são mais comuns em crianças com diabetes de tipo 1, enquanto o GAD65 ocorre mais comumente em indivíduos adultos. Esses testes para a detecção de anticorpos estão sendo usados tanto na detecção do diabetes de tipo 1 como na pesquisa preventiva. Até o momento, não é recomendada a sua utilização nas triagens de rotina de indivíduos assintomáticos, em parte,

Tabela 16.3 Classificação do diabetes melito

I. Diabetes de tipo 1 (destruição das células β, usualmente levando à absoluta deficiência de insulina)
   - A. Imunomediado
   - B. Idiopático

II. Diabetes de tipo 2 (pode variar de predominantemente resistente à insulina, com relativa insuficiência do hormônio, até predominantemente causada por defeito secretório, com resistência à insulina)

III. Outros tipos específicos
   - A. Defeitos genéticos da célula β
     1. Cromossomo 12, HNF-1α (MODY3)
     2. Cromossomo 7, glicoquinase (MODY2)
     3. Cromossomo 20, HNF-4α (MODY1)
     4. Cromossomo 13, fator promotor de insulina 1 (IPF-1; MODY4)
     5. Cromossomo 17, HNF-1β (MODY5)
     6. Cromossomo 2, *Neuro*D1 (MODY6)
     7. DNA mitocondrial
     8. Outros
   - B. Defeitos genéticos da ação da insulina
     1. Resistência à insulina de tipo A
     2. Leprechaunism
     3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
     4. Diabetes lipoatrófica
     5. Outros
   - C. Doenças do pâncreas exócrino
     1. Pancreatite
     2. Trauma/pancreatectomia
     3. Neoplasia
     4. Fibrose cística
     5. Hemocromatose
     6. Pancreatopatia fibrocalculosa
     7. Outros
   - D. Endocrinopatias
     1. Acromegalia
     2. Síndrome de Cushing
     3. Glucagonoma
     4. Feocromocitoma
     5. Hipertireoidismo
     6. Somatostatinoma
     7. Aldosteronoma
     8. Outros
   - E. Induzido por fármacos ou agentes químicos
     1. Vacor
     2. Pentamidina
     3. Ácido nicotínico
     4. Glicocorticoides
     5. Hormônio da tireoide
     6. Diazóxido
     7. Agonistas β-adrenérgicos
     8. Tiazidas
     9. Dilantina
     10. Interferon α
     11. Outros
   - F. Infecções
     1. Rubéola congênita
     2. Citomegalovírus
     3. Outros
   - G. Formas raras de diabetes imunologicamente mediado
     1. Síndrome do "homem rígido"
     2. Anticorpos antirreceptor de insulina
     3. Outros
   - H. Outras síndromes genéticas eventualmente associadas ao diabetes
     1. Síndrome de Down
     2. Síndrome de Klinefelter
     3. Síndrome de Turner
     4. Síndrome de Wolfram
     5. Ataxia de Friedreich
     6. Coreia de Huntington
     7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
     8. Distrofia miotônica
     9. Porfiria
     10. Síndrome de Prader-Willi
     11. Outros

IV. Diabetes gestacional

De: The American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2004a; 27:S8.

Tabela 16.4 Características do diabetes melito de tipos 1 e 2

	Diabetes de tipo 1	Diabetes de tipo 2
Frequência	5–10%	90–95%
Idade, no início da doença	Qualquer idade, sendo mais comum entre crianças e adultos jovens	Mais comum na idade avançada, embora também ocorra em crianças e adolescentes
Fatores de risco	Genética, autoimunidade, ambientais	Genética, obesidade, sedentarismo, raça/etnia
Patogênese	Destruição das células β pancreáticas, usualmente autoimune	Não autoimune; resistência e progressiva deficiência de insulina
Níveis de peptídeo C	Muito baixos ou indetectáveis	Detectáveis
Pré-diabetes	Pode haver produção de autoanticorpos (GAD65, ICA512, IAA)	Não há produção de autoanticorpos (os testes não mostram nenhuma indicação)
Medicação terapêutica	A insulina é indispensável, múltiplas injeções diárias ou bomba de insulina	Agentes orais, comumente, há necessidade de insulina
Terapia preventiva ou para retardar o início da doença	Nenhuma conhecida, triagens clínicas estão em andamento	Estilo de vida (perda de peso e aumento da atividade física), medicações orais (metmorfina, acarbose) podem ser úteis; triagens clínicas estão em andamento

porque ainda se faz necessária a demonstração de intervenções efetivas (Verge, 1998).

No passado, os testes para detecção de autoanticorpos não foram devidamente padronizados e seus valores de *cutoff* acabaram não sendo firmemente estabelecidos. É importante implantar programas de controle de qualidade, pois quase 50% das amostras cegas consideradas "fracamente positivas" resultam negativas em repetições subsequentes do teste utilizando duplicatas da amostra cega (Eisenbarth, 2003). Em geral, os radioensaios em fase líquida para GAD65 e IA-2 apresentam mais sensibilidade e especificidade do que os ensaios padrão de ELISA disponíveis (Bingley, 2003). No caso dos testes para IAA, os microrradioensaios apresentam o melhor desempenho, empregando volumes menores de soro e precipitação da proteína A (Williams, 1997).

O Diabetes Antibody Standardization Program – resultado da colaboração entre a Immunology of Diabetes Society e os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – estabeleceu um serviço de prestação de testes de proficiência. As entidades envolvidas forneceram informações acerca da primeira avaliação de proficiência que realizaram para diferentes ensaios de GAD65, IA-2 e IAA (Bingley, 2003). O desempenho mais fraco (com maior variação) foi observado entre os diferentes ensaios para IAA. Nesse estudo, os valores referentes aos anticorpos para GAD65 e IA-2 foram expressos em unidades comuns (unidades/mL, OMS) conforme sugerido pela Immunology of Diabetes Society. Mais informações sobre o Diabetes Antibody Standardization Program podem ser obtidas no site http://www.idsoc.org.

O período "pré-diabetes" de destruição progressiva das células β pode durar meses, anos ou décadas. Durante esse período, a resposta aguda de insulina à administração de glicose por via endovenosa – denominada liberação de insulina de primeira fase – é inibida ou ausente. A ausência da resposta de insulina de primeira fase é igualmente observada em outras formas de diabetes. Eventualmente, na maioria dos indivíduos com diabetes de tipo 1, quase todas ou todas as células β são destruídas e, como resultado, a secreção de insulina é inadequada ou inexistente. Portanto, os níveis de peptídeo C e insulina endógena são muito baixos ou até indetectáveis. Indivíduos não tratados desenvolvem cetoacidose diabética, sendo que a terapia à base de insulina é necessária a todos os pacientes com a doença.

Diabetes de tipo 2

O tipo 2 é a forma mais comum do diabetes, afetando cerca de 90% dos americanos com a doença. Seu caráter é familiar, porém os defeitos genéticos subjacentes, na maioria dos indivíduos afetados, ainda precisam ser determinados. Os fatores de risco são excesso de peso (IMC* ≥ 25 kg/m^2), sedentarismo, história familiar de diabetes, idade avançada (≥ 45 anos), raça (afro-americanos, latinos, americanos nativos, americanos asiáticos e nativos das ilhas do Pacífico), doença dos ovários policísticos e história de diabetes gestacional ou parto de um bebê com peso > 4 kg durante o período pré-diabetes, hipertensão, doença vascular ou dislipidemia (HDL colesterol ≤ 35 mg/dL [0,90 mmol/L] e triglicérides ≥ 250 mg/dL [2,82 mmol/L]). Como não se trata de uma doença autoimune, o teste de detecção de anticorpos é dispensável. Os níveis de peptídeo C podem ser determinados nesse tipo de diabetes. Dos quase 18 milhões de americanos com diabetes de tipo 2, cerca de 5 milhões permanecem não diagnosticados. A exemplo do diabetes de tipo 1 não diagnosticado, em que os pacientes geralmente são assintomáticos, aqueles que apresentam um novo ataque de diabetes de tipo 2 podem igualmente não apresentar sintomas. Essa doença não é comumente diagnosticada após a manifestação das complicações e, sendo assim, recomenda-se proceder à triagem de rotina para identificação dos indivíduos que apresentam alto risco.

* Índice de massa corporal = peso (kg)/[altura (m)]^2

A American Diabetes Association (2004c) recomenda que a triagem do diabetes de tipo 2 seja realizada pelo provedor de assistência de saúde do paciente, caso sejam detectados um ou mais fatores de risco. Em geral, recomenda-se que adultos com 45 anos de idade ou mais, especialmente aqueles que estão acima do peso, sejam submetidos à triagem para a detecção do diabetes a cada 3 anos. Todavia, essa triagem deve ser realizada mais precocemente e com mais frequência se o indivíduo apresentar fator de risco mais grave. O teste preferencialmente utilizado é a determinação dos níveis plasmáticos de glicose em jejum. Ele teste deve ser realizado se uma quantificação aleatória apontar níveis plasmáticos de glicose ≥ 160 mg/dL (8,9 mmol/L) (Tab. 16.1). É preciso lembrar que os valores detectados no sangue total, medidos com o auxílio de monitores de glicemia domésticos, são 10 a 15% menores do que os níveis plasmáticos de glicose. Tais dispositivos não devem ser utilizados para diagnosticar o diabetes. Entretanto, se os níveis capilares de glicose medidos com um desses aparelhos apresentarem uma leitura ≥ 140 mg/dL (7,8 mmol/L), deve ser realizada uma nova triagem para determinar os níveis plasmáticos de glicose em jejum ou um TTGO, utilizando amostras de sangue venoso (Tab.16.1).

Nos últimos anos, o diabetes de tipo 2 tem sido diagnosticado em indivíduos mais jovens, inclusive em crianças. A American Diabetes Association (2004c) recomenda a triagem de crianças e adolescentes, a partir dos 10 anos de idade, que estejam acima do peso ideal (IMC > 85º percentil ou peso > 120% do peso ideal) e que apresentem dois dos seguintes fatores de risco: história familiar (parentes de 1º e 2º graus com diabetes de tipo 2), raça/etnia de alto risco (americanos nativos, afro-americanos, hispano-americanos, asiáticos e nativos das ilhas do Pacífico Sul), sinais de resistência à insulina (acantose nigricans, hipertensão, dislipidemia, síndrome do ovário policístico).

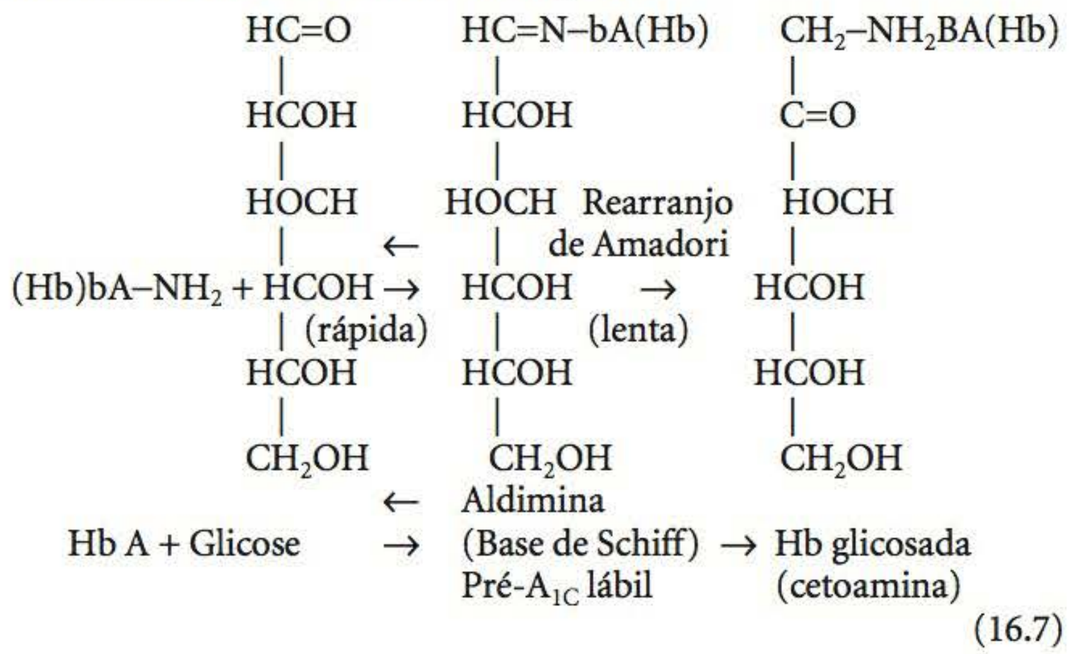
A maioria dos indivíduos com diabetes de tipo 2 é resistente à insulina e apresenta deficiência relativa ou absoluta de secreção desse hormônio. Grande parte desses indivíduos é obesa. Observa-se uma produção hepática de glicose elevada e inadequada, bem como comprometimento da utilização periférica do açúcar. A diminuição do transporte da glicose pode ser demonstrada nos tecidos muscular e adiposo. O pâncreas deve secretar insulina o suficiente para manter a tolerância à glicose normal, caso contrário há comprometi-

mento da homeostasia da glicose ou de desenvolvimento de diabetes de tipo 2. A hiperglicemia também é tóxica à função das células β e compromete a secreção de insulina. Com o tempo, frequentemente ocorre insuficiência progressiva das células b e elas passam a produzir menos insulina, intensificando ainda mais a deficiência desse hormônio. Embora muitas pessoas com diabetes de tipo 2 possam ser tratadas de modo efetivo através de dieta, exercícios e uso de agentes controladores da glicemia, há indivíduos que requerem terapia à base de insulina.

Medidas de controle glicêmico

No diabetes, estabeleceu-se que o melhor controle glicêmico está associado à prevenção ou atraso da progressão de complicações microvasculares. O Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) demonstrou que a redução dos níveis de glicose em pacientes com diabetes de tipo 1 retarda ou evita o desenvolvimento de retinopatias, neuropatias e nefropatias (DCCT Research Group, 1993). Foi observada uma redução de 50 a 75% na ocorrência de complicações no grupo de pacientes tratados de modo intensivo, com 7,2% de HbA_{1c} (contra 9% de HbA_{1c} no grupo que recebeu tratamento convencional). Ambos, o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) e um estudo menor realizado por japoneses, constataram uma diminuição da ocorrência de complicações microvasculares no diabetes de tipo 2 (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998a,b; Ohkubo, 1995). No UKPDS, houve redução de 25% na incidência de complicações microvasculares em pacientes tratados de modo intensivo, através da redução dos níveis de HbA_{1c} de 7,9% para 7%. O tratamento padrão consiste em quantificar os níveis de HbA_{1c} a cada 3–6 meses, com o objetivo de monitorar o controle glicêmico (American Association of Clinical Endocrinologists, 2002; American Diabetes Association, 2004d). As metas glicêmicas são mostradas na Tabela 16.5.

A hemoglobina glicosilada (GHb) é produzida de modo não enzimático em uma reação que envolve as duas etapas representadas a seguir. A primeira reação é rápida, reversível, dependente da concentração de glicose no ambiente e produz uma aldimina lábil ou base de Schiff. Ao longo do tempo, a aldimina passa por um lento processo de rearranjo de Amadori e é convertida a uma cetoamina estável – a GHb. A maioria dos testes para HbA_{1c} quantifica a produção dessa cetoamina e não o produto lábil, que é mais propenso a sofrer influências da dieta recentemente ingerida.



(16.7)

A HbA_{1c} atualmente é definida pelo International Federation of Clinical Chemistry Working Group on HbA_{1C} como hemoglobina A irreversivelmente glicosilada em uma ou ambas valinas N-terminais das cadeias β da molécula de hemoglobina tetramérica, incluindo a hemoglobina que também pode (porém, não isoladamente) ser glicosilada nos resíduos de lisina.

O teste de detecção de GHb fornece um índice da média dos níveis sanguíneos de glicose medidos nos últimos 2 a 4 meses. Embora a expectativa de vida das hemácias seja de aproximadamente 120 dias, os níveis de GHb representam uma média "ponderada" dos níveis de glicose, em que a contribuição dos eritrócitos jovens é maior que a dos eritrócitos senescentes. Cerca de 50% dos níveis de GHb são determinados pelos níveis plasmáticos de glicose quantificados no mês anterior, e 75% pelos dois últimos meses (Tahara, 1993). Os métodos

Tabela 16.5 Metas glicêmicas

	Hemoglobina A_{1c}	Glicose pré-prandial		Glicose pós-prandial*	
	(%)	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L
ADA†	< 7‡	90–130	5,0–7,2	< 180	< 10,0
AACE§	≤ 6,5	≤ 110	≤ 6,1	≤ 140	< 7,8

* 1 a 2 h após o início da refeição.

† ADA, American Diabetes Association, 2004d.

‡ < 6% pode ser considerado para casos de pacientes individuais.

§ AACE, American Association of Clinical Endocrinologists, 2002.

foram padronizados para o teste de detecção de HbA_{1c}, que atualmente é o teste de escolha para a avaliação do controle glicêmico. Para evitar criar confusão entre o público em geral, a American Diabetes Association, o American College of Endocrinology e o National Diabetes Education Program recomendam a adoção do termo "teste de *A1c*" para fazer referência aos resultados de HbA_{1C} ou o equivalente de HbA_{1C} (GHb).

O National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) teve início em 1996, com a meta de padronizar os testes de detecção de GHb para o método de HPLC, descrito como HbA_{1C} ou equivalente de HbA_{1C}, conforme o termo adotado pelo DCCT. Existem vários tipos de métodos certificados disponíveis para a quantificação da hemoglobina A_{1C}: imunoensaio, HPLC de troca iônica, eletroforese, HPLC de afinidade por boronato e métodos enzimáticos. Atualmente, já existem disponíveis analisadores de teste rápido de bancada confiáveis, como aquele que utiliza o método de imunoensaio em cassete (Guerci, 1997). A maioria dos laboratórios clínicos dos EU adota um método certificado e adere ao programa de teste de proficiência do College of American Pathologists, que utiliza amostras de sangue total e amostras liofilizadas (Little, 2001).

Para obter e manter um Certificate of Traceability to the DCCT reference method junto ao NGSP, anualmente, o laboratório deve satisfazer os critérios de precisão (CV ≤ 5%; ≤ 3% para laboratórios de nível 1), de distorção (o intervalo de confiança [IC] de 95% das diferenças existentes entre o método do teste e o Secondary Reference Laboratories [SRL] deve ser de ± 1% GHb do SRL (± 0,75% GHb para laboratórios de nível 1) e, por fim, os critérios de *outlier* (maior que + 3 DP das diferenças absolutas entre os pares). Usualmente, os laboratórios de nível 1 são maiores e se envolvem em pesquisas científicas. O site do NGSP na internet (http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp.html) contém informações sobre laboratórios certificados, métodos, protocolos e procedimentos para a obtenção das certificações.

Diante de certos fatores, os testes para GHb variam quanto à confiabilidade. É possível haver interferência da hemoglobina carbamilada em casos de uremia, hipertrigliceredemia e hiperbilirrubinemia. Os salicilatos podem causar interferência por meio de espécies acetiladas. A associação de hemoglobinopatias (HbSS, HbSC, HbCC) a uma elevada taxa de renovação de hemácias e à necessidade de transfusões exercerá efeitos danosos sobre a acurácia, do mesmo modo que o consumo crônico de álcool ou opiáceos, deficiência de ferro e envenenamento por chumbo (Hoberman, 1982; Tarim, 1999). As vitaminas C e E podem induzir falsamente a redução dos níveis da molécula ao inibirem sua glicosilação, contudo a vitamina C também pode aumentar os níveis detectados em alguns testes (Davie, 1992; Ceriello, 1991). É igualmente possível que o armazenamento da amostra exerça alguns efeitos. Qualquer condição associada à diminuição do tempo de sobrevida das hemácias ou da média da idade dessas células (p. ex., hemólise, recuperação de uma perda aguda, transfusões ou esplenectomia) causará uma queda dos níveis de HbA_{1C} decorrente da menor exposição à glicose plasmática. A hiperglicemia foi associada à diminuição da sobrevida dos eritrócitos, sugerindo que os níveis de HbA_{1C} em pacientes precariamente controlados talvez subestimem a média da concentração plasmática de glicose (Virtue, 2004).

De uma forma geral, indivíduos não diabéticos apresentam níveis de HbA_{1C} entre 4 e 6%. A Tabela 16.6 mostra a correlação entre a HbA_{1C}

e a média dos níveis plasmáticos de glicose utilizada na clínica, com base nos dados do DCCT.

O tempo de renovação das proteínas séricas, principalmente da albumina, é significativamente menor que o dos eritrócitos (14–20 dias). Sendo assim, a glicosilação dessas proteínas reflete o controle glicêmico em períodos mais estreitos. A sua glicação não enzimática ocorre de modo semelhante à glicação da hemoglobina, com formação de uma proteína da glicose associada à cetoamina. Existem vários métodos para quantificar proteínas glicosiladas ou albumina glicosilada, incluindo cromatografia por afinidade e imunoensaios. Tais análises podem ser úteis no caso de pacientes para os quais o teste de detecção de HbA_{1C} se mostra inacurado, como aqueles que apresentam hemoglobinopatias e anemias hemolíticas. Contudo, diferentemente dos níveis de HbA_{1C}, a sua utilidade clínica ainda precisar ser firmemente estabelecida.

Os testes de detecção de frutosamina são os mais amplamente utilizados para avaliar o controle glicêmico a curto prazo (3–6 semanas), visto que a média da meia-vida das proteínas é de 2 a 3 semanas. Esses testes proporcionam a vantagem de permitir o uso de amostras de soro e de requerer equipamentos automatizados bastante simples de manusear e que não custam caro. São mais confiáveis do que outros testes para proteínas glicosiladas, entretanto podem ser afetados pelas alterações dos níveis séricos de proteínas que ocorrem nas doenças agudas e hepáticas. Ainda é controverso se há necessidade de corrigir os valores de frutosamida para os valores séricos de proteínas ou de albumina. Esse teste não deve ser realizado se a concentração sérica de albumina for ≤ 3 mg/dL. Níveis elevados de ácido úrico, triglicérides e bilirrubina, bem como a presença de heparina ou hemólise também podem afetar a análise.

Teste de cetonas

Os corpos cetônicos – ácido β-hidroxibutírico, ácido acetoacético e acetona – são produtos da degradação de ácidos graxos. O ácido β-hidroxibutírico e o ácido acetoacético normalmente estão presentes na proporção de 1:1, a uma concentração de 0,5 a 1 mmol/L. O teste de detecção de cetonas, utilizando amostras de urina ou sangue, é particularmente importante para indivíduos com diabetes melito de tipo 1, na detecção de cetose. A cetoacidose diabética (DKA) é uma condição hiperglicêmica séria e potencial fatal que requer tratamento urgente. Está frequentemente associada a náusea, a vômito, a dor abdominal, a distúrbios eletrolíticos e a desidratação severa. Pacientes com diabetes de tipo 2 pouco controlados, particularmente em situações de estresse intenso ou doença aguda severa, também podem desenvolver DKA. O teste de cetonas pode ser útil durante a gravidez e na determinação da etiologia de distúrbios hipoglicêmicos.

A proporção de ácido β-hidroxibutírico e ácido acetoacético é notavelmente elevada na DKA, por causa da alteração do estado redox e dos elevados níveis de NADH nas mitocôndrias hepáticas. As tiras e os comprimidos mais comumente utilizados empregam o nitroprussiato de sódio (nitroferricianeto de sódio) e adquirem a cor púrpura diante de níveis elevados de ácido acetoacético. A acetona é detectada na presença de glicina. É possível que ocorram resultados falso-negativos com a utilização de tiras velhas, ou que foram excessivamente expostas ao ar, bem como após a ingestão de grandes quantidades de vitamina C. Resultados falso-positivos têm sido observados nos casos em que o paciente faz uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina ou de outros medicamentos com sulfidrila. O ácido β-hidroxibutírico não é detectado por esses métodos. Uma vez que os níveis de ácido β-hidroxibutírico sofrem uma queda, enquanto os níveis de ácido acetoacético e acetona aumentam durante o tratamento da DKA, esses testes não são úteis para o monitoramento terapêutico.

Para quantificar especificamente o ácido β-hidroxibutírico, existem métodos enzimáticos disponíveis tanto para uso hospitalar, como para o individual nos aparelhos de teste rápido domésticos. Esse ácido também pode ser quantificado por meio de métodos eletroquímicos, cromatográficos, eletroforéticos e colorimétricos. É possível realizar medidas seriadas de ácido β-hidroxibutírico para monitorar a recuperação da DKA no cenário hospitalar, contudo é mais frequente determinar a concentração sérica de eletrólitos, incluindo o bicarbonato, e calcular o intervalo aniônico.

Tabela 16.6 Correlação entre hemoglobina A_{1c} e a média dos níveis plasmáticos de glicose

	Média plasmática de glicose aproximada	
Hemoglobina A_{1c} (%)	**mg/dL**	**mmol/L**
4	65	3,5
5	100	5,5
6	135	7,5
7	170	9,5
8	205	11,5
9	240	13,5
10	275	15,5
11	310	17,5
12	345	19,5

De: Rohlfing, CL; Wiedmeyer, H-M; Little, RR et al. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. Copyright©2002 American Diabetes Association. De Diabetes Care, Vol. 25, 2002; 275–278. Modificado com permissão de *The American Diabetes Association*.

Hipoglicemia

A hipoglicemia resulta de um desequilíbrio entre a utilização e a produção de glicose, de modo que a taxa de utilização excede a de produção desse açúcar. Os sintomas de hipoglicemia podem ser agrupados em duas categorias: neurogênicos e neuroglicopênicos. Os sintomas neurogênicos são desencadeados pelo sistema nervoso autônomo. Tremores, palpitações e ansiedade são eventos mediados pelas catecolaminas, enquanto diaforese, fome e parestesias são fenômenos associados à liberação da acetilcolina. Os sintomas neuroglicopênicos ocorrem em consequência da diminuição do suprimento de glicose destinado ao sistema nervoso central e incluem tontura, formigamento, dificuldade de concentração, visão turva, confusão, alterações comportamentais, ataques e coma (Towler, 1993; Schwartz, 1987; Mitrakou, 1991).

O tratamento do diabetes melito com insulina ou agentes que elevam a secreção desse hormônio (fármacos secretagogos de insulina), como as sulfonilureias, constitui a principal causa de hipoglicemia. No entanto, inúmeros fármacos e condições médicas podem causar hipoglicemia (Tab. 16.7). A hipoglicemia hiperinsulinêmica pancreática pode ser diagnosticada pela demonstração da ausência da supressão normal da secreção de insulina no estado de hipoglicemia. Para estabelecer o diagnóstico correto, recomenda-se quantificar os níveis de insulina, peptídeo C, pró-insulina, autoanticorpos para insulina ou para receptor de insulina, β-hidroxibutirato e fármacos (i. e., níveis de sulfonilureia/meglitinida). Autoanticorpos para insulina e pró-insulina podem interferir nos imunoensaios para insulina, pró-insulina e peptídeo C.

A "tríade de Whipple", inicialmente proposta por Whipple para uso diagnóstico de distúrbios hipoglicêmicos, continua sendo uma importante ferramenta de avaliação de pacientes que apresentam episódios sugestivos de níveis plasmáticos de glicose reduzidos. A tríade de Whipple se refere aos sintomas consistentes com hipoglicemia associados ao registro de baixos níveis plasmáticos de glicose, bem como ao alívio de tais sintomas proporcionado pela correção da hipoglicemia (Whipple, 1938). Há indicação para a realização de mais avaliações, caso o paciente apresente sintomas de hipoglicemia e concentração plasmática de glicose ≤ 50 mg/dL (2,8 mmol/L) ao exame laboratorial, na ausência de tratamento para diabetes melito (Service, 1999a). Em crianças, uma concentração sanguínea de glicose ≤ 50 mg/dL (2,8 mmol/L) é considerada anormal e requer avaliação diagnóstica (Sperling, 2004; Haymond, 1989).

Distúrbios hipoglicêmicos

Fármacos. Medicamentos, particularmente a insulina e seus secretagogos (p. ex., fármacos à base de sulfonilureia, repaglinida e nateglinida), continuam sendo as causas mais comuns de hipoglicemia. Níveis

Tabela 16.7 Classificação clínica da hipoglicemia

Fármacos
Insulina
Sulfonilureias
Derivados do ácido benzoico (repaglinida)
Nateglinida
Álcool
Pentamidina
β-bloqueadores
Quinina
Salicilatos
Sulfonamidas
Haloperidol
Propoxifeno
Ácido paraminobenzoico
Doenças críticas
Insuficiência hepática
Insuficiência renal
Insuficiência cardíaca
Sepse
Desnutrição
Deficiências hormonais
Glucagon
Epinefrina
Cortisol
Hormônio do crescimento
Hiperinsulinismo endógeno
Distúrbios envolvendo as células β pancreáticas
Tumoral (insulinoma)
Não tumoral (nesidioblastose ou hiperplasia difusa das ilhotas)
Hipoglicemia autoimune
Anticorpos para insulina
Anticorpos para o receptor da insulina
Tumores de células não β
Mesenquimais: fibrossarcoma, mesotelioma, rabdomiossarcoma, leiomiossarcoma, lipossarcoma, linfossarcoma, hemangiopericitoma
Carcinomas: hepatomas, tumores adrenocorticais, hipernefroma, tumor de Wilms
Tumores neurológicos e neuroendócrinos: feocromocitoma, tumor carcinoide, neurofibroma
Hematológicos: leucemias, linfoma, mieloma
Hipoglicemia da primeira infância e da infância
Hiperinsulinismo
Transiente: eritroblastose fetal, síndrome de Beckwith-Wiedemann, diabetes descompensado (materno)
Persistente: hipoglicemia hiperinsulinêmica da infância
Doenças de armazenamento de glicogênio
Intolerância hereditária à frutose
Galactosemia
Déficits de neoglicogenêse
Síndrome de Reye
Deficiência de transportadores de glicose
Comprometimento da cetogênese
Deficiência de carnitina
Defeitos da função mitocondrial
Hipoglicemia alimentar
Cirurgia pós-gástrica
Hipoglicemia pós-prandial idiopática (funcional)

Adaptado de: Cryer PE: Glucose homeostasis and hypoglycemia. *In* Larsen PR, Kronenberg HK, Melmed S, Polonsky KS (eds): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, Saunders, 2003, pp. 1585–1618.
Lteif AN, Schwenk WF: Hypoglycemia in infants and children. Endocrinol Metab Clin N Amer 1999; 28(3):619–646.

de insulina elevados e níveis de peptídeo C reduzidos são detectados quando é realizada a administração de insulina exógena. Níveis elevados tanto de insulina como de peptídeo C, concomitantes a uma triagem farmacológica positiva para a detecção de secretagogo de insulina, seriam esperados em caso de uso clandestino desses agentes orais. É importante que esses testes sanguíneos sejam realizados durante o episódio hipoglicêmico. Os ensaios para a detecção de sulfonilureias e meglitinidas devem ser encaminhados a um laboratório que tenha condições adequadas para quantificar concentrações extremamente baixas de tais fármacos, uma vez que a utilização de testes com limites de detecção mais elevados pode acarretar um diagnóstico incorreto (Manning, 2003).

A pentamidina, utilizada no tratamento da pneumonia por *Pneumocystis carinii*, provoca hipoglicemia ao danificar as células β pancreáticas. A condição hipoglicêmica pode se instalar dentro de poucas horas ou dias após a administração do fármaco. Os níveis plasmáticos de insulina permanecem elevados, apesar da baixa concentração de glicose, apontando a liberação excessiva do hormônio (Bouchard, 1982; Assan, 1995). A hipoglicemia induzida por sulfonamida também está associada ao aumento dos níveis de insulina e peptídeo C em indivíduos suscetíveis (Hekimsoy, 1997). A hipoglicemia induzida por salicilatos pode ser decorrente do aumento da utilização periférica da glicose secundariamente ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, diminuição da neoglicogênese hepática e do aumento da liberação de insulina (Marks, 1999). Os β-bloqueadores (p. ex., propanolol) podem causar hipoglicemia pela antagonização da glicogenólise mediada pelas catecolaminas (Chavez, 1999).

O consumo de álcool pode inibir a neoglicogênese hepática e aumentar a atividade da fosforilase do glicogênio. Como resultado, há depleção dos estoques de glicogênio do fígado e, consequentemente, hipoglicemia. A hipoglicemia induzida por álcool usualmente é observada quando o indivíduo tem história de consumo de 50 a 300 g de álcool sem ingestão de nenhum alimento durante as 6 a 36 horas precedentes. O álcool pode ser detectado no sangue ou na respiração. Durante o episódio hipoglicêmico, os níveis plasmáticos de β-hidroxibutirato apresentam-se elevados, enquanto os níveis plasmáticos de insulina e peptídeo C estão diminuídos (Arky, 1989; Marks, 1999).

Doenças médicas severas. Uma doença hepática amplamente disseminada, bem como uma insuficiência cardíaca severa podem advir da condição hipoglicêmica. Os mecanismos patológicos envolvidos incluem comprometimento da neoglicogênese, congestão hepática com diminuição do aporte de oxigênio aos hepatócitos, comprometimento da degradação da insulina e desvio do sangue portal para dentro da circulação sistêmica (Khoury, 1998). A diminuição das reservas de glicogênio acoplada à falha da neoglicogênese e ao aumento da utilização de glicose são os fatores que podem constituir a causa da hipoglicemia observada em pacientes com sepse grave (Miller, 1980). Além disso, pacientes que apresentam grande redução da massa muscular, como ocorre na atrofia muscular espinhal e na miopatia congênita, são mais propensos a desenvolver hipoglicemia durante períodos de jejum prolongados (23 horas). Esse risco aumentado provavelmente está relacionado à pouca disponibilidade de alanina – um substrato para neoglicogênese. Uma baixa concentração plasmática de insulina e níveis plasmáticos aumentados de glucagon são observados no estado hipoglicêmico (Orngreen, 2003).

Na doença renal em estágio terminal (ESRD), a hipoglicemia pode estar relacionada a uma neoglicogênese defeituosa, como também ao comprometimento da glicogenólise hepática em decorrência de um estado nutricional precário (Arem, 1989). O consumo de álcool, o uso de insulina ou de fármacos à base de sulfonilureias, a sepse, a desnutrição, doença hepática e insuficiência cardíaca são fatores que podem aumentar a probabilidade de eventos hipoglicêmicos em indivíduos com insuficiência renal (Haviv, 2000). O uso de gabapentina foi associado à hipoglicemia num paciente com ESRD submetido à diálise peritoneal. Os níveis plasmáticos de insulina e peptídeo C estavam elevados durante o evento hipoglicêmico (Penumalee, 2003).

Deficiências hormonais. A contrarregulação da glicose, mediada pelo glucagon, catecolaminas, cortisol e GH é importante para a prevenção da hipoglicemia. Para aumentar os níveis plasmáticos de glicose, o glucagon inicialmente estimula a glicogenólise e, posteriormente, a neoglicogênese. As catecolaminas aumentam a glicogenólise, a neoglicogênese e a lipólise.

Elas ainda diminuem a captação de glicose mediada pela insulina e inibem a liberação de insulina. Tanto o GH como o cortisol reduzem a captação tecidual de glicose mediada pela insulina, além de aumentar a liberação da glicose na circulação. Uma deficiência na secreção desses hormônios pode contribuir para abaixar os níveis sanguíneos de glicose. Em adultos, a hipoglicemia raramente é atribuível a deficiências envolvendo o glucagon ou as catecolaminas. Entretanto, é comum haver comprometimento das respostas de glucagon e epinefrina à hipoglicemia em pacientes que apresentam diabetes melito há muito tempo e que estão associados a episódios hipoglicêmicos prolongados. Bebês e crianças com deficiências relacionadas ao cortisol e ao GH são propensos ao desenvolvimento de hipoglicemia, especialmente quando manifestam doenças agudas. Adultos com deficiência de glicocorticoides ou GH podem igualmente desenvolver hipoglicemia, normalmente após períodos de jejum prolongados (Smallridge, 1980; Zuker, 1995; Bunch, 2002).

Tumores de células não β. A hipoglicemia decorrente de tumores de células não oriundas das ilhotas pancreáticas (NICTH, *non-islet cell tumor hypoglycemia*) é produzida por tumores de células não β, principalmente mesenquimais. Esses tumores estão associados a uma produção aumentada de fator de crescimento insulino-símile II (IGF-II, *insulin-like growth factor II*). Acredita-se que os níveis elevados de IGF-II aumentam a utilização da glicose e suprimem a produção de glicose endógena (Chung, 1996; Daughaday, 1989). O diagnóstico da NICTH normalmente é feito pela detecção de hipoglicemia em estado de jejum, níveis baixos de insulina, pró-insulina e peptídeo C, uma elevada proporção IGF-II/IGF-I e baixos níveis de GH e β-hidroxibutirato. Em geral, o tumor é detectado ao exame físico e confirmado por estudos de diagnósticos radiológicos.

Hiperinsulinismo endógeno. A hipoglicemia causada pela insulina produzida endogenamente pode ser devida a: (1) tumores de células β secretores de insulina; (2) hiperinsulinismo congênito (também denominado nesidioblastose/hipertrofia de ilhotas ou síndrome da hipoglicemia pancreatógena não insulinoma); e (3) produção de autoanticorpos dirigidos contra a insulina em pacientes que nunca tenham recebido tratamento à base de insulina (Hirata, 1994). Para estabelecer o diagnóstico de insulinoma, recomenda-se proceder à supervisão de um período de jejum de 72 horas, com monitoramento clínico e bioquímico frequente dos sinais de hipoglicemia. Durante o episódio hipoglicêmico, amostras de sangue devem ser obtidas para determinação dos níveis de glicose, insulina, pró-insulina, peptídeo C e β-hidroxibutirato. Testes de amostras de sangue ou urina para detecção de fármacos à base de sulfonilureia/meglitinida também são realizados. Os critérios diagnósticos do insulinoma são: existência de sinais e sintomas de hipoglicemia com níveis plasmáticos de glicose ≤ 45 mg/dL (2,5 mmol/L); uma concentração de insulina indevidamente alta ≥ 6 μU/mL (por radioimunoensaio) ou ≥ 3 μU/mL (ensaio de imunoquimioluminescência); concentração de peptídeo C ≥ 0,2 pmol/L; concentração de pró-insulina ≥ 5 pmol/L; níveis de β-hidroxibutirato ≤ 2,7 mmol/L; uma alteração ≥ 25 mg/dL nos níveis plasmáticos de glicose em resposta à injeção endovenosa de 1 mg de glucagon; e, por fim, triagem negativa para detecção de sulfonilureia/meglitinida em amostras de sangue/urina (Service, 1995, 1999b).

Autoimune. Em pacientes que nunca receberam injeções de insulina, a hipoglicemia associada à produção de autoanticorpos anti-insulina constitui um distúrbio raro denominado síndrome da insulina autoimune (AIS, *autoimune insulin syndrome*). Indivíduos com doenças autoimunes ou que fizeram uso recente de medicação contendo sulfidrilas (i. e., metimazola, penicilamina, captopril, imipinem) apresentam risco aumentado de desenvolver AIS. Observa-se uma secreção excessiva de insulina após as refeições que está conectada à produção de autoanticorpos. Como resultado esse hormônio se torna indisponível para os tecidos-alvo. Horas mais tarde a insulina dissocia-se dos anticorpos e provoca hiperinsulinemia e hipoglicemia. Os níveis de insulina tornam-se extremamente elevados e distintamente mais altos que no insulinoma. Os níveis de peptídeo C estão suprimidos de modo parcial, sendo encontrada uma elevada proporção molar insulina/peptídeo C (Hirata, 1994; Dozio, 1998; Lidar, 1999; Cavaco, 2001; Vogeser, 2001; Yaturu, 2004).

Anticorpos dirigidos contra o receptor da insulina podem causar hipoglicemia ou hiperglicemia acompanhada de extrema resistência à insulina. Outras doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico e a tireoidite de Hashimoto, também podem estar presentes em tais pacientes. Nessas condições, os anticorpos que reconhecem o receptor da insulina bloqueiam a ligação insulina-receptor de insulina. Alguns pacientes apresentam hiperglicemia, porque a degradação ou a regulação negativa desse receptor levam à resistência à insulina. Há casos em que um mesmo paciente apresenta hiper e hipoglicemia. Os níveis plasmáticos de glicose, β-hidroxibutirato e pró-insulina estão baixos, enquanto os níveis de insulina e a proporção insulina/peptídeo C encontram-se inadequadamente altos. A detecção dos anticorpos antirreceptor de insulina pode ser realizada por meio de ensaios de imunoprecipitação (Redmon, 1999; Taylor, 1989). Mutações envolvendo o gene do receptor para insulina representam outra causa rara de hipoglicemia.

Primeira infância e infância. A hipoglicemia da infância – que ocorre já nas primeiras 72 horas após o nascimento – costuma ser passageira e comum em bebês prematuros ou pequenos demais para a idade gestacional que apresentam. Quando a mãe tem diabetes melito descompensado, o bebê apresenta hiperinsulinismo por tempo prolongado. Essa condição aumenta o risco de o bebê desenvolver hipoglicemia já nos primeiros dias de vida. Outras etiologias incluem distúrbios pituitários e suprarrenais. A hipoglicemia cetogênica pode ser observada em crianças com idade entre 18 meses e 5 anos. A alanina – um substrato da neoglicogênese – é encontrada em baixas concentrações nesses pacientes. Usualmente, o episódio de uma doença ou um período de jejum prolongado são associados à hipoglicemia (Haymond, 1983).

A hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente da infância (PHHI, *persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*) comumente se deve à incapacidade das células β pancreáticas de suprimir adequadamente a secreção de insulina diante da hipoglicemia. A manifestação dessa condição em geral ocorre no primeiro ano de vida, tipicamente durante as primeiras horas ou dias após o nascimento. A ocorrência de mutações nos genes codificadores dos canais de K^+ ATP-sensíveis das células β (canais K_{ATP}) – SUR1 (receptor da sulfonilureia) e Kir6.2 – provoca a liberação irregular da insulina e causa as formas mais severas de PHHI. A síndrome da hipoglicemia pancreatógena não insulinoma, descrita em adultos, não está associada à ocorrência de mutações em SUR1 e Kir6.2. Pacientes com a síndrome geralmente apresentam hipoglicemia pós-prandial. Os níveis séricos de insulina e peptídeo C estão elevados e as triagens para detecção de fármacos sulfonilureia e meglitinida resultam negativas (Service, 1999b).

A enzima glicoquinase (GCK) atua como um sensor de glicose nas células β pancreáticas e modula a secreção de insulina estimulada pela glicose. Mutações ativadoras de GCK são herdadas de forma autossômica dominante e foram associadas à hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar. Em geral, a hipoglicemia é branda (se comparada à forma autossômica recessiva) e não se limita à infância. Também foi descrita a ocorrência de mutações *de novo* no gene da GCK, resultando em hipoglicemia. Na síndrome da hiperamônia do hiperinsulinismo, a hipoglicemia é causada por uma mutação ativadora no gene da glutamato desidrogenase (GLUD1), localizado no cromossomo 10. Trata-se de um distúrbio autossômico dominante caracterizado por hipoglicemia e elevação dos níveis de amônia (3–8 vezes acima do normal). Uma hipoglicemia menos severa é observada em casos esporádicos (Sunehag, 2002; Straub, 2001; Cuesta-Munoz, 2004; Stanley, 1998). A ocorrência de acidose lática, além da hipoglicemia, foi descrita numa criança que apresentava mutação genética em uma das subunidades que compõem o complexo da cadeia respiratória mitocondrial III (Haut, 2003). Mutações envolvendo as enzimas que participam da oxidação mitocondrial de ácidos graxos podem, ainda, causar PHHI (Molven, 2004).

Alimentar. A hipoglicemia alimentar (reativa) ocorre horas depois das refeições. Os TTGOs não fornecem resultados confiáveis que possam ser utilizados para diagnosticar essa condição. Indivíduos submetidos à cirurgia gástrica apresentam risco de desenvolver o distúrbio. Um esvaziamento gástrico rápido aliado à síndrome correspondente podem desencadear uma resposta de insulina exagerada que resulta em hipoglicemia. Alguns indivíduos isentos de patologias GI relatam a ocorrência de sintomas espontâneos, sugestivos de hipoglicemia, 1 a 4 horas após a ingestão de refeições ricas em carboidratos. No entanto, como o exame laboratorial resulta normal, considera-se que tais indivíduos apresentam hipoglicemia reativa idiopática. O TTGO também não tem utilida-

de para o diagnóstico dessa condição (Lefebvre, 1988). Alguns pacientes, que apresentaram aumento da sensibilidade à insulina, exibiram características de hipoglicemia pós-prandial (Tamburrano, 1989). Os fatores colaboradores incluem retardo da liberação de insulina em resposta à refeição e ingestão de álcool concomitante (Flanagam, 1998).

Erros inatos do metabolismo de carboidratos

Os níveis plasmáticos de glicose são mantidos normais graças à absorção da glicose a partir da dieta, síntese de glicose através da neoglicogênese e liberação de glicose a partir do glicogênio – a principal forma de armazenamento de glicose. As doenças que envolvem os estoques de glicogênio ou glicogenoses resultam de defeitos do metabolismo do glicogênio. Tais doenças são consequência de deficiências enzimáticas herdadas, sendo que as enzimas afetadas controlam a síntese ou a quebra do glicogênio. Anomalias quantitativas ou qualitativas de glicogênio são encontradas nesses distúrbios, em que o fígado e os músculos são os órgãos mais comumente envolvidos, uma vez que possuem quantidades abundantes do polissacarídeo. As doenças do armazenamento de glicogênio que afetam primariamente o fígado (glicogenoses hepáticas) em geral se manifestam por hipoglicemia e hepatomegalia. Câimbras musculares, intolerância ao exercício, fadiga e fraqueza são queixas constantes de indivíduos com doenças de armazenamento de glicogênio envolvendo os músculos (glicogenoses musculares). As doenças de armazenamento de glicogênio que afetam principalmente o fígado são os tipos: I (deficiência de glicose-6-fosfatase), III (deficiência da enzima desramificadora), IV (deficiência de enzima ramificadora), VI (deficiência de fosforilase hepática), IX (deficiência de fosforilase quinase) e tipo 0 (deficiência de glicogênio sintase), além da deficiência de transportador de glicose 2 (GLUT-2). A Tabela 16.8 mostra as diversas características das glicogenoses hepáticas (Wolfsdorf, 1999; Chen, 2001). As glicogenoses musculares ou doenças de armazenamento de glicogênio que afetam os músculos (Tab. 16.9) são: as de tipo V (deficiência de fosforilase muscular), VII (deficiência de fosfofrutoquinase muscular) e as doenças de armazenamento de glicogênio secundárias a defeitos das enzimas fosfoglicerase quinase, fosfoglicerase mutase, lactato desidrogenase, frutose 1,6-bifosfato aldolase A, piruvato quinase, fosforilase quinase muscular, α-glicosidase ácida lisossômica (tipo II, doença de Pompe) e fosforilase quinase cardíaca específica (Tsujino, 2000; Chen, 2001; Weinstein, 2002).

Defeitos do metabolismo de galactose

A galactose é um monossacarídeo que, ao lado da glicose, constitui o dissacarídeo lactose. O leite e seus derivados são as principais fontes de galactose. Defeitos envolvendo as enzimas galactoquinase, galactose-1-fosfato uridiltransferase e uridina difosfato galactose-4-epimerase resultam em distúrbios do metabolismo e acúmulo de galactose e de seus metabólitos, com consequente galactosemia (Holton, 2001).

Galactosemia com deficiência de uridiltransferase. A deficiência de galactose-1-fosfato uridiltransferase (GalT; galactosemia clássica) está associada à herança autossômica recessiva. A mutação que mais comumente afeta o gene GalT é a mutação Q188R, no cromossomo 9. A deficiência de GalT se manifesta precocemente na infância, com sintomas de hipoglicemia, vômitos, diarreia, irritabilidade, dificuldades alimentares e falha do crescimento. As crianças que sofrem da doença podem apresentar icterícia, hepatomegalia e propensão a contusões. Os testes diagnósticos iniciais podem revelar hiperbilirrubinemia, elevação dos níveis de transaminases, acidose metabólica, galactosúria, glicosúria, hipoglicemia e medidas de coagulação anormais. Tais pacientes correm risco de desenvolverem edema cerebral. Casos de hemorragia vítrea e sepse por *Escherichia coli* foram descritos em indivíduos com doença. As complicações a longo prazo envolvidas na deficiência de GalT são comprometimento cognitivo, insuficiência ovariana em mulheres e doença neurológica atáxica. Ensaios microbiológicos e fluorimétricos são empregados na triagem de recém-nascidos para detectar casos de galactosemia. Existe um teste fluorimétrico utilizado para a detecção da atividade GalT (teste do ponto fluorescente de Beutler). Para o diagnóstico, um resultado anormal deve ser confirmado por análises bioquímicas ou moleculares. Os ensaios quantitativos podem fornecer resultados falso-negativos, se forem realizados após transfusões de sangue. Uma forma mais branda de galactosemia, conhecida como "variante de Duarte", é causada por uma mutação no gene GalT e caracteriza-se pela diminuição da atividade enzimática nas hemácias, em geral, clinicamente insignificante. O tratamento da deficiência de GalT consiste na restrição alimentar à galactose (Holton, 2001; Leslie, 2003).

Deficiência de galactoquinase (GalK). Nessa deficiência, a galactose não é convertida em galactose-1-fosfato e, como resultado, há formação de catarata. Os pseudotumores cerebrais constituem outra complicação raramente observada nessa condição. O diagnóstico é feito pela demonstração da elevação dos níveis sanguíneos de galactose concomitantemente a uma atividade de uridiltransferase normal e à ausência de atividade de galactoquinase nos eritrócitos. Uma dieta isenta de galactose pode reverter a catarata, desde que seja iniciada ainda na primeira infância (Holton, 2001; Bosch, 2002).

Deficiência de uridina difosfato galactose-4-epimerase (GalE). A forma benigna está associada a uma deficiência enzimática limitada a eritrócitos e leucócitos. Os indivíduos afetados permanecem sadios e não há necessidade de tratamento. Na forma grave, contudo, os achados clínicos assemelham-se aos da deficiência de GalT, adicionados de hipotonia e surdez sensório-neural. O tratamento consiste na restrição alimentar à galactose (Walter, 1999; Holton, 2001).

Defeitos do metabolismo de frutose

A frutosúria essencial, a intolerância hereditária à frutose e a deficiência de frutose-1,6-difosfatase são condições clínicas resultantes de defeitos no metabolismo da frutose.

Frutosúria essencial. Esse distúrbio autossômico recessivo resulta de uma deficiência de frutoquinase. A enzima frutoquinase catalisa a conversão da frutose em frutose-1-fosfato. A condição é assintomática e usualmente diagnosticada incidentalmente através da detecção de frutose na urina, como substância redutora. Não requer tratamento.

Intolerância hereditária à frutose. Um defeito na atividade da frutose-1,6-bifosfato aldolase B presente no fígado, rim e intestino provoca a falha da conversão de frutose-1-fosfato e frutose-1,6-bifosfato em di-hidroxiacetona fosfato, gliceraldeído-3-fosfato e gliceraldeídos. A ingestão de frutose leva ao acúmulo de frutose-1-fosfato e induz a sintomas de hipoglicemia e náusea, seguidos de vômito. Tais sintomas ocorrem somente quando o indivíduo ingere alimentos contendo frutose. A exposição prolongada a tais alimentos pode causar episódios hipoglicêmicos frequentes, hepatomegalia, irritabilidade, letargia, ataques e disfunção tubular proximal. A disfunção hepática pode resultar em aumento do tempo de coagulação, elevação dos níveis de transaminases e de bilirrubina, além de hipoalbuminemia. O diagnóstico apoia-se na suspeita clínica acompanhada da realização de um teste de tolerância à frutose administrada por via endovenosa. O diagnóstico definitivo pode ser obtido realizando-se o ensaio para atividade da aldolase B com amostra de biópsia hepática.

Deficiência de frutose-1,6-bifosfatase. Esse defeito autossômico recessivo da enzima frutose-1,6-bifosfatase resulta na falha da produção hepática de glicose a partir de precursores da neoglicogênese, tais como lactato, glicerol e alanina. Pacientes afetados podem apresentar episódios prejudiciais à vida, como hipoglicemia, hiperventilação, acidose lática, convulsões e coma. O diagnóstico é estabelecido pela demonstração da deficiência enzimática em amostras de biópsias hepáticas ou intestinais. A correção da hipoglicemia e da acidose por meio da administração endovenosa de líquidos é o tratamento de escolha em casos de ataque agudo. O jejum prolongado pode provocar o aparecimento dos sintomas em indivíduos afetados, se os estoques de glicogênio estiverem depletados. Há necessidade de limitar a ingestão de alimentos que contenham frutose e sucrose (Steinman, 2001).

Acidose lática

O ácido lático é um produto do metabolismo do ácido pirúvico. Aproximadamente 1.400 mmol de ácido lático/dia são produzidos em indivíduos sadios, sendo a maior parte derivada da glicose, a partir da via glicolítica e da desaminação da alanina (Marko, 2004; Kreisberg, 1980). Essa enorme quantidade de ácido lático é eliminada através de diversos mecanismos, incluindo tamponamento por líquidos extracelulares e remoção pelo fígado e rins. Sob circunstâncias normais, as

Tabela 16.8 Glicogenoses hepáticas

Tipo (GSD)	Defeito	Características clínicas	Achados laboratoriais	Tratamento	Genética
Ia/doença de von Gierke	Glicose-6-fosfatase	Membros magros, baixa estatura, abdômen protuberante, xantomas na pele, alterações retinais, hepatomegalia, ataques hipoglicêmicos, retardo do crescimento	Hipoglicemia, acidose lática, hiperuricemia, dislipidemia Diagnóstico: biópsia hepática para demonstração da atividade da glicose-6-fosfatase tanto em microssomas intactos como em microssomas totalmente rompidos	Ingestão matinal de alimentos com elevado teor de carboidratos complexos; nutrição parenteral total, infusão de glicose por tubo nasogástrico ou de gastrotomia durante a noite; amido cru; restrição à frutose e galactose	Autossômica recessiva
Ib	Glicose-6-fosfatase translocase	Igual a 1a, com infecções bacterianas recorrentes	Igual a 1a, acrescidos de neutropenia e enteropatia inflamatória	Igual a 1a, acrescido da administração de fatores estimuladores da formação de colônias de granulócitos e macrófagos (CSF-GM) para tratar a neutropenia	Autossômica recessiva
IIIa (também denominada "doença de Cori" ou "doença de Forbes")	Enzima desramificadora de glicogênio (tanto no fígado como no músculo)	Infância: hepatomegalia, hipoglicemia, retardo do crescimento Vida adulta: atrofia muscular, fraqueza, cardiomiopatia	Infância: dislipidemia, hipoglicemia, transaminases hepáticas, cetose de jejum, níveis normais de lactato e ácido úrico Vida adulta: o EMG indica miopatia Diagnóstico: demonstração de níveis anormais de glicogênio e atividade enzimática em amostras de biópsia do fígado e de músculo	Infância: igual a 1a, com inclusão de uma dieta de elevado teor proteico. Sem restrições à frutose nem à galactose Vida adulta: não há tratamento efetivo para a miopatia	Autossômica recessiva
IIIb	Enzima desramificadora de glicogênio hepática (enzima desramificadora muscular normal)	Igual a IIa, mas sem os sintomas musculares	Igual a IIIa, sem os achados musculares	Igual a IIIa	Autossômica recessiva
IV (também denominada doença de Andersen, amilopectinose)	Enzima ramificadora do glicogênio	Hepatoesplenomegalia, falha de crescimento, cirrose hepática, hipertensão hepática, ascite, varizes esofágicas, além além de ser fatal aos 5 anos de idade. Raramente há hipoglicemia, contudo pode haver cirrose hepática Forma neuromuscular: a) no recém-nascido: hipotonia, atrofia muscular b) na infância: miopatia ou cardiomiopatia c) na vida adulta: disfunção do sistema nervoso central e periférico difusa (doença do corpúsculo de poliglucosan do adulto)	Deposição tecidual de material similar à amilopectina Deficiência de enzima ramificadora no fígado Doença do corpúsculo de poliglucosan do adulto: deficiência da enzima ramificadora em leucócitos ou biópsia de nervo	Não há tratamento específico. Manutenção da normoglicemia Transplante de fígado em casos especiais	Autossômica recessiva
VI (também denominada doença de Hers)	Fosforilase do glicogênio (no fígado)	Hepatomegalia, retardo do crescimento na primeira infância, curso benigno A hepatomegalia melhora com a idade	Hipoglicemia discreta, dislipidemia, cetose Níveis normais de ácido úrico e ácido lático Diagnóstico: atividade enzimática anormal em biópsia obtida de tecidos afetados	Dieta rica em carboidratos, refeições frequentes Não há tratamento específico para a maioria dos pacientes	Autossômica recessiva
IXa	Fosforilase quinase (no fígado)	Hepatomegalia, abdômen protuberante, retardo do crescimento, retardo do desenvolvimento motor	Dislipidemia discreta, elevação discreta das transaminases hepáticas, cetose de jejum, hipoglicemia discreta Diagnóstico: atividade enzimática anormal em biópsia obtida de tecidos afetados	Dieta rica em carboidratos, refeições frequentes Curso usualmente benigno	Ligada ao cromossomo X
IXb	Deficiência de fosforilase (no fígado e no músculo)	Hepatomegalia, retardo do crescimento, hipotonia muscular (em alguns pacientes)	Igual a IXa	Igual a IXa	Autossômica recessiva

Tabela 16.8 Glicogenoses hepáticas (*continuação*)

Tipo (GSD)	Defeito	Características clínicas	Achados laboratoriais	Tratamento	Genética
0	Glicogênio sintase	Sintomas hipoglicêmicos durante o período matinal Hepatomegalia ausente Retardo discreto do crescimento (em poucos casos)	Hipoglicemia de jejum, hipercetonemia. Hiperglicemia e elevação dos níveis de lactato após as refeições Diagnóstico: análise de mutações do gene da glicogênio sintase hepática	Alimentação à base de amido cru durante a noite Refeições ricas em proteína e frequentes, durante o dia	Autossômica recessiva
XI (também denominada síndrome de Fanconi-Bickel)	GLUT 2	Abdômen protuberante em decorrência da hepatomegalia Rinomegalia, raquitismo e falha de crescimento	Glicosúria, fosfatúria, aminoacidúria, desperdício de bicarbonato, hipofosfatemia, elevação dos níveis de fosfatase alcalina Discreta hipoglicemia de jejum e dislipidemia. Raquitismo detectado por radiografias	Não há terapia específica Reposição sintomática de água, eletrólitos, e vitamina D Restrição à galactose Pequenas refeições realizadas com frequência e suplementação com amido de milho	Autossômica recessiva

Adaptado de: Chen YT: Glycogen storage diseases. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001. pp 1521–1551.

Wolfsdorf JI, Holm IA, Weinstein DA: Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. Endocrinol Metab Clin N Amer 1999; 28(4):801–823.

Weinstein DA, Wolfsdorf JI: Glycogen storage diseases: A primer for clinicians. Endocrinologist 2002; 12: 531–538.

Tabela 16.9 Glicogenoses musculares

Tipo	Defeito	Características clínicas	Achados laboratoriais	Tratamento
V (doença de McArdle)	Fosforilase muscular	Intolerância ao exercício, cãimbras musculares. Urina com tonalidade vermelho-escuro após a prática de exercícios físicos. Usualmente, surge na segunda ou terceira década de vida	Mioglobinúria, creatina quinase em repouso e após o exercício; amônia e ácido úrico com o exercício Diagnóstico: avaliação enzimática do do músculo ou análise de mutação	Tolerância ao exercício através do treinamento aeróbico ou pela ingestão de glicose ou frutose Dieta rica em proteínas; suplementação com vitamina B_6
VII (doença de Tarui)	Fosfofrutoquinase	Igual ao tipo V, acrescidas de: severa intolerância ao exercício ou miopatia na infância, anemia hemolítica compensada, hiperuricemia mais acentuada que no tipo V, intolerância aguda ao exercício após o consumo de refeições ricas em carboidrato	Creatina quinase e bilurrubina, reticulocitose, hiperuricemia Diagnóstico: demonstração bioquímica ou histoquímica do defeito enzimático	Evitar a prática extenuante de exercícios físicos para prevenir cãimbras musculares e mioglobinúria
Deficiência de fosfoglicerato quinase	Fosfoglicerato quinase	Igual ao tipo V, mais: anemia hemolítica, disfunção do SNC e/ou miopatia	Creatina quinase (nem sempre) Resultados anormais em ensaios enzimáticos para músculos	Igual ao tipo VII
Deficiência de fosfoglicerato mutase	Subunidade M da fosfoglicerato mutase	Igual ao tipo V	Níveis séricos de creatina quinase	Igual ao tipo VII
Deficiência de lactato desidrogenase	Subunidade M da ácido lático desidrogenase M subunit	Igual ao tipo V, mais: erupções eritematosas, dificuldades de parto (rigidez uterina)	Níveis séricos de creatina quinase (nem sempre)	Igual ao tipo VII
Deficiência de fructose-1,6-bifosfato aldolase A	Fructose-1,6-bifosfato aldolase A	Igual ao tipo V, mais: fraqueza muscular, anemia hemolítica	Níveis séricos de creatina quinase (nem sempre)	Igual ao tipo VII
Deficiência de piruvato quinase	Isoenzima da piruvato quinase muscular	Cãibras musculares, fraqueza muscular fixa	Níveis séricos de creatina quinase (nem sempre)	Igual ao tipo VII
Deficiência de fosforilase quinase muscular	Quinase muscular (específica do músculo)	Igual ao tipo V, mais: fraqueza muscular e atrofia	Níveis séricos de creatina quinase (nem sempre)	Igual ao tipo VII
II/doença de Pompe	Glicosidase α ácida lisossômica (maltase ácida)	Bebê: fraqueza muscular, problemas alimentares, macroglossia, hepatomegalia, cardiomiopatia Fase tardia da infância: fraqueza muscular proximal, dificuldades de deglutição, fraqueza dos músculos respiratórios Vida adulta: fraqueza muscular proximal com sério comprometimento do cíngulo do membro inferior e dos músculos paraespinal e do diafragma	Creatina quinase, aspartato transaminase, LDH Diagnóstico: atividade de glicosidase α ácida diminuída ou ausente no músculo ou em cultura de fibroblastos da pele	Bebê: não há tratamento efetivo Fase tardia da infância e vida adulta: dieta rica em proteínas Apoio ventilatório

Adaptado de: Chen YT: Glycogen storage diseases. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, pp. 1521–1551.

Tsujino S, Nonaka I, DiMauro S: Glycogen storage myopathies. Neurol Clin 2000; 18(1):125–150.

taxas de entrada e saída de lactato do sangue se mantêm em equilíbrio, de modo que o acúmulo líquido de lactato é nulo. O acúmulo excessivo de ácido L-lático é causado pela superprodução e/ou subutilização de L-lactato (a forma levógira do ácido lático).

A Tabela 16.10 mostra causas seletas de acidose lática. A produção de ácido lático aumenta durante a isquemia, ataques, exercício vigoroso e em algumas condições leucêmicas. Durante a prática extenuante de exercícios físicos, os elevados níveis de ácido lático produzidos são rapidamente eliminados por mecanismos tanto renais como hepáticos, bem como através do metabolismo aeróbio muscular (meia-vida aproximada de 60 minutos). A diminuição da utilização de ácido lático também pode levar ao seu acúmulo. De uma forma geral, é isso que ocorre nas doenças hepáticas e renais. Defeitos na remoção do ácido lático têm sido associados à insuficiência hepática, defeitos enzimáticos específicos e acidose severa. A metformina, amplamente prescrita para o tratamento do diabetes de tipo 2, raramente causa acidose lática. Os principais fatores de risco para esse distúrbio relacionados ao uso da metformina são insuficiência cardíaca congestiva, hipóxia tecidual, insuficiência renal e sepse (Salpeter, 2003; Misbin, 2004). Os nucleosídeos inibidores de transcriptase reversa (NRTI, *nucleoside reverse transcriptase inhibitor*) são empregados no tratamento da infecção por HIV e podem induzir acidose lática (John, 2002; Ogedegbe, 2003).

A acidose lática é diagnosticada pela detecção de níveis sanguíneos elevados de lactato (> 45 mg/dL ou > 5 mmol/L), intervalo aniônico elevado e pH sanguíneo baixo (< 7,35). Para quantificar os níveis de lactato com acurácia, no momento da obtenção das amostras a compressão exercida pelo torniquete deve ser mínima e o paciente não deve cerrar o punho. As amostras de sangue devem ser coletadas em tubos de tampa cinza contendo fluoreto de oxalato, que impede a glicólise.

O tratamento da acidose lática consiste na correção das condições subjacentes responsáveis pela perturbação do metabolismo de lactato. A oxigenação tecidual, a melhora do *status* hídrico, a amplificação do *status* cardíaco e o tratamento da sepse exercem papel importante no tratamento da acidose lática. A diálise se torna necessária em alguns casos para a remoção do lactato.

A acidose D-lática resulta do acúmulo excessivo de ácido D-lático (a forma dextrogira do ácido lático). Essa condição foi descrita em pacientes com desvio jejunoileal ou que sofreram ressecção do intestino delgado. Em tais condições a glicose e os demais carboidratos são convertidos em ácido D-lático no cólon por ação das bactérias. O ácido D-lático cai na circulação sistêmica e é lentamente metabolizado. Pacientes afetados apresentam episódios de acidose metabólica e encefalopatia. Os níveis de ácido D-lático podem ser determinados através de ensaios enzimáticos utilizando a D-lactato desidrogenase (Luft, 2001; Zhang, 2003).

Tabela 16.10 Causas seletas da acidose L-lática

Hipóxia tecidual
Choque séptico
Choque cardiogênico
Choque hemorrágico
Hipoxemia aguda
Envenenamento por monóxido de carbono
Condições metabólicas/médicas
Diabetes melito descompensado
Insuficiência hepática
Insuficiência renal
Tumores
Leucemia
Linfoma
Fármacos/substâncias tóxicas
Zidovudina
Metformina
Etanol
Salicilatos
Isoniazida
Cianeto
Metanol
Etilenoglicol
Erros inatos do metabolismo
Doença de armazenamento de glicogênio de tipo 1a (doença de von Gierke)
Deficiência de frutose-1,6-bifosfatase
Deficiência de piruvato desidrogenase
Acidúrias orgânicas: acidemia propriônica, acidemia metilmalônica
Doenças mitocondriais:
KSS (síndrome de Kearns-Sayre)
PEO (oftalmoplegia externa progressiva)
PS (síndrome de Pearson)
MERRF (epilepsia mioclônica com fibras vermelhas anfractuosas)
MELAS (miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose lática e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral)
MILS (síndrome de Leigh de herança materna)

Referências bibliográficas

American Association of Clinical Endocrinologists: Medical guidelines for the management of diabetes mellitus. Endocr Pract 2002; 8(Suppl 1):40–82.
Descreve as diretrizes de monitoramento e supervisão do diabetes endossadas pelo American College of Endocrinology.

American Diabetes Association: Economic costs of diabetes in the US in 2002. Diabetes Care 2003; 26(3):917–932.

American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2004a; 27(Suppl 1):S5–S10.

American Diabetes Association: Gestational diabetes mellitus. Diabetes Care 2004b; 27(Suppl 1):S88–S90.

American Diabetes Association: Screening for type 2 diabetes. Diabetes Care 2004c; 27(Suppl 1):S11–S14.

American Diabetes Association: Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care 2004d; 27 (Suppl 1):S15–S35.
Resume os critérios de classificação e diagnóstico do diabetes, além de fornecer recomendações para avaliação do controle glicêmico, metas de supervisão e estratégias para prevenir complicações.

Arem R: Hypoglycemia associated with renal failure. Endocrinol Metab Clin N Amer 1989; 18(1):103–121.

Arky RA: Hypoglycemia associated with liver disease and ethanol. Endocrinol Metab Clin N Amer 1989; 18(1):75–90.

Assan R, Perronne C, Assan D, et al: Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis. Determinant roles of renal failure and drug accumulation. A study of 128 patients. Diabetes Care 1995; 18(1):47–55.

Bellows C, Haque S, Jaffe B: Pancreatic polypeptide islet cell tumor: case report and review of the literature. J Gastrointest Surg 1998; 2(6):526–532.

Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW, and Participating Laboratories: Diabetes Antibody Standardization Program: First assay proficiency evaluation. Diabetes 2003; 52:1128–1136.
Relato da primeira avaliação de proficiência do Diabetes Antibody Standardization Program, *que inclui informações sobre o desempenho de diferentes ensaios para detecção de GAD, IA-2 e autoanticorpos anti-insulina.*

Bosch AM, Bakker HD, van Gennip AH, et al: Clinical features of galactokinase deficiency: a review of the literature. J Inherit Metab Dis 2002; 25(8):629–634.

Bouchard P, Sai P, Reach G, et al: Diabetes mellitus following pentamidine-induced hypoglycemia in humans. Diabetes 1982; 31(1):40–45.

Bunch TJ, Dunn WF, Basu A, Gosman RI: Hyponatremia and hypoglycemia in acute Sheehan's syndrome. Gynecol Endocrinol 2002; 16(5):419–423.

Cavaco B, Uchigata Y, Porto T, et al: Hypoglycaemia due to insulin autoimmune syndrome: report of two cases with characterisation of HLA alleles and insulin autoantibodies. Eur J Endocrinol 2001; 145(3):311–316.

Ceriello A, Guigliano D, Quatraro A, et al: Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetes complications? Diabetes Care 1991; 14:68–72.

Chan AY, Swaminathan R, Cockram CS: Effectiveness of sodium fluoride as a preservation of glucose in blood. Clin Chem 1989; 35:315–317.

Chavez H, Ozolins D, Losek JD: Hypoglycemia and propranolol in pediatric behavioral disorders. Pediatrics 1999; 103(6):1290–1292.

Chen YT: Glycogen storage diseases. *In*: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, pp 1521–1551.

Cheyne EH, Cavan DA, Kerr D: Performance of a continuous glucose monitoring system during controlled hypoglycaemia in healthy volunteers. Diabetes Technology & Therapeutics 2002; 4(5):607–613.

Chung J, Henry RR: Mechanisms of tumor-induced hypoglycemia with intraabdominal hemangiopericytoma. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81(3):919–925.

Cryer PE: Glucose homeostasis and hypoglycemia. *In* Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (eds): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, Saunders, 2003, pp 1585–1618.

Cuesta-Munoz AL, Huopio H, Otonkoski T, et al: Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de

novo glucokinase mutation. Diabetes 2004; 53(8):2164–2168.
Daughaday WH: Hypoglycemia in patients with non-islet cell tumors. Endocrinol Metab Clin N Amer 1989; 18(1):91–101.
Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS: Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. Diabetes 1992; 41:167–173.
Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329:977–986.
Dozio N, Scavini M, Beretta A, et al: Imaging of the buffering effect of insulin antibodies in the autoimmune hypoglycemic syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83(2):643–648.
Drucker DJ: Glucagon-like peptide 1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. Endocrinology 2003a; 144:5145–5148.
Drucker DJ: Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Care 2003b; 26:2929–2940.
Duncan GE, Li SM, Zhou X-H: Prevalence and trends of a metabolic syndrome phenotype among U.S. adolescents, 1999–2000. Diabetes Care 2004; 27:2438–2443.
Eisenbarth GS: Insulin autoimmunity: immunogenetics/immunopathogenesis of type 1A diabetes. Ann NY Acad Sci 2003; 1005:109–118.
Flanagan D, Wood P, Sherwin R, et al: Gin and tonic and reactive hypoglycemia: what is important – the gin, the tonic, or both? J Clin Endocrinol Metab 1998; 83(3):796–800.
Flint A, Raben A, Astrup A, et al: Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. J Clin Invest 1998; 101(3):515–520.
Ford ES, Giles WH, Mokdad AH: Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. Diabetes Care 2004; 27: 2444–2449.
Guerci B, Durain D, Leblanc H, et al: Multicentre evaluation of the DCA 2000 system for measuring glycated haemoglobin. DCA 2000 Study Group. Diabetes Metab 1997; 23(3):195–201.
Haymond MW: Hypoglycemia in infants and children. Endocrinol Metab Clin N Amer 1989; 18(1):211–252.
Haymond MW, Pagliara AS: Ketotic hypoglycaemia. Clin Endocrinol Metab 1983; 12(2):447–462.
Haut S, Brivet M, Touati G, et al: A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. Human Genetics 2003; 113:118–122.
Haviv YS, Sharkia M, Safadi R: Hypoglycemia in patients with renal failure. Renal Failure 2000; 22(2):219–223.
Hekimsoy Z, Biberoglu S, Comlekci A, et al: Trimethoprim/sulfamethoxazole-induced hypoglycemia in a malnourished patient with severe infection. Eur J Endocrinol 1997; 136(3):304–306.
Hirata Y, Uchigata Y: Insulin autoimmune syndrome in Japan. Diabetes Res Clin Pract 1994; 24(Suppl):S153–S157.
Hoberman HD, Chiodo SM: Elevation of the hemoglobin A1 fraction in alcoholism. Alcoholism: Clin Exp Res 1982; 16:260–266.
Holton JB, Walter JH, Tyfield LA: Galactosemia. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, pp 1553–1587.
Hostens K, Pavlovic D, Zambre Y, et al: Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. J Clin Invest 1999; 104(1):67–72.
Ido Y, Vindigni A, Chang K, et al: Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. Science 1997; 277(5325):563–566.
John M, Mallal S: Hyperlactatemia syndromes in people with HIV infection. Curr Opin Infect Dis 2002; 15(1):23–29.
Kaufman FR, Austin J, Neinstein A, et al: Nocturnal hypoglycemia detected with the Continuous Glucose Monitoring System in pediatric patients with type 1 diabetes. J Pediatr 2002; 141:625–630.
Khoury H, Daugherty T, Ehsanipoor K: Spontaneous hypoglycemia associated with congestive heart failure attributable to hyperinsulinism. Endocr Pract 1998; 4(2):94–95.
Kost GJ, Vu HT, Lee JH, et al: Multicenter study of oxygen-insensitive handheld glucose point-of-care testing in critical care/hospital/ambulatory patients in the United States and Canada. Crit Care Med 1998; 26(3):581–590.
Kreisberg RA: Lactate homeostasis and lactic acidosis. Ann Intern Med 1980; 92:227–237.
Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, et al: Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(1):103–108.
Kurahashi K, Maruta H, Usuda Y, et al: Influence of blood sample oxygen tension on blood glucose concentration measured using an enzyme-electrode method. Crit Care Med 1997; 25(2):231–235.
Lefebvre PJ, Andreani D, Marks V, Creutzfeldt W: Statement on postprandial hypoglycemia. Diabetes Care 1988; 11(5):439–440.
Leslie ND: Insights into the pathogenesis of galactosemia. Ann Rev Nutr 2003; 23:59–80.
Lidar M, Rachmani R, Half E, Ravid M: Insulin autoimmune syndrome after therapy with imipenem. Diabetes Care 1999; 22(3):524–525.
Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer H-M, et al: The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year progress report. Clin Chem 2001; 47(11):1985–1992.
Resume o National Glycohemoglobin Standardization Program, *incluindo descrições dos critérios e procedimentos para certificação, bem como o progresso da padronização nos níveis nacional e internacional.*
Lteif AN, Schwenk WF: Hypoglycemia in infants and children. Endocrinol. Metab Clinics N Amer 1999; 28(3):619–646.
Luft AN, Schwenk WF: Lactic acidosis update for critical care clinicians. J Amer Soc Nephrol 2001; 12(Suppl 17):S15–S19.
Mackin RB: Proinsulin: recent observations and controversies. Cell Molec Life Sci 1998; 54:696–702.
Maclaren N, Lan M, Coutant R, et al: Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. J Autoimmunity 1999; 12:279–287.
Maclaren NK, Lan MS, Scatz D, et al: Multiple autoantibodies as predictors of Type 1 diabetes in a general population. Diabetologia 2003; 46(6):873–874.
Manning PJ, Espiner EA, Yoon K, et al: An unusual cause of hyperinsulinaemic hypoglycaemia syndrome. Diabet Med 2003; 20(9):772–776.
Marko P, Gabrielli A, Caruso LJ: Too much lactate or too little liver? J Clin Anesth 2004; 16(5):389–395.
Marks V, Teale JD: Drug-induced hypoglycemia. Endocrinol Metab Clin N Amer 1999; 28(3):555–577.
Miller SI, Wallace RJ Jr, Musher DM, et al: Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. Amer J Med 1980; 68(5):649–654.
Misbin RI: The phantom of lactic acidosis due to metformin in patients with diabetes. Diabetes Care 2004; 27(7):1791–1793.
Mitrakou A, Ryan C, Veneman T, et al: Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. Am J Physiol 1991; 260(1 Pt 1):E67–74.
Molven A, Matre GE, Duran M, et al: Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. Diabetes 2004; 53:221–227.
Narayan KM, Boyle JP, Thompson TJ, et al: Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. JAMA 2003; 290(14):1884–1890.
Nyholm B, Brock B, Orskov L, et al: Amylin receptor agonists: a novel pharmacological approach in the management of insulin treated diabetes mellitus. Expert Opin Investig Drugs 2001; 10:1641–1652.
Ogedegbe AE, Thomas DL, Diehl AM: Hyperlactataemia syndromes associated with HIV therapy. Lancet Infect Dis 2003; 3(6):329–337.
Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, et al: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. Diabetes Res Clin Pract 1995; 28:103–117.
Orngreen MC, Zacho M, Hebert A, et al: Patients with severe muscle wasting are prone to develop hypoglycemia during fasting. Neurology 2003; 61:997–1000.
Pasieka JL, Hershfield N: Pancreatic polypeptide hyperplasia causing watery diarrhea syndrome: a case report. Can J Surg 1999; 42(1):55–58.
Penumalee S, Kissner PZ, Migdal SD: Gabapentin-induced hypoglycemia in a long-term peritoneal dialysis patient. Am J Kidney Dis 2003; 42(6): E3–E5.
Redmon JB, Nuttall FQ: Autoimmune hypoglycemia. Endocrinol Metab Clin N Amer 1999; 28(3):603–618.
Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, et al: Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. Diabetes 1996; 45:242–256.
Roder ME, Porte D Jr, Schwartz RS, Kahn SE: Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83(2):604–608.
Roder ME, Vissing H, Nauck MA: Hyperproinsulinemia in a three-generation Caucasian family due to mutant proinsulin (Arg65-His) not associated with impaired glucose tolerance: the contribution of mutant proinsulin to insulin bioactivity. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81(4):1634–1640.
Rohlfing CL, Wiedmeyer H-M, Little RR, et al: Defining the relationship between plasma glucose and $HbA_{(1c)}$: analysis of glucose profiles and $HbA_{(1c)}$ in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care 2002; 25:275–278.
Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter EE: Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. Arch Intern Med 2003; 163(21):2594–2602.
Schrot RJ, Foulis PR, Morrison AD, Farese RV: A computerized model for home glucose monitoring proficiency testing: efficacy of an innovative testing program. Diabetes Educator 1999; 25(1):48–55.
Schwartz NS, Clutter WE, Shah SD, Cryer PE: Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the threshold for symptoms. J Clin Invest 1987; 79(3):777–781.
Service FJ: Hypoglycemic disorders. N Engl J Med 1995; 332(17):1144–1152.
Revisa distúrbios hipoglicêmicos, com classificação clínica detalhada, descrição de testes diagnósticos (incluindo um protocolo para realização de jejum de 72 horas) e estratégias de supervisão.
Service FJ: Diagnostic approach to adults with hypoglycemic disorders. Endocrinol Metab Clinics N Amer 1999a; 28(3):519–532.
Service FJ, Natt N, Thompson GB, et al: Noninsulinoma pancreatogenous hypoglycemia: a novel syndrome of hyperinsulinemic hypoglycemia in adults independent of mutations in Kir6.2 and SUR1 genes. J Clin Endocrinol Metab 1999b; 84(5):1582–1589.
Smallridge RC, Corrigan DF, Thomason AM, Blue PW: Hypoglycemia in pregnancy. Occurrence due to adrenocorticotropic hormone and growth hormone deficiency. Arch Intern Med 1980; 140(4):564–565.
Sperling MA, Menon RK: Differential diagnosis and management of neonatal hypoglycemia. Pediatr Clin N Amer 2004; 51(3):703–723.
Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, et al: Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. N Engl J Med 1998; 338(19):1352–7.
Steinman B, Gitzelman R, Van den Berghe G: Disorders of fructose metabolism. *In* Scriver CR. Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, pp 1489–1520.
Straub SG, Cosgrove KE, Ammala C, et al: Hyperinsulinism of infancy: the regulated release of insulin by KATP channel-independent pathways. Diabetes 2001; 50(2):329–339.
Sunehag AL, Haymond MW: Glucose extremes in newborn infants. Clin Perinatol 2002; 29(2):245–260.
Tamburrano G, Leonetti F, Sbraccia P, et al: Increased insulin sensitivity in patients with idiopathic reactive hypoglycemia. J Clin Endocrinol Metab 1989; 69(4):885–890.

Tahara Y, Shima K: The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. Diabetes Care 1993; 16:1313–1314.

Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, et al: Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A_{1c} in type 1 diabetes mellitus. Pediatr Int 1999; 41:357–362.

Taylor SI, Barbetti F, Accili D, et al: Syndromes of autoimmunity and hypoglycemia. Autoantibodies directed against insulin and its receptor. Endocrinol Metab Clin N Amer 1989; 18(1):123–143.

Temple R., Clark PM, Hales CN: Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes: problems and pitfalls. Diabetic Med 1992; 9:503–512.

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al: Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:3717–3723.

Tomita T, Kimmel JR, Friesen SR, et al: Pancreatic polypeptide cell hyperplasia with and without watery diarrhea syndrome. J Surg Oncol 1980; 14(1):11–20.

Towler DA, Havlin CE, Craft S, Cryer P: Mechanism of awareness of hypoglycemia. Perception of neurogenic (predominantly cholinergic) rather than neuroglycopenic symptoms. Diabetes 1993; 42(12):1791–1798.

Tsujino S, Nonaka I, DiMauro S: Glycogen storage myopathies. Neurol Clin 2000; 18(1):125–150.

UK Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998a; 352(9131):837–853.

UK Prospective Diabetes Study Group: Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). Lancet 1998b; 352(9131):854–865.

Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, et al: Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes. Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. Diabetes 1998; 47:1857–1866.

Virtue MA, Furne JK, Nuttall FQ, Levitt MD: Relationship between GHb concentration and erythrocyte survival determined from breath carbon monoxide concentration. Diabetes Care 2004; 27:931–935.

Vogeser M, Parhofer KG, Furst H, et al: Autoimmune hypoglycemia presenting as seizure one week after surgery. Clin Chem 2001; 47(4):795–796.

Walter JH, Roberts RE, Besley GT, et al: Generalised uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. Arch Dis Child 1999; 80(4):374–376.

Weinstein DA, Wolfsdorf JI: Glycogen storage diseases: A primer for clinicians. Endocrinologist 2002; 12:531–538.
Revisa em detalhes as doenças do armazenamento do glicogênio mais importantes.

Weissman M, Klein B: Evaluation of glucose determinations in untreated serum samples. Clin Chem 1958; 4:420.

Whipple AE: The surgical therapy of hyperinsulinisim. J Int Chir 1938; 3:237–276.

Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, et al: A novel micro-assay for insulin autoantibodies. J Autoimmun 1997; 10:473–478.

Wojcikowski C, Blackman J, Ostrega D, et al: Lack of effect of high dose biosynthetic human C-peptide on pancreatic hormone release in normal subjects. Metabolism 1990; 39:827–832.

Wolfsdorf JI, Holm IA, Weinstein DA: Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. Endocrinol Metab Clin N Amer 1999; 28(4):801–823.

World Health Organization: Diabetes mellitus: Report of a WHO Study Group. (Technical Report Series, No. 727) Geneva, WHO, 1985.

Yaturu S, DePrisco C, Lurie A: Severe autoimmune hypoglycemia with insulin antibodies necessitating plasmapheresis. Endocr Pract 2004; 10(1):49–54.

Zaloga GP: Beware of errors in blood glucose measurement. Crit Care Med 1997; 25(2):212.

Zhang DL, Jiang ZW, Jiang J, et al. D-lactic acidosis secondary to short bowel syndrome. Postgrad Med J 2003; 79(928):110–112.

Zierler, K: Whole body glucose metabolism. Am J Physiol 1999; 276(3 Pt 1):E409–426.

Zuker N, Bissessor M, Korber M, et al: Acute hypoglycaemic coma – a rare, potentially lethal form of early onset Sheehan syndrome. Aust N Z J Obstet Gynaecol 1995; 35(3):318–320.

CAPÍTULO 17

Lipídeos e dislipidemia

Timothy Hilbert MD PhD JD, Mark S. Lifshitz MD

Visão geral 233
Lipoproteínas, apolipoproteínas e proteínas correlatas 235
Classificação 235
Proteínas importantes no metabolismo de lipoproteínas 236
Transporte de lipídeos e metabolismo de lipoproteínas 237
Quantificação de lipídeos e lipoproteínas 239
Coleta e armazenamento de sangue 239
Estimativa do conteúdo plasmático de lipídeos 241
Estimativa do conteúdo de lipoproteínas e lipoproteínas-colesterol 243
Métodos adicionais para o estudo da dislipidemia 245
Diretrizes do NCEP 246
Confiabilidade das quantificações 246
Teste e tratamento 246
Lipídeos, lipoproteínas e doença 248
Níveis elevados de colesterol e LDL-C 248
Níveis elevados de TGs e concentração de colesterol normal 251
Níveis elevados de colesterol e TGs 251
Baixa concentração isolada de colesterol total 252
Baixa concentração isolada de HDL-C 252
Alta concentração isolada de HDL-C 253
Referências bibliográficas 253

PONTOS-CHAVE

- Enquanto os métodos de ultracentrifugação e eletroforese são historicamente importantes no estudo dos lipídeos e das lipoproteínas, atualmente, o método considerado de maior utilidade é o teste enzimático, muitas vezes acoplado à precipitação com detergentes.
- O LDL colesterol (LDL-C) pode ser quantificado diretamente, porém, costuma-se calculá-lo utilizando a fórmula de Friedewald. Os valores calculados requerem avaliação de amostras obtidas em jejum.
- Nos dias atuais, o LDL-C é considerado o valor mais importante na avaliação do risco cardíaco, sendo determinante para a terapia.
- O padrão atualmente recomendado para a triagem inicial de indivíduos adultos (idade ≥ 20 anos) inclui exames de colesterol total (CT), LDL-C, HDL colesterol (HDL-C) e TGs (triglicerídeos). Os testes devem ser repetidos ao menos uma vez a cada cinco anos.
- Outros exames são a quantificação dos níveis de apolipoproteínas e das subclasses de lipoproteína, os quais podem ser úteis como forma de avaliação mais precisa do grau de risco, bem como na avaliação da resposta à terapia.
- As novas diretrizes apontam que pacientes com diabetes apresentam maior risco aterosclerótico percebido, e sustentam que os pacientes com síndrome metabólica recém-descoberta devem receber uma intervenção agressiva.

Visão geral

Os distúrbios do metabolismo lipídico exercem papel fundamental na aterosclerose e na doença cardíaca coronariana (DCC). Existe uma clara relação entre a elevação dos níveis séricos de colesterol e o infarto do miocárdio, e no nível tecidual, os depósitos se formam em áreas onde há dano celular endotelial e constituem uma parte proeminente das lesões ateroscleróticas. Se por um lado o colesterol pode ser considerado "ruim" por causa dessa associação, na verdade ele é um componente estrutural essencial das membranas celulares e um precursor de hormônios esteroides e ácidos biliares. Outro lipídeo, o TG, é uma das principais fontes de energia para as células. O colesterol e TGs são os lipídeos mais importantes no estudo e monitoramento do risco de DCC.

Os *lipídeos* são solúveis em solventes orgânicos apolares, como o clorofórmio e o éter, contudo, permanecem relativamente insolúveis na presença de solventes polares, como a água. Assim, o colesterol e os TGs não viajam pelo plasma como moléculas livres flutuantes, mas como parte de macromoléculas solúveis em água denominadas *lipoproteínas*. O colesterol contido nessas partículas apresenta-se sob duas formas: colesterol livre – um álcool não esterificado polar (cerca de 30%) – e éster de colesterol – uma forma hidrofóbica onde o colesterol encontra-se ligado aos ácidos graxos (cerca de 70%). As lipoproteínas apresentam um arranjo micelar. Os lipídeos hidrofóbicos, como os ésteres de colesterol e os TGs, ficam localizados na região central da partícula. Os lipídeos hidrossolúveis, como o colesterol livre e os fosfolipídeos (FLs), permanecem organizados na superfície com os grupos polares voltados para o lado externo. As *apolipoproteínas* – a porção proteica das lipoproteínas – também se encontram dispostas sobre a superfície (Fig. 17.1).

Existem quatro classes principais de lipoproteínas: quilomícron (QM), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, *very-low-density lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low-density lipoprotein*) e lipoproteína de alta densidade (HDL, *high-density lipoprotein*). Várias lipoproteínas menos significativas foram igualmente identificadas, incluindo as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, *intermediate-density lipoprotein*) e a lipoproteína (a) [Lp(a)] (Tabs. 17.1 e 17.2). As lipoproteínas podem ser diferenciadas de acordo com a densidade, tamanho da partícula, composição química e mobilidade eletroforética. Essas propriedades físicas se devem às diferenças de conteúdo em termos de proteínas, TGs e colesterol, refletindo o papel de cada lipoproteína no metabolismo lipídico (ver a seguir). Cada lipoproteína está associada a apolipoproteínas específicas que exercem funções importantes no transporte dos lipídeos, como ativação/inibição das enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, e também na ligação das lipoproteínas a receptores na superfície celular. A composição de apolipoproteínas das classes de lipoproteína está resumida na Tabela 17.1.

As lipoproteínas são comumente diferenciadas umas das outras com base em sua mobilidade eletroforética e densidade de flutuação. Quando as lipoproteínas plasmáticas são separadas por eletroforese em gel de agarose, os QMs permanecem na posição de origem, a HDL migra mais rapidamente na região α, seguida da VLDL na região "pré-β" e da IDL e LDL na região β. O processo de ultracentrifugação separa as lipoproteínas de acordo com suas densidades de flutuação. A densidade de uma partícula de lipoproteína é determinada principalmente por seu conteúdo de proteína e TGs. Lipoproteínas com grande conteúdo de TGs e pouca quantidade de proteínas (QM e VLDL) são menos densas do que aquelas com grande conteúdo proteico e pouca quantidade de TGs (HDL). LDL e IDL são mais densas do que a VLDL, porém, menos densas que a HDL.

Em termos funcionais, as lipoproteínas podem ser agrupadas em duas categorias gerais: partículas de menor densidade contendo predominantemente apoB (QM, VLDL, IDL e LDL), que distribuem

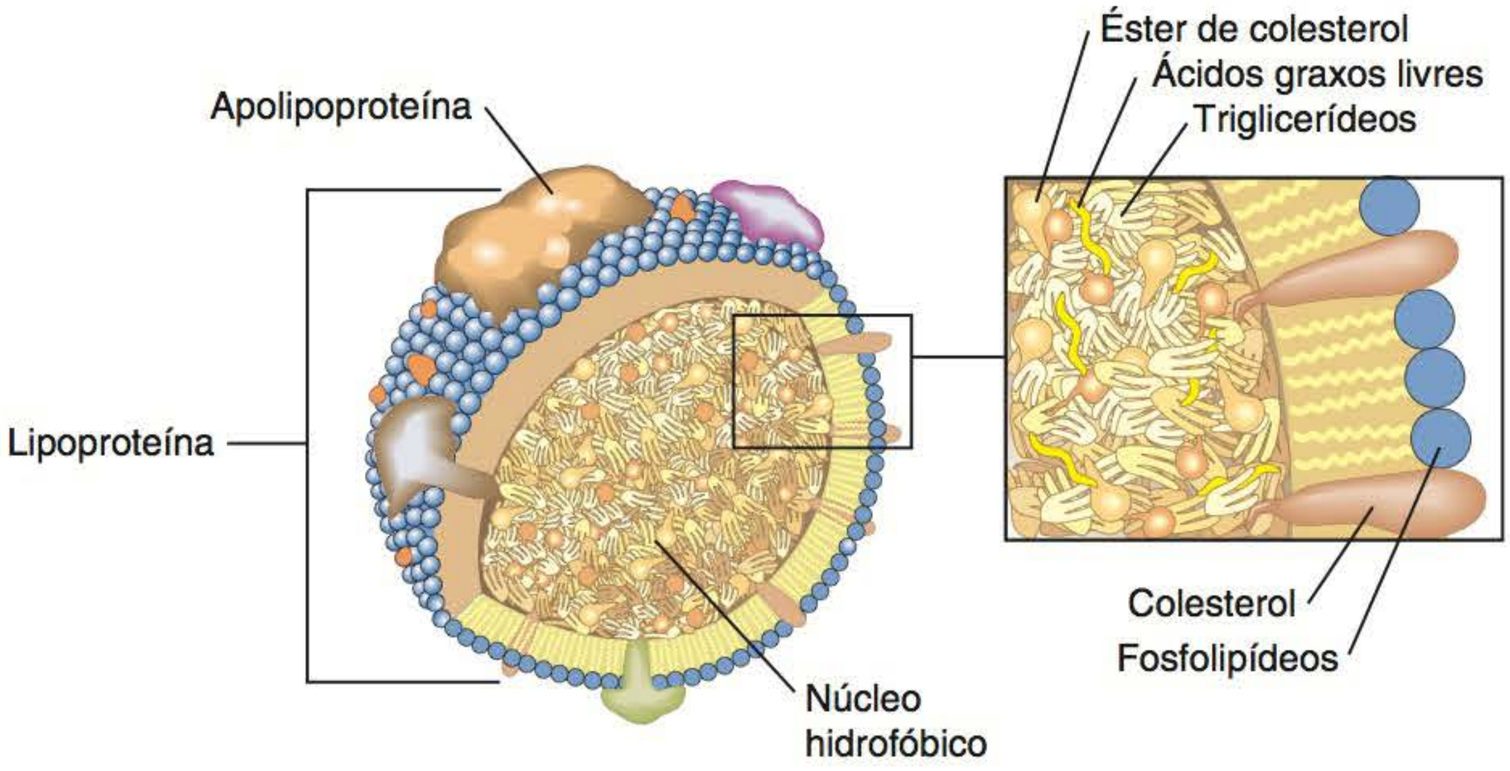


Figura 17.1 Estrutura da lipoproteína.

Tabela 17.1 Principais classes de lipoproteínas plasmáticas humanas: características fisicoquímicas

Partícula	Mobilidade eletroforética*	Principais apolipoproteínas	Diâmetro (Å)	Densidade (kg/L)	Sf†
QMs	Origem	ApoB-48, C, E	750–12.000	< 0,95	> 400
VLDL	Pré-β	ApoB-100, C, E	300–700	0,95–1,006	20–400
IDL	β ou pré-β	ApoB-100, E		1,006–1,019	12–20
LDL	β	ApoB-100	180–300	1,019–1,063	0–12
HDL_2	α	ApoA-I, A-II, C	50–120	1,063–1,125	
HDL_3	α	ApoA-II, A-I, C	50–120	1,125–1,210	
Lp(a)	Pré-β	ApoB-100, Apo(a)		1,045–1,080	

* Eletroforese em gel de agarose.
† Taxa de flotação de Svedberg.

Tabela 17.2 Composição química das principais classes de lipoproteínas plasmáticas

	Proteínas (%)*	Colesterol (%)	Ésteres de colesterol (%)	TGs (%)	FLs (%)
QMs	1–2	1–3	2–4	80–95	3–6
VLDL	6–10	4–8	16–22	45–65	15–20
IDL			*Intermediário entre VLDL e LDL*		
LDL	18–22	6–8	45–50	4–8	18–24
HDL	45–55	3–5	15–20	2–7	26–32

* Porcentual do peso seco.
Dados de Albers (1974); Fless (1984); Gaubatz (1983); Gotto (1986); e Gries (1988).

colesterol e TGs para os tecidos, e partículas de maior densidade contendo apoA (HDL). A HDL é formada no fígado e seu papel é fundamental no transporte reverso do colesterol – o processo por meio do qual o excesso de colesterol retorna dos tecidos para o fígado, onde é reutilizado ou excretado com a bile. Essa atuação explica por que a elevação dos níveis de HDL reduz o risco de DCC. Mais de 90% do componente proteico da HDL é apoA-I.

Ao contrário da HDL, as lipoproteínas de menor densidade são mais heterogêneas. Essas partículas contêm uma variedade de apolipoproteínas – apoB, C, D e E. A apolipoproteína predominante, apoB (B-48 no QM, e B-100 na VLDL, IDL e LDL), é um dos ligantes de receptores localizados na superfície de macrófagos, adipócitos e hepatócitos. O receptor correspondente é denominado receptor da LDL, ainda que se ligue a outras partículas além da LDL. Foi demonstrado que o receptor da LDL se liga à apoB-100 e à apoE, mas não se liga à apoB-48. Diferentemente da HDL, que remove o excesso de colesterol dos tecidos, esse grupo de lipoproteínas está envolvido principalmente no aporte de lipídeos aos tecidos para armazenamento ou utilização na obtenção de energia. O QM (formado no intestino a partir da gordura dos alimentos ingeridos) e a VLDL (formada no fígado) são partículas ricas em TGs que sofrem metabolismo após entrarem na circulação sanguínea. Por ação da lipoproteína lipase (LPL), essas partículas perdem TGs e ésteres de colesterol, transformando-se em lipoproteínas mais densas que possuem maior porcentual de colesterol. Entre essas partículas, a LDL é a mais densa, e o aumento dos níveis séricos de LDL-C constitui um dos principais fatores de risco cardíaco. O tratamento da dislipidemia que causa DCC em geral visa à redução dos níveis de LDL.

Um modo de compreender as lipoproteínas que contêm < apoB é considerá-las um produto do avanço metabólico em que o QM e a VLDL liberam TGs para os tecidos ao interagirem com a LPL. Como resultado dessa interação, as partículas de QM e VLDL se tornam depletadas de TGs, mais densas e relativamente ricas em proteína e colesterol, dando origem a resíduos de QM e LDL. Tais resíduos são internalizados e metabolizados pelas células – QM por hepatócitos e LDL por hepatócitos e todas as células do corpo. A LDL atua como

principal fonte de colesterol para os tecidos. A Figura 17.2 ilustra essa progressão metabólica.

O bloqueio de qualquer uma das etapas dessa via conduz ao acúmulo de uma ou mais lipoproteínas. O número correspondente a cada etapa da via metabólica representa a hiperlipoproteinemia funcional (originalmente descrita por Fredrickson, 1967) causada por um bloqueio entre dois intermediários. Por exemplo, um bloqueio na etapa de progressão de QM para resíduos de QM leva ao acúmulo de QM – doença de tipo 1 ou 5 – e manifesta-se com elevação dos níveis de TGs e concentração de colesterol normal. Um bloqueio na conversão de VLDL em IDL e LDL resulta em doença de tipo 4, ou seja, acúmulo de VLDL com elevação dos níveis de TGs e, frequentemente, também de colesterol. Por vezes, a causa da doença de tipos 1, 5 e 4 é a deficiência de LPL, com a consequente incapacidade de quebrar as moléculas de TGs. A doença de tipo 2 resulta de um bloqueio no metabolismo da LDL que pode ter origem genética: a produção de uma proteína apoB defeituosa, incapaz de se ligar ao receptor da LDL; ou um receptor mutante de LDL que não reconheça a apoB. Essa doença de tipo 2 é ainda subclassificada com base nos níveis de TGs. É importante observar que talvez seja necessário realizar outros estudos (ver adiante) para diferenciar os tipos 2B e 3, uma vez que em ambos nota-se uma elevação dos níveis de colesterol e TGs. A Tabela 17.3 apresenta essa classificação funcional.

A interação entre as lipoproteínas, na realidade, envolve uma complexidade bem maior do que a abordada na discussão anterior. Trata-se de um fenômeno mediado por inúmeras apolipoproteínas, enzimas e outros fatores, alguns dos quais ainda são pouco conhecidos. Por exemplo, além do receptor da LDL, foram identificados outros receptores de lipoproteínas, incluindo o da VLDL (VLDL-R) e o receptor 2 da apoE (apoE-R2), que se liga à apoE, e o receptor *scavenger* SCARBI. Não há um sistema de classificação ideal para as doenças lipídicas. Estas foram categorizadas de diversos modos: primária *versus* secundária; hereditária *versus* adquirida; e acordo com os fenótipos da fração lipoproteica. Em geral, cada categoria é heterogênea com relação a fatores genéticos, clínicos e patológicos, os quais serão discutidos em maior detalhe ao final do capítulo.

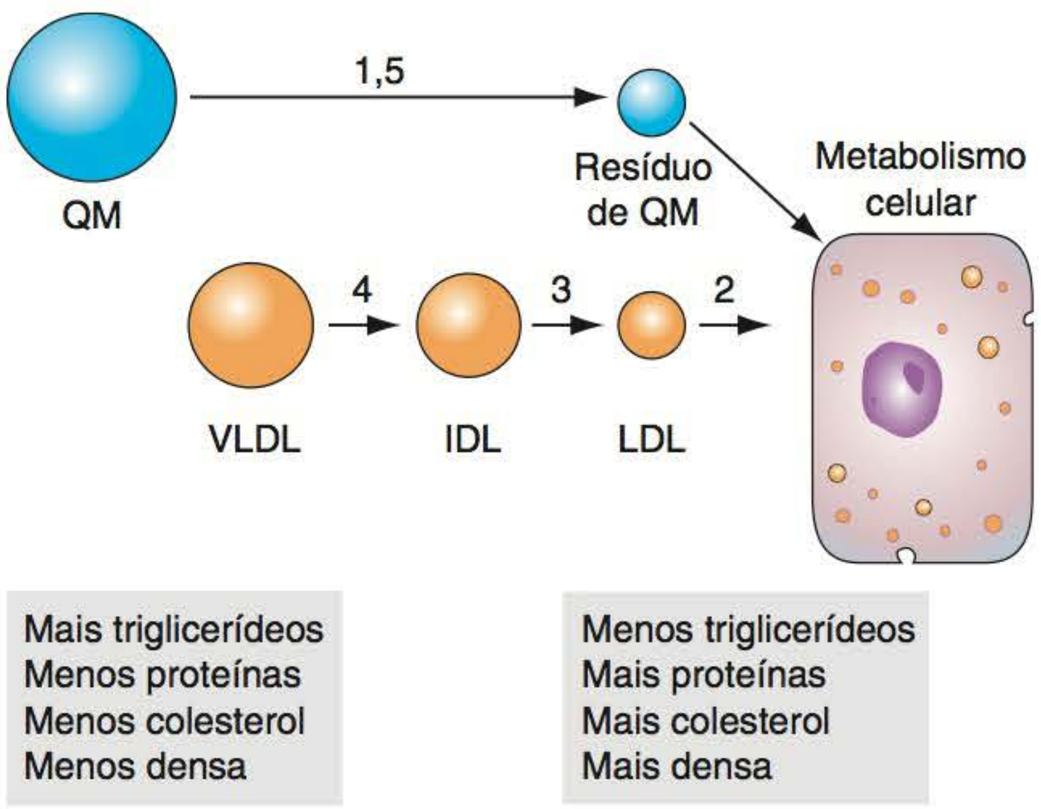


Figura 17.2 Metabolismo de partículas de lipoproteína. O número que identifica cada etapa da via representa a hiperlipoproteinemia funcional causada por um bloqueio entre dois intermediários (ver Tab. 17.3).

Tabela 17.3 Classificação funcional: achados laboratoriais essenciais

Tipo	Partícula	TGs	Colesterol	Comentários
1	QM	Muito alto	Normal	Baixo risco cardíaco; hereditário
5	QM	Muito alto	Normal	Baixo risco cardíaco; adquirido
4	VLDL	Muito alto	Baixo	Risco cardíaco menor que nos tipos 2 e 3
3	IDL	Alto	Alto	Alto risco cardíaco; controle dietético; presença de β-VLDL; proporção VLDL-C/TGs plasmáticos > 0,3
2A	LDL	Baixo	Alto	Alto risco cardíaco
2B	LDL, VLDL	Alto	Alto	Alto risco cardíaco

Lipoproteínas, apolipoproteínas e proteínas correlatas

Classificação

As partículas de lipoproteína são entidades dinâmicas que adquirem e liberam componentes proteicos e lipídicos à medida que circulam pelo corpo. Conforme já mencionado, as partículas de QM e VLDL perdem TGs e vão se tornando menores à proporção que avançam nas etapas metabólicas. Assim, partículas recém-formadas de QM e VLDL são maiores e menos densas do que as partículas maduras e já metabolizadas. Por esse motivo, é mais conveniente analisar as classes de lipoproteínas como um grupo de partículas heterogêneas, em vez de uma coleção de partículas idênticas. De fato, diversas subfrações ou subclasses de lipoproteínas foram descritas.

Principais lipoproteínas

Quilomícrons

Os quilomícrons (QMs) são partículas grandes produzidas pelo intestino, que transportam lipídeos provenientes da dieta alimentar até os tecidos do organismo. São bastante ricas em TGs, contudo, possuem relativamente pouco conteúdo de colesterol livre, FLs e proteínas. A interação dos QMs com a LPL na superfície luminal dos endotélios capilares resulta na depleção de seus TGs e elementos de superfície. As partículas resultantes de menor tamanho – denominadas resíduos de QM – são removidas da circulação pelo fígado, principalmente por meio da interação da apoE com receptores, entre os quais o receptor da LDL. Por apresentarem uma proporção lipídeos/proteínas muito alta, os QMs são consideravelmente menos densos do que a água e, assim, flutuam sem necessitar de centrifugação. Quando presentes em concentração elevada, os QMs fazem com que o plasma adquira um aspecto "leitoso" e, após várias horas na ausência de perturbações, acumulam-se sob a forma de uma consistente camada flutuante. As apolipoproteínas encontradas nos QMs são proteínas também presentes nas partículas recém-sintetizadas (apoB-48, apoA-I e apoA-IV), bem como nas proteínas adquiridas a partir de outras lipoproteínas na circulação (apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE).

Lipoproteínas de densidade muito baixa

As partículas de VLDL são produzidas pelo fígado e abastecem os tecidos do corpo com TGs endógenos, de origem primariamente hepática, e também colesterol. Comparadas aos QMs, as partículas de VLDL são menores e conferem um aspecto turvo ao plasma quando presentes em excesso. São ricas em TGs – ainda que não tanto quanto os QMs – e apresentam maior densidade de flutuação, em razão da menor proporção de lipídeos/proteínas. A massa das partículas de VLDL apresenta, aproximadamente, a seguinte composição: 50% de TGs, 40% de colesterol e FLs, e 10% de proteínas, principalmente apoB-100 e apoC, mas também apoE. As partículas de VLDL variam bastante quanto ao tamanho e à composição química. Partículas maiores são ricas em TGs e apoC, nas partículas menores esses dois componentes aparecem em menor concentração. A LPL hidrolisa a VLDL e, em consequência, há produção de partículas altamente aterogênicas, menores e depletadas de TGs e elementos de superfície, denominadas resíduos de VLDL e IDL. Essas partículas podem ser novamente metabolizadas e render LDL.

Lipoproteínas de baixa densidade

A LDL é produzida por meio da metabolização da VLDL circulante e constitui cerca de 50% da massa total de lipoproteínas do plasma humano. As partículas são consideravelmente menores do que aquelas com rico conteúdo de TGs (VLDL e QM), além de não dispersarem a luz nem alterarem a claridade plasmática mesmo quando presentes em maior concentração. Sua constituição aproximada é 50% de colesterol (na maior parte esterificado), 25% de proteínas (principalmente apoB-100, com traços de apoC), 20% de FLs e apenas traços

de TGs. Considerando que cada partícula de VLDL e LDL contém apenas uma molécula de apoB-100, o extraordinário tamanho dessa proteína a torna o maior componente proteico presente nessas partículas. O fígado é responsável pela captação da maior parte da LDL circulante (aproximadamente 75%), com a apoB-100 servindo de alvo para o receptor hepático. A LDL restante é distribuída a outros tecidos ou removida da circulação pelos receptores *scavenger* existentes nas células, como os que são encontrados na placa ateromatosa. Partículas de LDL pequenas contêm menor quantidade de éster de colesterol e apresentam menor proporção de colesterol/apoB. Níveis aumentados de partículas pequenas têm sido detectados em pacientes com várias formas de dislipidemia associadas à DCC.

Lipoproteína de alta densidade

A HDL é uma partícula pequena, constituída principalmente de proteína, colesterol, FLs e apenas traços de TGs. Produzida no fígado, a HDL está envolvida no transporte reverso do colesterol, que é o processo pelo qual o excesso de colesterol é removido dos tecidos e levado para o fígado. A HDL é eliminada da circulação por meio da interação da apoE com o receptor da LDL, embora tenham sido identificados receptores adicionais. Subpopulações discretas de HDL foram identificadas com base em diferenças de tamanho ou carga, incluindo duas subclasses principais isoladas por ultracentrifugação: HDL_2 e HDL_3 (Blanche, 1981; MacKenzie, 1973; Sundaram, 1974). Ambas apresentam diferenças significativas, uma vez que a HDL_2 é considerada mais cardioprotetora do que a HDL_3 e indivíduos com baixos níveis de HDL_2 apresentam maior risco de desenvolver DCC prematuramente. Além disso, a HDL também foi subfracionada em partículas que contêm apoA-I mas não apoA-II e outras que contêm tanto apoA-I como apoA-II (Fruchart, 1992; von Eckardstein, 1994). A função fisiológica dessas partículas ainda precisa ser esclarecida, contudo, aparentemente as partículas que contêm apenas apoA-I são mais importantes no efluxo de colesterol a partir dos tecidos. Um porcentual elevado de HDL_2 implica na classificação de partículas que contêm apenas apoA-I. Sua quantificação laboratorial eventualmente apresenta utilidade clínica.

Lipoproteínas minoritárias e anormais

Lipoproteínas de densidade intermediária

Formadas a partir do metabolismo da VLDL circulante, as IDLs podem ser rapidamente removidas da circulação por meio da interação com o receptor da LDL ou de sua metabolização em LDL. Como esperado, a IDL apresenta conteúdo lipídico, tamanho e densidade intermediários àqueles observados na VLDL e na LDL. Algumas vezes, a IDL é considerada uma subclasse da LDL.

Lipoproteína(a) ou Lp(a)

A Lp(a) assemelha-se à LDL em termos de densidade e composição geral, podendo ser considerada uma partícula de LDL à qual a apolipoproteína (a) foi adicionada e ligada à apoB-100 por uma ligação dissulfeto (Fless, 1984, 1985; Gaubatz, 1983). A mobilidade eletroforética da Lp(a) costuma ser pré-β, mas pode variar entre a mobilidade da LDL (β) e a da albumina (pré-α). Em geral, a concentração de Lp(a) é bem menor que a de LDL; entretanto, nos indivíduos normais, essa concentração pode variar de < 20 a 1.500 mg/L ou mais. Concentrações aumentadas de Lp(a) podem ser uma característica familiar, de herança autossômica dominante, estando associadas a um risco maior de DCC, doença cerebrovascular e acidente vascular cerebral (AVC). Quando os níveis plasmáticos de Lp(a) ultrapassam 200 a 300 mg/L, a partícula aparece eletroforeticamente como uma banda lipídica corada pré-β na fração plasmática que contém lipoproteínas de densidade > 1.006 g/mL.

A Lp(a) é sintetizada no fígado, porém, os detalhes de seu metabolismo permanecem pouco conhecidos. Ela se liga ao receptor da LDL por meio de seu componente apoB-100, todavia, com menor afinidade que a LDL (Floren, 1981). A remoção da apo(a) aumenta a afinidade da partícula residual que contém apoB pelo receptor da LDL (Armstrong, 1985), tendo sido sugerido que a apo(a) pode interferir na captação das partículas que contêm apoB-100 (Scanu, 1988). Atualmente, tanto a função da Lp(a) quanto suas propriedades aterogênicas permanecem pouco compreendidas. Existem especulações acerca da provável interferência da Lp(a) ou da apo(a) no processo de trombólise normal, dada a semelhança dessas partículas com o plasminogênio.

Lipoproteína LpX

A LpX é uma lipoproteína anormal encontrada em pacientes com doença biliar obstrutiva, e em indivíduos com deficiência familiar de lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT, *lecithin:cholesterol acyltransferase*). O componente lipídico corresponde a mais de 90% de seu peso (principalmente FLs, colesterol não esterificado e colesterol muito pouco esterificado). As proteínas, primariamente a apoC e quantidades menores de albumina, representam < 10% da massa da LpX.

VLDL-β (lipoproteína "β flutuante")

A VLDL-β (lipoproteína "β flutuante") é outra lipoproteína anormal que se acumula na hiperlipoproteinemia de tipo 3. É mais rica em colesterol do que a VLDL e aparentemente resulta de um defeito no catabolismo da VLDL. A partícula é isolada na mesma faixa de densidade da VLDL, contudo, apresenta mobilidade eletroforética igual ou próxima à da LDL.

Proteínas importantes no metabolismo de lipoproteínas

Apolipoproteínas

Como mencionado anteriormente, as apolipoproteínas são o principal componente proteico das lipoproteínas. São comumente designadas segundo a nomenclatura introduzida por Alaupovic (1971). Algumas de suas propriedades mais significativas são destacadas nas Tabelas 17.4 e 17.5.

Tabela 17.4 Apolipoproteínas humanas importantes

Apolipoproteína	Principais lipoproteínas	MMr* (kDa)	Aminoácidos	Cromossomo	Concentração plasmática (μmol/L)	Concentração plasmática (mg/dL)
A-I	HDL	29	243–245	11	32–46	90–130
A-II	HDL	17,4	154	1	18–29	30–50
A-IV		44,5	396	11		
(a)	Lp(a)	350–700	Variável	6		
B-100	VLDL, IDL, LDL	512,7	4.536	2	1,5–1,8	80–100
B-48	QM	240,8	2.152	2	< 0,2	< 5
C-I	QM, LDL	6,6	57	19	6,1–10,8	4–7
C-II	QM, LDL	8,9	78 ou 79	19	3,4–9,1	3–8
C-III	QM	8,8	79	11	9,1–17,1	8–15
D	HDL	19	169	3		
E	QM, LDL, IDL	34,1	299	19	0,8–1,6	3–6

* MMR, massa molecular relativa.

Tabela 17.5 Funções e características significativas das apolipoproteínas

Apolipoproteína	Principal distribuição	Função (se conhecida)	Comentários
A-I	HDL	Ativa a LCAT, que esterifica o colesterol no plasma	É sintetizada no fígado e no intestino
A-II	HDL		Pode inibir as lipases lipoproteicas e hepáticas e aumentar a concentração plasmática de TGs
A-IV	HDL, QM e livre no plasma		Pode atuar como cofator da LCAT
B-100	VLDL e LDL	Sinal de reconhecimento carboxiterminal, direciona a LDL ao receptor de LDL (apoB, E)	Proteína muito grande, sintetizada no fígado; encontrada em lipoproteínas com lipídeos de origem endógena (i. e., não QMs)
B-48	QM	Não é reconhecida pelo receptor da LDL	Sintetizada no intestino; compartilha com a apoB-100 o gene codificador e a sequência aminoterminal. A produção diferencial de ambas as proteínas envolve edição de RNA
C-I	QM e VLDL		Pode inibir a captação hepática da VLDL, bem como a proteína de transferência de éster de colesterol
C-II	QM e VLDL	Ativa a LPL	Sua deficiência causa diminuição da depuração de lipoproteínas ricas em TGs
C-III	VLDL, HDL	Aparentemente, inibe a lipólise das lipoproteínas ricas em TGs; pode regular a taxa de depuração das partículas residuais	
C-IV	QM, HDL		Pode estar envolvida na absorção lipídica
D	HDL	Ativa a LCAT	
E	QM, VLDL, IDL, resíduos e HDL	Fator de reconhecimento que direciona resíduos de VLDL e QMs ao receptor hepático; também se liga a receptores LDL de superfície celular	Isoformas E-2, E-3 e E-4 E-4 está associada a níveis elevados de LDL-C, maior risco de DCC e doença de Alzheimer E-2 está associada à hiperlipoproteinemia do tipo 3
H	HDL, VLDL e QM	Desconhecida; possivelmente relacionada à ativação da LPL	Anticorpos contra a apoH, ou β_2-glicoproteína-I, constituem um subgrupo de anticorpos antifosfolipídeos, e podem estar associados a hipertrombose e AVC
Apo(a)	Lp(a)		Homóloga ao plasminogênio, pode ser pró-trombótica. Liga-se à apoB-100 por meio de ligações dissulfeto

Enzimas lipolíticas e outras proteínas

Os principais sistemas enzimáticos que conhecidamente participam do metabolismo plasmático lipoproteico são a LCAT e as enzimas lipolíticas, LPL, TG lipase hepática (HL) e lipase endotelial (EL). Diversas outras proteínas também estão envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. Alguns atributos importantes que igualmente participam desse processo são mostrados pela Tabela 17.6.

Transporte de lipídeos e metabolismo de lipoproteínas

TGs e colesterol entram na circulação associados a partículas de lipoproteína ricas em TGs, QMs produzidos no intestino e VLDL produzida primariamente no fígado. Tais partículas lipoproteicas começam a sofrer modificações intravasculares quase imediatamente após caírem na circulação, por ação da LPL. Essa enzima hidrolisa os TGs e diglicerídeos, liberando ácidos graxos e monoglicerídeos que são captados pelas células e utilizados como fonte de energia. A apoC-II estimula a hidrólise dos TGs. Além de perderem TGs como resultado da hidrólise mediada pela LPL, os QMs perdem lipídeos de superfície e apolipoproteínas pela transferência desses elementos às HDLs. Em geral, os QMs perdem mais de 95% de sua massa na forma de TGs e apolipoproteínas A e C. As principais apolipoproteínas encontradas na partícula QM remanescente depletada são a apoB-48 e a apoE. Essa partícula se liga à superfície dos hepatócitos, é internalizada e degradada pela célula em um rápido processo de endocitose mediado por receptores específicos. Aparentemente, a apoE é a responsável pelo direcionamento do QM residual ao seu respectivo receptor, contudo, o mecanismo envolvido ainda não foi completamente elucidado. É provável que haja participação de diversas proteínas, incluindo o receptor da LDL, a proteína relacionada ao receptor da LDL e o SCARB1. As apolipoproteínas C inibem a captação de QMs. Estes, então, permanecem na circulação sanguínea por tempo suficiente para a completa hidrólise dos TGs. No estado de jejum, o intestino continua a produzir apoB e secreta "VLDL intestinal" (pequenos QMs). Essas partículas podem constituir até 10 a 20% da concentração total de "VLDL" circulante, no entanto, é provável que sejam metabolizadas como QMs (Byers, 1960; Cenedella, 1974; Green, 1981; Risser, 1978).

A VLDL é sintetizada no fígado. Assim como os QMs, ela é catabolizada logo após sua entrada na circulação sanguínea, parcialmente por ação da LPL, sendo convertida em resíduos de VLDL ricos em colesterol. Uma parte desses resíduos é removida da circulação pelo fígado, por meio de um processo endocítico mediado por receptores. A outra parte é catabolizada e se transforma em IDL e LDL (Bachorik, 1988). A LDL carrega a maior parte do colesterol circulante e o transporta até os tecidos hepáticos e extra-hepáticos, onde é endocitada via receptor da LDL (Brown, 1981). Ao ligar-se ao seu receptor (i. e., via apoB-100), a LDL é subsequentemente internalizada e direcionada para os lisossomos. Nesse compartimento intracelular, a apoB-100 é degradada e há hidrólise dos colesteril ésteres e demais lipídeos. Em seguida, os receptores de LDL são reciclados e levados de volta à membrana celular (Fig. 17.3).

O colesterol não esterificado produzido por hidrólise lisossomal é disponibilizado para a síntese de membranas, hormônios e ácidos biliares. O excesso de colesterol é re-esterificado pela enzima microssomal acil:colesterol aciltransferase (ACAT, *acyl:cholesterol acyl transferase*) e armazenado até que precise ser utilizado. O colesterol celular, quando presente em quantidade suficiente, exerce modulação negativa sobre o receptor de LDL. Em consequência, há redução do número de receptores expressos na membrana celular e, assim, também é reduzida a captação da LDL. Cerca de dois terços da LDL são removidos do plasma pela captação hepática mediada por receptores da LDL. Enquanto a maioria dos tecidos utiliza o colesterol apenas na síntese de membranas ou o estoca como éster de colesterol, o fígado é capaz de atribuir-lhe usos diferentes. O fígado excreta colesterol na bile – tanto na forma não esterificada quanto após convertê-lo em ácidos biliares – e também o reutiliza na síntese de lipoproteínas, como ocorre na secreção hepática de VLDL na circulação. Os tecidos secretores de esteroide empregam o colesterol como precursor de hormônios esteroides.

Tabela 17.6 Enzimas e outras proteínas importantes no metabolismo das lipoproteínas

	Localização do gene	Função	Deficiência	Expressão tecidual
Lipoproteína lipase (LPL)	8q22	Hidrólise de TGs lipoproteicos (esp. VLDL e QM), com liberação de ácidos graxos livres e glicerol para os tecidos. FL e apoC-II são cofatores essenciais	Aumento do tamanho das partículas de QM e VLDL, com acentuada elevação dos níveis de TGs	Presente na superfície das células endoteliais capilares no tecido adiposo e nos músculos esquelético e cardíaco; não é produzida pelas células endoteliais
Lipase hepática (HL)	15q22-23	Hidrólise de TGs e FLs, esp. da HDL_2; pode ser necessária ao metabolismo da HDL. Também está ativa nos lipídeos dos resíduos de VLDL e na IDL. Pouco ativa em VLDL ou QM recém-secretados	Aumento dos níveis de CT, TG e HDL-C em casos de deficiência	Secretada pelos hepatócitos, associa-se às células hepáticas não parenquimatosas
Lipase endotelial (EL)	18q21.1	Hidrólise de TGs e FLs nas lipoproteínas, esp. dos FLs da HDL. Homóloga à LPL e EL, bem como à lipase pancreática	Níveis aumentados de HDL_2 e partículas de LDL grandes e flutuantes. A superexpressão em camundongos causou diminuição dos níveis de CT, FL e HDL-C	Expressa-se em diversos tecidos, incluindo o fígado. Sintetizada pelo endotélio
Lecitina colesterol aciltransferase (LCAT)	16q22.1	Catalisa a esterificação do colesterol, esp. na HDL, promovendo a transferência de ácidos graxos da lecitina para o colesterol. Permite que a HDL acumule colesterol como éster de colesterol (EC). É ativada pela apoA-I	A deficiência resulta em diminuição da concentração de HDL	Produzida no fígado, circula com a HDL
Proteína de transferência de éster de colesterol (CETP)	16q21	Transfere EC, FL e TGs entre as lipoproteínas, esp. a transferência de EC a partir da HDL para as lipoproteínas que contêm apoB-100, em troca de TGs	A deficiência resulta em partículas de HDL maiores, repletas de colesterol	Produzida no fígado, circula com a HDL
Proteína de transferência de FLs (PLTP)	20q12	Transferência de FLs de/para a HDL. Importante no desenvolvimento e remodelamento da HDL.	Em camundongos, a deficiência provoca diminuição dos níveis de HDL	Expressa em muitos tipos celulares
Receptor da LDL (LDL-R)	19p13.2	Liga-se a apoE e apoB-100, e media a endocitose de lipoproteínas, principalmente LDL, mas também de VLDL, IDL e possivelmente dos resíduos de QM e HDL	Aparecimento de hipercolesterolemia familiar, principalmente diante da elevação dos níveis de LDL	Expressa na maioria dos tipos celulares. Todavia, os receptores hepáticos são responsáveis pela eliminação de 70% da LDL
Proteína cassete ligadora de ATP A1 (ABCA1)	9q22-31	Efluxo de colesterol a partir das células periféricas para a HDL. É importante na captação de colesterol pelas partículas nascentes de HDL	Doença de Tangier, com níveis muito baixos de HDL e acúmulo de lipídeos em células periféricas	Presente em muitos tipos celulares, sendo mais proeminente no fígado, testículos e glândula suprarrenal
Receptor *scavenger* de classe B, membro 1 (SCARB1)	12q24.31	Liga-se à HDL na superfície celular; pode ser útil no desenvolvimento da HDL e na depuração de ECs da HDL no fígado e nos tecidos produtores de esteroide. Também permite que os macrófagos se liguem à LDL oxidada	Acúmulo de partículas maiores de HDL, ricas em ECs, e aceleração do desenvolvimento de aterosclerose em camundongos	Presente em macrófagos, glândula suprarrenal, fígado e testículos

Enquanto a LDL e os QMs levam lipídeos até os tecidos, a HDL atua como veículo no transporte reverso do colesterol – mecanismo que remove o excesso de colesterol dos tecidos periféricos e o devolve ao fígado. A HDL é secretada tanto pelo fígado quanto pelo intestino, sob a forma de partículas discoides nascentes que contêm apolipoproteínas, colesterol e FLs (Havel, 1980; Oppenheimer, 1987; Oram, 1986; Scanu, 1982). A formação das partículas nascentes de HDL é quase exclusivamente dependente da síntese e liberação de apoA-I. Uma parte da HDL também parece ser proveniente da síntese *de novo* na circulação, a partir do excesso de material de superfície (p. ex., colesterol livre, apoA-I, apoA-II, apoC e FLs) removido das lipoproteínas ricas em TGs durante o catabolismo. Nos tecidos periféricos, o excesso de colesterol é exportado a partir das células (incluindo macrófagos) parcialmente por ação da proteína ABCA1. Esse colesterol livre é acumulado pelas partículas nascentes de HDL e esterificado pela LCAT. À medida que os colesteril ésteres se movem para o interior do núcleo hidrofóbico, a partícula vai se tornando esférica e aumenta de tamanho, desenvolvendo-se eventualmente em HDL_3 e, em seguida, em HDL_2. Várias enzimas e proteínas plasmáticas estão envolvidas nesse processo de remodelamento, incluindo a proteína de transferência de FLs (PLTP, *phospholipid transfer protein*) e a proteína de transferência de éster de colesterol (CETP, *cholesterol ester transfer protein*). A CETP catalisa a transferência de ésteres de colesterol para partículas que contêm apoB-100 em troca de TGs (Tall, 1990). A PLTP facilita a transferência de FLs de outras lipoproteínas para a HDL, permitindo que a partícula se desenvolva adquirindo FLs de superfície, enquanto acumula colesterol esterificado e TGs em seu núcleo. Uma vez formada, a HDL distribui o excesso de lipídeos, especialmente colesterol, para o fígado e outros tecidos (Bachorik, 1987; Glass, 1983; Stein, 1984). Esse fenômeno pode ocorrer diretamente quando a HDL é captada pelos hepatócitos seja pela ligação a receptores específicos, seja por ação de outros receptores de superfície celular e de enzimas

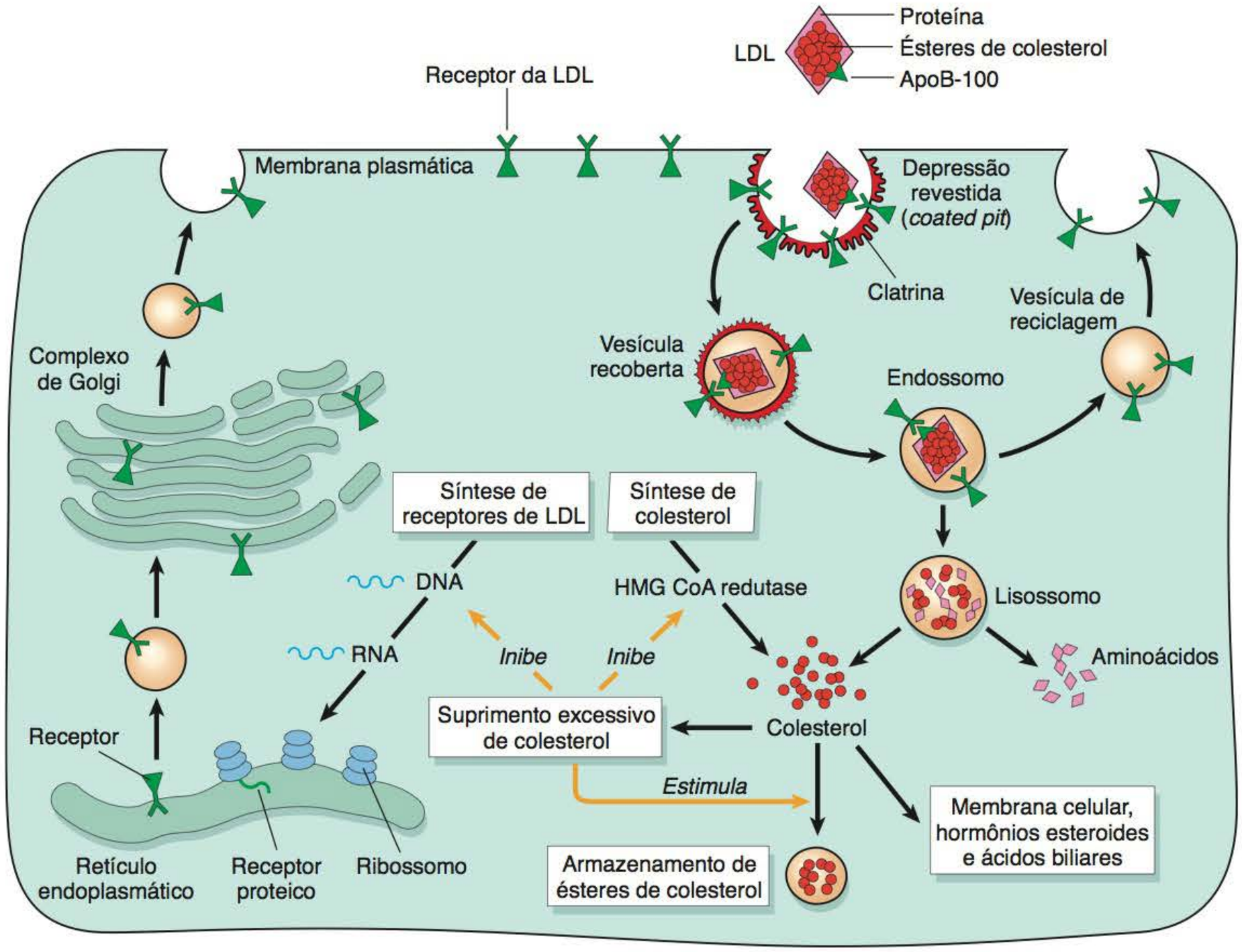


Figura 17.3 Via do receptor da LDL e regulação do metabolismo do colesterol.

(HL e EL) que depletam o conteúdo de FLs e TGs sem internalização das partículas de HDL. Os lipídeos também podem retornar ao fígado indiretamente, ou serem direcionados aos tecidos periféricos pelas lipoproteínas às quais são transferidos, a partir da HDL, por ação da PLTP e da CETP.

Embora as partículas de HDL possam retornar ao fígado logo após serem formadas, o volume de HDL parece permanecer na circulação durante vários dias, continuamente realizando trocas de lipídeos e apolipoproteínas com outras partículas de lipoproteína, recuperando colesterol extra a partir dos tecidos periféricos e distribuindo esses lipídeos para o fígado e os tecidos produtores de esteroides. Essa atividade é sustentada pelo fato de a apoA-I ter meia-vida de vários dias na circulação. Eventualmente, a HDL pode ser internalizada pelo fígado (provavelmente, via receptor da LDL ou SCARB1), ou a pequena partícula de HDL depletada de lipídeos pode ser catabolizada nos rins, filtrada em seguida e recapturada por ação da cubulina no túbulo proximal.

Quantificação de lipídeos e lipoproteínas

A concentração de lipoproteína tem sido quantificada e descrita de vários modos. Algumas dessas quantificações, incluindo a determinação da massa da partícula e da concentração em massa (a massa de cada partícula de lipoproteína como soluto por litro de solução), não são facilmente aplicáveis para triagens ou para fins de rotina clínica. Felizmente, há outros métodos disponíveis para descrever o conteúdo sanguíneo de lipoproteínas. Como a composição de cada classe de lipoproteína em termos de colesterol é semelhante entre os indivíduos, o colesterol das lipoproteínas é comumente utilizado para avaliar a concentração de lipoproteínas. Por exemplo, é mais fácil determinar a quantidade de LDL-C presente em uma amostra do que a massa de LDL (colesterol + TGs + proteínas) em solução, ainda que ambas as medidas forneçam informações semelhantes acerca do conteúdo plasmático de LDL. As concentrações de lipoproteína-colesterol apresentam boa correlação com os valores obtidos por ultracentrifugação analítica. Do mesmo modo, como tais valores têm sido empregados na maioria dos estudos populacionais sobre risco cardíaco, apresentam valor preditivo registrado.

Ao considerar os diversos métodos de análise lipídica, é preciso lembrar de vários aspectos. Primeiramente, quanto mais complicados forem os procedimentos analíticos, maior é a variabilidade das análises (Bookstein, 1990; Brown, 1990). Por exemplo, a quantificação das lipoproteínas plasmáticas usualmente requer duas etapas: separação das classes de lipoproteínas e quantificação da classe de interesse. Ambas as etapas contribuem para a ocorrência de erros nas determinações. E, de fato, as análises de lipoproteína-colesterol geralmente apresentam maior variabilidade do que as análises de CT, em razão das manipulações adicionais necessárias ao preparo das frações que contêm lipoproteínas. Em segundo lugar, além das fontes de erro analíticas, existem variáveis pré-analíticas significativas que afetam os níveis de lipídeos e lipoproteínas quantificados. Na verdade, as concentrações plasmáticas de lipoproteínas podem sofrer mudanças drásticas, como resultado da variação fisiológica normal. Esta seção aborda os aspectos relacionados à coleta e ao armazenamento, bem como os métodos empregados na quantificação de lipídeos e lipoproteínas.

Coleta e armazenamento de sangue

Variação e erro podem ser introduzidos antes ou durante a punção venosa, ou no momento em que as amostras são manipuladas e armazenadas antes da realização dos testes. Portanto, é importante padronizar as condições de coleta e preparo de amostras de sangue a serem analisadas.

Variação biológica. As variações fisiológicas envolvendo colesterol, TGs e lipoproteínas foram abordadas em inúmeros estudos (Bookstein, 1990; Brown, 1990; Demacker, 1982; Kafonek, 1992; Warnick, 1979). O coeficiente de variação fisiológica do colesterol para um dado indivíduo é, em média, 6,5%. Entretanto, esse valor pode ser maior em certos casos (Tab. 17.7). Na análise de amostras seriadas obtidas de um mesmo indivíduo, os níveis de colesterol quantificados em 95% das amostras apresentam uma variação de cerca de 13% acima ou abaixo

Tabela 17.7 Variação fisiológica dos lipídeos, lipoproteínas e apolipoproteínas plasmáticas

Componente	CV_P (%)*	CV_P (%)†
CT	5,0	6,4
TGs	17,8	23,7
LDL-C	7,8	8,2
HDL-C	7,1	7,5
ApoA-I	7,1	–
ApoB	6,4	–

CV_P = coeficiente de variação fisiológica.

* Dados obtidos de pacientes de uma clínica especializada em lipídeos (Kafonek, 1992).

† Dados do *National Cholesterol Education Program* (NCEP) 1995 *Working Group on Lipoprotein Measurement.*

da média que esse indivíduo costuma apresentar. Como resultado, a variação fisiológica pode ser várias vezes maior do que o erro analítico e, assim, as quantificações devem ser realizadas em várias amostras de sangue obtidas com um intervalo mínimo de uma semana, a fim de estabelecer a concentração de lipoproteínas usualmente apresentada pelo paciente.

Vários fatores biológicos podem afetar os níveis de lipídeos e lipoproteínas. Os níveis de colesterol aumentam com a idade, a partir do início da fase adulta, em ambos os sexos. As mulheres apresentam níveis menores do que os homens, exceto durante a infância e logo após os 50 anos. O National Cholesterol Education Program (NCEP), com base na variação associada à idade, recomenda que a triagem de colesterol seja realizada a cada 5 anos. Há também a variação sazonal, responsável pela discreta elevação dos níveis de colesterol que se observa durante o inverno (Robinson, 1992). Do mesmo modo, a ingestão diária de uma dieta com gordura saturada e colesterol influencia significativamente os níveis plasmáticos de lipídeos. Demora várias semanas até que os efeitos da modificação da dieta se tornem aparentes. Por isso, antes de determinar os níveis de colesterol de um indivíduo, é importante garantir que ele(a) consuma sua dieta habitual por um período de 2 semanas e que não ganhe nem perca peso. Os níveis lipídicos são significativamente alterados por vários medicamentos de uso comum, tais como contraceptivos orais, estrógenos da terapia pós-menopáusica e alguns fármacos anti-hipertensivos. Dislipoproteinemias secundárias podem ser causadas por distúrbios médicos envolvendo a tireoide, o fígado e os rins (ver Tab. 17.15, a seguir). Nesses casos, a supervisão da hiperlipidemia é predominantemente uma função do tratamento da doença subjacente. Desvios de curta duração nos valores lipídicos basais podem ser causados por fatores biológicos e relacionados ao estilo de vida do paciente, tais como jejum, postura, oclusão venosa, anticoagulantes, infarto de miocárdio recente, AVC, cateterismo cardíaco, trauma, infecção aguda e gravidez. Recomenda-se que as quantificações de lipoproteínas sejam realizadas somente 8 semanas após qualquer tipo de episódio envolvendo trauma ou infecção aguda bacteriana ou viral, e 3 a 4 meses após o nascimento de bebês.

Jejum. Idealmente, os pacientes devem jejuar por 12 horas antes de serem submetidos à punção venosa. Os QMs costumam estar presentes no plasma pós-prandial e, dependendo do tipo e da quantidade de alimentos ingeridos, podem causar um aumento significativo da concentração plasmática de TGs. As concentrações de LDL-C e HDL-C também sofrem uma queda transitória após as refeições, o que se deve, em parte, às alterações de composição promovidas pela CETP durante o catabolismo dos QMs (Cohn, 1988). Os QMs são quase totalmente eliminados em 6 a 9 horas, de modo que sua presença é considerada anormal após um período de 12 horas. Em geral, os níveis de CT e HDL-C podem ser quantificados em indivíduos que não jejuaram, facilitando consideravelmente a triagem e o monitoramento. O jejum exerce pouco efeito sobre os níveis plasmáticos de CT e, embora os níveis de HDL-C na ausência de jejum possam ser poucos mg/dL menores que os níveis medidos em jejum, não é correto considerar que o paciente apresenta níveis reduzidos de HDL. Por outro lado, o jejum é condição essencial à quantificação de TG e LDL-C. O aparecimento pós-prandial de QMs e as alterações composicionais da LDL levam à subestimação do LDL-C, podendo resultar na classificação incorreta de pacientes verdadeiramente afetados. O NCEP, por meio do Adult Treatment Panel III (ATP III, Painel de Tratamento do Adulto III) (NCEP, 2002), recomenda aos pacientes um jejum de 9 horas antes da coleta de amostras de sangue para realização das análises de lipídeos e lipoproteínas. Esse período de 9 horas foi adaptado para pacientes que não conseguem ou não estão dispostos a jejuar por 12 horas. O período mais curto de jejum deve produzir apenas erros mínimos e clinicamente insignificantes nas estimativas dos níveis habituais de TG, LDL-C e HDL-C do paciente. Mesmo assim, o período de 12 horas de jejum ainda é considerado apropriado para quantificações de lipoproteína realizadas em estudos clínicos e epidemiológicos.

Postura. Quando o paciente muda da posição vertical para a reclinada, o conteúdo extravascular de água é transferido ao sistema vascular e dilui os constituintes plasmáticos não difusíveis. Ocorre um decréscimo de até 10% nas concentrações de CT, LDL-C, HDL-C, apoA-I e apoB após um período de 20 minutos, com o indivíduo deitado (Miller, 1992). A diminuição da concentração de TG é aproximadamente 50% maior, sugerindo a contribuição de outros fatores além da hemodiluição. No indivíduo sentado, a intensidade de tais efeitos cai mais ou menos pela metade (Miller, 1992). As alterações posturais são reversíveis quando o paciente retoma a posição vertical. Portanto, para a realização da punção venosa, o posicionamento do paciente deve ser padronizado. A posição sentada é preferencial e a mais adotada para esse procedimento. As atuais diretrizes do NCEP recomendam que o paciente permaneça sentado por 5 minutos antes de ser iniciada a coleta das amostras, a fim de evitar hemoconcentração. Caso seja necessário deitar o paciente, essa posição deve ser utilizada todas as vezes que esse paciente for submetido a novas coletas, com o intuito de minimizar a variação postural. Uma oclusão venosa prolongada pode causar hemoconcentração e aumentos de 10 a 15% nos níveis de colesterol. Por isso, recomenda-se evitar o uso de torniquetes por períodos superiores a 1 ou 2 minutos, quando possível.

Amostras de sangue venoso *vs.* capilar. Embora as amostras de sangue venoso e capilar em geral sejam consideradas equivalentes, as informações atualmente disponíveis são limitadas e um pouco contraditórias. Alguns pesquisadores constataram que quantificações realizadas com ambos os tipos de amostra apresentam uma concordância aproximada de 4% (Koch, 1987) ou menos (Law, 1997; Lunz, 1987). Outros, contudo, relataram diferenças da ordem de 8 a 12% (Bachorik, 1990). De forma geral, as quantificações realizadas com amostras de sangue capilar parecem resultar em valores um pouco inferiores do que aqueles obtidos com amostras de sangue venoso. Além disso, quantificações realizadas com amostras de sangue coletadas por picada no dedo da mão tendem a apresentar maior variabilidade, em comparação às amostras de sangue venoso obtidas ao mesmo tempo, provavelmente por conta da existência de fontes de erro pré-analíticas. Com relação ao componente biológico inerente ao indivíduo, foram realizadas estimativas das variações da quantificação de lipídeos e lipoproteínas em amostras de sangue venoso e de sangue obtido por picada do dedo. Em ambos os tipos de amostra, foram observadas variações similares dos níveis de colesterol, TG, HDL e LDL (Kafonek, 1996). Apesar de o uso de amostras de sangue capilar ser inevitável em alguns casos, é importante lembrar que os dados epidemiológicos, dos quais derivam os níveis de lipídeos e lipoproteínas considerados de risco, basearam-se em quantificações realizadas com amostras de sangue venoso. E, além disso, por vários motivos de caráter fisiológico e metodológico, as quantificações realizadas com ambos os tipos de amostra podem apresentar diferenças.

Plasma *vs.* soro. Tanto o plasma quanto o soro podem ser utilizados, quando se pretende quantificar apenas colesterol, TG e HDL-C; o LDL-C é calculado a partir dessas três determinações (ver a seguir). Entretanto, o plasma é preferencialmente utilizado na quantificação de lipoproteínas por ultracentrifugação ou métodos eletroforéticos, uma vez que as amostras podem ser imediatamente resfriadas a 4°C para retardar as alterações a que as lipoproteínas estão sujeitas à temperatura ambiente. Quando há necessidade de utilizar plasma, o sangue é resfriado em banho de gelo logo após a coleta e as células são removidas o quanto antes (geralmente, dentro de 3 horas). Em seguida, o plasma é mantido a 4°C até o momento da análise. Ele não deve permanecer

em contato com as células de um dia para outro. Mesmo com o uso de anticoagulantes, o plasma pode apresentar agregação proteica quando armazenado sob refrigeração durante alguns dias ou congelado por mais tempo. Esse aspecto pode dificultar a obtenção de alíquotas homogêneas para a análise e, além disso, interferir no fluxo de amostras em analisadores automatizados. Em consequência, os resultados obtidos serão imprecisos ou variáveis. A agregação proteica é menos frequente em amostras de soro, as quais têm sido utilizadas em determinadas circunstâncias, como diante da necessidade de estocar amostras durante semanas ou meses antes da realização das análises.

A escolha do anticoagulante é igualmente importante. Anticoagulantes, como o citrato, exercem efeitos osmóticos consideráveis que resultam em concentrações plasmáticas de lipídeos e lipoproteínas falsamente baixas. A heparina, em razão de seu peso molecular relativamente alto, exerce pouco efeito sobre o volume plasmático, mas pode alterar as mobilidades eletroforéticas das lipoproteínas. O EDTA é o anticoagulante preferido, ainda que as concentrações de colesterol e TGs no plasma tratado apresentem uma redução aproximada de 3% em relação aos níveis séricos (Laboratory Methods Committee of the Lipid Research Clinics Program, 1977). Esse anticoagulante retarda certos tipos de alterações oxidativas e enzimáticas que ocorrem nas lipoproteínas durante o armazenamento.

Armazenamento. Geralmente, CT, TGs e HDL-C podem ser analisados de modo satisfatório em amostras congeladas, sendo possível estimar a concentração de LDL-C com o auxílio da equação de Friedewald (Friedewald, 1972). As apolipoproteínas também podem ser quantificadas em amostras congeladas (ver a seguir). No entanto, amostras congeladas são inadequadas para análises por ultracentrifugação, uma vez que as lipoproteínas ricas em TGs não resistem ao congelamento. Diante da necessidade de estocar soro ou plasma por tempo prolongado, as amostras devem ser mantidas a temperaturas ≤ –70°C. Para armazenamento de curta duração (até 1–2 meses), as amostras podem ser mantidas a –20°C, porém, não devem ser armazenadas em congeladores que possuam mecanismo de descongelamento automático. Nesse tipo de congelador, a temperatura oscila entre –20 e –2°C durante o ciclo de descongelamento, submetendo efetivamente as amostras a ciclos de congelamento-descongelamento que aceleram sua deterioração e provocam variações nas quantificações de lipídeos e lipoproteínas (i. e., medidas menos reproduzíveis).

Estimativa do conteúdo plasmático de lipídeos

Colesterol e TGs são os lipídeos plasmáticos de maior interesse para o diagnóstico e monitoramento de distúrbios envolvendo as lipoproteínas. As análises de FLs geralmente fornecem pouca informação adicional, além de raramente serem requisitadas. Em alguns casos, esse tipo de análise pode ser necessário diante de doenças obstrutivas hepáticas ou distúrbios associados a níveis de lipoproteínas anormalmente baixos.

Colesterol

O colesterol corresponde a praticamente todo o conteúdo plasmático de esteróis. Constitui uma mistura de formas não esterificadas (30–40%) e esterificadas (60–70%), sendo a proporção dessas duas formas consideravelmente constante em e entre indivíduos normais. As concentrações de CT e lipoproteína-colesterol costumam ser expressas em termos de núcleos esteróis, sem distinção das frações esterificadas e não esterificadas. Em geral, essa distinção somente é necessária nos casos em que a contribuição da porção ácido graxo à massa de colesteril éster deva ser considerada ou quando houver interesse na proporção das massas de colesterol/colesteril éster.

A presente discussão leva em consideração principalmente os métodos enzimáticos de quantificação do colesterol, os quais virtualmente substituíram os métodos bioquímicos que eram utilizados para a maioria dos propósitos da clínica e da pesquisa (Bachorik, 1976; Lipid Research Clinics Program, 1982; Wood, 1980). Entretanto, um desses métodos bioquímicos – uma modificação do método de Abell-Kendall (Abell, 1952) – continua sendo o método referencial para quantificação de colesterol utilizado pelos CDCs e por uma rede de laboratórios de referência secundários (Myers, 1989). No método de Abell-Kendall, os colesteril ésteres são hidrolisados com hidróxido de potássio (KOH) alcoólico e o colesterol não esterificado é extraído com éter de petróleo e quantificado com reagente de Liebermann-Burchard, utilizando padrões de colesterol purificados. Esse método apresenta uma acurácia que lhe permite fornecer resultados com até 0,5% de variação em relação aos valores reais.

Métodos enzimáticos. Esses métodos quantificam diretamente o CT plasmático ou sérico por meio de uma série de reações químicas que hidrolisam os colesteril ésteres e oxidam o grupo 3-OH do colesterol. O peróxido de hidrogênio – um dos produtos da reação – é quantificado enzimaticamente:

$$\text{Colesteril éster} + H_2O \xrightarrow[\text{hidrolase}]{\text{colesteril éster}} \text{colesterol} + \text{ácidos graxos livres} \qquad \text{(Rx. 17.1)}$$

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{colesterol}} \text{colest-(4 em 1)} + H_2O_2 \qquad \text{(Rx. 17.2)}$$

$$H_2O_2 + \text{fenol} + \text{4-aminoantipirina} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{Coloração de quinoneimina} + 2H_2O \qquad \text{(Rx. 17.3)}$$

A absorbância da coloração de quinoneimina produzida na reação 17.3 é medida a 500 nm.

Os métodos enzimáticos são menos sujeitos às interferências das substâncias não esteróis que reagem nos métodos bioquímicos. Contudo, não são absolutamente específicos para o colesterol. Além de reagir com colesterol (reação 17.2), a colesterol oxidase pode reagir com outros esteróis presentes no plasma e com esteróis vegetais, que são encontrados em concentrações consideráveis na circulação de pacientes com β-sitosterolemia. Esses esteróis também contribuem para os valores de colesterol detectados pela maioria dos métodos bioquímicos. Além dos esteróis, substâncias redutoras, como ácido ascórbico e bilirrubina, interferem nas quantificações enzimáticas ao consumirem H_2O_2 (Naito, 1984; Witte, 1978). A interferência provocada pela bilirrubina é complexa e pode produzir resultados falsamente altos ou baixos, dependendo das concentrações de reagente utilizadas. A própria bilirrubina absorve luz a 500 nm, criando uma tendência à elevação dos valores de colesterol medidos. No entanto, por ser oxidada pelo H_2O_2, como resultado perde sua capacidade de absorção da luz no referido comprimento de onda. Esse fenômeno dificulta a utilização de soro como "*blank*" para correção da absorbância devida à bilirrubina. Esta também pode causar interferência direta em métodos enzimáticos ao reagir com um produto intermediário na reação que envolve a peroxidase. De um modo global, a interferência da bilirrubina parece ser significativa apenas diante de concentrações superiores a 5 mg/dL, em que foi descrita uma aparente redução dos valores de colesterol da ordem de 5 a 15% (Deacon, 1979; Naito, 1984; Pesce, 1977). A turbidez da amostra, em decorrência de uma elevada concentração de TGs, também pode causar interferência nos métodos enzimáticos (Pesce, 1977). Ácido úrico e hemoglobina, assim como inúmeras substâncias distintas, não afetam significativamente a quantificação dos níveis de colesterol, mesmo diante de concentrações plasmáticas anormalmente elevadas (Deacon, 1979; Pesce, 1977).

Além da relativa resistência a interferências, os métodos enzimáticos apresentam outros benefícios importantes. São métodos que consomem apenas alguns μL de amostra e não requerem uma etapa preliminar de extração. São rápidos e – se for eliminada a etapa da colesterol éster hidrolase – podem ser utilizados para a quantificação de colesterol não esterificado. Por fim, os métodos enzimáticos são precisos, e normalmente apresentam coeficientes de variação da ordem de 1 a 2%. Em sua grande maioria, empregam padrões de colesterol puros e estáveis ou padrões séricos de calibração, cujos valores estabelecidos são rastreáveis pelo método de referência para colesterol do CDC (Pesce, 1977). Os valores enzimáticos em geral mostram uma concordância de 1 a 2% com os valores referenciais, quando obtidos em condições laboratoriais com equipamentos modernos. Os calibradores séricos são propriamente os favoritos, em relação ao colesterol puro, por estarem sujeitos a todas as reações analíticas às quais são submetidas as amostras do paciente.

Triglicerídeos

Uma ampla variedade de métodos tem sido utilizada para quantificar os TGs plasmáticos (Bachorik, 1977). No entanto, os métodos mais

empregados com finalidade clínica ou epidemiológica baseiam-se na hidrólise dos TGs e na quantificação do glicerol liberado na reação:

$$TG + 3H_2O \xrightarrow{\text{lipase}} \text{glicerol} + \text{ácidos graxos} \qquad \text{(Rx. 17.4)}$$

As reações são quase universalmente realizadas de modo enzimático (como a reação 17.4). No caso do colesterol, os métodos enzimáticos substituíram os antigos métodos bioquímicos (Kessler, 1966; Lipid Research Clinics Program, 1982).

Um método bioquímico continua sendo utilizado como método referencial para TGs pelo CDC. Esse método emprega um procedimento de extração com clorofórmio seguido de cromatografia em ácido salicílico para isolamento dos TGs. O glicerol é liberado por saponificação (hidrólise alcalina de TGs) e oxidado com periodato de sódio:

$$\text{Glicerol} + NaIO_4 \longrightarrow \text{formaldeído} + \text{ácido fórmico} \qquad \text{(Rx. 17.5)}$$

O formaldeído produzido é quantificado por meio da reação com uma solução de ácido sulfúrico de ácido cromotrópico, que resulta na produção de um cromóforo cor-de-rosa. Esse método é inespecífico para glicerol. O formaldeído é também produzido indiretamente a partir de FLs que contêm glicerol. Todavia, estas e outras substâncias interferentes são removidas nas etapas de extração (com clorofórmio) e adsorção (cromatografia em ácido salicílico), de modo que não causem interferências na quantificação de TGs pelo método de referência do CDC.

Métodos enzimáticos (Bucolo, 1973). Esses métodos são, no momento, universalmente utilizados para análise de TGs em laboratórios clínicos. São relativamente específicos, rápidos e de fácil execução. As análises são realizadas diretamente no plasma ou soro, e não estão sujeitas a interferências provocadas por FLs ou glicose.

A maioria dos métodos enzimáticos compartilha a hidrólise dos TGs a ácidos graxos livres e glicerol, seguida da fosforilação do glicerol a glicerofosfato.

$$\text{Triglicerídeos} \xrightarrow{\text{lipase}} \text{glicerol} + \text{ácidos graxos} \qquad \text{(Rx. 17.6)}$$

$$\text{Glicerol} + ATP \xrightarrow{\text{gliceroquinase}} \text{glicerofosfato} + ADP \qquad \text{(Rx. 17.7)}$$

Entretanto, existem vários métodos que podem ser utilizados para quantificar a quantidade de glicerol produzida e, assim, a quantidade de TGs plasmáticos. Em uma das abordagens, o glicerofosfato reage do seguinte modo:

$$\text{Glicerofosfato} + NAD \xrightarrow[\text{desidrogenase}]{\text{glicerofosfato}} \text{di-hidroxiacetona fosfato} + NADH + H^+ \qquad \text{(Rx. 17.8)}$$

$$NADH + \text{corante tetrazólio} \xrightarrow{\text{diaforase}} \text{formazan} + NAD^+ \qquad \text{(Rx. 17.9)}$$

A formação de NADH pode ser quantificada por espectrofotometria a 340 nm. Em outros métodos, a reação 17.9 tem sido adicionada para possibilitar a leitura da absorbância a 500-600 nm, utilizando instrumentos mais comumente disponíveis no laboratório clínico.

Em uma das variações comuns, o glicerofosfato produzido na reação 17.7 é oxidado por ação da glicerofosfato oxidase:

$$\text{Glicerofosfato} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{glicerofosfato}} \text{di-hidroxiacetona} + H_2O_2 \qquad \text{(Rx. 17.10)}$$

O H_2O_2 resultante é quantificado conforme descrito anteriormente para os métodos de determinação de colesterol (reação 17.3).

Em uma terceira abordagem, em vez do glicerofosfato formado na reação 17.7, é quantificado o ADP:

$$ADP + \text{fosfoenol piruvato} \xrightarrow[\text{quinase}]{\text{piruvato}} ATP + \text{piruvato} \qquad \text{(Rx. 17.11)}$$

$$\text{Piruvato} + NADH + H^+ \xrightarrow[\text{deidrogenase}]{\text{Lactato}} \text{lactato} + NAD^+ \qquad \text{(Rx. 17.12)}$$

Nesse método, o desaparecimento de NADH é determinado a 340 nm.

Os métodos enzimáticos para quantificação de TGs geralmente apresentam bom desempenho. Os reagentes necessários são disponibilizados comercialmente na forma de preparações liofilizadas, que necessitam ser reconstituídas apenas momentos antes do uso. Com base em levantamentos recentemente realizados pelo CAP, foram encontrados coeficientes de variação interlaboratorial (CVs) da ordem de 5 a 6% para quantificação de TGs por métodos enzimáticos. Assim, antes de escolher um método enzimático, é prudente avaliá-lo quanto à acurácia e à precisão ao longo do intervalo de concentrações de TGs que poderão ser encontradas com mais frequência (1,299–12,987 mmol/L; 50–500 mg/dL).

***Blanks* de TGs.** As quantificações enzimáticas de TGs envolvem a produção e quantificação de glicerol. Ao contrário dos FLs e da glicose, os gliceróis livres causam interferências em tais métodos. Normalmente, a concentração plasmática de glicerol é inferior a 0,163 mmol/L (1,5 mg/dL), diante de uma concentração de TGs equivalente a 14 mg/dL. No entanto, os níveis de glicerol podem aumentar em certas ocasiões, como após a prática de exercícios vigorosos, em pacientes com diabetes descompensado, após a contaminação com lubrificantes à base de glicerol utilizados em tampas de tubos de coleta de sangue, logo após a ingestão de medicamentos que contêmo glicerol ou, ainda, em um distúrbio relativamente raro – hiperglicerolemia –, que surge em consequência de uma mutação no gene da glicerol quinase, localizado no cromossomo Xp21.3. A realização de ensaio com *blank*, sem adição da lipase, fornece uma medida do conteúdo de glicerol pré-existente na amostra. Caso o *blank* apresente leitura elevada, significa que a amostra contém glicerol, e essa leitura deve ser utilizada para corrigir adequadamente os valores referentes à quantificação de TG. Em um procedimento alternativo, o glicerol livre é consumido em uma reação preliminar antes que a hidrólise de TGs seja iniciada. Nesse caso, o valor quantificado equivale ao de uma leitura de TGs já corrigida com o *blank*.

Os procedimentos de correção com *blank* anteriormente descritos eliminam de modo satisfatório as incorreções presentes em quantificações espúrias advindas de muitas fontes não glicerídicas. Entretanto, essa correção não é adequada para os resultados obtidos de glicerídeos parciais (di e monoglicerídeos). Esses glicerídeos parciais geralmente são encontrados em concentrações muito baixas em amostras frescas de plasma ou soro, mas também podem se formar na hidrólise lenta dos TGs que ocorre durante o armazenamento das amostras. Resta esclarecer se os glicerídeos parciais presentes no plasma fresco devem ser subtraídos; contudo, aqueles formados durante o período de armazenamento provavelmente não devem ser descontados, visto serem provenientes dos TGs originalmente presentes na amostra.

Felizmente, o problema que envolve a correção com *blank* é tão complexo quanto insignificante, do ponto de vista prático. Muitos laboratórios não estabelecem *blanks* em sua rotina, e seu uso continua sendo incerto. Quando determinados, a magnitude dos valores de *blank* encontrada na maioria das amostras frescas é da ordem de 0,056 a 0,112 mmol/L (5–10 mg/dL), expressa em termos de TGs, ainda que possa ser um pouco maior em amostras que contenham uma concentração elevada desses lipídeos. Entretanto, os *blanks* podem ter papel importante na padronização e no controle de qualidade das quantificações de TGs, já que podem chegar a 0,226 a 0,339 mmol/L (20–30 mg/dL) ou mais nas misturas de várias amostras de soro utilizadas com tal finalidade, provavelmente, e em parte, em razão da hidrólise parcial dos TGs que ocorre durante o preparo dessas misturas.

Fosfolipídeos (FLs)

Os FLs encontrados no plasma humano são, em sua maioria, fosfatidilcolina (FC) (70–75%) ou esfingomielina (18–20%). Os FLs restantes incluem fosfatidilserina (FS), fosfatidiletanolamida (FE) (3–6%) e lisofosfatidilcolina (LFC) (4–9%). A análise de FLs usualmente fornece pouca informação adicional nos casos de dislipoproteinemia; porém, talvez seja desejável quantificar a concentração total de FLs ou mesmo a concentração de classes individuais de FLs em determinados distúrbios caracterizados pela alteração da concentração e composição de FLs ou distribuição de lipoproteínas, como ocorre na icterícia obstrutiva, doença de Tangier, abeta ou hipobetalipoproteinemia e deficiência de LCAT.

A concentração de FLs total pode ser convenientemente determinada pela quantificação do fósforo existente nos FLs. Os lipídeos são extraídos da amostra e completamente oxidados para conversão do conteúdo de fósforo dos FLs em fosfato inorgânico. Este, então, é quantificado por meio de métodos colorimétricos. Esses procedimentos são

reproduzíveis e sensíveis, e podem ser adaptados para quantificação do conteúdo total do fósforo de FLs em amostras de 100 μL (ou menos) de plasma ou soro. Cada mol de fósforo contribui para cerca de 4% da massa total de FLs. Dessa forma, a massa de FLs pode ser determinada multiplicando-se por 25 a concentração de fósforo dos FLs (expressa em mg/dL).

O conteúdo de FLs do soro ou do plasma também pode ser determinado enzimaticamente, utilizando métodos comercialmente disponíveis. No método comercializado pela WAKO Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japão), lecitina (FC), esfingomielina e lisolecitina são hidrolisadas pela fosfolipase D, e a colina liberada é oxidada.

$$\text{FL} \xrightarrow{\text{fosfolipase D}} \text{colina} \qquad \text{(Rx. 17.13)}$$

$$\text{Colina} \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{colina}} \text{betaína} + H_2O_2 \qquad \text{(Rx. 17.14)}$$

O H_2O_2 resultante produzido é quantificado de modo semelhante àquele apresentado na reação 17.3.

A análise de classes individuais de FLs raramente é necessária para avaliação de casos de dislipoproteinemia e, portanto, é desconsiderada neste capítulo.

Estimativa do conteúdo de lipoproteínas e lipoproteínas-colesterol

Como as lipoproteínas compartilham componentes lipídicos e apolipoproteínas, o problema central com que se depara na análise das lipoproteínas é o isolamento das diferentes classes existentes. Muitos métodos foram empregados na tentativa de realizar essa separação: ultracentrifugação, adsorção, gel filtração, cromatografia por afinidade, eletroforese em vários meios, precipitação em poliânion e álcool, procedimentos imunoquímicos e diversas combinações metodológicas. Algumas dessas alternativas necessitam de habilidades e equipamentos especiais, não sendo tão facilmente adaptáveis para fins clínicos e epidemiológicos. A presente discussão se restringe aos vários procedimentos que têm sido empregados em laboratórios clínicos.

Métodos que envolvem ultracentrifugação. Tais métodos aproveitam as vantagens oferecidas por duas propriedades inerentes às lipoproteínas. Em primeiro lugar, graças ao seu conteúdo proteico, as lipoproteínas apresentam densidades menores que as de outras macromoléculas encontradas no plasma. Em segundo lugar, cada uma das classes de lipoproteínas apresenta um densidade caracteristicamente distinta. Assim, as lipoproteínas podem ser isoladas das demais proteínas plasmáticas e também entre si realizando-se ultracentrifugações nas densidades apropriadas. Os métodos de ultracentrifugação são de amplo interesse histórico e acadêmico, sendo raramente empregados na clínica.

Métodos eletroforéticos. No passado, a eletroforese era amplamente utilizada no laboratório clínico para separar e quantificar as lipoproteínas. Entretanto, em razão das significativas limitações que apresenta (descritas adiante) e por ser em geral desnecessária ao diagnóstico da dislipoproteinemia, seu uso tornou-se menos frequente na rotina clínica nos últimos anos. Normalmente, o custo do procedimento – tanto em termos de tempo quanto de dinheiro – raramente é justificado pelas informações que fornece.

O meio de suporte mais utilizado na eletroforese de lipoproteínas é o gel de agarose, que proporciona rapidez, sensibilidade e capacidade de resolver as diferentes classes de lipoproteínas. Os QMs, quando presentes, permanecem retidos no ponto de origem. Entre as principais lipoproteínas, a HDL é a que migra mais rapidamente, a LDL é a mais lenta e a VLDL move-se a uma velocidade intermediária entre a da HDL e a LDL. As lipoproteínas separadas por eletroforese são nomeadas de acordo com suas mobilidades eletroforéticas: HDL (α-lipoproteína) migra com as α_1-globulinas; a LDL (β-lipoproteína) migra com as β-globulinas; e a VLDL (pré-β-lipoproteína) se move com as α_2-globulinas. As diferentes propriedades das lipoproteínas constituem a base da separação por eletroforese e ultracentrifugação, e as frações análogas isoladas por ambas as técnicas nem sempre são idênticas. Por exemplo, a β-VLDL (encontrada na hiperlipidemia de tipo 3; ver adiante) é isolada com a VLDL por ultracentrifugação, porém, se move eletroforeticamente com a LDL. Na ausência de informações adicionais, uma amostra com β-VLDL aparentemente contém uma concentração elevada de VLDL quando processada por ultracentrifugação, assim como aparenta ter elevada concentração de LDL quando submetida à eletroforese. Em outro exemplo, a Lp(a) é isolada por ultracentrifugação na faixa de densidade LDL-HDL, contudo, apresenta mobilidade eletroforética semelhante à da VLDL. Essa dicotomia foi a responsável pela denominação *sinking pré-β-lipoprotein* atribuída à Lp(a).

A eletroforese pode ser realizada com plasma não fracionado ou em frações plasmáticas que contêm outras proteínas séricas. Para serem visualizados, os eletroforetogramas de lipoproteínas comumente são tratados com corantes para lipídeos, como o óleo vermelho O, *fat red 7B* ou sudão negro B. Esses corantes de lipídeos reagem primariamente com as ligações éster existentes nos TGs e nos ésteres de colesterol. As lipoproteínas ricas em colesterol livre e FLs (como a LpX) coram-se muito fracamente e, assim, são grosseiramente subestimadas pelas técnicas eletroforéticas.

Esforços foram empreendidos no sentido de quantificar as lipoproteínas por densitometria. Os níveis de lipoproteínas foram expressos em termos de porcentual de distribuição de material lipocorante nas lipoproteínas β, pré-β e α, ou foram convertidos em concentrações lipoproteína-colesterol, de acordo com cálculos que incorporam hipóteses acerca do conteúdo de colesterol e da captação de corantes pelas lipoproteínas. De forma geral, tais abordagens falharam por vários motivos, incluindo resolução incompleta de lipoproteínas β e pré-β, presença de lipoproteínas minoritárias ou incomuns e diferenças de intensidade de coloração. A eletroforese tem sido empregada de forma mais bem-sucedida em conjunto com outros métodos.

Métodos de precipitação com poliânions. Algumas lipoproteínas são precipitadas com poliânions, como sulfato de heparina, dextran sulfato, fosfotungstato e outros, na presença de cátions, como Ca^{2+}, Mg^{2+} e Mn^{2+}. As condições necessárias à precipitação das principais classes de lipoproteínas foram estabelecidas em etapas, começando pelas lipoproteínas de menor densidade e ricas em lipídeos (Burstein, 1982). As melhores separações são obtidas quanto mais distintas forem as lipoproteínas entre si. Dessa forma, é mais fácil separar as lipoproteínas que contêm apoB das HDLs do que separar VLDLs de LDLs ou HDL_2 de HDL_3. Historicamente, a precipitação com poliânion era mais empregada na remoção de lipoproteínas com apoB antes de iniciar as análises de HDL-C. Era necessário realizar um pré-tratamento da amostra, e o processo não era totalmente automatizado. Para a análise de HDL-C e LDL-C, a maioria dos laboratórios clínicos substituiu as técnicas de precipitação por ensaios homogêneos automatizados.

Métodos para determinação dos valores de HDL-C

Historicamente, o HDL-C tem sido quantificado no sobrenadante das amostras após a precipitação com poliânions de cátions bivalentes das lipoproteínas que contêm apoB. Várias combinações de poliânions de cátions bivalentes têm sido utilizadas, mas nem todas fornecem precisamente os mesmos resultados. Os valores de HDL-C determinados por procedimentos que empregam sulfato de heparina-Mn^{2+} apresentam boa concordância com aqueles obtidos por meio de ultracentrifugação analítica ou preparativa (Bachorik, 1976; Warnick, 1979). Esse método foi amplamente utilizado em estudos epidemiológicos. Os métodos que utilizam dextran sulfato (massa molecular relativa = 50.000) – Mg^{2+} e fosfotungstato de sódio – Mg^{2+}, tornaram-se populares por não causarem interferência nos estudos enzimáticos de colesterol. No entanto, fornecem resultados que são aproximadamente 5% inferiores aos obtidos por ultracentrifugação. Por outro lado, a utilização de heparina-Ca^{2+} aparentemente fornece resultados 10% maiores. Essas diferenças surgem, em parte, em razão da subprecipitação das lipoproteínas que contêm apoB e consequente superestimação do conteúdo de HDL-C, ou da superestimação da HDL e consequente subestimação do HDL-C. Concentrações aumentadas de TGs provocam interferências nos métodos de precipitação, resultando na superestimação do conteúdo de HDL-C. Foram realizadas tentativas de simplificar os métodos de precipitação por meio da utilização de pérolas magnéticas recobertas com dextran sulfato, para separação da HDL de lipoproteínas que contêm apoB (Naito, 1995).

Atualmente, os ensaios homogêneos são o método mais popular de quantificação de HDL-C. Diferentemente dos métodos de precipitação, os procedimentos utilizam dois reagentes e são totalmente automatizados, dispensando as etapas de pré-tratamento e separação desconectadas (daí serem denominados "homogêneos"). Além disso, podem ser adaptados à maioria dos analisadores químicos. Assim, reduzem o tempo de manipulação das amostras e a despesa total com os ensaios. Os *kits* de testes distribuídos nos EUA baseiam-se em diversos métodos. Usualmente, o primeiro reagente forma um complexo estável com as lipoproteínas não HDL, impedindo-as de participar da reação. O segundo reagente, então, libera o HDL-C, que é quantificado enzimaticamente. De acordo com os levantamentos realizados pelo CAP em 2005, o método mais utilizado emprega um polímero sintético com um poliânion para bloquear as lipoproteínas não HDL e, em seguida, um detergente que libera o HDL-C (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA; Beckman Coulter, Inc.). Outros métodos empregam uma enzima modificada com polietilenoglicol (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN), ou imunoinibição (Wako Chemicals EUA, Inc., Richmond, VA) para bloquear as lipoproteínas não HDL. Um quarto método (Polymedco Inc., Cortlandt Manor, NY) emprega um reagente especial para eliminar seletivamente o colesterol presente nas lipoproteínas não HDL, seguido de outro reagente que libera o colesterol da HDL (Denka Seiken Co., Niigata, Japão). Esses métodos, de modo geral, não são afetados por concentrações elevadas de TGs, bilirrubina e globulinas.

Em uma revisão abrangente (Warnick, 2001), múltiplos ensaios homogêneos para quantificação de HDL-C foram comparados aos procedimentos tradicionais de precipitação e ultracentrifugação. Os autores concluíram que os novos procedimentos simplificam a determinação da concentração de HDL-C, ao mesmo tempo em que são acurados, precisos e atendem aos critérios estabelecidos pelo NCEP referentes ao erro total. Entretanto, a avaliação de lipoproteínas atípicas pelo ensaio homogêneo pode gerar resultados discrepantes, comparados àqueles obtidos com o método já estabelecido da precipitação. Tais diferenças são observadas em pacientes com hiperlipidemia, ou doença hepática ou renal, em que são encontradas formas anormais de lipoproteínas. Os laboratórios que se deparam com uma elevada proporção de lipoproteínas atípicas (p. ex., clínicas especializadas em lipídeos ou no cenário da pesquisa) devem realizar uma validação completa dos ensaios homogêneos a serem utilizados na análise das amostras provenientes dessa população de pacientes.

Métodos para quantificação da LDL-C

Vários métodos têm sido utilizados para quantificar a concentração de LDL-C. O primeiro deles – um procedimento laboratorial de referência – envolve ultracentrifugação para separar a LDL das demais lipoproteínas, seguida de análise, conforme descrito anteriormente para a quantificação do colesterol. Esse método não será discutido aqui de forma extensiva. Um segundo método, bem mais empregado, utiliza a fórmula de Friedewald para calcular a concentração de LDL-C. E, por fim, já estão sendo disponibilizados métodos homogêneos desenvolvidos mais recentemente para quantificar esse tipo de colesterol.

Cálculo de Friedewald. O LDL-C pode ser determinado com o auxílio da fórmula de Friedewald, originalmente descrita por Friedewald, Levy e Fredrickson (Friedewald, 1972). Em geral, nas amostras de plasma obtidas em jejum, a LDL contém o colesterol que está ausente na HDL ou na VLDL. Assim, o LDL-C pode ser determinado aplicando-se a equação a seguir, na qual as concentrações são expressas em mmol/L e o termo [plasma TG]/2,175 é utilizado para representar o conteúdo de VLDL-C.

$$[\text{LDL-C}] = [\text{CT}] - [\text{HDL-C}] - [\text{plasma TG}]/2{,}175 \quad (17.1)$$

O termo [plasma TG]/2,175 é empregado quando as concentrações são expressas em mg/dL. Nesse método, as concentrações plasmáticas de CT, TG e HDL-C são determinadas como descrito. Uma vez que a maioria dos TGs plasmáticos é transportada pela VLDL, a concentração de VLDL-C é estimada a partir da proporção de TG/VLDL-C:

$$\text{VLDL-C} = [\text{plasma TG}]/2{,}175 \quad (17.2)$$

Foi demonstrado que o fator [plasma TG]/2,825 fornece uma estimativa mais acurada da concentração de VLDL-C (DeLong, 1986). Esta, por sua vez, equivale à [plasma TG]/6,5 em que as concentrações são expressas em mg/dL. Todavia, o fator que fornece a melhor estimativa do conteúdo de VLDL-C – e, portanto, a melhor estimativa de LDL-C – varia entre as populações e depende do método utilizado para quantificação dos TGs. Buscando o equilíbrio, o NCEP Working Group on Lipoprotein Measurement preferiu adotar a equação de Friedwald não modificada (NCEP Working Group on Lipoprotein Measurement, 1995).

A fórmula de Friedewald apresenta limitações significativas (Sniderman, 2003). Tais limitações decorrem, em grande parte, de duas considerações nas quais o método se baseia. Primeiro, o cálculo parte do princípio de que essencialmente todos os TGs plasmáticos são transportados pela VLDL. Segundo, o método considera que a proporção TGs/colesterol da VLDL é constante. Nenhuma dessas duas afirmações, contudo, é inteiramente verdadeira. Sendo assim, esse método é inadequado para a análise de amostras obtidas sem jejum e que, portanto, contêm QMs ou amostras que contêm β-VLDL. Como na comparação realizada com as VLDLs, a proporção de TGs/colesterol nos QMs é bem mais elevada. Dessa forma, havendo QMs na amostra, o uso do fator TG/2,175 para representar o conteúdo de lipoproteínas não HDL e colesterol não HDL pode resultar em superestimação do conteúdo de colesterol da VLDL, com consequente subestimação da concentração de LDL-C. Similarmente, a proporção de TGs/colesterol na β-VLDL é bem menor do que na VLDL, e o uso do fator TG/2,175 na presença de β-VLDL pode subestimar o conteúdo de VLDL-C e, assim, superestimar a concentração de LDL-C. Um paciente com hiperlipoproteinemia do tipo 3 pode ser classificado, de forma errônea, com elevada concentração de LDL-C. É importante distinguir ambas as condições, porque o tratamento para cada uma delas é diferente.

Mesmo nas amostras isentas de QMs, a proporção de VLDL-C/TGs muda à medida que os níveis de TGs aumentam, podendo conduzir a erros na estimativa do conteúdo de VLDL-C. Tendo em vista que a VLDL geralmente transporta apenas cerca de 25% do CT plasmático, os erros resultantes na estimativa do conteúdo de LDL-C costumam ser inferiores a 5 a 10 mg/dL (0,130–0,260 mmol/L). Todavia, esse cálculo é inadequado para amostras que apresentam elevada concentração de TGs. Os erros na estimativa de LDL-C se tornam aparentes a partir de níveis de TGs > 2,26 mmol/L (200 mg/dL), e adquirem proporções inaceitavelmente grandes diante de níveis de TGs > 4,52 mmol/L (400 mg/dL). A acurácia dos cálculos de LDL-C também é afetada por níveis de TGs reduzidos, indicando que os valores de LDL-C estimados podem não fornecer a melhor avaliação do risco cardíaco para pacientes que já estejam sendo submetidos à terapia redutora de colesterol (Sniderman, 2003). Contanto que suas limitações sejam consideradas, a equação de Friedewald possui ampla utilidade, seja como ferramenta de triagem, seja para monitoramento dos pacientes.

As lipoproteínas não HDL também merecem atenção. De maneira geral, a LDL contribui com a maior parte do colesterol quantificado, enquanto a IDL e a Lp(a) contribuem apenas com alguns mg de colesterol/dL cada. Entretanto, a contribuição dessas lipoproteínas para as quantificações de colesterol pode se tornar significativa em certos casos de pacientes hiperlipidêmicos. Uma vez que os níveis de Lp(a) não são reduzidos por diversos tratamentos efetivos na redução dos níveis de LDL, as quantificações de Lp(a) podem, em algumas situações, revelar o motivo pelo qual um paciente não responde de modo satisfatório à terapia de redução da LDL.

Quantificação direta de LDL-C. A capacidade de calcular o LDL-C eliminou consideravelmente a necessidade de quantificações diretas. Contudo, os métodos homogêneos diretos para LDL-C são úteis diante de concentrações de TGs elevadas, visto que não estão sujeitos à interferência desses lipídeos mesmo em altas concentrações (= 600 mg/dL) (Bachorik, 2000). Os ensaios diretos foram adaptados para uso em diversos analisadores, e o assunto foi extensivamente revisado (Nauck, 2002; Miller, 2002). Embora tais métodos apresentem diferenças significativas, geralmente utilizam uma combinação de dois "reagentes". O primeiro reagente usualmente é aquele que remove de maneira seletiva as lipoproteínas não HDL (e/ou estabiliza ou inibe a reação da LDL com enzimas), enquanto o segundo reagente libera o colesterol da LDL para ser quantificado enzimaticamente.

Em um desses métodos (Equal Diagnostics, Exton, PA; Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA), o primeiro reagente emprega uma mistura de polímeros com ação detergente para romper as lipoproteínas não LDL e liberar seu conteúdo de colesterol. Esse colesterol é, em seguida, desesterificado e submetido à ação da colesterol oxidase. Há produção de peróxido de hidrogênio, que reage com elementos do meio e forma um composto incolor. O segundo reagente contém um detergente que libera o conteúdo de colesterol da LDL. Após a desesterificação, o LDL-C passa por uma sequência semelhante de reações, exceto pela etapa final, na qual produz um composto colorido. A intensidade da cor do composto formado é proporcional à concentração de LDL-C. Outro método (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) baseia-se na solubilização micelar seletiva da LDL por um detergente não iônico, bem como na interação de um açúcar com HDL, VLDL e QMs para inibição da participação desses lipídeos no ensaio quantitativo (Sugiuchi, 1998). Um terceiro método explora o fato de a reatividade do colesterol em diferentes lipoproteínas ser afetada pelo equilíbrio hidrófilo:lipofílico (EHL) dos detergentes solubilizantes. Nesse método, o não LDL-C reage com a colesterol esterase e com a colesterol oxidase em condições que inibem a participação do LDL-C, resultando na eliminação do peróxido de hidrogênio por ação da catalase. Um segundo reagente, então, altera o EHL do detergente e cria as condições necessárias para que o LDL-C participe da reação. Esse reagente também contém azida, que inibe a catalase e permite a detecção colorimétrica do peróxido formado (ver reação 17.3) (Polymedco Inc., Cortlandt Manor, NY; Reference Diagnostics, Bedford, MA). Em um quarto método, o primeiro reagente contém surfactantes anfotéricos que protegem a LDL e permitem a eliminação de não LDL-C e do peróxido formado, como descrito anteriormente . O segundo reagente contém surfactantes não iônicos que deslocam os surfactantes protetores e permitem a quantificação do LDL-C (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO).

Embora apresentem uma boa precisão, esses métodos produzem certas discrepâncias em relação aos procedimentos referenciais de ultracentrifugação em diversas circunstâncias, inclusive diante da presença de lipoproteínas anormais. Quando os níveis de TG são < 400 mg/dL, o desempenho dos métodos homogêneos não supera o cálculo de Friedewald na classificação dos pacientes em grupos de tratamento (Miller, 2002). Entretanto, diferentemente do cálculo, os ensaios homogêneos podem fornecer resultados clinicamente úteis diante de concentrações de TGs > 400 mg/dL. Outra vantagem potencial reside na conveniência de quantificar LDL-C sem a necessidade de jejum, ainda que existam recomendações contrárias (Miller, 2002). As recomendações do ATP III desfavorecem a substituição da quantificação de LDL-C calculada pela quantificação de LDL-C direta, alegando que é necessário quantificar os componentes do cálculo seja qual for o caso. Portanto, realizar um ensaio direto para LDL-C apenas acrescentaria despesas.

Métodos adicionais para o estudo da dislipidemia

Quantificação das subclasses de lipoproteínas. Subpopulações ou subclasses foram identificadas para VLDL, LDL e HDL por meio de técnicas como ultracentrifugação analítica, eletroforese de gradiente em gel e espectroscopia por ressonância nuclear magnética (RNM) (Krauss, 1992, 1987; Otvos, 1992). Algumas distinções de subclasses possuem importância clínica, ainda que o número de subclasses identificado seja variável conforme os métodos de separação utilizados e a nomenclatura atribuída às subclasses não seja uniforme. Por exemplo, quando se emprega a tecnologia de RNM para identificar as subclasses de lipoproteínas, os números de subclasse de partícula tendem a aumentar com o crescimento do tamanho da partícula. Assim, as partículas de LDL da subclasse L2 são maiores que as partículas da subclasse L1. Por outro lado, quando se emprega eletroforese ou ultracentrifugação, ocorre exatamente o oposto: as partículas de menor tamanho são designadas por números maiores. Dessa forma, na eletroforese em gel de gradiente segmentado, as partículas da subclasse IV de LDL (ou LDL_4) são menores que as partículas da subclasse II (ou LDL_2), enquanto que na ultracentrifugação de gradiente as partículas da subclasse LDL_4 são menores que as partículas LDL_3.

Recentemente, tem despertado interesse o papel das subclasses no desenvolvimento da aterosclerose, especificamente das partículas menores e menos densas de LDL. Essa fração é considerada mais aterogênica do que as grandes partículas de LDL. As subclasses de partículas pequenas de HDL e de partículas grandes de VLDL também têm sido associadas ao aumento da incidência de aterosclerose. O *NMR Lipoprofile* (LipoScience, Raleigh, NC) permite a quantificação de partículas lipoproteicas de acordo com a subclasse, com base nas características espectrais de RNM exclusivas por elas apresentadas. Esse perfil fornece informações sobre o risco de DCC por meio da determinação da distribuição das subclasses de partículas lipoproteicas (Otvos, 2002). Ao menos parcialmente, o atrativo dessa técnica advém da ideia de que a migração das partículas de LDL pela parede arterial é dirigida pelo gradiente e dependente do número de partículas de LDL envolvidas. Se um grande número de partículas pequenas de LDL estiver presente, a quantificação do conteúdo de LDL-C tende a subestimar o número de partículas de LDL e, do mesmo modo, os efeitos ateroscleróticos da LDL. Níveis de TGs > 100 mg/dL e de HDL-C < 60 mg/dL estão associados a níveis elevados de partículas pequenas de LDL. Sendo assim, diante de tais condições, o perfil de RNM pode ser uma ferramenta útil para avaliar o risco de DCC. Métodos eletroforéticos sensíveis devem fornecer resultados semelhantes. Esses métodos atualmente não são considerados ferramentas de triagem. Seu uso é mais adequado ao refinamento da avaliação do risco e ao tratamento, no caso de pacientes com risco de DCC previamente identificado, que estejam sob tratamento e tenham alcançado (ou estejam perto de alcançar) os valores-alvo de LDL-C pretendidos pelo tratamento. Essa utilização está de acordo com as diretrizes mais aceitas, que enfatizam a importância do controle dos níveis de LDL-C como principal meta terapêutica na maioria dos tipos de dislipidemia.

Teste do plasma em repouso. Caso estejam presentes em concentração considerável, os QMs são detectados pelo teste do "plasma em repouso". Uma alíquota de plasma (2 mL) é transferida para um tubo de ensaio (10 ↔ 75 mm) e deixada em repouso a 4°C de um dia para o outro, sem interferências. Os QMs se acumulam formando uma camada "cremosa" flutuante e podem ser detectados visualmente. A presença de QMs em amostra de plasma obtida em jejum é considerada anormal. Uma amostra de plasma que permanece turva após o período de repouso *overnight* contém quantidade excessiva de VLDL e, se houver formação da camada "cremosa" flutuante, também contém QMs.

Detecção de β-VLDL e Lp(a). Como já mencionado, a lipoproteína β-VLDL anormal ("lipoproteína β-flutuante") possui a mesma densidade da VLDL, porém, migra eletroforeticamente com a LDL na região β. É possível detectá-la quando a fração de ultracentrifugação de densidade < 1,006 kg/L é examinada por eletroforese. Na prática, o plasma não fracionado e ambas as frações de ultracentrifugação (< e > 1,006 kg/L) são examinadas ao mesmo tempo. Dessa forma, cada amostra atua como seu próprio controle para estabelecer a migração relativa das bandas lipoproteicas. No plasma normal, as bandas lipoproteicas β (LDL e IDL), pré-β (VLDL) e α (HDL) são visíveis no plasma não fracionado, e apenas a banda pré-β está presente na fração de densidade < 1,006 kg/L. As bandas lipoproteicas β e α são encontradas somente na fração com densidade > 1,006 kg/L. Quando presente, a β-VLDL é observada como uma banda com mobilidade β na fração de densidade < 1,006 kg/L. Sua presença é considerada anormal e costuma estar associada à disbetalipoproteinemia (hiperlipoproteinemia de tipo 3), embora seja vista ocasionalmente em outros distúrbios. Os QMs, frequentemente observados em pacientes com doença de tipo 3, permanecem no ponto de origem do gel de agarose.

A densidade da Lp(a) é semelhante à densidade da LDL, porém, apresenta mobilidade eletroforética similar à da VLDL. Por isso, é possível detectá-la na análise eletroforética da proteína de densidade > 1,006 kg/L. Quando a Lp(a) está presente em concentrações maiores que 20 a 30 mg/dL (i. e., quando contribui com mais de 10 mg/dL para a quantificação de LDL-C), observa-se uma banda adicional com mobilidade pré-β na fração de densidade > 1,006 kg/L (daí a denominação "*sinking pré-β lipoprotein*"). Nessas condições, o médico talvez resolva solicitar uma medida qualitativa de Lp(a). Atualmente, a Lp(a) já pode ser quantificada por imunoturbidimetria. Quando a concentração de Lp(a) está muito alta, pode ser necessário corrigir o conteúdo de LDL-C quanto à contribuição do componente Lp(a)-C (Lp(a)-colesterol). A relação apresentada a seguir tem sido empregada

na estimativa da contribuição do Lp(a)-C para o valor calculado de LDL-C, em que os valores são expressos em mg/dL:

$$\text{Lp(a)-colesterol} = 0{,}3 \times [\text{Lp(a) mass}] \quad (17.3)$$

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - [\text{HDL-colesterol}] - [\text{plasma TG}]/5 - (0{,}3[\text{massa de Lp(a)}]) \quad (17.4)$$

Proporção VLDL-C/TGs plasmáticos. A proporção VLDL-C/TGs plasmáticos pode ser útil na avaliação da hiperlipoproteinemia de tipo 3. Essa proporção, expressa em mol/mol (ou massa/massa), geralmente situa-se na faixa de 0,230 a 0,575 (0,1–0,25) em amostras isentas de β-VLDL, dependendo das quantidades relativas de VLDL, LDL e HDL presentes, bem como dos erros inerentes às quantificações de VLDL-C e TGs plasmáticos. Indivíduos com doença do tipo 3 apresentam proporções > 0,689 (0,3), usualmente na faixa de 0,689 a 0,919 (0,3–0,4), embora proporções ainda mais altas possam ser observadas. De novo, por conta dos erros das quantificações, a observação de uma proporção igual a 0,689 (0,3) em uma única ocasião pode ou não ser significativa. Pacientes que notadamente apresentam a doença do tipo 3 exibem tanto β-VLDL quanto proporção VLDL-C/TGs plasmáticos > 0,689 (0,3). Ocasionalmente, uma clínica de tratamento de distúrbios lipídicos pode solicitar a avaliação do fenótipo da apoE para complementar o diagnóstico da hiperlipoproteinemia do tipo 3 (ver adiante), uma vez que a homozigose para apoE-2 está associada a esse distúrbio. Entretanto, nem todos os pacientes homozigotos apresentam hiperlipoproteinemia do tipo 3, e a ultracentrifugação ainda é requerida para detecção da β-VLDL.

Análise de apolipoproteínas. Estudos indicaram que a apoA-I e a apoB podem ser mais bem-sucedidas na discriminação da doença aterosclerótica, em comparação às determinações de lipídeos ou lipoproteínas. Como a apoA-I é encontrada primariamente na HDL, enquanto a apoB (em amostras obtidas em jejum) está presente na VLDL, IDL e LDL, é lógico considerar favorável a detecção de níveis baixos de apoB e altos de apoA-I, bem como uma baixa proporção apoB/apoA-I. Em geral, as evidências que sustentam esse raciocínio parecem ser mais consistentes com relação à apoB do que à apoA-I, embora ainda não esteja claro por quê. Uma triagem interventiva de larga escala, placebo-controlada – a AFCAPS (Gotto, 2000) – descobriu que a apoB, seguida pela apoA-I, era a melhor quantificação isolada de lipídeo, lipoproteína ou apolipoproteína na previsão do risco de doença arterial coronariana (DAC), tanto basal quanto durante o tratamento. A proporção apoB/apoA-I também pode ser útil na determinação desse risco.

As apolipoproteínas usualmente são quantificadas por imunoensaio ou imunonefelometria. Essas técnicas baseiam-se na determinação da turbidez decorrente da presença de complexos apolipoproteína-anticorpo (Lopes-Virella, 1980). Uma potencial limitação desse método reside na inerente turbidez das amostras lipêmicas, ou mesmo de amostras não lipêmicas submetidas a repetidos ciclos de congelamento-descongelamento. Os sistemas automatizados corrigem essa turbidez até certo ponto.

Diretrizes do NCEP

O terceiro relatório do Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III) do NCEP III foi publicado em 2002 (NCEP, 2002). Seu conteúdo apresenta as diretrizes atualizadas do NCEP, que se baseiam em evidências e destinam-se a orientar o teste e o monitoramento dos níveis de colesterol, além de fornecer informações detalhadas sobre outros tópicos, como a classificação das partículas de lipídeos e lipoproteínas, avaliação do risco de DCC, intervenção no estilo de vida do paciente, tratamento com fármacos, dislipidemias específicas e questões relativas à aderência ao tratamento. Mais recentemente, as recomendações do NCEP passaram por nova atualização em decorrência dos dados produzidos pelas últimas triagens clínicas (Grundy, 2004).

Confiabilidade das quantificações

Anteriormente focadas no reconhecimento de valores de colesterol normais e anormais, as diretrizes estabelecidas pelo NCEP atualmente enfatizam a avaliação do risco cardiovascular geral com base nos *cutoffs* para colesterol, TGs, HDL-C e LDL-C. A adoção de um único conjunto de *cutoffs* impõe aos laboratórios uma quantificação acurada e precisa do conteúdo de lipídeos e lipoproteínas. A Tabela 17.8 mostra as diretrizes do Laboratory Standardization Panel of NCEP (NCEP, 1995). Percebe-se que cada teste possui um único valor máximo aceitável de erro total, no qual está incluído o grau de distorção do ensaio (i. e., a medida da acurácia) e o CV (i. e., a quantificação do grau de imprecisão). O erro total é calculado do seguinte modo:

$$\%\text{ de erro total} = \%\text{ distorção} + 1{,}96\ (\%\text{ CV}) \quad (17.5)$$

Para cada teste, a Tabela 17.8 dá um exemplo de distorção e CV que, quando tomados em conjunto, devem resultar em um erro total aceitável. É importante notar que, ao utilizar o erro total, um laboratório pode exceder discretamente o limite de distorção, caso o CV seja suficientemente pequeno para manter o erro total conforme as diretrizes (o oposto também é válido). Por exemplo, o colesterol apresenta 3% de distorção e um CV-alvo de 3%. Um laboratório que apresente distorção-alvo igual a 3,5% e CV de 2% excede as metas referentes à distorção, embora esteja de acordo com as diretrizes para o CV. Todavia, o erro total de 7,5% (i. e., 3,5% + 1,96 ↔ 2%) é aceitável, visto ser inferior à meta de 9%.

Teste e tratamento

O ATP III introduziu vários conceitos novos para a avaliação da hiperlipidemia. Atualmente, o diabetes melito é considerado um risco equivalente, pois está associado ao risco elevado de novos episódios de DCC em um período de 10 anos. Isso quer dizer que, para a avaliação de níveis altos de colesterol, os pacientes diabéticos são tratados como pacientes que já apresentam DCC. Do mesmo modo, com base nas projeções de risco de Framingham, o ATP III reconheceu que os pacientes com "síndrome metabólica" (descrita adiante) e com risco elevado de desenvolver DCC em 10 anos são candidatos à terapia e intervenção intensiva.

Metas para o colesterol. O ATP III recomenda a elaboração de um perfil completo de lipoproteínas (CT, LDL-C, HDL-C e TGs) como teste inicial para avaliação dos níveis sanguíneos de colesterol. O teste deve ser realizado em todos os adultos com idade ≥ 20 anos e deve ser repetido ao menos a cada 5 anos. Caso o teste seja realizado sem que o indivíduo esteja em jejum, então somente podem ser utilizados os valores de CT e HDL-C. Em tais circunstâncias, será necessário estabelecer um perfil de acompanhamento se CT = 200 mg/dL ou HDL < 40 mg/dL. O ATP III fornece as diretrizes que determinam os valores aceitáveis dos testes, utilizando o LDL-C como alvo principal da terapia de redução dos níveis de colesterol (Tab. 17.9). Observe que os fatores de risco mais importantes (Tab. 17.10) podem modificar as metas definidas para os níveis de LDL-C (Tab. 17.11). A mudança terapêutica do estilo de vida (MTEV) do paciente e a terapia farmacológica são duas abordagens utilizadas para alcançar as metas estabelecidas para o LDL-C. A MTEV envolve modificação da dieta e aumento da atividade física, combinados a um acompanhamento regular. Independentemente da categoria de risco à qual pertence o paciente, ou mesmo da meta estabelecida para LDL, a MTEV representa a primeira linha de terapia, embora possa ser inicialmente combinada à terapia com fármacos no tratamento de pacientes de alto risco. É preciso notar que os pacientes que pertencem à categoria de risco moderado são subclassificados

Tabela 17.8 Diretrizes do NCEP para erros de quantificação aceitáveis

Analito	Erro total (%)	Distorção (%)	CV* (%)
Colesterol	≤ 9%	≤ 3%	≤ 3%
TGs	≤ 15%	≤ 5%	≤ 5%
HDL-C	≤ 13%	≤ 5%	≤ 4%†
LDL-C	≤ 12%	≤ 4%	≤ 4%

* Coeficiente de variação definido como (desvio padrão/média) × 100.

† Critério de precisão aplicado a níveis de HDL-C ≥ 42 mg/dL (1,09 mmol/L). A concentrações inferiores, o CV não é empregado; em vez disso, considera-se que o desvio padrão não deve exceder 1,7 mg/dL (0,044 mmol/L).

(para fins de terapia farmacológica) com base no Escore de Risco de Framingham, que estima o risco de haver eventos cardíacos em um período de 10 anos, considerando os fatores listados na Tabela 17.10, além do CT e do HDL-C (Wilson, 1998). A terapia farmacológica para hiperlipidemia usualmente consiste na administração de quatro tipos de medicamentos: estatinas, derivados do ácido fíbrico, resinas de ácidos biliares e ácido nicotínico. A Tabela 17.12 resume brevemente algumas características relevantes desses fármacos.

Síndrome metabólica. Essa síndrome fisiológica é caracterizada por uma constelação de fatores de risco conhecidos e emergentes para DCC. Várias organizações, incluindo a OMS e o NCEP, propuseram diferentes definições para essa síndrome. No entanto, os fatores de risco geralmente são obesidade abdominal, dislipidemia aterogênica (concentração elevada de TGs e partículas pequenas de LDL, e níveis reduzidos de HDL-C), pressão sanguínea elevada, resistência à insulina (com ou sem intolerância à glicose) e estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios. Inicialmente descrita como "síndrome X" no fim da década de 1980, essa condição pode estar presente em 20 a 25% dos adultos americanos. Nos pacientes com síndrome metabólica, o LDL-C constitui o principal alvo da terapia. Entretanto, esses pacientes comumente são candidatos a terapias mais intensivas de redução do colesterol do que sugerem as estimativas de LDL-C isoladamente. Outros objetivos terapêuticos são o tratamento das causas subjacentes (i. e., obesidade e inatividade física) e dos fatores de risco lipídicos e não lipídicos associados (Garber, 2004).

Hipertrigliceridemia. Sustentado pelos dados recentemente obtidos a partir de metanálises, o ATP III identifica a elevação dos níveis de TGs como fator de risco independente para DCC. Os fatores associados a níveis elevados de TGs são obesidade, falta de atividade física, tabagismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, dietas ricas em carboidratos (> 60% da ingestão energética), várias doenças (p. ex., diabetes do tipo 2, insuficiência renal crônica, síndrome nefrítica), certos fármacos (p. ex., corticosteroides, estrógenos, retinoides, doses mais altas de agentes bloqueadores β-adrenérgicos) e distúrbios genéticos (hiperlipidemia combinada familiar, hipertrigliceridemia familiar e disbetalipoproteinemia familiar). Em indivíduos com elevação dos níveis de TGs, o alvo primário da terapia é alcançar as metas estabelecidas para LDL-C. No estado de jejum, a maior parte dos TGs circulantes encontra-se nas lipoproteínas residuais de VLDL, de modo que o não HDL-C ([CT] – [HDL-C]) pode ser utilizado como alvo terapêutico secundário. O não HDL-C inclui todas as lipoproteínas que contêm apoB, porém, no estado de jejum, proporciona a avaliação combinada de LDL-C e VLDL-C. Os planos de tratamento para hipertrigliceridemia enfatizam a redução de peso e o aumento da atividade física com elevações limítrofes, mas incluem medicações redutoras de LDL e fármacos que diminuem os níveis de TGs (ácidos nicotínico e fíbrico) diante de níveis ainda mais altos. Nos raros casos de pacientes que apresentam níveis de TGs muito elevados (> 500 mg/dL), o alvo terapêutico inicial é a prevenção de pancreatite aguda.

Tabela 17.9 Classificação ATP III para valores de LDL, CT, HDL-C e TGs*

LDL-C	
< 100	Ótimo
100–129	Quase ótimo/acima do ótimo
130–159	Alto limítrofe
160–189	Alto
≥ 190	Muito alto
CT	
< 200	Desejável
200–239	Alto limítrofe
≥ 240	Alto
HDL-C	
< 40	Baixo
≥ 60	Alto
TGs	
< 150	Normal
150–199	Alto limítrofe
200–499	Alto
≥ 500	Muito alto

* NCEP, 2002.

Tabela 17.10 Principais fatores de risco modificadores das metas de LDL*

Tabagismo
Hipertensão (PS ≥ 140/190 ou uso de medicação anti-hipertensiva)
Baixos níveis de HDL-C (< 40 mg/dL)
História familiar de DCC prematura (DCC em parente de primeiro grau, do sexo masculino, com idade < 55 anos; DCC em parente de primeiro grau, do sexo feminino, com idade < 65 anos)
Idade (homens ≥ 45 anos; mulheres ≥ 55 anos)
Diabetes melito
DCC pré-existente

* NCEP, 2002.

Fatores de risco emergentes. O ATP III reconhece como fatores de risco positivos adicionais para a DCC: elevações da concentração de Lp(a), lipoproteínas residuais, partículas pequenas de LDL, fibrinogênio, homocisteína, proteína C reativa altamente sensível (hs-CRP, *high-sensitivity C-reactive protein*), comprometimento dos níveis plasmáticos de glicose em estado de jejum (110–125 mg/dL) e aterosclerose subclínica pré-existente (evidenciada por isquemia miocárdica durante o teste de exercícios, espessamento íntimo-medial da carótida e/ou deposição de cálcio na artéria coronária). As conexões existentes entre alguns desses fatores e a DCC são evidentes e serão posteriormente discutidas; entretanto, os demais fatores requerem maior consideração. Por exemplo, a elevação dos níveis de homocisteína tem sido associada tanto à medicação quanto às condições relativas à genética, à doença e ao estilo de vida do paciente, podendo contribuir ao menos parcialmente para a DCC por meio dos efeitos tóxicos que exerce sobre o endotélio. As conexões existentes entre hs-CRP (um marcador de inflamação crônica), fibrinogênio (um marcador de estados pró-trombóticos) e DCC, a essa altura, continuam sendo principalmente estatísticas. Os mecanismos envolvidos ainda precisam ser claramente definidos. A elevação dos níveis de apoB (presente nos QMs, VLDL, IDL e LDL), a diminuição da concentração de apoA-I (presente principalmente na HDL) e os aumentos na proporção apoB/apoA-I também foram associados ao risco aumentado de DCC (Walldius, 2004). Tais fatores, conquanto não sejam amplamente considerados para fins de triagem, podem ser úteis na definição do *status* de risco e no refinamento do tratamento para pacientes que apresentam grande chance de desenvolver a doença.

Crianças. As evidências disponíveis indicam que as lesões ateroscleróticas podem ser originadas durante a infância e que as crianças que apresentam níveis altos de colesterol são mais propensas a se tornarem

Tabela 17.11 Metas de LDL-C baseadas no risco*

Categoria do risco	Meta de LDL (mg/dL)	Início da MTEV	Considerar terapia farmacológica
DCC e risco de DCC equivalentes	< 100 *Opcional:* < 70	≥ 100	≥ 100 70–100
Fatores† de risco produtores de risco moderadamente alto (2+) e risco de Framingham de 10 anos igual a 10–20%	< 130 *Opcional:*	≥ 130 < 100	≥ 130 100–129
Fatores† de risco produtores de risco moderado (2+) e risco de Framingham de 10 anos < 10%	< 130	≥ 130	≥ 160
0–1 fator de risco†	< 160	≥ 160	≥ 190

* NCEP, 2002; Grundy, 2004.

† Os fatores modificadores de risco estão listados na Tabela 17.10.

Tabela 17.12 Fármacos utilizados na hiperlipidemia

Classe farmacológica	Efeitos primários	Efeitos secundários	Mecanismo	Efeitos colaterais	Exemplos
Estatinas	Diminuição dos níveis de LDL-C (20–60%)	Pequenas reduções da concentração elevada de TGs Aumento moderado do conteúdo de HDL-C	Inibição da HmG-CoA redutase	Raramente, causa distúrbios GI, problemas hepáticos, rabdomiolise	Lovastatina Simvastatina Pravastatina Fluvastatina Atorvastatina
Derivados do ácido fíbrico	Diminuição dos níveis de TGs (20–50%)	Pequenas elevações do conteúdo de HDL (10–15%)	Indefinida. Pode diminuir o catabolismo da HDL, aumentar a atividade de LPL e inibir a síntese hepática de VLDL	Distúrbios GI, aumento da probabilidade de formação de cálculos biliares; pode intensificar os efeitos da warfarina, bem como a tendência das estatinas de causar rabdomiolise	Gemfibrozil Fenofibrato
Resinas de ácidos biliares	Diminuição dos níveis de LDL-C (10–20%)		Ligação aos ácidos biliares no intestino, levando à excreção	Distúrbios GI brandos	Colestiramina Colestipol Colesevelam
Niacina (ácido nicotínico)	Diminuição dos níveis de TGs (20–50%)	Aumenta os níveis de HDL-C (15–35%) Reduz o conteúdo de LDL-C (redução de 10–20%)	Pode inibir a mobilização de ácidos graxos nos adipócitos via receptor acoplado à proteína G, HM74A, levando à diminuição da produção de VLDL pelo fígado	Distúrbios GI, eritema, calafrios, prurido, problemas hepáticos, gota, elevação da concentração de açúcar no sangue	Niacina

adultos com elevada concentração sanguínea de colesterol. Em uma tentativa de intervir precocemente no curso dessa doença, na criança com predisposição aterosclerótica, diretrizes para avaliação do risco de DCC em crianças e adolescentes foram promulgadas por organizações como o NCEP (NCEP Expert Panel on Children and Adolescents) (NCEP, 1992) e a American Heart Association (Kavey, 2003). As recomendações vigentes apoiam a triagem seletiva de crianças (a partir dos 2 anos de idade) e adolescentes com histórico familiar de doença cardiovascular precoce, ou nos casos em que ao menos um dos pais apresente níveis elevados de colesterol no sangue. A Tabela 17.13 classifica essas crianças de acordo com a concentração total de LDL-C. Essas recomendações não apoiam a triagem laboratorial universal para crianças e adolescentes.

A intervenção focada na redução do risco é recomendada para os casos em que a média dos resultados de três perfis lipídicos obtidos em jejum encontra-se acima dos *cutoffs* estabelecidos para CT e LDL, anteriormente descritos, ou diante de níveis elevados de TGs (> 150 mg/dL) ou, ainda, diante da redução dos níveis de HDL-C (< 35 mg/dL). Nos adultos, a intervenção é direcionada à busca das causas médicas das anomalias lipídicas, MTEV e intervenção farmacológica, quando necessário.

Tabela 17.13 Classificação de CT e LDL-C em crianças: triagem direcionada em jejum para crianças com mais de 2 anos de idade e história familiar de dislipidemia ou DCC prematura

Categoria	CT (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
Aceitável	< 170	< 110
Limítrofe	171–199	111–129
Alto	≥ 200	≥ 130

Segundo Karvey, 2003.

Lipídeos, lipoproteínas e doença

Os níveis de lipoproteínas e lipídeos são utilizados para prever a DCC e constituem a base das diretrizes do NCEP anteriormente discutidas. Todavia, durante muitos anos, a classificação de Fredrickson (aludida na Tabela 17.3 e na seção "Visão geral" deste capítulo) foi empregada para caracterizar os distúrbios lipídicos (Hansen,1998). A classificação de Fredrickson utilizava eletroforese e teste de plasma em repouso para QMs a fim de correlacionar síndromes de doenças clínicas com fenótipos laboratoriais (Fredrickson, 1967). Observe que cada fenótipo não representava uma doença específica, mas um grupo de distúrbios que afetavam as mesmas lipoproteínas e, portanto, expressavam o mesmo padrão de lipídeos. Sendo assim, o tratamento usualmente era o mesmo para todos os distúrbios que compartilhavam o mesmo fenótipo. Uma das limitações desse sistema reside em não considerar níveis baixos de LDL como fator de risco para DCC. Recentemente, a classificação de Fredrickson mostrou-se menos importante, diante das modernas técnicas analíticas e da evolução do conhecimento acerca da genética desses distúrbios. Apesar disso, continua sendo adotada na nomenclatura de algumas síndromes patognomônicas (p. ex., hiperlipidemias dos tipos 1 e 3). A Tabela 17.14 apresenta alguns detalhes pertinentes à classificação de Fredrickson.

À medida que o conhecimento acerca do metabolismo e da genética dos lipídeos e lipoproteínas evoluiu, sistemas ainda mais complexos para descrição dos distúrbios lipídicos clínicos foram criados. Atualmente, falta um esquema ideal para classificação de tais distúrbios. Eles podem surgir tanto em decorrência do estilo de vida do paciente, quanto ter causas secundárias, ou ainda resultarem de mutações nos genes que codificam apolipoproteínas, receptores de apolipoproteínas ou enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. Alguns genes (p. ex., *apoA-I*, *apoC-III* e *apoA-IV*) localizam-se em regiões cromossômicas muito próximas e compartilham elementos de resposta similares, de modo que uma única mutação é capaz de alterar múltiplos aspectos do metabolismo das lipoproteínas. Os distúrbios do metabolismo lipoproteico abordados a seguir são classificados com base nos achados laboratoriais. Os fatores relativos ao estilo de vida que afetam os perfis lipídicos e as causas secundárias de hiperlipidemia são listados na Tabela 17.15, junto aos dados laboratoriais com os quais se associam mais comumente. Assim como nas dislipidemias genéticas, tais fatores podem produzir sobreposição e perfis de lipoproteínas variáveis. Nas Figuras 17.4 e 17.5, alguns dos distúrbios descritos adiante foram incorporados a esquemas de transporte anterior e reverso do colesterol, de modo que facilite a pronta compreensão de sua etiologia e patogênese.

Níveis elevados de colesterol e LDL-C

Estes distúrbios compartilham um aspecto: a hiperbetalipoproteinemia (Fredrickson do tipo 2A). Esta é caracterizada pela elevação dos níveis de LDL-C e manutenção da concentração normal de TGs. Associa-se a um

Tabela 17.14 Detalhes pertinentes sobre a classificação de Fredrickson

Tipo	Teste do refrigerador	Eletroforese em gel	Apresentação clínica
1	Positivo; plasma transparente	Normal	Xantoma eruptivo; pancreatite aguda e recorrente na primeira infância; melhora do perfil lipídico com dieta de baixo teor de gordura
2a	Negativo; plasma transparente	Banda β aumentada	Xantelasma, xantoma tendinoso; DCC prematura; herança autossômica dominante familiar; comumente conhecida como hipercolesterolemia familiar
2b	Negativo; plasma turvo	Bandas β e pré-β aumentadas	Pode haver xantelasma isolado; DCC prematura; padrão autossômico dominante; os membros afetados da família devem apresentar padrões variados (p. ex., hipertrigliceridemia isolada, hipercolesterolemia isolada ou hiperlipidemia combinada) para atender aos critérios diagnósticos da hiperlipidemia combinada familiar
3	Plasma ocasionalmente turvo	Banda pré-β aumentada (denominada "banda-β ampla")	Xantomas eruptivo e palmar; DCC prematura; padrão autossômico recessivo; uma causa secundária de dislipidemia, como hipotireoidismo, pode desmascarar o tipo 3, e o tratamento da condição secundária é capaz de trazer os níveis lipídicos de volta ao normal
4	Negativo; plasma turvo	Banda α-2 aumentada	Pode estar ou não associada à DCC prematura
5	Positivo; plasma turvo	Banda α-2 aumentada	Xantoma eruptivo; pode estar associada à pancreatite; pode estar associada à DCC

Tabela 17.15 Fatores relacionados ao estilo de vida e causas secundárias de dislipidemia

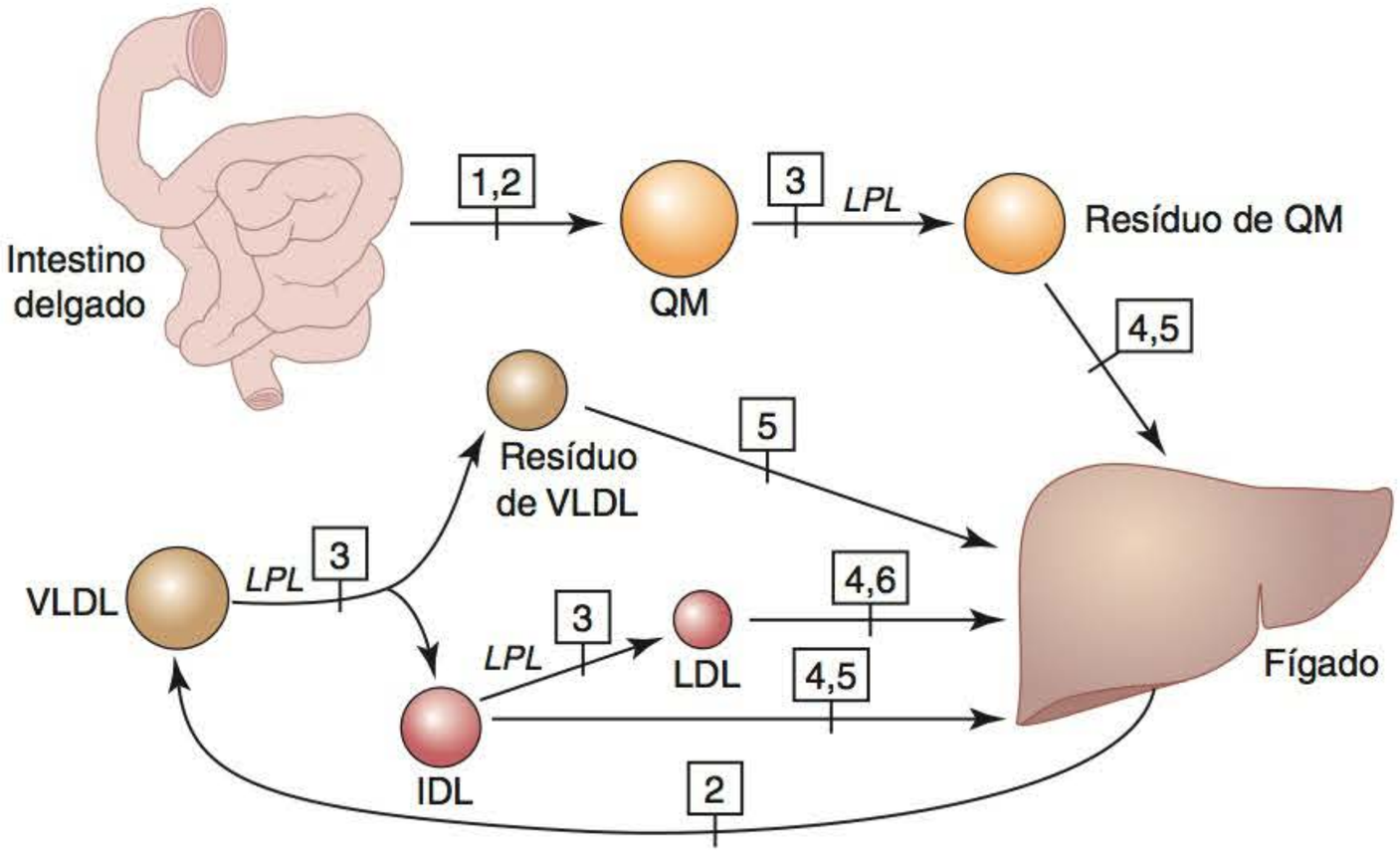
Padrão de lipoproteínas	Causas secundárias	Fatores relativos ao estilo de vida
Colesterol alto e LDL-C alto na presença ou ausência de HDL-C baixo	Hipotireoidismo e síndrome nefrótica Medicamentos, como diuréticos tiazida e esteroides Doença hepática obstrutiva crônica	Obesidade Dieta com excesso de colesterol e/ou gordura saturada A apoE-4 pode aumentar a suscetibilidade
TGs elevados com CT e LDL-C normais, na ausência ou presença de HDL-C baixo	Medicamentos, como diuréticos tiazida, estrógenos, corticosteroides, retinoides, ciclosporina e β-bloqueadores (sem simpatomiméticos intrínsecos) Resistência à insulina/diabetes Insuficiência renal crônica e síndrome nefrótica	Obesidade Inatividade física Tabagismo Consumo excessivo de álcool Dietas ricas em carboidratos
Colesterol e TGs elevados com ou sem HDL-C baixo	Medicamentos, notavelmente doses elevadas de esteroides ou ciclosporina Hipotireoidismo severo, resistência à insulina/diabetes e síndrome nefrótica	Obesidade
HDL-C baixo isolado	Medicamentos, como isotretinoína, probucol e esteroides anabólicos, β-bloqueadores e certos progestógenos	Inatividade física Peso corporal aumentado Dietas ricas em carboidratos e com baixo teor de gordura
HDL-C alto isolado	Medicamentos, como fenitoína, fenobarbital, rifampicina, griseofulvina e estrógenos	Consumo de álcool

elevado risco cardíaco que, afinal, não surpreende, dada a elevação dos níveis de LDL – uma partícula altamente aterogênica. Trata-se de uma apresentação laboratorial observada com frequência.

Hipercolesterolemia poligênica (não familiar). Este é o termo geral utilizado para descrever os indivíduos cuja hipercolesterolemia provavelmente tem causa multifatorial (Soutar, 1998). Embora acredite-se que alguns dos fatores causadores sejam genéticos, é preciso excluir a possibilidade de que uma hipercolesterolemia secundária e familiar (autossômica dominante) sejam as causas subjacentes, antes de afirmar que a hipercolesterolemia apresentada pelo paciente é "poligênica". Cerca de 85% dos casos de hipercolesterolemia detectados na população podem pertencer a essa categoria. Alguns médicos preferem empregar esse termo para descrever os pacientes que apresentam aumentos dos níveis de colesterol associados à idade, sem resposta à mudança no estilo de vida.

Hipercolesterolemia familiar (HF). Trata-se de um distúrbio autossômico dominante causado por uma entre as várias mutações que afetam o gene do receptor da LDL, localizado no cromossomo 19. Os receptores defeituosos resultantes são incapazes de se ligar ou remover a LDL da circulação (Hobbs, 1992). Várias centenas de mutações foram identificadas no gene que codifica o *receptor da LDL*, as quais afetam a maioria dos aspectos relacionados à síntese do receptor, transporte e função (Fig. 17.6). Essa heterogeneidade genética conduz a uma grande variedade de apresentações e repostas à terapia. A HF heterozigota ocorre em 1 a cada 500 indivíduos e está associada a doença aterosclerótica prematura. Homens heterozigotos afetados, usualmente manifestam a doença na quarta década de vida, enquanto nas mulheres isso ocorre 10 a 15 anos mais tarde. Os níveis de LDL-C, quando não tratados, tipicamente atingem valores > 220 mg/dL. A HF homozigota manifesta-se durante a infância, com níveis de LDL > 400 mg/dL. A deposição vascular de lipídeos resulta em DCC precoce e sintomática. Além disso, a formação de grandes depósitos valvulares e supravalvulares de colesterol pode causar estenose aórtica sintomática. Outros estigmas produzidos pela doença são arco senil, xantomas tendinosos e xantelasma. Na forma homozigota, essas marcas geralmente se desenvolvem precocemente, ainda na primeira infância. Na forma heterozigota, os estigmas aparecem na idade adulta. As estatinas, que inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HmG-CoA) redutase, podem ser efetivas no tratamento. Contudo, por serem fármacos que atuam indiretamente induzindo o aumento da atividade do receptor da LDL, mesmo doses máximas nem sempre são capazes de normalizar os níveis de LDL-C em todos os pacientes heterozigotos. Em pacientes homozigotos, dois genes codificados do receptor da LDL são afetados e tornam as estatinas ineficazes, a menos que sejam combinadas à aférese (Ose, 1999).

Defeito da apoB familiar. Este é um distúrbio autossômico dominante que envolve o gene *apoB*, localizado no cromossomo 2. Há comprometimento do reconhecimento da apoB-100 pelo receptor da LDL (Hansen, 1998). A frequência estimada na população é de 1 a cada 750 indivíduos. Pacientes com defeito da apoB familiar apresentam estigmas físicos



1 - Retenção de quilomícron (defeito na apoB-48)
2 - Hipobetalipoproteinemia/abetalipoproteinemia
3 - Deficiência de LDL/deficiência de apoC-II
4 - Hipercolesterolemia familiar
5 - Disbetalipoproteinemia (hiperlipoproteinemia do tipo 3, associada à apoE-2)
6 - Defeito da apoB familiar

Figura 17.4 Distúrbios associados ao transporte de lipídeos. LPL = lipoproteína lipase.

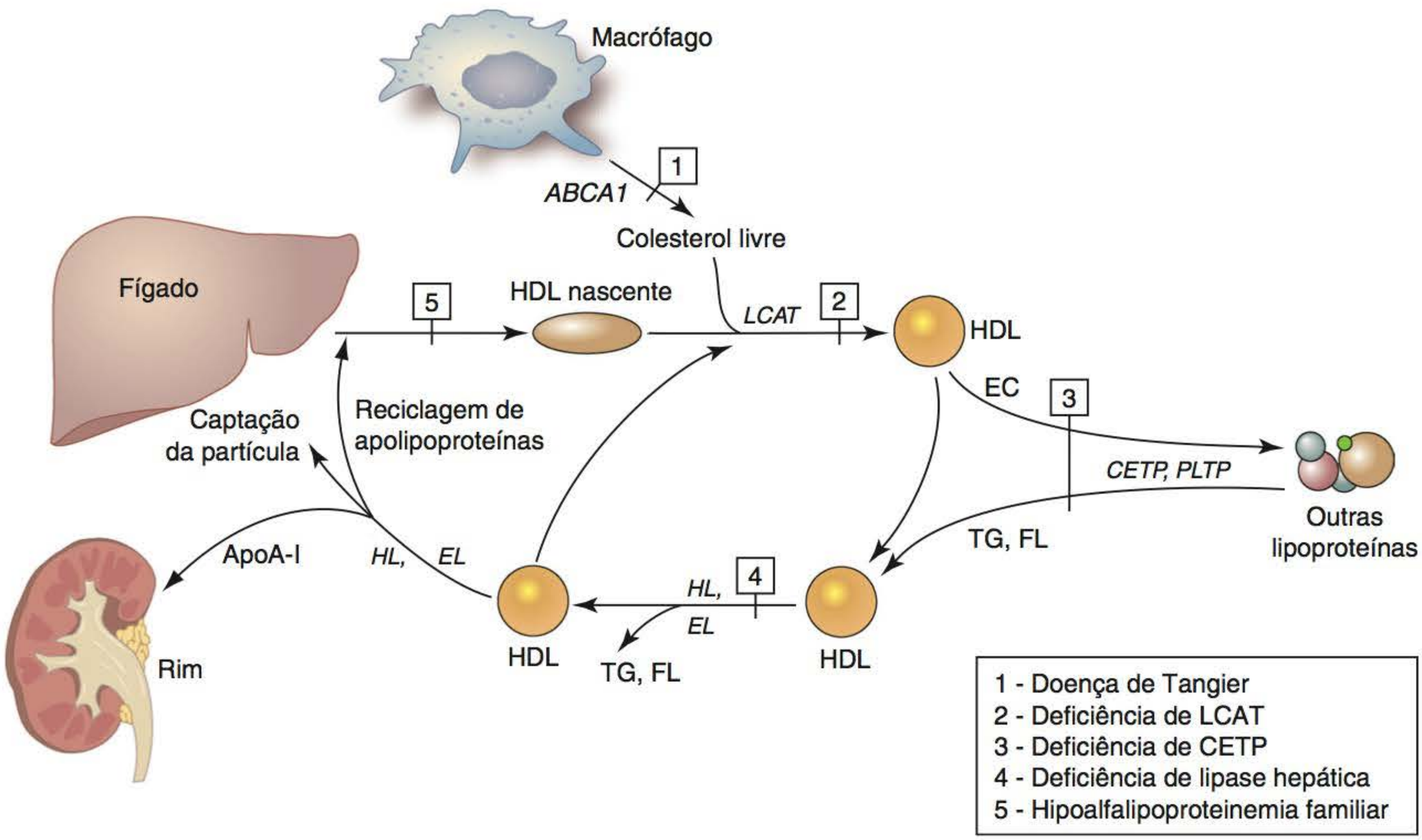
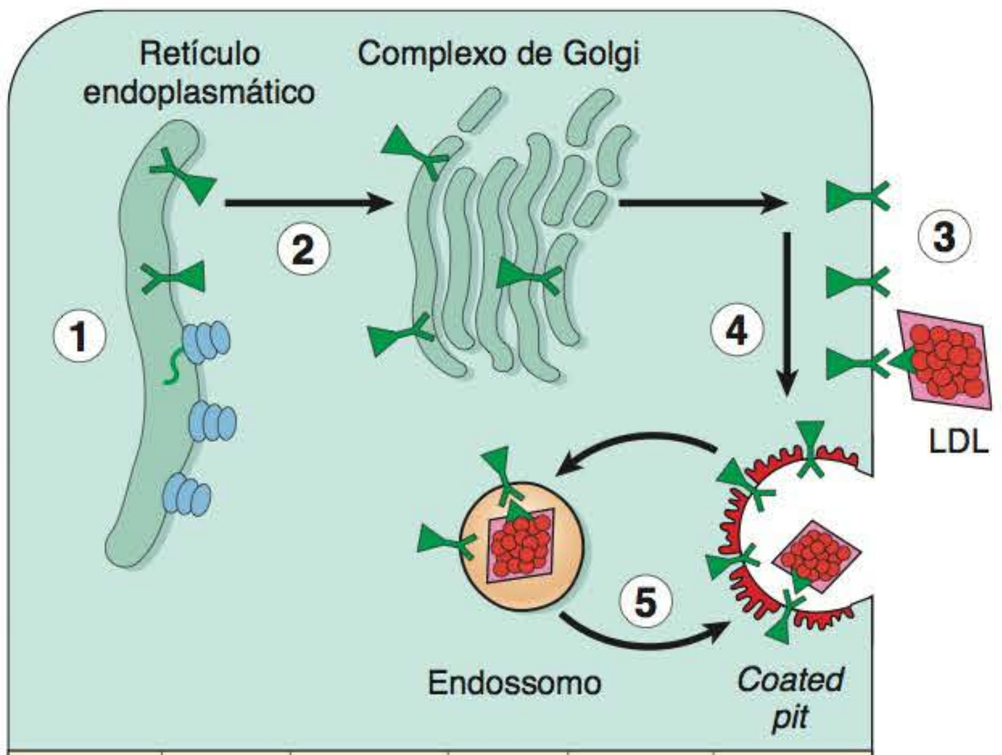


Figura 17.5 Distúrbios associados ao transporte reverso de lipídeos. ABCA1 = proteína cassete ligadora de ATP A1; EC = éster de colesterol; CETP = proteína de transferência de éster de colesterol; EL = lipase endotelial; HL = lipase hepática; LCAT = lecitina-colesterol aciltransferase; FL = fosfolipídeos; PLTP = proteína de transferência de fosfolipídeos; TG = triglicerídeos.



Classe de mutação	Síntese	Transporte	Ligação	Agrupamento	Reciclagem
I	X				
II	→	X			
III	→	→	X		
IV	→	→	→	X	
V	→	→	→	→	X

Figura 17.6 Classificação das mutações que afetam o receptor da LDL com base na função anormal da proteína mutante. Essas mutações interrompem a síntese do receptor no retículo endoplasmático, o transporte no Complexo de Golgi, a ligação das apoproteínas ligantes, o agrupamento nas depressões revestidas (*coated pits*) e a reciclagem nos endossomos. Cada classe apresenta heterogeneidade no nível do DNA. (Modificado com permissão de Hobbs, HH et al.: The LDL receptor *locus* in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. Annu Rev Genet 1990; 24:133-170. Copyright 1990, Annual Reviews.)

semelhantes aos observados na HF: xantomas tendinosos, xantelasma e DCC precoce. Caso não sejam tratados, os elevados níveis de LDL-C podem ultrapassar os valores detectados na HF, embora tendam a ser discretamente mais baixos. Os fármacos à base de estatinas são eficazes.

Sitosterolemia. É um distúrbio autossômico recessivo extremamente raro, em que os fitosteróis (esteróis vegetais) são absorvidos e se acumulam no plasma e nos tecidos periféricos. Aparentemente, essa doença é causada por mutações que envolvem os genes *ABCG8* e *ABCG5*, ambos localizados no cromossomo 2p21. Essas mutações interrompem o mecanismo pelo qual os esteroides vegetais (fitosteróis) passivamente absorvidos são bombeados de volta para o intestino e secretados pelo fígado na bile. Crianças afetadas apresentam xantomas tendinosos e níveis de LDL que vão de normais a elevados. Há DCC precoce. Os níveis de colesterol podem permanecer normais ou aumentar. Muitos dos ensaios comumente empregados são incapazes de diferenciar o colesterol dos esteróis vegetais, e a quantificação da concentração plasmática de fitoesterois é necessária para confirmação do diagnóstico. O tratamento consiste na restrição à ingestão de alimentos que contêm fitoesteróis (Patel, 1998).

Níveis elevados de TGs e concentração de colesterol normal

Estes distúrbios relacionam-se a elevações da concentração de partículas ricas em TGs – QMs ou VLDLs (Fredrickson dos tipos 1 e 4). Essa apresentação laboratorial comumente observada costuma ser devida à hiperpré-betalipoproteinemia (VLDL) e pode ter causas secundárias, como consumo de álcool em excesso ou dieta rica em carboidratos. Os níveis de LDL e LDL-C em geral se mantêm normais.

Dislipidemia diabética. Este distúrbio é um tipo de dislipidemia aterogênica (níveis elevados de TGs e baixas concentrações de HDL e partículas pequenas e densas de LDL) que acomete indivíduos com diabetes do tipo 2. Até o momento, as evidências sustentam que os níveis de LDL-C devem ser o alvo principal do tratamento dos indivíduos afetados. Embora os níveis de colesterol se mantenham dentro da faixa de "normalidade", o tratamento com frequência é direcionado à concentração de LDL-C, porque o diabetes é considerado um risco equivalente de DCC e, assim, está associado a metas de valores de colesterol que estão abaixo da concentração "normal" (Tab. 17.11).

Hipertrigliceridemia familiar. Ocorre concomitantemente a outras anormalidades que envolvem as lipoproteínas, como parte de inúmeras síndromes de hiperlipidemia familiar. A hipertrigliceridemia isolada (hiperlipidemia do tipo 4) é um distúrbio autossômico dominante relativamente comum, cuja incidência varia de 1:300 a 1:50 na população dos EUA, dependendo dos critérios adotados para o diagnóstico. A doença costuma se manifestar na idade adulta, com níveis de TGs na faixa de 200 a 500 mg/dL. A patofisiologia ainda precisa ser esclarecida, porém, sabe-se que a produção de TGs de VLDL aumenta enquanto a de apoB permanece normal, resultando na formação de partículas "macias" de VLDL ricas em TGs. Alguns indivíduos, em uma mesma família, apresentam DCC precoce, entretanto, ainda resta esclarecer se a DCC resulta da hipertrigliceridemia ou de fatores exacerbadores frequentemente coexistentes, como obesidade e resistência à insulina (Brunzell, 1983).

Deficiência de lipoproteína lipase (hiperlipoproteinemia do tipo 1 ou hiperquilomicronemia). É um raro distúrbio autossômico recessivo que se manifesta durante a infância na forma de dor abdominal e pancreatite. A presença de uma LPL defeituosa ou a ausência da enzima resulta na incapacidade de eliminar os QMs e, consequentemente, no aparecimento da clássica síndrome de quilomicronemia do "tipo 1" (Tabs. 17.3 e 17.14). Os níveis de TGs na condição de jejum podem ser > 100 mg/dL, podendo se tornar > 10.000 mg/dL no período pós-prandial. Pacientes com deficiência de LPL não desenvolvem DCC precoce, indicando que os QMs, por si só, não são aterogênicos. Um tratamento efetivo consiste em uma dieta com baixo teor de gorduras para redução da produção de QMs. Deve ser realizada a suplementação com vitaminas lipossolúveis, e a terapia farmacológica pode ser considerada para diminuição da produção de VLDL endógeno (Brunzell, 1995). Em indivíduos heterozigotos, metade da atividade de LPL permanece normal, e a incidência dessa condição na população geral é de 1 a cada 500 indivíduos. Especula-se que tais indivíduos, com um gene *LPL* defeituoso, constituem um subgrupo de famílias que apresenta hiperlipidemia combinada familiar (Babirak, 1989).

Deficiência de apoC-II. A apoC-II é um cofator de ativação da LPL. Por isso, sua ausência provoca uma deficiência funcional de LPL, que se manifesta de modo semelhante à deficiência da enzima em sua forma autossômica recessiva rara de hiperquilomicronemia familiar. O distúrbio surge em crianças e adultos jovens como ataques recorrentes de dor abdominal e pancreatite. Vários defeitos que envolvem o gene *apoC-II* foram descritos (Fojo, 1992). Em casos de hipertrigliceridemia severa, os pacientes podem ser tratados com transfusões de plasma para fornecimento de apoC-II, que irá, então, ativar a LPL endógena.

Excesso de apoC-III. A apoC-III, quando em excesso, interfere na atividade da LPL e se liga à porção carboxiterminal da apoB, impedindo a ligação das lipoproteínas ao receptor da LDL. Esse excesso, especialmente no caso das lipoproteínas que contêm apoB – LDL e VLDL – pode atuar como fator de risco independente para DCC. Pode haver elevação dos níveis de apoC-III em indivíduos diabéticos, enquanto aqueles com diabetes e hipertrigliceridemia podem apresentar defeitos no gene *apoC-III* (Fredenrich, 1998). Contudo, o significado fisiológico exato de tais mutações ainda precisa ser elucidado.

Níveis elevados de colesterol e TGs

Estes distúrbios estão associados a elevações dos níveis de LDL e TGs (Fredrickson dos tipos 2B e 3). A hiperlipidemia combinada familiar (2B) é a hiperlipoproteinemia primária mais comum e manifesta-se por meio de vários fenótipos de lipoproteínas junto a uma mesma família. Relativamente rara, a disbetalipoproteinemia (tipo 3) é caracterizada pela presença de uma LDL anormal (IDL) que aparece como uma ampla banda β-eletroforética, distinguindo-se da hiperlipidemia combinada familiar. Esses distúrbios estão associados ao aumento do risco cardíaco devido à elevação dos níveis de LDL.

Hiperlipidemia combinada familiar (tipo 2B). Trata-se de um distúrbio relativamente comum, no qual os indivíduos afetados podem apresentar hipercolesterolemia simples, hipertrigliceridemia simples ou um defeito misto. Em razão da heterogeneidade fenotípica e da falta de um marcador bioquímico definitivo da doença, verifica-se uma considerável sobreposição e confusão em relação a outras formas de hiperlipidemia. Sua frequência estimada na população é de 1 a cada 100 indivíduos. As famílias afetadas devem apresentar mais de um padrão de distúrbio lipídico para atender aos critérios diagnósticos da hiperlipidemia combinada familiar. A base genética dessa doença é desconhecida (deGraaf, 1998), mas parece ser multifatorial, embora inicialmente se pensasse que sua herança era autossômica codominante. O gene (ou genes) responsável pelo defeito ainda não foi totalmente identificado.

Disbetalipoproteinemia (tipo 3). A apoE é encontrada em QMs, VLDL, IDL e em resíduos de QMs. Por meio de sua ligação ao receptor da LDL (e provavelmente a outros receptores), a apoE ajuda a eliminar essas lipoproteínas da circulação. Essa apolipoproteína possui três isoformas eletroforeticamente comuns, sendo cada uma delas atribuída a várias mutações genéticas distintas. A isoforma mais comum é a E-3, seguida da E-4 e da E-2. A apoE-2 parece ter baixa afinidade pelo receptor da LDL e, por isso, as partículas lipoproteicas se acumulam no sangue de indivíduos homozigotos para E-2. Todavia, enquanto tais indivíduos são relativamente comuns na população (1 em 100 indivíduos), a expressão do fenótipo do tipo 3 ocorre apenas em 1 a cada 10.000 indivíduos. Sendo assim, a manifestação do fenótipo da hiperlipidemia do tipo 3 aparentemente requer a expressão de um segundo fator além do genótipo homozigoto para E-2 (Mahley, 1995). Os fatores secundários implicados na manifestação da doença incluem obesidade, diabetes melito, hipotireoidismo e medicamentos, como os inibidores de protease.

A hiperlipidemia do tipo 3 afeta sobretudo adultos, sendo mais comum entre os homens do que entre as mulheres. Indivíduos sintomáticos tipicamente apresentam, grosso modo, o mesmo grau de elevação dos níveis de colesterol e TGs, e mais estudos se fazem necessários para distinguir esse distúrbio da hiperlipidemia combinada familiar. O tipo 3 possui uma característica patognomônica: uma ampla banda anormal entre a VLDL e a LDL, conhecida como "lipoproteína β de migração anormal" ou β-VLDL. O conteúdo de colesterol da VLDL também está aumentado, e a determinação da proporção VLDL-C/TGs é útil para triagens. Normalmente, a proporção VLDL-C/TGs vale 0,2. Pacientes com distúrbio do tipo 3 costumam apresentar uma proporção > 0,3. A variação dos níveis lipídicos observada de um dia para o outro se torna mais pronunciada do que o normal. Os estigmas clínicos são xantoma palmar e xantoma túbero-eruptivo nos cotovelos, nos joelhos e nas nádegas. A aterosclerose prematura é bastante prevalente e, ao contrário da hipercolesterolemia familiar, envolve com mais frequência as artérias abdominal e femoral. A aterosclerose parece ser reversível com o tratamento do distúrbio lipídico (Kuo, 1988). Os pacientes são responsivos a dietas com baixo teor de gordura, à perda de peso e à maioria dos fármacos redutores dos níveis lipídicos.

Deficiência de lipase hepática. Geralmente, como resultado de mutações que envolvem o gene *HL*, essa deficiência é um raro distúrbio familiar associado à hiperlipidemia combinada, que se caracteriza por níveis elevados de CT (250–1.500 mg/dL) e de TGs (400–8.000 mg/dL). Os níveis de HDL-C permanecem normais ou aumentam. Os estigmas físicos incluem xantomas palmar e túbero-eruptivo, e o risco de aterosclerose está aumentado. Contrastando com a hiperlipidemia do tipo 3, embora a VLDL-β esteja aumentada, a proporção CT/TGs continua inalterada. O conteúdo de TGs de todas as lipoproteínas aumenta cerca de 3 a 5 vezes em relação ao normal. Foram descritas famílias que apresentam mutações heterozigotas compostas (Connelly, 1998).

Baixa concentração isolada de colesterol total

Esses distúrbios pouco comuns estão associados a um defeito na síntese ou no metabolismo de apoB, que faz com que os níveis das apoB-lipoproteínas (QMs, VLDL e LDL) se tornem reduzidos ou nulos. Os níveis de TGs e colesterol são baixos. Frequentemente, deficiências de vitaminas lipossolúveis são observadas. É necessário implantar uma terapia com dieta de baixo teor de gordura.

Abetalipoproteinemia. É um distúrbio autossômico recessivo raro, em que a apoB é degradada logo após a transcrição, resultando em níveis indetectáveis de apoB circulante. A degradação precoce da apoB não é causada por defeitos que envolvem o gene *apoB* nem seu produto, e sim por defeitos na proteína transportadora microssomal hepática, que é essencial à secreção da apoB (Rader, 1993). Nem a apoB-48 nem a apoB-100 estão presentes no plasma. Durante a infância ou a adolescência, os pacientes apresentam má absorção de gorduras, hipolipidemia, retinite pigmentosa, ataxia cerebelar e acantocitose. Os testes laboratoriais usualmente indicam a diminuição dos níveis de apoB, bem como de TGs e CT (concentrações típicas < 50 mg/dL). Os pacientes desenvolvem deficiências de vitaminas lipossolúveis, em decorrência da má absorção das vitaminas A, K e E. Tipicamente não há deficiência de vitamina D, uma vez que a absorção dessa vitamina não requer QMs. Uma vez que as vitaminas A e K possuem sistemas de transporte independentes das lipoproteínas, sua deficiência clínica não é tão severa quanto a deficiência de vitamina E. Esta não só depende dos QMs para ser absorvida, mas requer VLDL e LDL para ser distribuída aos tecidos. Crianças com esse tipo de distúrbio são responsivas a dietas com baixo teor de gordura que sejam ricas em ácidos graxos de cadeia média e suplementadas com doses elevadas de vitaminas lipossolúveis, principalmente vitamina E. A reposição dos estoques de vitamina E melhora os sintomas neuropáticos periféricos e retinais. Indivíduos heterozigotos são assintomáticos e não apresentam evidências de níveis plasmáticos lipídicos anormais.

Hipobetalipoproteinemia. É um distúrbio autossômico dominante que, em algumas famílias, pode ser explicado pela ocorrência de mutações *nonsense* ou *missense* no gene *apoB*, com consequente redução dos níveis de LDL-C a valores muito baixos (Wu, 1999). Sua forma familiar está associada à diminuição do risco de doença cardiovascular. Indivíduos homozigotos apresentam níveis de CT < 50 mg/dL e, durante os primeiros anos de vida, má absorção de gorduras, além de baixos níveis plasmáticos de colesterol na juventude. Tais indivíduos desenvolvem doença degenerativa neurológica progressiva, retinite pigmentosa e acantocitose, de modo semelhante aos pacientes com abetalipoproteinemia. As complicações decorrentes da deficiência de vitamina E podem ser evitadas pela suplementação com doses elevadas dessa vitamina (100–300 mg/kg/dia). Em indivíduos heterozigotos, os níveis de LDL-C correspondem aproximadamente à metade daqueles detectados em indivíduos-controle da mesma idade e sexo, porém, exceto por essa característica, esses pacientes são assintomáticos.

Doença de retenção de QMs. Esta doença se manifesta durante a infância, por meio da má absorção de gorduras e baixa concentração de lipídeos circulantes. Difere-se da abetalipoproteinemia, pois somente a apoB-48 parece ser afetada. A anomalia genética associada a esse distúrbio envolve o gene *SARA2*, localizado no cromossomo 5q3. A proteína codificada por esse gene pertence à família de GTPases que governam o tráfico intracelular de proteínas em vesículas recobertas por proteínas (Jones, 2003).

Baixa concentração isolada de HDL-C

Baixos níveis de HDL estão associados à DCC, provavelmente porque a quantidade de HDL disponível é insuficiente para a realização do transporte reverso de colesterol – o mecanismo que garante a eliminação do colesterol presente nos tecidos periféricos.

Hipoalfalipoproteinemia familiar. É um distúrbio autossômico dominante comumente observado na população, com uma incidência de 1:400. Homens afetados apresentam níveis de HDL-C < 30 mg/dL, enquanto nas mulheres afetadas essa concentração é < 40 mg/dL. Metade das famílias afetadas parece apresentar defeitos que envolvem os genes da lipase hepática ou os genes *apoA-I/C-III/A-IV* (Breslow, 1995). Mutações no gene *ABCA1* – o mesmo gene que sofre mutação na doença de Tangier – também foram associadas a alguns casos de hipoalfalipoproteinemia. A ocorrência de DCC precoce é típica.

Deficiências de apoA-I e apoC-III. Tais deficiências constituem uma rara condição autossômica recessiva que se caracteriza pela redução da formação de HDL. Tem sido associada a mutações pontuais no gene *apoA-I* e a deleções/rearranjos genéticos que envolvem o *locus apoA-I/C-III/A-IV* no braço comprido do cromossomo 11 (Assman, 1995). Os níveis de HDL-C são inferiores a 5 mg/dL. Os indivíduos afetados apresentam opacificação da córnea e DCC prematura.

Variantes apoA-I. São substituições raras que envolvem aminoácidos específicos no gene *apoA-I*. Foi demonstrado que provocam aumento do catabolismo da HDL e da apoA-I (Breslow, 1995). Pacientes homozigotos geralmente apresentam herança autossômica recessiva para baixos níveis de HDL-C (cerca de 10 mg/dL), opacificação da córnea, xantomas e DCC precoce. Indivíduos heterozigotos podem igualmente apresentar baixos níveis de HDL-C. Uma das mutações – *apoA-I-Milano* – é herdada de forma autossômica dominante, e está associada a níveis reduzidos de HDL-C, mas não à DCC precoce (Calabresi, 1997).

Doença de Tangier. É um distúrbio autossômico recessivo caracterizado por níveis extremamente baixos de colesterol e elevação dos níveis de TGs. Na condição homozigota, os pacientes apresentam concentrações plasmáticas de HDL muito baixas ou indetectáveis, hepatoesplenomegalia, neuropatia periférica, tonsilas alaranjadas e DCC prematura (Rust, 1999). Dados recentes indicaram que essa doença resulta de mutações no gene *ABCA1*. Em células normais, a proteína ABCA1 permite que o colesterol saia da célula, onde se combina à apoA-I para formar HDL. Na ausência da atividade ABCA1, o colesterol se acumula no meio intracelular (Bodzioch, 1999; Rust, 1999). Nos pacientes com a doença, a HDL detectada em pequena quantidade difere qualitativamente da HDL normal. Os níveis de LDL-C também estão diminuídos, entretanto, a causa subjacente a esse único achado laboratorial ainda precisa ser elucidada.

Deficiência de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). Esse distúrbio ocorre sob duas formas: a clássica deficiência familiar (ou completa) de LCAT, e um fenótipo mais brando de deficiência parcial conhecido como doença do olho de peixe (Peelman, 1999). Ambas as formas são distúrbios muito raros, transmitidos por herança autossômica recessiva e causados por mutações no gene *LCAT*. Na deficiência completa, os níveis de HDL-C são tipicamente < 10 mg/dL, porém, o conteúdo de CT se mantém normal ou aumenta. Diante da falta de LCAT, a maior parte do colesterol permanece não esterificada e a síntese da HDL é comprometida. Há relatos de DCC precoce em vários casos de deficiência parcial de LCAT (Kuivenhoven, 1997).

Alta concentração isolada de HDL-C

Defeitos no gene da proteína de transferência de colesteril éster. A HDL está envolvida no transporte reverso do colesterol a partir do tecidos periféricos em direção ao fígado. Nesse processo, uma etapa importante envolve a CETP – a proteína plasmática que facilita a transferência de colesteril ésteres da HDL para as proteínas ricas em apoB-100 (VLDL e LDL), em troca da captação de TGs. A deficiência de CETP é um distúrbio autossômico recessivo, no qual há inibição da transferência de ésteres de colesterol. Como resultado, as partículas de HDL se tornam grandes e repletas de éster de colesterol, e há aumento dos níveis de apoA-I e HDL-C (tipicamente > 100 mg/dL). Existe um risco aumentado de DCC associado (Inazu, 1990). Indivíduos heterozigotos apresentam aumento moderado dos níveis de HDL-C. Paradoxalmente, a inibição de CETP foi proposta como estratégia terapêutica para elevar os níveis de HDL-C.

Referências bibliográficas

Abell LL, Levy BB, Brodie BB, et al: A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J Biol Chem 1952; 195:357–366.

Alaupovic P: Apolipoproteins and lipoproteins. Atherosclerosis 1971; 13:141–146.

Albers JJ, Hazzard WR: Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. Lipids 1974; 9:15–26.

Armstrong VW, Walli AK, Seidel D: Isolation, characterization, and uptake in human fibroblasts of an apo(a)-free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein (a)1. J Lipid Res 1985; 26:1314–1323.

Assman G, von Eckardstein A, Brewer HB: Familial high-density lipoprotein deficiency: Tangier's disease. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 1995, pp 2053–2072.

Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, et al: Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. Arteriosclerosis 1989; 9:326–334.

Bachorik PS: Measurement of low density lipoprotein cholesterol. *In* Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (eds): Handbook of Lipoprotein Testing. Washington, DC, AACC Press, 2000.

Bachorik PS, Kwiterovich PO Jr: Apolipoprotein measurements in clinical biochemistry and their utility vis-a-vis conventional assays. Clin Chim Acta 1988; 178:1–34.

Bachorik PS, Wood PDS: Laboratory considerations in the diagnosis and management of hyperlipoproteinemia. *In* Rifkind BM, Levy RI (eds): Hyperlipidemia: Diagnosis and Therapy. New York, Grune & Stratton, 1977.

Bachorik PS, Rock R, Cloey T, et al: Cholesterol screening: Comparative evaluation of on-site and laboratory-based measurements. Clin Chem 1990; 36:255–260.

Bachorik PS, Virgil DG, Kwiterovich PO: Effect of apolipoprotein E-free high-density lipoproteins on cholesterol metabolism in cultured pig hepatocytes. J Biol Chem 1987; 262:13636–13645.

Bachorik PS, Wood PDS, Albers JJ, et al: Plasma high-density lipoprotein cholesterol concentrations determined after removal of other lipoproteins by heparin/manganese precipitation or by ultracentrifugation. Clin Chem 1976; 22:1828–1834.

Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, et al: Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. Biochim Biophys Acta 1981; 665:408–419.

Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. Nat Genet 1999; 22:347–351.

Bookstein L, Gidding SS, Donovan M, Smith FA: Day-to-day variability of serum cholesterol, triglyceride and high-density lipoprotein cholesterol levels. Arch Intern Med 1990; 150:1653–1657.

Breslow JL: Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. *In* Scriver CR, Beaudet AL, et al: (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 1995, pp 2031–2052.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. Science 1981; 212:628–635.

Brown SA, Boerwinkle E, Kashanian FK, et al: Variation in concentrations of lipids, lipoprotein lipids, and apolipoproteins A-I and B in plasma from healthy women. Clin Chem 1990; 36:207–210.

Brunzell JD, Albers JJ, Chait AI, et al: Plasma lipoprotein in familial combined hyperlipidaemia and monogenic familial hypertriglyceridaemia. J Lipid Res 1983; 24:147–155.

Brunzell JD: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 1995, pp 1913–1932.

Bucolo G, David H: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem 1973; 19:476–482.

Burstein M, Legmann P: Lipoprotein precipitation. *In* Clarkson TB, Kritchevsky D, Pollak OJ (eds): Monographs on Atherosclerosis, Vol II. Basel S, Karger AG, 1982.

Byers SO, Friedman M: Site of origin of plasma triglyceride. Am J Physiol 1960; 198:629–631.

Calabresi L, Franceschini G: High-density lipoprotein and coronary heart disease: Insights from mutations leading to low high-density lipoprotein. Curr Opin Lipidol 1997; 8:219–224.

Cenedella RJ, Crouthamel WG: Intestinal versus hepatic contribution to circulating triglyceride levels. Lipids 1974; 9:35–42.

Cohn JS, McNamara JR, Schaefer EJ: Lipoprotein cholesterol concentrations in plasma of human subjects as measured in the fed and fasted states. Clin Chem 1988; 34:2456–2459.

Connelly PW, Hegele RA: Hepatic lipase deficiency. Crit Rev Clin Lab Sci 1998; 35:547–572.

Deacon AC, Dawson PJG: Enzymic assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis – a comparison of methods. Clin Chem 1979; 25:976–984.

deGraaf J, Stalenhoef AF: Defects of lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidaemia. Curr Opin Lipidol 1998; 9:189–196.

DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, et al: A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. JAMA 1986; 256:2372–2377.

Demacker PNM, Schade RWB, Jansen RTP, et al: Intra-individual variation of serum cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol in normal humans. Artherosclerosis 1982; 45:259–266.

Fless GM, Rolih CQ, Scanu AM: Heterogeneity of human plasma lipoprotein(a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. J Biol Chem 1984; 259:11470–11478.

Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM: Isolation of apolipoprotein(a) from lipoprotein(a). J Lipid Res 1985; 26:1224–1229.

Floren C-H, Albers JJ, Bierman EL: Uptake of Lp(a) lipoprotein by cultured fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 1981; 102:636.

Fojo SS, Brewer HB: Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. J Intern Med 1992; 231:669–677.

Fredenrich A: Role of apolipoprotein CIII in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. Diabetes Metab 1998; 24:490–495.

Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS: Fat transport in lipoproteins – an integrated approach to mechanisms and disorders. N Engl J Med 1967; 276:34–42, 94–103, 148–156, 215–225, 273–281.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18:499–502.

Fruchart JC, Ailhaud G: Apolipoprotein A-containing particles: Physiological role, quantification and clinical significance. Clin Chem 1992; 38:793–797.

Garber AJ: The metabolic syndrome. Med Clin North Am 2004; 88(4):837–846.

Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM Jr, et al: Human

plasma lipoprotein(a). Structural properties. J Biol Chem 1983; 258:4582–4589.
Glass C, Pittman RC, Weinstein DB, et al: Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high-density lipoprotein: Selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal and gonad. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:5435–5439.
Gotto AM Jr, Pownall HJ, Havel RJ: Introduction to the plasma lipoproteins. Meth Enzymol 1986; 128:3–41.
Gotto AM, Whitney E, Stein EA, et al: The relation between baseline and on-treatment lipid parameters and first acute major coronary events in the Air Force/ Texas Coronary Artery Prevention Study (AFCAPS/ TEXCAPS). Circulation 2000; 101:477–484.
Green PHR, Glickman RM: Intestinal lipoprotein metabolism. J Lipid Res 1981; 22:1153–1173.
Gries A, Fievet C, Marcovina S, et al: Interaction of LDL, Lp(a), and reduced Lp(a) with monoclonal antibodies against apoB. J Lipid Res 1988; 29:1–8.
Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al: Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. J Am Coll Cardiol 2004; 4:44(3):720–732.
Hansen PS: Familial defective apolipoprotein B-100. Danish Med Bull 1998; 45:370–382.
Havel RJ: Lipoprotein biosynthesis and metabolism. Ann NY Acad Sci 1980; 348:16–29.
Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL: Molecular genetics of the LDL-receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutation 1992; I:445–466.
Inazu A, Brown ML, Hesler CB, et al: Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. N Engl J Med 1990; 323:1234–1238.
Jones B, Jones EL, Bonney SA, et al: Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. Nat Genet 2003; 34:29–31.
Kafonek SD, Derby CA, Bachorik PS: Biological variability of lipoproteins and apoliproteins in patients referred to a lipid clinic. Clin Chem 1992; 38:864–872.
Kafonek SD, Donovan L, Lovejoy KL, Bachorik PS: Biological variation of lipids and lipoproteins in fingerstick blood. Clin Chem 1996; 42:2002–2007.
Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, et al; American Heart Association: American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. J Ped 2003; 142(4):368–372.
Kessler G, Lederer H: Fluorometric measurement of triglycerides. *In* Skeggs LT (ed): Automation in Clinical Chemistry, Technicon Symposia. New York, Mediad, 1966.
Koch TR, Mehta U, Lee H, et al: Bias and precision of cholesterol analysis of physician's office analyzers. Clin Chem 1987; 33:2262–2267.
Krauss RM: Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary heart disease. Am Heart J 1987; 113:578–582.
Krauss RM, Blanche PJ: Detection and quantitation of LDL subfractions. Curr Opin Lipidol 1992; 3:377–383.
Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, et al: The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. J Lipid Res 1997; 38:191–205.
Kuo PT, Wilson AC, Kostis JB: Treatment of type III hyperlipoproteinemia with gemfibrozil to retard progression of coronary artery disease. Am Heart J 1988; 116:85–90.
Laboratory Methods Committee of the Lipid Research Clinics Program: Cholesterol and triglyceride concentrations in serum/plasma pairs. Clin Chem 1977; 23:60.
Law WT, Doshi S, McGeehan J, et al: Whole-blood testing for total cholesterol by a self-metering, self-timing disposable device with built in quality control. Clin Chem 1997; 43:384–389.
Lipid Research Clinics Program: Manual of laboratory operations. Lipid and lipoprotein analysis. U.S. Department of Health and Human Services, Publication No. (NIH) 75. Revised September, 1982.
Lopes-Virella MFL, Virella G, Evangs G, et al: Immunocephelometric assay of human apoliprotein A. J Clin Chem 1980; 26:1205–1208.
Lunz ME, Castleberry BM, James K, et al: The impact of the quality of laboratory staff on the accuracy of laboratory results. J Am Med Assoc 1987; 258:361–363.
MacKenzie SL, Sundaram GS, Sodhi HS: Heterogeneity of human high-density lipoprotein (HDL_2). Clin Chim Acta 1973; 43:223–229.
Mahley RW, Rall SC: Type III hyperlipoproteinaemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 7th ed, New York, McGraw-Hill, 1995, pp 1953–1986.
Miller M, Bachorik PS, Cloey TA: Normal variation of plasma lipoproteins: Postural effects on plasma concentrations of lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Clin Chem 1992; 38:569–574.
Miller WG, Waymack PP, Anderson FP, et al: Performance of four homogenous direct methods for LDL-cholesterol. Clin Chem 2002; 48(3):489–498.
Myers GL, Cooper GR, Winn CL, et al: The Centers for Disease Control–National Heart, Lung and Blood Institute Lipid Standardization Program. An approach to accurate and precise lipid measurements. Clin Lab Med 1989; 9:105–135.
Naito HK, David JA: Laboratory considerations: Determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. *In* Story JA (ed): Lipid Research Methodology. New York, Alan R Liss, 1984.
Naito HK, Kwak YS: The evaluation of a new high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) technology; selective separation of lipoproteins by magnetic separation. Clin Chem 1995; 41:S135.
National Cholesterol Education Program (NCEP): Highlights of the report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. Pediatrics 1992; 89:495–501.
National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement: Recommendations on lipoprotein measurement. Publication No. 95-3044, Bethesda, MD, NIH, 1995.
National Cholesterol Education Program Expert Panel: Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. Circulation 2002; 106:3143–3421.
Monografia abrangente que inclui as últimas recomendações para triagem, avaliação e tratamento da hiperlipidemia.
Nauck M, Warnick GR, Rifai N: Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogenous assays versus calculation. Clin Chem 2002; 48(2):236–254.
Revisão abrangente sobre os métodos de determinação de LDL-C, incluindo as vantagens e desvantagens de cada um, características de desempenho e uma explicação sobre as bases químicas e tecnológicas do ensaio.
Oppenheimer MJ, Oram JF, Bierman EL: Down regulation of high-density lipoprotein receptor activity of cultured fibroblasts by platelet-derived growth factor. Arteriosclerosis 1987; 7:325–332.
Oram JF: Receptor-mediated transport of cholesterol between cultured cells and high-density lipoproteins. Meth Enzymol 1986; 129:645–659.
Ose L: An update on familial hypercholesterolaemia. Ann Med 1999; 31(Suppl 1):13–18.
Otvos J, Jeyarajah E, Bennett DW, Krauss RM: Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. Clin Chem 1992; 39:1632–1638.
Otvos JD: Handbook of Lipoprotein Testing, 2nd ed. Washington, DC, AACC Press, 2000, Ch 31 (Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy), pp 609–623.
Patel SB, Salen G, Hidaka H, et al: Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. J Clin Invest 1998; 102:1041–1044.
Peelman F, Verschelde JL, Vanloo B, et al: Effects of natural mutations in lecithin:cholesterol acyltransferase on the enzyme structure and activity. J Lipid Res 1999; 40:59–69.
Pesce MA, Bodourian SH: Interference with the enzymatic measurement of cholesterol in serum by use of five reagent kits. Clin Chem 1977; 23:757–760.
Rader DJ, Brewer HB: Abetalipoproteinemia. New insights into lipoprotein assembly and vitamin E metabolism from a rare genetic disease. JAMA 1993; 270:865–869.
Risser TR, Reaven GM, Reaven EP: Intestinal contribution to secretion of very low-density lipoproteins into plasma. Am J Physiol 1978; 234:E277–E281.
Robinson D, Bevan EA, Hinohara S, Takahashi T: Seasonal variation in serum cholesterol levels – evidence from the UK and Japan. Atherosclerosis 1992; 95:15–24.
Rust S, Rosier M, Funke H, et al: Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. Nat Genet 1999; 22:352–355.
Scanu AM: Lipoprotein(a). A potential bridge between the fields of atherosclerosis and thrombosis. Arch Pathol Lab Med 1988; 112:1045–1047.
Scanu AM, Byrne RE, Mihovilovic M: Functional roles of plasma high-density lipoproteins. CRC Crit Rev Biochem 1982; 13:109–140.
Sniderman AD, Blank D, Zakariana R, et al: Triglycerides and small dense LDL: the twin Achilles heels of the Friedewald formula. Clinical Biochemistry 2003; 36:499–504.
Soutar AK: Update on low-density lipoprotein receptor mutations. Curr Opin Lipidol 1998; 9:141–147.
Stein O, Stein Y, Coetzee GA, Van der Westhuyzen DR: Metabolic fate of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein labeled with an ether analogue of cholesteryl ester. Klin Wochenschr 1984; 62:1151–1156.
Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, et al: Homogenous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock co-polymer and α-cyclodextrin sulfate. Clin Chem 1998; 44:522–531.
Sundaram GS, MacKenzie SL, Sodhi HS: Preparative isoelectric focusing of human serum high-density lipoprotein (HPL_3). Biochem Biophys Acta 1974; 337:196–203.
Tall AR: Plasma high-density lipoproteins: Metabolism and relationship to atherogenesis. J Clin Invest 1990; 86:379–384.
von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G: Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. Curr Opin Lipidol 1994; 5:404–416.
Walldius G, Jungner I: Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. J Int Med 2004; 255:188–205.
Warnick GR, Cheung MC, Albers JJ: Comparison of current methods for high-density lipoprotein cholesterol quantitation. Clin Chem 1979; 25:596–604.
Warnick GR, Nauck M, Rifai N: Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. Clin Chem 2001; 47:1579–1596.
Revisão ampla de todos os métodos utilizados para quantificar HDL-C, dando ênfase em particular aos novos ensaios homogêneos. Discute os prós e contras de cada ensaio, acurácia e precisão, utilidade clínica, bem como bases químicas e tecnológicas de cada ensaio.
Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 1998; 97: 1837–1847.
Witte DL, Brown LF, Feld RD: Effects of bilirubin on the detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase. Clin Chem 1978; 24:1778–1782.
Wood PD, Bachorik PS, Albers JJ, et al: An investigation of the effects of sample aging on total cholesterol values determined by the automated ferric chloride-sulfuric acid and Liebermann–Burchard procedures. Clin Chem 1980; 26:592–597.
Wu J, Kim J, Li Q, et al: Known mutations of apoB account for only a small minority of hypobetalipoproteinemia. J Lipid Res 1999; 40:955–959.

CAPÍTULO 18

Avaliação de lesão e função cardíaca

Jay L. Bock MD PhD

Visão geral 255
Aspectos gerais 255
Marcadores de lesão miocárdica 257
- Evolução histórica 257
- CK-MB massa 257
- Troponina cardíaca 257
- Mioglobina 258
- Outros marcadores 258
- Procedimentos 259
- Protocolos clínicos 260

Marcadores de risco coronariano 261
- Proteína C reativa 261
- Homocisteína 262

Marcadores de insuficiência cardíaca congestiva 263
- Peptídeos natriuréticos cardíacos 263

Referências bibliográficas 265

PONTOS-CHAVE

- A doença mais importante que afeta o coração é a doença cardíaca coronariana (DCC), que pode levar à obstrução aguda do fluxo sanguíneo coronariano conhecida como síndrome coronariana aguda (SCA). A SCA com necrose franca de qualquer magnitude é conhecida como infarto do miocárdio (IM).
- Os principais exames para diagnóstico da SCA são o eletrocardiograma (ECG) e determinações laboratoriais de marcadores cardíacos. Marcadores cardíacos são proteínas liberadas na circulação pelo músculo cardíaco lesado. Atualmente, o marcador cardíaco mais importante é a troponina cardíaca (cTn), a qual deriva somente do músculo cardíaco.
- A troponina é um complexo de três proteínas, das quais duas são adequadas como marcadores cardíacos específicos: cTnI e cTnT. Essas duas proteínas possuem propriedades diferentes, mas suas aplicações clínicas são similares. Clinicamente, o IM é atualmente definido como uma SCA que causa liberação de troponina.
- Após um IM, decorre um período de algumas poucas horas antes que a cTn seja detectada. O seu pico ocorre em aproximadamente 24 horas e, a seguir, diminui ao longo de vários dias. A mioglobina é um marcador que aparece na circulação mais rapidamente que a cTn, mas ela também está presente no músculo esquelético.
- Pacientes que procuram um serviço de emergência com sintomas sugestivos de SCA devem ser atendidos rapidamente e de modo preciso para que sejam instituídas intervenções salva-vidas de acordo com a necessidade e, ao mesmo tempo, com dever de se evitar o desperdício de recursos. A dosagem rápida da cTn e possivelmente de outros marcadores cardíacos tem um papel crítico.
- O laboratório clínico também mensura fatores de risco associados ao desenvolvimento e à progressão da DCC. Os marcadores laboratoriais importantes incluem as dosagens de lipídeos (colesterol, triglicerídeos e frações lipoproteicas específicas – ver Cap. 17), homocisteína e proteína C reativa. A homocisteína é um aminoácido que exacerba a trombose. A proteína C reativa é um marcador inflamatório que parece refletir a gravidade da doença coronariana e que pode contribuir para a sua patogênese.
- A doença coronariana e outras doenças cardíacas podem comprometer a capacidade cardíaca de bombear sangue, provocando a síndrome clínica de insuficiência cardíaca. O peptídeo natriurético B (BNP), um peptídeo com 32 aminoácidos secretado pelos ventrículos cardíacos em resposta ao estímulo de distensão da parede, é um marcador da presença e da gravidade da insuficiência cardíaca. A dosagem do BNP é particularmente útil por ajudar no diagnóstico diferencial de pacientes que procuram um serviço de emergência com a presença de falta de ar.

Visão geral

A doença cardíaca é um evento intimamente ligado à alta tecnologia. A tecnologia teve um papel causal, parte por permitir aos indivíduos viver mais tempo e parte por permitir um estilo de vida sedentário e excessivamente consumista. Durante o século XX, a doença cardíaca saiu da obscuridade para se tornar a principal causa de morbidade e mortalidade nas nações desenvolvidas (ver Tab. 18.1). O diagnóstico e o tratamento da doença cardíaca também depende fortemente da tecnologia avançada, incluindo a eletrofisiologia, exames imagenológicos, cateterismos, procedimentos cirúrgicos e exames laboratoriais. As principais aplicações laboratoriais a seguir serão o tema deste capítulo:

1. mensurações de proteínas específicas dos miócitos cardíacos indicam lesão recente do músculo cardíaco. Esses exames são utilizados principalmente para o diagnóstico e tratamento de eventos isquêmicos (síndromes coronárias agudas);
2. mensurações de substâncias que lesam as artérias coronárias ou que pelo menos têm uma associação comprovada com a doença coronariana são utilizadas para avaliar o risco e selecionar medidas preventivas adequadas. Os fatores de risco laboratoriais mais importantes são os lipídeos, os quais são discutidos no Capítulo 17. Entre as muitas outras substâncias que poderiam ser discutidas, este capítulo centrará a atenção em duas: homocisteína e proteína C reativa;
3. mais recentemente, a mensuração de peptídeos natriuréticos liberados pelo miocárdio tem sido utilizada no diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca congestiva.

Aspectos gerais

É irônico que para o coração, um órgão que bombeia vários litros de sangue por minuto, a doença mais importante seja a isquemia – falta de um suprimento sanguíneo adequado. Isso ocorre porque o músculo cardíaco depende da nutrição constante por meio de um sistema de artérias coronárias, as quais são altamente vulneráveis ao processo de aterosclerose. A aterosclerose é um processo crônico que envolve a lesão do endotélio e o aparecimento de lesões oclusivas vasculares chamadas placas. Nos estágios iniciais da aterosclerose, quando o fluxo sanguíneo coronariano é gradualmente reduzido, em geral não há sintomas nem evidências laboratoriais de lesão cardíaca. Quando o diâmetro de uma artéria coronariana é reduzido para menos de 10 a 20% de seu tamanho original, frequentemente há evidência de dor torácica (*angina pectoris*) quando a demanda de oxigênio aumenta, em particular durante a prática de exercícios (angina de esforço). Uma redução mais rápida do fluxo sanguíneo pode ocorrer quando a placa estimula a formação de um trombo em uma artéria coronária, levando a uma síndrome coronariana aguda (SCA). Quando um trombo interrompe completamente o fluxo sanguíneo, o músculo suprido desenvolve uma lesão isquêmica irreversível, e a síndrome é um infarto do miocárdio (IM). Quando a obstrução não é completa, a lesão muscular irreversível pode ser evitada, mas o paciente apresentará

Tabela 18.1 Estatísticas da doença coronariana nos Estados Unidos

- Um em cada 5 homens e mulheres apresentam alguma forma de doença cardiovascular (incluindo a hipertensão arterial)
- 13.200.000 norte-americanos apresentam histórico de doença coronariana. Desses, 7.800.000 tiveram um IM e 6.800.000 apresentaram *angina pectoris*
- 5.000.000 de norte-americanos apresentam IC
- 5.000.000 de norte-americanos sofreram um acidente vascular cerebral
- A doença cardiovascular é responsável por 38,5% de todas as mortes, quase 1.000.000 de mortes por ano. Ela causa mais mortes anualmente que as 5 causas de morte seguintes de maneira combinada: câncer, doença de via respiratória inferior, acidente, diabetes melito, *influenza* e pneumonia
- O custo anual direto e indireto estimado da doença cardiovascular é de 368 bilhões de dólares
- Embora algumas tendências na doença cardiovascular sejam favoráveis, outros fatores, incluindo o aumento alarmante na prevalência da obesidade e do diabetes tipo 2, servirão como combustível para a epidemia por muitos anos ainda

Fonte: American Heart Association, 2003.

angina grave mesmo em repouso, e essa síndrome é conhecida como angina instável. O amplo espectro da doença cardíaca resultante do comprometimento do fluxo sanguíneo coronariano é denominado doença cardíaca coronariana (DCC).

O IM pode ser categorizado pelas alterações eletrocardiográficas características que o acompanham. O IM mais grave, que em geral envolve a lesão transmural do miocárdio, tipicamente provoca um aparecimento rápido de elevações do segmento ST e o surgimento tardio de ondas Q. Eles são categorizados como IM com elevação de ST (STEMIs). O IM sem essas alterações (IM sem onda Q ou IM sem elevação do ST-NSTEMIs) com frequência envolve graus menores de lesão muscular, possivelmente apenas do subendocárdio, mas qualquer episódio de SCA apresenta um grave risco de arritmias que podem ser letais e de futuros eventos. A lesão de uma quantidade mensurável de músculo cardíaco apresenta o risco adicional de comprometer a capacidade cardíaca de bombear sangue, o que leva à síndrome clínica de insuficiência cardíaca, discutida adiante.

O músculo cardíaco é relativamente resistente à isquemia quando comparado com outras células (p. ex., neurônios e células epiteliais tubulares renais), nas quais mesmo episódios de isquemia de curta duração podem causar morte celular. Em experimentos animais, o bloqueio completo do fluxo sanguíneo para uma área do coração causou morte (IM) apenas após 20 a 30 minutos de isquemia. Quando o fluxo sanguíneo foi restringido previamente, a morte celular em geral ocorreu após cerca de 1 hora. Na oclusão coronariana completa, ocorre tipicamente um gradiente de isquemia, com a privação de oxigênio, sendo pior nas áreas que recebem o fluxo sanguíneo por último (as porções subendocárdicas da parede ventricular). As células próximas da borda entre o miocárdio isquêmico e o miocárdio com perfusão normal podem receber algum suprimento de oxigênio e, por essa razão, elas permanecem viáveis por várias horas. Quanto maior for a duração da isquemia, maior a porcentagem de células com risco de morrer; 3 horas de isquemia aumentam a morte celular para 80% das células em risco, enquanto 6 horas de isquemia causa a morte de quase 100% das células em risco. Por essa razão, o reconhecimento precoce de angina persistente e a intervenção para restaurar o fluxo sanguíneo são necessários para minimizar a morte celular.

A biopatologia da aterosclerose e da SCA ainda não foi totalmente esclarecida. A formação de placas obstrutivas provavelmente inicia com lesões não obstrutivas conhecidas como estrias gordurosas, as quais foram observadas nas artérias coronárias de indivíduos jovens mortos em combate ou em acidentes (Enos, 1953; Strong, 1999; Berenson, 1992). Provavelmente, as lesões são desencadeadas pela captação de partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada pelos macrófagos, os quais então invadem o endotélio coronariano (Ross, 1993; Witztum, 1994; Adams, 2000; Zaman, 2000). Células inflamatórias e mediadores têm um papel na evolução da lesão, a qual acaba se tornando uma estrutura que contém um núcleo lipídico (principalmente de ésteres de colesterol) circundado por numerosos macrófagos e outras células inflamatórias e coberto por uma capa de tecido conjuntivo endotelizado (Weissberg, 2000; Davies, 2000). Lesões avançadas também contêm novos vasos sanguíneos e depósitos de cálcio. Placas nas artérias coronárias eram anteriormente vistas como barreiras passivas e fisiologicamente irreversíveis ao fluxo sanguíneo. Nos últimos anos, um papel mais dinâmico na SCA foi avaliado. Um equilíbrio entre mediadores inflamatórios, forças de cisalhamento e outros fatores podem produzir uma capa fibrosa na placa para fortalecê-la ou enfraquecê-la. A erosão da capa pode expor material trombogênico, o que leva à deposição de plaquetas e, por fim, ao aumento da lesão. Mais ameaçadora é a ruptura da placa, provocando trombose com oclusão suficiente para acarretar uma SCA. Um contribuinte importante para esse conceito de vulnerabilidade da placa foi o achado de que estatinas que reduzem o colesterol podem diminuir substancialmente o risco de SCA sem causar diminuição apreciável do grau de estenose causada por lesões ateroscleróticas (ver Cap. 17).

A extensão da doença aterosclerótica na circulação coronariana pode ser identificada pela angiografia coronariana e outros exames. Exames de sangue que refletem a extensão real da doença aterosclerótica podem estar disponíveis no futuro. Por exemplo, a mensuração de micropartículas liberadas pela placa foi proposta (Heloire, 2003). Hoje em dia, no entanto, o risco de DCC nos indivíduos é sobretudo avaliada de maneira indireta por meio da mensuração de fatores de risco, pois parece que cada um deles tem um papel contribuinte e não necessariamente definitivo (Stampfer, 2004). Vários parâmetros clínicos, resumidos na Tabela 18.2, foram estabelecidos como fatores de risco importantes. Além disso, centenas de exames laboratoriais foram estudados em relação ao risco de DCC. Entre eles, vários exames de lipídeos (discutidos no Cap. 17) tiveram o seu papel mais bem estabelecido na avaliação de risco. Dois novos marcadores, homocisteína e proteína C reativa, serão discutidos a seguir.

Junto à DCC e, frequentemente, como consequência direta dela, a doença cardíaca mais importante é a insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica, com sintomas proeminentes que incluem a fadiga, falta de ar e edema, resultante do comprometimento da capacidade de bombeamento do coração. Ela é mais causada por lesão do miocárdio, como a causada pela DCC. Em virtude da alta incidência de DCC e ao aumento da sobrevida de pessoas vítimas da doença, a insuficiência cardíaca está se tornando um problema crescente, em especial entre os idosos. A insuficiência cardíaca também pode ser causada por problemas mecânicos, por exemplo, doenças valvares, os quais interferem na função de bomba do coração. Quando o problema está relacionado com o enchimento do ventrículo esquerdo durante a diástole, ele é comumente denominado insuficiência cardíaca diastólica.

O diagnóstico de insuficiência cardíaca e a monitoração de sua progressão podem ser difíceis. Um parâmetro que define a insuficiência cardíaca sistólica é a fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE), a qual é a fração do volume sanguíneo do ventrículo esquerdo que é ejetada durante a sístole. Ela pode ser mensurada pela ecocardiografia ou pela ventriculocintilografia cardíaca. A insuficiência cardíaca sintomática está comumente associada a uma FEVE < 40%, mas a correlação entre a FEVE e os sintomas subjetivos é ruim. Até recentemente,

Tabela 18.2 Fatores de risco clínicos (não laboratoriais) de DCC

- Tabagismo (qualquer consumo de cigarro no último mês)
- Hipertensão arterial (pressão arterial > 140/90 mmHg ou em uso de medicamento anti-hipertensivo)
- Histórico familiar de DCC prematura (DCC em parente de primeiro grau do sexo masculino com menos de 55 anos ou do sexo feminino com menos de 65 anos)
- Faixa etária (homens > 45 anos; mulheres > 55 anos)
- Obesidade
- Diabetes melito
- Estilo de vida sedentário

As definições entre parênteses são utilizadas, juntamente com o nível de HDL-C, em uma fórmula de estimativa de risco para estabelecer o nível desejável de LDL-C (*National Cholesterol Education Program Expert Panel*, 2002) – ver Capítulo 7.

nenhum exame laboratorial apresentava uma utilidade específica na detecção da presença ou da gravidade da insuficiência cardíaca. Essa situação mudou com a introdução da pesquisa de peptídeos natriuréticos cardíacos, discutidos a seguir.

Da miríade de outras doenças que podem afetar o coração, é preciso mencionar de forma breve as doenças genéticas que, embora sejam relativamente incomuns, têm uma importância desproporcional por causa de suas consequências potencialmente letais. A síndrome da miocardiopatia hipertrófica, descrita há mais de um século, afeta um em cada 500 indivíduos e é a causa mais comum de morte súbita entre jovens (Taylor, 2004). Mais de 240 mutações foram ligadas a esse distúrbio (Gomes, 2004); elas afetam várias proteínas do aparelho contrátil, incluindo as troponinas, actina e miosina, e em geral são herdadas de modo autossômico dominante. A síndrome do QT longo, uma anormalidade na repolarização ventricular que pode causar morte súbita, possui várias variantes distintas causadas por mutações autossômicas dominantes e recessivas nos canais iônicos e em outras proteínas (Priori, 2004). As aplicações do diagnóstico molecular para esses distúrbios encontram-se ainda na infância, mas já existem evidências de que a identificação do genótipo não é apenas útil na confirmação do diagnóstico, mas também pode ter um papel importante na orientação da terapia específica.

Marcadores de lesão miocárdica

Evolução histórica

Marcadores bioquímicos de lesão miocárdica foram essencialmente descobertos de forma inesperada no início da década de 1950, quando LaDue et al. estavam investigando as enzimas transaminases conhecidas então como TGO (transaminase glutâmica oxalacética; atualmente aspartato transaminase, AST) e TGP (trasaminase glutâmica pirúvica; atualmente alanina transaminase, ALT) (LaDue, 1954). Ao investigar vários pacientes hospitalizados, os investigadores observaram que os níveis séricos de transaminases aumentavam agudamente após um IM e assim começou a era das "enzimas cardíacas". O simples princípio subjacente, como com outros marcadores orgânicos, é que a morte celular causará liberação de proteínas celulares na circulação. (Uma questão mais difícil e ainda não totalmente solucionada é a extensão com que a lesão celular reversível pode causar extravasamento de proteínas.)

As transaminases não resistiram como marcadores cardíacos por causa de sua abundância no fígado, músculo esquelético e outros tecidos. Eles logo foram sobrepujados para o diagnóstico cardíaco por duas outras enzimas, a lactato desidrogenase (LDH) e a creatina quinase (CK) (Hess, 1963; Roe, 1977; Johnston, 1982; Wolf, 1989; Lee, 1986). A LDH é uma enzima que contém zinco e participa da via glicolítica, sendo encontrada em praticamente todas as células do corpo. A CK transfere fosfato de alta energia entre a creatinina e o ADP, principalmente nas células musculares, mas ela é encontrada em todos os tipos de músculo e também no cérebro e em outros tecidos. Com essas duas enzimas, o aumento da especificidade cardíaca foi obtido por meio da separação de isoenzimas. A LDH é um tetrâmero de duas subunidades ativas, H (para coração) e M (para músculo) com um peso molecular de 134 kDa. Combinações de subunidades produzem cinco isoenzimas que vão de LDH_1 (HHHH) até LDH_5 (MMMM). As isoenzimas intermediárias contêm diferentes combinações de subunidades H e M (LDH_2, HHHM; LDH_3. HHMM; LDH_4, HMMM). Como os nomes das subunidades indicam, a LDH_1 é relativamente abundante no músculo cardíaco, enquanto a LDH_5 é mais abundante no músculo esquelético. Pacientes com IM apresentam um padrão característico de LDH "alternado", no qual o achado normal $LDH_2 > LDH_1$ é invertido.

A CK é predominantemente observada como um dímero de subunidades catalíticas, cada uma delas com um peso molecular de aproximadamente 40 kDa. As duas subunidades são denominadas M (para músculo) e B (do inglês *brain*, "cérebro"). As três isoenzimas resultantes são a CK_1 (BB), CK_2 (MB) e CK_3 (MM). A CK é encontrada em pequenas quantidades no corpo, mas encontra-se em maior concentração somente no músculo e no cérebro, embora a CK do cérebro praticamente nunca cruze a barreira hematoencefálica para atingir o plasma. No músculo esquelético, a CK-MB representa 0 a 1% da CK total nas fibras tipo 1; e 2 a 6% da CK nas fibras tipo 2. Durante a regeneração do músculo esquelético, uma quantidade maior de CK-MB é produzida em comparação com a CK-MM, similar ao padrão observado no músculo fetal (Tzvetanova, 1971). No coração normal, uma média de 15 a 20% da CK é CK-MB. A sua distribuição não é uniforme, com uma porcentagem de CK-MB maior no coração direito que no coração esquerdo (Marmor, 1980). Um estudo, no entanto, sugere que a CK-MB não é encontrada no miocárdio normal, aparecendo somente quando ele se torna doente (Ingwall, 1985). A CK-BB é a isozima dominante da CK encontrada no cérebro e no músculo liso.

No passado, laboratórios clínicos comumente analisavam isoenzimas da CK e da LDH para melhorar o desempenho diagnóstico global, em especial porque as duas enzimas exibem cinéticas diferentes, com alterações de LDH observáveis por um período maior que as alterações de CK. A análise de isoenzimas era relativamente longa e tediosa, em geral envolvia a separação eletroforética, seguida pelo desenvolvimento de cor ou fluorescência utilizando substratos adequados, seguido pela varredura densitométrica. Por essas razões, esses exames podiam ser realizados somente uma vez por dia, uma situação aceitável quando pacientes com suspeita de IM eram geralmente internados por um período de observação de vários dias.

CK-MB massa

Um passo importante em direção ao diagnóstico cardíaco foi o desenvolvimento de imunoensaios para proteínas utilizando a tecnologia de anticorpo monoclonal. Essa tecnologia permitiu a introdução da chamada dosagem de CK-MB massa, na qual a proteína é simplesmente mensurada como um antígeno, sem depender de suas propriedades enzimáticas (El Allaf, 1986; Mair, 1991). Hoje em dia, a dosagem de CK-MB massa é utilizada de modo amplo e pode ser realizada rapidamente, de modo geral em bem menos de 1 hora, em uma variedade de plataformas automatizadas. Hoje em dia, a dosagem também oferece um melhor desempenho analítico, especialmente em termos de acurácia barata, em relação à separação de isoenzimas tradicional. No entanto, o exame ainda sofre por causa de uma limitação fundamental: a de CK-MB não ser específica do miocárdio. A interpretação é auxiliada pelo conhecimento da CK total, a qual, por razões de custo, ainda é mensurada como atividade enzimática. A relação CK-MB massa e atividade da CK total é frequentemente denominada "índice relativo" (IR) ou "porcentagem relativa", pois é uma relação inadequada entre diferentes tipos de mensurações com diferentes unidades. Um alto IR é mais sugestivo de lesão cardíaca. Para ser sugestivo de IM, um resultado de CK-MB massa deve ultrapassar o limite de referência da quantidade absoluta (tipicamente cerca de 5 ng/mL) e do IR (tipicamente cerca de 2%).

Troponina cardíaca

Com o advento dos imunoensaios, tornou-se possível pela primeira vez buscar marcadores proteicos órgão-específicos que não possuem atividade enzimática mensurável. Isso levou à introdução de ensaios para a troponina cardíaca (cTn), atualmente o exame laboratorial mais importante para o diagnóstico cardíaco.

A troponina (Tn) é um complexo regulador de três proteínas localizado em intervalos regulares no filamento fino do músculo estriado. As três proteínas são: TnT (subunidade ligadora de tropomiosina, 37 kDa), TnI (subunidade inibidora, 24 kDa) e Tnc (subunidade ligadora de cálcio, 18 kDa). O Ca^{2+}, disparador da contração muscular, é transmitido por meio do complexo Tn, que causa uma alteração conformacional em outro componente do filamento fino, a tropomiosina, permitindo então que ocorra a interação entre a actina e a miosina. Em contraste com a maioria dos outros marcadores, as formas de Tn encontradas no músculo esquelético e no músculo cardíaco são diferentes. Para a TnC, as formas observadas nas fibras do tipo 2 e no músculo cardíaco são idênticas, tornando óbvio o seu uso como um marcador diferencial. A TnI possui uma forma cardioespecífica (cTnI), assim como formas distintas das fibras musculares esqueléticas dos tipos 1 e 2, cada uma codificada por um gene separado. A presença da forma cardioespecífica em tecido que não o músculo cardíaco nunca foi documentada (Bodor, 1995). A TnT também possui formas distintas no miocárdio (cTnT), músculo esquelético de contração rápida e contração lenta, mas aqui a situação é mais complicada porque a cTnT foi detectada no músculo esquelé-

tico fetal e no músculo esquelético doente. Entretanto, modificações pós-translacionais causam diferenças detectáveis entre a cTnT produzida no miocárdio e a cTnT produzida no músculo esquelético doente (Apple, 1998, 1999). Por essa razão, um exame imunoquímico para a cTnT com anticorpos cuidadosamente escolhidos como, por exemplo, da geração atual (mas não de gerações anteriores) de ensaio de cTnT comercial também deve ter uma especificidade miocárdica próxima de 100%. Contudo, pequenos aumentos de cTnT circulante, mesmo com ensaios mais novos, foram relatados em pacientes com distrofia muscular e insuficiência renal que não apresentavam qualquer outra evidência de doença cardíaca (Muller-Bardorff, 1997; Hammerer-Lercher, 2001a).

Nos miócitos cardíacos, a cTnT e a cTnI estão predominantemente ligadas a fibras musculares, como descrito acima, e a forma ligada é liberada lentamente ao longo de uma a duas semanas após o infarto do miocárdio. Por essa razão, embora a cTnI e a cTnT sejam proteínas relativamente pequenas e que são eliminadas de forma rápida, seus níveis plasmáticos caem de modo lento após uma lesão cardíaca. Uma pequena fração de cTn da célula miocárdica está livre no citoplasma. A média para a cTnT é de 6% e levemente menor (2–5%) para a cTnI. A fração livre permite o escape precoce das células miocárdicas lesadas e a detecção em um período similar ao da CK-MB, com a cTn atingindo um pico aproximadamente 24 horas após um IM. Em virtude da lenta liberação da cTn ligada às fibras, o declínio rápido da cTn circulante logo após o seu pico é com frequência seguido por um platô e mesmo um pequeno aumento secundário. É importante que tal aumento não seja interpretado como evidência de reinfarto. A cTn circulante retorna aos níveis basais em aproximadamente 5 a 10 dias, dependendo da magnitude do infarto (Mair, 1997) (Fig. 18.1).

Ao contrário de outros marcadores cardíacos, a cTnT e a cTnI estão quase ausentes no soro normal. É raro a cTn ultrapassar 0,1 ng/mL em indivíduos saudáveis. Entretanto, é importante observar que a elevação da cTn, embora presumivelmente indicadora de lesão de miócitos cardíacos, não necessita ser causada por lesão isquêmica. Apesar de serem em geral muito menores que aquelas observadas no IM, foram observadas elevações na pericardite, miocardite, embolia pulmonar, insuficiência renal, sépsis e outras doenças graves (Roongsritong, 2004). Pequenas elevações mensuradas da cTn também podem ser artefatos analíticos (ver "Procedimentos").

A alta sensibilidade e especificidade da cTn fizeram com que fosse repensada a definição clínica de IM. Os critérios prévios eram os da Organização Mundial da Saúde, os quais eram destinados principalmente para fins epidemiológicos (Joint Task Force, 1979). A definição um pouco vaga era baseada na tríade composta pela anamnese, ECG e alterações de "enzimas séricas". Muitos pacientes com sintomas isquêmicos podem apresentar um ECG negativo ou ambíguo e exames negativos de marcadores mais antigos (p. ex., CK-MB), mas com elevação evidente (embora frequentemente discreta) da cTn. É provável que a isquemia reversível não cause essas elevações, apesar de isso não ter sido estabelecido com certeza (Morrow, 2001). Esses pacientes algumas vezes relataram "lesão miocárdica mínima", "microinfartos" ou "infartinhos", provavelmente apresentam um IM verdadeiro com uma menor quantidade de necrose muscular da que poderia ser previamente detectada. Uma conferência de consenso recomendou que essas pessoas sejam diagnosticadas adequadamente com IM (Joint Committee, 2000).

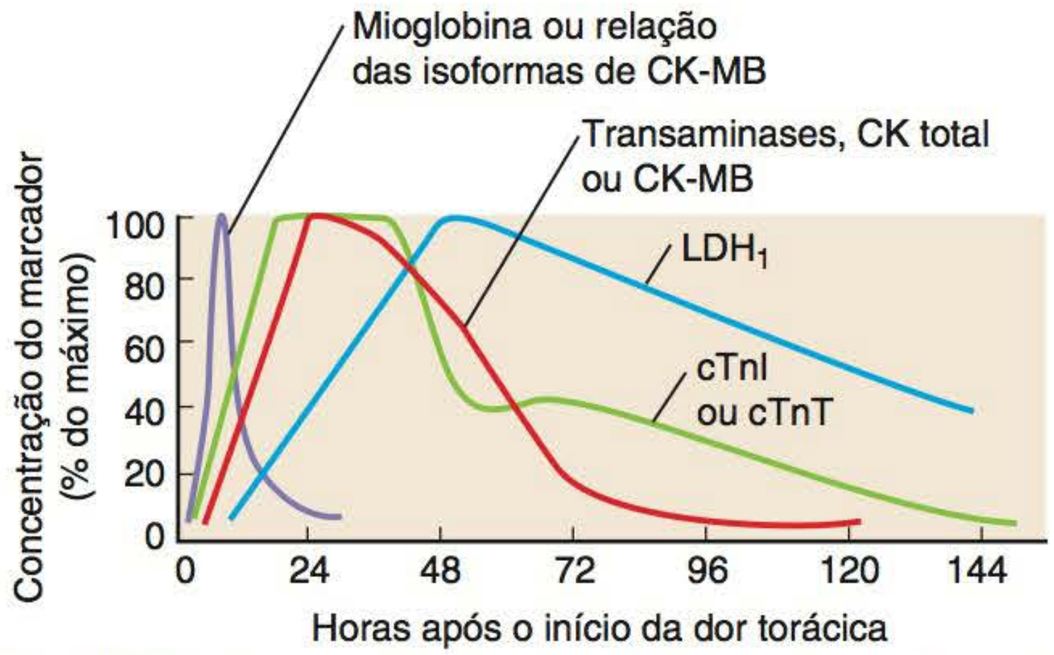


Figura 18.1 Descrição esquemática da cinética de vários marcadores cardíacos após um IM.

À parte da nosologia, uma cTn positiva baixa indica maior risco de complicações da DCC (Hamm, 1992, 1997; Polanczyk, 1998; Luscher, 1997; Antman, 1996) (ver Fig. 18.2) e pode ter implicações importantes na terapia. Pacientes com sintomas isquêmicos que também apresentam elevações de cTn são mais beneficiados com as terapias com vários agentes antiplaqueta e antitrombóticos (Hamm, 1999; Lindahl, 1997; Morrow, 2000; Newby, 2001).

Mioglobina

A mioglobina é uma proteína que contém heme e que se liga ao oxigênio no músculo cardíaco e esquelético. Existe apenas uma única forma comum a ambos os tipos de músculo. Por não apresentar especificidade cardíaca, a utilidade da mioglobina deriva de sua cinética (ver Fig. 18.1). Com um peso molecular de apenas 18 kDa, acredita-se que ela saia das células lesadas mais rapidamente que outras proteínas. Níveis séricos elevados são aparentes em 2 a 3 horas após o início de IM, mais cedo do que com a troponina ou outros marcadores (Montague, 1995). A mioglobina é eliminada sobretudo pela filtração renal; a sua meia-vida é de cerca de 4 horas, mas é maior se a função renal estiver comprometida. Tipicamente, a mioglobina atinge o pico cerca de 6 horas após o IM e retorna ao valor basal após 24 horas. Em indivíduos normais, o nível de mioglobina está relacionado à massa muscular e à atividade muscular, similar ao padrão da CK. O nível plasmático é mais alto nos homens que nas mulheres. A mioglobina aumenta com a idade, refletindo a diminuição da taxa de filtração glomerular. A variação dia a dia é de aproximadamente 10 a 15% (Panteghini, 1997). Apesar da falta de especificidade cardíaca da mioglobina, como um exame para IM ela oferece uma especificidade clínica razoavelmente alta (> 95%) quando pacientes com insuficiência renal ou lesão suspeita de músculo esquelético são excluídos. A sensibilidade da mioglobina pode ser aumentada considerando-se um resultado positivo se, embora dentro do intervalo de referência, ele representar uma grande alteração ("delta mioglobina") de uma amostra coletada 1 a 3 horas antes (Brogan, 1994; Tucker, 1994; Woo, 1995).

O exame de mioglobina pode, em alguns casos, ser útil para documentar a lesão de músculo esquelético, mas outros marcadores (p. ex., CK total) em geral são mais convenientes para esse objetivo. Ocasionalmente, a dosagem da mioglobina no soro ou na urina é útil para determinar se um teste positivo de pesquisa de "sangue" com fita reagente baseado na atividade da peroxidase do heme reflete de fato a mioglobinúria.

Outros marcadores

Anidrase carbônica III

A anidrase carbônica III é uma enzima presente no músculo esquelético, mas não no músculo cardíaco. Por essa razão, ela pode servir como um tipo de marcador cardíaco "negativo". Ela é liberada do músculo lesado em uma relação relativamente fixa com a mioglobina. Por esse motivo, a mioglobina é um indicador mais específico de lesão miocárdica quando a sua relação com a CA III também está elevada (Väänänen, 1990; Brogan, 1996; Beuerle, 2000).

Glicogênio fosforilase

A glicogênio fosforilase é uma enzima amplamente distribuída que catalisa a primeira etapa da glicogenólise. Trata-se de um dímero de subunidades idênticas que possui três isoenzimas categorizadas, nomeadas segundo o tecido no qual elas têm a maior expressão: GPLL (fígado), GPMM (músculo) e GPBB (cérebro). A GPBB também se expressa no miocárdio, assim como em outros tecidos, mas não no músculo esquelético, o qual contém apenas GPMM. A possível utilidade de GPBB é que parece que ela é liberada mais cedo que outros marcadores e pode, de fato, ser liberada em condições de isquemia reversível que não provocam elevações comparáveis de outros marcadores (Rabitzsch, 1995; Krause, 1996). Entretanto, comparações com ensaios de cTn modernos ainda são limitadas e não são particularmente encorajantes (Lang, 2000).

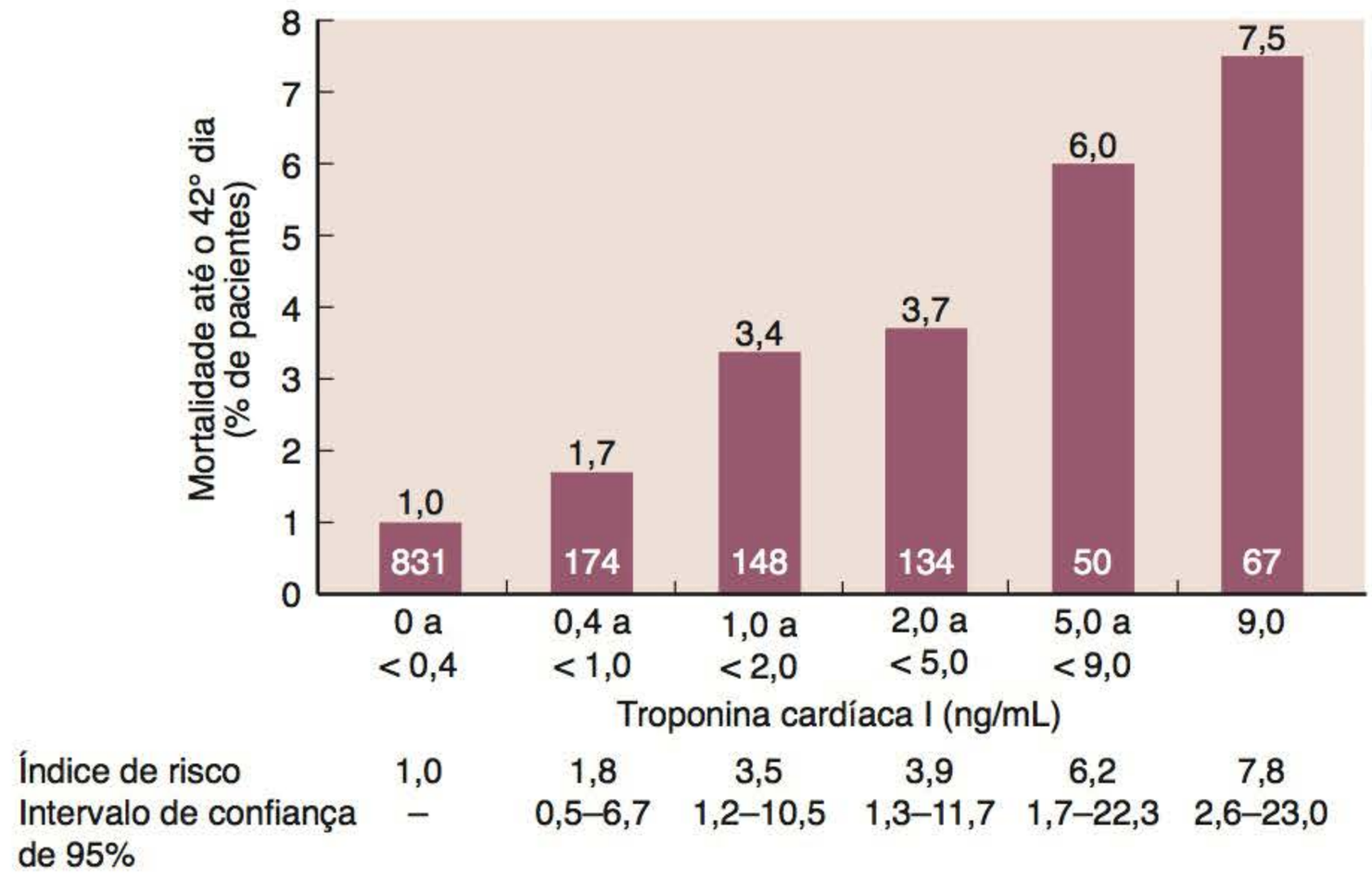


Figura 18.2 Taxas de mortalidade de pacientes com SCA em função do nível de cTnI. Os 1.441 pacientes do estudo TIMI IIIB apresentavam idades entre 21 e 76 anos, com antecedentes de episódios de dor ao repouso que foram considerados de origem isquêmica e com duração de pelo menos 5 minutos (e inferior a 6 horas) nas 24 horas anteriores e evidências documentadas de DCC. Foram excluídos do estudo os pacientes que foram diagnosticados com bloqueio de ramo esquerdo ao se apresentarem, que sofreram infarto do miocárdio nos 21 dias prévios, que apresentavam uma causa tratável de angina, que foram submetidos à terapia trombolítica nas 72 horas anteriores ou que foram submetidos a uma angioplastia nos últimos 6 meses. As taxas de mortalidade até o 42° dia são mostradas para faixas de cTnI mensurada no recrutamento. Os números na base de cada barra são as quantidades de pacientes em cada faixa de cTnI, e os números acima das barras são porcentagens. $p < 0{,}001$ para o aumento da taxa de mortalidade (e o índice de risco de mortalidade) com níveis crescentes de cTnI no recrutamento. (Reproduzido de Antman EM, Tanasijeric MJ, Thompson B, et al: Cardiac-Specific Troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med 335:1342-1349, 1996.)

Isoformas de creatina quinase

A eletroforese de alta resolução da creatina quinase sérica revela que as isoenzimas MM e MB são heterogêneas; a MB tem duas sub-bandas e a MM, três. Essas espécies, conhecidas como isoformas, aumentam em virtude da ação da carboxipeptidase no soro, clivando a lisina terminal da subunidade M (Wevers, 1978; George, 1984). Por essa razão, a isozima MB pode ter 0 ou 1 lisina clivada, enquanto a isozima MM pode ter 0, 1 ou 2 lisinas clivadas. A clivagem ocorre apenas depois que a enzima nativa é liberada na circulação em decorrência de dano tecidual. No infarto agudo do miocárdio (IAM), as isoformas nativas (tissulares) CK-MB_2 e CK-MM_3 são liberadas no sangue; são necessárias várias horas antes de elas serem convertidas nas isoformas CK-MB_1 e CK-MM_1/MM_2, respectivamente. Por isso, uma relação alta de MB_2/MB_1 ou MM_3/MM_1 sugere que ocorreu uma liberação recente de enzima, como de um infarto do miocárdio. Essa relação mais alta é tipicamente observada um pouco antes de a quantidade absoluta de MB sérica exceder o limite de referência. Como consequência, nas primeiras 3 a 4 horas após o início do sintoma, é obtida uma maior sensibilidade para detecção do infarto do miocárdio (Puleo, 1994; Bock, 1999). O exame pode ser realizado de modo rápido por um sistema de eletroforese comercial, automatizado e rápido, mas que ainda representa uma estação de trabalho dedicada para o laboratório clínico.

Proteína ligadora de ácidos graxos do coração (HFABP)

A HFABP (do inglês, *heart fatty acid binding protein*) é uma proteína de baixo peso molecular (15 kD) que é um marcador relativamente precoce de lesão miocárdica, com cinética similar à da mioglobina. Ela não é cardioespecífica e, por essa razão, parece não oferecer vantagem em comparação com a mioglobina. Contudo, a relação mioglobina/HFABP é muito mais baixa no coração do que no músculo esquelético e pode ter aplicabilidade diagnóstica (Van Nieuwenhoven, 1995; Zanotti, 1999).

Miosina

A miosina compõe o filamento espesso do aparelho contrátil muscular e é composta por um par de cadeias pesadas (200 kD) e um par de cadeias leves do tipo I e um de cadeias leves do tipo II (20-26 kD). Vários desses componentes foram examinados como marcadores cardíacos (Uji, 1991; Ravkilde, 1994, 1995; Katus, 1988). Não foi possível obter uma cardioespecificidade completa com a miosina, e não está claro que ela ofereceria qualquer vantagem importante.

Albumina modificada pela isquemia

A albumina modificada pela isquemia é um tipo único de marcador cardíaco, aprovado pelo FDA em 2003, que não é uma proteína liberada pelos miócitos lesados (Bar-Or, 2000, 2001; Bhagavan, 2003; Christenson, 2001). Em vez disso, o exame detecta uma forma variante da albumina com menor afinidade pelos íons metais próxima do terminal N. A variante é mensurada por uma determinação espectroscópica da ligação de CO^{2+}. Foi postulado que ela surge em decorrência da interação da albumina com radicais livres em locais de isquemia tissular. A vantagem teórica desse exame é que ele detecta a isquemia antes da lesão celular irreversível. A alteração da albumina parece ocorrer em minutos de isquemia e durar por cerca de 6 horas. O exame é claramente inespecífico para a isquemia cardíaca, mas parece apresentar uma sensibilidade clínica de 80 a 90% para a SCA no momento do primeiro atendimento, maior que a de um eletrocardiograma (Roy, 2004; Sinha, 2004). No momento da redação deste livro, ainda não havia uma boa documentação sobre a utilidade clínica do exame.

Procedimentos

Como indicado anteriormente, a mensuração de marcadores cardíacos evoluiu ao longo dos anos de mensurações de atividade enzimática total para separações de isoenzimas por eletroforese ou cromatografia e, atualmente, para tecnologias sofisticadas de imunoensaio. Hoje em dia, quase todas as análises de marcadores cardíacos (com exceção da albumina modificada pela isquemia) são realizadas por imunoensaio, e as dificuldades do imunoensaio são aplicáveis a todas elas. As dificuldades específicas com a cTn, o marcador mais importante e, de alguma maneira, um analito proteico especialmente desafiador, justificam uma discussão separada.

Sendo um complexo proteico que degrada quando liberado na circulação, a cTn é um analito altamente heterogêneo. As formas circulantes que foram identificadas incluem o complexo ternário cTnT-I-C, o binário cTnI-C, a cTnT livre (mas não a cTnI livre), formas oxidadas (a cTnI, mas não a cTnT, contém resíduos de cisteína que podem ser oxidadas para formar uma ligação dissulfeto intramolecular), formas fosforiladas e formas degradadas (Wu, 1998; Gao, 1997; Shi, 1999; Morjana, 1998; Katrukha, 1998; Bunk, 2000; Labugger, 2000). Evidentemente, alguns epítopos são bloqueados ou modificados em algumas dessas formas, pois diferenças em sua reatividade com diferentes ensaios comerciais para cTnI superiores a 20 vezes foram observadas (Wu, 1998; Shi, 1999; Kao, 2001; Datta, 1999; Newman, 1999; Tate, 1999). O problema não ocorre da mesma maneira com a cTnT porque os ensaios são comercializados por um único fabricante.

Um outro problema é que como o nível plasmático normal da cTn é muito baixo, mesmo um grau minúsculo de reatividade do ensaio causado pela interferência ou artefato técnico pode ser interpretado como um resultado "positivo", indicando lesão miocárdica. Isso pode levar a procedimentos invasivos desnecessários (p. ex., angiografia coronariana). Foi observado que vários ensaios de cTnI são susceptíveis a interferências de anticorpos heterófilos, fibrina e outras substâncias (Nosanchuk, 1999; Fitzmaurice, 1998; Roberts, 1997; Dasgupta, 1999, 2001; Parry, 1999;

Galambos, 2000). A interferência negativa em virtude de um componente sérico frequente também foi relatada (Eriksson, 2003).

As faixas de referência e os pontos de decisão deram origem a certa confusão (Jaffe, 2004). Como discutido anteriormente, quando o exame de cTn foi introduzido pela primeira vez, percebeu-se que pequenas elevações não estavam correlacionadas com qualquer elevação de CK-MB ou outro sinal convencional (mas menos sensível) de necrose miocárdica. Portanto, foi definido um ponto de decisão relativamente alto, e em essencial arbitrário, para a cTn como indicador de infarto do miocárdio; níveis mais baixos foram indeterminados ou considerados "lesão miocárdica mínima". A redefinição subsequente do infarto do miocárdio alterou esse pensamento, e foi recomendado que o limite de referência superior para a cTn fosse o 99° percentil da população saudável, um nível no qual ensaios deveriam idealmente obter um coeficiente de variação (CV) dentro de 10% (Joint Committee, 2000). Entre 2003 e 2004, nenhum ensaio comercial norte-americano atingiu esse nível de precisão (Panteghini, 2004), mas, recentemente, foi descrito um ensaio para a cTnI que obteve um CV < 10% a 0,027 µg/L (Venge, 2003), o qual era inferior na população acima do limite de referência (99° percentil) mensurado a 0,041 µg/L. Para ensaios que não obtêm um CV de 10% no 99° percentil, o *cutoff* diagnóstico deveria ser a concentração mais baixa que produz um CV de 10%.

Protocolos clínicos

Diagnóstico de SCA

O diagnóstico de infarto do miocárdio evoluiu de um processo um pouco lento que demandava vários dias de permanência hospitalar para uma tarefa urgente realizada em grande parte no serviço de emergência, algumas vezes dentro de um centro especializado em dor torácica (Zalenski, 1998). Anualmente, cerca de 8 milhões de atendimentos em serviços de emergência norte-americanos são devidos à dor torácica ou outros sintomas, incluindo falta de ar, tontura ou perda de consciência, que podem sugerir SCA (Storrow, 2000). Embora o diagnóstico com frequência seja direto, o desafio é obter um nível de acurácia muito alto. A falta de um diagnóstico de SCA, o que pode ocorrer em cerca de 2% dos casos, representa um maior risco de mortalidade e é a principal causa de indenizações por má conduta profissional entre os médicos que trabalham em serviços de emergência (Pope, 2000; Karcz, 1996). Por outro lado, a prática conservadora de internação hospitalar para a maioria dos pacientes com suspeita de SCA representa um gasto desnecessário de bilhões de dólares, pois dois terços desses pacientes acabam não tendo o diagnóstico de SCA confirmado.

Marcadores bioquímicos têm um papel secundário na conduta inicial para pacientes com suspeita de SCA. A tomada de decisão mais precoce, a qual idealmente deve ser feita em 10 minutos após a chegada do paciente no serviço de emergência, é baseada na anamnese, exame físico e um ECG de 12 derivações (Braunwald, 2002) (ver Fig. 18.3). O ECG pode estabelecer o diagnóstico de STEMI, sendo o paciente candidato à trombólise imediata e outras intervenções, conforme apresentado em diretivas detalhadas para essa condição (Antman, 2004). Os resultados de marcadores bioquímicos não são necessários antes dessas intervenções e, de fato, podem ser negativos nesse período inicial.

Se o ECG inicial for negativo para um STEMI, a importância dos marcadores cardíacos aumenta. A escolha dos marcadores e os momentos de avaliação variam entre as instituições, mas existe uma concordância geral de que a cTn (seja a I ou a T) é o marcador preferido para o diagnóstico definitivo (Christenson, 2004; Braunwald, 2002). O momento da coleta de amostras é baseado na cinética do marcador. Por isso, para a cTn, que pode aumentar apenas várias horas após a necrose dos miócitos, uma amostra negativa no momento do atendimento inicial deve ser seguida por uma segunda amostra coletada 6 a 12 horas depois e, possivelmente, pelo menos quando o índice de suspeita for alto, uma terceira amostra deverá ser coletada na 24ª hora. Em centros que enfatizam o diagnóstico precoce, uma amostra no período da 1ª à 4ª hora também pode ser incluída, e ela é útil para incluir um marcador precoce, em geral a mioglobina, mas, possivelmente, isoformas da CK,

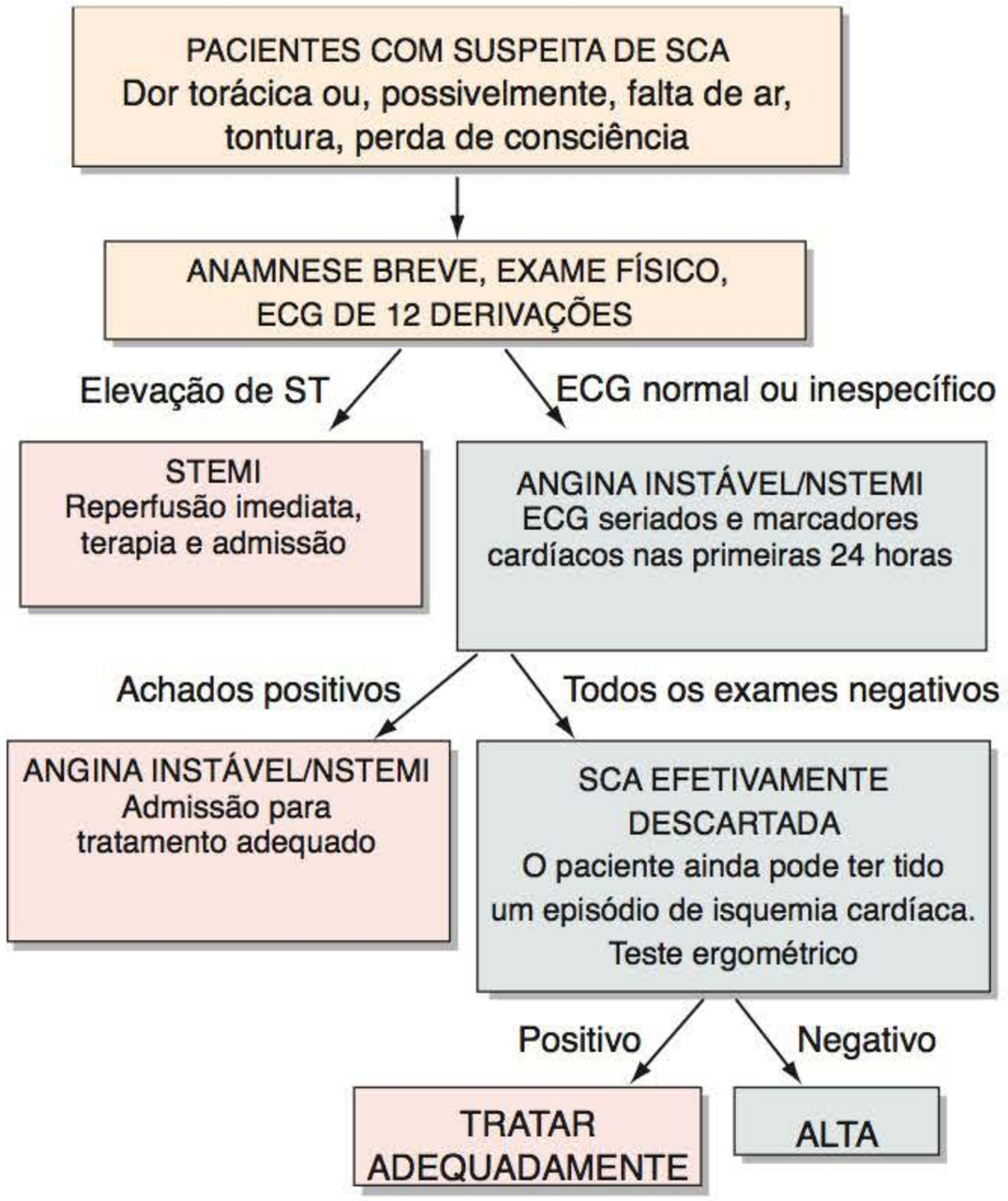


Figura 18.3 Sumário de um algoritmo clínico para tratamento de pacientes que se dirigem a um serviço de emergência com sintomas sugestivos de SCA. O protocolo é genérico, devendo ser personalizado para instituições particulares e utilizado com julgamento clínico adequado. (Adaptado de Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al: Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 107:499-511, 2003.)

nos momentos de avaliação 0 e 1 a 4 horas. O diagnóstico do NSTEMI é estabelecido por um resultado positivo de um marcador biológico com alterações apropriadas ao longo do tempo. Um resultado negativo, mas com alterações eletrocardiográficas de isquemia (depressão do ST e inversão da onda T) ou outras evidências podem estabelecer o diagnóstico de angina instável. Esses dois diagnósticos são tratados de modo similar, possivelmente com uma terapia invasiva de abertura arterial (Braunwald, 2002).

Se os sintomas iniciais do paciente desaparecerem após várias horas e os achados eletrocardiográficos e bioquímicos foram consistentemente negativos, a SCA é descartada por completo. Para uma maior segurança, antes de dar alta ao paciente, um teste provocativo de DCC é com frequência realizado, como um teste ergométrico ou um exame de cintilografia ou um ecocardiograma com estresse (Lindsay, 1998; Farkouh, 1998; Storrow, 2000). Esses exames devem estar rápida e continuamente disponíveis se o serviço de emergência tiver como objetivo uma alta rápida de pacientes de baixo risco. Eles apresentam o inconveniente do custo e do número significativo de resultados falso-positivos ou falso-negativos, dependendo da modalidade do exame escolhido.

Como o tratamento clínico e o fluxo de pacientes no serviço de emergência exigem uma avaliação de risco rápida, o resultado do exame de marcador cardíaco deve estar disponível o quanto antes. Normalmente, aconselha-se que seja considerada a realização do exame no local de atendimento quando o laboratório central não puder fornecer de modo confiável o resultado em no máximo 1 hora. Tanto os exames qualitativos como os quantitativos de marcadores cardíacos são adequados para a realização no local de atendimento, e eles demonstraram ser eficazes (Antman, 1997; Brogan, 1998; Muller-Bardoff, 1999).

Outras aplicações

Exames de marcadores cardíacos são realizados na maioria dos pacientes com SCA, mesmo após o diagnóstico ser estabelecido. Embora como uma prática universal isso possa ser questionado, apresenta alguns benefícios (Christenson, 2004). Pode servir como um indicador não invasivo de que ocorreu reperfusão, seja espontaneamente ou como consequência da terapia. Em consequência do "fenômeno de lavagem", um bolo de proteínas dos miócitos é liberado nos minutos que sucedem a reperfusão, de modo que o sangue coletado nos 60 a 120 minutos seguintes deve apresentar um aumento da concentração do marcador (aumento porcentual ou absoluto) acima do limiar definido. Foi observado que o desempenho da mioglobina é melhor que o da CK-MB ou da cTn para esse propósito (Ishii, 1994; Zabel, 1993; Tanasijevic, 1997), mas, ao contrário da angiografia, as mensurações de marcadores biológicos não conseguem distinguir o grau de oclusão do fluxo.

A concentração dos marcadores após o infarto do miocárdio está correlacionada com o tamanho do infarto, o comprometimento funcional e o prognóstico (Delanghe, 1992; Glatz, 1994; Hackel, 1984; Mair, 1995; Omura, 1995; Panteghini, 2002; Mutlu, 2004). A aplicação clínica é limitada porque as correlações são bem fracas, em especial quando são consideradas mensurações realizadas em um único momento, e a interpretação é enormemente afetada pelo fato de a reperfusão ter ocorrido ou não. A mensuração de marcadores também é útil para a detecção de aproximadamente 17% de pacientes com infarto do miocárdio que apresentam reinfarto precoce (Marmor, 1981). Essa é uma das aplicações na qual a CK-MB parece ser superior à cTN por causa de seu declínio mais rápido após um infarto do miocárdio. A mioglobina também é útil. A cTn pode ser útil para a monitoração e o prognóstico do paciente em outras situações que não sejam uma SCA como, por exemplo, a insuficiência cardíaca (Missov, 1999; Missov, 1997; Del Carlo, 1999), mas ainda não foram definidos protocolos.

O diagnóstico de infarto do miocárdio após procedimentos cirúrgicos (infarto do miocárdio perioperatório) era desafiador na era pré-troponina porque marcadores inespecíficos eram comumente liberados em virtude da lesão de músculo esquelético ou de outros tecidos não cardíacos. A cTn é claramente o marcador de escolha nessa situação, mas se a cirurgia é realizada no coração em si, surge o questionamento da magnitude esperada da liberação de cTn na ausência de complicações. Em um estudo com pacientes submetidos a várias cirurgias cardíacas, 17 deles que apresentaram "eventos cardíacos" definidos no pós-operatório apresentaram valores máximos de cTnI acima de 40 ng/mL, alguns com valores muito mais altos, enquanto somente 3 de 83 pacientes sem eventos apresentaram cTn > 40 ng/mL, a maioria com valores muito mais baixos (Greenson, 2001). Um estudo mais recente observou que a cTnT > 1,26 ng/mL em uma amostra coletada 24 horas após a cirurgia foi associada a um risco 6,3 vezes maior de aparecimento de novas ondas Q (Lehrke, 2004). Em um estudo de pacientes submetidos a revascularização do miocárdio, 69 indivíduos que não apresentaram ondas Q alcançaram um pico mediano de cTnI no pós-operatório de 2,1 ng/mL, comparado com 17 ng/mL naqueles que apresentaram ondas Q. A cardioversão, externa ou interna, não causa ou causa elevação mínima da cTn (Allan, 1997; Gorenek, 2004; Greaves, 1998; Rao, 1998). Intervenções percutâneas podem causar graus menores de elevação que não indicam prognóstico adverso (Shyu, 1998; Attali, 1998; Bertinchant, 1999).

Marcadores de risco coronariano

A DCC é uma doença crônica da idade, e obviamente a abordagem mais desejável é prevenir ou minimizar o seu desenvolvimento. Conforme resumido na seção Aspectos Gerais, o conhecimento das causas da DCC ainda é incompleto e, por essa razão, até o momento não se tem as medidas preventivas definitivas. Contudo, muitas linhas de evidência, sendo a mais importante grandes estudos epidemiológicos, identificaram vários fatores de risco associados à DCC. A maioria desses fatores de risco refere-se não apenas ao coração, mas também aos processos de aterosclerose e/ou trombose. Portanto, eles também têm implicações importantes no acidente vascular cerebral e na doença vascular periférica.

Os principais fatores de risco clínicos da DCC (não relacionados aos exames laboratoriais) estão resumidos na Tabela 18.2. Dos fatores de risco que podem ser determinados pelo laboratório clínico, o mais precocemente identificado e ainda um dos mais importantes é o colesterol sérico. Na realidade, ele é a fração do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual geralmente contém cerca de 70% do colesterol total circulante, que está diretamente associada ao risco. A fração de lipoproteína de alta densidade (HDL) é de fato um fator de risco negativo. A outra classe importante de lipídeos comumente mensurada no plasma, os triglicerídeos, foi um assunto controverso, mas ela é atualmente aceita como um fator de risco importante. O exame de lipídeos e a sua relação com a avaliação de risco de DCC foram discutidos no Capítulo 17.

Além dos lipídeos, uma ampla gama de constituintes plasmáticos foi relacionada ao risco de DCC. Eles incluem vários nutrientes, hormônios, fatores de coagulação, fármacos, toxinas, oxidantes, antioxidantes e marcadores de inflamação ou infecção. Neste capítulo, somente dois marcadores que parecem ser relativamente importantes serão discutidos: a proteína C reativa e a homocisteína.

Proteína C reativa

Isolada pela primeira vez em 1930 do plasma de pacientes com pneumonia pneumocócica, a proteína C reativa foi assim denominada porque ela se liga ao polissacarídeo C do pneumococo. Posteriormente, foi observado que a proteína aparecia no plasma durante muitas condições infecciosas ou inflamatórias, e a proteína C reativa era o *reagente da fase aguda* original. Estudos moleculares modernos determinaram que a proteína C reativa é um membro da família da proteína *pentraxina*. Ela possui cinco protômeros, cada um com 206 aminoácidos e peso molecular de 23 kDa, dispostos em simetria cíclica. Com a participação de íons Ca^{2+}, ela liga várias proteínas e fosfolipídeos, particularmente a fosfocolina. Ela opsoniza partículas e também ativa o complemento pela via clássica, mas a sua função biológica real é desconhecida (Black, 2004; Szalai, 1999).

No plasma de indivíduos normais, a concentração média da proteína C reativa é de aproximadamente 1 mg/L e o 99º percentil é de aproximadamente 10 mg/L. Em indivíduos com doença aguda, citocinas (principalmente a interleucina-6) estimulam a produção hepática de proteína C reativa, e o nível plasmático aumenta para 300 mg/L ou mais. A proteína C reativa plasmática aumenta em vários distúrbios, incluindo a maioria das infecções bacterianas, mas comumente não aumenta em infecções virais. O infarto do miocárdio está entre as doenças agudas associadas a uma elevação do nível plasmático de proteína C reativa (de Beer, 1982).

Nos últimos anos, muitos estudos epidemiológicos estabeleceram que indivíduos com níveis basais mais altos de proteína C reativa plasmática apresentam um maior risco de DCC e acidente vascular cerebral. No relativamente antigo Physician Health Study, que envolveu 22.000 médicos norte-americanos do sexo masculino para investigar os efeitos cardioprotetores da aspirina e do betacaroteno, a média da proteína C reativa plasmática foi de 1,51 mg/L em participantes que sofreram infarto do miocárdio, 1,38 mg/L naqueles que sofreram um acidente vascular cerebral e de 1,13 mg/L nos controles que não sofreram qualquer distúrbio vascular (Ridker, 1997). No estudo maior e mais recente realizado em Reykjavik, o valor basal médio da proteína C reativa foi de 1,75 mg/L em participantes que sofreram um infarto do miocárdio *versus* 1,25 mg/L naqueles que não sofreram qualquer distúrbio vascular (Danesh, 2004). Geralmente, achados similares, resumidos em uma meta-análise de 2004, foram relatados em 20 outros estudos epidemiológicos, embora o grau de risco independente associado à proteína C reativa tenha variado (Danesh, 2004). Um relatório no Women's Health Study sugeriu que a proteína C reativa de fato era mais preditiva que o LDL-colesterol (Ridker, 2002), enquanto os investigadores do estudo de Reykjavik relataram que a proteína C reativa era menos preditiva que o colesterol total, o tabagismo ou a pressão arterial sistólica. Diferenças podem estar relacionadas com a natureza da população estudada e com os meios de correção de fatores de risco tradicionais.

A elevação da proteína C reativa plasmática indicada anteriormente, que confere um risco coronariano maior, é mínima quando comparada com o aumento de 100 a 1.000 vezes que ocorre em doenças inflamatórias ou infecciosas francas. Por essa razão, o exame da proteína C reativa

relacionado ao risco cardíaco recebeu o nome um tanto enganador de "proteína C reativa de alta sensibilidade" (do inglês, *high-sensitivity C reactive protein,* hsCRP). Na verdade, mesmo em concentrações de aproximadamente 1 mg/L ou menos, a proteína C reativa é uma proteína plasmática relativamente abundante, não exigindo as técnicas mais sensíveis para uma mensuração adequada. Métodos como o nefelométrico, que foi estabelecido para mensurar a proteína C reativa como um marcador inflamatório, foram rapidamente adaptados para mensurar a "hsCRP", as principais diferenças são o grau de diluição e a calibragem. Ensaios comerciais de hsCRP apresentam uma precisão adequada, e a estabilidade a longo prazo da hsCRP nos pacientes parece ser comparável ao de outros fatores de risco como, por exemplo, hipertensão arterial e colesterol (Danesh, 2004).

Embora várias evidências apontem para um papel da inflamação na DCC (Paoletti, 2004), ainda não foi estabelecido um mecanismo preciso para a relação entre a proteína C reativa plasmática e o risco de DCC. Uma questão fundamental que ainda não foi solucionada é se a elevação dessa proteína é uma causa ou uma consequência da doença (ou possivelmente ambas). A resposta inflamatória associada a lesões ateroscleróticas pode desencadear uma produção suficiente de citocina para ser associada a um aumento mensurável da proteína C reativa plasmática. Por sua vez, a proteína aumenta a vulnerabilidade da placa ou tem outros efeitos que pioram a gravidade da DCC por meio de seus efeitos anti-inflamatórios. A presença de proteína C reativa em lesões ateromatosas humanas foi demonstrada (Reynolds, 1987), e, em ratos, foi demonstrado que a injeção de proteína C reativa humana após a ligadura da artéria coronária aumenta o tamanho do infarto (Griselli, 1999). Uma outra possibilidade intrigante é que o risco associado à proteína C reativa está relacionado com a produção de citocina pelos adipócitos e que essa proteína é essencialmente um marcador bioquímico da síndrome metabólica recentemente reconhecida e discutida no Capítulo 17 (Ridker, 2004b; Yudkin, 1999).

Considerando-se as variações da estimativa de risco quantitativa, o papel obscuro da proteína C reativa na patogênese da doença vascular e a ausência de tratamento específico para a proteína C reativa alta, a utilidade do exame de hsCRP em pacientes individuais é controversa. Um comitê do Centers for Disease Control and Prevention e da American Heart Association publicaram recomendações em 2003, algumas das quais estão apresentadas na Tabela 18.3.

Tabela 18.3 Recomendações da Joint Committee of the American Heart Association and the Centers for Disease Control and Prevention sobre a proteína C reativa para avaliar o risco de DCC (Pearson, 2003)

- Se marcadores inflamatórios tiverem que ser utilizados na avaliação da DCC, a hs-CRP é o analito de escolha atual.
- Preferencialmente, o resultado da hs-CRP deve ser a média de duas amostras coletadas com um intervalo de aproximadamente duas semanas. Se um nível > 10 mg/L for identificado, deve ser realizada uma busca de uma causa óbvia de infecção ou inflamação. Esse resultado deve então ser descartado e um outro exame deve ser realizado duas semanas mais tarde.
- Os intervalos de decisão são: < 1 mg/L, baixo risco; 1–3 mg/L, risco intermediário; > 3 mg/L, alto risco (correspondendo aproximadamente a tercis na população adulta).
- Os pacientes que podem ser beneficiados com um exame de hs-CRP são aqueles cuja estimativa de risco, a partir de fatores estabelecidos, é moderada (i. e., risco de aproximadamente 10–20% de sofrer uma DCC nos próximos 10 anos) e cujo médico deseja informações adicionais para orientar a terapia preventiva.
- O papel da hs-CRP na prevenção secundária (i. e., prevenção da progressão da doença em pacientes com DCC estabelecida) é limitado, pois é improvável que ela altere o tratamento (o qual deve ser agressivo, independentemente das informações adicionais fornecidas pela proteína C reativa ou por outros marcadores).
- A investigação universal da hs-CRP na população adulta não é justificada.

Homocisteína

A homocisteína (Fig. 18.4) é um aminoácido que contém enxofre que não é incorporado na proteína, mas é um intermediário metabólico. Ela pode ser metilada para formar a metionina ou convertida pela via da transsulfuração em cistantiona e, a seguir, em cisteína. A homocisteína pode existir no plasma como espécies com um grupo sulfidrila livre, como um dissulfeto (homocistina) ou como um dissulfeto misto, ligadas a uma proteína plasmática via um de seus resíduos de cisteína (tHcy). É uma soma delas que pode ser designada homocisteína total ou homocisteína, que é geralmente mensurada.

O nível excessivo de homocisteína circulante em geral reflete um nível diminuído de uma das enzimas envolvidas em seu metabolismo. A síndrome clássica da homocistinúria, primeiramente descrita em 1962 (Carson, 1962; Gerritsen, 1962), se dá em função de um defeito homozigótico da enzima cistationina-β-sintase. Ela acarreta um nível circulante muito alto das várias formas de homocisteína e de medionina. As manifestações clínicas incluem a luxação das lentes, osteoporose com anormalidades esqueléticas associadas, retardo mental, distúrbios psiquiátricos e doença tromboembólica, incluindo a DCC (Yap, 2003).

A base dos efeitos lesivos da homocisteína é incerta. No nível bioquímico, o estresse oxidativo e a inibição de reações de transmetilação são possibilidades prováveis. Os efeitos celulares que foram documentados em estudos experimentais incluem: lesão endotelial, alteração do metabolismo do NO, ativação plaquetária e proliferação de músculo liso (Thambyrajah, 2000). Parte da toxicidade da homocisteína pode ser originária da conversão enzimática em homocisteína tiolactona (Fig. 18.4), a qual pode modificar a LDL e aumentar a sua captação pelos macrófagos (McCully, 1993; Vignini, 2004).

O desenvolvimento da homocisteína como marcador de risco de DCC é, de alguma maneira, paralelo ao do colesterol: a recorrência regular da aterosclerose em indivíduos com elevação maciça, em decorrência de um erro inato do metabolismo, levou à hipótese do aumento do risco em indivíduos com elevações mais moderadas. De maneira experimental, a hiper-homocisteinemia induzida em animais apoia a hipótese (McCully, 1993). Em humanos, elevações leves a moderadas de homocisteína podem ter muitas causas. As causas genéticas incluem um defeito heterozigoto de cistationina-β-sintase, um defeito da metionina sintase (raro) ou um defeito da 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase

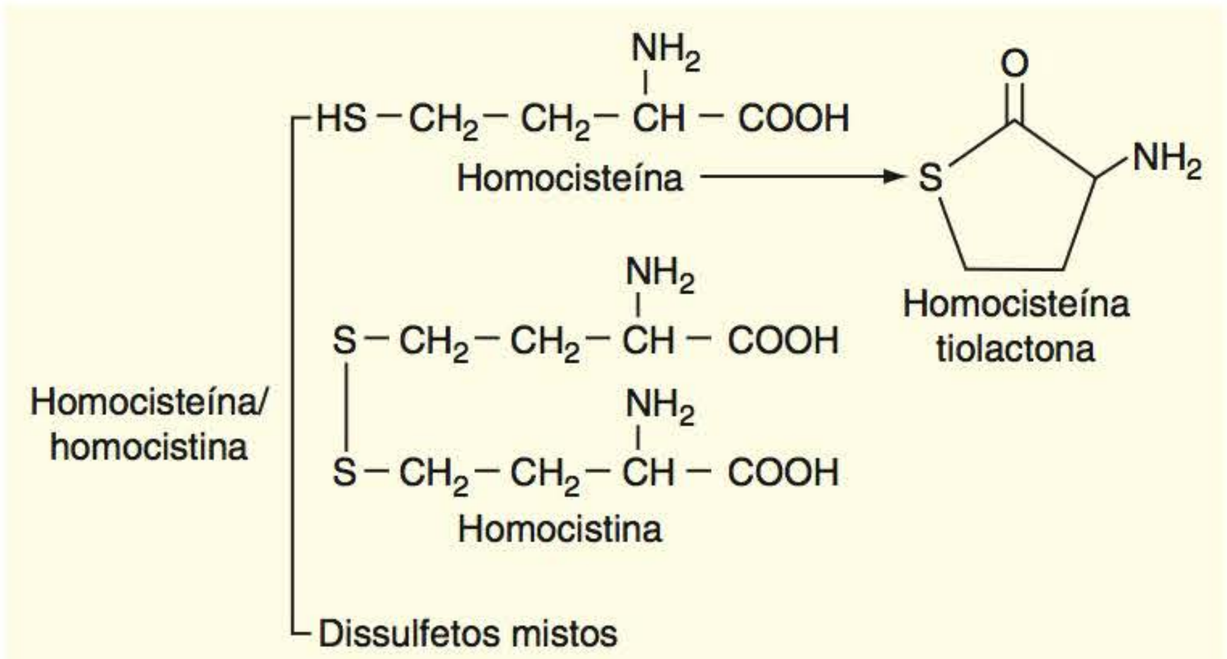


Figura 18.4 Estrutura química da homocisteína e compostos relacionados.

(MTHFR) (em geral raro, excetuando-se uma forma sensível à temperatura que é relativamente comum). As causas nutricionais incluem a deficiência de qualquer cofator vitamínico envolvido no metabolismo da homocisteína: folato, vitamina B_{12} ou piridoxina (vitamina B_6).

Muitos dos primeiros estudos epidemiológicos pareciam confirmar uma correlação entre níveis moderados de homocisteína e DCC. Por exemplo, no Physicians Health Study foi relatado inicialmente que níveis de homocisteína na faixa de mais que 5% da população conferia um risco três a quatro vezes maior (Stampfer, 1992). Contudo, outros estudos, incluindo um acompanhamento de longo prazo do Physicians Health Study (Chasan-Taber, 1996) e muitos dos estudos maiores e mais recentes, demonstraram nenhuma ou uma pequena associação entre a elevação moderada de homocisteína e o risco de DCC. Além disso, a suplementação alimentar disseminada de folato provavelmente tendeu a diminuir o nível médio de homocisteína circulante na população norte-americana, e existem dados esparsos que defendem o efeito cardioprotetor da terapia de redução da homocisteína. Por essas razões, não existe um conselho geral para a investigação disseminada da homocisteína. No entanto, a mensuração da homocisteína pode ser justificada em indivíduos que apresentam DCC apesar de apresentarem um risco relativamente baixo baseado nos fatores de risco tradicionais (Homocysteine Studies Collaboration, 2002; Malinow, 1999; Ridker, 2004a).

A homocisteína tradicionalmente é mensurada por meio de técnicas cromatográficas (Ubbink, 1999; Arndt, 2004; Frick, 2003; Vester, 1991). Um método que utilizou a adenosilação enzimática seguida por imunoensaio foi automatizada no analisador Abbot IMx (Shipchandler, 1995). Além disso, métodos puramente enzimáticos adequados para a automação foram introduzidos (Huijgen, 2004; Roberts, 2004; Tan, 2000). Deve-se atentar à coleta e ao armazenamento adequados da amostra para prevenir um aumento artificial da homocisteína mensurada (Willems, 2004).

Marcadores da insuficiência cardíaca congestiva

Peptídeos natriuréticos cardíacos

O conceito herético de que o coração poderia ser um órgão endócrino foi imposto por dois relatos em 1956: que a insuflação de um balão no interior do átrio esquerdo de um cachorro causou um aumento do fluxo urinário (Henry, 1956); e que estruturas semelhantes a grânulos secretores eram visíveis em microfotografias eletrônicas de células atriais de cobaias (Kisch, 1956). Em 1981, foi observado que extratos de átrios (e não ventrículos) cardíacos de ratos tinham um efeito natriurético (de Bold, 1981), e em 1984 um peptídeo denominado peptídeo natriurético atrial (do inglês, *atrial natriuretic peptide*, ANP) foi isolado do coração humano (Kangawa, 1984). Um pouco mais tarde, um peptídeo similar denominado peptídeo natriurético cerebral (do inglês, *brain natriuretic peptide*, BNP) foi isolado do cérebro de porcos (Sudoh, 1988). Ocorre que, em humanos, o BNP é produzido principalmente no ventrículo cardíaco (Mukoyama, 1991), de modo que, hoje em dia, o hormônio é geralmente designado peptídeo natriurético tipo B.

A Figura 18.5 mostra membros da família do peptídeo natriurético. A sua característica comum notável é a estrutura em anel de 17 aminoácidos, fechado por uma ponte de cistina, com substancial homologia entre os membros da família. O peptídeo natriurético de tipo C (CNP), descrito em 1990, não é produzido no coração e sim nas células endoteliais (Sudoh, 1990). O peptídeo natriurético tipo D (DNP) foi isolado da cobra mamba verde, *Dendoraspis angusticeps* (Schweitz, 1992). A imunorreatividade do DNP foi posteriormente relatada no plasma humano (Schirger, 1999), mas esse peptídeo não foi demonstrado em definitivo no ser humano (Richards, 2002). Por fim, a urodilatina é uma forma de ANP com quatro aminoácidos adicionais no terminal N, sendo provavelmente produzida nos rins pelo *splicing* do mesmo produto genético (Schulz-Knappe, 1988). Tanto o ANP quanto o BNP foram investigados em relação aos testes para a insuficiência cardíaca, e o último provou ser mais útil. Por essa razão, uma discussão mais detalhada será limitada ao sistema do BNP.

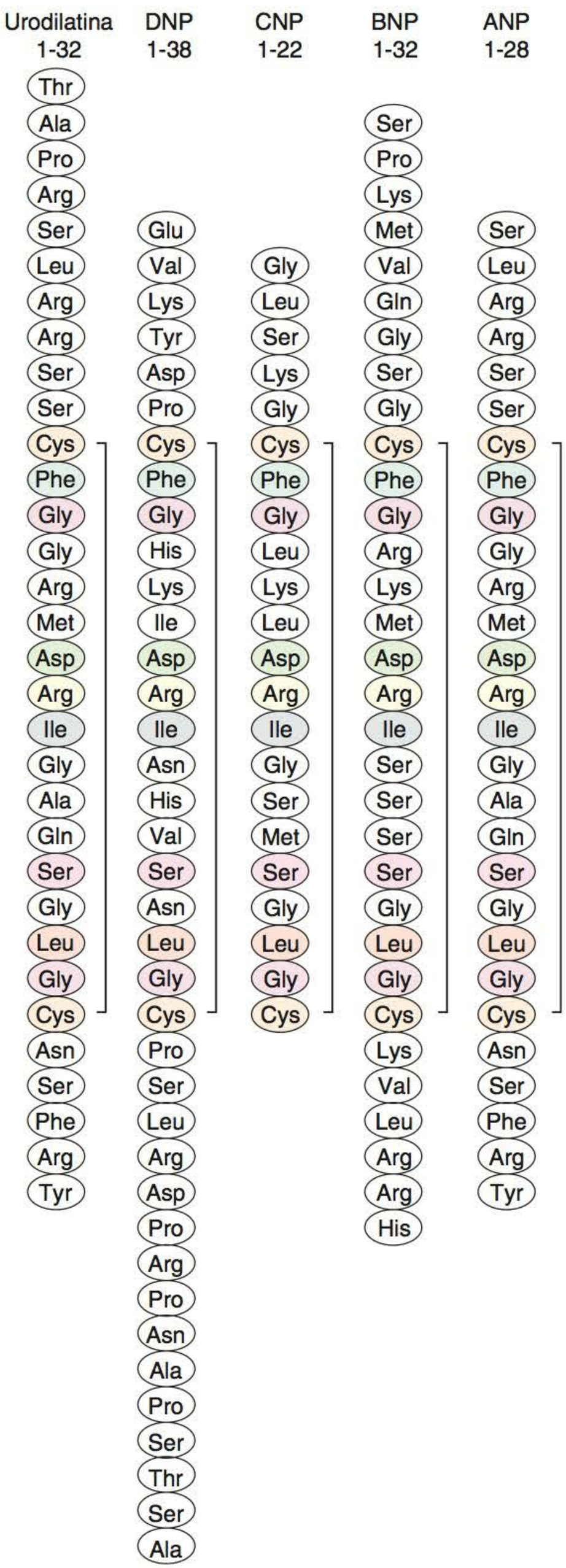


Figura 18.5 Sequência de aminoácidos dos peptídeos natriuréticos. Aminoácidos preservados por meio da família são indicados por cores.

O BNP circulante deriva de um pró-hormônio com 108 aminoácidos, o pró-BNP, que é clivado nos miócitos cardíacos pela endoprotease furina em um fragmento terminal C com 32 aminoácidos, o BNP ativo e um fragmento terminal N inativo, N-BNP ou NT-pró-BNP (Sawada, 1997). A secreção de ambos os fragmentos é aumentada pela distensão da parede ventricular e pela sobrecarga de volume,

como ocorre na insuficiência cardíaca (Tabbibizar, 2002). O BNP é removido da circulação ligando-se a um receptor da depuração e também pela ação de endopeptidases. A sua meia-vida de circulação é de aproximadamente 22 minutos. A meia-vida de circulação do N-BNP é consideravelmente maior (60–120 minutos), e o seu mecanismo de depuração não é bem compreendido.

O BNP e os outros peptídeos natriuréticos exercem seus efeitos por meio de dois tipos de receptores acoplados à proteína G, acarretando liberação do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (c-GMP). Eles infrarregulam o sistema renina-angiotensina-aldosterona, diminuem a atividade nervosa simpática no coração e nos rins, aumentam o fluxo sanguíneo renal e aumentam a excreção de sódio por meio de um efeito direto sobre os tubos coletores renais (Spevack, 2004; Beltowski, 2002).

Os níveis plasmáticos de BNP são inferiores a 100 pg/mL, na maioria dos indivíduos saudáveis; as faixas de referência dependem da idade e do sexo. A aplicação mais bem estabelecida da dosagem de BNP é para o diagnóstico de pacientes agudos que procuram um serviço de emergência com falta de ar. Em alguns casos, é difícil diferenciar a insuficiência cardíaca de doenças pulmonares (p. ex., enfisema) nesses pacientes e, até o momento, não existe um exame laboratorial especificamente aplicável. O estudo multinacional Breathing Not Properly recrutou pacientes que procuraram serviços de emergência com dispneia e utilizou um método de execução do exame no local de atendimento para a mensuração do BNP. Em um ponto de decisão de 100 pg/mL, o exame de BNP tem as seguintes características para o diagnóstico de insuficiência cardíaca: sensibilidade de 90%, especificidade de 76%, valor preditivo positivo (VPP) de 79% e valor preditivo negativo (VPN) de 89% (Maisel, 2002). Entre os pacientes com uma história de disfunção ventricular, o BNP foi mais alto que naqueles cujos sintomas no momento foram considerados como causa da insuficiência cardíaca. Ele também foi mais alto em pacientes com insuficiência cardíaca mais grave (Fig. 18.6).

Muitas outras aplicações possíveis para o exame de BNP foram sugeridas, incluindo a monitoração da evolução e do tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca (Cheng, 2001); estratificação de risco de pacientes com SCA (de Lemos, 2001; Wiviott, 2004; Jernberg, 2004; Omland, 2002); monitoramento da gravidade da doença em pacientes com DCC estável (Weber, 2004); rastreamento de disfunção ventricular em populações selecionadas (Nielsen, 2003; Bay, 2003); e testes de cardiotoxicidade de medicamentos (Okumura, 2000). Um pequeno estudo demonstrou menos eventos adversos em um grupo de pacientes tratados para insuficiência cardíaca com o uso da monitoração do BNP que em um grupo controle tratado sem o uso do exame (Troughton, 2000). No entanto, o benefício pode ter derivado de um ímpeto geral por um tratamento mais agressivo e não de uma informação discriminatória importante fornecida pelo exame (Packer, 2003). Mueller et al. selecionaram aleatoriamente 452 pacientes que procuraram um serviço de emergência com dispneia para uma estratégia diagnóstica com e sem uso de uma dosagem do BNP à beira do leito. A dosagem do BNP pareceu diminuir o período de internação e o custo total do tratamento (Mueller, 2004).

Uma limitação importante do BNP é que uma ampla faixa de valores é observada em pacientes com e sem insuficiência cardíaca, e todos os determinantes do nível de BNP circulante ainda não foram bem estabelecidos. O BNP encontra-se aumentado em condições de desequilíbrio hídrico, excetuando-se a insuficiência cardíaca, particularmente a insuficiência renal, a qual com frequência coexiste com a insuficiência cardíaca (McCullough, 2004). Além disso, pacientes com insuficiência cardíaca sintomática, em especial quando ela é crônica e estável, podem apresentar níveis "normais" (Tang, 2003). A variabilidade intraindividual é relativamente alta. Em um grupo de pacientes com insuficiência cardíaca crônica e estável, a variabilidade semana a semana do BNP e do N-BNP foi de 30 a 40% (Bruins, 2004). Atualmente, parece que o uso mais adequado do exame do BNP é como um exame adjuvante para descartar a insuficiência cardíaca em uma situação aguda. Em outros contextos, ele deveria ser utilizado judiciosamente até que existam mais informações (Cowie, 2003).

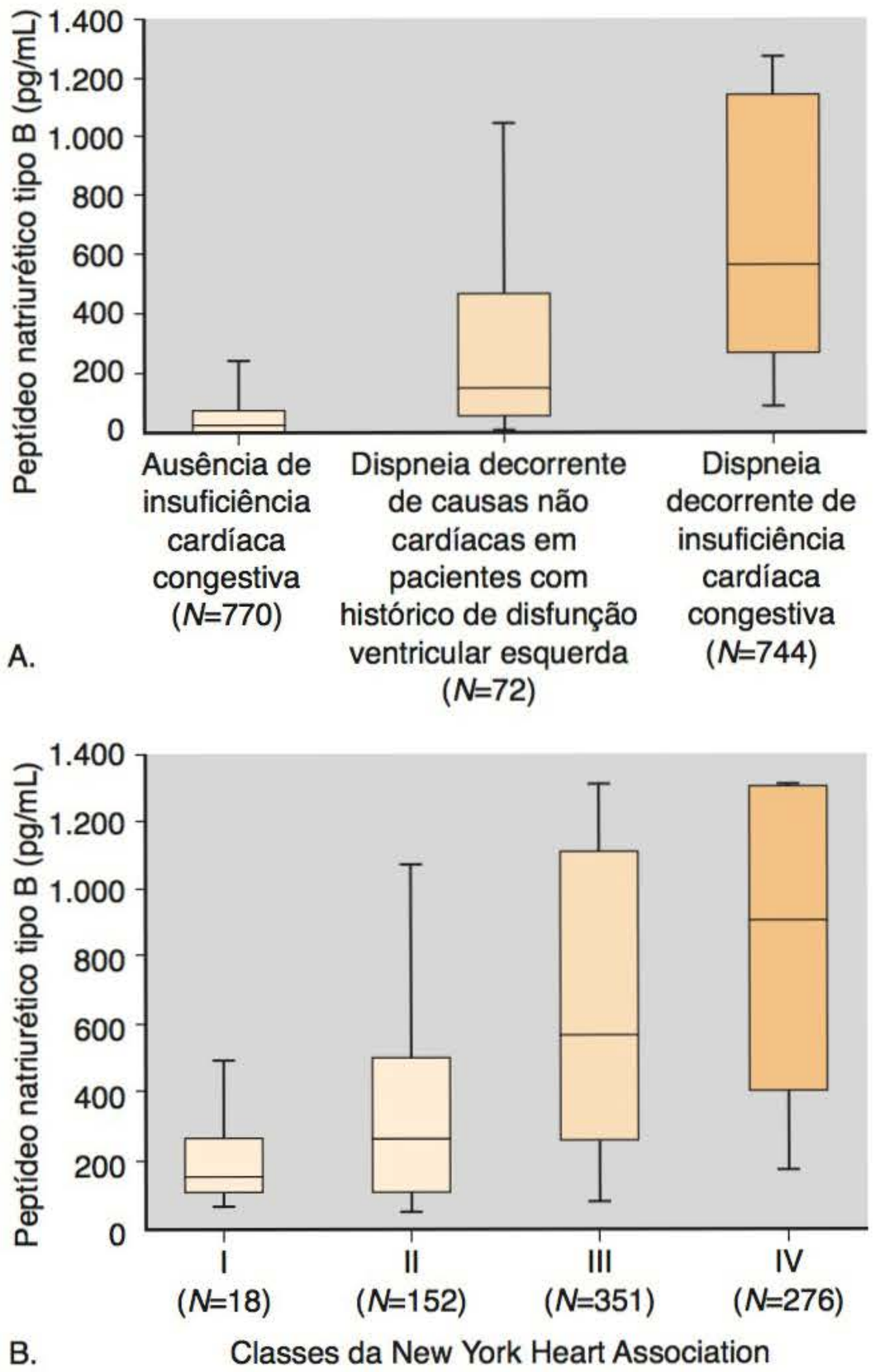


Figura 18.6 Gráficos mostrando níveis médios do peptídeo natriurético tipo B em pacientes atendidos em um serviço de emergência com dispneia, no estudo *Breathing Not Properly*. *A*, pacientes em diferentes categorias diagnósticas. *B*, pacientes com insuficiência cardíaca, classificados de acordo com os critérios da New York Heart Association. Uma classe mais alta indica doença mais grave, evidenciada por uma menor quantidade de atividade necessária para provocar sintomas (American Heart Association, 1994). Os gráficos mostram faixas interquartis, e as barras representam os valores mais altos e mais baixos. (Reproduzido de Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al: Rapide measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Eng J Med 347:161-167, 2002).

O primeiro ensaio para BNP disponível no comércio norte-americano era um imunoensaio que utilizava um instrumento mais adequado para a dosagem no local de atendimento. Mais recentemente, o exame tornou-se disponível para grandes plataformas automatizadas de imunoensaio. Existem ensaios tanto para o BNP quanto para o N-BNP. Uma vantagem clara de um marcador biológico sobre o outro para uma determinada aplicação não foi estabelecida (Hammerer-Lercher, 2001b).

Além de ser um marcador biológico para a insuficiência cardíaca, o BNP possui efeitos natriuréticos, vasodilatadores e outros que melhoram a síndrome, e ele está disponível como o fármaco nesiritida (Natrecor) para o tratamento da insuficiência cardíaca. Em virtude da meia-vida curta do BNP, o nível mensurado várias horas após a sua administração refletiria a secreção endógena. Entretanto, a utilidade da mensuração do BNP no contexto de sua administração terapêutica não foi estabelecida até o momento.

Referências bibliográficas

Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, et al: Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. Annu Rev Med 2000; 51:149–167.

Revisa os mecanismos envolvidos na gênese da DCC.

Allan JJ, Feld RD, Russell AA, et al: Cardiac troponin I levels are normal or minimally elevated after transthoracic cardioversion. J Am Coll Cardiol 1997; 30:1052–1056.

American Heart Association: Classification of functional capacity and objective assessment. American Heart Association. Entered 1994. Online. Available: http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4569 13 October 2004.

American Heart Association: Heart disease and stroke statistics – 2004 update. American Heart Association. Entered 2003. Online. Available: http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1079736729696HDSStats2004UpdateREV3-19-04.pdf 13 October 2004.

Extensa compilação de estatísticas para DCC, IC e outras doenças cardíacas, além do derrame.

Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). Entered 4 August 2004. Online. Available: http://www.acc.org/clinical/guidelines/stemi/index.pdf 13 October 2004.

Diretrizes detalhadas para supervisão do STEMI.

Antman EM, Grudzien C, Mitchell RN, et al: Detection of unsuspected myocardial necrosis by rapid bedside assay for cardiac troponin T. Am Heart J 1997; 133:596–598.

Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, et al: Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med 1996; 335:1342–1349.

Apple FS: Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. Clin Chim Acta 1999; 284:151–159.

Apple FS, Ricchiuti V, Voss EM, et al: Expression of cardiac troponin T isoforms in skeletal muscle of renal disease patients will not cause false-positive serum results by the second generation cardiac troponin T assay. Eur Heart J 1998; 19(Suppl N):N30–N33.

Arndt T, Guessregen B, Hohl A, et al: Total plasma homocysteine measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with use of 96-well plates. Clin Chem 2004; 50:755–757.

Attali P, Aleil B, Petitpas G, et al: Sensitivity and long-term prognostic value of cardiac troponin-I increase shortly after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clin Cardiol 1998; 21:353–356.

Bar-Or D, Curtis G, Rao N, et al: Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. Eur J Biochem 2001; 268:42–47.

Bar-Or D, Lau E, Winkler JV: A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report. J Emerg Med 2000; 19:311–315.

Bay M, Kirk V, Parner J, et al: NT-proBNP: a new diagnostic screening tool to differentiate between patients with normal and reduced left ventricular systolic function. Heart 2003; 89:150–154.

Beltowski J, Wojcicka G: Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. Med Sci Monit 2002; 8:RA39–RA52.

Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, et al: Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). Am J Cardiol 1992; 70:851–858.

Bertinchant JP, Polge A, Ledermann B, et al: Relation of minor cardiac troponin I elevation to late cardiac events after uncomplicated elective successful percutaneous transluminal coronary angioplasty for angina pectoris. Am J Cardiol 1999; 84:51–57.

Beuerle JR, Azzazy HM, Styba G, et al: Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. Clin Chim Acta 2000; 294:115–128.

Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al: Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. Clin Chem 2003; 49:581–585.

Black S, Kushner I, Samols D: C-reactive protein. J Biol Chem 2004; 279(47):48487–48490.

Bock JL, Brogan GX Jr, McCuskey CF, et al: Evaluation of CK-MB isoform analysis for early diagnosis of myocardial infarction. J Emerg Med 1999; 17:75–79.

Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, et al: Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. Clin Chem 1995; 41:1710–1715.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). Entered 2002. Online. Available: http://www.acc.org/clinical/guidelines/unstable/unstable.pdf 8 October 2004.

Diretrizes extensivas para supervisão do NSTEMI.

Brogan GX Jr, Bock JL: Cardiac marker point-of-care testing in the Emergency Department and Cardiac Care Unit. Clin Chem 1998; 44:1865–1869.

Brogan GX Jr, Friedman S, McCuskey C, et al: Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. Ann Emerg Med 1994; 24:665–671.

Brogan GX Jr, Vuori J, Friedman S, et al: Improved specificity of myoglobin plus carbonic anhydrase assay versus that of creatine kinase-MB for early diagnosis of acute myocardial infarction. Ann Emerg Med 1996; 27:22–28.

Bruins S, Fokkema R, Römer JWP, et al: High intraindividual variation of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. Clin Chem 2004; 50:2052–2058.

Bunk DM, Dalluge JJ, Welch MJ: Heterogeneity in human cardiac troponin I standards. Anal Biochem 2000; 284:191–200.

Carson NA, Neill DW: Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch Dis Child 1962; 37:505–513.

Chasan-Taber L, Selhub J, Rosenberg IH, et al: A prospective study of folate and vitamin B6 and risk of myocardial infarction in US physicians. J Am Coll Nutr 1996; 15:136–143.

Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, et al: A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. J Am Coll Cardiol 2001; 37:386–391.

Christenson RH, Apple FS, Cannon CP, et al: Biomarkers of acute coronary syndrome and heart failure. Draft guidelines, Version 2. Entered 2004. Online. Available: http://www.nacb.org/lpmg/card_biomarkers_lmpg_draft.stm 13 October 2004.

Esboço de uma revisão das diretrizes publicadas pela primeira vez em 1999.

Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, et al: Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. Clin Chem 2001; 47:464–470.

Cowie MR, Jourdain P, Maisel A, et al: Clinical applications of B-type natriuretic peptide (BNP) testing. Eur Heart J 2003; 24:1710–1718.

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al: C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. N Engl J Med 2004; 350:1387–1397.

Estudo relativamente amplo do risco coronariano associado à PCR, acompanhado de metanálise.

Dasgupta A, Banerjee SK, Datta P: False positive troponin I in the MEIA assay due to the presence of rheumatoid factors in serum: elimination of this interference by using a polyclonal antisera against rheumatoid factors. Am J Clin Pathol 1999; 112:753–756.

Dasgupta A, Wells A, Biddle DA: Negative interference of bilirubin and hemoglobin in the MEIA troponin I assay but not in the MEIA CK-MB assay. J Clin Lab Anal 2001; 15:76–80.

Datta P, Foster K, Dasgupta A: Comparison of immunoreactivity of five human cardiac troponin I assays toward free and complexed forms of the antigen: implications for assay discordance. Clin Chem 1999; 45:2266–2269.

Davies MJ: The pathophysiology of acute coronary syndromes. Heart 2000; 83:361–366.

de Beer FC, Hind CR, Fox KM, et al: Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. Br Heart J 1982; 47:239–243.

de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci 1981; 28:89–94.

de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al: The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med 2001; 345:1014–1021.

Del Carlo CH, O'Connor CM: Cardiac troponins in congestive heart failure. Am Heart J 1999; 138:646–653.

Delanghe JR, De Buyzere ML, Cluyse LP, et al: Acute myocardial infarction size and myoglobin release into serum. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30:823–830.

el Allaf M., Chapelle JP, el Allaf D, et al: Differentiating muscle damage from myocardial injury by means of the serum creatine kinase (CK) isoenzyme MB mass measurement/total CK activity ratio. Clin Chem 1986; 32:291–295.

Enos WF, Holmes RH, Beyer J: Coronary disease among United States soldiers killed in action in Korea. Preliminary report. JAMA 1953; 152:1090–1093.

Eriksson S, Junikka M, Laitinen P et al: Negative interference in cardiac troponin I immunoassays from a frequently occurring serum and plasma component. Clin Chem 2003; 49:1095–1104.

Farkouh ME, Smars PA, Reeder GS, et al: A clinical trial of a chest-pain observation unit for patients with unstable angina. Chest Pain Evaluation in the Emergency Room (CHEER) Investigators. N Engl J Med 1998; 339:1882–1888.

Fitzmaurice TF, Brown C, Rifai N, et al: False increase of cardiac troponin I with heterophilic antibodies. Clin Chem 1998; 44:2212–2214.

Frick B, Schrocksnadel K, Neurauter G, et al: Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. Clin Chim Acta 2003; 331:19–23.

Galambos C, Brink DS, Ritter D, et al: False-positive plasma troponin I with the AxSYM analyzer. Clin Chem 2000; 46:1014–1015.

Gao WD, Atar D, Liu Y, et al: Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. Circ Res 1997; 80:393–399.

George S, Ishikawa Y, Perryman MB, et al: Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. J Biol Chem 1984; 259:2667–2674.

Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA: The identification of homocystine in the urine. Biochem Biophys Res Commun 1962; 9:493–496.

Glatz JF, Kleine AH, Van Nieuwenhoven FA, et al: Fatty-acid-binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans. Br Heart J 1994; 71:135–140.

Gomes AV, Potter JD: Molecular and cellular aspects of troponin cardiomyopathies. Ann N Y Acad Sci 2004; 1015:214–224.

Gorenek B, Kudaiberdieva G, Goktekin O, et al: Detection of myocardial injury after internal cardioversion for atrial fibrillation. Can J Cardiol 2004; 20:165–168.

Greaves K, Crake T: Cardiac troponin T does not increase after electrical cardioversion for atrial fibrillation or atrial flutter. Heart 1998; 80:226–228.

Greenson N, Macoviak J, Krishnaswamy P, et al: Usefulness of cardiac troponin I in patients undergoing open heart surgery. Am Heart J 2001; 141:447–455.

Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, et al: C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. J Exp Med 1999; 190:1733–1740.

Hackel DB, Reimer KA, Ideker RE, et al: Comparison of enzymatic and anatomic estimates of myocardial infarct size in man. Circulation 1984; 70:824–835.

Hamm CW, Goldmann BU, Heeschen C, et al: Emergency room triage of patients with acute chest pain by means

of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. N Engl J Med 1997; 337:1648–1653.
Hamm CW, Heeschen C, Goldmann B, et al: Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels. c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina (CAPTURE) Study Investigators. N Engl J Med 1999; 340:1623–1629.
Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al: The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. N Engl J Med 1992 327:146–150.
Hammerer-Lercher A, Erlacher P, Bittner R, et al: Clinical and experimental results on cardiac troponin expression in Duchenne muscular dystrophy. Clin Chem 2001a; 47:451–458.
Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Muller S, et al: Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. Clin Chim Acta 2001b; 310:193–197.
Heloire F, Weill B, Weber S, et al: Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. Thrombosis Research 2003; 110:173–180.
Henry JP, Pearce JW: The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. J Physiol 1956; 131:572–585.
Hess JW, MacDonald RP: Serum creatine phosphokinase activity. A new diagnostic aid in myocardial and skeletal muscle disease. J Mich State Med Soc 1963; 62:1095–1099.
Homocysteine Studies Collaboration: Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. JAMA 2002; 288:2015–2022.
Huijgen HJ, Tegelaers FP, Schoenmakers CH, et al: Multicenter analytical evaluation of an enzymatic method for the measurement of plasma homocysteine and comparison with HPLC and immunochemistry. Clin Chem 2004; 50:937–941.
Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, et al: The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. N Engl J Med 1985; 313:1050–1054.
Ishii J, Nomura M, Ando T, et al: Early detection of successful coronary reperfusion based on serum myoglobin concentration: Comparison with serum creatine kinase isoenzyme MB activity. Am Heart J 1994; 128:641–648.
Jaffe AS, Katus H: Acute coronary syndrome biomarkers: the need for more adequate reporting. Circulation 2004; 110:104–106.
Jernberg T, James S, Lindahl B, et al: Natriuretic peptides in unstable coronary artery disease. Eur Heart J 2004; 25:1486–1493.
Johnston CC, Bolton EC: Cardiac enzymes. Ann Emerg Med 1982; 11:27–35.
Joint Committee: Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2000; 36:959–969.
Este documento modificou os "critérios da OMS" para diagnóstico do IM, há muito estabelecidos, utilizando a liberação definitiva de troponina cardíaca como base do diagnóstico do IM.
Joint Task Force: Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. Circulation 1979; 59:607–609.
Kangawa K, Matsuo H: Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). Biochem Biophys Res Commun 1984; 118:131–139.
Kao JT, Wong IL, Lee JY, et al: Comparison of Abbott AxSYM, Behring Opus Plus, DPC Immulite and Ortho-Clinical Diagnostics Vitros ECi for measurement of cardiac troponin I. Ann Clin Biochem 2001; 38:140–146.
Karcz A, Korn R, Burke MC, et al: Malpractice claims against emergency physicians in Massachusetts: 1975–1993. Am J Emerg Med 1996; 14:341–345.
Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, et al: Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. Clin Chem 1998; 44:2433–2440.
Katus HA, Diederich KW, Hoberg E, et al: Circulating cardiac myosin light chains in patients with angina at rest: identification of a high risk subgroup. J Am Coll Cardiol 1988; 11:487–493.
Kisch B: Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. Exp Med Surg 1956; 14:99–112.
Krause EG, Rabitzsch G, Noll F, et al: Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischaemic injury and infarction. Mol Cell Biochem 1996; 160–161:289–295.
Labugger R, Organ L, Collier C, et al: Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. Circulation 2000; 102:1221–1226.
LaDue JS, Wróblewski F, Karmen A: Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. Science 1954; 120:497–499.
Lang K, Borner A, Figulla HR: Comparison of biochemical markers for the detection of minimal myocardial injury: superior sensitivity of cardiac troponin – T ELISA. J Intern Med 2000; 247:119–123.
Lee TH, Goldman L: Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. Ann Intern Med 1986; 105:221–233.
Lehrke S, Steen H, Sievers HH, et al: Cardiac troponin T for prediction of short- and long-term morbidity and mortality after elective open heart surgery. Clin Chem 2004; 50:1560–1567.
Lindahl B, Venge P, Wallentin L: Troponin T identifies patients with unstable coronary artery disease who benefit from long-term antithrombotic protection. Fragmin in Unstable Coronary Artery Disease (FRISC) Study Group. J Am Coll Cardiol 1997; 29:43–48.
Lindsay J Jr, Bonnet YD, Pinnow EE: Routine stress testing for triage of patients with chest pain: is it worth the candle? Ann Emerg Med 1998; 32:600–603.
Luscher MS, Thygesen K, Ravkilde J, et al: Applicability of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease. TRIM Study Group. Thrombin Inhibition in Myocardial ischemia. Circulation 1997; 96:2578–2585.
McCullough P, Joseph K, Mathur VS: Diagnostic and therapeutic utility of B-type natriuretic peptide in patients with renal insufficiency and decompensated heart failure. Rev Cardiovasc Med 2004; 5:16–25.
McCully KS: Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. Ann Clin Lab Sci 1993; 23:477–493.
Mair J: Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians. Crit Rev Clin Lab Sci 1997; 34:1–66.
Embora faltem algumas informações, é fornecida uma revisão relativamente completa da bioquímica dos marcadores cardíacos.
Mair J, Artner-Dworzak E, Dienstl A, et al: Early detection of acute myocardial infarction by measurement of mass concentration of creatine kinase-MB. Am J Cardiol 1991; 68:1545–1550.
Mair J, Wagner I, Morass B, et al: Cardiac troponin I release correlates with myocardial infarction size. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33:869–872.
Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al: Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med 2002; 347:161–167.
Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM: Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. Circulation 1999; 99:178–182.
Marmor A, Margolis T, Alpan G, et al: Regional distribution of the MB isoenzyme of creatine kinase in the human heart. Arch Pathol Lab Med 1980; 104:425–427.
Marmor A, Sobel BE, Roberts R: Factors presaging early recurrent myocardial infarction ('extension'). Am J Cardiol 1981; 48:603–610.
Missov E, Calzolari C, Pau B: Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. Circulation 1997; 96:2953–2958.
Missov E, Mair J: A novel biochemical approach to congestive heart failure: cardiac troponin T. Am Heart J 1999; 138:95–99.
Montague C, Kircher T: Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain. Am J Clin Pathol 1995; 104:472–476.
Morjana NA: Degradation of human cardiac troponin I after myocardial infarction. Biotechnol Appl Biochem 1998; 28(Pt 2):105–111.
Morrow DA: Troponins in patients with acute coronary syndromes: biologic, diagnostic, and therapeutic implications. Cardiovasc Toxicol 2001; 1:105–110.
Morrow DA, Antman EM, Tanasijevic M, et al: Cardiac troponin I for stratification of early outcomes and the efficacy of enoxaparin in unstable angina: a TIMI-11B substudy. J Am Coll Cardiol 2000; 36:1812–1817.
Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, et al: Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. N Engl J Med 2004; 350:647–654.
Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, et al: Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. J Clin Invest 1991; 87:1402–1412.
Muller-Bardorff M, Hallermayer K, Schroder A, et al: Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation. Clin Chem 1997; 43:458–466.
Muller-Bardorff M, Rauscher T, Kampmann M, et al: Quantitative bedside assay for cardiac troponin T: a complementary method to centralized laboratory testing. Clin Chem 1999; 45:1002–1008.
Mutlu B, Yilmaz A, Sonmez K, et al: Prognostic importance of predischarged troponin T levels in acute anterior myocardial infarction. Jpn Heart J 2004; 45:43–52.
National Cholesterol Education Program Expert Panel: Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. Bethesda, MD, National Institutes of Health, 2002. Online. Available: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf 13 October 2004.
Newby LK, Ohman EM, Christenson RH, et al: Benefit of glycoprotein IIb/IIIa inhibition in patients with acute coronary syndromes and troponin T-positive status: the PARAGON-B troponin T substudy. Circulation 2001; 103:2891–2896.
Newman DJ, Olabiran Y, Bedzyk WD, et al: Impact of antibody specificity and calibration material on the measure of agreement between methods for cardiac troponin I. Clin Chem 1999; 45:822–828.
Nielsen OW, McDonagh TA, Robb SD, et al: Retrospective analysis of the cost-effectiveness of using plasma brain natriuretic peptide in screening for left ventricular systolic dysfunction in the general population. J Am Coll Cardiol 2003; 41:113–120.
Nosanchuk JS, Combs B, Abbott G: False increases of troponin I attributable to incomplete separation of serum. Clin Chem 1999; 45:714.
Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, et al: Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. Acta Haematol 2000; 104:158–163.
Omland T, Persson A, Ng L, et al: N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. Circulation 2002; 106:2913–2918.
Omura T, Teragaki M, Takagi M, et al: Myocardial infarct size by serum troponin T and myosin light chain 1 concentration. Jpn Circ J 1995; 59:154–159.
Packer M: Should B-type natriuretic peptide be measured routinely to guide the diagnosis and management of chronic heart failure? Circulation 2003; 108:2950–2953.
Panteghini M, Pagani F: Biological variation of myoglobin in serum. Clin Chem 1997; 43:2435.
Panteghini M, Cuccia C, Bonetti G, et al: Single-point cardiac troponin T at coronary care unit discharge after myocardial infarction correlates with infarct size and ejection fraction. Clin Chem 2002; 48:1432–1436.
Panteghini M, Pagani F, Yeo KT, et al: Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. Clin Chem 2004; 50:327–332.
Paoletti R, Gotto AM Jr, Hajjar DP: Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. Circulation 2004; 109:III20–III26.
Discute o papel da inflamação na DCC.
Parry DM, Krahn J, Leroux M, et al: False positive analytical interference of cardiac troponin I assays: an important consideration for method selection. Clin Biochem 1999; 32:667–669.
Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al: Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 2003; 107:499–511.

Polanczyk CA, Lee TH, Cook EF, et al: Cardiac troponin I as a predictor of major cardiac events in emergency department patients with acute chest pain. J Am Coll Cardiol 1998; 32:8–14.

Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, et al: Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. N Engl J Med 2000; 342:1163–1170.

Priori SG, Napolitano C: Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. Ann N Y Acad Sci 2004; 1015:96–110.

Puleo PR, Meyer D, Wathen C, et al: Use of a rapid assay of subforms of creatine kinase-MB to diagnose or rule out acute myocardial infarction. N Engl J Med 1994; 331:561–566.

Rabitzsch G, Mair J, Lechleitner P, et al: Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. Clin Chem 1995; 41:966–978.

Rao AC, Naeem N, John C, et al: Direct current cardioversion does not cause cardiac damage: evidence from cardiac troponin T estimation. Heart 1998; 80:229–230.

Ravkilde J, Botker HE, Sogaard P, et al: Human ventricular myosin light chain isotype 1 as a marker of myocardial injury. Cardiology 1994; 84:135–144.

Ravkilde J, Nissen H, Horder M, et al: Independent prognostic value of serum creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T and myosin light chain levels in suspected acute myocardial infarction. Analysis of 28 months of follow-up in 196 patients. J Am Coll Cardiol 1995; 25:574–581.

Reynolds GD, Vance RP: C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:265–269.

Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, et al: *Dendroaspis* natriuretic peptide: endogenous or dubious? Lancet 2002; 359:5–6.

Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, et al: Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. Circulation 2004a; 109:IV6–19.

Revisão concisa de muitos fatores de risco estabelecidos e propostos para DCC.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al: Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med 1997; 336:973–979.

Um dos principais estudos, destinado a estabelecer a PCR como fator de risco para DCC.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. N Engl J Med 2002; 347:1557–1565.

Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM: Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? Circulation 2004b, 109:2818–2825.

Roberts RF, Roberts WL: Performance characteristics of a recombinant enzymatic cycling assay for quantification of total homocysteine in serum or plasma. Clin Chim Acta 2004; 344:95–99.

Roberts WL, Calcote CB, De BK, et al: Prevention of analytical false-positive increases of cardiac troponin I on the Stratus II analyzer. Clin Chem 1997; 43:860–861.

Roe CR: Diagnosis of myocardial infarction by serum isoenzyme analysis. Ann Clin Lab Sci 1977; 7:201–209.

Roongsritong C, Warraich I, Bradley C: Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: incidence and clinical significance. Chest 2004; 125:1877–1884.

Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993; 362:801–809.

Discussão da patogênese da DCC.

Roy D, Quiles J, Aldama G, et al: Ischemia modified albumin for the assessment of patients presenting to the emergency department with acute chest pain but normal or non-diagnostic 12-lead electrocardiograms and negative cardiac troponin T. Int J Cardiol 2004; 97:297–301.

Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, et al: Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. J Biol Chem 1997; 272:20545–20554.

Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, et al: Presence of *Dendroaspis* natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. Mayo Clin Proc 1999; 74:126–130.

Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, et al: Isolation and structural analysis of 'urodilatin,' a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. Klin Wochenschr 1988; 66:752–759.

Schweitz H, Vigne P, Moinier D, et al: A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). J Biol Chem 1992; 267:13928–13932.

Shi Q, Ling M, Zhang X, et al: Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. Clin Chem 1999; 45:1018–1025.

Shipchandler MT, Moore EG: Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. Clin Chem 1995; 41:991–994.

Shyu KG, Kuan PL, Cheng JJ, et al: Cardiac troponin T, creatine kinase, and its isoform release after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty with or without stenting. Am Heart J 1998; 135:862–867.

Sinha MK, Roy D, Gaze DC, et al: Role of 'ischemia modified albumin,' a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. Emerg Med J 2004; 21:29–34.

Spevack DM, Schwartzbard A: B-type natriuretic peptide measurement in heart failure. Clin Cardiol 2004; 27:489–494.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. JAMA 1992; 268:877–881.

Stampfer MJ, Ridker PM, Dzau VJ: Risk factor criteria. Circulation 2004; 109:IV3–IV5.

Storrow AB, Gibler WB: Chest pain centers: diagnosis of acute coronary syndromes. Ann Emerg Med 2000; 35:449–461.

Strong JP, Malcom GT, McMahan CA et al: Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. JAMA 1999; 281:727–735.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al: A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature 1988; 332:78–81.

Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, et al: C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. Biochem Biophys Res Commun 1990; 168:863–870.

Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, et al: C-reactive protein: structural biology and host defense function. Clin Chem Lab Med 1999; 37:265–270.

Tabbibizar R, Maisel A: The impact of B-type natriuretic peptide levels on the diagnoses and management of congestive heart failure. Curr Opin Cardiol 2002; 17:340–345.

Tan Y, Tang L, Sun X, et al: Total-homocysteine enzymatic assay. Clin Chem 2000; 46:1686–1688.

Tanasijevic MJ, Cannon CP, Wybenga DR, et al: Myoglobin, creatine kinase MB, and cardiac troponin-I to assess reperfusion after thrombolysis for acute myocardial infarction: results from TIMI 10A. Am Heart J 1997; 134:622–630.

Tang WH, Girod JP, Lee MJ, et al: Plasma B-type natriuretic peptide levels in ambulatory patients with established chronic symptomatic systolic heart failure. Circulation 2003; 108:2964–2966.

Tate JR, Heathcote D, Rayfield J, et al: The lack of standardization of cardiac troponin I assay systems. Clin Chim Acta 1999; 284:141–149.

Taylor MR, Carniel E, Mestroni L: Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:99–113.

Thambyrajah J, Townend JN: Homocysteine and atherothrombosis – mechanisms for injury. Eur Heart J 2000; 21:967–974.

Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, et al: Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. Lancet 2000; 355:1126–1130.

Tucker JF, Collins RA, Anderson AJ, et al: Value of serial myoglobin levels in the early diagnosis of patients admitted for acute myocardial infarction. Ann Emerg Med 1994; 24:704–708.

Tzvetanova E: Creatine kinase isoenzymes in muscle tissue of patients with neuromuscular diseases and human fetuses. Enzyme 1971; 12:279.

Ubbink JB, Delport R, Riezler R, et al: Comparison of three different plasma homocysteine assays with gas chromatography–mass spectrometry. Clin Chem 1999; 45:670–675.

Uji Y, Sugiuchi H, Okabe H: Measurement of human ventricular myosin light chain-1 by monoclonal solid-phase enzyme immunoassay in patients with acute myocardial infarction. J Clin Lab Anal 1991; 5:242–246.

Väänänen A, Syrjälä H, Rahkila P, et al: Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction. Clin Chem 1990; 36:635–638.

Van Nieuwenhoven FA, Kleine AH, Wodzig WH, et al: Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein. Circulation 1995; 92:2848–2854.

Venge P, Johnston N, Lagerqvist B, et al: Clinical and analytical performance of the liaison cardiac troponin I assay in unstable coronary artery disease, and the impact of age on the definition of reference limits. A FRISC-II substudy. Clin Chem 2003; 49:880–886.

Vester B, Rasmussen K: High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991; 29:549–554.

Vignini A, Nanetti L, Bacchetti T, et al: Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: an in vitro study. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:4558–4561.

Weber M, Dill T, Arnold R, et al: N-terminal B-type natriuretic peptide predicts extent of coronary artery disease and ischemia in patients with stable angina pectoris. Am Heart J 2004; 148:612–620.

Weissberg PL: Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. Heart 2000; 83:247–252.

Wevers RA, Delsing M, Klein Gebbink JA, et al: Post-synthetic changes in creatine kinase isozymes (EC 2.7.3.2). Clin Chim Acta 1978; 86:323–327.

Willems HP, Den HM, Lindemans J, et al: Measurement of total homocysteine concentrations in acidic citrate- and EDTA-containing tubes by different methods. Clin Chem 2004; 50:1881–1883.

Witztum JL: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet 1994; 344:793–795.

Wiviott SD, de Lemos JA, Morrow DA: Pathophysiology, prognostic significance and clinical utility of B-type natriuretic peptide in acute coronary syndromes. Clin Chim Acta 2004; 346:119–128.

Wolf PL: Lactate dehydrogenase isoenzymes in myocardial disease. Clin Lab Med 1989; 9:655–665.

Woo J, Lacbawan FL, Sunheimer R, et al: Is myoglobin useful in the diagnosis of acute myocardial infarction in the emergency department setting? Am J Clin Pathol 1995; 103:725–729.

Wu AH, Feng YJ, Moore R, et al: Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. American Association for Clinical Chemistry Subcommittee on cTnI Standardization. Clin Chem 1998; 44:1198–1208.

Yap S: Classical homocystinuria: vascular risk and its prevention. J Inherit Metab Dis 2003; 26:259–265.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:972–978.

Zabel M, Hohnloser SH, Koster W, et al: Analysis of creatine kinase, CK-MB, myoglobin, and troponin T time–activity curves for early assessment of coronary artery reperfusion after intravenous thrombolysis. Circulation 1993; 87:1542–1550.

Zalenski RJ, Rydman RJ, Ting S, et al: A national survey of emergency department chest pain centers in the United States. Am J Cardiol 1998; 81:1305–1309.

Zaman AG, Helft G, Worthley SG, et al: The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. Atherosclerosis 2000; 149:251–266.

Zanotti G: Muscle fatty acid-binding protein. Biochim Biophys Acta 1999; 1441:94–105.

CAPÍTULO 19

Proteínas específicas

Richard A. McPherson MD

Estrutura da proteína 268
Técnicas de separação de proteínas 269
- Eletroforese 269
- Precipitação 271
- Separações em coluna 271

Detecção e quantificação de proteínas 272
Proteínas plasmáticas específicas 273
- Componentes majoritários 273
- Componentes minoritários 278
- Inibidores de protease 279
- Reagentes de fase aguda 280

Padrões de anomalias proteicas 280
Referências bibliográficas 282

PONTOS-CHAVE

- A estrutura primária de uma proteína consiste em sua sequência linear de aminoácidos com diferentes grupos laterais, que determinam como a proteína se dobra sobre si mesma (estruturas secundária e terciária) e como reage com outras moléculas e células (i. e., sua identidade molecular).
- Os métodos existentes para quantificar e fracionar as proteínas baseiam-se em turbidimetria, colorimetria, absorção espectrofotométrica, ligação a corantes, cromatografia em coluna, eletroforese e imunoensaios.
- A eletroforese de proteínas separa as moléculas proteicas de acordo com suas cargas elétricas (usualmente em pH 8,6).
- As principais proteínas plasmáticas que contribuem para o padrão eletroforético são a albumina, α_1-antitripsina (AAT), α_2-macroglobulina (AMG), haptoglobina, β-lipoproteína, transferrina, molécula C3 do complemento, fibrinogênio e imunoglobulinas (Igs).
- Vários componentes minoritários das proteínas plasmáticas possuem utilidade clínica no diagnóstico e monitoramento das doenças, sendo quantificados por meio de imunoensaios. São exemplos a ceruloplasmina, a proteína C reativa, a pré-albumina e os inibidores de protease.
- Há padrões eletroforéticos de proteínas de amostras de soro e urina que são característicos de doenças específicas, envolvendo primariamente alterações nas taxas de síntese (fígado), perda (renal) ou estados inflamatórios.
- A deficiência hereditária de algumas proteínas plasmáticas conduz a doenças significativas (p. ex., α_1-antitripsina).
- As proteínas existentes no plasma exercem diversos papéis, tais como a manutenção da pressão oncótica, o transporte de pequenas moléculas e a promoção ou inibição de reações inflamatórias.
- A triagem de gamopatias monoclonais constitui o principal uso clínico da eletroforese de proteínas séricas e urinárias.

O exame das proteínas existentes no plasma pode fornecer informações que refletem estados patológicos em muitos sistemas orgânicos. A quantificação realizada com mais frequência – considerando as proteínas totais – usualmente utiliza amostras de soro, nas quais não há fibrinogênio e nenhum anticoagulante que possa causar uma diluição discreta das proteínas plasmáticas. Embora a determinação do conteúdo de proteínas totais forneça ao médico algumas informações acerca do *status* geral do paciente em termos nutricionais ou no caso de doenças orgânicas graves (como nos estados em que ocorre perda proteica), o fracionamento das proteínas pode fornecer informações ainda mais úteis à clínica.

A quantificação adicional da albumina, por exemplo, fornece mais informações sobre o *status* nutricional, a capacidade de síntese hepática ou a existência de uma nefropatia ou enteropatia perdedora de proteína. Os dados obtidos permitem ao médico interpretar a detecção de concentrações elevadas ou baixas de cálcio e magnésio, uma vez que a albumina se liga a cerca da metade do conteúdo de cada um desses íons no nível molar. A diferença calculada entre o conteúdo de proteínas totais e o de albumina representa o conteúdo de todas as globulinas. Este é composto por outras frações que, individualmente, podem estar várias unidades acima do normal em doenças graves.

A eletroforese de proteínas separa as globulinas da albumina, dividindo as principais proteínas séricas em padrões que podem ser altamente específicos para algumas doenças. As técnicas de alta resolução podem revelar todos os componentes de uma amostra que estejam presentes em concentrações de até 1 g/L (0,1 g/dL, em unidades tradicionais). Entretanto, nesse nível, a quantificação por varredura de proteínas coradas não é altamente confiável, de modo que métodos alternativos devem ser empregados. Comparadas à eletroforese, as técnicas que envolvem detecção imunológica de proteínas individuais apresentam dupla vantagem – especificidade e sensibilidade (Cap. 43).

Todavia, ainda há muito a ser considerado a partir da inspeção visual de um eletroforetograma de proteínas, pois o olho humano é altamente eficiente na detecção de variações mínimas em proteínas individuais, bem como na detecção de alterações de padrões proteicos. A determinação de tais padrões é um método de triagem útil que deve ser seguido da realização de procedimentos confirmatórios mais específicos, para identificar e quantificar bandas proteicas aberrantes. A eletroforese de proteínas também pode ser uma ferramenta útil no monitoramento de pacientes por tempo prolongado, quando ocorrem alterações marcantes dos níveis de certas proteínas, como no mieloma, na síndrome nefrótica, na cirrose ou em queimaduras que afetam uma área corporal extensa.

O presente capítulo revisa a estrutura proteica, as metodologias de quantificação e separação, as principais proteínas plasmáticas (com exceção dos fatores de coagulação, Igs e sistema complemento, que são abordados nos Caps. 38, 45 e 46) e alguns padrões detectados em certos estados patológicos.

Estrutura da proteína

O esqueleto de todas as moléculas de proteína consiste em uma cadeia de átomos de carbono e nitrogênio que permanecem unidos por *ligações peptídicas* estabelecidas entre *aminoácidos* adjacentes. Em uma das extremidades dessa cadeia (a porção aminoterminal) existe um grupo amino ($-NH_2$) livre, enquanto na outra (a porção carboxiterminal) há um grupo carboxila (–COOH) livre. Enquanto o esqueleto peptídico é qualitativamente invariável nas inúmeras proteínas existentes (seu comprimento total equivale ao número total de aminoácidos presentes em cada proteína em particular), a identidade proteica é conferida pelos grupos laterais ou resíduos dos aminoácidos constituintes. Em média, o peso molecular de um aminoácido é

120 Da. O tamanho das proteínas séricas varia entre 66 e 700 kDa. Essas cadeias laterais de aminoácidos são convencionalmente agrupadas de acordo com a natureza química: *hidrogênio* (glicina), *alifática* (alanina, valina, leucina e isoleucina), *hidroximetilamina* (serina e treonina), *aromática* (tirosina, fenilalanina e triptofano), *imina* (prolina e hidroxiprolina), *acídica* (aspartato e glutamato), *básica* (arginina, histidina e lisina), *amidas* (asparagina e glutamina) e *sulfurada* (cisteína e metionina). Essas diferentes cadeias laterais possuem carga, são polares ou hidrofóbicas e, como resultado, tendem a ser relativamente solúveis ou insolúveis em água, respectivamente.

A sequência linear de aminoácidos de uma proteína é denominada *estrutura primária*. É essa sequência que determina a identidade de uma proteína, sua estrutura molecular, que funções desempenha, como se liga a outras moléculas e como atua nos processos de reconhecimento entre moléculas e células. Essas interações biológicas são orientadas pela reatividade existente entre os grupos carregados de cada molécula e, similarmente, pelas interações hidrofóbicas entre essas mesmas moléculas. Processos analíticos, como cromatografia, eletroforese, ligação a corantes, absorbância de luz, entre outros, também dependem da sequência de aminoácidos primária.

A *estrutura secundária* se refere à conformação tridimensional na qual se dobram partes da cadeia polipeptídica. Existem três estruturas desse tipo (Branden, 1991). A primeira delas é uma α-hélice, na qual a cadeia forma uma hélice regular, de modo que a porção C=O do esqueleto, da qual faz parte o hidrogênio *i* do grupo peptídico, se liga à porção N–H da unidade peptídica (*i* + 4). A segunda corresponde às lâminas β-pregueadas observadas em estruturas completamente estendidas, nas quais a cadeia forma uma estrutura achatada, com as cadeias laterais de aminoácidos adjacentes apontando para sentidos opostos. Nessa conformação, duas ou mais cadeias estendidas podem se associar, de modo que formem, entre si, o número máximo de ligações C=O • • • H–N. As lâminas β-pregueadas podem apresentar β-filamentos individuais orientados tanto em sentido paralelo quanto antiparalelo. Por fim, o terceiro grupamento estrutural é a conformação em dobras, na qual a direção da cadeia polipeptídica é revertida em relação a si própria, permitindo que as estruturas primárias longas se dobrem sobre si mesmas e adquiram uma conformação compacta.

O núcleo da molécula de proteína tipicamente consiste em combinações de α-hélices e β-filamentos conectados por alças de vários comprimentos e formas. Esse núcleo interno geralmente contém aminoácidos hidrofóbicos, enquanto as alças e demais partes da superfície da molécula de proteína são mais ricas em aminoácidos polares e carregados, ou seja, hidrofílicos. Ao serem degradadas, algumas proteínas (p. ex., proteína sérica associada ao amiloide, cadeias leves de Igs, pré-albumina) liberam fragmentos ricos em regiões β. Esses fragmentos são capazes de se unir espontaneamente *in vivo* e formar depósitos de β-filamentos em fibrilas que constituem os amiloides. Estudos recentes demonstraram a existência de uma associação entre o genótipo da apolipoproteína E (especialmente o alelo *apoE-4*) e a progressão da doença de Alzheimer de início tardio, em que há formação de placas de amiloide no cérebro. Tais achados genéticos sugerem que a doença de Alzheimer pode ser compreendida e tratada como uma doença cuja base bioquímica reside na geração de β-filamentos (Roses, 1994; Hayashi, 2004).

Na proteína solúvel em água, as regiões moleculares que apresentam agregados de grupos laterais hidrofílicos tendem a permanecer voltadas para o interior da molécula. Ao mesmo tempo, as regiões que contêm grupos carregados ou outras porções hidrofílicas tendem a ficar expostas na superfície da proteína. Por outro lado, as proteínas que se encontram ligadas a membranas usualmente possuem um segmento hidrofóbico que se projeta para fora da molécula, ancorando-a na fase lipídica da membrana. A estrutura tridimensional real (ou padrão de dobramento da proteína) – determinada exclusivamente pela sequência de aminoácidos – é denominada *estrutura terciária*. Proteínas individuais ou subunidades monoméricas podem formar complexos mais estáveis, como dímeros, trímeros e tetrâmeros, que são denominados *estrutura quarternária*.

O grupo sulfidrila (–SH), encontrado em resíduos de cisteína, pode formar uma ligação *dissulfeto* (covalente) com outra cisteína na mesma proteína e, assim, fortalecer a união entre segmentos distintos. Essa ligação ajuda a estabilizar a estrutura como um todo, evitando sua quebra por ação de forças mecânicas, térmicas ou outras. As ligações dissulfeto intramoleculares se formam mais frequentemente após o dobramento espontâneo da proteína, ao longo da sequência linear de aminoácidos, e resultam em conformações mais estáveis do ponto de vista termodinâmico. As ligações dissulfeto também podem se formar entre resíduos de cisteína presentes em diferentes moléculas de proteína, conferindo estabilidade a estruturas moleculares multiméricas (p. ex., haptoglobina, antígeno de von Willebrand).

Os aminoácidos acídicos e básicos determinam a carga líquida da proteína e, portanto, sua mobilidade eletroforética. Nos grupos carboxila e amino, a carga é uma função do pH (i. e., se um íon de hidrogênio está ligado ou dissociado do grupo). Combinando todos os grupos laterais e seus diferentes graus de dissociação, o pH em que uma determinada proteína apresenta carga líquida igual a zero é denominado *ponto isoelétrico* (pI). Proteínas com pI < 7,0 são acídicas e tendem a expor grupos carboxila laterais, enquanto aquelas com pI > 7,0 são básicas (p. ex., as histonas se ligam à estrutura helicoidal externa do DNA, que é negativamente carregado com grupos fosfato).

As proteínas são sintetizadas a partir da porção aminoterminal em direção à extremidade carboxiterminal por ação dos ribossomos que realizam a tradução da informação codificada na molécula de RNA mensageiro (mRNA). Antes de ser secretado, o produto inicial da tradução de algumas proteínas é processado por enzimas que convertem a pré-forma em proteína madura, pela remoção de um peptídeo sinalizador (geralmente, hidrofóbico). Esse peptídeo-sinal mantém a molécula de proteína junto ao retículo endoplasmático. A liberação da pré-proteína a partir dessa organela implica a passagem da molécula por um poro existente na membrana, envolvendo a participação de vários fatores de translocação (Brodsky, 1998). A montagem correta da proteína também depende criticamente da função das chaperonas moleculares – proteínas que orientam o dobramento das proteínas nascentes, atuando com as proteases que removem segmentos selecionados para obtenção de conformações funcionais (Wickner, 1999). Muitas doenças de cunho genético são devidas à ocorrência de mutações prejudiciais no DNA, que promovem alterações na sequência de aminoácidos de uma determinada proteína, podendo bloquear esse complexo mecanismo de montagem ou fazer com que quaisquer moléculas de proteína montadas não sejam funcionais (Kuznetsov, 1998).

Modificações adicionais à estrutura proteica ocorrem no nível pós-tradução (i. e., após a finalização da união dos aminoácidos) (Harding, 1985). A *fosforilação* consiste na fixação – enzimaticamente regulada – de grupos fosfato aos grupos serina ou treonina existentes no esqueleto peptídico, resultando na formação de fosfoproteínas com maior carga negativa. A *glicosilação* pode ocorrer de forma espontânea, mediante a presença de moléculas de açúcar, ou de forma orientada e enzimaticamente controlada, com fixação de oligossacarídeos (em geral, delimitados por ácido siálico negativamente carregado) à proteína (Van den Steen, 1998). Esses tipos de molécula são denominados glicoproteínas. As ligações com frequência envolvem resíduos de asparagina, por meio da *N*-acetilglicosamina, ou resíduos de serina e treonina, por meio da *N*-acetilgalactosamina. A *proteólise* resulta na clivagem ou remoção de pequenos segmentos do esqueleto peptídico, capazes de abrir sítios catalíticos para um zimogênio (p. ex., plasminogênio em plasmina) ou facilitar o reconhecimento por uma molécula de receptor (p. ex., pró-insulina em insulina). Muitas dessas etapas pós-traducionais são exclusivas das células eucarióticas e, portanto, não ocorrem em células procarióticas. Esse detalhe é muito valioso para a indústria da biotecnologia, que utiliza genes clonados para produzir proteínas humanas em bactérias, leveduras ou outros tipos de células artificiais e, assim, devem dispor de etapas adicionais para sintetizar moléculas corretas (Jenkins, 1996). As alterações pós-traducionais que ocorrem na estrutura das proteínas influenciam sua antigenicidade, atividades bioquímicas ou catalíticas específicas, capacidade de ligação a receptores e mobilidade eletroforética.

Técnicas de separação de proteínas

Eletroforese

A compreensão moderna acerca da composição proteica do soro e do plasma foi adquirida por meio do emprego das técnicas eletroforéticas introduzidas por Tiselius. Ele separava proteínas dissolvidas

em uma solução de eletrólitos, submetendo-as à passagem de uma corrente elétrica no tubo de quartzo em forma de U, que continha a solução. Em pH 7,6, quatro frações de proteínas séricas – denominadas albumina, α, β e γ – foram identificadas e quantificadas opticamente pela modificação do índice de refração nas regiões fronteiriças entre as bandas. Como a separação foi obtida utilizando-se uma solução homogênea sem auxílio de meio sólido, as forças de convecção impediram a resolução em zonas distintas. Por esse motivo, a técnica recebeu o nome de *eletroforese de fronteiras móveis* ou *frontal*. A introdução de um filtro de papel como meio de suporte anticonvectivo permitiu a separação das frações proteicas em bandas discretas ou zonas, em um processo denominado *eletroforese de zona*. Sobre o suporte sólido e em pH 8,6, a fração α se divide em dois grupos de proteínas – α_1 e α_2. Outros meios de suporte também são utilizados, como a membrana de acetato de celulose e os géis de agarose, amido e poliacrilamida. O acetato de celulose e a agarose são os meios predominantemente utilizados no laboratório clínico, em razão da facilidade de uso, do baixo custo e da disponibilidade comercial (Jeppsson, 1979).

As amostras podem ser aplicadas em poços que são cortados no gel, porém, esse processo costuma criar artefatos que interferem na análise. Uma forma de contornar esse inconveniente consiste em embeber a amostra no gel por meio da sobreposição de um molde. Em seguida, cada extremidade do gel é submersa em uma solução tampão, no interior de câmaras separadas, onde os eletrodos são montados. Uma voltagem é aplicada entre esses eletrodos, e é gerada a corrente elétrica que atravessa o gel usualmente em 30 minutos, para obtenção do grau de resolução desejado. A força iônica do tampão determina a quantidade de corrente e o movimento das proteínas para uma voltagem fixa. Se a força iônica for baixa, uma quantidade relativamente maior de corrente é transportada pelas proteínas carregadas. Se a força iônica for alta, menos corrente será transportada pelas proteínas, as quais percorrerão uma distância menor no gel. Caso os eletrodos não sejam adequadamente alinhados, a corrente pode se tornar mais densa em um dos lados do gel e, assim, as proteínas migrarão mais desse lado. Se a eletroforese prosseguir por muito tempo, as proteínas podem acabar migrando para fora do gel e caindo na solução tampão. Uma interrupção do circuito elétrico e a consequente ausência de corrente elétrica que atravessa o gel farão com que as proteínas parem de se mover a partir do ponto de aplicação. Com frequência, os géis apresentam "artefato em sorriso", no qual as amostras localizadas no centro do gel migram mais do que aquelas que se encontram mais próximas das margens.

Ao final da eletroforese, o gel é tratado com um fixador suave, como o ácido acético, que precipita as proteínas nas posições para as quais migraram durante a corrida. Em seguida, o gel é corado e seco, e o excesso de corante é removido. Os padrões de proteína podem ser examinados visualmente para identificação qualitativa de proteínas anormais. Escaneadores densitométricos são empregados para gerar traçados e quantificar os porcentuais relativos de cada proteína em relação ao conteúdo proteico total (determinado separadamente) da amostra, a fim de obter a concentração de proteínas de cada uma das frações.

Quando um meio de suporte eletroforético possui carga negativa, a força eletromotora à qual fica submetido tende a movê-lo em direção ao ânodo (polo positivo; Fig. 19.1). Entretanto, como é fixo, o suporte de meio sólido fica impedido de se mover. Na solução tampão ao redor, os íons complementares com carga positiva movem-se livremente sob a ação da força eletromotora, transportando consigo moléculas de água, as quais se aglomeram em torno de suas cargas. O resultado líquido é o fluxo de tampão em direção ao cátodo. Esse fluxo de solução tampão é denominado *eletrosmose* ou *endosmose*, e também transporta certa quantidade de proteínas por fluxo mecânico, e não devido à carga. A distância real percorrida por uma determinada proteína durante sua migração pelo campo elétrico é determinada pelas magnitudes combinadas das forças eletromotora (uma característica da própria proteína e do pH) e eletrosmótica (uma função primariamente do meio de suporte). Quando a força eletrosmótica é maior do que a força eletroforética que atua sobre proteínas aniônicas fracas (p. ex., γ-globulinas), essas proteínas se movem a partir do ponto de aplicação rumo ao cátodo, mesmo que apresentem carga discretamente negativa.

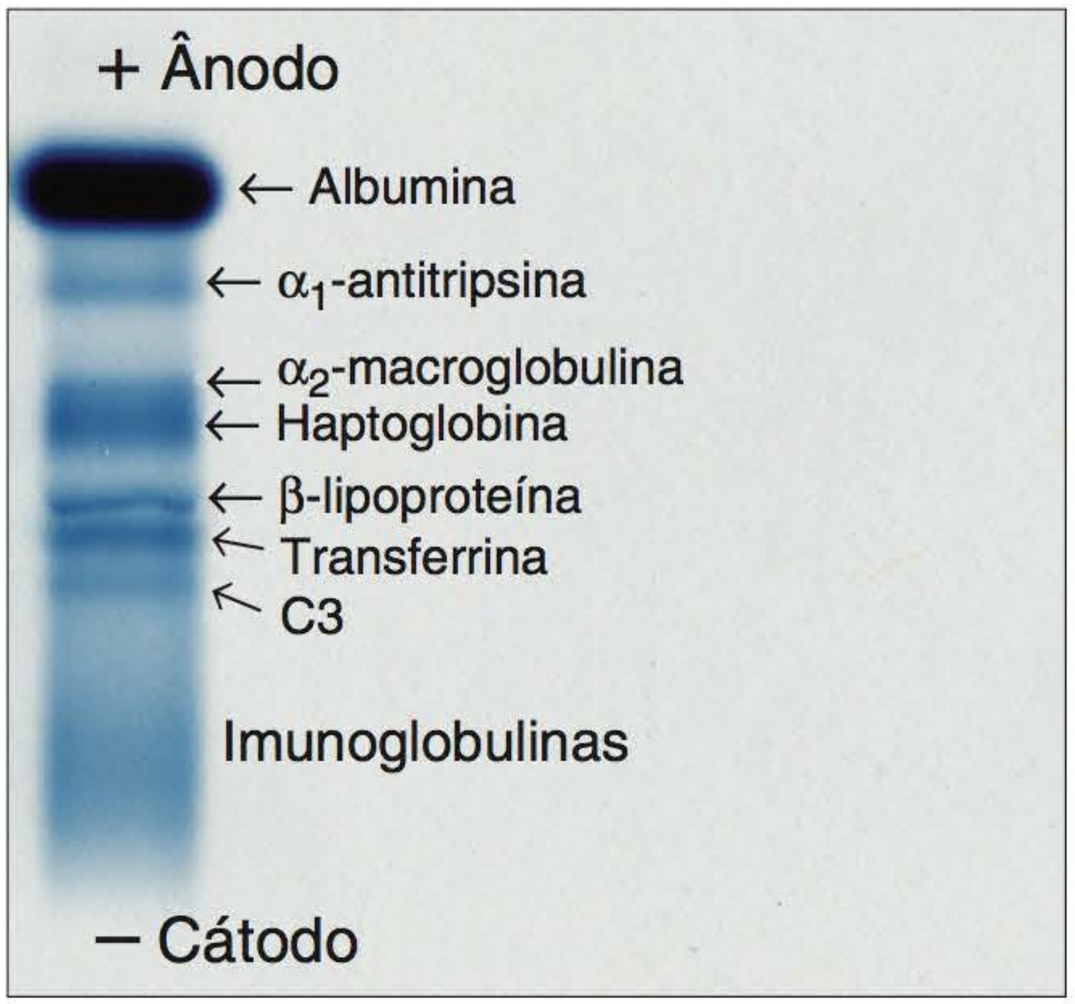


Figura 19.1 Posições das principais proteínas plasmáticas na eletroforese em agarose de amostra proveniente de indivíduo normal. Proteínas individuais são separadas conforme suas cargas elétricas entre o ânodo (polo positivo) e o cátodo (polo negativo).

Graças a manipulações da composição salina do tampão, das propriedades endosmóticas do meio e dos modos de aplicação da amostra, as placas eletroforéticas de agarose comercialmente disponíveis agora apresentam uma qualidade de alta resolução consistente, que permite seu uso na rotina para separação de todas as principais proteínas séricas (Fig. 19.2). Por conta da variabilidade das formulações químicas dos géis, não se deve necessariamente esperar obter padrões de separação proteica idênticos de sistemas eletroforéticos produzidos por fabricantes diferentes. Além disso, a separação ótima de isoenzimas geralmente requer composições distintas de solução tampão e gel, em comparação às condições necessárias para se obter o melhor grau de resolução na separação de proteínas séricas *versus* lipoproteínas *versus* hemoglobinas. Uma variação significativa das condições empregadas na eletroforese de proteínas consiste na otimização da separação da região γ com o intuito de determinar e detectar bandas oligoclonais de Igs no LCE. Nesse caso, é estabelecida uma endosmose elevada para maximizar a movimentação catódica das Igs a partir do ponto de aplicação a uma determinada distância no gel que seja conveniente para o exame visual.

A poliacrilamida é um meio de suporte inerte, cuja porosidade é facilmente ajustável por meio da alteração de sua composição em termos de acrilamida antes do início da polimerização do gel. Embora a *eletroforese em gel de poliacrilamida* (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) seja aplicável à separação padrão de proteínas nativas, também pode ser utilizada para separar proteínas de acordo com o peso molecular. Nesse caso, as proteínas são desnaturadas em presença de sulfato sódico de dodecila (SDS, *sodium dodecyl sulfate*). Hoje em dia, a SDS-PAGE é a técnica de eletroforese de proteínas mais utilizada em pesquisas de biologia molecular. Contudo, seu próprio poder de resolução e separação de proteínas em numerosas subunidades virtualmente excluiu seu uso da rotina dos laboratórios clínicos. Ainda assim, existe a promessa da aplicação clínica da *eletroforese bidimensional* (2-DE, *two-dimensional electrophoresis*). Esta consiste na realização de uma separação padrão em uma direção, seguida de uma SDS-PAGE na direção perpendicular. A 2-DE resulta na geração de, talvez, centenas de picos de proteína identificáveis, a partir dos quais é possível obter informações diagnósticas importantes por meio da análise de um padrão sofisticado.

A *focalização isoelétrica* proporciona um grau de resolução superior para proteínas que migram muito próximas entre si ou para as várias formas de uma mesma proteína, que diferem quanto à carga por apresentarem

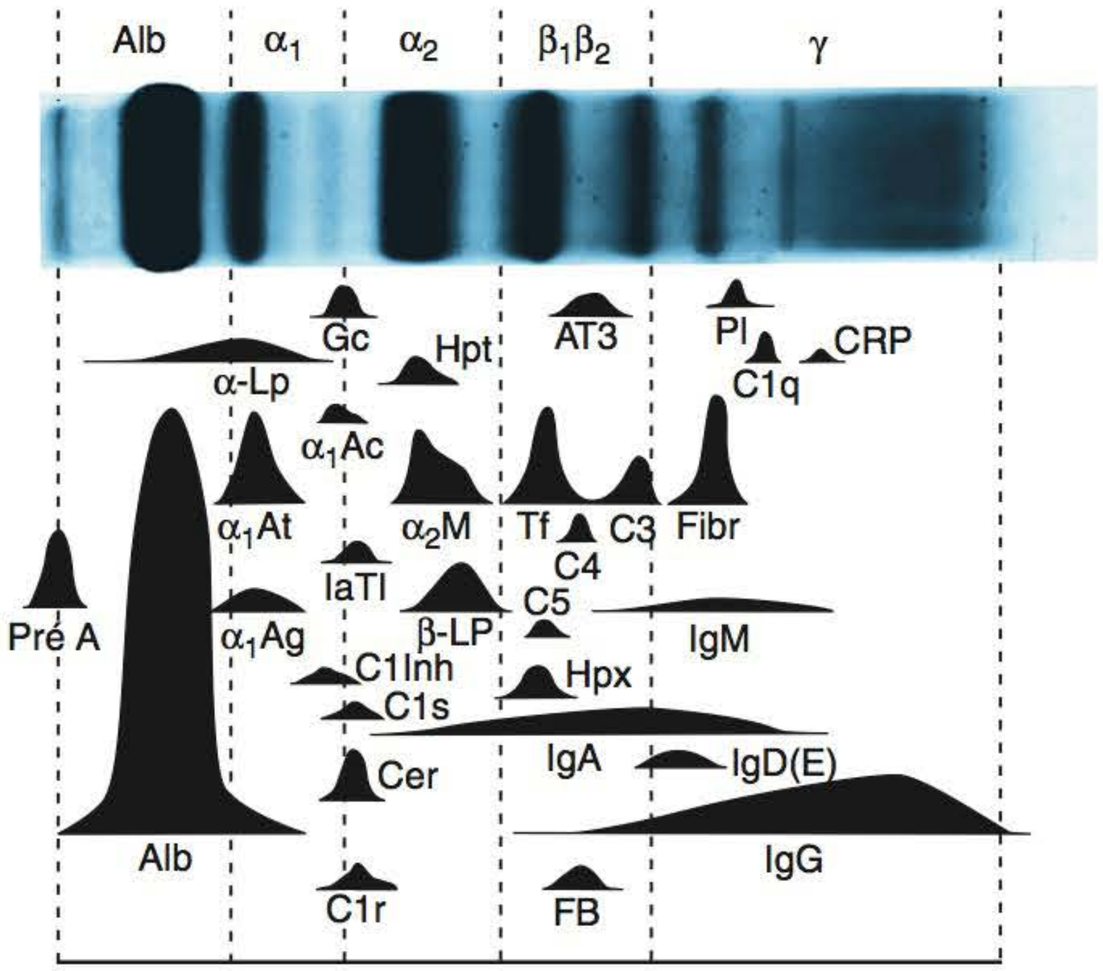


Figura 19.2 O padrão de eletroforese de proteínas em gel de agarose é composto por cinco frações, sendo cada uma delas constituída por muitas espécies proteicas individuais. Algumas das principais proteínas são mostradas nesta representação artística, empregada como ilustração explicativa. (Adaptado de Laurell, CB: Electrophoresis, specific protein assays, or both in measurement of plasma proteins? Clin Chem 1973; 19:99, com permissão.)
α_1Ac = α_1-antiquimotripsina
α_1Ag = α_1-glicoproteína ácida
α_1At = α_1-antitripsina
α_2-M = α_2-macroglobulina
α-Lp = α-lipoproteína
Alb = albumina
AT3 = antitrombina III
β-Lp = β-lipoproteína
Componentes do complemento:
C1q, C1r, C1s, C3, C4, C5 = designados como C1Inh = inibidor de esterase
Cer = cerulosplasmina
CRP = proteína C reativa
Gc = Gc-globulina (proteína ligadora de vitamina D)
FB = fator B
Fibr = fibrinogênio
Hpt = haptoglobina
Hpx = hemopexina
Immunoglobulinas:
IgA, IgD, IgE, IgG, IgM = designadas como
IaTI = inter-α-inibidor de tripsina
Pl = plasminogênio
Pré-A = pré-albumina
Tf = transferrina

apenas modificações mínimas (p. ex., pós-traducionais) (Cap. 4). Nessa técnica, as proteínas migram através de um gel que apresenta um gradiente de pH estabelecido com uma mistura de anfolitos. À medida que cada proteína alcança a localização onde o pH do gel é igual ao seu pI, a carga líquida nesse local se torna nula. Assim, deixa de haver uma força eletromotora que atua sobre a proteína, a qual para de se mover no gel. O padrão final é obtido estritamente de acordo com o pI.

Precipitação

As precipitações químicas de proteínas séricas foram idealizadas para resolução da albumina e das globulinas em duas ou mais frações que, assim, poderiam ser quantificadas em termos de conteúdo proteico. Com a adição de sulfato de sódio, sulfito de sódio, sulfato de amônio ou metanol, as globulinas tendem a precipitar, enquanto a albumina permanece em solução. Quantificando-se o conteúdo de proteína total na amostra de soro original, bem como o conteúdo proteico tanto no precipitado quanto no sobrenadante, é possível derivar os valores correspondentes às concentrações de albumina e de globulinas. A proporção desses valores (proporção A/G) tem sido utilizada de maneira extensiva, visto que acentua anormalidades eventualmente existentes na composição proteica do soro e que, nas doenças, em geral envolvem a depressão da fração de albumina e a elevação da fração de uma ou mais globulinas. A concentração de albumina pode estar deprimida em decorrência da diminuição da síntese (desnutrição, má absorção, insuficiência hepática, desvio favorecedor da síntese de outras proteínas) ou do aumento da perda (proteinúria, acumulo de líquido ascítico, enteropatia). A concentração de globulinas pode estar aumentada em razão do aumento da síntese de muitas proteínas diferentes, como parte de reações agudas ou crônicas a uma doença. A redução dos níveis de albumina e o aumento dos níveis de globulinas tendem a ocorrer simultaneamente em caso de doença. Desse modo, a proporção A/G é alterada, uma vez que o numerador e o denominador movem-se em sentidos opostos. Os métodos de precipitação não são tão acurados quanto a eletroforese de zona, pois as α-globulinas podem falhar ao precipitar e, assim, levar à superestimação da fração de albumina.

Os procedimentos de preparo para isolamento de uma única proteína constituinte minoritária com frequência iniciam-se pela precipitação, para remoção das proteínas séricas indesejáveis. Tipicamente, a etapa seguinte do processo de isolamento da proteína consiste na passagem por uma coluna que faz separações com base no tamanho molecular (gel filtração) ou na carga (troca iônica).

Separações em coluna

Os meios de *gel filtração*, como Sephadex ou esferas de agarose, são classificados de acordo com o tamanho de seus poros, que, por sua vez, determinam o tamanho das moléculas que são capazes de atravessá-los no interior de cada uma das esferas ou partículas da coluna. Após a aplicação de uma amostra, constituída de proteínas com tamanhos variados em uma solução de solvente aquoso com tampão e sais, aplica-se mais tampão para conduzir a amostra ao longo da coluna. Moléculas muito grandes tendem a se deslocar pelos interstícios da coluna, sem entrar nas esferas, e são as que primeiro emergem na parte inferior da coluna, junto ao volume morto. As moléculas de tamanho discretamente menor entram nos poros maiores antes de serem lavadas e, assim, deslocam-se pela coluna de forma um pouco mais lenta. As moléculas proteicas pequenas entram em poros ainda menores e se deslocam ainda mais lentamente do que as moléculas maiores, sendo retidas na coluna por mais tempo. Por fim, as partículas cujo tamanho equivale ao das moléculas de sal dissolvidas no tampão penetram mais profundamente no interior das esferas do gel de filtração e saem da coluna por último, depois que todas as outras moléculas proteicas maiores já saíram, junto a um volume de solução tampão que é denominado volume de sal. Assim, na gel filtração, a ordem da eluição das proteínas é determinada pelo peso ou tamanho molecular, com a maior saindo primeiro e a menor, por último. Como todos os tipos de proteína movem-se continuamente ao longo da coluna de gel filtração ao mesmo tempo, porém a diferentes velocidades, é necessário aplicar um volume de amostra pequeno e uniforme para otimizar a separação entre os picos. A gel filtração requer que o meio seja inerte e que não apresente nenhum tipo de interação química ou elétrica com as proteínas, e não é o método de escolha quando se deseja obter uma separação proteica com alto grau de resolução.

A cromatografia de troca iônica, por outro lado, proporciona a vantagem de permitir que a carga elétrica das proteínas as ligue às esferas constituintes de um meio de suporte eletricamente carregado, como DEAE ou QAE. Na *cromatografia de troca aniônica*, as proteínas usualmente são aplicadas com uma solução básica (p. ex., de pH 8,6), na qual apresentam carga negativa (a albumina e as globulinas α_1, α_2 e β são ânions) ou não possuem carga líquida (γ-globulinas). As proteínas neutras atravessam diretamente a coluna de troca aniônica, enquanto as proteínas aniônicas aderem à matriz positivamente carregada da coluna. Se uma solução tampão com elevada concentração de sal for aplicada para lavagem da coluna, os ânions presentes no sal deslocarão

as proteínas aniônicas e ocuparão seu lugar junto à matriz, ligando-se ao meio do suporte. As proteínas deslocadas, então, são eluídas da coluna. Empregando-se um gradiente crescente e constante de concentração de sal no tampão de eluição, é possível resolver as proteínas de acordo com suas cargas elétricas. Aquelas com menos carga elétrica negativa serão eluídas primeiro do que aquelas com mais carga elétrica negativa (p. ex., albumina), as quais somente serão deslocadas da matriz por tampões com maior concentração de sal.

Alternativamente, se o pH for diminuído e a concentração de sal for mantida baixa, as proteínas aniônicas irão adquirir uma carga líquida neutra ou discretamente positiva e passarão diretamente pela coluna. É possível utilizar um gradiente decrescente de pH para resolver as proteínas aniônicas. Nesse caso, grosso modo, a ordem de eluição será: globulinas β, α_2 e α_1 e, por último, albumina. Deve ser observado que essa ordem de eluição é inversa à ordem de migração eletroforética em pH 8,6, pois na cromatografia de troca aniônica a mobilidade é retardada de acordo com a carga líquida negativa, enquanto na eletroforese a mobilidade é aumentada por essa mesma carga elétrica.

A *cromatografia de troca catiônica* inicia-se com pH ácido, no qual as proteínas contidas na amostra apresentam carga elétrica positiva (cátions) e, assim, aderem à matriz negativamente carregada da coluna (p. ex., carboximetilcelulose). As proteínas podem ser deslocadas pelos cátions de um tampão de eluição com grande concentração de sal ou pela elevação do pH, que irá reverter a carga dessas proteínas e torná-las negativamente carregadas. Na troca catiônica, a albumina deve eluir primeiro, seguida das globulinas α_1, α_2, β e γ.

Outra modalidade de separação em coluna é a *cromatografia hidrofóbica*. Nesse processo, as amostras são aplicadas na coluna em uma solução com elevada concentração de sal e são eluídas em uma solução com baixa concentração de sal. O meio do suporte interage com as proteínas conforme a sua natureza hidrofóbica, sendo uma boa técnica complementar para ser utilizada após a cromatografia de troca iônica, na qual as amostras são eluídas em solução com alto teor de sal.

A *cromatografia por afinidade* baseia-se na ligação específica entre a proteína de interesse e uma outra proteína, que foi covalentemente ligada ao meio sólido do suporte da coluna. Por exemplo, o fator de coagulação VIII complexado ao fator de von Willebrand (vWF) pode ser removido de maneira seletiva de outras proteínas plasmáticas, por meio da passagem do plasma em uma coluna que contenha anticorpos monoclonais anti-vWF ligados à matriz de fase sólida. O complexo fator VIII-vWF se liga de modo seletivo à coluna, enquanto as demais proteínas plasmáticas são lavadas da coluna. Em seguida, o fator VIII é dissociado do vWF, que, assim, pode ser eluído em uma fração purificada e utilizado na terapia de transfusão. Interações antígeno-anticorpo como essa podem ser rompidas por concentrações de sal elevadas, por mudança do pH ou pela ação de um agente químico desnaturante (p. ex., ureia), em diferentes aplicações. Outros géis de cromatografia por afinidade utilizam um fenômeno de ligação que mimetiza as interações moleculares observadas naturalmente. Desse modo, alguns corantes acoplados à agarose são capazes de se ligar à albumina e removê-la seletivamente do soro. Anticorpos terapêuticos ou suas porções Fab podem ser concentrados em colunas cromatográficas de afinidade que contenham antígenos-alvo planejados (p. ex., Digibind, para digoxina; CroFab, para veneno de cobra crotalínea). As Igs também podem ser removidas de uma amostra pela proteína A estafilocócica acoplada a uma matriz em gel. Existem inúmeros esquemas de separação distintos que proporcionam um elevado grau de purificação, a partir de um processo de etapa única, utilizando meio de cromatografia por afinidade acoplado a corantes, fármacos, cofatores nucleotídicos e açúcares. Um teste clínico que emprega cromatografia por afinidade é a quantificação de hemoglobina glicosilada. Esse teste utiliza uma matriz com afinidade para di-hidroxiboronato que se liga de modo seletivo a espécies moleculares da hemoglobina ligadas covalentemente à glicose, ao mesmo tempo em que permite às formas não glicosiladas passarem pela coluna. Em seguida, a hemoglobina glicosilada é eluída em separado e quantificada.

A *eletroforese capilar* é um método de separação baseado no fluxo da amostra através de um tubo capilar. Esse tubo pode ser adaptado para a resolução de diferentes moléculas, de acordo com o tamanho, a hidrofobicidade ou a esteroespecificidade. Seu uso é aplicável tanto a moléculas grandes, como o DNA ou as proteínas, quanto a moléculas pequenas, como hormônios ou fármacos terapêuticos. Fisicamente, o método é semelhante à cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, *high performance liquid chromatography*), na qual o solvente é bombeado através de uma coluna que retém ou deixa passar solutos conforme as interações químicas que nela ocorrem. A eletroforese capilar para proteínas séricas emprega uma coluna cujas propriedades são semelhantes às da agarose. Dessa forma, a separação das proteínas é comparável àquela que se obtém na eletroforese convencional. Essa análise pode ser automatizada por meio do acoplamento a um detector na extremidade efluente do tubo, capaz de detectar e quantificar as bandas proteicas sem necessidade de corá-las nem de realizar varreduras em separado. Embora o equipamento tenha um custo relativamente alto para eletroforese capilar, as despesas com reagentes e mão de obra são baixas e o procedimento é rápido e bastante quantitativo, transformando esse sistema em uma promessa de amplas aplicações clínicas futuras (Chen, 1991; Brinkman, 2004).

Detecção e quantificação de proteínas

O método de referência definitivo para determinação da concentração de proteínas é a análise do *conteúdo de nitrogênio*. O nitrogênio está presente de maneira uniforme nas ligações peptídicas, em toda a extensão de uma proteína e, mais irregularmente, nos grupos laterais, sempre que houver triptofano, arginina, lisina, histidina, asparagina ou glutamina. A técnica de Kjeldahl consiste na digestão ácida da proteína para liberação de íons amônio a partir de seus compostos nitrogenados. Em seguida, a quantificação do amônio é feita pela sua conversão em gás amônia e subsequente titulação como base ou por nesselerização, na qual iodetos duplos (potássio e mercúrio) formam um complexo colorido com a amônia em meio alcalino. Embora a determinação do conteúdo de nitrogênio possa ser extremamente precisa, seu uso para calcular a concentração de proteínas depende da exata composição proteica da amostra, uma vez que as proteínas diferem entre si em termos de nitrogênio, conforme seus aminoácidos constituintes. Entretanto, para estimar a concentração de proteínas de uma amostra de proteína purificada, a determinação do conteúdo de nitrogênio é uma medida altamente acurada, desde que a concentração molar desse conteúdo seja conhecida para a proteína em questão. O conhecimento da sequência de aminoácidos exata de uma proteína permite calcular seu conteúdo de nitrogênio com acurácia. No entanto, esse procedimento é pouco utilizado em laboratórios clínicos, porque as amostras clínicas são misturas cuja composição é imprevisível.

O *índice de refração* pode ser uma medida acurada para determinação da concentração de proteína dissolvida em solução a níveis acima de 2,5 g/dL. Hemólise, lipemia, icterícia e azotemia são fatores que levam à produção de resultados incorretamente elevados. O índice de refração não pode ser utilizado para quantificar proteínas em amostras de urina, pois estas apresentam excesso de solutos em relação ao conteúdo proteico.

A *gravidade específica* (e, por inferência, o conteúdo de proteínas) pode ser estimada pipetando-se gotas de soro ou sangue em uma série graduada de soluções de sulfato de cobre. Sobre a gota de amostra, forma-se um tipo de concha (ou casca) de proteína-cobre, a fim de evitar sua dissolução durante um curto intervalo de tempo. Nesse momento, ou a gota desce até o fundo do recipiente que contém a solução e lá permanece estacionária, ou sobe de volta à superfície da solução. A concentração de proteínas da amostra é estimada a partir da gravidade específica da solução de sulfato de cobre na qual a gota permanece estacionária. Essa técnica é simples e tem sido amplamente empregada como teste de triagem para determinação da concentração de hemoglobina em amostras de sangue total.

Proteínas em solução *absorvem luz ultravioleta* a 280 nm (A_{280}). Esse fenômeno se deve principalmente à presença de triptofano, mas também é causado pela presença de tirosina e fenilalanina (Layne, 1957). Para converter acuradamente a leitura da A_{280} em concentração de proteínas, deve ser utilizada a absortividade molar, uma vez que cada proteína contém quantidades diferentes desses três aminoácidos. Entretanto, a A_{280} de uma mistura de proteínas não constitui uma medida perfeita do conteúdo proteico, pois as absortividades molares variam muito entre proteínas distintas. Como os ácidos nucleicos (que apresentam

elevada absorbância a 260 nm, e uma absorbância menor a 280 nm) podem estar presentes em preparações de proteínas, uma forma de estimar melhor a concentração proteica é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de proteínas (mg/mL)} = 1{,}55 \times A_{280} - 0{,}76 \times A_{260}$$

Medidas diretas da absorbância podem ser utilizadas para quantificar proteínas na faixa de 0,05 a 1,5 mg/mL.

Os *métodos turbidimétricos* são empregados com frequência para detecção de proteínas em faixas de concentração similares, com amostras de LCE e urina. As proteínas precipitam mediante a adição de ácido tricloroacético, ácido sulfossalicílico ou qualquer outro reagente ácido. A turbidez resultante pode ser utilizada para quantificar o conteúdo de proteínas pela observação do incremento produzido na densidade óptica em comparação com padrões tratados de forma semelhante. Entretanto, essas técnicas não são específicas para proteínas, uma vez que qualquer substância insolúvel em ácido presente na amostra também pode precipitar.

A técnica *colorimétrica* altamente específica para proteínas e peptídeos é o método do *biureto*. Nesse método, os sais de cobre em solução alcalina formam um complexo de cor púrpura com substâncias que contêm duas ou mais ligações peptídicas. As interferências são mínimas, embora o íon amônio possa acidificar a reação, enquanto a hemoglobina e a bilirrubina absorvem luz na mesma região do espectro do complexo de biureto (540–560 nm). O método do biureto é empregado de forma extensivaem laboratórios clínicos, particularmente nos analisadores automatizados que detectam concentrações de proteína abaixo de 10 ou 15 mg/dL.

É possível tornar o método mais sensível utilizando-se o *reagente de Folin-Ciocalteu* (ou reagente fenol, ácido fosfotungstomolibdico), que oxida compostos fenólicos, como a tirosina, além de triptofano e histidina, resultando na produção de uma cor azul escura.

Lowry (1951) utilizou o método do biureto com reagente fenol e obteve uma notável intensificação da cor formada, uma vez que o reagente fenol é capaz de reagir com complexos de biureto envolvendo todas as ligações peptídicas. O *ensaio de Lowry* tem sido muito utilizado em determinações consistentemente acuradas da concentração de proteínas.

A sensibilidade da detecção pode ser melhorada ainda mais, para detecção de concentrações proteicas abaixo de 1 μg, com a utilização do *corante Coomassie brilliant blue* (azul brilhante de Coomassie). Esse corante permanece livre de interferências causadas por uma ampla variedade de substâncias.

Um grau de sensibilidade comparável pode ser obtido com o uso da *ninidrina*, que gera uma cor violeta ao reagir com aminas primárias. Esse reagente é amplamente utilizado para detecção de peptídeos e aminoácidos após a cromatografia em papel e a realização de análises de aminoácidos em colunas de troca iônica, bem como para detecção de fármacos em triagens toxicológicas empregando cromatografia em camada delgada (Cap. 23).

Em presença de outras proteínas, a albumina pode ser quantificada graças à sua capacidade de ligar-se a certos corantes, como o azul de bromofenol, laranja de metila, ácido hidroxibenzenoazobenzoico (HABA), púrpura de bromocresol e verde de bromocresol (BC-G, *bromcresol green*). O BC-G é largamente utilizado em analisadores automáticos, para determinação dos níveis séricos de albumina, em paralelo ao uso do método do biureto para quantificação do conteúdo de proteína total. Os corantes ligados à albumina apresentam absorção máxima em comprimentos de onda discretamente diferentes e, assim, permitem a quantificação espectrofotométrica direta da proteína.

Os corantes padrão empregados na eletroforese são azul brilhante de Coomassie, Ponceau S e *amido black* (negro de amida). A coloração com prata é bastante sensível para detecção de componentes minoritários em géis de alta resolução, permitindo quantificar concentrações da ordem de nanogramas (Merril, 1981).

Além disso, certos corantes possuem aplicações particulares na eletroforese. Estes são os corantes especiais, como o *oil red O* (óleo vermelho O) e o *Sudan Black B* (Sudão Negro B), que coram lipoproteínas, e os corantes do ácido periódico de Schiff, que coram glicoproteínas separadamente.

Tendo em vista que a eletroforese seguida de coloração não proporciona a identificação explícita das proteínas séricas, foram instituídas determinações imunológicas para quantificação de proteínas individuais (Laurell, 1966). A nefelometria detecta a turbidez usualmente produzida em questão de alguns minutos (ou menos) pela precipitação de um anticorpo que reage com sua proteína-alvo em uma amostra de soro (Maachi, 2004). Nos dias atuais, as principais proteínas séricas são amplamente quantificadas por meio desse método em analisadores imunoquímicos automatizados, que superaram as antigas quantificações realizadas por imunodifusão radial. Em razão da especificidade do anticorpo reagente, a nefelometria é altamente específica e permite a quantificação de proteínas individuais mesmo na presença de outras proteínas. Métodos imunológicos, como o radioimunoensaio (RIA) e o ensaio imunosorvente ligado à enzima (ELISA), também são capazes de quantificar as proteínas encontradas em menor concentração.

Proteínas plasmáticas específicas

Componentes majoritários

As proteínas séricas majoritárias são os componentes prontamente resolvidos e detectados em géis de eletroforese corados por meio de técnicas convencionais utilizadas em laboratórios clínicos (Tab. 19.1 e Fig. 19.1).

Pré-albumina. A pré-albumina é definida pela eletroforese, como a fração que migra de modo mais rápido do que a albumina em direção ao ânodo. Sendo uma estrutura tetramérica, seu peso molecular de 62.000 Da a torna uma das menores proteínas séricas. Cada monômero se liga a uma molécula de tirotoxina e, por esse motivo, é também denominado pré-albumina ligadora de tirotoxina (TBPA, *thyroxine-binding prealbumin*) ou transtiretina (TTR). No entanto, apenas uma pequena fração da tirotoxina encontra-se de fato ligada à TBPA em indivíduos normais, pois a globulina ligadora de tirotoxina possui uma afinidade cerca de 100 vezes maior por esse hormônio (Oppenheimer, 1968). Todavia, existe ao menos uma variante molecular da pré-albumina, herdada segundo um padrão familiar, que apresenta maior afinidade pela tirotoxina. Em consequência, essa variante provoca elevação dos níveis séricos de tirotoxina, ainda que os indivíduos afetados apresentem concentrações normais de tirotoxina livre e sejam, portanto, eutireoides (Moses, 1982).

A pré-albumina exerce papel importante no metabolismo da vitamina A, ao complexar-se à proteína ligadora de retinol (RBP, *retinol-binding*

Tabela 19.1 Características das principais proteínas plasmáticas

Proteína	Intervalo de concentração (g/L)	Peso molecular	Ações
Pré-albumina	0,15–0,36	62.000	Liga-se à tirotoxina; transporta vitamina A
Albumina	39–51	66.000	Pressão oncótica; reservatório de aminoácidos; transporta pequenas moléculas
α_1-antitripsina	2–4	54.000	Inibidor de protease
α_2-macroglobulina	1,5–3,5	725.000	Inibidor de protease
Haptoglobulina	0,4–2,9	100.000 (tipo 1–1)	Liga-se à hemoglobina
β-lipoproteína	2,7–7,4	380.000	Transporta lipídeos
Transferrina	2–4	80.000	Transporta ferro
C3	0,6–1,4	185.000	Componente do sistema complemento
Fibrinogênio	1–4	340.000	Formação de coágulos
IgA	0,4–3,5	160.000	Imunidade de superfície
IgD	0,1–0,4	180.000	
IgE	50–600 (μg/L)	180.000	Liga-se aos mastócitos; reações de hipersensibilidade
IgG	7–15	150.000	Imunidade humoral
IgM	0,25–2	850.000	Resposta primária na imunidade humoral

protein). Esta, por sua vez, forma complexo com a vitamina A para transportá-la pelo corpo (Peterson, 1971). A RBP é uma pequena proteína constituída por apenas 182 aminoácidos. Por ser pequena, é rapidamente removida da circulação por filtração renal, caso não seja mantida no plasma pela pré-albumina (proteína maior), a qual não é eliminada na filtração glomerular. O complexo retinal, a RBP e a transtiretina aparentemente são montados no retículo endoplasmático dos hepatócitos (Gaetani, 2002).

É uma proteína rica em triptofano (sendo, às vezes, denominada pré-albumina rica em triptofano) e também apresenta uma considerável conformação em lâminas β-pregueadas. Uma parte da pré-albumina atua como fonte do componente amiloide β-fibrilar na polineuropatia amiloidótica familiar do tipo I (Glenner, 1980). Essa amiloidose hereditária deriva de uma mutação no gene da pré-albumina, que resulta na formação de uma proteína (p. ex., variante Met 30 da TTR) suscetível à clivagem proteolítica, com consequente formação dos fragmentos β-estruturados constituintes do amiloide nas fibras nervosas (Ii, 1991; Saraiva, 1989). Mais de 80 mutações diferentes no gene da TTR foram identificadas, e a maioria afeta os nervos ou o coração por meio da formação do amiloide. Essas variantes patogênicas da pré-albumina são indistinguíveis da forma normal, quando analisadas pela eletroforese de proteínas padrão. Atualmente, o diagnóstico se baseia na análise no nível do DNA.

A pré-albumina circulante apresenta meia-vida curta (cerca de 2 dias), comparada às demais proteínas séricas majoritárias. Sua taxa de síntese é também extraordinariamente sensível à manutenção de uma nutrição adequada e a alterações da função hepática no local em que é produzida. Por isso, suas concentrações séricas flutuam mais rapidamente em resposta a alterações na taxa de síntese, em comparação às demais proteínas, inclusive a albumina. Assim, a quantificação da pré-albumina sérica tem utilidade sobretudo clínica, como marcador do *status* nutricional (Gofferje, 1978). Dada a rápida dinâmica de sua síntese e depuração, atua melhor como indicador precoce de mudanças do *status* nutricional do que outros marcadores comumente utilizados, como a albumina e a transferrina, cujos níveis, apesar de mais abundantes, respondem a outros fatores e de forma mais lenta.

Em razão do seu grau de compactação, a pré-albumina circula mais facilmente pelo LCE do que as demais proteínas séricas. Por esse motivo, concentrar o LCE antes da realização da eletroforese permite visualizar uma banda distinta de pré-albumina no gel. O LCE normalmente exibe um pico maior de albumina mais pré-albumina e uma pequena quantidade de transferrina. A eletroforese de LCE é solicitada com frequência para detecção de bandas oligoclonais de Igs, e a presença de uma banda distinta de pré-albumina serve apenas de referencial para confirmar que a amostra analisada era provavelmente LCE. A verdadeira pré-albumina em geral está abaixo do limiar de detecção da eletroforese sérica e, em vez desse método, é melhor detectada por ensaios imunológicos, como a nefelometria. Em pacientes submetidos à terapia com heparina, a banda de pré-albumina é observada com frequência. Na circulação, a heparina ativa e libera LPL. Essa enzima ataca os TGs existentes nas frações lipoproteicas e, assim, aumenta consideravelmente a migração eletroforética para o ânodo. A coloração das proteínas revela a presença de apolipoproteínas na posição correspondente à pré-albumina, porém, nenhuma fração de β-lipoproteína é detectada. Esse efeito ocorre *in vivo* e é anulado caso a heparina seja adicionada a amostras já coletadas.

Albumina. É a proteína isolada mais abundante no plasma normal e, usualmente, constitui até dois terços do conteúdo plasmático total de proteínas (Peters, 1975). Por esse motivo, a queda dos níveis de albumina em decorrência do comprometimento de sua síntese (p. ex., desnutrição, má absorção, disfunção hepática) (Rothschild, 1972) ou de perdas (p. ex., ascites, nefropatia ou enteropatia com perda proteica) resulta em sério desequilíbrio da pressão oncótica intravascular. Essa perda se manifesta clinicamente pelo desenvolvimento de edema periférico (Slater, 1975). Entretanto, a ausência congênita de albumina (analbuminemia) em geral não acarreta problemas desse tipo, talvez graças ao controle das pressões hidrostáticas exercido por mecanismos compensatórios vitalícios (Waldman, 1964). A albumina também serve de repositório móvel de aminoácidos para incorporação a outras proteínas. Uma terceira função é a de transporte geral ou de proteína transportadora. Muitos ligantes orgânicos e inorgânicos (p. ex., tirotoxina, bilirrubina, penicilina, cortisol, estrógeno, ácidos graxos livres, warfarina [Coumadina], cálcio, magnésio e heme) acoplam-se a diferentes regiões da molécula, seja por meio de ligações covalentes (p. ex., δ-bilirrubina) (Lauff, 1982), seja por meio de ligações dissociáveis (Koch-Weser, 1976). Essas interações com ligantes tão distintos tornam-se possíveis em razão da ampla variedade de sítios de ligação existentes na albumina, que é composta por 585 aminoácidos dispostos em nove alças unidas por ligações dissulfeto estabelecidas entre os resíduos de cisteína (Meloun, 1975). Sua sequência primária possui três regiões principais, e cada uma contém três alças peptídicas. Essa conformação das alças sugere que a molécula resulta da duplicação de algum gene ancestral em processo de rearranjo em tandem (Peters, 1977; Sevall, 1986). É igualmente interessante observar que a α-fetoproteína possui regiões de homologia com a molécula de albumina sérica, indicando uma origem ancestral comum a ambas as proteínas.

Além da anomalia genética da analbuminemia, existem muitas variantes hereditárias de albumina que diferem do alótipo mais comum – a albumina A – por substituições de aminoácidos únicos. Em comparação à albumina A, tais variantes apresentam migração mais rápida ou mais lenta, que resulta na formação de dois picos distintos de albumina (bisalbuminemia) na condição heterozigota. Aparentemente, nenhuma das variantes afeta a saúde, contudo, uma delas apresenta grande afinidade pela tirotoxina e, em consequência, provoca aumento dos níveis séricos desse hormônio em indivíduos que, todavia, permanecem eutireoides (Ruiz, 1982).

Em indivíduos normais, até 8% da concentração de albumina circulante sofre glicosilação não enzimática. Por outro lado, até 25% perde a glicosilação durante a hiperglicemia, analogamente ao que ocorre com a hemoglobina glicosilada (Guthrow, 1979). A meia-vida da albumina circulante é de cerca de 17 dias. Desse modo, a quantificação da forma glicosilada pode ser útil ao monitoramento de controle do diabetes em um intervalo de algumas semanas. A quantificação da fração de albumina glicosilada (também denominada frutosamina) pode ser bastante útil em avaliações de controle do diabetes em pacientes com anemias hemolíticas (p. ex., anemia falciforme, talassemia, hemólise autoimune), cujas hemácias apresentam sobrevida acentuadamente diminuída e nos quais a determinação do conteúdo de hemoglobina glicosilada não é confiável. As medidas da concentração de albumina glicosilada podem não ser confiáveis para avaliações de controle do diabetes em casos de pacientes que apresentam nefropatia com perda proteica, pois nestes a depuração da albumina é acelerada. Pacientes diabéticos submetidos à hemodiálise podem ser monitorados tanto pela hemoglobina glicosilada quanto pela albumina glicosilada (Ghacha, 2001).

A análise de albumina recém-sintetizada a partir de sítios intracelulares revelou a existência de uma pró-albumina precursora, que contém um hexapeptídeo adicional em sua porção aminoterminal. A estrutura primária da albumina possui 35 resíduos de cisteína, dos quais 34 formam ligações dissulfeto, enquanto um permanece livre. Durante o armazenamento prolongado por vários dias, a albumina forma dímeros covalentemente ligados por meio das cisteínas livres e, como resultado, às vezes há o aparecimento de uma banda extra de albumina no gel de eletroforese.

As quantificações clínicas do conteúdo de albumina são realizadas com bastante frequência, e as determinações do conteúdo de proteínas totais e de albumina costumam ser incluídas nos padrões de painéis bioquímicos. Os painéis de testes bioquímicos orientados por um dado órgão ou doença atualmente em uso incluem as seguintes determinações: albumina e proteínas totais, em painéis metabólicos abrangentes e no painel de função hepática; albumina, no painel de função renal.

Elevações da concentração sérica de albumina são pouco comuns, embora sejam observadas em casos de desidratação, à medida que o conteúdo plasmático de água diminui. Após a re-hidratação, os níveis de albumina devem retornar à faixa referencial normal. Também pode haver aumento da concentração sérica de albumina causado por artefatos, como resultado da aplicação de torniquetes por tempo prolongado para realização de punções venosas. Nesse caso, a aumentada pressão hidrodinâmica gerada pelo volume venoso sobressalente empurra a água e pequenos solutos para fora do espaço intravascular e, assim, concentra elementos celulares, formas micelares de lipoproteínas e proteínas, como a albumina.

A queda da concentração de albumina é com frequência observada em indivíduos doentes, e um exame de pacientes hospitalizados é capaz de revelar uma proporção substancial de quantificações de albumina com resultados abaixo dos valores de referência para indivíduos sadios (Fig. 19.6). Embora algumas dessas diminuições provavelmente se devam a diluições produzidas pela administração de líquidos endovenosos, outras são causadas pela perda de albumina por meio da urina, líquido ascítico ou trato GI, durante enteropatias, ou pela diminuição da síntese hepática consequente a uma doença hepática (p. ex., cirrose), ou ainda em decorrência de um efeito secundário sobre a síntese causado por comprometimento da nutrição ou desvio da capacidade de síntese para produção de outras proteínas. Essa redução sensível – porém inespecífica – do conteúdo de albumina em tantas condições diferentes resultou na denominação "reagente de fase aguda negativo" (Post, 1991). A quantificação da concentração de albumina é vital à compreensão e interpretação dos níveis de cálcio e magnésio. Como tais íons se ligam à albumina, como consequência a redução da concentração de albumina é diretamente responsável pela queda de suas concentrações. Em alguns estados doentios, a diminuição do conteúdo de albumina é compensada ao menos parcialmente por aumentos da concentração de outras proteínas séricas que estabilizam a pressão oncótica intravascular. Na cirrose, em particular, observa-se um importante aumento policlonal da concentração de Igs da fração γ (Fig. 19.3*A*). Na síndrome nefrótica, os níveis de AMG encontram-se aumentados (Fig. 19.3*B*).

Os líquidos corporais produzidos normalmente, como o LCE, ou em condições patológicas, como os filtrados plasmáticos (p. ex., ascite), contêm albumina como componente principal e outras proteínas plasmáticas cuja contribuição é irrelevante. De forma geral, a presença de albumina na urina é considerada anormal, mesmo quando são detectados apenas traços da proteína, embora alguns indivíduos apresentem albuminúria após a prática de exercícios intensos. A progressão da nefropatia diabética pode ser avaliada por meio da quantificação da albuminúria, uma vez que tende a aparecer na urina antes das demais proteínas séricas no curso da lesão glomerular renal. A determinação imunológica da microalbumina na urina atualmente é considerada um método padrão para supervisão do diabetes melito e para detecção prococe das complicações decorrentes desse distúrbio. A síndrome nefrótica, que é marcada por uma hipoalbuminemia extensiva, muitas vezes se deve à nefropatia diabética ou a uma das várias doenças glomerulares primárias (Orth, 1998).

α_1-antitripsina (AAT). O principal componente das α_1-globulinas é uma proteína inibidora de protease – a AAT. Essa proteína tem a capacidade de se combinar à tripsina e inativá-la (Eriksson, 1965; Berninger, 1985a). A primeira evidência de sua função veio com a descoberta de que o soro de alguns adultos jovens com enfisema pulmonar era deficiente em α_1-globulina. Novas investigações revelaram uma deficiência semelhante envolvendo a AAT em crianças com cirrose (Sveger, 1976). Normalmente, a concentração sanguínea de tripsina circulante não é apreciável, contudo, outras proteases correlatas, como a elastase, são liberadas por leucócitos em resposta a agentes irritantes ou inflamação. A AAT é capaz de neutralizar a atividade dessas proteases e, por esse motivo, atua como fator intrínseco no mecanismo homeostático, modulando a proteólise endógena e prevenindo respostas bioquímicas inadequadamente severas à inflamação (Cox, 1986).

A maioria da população é homozigota para o alelo M totalmente ativo da AAT ou apresenta fenótipo MM (Lieberman, 1972). Cerca de 10% da população de indivíduos brancos (e proporções menores das demais raças) é heterozigota para o alelo M e para alguns outros alelos de inibidores de protease (ou sistema Pi). Mais de 2% é portador do alelo *PiZ* e exibe fenótipo MZ. Embora tais indivíduos apresentem uma capacidade de inibição de tripsina um pouco reduzida, são assintomáticos. Entretanto, sua prole homozigota (ZZ) é suscetível à doença pulmonar ou hepática. O fenótipo ZZ é observado em cerca de 1 a cada 4.000 indivíduos. A eletroforese de proteínas séricas pode ser empregada na triagem da deficiência de AAT, contudo, os resultados obtidos devem ser confirmados com testes auxiliares, como o teste de capacidade inibitória da tripsina (TIC, *trypsin inhibitory capacity*) e a fenotipagem por eletroforese cruzada ou focalização isoelétrica (Jeppsson, 1982), para que possa ser excluída a possível presença de outros alelos, como *PiS* ou *PiF*, que migram de modos diferentes. Esses alelos resultam em menor TIC, contudo, provavelmente são suficientes para prevenir a ocorrência das anormalidades observadas com o fenótipo ZZ, cujo TIC muito baixo corresponde à concentração de AAT antigênica. Diante de casos suspeitos, a triagem também pode ser realizada por nefelometria para quantificação dos níveis séricos de AAT. Somente o fenótipo ZZ apresenta níveis notavelmente reduzidos dessa proteína. A caracterização definitiva pode requerer uma análise da sequência de DNA na região correspondente ao gene *AAT*. Existem pelo menos 75 alelos diferentes desse gene. Cerca de 17 alelos determinam uma produção de proteína suficientemente baixa para causar doença pulmonar, sendo poucos os que causam doença hepática (Cox, 1986).

A terapia para enfisema pulmonar secundário à deficiência de AAT apresentou avanços consideráveis nos últimos anos, por causa da reposição endovenosa de AAT com concentrados ou proteína recombinante, visando a elevar suficientemente os níveis da proteína para conferir proteção antielastase aos pulmões (Snider, 1989). A reposição da proteína por inalação também é efetiva nos casos de pacientes em que a doença pulmonar ainda não se expandiu (Hubbard, 1989). É essencial que os indivíduos homozigotos não fumem, pois a fumaça do cigarro é uma das principais fontes de irritantes que desencadeiam a liberação de proteases pelos leucócitos nos pulmões (Gelb, 1977). Em crianças pequenas, a cirrose é tratada com transplante hepático, uma vez que o fígado é o sítio da síntese de AAT. Um aspecto interessante da cirrose e do fenótipo ZZ consiste na presença de grânulos com AAT mutante não sialilada no interior dos hepatócitos, implicando um defeito de secreção associado a esses alelos. A terapia de reposição é ineficaz nos casos de cirrose secundária à anomalia da AAT. Crianças com esse distúrbio podem desenvolver uma colestase progressiva e severa que requer transplante hepático imediato. Após o transplante, o paciente adquire o fenótipo do doador do órgão.

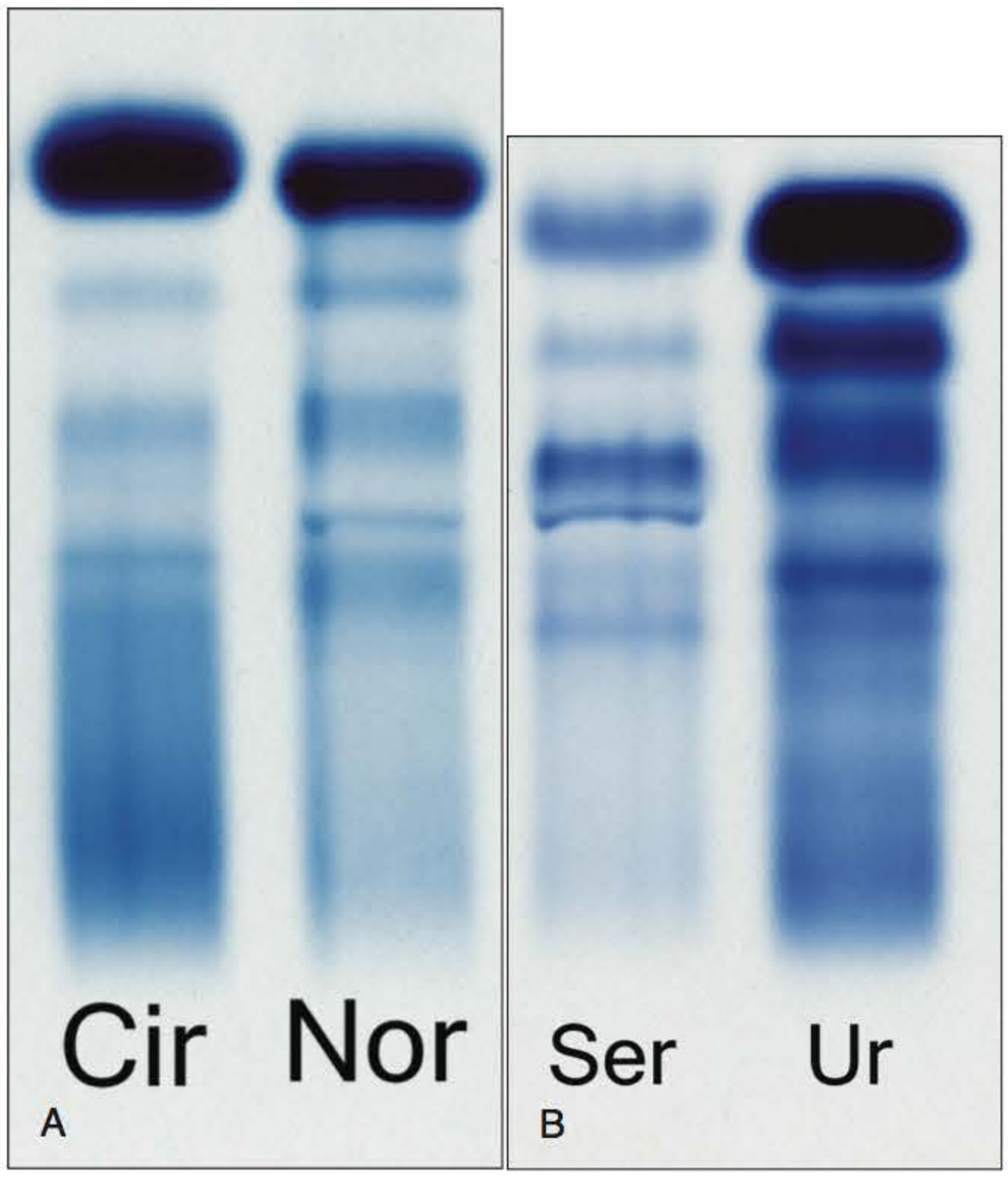


Figura 19.3 *A*, eletroforese de proteínas séricas em amostra de paciente com cirrose (Cir), mostrando uma albumina que migra mais rapidamente do que no soro de paciente normal (Nor), em razão da carga negativa adicional da bilirrubina conjugada covalentemente ligada (i.e., δ-bilirrubina). As γ-globulinas estão muito aumentadas na elevação policlonal característica da cirrose hepática. *B*, padrões de eletroforese de proteínas séricas (Ser) e de urina concentrada (Ur) de amostras de paciente com síndrome nefrótica. Proteínas de menor tamanho molecular, como a albumina, são preferencialmente perdidas a partir do sangue pela urina. Proteínas maiores, como a α_2-macroglobulina e a β-lipoproteína, permanecem retidas no sangue e constituem as bandas predominantes no padrão sérico.

A AAT é uma das glicoproteínas cujos níveis se elevam em resposta à inflamação aguda, porém, essa elevação não possui especificidade clínica. A fração α_1 jamais é totalmente nula na deficiência de AAT, uma vez que outras proteínas (p. ex., α-lipoproteína, α_1-glicoproteína ácida) migram sem, no entanto, se resolverem em bandas distintas.

α_2-macroglobulina (AMG). A AMG é a maior proteína não Ig existente no plasma, com peso molecular de 725.000 Da (Roberts, 1985). Em indivíduos normais, a concentração sérica é comparável à da AAT, outra importante inibidora de proteases, embora seja encontrada em níveis discretamente maiores em mulheres em resposta aos estrógenos (Horne, 1970). A concentração de AMG aumenta cerca de 10 vezes (ou mais) na síndrome nefrótica, quando há perda de outras proteínas plasmáticas de peso molecular inferior (Beetham, 1993). Em razão do seu tamanho, a AMG não é perdida pela urina e, como resultado líquido, acaba alcançando níveis plasmáticos iguais ou maiores que os de albumina (cerca de 2–3 g/dL) na síndrome nefrótica. Com isso, a pressão oncótica é mantida. Nessa condição, observa-se ainda um aumento de sua síntese, o qual responde pelo aumento absoluto de sua concentração. A AMG inativa as proteases ao formar complexos e ligar-se a elas de modo covalente. Assim, sua própria conformação é alterada e, como resultado, aumenta sua depuração por meio do sistema reticular endotelial. Existem ao menos quatro formas moleculares de AMG que diferem entre si quanto ao conteúdo de ácido siálico, manose e galactose, e que podem ser separadas por focalização isoelétrica. Outras variações moleculares provavelmente são resultantes de proteases que se ligaram à AMG antes de sua remoção da circulação. O espectro de sua ação inibitória é bastante amplo, incluindo quase todos os tipos de serina, carboxil, tiol e metaloproteases. Com o antígeno específico da próstata, a AMG forma um complexo que não é detectado por meio do imunoensaio para PSA (Cap. 74). Embora sua função certamente seja importante para a manutenção do equilíbrio durante o declínio e para o fluxo da proteólise, não se conhece nenhuma deficiência específica associada ou condição patológica atribuída à diminuição dos níveis de AMG, de modo geral. Elevações discretas da concentração dessa proteína podem ser precocemente detectadas por eletroforese de proteínas séricas no curso da nefropatia diabética.

Haptoglobina. Outra proteína importante que migra na região α_2 é a haptoglobina. Sua função consiste em combinar-se à hemoglobina liberada por hemácias lisadas, a fim de preservar os estoques de ferro e proteínas do organismo. A meia-vida da haptoglobina circulante, livre de hemoglobina, é de cerca de 4 dias. Os complexos haptoglobina-hemoglobina são removidos da circulação em poucos minutos pelo sistema reticular endotelial. Nesse local, a hemoglobina é quebrada em globina e heme, o qual é degradado em ferro e bilirrubina. Quando a capacidade de ligação da haptoglobina à hemoglobina é excedida, a hemoglobina livre entra no filtrado glomerular sob a forma de dímeros de cadeias α e β. Esses dímeros são reabsorvidos subsequentemente nos túbulos proximais renais e convertidos em hemossiderina.

A haptoglobina possui duas cadeias pesadas e duas cadeias leves unidas por ligações dissulfeto, analogamente à estrutura básica das Igs. Em alguns indivíduos, o gene que codifica a cadeia leve encontra-se duplicado, apresentando um arranjo em cabeça-cauda (tipo 2). A haptoglobina normal (tipo 1-1) origina espécies moleculares únicas com peso molecular igual a 100.000 Da. Além da haptoglobina de tipo 1-1, os indivíduos heterozigotos (1-2) possuem uma série de multímeros (p. ex., dímeros, trímeros) que resultam das ligações dissulfeto intermoleculares existentes na cadeia leve duplicada. A haptoglobina de tipo 2-2 consiste em uma série distinta de multímeros, uma vez que as cadeias leves de tipos 1 e 2 apresentam pesos moleculares diferentes (Konigsberg, 1974).

A haptoglobina pode ser quantificada em termos de sua capacidade de ligação à hemoglobina ou por meio de métodos imunológicos, especialmente por nefelometria. Por conta do impedimento estérico existente entre os sítios moleculares dos multímeros, os diferentes fenótipos de haptoglobina resultam em medidas de capacidade de ligação a antígenos ou à hemoglobina que podem ser discrepantes em relação à quantidade absoluta de haptoglobina existente na amostra. Do mesmo modo, o intervalo de referência para a haptoglobina é mais amplo quando se considera uma população de fenótipos distintos, em comparação aos fenótipos individuais. Por esse motivo, a interpretação das concentrações dessa proteína é segura para medidas seriadas tomadas de um mesmo indivíduo. Todavia, níveis muito elevados podem ser distinguidos de concentrações muito baixas de imediato, e essa distinção pode ser importante na primeira vez em que o paciente é avaliado quanto à hemólise. A deficiência congênita de haptoglobina aparentemente não tem consequências clínicas (Manoharan, 1997).

A concentração sérica de haptoglobina aumenta em resposta ao estresse, infecções, inflamação aguda ou necrose tecidual, possivelmente em decorrência da estimulação de sua síntese (ver adiante em Reagentes de Fase Aguda). Após um episódio hemolítico, a concentração de haptoglobina cai, à medida que os complexos haptoglobina-hemoglobina são eliminados da circulação. Esse efeito é drástico após os eventos de hemólise massiva observados em reações hemolíticas transfusionais, queimaduras térmicas ou anemia hemolítica autoimune. A quantificação dessa proteína também é útil para o monitoramento seriado de pacientes que apresentam uma taxa lenta, porém constante, de quebra de hemácias, como aquelas causadas pela ação mecânica de válvulas cardíacas, hemoglobinopatias ou trauma associado ao exercício. Baixas concentrações de haptoglobina podem ser detectadas na doença hepática, quando há comprometimento de sua síntese. Além disso, indivíduos com deficiência congênita de haptoglobina aparentemente utilizam outros mecanismos para preservar as reservas de ferro do organismo. Amostras de soro obtidas de sangue hemolisado *in vitro* durante a flebotomia ou o processamento apresentam uma banda eletroforética deslocada correspondente aos complexos haptoglobina-hemoglobina.

É preciso observar que a mioglobina não se liga à haptoglobina e, portanto, a liberação de grandes quantidades de mioglobina durante a rabdomiólise não acarreta a diminuição dos níveis séricos de haptoglobina. Essa diferença pode ser útil no *work up* de um teste de vareta medidora de nível positivo (na verdade, um teste para detecção da atividade de pseudoperoxidase do heme da hemoglobina ou da mioglobina) para presença de sangue na urina sem coexistência de hemácias. Nesse caso, a detecção de baixos níveis séricos de haptoglobina sugere hemoglobinúria (hemólise), enquanto a detecção de níveis séricos elevados da proteína indica mioglobinúria. A isozima lactato desidrogenase (LDH) 1 presente no soro também está associada à hemólise, enquanto a LD_5 e a creatina quinase são liberadas na rabdomiólise.

β-lipoproteína. A β-lipoproteína (lipoproteína de baixa densidade [LDL]) migra com uma característica borda pontiaguda de orientação catódica que deixa um rasto peniforme mais próximo ao ânodo. Apesar de ser melhor quantificada com corantes para lipídeos, o conteúdo de apolipoproteína é suficiente para dar origem a uma banda distinta quando são utilizados corantes para proteína. A posição exata da banda de β-lipoproteína é sensível à ingestão recente de alimentos ricos em gordura. Assim, as amostras coletadas em jejum e aquelas obtidas no período pós-prandial apresentam bandas de β-lipoproteína em posições discretamente diferentes. As demais lipoproteínas (lipoproteína de densidade muito baixa [VLDL], lipoproteínas de alta densidade [HDL] e quilomícrons [QM]) apresentam intensidade relativamente pequena e ocupam posições eletroforéticas que se sobrepõem às de outras proteínas séricas. Por esse motivo, tais frações em geral não são observadas com os corantes de proteína. A administração de heparina ativa a lipoproteína lipase pós-heparina, que, por sua vez, degrada os triglicerídeos existentes nas frações de lipoproteínas circulantes. Em consequência, as amostras obtidas de pacientes tratados com heparina apresentam uma banda anômala de β-lipoproteína passageira que migra muito rapidamente e percorre a via eletroforética de modo irregular, mesmo na região pré-albumina. Elevações da concentração de LDL – com uma banda de β-lipoproteína corada de modo mais intenso – são observadas em casos de hipercolesterolemia. As lipoproteínas foram discutidas em maior profundidade no Capítulo 17.

Transferrina. A principal β-globulina é a transferrina (siderofilina). Essa proteína transporta íons férricos a partir das reservas de ferro da ferritina intracelular ou mucosa até a medula óssea, onde os receptores de transferrina são encontrados na superfície dos precursores de hemácias e linfócitos (Irie, 1987).

A transferrina é composta por 687 aminoácidos, e seu peso molecular calculado é igual a 79.550 Da (MaCGillivray, 1982). A análise da sequência de aminoácidos revela que essa proteína possui dois domínios homólogos, que podem ter surgido a partir da duplicação contínua

de um gene ancestral da transferrina. Cada domínio possui um sítio de ligação com afinidade muito forte pelo ferro. A transcrição do mRNA para síntese hepática de transferrina é regulada pela concentração de ferro na circulação e ao redor dos hepatócitos.

No soro normal, os níveis de transferrina variam de 200 a 400 mg/dL e são convenientemente quantificados como capacidade de ligação ao ferro (IBC, *iron binding capacity*) (Tsung, 1975). Em resposta a uma deficiência de ferro de curta duração, os níveis da proteína sobem acentuadamente, alcançando valores equivalentes ao dobro (ou mais) do normal. Por ser uma espécie molecular única com estreita mobilidade eletroforética, a transferrina, em níveis elevados, pode parecer semelhante a uma paraproteína (pseudoparaproteinemia) em casos de deficiência de ferro severa (Zawadzki, 1970). Na gravidez, deve ser previsto ao menos um certo grau de deficiência de ferro e elevação dos níveis de transferrina (Mendenhall, 1970). A administração de ferro a pacientes com deficiência aumenta a saturação e resulta na normalização da transferrina.

A saturação crônica da transferrina ocorre na hemocromatose idiopática e na hemossiderose transfusional. Como praticamente inexiste IBC insaturado nessas síndromes, a mobilização normal do ferro para excreção fica comprometida e resulta na manifestação de distúrbios relacionados à deposição desse bioelemento. Essa deposição também ocorre na deficiência congênita de transferrina. Entre as estratégias empregadas na triagem da hemocromatose, é realizada a quantificação dos níveis séricos de ferro e transferrina (em geral, por ensaio nefelométrico), acompanhada do cálculo do porcentual de saturação como melhor índice para identificação de casos previamente não reconhecidos. A hemocromatose é um distúrbio hereditário que resulta em cirrose, diabetes, cardiomiopatia, artrite e outros distúrbios de ordem endócrina, que são devidos aos efeitos tóxicos do excesso de ferro livre. A triagem dessa doença é importante, pois sua progressão pode ser interrompida pela redução da carga de ferro do organismo por meio de procedimentos como flebotomia ou terapia quelante.

A transferrina também pode apresentar efeito antibacteriano ao complexar-se e remover ferro das bactérias que dele necessitam para crescer (Reddy, 1970; Weinberg, 1978).

Na nefropatia com perda proteica suficientemente grave, a transferrina circulante é perdida pela urina, levando ferro consigo. Essa perda pode contribuir para o desenvolvimento de anemia hipocrômica.

Variantes eletroforéticas da transferrina são às vezes observadas no soro, em razão da variação alotípica da sequência de aminoácidos. Por esse motivo, suas moléculas apresentam cargas elétricas diferentes. Nesse caso, na condição de heterozigose, observa-se uma banda duplicada onde deveria haver uma única banda eletroforética de transferrina (Kamboh, 1987).

A transferrina é uma glicoproteína em que são adicionadas várias moléculas de açúcar a moléculas proteicas recém-sintetizadas no fígado. Indivíduos que consomem álcool em excesso apresentam no soro uma transferrina anormalmente deficiente em carboidratos (Stibler, 1991). Essa molécula aberrante de transferrina pode ser produzida em decorrência de uma falha das glicosiltransferases presentes nos hepatócitos ou de um aumento da atividade de sialidase no soro, ou ainda por conta de uma combinação desses dois fatores (Xin, 1995). A transferrina deficiente em carboidrato pode ser detectada por cromatografia de troca aniônica ou por focalização isoelétrica das isoformas séricas, com subsequente realização de *immunoblotting*. Outros métodos são HPLC, eletroforese de zona capilar, espectrometria de massa e imunoensaio turbidimétrico (Bean, 2001).

Uma variante da transferrina foi identificada no LCE (Zaret, 1992), nos humores vítreo e aquoso oculares (Tripathi, 1990) e na perilinfa do ouvido (Thalmann, 1994). Em termos bioquímicos, comparativamente à transferrina encontrada no plasma, falta ácido siálico em sua glicosilação (Hoffman, 1995). É denominada asialotransferrina, proteína τ ou β_2-transferrina, porque apresenta uma migração eletroforética discretamente diferente (em direção ao cátodo) em decorrência de sua menor carga elétrica negativa (Blennow, 1995). O LCE contém ambas as formas da proteína – transferrina plasmática e asialotransferrina. O plasma, por outro lado, contém apenas uma das formas. Consequentemente, a detecção da asialotransferrina no líquido de uma fístula ou no líquido de drenagem constitui evidência presumível da presença de LCE em casos de fratura do crânio ou outros tipos de trauma na cabeça envolvendo drenagem nasal (Solomon, 1999), ou da presença de perilinfa no líquido da fístula ocasionada por procedimentos otológicos, como implantes cocleares (Delaroche, 1996). A asialotransferrina apresenta a mesma reatividade imunológica da transferrina e, assim, pode ser prontamente detectada por *immunoblotting* logo após uma análise de eletroforese (Roelandse, 1998). Esse procedimento pode ser realizado com facilidade, por meio da adaptação de sistemas de eletroforese em gel comercialmente disponíveis, já em uso em diversos laboratórios para imunofixação direta de Igs (Normansell, 1994). Utilizando-se um anticorpo antitransferrina, é possível demonstrar a presença de uma única banda de transferrina em amostras de soro, porém, serão observadas duas bandas eletroforéticas se houver LCE em tais amostras (Fig. 19.4). Além do líquido a ser testado, obtido do paciente, é necessário incluir soro para excluir as possíveis variantes alélicas da transferrina, que poderiam resultar em falsos positivos caso não fossem identificadas (Sloman, 1993). A presença de LCE no líquido de drenagem pode requerer um reparo cirúrgico ou uma terapia com antibióticos, de modo que a detecção da asialotransferrina como marcador de LCE possa exercer forte impacto clínico.

Complemento. A molécula C3 do sistema complemento é uma fração à parte de β-globulina. Embora seja facilmente resolvida a partir de uma amostra de soro fresco, em amostras armazenadas e em controles comerciais produzidos com soro liofilizado, a C3 é clivada para formar C3c, a qual migra anodicamente para C3, comportando-se de modo indistinto das demais β-globulinas. A queda dos níveis de C3 é observada em doenças autoimunes, quando o sistema complemento é ativado e a proteína se liga a imunocomplexos que se depositam sobre os tecidos, removendo-a do plasma. Dessa forma, a concentração de C3 (e também de C4) constitui um marcador conveniente para avaliar a atividade da doença em distúrbios reumáticos, como lúpus eritematoso e artrite reumatoide. A C4 não é observada na eletroforese de proteínas séricas, pois sua concentração em geral corresponde a apenas um quinto da concentração de C3. Por meio da nefelometria é possível quantificar ambas, C3 e C4, para monitorar a atividade de uma doença reumática. Nenhum significado diagnóstico particular é atribuído à detecção de níveis anormalmente elevados de C3 ou C4, a não ser o de indicação discreta de uma resposta de fase aguda. O sistema complemento e seus inibidores serão discutidos em maiores detalhes no Capítulo 46.

Fibrinogênio. O plasma contém cerca de 100 a 400 mg/dL de fibrinogênio, que é o mais abundante dos fatores de coagulação, responsável pela formação do coágulo de fibrina. Com peso molecular total

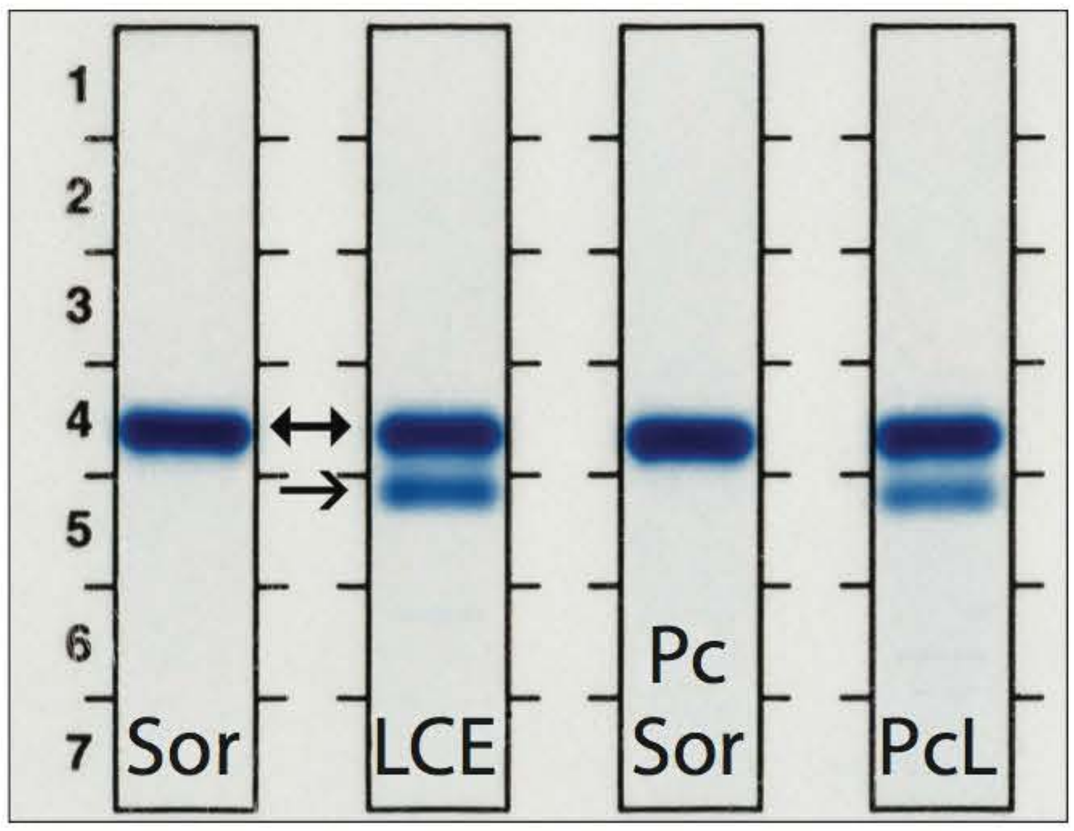


Figura 19.4 Imunofixação com anticorpos antitransferrina para detecção no LCE. Sor, soro normal, mostrando a posição da transferrina (Tf, seta dupla); LCE, posição normal da Tf e da asialotransferrina (aTf, seta de cabeça única); Pc Sor, soro de paciente incluído na análise para exclusão da variante eletroforética de Tf; Pc L, líquido desconhecido proveniente de paciente, demonstrando bandas tanto de Tf quanto de aTf, que confirmam a presença de LCE nesse material.

de 340.000 Da, o fibrinogênio é um dímero constituído por três pares de cadeias peptídicas (A-α, B-β e γ) unidas por múltiplas ligações dissulfeto nas proximidades das regiões aminoterminais (Doolittle, 1975, 2001). Essa região da molécula é denominada domínio E ou nó dissulfeto (DSK, *disulfide knot*). As cadeias se estendem para fora, em outros dois domínios (D) idênticos em suas porções carboxiterminais, onde as três se entrelaçam. A trombina cliva os fibrinopeptídeos A e B a partir da região aminoterminal das cadeias A-α e B-β, resultando na formação de um monômero de fibrina. Este se polimeriza nas fibrilas que, macroscopicamente, compõem o coágulo de fibrina. Em seguida, o fator XIII produz ligações covalentes entre os resíduos de lisina e glutamina em cadeias γ paralelas de diferentes móleculas de fibrina, transformando o coágulo de fibrina essencialmente em uma molécula única. O coágulo, com suas ligações cruzadas, é refratário à dissolução por agentes químicos desnaturantes e é muito estável do ponto de vista mecânico.

Inúmeras variantes hereditárias do fibrinogênio (disfibrinogenemias) foram identificadas, nas quais uma molécula de fibrinogênio funcionalmente anormal é sintetizada com uma sequência de aminoácidos alterada em decorrência de mutações genéticas. Em algumas disfibrinogenemias, há comprometimento da coagulação e diátese hemorrágica. Em outros casos, observa-se uma tendência aumentada à trombose (Menache, 1973). A afibrinogenemia congênita – condição em que não ocorre síntese de fibrinogênio – resulta paradoxalmente em um distúrbio hemorrágico que não é tão severo como nas hemofilias, em termos de anormalidades articulares secundárias à hemorragia (hemartroses).

Assim como para os demais reagentes de fase aguda, os níveis de fibrinogênio ocasionalmente atingem valores acima de 1 g/L. Em tais circunstâncias, a taxa de sedimentação eritrocitária (ESR, *erythrocyte sedimentation rate*) também sofre um aumento marcante como consequência direta da alteração do conteúdo de fibrinogênio. Na gravidez e durante o uso de contraceptivos, os níveis desse fator igualmente se elevam. Baixos níveis em geral indicam a ocorrência de ativação extensiva da coagulação com consumo de fibrinogênio. Durante esse processo, o plasminogênio também é ativado e dá origem à plasmina, a qual degrada fibrina e fibrinogênio em produtos de quebra que são quantificados para avaliação da coagulação intravascular. Normalmente, os coágulos formados são removidos pela ação da plasmina, que, por sua vez, é inativada por uma antiplasmina e por outros inibidores de proteases.

O fibrinogênio está ausente no soro normal, porém, deve ser encontrado na eletroforese de amostras de plasma como uma banda distinta entre as bandas de β e γ-globulinas (Fig. 19.5). Não raro, o sangue coletado de pacientes tratados com heparina não coagula por completo e, na análise da amostra por eletroforese, é detectada uma banda de fibrinogênio. Essa banda pode ser distinguida por meio do exame da amostra à procura de um bom coágulo e por repetidas corridas eletroforéticas de uma amostra totalmente coagulada. É importante realizar esse procedimento para distinguir uma banda residual de fibrinogênio de uma deflexão (*spike*) na banda de Ig monoclonal, uma vez que ambos podem migrar na mesma posição eletroforética.

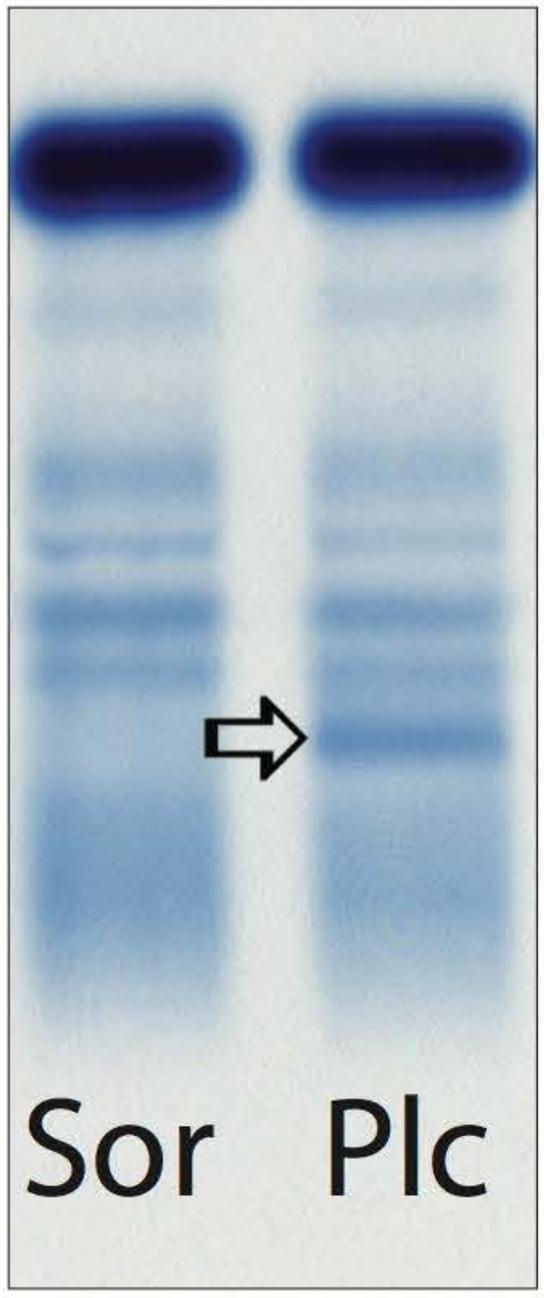


Figura 19.5 A comparação do soro (Sor) com o plasma citrado (Plc) do mesmo paciente mostra a posição do fibrinogênio plasmático (seta), o qual não deve ser confundido com uma imunoglobulina monoclonal.

Componentes minoritários

O próximo grupo de proteínas individuais representa aquelas que, por estarem presentes no soro em baixas concentrações, são detectadas com pouca frequência por meio da eletroforese de proteínas padrão. Tipicamente, sua quantificação é realizada por métodos imunológicos.

Ceruloplasmina. Trata-se de uma proteína ligadora de cobre que migra com as α_2-globulinas. Seu papel fisiológico preciso é desconhecido, no entanto, sua atividade de oxidase já foi demonstrada em laboratório (Cap. 21). Sintetizada no fígado, tem peso molecular de 132.000 Da e é constituída de uma única cadeia polipeptídica. Embora os níveis séricos de ceruloplasmina sejam baixos ao nascimento (Al-Rashid, 1971), chegam a 20 a 40 mg/dL em adultos normais, apresentando aumentos de até duas vezes a concentração normal diante de terapia contraceptiva e na gravidez (Burrows, 1971), ou como reagente de fase aguda. Cada molécula dessa proteína pode ligar até seis átomos de cobre, os quais lhe conferem uma cor azulada. A combinação da cor azul à cor amarela de outros cromógenos plasmáticos resulta em plasma de cor verde rico em ceruloplasmina (Schenker, 1971). Essa aparência esverdeada é observada com frequência em bolsas de plasma doado para transfusão. O ferro é oxidado por ação da ceruloplasmina, que converte íon ferroso em íon férrico, possivelmente como forma de liberar ferro a partir da ferritina para ligação à transferrina (Roeser, 1970).

A doença de Wilson (degeneração hepatolenticular) resulta de um metabolismo de cobre desregulado, no qual o comprometimento da excreção hepática de cobre por meio da bile conduz à deposição tóxica desse bioelemento nos tecidos. No metabolismo normal, o cobre é incorporado pelo fígado à ceruloplasmina (cerca de 6 a 7 átomos de cobre por molécula) que, em seguida, é secretada no plasma. Nessa doença, tal mecanismo está comprometido, e o cobre, absorvido pelo organismo e transportado pelo fígado, não retorna à circulação como parte da ceruloplasmina. Observa-se diminuição da excreção normal de cobre pela bile, com aumento geral de sua deposição no organismo, resultando em efeitos tóxicos para o fígado, cérebro, córneas, rins, ossos e paratireoides. O diagnóstico usualmente se dá na infância ou durante a adolescência, quando o dano hepático é notado pela primeira vez. Ao longo da vida, certos indivíduos afetados podem apresentar manifestações tardias, e também ocorrem alterações neurológicas. O tratamento consiste em uma terapia quelante de longa duração com penilcilamina ou, em casos graves, no transplante de fígado que pode ter ação curativa.

O diagnóstico da doença de Wilson baseia-se em achados físicos (doença hepática, sinais neurológicos, anel de Kayser-Fleischer na córnea), detecção de baixos níveis séricos de ceruloplasmina e elevação da concentração de cobre na urina ou em amostras de biópsia hepática. A atividade de oxidase inerente à ceruloplasmina pode ser empregada em um ensaio colorimétrico, tendo a *p*-fenilenediamina como substrato, para realização de quantificações. Métodos imunoquímicos são utilizados adicionalmente, porque a banda é pouco aparente e, portanto, não pode ser utilizada com segurança na eletroforese de proteínas. Como nenhum achado clínico ou laboratorial isolado é suficiente para estabelecer o diagnóstico da doença, é necessário combinar todos os dados obtidos (Ferenci, 2004).

Gc-globulina. A vitamina D se liga à globulina de componente grupo-específico (Gc) (proteína ligadora de vitamina D [DBP, *vitamin*

D-binding protein]) (Daiger, 1975; Bikle, 1986). Essa proteína migra como uma α_1-globulina e tem peso molecular de aproximadamente 51.000 Da. Sua concentração sérica normal é de 20 a 55 mg/dL, podendo diminuir em caso de doença hepática severa. A Gc-globulina possui dois alelos autossômicos codominantes que se expressam por meio de três fenótipos: 1-1, 2-2 e 1-2 (Giblett, 1969). A ausência congênita dessa proteína pode ser determinada por uma mutação letal, decorrente do comprometimento do transporte da vitamina D, uma vez que esta é pouco solúvel em meio aquoso. A Gc-globulina se liga à vitamina D e aos seus metabólitos, segundo uma relação mol por mol. No plasma, contudo, é provável que não esteja totalmente saturada. A síndrome nefrótica resulta em perda urinária de DBP, em parte sob a forma complexada à vitamina D. Essa perda vitamínica pode contribuir para o aparecimento subsequente dos problemas relacionados ao metabolismo do cálcio observados nessa doença (Goldstein, 1981). Sendo um componente minoritário de proteínas plasmáticas, a Gc-globulina pode ser quantificada por RIA, radioimunodifusão ou imunoeletroforese em foguete (Walsh, 1982; Westwood, 1986). Com o uso de nefelometria, estudos mais recentes detectaram níveis reduzidos de Gc-globulina em pacientes traumatizados que desenvolveram disfunção orgânica e sépsis (Dahl, 2003).

Hemopexina. Trata-se de uma globulina com comportamento migratório de β-globulina que se liga ao heme liberado durante a degradação da hemoglobina (Muller-Eberhard, 1970). De tal forma, essa pequena molécula de porfirina com seu átomo de ferro fica protegida da excreção e contribui para a preservação das reservas de ferro do organismo. Entre as proteínas plasmáticas, a hemopexina é a que se liga ao heme com maior afinidade, e essa forte ligação provavelmente ajuda a limitar a toxicidade inerente ao heme livre (Tolosano, 2002). Sua concentração sérica normal é de 50 a 120 mg/dL e, assim, deve ser quantificada por métodos imunológicos. É constituída por uma única cadeia polipeptídica e, de seus 70.000 Da de peso molecular, 20% correspondem à presença de carboidratos. Embora os níveis de hemopexina possam ser tornar baixos em decorrência de perdas urinárias inespecíficas ou da diminuição de sua síntese por insuficiência hepática, as diminuições mais significativas ocorrem após a hemólise intravascular, quando a concentração de hemoglobina livre excede a capacidade de ligação da haptoglobina. Assim, pode haver degradação da hemoglobina plasmática circulante com liberação de heme, que, por sua vez, é ligado molécula a molécula pela hemopexina. Os complexos heme-hemopexina são, então, removidos da circulação pelos hepatócitos, e há uma notável redução da concentração sérica de hemopexina. O excesso de heme se liga à albumina, na forma de meta-hemealbumina. À medida que mais hemopexina vai sendo disponibilizada em uma nova síntese, o heme é transferido da meta-hemealbumina para a hemopexina, e os níveis dessa proteína continuam a cair. A constatação dessa situação pode ser útil ao diagnóstico da hemólise ainda em fase precoce, depois que os níveis de haptoglobina tiverem sido normalizados, porém, antes da completa depuração do heme (Wochner, 1974).

α_1-glicoproteína ácida. Também conhecida como proteína orosomucoide, possui um conteúdo muito grande de carboidratos, que minimiza sua visualização por meio das colorações padrão utilizadas para proteínas (Alvan, 1986). Com peso molecular de cerca de 44.000 Da, passa em grande parte para o filtrado glomerular e, por isso, apresenta meia-vida de apenas 5 dias na circulação. Os níveis séricos normais são da ordem de 40 a 105 mg/dL e se elevam durante a gravidez (Schmid, 1975). Embora seja um reagente de fase aguda, seu papel biológico ainda é desconhecido. É uma proteína de ligação da progesterona e, como tal, pode ser importante no transporte ou metabolismo desse esteroide. Também se liga a certos fármacos (p. ex., lidocaína) e os mantêm inativos e unidos à parte. A quantificação dessa proteína tem utilidade clínica na interpretação de dados acerca dos níveis de fármacos, como a lidocaína, que atingem altas concentrações séricas sem, no entanto, exercerem o efeito terapêutico esperado, por estarem complexados em formas inativas à α_1-glicoproteína ácida em níveis acima do normal. Essa proteína também apresenta alguns polimorfismos genéticos, os quais podem ser ainda mais agravados pela existência de formas isomórficas provenientes de fontes teciduais específicas, embora o sítio primário de sua síntese pareça ser o fígado.

Proteína C reativa. Esse constituinte do soro foi descoberto por meio da interação do soro de pacientes, que haviam se recuperado de infecções por pneumococos, com o polissacarídeo-C dessa bactéria. Houve formação de flocos visíveis que permitiram estudar e purificar extensivamente a proteína C reativa (CRP, *C-reactive protein*) a partir do soro, nos anos 1940. Constatou-se que a CRP estava presente no soro de pacientes com outros distúrbios, além das infecções pneumocócicas, e que seus níveis aumentavam drasticamente sempre que havia necrose tecidual. Diversas substâncias reagem com a CRP, entre as quais DNA, nucleotídeos, vários lipídeos e outros polissacarídeos (Hokama, 1982). Dessa forma, a proteína parece atuar como uma molécula "removedora" (*scavenger*) geral. Com um peso molecular que varia entre 118.000 e 144.000 Da, possui um conteúdo de carboidratos substancial. As concentrações séricas normais variam em diferentes fases da vida: 100 ng/mL ao nascimento, 170 ng/mL em crianças e 470 a 1.340 ng/mL em adultos. Apesar das baixas concentrações, a CRP exerce papel fundamental como reagente de fase aguda altamente sensível (Deodhar, 1989). Geralmente, é quantificada quanto à capacidade de precipitar substância P ou por métodos imunológicos, tais como nefelometria, precipitações, RIA e ELISA (Saxstad, 1970; Claus, 1976). Na eletroforese, migra como proteína γ e forma uma banda monoclonal mínima, porém distinta, quando a amostra provém de paciente que apresenta reação inflamatória grave. Em certos casos, a determinação dos níveis de CRP é utilizada como teste rápido para estabelecer o provável diagnóstico de uma infecção bacteriana (CRP elevada) *versus* infecção viral (CRP baixa) (Clyne, 1999). Essa proteína é utilizada com frequência pelos reumatologistas no monitoramento da progressão ou remissão de doenças autoimunes. O gene que codifica a CRP foi localizado no cromossomo humano 1 (Whitehead, 1983). Estudos epidemiológicos recentes mostraram que um ensaio altamente sensível para detecção de CRP (hs-CRP) pode contribuir para determinar o valor preditivo dos lipídeos séricos na identificação de indivíduos que correm risco de passar por eventos cardiovasculares, provavelmente em razão do papel da inflamação na aterogênese (Ridker, 2000). Indivíduos com níveis de CRP normalmente elevados apresentam maior risco de sofrer AVC ou infarto do miocárdio do que aqueles com níveis normalmente baixos (esse assunto foi discutido em mais detalhes no Cap. 18).

Inibidores de protease

Além da α_1-antitripsina e da α_2-macroglobulina, já consideradas neste capítulo, há ainda no plasma outros inibidores de proteases distintas. Estes são a α_1-antiquimotripsina (AAC) (Berninger, 1985b), inibidor de inter-α-tripsina (IATI) (Daniels, 1975), antitrombina III (AT3), antiplasmina, inibidor de esterase C1 (Prograis, 1985), proteína C (Stenflo, 1984) e inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) (Nilsson, 1984). Nenhuma dessas proteínas alcança concentrações plasmáticas detectáveis pela eletroforese com coloração de proteínas. Enquanto outros inibidores exercem atividade inibitória sobre uma ampla gama de proteases, a AAC atua de modo altamente específico, neutralizando a quimotripsina – enzima que cliva ligações peptídicas em grupos carboxila laterais de resíduos de tirosina e fenilalanina. A AAC tem peso molecular de 68.000 Da, e cerca de 25% de seu conteúdo é composto por carboidratos. Normalmente, a concentração sérica é de 40 a 60 mg/dL, contudo, tais valores podem se tornar até cinco vezes maiores quando a AAC atua como reagente de fase aguda, e essa elevação persiste enquanto durar a inflamação (Kosaka, 1976). A AAC forma complexos com o PSA, os quais podem ser quantificados por imunoensaio como PSA em forma ligada (Cap. 74). Pode ser perdida com outras proteínas séricas de baixo peso molecular na proteinúria da síndrome nefrótica.

O IATI é uma glicoproteína de peso molecular igual a 160.000 Da. Em geral, sua concentração aproximada é de 50 mg/dL, e esse valor não sofre grandes aumentos quando a proteína atua como reagente de fase aguda. Em condições patológicas, seu papel provavelmente é semelhante ao dos principais inibidores de protease na prevenção da autodigestão tecidual por enzimas celulares endógenas (Daniels, 1975).

Há um interesse clínico especial na AT3, em razão do seu papel na neutralização da trombina, que normalmente sofre ativação intravascular a partir da pró-trombina, durante a formação do coágulo. Essa proteína de 62.000 Da, por meio de ligações covalentes, forma complexos com a trombina no decorrer de alguns minutos, quando ambas são

misturadas em solução. Com a adição de heparina, a formação desses complexos ocorre de forma quase instantânea (Rosenberg, 1975, 1985, 1987). Embora seja provável que a AT3 é essencial ao sucesso terapêutico da administração de heparina, são apenas os raros indivíduos com deficiências marcantes que aparentemente apresentam distúrbios trombóticos (Carvalho, 1976). A ação da AT3 é extensiva a outros fatores de coagulação (IX, X, XI, XII e a calicreína). Pode haver queda dos níveis séricos de AT3 em casos graves de doença hepática ou em distúrbios com perda proteica, quando se verifica perda da albumina, cujo tamanho é semelhante ao da AT3, bem como na coagulopatia intravascular disseminada (CID). Um novo protocolo experimental para tratamento da CID envolve a reposição de AT3 por meio da infusão de concentrados, no momento em que os níveis dessa proteína atingem valores muito baixos em decorrência da coagulopatia de consumo apresentada pelo paciente. É provável que a recuperação dos níveis normais da proteína produza o efeito de bloquear a trombose no nível sistêmico. A terapia com heparina acarreta diminuição dos níveis de AT3, enquanto a terapia com anticoagulantes orais causa um discreto aumento. Tais efeitos se devem, respectivamente, ao aumento e à diminuição da renovação da proteína.

Embora a AAT, AMG e AT3 constituam o conjunto com atividade neutralizadora de plasmina no soro (Harpel, 1976), existe uma antiplasmina distinta que migra como α_2-globulina (Lijnen, 1985). Essa reatividade cruzada dos inibidores de proteases com relação à plasmina ilustra a dificuldade para atribuir funções fisiológicas precisas para cada tipo de molécula, visto que uma parece poder substituir a outra em diferentes situações. Todavia, a antiplasmina se liga quantitativamente à maior parte da plasmina que é gerada a partir do plasminogênio no plasma humano, durante o processo de coagulação. Sendo assim, ela atua como controle crítico na coagulação-sistema fibrinolítico, mantendo a homeostasia por meio do equilíbrio entre formação e dissolução de coágulos. Por esse mecanismo, a formação e a quebra de coágulos geralmente ficam confinadas a determinadas regiões da vasculatura, sem se estenderem por toda a circulação. A deficiência hereditária de antiplasmina resulta em um distúrbio de sangramento, decorrente de um processo de fibrinólise relativamente ilimitado.

O PAI-1 atua para prevenir a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise ainda no estágio inicial. A deficiência de PAI-1 resulta em menos inibição e, consequentemente, maior fibrinólise e potencial aparecimento de um distúrbio de sangramento. A elevação dos níveis de PAI-1 impede a ocorrência de fibrinólise, causando distúrbios trombóticos e – é interessante notar – progresso da aterosclerose. A proteína C (tendo a proteína S como cofator) inativa os fatores de coagulação V e VIII ativados. A deficiência de proteína C ou S (Griffin, 1987) propicia a ativação prolongada de fatores pró-coagulantes *in vivo* e causa distúrbios trombóticos.

O inibidor de esterase C1 é capaz de inibir os componentes C1r e C1s do complemento ativados, além de mais alguns fatores de coagulação e fibrinolíticos. Seus níveis aumentam quando atua como reagente de fase aguda. A deficiência hereditária desse inibidor de esterase C1 permite que a ativação do complemento se mantenha relativamente sem nenhuma diminuição – um distúrbio conhecido como angioedema hereditário. O sistema complemento e seus inibidores serão discutidos de modo mais aprofundado no Capítulo 46.

Reagentes de fase aguda

As proteínas reagentes de fase aguda compartilham a propriedade de ter a concentração aumentada em resposta aos estados de estresse ou inflamação comumente observados em casos de infecção, lesões, cirurgia, trauma ou necrose tecidual (Daniels, 1974; Laurell, 1975; Dowton, 1988). Essas proteínas são AAT, α_1-glicoproteína ácida, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio, proteína A do amiloide sérico e CRP. Entre os demais fatores estão o fator VIII, ferritina, lipoproteínas, proteínas do complemento e Igs. É fácil observar como a resposta das proteínas plasmáticas confere uma vantagem ao organismo: a inflamação faz com que os leucócitos liberem enzimas proteolíticas nos tecidos, e essas enzimas precisam ser neutralizadas pelos inibidores enzimáticos, para que a extensão de sua ação destrutiva seja limitada. As proteínas *scavenger* (haptoglobulina, CRP) ajudam a coletar e transportar debris celulares e produtos de quebras até as células fagocíticas (sistema reticuloendotelial), as quais processam esse material e, ao mesmo tempo, conservam as substâncias vitais (p. ex., ferro). A cicatrização de feridas requer grande quantidade de fibrina, a qual é fornecida através da circulação na forma de fibrinogênio. Assim, a resposta humoral dos reagentes de fase aguda pode ser considerada um fenômeno que é acionado para lidar com insultos extensivos todas as vezes em que é desencadeado, mesmo que nem todos os componentes sejam necessários em todas as situações. A elevação dos níveis de reagentes de fase aguda provavelmente é uma resposta às citocinas, entre as quais a interleucina 1, fator de necrose tumoral, interferon γ e interleucina-6. A resposta fisiológica total envolve a indução de febre, recrutamento de leucócitos, catabolismo de músculos e uma mudança dos padrões de síntese proteica, com redução da produção de albumina.

De fato, para uso clínico no diagnóstico, outros parâmetros podem ser tão sensíveis quanto esses e até bem mais fáceis de quantificar (p. ex., febre, leucocitose ou ESR). Entretanto, tais proteínas oferecem uma outra dimensão de quantificação que pode ser útil no monitoramento do progresso do paciente, por meio da obtenção de medidas seriadas (van Oss, 1975). Certamente, pacientes com deficiências congênitas (Gitlin, 1975), com outros tipos de comprometimento da síntese decorrentes do uso de fármacos ou de doença envolvendo um órgão, ou ainda recém-nascidos que em geral apresentam baixos níveis de muitos constituintes (Gitlin, 1969) podem não apresentar os aumentos drásticos esperados. Contudo, a CRP é um reagente de fase aguda geralmente utilizado para monitorar respostas. Essa proteína é o reagente de fase aguda cujos níveis tanto aumentam quanto retornam ao normal mais depressa, após várias terapias bem-sucedidas (Fischer, 1976). A CRP é aplicada com frequência na detecção e classificação preliminar de infecções ocultas, porque as infecções bacterianas, ao contrário das virais, podem estimular níveis bem mais altos de CRP. É também muito utilizada para avaliar a atividade de doenças autoimunes, uma vez que seus níveis raramente permanecem elevados sem que uma resposta inflamatória continue sendo mantida. As elevações da concentração de CRP podem ser da ordem de até 1.000 vezes a concentração normal, fato que auxilia bastante na detecção de estados anormais, em comparação aos demais reagentes de fase aguda, cujos níveis podem aumentar no máximo várias vezes em relação ao normal durante tais respostas, ainda que os níveis de ferritina eventualmente atinjam valores acima de 20.000 ng/mL.

Padrões de anomalias proteicas

Alguns dos padrões de anomalias proteicas mais encontrados na eletroforese são mostrados como gráficos de varreduras densitométricas na Figura 19.6. As varreduras permitem a quantificação de cada fração, porém, a inspeção visual da tira eletroforética fornece informações mais detalhadas acerca das proteínas individualmente separadas em sistemas de alta resolução (Ritzman, 1975). A interpretação dos resultados da eletroforese depende da inspeção visual para identificação de padrões anormais ou aberrantes, e para quantificação por varredura para aferição das quantidades relativas das frações individuais.

Padrões de *hipoproteinemia* decorrente de desnutrição ou de perda proteica bruta apresentam reduções em todas as frações. Contudo, a redução mais drástica com frequência é detectada na fração da albumina, comparando-se à concentração normalmente alta que a caracteriza como a proteína mais abundante no soro (Fig. 19.7, tira 3). Inanição severa, má absorção ou inanição associada a doença crônica severa são condições em que ocorre diminuição marcante dos níveis de albumina (abaixo de 20 g/L). As demais proteínas séricas – incluindo AAT, AMG, haptoglobina, transferrina e C3 – aparecem ainda mais fracamente na eletroforese. A redução da intensidade da coloração da banda de β-lipoproteínas ocorre em paralelo a uma notável diminuição da concentração sérica de colesterol. O sistema imune é fortemente afetado pela inanição severa, havendo diminuição da síntese de imunoglobulinas e consequente hipogamaglobulinemia, bem como comprometimento da resistência a infecções causadas por bactérias e outros microrganismos. A enteropatia com perda proteica (Fig. 19.6*H*) mostra uma variação do padrão de hipoproteinemia, na qual a maioria das frações está diminuída em razão da combinação de síntese reduzida com perda aumentada. Ainda assim, a fração α_2 continua relativamente elevada em função da

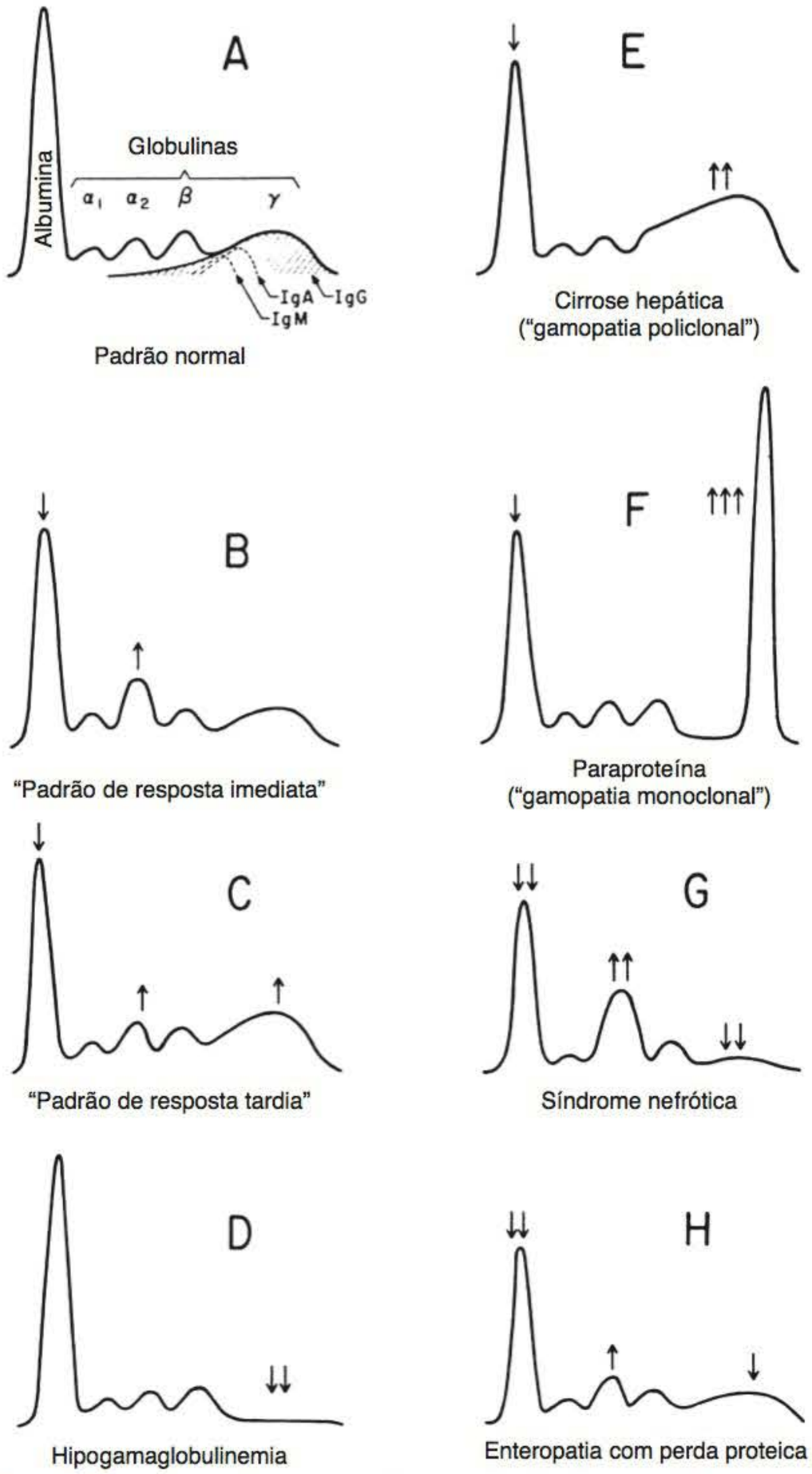


Figura 19.6 Eletroforese de proteínas séricas: correlações clinicopatológicas. (Cortesia do Dr. A. E. Krieg.)

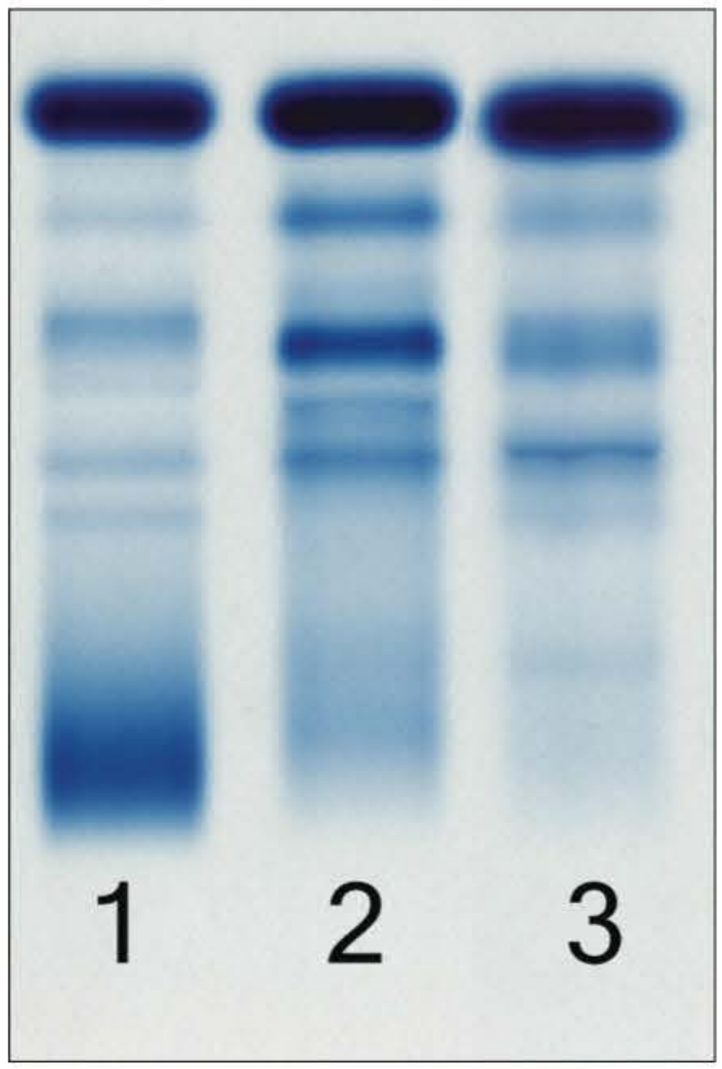


Figura 19.7 Padrões de proteína sérica em casos de: (1) inflamação crônica, com diminuição da albumina e aumento de γ-globulinas; (2) inflamação aguda, com aumento da fração α_2 (haptoglobina) e diminuição de C3, por conta de ativação e consumo do complemento; (3) inanição pós-lesão medular espinal, com hipoproteinemia de várias frações.

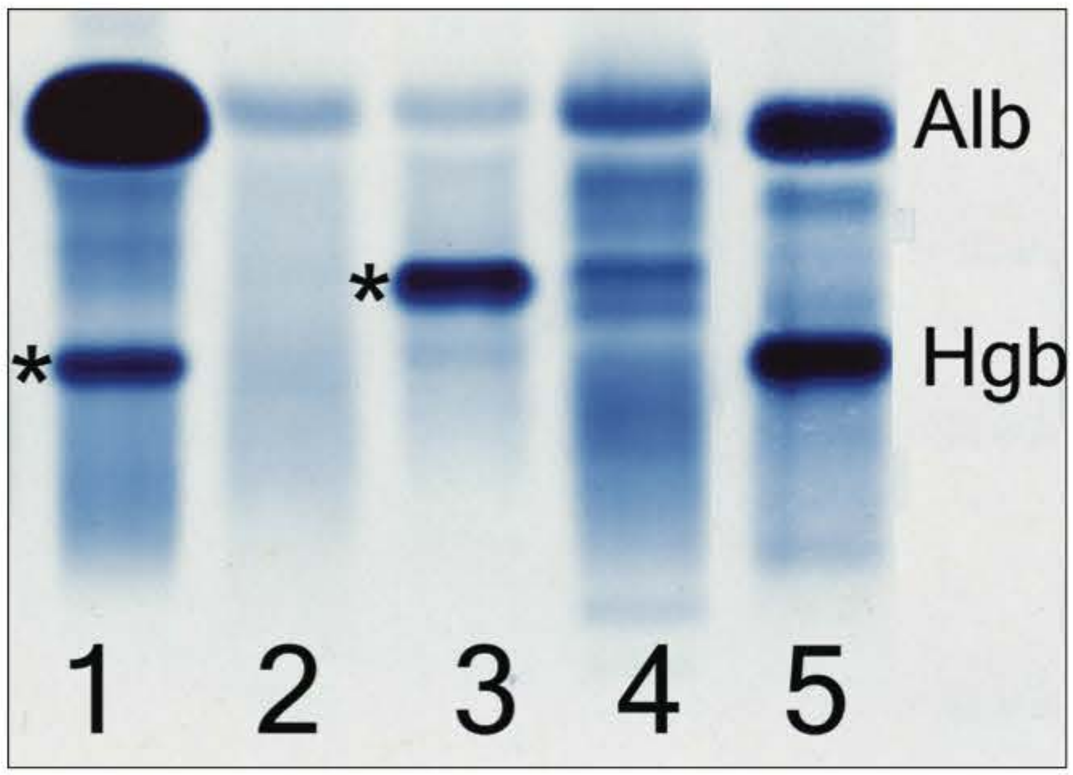


Figura 19.8 Padrões eletroforéticos de proteínas urinárias em diferentes distúrbios. (1) Proteinúria glomerular severa, com aparecimento de uma banda majoritária de albumina mais uma banda secundária de transferrina (*). (2) Traços de proteinúria, com detecção de uma banda fraca de albumina e padrões proteicos difusos. (3) Cadeias leves de imunoglobulinas (*). (4) Proteinúria tubular, com detecção de bandas múltiplas que não correspondem às principais proteínas séricas. (5) Hematúria, com formação de uma banda majoritária de hemoglobina (não confundir com gamopatia monoclonal), além da banda de albumina.

coexistência de uma resposta de fase aguda (haptoglobina) ou da retenção preferencial de moléculas maiores (α_2-macroglobulina).

A perda urinária específica de proteínas, como na *síndrome nefrótica*, ocorre no nível do peso molecular. Assim, as proteínas menores são perdidas mais depressa do que as proteínas de maior tamanho. Como consequência, a albumina é detectada precocemente na urina no decorrer das nefropatias com perda proteica, seguida de quantidades menores de AAT, transferrina e, por último, Igs (Fig. 19.8, tiras 1 e 2). A enorme molécula de AMG fica retida, do mesmo modo que as micelas de β-lipoproteína. O resultado é o aparecimento de padrões complementares de proteínas no soro (diminuição do conteúdo de albumina e de globulinas α_1, β e γ, com aumento dos níveis de α_2-macroglobulina e β-lipoproteínas) em oposição àqueles detectados na urina (Fig. 19.3*B*) (proteinúria glomerular com albumina, presença das frações α_1, β e γ, porém, ausência de α_2-macroglobulina na amostra de urina). A proteinúria tubular – decorrente do comprometimento da reabsorção tubular renal de pequenas proteínas – apresenta um padrão urinário α, β e γ, com apenas uma perda urinária mínima de albumina (Killingsworth, 1982) (Fig. 19.8, tira 4). Além dos padrões glomerular e tubular de proteinúria (Maachi, 2004), merece reconhecimento o interessante padrão de uma gamopatia monoclonal na urina (Fig. 19.8, tira 3; Fig. 19.9). Um padrão similar de uma banda única e grande também é observado na hemoglobinúria (Fig. 19.8, tira 5), devendo ser distinguido de uma Ig monoclonal ou das cadeias leves livres.

Os padrões de *fase aguda ou resposta imediata* são os que exercem maior efeito na eletroforese de proteínas séricas, ao aumentarem a quantidade de haptoglobina e diminuírem discretamente a concentração de albumina. Aumentos envolvendo a haptoglobina usualmente indicam algum tipo de resposta, seja aguda ou crônica, a estímulos causadores de estresse (Fig. 19.7). Outras proteínas, como a AAT, podem contribuir para essa resposta. Já os componentes minoritários, como a CRP, não contribuem de modo significativo para esse padrão de coloração de proteínas, ainda que a quantificação da CRP por métodos imunológicos aponte elevações da ordem de até 1.000 vezes

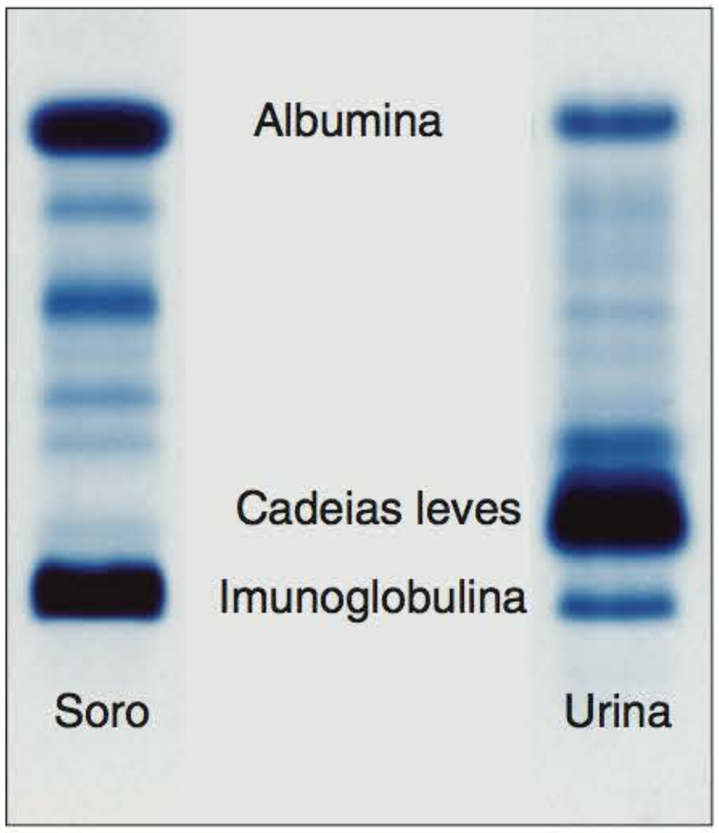


Figura 19.9 Padrões eletroforéticos de proteínas do soro e da urina de paciente com mieloma múltiplo. O soro demonstra predominância da imunoglobulina completa, de maior tamanho. A urina apresenta maior quantidade de cadeias leves pequenas e apenas pouca quantidade de imunoglobulina inteira.

os níveis normais. Se um paciente apresenta depleção de haptoglobina como resultado de hemólise ativa, é possível que uma banda independente de hemoglobina migre nas regiões β ou α_2. A hemólise de uma amostra *in vitro* pode exibir uma banda avermelhada (no gel não corado) correspondente ao complexo haptoglobina-hemoglobina, que migra de modo distinto da hemoglobina sozinha. O padrão de resposta tardia ou padrão crônico constitui uma extensão da resposta de fase aguda (haptoglobina elevada e discreta redução da albumina), com diminuição mais acentuada da albumina e aumento policlonal das Igs ampliando a região γ.

Algumas vezes, em pacientes que sofrem de *anemia ferropriva*, há um aumento marcante da transferrina na região β. Esse aumento corresponde ao elevado IBC, e o porcentual de saturação é baixo (Koerper, 1977). Essa variação pode ser confundida com uma proteína do mieloma, uma vez que a banda de transferrina forma uma estreita banda de aparência clonal.

A *cirrose hepática* cria um padrão proteico que pode ser identificado (Fig. 19.3*A*). O dano hepatocelular consequente à cirrose resulta em diminuição da capacidade de sintetizar albumina. Além disso, o desequilíbrio de pressões hemodinâmicas na hipertensão portal secundária à cirrose conduz à formação de um líquido ascítico que contém quase exclusivamente albumina. Essa diminuição da síntese, acoplada ao aumento da perda, provoca uma redução marcante da concentração sérica de albumina. A perda de albumina é equilibrada, até certo ponto, por um acentuado aumento policlonal da concentração de Igs da fração γ que, por sua vez, pode contribuir significativamente para as pressões oncóticas observadas. Esse aumento envolvendo as γ-globulinas engloba todas as Igs. O aumento da concentração de imunoglobulina A (IgA) na lenta região β está em continuidade com a região γ (também denominado ponte β-γ).

Contrastando com as elevações policlonais, as *bandas oligoclonais* consistem em apenas poucos clones de Igs distintas que migram de posições definidas. Esse padrão é observado no soro em casos de distúrbio imunológico ou em alguns pacientes submetidos à imunossupressão crônica para transplante de órgão (Myara, 1991). As bandas oligoclonais em amostras de LCE são utilizadas para indicar atividade imunológica no sistema nervoso central, e são detectadas em doenças infecciosas, na autoimunidade ou em distúrbios desmielinizantes (Cap. 45).

A hipogamaglobulinemia se manifesta quase como ausência completa da fração γ. Ocorre normalmente em recém-nascidos, antes da maturação do sistema imunológico. Também ocorre em algumas imunodeficiências congênitas, como na agamaglobulinemia de Bruton, e em outros estados envolvendo a função da células B. Mais comumente, talvez, esse padrão é observado em adultos com distúrbios linforreticulares, nos quais as células plasmáticas normais foram deslocadas pela proliferação linfocítica, e também, até certo grau, após a quimioterapia para erradicação de malignidades, bem como nos estados hipoproteinêmicos (Fig. 19.7, tira 3).

A aplicação clínica mais importante e disseminada da eletroforese de proteínas séricas consiste na detecção das *gamopatias monoclonais*. O padrão notavelmente explícito desses distúrbios é dado por uma paraproteína (Ig) secretada por uma população de células plasmáticas monoclonais proliferantes. Em geral, essa paraproteína não é acompanhada das quantidades habituais de γ policlonais, à medida que as células plasmáticas normais vão sendo substituídas pelo clone maligno (Fig. 19.9). A presença de uma paraproteína acompanhada de γ policlonal normal sugere a possível existência de um plasmacitoma, ainda não disseminado por toda a medula óssea. A avaliação laboratorial de um mieloma deve incluir: eletroforese de proteínas de amostras de soro e urina, visando à detecção de bandas clonais anormais; imunoeletroforese ou imunofixação, para tipificar as cadeias leves e pesadas da paraproteína; e quantificação de Igs, para determinar os níveis basais e empregá-los no monitoramento da resposta do paciente à terapia ou da progressão da doença. Outras proteínas que, em alguns casos, podem ser confundidas com as bandas monoclonais de Igs na eletroforese de proteínas séricas são os complexos haptoglobina-hemoglobina, C3 e suas variantes, β-lipoproteínas, transferrina, fibrinogênio, imunocomplexos, CRP e, ocasionalmente, α_2-macroglobulina.

Os capítulos 45, 46 e 49 abordam as Igs, os distúrbios que envolvem o sistema imune e as anomalias relacionadas ao complemento.

Referências bibliográficas

Al-Rashid RA, Spangler J: Neonatal copper deficiency. N Engl J Med 1971; 285:841–843.

Alvan G: Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics. Other protein variants with pharmacogenetic consequences: Albumin and orosomucoid. Prog Clin Biol Res 1986; 214:345–355.

Bean P, Harasymiw J, Peterson CM, Javors M: Innovative technologies for the diagnosis of alcohol abuse and monitoring abstinence. Alcoholism Clin Exp Res 2001; 25:309–316.
Revisão abrangente dos ensaios para detecção de transferrina deficiente em carboidrato e estratégias para sua utilização.

Beetham R, Cattell WR: Proteinuria: Pathophysiology, significance and recommendations for measurement in clinical practice. Ann Clin Biochem 1993; 30:425–434.

Berninger RW: Protease inhibitors of human plasma. Alpha 1-antitrypsin. J Med 1985a; 16:23–99.

Berninger RW: Protease inhibitors of human plasma. Alpha 1-antichymotrypsin. J Med 1985b; 16:101–128.

Bikle DD, Halloran BP, Gee E, et al: Free 25-hydroxyvitamin D levels are normal in subjects with liver disease and reduced total 25-hydroxyvitamin D levels. J Clin Invest 1986; 78:748–752.

Blennow K, Fredman P: Detection of cerebrospinal fluid leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gels with silver staining using the PhastSystem. Acta Neurochir (Wien) 1995; 136:135–139.

Branden C, Tooze J: Introduction to Protein Structure. New York, Garland Publishing, Inc, 1991.

Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, et al: Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. Kidney Int Suppl 2004; 92:569–575.

Brodsky JL: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. Int Rev Cytol 1998; 178:277–328.

Burrows S, Pekala B: Serum copper and ceruloplasmin in pregnancy. Am J Obstet Gyncecol 1971; 109:907–909.

Carvalho A, Ellman L: Hereditary antithrombin III deficiency. Effect of antithrombin on platelet function. Am J Med 1976; 61:179–183.

Chen FA: Rapid protein analysis by capillary electrophoresis. J Chromatogr 1991; 559:445–543.

Claus DR, Osmand AP, Gewurz H: Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera. J Lab Clin Med 1976; 87:120–128.

Clyne B, Olshaker JS: The C-reactive protein. J Emerg Med 1999; 17:1019–1025.

Cox DW: Clinical and molecular studies of alpha 1-antitrypsin deficiency. Prog Clin Biol Res 1986; 214:373–384.

Dahl B, Schiodt FV, Ott P, et al: Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. Crit Care Med 2003; 31:152–156.

Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL: Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxy-vitamin D. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72:2076–2080.

Daniels JC: Abnormalities of protease inhibitors. *In* Ritzmann SE, Daniels JC (eds): Serum Protein Abnormalities, Diagnostic and Clinical Aspects. Boston, Little, Brown & Co, 1975.

Daniels JC, Larson DL, Abston S, Ritzmann SE: Serum protein profiles in thermal burns. II. Protease inhibitors,

complement factors and C-reactive proteins. J Trauma 1974; 14:153–162.
Delaroche O, Bordure P, Lippert E, Sagniez M: Perilymph detection by beta 2-transferrin immunoblotting assay. Application to the diagnosis of perilymphatic fistulae. Clin Chim Acta 1996; 245:93–104.
Deodhar SD: C-reactive protein: The best laboratory indicator available for monitoring disease activity. Cleveland Clin J Med 1989; 56:126–130.
Doolittle RF: Fibrinogen and fibrin. *In* Putnam FW (ed): The Plasma Proteins, Vol II, 2nd ed. New York, Academic Press, 1975, p 110.
Doolittle RF, Yang Z, Mochalkin I: Crystal structure studies on fibrinogen and fibrin. Fibrinogen. Ann N Y Acad Sci 2001; 936:31–43.
Dowton SB, Colten HR: Acute phase reactants in inflammation and infection. Semin Hematol 1988; 25:84–90.
Eriksson S: Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. Acta Med Scand 1965; 177(Suppl):1–85.
Ferenci P: Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. Aliment Pharmacol Ther 2004;19:157–165.
Relato atualizado descrevendo o papel do teste laboratorial no diagnóstico da doença de Wilson.
Fischer CL, Gill C, Forrester MG, Nakamura R: Quantitation of 'acute phase proteins' postoperatively. Value in detection and monitoring of complications. Am J Clin Pathol 1976; 66:840–846.
Gaetani S, Bellovino D, Apreda M, Devirgiliis C: Hepatic synthesis, maturation and complex formation between retinol-binding protein and transthyretin. Clin Chem Lab Med 2002; 40:1211–1220.
Gelb AF, Klein E, Lieberman J: Pulmonary function in nonsmoking subjects with alpha-1-antitrypsin deficiency (MZ phenotype). Am J Med 1977; 62:93–98.
Ghacha R, Sinha AK, Karkar AM: HbA1c and serum fructosamine as markers of the chronic glycemic state in type 2 diabetic hemodialysis patients. Dialysis & Transplantation 2001; 30:214–217.
Giblett ER (ed): Genetic Markers in Human Blood. Oxford, Blackwell Scientific, 1969.
Gitlin D, Biasucci A: Development of gamma G, gamma A, gamma M, C?1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. J Clin Invest 1969; 48:1433–1446.
Gitlin D, Gitlin JD: Genetic alterations in the plasma proteins of man. *In* Putnam FW (ed): The Plasma Proteins, Vol II, 2nd ed. New York, Academic Press, 1975, p 321.
Glenner GG: Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses. N Engl J Med 1980; 302:1283–1292.
Gofferje H: Prealbumin and retinol binding protein, highly sensitive parameters for the nutritional state in respect to protein. Med Lab 1978; 5:38–44.
Goldstein DA, Haldimann B, Sherman D, et al: Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. J Clin Endocrinol Metab 1981; 52:116–121.
Griffin JH, Heeb MJ, Schwarz HP: Plasma protein S deficiency and thromboembolic disease. Prog Hematol 1987; 15:39–49.
Guthrow CE, Morris MA, Day JF, et al: Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:4258–4261.
Harding JJ: Nonenzymatic covalent posttranslational modification of proteins in vivo. Adv Protein Chem 1985; 37:247–334.
Harpel PC, Rosenberg RD: Alpha-2-macroglobulin and antithrombin–heparin cofactor: Modulators of hemostatic and inflammatory reactions. Prog Hemost and Thromb 1976; 3:145–189.
Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, et al: A seed for Alzheimer amyloid in the brain. J Neurosci 2004; 24:4894–4902.
Hoffmann A, Nimtz M, Getzlaff R, Conradt HS: 'Brain-type' N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid. FEBS Lett 1995; 359:164–168.
Hokama Y: Methods of assay and role of acute phase C-reactive protein in human diseases. *In* Nakamura RM, Dito WR, Tucker ES (eds): Immunologic Analysis. Recent Progress in Diagnostic Laboratory Immunology. New York, Masson Publishing, 1982, p 239.
Horne CHW, Weir RJ, Howie PW, Goudie RB: Effect of combined oestrogen–progesterone oral contraceptives on serum levels of alpha-2-macroglobuin, transferrin, albumin, and IgG. Lancet 1970; 1:49–50.
Hubbard RC, Brantly ML, Sellers S, et al: Anti-neutrophil-elastase defenses of the lower respiratory tract in alpha 1-antitrypsin deficiency directly augmented with an aerosol of alpha 1-antitrypsin. Ann Intern Med 1989; 111:206–212.
Ii S, Minnerath S, Ii K, et al: Two-tiered DNA-based diagnosis of transthyretin amyloidosis reveals two novel point mutations. Neurology 1991; 41:893–898.
Irie S, Tavassoli M: Transferrin-mediated cellular iron uptake. J Med Sci 1987; 293:103–111.
Jenkins N, Parekh RB, James DC: Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. Nat Biotechnol 1996; 14:975–981.
Jeppsson J-O, Franzén B: Typing of genetic variants of alpha-1-antitrypsin by electrofocusing. Clin Chem 1982; 28:219–225.
Jeppsson J-O, Laurell CB, Franzén B: Agarose gel electrophoresis. Clin Chem 1979; 25:629–638.
Kamboh MI, Ferrell RE: Human transferrin polymorphism. Hum Hered 1987; 37:65–81.
Killingsworth LM: Clinical applications of protein determinations in biological fluids other than blood. Clin Chem 1982; 28:1093–1102.
Koch-Weser J, Sellers EM: Drug therapy. Binding of drugs to serum albumin. N Engl J Med 1976; 294:311–316.
Koerper MA, Dallman PR: Serum iron concentration and transferrin saturation in the diagnosis of iron deficiency in children: Normal developmental changes. J Pediatr 1977; 91:870–874.
Konigsberg W: Molecular diseases. *In* Bondy PK, Roenberg LE (eds): Duncan's Diseases of Metabolism, 7th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1974, p 86.
Kosaka S, Tazawa M: Alpha-1-antichymotrypsin in rheumatoid arthritis. Tohoku J Exp Med 1976; 119:369–375.
Kuznetsov G, Nigam SK: Folding of secretory and membrane proteins. N Engl J Med 1998; 339:1688–1695.
Lauff JJ, Kasper ME, Wu TW, Ambrose RT: Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin in serum that is firmly bound to protein. Clin Chem 1982; 28:629–637.
Relato inicial descrevendo a bilirrubina-d e sua relação com a albumina.
Laurell CB: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal Biochem 1966; 15:45–52.
Laurell CB: Electrophoresis, specific protein assays, or both in measurement of plasma proteins? Clin Chem 1973; 19:99–102.
Laurell CB, Jeppsson J-O: Protease inhibitors in plasma. *In* Putnam FW (ed): The Plasma Proteins, Vol I, 2nd ed. New York, Academic Press, 1975, p 299.
Layne E: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Meth Enzymol 1957; 3:447–445.
Artigo clássico sobre quantificação de proteínas.
Lieberman J, Gaidulis L, Garoutte B, Mittman C: Identification and characteristics of the common alpha-1-antitrypsin phenotypes. Chest 1972; 62:557–564.
Lijnen HR, Collen D: Protease inhibitors of human plasma. Alpha 2-antiplasmin. J Med 1985; 16:225–284.
Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265–275.
Maachi M, Felahi S, Regeniter A, et al: Patterns of proteinuria: urinary sodium dodecyl sulfate electrophoresis versus immunonephelometric protein marker measurement followed by interpretation with the knowledge-based system MDI-LabLink. Clin Chem 2004; 50:1834–1837.
Este artigo apresenta os padrões de proteinúria e os novos métodos utilizados em sua discriminação.
MacGillivray RTA, Mendez E, Sinha S, et al: The complete amino acid sequence of human serum transferrin. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:2504–2508.
Manoharan A: Congenital haptoglobin deficiency, letter. Blood 1997; 90:1709.
Meloun B, Moravek L, Kostka V: Complete amino acid sequence of human serum albumin. FEBS Lett 1975; 58:134–137.
Menache D: Abnormal fibrinogens: A review. Thromb Diath Haemorrh 1973; 29:525–535.
Mendenhall HW: Serum protein concentrations in pregnancy. I. Concentrations in maternal serum. Am J Obstet Gynecol 1970; 106:388–399.
Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 1981; 211:1437–1438.
Moses AC, Lawlor J, Haddow J, Jackson IMD: Familial euthyroid hyperthyroxinemia resulting from increased thyroxine binding to thyroxine-binding prealbumin. N Engl J Med 1982; 306:966–969.
Muller-Eberhard U: Hemopexin. N Engl J Med 1970; 283:1090–1094.
Myara I, Quenum G, Storogenko M, et al: Monoclonal and oligoclonal gammopathies in heart transplant recipients. Clin Chem 1991; 37:1334–1337.
Nilsson IM, Tengborn LA: A family with thrombosis associated with high level of tissue plasminogen activator. Haemostasis 1984; 14:24.
Normansell DE, Stacy EK, Booker CF, Butler TZ: Detection of beta-2 transferrin in otorrhea and rhinorrhea in a routine clinical laboratory setting. Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1:68–70.
Oppenheimer JH: Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. N Engl J Med 1968; 278:1153–1162.
Orth SR, Ritz E: The nephrotic syndrome. N Engl J Med 1998; 338:1202–1211.
Peters T: Serum albumin: Recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. Clin Chem 1977; 23:5–12.
Revisão abrangente das relações estrutura-função clinicamente importantes da albumina.
Peters T Jr: Serum albumin. *In* Putnam FW (ed): The Plasma Proteins, Vol II, 2nd ed. New York, Academic Press, 1975, p 133.
Peterson PA: Studies on interaction between pre-albumin, retinol-binding protein and vitamin A. J Biol Chem 1971; 246:44–49.
Post DJ, Carter KC, Papaconstantinou J: The effect of aging on constitutive mRNA levels and lipopolysaccharide inducibility of acute phase genes. Ann NY Acad Sci 1991; 621:66–77.
Prograis LJ, Brickman CM, Frank MM: Protease inhibitors of human plasma. C1-inhibitor (C1-Inh). J Med 1985; 16:303–350.
Reddy S, Adcock KJ, Adeshina H, et al: Immunity, transferrin, and survival in kwashiorkor. Br Med J 1970; 4:268–270.
Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med 2000; 342:836–843.
Ritzmann SE, Daniels JC (eds): Serum Protein Abnormalities. Diagnostic and Clinical Aspects. Boston, Little, Brown & Co, 1975.
Roberts RC: Protease inhibitors of human plasma. Alpha 2-macroglobulin. J Med 1985; 16:129–224.
Roelandse FW, van der Zwart N, Didden JH, et al: Detection of CSF leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gel, direct immunofixation of transferrins, and silver staining. Clin Chem 1998; 44:351–353.
Roeser HP, Lee GR, Nacht S, Cartwright GE: The role of ceruloplasmin in iron metabolism. J Clin Intest 1970; 49:2408–2417.
Rosenberg RD: Actions and interactions of antithrombin and heparin. N Engl J Med 1975; 292:146–151.
Rosenberg RD, Bauer KA: Thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C, and protein S. Hum Pathol 1987; 18:253–262.
Rosenberg RD, Bauer KA, Marcum JA: Protease inhibitors of human plasma. Antithrombin-III: The heparin–antithrombin system. J Med 1985; 16:351–416.
Roses AD: Apolipoprotein E is a genetic locus that affects the rate of Alzheimer disease expression. Neuropsychopharmacology 1994; 10:55.
Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS: Albumin synthesis. N Engl J Med 1972; 286:748, 816–821.

Ruiz M, Rajatanavin R, Young RA, et al: Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. A syndrome that can be confused with thyrotoxicosis. N Engl J Med 1982; 306:635-639.

Saraiva M, Alves IL, Costa PP: Simplified method for screening populations at risk for transthyretin met 30 associated familial amyloidotic polyneuropathy. Clin Chem 1989; 35:1033–1035.

Saxstad J, Nilsson L-A, Hanson LA: C-reactive protein in serum from infants as determined with immunodiffusion techniques. Acta Pediatr Scand 1970; 59:676–680.

Schenker JG, Jungreis E, Polishuk WZ: Oral contraceptives and serum copper concentrations. Obstet Gynecol 1971; 37:233–237.

Schmid K: Alpha-1-acid glycoprotein. *In* Putnam FW (ed): The Plasma Proteins, Vol I, 2nd ed. New York, Academic Press, 1975.

Sevall JS: The albumin gene: DNA–protein interaction. Fed Proc 1986; 45:2412–2415.

Slater L, Carter PM, Hobbs JR: Measurement of albumin in the sera of patients. Ann Clin Biochem 1975; 12:33–40.

Sloman AJ, Kelly RH: Transferrin allelic variants may cause false positives in the detection of cerebrospinal fluid fistulae. Clin Chem 1993; 39:1444–1445.

Snider GL: Pulmonary disease in alpha1-antitrypsin deficiency. Ann Intern Med 1989; 111:957–959.

Solomon P, Chen J, D'Costa M, et al: Extracranial drainage of cerebrospinal fluid: A study of beta-transferrins in nasal and lymphatic tissues. Laryngoscope 1999; 109:1313–1315.

Stenflo J: Structure and function of protein C. Semin Thromb Hemost 1984; 10:109–121.

Stibler H: Carbohydrate-deficient transferrin in serum: A new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. Clin Chem 1991; 37:2029–2037.

Sveger T: Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. N Engl J Med 1976; 294:1316–1321.

Thalmann I, Kohut RI, Ryu J, et al: Protein profile of human perilymph: In search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease. Otolaryngol Head Neck Surg 1994; 111:273–280.

Tolosano E, Altruda F: Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA Cell Biol 2002; 21:297–306.

Discussão abrangente sobre a química e os papeis exercídos pela hemopexina.

Tripathi RC, Millard CB, Tripathi BJ, Noronha A: Tau fraction of transferrin is present in human aqueous humor and is not unique to cerebrospinal fluid. Exp Eye Res 1990; 50:541–547.

Tsung SH, Rosenthal WA, Milewski KA: Immunological measurement of transferrin compared with chemical measurement of total iron-binding capacity. Clin Chem 1975; 21:1063–1066.

Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: Concepts and principles of O-linked glycosylation. Crit Rev Biochem Mol Biol 1998; 33:151–208.

Van Oss CJ, Bronson PM, Border JR: Changes in the serum alpha glycoprotein distribution in trauma patients. J Trauma 1975; 15:451–455.

Waldman TA, Gordon RS, Rosse W: Studies on the metabolism of the serum proteins and lipids in patients with analbuminemia. Am J Med 1964; 37:960–968.

Walsh PG, Haddad JG: 'Rocket' immunoelectrophoresis assay of vitamin D-binding protein (Gc globulin) in human serum. Clin Chem 1982; 28:1781–1783.

Weinberg ED: Iron and infection. Microbiol Rev 1978; 42:45–66.

Westwood SA, Werrett DJ: Group-specific component: A review of the isoelectric focusing methods and auxillary methods available for the separation of its phenotypes. Forensic Sci Int 1986; 32:135–150.

Whitehead AS, Bruns GAP, Markham AF, et al: Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localization of the gene to chromosome 1. Science 1983; 221:69–71.

Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S: Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. Science 1999; 286:1888–1893.

Wochner RD, Spilberg I, Iio A, et al: Hemopexin metabolism in sickle cell disease, porphyrias and control subjects: Effect of heme injection. N Engl J Med 1974; 290:822–826.

Xin Y, Lasker JM, Lieber CS: Serum carbohydrate-deficient transferrin: Mechanism of increase after chronic alcohol intake. Hepatology 1995; 22:1462–1468.

Zaret DL, Morrison N, Gulbranson R, Keren DF: Immunofixation to quantify beta 2-transferrin in cerebrospinal fluid to detect leakage of cerebrospinal fluid from skull injury. Clin Chem 1992; 38:1908–1912.

Descrição do ensaio para detecção de marcador específico para LCE em líquido desconhecido.

Zawadzki Z, Edwards G: Pseudoparaproteinemia due to hypertransferrinemia. Am J Clin Pathol 1970; 54:802–809.

CAPÍTULO 20

Enzimologia clínica

Naif Z. Abraham Jr MD PhD, Robert P. Carty MD, D. Robert DuFour MD, Matthew R. Pincus MD PhD

Propriedades gerais das enzimas 285
- Nomenclatura das enzimas 286
- Cofatores enzimáticos 287
- Fatores que afetam a atividade das enzimas plasmáticas 288
- Cinética enzimática 289
- Eficiência catalítica 290
- Inibição enzimática 291

Análise enzimática 293
- Ensaios enzimáticos 294
- Determinação da atividade enzimática 295
- Outros fatores que afetam a atividade enzimática 296

Enzimas específicas 297
- Fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) 297
- Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) 298
- Enzima conversora de angiotensina (EC 3.4.15.1) 299
- Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) e colinesterase (EC 3.1.1.8) 300
- Lactato desidrogenase (EC 3.1.1.27) 301
- 5′-nucleotidase (EC 3.1.3.5) 303

Lesão musculoesquelética – creatina quinase/fosfoquinase (CK/CPK) 303

Referências bibliográficas 304

PONTOS-CHAVE

- As enzimas são proteínas catalisadoras utilizadas por essencialmente todas as células dos mamíferos em reações bioquímicas específicas, em diferentes órgãos do corpo, e que também podem estar fisicamente localizadas em diferentes organelas e estruturas celulares.
- A maioria das enzimas tem um nome prático ou trivial, além de um nome atribuído baseado na nomenclatura padrão estabelecida pela International Union of Biochemistry (União Internacional de Bioquímica). Esse nome formal se baseia no tipo de reação catalisado pela enzima.
- Além de certas faixas estreitas de pH, temperatura e concentração de proteína e de sal, a maioria das enzimas requer moléculas orgânicas extras e/ou íons inorgânicos para exercer sua função enzimática com eficácia.
- A compreensão da cinética enzimática permite ao laboratório quantificar os níveis plasmáticos de enzimas, bem como determinar uma possível inibição enzimática.
- No interior dos órgãos, as células lesadas ou em processo de morte celular podem liberar enzimas na circulação. Os níveis plasmáticos de enzimas podem ser utilizados clinicamente para desenvolver o diagnóstico diferencial de um dado paciente, com relação a uma doença ou disfunção de órgão específica.
- Muitas enzimas possuem isozimas (i. e., cadeias polipeptídicas que diferem quanto às sequências, mas cujas atividades enzimáticas são semelhantes). Algumas enzimas são compostas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, como as cadeias M e B da creatina fosfoquinase, e dão origem a isozimas com cadeias de composição distinta (p. ex., as formas MM, MB e BB da CPK). Em inúmeras doenças, a concentração sérica de isozimas específicas aumenta e, assim, facilita o diagnóstico.
- Alguns exemplos dos aspectos até então mencionados incluem as alterações dos níveis séricos da isoforma MB-(CPK) da creatina fosfoquinase (uma enzima miocárdica) na doença cardíaca; modificações do nível sérico de alanina aminotransferase (ALT) na doença hepática; e alterações dos níveis séricos de creatina fosfoquinase total em casos de lesão no músculo esquelético.

Propriedades gerais das enzimas

O catalisador acelera a velocidade das reações químicas. Essa aceleração pode se dar em solução; nesse caso, o processo é denominado *catálise homogênea*. A catálise em uma superfície insolúvel é denominada *catálise heterogênea*. Os catalisadores biológicos são chamados de *enzimas* e são, em sua maior parte, proteínas que exibem *catálise homogênea*. Entretanto, algumas enzimas estão imersas em estruturas membranosas e devem ser consideradas catalisadores heterogêneos insolúveis.

A especificidade enzimática define a capacidade de as proteínas catalisadoras reconhecerem e se ligarem a apenas uma ou a poucas moléculas – o(s) *substrato(s)* –, excluindo todas as demais, uma característica denominada *especificidade da ligação*. Uma enzima catalisa um único processo bioquímico (i. e., há quebra ou formação de um tipo isolado de ligação covalente). Esse aspecto é denominado *especificidade da reação*. A maioria das enzimas apresenta absoluta especificidade de reação (i. e., não gera subprodutos minoritários). A especificidade da ligação permite que muitas reações bioquímicas ocorram simultaneamente, no mesmo espaço biológico. A especificidade de reação absoluta poupa energia, uma vez que reduz o volume de metabólitos indesejados.

As enzimas são estéreo-seletivas, por conta da assimetria de seus sítios ativos. Reconhecem apenas uma forma enantiomérica (i. e., um composto de um par, cujos compostos possuem imagens espelhadas) de um substrato quiral. Dessa forma, as proteases se ligam exclusivamente aos polipeptídios constituídos por L-aminoácidos (mas *não* D-aminoácidos) e catalisam suas hidrólises. As enzimas apresentam especificidade geométrica, exemplificada pela reação da fumarase, na qual um intermediário do ciclo de Krebs, o fumarato (isômero *trans*), e não o maleto (isômero *cis*), sofre hidratação.

A concentração das moléculas enzimáticas em um determinado espaço intra ou extracelular depende de suas taxas de síntese e degradação. O controle da síntese de enzimas se dá tanto no nível transcricional quanto no traducional. Nos eucariontes, as células dos diferentes órgãos expressam isoformas distintas da mesma enzima, na qual variam as taxas e especificidade mais adequadas à obtenção de uma homeostase celular seletiva. A presença do substrato ou de outra molécula indutora pode causar um aumento repentino dos níveis enzimáticos.

A atividade enzimática também está sujeita ao controle exercido pela ligação de pequenas moléculas, que produzem alterações conformacionais na estrutura da enzima. Essa ligação pode afetar a afinidade da enzima pelo substrato, modificar a atividade catalítica enzimática ou, ainda, provocar ambos os efeitos. Geralmente, as enzimas que catalisam etapas determinantes da velocidade da reação em vias metabólicas estão sujeitas a esse tipo de regulação.

As enzimas não afetam o valor da constante de equilíbrio. Em reações reversíveis, promovem aceleração para ambos os sentidos (direita ou esquerda), envolvendo relativamente a mesma quantidade. A distribuição do equilíbrio de reagentes e produtos não muda depois que o estado de equilíbrio é alcançado, seja na presença ou na ausência de uma enzima.

Quase todas as enzimas conhecidas são proteínas ou conjugados proteicos. Poucas enzimas são proteínas nucleares, as quais constituem complexos de moléculas de RNA e proteína.

As enzimas apresentam na superfície uma região denominada *sítio ativo*, que é o local onde ocorrem os eventos de ligação e catálise. Esse sítio é uma fenda (ou fissura) na qual ficam imersos grupos específicos, convenientemente orientados, que exercem papéis de ligação e formação ou quebra de ligações. O formato tridimensional de um sítio ativo é determinante vital no processo de reconhecimento e especificidade. O *complexo enzima-substrato* constitui o aduto formado pela adsorção física do substrato ao sítio ativo. A formação desse complexo requer o alinhamento específico entre átomos presentes no sítio ativo e átomos existentes na molécula de substrato. Tal arranjo complementar é referido como ajuste em *chave e fechadura* entre substrato e sítio ativo, e é ilustrado pela Figura 20.1. Há ocasiões em que o formato da molécula de substrato não corresponde exatamente ao contorno do sítio ativo. Mesmo assim, o substrato consegue se ligar firmemente ao sítio ativo, graças à sua capacidade de remodelá-lo a uma conformação que propicie a ligação de alta afinidade entre ambos. Esse tipo de adsorção do substrato é descrito como *ajuste induzido*, e é ilustrado na Figura 20.2. Os sítios ativos das enzimas dotadas de "ajuste induzido" só se tornam complementares *após* a ligação do substrato. Uma parte da energia de ligação favorável é empregada no reconhecimento da forma do sítio ativo.

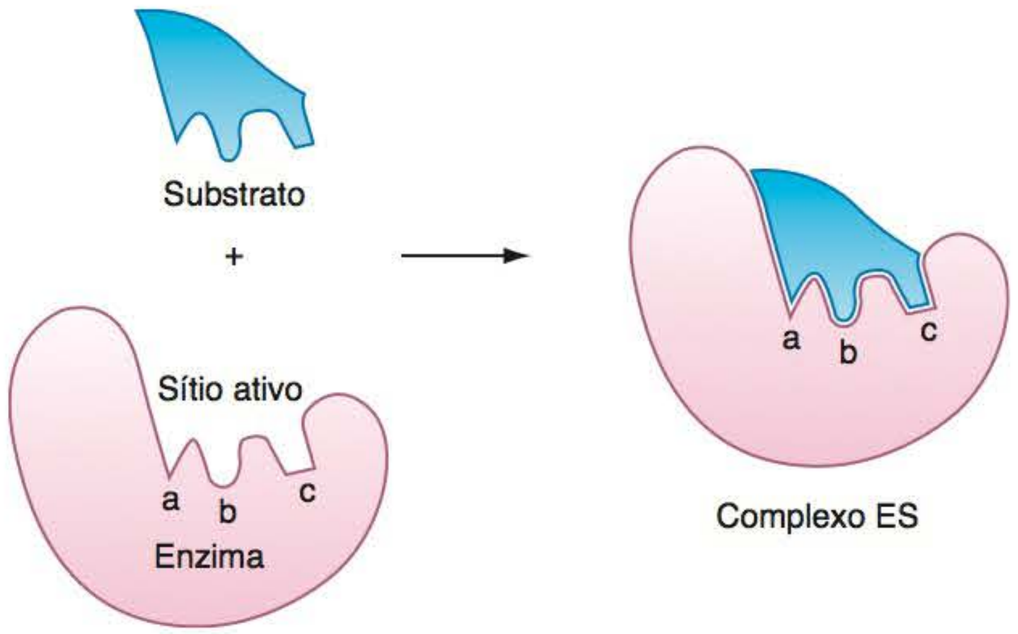


Figura 20.1 O modelo de *chave e fechadura* da ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Ela apresenta complementaridade estérica e eletrônica pré-formada em relação ao formato e à distribuição de carga do substrato. Alterações no formato ou redistribuições eletrônicas, tanto na enzima quanto no substrato, são desnecessárias para que a ligação seja a ideal. (Redesenhado de W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA, Lubert Stryer, Stanford University, Biochemistry, 2nd edn., 1981.)

A *energia livre de ativação* é a energia absorvida pelas moléculas de reagente antes de sua conversão em produtos da reação. Essa energia atua como barreira à reatividade química. Quando essa barreira é grande, a velocidade da reação torna-se muito baixa. Portanto, quanto menor for a barreira, mais rápida será a velocidade da reação. Praticamente todas as reações químicas apresentam uma barreira, uma vez que as ligações, para serem rompidas, necessitam ser alongadas e, às vezes, desviadas para fora de suas posições de equilíbrio. Essa deformação toda consome energia. As enzimas *reduzem* a energia livre de ativação. A maioria das reações metabólicas apresenta barreiras de ativação muito altas e, na ausência de enzimas, apresentaria velocidade de reação imperceptivelmente lenta. Por meio da inibição da atividade enzimática, as células podem reduzir seletivamente a velocidade das reações metabólicas para taxas próximas de zero. Esse aspecto do metabolismo permite que as células "liguem" e "desliguem" as vias metabólicas ao longo dos diversos estágios do ciclo celular. As enzimas reduzem a energia livre de ativação de várias maneiras. A ligação e a devida orientação do substrato no sítio ativo aumentam sua proximidade em relação aos grupos catalíticos. Vários tipos de catálise são empregados pelas enzimas. Os principais tipos de catálise são: acidobásico, eletrofílica, nucleofílica, íon metálico e eletrostática. As reduções da energia livre de ativação ocorrem por meio da ligação preferencial do complexo do estado de transição (ou enzima-substrato intermediário) aos grupos do sítio ativo. Cadeias laterais de diferentes aminoácidos participam da catálise. A cadeia lateral da histidina constitui um eficiente catalisador acidobásico, enquanto as cadeias laterais da serina, cisteína, lisina, histidina e ácido aspártico participam da catálise covalente. As cadeias laterais de lisina e arginina, bem como os íons metálicos, podem atuar como catalisadores eletrostáticos ao estabilizarem as cargas negativas que se desenvolvem durante a catálise.

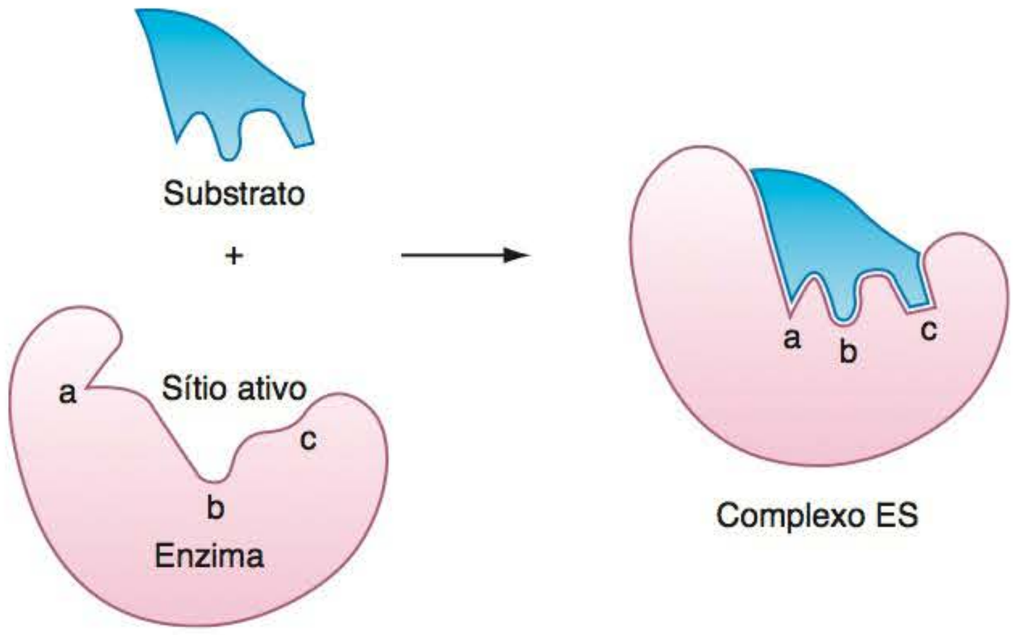


Figura 20.2 O modelo de *ajuste induzido* da ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Esse modelo postula a ocorrência de uma interação inicial fraca e flexível entre o substrato e os grupos existentes no sítio de ligação ao substrato da enzima. A ligação é suficiente para desencadear um rearranjo conformacional na superfície da enzima, que resulta na exposição de grupos adicionais de ligantes. Estes, por sua vez, aumentam a afinidade do substrato pela enzima. (Redesenhado de W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA, Lubert Stryer, Stanford University, Biochemistry, 2nd edn., 1981.)

A velocidade da reação é proporcional à concentração de moléculas que ganharam energia equivalente à energia livre de ativação, $\Delta G^{\ddagger}$. Essa energia é maior nas reações não catalisadas. A ideia de que as enzimas aceleram as reações químicas promovendo a redução do $\Delta G^{\ddagger}$ é ilustrada na Figura 20.3, em que é feita uma comparação da energia livre necessária a uma reação produtiva não catalisada *versus* a reação catalisada. As enzimas se desenvolveram em excelentes catalisadores, porque seus sítios ativos evoluíram para ligar complexos de estados de transição de modo bastante firme. É essa ligação firme que estabiliza o estado de transição e diminui a energia livre de ativação. As enzimas não alteram as energias do estado basal dos reagentes e produtos das reações químicas. O estado de equilíbrio caracteriza-se por ser o estado de menor energia, em que a composição da mistura de reagentes e produtos encontra-se em equilíbrio como reflexo de tais energias de estado basal. Ao final do processo catalítico, as enzimas emergem inalteradas, embora algumas sofram modificações químicas passageiras durante a reação.

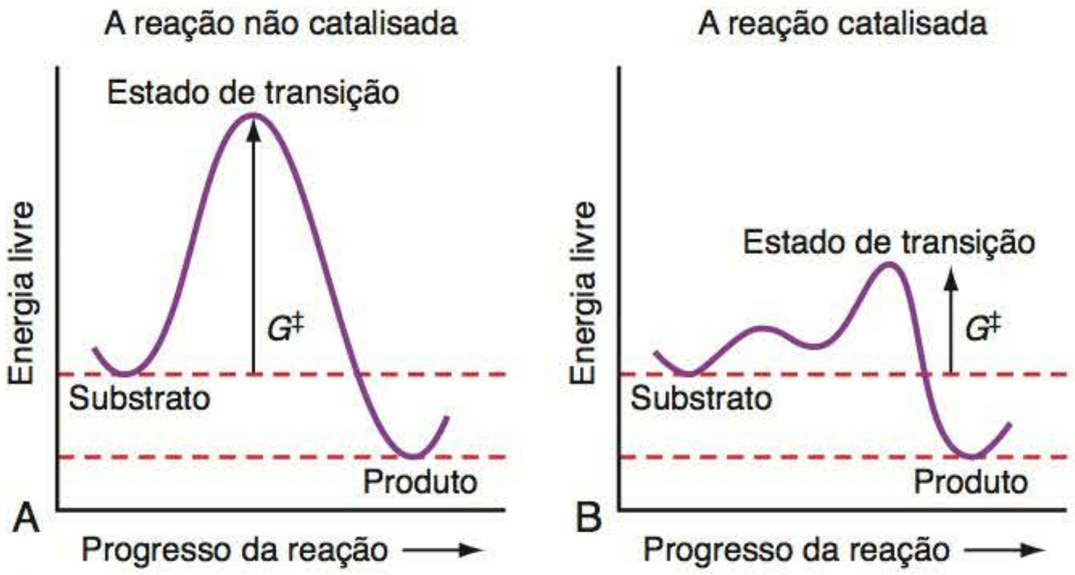


Figura 20.3 O caminho da energia livre de uma molécula de reagente ao longo de seu estado de transição, em vias de se tornar uma molécula de produto. *A*, reação não catalisada. *B*, reação enzimaticamente catalisada. A trajetória da energia seguida pela molécula que participa da reação química é o caminho da energia livre mínima, conhecido como *coordenada da reação*. O estado de transição – o estado de maior energia livre – é o ponto em que há igual probabilidade de a reação acontecer ou de haver decomposição do *complexo ativado* de volta em reagentes. A variação da energia livre ($\Delta G^{\ddagger}$) é a energia que a molécula de substrato precisa adquirir para reagir com o complexo ativado. Essa energia é menor quando a reação é catalisada. O diagrama de energia à direita (*B*) representa um processo de duas etapas característico das reações catalisadas por enzimas, no qual a alteração covalente é precedida por uma etapa de ligação. Em uma reação de etapas múltiplas, a velocidade global é uma função da etapa que apresenta maior $\Delta G^{\ddagger}$.

Nomenclatura das enzimas

A nomenclatura das enzimas comumente avaliadas foi padronizada pela Enzyme Commission (EC, Comissão da Enzima) da International

Union of Biochemistry (1979, 1992). Cada enzima possui dois nomes: um nome prático ou trivial, e um nome sistemático. Esse último baseia-se na designação de código numérico v único e na natureza da reação catalítica – as enzimas são nomeadas pela citação do nome da molécula de substrato, seguida do sufixo *-ase*. Há casos em que o nome inclui também uma designação do tipo de reação catalisada.

Exemplos

1. O ácido ribonucleico (RNA) é hidrolisado por uma enzima denominada *ribonuclease*.
2. O ácido lático é oxidado a ácido pirúvico por uma enzima denominada *ácido lático desidrogenase*.

Os nomes triviais mais antigos persistem na literatura, como a tripsina (uma enzima promotora de hidrólise proteica que é secretada no intestino) e a papaína (uma enzima encontrada nas plantas, que também hidrolisa proteínas). Uma classificação enzimática mais sistemática foi implantada na literatura bioquímica (International Union of Biochemistry, 1979, 1992). As enzimas estão organizadas em seis classes principais, de acordo com o tipo de reação, conforme mostra a Tabela 20.1.

Muitas enzimas possuem *isozimas* (i. e., formas estruturalmente distintas que catalisam a mesma reação). É mais comum encontrar diferentes isozimas em órgãos ou tecidos específicos. Assim, a determinação do tipo de uma dada isozima pode ser utilizada na identificação do tecido danificado que está liberando a enzima. A nomenclatura padronizada das isozimas baseia-se na migração eletroforética, e as isozimas que se movem mais rapidamente na direção do ânodo são denominadas *isozimas 1*. As mais reconhecidas são aquelas compostas por combinações variáveis de subunidades, exemplificadas pela creatina quinase (CK), um dímero de subunidades M (*muscle*, músculo) e B (*brain*, cérebro), e pela lactato desidrogenase (LDH), um tetrâmero de subunidades H (*heart*, coração) e M. Em outros casos, as isozimas podem ter o mesmo componente proteico, porém diferem quanto às modificações feitas pela célula de origem. Por exemplo, as isozimas da fosfatase alcalina (ALP) encontradas no osso, rim e fígado apresentam sequências de aminoácido idênticas, mas diferem quanto à composição de carboidratos.

Algumas vezes, as isozimas podem apresentar estruturas proteicas completamente distintas. Existem isozimas citoplasmáticas e mitocondriais tanto da CK quanto da aspartato aminotransferase (AST), cujas estruturas são notavelmente diferentes. As isozimas de ALP encontradas na placenta e no intestino possuem estruturas proteicas mais distintas, em comparação com as formas "teciduais inespecíficas" que são encontradas no fígado, osso e outros órgãos.

Tabela 20.1 Classificação das enzimas

Classe		Tipo de reação que catalisa
1	Oxidorredutases	Reações de oxidorredução
2	Transferases	Transferência de grupos funcionais
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Eliminação de grupo para formar ligações duplas
5	Isomerases	Isomerizações
6	Ligases	Formação de ligação acoplada à hidrólise de ATP

Por fim, as enzimas podem ser modificadas pelas proteases existentes no soro; em consequência, há geração de formas com diferenças discretas entre si. Tais formas são denominadas *isoformas*. Por exemplo, as subunidades CK-M são parcialmente metabolizadas pela carboxipeptidase N, que remove um resíduo de lisina da porção carboxiterminal da molécula, convertendo a isoforma tecidual em uma isoforma plasmática com carga diversa. A concentração relativa de isoformas teciduais e plasmáticas pode ser utilizada como marcador da duração da lesão em células que contenham CK. A Tabela 20.2 lista nomes oficiais e números EC de enzimas úteis na clínica, que são avaliadas com maior frequência (Zollner, 1989).

Cofatores enzimáticos

Dois terços de todas as enzimas contêm cofatores, que são grupos de substâncias termoestáveis, necessárias à catálise. São íons orgânicos e inorgânicos de baixo peso molecular. A combinação do cofator a uma parte da proteína – a *apoenzima* – constitui uma entidade catalítica completa e é conhecida como *holoenzima*. Os cofatores orgânicos se ligam de modo covalente ou não covalente à apoenzima. Os cofatores covalentemente ligados são referidos, por vezes, como *grupos prostéticos*. Há cofatores que são observados em reações de oxidorredução, transferência de grupos e isomeração, bem como em reações formadoras de ligação covalente. As reações de hidrólise em geral dispensam cofatores. A Tabela 20.3 lista os cofatores orgânicos, e a Tabela 20.4, os cofatores inorgânicos, que incluem os principais íons metálicos. Um *cossubstrato* é um cofator orgânico que se comporta como substrato secundário em reações catalisadas por enzimas. Cofatores como NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídio) podem atuar como cossubstratos para inúmeras oxidorredutases. Uma única molécula de

Tabela 20.2 Nomes, números e substratos das enzimas

Enzima (grupo IUB, número EC)	Substrato	Comentários
Acetilcolinesterase (hidrolase, EC 3.1.1.7) ou AChE	Acetilcolina, acetil tiocolina; hidrolisa acetil-β-metilcolina	A colina é $HOCH_2CH_2CH_2N(CH_3)_3$, uma amina quarternária; muitos ésteres com grupo OH são substratos
Pseudocolinesterase (hidrolase, EC 3.1.1.8) ou PChE	Muitos ésteres alifáticos da colina; diferentemente da AChE, não hidrolisa acetil-β-metilcolina, porém, ainda contrastando com a AChE, hidrolisa butiril- e benzoilcolina	
Fosfatase ácida (hidrolase, EC 3.1.3.2)	Cliva ésteres de fosfato, como ALP, porém em pH em torno de 5, incl. G6P, fenil-α-glicerofosfato, fenolftaleína-P, timolftaleína-P, naftol-P	Cliva ésteres de fosfato, como ALP, porém em pH em torno de 5 pH ideal em torno de 5
Fosfatase alcalina (hidrolase, EC 3.1.3.1)	Ver fosfatase ácida	A ALP tem um pH ideal incomum, de aproximadamente 9. O pH ideal varia de acordo com o substrato e o tampão
Enzima conversora de angiotensina (ACE) (hidrolase, EC 3.4.15.1)	Quebra o dipeptídio His-Leu na porção C-terminal da angiotensina I para formar angiotensina 2; também quebra hipuril-His-Leu em hipurato + His-Leu	Considerada uma hidrolase inespecífica; atua sobre a met e a leu-encefalina
Lactato desidrogenase (oxidorredutase, EC 1.1.1.27)	Piruvato e outros cetoácidos + NADH. Também lactato e outros α-hidroxiácidos + NAD	Moderadamente específica
5?-nucleotidase (hidrolase, EC 3.1.3.5)	5?-ribonucleotídeos	Especificidade ampla para 5'-ribonucleotídeos

IUB = International Union of Biochemistry; EC = Enzyme Commission; ALP = fosfatase alcalina; G6P = glicose-6-fosfato; P = fosfato; NAD = nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH = forma reduzida do NAD.

Tabela 20.3 Cofatores orgânicos

Coenzima	Tipo de reação	Deficiência
Coenzima A	Transferência de acil	
Pirofosfato de tiamina	Transferência de aldeído	Beribéri
Coenzimas do ácido fólico	Transferência de 1 carbono	Anemia megaloblástica
Coenzimas da cobalamida (B_{12})	Alquilação	Anemia perniciosa
Coenzimas da nicotinamida	Oxidorredução	Pelagra
Coenzimas da flavina	Oxidorredução	
Biotina	Carboxilação	
Ácido lipoico	Transferência de acil	
Fosfato piridoxal	Transferência de grupo amino	
Coenzima Q	Transferência de elétron	

Tabela 20.4 Cofatores inorgânicos

Mg^{2+}	Ca^{2+}
Fe^{2+}/Fe^{3+}	Mn^{2+}
Zn^{2+}	Co^{2+}
Cu^{+}/Cu^{2+}	

NAD^+ pode atuar como cossubstrato milhares de vezes. O produto NADH deve ser primeiramente oxidado de volta a NAD^+ antes de participar da reação outra vez, como aceptor de elétron e átomos de H. A reciclagem do par NAD^+–NADH de oxidorredução depende da real disponibilidade de um sistema químico que seja capaz de regenerar NAD^+ a partir de NADH. A molécula de substrato com frequência é modificada de modo irreversível em uma reação. Por outro lado, as moléculas de cossubstrato são renováveis.

Fatores que afetam a atividade das enzimas plasmáticas

Existem diversos mecanismos pelos quais os níveis plasmáticos de enzimas podem aumentar. Por serem compostos de alto peso molecular, a causa mais comum do aumento de seus níveis plasmáticos é a morte das células que as contêm. À medida que essas células morrem, a ativação de fosfolipases provoca a formação de buracos na membrana plasmática e, com isso, há vazamento de macromoléculas citoplasmáticas, entre as quais, proteínas. Também há liberação de enzimas durante o processo normal de renovação celular, considerado fonte de níveis plasmáticos normais de várias enzimas. O aumento da síntese celular dessas proteínas conduz igualmente à elevação de seus níveis no plasma. Diante do aumento da atividade dos osteoblastos, há elevação dos níveis plasmáticos da isozima óssea da ALP. Esse aumento pode ser responsável pelo aumento da concentração das enzimas musculoassociadas, detectado durante a prática intensificada de exercícios (Dickerman, 1999). Muitos fármacos que estimulam enzimas microssomais, incluindo etanol e agentes antiepilépticos, elevam os níveis plasmáticos de γ-glutamil transferase (GGT). Em alguns casos, a liberação da enzima a partir das células ocorre sem que haja morte celular ou aumento da síntese. Como discutido no Capítulo 21, a respeito da função hepática, o etanol induz a expressão da isozima mitocondrial da AST na superfície dos hepatócitos, bem como a elevação de seus níveis plasmáticos. A isquemia das células miocárdicas causa perda da isozima BB da glicogênio fosfolipase no plasma. A ingestão de alimentos provoca liberação de ALP intestinal no líquido linfático, podendo aumentar transitoriamente os níveis plasmáticos dessa enzima. Inúmeras enzimas hepáticas (ALP, GGT, leucina aminopeptidase, 5'-nucleotidase [5'-NT]) estão ligadas à superfície canalicular do hepatócito. Concentrações aumentadas de sais biliares com obstrução canalicular podem causar a liberação de fragmentos de membrana que contêm enzima ligada na circulação, ou podem também solubilizar os domínios de ligação à membrana (Van Hoof, 1997). Por fim, o aumento dos níveis plasmáticos de enzimas pode se dar em decorrência da diminuição de sua depuração a partir da circulação. Algumas enzimas menores, como a amilase e a lipase, são parcialmente removidas por meio da filtração glomerular. Desse modo, uma insuficiência renal acarreta o aumento de seus níveis no plasma. Para diversas enzimas, anticorpos contra uma ou mais isozimas podem levar à formação de complexos enzima-anticorpo (com frequência denominados *macroenzimas*), que resultam em meias-vidas enzimáticas semelhantes à meia-vida de 3 semanas da IgG (Remaley, 1989). Mais comumente, não se observa nenhuma característica clínica específica associada a tais macroenzimas. Todavia, é comum detectar anticorpos contra isozimas intestinais da ALP em indivíduos com infecções bacterianas (Mader, 1994). Um fenômeno semelhante pode ocorrer quando as enzimas se ligam a anticorpos dirigidos a outros antígenos, como complexos de LDH e anticorpos para estreptoquinase (Podlasek, 1989).

O curso do aparecimento e desaparecimento das enzimas com a lesão celular depende de alguns fatores. Com a morte celular, os defeitos que surgem na membrana celular vão se tornando gradativamente maiores no decorrer do tempo. Assim, as enzimas citoplasmáticas menores extravasarão das células lesadas antes das enzimas maiores. Por exemplo, na lesão do miocárdio, a CK e a AST são menores que a LDH e, portanto, aparecem mais precocemente no plasma. Algumas enzimas não são citoplasmáticas, porém são encontradas na mitocôndria (isozimas da CK e da AST) ou ligadas à membrana plasmática (como a ALP e a GGT). A morte celular em geral não resulta na liberação dessas enzimas. Se a morte celular ocorrer em um episódio de infarto, em decorrência da interrupção do fluxo sanguíneo em uma parte do órgão, as enzimas liberadas a partir das células lesadas têm de se difundir para longe da área não perfundida, antes de alcançarem a circulação. Por exemplo, no infarto do miocárdio (IM), a concentração de CK atinge o pico mais tardiamente em indivíduos cujas artérias coronárias não foram reperfundidas de maneira suficiente por meio do uso de agentes trombolíticos. O grau de elevação dos níveis de uma enzima está relacionado ao número de células lesadas, ao gradiente de concentração existente entre a célula e o plasma e às taxas de entrada e depuração da enzima a partir do plasma. No IM, a quantidade de CK liberada correlaciona-se fortemente com as dimensões da área afetada pelo infarto. Por isso, diante de uma lesão antiga, os níveis da enzima estão associados à intensidade da lesão celular que ainda está em andamento. Caso a lesão esteja em curso, os níveis plasmáticos de enzima se manterão elevados por um tempo mais prolongado. Na lesão hepática aguda, por exemplo, o curso das alterações do conteúdo enzimático pode ser utilizado para diferenciar um caso de hepatite viral, na qual o dano imunológico dá andamento ao processo de morte celular e provoca elevação da concentração de enzimas por tempo prolongado – de uma lesão isquêmica e tóxica –, em que o dano é imediato, porém de curta duração, e as elevações dos níveis enzimáticos retornam rapidamente ao normal.

Outros determinantes importantes do curso temporal das alterações enzimáticas incluem o gradiente relativo dos níveis enzimáticos entre as células e o soro e a taxa de depuração da enzima a partir do plasma. Seja qual for o grau de dano celular, a enzima com o maior gradiente entre células/soro é a que mostra maior elevação dos níveis plasmáticos. Assim, os hepatócitos, quando lesados, apresentam níveis de AST mais altos que de ALT, e as concentrações de ambas são muitas vezes maiores do que os níveis de LDH. Portanto, imediatamente após a lesão, os níveis de AST apresentam maior elevação que os níveis de ALT, enquanto a concentração de LDH apresentará o menor grau de aumento. No tecido cardíaco, o gradiente de CK estabelecido entre as células miocárdicas e o plasma é várias vezes maior do que o observado para LDH e, em consequência, o pico de CK é maior que os níveis de LDH. Com a chegada da enzima no plasma, a taxa de depuração também se transforma em um fator importante. A meia-vida da AST é significativamente menor que a da ALT, e a meia-vida da CK é mais curta que a das isozimas cardíacas da LDH. Assim, com a lesão hepática, a ALT plasmática frequentemente se torna maior que a AST logo após o aparecimento da lesão. Passado o episódio de MI, a concentração de CK é normalizada vários dias antes da normalização dos níveis de LDH.

Cinética enzimática

O objetivo básico da enzimologia clínica consiste na determinação da concentração total de enzimas específicas no soro e em outros líquidos corporais. Em termos qualitativos, a detecção da presença de enzimas nesse material é, felizmente, um procedimento bem simples, pois cada enzima apresenta especificidade quase total para um ou (no máximo) poucos substratos. Pela adição do substrato, diga-se, ao soro e subsequente observação de seu desaparecimento ou do aparecimento de seu produto, é possível constatar a presença da enzima. Esse fenômeno pode ser explicado pela constatação de que a taxa de desaparecimento do substrato ou de formação de seu produto pode ser utilizada diretamente para determinar a concentração da enzima presente no soro (Cleland, 1970, 1990; Cornish-Bowden, 1995; Fersht, 1999; Segal, 1993).

As enzimas exibem saturação, que é atingida quando a velocidade deixa de responder a incrementos adicionais da concentração de substrato. As reações químicas comuns ocorrem a velocidades proporcionais a toda a faixa de concentrações dos reagentes. Em uma reação catalisada por enzima, quando a concentração de substrato é baixa, a velocidade é proporcional à concentração do substrato. Por outro lado, diante de concentrações maiores, a velocidade da reação não aumenta de modo diretamente proporcional. Quando concentrações ainda maiores de substrato são empregadas, essa velocidade se torna constante e irresponsiva a qualquer alteração que venha a ocorrer na concentração do substrato. Esse comportamento fez com que fosse proposta a hipótese de que a catálise enzimática é um processo composto por duas etapas. A etapa inicial consiste na adsorção, em que o substrato se combina à enzima para formação do complexo não covalente enzima-substrato (ES). Na segunda etapa, esse complexo se decompõe em produto (P) e enzima livre (E).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E \tag{20.1}$$

A explicação física para a saturação é que a ligação reduz o número de sítios ativos disponíveis para formação do complexo enzima-substrato. A ocupação de todos os sítios impossibilita novas ligações, que somente voltam a ocorrer quando um sítio ativo é desocupado. A etapa que determina a velocidade global é k_2. A adição de moléculas de substrato sob condições de saturação não altera a velocidade da reação, pois as moléculas de substrato livres precisam aguardar a desocupação dos sítios ativos.

A velocidade v – a taxa de formação do produto – de uma reação enzimaticamente catalisada é definida por:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]` \tag{20.2}$$

em que t significa tempo.

A lei da velocidade diferencial, que determina a taxa de modificação de [ES] ao longo do tempo, é a diferença existente entre a velocidade da etapa k_1 (que conduz à formação do complexo) e as velocidades das etapas que levam ao desaparecimento de [ES] (etapas k_{-1} e k_2).

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \tag{20.3}$$

Para uma ampla variedade de reações catalisadas por enzimas, constatou-se que no decorrer de longos períodos, após uma fase inicial transitória de alguns milissegundos, a concentração do complexo ES permanece constante, desde que $[S] >> [E_T]$, em que E_T é a concentração de enzima total. Esse comportamento permite:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \tag{20.4}$$

A equação de conservação para a enzima, $E_T = E + ES$, pode ser empregada para eliminar [E] da equação (20.4) e resultar em:

$$0 = k_1[E_T][S] - k_1[ES][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \tag{20.5}$$

Em seguida, combinando-se os termos e resolvendo [ES]:

$$k_1[E_T][S] = [ES](k_1[S] + k_{-1} + k_2) \tag{20.6}$$

E, então:

$$[ES] = \frac{k_1[E_T[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \tag{20.7}$$

Dividindo-se por k_1 os termos de cima e de baixo, à direita, tem-se:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{([S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1})} \tag{20.8}$$

E, por fim:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{[S] + K_M} \tag{20.9}$$

em que:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \tag{20.10}$$

K_M é conhecida como *constante de Michaelis* e representa uma quantidade experimentalmente derivada. A velocidade inicial pode ser expressa em termos de variável mensurável, [S], e constante, $[E_r]$. Portanto:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E_T][S]}{([S] + K_M)} \tag{20.11}$$

Quando $[E_T] = [ES]$, significa que houve saturação, e a velocidade é máxima. Essa velocidade é denominada velocidade máxima ($V_{máx}$) e:

$$V_{máx} = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E_T] \tag{20.12}$$

Substituindo por $k_2[E_T]$,

$$v_O = \frac{V_{máx}[S]}{([S] + K_M)} \tag{20.13}$$

Em que v_o é a velocidade inicial. A equação 20.13 é denominada *Lei de Michaelis-Menten* e governa a maioria das reações de substrato único enzimaticamente catalisadas. É importante observar nessa equação que v é escrito como v_o. Essa representação se deve ao fato de que, quando as velocidades das reações catalisadas por enzima são medidas, é mais desejável determinar a *velocidade* ou *taxa inicial* (i. e., a velocidade da reação logo após o seu início, quando ainda se sabe a concentração de substrato). É igualmente interessante determinar as velocidades iniciais para garantir a ausência de inibição do produto (em t_o, $[P] = 0$) e de perda de enzimas em decorrência de proteólise, desnaturação ou adsorção em superfícies de vidro ou plástico dependente do tempo.

Quando a estabilidade se desenvolve, nenhuma consideração é feita acerca das magnitudes relativas das velocidades constantes. Michaelis & Menten descreveram a mesma lei de velocidade em 1913, antes da introdução do conceito de estabilidade por Briggs e Haldane, em 1925. Michaelis & Menten consideraram $k_{-1} >> k_2$, o que equivale afirmar que a primeira etapa alcança o equilíbrio. Sendo assim, atualmente considera-se que K_M é igual à constante de equilíbrio de dissociação do complexo ES, K_S, a qual pode ser escrita da seguinte forma:

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \tag{20.14}$$

A afinidade do substrato pela enzima é uma medida quantitativa da força da interação não covalente entre o substrato e a enzima no complexo enzima-substrato. É definida como constante de equilíbrio para a reação de associação:

$$E + S \rightleftharpoons ES \tag{20.15}$$

Infelizmente, a afinidade é com mais frequência indexada à constante de dissociação, K_S, para a seguinte reação:

$$ES \rightleftharpoons E + S \tag{20.16}$$

Existe uma relação recíproca entre a constante de dissociação e a afinidade. Quanto maior for K_S, menor será a afinidade.

K_M é uma constante experimentalmente derivada, enquanto K_S é uma afirmação sobre o significado de K_M, e:

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1 = K_S + k_2/k_1 \tag{20.17}$$

$K_M = K_S$ apenas quando k_2 tende a zero. Portanto, K_M é sempre $\geq K_S$. K_M jamais poderá ser $< K_S$. K_M somente se torna uma medida razoável da afinidade caso k_2/k_1 seja um valor baixo. Essa consideração é

razoável, pois k_1 refere-se à etapa da ligação ao substrato que, em geral, é rápida e por vezes ocorre no limite controlado por difusão. Todavia, k_2 é um valor alto para as enzimas e, por isso, o equilíbrio não se aplica à situação. Alguns exemplos são a anidrase carbônica ($k_2 = 10^6\ s^{-1}$, tendo CO_2 como substrato), catalase ($k_2 = 10^7\ s^{-1}$, tendo H_2O_2 como substrato) e superóxido dismutase ($k_2 = 10^6\ s^{-1}$, tendo o ânion superóxido, $O_2^{\bullet -}$, como substrato). K_M tem as dimensões da concentração. A soma ($k_2 + k_{-1}$) tem unidades de tempo recíproco (s^{-1}), enquanto as unidade de k_1 são a concentração recíproca vezes o tempo recíproco ($M^{-1}s^{-1}$). Se ($k_{-1} + k_2$) for dividido por k_1, restará 1/concentração recíproca, ou concentração, geralmente M.

Uma representação gráfica das velocidades iniciais (v_o) *versus* as concentrações de substrato ([S]) consiste na hipérbole representada na Figura 20.4.

K_M, definido em termos operacionais, é a concentração de substrato necessária para que seja alcançada metade da velocidade máxima. Essa definição é evidenciada pela substituição de $v_o = V_{máx}/2$ na equação da lei de velocidade de Michaelis-Menten:

$$v_O = V_{máx}/2\ \frac{V_{máx}[S]}{([S] + K_M)} \qquad (20.18)$$

Em seguida:

$$[S] + K_M = 2[S] \qquad (20.19)$$

E, então:

$$K_M = [S] \qquad (20.20)$$

A uma concentração de substrato menor ([S] << K_M), a velocidade é proporcional a [S], e:

$$v_O = \frac{V_{máx}[S]}{K_M} \qquad (20.21)$$

Tendo em vista que a velocidade depende apenas da concentração de substrato, a reação é denominada "reação de substrato de primeira ordem" ou reação de primeira ordem.

Diante de uma concentração de substrato maior ([S] >> K_M), a velocidade é constante e igual a $V_{máx}$, e:

$$v_O = \frac{V_{máx}[S]}{[S]} = V_{máx} \qquad (20.22)$$

Visto que a velocidade é constante (a reação ocorre à velocidade máxima ou $V_{máx}$), a reação é referida como reação de ordem zero (independe da concentração). Considerando que $V_{máx} = k_2 \times [E]t$, a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de enzimas e, assim, torna-se possível determinar diretamente essa concentração. É importante notar que tal condição pode ser atendida pela simples adição de uma quantidade de substrato que seja suficiente para tornar a concentração significativamente maior do que o valor de K_M conhecido. A velocidade inicial de formação de produto (ou desaparecimento de substrato) será, então, diretamente proporcional à concentração de enzimas, e essa relação constitui o alvo da enzimologia clínica.

Todas as condições mencionadas até aqui são atendidas pela relação hiperbólica da curva v_o *versus* [S]. A inversão da equação de Michaelis-Menten e a separação dos termos resultam na *transformação de Lineweaver-Burk*, que proporciona a relação linear entre as novas variáveis, $1/v_o$ e 1/[S].

$$\frac{1}{v_O} = \left(\frac{K_M}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \qquad (20.23)$$

Um gráfico de ($1/v_o$) *versus* (1/[S]) é mostrado na Figura 20.5. No gráfico de ($1/v_o$) *versus* [S], a velocidade se aproxima assintoticamente de $V_{máx}$. Portanto, $V_{máx}$ pode ser apenas estimado a partir dessa representação. Uma vez que $V_{máx}$ é essencial à estimativa de K_M, um simples gráfico de v_o *versus* [S] é capaz de fornecer estimativas grosseiras acerca dos parâmetros cinéticos. A transformação de Lineweaver-Burk permite realizar uma extrapolação linear do gráfico de ($1/v_o$) *versus* (1/[S]) para o eixo das ordenadas, no qual o valor de ($1/v_o$) com (1/[S]) = 0 corresponde à $V_{máx}$. Dividindo-se o valor da inclinação, $K_M/V_{máx}$, pelo ponto de interceptação, ($1/V_{máx}$), é possível conseguir uma estimativa razoável de K_M. As concentrações de substrato devem abranger uma gama de valores que sustente K_M. Determinações do valor de v_o com baixa [S] resultam em erros relativamente significativos, ainda

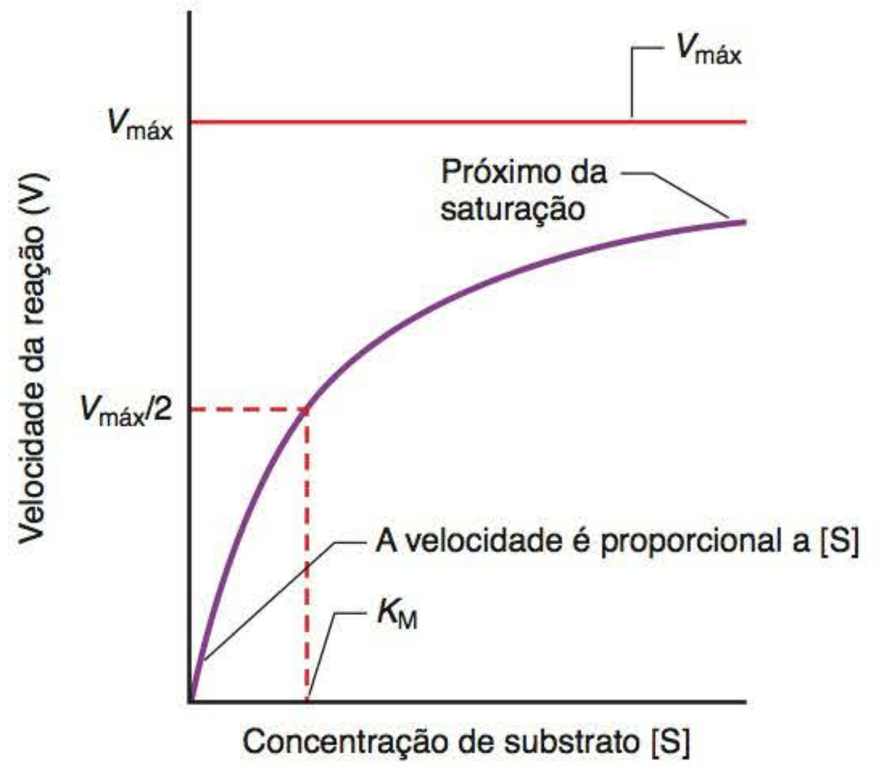


Figura 20.4 O efeito da concentração de substrato [S] sobre a velocidade (*V*) de uma reação catalisada por enzima. O gráfico representa uma reação cuja enzima catalisadora segue a cinética de Michaelis-Menten. A velocidade máxima é $V_{máx}$, e [S] é igual a K_M, em que *V* é igual a $V_{máx}/2$.

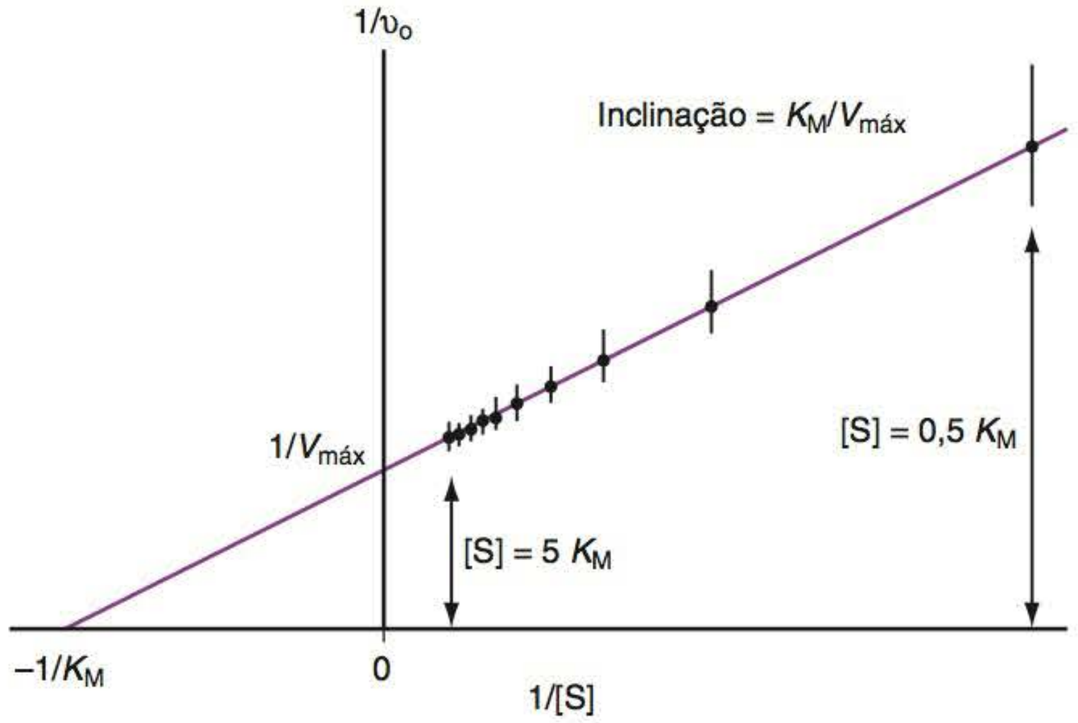


Figura 20.5 O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk de $1/v_o$ *versus* 1/[S]. O intervalo da concentração de substrato vai de 0,5 a 5 K_M, e as barras verticais são barras de erro ponderado. As menores concentrações de substrato conferem as menores velocidades, cujas estimativas apresentam o maior grau de incerteza. Estas aparecem no lado direito do gráfico, em que 1/[S] é maior. As maiores concentrações de substrato conferem as maiores velocidades, cujas estimativas apresentam o menor grau de incerteza. Elas aparecem no lado esquerdo do gráfico, em que 1/[S] é menor. Grandes erros em $1/v_o$ levam a grandes erros no K_M e em $V_{máx}$.

que tais estimativas sejam importantes na determinação de valores acurados para K_M e $V_{máx}$. Tais parâmetros podem ser estimados com acurácia razoável por programas de computador modernos, com base nas velocidades iniciais. Pesos são atribuídos com base na magnitude de v_o. Emprega-se uma análise de regressão não linear para ajustar os dados ponderados a uma curva hiperbólica de v_o *versus* [S]. Os dados de cinética são visualmente representados por meio de um gráfico de Lineweaver-Burk.

Eficiência catalítica

A eficiência catalítica é avaliada em termos de constantes de velocidade de reação catalisada. A constante de velocidade catalítica, k_{cat}, ou *número de renovação*, é definida pelo número de moléculas de substrato convertidas em moléculas de produto por cada molécula de enzima (ou sítio ativo) por unidade de tempo (segundos). Essa constante é expressa como:

$$k_{cat} = V_{máx}/E_T \qquad (20.24)$$

Para o modelo simples de substrato único de Michaelis-Menten, $k_{cat} = k_2$. O significado de k_{cat}/K_M pode ser compreendido considerando-se a velocidade catalítica quando S << K_M. Nessas circunstâncias [E] ∪ [E_r] e:

$$v_O \approx \left(\frac{k_2}{K_M}\right)[E]_T[S] \text{ a } \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)[E][S] \quad (20.25)$$

(k_{cat}/K_M) é expresso em unidades de constante de velocidade de segunda ordem (*é considerada de segunda ordem porque a velocidade passa a depender da concentração de enzima e de substrato*), sendo um reflexo da frequência de encontros produtivos entre as moléculas de enzima e substrato em solução. Há um limite superior de frequência de encontros que é determinado pela temperatura e pelos coeficientes de difusão da enzima e do substrato. Esse valor limitante é 10^8–$10^9 M^{-1}s^{-1}$. Se o valor de k_{cat}/K_M corresponder ao limite de difusão controlada, significa que cada encontro entre a enzima e o substrato leva à formação de produto, e a enzima, por sua vez, atingiu a perfeição catalítica. Algumas enzimas já alcançaram esse estado de perfeição, entre elas a superóxido dismutase ($k_{cat}/K_M = 2{,}8 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$), a acetilcolinesterase ($k_{cat}/K_M = 1{,}5 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$) e a catalase ($k_{cat}/K_M = 4{,}0 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$). Como parte da estratégia evolucionária de alcançar a eficiência catalítica perfeita, as enzimas evoluíram e passaram a se ligar a seus substratos de forma mais fraca. Por exemplo, uma molécula como NAD^+ potencialmente poderia se ligar por meio de seu sítio de ligação de substrato com uma K_S de cerca de 1×10^{-20} M. Entretanto, os valores de K_M para o NAD^+ são da ordem de 1×10^{-4} M. O valor da constante de ligação se aproxima do valor da concentração intracelular de NAD^+ e, para muitas enzimas, [S] *in vivo* ≈ K_M. Próximo ao K_M, a velocidade é sensível tanto a aumentos quanto a diminuições de [S]. Além disso, a energia basal do complexo ES não é tão baixa a ponto de representar um obstáculo ao alcance do estado de transição da etapa com velocidade determinada por k_2. Ao se ligarem frouxamente ao substrato e de preferência no estado de transição k_2, as enzimas evoluíram com o objetivo de minimizar a quantidade de energia necessária para ultrapassar as barreiras de ativação das reações que catalisam.

Outra medida da eficácia catalítica das enzimas é a *taxa de aceleração*. Para avaliar esse parâmetro, além de k_{cat}, deve ser conhecida a constante de velocidade de primeira ordem para a conversão não enzimática de substrato em produto ($k_{não\text{-}cat}$). A proporção $k_{cat}/k_{não\text{-}cat}$ revela a taxa de aceleração. Esta, por sua vez, costuma ser obtida com bastante dificuldade, uma vez que as velocidades da maioria das reações celulares são muito lentas na ausência de enzimas. Para as enzimas, variam entre 10^8 e 10^{12}, contudo podem ser ainda maiores. A taxa de aceleração para a adenosina desaminase – que catalisa a desaminação da adenosina em inosina – vale 10^{14}, enquanto para a ALP é de 10^{17}. Ambas as enzimas, adenosina desaminase e ALP, apresentam valores modestos de k_{cat} ($10^2 s^{-1}$). Suas taxas de aceleração inusitadamente elevadas decorrem da estabilidade de seus substratos em pH 7,0 e à temperatura de 25°C. Por exemplo, a meia-vida para a desaminação da adenosina a 20°C e pH 7,0 é de cerca de 20.000 anos, enquanto $k_{não\text{-}cat}$ vale 10^{-12} s^{-1}. A constante de velocidade não enzimática para a hidrólise de ésteres de fosfato sob condições neutras e temperatura ambiente é estimada em 10^{-15} s^{-1}.

Inibição enzimática

A inibição de enzimas pode ser reversível ou irreversível. Na inibição irreversível, forma-se uma ligação covalente entre o inibidor e a enzima, de modo que a atividade enzimática não pode ser restaurada com a dissociação do inibidor. Alguns exemplos são a inibição da acetilcolinesterase e da pseudocolinesterase por agentes empregados como arma química, tais como sarin e tabun, que promovem a fosforilação irreversível do grupo OH na cadeia lateral do resíduo de serina do sítio ativo. O primeiro anestésico fluorado – fluoxeno ($CF_3CH_2OCH{=}CH_2$) – demonstrou ser extremamente tóxico para uso como anestésico geral, por promover a alquilação irreversível de um átomo de N do anel do heme existente na citocromo P450 mono-oxigenase, a enzima responsável por sua destoxificação. Essa alquilação leva à perda total da enzima.

A inibição reversível pode ser de dois tipos: competitiva e não competitiva.

- *Inibição competitiva*: ocorre quando o inibidor se liga ao sítio de ligação do substrato. A base molecular da ligação dos inibidores competitivos ao sítio ativo reside na semelhança estrutural existente entre o substrato e o inibidor. Em consequência, a enzima é "enganada" e acaba reconhecendo e se ligando ao inibidor. Alguns exemplos de inibição competitiva são a inibição da di-hidrofolato redutase pelo metotrexato (um agente quimioterápico) e a inibição da desidrogenase succínica (uma enzima do ciclo de Krebs) pelo malonato.
- *Inibição não competitiva*: ocorre quando o inibidor se liga a um sítio enzimático distinto do sítio de ligação ao substrato. Tanto o inibidor quanto o substrato podem se ligar à enzima ao mesmo tempo. A ligação do inibidor a esse segundo sítio pode inibir completamente a atividade enzimática ou pode causar sua redução parcial. Portanto, a inibição não competitiva pode ser *total* ou *parcial*. Os inibidores não competitivos se ligam tanto à enzima livre quanto ao complexo ES. Caso a ligação do inibidor e do substrato à enzima sejam eventos independentes, tem lugar uma *inibição não competitiva simples*. No entanto, se a ligação de um substrato à enzima alterar a afinidade enzimática pelo inibidor, tem-se uma condição denominada *inibição competitiva mista*. Essas duas situações podem ser distinguidas por meio da análise cinética. A Figura 20.6 mostra alguns exemplos de inibição competitiva e não competitiva. A ligação do inibidor não competitivo altera a conformação do sítio de ligação do substrato; e, embora a ligação ao substrato ainda seja possível, sua afinidade e/ou a atividade catalítica da enzima são reduzidas.
- Uma outra forma de *inibição não competitiva* é observada quando o inibidor se liga apenas ao complexo ES, mas não à enzima livre. Não há formação de complexos EI (enzima-inibidor). É a ligação do substrato à enzima que provoca uma alteração conformacional e cria o sítio de ligação ao inibidor.

O mecanismo cinético da inibição competitiva é ilustrado na Figura 20.7. Considera-se que o inibidor rapidamente entra em equilíbrio com a E livre e os complexos EI. Em termos de cinética, o inibidor reduz a concentração de E livre disponível para combinação ao S. Segundo a equação da conservação da enzima:

$$[E_T] = [E] + [EI] + [ES] \quad (20.26)$$

[EI] é definido em termos de constante de equilíbrio (K_I) na dissociação do inibidor a partir do complexo EI, e:

$$[EI] = [E][I]/K_I \quad (20.27)$$

Uma vez que:

$$[E] = K_M[ES]/[S] \quad (20.28)$$

$$[EI] = \frac{[E][I]}{K_I} = \frac{K_M[ES][I]}{[S]K_I} \quad (20.29)$$

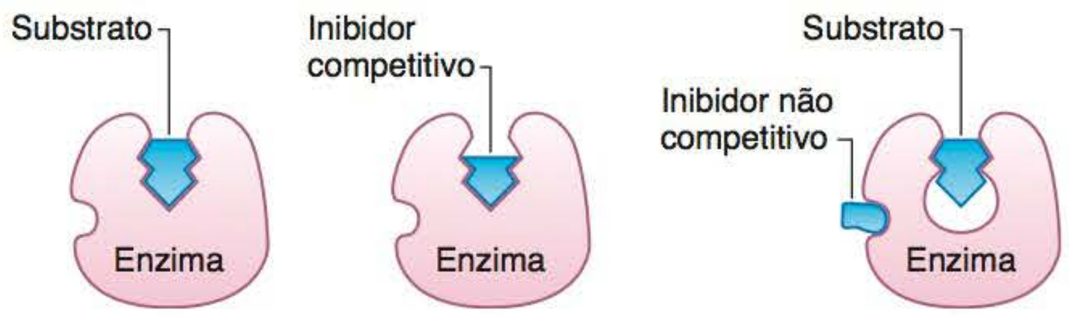


Figura 20.6 A diferença estrutural entre os inibidores *competitivo* e *não competitivo*. Durante a inibição competitiva, o inibidor ocupa o sítio de ligação ao substrato e impede a ligação do próprio substrato. O inibidor não competitivo, por sua vez, se liga a um sítio distinto do sítio ativo. A ligação do inibidor a esse sítio altera o K_M e/ou a $V_{máx}$. As alterações dos parâmetros cinéticos ocorrem como resultado de alterações conformacionais no sítio ativo, acarretadas pela ligação do inibidor não competitivo.

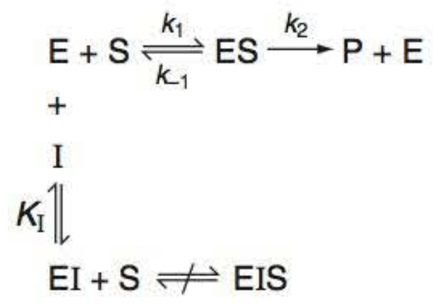


Figura 20.7 O modelo cinético da inibição competitiva. O inibidor (I) se liga à enzima de modo reversível e rapidamente entra em equilíbrio com ela. O complexo binário ou complexo enzima-inibidor (EI) é inativo. O efeito de uma inibição competitiva consiste em reduzir a quantidade de enzima livre disponível para ligação ao substrato.

E, então:

$$[E_T] = [ES]\left[\frac{K_M}{[S]}\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + 1\right] \quad (20.30)$$

O rearranjo da equação para resolver [ES] resulta em:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (20.31)$$

Empregando a expressão para velocidade inicial, $v_o = k_2[ES]$:

$$v_O = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (20.32)$$

A inversão da equação 20.32 resulta na transformação linear de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{vo} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\left(\frac{K_M}{V_{m\,áx}}\right)\frac{1}{[S]} = \frac{1}{V_{máx}} \quad (20.33)$$

Observe que um gráfico de $(1/v_o)$ *versus* $(1/[S])$ com diferentes concentrações de inibidor apresenta traços lineares em que a inclinação – e não o ponto de interceptação – é alterada na presença de um inibidor competitivo. $V_{máx}$ permanece inalterado, e somente K_M é modificado pelo coeficiente $(1 + [I]/K_I)$. O gráfico de Lineweaver-Burk na presença de um inibidor competitivo é ilustrado na Figura 20.8. Os valores para $(1 + [I]/K_I)K_M$ podem ser obtidos dividindo-se as inclinações pelo ponto de interceptação em que $(1/[S])$ é igual a zero. O K_I pode, então, ser estimado a partir do K_M e de [I].

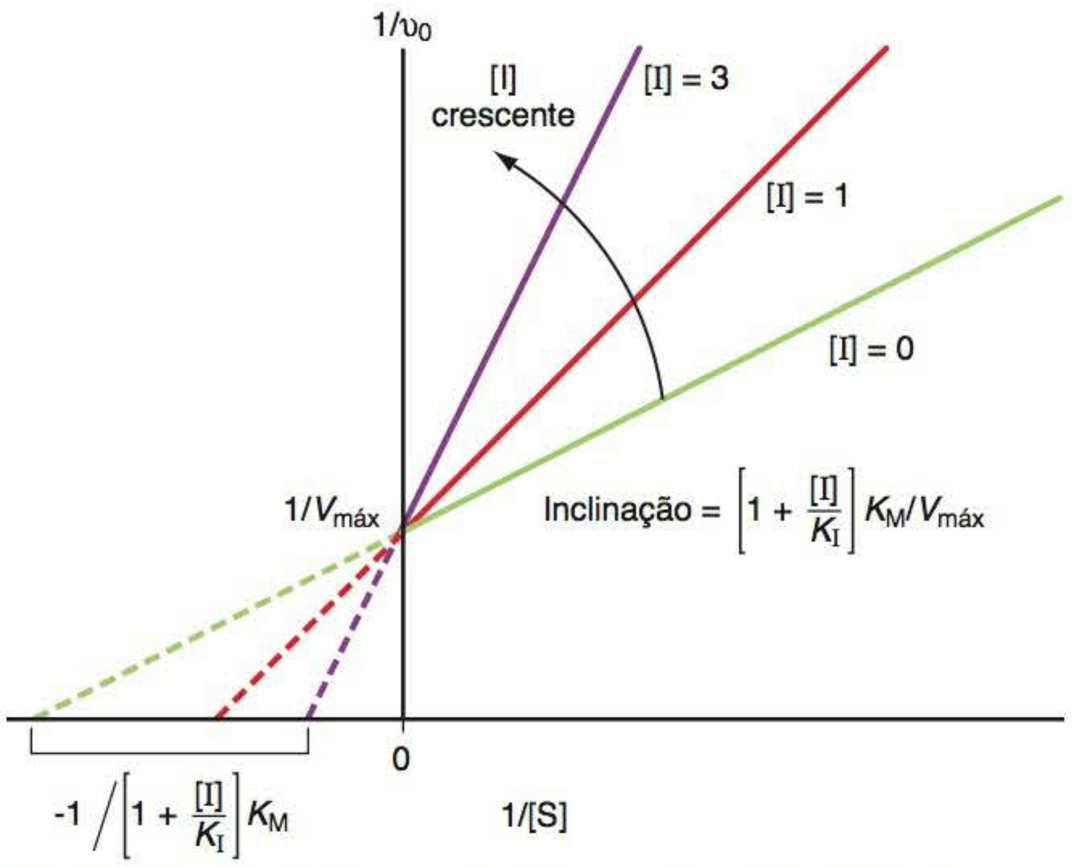


Figura 20.8 O gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima do tipo Michaelis-Menten, na presença de um inibidor competitivo. Cada reta é gerada a partir de um gráfico de $1/v_o$ para diferentes valores iniciais de 1/[S], diante de [I] constante. As retas de diferentes inclinações correspondem a diferentes valores de [I], incluindo [I] = 0. Todas as retas fazem intersecção no eixo $1/v_o$, refletindo a ausência de inibição quando a concentração de substrato tende ao infinito.

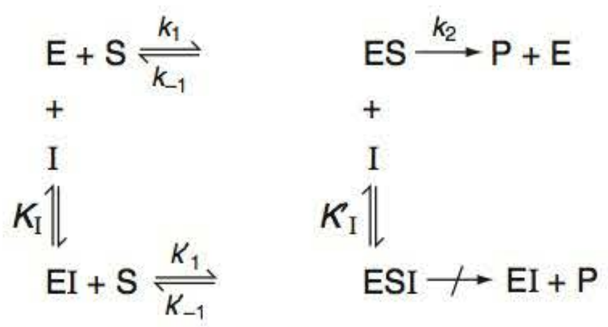


Figura 20.9 O modelo cinético para inibição não competitiva. O inibidor (I) pode se ligar tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato (ES). O inibidor é capaz de formar complexos binários (EI) ou ternários (ESI). Caso o substrato ligado não altere a constante de dissociação do inibidor em relação à enzima, observa-se uma inibição não competitiva *simples*. Por outro lado, caso o substrato ligado altere a afinidade da ligação do inibidor, observa-se uma inibição não competitiva *mista*.

O esquema cinético de uma *inibição não competitiva* pode ser observado na Figura 20.9. Se $K_I = K_I'$, a inibição é denominada *não competitiva simples*. Caso $K_I \neq K_I'$, a inibição é classificada como não competitiva mista. Considerando o equilíbrio e assumindo que $K_s = K_s'$, a lei de velocidade de Michaelis-Menten para inibição não competitiva é:

$$v_O = \frac{V_{máx}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)K_M + \left(1 + \frac{[I]}{K_1}\right)[S]} \quad (20.34)$$

A equação de Lineweaver-Burk para inibição não competitiva simples é:

$$\frac{1}{v_O} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\left(\frac{K_M}{V_{m\,áx}}\right)\frac{1}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\left(\frac{1}{V_{máx}}\right) \quad (20.35)$$

Na presença do inibidor, aumentam os valores tanto da inclinação quanto do ponto de interceptação. Se o substrato não modificar a afinidade da enzima pelo inibidor – e vice-versa – então, para uma dada concentração de inibidor, o incremento das inclinações e dos pontos de interceptação se dará pela mesma quantidade relativa. Quando $K_I = K_I'$, as retas do gráfico de Lineweaver-Burk farão intersecção no eixo em $(1/[S])$, em um ponto correspondente a $(-1/K_M)$, conforme mostra o gráfico de dupla reciprocidade da Figura 20.10. Em qualquer valor de [I] (incluindo ([I] = 0), a divisão da inclinação pelo ponto de interceptação resulta em K_M, indicando que, se $K_I = K_I'$ e $K_S = K_S'$, o inibidor só modifica a etapa k_2. Se $K_I \neq K_I'$, então se instala uma *inibição não competitiva mista*, e as retas no gráfico de inibição não competitiva de Lineweaver-Burk apresentarão uma intersecção no segundo ($K_I < K_I'$, K_M diminui) ou no terceiro ($K_I > K_I'$, K_M aumenta) quadrante, e não no eixo da abcissa. $V_{máx}$ é menor, e o valor de $(1/[S])$ quando $(1/v_o) = 0$ é:

$$-\left(1 + \frac{[I]}{K'_I}\right) \Big/ \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)K_M \quad (20.36)$$

Para a inibição não competitiva, em que o inibidor se liga apenas ao complexo ES, o modelo de cinética toma a forma ilustrada na Figura 20.11. K_I' é a constante de dissociação do complexo ESI (enzima-substrato-inibidor) e é igual a [ES][I]/[ESI]. A equação de Michaelis-Menten para esse tipo de competição é:

$$v_O = \frac{V_{máx}[S]}{K_M + \left(1 + \frac{[I]}{K'_1}\right)[S]} \quad (20.37)$$

Para valores de [S] elevados, em que $[S] >> K_M$, v_o se aproxima de $V_{máx}/(1 + [I]/K_I')$. Para valores de [S] baixos, v_o é igual a $(V_{máx}/K_M)$

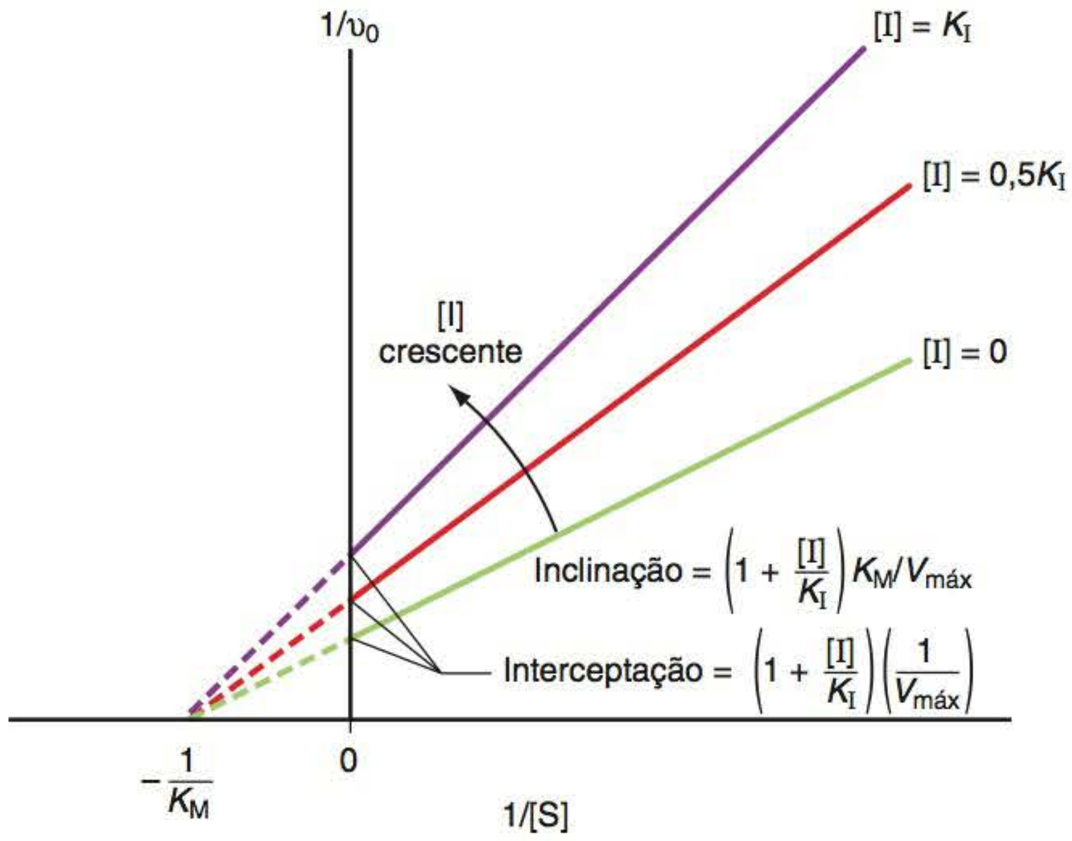


Figura 20.10 O gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima do tipo Michaelis-Menten, na presença de um inibidor não competitivo. Cada reta é gerada a partir de um gráfico de $1/v_o$ para diferentes valores iniciais de 1/[S], diante de [I] constante. As retas de diferentes inclinações correspondem a diferentes valores de [I], incluindo [I] = 0. Para uma inibição não competitiva simples, todas as retas fazem intersecção no eixo 1/[S], em um ponto que corresponde a $-1/K_M$. Para a inibição não competitiva mista, todas as retas fazem intersecção no segundo quadrante.

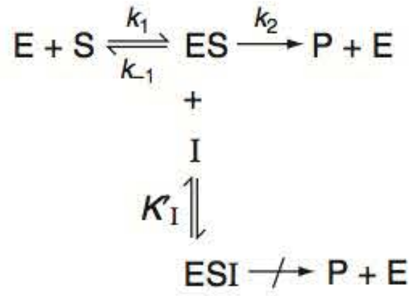


Figura 20.11 O modelo cinético para um terceiro tipo de inibição não competitiva. O inibidor (I) pode se ligar ao complexo enzima-substrato (ES), mas não se liga à enzima livre. O inibidor é capaz de formar apenas complexos ternários (ESI), e nenhum complexo binário (EI) se forma. O sítio de ligação ao inibidor somente passa a existir depois que o complexo ES é formado. O substrato não pode se dissociar do complexo ESI, e o efeito desse inibidor não competitivo é o bloqueio do acesso ou do egresso a partir do sítio ativo.

[S] e o inibidor não competitivo é ineficaz. A inversão e o isolamento dos termos resulta na seguinte transformação da equação linear de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v_O} = \left(\frac{K_M}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \left(1+\frac{[I]}{K'_I}\right)\left(\frac{1}{V_{máx}}\right) \qquad (20.38)$$

Um gráfico de $(1/v_o)$ *versus* $(1/[S])$ resulta em um grupo de retas paralelas que apresentam a mesma inclinação e pontos de interceptação no eixo $(1/v_o)$ iguais a $(1 + [I]/K_I')/V_{máx}$. O gráfico de Lineweaver-Burk para esse tipo de inibição não competitiva simples é mostrado na Figura 20.12. Para avaliar K_I', podem ser utilizados novos gráficos de $(1 + [I]/K_I')/V_{máx}$ *versus* valores de interceptação em que $(1/[S]) = 0$. Alternativamente, também é possível obter um valor de K_I' pela utilização de novos gráficos de $-(1 + [I]/K_I')/K_M$ *versus* valores de $(1/[S])$ na abcissa em que $(1/v_o) = 0$.

A Tabela 20.5 resume as alterações nos valores aparentes de $V_{máx}$ e K_M derivados da interceptação e da inclinação do gráfico Lineweaver-Burk duplo-recíproco para inibições competitiva, não competitiva simples e não competitiva.

Análise enzimática

A *concentração* de enzima em líquidos biológicos, como o plasma, pode ser determinada tanto pela análise da atividade enzimática quanto pela aplicação de uma técnica imunológica. A atividade enzimática é testada estimando-se a velocidade inicial sob condições definidas e calculando-se a atividade específica, que consiste na medida da atividade por unidade de volume de líquido biológico (ou por unidade de peso de alguma proteína sanguínea, como a hemoglobina). Conforme já observado, a condição em que a velocidade é diretamente proporcional à concentração da enzima ocorre quando $[S] >> K_M$. Assim, muitos ensaios para enzimas são realizados em tais circunstâncias. Em alguns casos, é difícil alcançar $v_o = V_{máx}$, uma vez que v_o com $[S] = 10K_M$ é apenas $0{,}91V_{máx}$. A solubilidade e/ou o custo do substrato são dois motivos pelos quais não se deve realizar um ensaio diante de concentrações saturantes de substrato.

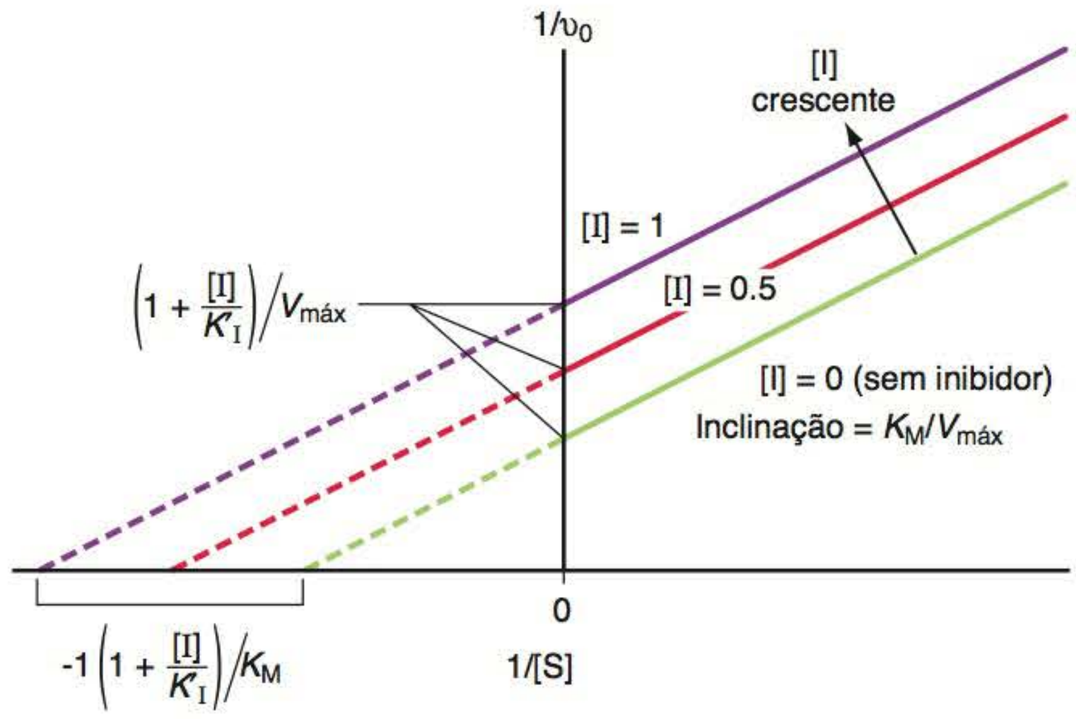


Figura 20.12 O gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima do tipo Michaelis-Menten, na presença de um inibidor competitivo (terceiro tipo de inibição não competitiva). Cada reta é gerada a partir de um gráfico de $1/v_o$ para diferentes valores iniciais de 1/[S], diante de [I] constante. As retas de inclinações idênticas e diferentes valores de $1/v_o$ quando 1/[S] = 0 correspondem a diferentes valores de [I], incluindo [I] = 0. Todas as retas apresentam inclinações idênticas, iguais a $K_M/V_{máx}$. O K_M aparente e o $V_{máx}$ aparente são alterados pela mesma quantidade relativa, na presença de um inibidor não competitivo.

Em certos estados de deficiência, as condições do ensaio *in vitro* podem não refletir a situação que, *in vivo*, dá origem ao estado deficiente. Quando há um defeito genético que não altera os níveis normais da proteína enzimática e o valor de k_{cat} permanece inalterado, e partindo-se do princípio de que o ensaio deve ser conduzido fora da concentração saturante de substrato, é possível que um tipo de mutação K_M^- passe despercebido. Essa possibilidade advém do fato de que a enzima, inativa diante de baixos níveis de substrato, exibe atividade máxima ou quase máxima diante das elevadas [S] utilizadas no ensaio. Por exemplo, uma variante eritrocitária da hipoxantina-guanina-fosforribosil transferase (HGPRT) mostrou-se inativa em ensaios realizados com baixa [S], porém sua atividade máxima pode ser restaurada pelo aumento da concentração de substrato. Interpretou-se que o defeito foi decorrente da existência de uma mutação no sítio de ligação ao substrato da HGPRT, com o consequente aumento de K_M. A fim de evitar esse resultado falso-negativo, é preciso incluir na avaliação clínica a determinação do K_M para a enzima mutante.

Em alguns casos, um defeito enzimático pode não ser detectado se a avaliação clínica for realizada no momento errado. Para indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) portadores da variante comum A– (G6PDH A–), a administração do agente antimalárico primaquina causa anemia hemolítica transiente. Os pacientes conseguem se recuperar completamente dessa anemia mesmo que o tratamento com primaquina continue. Diante da variante A-, os parâmetros cinéticos permanecem normais, porém a estabilidade térmica é reduzida. O episódio inicial elimina eritrócitos

Tabela 20.5 Resumo dos valores de inclinação, ponto de interceptação, K_m aparente e V_m[1] aparente para vários tipos de inibição reversível

Tipo	Inclinação	Ponto de interceptação	K_m[2] aparente	V_m[3] aparente
Não inibida	K_M/V_m	$1/V_m$	K_M	V_m
Competitiva	$(K_M/V_m)(1 + I/K_i)$	$1/V_m$	$K_M(1 + I/K_i)$	V_m
Não competitiva	K_M/V_m	$(1/V_m)(1 + I/K_i)$	$K_M(1 + I/K_i)$	$V_m/(1 + I/K_i)$
Não competitiva simples	$(K_M/V_m)(1 + I/K_i)$	$(1/V_m)(1 + I/K_i)$	K_M	$V_m/(1 + I/K_i)$
Não competitiva mista[4]	$(K_M/V_m)(1 + I/K_i)$	$(1/V_m)(1 + I/K_{i'})$	$K_M(1 + I/K_i)/(1 + I/K_{i'})$	$V_m/(1 + I/K_{i'})$

[1] V_m é $V_{máx}$ no texto.

[2] Obtido dividindo-se a inclinação pelo ponto de interceptação do gráfico duplo-recíproco.

[3] Obtido invertendo-se o ponto de interceptação do gráfico duplo-recíproco.

[4] Esta é uma forma mais geral de inibição não competitiva, em que a constante de dissociação para o inibidor ligado à enzima livre (K_i) não é igual à constante para o inibidor ligado ao complexo ES ($K_{i'}$).

velhos, nos quais a atividade de G6PDH está diminuída. As células mais velhas são repostas por células novas que possuem maior concentração da enzima. A quantidade de moléculas de G6PDH existente nos eritrócitos varia em razão da idade da célula e, nas células do tipo A-, a taxa de perda de moléculas de enzima excede significativamente o observado nos eritrócitos normais. O resultado do ensaio para determinação da atividade de G6PDH, depois que o paciente se recupera da anemia, será substancialmente maior do que aquele obtido quando o ensaio é realizado antes ou durante o episódio hemolítico. Essa diferença ocorre porque a hemólise destrói de forma seletiva as células mais velhas que contêm menor concentração de enzima. A recuperação resulta na reposição das células perdidas por células novas com maior concentração de moléculas G6PDH A–. Durante e após essa recuperação, a população de células mais novas é capaz de enfrentar o tratamento com primaquina em razão da presença de níveis mais elevados de atividade enzimática.

As determinações iniciais da velocidade estão sujeitas a erros oriundos de outras fontes. Em líquidos biológicos, os inibidores enzimáticos podem permitir que a quantidade de enzimas existente seja subestimada. As proteases plasmáticas podem atacar as enzimas durante a estimativa da velocidade. A estabilidade da enzima avaliada deve ser determinada, assim como as condições de armazenamento da amostra. Em alguns casos, é preciso utilizar plasma para determinar a atividade de uma enzima em amostras de sangue, uma vez que agentes anticoagulantes polianiônicos, como citrato, heparina e EDTA, inativam as enzimas que contêm metais. Por exemplo, o EDTA inativa a ALP, que contém zinco.

O substrato pode estar sujeito ao ataque de outras enzimas normalmente presentes em líquidos biológicos. A atividade de creatina quinase (também conhecida como creatina fosfoquinase) muitas vezes é estimada por meio de ensaios acoplados, em que o produto de uma reação reversa (CrP + ADP $\rightleftharpoons$ Cr + ATP), o ATP (adenosina trifosfato), é utilizado para fosforilar a glicose na reação que envolve a hexoquinase. A resultante glicose-6-fosfato (G6P) é oxidada em uma terceira etapa por ação da G6PDH, que transfere equivalentes redutores ao $NADP^+$ e forma NADPH. A atividade de creatina quinase é proporcional ao aumento da absorbância a 340 nm, associado à formação de NADPH. Entretanto, se a amostra contiver adenilato quinase – o substrato da creatina quinase –, também haverá consumo de ADP nessa reação indesejada. Não há como corrigir esse problema por meio da utilização de concentrações saturantes de ADP, visto que o produto da reação que envolve a adenilato quinase é também o ATP. O ATP produzido na reação com a creatina quinase tem de determinar diretamente a quantidade de G6P produzida, a fim de refletir corretamente o nível dessa enzima.

O dano à enzima causado por proteólise, bem como a decomposição do substrato, podem ser corrigidos pelo uso de *blanks* adequados e por estudos envolvendo pré-incubação. Os níveis de enzima no plasma ou em outros líquidos biológicos podem ser estimados sob condições em que $[S] << K_M$, por meio do acompanhamento do desaparecimento de primeira ordem do substrato. Nessas circunstâncias, a constante de velocidade de primeira ordem é diretamente proporcional à concentração de enzimas da mistura analisada. Como a determinação da constante de velocidade de primeira ordem requer a estimativa da concentração de substrato remanescente em vários momentos, pelo menos em duas meias-vidas, a enzima deve permanecer razoavelmente estável. Os ensaios devem ser realizados após o aparecimento do produto, uma vez que $-d[S]/dt = d[P]/dt$. Se houver um método que permita acompanhar a formação de produto (como já discutido), este será o método de escolha, uma vez que o monitoramento do desaparecimento do substrato requer a quantificação de pequenas diferenças entre dois valores altos de [S]. As estimativas da velocidade inicial eliminam a possibilidade de inibição do produto, pois $[P_o] = 0$ em t_o, além de remeterem todas as determinações de velocidade à mesma concentração de substrato $[S_o]$. Com frequência, as velocidades iniciais são calculadas a partir de estimativas de $\Delta P/\Delta t$, em que $\Delta P = P_t - P_o$, em que P_t é medido no momento t_t e P_o, no momento t_o. Determinações de pontos isolados desse tipo consideram a linearidade do consumo de substrato ou aparecimento de produto até o momento t_t. A linearidade também dependerá da sensibilidade do método, a qual determinará a magnitude de $-\Delta S$ ou ΔP necessária a uma estimativa acurada e reproduzível da alteração. Para as reações enzimaticamente catalisadas em que o produto se liga à enzima com maior afinidade do que o substrato, $\Delta P/\Delta t$ ou $-\Delta S/\Delta t$ serão curvilineares, e as estimativas da velocidade inicial serão calculadas de modo mais adequado a partir de tangentes traçadas nas curvas de tempo do substrato ou do produto em $t = 0$. Essas tangentes são mais bem determinadas a partir de traços contínuos de desaparecimento de substrato ou formação de produto.

Conforme será discutido em mais detalhes adiante, a concentração de uma enzima em um líquido biológico pode ser determinada pelo uso de anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados contra essa enzima. Em imunoensaios, a correspondência entre a determinação da atividade enzimática e a concentração de proteína (enzima) será pertinente enquanto o antígeno da enzima estiver totalmente ativo. No entanto, nem sempre é isso que ocorre quando estão envolvidas deficiências hereditárias associadas a mutações pontuais. Em tais casos, as estimativas da concentração de enzimas baseadas em imunoensaios podem exceder aquelas que se baseiam na determinação da atividade enzimática. Se a base da doença for genética, é melhor estimar a atividade da enzima a partir de medidas cinéticas e comparar os resultados aos valores normais. Algumas mutações desestabilizam a estrutura das proteínas, causando a rápida proteólise da enzima no nível intracelular. Nessa situação, os resultados derivados de métodos imunológicos e as determinações de atividade enzimática podem ser concordantes. A presença de inibidores no líquido biológico pode levar à subestimação da quantidade de enzima presente no material se for considerada a atividade, mas não quando são realizadas determinações imunológicas. Geralmente, os inibidores reversíveis não interferem nas estimativas imunológicas da concentração de enzimas.

Outra fonte de erro envolve a idade da amostra. Enzimas cuja atividade depende dos grupos sulfidrila presentes no sítio ativo podem ser lentamente inativadas por reações de oxidação e/ou troca de dissulfeto. Muitas vezes, tais processos são irreversíveis e conduzem à subestimação da concentração de enzimas determinada por medidas da atividade enzimática. Do mesmo modo, imunoensaios são o método de escolha quando se deseja conhecer a distribuição das isozimas na amostra, uma vez que emprega anticorpos específicos que identificam e quantificam cada uma das variantes existentes no material.

Ensaios enzimáticos

Conforme discutido na seção anterior, sobre as reações catalisadas por enzimas, uma vez determinado o $V_{máx}$, é possível calcular diretamente a concentração de enzimas. Sendo $V_{máx} = k_2[E_r]$ e se k_2 for conhecida (como a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk da enzima), então $[E_T] = V_{máx}/k_2$. Todavia, como muitas vezes mais de uma isozima está presente e, em geral, cada uma apresenta valores diferentes de k_2, descreve-se o $V_{máx}$ que corresponde à atividade enzimática. É importante entender que o $V_{máx}$ contém o termo k_2, cujos valores dependem do substrato específico utilizado na análise da enzima. Portanto, o substrato utilizado deve ser especificado.

A atividade enzimática é descrita em termos de unidades de enzima, e são empregados dois padrões. Até a década de 1960, a transmissão dos dados relativos à velocidade da reação de uma enzima baseava-se tipicamente no método utilizado para determiná-los. Em 1964, um termo comum – a UI (Unidade Internacional) – foi desenvolvido para padronizar a expressão da velocidade enzimática. A International Commission on Enzymes, estabelecida pela International Union of Biochemistry, definiu UI como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de produto em 1 minuto. Essa definição é aplicável somente mediante condições específicas de pH, temperatura e força iônica – todos os fatores que influenciam a atividade enzimática. Com o desenvolvimento do Système International d'Unites (SI, Sistema Internacional de Unidades), e com o uso de moles e segundos como unidades básicas, uma segunda definição para unidade de atividade enzimática foi criada: o catal (kat). Assim, 1 kat foi definido como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mol de substrato em produto em 1 segundo, nas condições em que o ensaio é realizado. Um UI é igual a 16,7 nkat, e 1 kat é igual a 6×10^7 UI.

Uma importante limitação de ambos os termos está relacionada às condições do ensaio que, muitas vezes, não são padronizadas entre os laboratórios. Portanto, embora os termos "UI" e "kat" sejam empregados, os resultados obtidos somente são comparáveis quando

são empregadas as mesmas condições de ensaio. Dessa forma, os intervalos de referência para atividade enzimática podem variar de um laboratório a outro (Langdon, 1994). Por exemplo, em um dado momento, constatou-se que os limites superiores da atividade de lipase normal eram 300 U/L e 24 U/L em dois hospitais situados na mesma área geográfica. Similarmente, o limite superior da atividade de LDH em um dado hospital era igual a 618 U/L, enquanto em um segundo hospital, no mesmo instante, esse limite era 172 U/L. Além disso, à medida que os procedimentos sofrem modificações em um mesmo laboratório, os níveis normais podem ser alterados em duas ou três vezes os seus valores no decorrer de alguns anos. Os médicos solicitantes podem repassar valores enzimáticos diferentes daqueles obtidos pelo médico recebedor caso as estimativas tenham sido feitas em duas localidades. A variabilidade dentro do intervalo de valores normais para enzimas selecionadas, estimada em diferentes localidades, pode ser eliminada adotando-se um procedimento universal, em que 100 é estabelecido como o limite superior de valores normais e todos os demais valores são expressos em forma de porcentuais ou proporções. Resultados em que o nível de uma determinada enzima está 10 vezes acima do normal constituem informações úteis ao médico. Se o resultado for 10*x* U/L, então o próprio médico deve buscar o valor de *x* e calcular a velocidade. Atualmente, muitos laboratórios transmitem os valores de amostras em U/L, bem como seu intervalo de referência normal.

A determinação da atividade enzimática em amostras biológicas depende de inúmeras variáveis, incluindo o método utilizado no ensaio, além do preparo, idade e condições de armazenamento da amostra. Algumas variáveis extras que também merecem ser consideradas na determinação da atividade enzimática são a temperatura, pH, concentração de substrato, concentração de cofatores do ensaio, uso de outras reações enzimáticas como indicadores e se foi empregada reação progressiva ou retrógrada para quantificar a enzima. Tais variáveis podem conduzir ao aparecimento de diferenças significativas nas determinações de atividade enzimática por métodos distintos. Por exemplo, a LDH medida por meio de uma reação progressiva apresenta cerca de um terço da atividade apresentada pela LDH medida com a reação retrógrada, enquanto a lipase determinada na presença de colipase apresenta uma atividade que equivale a 5 a 10 vezes a atividade de lipase determinada sem o cofator. Desde que os ensaios sejam realizados com consistência interna, de forma altamente reproduzível, os resultados obtidos são comparáveis entre laboratórios distintos, caso as atividades relativas sejam informadas.

Determinação da atividade enzimática

Na determinação da atividade enzimática, é possível quantificar tanto a taxa de desaparecimento de substrato quanto a taxa de formação de produto. Em geral, é mais fácil quantificar pequenos aumentos da quantidade de produto do que medir pequenas diminuições em uma grande quantidade de substrato. Entretanto, em muitos casos, nem o produto nem o substrato de uma reação química pode ser quantificado adequadamente. Em tais circunstâncias, a reação enzimática pode ser "acoplada" a uma outra reação que emprega um produto da reação catalisada pela enzima, com o intuito de gerar uma substância indicadora. Um exemplo de reação enzimática tipicamente acoplada é o método de Olivier-Rosalki, utilizado na determinação da atividade de CK. Esse método é ilustrado pela equação 20.39, disposta a seguir. Emprega-se a reação retrógrada de CK, sendo produzido ATP, que é consumido em uma segunda reação para produzir G6P. Uma terceira reação produz a forma reduzida de NAD – o NADH – que atua como indicador da reação.

Creatina fosfato + ADP → creatina + ATP (reação catalisada por CK) (20.39)
Glicose + ATP → G6P + ADP (reação catalisada por hexoquinase)
G6P + NAD → 6-fosfogliconato + NADH (reação catalisada pela G6PDH)

Em reações acopladas, é importante que a etapa limitante da velocidade da reação seja a quantidade de ATP gerada por ação da CK. Nas quantificações de CK que utilizam essa reação, um problema em potencial é a presença de outras enzimas capazes de produzir ATP. A adenilato quinase, uma enzima encontrada nos eritrócitos e no fígado, converte ADP em ATP (equação 20.40). Assim, amostras que contenham uma elevada concentração dessa enzima apresentarão valores falsamente elevados de atividade de CK.

2ADP → ATP + AMP (reação catalisada pela adenilato quinase) (20.40)

Nas análises de atividade enzimática, alguns métodos empregam medidas de "ponto terminal", para determinar a concentração de substrato ou produto em um dado momento, após a adição da amostra. Os métodos que consideram o ponto terminal são tipicamente empregados em métodos simples, como aqueles utilizados em medidores de cabeceira dos níveis de glicose ou em testes com vareta medidora de nível, utilizados para quantificação da glicose ou da esterase leucocitária na urina. Esses métodos podem fornecer resultados erroneamente baixos nos casos em que a atividade enzimática é muito alta. A maioria dos ensaios enzimáticos emprega métodos "cinéticos" de quantificação (como já discutido), nos quais é determinada a taxa de alteração da concentração de substrato ou produto. (Para fins de simplificação, no decorrer desta seção, serão descritos apenas sistemas de quantificação que detectam o aparecimento do produto. Entretanto, os mesmos princípios se aplicam às situações em que o desaparecimento de substrato é monitorado.) Os métodos cinéticos são mais acurados e facilitam a detecção de mudanças das condições de reação, bem como de amostras que requeiram diluição. Em uma reação cinética, a velocidade da reação pode ser expressa como $\Delta P/\Delta t$, que representa a alteração da quantidade de produto na unidade de tempo. Uma vez que UI e catal representam a quantidade de enzima que produz uma quantidade específica de produto em um determinado intervalo de tempo, essa abordagem permite relatar diretamente a atividade enzimática tanto em UI quanto em catal, conforme a conveniência.

A maioria dos ensaios para enzimas usa a espectrofotometria para medir a quantidade de produto gerada. Entretanto, inúmeros métodos de detecção podem ser utilizados de acordo com a necessidade, dependendo do produto de interesse. Por exemplo, a lipase atua em emulsões lipídicas. Como essas emulsões costumam ser turvas, a determinação da taxa de depuração da turbidez pode ser empregada para determinar a atividade da lipase. A glicose oxidase, amplamente utilizada na quantificação da concentração de glicose, utiliza oxigênio ou um aceptor de oxigênio alternativo. A determinação da alteração de potencial decorrente da alteração da carga do aceptor também pode ser empregada para determinar a velocidade da reação. A urease, bastante utilizada na quantificação da concentração de ureia, quebra essa substância em íons bicarbonato e amônio. A alteração na condutância da amostra em decorrência do aparecimento dos íons pode ser utilizada para determinar a velocidade da reação. (Para fins de simplificação da discussão seguinte, somente o termo "absorbância" será empregado na abordagem da determinação da atividade enzimática, ao mesmo tempo em que se reconhece a aplicação da mesma relação a outros métodos de quantificação.) Tendo em vista que a concentração de um produto pode ser quantificada por meio da medida de sua absorbância, então $\Delta P/\Delta t \propto \Delta A/\Delta t$. A fórmula exata para determinação da atividade enzimática a partir da determinação de $\Delta P/\Delta t$ é dada pela equação 20.41. Nessa equação, ε é o coeficiente de absortividade molar do composto e b é o comprimento da trajetória da luz que atravessa a amostra (ver no Cap. 4 uma discussão detalhada sobre espectroscopia de absorção). Caso a absortividade molar do produto seja conhecida, então a equação pode ser utilizada diretamente para determinar a atividade enzimática, uma vez que todos os demais fatores envolvidos são especificados como parte das condições de reação. Por exemplo, um indicador comumente empregado na enzimologia clinica é o NADH, que apresenta intensa absorção máxima a 340 nm, enquanto o NAD^+ não absorve luz nesse comprimento de onda. O coeficiente de absortividade molar para o NADH é $6{,}22 \times 10^3$ L mol^{-1} cm^{-1}. Se a absortividade molar do produto não for conhecida, poderá ser determinada pela representação gráfica de $\Delta A/\Delta t$ sobre o eixo y, com a atividade conhecida dos calibradores enzimáticos sobre o eixo x.

Atividade da enzima = $\Delta A/\Delta t \times 1/e \times 1/b \times$ (volume total/volume da amostra) (20.41)

Como discutido anteriormente, para determinar a atividade enzimática de uma amostra, é necessário projetar um sistema quantitativo

em que a reação ocorra a uma cinética de ordem zero. A princípio, discutiu-se que diante uma concentração de substrato >> K_M, a reação é de ordem zero com relação ao substrato, e a velocidade da reação é igual a $V_{máx}$. Em tais condições, a velocidade da reação é diretamente proporcional à quantidade total de enzima presente na amostra. Com um sistema de ensaio cinético para enzimas, a velocidade da reação é determinada medindo-se a alteração da concentração de produto por unidade de tempo, conforme ilustra a Figura 20.13. A inclinação da reta ($\Delta A/\Delta t$) está diretamente relacionada à atividade da enzima encontrada nas regiões lineares do gráfico. Em uma reação enzimática, observa-se tipicamente a ocorrência de uma fase de retardo após a mistura dos reagentes à amostra, no momento em que acontecem as reações preliminares e a mistura da amostra. A absorbância inicial da amostra baseia-se na absorbância devida aos reagentes e à amostra e, para fins de interpretação da atividade enzimática, considera-se que seja igual a "zero". Uma vez iniciada a reação, instala-se um período cuja representação gráfica é uma reta. Nesse momento, a reação é de ordem zero e é possível determinar a atividade enzimática. À medida que a reação prossegue, o substrato é utilizado e sua concentração diminui a níveis próximos ao K_M. Em um dado momento, a reação se torna de primeira ordem e passa a ser afetada tanto pela quantidade de substrato (que não é constante) quanto pela atividade enzimática. Nesse ponto, a velocidade da reação deixa de refletir apenas a quantidade de enzima existente na amostra. Com auxílio de instrumentos modernos e automatizados, a representação gráfica desses eventos torna-se desnecessária. Tais aparelhos realizam medidas simples de ($\Delta A/\Delta t$) em diversos momentos específicos, durante um período em que a cinética é tipicamente de ordem zero. Em seguida, verificam se a alteração de ($\Delta A/\Delta t$) permanece a mesma ao longo de todo o período analisado. Caso seja detectada uma diminuição de ($\Delta A/\Delta t$), o aparelho transmite um código de linearidade, apontando a necessidade de diluir a amostra.

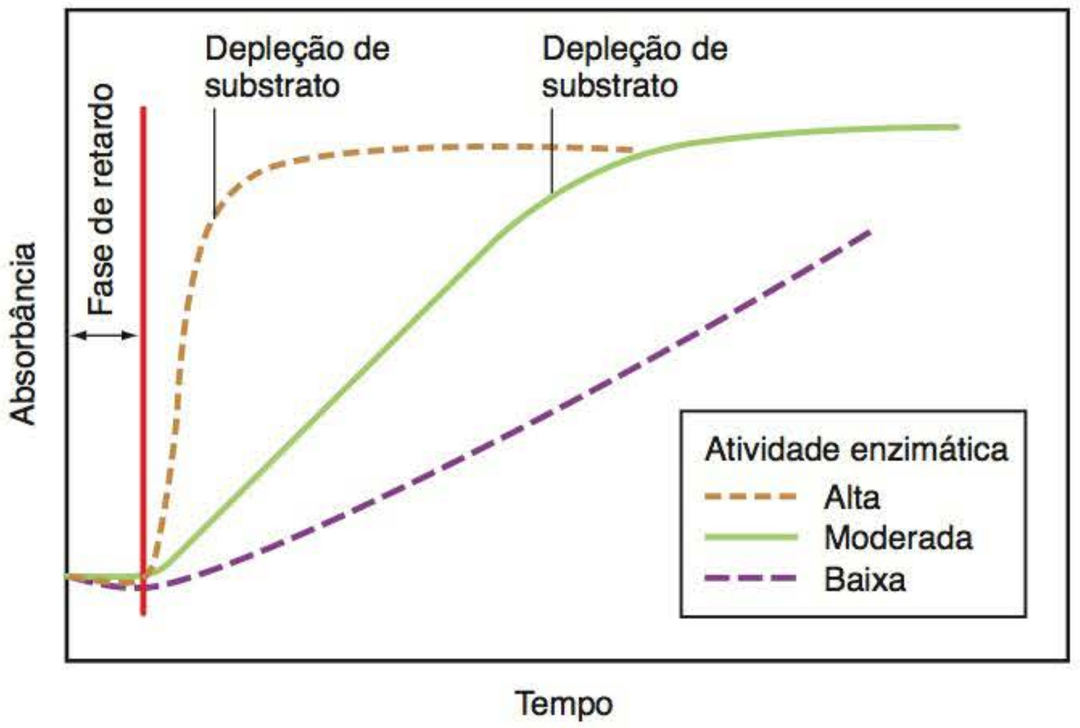


Figura 20.13 A atividade enzimática pode ser calculada a partir de um gráfico de absorbância *versus* tempo, no monitoramento de uma reação catalisada por enzima. Quando reagentes e soro são misturados, é possível que exista um período no qual ocorrem reações de mistura e quaisquer reações químicas preliminares. Esse período é denominado *período de retardo* (fase *lag*). Seguindo-se a esse período, a reação prossegue a uma cinética de ordem zero ($V_{máx}$). Nesse momento, a taxa de aparecimento do produto (conforme determinada a partir da inclinação da reta, $\Delta A/\Delta t$) é diretamente proporcional à atividade da enzima presente no meio. Conforme a reação continua e o substrato é depletado, a velocidade da reação acaba se tornando menor que $V_{máx}$ e o gráfico deixa de ser linear. A essa altura, a reação já não apresenta cinética de ordem zero com relação ao substrato. A velocidade de reação passa a ser dependente da quantidade de substrato (cuja concentração está em declínio) e da quantidade de enzima presente, de modo que se torna difícil calcular a quantidade de enzima ainda existente. (De Dufour DR: Enzyme kinetics. *In* Dufour DR [ed.]: Professional Practice in Clinical Chemistry: A Companion Text. Washington, DC, American Association for Clinical Chemistry, 1999, p. 8-1, com permissão.)

Outros fatores que afetam a atividade enzimática

Temperatura

As velocidades das reações catalisadas por enzimas são extremamente sensíveis a alterações da temperatura. Para garantir a acurácia, a temperatura da mistura da reação não deve apresentar um desvio maior que ± 0,1°C em relação à temperatura pré-estabelecida. De uma forma geral, cada aumento de 10°C na temperatura provoca uma elevação de aproximadamente duas vezes da atividade enzimática, embora ela varie de acordo com a enzima. O uso de temperaturas elevadas proporciona reações mais velozes e melhora a sensibilidade do ensaio – uma vantagem nos casos em que a atividade enzimática é baixa. Temperaturas mais baixas aumentam o limite linear do ensaio e requerem, assim, diluições menores. Nos instrumentos mais modernos, a escolha da temperatura é governada pelas capacidades do equipamento. Há um limite de aumento da temperatura que pode ser aplicado. A maioria da enzimas sofre desnaturação e se torna inativa com a elevação da temperatura. Por exemplo, a CK começa a sofrer quebras a 37°C, enquanto a amilase começa a sofrer desnaturação a 45°C. Algumas enzimas permanecem estáveis a temperaturas extremamente altas. A Taq polimerase, discutida no Capítulo 67, é utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) e permanece estável a 95°C.

pH

As enzimas apresentam atividade máxima em um dado pH ideal. Em geral, nas condições em que ocorre a reação, o pH é escolhido com base naquele em que a enzima apresenta a maior atividade. Essa escolha nem sempre é importante. Algumas enzimas apresentam atividade máxima diante de uma faixa de pH bastante ampla e, assim, pequenas alterações do pH não acarretam mudanças apreciáveis em sua atividade. Por exemplo, a ALP apresenta atividade máxima em pH de 9 a 10. Em certos casos, particularmente quando se trata de enzimas que possuem múltiplas isozimas, a escolha do pH representa um compromisso, uma vez que as diversas isozimas podem exibir atividade máxima em diferentes pHs. Nessa situação, o pH da reação é selecionado a fim de permitir a análise de todas as isozimas envolvidas.

Concentração de sal e proteínas

A força iônica das soluções afeta a atividade enzimática. Se a força iônica for demasiadamente intensa, a atividade enzimática diminui. A atividade de muitas enzimas também é afetada pela concentração de proteínas. Quando a atividade da enzima encontra-se nos limites lineares do ensaio, a diluição do plasma tipicamente requer o uso de "diluentes de enzimas" que contenham proteínas plasmáticas. Há cerca de 70 g de proteína por litro de plasma humano, contudo a urina normal quase não contém proteínas. O uso da albumina, entre outras, aumenta a atividade da amilase urinária e padroniza sua quantificação. Em soluções isentas de proteínas, as enzimas perdem rapidamente sua atividade, seja por desnaturação, seja por adsorção nas paredes do tubo de ensaio.

Inibidores e interferências

Em geral, as enzimas são quantificadas em amostras de soro. O plasma heparinizado geralmente é considerado uma amostra equivalente ao soro para a maioria das análises de rotina, porém o mesmo não é válido para os ensaios enzimáticos. A heparina inibe a atividade de algumas enzimas, notavelmente a amilase e a aspartato aminotransferase (AST) (apenas em alguns métodos). Utilizado em tubos de coleta a vácuo para testes de coagulação e como conservante de produtos do sangue, o citrato se complexa a cátions divalentes. Amostras que contêm citrato podem fornecer resultados falsamente baixos em determinações enzimáticas, como no caso da CK e da ALP. O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e o fluoreto inibem a atividade de muitas enzimas e, virtualmente, jamais devem ser utilizados para amostras destinadas a análises enzimáticas. A única exceção constitui a quantificação de renina, em que o EDTA inibe a ação de enzimas que convertem a pró-renina em enzima ativa (renina) e evita artefatos que aumentam a atividade da renina.

Técnicas baseadas em anticorpos para quantificação de enzimas

Como já mencionado brevemente, os imunoensaios podem ser empregados para quantificar o conteúdo de proteínas enzimáticas. Mais comumente, são utilizados para quantificar uma isozima,

simplificando sua determinação. Tais ensaios, de um modo geral, são menos afetados pelos fatores que afetam a atividade enzimática, além de serem frequentemente mais precisos. No entanto, a determinação do conteúdo de enzimas pode ser variável, dependendo dos reagentes utilizados. Muitas vezes, os calibradores levam a resultados diferentes de atividade em massa, quando se comparam diferentes métodos. Alguns exemplos são a isozima MB da CK, a isozima pancreática da amilase, as isozimas prostática e óssea da fosfatase ácida (ACP) e a isozima óssea da ALP. Os anticorpos podem igualmente ser empregados na inibição ou ligação seletiva de subunidades enzimáticas particulares. Essa abordagem permite que os dados referentes às quantificações totais e de isozimas sejam expressos com as mesmas unidades. Por exemplo, anticorpos para subunidades CK-M inibem metade das isozimas CK-MB e todas as isozimas CK-MM. A determinação da atividade de CK de uma amostra, após incubação com anticorpos anti-M, pode ser utilizada para estabelecer a atividade das subunidades não M da CK. Os anticorpos também podem ser empregados como anticorpos de "captura", para separar uma dada isozima de outras formas da mesma enzima, seguida da determinação da atividade enzimática. Exemplos de tais ensaios de captura são os testes para detecção da isozima óssea da ALP, e de isozimas de ACP presentes no osso e na próstata. Algumas enzimas circulantes estão ligadas a antiproteases, a exemplo do antígeno específico da próstata (PSA) (ver Cap. 74), da α_1-antiquimotripsina ou da tripsina e α_1-antitripsina. Os anticorpos podem diferir quanto à capacidade de quantificar formas livres e ligadas. Algumas enzimas também se ligam à α_2-macroglobulina, como o PSA (Otto, 1998) e a ACP (Brechme, 1999). A enzima ligada a essa antiprotease geralmente está inativada e não pode ser quantificada pela maioria dos imunoensaios, uma vez que o sítio de ligação permanece inacessível ao reconhecimento pelos anticorpos. Por fim, do mesmo modo que outros tipos de imunoensaios, a quantificação das enzimas por imunoensaio pode apresentar interferências causadas por outras substâncias que se ligam aos anticorpos reagentes, como os anticorpos heterófilos (Sosolik, 1997) e o fator reumatoide (Dasgupta, 1999).

Enzimas específicas

Inúmeras enzimas são clinicamente úteis no reconhecimento e monitoramento de certos processos patológicos. Muitas são discutidas em outros capítulos deste livro. No Capítulo 14 são discutidas as enzimas encontradas no soro e na urina, utilizadas no reconhecimento de doenças renais. As enzimas envolvidas no metabolismo ósseo são abordadas no Capítulo 15. As enzimas úteis ao reconhecimento de doenças hepáticas são mencionadas no Capítulo 21. O Capítulo 22 trata das enzimas pancreáticas, enquanto as enzimas e demais proteínas úteis no diagnóstico de doenças cardíacas são abordadas no Capítulo 18. Por fim, as deficiências enzimáticas que produzem anemia hemolítica são resumidas no Capítulo 31. No presente capítulo, são abordados aspectos gerais referentes às enzimas que possuem utilidade clínica e, especificamente, discute-se os marcadores da lesão muscular. Diversas enzimas tratadas em outros capítulos (amilase, G6PDH, lipase e piruvato quinase) não são discutidas aqui.

O padrão de alterações enzimáticas muitas vezes ajuda a indicar a fonte de uma lesão. Em alguns casos, as isozimas são relativamente específicas para um determinado órgão, de modo que a identificação de qual enzima encontra-se elevada pode apontar o órgão lesionado. Quando se trata de enzimas que não possuem isozimas com especificidade tecidual, a quantidade relativa de diferentes enzimas encontradas no plasma fornece evidências acerca do tipo de órgão que apresenta lesão. Por exemplo, as enzimas LDH, AST e ALT são detectadas em muitos órgãos, porém suas concentrações relativas em cada um deles podem ser diferentes (Tab. 20.6). Se os níveis de LDH estiverem acentuadamente altos, enquanto os de AST e ALT apresentarem um aumento discreto, a elevada proporção LDH/AST pode sugerir a existência de lesão em um órgão ou tecido (envolvendo, por exemplo, eritrócitos, leucócitos ou tumores). Por outro lado, se os níveis de AST e ALT estiverem altos, mas a concentração de LDH estiver apenas discretamente aumentada, a baixa proporção LDH/AST é indicativa de uma lesão hepática.

Tabela 20.6 Quantidades relativas de enzimas em vários órgãos (em relação ao soro)*

	AST†	ALT	LDH	CK
Fígado	7.000	3.000	700	
Rim	4.500	1.200	500	10
Cérebro				1.700
Baço	700	150		
Coração	8.000	500	600	5.000–8.000
Músculo esquelético	5.000	300	700	20.000–30.000
Músculo liso				300–600
Eritrócitos	15	7	500	0

* A quantidade relativa é calculada dividindo-se a atividade da enzima no tecido (em UI/kg de tecido) pelo limite superior do intervalo de referência para a atividade plasmática da enzima (em UI/L), considerando 1 L de plasma = 1 kg. Tendo em vista que os dados são provenientes de múltiplas publicações, as quantidades relativas entre as enzimas podem ser aproximadas. Entretanto, a quantidade relativa de uma única enzima em cada tecido é uma medida acurada.

† Conteúdo total nas células; quantidades variáveis representam a isozima mitocondrial, a qual atinge o soro apenas em pequenas concentrações.

AST = aspartato transaminase; ALT = alanina transferase; LDH = lactato desidrogenase; CK = creatina quinase.

Fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)

Bioquímica e fisiologia

As ACPs pertencem à classe enzimática das hidrolases (Tab. 20.1) e ocorrem sob a forma de várias isozimas que apresentam uma função enzimática em comum (a quebra hidrolítica dos monoésteres de fosfato). Todas apresentam atividade ideal em pH abaixo de 7,0. Possuem certo grau de especificidade tecidual (são detectadas em maior concentração na próstata, fígado, baço e osso). Suas principais formas são codificadas por genes distintos e também possuem pesos e estruturas moleculares distintos, além das diferenças relativas à inibição do tartarato (Moss, 1995). As ACPs lisossômicas, prostáticas, eritrocitárias, macrofágicas e osteoclásticas representam cinco tipos importantes encontrados em seres humanos. Normalmente, são encontradas no soro em baixas concentrações (Moss, 1999; Bull, 2002). A atividade da ACP eritrocitária pode ser distinguida das demais isozimas de ACP, pois pode ser inibida por soluções de formaldeído a 2%, bem como de sulfato cúprico a 1 mM. Essa característica contrasta com as demais isozimas, que não são inibidas por tais agentes. Além disso, a ACP eritrocitária não é inibida por soluções de tartarato a 20 mM, enquanto as outras isoformas são. É importante notar a presença da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *tartrate-resistant acid phosphatase*) em certos tipos de leucemias crônicas e em alguns linfomas, principalmente na leucemia de células pilosas, como descrito no Capítulo 32, sobre distúrbios leucocíticos.

Intervalos de referência e variação pré-analítica

Os valores de referência dependem da idade, sexo e status hormonal (em mulheres). Os valores para ACP total e TRAP são elevados em crianças e aumentam durante a primeira década de vida, atingindo valores de pico na adolescência que equivalem a 3 a 4 vezes os níveis detectados em adultos. Tais alterações ocorrem paralelamente às alterações dos níveis de ALP (Chen, 1979). Nos últimos anos da adolescência, a concentração das enzimas cai e atinge os valores comumente observados em indivíduos adultos, mantendo-se constante até aproximadamente os 80 anos de idade, em ambos os sexos. Homens e mulheres normais, com até 55 anos de idade, apresentam os mesmos valores de referência para ACP. Os níveis de ACP total e TRAP aumentam nas mulheres após a menopausa (Schiele, 1988) bem como mediante uso de acetato de depo-medroxiprogesterona antes da menopausa (Mukherjea, 1981).

A atividade enzimática da ACP é instável no pH normal do plasma. As amostras de soro devem ser acidificadas para evitar a perda de atividade de ACP (Theodorsen, 1985). O efeito do pH da amostra não é tão consistentemente observado nos imunoensaios para ACP prostática

(PACP). Alguns estudos recomendaram a acidificação rotineira de todas as amostras destinadas a testes para ACP, porém ainda não está claro se esse procedimento é realmente essencial (Panteghini, 1992).

A meia-vida da PACP é de cerca de 1 a 3 horas (Wadstrom, 1985). A variação da ACP que ocorre de um dia a outro é relativamente alta. No caso da isozima prostática, a média dessa variação é 30% (Maatman, 1993), embora possa chegar a 100% em pacientes com carcinoma de próstata (Brenckman, 1981). A média da variação para a isozima óssea é de cerca de 35% (Panteghini, 1995).

Quantificação

A ACP total costuma ser quantificada com base em sua capacidade de clivar grupos fosfato em pH ácido. Em geral, o teste é empregado para determinação da concentração sérica de PACP no diagnóstico ou monitoramento do adenocarcinoma da próstata. Vários substratos e diversas condições foram empregadas para quantificar a atividade enzimática com maior especificidade. Alguns exemplos são a timolftaleína monofosfato e o α-naftil fosfato. Níveis elevados de bilirrubina resultam na detecção de valores falsamente baixos de atividade de TRAP, contudo não afetam a ACP total (Alvarez, 1999).

As isozimas de ACP podem ser separadas por eletroforese. Todavia, em geral há pouco interesse nas isozimas, com exceção das variantes prostática e óssea. Foram desenvolvidos imunoensaios (Moss, 1999; Bull, 2002) para detecção dessas duas isozimas de ACP. A PAPC encontra-se amplamente disponível.

Causas de resultados anormais

A principal causa de aumento dos níveis de ACP é a doença prostática. Com o desenvolvimento da técnica de detecção do PSA (ver Cap. 74), o uso dos testes para ACP no câncer da próstata perdeu popularidade. No início desse câncer, a sensibilidade da ACP é inferior à do PSA (Burnett, 1992). Tanto a ACP quanto o PSA encontram-se aumentados em uma parcela significativa dos pacientes com hiperplasia benigna da próstata (Salo, 1990) ou infarto prostático. Por esse motivo, a ACP tornou-se pouco útil na triagem do câncer de próstata (Kaplan, 1985). Quase todos os pacientes com câncer de próstata e elevação dos níveis de ACP apresentam extensão extracapsular ou metástases (Salo, 1990; Burnett, 1992), de modo que a concentração elevada de ACP pode fornecer informações úteis acerca do estadiamento desse pacientes. Ocasionalmente, a elevação da PACP pode ter outras causas. Assim, uma obstrução do trato urinário/retenção urinária aguda pode provocar elevação dos níveis de ACP (Collier, 1986). Uma extensiva massagem prostática, inflamação, infarto/isquemia da próstata e manipulações prostáticas, como a obtenção de biópsia com agulha e citoscopia, também podem causar um aumento transitório dos níveis séricos de PACP. Os testes devem ser realizados antes de qualquer procedimento.

Após o tratamento cirúrgico do câncer da próstata, os níveis de ACP caem mais rapidamente que os de PSA (Price, 1991), e devem se tornar indetectáveis após a total ressecção do tumor. Como o PSA é uma proteína dependente de andrógenos, a terapia com deprivação de andrógenos leva à diminuição de sua produção, mas não afeta a síntese de ACP (Price, 1991; Narayan, 1995), sugerindo que a ACP pode ter utilidade no monitoramento de pacientes submetidos a esse tipo de tratamento.

Há muitos anos a ACP tem sido utilizada em casos de suspeita de estupro. O líquido coletado da vagina com auxílio de um cotonete fornece resultado positivo no teste de detecção de ACP, caso haja sêmen na amostra, desde que seja empregado um líquido estabilizador com pH acídico (Ricci, 1982). Os valores de pico em geral são detectados nas primeiras 12 horas, permanecendo elevados por até 4 dias.

Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)

Bioquímica e fisiologia

Assim como a ACP, as ALPs constituem uma classe enzimática de hidrolases (Tab. 20.1). A ALP encontrada no sistema canalicular (biliar) será discutida no Capítulo 21, que trata da função hepática. As ALPs representam uma família de enzimas codificadas por genes diferentes. Seu papel fisiológico ainda precisa ser esclarecido. As isoformas de ALP mais abundantes no plasma são codificadas por um único gene, localizado no cromossomo 1. Esse gene produz isozimas (por vezes denominadas inespecíficas) sem especificidade tecidual, que são encontradas no rim, fígado e ossos, diferindo entre si quanto às cadeias laterais de carboidrato. Outros dois genes, localizados no cromossomo 2, codificam ALPs de origem placentária e intestinal. Ainda, outro gene também localizado nesse mesmo cromossomo codifica a chamada isozima da célula germinativa ou de origem plancentária-símile, que apresenta certas semelhanças com a isozima da placenta. Nas células, a ALP encontra-se primariamente ligada às membranas celulares, onde parece estar envolvida na clivagem de compostos que contêm fósforo e pode atuar facilitando a movimentação de diversas substâncias por meio dessas estruturas. Os hepatócitos produzem a ALP hepática que, por sua vez, encontra-se fixa à superfície canalicular dessas células. Os osteoblastos produzem a ALP óssea, que parece estar envolvida na clivagem do pirofosfato – um inibidor da mineralização óssea. As células epiteliais intestinais produzem a ALP intestinal, que é liberada no intestino após a ingestão de alimentos ricos em gordura.

Aparentemente, diferentes mecanismos estão envolvidos na liberação da ALP pelas células e, como resultado, surgem as diversas formas da enzima no plasma. Diante de uma lesão hepática, embora a síntese de ALP aumente, os ácidos biliares dissolvem os fragmentos de membrana celular canalicular nos quais as enzimas estão fixas (incluindo ALP, GGT, leucina aminopeptidase e 5'-NT) (Moss, 1997). Por um lado, se no soro normal tipicamente se observa apenas uma única isoforma de ALP (hepática ou óssea), na doença hepatobiliar são detectados tanto o produto normal quanto a forma ligada à membrana (alto peso molecular) e acoplada à lipoproteína (Wolf, 1994). A isozima intestinal da ALP é liberada em grande quantidade no líquido duodenal (Deng, 1992), e uma quantidade significativa entra no líquido linfático, drenando o trato intestinal logo após as refeições (Reynoso, 1971). Entretanto, uma boa parte das isozimas parece se ligar aos antígenos ABO dos eritrócitos (Bayer, 1980). Desse modo, somente pequenas quantidades chegam ao plasma, exceto em indivíduos que possuem tanto o gene secretor quanto uma grande concentração de substância H (grupos O ou B), nos quais pode haver uma elevação dos níveis de ALP para até 30 UI/L após uma refeição (Domar, 1993). Os níveis de ALP também estão aumentados em indivíduos pertencentes aos grupos O ou B, em comparação aos indivíduos dos grupos A e AB (Agbedana, 1996). Essa discrepância se deve às diferenças relativas aos níveis de ALP intestinal (Domar, 1993). Curiosamente, a concentração de ALP placentária está diminuída em mulheres grávidas que pertencem aos grupos sanguíneos A e AB (Ind, 1994).

A meia-vida das isozimas de ALP difere de maneira significativa. Por esse motivo, torna-se necessário saber qual isozima está aumentada, para avaliar a taxa de depuração: intestinal, minutos; óssea, 1 dia; hepática, 3 dias; e placentária, 7 dias. A variação de uma dia a outro no conteúdo de ALP total é de aproximadamente 5 a 10%, embora a isozima óssea mostre uma variabilidade de 20%.

Intervalos de referência e variação pré-analítica

Os intervalos de referência para a ALP são altamente dependentes da idade e do sexo (Tab. 20.7). Durante a infância, os níveis sobem de forma gradual ao longo de toda a primeira década até alcançarem o pico, com valores equivalentes a 3 a 4 vezes os níveis normalmente detectados em adultos, sendo maiores nos meninos. Tais valores aumentados em crianças se devem à isozima óssea. Depois que o pico é atingido no início da adolescência, os valores passam a cair de modo gradativo até chegarem aos níveis encontrados nos adultos, ao redor dos 20 anos de idade, quando se tornam semelhantes em homens e mulheres até os 50 anos de idade. Após a menopausa, os níveis de isozima óssea aumentam discretamente nas mulheres, provocando a elevação dos limites de referência após os 50 anos de idade. Esses limites são 15% mais altos em homens afro-americanos e 10% mais altos em mulheres afro-americanas (Manolio, 1992). A gravidez faz com que a concentração de ALP aumente 2 a 3 vezes, principalmente em virtude da da isozima placentária, mas também por causa da isozima óssea (Valenzuela, 1987).

Há também inúmeros fatores distintos que afetam os níveis de ALP. Um elevado índice de massa corporal (IMC) está associado a um aumento médio de 10% do conteúdo de ALP (Salvaggio, 1991). O uso

Tabela 20.7 Níveis relativos de enzimas, por sexo, em relação a adultos jovens do sexo masculino (1,0)*

Enzima	Idade/ sexo	8	12	16	22	30	40	50	60
Aspartato	Masc.	0,75	0,86	0,82	1,00	1,16	1,26	1,21	1,11
aminotransferase	Fem.	0,73	0,80	0,69	0,89	0,89	1,01	0,77	0,96
Alanina	Masc.	1,14	1,09	0,89	1,00	1,03	1,11	1,06	0,83
aminotransferase	Fem.	1,11	0,89	0,83	0,75	0,75	0,75	0,72	0,83
Fosfatase	Masc.	3,61	4,76	4,48	1,52	1,00	1,00	0,95	0,95
alcalina	Fem.	3,14	4,10	2,52	0,81	0,86	0,76	1,00	1,38
γ-glutamil	Masc.	0,25	0,29	0,37	0,62	1,00	1,07	1,16	0,99
transferase	Fem.	0,24	0,28	0,33	0,38	0,52	0,58	0,90	1,09

* Resultados expressos como limites de referência superiores, em forma de fração dos limites de referência superiores para jovens saudáveis do sexo masculino.

Dados de Siest G, Henry J, Schiele F, Young DS: Interpretation of Clinical Laboratory Tests: Reference Values and Their Biological Variation, Foster City, CA, Biomedical Publications, 1985.

de contraceptivos orais causa uma diminuição da concentração de ALP de, em média, 20% (Dufour, 1998; Schiele, 1998). Já os derivados do ácido fíbrico promovem uma diminuição de 25% no conteúdo total de ALP, e de 40% no conteúdo de isozima hepática (Day, 1993). Agentes antiepilépticos comumente levam ao aumento da ALP total, sobretudo por elevarem a concentração da isozima hepática. Todavia, em certos casos, os níveis de isozima óssea também podem sofrer elevação (Nijhawan, 1990). O tabagismo provoca um aumento médio de 10% no conteúdo total de ALP, em decorrência da produção pulmonar de uma variante similar à isoforma placentária da enzima (Kallioniemi, 1987). Transfusões de sangue e desvio cardiopulmonar reduzem os níveis de ALP, frequentemente a ponto de torná-los baixos (Kyd, 1998). Esse efeito pode ser decorrente da quelação pelo citrato dos cátions necessários.

Quantificação

Apesar de existirem incontáveis métodos, a atividade da ALP costuma ser determinada utilizando-se *p*-nitrofenil fosfato como substrato em pH alcalino. Vários tampões são empregados para ligação dos grupos fosfato; como o fosfato inorgânico (bem como alguns ânions) inibe a ALP, esse procedimento aumenta a atividade. O zinco é um componente da enzima, enquanto o magnésio e outros cátions a ativam. Os agentes quelantes presentes nos tubos de coleta (como EDTA, citrato e oxalato) reduzem falsamente a atividade da ALP. No caso do EDTA, a atividade da enzima com frequência se torna baixa demais para ser medida. Durante o armazenamento, observa-se um discreto aumento da atividade em decorrência da perda dos inibidores, no entanto as amostras permanecem relativamente estáveis a 4°C, por até 1 semana.

Inúmeros métodos têm sido empregados para separar as isozimas da ALP. A inibição pela fenilalanina reduz a reatividade das isozimas intestinais e placentárias, enquanto a levamisola inibe as isozimas ósseas e hepáticas. Os ensaios de inibição são pouco reproduzíveis e, assim, raramente utilizados. O fracionamento por aquecimento tem sido utilizado há muitos anos para determinar a fonte de elevação dos níveis de ALP total. A isozima mais estável diante do calor é a ALP placentária (e também das células germinativas), enquanto a isozima hepática apresenta estabilidade moderada e a isozima óssea é a mais sensível ao calor. Para obter resultados confiáveis, é essencial utilizar padrões de composição conhecida e exercer um controle cuidadoso tanto da temperatura quanto do tempo. Por esses motivos, a separação eletroforética vem sendo empregada há vários anos. A eletroforese padrão em gel de agarose e acetato de celulose não é capaz de resolver completamente as isozimas ósseas e hepáticas, tornando-as inconvenientes a ensaios que não sejam os qualitativos. Uma vez que a diferença entre essas isozimas reside em suas cadeias laterais de carboidrato, o uso de neuraminidase (para remover o ácido siálico) e lectina de germe de trigo (para ligar outras isozimas) melhora a separação das formas óssea e hepática, permitindo sua quantificação. A eletroforese de alta resolução em gel de poliacrilamida e a focalização isoelétrica são capazes de resolver bandas múltiplas de ALP. Há imunoensaios comercialmente disponíveis para as isozimas óssea e placentária da ALP. Os ensaios para isozimas ósseas costumam mostrar algum grau de reatividade cruzada com a isozima hepática, enquanto os ensaios destinados à isozima placentária apresentam reatividade cruzada em graus variáveis com a isozima da célula germinativa.

Causas de resultados anormais

As causas mais comuns de aumento dos níveis de ALP são as doenças hepáticas e ósseas. As causas hepáticas da elevação da ALP serão discutidas com maior detalhamento no Capítulo 21. A elevação dos níveis da enzima é provocada por distúrbios causadores de colestase com mais frequência do que por distúrbios hepatocelulares. As causas da elevação dos níveis de ALP óssea são discutidas de forma mais aprofundada no Capítulo 15. O aumento da atividade osteoclástica na doença de Paget, osteossarcoma, tumores que produzem metástases ósseas e doenças envolvendo o metabolismo ósseo são os fatores que mais levam ao aumento dos níveis da isozima óssea. Em certas ocasiões, os pacientes podem apresentar elevação da concentração de ambas as isozimas – óssea e hepática –, sobretudo em casos de carcinoma metastático. Aumentos acentuados e transitórios da ALP são raros e, em geral, ocorrem em crianças e após doenças triviais. Em tais situações, os níveis da enzima podem chegar a vários milhares de UI/L e persistir durante semanas ou meses (Steinherz, 1984).

É possível que haja aumento dos níveis de ALP em pacientes com infarto intestinal, inflamação e ulceração. Aumentos que envolvem as concentrações de variantes similares à isozima placentária (como Regan e Nagao) são comumente detectados em pacientes que apresentam malignidades (cervical, do ovário, pulmão, mama, cólon, pâncreas) e decorrem da produção ectópica por parte do neoplasma.

Conforme já mencionado, os níveis de ALP podem cair de modo transitório após a realização de transfusões de sangue ou desvio cardiopulmonar. Quedas severas e prolongadas são detectadas na hipofosfatasia – um raro distúrbio herdado que envolve o metabolismo ósseo (Whyte, 1996). A diminuição da concentração de ALP também pode ser observada, entre outras condições, na deficiência de zinco, uma vez que esse bioelemento é um cofator necessário à atividade da enzima.

Conforme discutido no Capítulo 74, com relação aos marcadores tumorais, a ALP placentária detectada no soro e no LCE (líquido cerebrespinal) é útil como marcador tumoral na maioria dos tumores de células germinativas.

Enzima conversora de angiotensina (EC 3.4.15.1)

Bioquímica e fisiologia

A enzima conversora de angiotensina I (ACE, *angiotensin I-converting enzyme*), também conhecida como peptidil-dipeptidase A, pertence à classe enzimática das hidrolases (Tab. 20.1) e geralmente está envolvida na hidrólise de ligações peptídicas na extremidade C-terminal livre, liberando um dipeptídio na reação. Contudo, também pode atuar como endopeptidase ou aminopeptidase. É responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II (no sistema renina-angiotensina-aldosterona), bem como pela inativação da bradicinina (no sistema calicreína-cinina). Por meio desses sistemas, a ACE modula a resistência vascular periférica e as funções renal e cardiovascular. Embora sua ação catalítica seja um pouco inespecífica *in vitro*, somente a angiotensina I, a bradicinina e o peptídio hemorregulador Ac-DSKP são seus substratos definidos *in vivo* (Macours, 2004).

A ACE é constituída por uma única cadeia polipeptídica que contém dois sítios catalíticos de ligação ao zinco, sendo homólogos (a ACE é uma metaloprotease do zinco). Sua atividade enzimática é perdida quando o zinco é ligado por uma agente quelante, como EDTA, ou substituído por um cátion diferente. Nas células, a ACE é uma proteína transmembrana que possui um longo domínio aminoterminal extracelular, um domínio transmembrana hidrofóbico muito curto e um pequeno domínio carboxiterminal intracelular. A molécula ligada à célula é referida como ACE tecidual. Os dois sítios catalíticos estão localizados no domínio extracelular. Um deles situa-se próximo à porção aminoterminal e o outro, mais próximo à porção carboxiterminal. A enzima funcional é solta da membrana celular por clivagem proteolítica e, no meio extracelular, constitui a ACE circulante.

A maior parte da ACE encontra-se associada aos tecidos (> 90%), sendo detectada em concentração bem menor no plasma. A ACE é predominantemente encontrada nas membranas das células endoteliais ao longo de todo o corpo. Os pulmões e os testículos são particularmente ricos em ACE. O leitor pode encontrar informações acerca da biologia e estrutura da ACE na literatura (Dzau, 2002; Macours, 2004). Aparentemente, existem duas formas distintas de ACE: uma somática (sACE) e outra menor, encontrada nos testículos (tACE). Um único gene codifica ambas as formas, utilizando promotores alternativos. A sACE é encontrada em muitos tecidos e possui dois sítios ativos (como descrito anteriormente), enquanto a tACE possui apenas um sítio ativo C-terminal e é encontrada exclusivamente nos testículos. Apesar de ambos os sítios ativos de sACE necessitarem de íon zinco, suas propriedades bioquímicas não são idênticas (Dzau, 2002; Macours, 2004).

Intervalos de referência e variação pré-analítica

A atividade da ACE é maior em crianças do que em adultos. Durante a adolescência, os valores são mais altos nos meninos (Beneteau-Burnat, 1990), caindo gradualmente até atingirem os valores detectados nos adultos ao redor dos 18 anos de idade. Homens e mulheres apresentam os mesmos valores, embora nem todos os estudos mostrem esse padrão. Aparentemente, a ACE é eliminada pelo fígado. Sua meia-vida no plasma é de cerca de 48 horas. A média da variação de um dia a outro é inferior a 10%, e não há variação diurna (Thompson, 1986).

Existem ainda vários fatores que afetam os níveis de ACE. Fumantes apresentam cerca de 30% menos atividade de ACE do que indivíduos não fumantes ou fumantes que pararam de fumar a pelo menos 10 anos (Ninomiya, 1987). O hormônio da tireoide estimula a síntese de ACE. Na pós-menopausa, a reposição de estrógenos provoca uma queda de 20% na atividade da ACE sérica (Proudler, 1995). Em algumas famílias raras, falta um inibidor endógeno da atividade da ACE e, em consequência, os níveis séricos de ACE são notavelmente elevados (Luisetti, 1990).

Quantificação

A ACE é tipicamente quantificada por sua capacidade de clivar peptídios sintéticos, liberando ácido hipúrico ou outras moléculas indicadoras. Amostras de LCE requerem uma modificação do ensaio, pois apresentam atividade de ACE bem menor (Oksanen, 1985).

Causas de resultados anormais

A justificativa mais comum de um pedido de quantificação dos níveis de ACE é o uso no diagnóstico e monitoramento da sarcoidose. Em geral, os níveis da ACE estão diretamente relacionados ao número de órgãos afetados (Muthuswamy, 1987) e à atividade de granulomas. Quando maduros, os granulomas tendem a produzir menos ACE do que aqueles ainda em desenvolvimento (Mimori, 1998). Na sarcoidose, há uma correlação geral entre a atividade da doença e os níveis de ACE (Gupta, 1992). À medida que a doença evolui para fibrose, os níveis da enzima diminuem. É mais provável que os níveis de ACE aumentem com o envolvimento pulmonar do que na adenopatia hilar pura. Em muitas doenças granulomatosas também é detectado o aumento dos níveis da enzima, ainda que menos frequentemente que na sarcoidose. Enquanto a maioria dos indivíduos com essa doença apresenta elevação de ACE, a incidência dessa elevação é de 10% em outros distúrbios granulomatosos (Studdy, 1978). Por esse motivo, o teste de detecção da enzima em geral não é considerado diagnóstico, ainda que possa ser útil nos casos de pacientes com envolvimento primariamente ocular, quando é impossível realizar biópsias de imediato (Power, 1995).

É comum detectar aumento dos níveis de ACE em inúmeros distúrbios, incluindo esclerose múltipla (Constantinescu, 1997), doença de Addison (Falezza, 1985), hipertireoidismo (Reiners, 1988), diabetes melito (Schernthaner, 1984), hepatite alcoólica (Borowsky, 1982), úlcera péptica (D'Onofrio, 1984), síndrome nefrótica (Huskic, 1996) e, em vários estágios, em pacientes com pneumonite bacteriana (Kerttula, 1986) e pneumonite por *Pneumocystis* (Singer, 1989). Outros distúrbios pulmonares em que há aumento significativo da concentração de ACE são enfisema, asma, carcinoma de células pequenas e carcinoma de células escamosas (Ucar, 1997). Na insuficiência renal crônica, esse aumento é observado somente em indivíduos submetidos à hemodiálise, e a elevação dos níveis da enzima é observada no decorrer do procedimento de diálise (Docci, 1988). Os níveis de ACE diminuem em indivíduos com insuficiência renal crônica que não se submetem à diálise (Le Treut, 1983). Na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a frequência e o grau de elevação correlacionam-se ao estágio da doença (Ouellette, 1992). A diminuição dos níveis de ACE é observada em várias malignidades (Romer, 1980; Schweisfurth, 1985), na doença hepática crônica (Sakata, 1991), na anorexia nervosa (Matsubayashi, 1988) e no hipotireoidismo (Reiners, 1988).

O uso dos níveis de ACE do LCE para diagnóstico e monitoramento da neurossarcoidose tem recebido críticas (Dale, 1999). Muitas outras doenças provocam elevação dos níveis da enzima presente no LCE, entre as quais a encefalite viral, esclerose múltipla e sífilis do sistema nervoso central (SNC) (Schweisfurth, 1987).

Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) e colinesterase (EC 3.1.1.8)

Bioquímica e fisiologia

A acetilcolinesterase (AChE, colinesterase verdadeira ou colina esterase I) e a colinesterase (PChE, pseudocolinesterase ou colina esterase II) são hidrolases do éster carboxílico (classe 3, Tab. 20.1). A AChE catalisa a seguinte reação:

$$\text{Acetilcolina} + H_2O \rightleftharpoons \text{colina} + \text{acetato} \qquad (20.42)$$

A PChE catalisa a reação:

$$\text{Uma acilcolina} + H_2O \rightleftharpoons \text{colina} + \text{Um carboxilato} \qquad (20.43)$$

A AChE e a PChE são duas enzimas distintas, produzidas por tecidos diferentes, que são capazes de clivar a acetilcolina – um dos principais neurotransmissores do organismo. A colinesterase verdadeira tem a molécula de acetilcolina (ACh) como seu substrato primário natural, e também é inibida por ela a uma concentração aproximada de 10^{-2} mol/L. Apresenta elevada atividade no SNC, eritrócitos, pulmão e baço. A ACh atua como neurotransmissor primário em vários sítios do SNC, enquanto a AChE rapidamente a hidrolisa e, assim, encerra neurotransmissão de modo rápido. A AChE em geral não é encontrada no líquido amniótico.

A função normal da enzima encontrada no soro – a PChE (também chamada de acilcolina acil-hidrolase) – é desconhecida, porém é importante na clivagem da succinilcolina e do mivacúrio, ambos relaxantes musculares de uso cirúrgico. A PChE sérica não é inibida pela AChE. Sua produção ocorre primariamente no fígado, embora outros tecidos, como miocárdio e pâncreas, também possam produzi-la. Enquanto ambas as enzimas hidrolisam a ACh, somente a AChE promove a hidrólise de acetil-β-metilcolina. Por outro lado, apenas a PChE hidrolisa butiril e benzoilcolina.

Inúmeras variantes genéticas da PChE apresentam afinidade reduzida (maior K_M) pela ACh, bem como por inibidores competitivos, como dibucaína e fluoreto, comparativamente à forma U comum (usual). Tais variantes são denominadas A (atípica), F (fluoreto-resistente) e S (silenciosa). A variante S na verdade representa certo número de mutações que podem levar à ausência de atividade enzimática ou de síntese de PChE. A deficiência determinada por heterozigose é observada em cerca de 4% da população, enquanto a condição homozigótica é encontrada em 0,3 a 0,5% dos indivíduos. Essas variantes causam diminuição (ou, no caso da variante S, ausência) da atividade de PChE, quando são determinadas por homozigose ou ocorrem como formas heterozigóticas mistas (AA, AF, AS, FF, FS, SS). Por conta do amplo intervalo de valores normais, a redução da atividade de PChE não costuma ser detectada nas formas comuns (U) heterozigóticas.

Outra forma de detectar essas variantes consiste em determinar o porcentual de atividade enzimática remanescente após incubação *in vitro* da enzima sérica com dibucaína ou fluoreto (denominado, respectivamente, *número de dibucaína* [DN] e *número de fluoreto*). Conforme mencionado anteriormente, o elevado K_M das variantes resulta em uma catálise menos eficiente do que o normal. Assim, observa-se uma afinidade menor pela dibucaína e pelo fluoreto, que torna as variantes mais resistentes à inibição do que o normal. Geralmente, a dibucaína inibe a atividade da colinesterase plasmática usual (U) em cerca de 70 a 90%.

A atividade da variante colinesterase é mais resistente à inibição – a atividade da variante heterozigótica sofre uma inibição de cerca de 50 a 70%, enquanto a atividade da variante homozigótica é inibida em aproximadamente 10 a 30%. O DN, então, além de refletir o porcentual de inibição da atividade enzimática, fornecerá uma medida grosseira dessa atividade. Esses dados, por sua vez, indicarão a presença ou ausência de uma determinada variante da enzima. O DN é calculado utilizando-se a fórmula da equação 20.44. Por exemplo, a forma UU pode apresentar uma inibição de 85% ou uma atividade remanescente de 15%, resultando em um DN igual a 85.

$$\text{Número de dibucaína (fluoreto)} = 100 \times (1 - \text{atividade da enzima com inibidor/atividade da enzima sem inibidor}) \quad (20.44)$$

Técnicas de biologia molecular mais modernas – como o uso de amplificação em cadeia com polimerase (como descrito no Cap. 67) seguida da separação dos produtos da reação por eletroforese em gel (Cerf, 2002) – possibilitam uma identificação muito mais acurada das variantes, em comparação aos métodos tradicionais de análise bioquímica.

Intervalos de referência e variação pré-analítica

Os valores de PChE são baixos em bebês e aumentam gradativamente até atingirem os níveis detectados no adulto, aos 4 meses de idade (Karlsen, 1981). Nos homens, tais valores permanecem inalterados a partir desse momento até os 45 anos de idade. Nas mulheres, observa-se uma queda de cerca de 10% na menarca e um aumento de 15% após a menopausa. Um estudo recente (Abou-Hatab, 2001) não detectou qualquer correlação significativa entre a idade avançada dos pacientes e as alterações plasmáticas da atividade de AChE e PChE. Indivíduos sadios jovens e idosos (idade entre 18–85 anos) mostraram atividades enzimáticas semelhantes. Nos homens, os valores foram cerca de 15 a 20% mais altos do que nas mulheres, na faixa etária que vai até os 45 anos de idade. A partir daí, homens e mulheres passaram a apresentar os mesmos valores. O uso de contraceptivo oral causou uma diminuição de cerca de 15% na atividade da PChE (Lepage, 1985). A atividade enzimática de indivíduos normais apresenta um intervalo de variação cujos valores diferem entre si em até quatro vezes. Um IMC aumentado está associado ao aumento dos níveis de PChE, enquanto a baixa ingestão proteica leva à diminuição da concentração dessa enzima.

A meia-vida da PChE foi estimada em 2 a 10 dias. A média da variação de um dia a outro é de aproximadamente 7% (Moses, 1986), sendo muito inferior que a da maioria das demais enzimas.

Quantificação

A atividade enzimática é tipicamente determinada com o uso de éster de aciltiocolina como substrato. A tiocolina liberada reage com o reagente de Ellman (ácido ditiobisnitrobenzoico [DTNB]) e libera ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico, que é quantificado por fotometria. A atividade da PChE é medida em amostras de soro, enquanto a da AChE é medida no hemolisado do lavado de eritrócitos. A AChE também pode ser determinada no líquido amniótico por eletroforese em gel. Para determinar os números de dibucaína e fluoreto, incuba-se o soro com 30 Ìmol de dibucaína/L ou 4 mmol de fluoreto/L.

Causas de resultados anormais

As principais justificativas para quantificar a PChE são: (1) monitoramento da exposição aos inibidores de colinesterase; (2) uso como teste de função hepática; ou (3) diagnóstico de variantes genéticas. Os inseticidas de organofosfato são inibidores irreversíveis tanto da AChE quanto da PChE, ainda que a atividade plasmática da PChE caia tipicamente antes da atividade da AChE nos eritrócitos envenenados (Areekul, 1981). Em razão da pequena variação individual e da grande variação interindividual dos valores de PChE, recomenda-se obter os valores basais da enzima antes da exposição dos indivíduos aos organofosfatos (Trundle, 1988). É necessário haver uma diminuição de 40% em relação aos níveis basais para que os sintomas se desenvolvam, e os sintomas severos caracteristicamente se manifestam diante de uma queda superior a 80%. Portanto, tais sintomas costumam ocorrer diante de valores de PChE que estão dentro do intervalo de referência. Caso não haja nenhum valor basal, será útil realizar determinações seriadas. Em certo estudo, 90% dos envenenamentos por organofosfatos sintomáticos foram associados a valores de PChE que estavam dentro do intervalo de referência, enquanto os níveis pós-exposição aumentados confirmaram a toxicidade (Coye, 1987). Se por um lado a PChE reflete uma toxicidade aguda, a AChE (eritrócitos) reflete melhor a exposição crônica.

Em comparação com outras enzimas encontradas nos hepatócitos, a produção de PChE pelo fígado parece refletir a função de síntese do órgão, em vez da lesão de suas células. Os níveis de PChE diminuem em casos de hepatite aguda, cirrose e carcinoma com metástases para o fígado. A diminuição dos níveis dessa enzima também é detectada em estados de desnutrição, mas não é observada na síndrome nefrótica, em que a concentração da enzima se mantém normal. Assim como no monitoramento da exposição aos organofosfatos, as alterações dos valores em relação aos níveis basais são mais úteis do que valores isolados e, desse modo, limitam a utilidade diagnóstica da PChE no monitoramento nutricional ou da lesão hepática.

Outro uso comumente atribuído à quantificação da PChE consiste no reconhecimento da presença de variantes genéticas. Testes desse tipo costumam envolver os familiares de indivíduos que apresentam apneia prolongada após o uso de succinilcolina ou mivacúrio (agentes bloqueadores neuromusculares/relaxantes musculares) durante a anestesia. O teste tipicamente abrange a PChE total e a determinação dos números de fluoreto e dibucaína para reconhecimento de variantes homozigóticas ou heterozigóticas compostas, que colocam o indivíduo em risco na exposição aos inibidores de colinesterase. Pacientes em situação de risco (com formas variantes da colinesterase) podem demorar mais para hidrolisar os agentes bloqueadores neuromusculares, apresentando um aumento inexplicável da duração do relaxamento do músculo respiratório com prolongamento da apneia. Essa característica contrasta com a hidrólise geralmente rápida do fármaco em presença das formas usuais (U) da enzima, levando a uma rápida recuperação do paciente.

Conforme já mencionado, a quantificação da AChE dos eritrócitos é útil na exposição e envenenamento por organofosfatos. Além disso, a análise qualitativa da AChE em amostras de líquido amniótico pode ser útil no diagnóstico de defeitos do tubo neural, especialmente em grupos de risco elevado (Muller, 2003). A AChE pode ser identificada no líquido amniótico obtido de mulheres grávidas cujo feto apresenta defeitos que envolvem o tubo neural, bem como no caso de outros tipos de defeitos de nascença. Contudo, na gravidez normal, essa enzima está ausente no material.

Lactato desidrogenase (EC 3.1.1.27)

Bioquímica e fisiologia

A LDH é uma enzima de classe 1 (oxidorredutase, Tab. 20.1) que atua em um grupo CH–OH de doadores com NAD^+ (uma coenzima requerida na reação) como aceptor e catalisa a transferência de hidrogênio:

$$\text{(L)-lactato} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{piruvato} + NADH + H^+ \quad (20.45)$$

A enzima também é capaz de oxidar outros ácidos (L)-2-hidroximonocarboxílicos.

A LDH contém zinco e faz parte da via glicolítica. É encontrada no citoplasma de todas as células em todos os tecidos do corpo. É um tetrâmero constituído por duas subunidades ativas – H (*heart*, coração) e M (músculo). Seu peso molecular é igual a 134 kDa. Combinações das subunidades produzem cinco isozimas: LDH_1 (HHHH) a LDH_5 (MMMM). As isozimas de combinações intermediárias apresentam diferentes arranjos das subunidades H e M (LDH_2, HHHM; LDH_3, HHMM; LDH_4, HMMM). Existem formas herdadas de deficiência das subunidades H (Joukyuu, 1989) e M (Kanno, 1980) da LDH, as quais estão associadas a baixos níveis plasmáticos da enzima e à detecção de apenas uma isozima na eletroforese. Outra forma de LDH – composta de quatro subunidades C – é encontrada nos espermatozoides e no sêmen, no entanto jamais foi detectada no soro, mesmo em indivíduos com seminoma (Vogelzang, 1982). Raramente, uma outra banda é detectada por eletroforese. Essa banda visível é denominada "LDH_6" e é provável que represente uma álcool desidrogenase, a qual também é capaz de metabolizar lactato (Kato, 1984).

A distribuição tecidual da LDH varia primariamente quanto à sua composição de isozimas, em vez de seu conteúdo em termos da própria LDH (Tab. 20.6). É importante observar que a LDH_1 e a LDH_2 são expressas em altas concentrações no tecido miocárdico e nos eritrócitos, sendo o inverso também verdadeiro, seus níveis são muito baixos em outros tecidos, como o hepático e o muscular. Nesse caso, o inverso é verdadeiro para LDH_4 e LDH_5. Diante de uma lesão de miocárdio, as isozimas predominantes cujas concentrações séricas aumentam são LDH_1 e LDH_2, enquanto na doença hepática ou muscular esquelética as isozimas LDH_4 e LDH_5 se elevam sobretudo no soro. Em contraste com enzimas como AST, ALT e CK, que exibem uma notável variação da atividade enzimática entre os tecidos, a amplitude dos valores de LDH é, aproximadamente, de apenas 1,5 vezes entre os níveis mais altos (como os do fígado) e os mais baixos (como os do rim). A maioria dos tecidos apresenta atividades de LDH 500 a 1.000 vezes mais altas do que aquela detectada no soro normal (ver Tab. 20.6). Por isso, observa-se uma elevação significativa dos níveis plasmáticos diante de uma pequena quantidade de lesão/degradação tecidual. A distribuição das isozimas de LDH nos tecidos é mostrada na Tabela 20.8. A composição específica dos níveis aumentados de isozimas detectados no plasma refletirá o tecido de origem. No plasma, a maior parte da LDH é proveniente da quebra dos eritrócitos e plaquetas, com contribuições variáveis de outros órgãos. A LDH aparentemente é eliminada pela bile, como mostram os resultados de estudos realizados com injeção de LDH radiomarcada, cuja radioatividade foi detectada na vesícula biliar e no intestino delgado (Smith, 1988).

Tabela 20.8 Porcentuais relativos de isozimas de lactato desidrogenase (LDH) em vários tecidos

Tecido	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
Soro	25	35	20	15	5
Coração	45	40	10	5	0
Eritrócitos	40	35	15	10	0
Córtex renal	35	30	25	20	0
Pulmão	10	15	40	30	5
Músculo esquelético	0	0	10	30	60
Fígado	0	5	10	15	70

Intervalos de referência e variação pré-analítica

Os valores de LDH mais elevados são detectados em recém-nascidos e bebês (com menos de 2 anos de idade). Os valores permanecem inalterados com o avanço da idade, até a fase adulta, e não existem diferenças relacionadas ao sexo. Indivíduos com mais de 65 anos tendem a apresentar valores discretamente mais altos. O exercício causa, no máximo, pequenos aumentos no conteúdo de LDH total. Até mesmo o exercício extenuante promove uma elevação de apenas 25% na média dos valores (Tanada, 1993). As análises de LDH e de suas isozimas são invalidadas diante da ocorrência de hemólise, ainda que presente somente em traços ou quantidades discretas. O contato com coágulos aumenta a concentração de LDH, enquanto a agitação física das amostras – como a que ocorre na maioria dos sistemas de tubo pneumático – provoca certo grau de hemólise e aumento de LDH. A hemólise afeta tanto a concentração total da enzima quanto a proporção LDH_1/LDH_2. O exercício pouco afeta a LDH ou suas isozimas. Níveis extremados de exercício físico podem fazer a concentração de LDH_1 se tornar maior que a de LDH_2. O conteúdo de LDH total aumenta de modo transitório após a realização de transfusão sanguínea, retornando aos valores basais dentro de 24 horas (Wiesen, 1998). Uma demora de até 1 a 2 dias na separação dos eritrócitos a partir do soro não interfere nos valores de LDH. São poucos os fármacos que afetam diretamente a sua atividade, contudo o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) aparentemente aumenta a contagem de leucócitos (Sarris, 1995).

A meia-vida das isozimas de LDH varia consideravelmente: desde 4 a 4,5 dias para LDH_1 a 4–6 horas para LDH_5. A LDH apresenta uma variação de um dia a outro de apenas 5 a 10%.

Quantificação

A atividade de LDH pode ser medida por meio da reação que ocorre da esquerda para a direita (lactato para piruvato) e também da que ocorre no sentido inverso (piruvato para lactato). A vasta maioria dos laboratórios utiliza a primeira reação. A reação inversa é utilizada de maneira predominante na detecção de LDH pelo método do esfregaço seco, e produz atividades que apresentam boa correlação com a reação que ocorre da esquerda para a direita. Entretanto, as atividades enzimáticas medidas são aproximadamente 3 vezes mais altas, dificultando a comparação dos resultados quando não é feita uma conversão.

A reação reversa (piruvato para lactato) atualmente é utilizada em poucos laboratórios, por conta da cinética mais rápida e necessidade de um cofator (NADH) mais barato e de um volume de amostra menor. Como desvantagens, essa reação apresenta perda prematura da linearidade da cinética, potente efeito de inibidores da LDH em algumas preparações de NADH e concentrações subideais de piruvato que podem ser utilizadas por causa da inibição da atividade da LDH pelo substrato. Do mesmo modo, o lactato é um substrato mais específico para essa enzima. O piruvato é menos específico e serve de substrato para enzimas como a piruvato desidrogenase.

A separação eletroforética das isozimas da LDH é tipicamente empregada nos casos em que a quantificação de diferentes isozimas se faz necessária. O gel de agarose é mais utilizado. A quantificação costuma empregar a reação que ocorre da esquerda para a direita (progressiva), permitindo a detecção de NADH fluorescente ou de um corante de formazan reduzido em uma etapa de desenvolvimento colorimétrico. O suporte de eletroforese e o agente de desenvolvimento afetam os resultados, e os intervalos de referência para métodos distintos não são os mesmos. Também há métodos de inibição da LDH_1; entretanto, somente permitem a quantificação dessa isozima. Os resultados com frequência são expressos na forma de proporção de LDH_1 por LDH total. O hidroxibutirato é preferencialmente clivado pela isozima LDH_1. Até o início da década de 1970, a quantificação da "hidroxibutirato desidrogenase" era empregada como teste diagnóstico para infarto de miocárdio.

A concentração de LDH sérica é, em média, 30 UI/L mais elevada do que a concentração da enzima plasmática, por conta da liberação de LDH a partir das plaquetas. Na incubação prolongada do plasma com plaquetas (separadas por centrifugação a uma velocidade < 1.200 *g*), observa-se o vazamento da LDH a partir das plaquetas danificadas e o consequente aumento dos níveis da enzima plasmática (Hollaar, 1979). A LDH é instável quando estocada a 4°C, em decorrência da labilidade da LDH_5. As amostras podem ser estocadas por até 24 horas à temperatura ambiente, sem sofrerem grandes alterações. O armazenamento por 3 dias à temperatura ambiente causa uma diminuição de cerca de 20% no conteúdo da LDH total, aumenta em 20% o conteúdo de LDH_1 aparente e diminui em cerca de 18% o conteúdo de LDH_5 aparente. Em amostras congeladas, observa-se uma diminuição significativa do conteúdo de LDH_5, enquanto o padrão de isozimas é modificado por um aumento artificial do conteúdo de LDH_1 e diminuição da LDH_5. O soro não deve ser congelado para uso em testes de LDH ou de suas isozimas.

Causas de resultados anormais

O teste para LDH é altamente inespecífico. Um valor anormal é inespecífico para indicação de um possível dano em qualquer órgão em particular. As quantidades relativas de LDH, AST e ALT (aliadas a de CK) podem fornecer indícios de uma fonte de elevação da LDH. Caso a enzima apresente um aumento marcante, porém as concentrações de AST, ALT e CK permaneçam normais ou aumentem minimamente, é possível que haja dano envolvendo células como eritrócitos e leucócitos, células do rim, pulmão, linfonodos ou células tumorais. O aumento do conteúdo de CK e LDH, acompanhado de um maior aumento de AST em comparação aos níveis de ALT, é observado na lesão do miocárdio ou do músculo esquelético. Aumentos do conteúdo de LDH raramente são detectados na doença hepática e, em geral, ocorrem apenas de forma transitória em casos de lesão hepática tóxica ou isquêmica (Cassidy, 1994). Em tais casos, o conteúdo de AST e ALT está tipicamente mais elevado que o de LDH. Em diversas condições, como no choque e em carcinomas metastáticos, a concentração de LDH aumenta em decorrência de uma lesão que envolve múltiplos órgãos e, assim, é possível distinguir padrões mistos. Elevações marcantes da LDH (> 5–10 vezes o valor normal) são detectadas na anemia megaloblástica, nas anemias

hemolíticas, nos estágios avançados de malignidades (particularmente, linfomas e leucemia), na sépsis ou diante de outras causas de choque e na parada cardiopulmonar. A LDH com frequência encontra-se moderadamente elevada na pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (Smith, 1988), permanecendo normal na maioria das demais formas de pneumonia (Rotenberg, 1988). Enquanto a LDH é uma enzima altamente sensível (a detecção de níveis normais torna um diagnóstico improvável) (Quist, 1995), seu valor preditivo é inadequado para estabelecer um diagnóstico de pneumonia por *P. carinii* em pacientes com HIV (Grover, 1992). Em pacientes com pancreatite biliar (inflamação causada pela obstrução do ducto biliar por cálculos biliares), a proporção de LDH:AST é aumentada e aparentemente indica a ocorrência de necrose pancreática (Isogai, 1998). É importante observar que 10 a 20% dos pacientes com pancreatite biliar podem apresentar resultados normais no teste de função hepática (Dholakia, 2004).

Nos casos em que a origem da elevação dos níveis de LDH permanece indeterminada quando são utilizados outros métodos, as isozimas da LDH podem ser úteis para determinar a fonte de lesão. No soro normal, essas isozimas (em ordem decrescente de atividade) são $2 > 1 > 3 > 4 > 5$. Em tumores de células germinativas (particularmente, seminomas e disgerminomas), a concentração de LDH_1 aumenta e pode servir de marcador tumoral (von Eyben, 2000, 2001).

Conforme observado no Capítulo 18, que trata da função cardíaca, os níveis séricos de LDH aumentam no decorrer de um período de 36 horas, quando a proporção LDH_1:LDH_2 (normalmente < 1) aumenta e atinge valores que podem ser ≥ 1 – a conhecida "*flipped ratio*" (inversão da proporção LDH_1:LDH_2). Esse fenômeno era utilizado para confirmar o diagnóstico de infarto de miocárdio (IM), no entanto era impossível utilizá-lo em diagnósticos agudos dessa condição, por causa do prolongado intervalo de tempo (36 h) necessário ao desenvolvimento da "*flipped ratio*". Como já discutido no Capítulo 18, existem biomarcadores mais adequados – em especial a troponina – tanto para o diagnóstico agudo do IM quanto para a confirmação diagnóstica (os níveis séricos de troponina permanecem elevados por mais de 1 semana após o episódio). Do mesmo modo, anemia hemolítica, anemia megaloblástica e doenças renais corticais, como infartos renais e carcinoma de células renais, causam aumento da concentração de LDH_1 e, com frequência, inversão da proporção LDH_1:LDH_2 ("*flipped ratio*"). Em tumores de leucócitos (leucemia, linfoma, mieloma múltiplo), a LDH_3 e, muitas vezes, a LDH_4 encontram-se tipicamente aumentadas, enquanto as quantidades relativas de LDH_1 e LDH_2 diminuem (Copur, 1989; Ricerca, 1988; Pandit, 1990). A doença pulmonar pode produzir um padrão semelhante. Aumentos da concentração de LDH_5 e, às vezes, de LDH_4 costumam ser detectados em casos de lesão do músculo esquelético ou lesão hepática tóxica ou isquêmica. A presença de LDH_6 está associada a um prognóstico desfavorável (Ketchum, 1984). Um padrão isomórfico (em que os níveis de LDH total estão elevados e as proporções de isozimas permanecem normais) e um padrão em "lápide" (em que as quantidades relativas de cada isozima são em geral iguais) são tipicamente observados em indivíduos com lesão tecidual difusa, muitas vezes acompanhada de choque ou hipoxemia.

5′-nucleotidase (EC 3.1.3.5)

Bioquímica e fisiologia

A 5'-nucleotidase (5'-NT) é uma monoéster hidrolase fosfórica (enzima de classe 3, Tab. 20.1), também denominada 5'-ribonucleotídio fosfo-hidrolase ou NTP, que catalisa a seguinte reação:

$$\text{A 5'-ribonucleotídeo} + H_2O \rightleftharpoons \text{Um ribonucleosídio} + \text{fosfato} \qquad (20.46)$$

Trata-se de uma fosfatase citoplasmática acoplada à membrana celular que apresenta ampla especificidade para 5'-ribonucleotídios e peso molecular de cerca de 70 kDa. Atua somente em nucleotídios (como ATP ou guanosina 5'-trifosfato [GTP]), e acredita-se que sua função está associada aos processos de produção de adenosina extracelular, absorção de nutrientes e proliferação celular. A 5'-NT é uma metaloproteína, e o zinco parece ser componente integral de sua molécula. Está amplamente distribuída pelo organismo, predominantemente acoplada às membranas celulares (de modo semelhante a ALP e GGT). Deriva sobretudo do fígado. A literatura apresenta revisões detalhadas sobre a 5'-NT (Sunderman, 1990).

Intervalos de referência e variação pré-analítica

A atividade de 5'-NT normalmente é baixa em crianças, aumenta na adolescência e atinge o platô por volta dos 40 anos de idade, quando os níveis da enzima aumentam de forma significativa (Moses, 1986). Os valores de referência independem do sexo e da raça. O conteúdo de 5'-NT aumenta discretamente durante o segundo e o terceiro trimestres da gravidez (Bacq, 1996). De modo similar às enzimas ALP e GGT, os fármacos antiepilépticos podem causar um aumento na atividade da 5'-NT. Todavia, os valores geralmente são inferiores ao dobro dos limites de referência, e menos de 25% dos indivíduos que consomem tais agentes apresentam elevação da atividade da enzima (Fortman, 1985).

Quantificação

A quantificação da 5'-NT é dificultada pelo fato de outras fosfatases – sobretudo a ALP – serem capazes de clivar o substrato utilizado para medir a menor atividade de 5'-NT existente na amostra. As abordagens costumam utilizar quantidades maiores de outros substratos não nucleosídicos para que eles realizem a "inibição competitiva" da ALP (ainda que possam, na verdade, ser metabolizadas pela ALP, essas moléculas a impedem de atuar sobre os fosfatos nucleotídicos). Embora seja mais simples determinar a quantidade de fosfato gerada, não é possível realizar essa quantificação, porque a clivagem de outros fosfatos pela ALP pode tornar os resultados incorretos. Portanto, é necessário quantificar os nucleotídios liberados por ação da 5'-NT. A maioria dos agentes quelantes, como o EDTA, inibe a atividade enzimática, provavelmente por meio da indisponibilização do zinco.

Causas de resultados anormais

Assim como a GGT, a 5'-NT é mais utilizada para determinar se a fonte de elevação dos níveis de ALP é hepática ou óssea. Se por um lado é mais comum que a concentração de 5'-NT esteja elevada em distúrbios colestáticos, a hepatite aguda causa aumento da síntese da enzima pelo fígado e uma discreta elevação de seus níveis plasmáticos (Fukano, 1990). A concentração de 5'-NT aumenta no carcinoma ovariano (Chatterjee, 1981) e na artrite reumatoide, em que seus níveis correlacionam-se com a extensão da inflamação, conforme refletido pela taxa de sedimentação eritrocitária (Johnson, 1999). Sapey et al. (2000) fizeram um estudo prospectivo sobre as enzimas ALP, GGT e 5'-NT em 80 pacientes colestáticos, correlacionando as causas intra-hepáticas (i. e., secundárias à doença parenquimatosa hepática) e extra-hepáticas (i. e., secundárias à obstrução da árvore biliar) às alterações enzimáticas. Eles constataram níveis enzimáticos notavelmente elevados associados às causas extra-hepáticas (em comparação à doença intra-hepática), e as elevações de GGT e 5'-NT estavam independentemente associadas à causa. A proporção GGT/5'-NT diferiu de modo significativo entre os dois grupos, e uma proporção $< 1{,}9$ foi considerada altamente sugestiva de (porém, insensível à) doença intra-hepática (Sapey, 2000).

Lesão musculoesquelética – creatina quinase/fosfoquinase (CK/CPK)

O ensaio básico para essa enzima já foi discutido na seção "Análise enzimática". Essa enzima possui duas isozimas principais, M e B, ambas apresentando a mesma atividade. A CK é composta por três tipos de dímeros: MM (principalmente no músculo esquelético), MB (encontrado sobretudo no tecido cardíaco) e BB (encontrado predominantemente no cérebro e intestino). Conforme discutido no Capítulo 18, a CK-MB, por ser detectada sobretudo no tecido miocárdico, é utilizada como teste sorodiagnóstico no IM. Na presente seção, a CK é discutida como biomarcador da lesão do músculo esquelético.

A lesão muscular esquelética pode ocorrer a partir de uma variedade de fontes. Trauma direto, como ocorre na lesão física (incluindo esportes que envolvem contato), cirurgia, exercício extenuante e injeções intramusculares são causas comuns de elevações brandas dos níveis de CK (até cerca de 5 a 6 vezes os limites de referência). Em tais situações, a concentração de CK tipicamente sofre um rápido aumento e, em seguida, cai também de modo rápido, retornando aos valores basais com uma meia-vida aproximada de 24 horas. Um importante distúrbio clínico associado à lesão muscular aguda é a síndrome maligna neuroléptica. Trata-se de uma complicação rara do tratamento com

fenotiazinas ou outros agentes psicotrópicos. Os indivíduos afetados caracteristicamente apresentam rigidez muscular, febre e elevação das contagens de leucócitos. O teste para CK é considerado diagnóstico para essa doença. É necessário haver o pronto reconhecimento e tratamento da condição para evitar a morte do paciente acometido por essa síndrome. A base do tratamento consiste na suspensão da medicação e no uso de dantroleno, um agente estabilizador muscular (Pelonero, 1998).

O dano crônico muscular provoca uma elevação persistente dos níveis de CK, a qual pode ser tanto branda quanto mais extensiva. A ampla gama de valores normais e a variação pré-analítica observadas em relação aos valores de CK total podem dificultar o reconhecimento de uma lesão muscular discreta que esteja em curso. De uma forma geral, o diagnóstico de lesão muscular em indivíduos assintomáticos requer a detecção de uma elevação persistente, acima dos limites de referência para um grupo de comparação apropriado, mesmo diante da interrupção de quaisquer outros fatores que conhecidamente afetem a CK. As causas comuns de lesão muscular crônica incluem medicações (em particular, inibidores de HMG-CoA redutase e glicocorticoides), miopatias congênitas (como a distrofia muscular de Duchenne), distúrbios inflamatórios (polimiosite e dermatomiosite), hipotireoidismo e consumo abusivo de álcool. Nas miopatias crônicas, os níveis de CK-MB aumentam com frequência, refletindo sua produção pelo músculo em processo de regeneração.

Diante de um dano muscular severo, o indivíduo pode desenvolver um quadro clínico denominado *rabdomiólise*. Em situações como essa, a proporção CK-MB/CK total pode estar acima do normal na ausência de IM (os níveis de troponina cardíaca permanecem normais). Pacientes com doença muscular inflamatória não costumam apresentar essa condição (Kiely, 2000). Além dos níveis normais de troponina cardíaca acompanhados do aumento dos níveis de CK, podem ser identificadas duas isoformas distintas (representando fibras esqueléticas de tipos rápido e lento) de troponina esquelética I do soro (Simpson, 2002). Existem pesquisas em andamento nessa área.

Não há critérios específicos para diferenciar a rabdomiólise das lesões musculares de menor grau. Entre as características que mais merecem atenção, citam-se os níveis mais elevados de CK total (para fins diagnósticos, foi sugerida uma concentração > 20 vezes acima dos limites de referência superiores), aumento e queda rápidos dos níveis de CK e aparecimento de mioglobinúria. Muitos ensaios para detecção de mioglobina (encontrada nos músculos esquelético, liso e cardíaco) são relativamente insensíveis e, além disso, a mioglobina tem meia-vida curta. Por esse motivo, os testes para CK são mais confiáveis para estabelecer o diagnóstico. Sendo uma forma de "síndrome de lise celular", a rabdomiólise está associada à liberação de outros conteúdos celulares, como potássio, fosfato e nucleotídios, que podem ser convertidos em ácido úrico. O teste qualitativo para mioglobina presente na urina é importante, uma vez que ela é potencialmente tóxica para os rins, colocando o paciente em risco de desenvolver insuficiência renal aguda. A mioglobinúria pode levar ao desenvolvimento de necrose tubular aguda, com aparecimento de cálculos pigmentados no sedimento urinário. Caso haja desenvolvimento de insuficiência renal, costumam estar presentes também hipercalemia, hiperfosfatemia e hiperuricemia. Não existe relação direta entre o grau de elevação dos níveis de CK e a probabilidade de desenvolver insuficiência renal (Gabow, 1982; Ward, 1988). Causas comuns de rabdomiólise incluem o uso de certos fármacos (em particular, etanol e cocaína), infecções virais, realização de esforço extremo, hipertermia, trauma (incluindo lesões por esmagamento), isquemia de membros inferiores e miopatias inflamatórias.

Referências bibliográficas

Geral

Brehme CS, Roman S, Shaffer J, et al: Tartrate-resistant acid phosphatase forms complexes with alpha2-macroglobulin in serum. J Bone Miner Res 1999; 14:311–318.

Dasgupta A, Banerjee SK, Datta P: False-positive troponin I in the MEIA due to the presence of rheumatoid factors in serum. Elimination of this interference by using a polyclonal antisera against rheumatoid factors. Am J Clin Pathol 1999; 112:753–756.

Dickerman RD, Pertusi R, Zachariah NY, et al: Anabolic steroid induced hepatotoxicity: Is it overstated? Clin J Sports Med 1999; 9:34–39.

International Union of Biochemistry: Enzyme Nomenclature, 1978: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry of the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego, Academic Press, 1979.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Nomenclature Committee: Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. San Diego, Academic Press, 1992.

Langdon DE: Enzyme neurosis – a clinician's plan for standardization. Ann Intern Med 1994; 121:234–235.

Mader M, Kolbus N, Meihorst D, et al: Human intestinal alkaline phosphatase-binding IgG in patients with severe bacterial infections. Clin Exp Immunol 1994; 95:98–102.

Moss DW, Henderson AR: Clinical enzymology. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999, pp 617–721.

Otto A, Bar J, Birkenmeier G: Prostate-specific antigen forms complexes with human alpha 2-macroglobulin and binds to the alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein. J Urol 1998; 159:297–303.

Podlasek SJ, Dufour DR, McPherson RA: Alterations in lactate dehydrogenase isoenzyme pattern after therapy with streptokinase or streptococcal infection. Clin Chem 1989; 35:1763–1766.

Remaley AT, Wilding P: Macroenzymes: Biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. Clin Chem 1989; 35:2261–2270.

Sosolik RC, Hitchcock CL, Becker WJ: Heterophilic antibodies produce spuriously elevated concentrations of the MB isoenzyme of creatine kinase in a selected patient population. Am J Clin Pathol 1997; 107:506–510.

Van Hoof VO, Deng DT, De Broe ME: How do plasma membranes reach the circulation? Clin Chim Acta 1997; 266:23–31.

Zollner H: Handbook of Enzyme Inhibitors. New York, VCH Publishers, 1989.

Cinética enzimática

Cleland WW: Steady state kinetics. *In* Boyer PD (ed): The Enzymes, Vol 2, 3rd ed. San Diego, Academic Press, 1970, pp 1–65.

Cleland WW: Steady-state kinetics. *In* Sigman DS, Boyer PD (eds): The Enzymes, Vol 19, 3rd ed. San Diego, Academic Press, 1990, pp 99–158.

Cornish-Bowden A: Fundamentals of Enzyme Kinetics, Revised ed. London, Portland Press, 1995.

Fersht A: Structure and Mechanism in Protein Science. New York, Freeman, 1999, Chapters 3–7.

Segal IH: Enzyme Kinetics, New York, Wiley-Interscience, 1993.

Enzimas específicas

Abou-Hatab K, O'Mahony MS, Patel S, Woodhouse K: Relationship between age and plasma esterases. Age Ageing 2001; 30:41–45.

Agbedana EO, Yeldu MH: Serum total, heat and urea stable alkaline phosphatase activities in relation to ABO blood groups and secretor phenotypes. Afr J Med Med Sci 1996; 25:327–329.

Alvarez L, Peris P, Bedini JL, et al: High bilirubin levels interfere with serum tartrate-resistant acid phosphatase determination: Relevance as a marker of bone resorption in jaundiced patients. Calcif Tissue Int 1999; 64:301–303.

Areekul S, Srichairat S, Kirdudom P: Serum and red cell cholinesterase activity in people exposed to organophosphate insecticides. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1981; 12:94–98.

Bacq Y, Zarka O, Brechot JF, et al: Liver function tests in normal pregnancy: A prospective study of 103 pregnant women and 103 matched controls. Hepatology 1996; 23:1030–1034.

Bayer PM, Hotschek H, Knoth E: Intestinal alkaline phosphatase and the ABO blood group system: A new aspect. Clin Chim Acta 1980; 108:81–87.

Beneteau-Burnat B, Baudin B, Morgant G, et al: Serum angiotensin-converting enzyme in healthy and sarcoidotic children: Comparison with the reference interval for adults. Clin Chem 1990; 36:344–346.

Borowsky SA, Lieberman J, Strome S, Sastre A: Elevation of serum angiotensin-converting enzyme level. Occurrence in alcoholic liver disease. Arch Intern Med 1982; 142:893–895.

Brenckman WD Jr, Lastinger LB, Sedor F: Unpredictable fluctuations in serum acid phosphatase activity in prostatic cancer. JAMA 1981; 245:2501–2504.

Bull H, Murray PG, Thomas D, et al: Acid phosphatases. J Clin Pathol: Mol Pathol 2002; 55:65–72.

Revisão recente sobre as fosfatases ácidas, destacando o fosfatase ácida tartarato-resistente e sua função e utilidade clínica em processos que envolvam reabsorção óssea.

Burnett AL, Chan DW, Brendler CB, et al: The value of serum enzymatic acid phosphatase in the staging of localized prostate cancer. J Urol 1992; 148:1832–1834.

Cassidy WM, Reynolds TB: Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury. J Clin Gastroenterol 1994; 19:118–121.

Cerf C, Mesguish M, Gabriel I, et al: Screening patients with prolonged neuromuscular blockade after succinylcholine and mivacurium. Anesth Analg 2002; 94:461–466.

Chatterjee SK, Bhattacharya M, Barlow JJ: Evaluation of 5?-nucleotidase as an enzyme marker in ovarian carcinoma. Cancer 1981; 47:2648–2653.

Chen J, Yam LT, Janckila AJ, et al: Significance of 'high' acid phosphatase activity in the serum of normal children. Clin Chem 1979; 25:719–722.

Collier DS, Pain JA: Acute and chronic retention of urine: Relevance of raised serum prostatic acid phosphatase levels. A prospective study. Urology 1986; 27:34–37.

Constantinescu CS, Goodman DB, Grossman RI, et al: Serum angiotensin-converting enzyme in multiple sclerosis. Arch Neurol 1997; 54:1012–1015.

Copur S, Kus S, Kars A, et al: Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in serum from patients with multiple myeloma. Clin Chem 1989; 35:1968–1970.

Coye MJ, Barnett PG, Midtling JE, et al: Clinical confirmation of organophosphate poisoning by serial cholinesterase analyses. Arch Intern Med 1987; 147:438–442.

Dale JC, O'Brien JF: Determination of angiotensin-converting enzyme levels in cerebrospinal fluid is not a useful test for the diagnosis of neurosarcoidosis. Mayo Clin Proc 1999; 74:535.

Day AP, Feher MD, Chopra R, et al: The effect of benzafibrate treatment on serum alkaline phosphatase isoenzyme activities. Metabolism 1993; 42:839–842.

Deng JT, Hoylaerts MF, Van Hoof VO, et al: Differential release of human intestinal alkaline phosphatase in duodenal fluid and serum. Clin Chem 1992; 38:2532–2538.

Dholakia K, Pitchumoni CS, Agarwal N: How often are liver function tests normal in acute biliary pancreatitis? J Clin Gastroenterol 2004; 38:81–83.

Docci D, Delvecchio C, Turci F, et al: Effect of different dialyzer membranes on serum angiotensin-converting enzyme during hemodialysis. Int J Artif Organs 1988; 11:28–32.

Domar U, Karpe F, Hamsten A, et al: Human intestinal alkaline phosphatase; release to the blood is linked to lipid absorption, but removal from the blood is not linked to lipoprotein clearance. Eur J Clin Invest 1993; 23:753–760.

D'Onofrio GM, Levitt S, Ilett KF: Serum angiotensin converting enzyme in Crohn's disease, ulcerative colitis and peptic ulceration. Aust N Z J Med 1984; 14:27–30.

Dufour DR: Effects of oral contraceptives on routine laboratory tests. Clin Chem 1998; 44:A137.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, et al: Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: A consensus report. Cardiovasc Drugs Ther 2002; 16:149–160.

Relato de uma recente conferência de consenso, analisando as ações da enzima conversora de angiotensina na patologia da doença cardiovascular e o uso de inibidores da ACE como agentes anti-hipertensivos nesses pacientes.

Falezza G, Lechi Santonastaso C, Parisi T, et al: High serum levels of angiotensin-converting enzyme in untreated Addison's disease. J Clin Endocrinol Metab 1985; 61:496–498.

Fortman CS, Witte DL: Serum 5?-nucleotidase in patients receiving anti-epileptic drugs. Am J Clin Pathol 1985; 84:197–201.

Fukano M, Amano S, Hazama F, et al: 5?-Nucleotidase activities in sera and liver tissues of viral hepatitis patients. Gastroenterol Jpn 1990; 25:199–205.

Gabow PA, Kaehny WD, Kelleher SP: The spectrum of rhabdomyolysis. Medicine (Baltimore) 1982; 61:141–152.

Grover SA, Coupal L, Suissa S, et al: The clinical utility of serum lactate dehydrogenase in diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia among hospitalized AIDS patients. Clin Invest Med 1992; 15:309–317.

Gupta SK, Chakraborty M, Mitra K: Serum angiotensin converting enzyme in respiratory diseases. Indian J Chest Dis Allied Sci 1992; 34:19–24.

Hollaar L, Van der Laarse A: Interference of the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in human serum and plasma by LDH from blood cells. Clin Chim Acta 1979; 99:135–142 1979.

Huskic J, Kulenovic H, Culo F: Serum angiotensin-converting enzyme activity in patients with endemic nephropathy. Nephron 1996; 74:120–124.

Ind TE, Iles RK, Carter PG, et al: Serum placental-type alkaline phosphatase activity in women with squamous and glandular malignancies of the reproductive tract. J Clin Pathol 1994; 47:1035–1037.

Isogai M, Yamaguchi A, Hori A, Kaneoka Y: LDH to AST ratio in biliary pancreatitis – a possible indicator of pancreatic necrosis: Preliminary results. Am J Gastroenterol 1998; 93:363–367.

Johnson SM, Patel S, Bruckner FE, et al: 5?-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. Rheumatology 1999; 38:391–396.

Joukyuu R, Mizuno S, Amakawa T, et al: Hereditary complete deficiency of lactate dehydrogenase H-subunit. Clin Chem 1989; 35:687–690.

Kallioniemi OP, Nieminen MM, Lehtinen J, et al: Increased serum placental-like alkaline phosphatase activity in smokers originates from the lungs. Eur J Respir Dis 1987; 71:170–176.

Kanno T, Sudo K, Takeuchi I, et al: Hereditary deficiency of lactate dehydrogenase M-subunit. Clin Chim Acta 1980; 108:267–276.

Kaplan LA, Chen IW, Sperling M, et al: Clinical utility of serum prostatic acid phosphatase measurements for detection (screening), diagnosis, and therapeutic monitoring of prostatic carcinoma; assessment of monoclonal and polyclonal enzymes and radioimmunoassays. Am J Clin Pathol 1985; 84:334–339.

Karlsen RL, Sterri S, Lyngaas S, et al: Reference values for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in children, implications for organophosphate intoxication. Scand J Clin Lab Invest 1981; 41:301–302.

Kato S, Ishii H, Kano S, et al: Evidence that 'lactate dehydrogenase isoenzyme 6' is in fact alcohol dehydrogenase. Clin Chem 1984; 30:1585–1586.

Kerttula Y, Weber TH: Serum angiotensin converting enzyme in pneumonias. J Clin Pathol 1986; 39:1250–1253.

Ketchum CH, Robinson CA, Hall LM, et al: Clinical significance and partial biochemical characterization of lactate dehydrogenase isoenzyme 6. Clin Chem 1984; 30:46–49.

Kiely PD, Bruckner FE, Nisbet JA, Daghir A: Serum skeletal troponin I in inflammatory muscle disease: Relation to creatine kinase, CKMB and cardiac troponin I. Ann Rheum Dis 2000; 59:750–751.

Kyd PA, Vooght KD, Kerkhoff F, et al: Clinical usefulness of bone alkaline phosphatase in osteoporosis. Ann Clin Biochem 1998; 35:717–725.

Lepage L, Schiele F, Gueguen R, et al: Total cholinesterase in plasma: Biological variations and reference limits. Clin Chem 1985; 31:546–550.

Le Treut A, Chevet D, Guenet L, et al: Serum angiotensin-converting enzyme levels in patients with chronic renal failure. Pathol Biol (Paris) 1983; 31:182–185.

Luisetti M, Martinetti M, Cuccia M, et al: Familial elevation of serum angiotensin converting enzyme activity. Eur Respir J 1990; 3:441–446.

Maatman TJ: Comparative analysis of fluctuation of serum tumor markers in advanced cancer of prostate. Urology 1993; 42:672–676.

Macours N, Poels J, Hens K, et al: Structure, evolutionary conservation, and functions of angiotensin- and endothelin-converting enzymes. Int Rev Cytol 2004; 239:47–97.

Recente visão geral da enzima conversora de angiotensina e da enzima conversora de endotelina, analisando a estrutura e o papel biológico dessas moléculas.

Manolio TA, Burke GL, Savage PJ, et al: Sex- and race-related differences in liver-associated serum chemistry tests in young adults in the CARDIA study. Clin Chem 1992; 38:1853–1859.

Matsubayashi S, Tamai H, Kobayashi N, et al: Angiotensin-converting enzyme and anorexia nervosa. Horm Metab Res 1988; 20:761–764.

Mimori Y: Sarcoidosis: Correlation of HRCT findings with results of pulmonary function tests and serum angiotensin-converting enzyme assay. Kurume Med J 1998; 45:247–256.

Moses GC, Tuckerman JF, Henderson AR: Biological variance of cholinesterase and 5?-nucleotidase in serum of healthy persons. Clin Chem 1986; 32:175–177.

Moss DW: Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. Clin Chim Acta 1997; 257:133–140.

Moss DW, Raymond FD, Wile DB: Clinical and biological aspects of acid phosphatase. Crit Rev Clin Lab Sci 1995; 32:431–467.

Mukherjea M, Mukherjee P, Biswas R, et al: Effect of medroxyprogesterone acetate contraception on human serum enzymes. Int J Fertil 1981; 26:35–39.

Muller F: Prenatal biochemical screening for neural tube defects. Childs Nerv Syst 2003; 19:433–435.

Muthuswamy PP, Lopez-Majano V, Ranginwala M, et al: Serum angiotensin-converting enzyme (SACE) activity as an indicator of total body granuloma load and prognosis in sarcoidosis. Sarcoidosis 1987; 4:142–148.

Narayan P, Tewari A, Jacob G, et al: Differential suppression of serum prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen by 5-alpha-reductase inhibitor. Br J Urol 1995; 75:642–646.

Nijhawan R, Wierzbicki AS, Tozer R, et al: Antiepileptic drugs, hepatic enzyme induction and raised serum alkaline phosphatase isoenzymes. Int J Clin Pharmacol Res 1990; 10:319–323.

Ninomiya Y, Kioi S, Arakawa M: Serum angiotensin converting enzyme activity in ex-smokers. Clin Chim Acta 1987; 164:223–226.

Oksanen V, Fyhrquist F, Somer H, et al: Angiotensin converting enzyme in cerebrospinal fluid: A new assay. Neurology 1985; 35:1220–1223.

Ouellette DR, Kelly JW, Anders GT: Serum angiotensin-converting enzyme level is elevated in patients with human immunodeficiency virus infection. Arch Intern Med 1992; 152:321–324.

Pandit MK, Joshi BH, Patel PS, et al: Efficacy of serum lactate dehydrogenase and its isozymes in monitoring the therapy in patients with acute leukemia. Indian J Pathol Microbiol 1990; 33:41–47.

Panteghini M, Pagani F: Biological variation in bone-derived biochemical markers in serum. Scand J Clin Lab Invest 1995; 55:609–616.

Panteghini M, Pagani F, Bonora R: Pre-analytical and biological variability of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen in serum from patients with prostatic pathology. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30:135–139.

Pelonero AL, Levenson JL, Panduranji AK: Neuroleptic malignant syndrome: A review. Psychiatr Serv 1998; 49:1163–1172.

Power WJ, Neves RA, Rodriguez A, et al: The value of combined serum angiotensin-converting enzyme and gallium scan in diagnosing ocular sarcoidosis. Ophthalmology 1995; 102:2007–2011.

Price A, Attwood SE, Grant JB, et al: Measurement of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase concentrations in serum before and 1–42 days after transurethral resection of the prostate and orchidectomy. Clin Chem 1991; 37:859–863.

Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, et al: Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. Lancet 1995; 346:89–90.

Quist J, Hill AR: Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. Chest 1995; 108:415–418.

Reiners C, Gramer-Kurz E, Pickert E, et al: Changes of serum angiotensin-I-converting enzyme in patients with thyroid disorders. Clin Physiol Biochem 1988; 6:44–49.

Reynoso G, Elias EG, Mittelman A: The contribution of the intestinal mucosa to the total serum alkaline phosphatase activity. Am J Clin Pathol 1971; 56:707–712.

Ricci LR, Hoffman SA: Prostatic acid phosphatase and sperm in the post-coital vagina. Ann Emerg Med 1982; 11:530–534.

Ricerca BM, Storti S, Campisi S, et al: Serum lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in non-Hodgkin's lymphomas. Int J Biol Markers 1988; 3:237–242.

Romer FK, Emmertsen K: Serum angiotensin-converting enzyme in malignant lymphomas, leukaemia and multiple myeloma. Br J Cancer 1980; 42:314–318.

Rotenberg Z, Weinberger I, Davidson E, et al: Significance of isolated increases in total lactate dehydrogenase and its isoenzymes in serum of patients with bacterial pneumonia. Clin Chem 1988; 34:1503–1505.

Sakata T, Takenaga N, Endoh T, et al: Diagnostic significance of serum angiotensin-converting enzyme activity in biochemical tests with special reference of chronic liver diseases. Jpn J Med 1991; 30:402–407.

Salo JO, Rannikko S, Haapiainen R: Serum acid phosphatase in patients with localised prostatic cancer, benign prostatic hyperplasia or normal prostates. Br J Urol 1990; 66:188–192.

Salvaggio A, Periti M, Miano L, et al: Body mass index and liver enzyme activity in serum. Clin Chem 1991; 37:720–723.

Sapey T, Mendler M-H, Guyader D: Respective value of alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase and 5? nucleotidase serum activity in the diagnosis of cholestasis: a prospective study of 80 patients. J Clin Gastroenterol 2000; 30:259–263.

Sarris AH, Majlis A, Dimopoulos MA, et al: Rising serum lactate dehydrogenase often caused by granulocyte- or granulocyte-macrophage colony stimulating factor and not tumor progression in patients with lymphoma or myeloma. Leuk Lymphoma 1995; 17:473–477.

Schernthaner G, Schwarzer C, Kuzmits R, et al: Increased angiotensin-converting enzyme activities in diabetes mellitus: Analysis of diabetes type, state of metabolic control and occurrence of diabetic vascular disease. J Clin Pathol 1984; 37:307–312.

Schiele F, Artur Y, Floc'h AY, et al: Total, tartrate-resistant, and tartrate-inhibited acid phosphatases in serum: Biological variations and reference limits. Clin Chem 1988; 34:685–690.

Schiele F, Vincent-Viry M, Fournier B, et al: Biological effects of eleven combined oral contraceptives on serum triglycerides, gamma-glutamyl-transferase, alkaline phosphatase, bilirubin and other biochemical variables. Clin Chem Lab Med 1998; 36:871–878.

Schweisfurth H, Schioberg-Schiegnitz S, Kuhn W, et al: Angiotensin I converting enzyme in cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. Klin Wochenschr 1987; 65:955–958.

Schweisfurth H, Schmidt M, Brugger E, et al: Alterations of serum carboxypeptidases N and angiotensin-I-converting enzyme in malignant diseases. Clin Biochem 1985; 18:242–246.

Simpson JA, Labugger R, Hesketh GG, et al: Differential detection of skeletal troponin I isoforms in serum of a patient with rhabdomyolysis: markers of muscle injury? Clin Chem 2002; 48:1112–1114.

Singer F, Talavera W, Zumoff B: Elevated levels of angiotensin-converting enzyme in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Chest 1989; 95:803–806.

Smith RL, Ripps CS, Lewis ML: Elevated lactate dehydrogenase values in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. Chest 1988; 93:987–992.

Steinherz PG, Steinherz LJ, Nisselbaum JS, et al: Transient, marked, unexplained elevation of serum alkaline phosphatase. JAMA 1984; 252:3289–3292.

Studdy P, Bird R, James DG: Serum angiotensin-converting enzyme (SACE) in sarcoidosis and other granulomatous disorders. Lancet 1978; 2:1331–1334.

Sunderman FW Jr: The clinical biochemistry of 5?-nucleotidase. Ann Clin Lab Sci 1990; 20:123–139.

Tanada S, Higuchi T, Nakamura T, et al: Evaluation of exercise intensity indicated by serum lactate dehydrogenase activity in healthy adults. Acta Biol Hung 1993; 44:153–160.

Theodorsen L: Collection and storage of samples for the determination of prostatic acid phosphatase in serum. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1985; 179:57–65.

Thompson PJ, Kemp MW, McAllister WA, et al: Angiotensin-converting enzyme. Investigation of diurnal variation, the effect of a large dose of prednisolone, and prednisolone pharmacokinetics in patients with sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1986; 134:1075–1077.

Trundle D, Marcial G: Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. Ann Clin Lab Sci 1988; 18:345–352.

Ucar G, Yildirim Z, Ataol E, et al: Serum angiotensin converting enzyme activity in pulmonary diseases: Correlation with lung function parameters. Life Sci 1997; 61:1075–1082.

Valenzuela GJ, Munson LA, Tarbaux NM, et al: Time-dependent changes in bone, placental, intestinal, and hepatic alkaline phosphatase activities in serum during human pregnancy. Clin Chem 1987; 33:1801–1806.

Vogelzang NJ, Lange PH, Goldberg E: Absence of sperm-specific lactate dehydrogenase-x in patients with testis cancer. Oncodev Biol Med 1982; 3:269–272.

von Eyben FE: A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors. Clin Biochem 2001; 34:441–454.

Revisão sobre a isozima 1 da lactato desidrogenase como possível marcador sérico em pacientes com tumores de células germinativas.

von Eyben FE, Liu FJ, Amato RJ, Fritsche HA: Lactate dehydrogenase isoenzyme 1 is the most important LD isoenzyme in patients with testicular germ cell tumor. Acta Oncol 2000; 39:509–517.

Wadstrom J, Wenk M, Huber P: Serum half life of prostatic acid phosphatase. Urol Res 1985; 13:131–132.

Ward MM: Factors predictive of acute renal failure in rhabdomyolysis. Arch Intern Med 1988; 148:1553–1557.

Whyte MP, Walkenhorst DA, Fedde KN, et al: Hypophosphatasia: Levels of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:2142–2148.

Wiesen AR, Byrd JC, Hospenthal DR, et al: Transient abnormalities in serum bilirubin and lactate dehydrogenase levels following red blood cell transfusions in adults. Am J Med 1998; 104:144–147.

Wolf PL: Clinical significance of serum high-molecular-mass alkaline phosphatase, alkaline phosphatase–lipoprotein-X complex, and intestinal variant alkaline phosphatase. J Clin Lab Anal 1994; 8:172–176.

CAPÍTULO 21

Avaliação da função hepática

Matthew R. Pincus MD PhD, Philip Tierno PhD, D. Robert Dufour MD

Função hepática normal 307
Funções metabólicas 307
Funções sintéticas 312
Testes de lesão hepática 314
Níveis de enzimas plasmáticas 314
α-fetoproteína (AFP) 316
Marcadores autoimunes 316
Marcadores de infecção pelo vírus da hepatite 317
Diagnóstico das doenças hepáticas 320
Hepatite 320
Congestão passiva crônica 321
Cirrose 321
Diagnóstico e acompanhamento de cirrose, fibrose e inflamação necrotizante do fígado por meio de métodos não invasivos e utilizando analitos séricos 321
Correlações bioquímicas e clínicas da cirrose 322
Obstrução biliar pós-hepática e pós-hepatocítica 323
Lesões que ocupam espaço 323
Insuficiência hepática fulminante 323
Referências bibliográficas 324

PONTOS-CHAVE

- O fígado é composto por três sistemas: o hepatócito, que está relacionado às reações metabólicas e à síntese e degradação macromolecular (especialmente de proteínas); o sistema biliar, que está envolvido com o metabolismo da bilirrubina e dos sais biliares; e o sistema reticuloendotelial, que tem a ver com o sistema imune e a produção de heme e metabólitos da globina (p. ex., bilirrubina).
- A função de cada um desses sistemas pode ser medida de forma conveniente e praticamente não invasiva, pela determinação dos níveis séricos de analitos específicos, conforme o conhecido perfil de teste de função hepática.
- Uma das causas mais comuns de lesão hepática aguda é a hepatite viral, principalmente dos tipos A, B e C. Todas essas variantes da hepatite induzem elevações dos níveis séricos das aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT, respectivamente).
- O diagnóstico de hepatite viral pode ser feito pela triagem de antígenos virais, especialmente no caso da hepatite B, e da triagem de IgM e IgG dirigida a antígenos virais específicos. A confirmação do diagnóstico de uma forma particular de hepatite viral é realizada com auxílio de técnicas de diagnóstico molecular apropriadas, como PCR em tempo real (RT-PCR), empregando iniciadores (*primers*) que codificam sequências de genes virais.
- O diagnóstico de doenças hepáticas específicas, incluindo hepatite, cirrose, obstrução biliar aguda, lesões ocupadoras de espaço, doenças autoimunes e insuficiência hepática fulminante, pode ser realizado a partir da detecção de padrões específicos de testes séricos de função hepática, bem como da presença de anticorpos específicos no soro.

Função hepática normal

O fígado é o maior e mais complexo órgão do trato gastrintestinal (GI). De forma geral, abrange três sistemas. O primeiro deles – o sistema hepatocítico bioquímico – é responsável pela vasta maioria das atividades metabólicas que ocorrem no corpo, incluindo a síntese de proteínas, o metabolismo aeróbio e anaeróbio da glicose e de outros açúcares, a síntese e a quebra de glicogênio, o metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos, as intervenções em aminoácidos e ácido dicarboxílico via transaminases (aminotransferases), a síntese e o metabolismo de lipoproteínas, o metabolismo xenobiótico (p. ex., metabolismo de fármacos, usualmente envolvendo o sistema oxidativo do citocromo P450), o armazenamento de ferro e vitaminas (como A, D e B_{12}) e a síntese de hormônios (como angiotensinogênio, fator de crescimento insulina-símile I e tri-iodotironina). É também o local de depuração de muitos outros hormônios, como insulina, PTH, estrógenos e cortisol. Singularmente, o fígado é o sítio onde a amônia é metabolizada em ureia.

Também deve ser observado que todo o conteúdo de albumina do organismo é sintetizado no fígado, assim como todas as proteínas que atuam como fatores de coagulação, com exceção do fator de von Willebrand. Este é sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos. Pacientes com doença hepática podem apresentar sinais ou sintomas relacionados a um distúrbio envolvendo quaisquer uma dessas funções.

O segundo sistema hepático mais importante é o *sistema hepatobiliar*. Esse sistema está relacionado ao metabolismo da bilirrubina – um processo que envolve o transporte da bilirrubina pelo interior do hepatócito, sua conjugação ao ácido glicurônico e sua secreção nos canalículos biliares, além do sistema êntero-hepático. Por fim, há ainda o *sistema reticuloendotelial*, ou seja, as *células de Kupffer*. Essas células são um tipo de macrófago e estão envolvidas com: (a) o sistema imunológico, mesmo como um dos principais locais de defesa contra bactérias intestinais e um local primário para remoção de complexos antígeno-anticorpo da circulação; e (b) a quebra da hemoglobina proveniente dos eritrócitos, dando origem à bilirrubina que, junto à bilirrubina oriunda do baço, entra no hepatócito.

Na doença hepática, a manifestação dos sintomas clínicos por vezes ocorre tardiamente, após a progressão da doença, portanto torna-se importante detectar a presença e até mesmo o início de tais condições. Felizmente, muitas vezes é possível ter acesso a uma avaliação da função hepática determinando-se o conteúdo sérico de analitos segundo um perfil de teste conhecido como "testes de função hepática". Muitos desses componentes não são exclusivamente hepáticos, contudo possibilitam um diagnóstico acurado quando são avaliados em conjunto. No Capítulo 8, são destacados os teste de função hepática e sua interpretação.

O presente capítulo aborda os testes laboratoriais mais comumente empregados para avaliar a função e as lesões hepáticas, bem como os métodos utilizados em sua quantificação, os testes para determinação das causas de lesão e os perfis de anomalias laboratoriais observados em doenças hepáticas específicas.

Funções metabólicas

Bilirrubina

Metabolismo normal da bilirrubina

A bilirrubina é o principal metabólito do heme – o anel tetrapirrólico de ligação ao ferro encontrado em hemoglobina, mioglobina e citocromos. Aproximadamente 250 a 350 mg de bilirrubina são produzidos diariamente em indivíduos adultos sadios, sendo que cerca de 85% desse total deriva da renovação de hemácias senescentes (Chowdhury, 1988; Berk, 1994a; Berlin, 1981). Em macrófagos, principalmente

esplênicos, a metemoglobina das hemácias é quebrada e gera cadeias livres de globina e heme. O anel porfirínico do heme é oxidado pela oxidase do heme microssomal, resultando na produção de biliverdina (um composto de cadeia reta) e na liberação de ferro. Nessa reação de abertura do anel, há liberação de 1 mol de CO (monóxido de carbono) que, por sua vez, é transportado definitivamente como carboxiemoglobina. Os níveis séricos da carboxiemoglobina podem ser úteis no diagnóstico da anemia hemolítica, como já discutido no Capítulo 8. A biliverdina, então, é reduzida à bilirrubina (Fig. 21.1) pela enzima dependente de NADPH – a biliverdina redutase. Em seguida, a bilirrubina é transportada principalmente no sistema porta, sobretudo ligada à albumina, e segue para o fígado. Uma vez no fígado, a bilirrubina entra nos hepatócitos através da região da membrana celular que está em contato com os sinusoides, conforme ilustrado na Figura 21.2.

À medida que a bilirrubina livre entra nos hepatócitos, mais bilirrubina se dissocia da albumina. Esse processo é altamente eficiente. A depuração de bilirrubina não conjugada normalmente é de cerca de 5 mg/kg/dia ou, em um indivíduo que pesa 75 kg, aproximadamente 400 mg/dia (Berk, 1994 b). A bilirrubina não conjugada apresenta meia-vida curta. Após a inoculação, cerca de 60% da bilirrubina marcada aparece junto aos hepatócitos em 5 minutos (Bloomer, 1973). A taxa de depuração se eleva com o aumento da concentração de bilirrubina não conjugada, chegando, pelo menos, a 4 mg/dL (Berk, 1994 b).

Em sua forma isomérica mais comum (*trans*-), a bilirrubina é altamente insolúvel em água, sendo que a maior parte é transportada na forma acoplada à albumina e apenas uma pequena fração permanece livre. A luz pode causar fotoisomeração, transformando a forma *trans* em uma forma *cis* mais compacta, que é bem mais hidrossóluvel e, portanto, excretável pela urina (Onishi, 1986). Esse processo constitui a base da fototerapia no tratamento da hiperbilirrubinemia (não conjugada) neonatal. A via de depuração hepática da bilirrubina é ilustrada na Figura 21.2. Repare que a bilirrubina não conjugada entra no hepatócito pela região da membrana celular adjacente aos sinusoides, opostamente à face que entra em contato com os canalículos biliares.

Existem dois mecanismos de entrada da bilirrubina no hepatócito: a difusão passiva e a endocitose mediada por receptores. De acordo

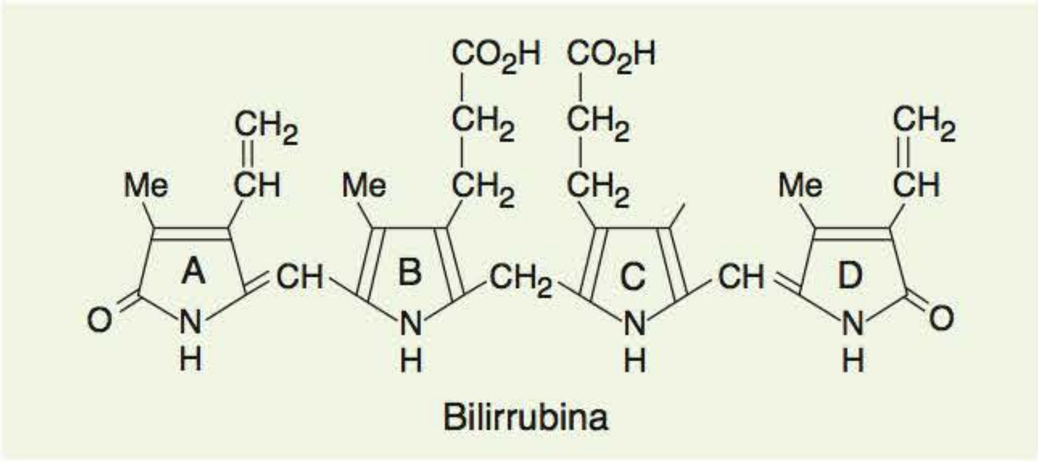


Figura 21.1 Estruturas de moléculas críticas no metabolismo da bilirrubina em diglicuronida. A bilirrubina é transportada para dentro do hepatócito, onde é convertida em diglicuronida e, em seguida, é secretada nos canalículos (Crawford, 1988 b).

com o resumo apresentado na Figura 21.2, uma vez no hepatócito, a bilirrubina passa de um complexo proteico a outro em uma cadeia. Primeiramente, se complexifica às proteínas conhecidas como Y e Z e, em seguida, liga-se de modo sequencial a um complexo proteico denominado ligandina. A partir desse complexo, é transportada ao

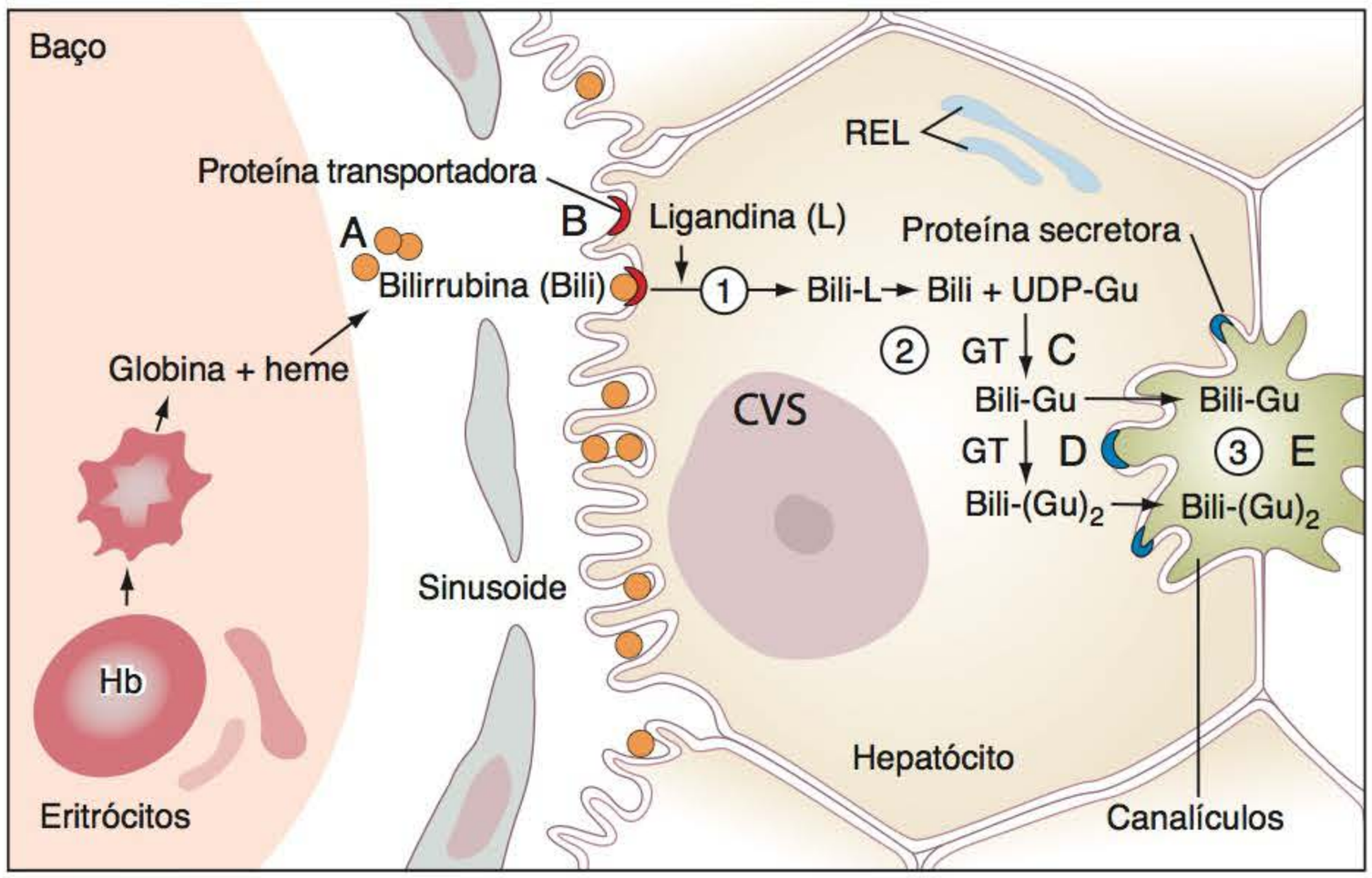


Figura 21.2 Resumo esquemático da via de transporte e do metabolismo da bilirrubina (indicada por "Bili" e também com círculos marrons). A bilirrubina (Bili) é produzida a partir da metabolização do heme primariamente no baço. Em seguida, é transportada para o fígado ligada à albumina. Para entrar no hepatócito, liga-se a uma proteína transportadora (crescentes em vermelho) e atravessa a membrana celular (círculo 1) entrando na célula. Liga-se às proteínas Y e Z (omitidas) e, então, à ligandina para ser transportada até o retículo endoplasmático liso (REL). Uma vez no REL, a bilirrubina é conjugada a ácido glicurônico pela UDP glicuronil transferase-1 (círculo 2), produzindo mono e diglicuronídeos de bilirrubina – Bili-Gu e Bili-$(Gu)_2$. A bilirrubina conjugada é, em seguida, secretada dentro dos canalículos (círculo 3) pela proteína de transporte *ATP-binding cassete* MRP2/cMOAT/ABCC2 (crescentes azuis). Em doenças de superprodução (**A**), como na anemia hemolítica, a taxa de produção de bilirrubina não conjugada excede a capacidade de depuração do fígado, acarretando um aumento transiente dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada. Tanto na síndrome de Gilbert como na de Crigler-Najjar, mutações que afetam o gene coficador da UDP glicuronil transferase (UDPGT1A1) (em C) resultam no acúmulo da bilirrubina não conjugada nos hepatócitos e, por fim, no soro. Na síndrome de Gilbert, também pode haver um defeito envolvendo a proteína transportadora de bilirrubina (em B). Mutações no gene MRP2/cMOAT/ABCC2 resultam em proteínas secretoras defeituosas e, consequentemente, no acúmulo de bilirrubina conjugada dentro dos hepatócitos e, por fim, no soro. Tais alterações levam à síndrome de Dubin-Johnson (**D**), uma doença autossômica recessiva. A hiperbilirrubinemia conjugada também é encontrada na síndrome de Rotor, possivelmente induzida por vírus. Em adultos, o bloqueio de qualquer um dos principais ductos biliares, em especial o ducto biliar comum, por cálculos ou lesões espaçosas (como os tumores) (**E**) constitui as causas mais comuns de hiperbilirrubinemia conjugada.

retículo endoplasmático liso (REL), onde se transforma em substrato da enzima glicuronil transferase. Essa enzima catalisa a esterificação das cadeias laterais do ácido propiônico da bilirrubina com o ácido glicurônico (presente como ácido uridina difosfoglicurônico) para formar principalmente o conjugado diglicuronida, mostrado na Figura 21.1 (Chowdhury, 1988). Também são formados monoglicuronida e um pouco de triglicuronida. A proporção de pigmentos monoconjugado e diconjugado na bile é 1:4, enquanto essa mesma proporção é igual a 1:1 no plasma, sugerindo que o refluxo de monoconjugados para o plasma ocorre mais prontamente.

Conforme o esquema ilustrado na Figura 21.2, a bilirrubina conjugada é transportada em seguida até a face canalicular do hepatócito para ser diretamente secretada dentro dos canalículos por meio de um mecanismo dependente de energia. Apenas a bilirrubina conjugada pode ser excretada diretamente dentro dos canalículos, sendo que a bilirrubina não conjugada é incapaz de atravessar as membranas nesse local.

Depois de ser excretada nos canalículos e, definitivamente, no trato GI, a bilirrubina passa por mais uma etapa metabólica, dessa vez por ação das bactérias intestinais. Como resultado, sofre desconjugação e oxidação ou redução, dando origem a compostos que, tomados em conjunto, são denominados urobilinogênio e urobilina. Esses compostos podem ser reabsorvidos no intestino. A maior parte do urobilinogênio absorvido é reexcretada pelo fígado. Uma fração minoritária pode ser eliminada pela urina. Grandes quantidades são detectadas na urina em condições que levam à hiperbilirrubinemia ou em casos nos quais o fígado não pode secretar prontamente o urobilinogênio absorvido no intestino. Por fim, o urobilinogênio intestinal é convertido nos pigmentos das fezes, como a estercobilina. A ausência desses pigmentos resulta em fezes com cor de argila que, muitas vezes, constituem um dos primeiros sinais de comprometimento do metabolismo da bilirrubina.

Quando está presente no soro, a bilirrubina conjugada pode ligar-se covalentemente à albumina e produzir biliproteína ou bilirrubina-Δ (Lauff, 1982; McDonagh, 1984). Enquanto a bilirrubina conjugada tem meia-vida inferior a 24 horas, a bilirrubina-Δ tem meia-vida semelhante à da albumina (17 dias) (Fevery, 1986). Por esse motivo, causa icterícia prolongada durante a recuperação de lesões hepatocelulares (Van Hootegem, 1985) ou de obstrução biliar (Kozaki, 1998). A bilirrubina conjugada, sendo hidrossolúvel, pode ser filtrada pelo glomérulo e aparecer na urina, onde é detectada por meio do exame com vareta medidora de nível. A quantificação do urobilinogênio, contudo, acrescenta pouca informação aos testes-padrão de função ou lesão hepática (Binder, 1989). A concentração de bilirrubina urinária aumenta na maioria dos pacientes que apresenta níveis séricos elevados de bilirrubina conjugada (Binder, 1989).

Desarranjos do metabolismo da bilirrubina. De acordo com a Figura 21.2, em cada etapa do processamento da bilirrubina, uma possível lesão talvez esteja levando ao aumento dos níveis séricos de bilirrubina conjugada ou não conjugada. Cada caso, por sua vez, é discutido a seguir.

Causas da elevação dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada

Hemólise. Conforme discutido no Capítulo 8, nas anemias hemolíticas, o aparecimento de bilirrubina não conjugada se deve à elevação anormal dos níveis de hemoglobina liberada a partir dos eritrócitos. Se a taxa de formação de bilirrubina excede sua taxa de depuração hepática, isto é, diante da *superprodução de bilirrubina*, os níveis séricos dessa molécula aumentarão. Praticamente todo o conteúdo de bilirrubina produzida será da forma não conjugada. Essa situação é particularmente provável em recém-nascidos, nos quais a atividade de glicuronil transferase é baixa. Assim, um modo de confirmar o diagnóstico de anemia hemolítica é detectar, em indivíduos adultos, níveis séricos elevados de bilirrubina indireta. Usualmente, esses níveis não estão muito altos e, em geral, são da ordem de 1,5 a 3 mg/dL.

As síndromes de Gilbert e de Crigler-Najjar são causadas por mutações e deleções genéticas. Na síndrome de Gilbert, caracterizada por uma discreta hiperbilirrubinemia não conjugada, a lesão genética mais comum parece ser a inserção de duas bases na região promotora do gene UGT1A1. Como resultado, observam-se diminuição das taxas de transcrição (Maruo, 2004; Kraemer, 2002) e atividade enzimática global reduzida (para aproximadamente 30% do valor normal). Na síndrome de Crigler-Najjar, mais grave e caracterizada por elevados níveis séricos de bilirrubina não conjugada, são detectadas mutações múltiplas nesse mesmo gene, incluindo *frame shifts* (mutações genéticas que resultam na modificação das bases do mRNA, tornando-o sem registro) nas regiões de leitura, inserção de códons de parada e substituições de aminoácidos críticos. Todas essas modificações dão origem a um espectro de proteínas não funcionais, cuja perda funcional varia de discreta a total (Kraemer, 2002).

Na *síndrome de Gilbert*, que acomete uma parcela significativa da população (3 a 5%), embora seja necessário, o defeito genético não é suficiente para causar a doença. Em um estudo realizado por Persico et al. (1999), constatou-se que um percentual significativo de indivíduos do sexo masculino com esse defeito apresentavam hiperbilirrubinemia, enquanto nenhuma das mulheres com o déficit enzimático apresentou elevação dos níveis séricos de bilirrubina (Bosma, 1995). Em alguns pacientes com síndrome de Gilbert, observou-se que a taxa de captação de ânions orgânicos exibia uma correlação negativa com os níveis séricos de bilirrubina (Persico, 1999). Desse modo, foi sugerido que um defeito adicional poderia estar presente e ser o responsável pela hiperbilirrubinemia, a qual poderia estar relacionada a um déficit de transporte na membrana sinusoidal do hepatócito. Nessa condição, é típico o conteúdo de bilirrubina total – praticamente constituído da forma não conjugada – estar elevado (2 a 3 mg/dL). Tais níveis podem aumentar ainda mais durante o jejum, contudo raramente ultrapassam 5 mg/dL. Uma vez que ocorre difusão passiva da bilirrubina dentro dos hepatócitos, essa condição não costuma ser grave e pode resultar em elevações discretas dos níveis de bilirrubina, como aquelas que são observadas na anemia hemolítica, conforme foi descrito.

A síndrome de Gilbert talvez tenha sido superdiagnosticada, pois seu diagnóstico é mais frequente em adultos jovens com idade entre 20 e 30 anos. Entretanto, o intervalo de valores normais de bilirrubina é dependente da idade; e, de fato, os valores máximos são detectados em adolescentes e adultos jovens (Rosenthal, 1984). Essa característica será discutida adiante.

Nas formas mais graves da *síndrome de Crigler-Najjar*, ou seja, na doença de tipo I com perda da função proteica determinada por homozigose, a hiperbilirrubinemia não conjugada torna-se marcante. Os níveis de bilirrubina são quase sempre maiores que 5 mg/dL e causam icterícia, mas podem ultrapassar 20 mg/dL. Bebês afetados desenvolvem uma severa hiperbilirrubinemia que, tipicamente, leva ao *kernicterus* (icterícia nuclear) e à deposição de bilirrubina no cérebro, afetando, em particular, os gânglios basais e principalmente o núcleo lenticular. Como resultado, ocorre disfunção motora severa e retardamento. Na doença de tipo II, menos grave, a atividade enzimática encontra-se reduzida em cerca de 10% da atividade normal, e a sobrevivência até a idade adulta é uma possibilidade (Berk, 1994 c). O *kernicterus* transforma-se em uma ameaça real quando os níveis de bilirrubina excedem 20 mg/dL. É essencial tratar com fototerapia os bebês que apresentam essa condição, como já discutido, a fim de promover a excreção da bilirrubina não conjugada.

Causas da elevação dos níveis séricos de bilirrubina conjugada

Déficits de excreção: síndrome de Dubin-Johnson. Em outro erro inato do metabolismo, denominado Síndrome de Dubin-Johnson, há um bloqueio da excreção de bilirrubina no interior dos canalículos em decorrência de defeitos no transportador de ânions orgânicos multiespecífico canalicular *ATP-binding cassette* (ABC), o MRP2/cMOAT/ABCC2 (Paulusma, 1997; Tsujii, 1999; Gottesman, 2001). Essa proteína integra uma família de aproximadamente 100 proteínas transportadoras diferentes, que compartilham homologia na região ABC. Essas proteínas contêm domínios transmembrana que estão envolvidos no reconhecimento de substratos, os quais são transportados através, dentro e fora das membranas celulares, e incluem proteínas relacionadas à resistência farmacológica múltipla (RFM) a agentes quimioterápicos utilizados na terapia do câncer. Alguns dos membros dessa família utilizam ABCs para regular canais iônicos. Várias doenças genéticas resultam de mutações envolvendo os transportadores, entre as quais estão síndrome de Dubin-Johnson, fibrose cística, degeneração macular associada à idade, doença de Tangier e colestase intra-hepática familiar progressiva (Gottesman, 2001).

A síndrome de Dubin-Johnson está associada ao aumento dos níveis plasmáticos de bilirrubina conjugada, tipicamente acompanhado de icterícia branda (bilirrubina total igual a 2 a 5 mg/dL) e intensa pigmentação escura do fígado, decorrente do acúmulo de lipofuscina. Assim, a bilirrubina conjugada se acumula junto ao hepatócito e, eventualmente, difunde-se de volta para a circulação, sendo detectada no soro. Esse erro inato por vezes é confundido com a síndrome de Rotor, cuja origem pode ser viral e também apresenta um bloqueio da excreção da bilirrubina conjugada, embora a pigmentação hepática esteja ausente (Berk, 1994 d). Em tais circunstâncias, a biópsia hepática muitas vezes revela a presença de corpos de inclusão citosólicos nos hepatócitos.

Obstrução biliar. Em adultos, a colelitíase é a causa mais comum de hiperbilirrubinemia. Essa condição resulta da presença de cálculos biliares (compostos tanto de bilirrubina como de colesterol), mais frequentemente no ducto biliar comum (coledocolitíase). Na maioria das vezes, os pacientes com essa condição são mulheres brancas que deram à luz no início da meia-idade (o que deu origem à semi-mnemônica "*fair, fecund, fortyish female*", mulher clara, fecunda e quarentona). A obstrução biliar decorrente da colelitíase resulta na elevação dos níveis de bilirrubina total, com mais de 90% de bilirrubina direta. Em mais de 90% desses pacientes, observa-se um aumento concomitante dos níveis de ALP, os quais são variáveis e frequentemente superiores a 300 UI/L.

Condições inflamatórias envolvendo o trato biliar, como a colangite ascendente, também resultam em elevação dos níveis séricos de bilirrubina direta e ALP, como será discutido adiante. Os níveis elevados de bilirrubina direta muitas vezes excedem 5 mg/dL. Na sepse causada por bactérias Gram-negativas, pode haver uma condição semelhante a uma inflamação branda no trato biliar e, como resultado, ocorrem aumentos discretos dos níveis de bilirrubina direta de 2 a 3 mg/dL. Há também uma elevação concomitante da concentração de ALP, que atinge valores de 200 a 300 UI/L.

Na hepatite, em que ocorre destruição tóxica dos hepatócitos de origem viral, química ou traumática, a necrose focal e/ou danos celulares resultam no bloqueio tanto da conjugação da bilirrubina como da excreção de bilirrubina conjugada. Assim, verifica-se uma elevação dos níveis de bilirrubina tanto direta como indireta. Os níveis séricos de bilirrubina são variáveis, dependendo do grau de severidade da infecção e da extensão da doença. Na hepatite viral, como a hepatite B, conforme discutido adiante, os níveis séricos de bilirrubina muitas vezes chegam a cerca de 5 a 10 mg/dL ou mais.

À parte da doença hepática, elevações da concentração de bilirrubina conjugada podem ser detectadas em poucas doenças. Condições como septicemia e nutrição parenteral total, além de certos fármacos, como os andrógenos, costumam induzir aumento dos níveis de bilirrubina conjugada, no entanto os mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos (Zimmerman, 1979). O jejum provoca aumento da concentração de bilirrubina não conjugada em indivíduos normais, porém esse efeito é mais intenso na síndrome de Gilbert.

Testes laboratoriais para bilirrubina

A bilirrubina é tipicamente quantificada com ácido sulfanílico diazotizado, que forma um conjugado de composto azo com os anéis porfirínicos da bilirrubina, resultando em produtos de reação que absorvem fortemente a 540 nm. Como a bilirrubina não conjugada reage lentamente, substâncias aceleradoras, como a cafeína ou o metanol, são empregadas para determinar o conteúdo de bilirrubina total. A deleção desses aceleradores permite a quantificação da bilirrubina de reação direta ou bilirrubina direta.

Até o início dos anos 1980, aceitava-se que a bilirrubina direta era igual à bilirrubina conjugada. A introdução da tecnologia do esfregaço seco, empregando espectrofotometria diferencial para quantificar separadamente a bilirrubina conjugada e a não conjugada, conduziu à constatação de que a soma dessas duas entidades não correspondia ao conteúdo de bilirrubina total e à caracterização da bilirrubina Δ. Aproximadamente 70 a 80% da bilirrubina conjugada e da bilirrubina Δ, além de um pequeno percentual de bilirrubina não conjugada, é quantificada por meio do ensaio de bilirrubina direta (Lo, 1983; Doumas, 1991). Embora existam bons dados sustentando a determinação dos níveis de bilirrubina conjugada em vez de sua estimação a partir da bilirrubina direta (Arvan, 1985; Doumas, 1987), o ensaio da bilirrubina direta é ainda amplamente empregado. A acurácia desse ensaio depende do manuseio da amostra e da composição do reagente. A exposição prolongada à luz provoca fotoisomeração e aumenta a concentração de bilirrubina de reação direta (Ihara, 1997). O uso de agentes umidificadores ou de tampões com pH incorreto aumenta a quantidade de bilirrubina não conjugada detectada como bilirrubina direta (Doumas, 1991). Tipicamente, a concentração de bilirrubina direta deve ser de 0 a 0,1 mg/dL em indivíduos normais, sendo raro detectar valores iguais a 0,2 mg/dL na ausência de doença envolvendo o fígado ou o trato biliar.

Os valores de referência para bilirrubina total variam conforme a idade e o sexo. Os níveis dessa substância propriamente chegam ao pico próximo aos 14 a 18 anos de idade e, ao redor dos 25 anos, caem até atingir os níveis estáveis detectados nos indivíduos adultos (Rosenthal, 1983; Notter, 1985; Zucker, 2004). Homens apresentam valores mais altos que as mulheres, seja qual for a idade do indivíduo (Rosenthal, 1983; Notter, 1985; Carmel, 1985; Dufour, 1998 a; Zucker, 2004). O exercício extenuante causa um aumento significativo dos valores de bilirrubina, em comparação àqueles observados em indivíduos sedentários ou que praticam exercícios físicos de forma crônica (Dufour, 1998 b). Indivíduos afro-americanos apresentam níveis de bilirrubina significativamente mais baixo que indivíduos de outros grupos étnicos.

Outros testes metabólicos

A amônia é metabolizada exclusivamente no fígado. A amônia deriva principalmente do metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos. Uma parte é também produzida em certas reações metabólicas, como na que envolve a ação da enzima glutaminase sobre a glutamina, resultando na produção de ácido glutâmico e amônia. Quando isso ocorre, a amônia pode ser metabolizada somente no fígado, pois esse órgão é o único que contém as enzimas essenciais ao ciclo de Krebs-Henseleit ou ciclo da ureia. Ao final desse processo, a amônia (tóxica) é convertida em ureia (não tóxica), e esta é excretada. Nesse ciclo, amônia, carbamoil fosfato sintetase condensada com CO_2 e ATP atuam na formação de fosfato de carbamoil que, na etapa determinante da velocidade, promove a "carboxamidação" do grupo Δ-amino da ornitina para formar citrulina com auxílio da enzima ornitina carbamoiltransferase (OCT), uma enzima que é exclusivamente hepática. A deficiência congênita dessa enzima ou de outras enzimas que participam do ciclo da ureia leva ao aumento dos níveis de amônia no soro e no líquido cerebrospinal (LCE) (Batshaw, 1994).

Uma característica diferencial do tecido hepático é sua capacidade de regeneração. Para que a função hepática seja perdida, é preciso que mais de 80% do fígado seja destruído. Se a maior parte do órgão for destruída em decorrência de condições como a cirrose (Stahl, 1963) ou, menos comumente, insuficiência hepática aguda fulminante, incluindo a síndrome de Reye (Heubi, 1984; Sunheimer, 1994), as enzimas do ciclo da ureia deixam de estar presentes. Em consequência, formam-se acúmulos de amônia tóxica e de alguns aminoácidos intermediários desse ciclo, como a arginina, cujos efeitos são conhecidamente neurotóxicos. O resultado é o aumento da concentração de amônia e desses aminoácidos intermediários na circulação e no sistema nervoso central (SNC), dando origem à encefalopatia hepática. Além disso, na maioria dos pacientes cirróticos, observa-se uma derivação portossistêmica intra-hepática que faz a amônia se desviar do fígado e ser detectada em elevada concentração no soro. Os altos níveis séricos de amônia, portanto, muitas vezes apontam a existência de alguma forma de insuficiência hepática, embora outras condições também possam induzi-los.

Em pacientes com cirrose ou insuficiência hepática fulminante, há certa controvérsia com relação a ser a própria amônia a causadora da encefalopatia hepática. É possível que essa doença seja causada por outras toxinas, as quais também se acumulam em decorrência da ausência de destoxificação hepática. Um dos argumentos utilizados com frequência é a inexistência de uma correlação entre o grau de severidade da encefalopatia e a concentração sérica de amônia (Lewis, 2003). Como contra-argumento, afirma-se que, embora os níveis venosos de amônia não se correlacionem com o grau de encefalopatia (Stahl, 1963), os níveis *arteriais* de amônia geralmente

apresentam correlação com a gravidade da doença. Além disso, em pacientes com cirrose ou insuficiência hepática fulminante, a redução dos níveis séricos de amônia invariavelmente diminui o grau de severidade da encefalopatia (Pincus, 1991). Um importante mecanismo pelo qual a amônia pode causar toxicidade ao SNC é por meio da capacidade de reduzir a concentração de ácido γ-aminobutírico (GABA, *gama-aminobutyric acid*), um neurotransmissor criticamente importante do SNC. Essa redução se dá pela reação da amônia com o ácido glutâmico, com formação de glutamina via reversão da reação catalisada pela glutaminase (Butterworth, 1987). O processo resulta na depleção do ácido glutâmico no SNC. Entretanto, como o GABA é formado diretamente a partir da descarboxilação do ácido glutâmico, seus níveis acabam diminuindo e acarretando efeitos potencialmente sérios sobre a neurotransmissão. Uma vez que amônia provoca acúmulo de glutamina no SNC, foi sugerido que – ao menos na hiperamoninemia induzida por ácido valproico – os níveis desse metabólito no LCE podem ser utilizados para diagnóstico e monitoramento da encefalopatia hepática.

Os elevados níveis séricos de amônia detectados na encefalopatia hepática são mais comumente reduzidos pela lactulose, que é um agente metabolizado a ácido lático por bactérias intestinais específicas. O ácido produzido no lúmen intestinal captura a amônia como íon amônio. Este é incapaz de se difundir através das membranas intestinais e, por esse motivo, acaba sendo excretado. No intestino, as bactérias produtoras de amônia são removidas pelo tratamento com antibióticos, como a neomicina.

Ensaios para amônia. A amônia é tipicamente quantificada por meio de ensaios enzimáticos, utilizando glutamato desidrogenase. Essa enzima catalisa a reação do α-cetoglutarato com a amônia para formar glutamato, tendo a oxidação de NADPH a NADP como indicador (diminuição da absorbância a 340 nm). A amônia também é quantificada pelo método do esfregaço seco, utilizando tampões de pH alcalino para converter todos os íons amônio em gás amônia e azul de bromofenol como indicador da reação (Huizenga, 1994). Sendo a amônia um produto do metabolismo celular, os métodos empregados na coleta e no transporte da amostra são críticos na prevenção de artefatos que levem à detecção de níveis falsamente elevados. O sangue arterial é a amostra preferida para quantificação da amônia. Embora o sangue venoso não seja recomendado, nos casos em que for utilizado, é preciso reduzir ao mínimo o uso de torniquetes, bem como evitar cerrar e relaxar o punho durante a coleta. As amostras devem ser mantidas em água gelada até o momento da separação do componente celular do plasma (Howanitz, 1984; da Fonseca-Wollheim, 1990).

Lipídeos

Colesterol e outros lipídeos (Cap. 17). Sendo o fígado essencial à síntese das lipoproteínas e às interconversões, os distúrbios hepáticos muitas vezes desequilibram o metabolismo lipoproteico. Embora nenhuma anomalia desse tipo seja empregada no diagnóstico de patologias hepáticas, é importante reconhecer que podem resultar de doenças hepáticas. Nos casos de *lesão hepática severa*, entre os quais a *cirrose*, tais anormalidades incluem uma redução da fração HDL, em particular de HDL_3 (e raramente de HDL_2), bem como alteração da distribuição de outras lipoproteínas, decorrente, em parte, da deficiência das seguintes lecitinas: colesterol aciltransferase (LCAT, a enzima que esterifica o colesterol) e lipoproteína lipases. Como resultado, o indivíduo afetado apresenta hipertrigliceridemia (níveis de TGs em torno de 250 a 500 mg/dL). Além disso, a diminuição da síntese de LCAT e das lipoproteínas lipases provoca aumento dos níveis de colesterol não esterificado no sangue e nas frações de HDL, aumento dos níveis de fosfolipídeos (incluindo lecitinas) no sangue e na fração VLDL, bem como aumento da concentração sérica de TGs. Em termos globais, o padrão lipoproteico resultante é o mesmo da conhecida β-lipoproteína, cuja migração é anormal, característico da hiperlipoproteinemia de tipo III (Cap. 17). Todavia, em pacientes cirróticos desnutridos, apesar das deficiências enzimáticas críticas, podem ser detectados baixos níveis de colesterol (< 100 mg/dL).

Ao contrário, na *lesão hepática induzida por álcool*, observa-se um aumento da expressão de apoA-I induzido pelo álcool. Assim, se o paciente continuar consumindo essa substância, poderá apresentar conteúdo de HDL (em especial, a HDL3) aumentado.

Como na cirrose há diminuição dos níveis de apoA-I, os níveis séricos dessa proteína têm sido utilizados para diagnosticar a doença pelo método do índice de PGA da atividade da transferase (Teare, 1993). Trata-se de uma combinação da proteína apoA-I com a atividade de γ-glutamil transferase (discutida adiante), a qual aumenta, e o tempo de protrombina, o qual também aumenta (índice PGA). Esse índice é diferente em casos de hepatite alcoólica e, portanto, permite distinguir as duas condições eliminando a necessidade de realizar biópsia hepática.

Na *colestase*, a regurgitação do conteúdo biliar para dentro da circulação sanguínea resulta em acúmulo de lipoproteína X (LpX), já discutido no Capítulo 17, e elevação dos níveis de lipídeos biliares. Tendo em vista que a LpX transporta alta concentração de colesterol não esterificado, os níveis séricos de colesterol podem se tornar acentuadamente elevados (Turchin, 2005).

Sais biliares. Os sais biliares são produtos do metabolismo do colesterol e facilitam a absorção de gorduras no intestino. São armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino após as refeições, por meio da contração da vesícula mediada pela colecistoquinina. Embora seja incomum usá-los no diagnóstico de anomalias da função hepática, podem ser empregados no diagnóstico da colestase por serem importantes constituintes de uma quantidade substancial da bile na excreção da bilirrubina. Do mesmo modo, na obstrução biliar severa, o acúmulo de sais biliares no soro causa uma doença sintomática que se apresenta como uma coceira intratável, ainda que existam controvérsias (Jones, 1999). Os sais biliares primários – colato e quenodeoxicolato – são produzidos no fígado. Sua excreção se dá pelos sistemas biliar e êntero-hepático, além do trato intestinal, onde são metabolizados pelas bactérias locais e produzem os sais biliares secundários (i. e., litocolato, deoxicolato e ursodeoxicolato) (Carey, 1988) por 7-α-desidroxilação bacteriana no lúmen intestinal. Sendo um produto terminal do metabolismo dos sais biliares no homem, o ursodeoxicolato é produzido por isomerização dos sais biliares secundários e tem sido empregado com fins terapêuticos nas doenças colestáticas (Rost, 2004). No sistema microssomal (discutido anteriormente), os sais biliares são conjugados em glicina e taurina, além de também serem sulfatados e submetidos à glicuronidação. A conjugação dos sais biliares em taurina e sulfatos aumenta com o grau de severidade da colestase em condições que provocam obstrução do escoamento da bile. A recirculação dos sais biliares no fígado se dá por reabsorção a partir do íleo terminal, onde quase todo o deoxicolato e cerca de 75% do quenodeoxicolato são reabsorvidos. Na cirrose, ocorre uma diminuição desigual dos níveis de ácido cólico e da proporção entre sais biliares primários e secundários. Diante da colestase, não há formação de sais biliares secundários e, assim, a proporção entre sais biliares primários e secundários aumenta acentuadamente.

Em pacientes normais, a depuração renal dos sais biliares é negligível. Nos pacientes com colestase, por outro lado, ocorre elevação da excreção renal desses sais, principalmente na forma de sulfatos e glicuronídeos. Sais biliares de jejum normais podem excluir a doença do parênquima hepático em pacientes com síndrome de Gilbert (Vierling, 1982), anteriormente discutida. Do mesmo modo, também é preciso considerar que a produção hepática defeituosa de sais biliares – os quais auxiliam na solubilização do conteúdo da bile – pode predispor à formação de bilirrubinato ou cálculos de colesterol, bem como obstrução biliar pós-hepática.

A análise dos sais biliares deve ser feita em amostras de soro obtidas de pacientes em jejum, ou em amostras de soro coletadas em um intervalo de tempo específico após as refeições, uma vez que a ingestão de alimentos causa elevação significativa dos níveis de ácidos biliares. Os sais da bile podem ser quantificados por meio de muitas técnicas, contudo os métodos cromatográficos, em particular o HPLC (discutido no Cap. 23), são mais amplamente utilizados e permitem a separação dos diferentes tipos de sais biliares.

Metabolismo de fármacos

Muitos xenobióticos, como os fármacos, são metabolizados no fígado, principalmente nos microssomos hepáticos. Existem séries complexas de reações, muitas das quais dependem do citocromo P450, que estão envolvidas na oxidação desses compostos. As isoformas do citocromo P450 determinam se as substâncias exógenas específicas são ou não convertidas em metabólitos. Algumas dessas

isoformas são CYP1A e CYP2B (citocromo P450 1A e 2B, respectivamente). Com frequência, a conversão dos xenobióticos em metabólitos por meio desse sistema envolve duas fases: as reações da fase I promovem oxidação/hidroxilação, enquanto as reações da fase II conjugam o metabólito (ou composto parental) a compostos polares, como ácido glicurônico, glicina, taurina e sulfato. Na doença hepática mais grave, em que há dano microssomal, essa capacidade de metabolização dos agentes xenobióticos está comprometida. Dessa forma, a capacidade dos hepatócitos de metabolizar fármacos pode ser utilizada para determinar o grau de dano hepático. Nesse caso, em geral é administrada uma dose conhecida de fármaco com marcação radioativa (usualmente, ^{13}C) e quantifica-se o $^{13}CO_2$ exalato pelo indivíduo no decorrer de uma respiração. Duas categorias de testes de respiração foram desenvolvidas com base na etapa limitante da taxa de metabolismo. No primeiro grupo – que inclui fármacos como aminopirina, cafeína e diazepam – todos são metabolizados a taxas que independem do fluxo de sangue para o fígado, mas que dependem apenas da atividade enzimática de diferentes citocromos P450 (p. ex., CYP1A). O segundo grupo é composto por fármacos como metacetina, fenacetina e eritromicina, cujas taxas de metabolização são dependentes da velocidade do fluxo sanguíneo, isto é, suas taxas de metabolização são mais rápidas que suas taxas de distribuição para o fígado. Esses tipos de testes dinâmicos aparentemente não são tão úteis no diagnóstico inicial da doença hepática. Em vez disso, são mais úteis para estimar a extensão do dano ao fígado diante de uma doença hepática conhecida (Nista, 2004). Uma interferência que complica a interpretação dos resultados de tais testes é a dependência da desmetilação da aminopirina (o grupo metil é oxidado a CO_2) contida na vitamina B_{12}. Em casos de deficiência dessa vitamina, quantidades de $^{13}CO_2$ abaixo do normal são exaladas em decorrência dos baixos níveis de vitamina, não necessariamente dano hepático. As taxas de metabolização da cafeína, em geral, diminuem com o avanço da idade, porém são aumentadas pelo tabagismo – achados estes que podem complicar a interpretação dos resultados.

Funções sintéticas

Síntese proteica

O fígado é sítio de síntese da maioria das proteínas plasmáticas. (As principais exceções constituem as imunoglobulinas e o fator de von Willebrand). É no fígado que ocorre mais de 90% da síntese de todas as proteínas e 100% da síntese de albumina. Assim, uma destruição extensa do tecido hepático resultará em baixos níveis séricos de proteína total e de albumina. Na cirrose, além da destruição dos hepatócitos, outra causa da diminuição da produção de proteínas é a hipertensão porta, que leva à diminuição da distribuição de aminoácidos para o fígado. Duas quantificações essenciais da função hepática são, portanto, a determinação dos níveis séricos de proteína total e de albumina. Todavia, é preciso lembrar que existem ainda outras causas importantes da queda desses parâmetros, as quais são doença renal, desnutrição, enteropatias perdedoras de proteína e, menos frequentemente, doenças inflamatórias crônicas. Tais causas alternativas devem ser sempre consideradas ao avaliar o *status* funcional do fígado.

Nas doenças hepáticas em que há lesão ou necrose disseminadas, como na insuficiência hepática fulminante e na cirrose, há uma queda dos níveis plasmáticos das proteínas sintetizadas no fígado. Desse modo, as proteínas cuja meia-vida é maior tendem a ter a concentração diminuída mais lentamente. A meia-vida da albumina é de cerca de 20 dias, por isso seus níveis séricos caem mais devagar que os níveis das proteínas cujas meias-vidas são mais curtas. Entre as proteínas produzidas no fígado que apresentam meia-vida curta estão o fator VII (4 a 6 horas), a transtiretina (1 a 2 dias) e a transferrina (6 dias).

A determinação dos níveis séricos de proteína costuma ser baseada no método do ácido biurético. Esse método reflete a capacidade de os grupos C=O do esqueleto peptídico das proteínas formarem complexos coloridos com o cobre e, então, apresentarem forte absorbância a 540 nm. Alguns métodos empregam método que envolve a ligação a um corante, no qual as proteínas formam complexos com o azul de Coomassie. A albumina forma um complexo de cor única que se cora com verde de bromocresol e púrpura de bromocresol, de modo a apresentar absorbância máxima em comprimentos de onda discretamente diferentes e, assim, permitir a quantificação direta por espectrofotometria (Ihara, 1991). O intervalo de referência dos níveis séricos normais de proteína total geralmente são da ordem de 6 a 7,8 g/dL. Ao menos 60% desse conteúdo deve ser constituído de albumina, cuja faixa de normalidade é de cerca de 3,5 a 5 g/dL.

A eletroforese de proteínas séricas e a quantificação com imunoglobulinas (Igs) podem revelar alterações características da doença hepática, as quais são discutidas no Capítulo 19. Na cirrose, é típico que a albumina esteja significativamente diminuída, assim como as bandas α_1, α_2 e β (principalmente, transferrina). Entretanto, há sempre um aumento policlonal da concentração de Igs que produz o característico padrão de "ponte" β-γ, conforme discutido no Capítulo 19. Na hepatite autoimune, a diminuição da concentração de albumina é tipicamente acompanhada de um aumento policlonal marcante da concentração de IgG. A cirrose biliar primária é acompanhada de um aumento policlonal da concentração de IgM.

Albumina

A albumina é a principal proteína produzida pelo fígado. A síntese hepática é aumentada pela diminuição da pressão oncótica do plasma, sendo diminuída por ação das citocinas (principalmente, interleucina-6). Enquanto a síntese normal de albumina é da ordem de 120 mg/kg/dia, a taxa de síntese pode se tornar duas vezes maior diante de uma pressão oncótica reduzida. Uma diminuição da concentração de albumina constitui um dos principais aspectos prognósticos de pacientes com cirrose. Sua quantificação foi discutida anteriormente e é detalhada no Capítulo 19. A albumina é também uma proteína de transporte para muitas substâncias, tanto endógenas (p. ex., bilirrubina e hormônio da tireoide) como exógenas (p. ex., fármacos). Baixos níveis séricos de albumina decorrentes de doença hepática são quase sempre causados pela destruição massiva do tecido hepático, sendo detectados primariamente na cirrose e, com mais frequência, secundariamente ao alcoolismo. A queda da concentração de albumina ocorre em paralelo à queda do conteúdo de proteína total. Como a albumina é o coloide intravascular osmoticamente ativo, a hipoalbuminemia muitas vezes resulta em edema. Na cirrose, em que a resistência ao fluxo sanguíneo está maior nos sinusoides e causa hipertensão porta, o efeito combinado da elevada pressão hidrostática no sistema porta e da reduzida pressão osmótica do coloide resulta na formação de ascite – um achado comum nessa doença.

Outras proteínas séricas

Enquanto a maioria das proteínas discutidas no Capítulo 19 é produzida no fígado, duas delas possuem especial importância na detecção de distúrbios hepáticos.

α_1-antitripsina (AAT). A α_1-antitripsina – a α_1-globulina mais abundante – é o principal inibidor de proteases existente no plasma. Embora seu nome indique a inibição da tripsina, essa proteína também inibe outras serina-proteases, como a elastina. A AAT é codificada pelo gene *Pi*, situado no cromossomo 14. Existem diversas variantes genéticas que são produzidas por mutações pontuais, as quais levam a substituições de um único aminoácido (Chappell, 2004). A variante mais comum (M) está associada a níveis séricos normais de AAT. A mutação presente nas variantes S e Z impedem a glicação normal da proteína, levando ao acúmulo de AAT nos hepatócitos com redução dos níveis plasmáticos dessa proteína (Propst, 1994). Nos Estados Unidos, o genótipo esmagador é o Pi^{MM}, em que Pi constitui o inibidor de protease. Todos os demais genótipos (Pi^{ZZ}, Pi^{SS}, Pi^{SZ}, Pi^{MZ} e Pi^{MS}) apresentam atividade de antiprotease mensurável, com exceção do raro genótipo nulo Pi^{-}. Se a atividade de antiprotease do fenótipo MM é adotada como referencial, então a atividade determinada por ZZ será de 15%, a de SS será de 60%, a de MZ será de 57,5% e a de MS será de 80%. Adultos com genótipo Pi^{ZZ} são mais propensos ao desenvolvimento de enfisemas com relativa prematuridade, em consequência de ausência de inibição da atividade da tripsina sobre a elastina da parede alveolar. Esses pacientes Pi^{ZZ} tendem a acumular proteína Z nos hepatócitos periportais, onde se formam corpúsculos citoplasmáticos, sendo que também pode haver desenvolvimento de hepatite neonatal. Curiosamente, embora bebês possam morrer em decorrência de uma lesão hepática, essa condição se resolve na

maioria dos casos e progride para cirrose em apenas 3% dos bebês afetados (Sveger, 1988). Há uma probabilidade maior de lesão hepática em pacientes adultos heterozigotos ou homozigotos para a variante Z da AAT, possivelmente devido ao acúmulo de AAT no retículo endoplasmático com consequente indução de autofagia e apoptose nos hepatócitos (Teckman, 2004). A fenotipagem de AAT pode ser realizada pela focalização isoelétrica (Propst, 1994). Sendo um reagente de fase aguda, os níveis séricos dessa enzima podem permanecer normais em indivíduos heterozigotos MZ.

Ceruloplasmina. A ceruloplasmina é a principal proteína sérica contendo cobre, sendo também a enzima que circula em maior concentração. É uma ferroxidase, essencial à conversão do ferro ao estado férrico que possibilita a ligação à transferrina. Níveis baixos de ceruloplasmina são detectados na doença de Wilson, um raro distúrbio congênito (1 a cada 30.000 indivíduos) associado a uma mutação – entre várias possíveis – no gene localizado no cromossomo 13, que codifica uma adenosina trifosfatase celular (ATPase) denominada ATP7B. Essa enzima é um novo membro da família de ATPases de tipo p transportadoras de cátions (Bull, 1993). É uma proteína expressa principalmente no fígado que promove a secreção de cobre no plasma, acoplada à síntese de ceruloplasmina, bem como no trato biliar. Foram detectadas mais de 200 mutações do gene envolvido na doença de Wilson, as quais resultam no comprometimento da função da ATP7B e em acúmulo intracelular de cobre (Langner, 2004). Nos hepatócitos, o excesso de cobre no meio intracelular acaba se depositando nos lisossomos e induzindo reações com radicais livres, incluindo peroxidação lipídica e instabilidade da membrana. O dano hepático resultante pode levar à hepatite crônica ativa, à cirrose ou, mais raramente, à insuficiência hepática fulminante. Além disso, esteatose e inflamação também podem ocorrer como resultado dessa condição. O cobre se deposita no SNC, em especial no núcleo lenticular dos gânglios basais, causando doença neuropsiquiátrica. Pode, ainda, depositar-se na borda da íris, onde forma os conhecidos anéis de Keyser-Fleischer.

O diagnóstico da doença de Wilson é feito com base em achados clínicos e laboratoriais típicos, tais como níveis baixos de ceruloplasmina no soro – que podem ser quantificados tanto por imunoensaio como por ensaio enzimático –, aumento da excreção urinária de cobre e aumento do conteúdo hepático de cobre. Enquanto a ceruloplasmina encontra-se caracteristicamente diminuída na doença de Wilson, fatores que provocam o aumento de sua síntese (p. ex., citocinas, gravidez, estrógenos) podem fazer com que os níveis da proteína permaneçam normais em até 15% dos pacientes, de uma forma global, bem como em 35% dos pacientes que apresentam manifestações hepáticas da doença de Wilson (Dufour, 1997), particularmente hepatite wilsoniana aguda (Berman, 1991). O teste genético é o modo mais confiável de estabelecer o diagnóstico, apesar da dificuldade para realizá-lo, uma vez que foram identificadas mais de 200 mutações causadoras da doença.

Fatores de coagulação

Como já mencionado, à exceção do fator de von Willebrand, que é produzido por células endoteliais e megacariócitos, as proteínas da coagulação são sintetizadas no fígado. Além disso, os inibidores da coagulação (como antitrombina III, α_2-macroglobulina, α_1-antitripsina, inibidor de esterase C1 e proteína C) também são sintetizados nesse órgão. Além disso, os produtos da degradação da fibrina são catabolisados no fígado. A diminuição da síntese de antitrombina III em pacientes cirróticos e com hepatite pode ser causada pelo aumento do consumo ou por uma alteração do fluxo transcapilar (Kelly, 1987). A coagulopatia mais comumente observada na insuficiência hepática (i. e., cirrose e insuficiência hepática fulminante aguda) é a coagulopatia intravascular disseminada (CID). Esse assunto é discutido no Capítulo 8 e ao longo da Parte V deste livro. Essa condição é caracterizada pelo aumento do consumo dos fatores de coagulação e das plaquetas, causando trombocitopenia e elevações dos tempos de protrombina (PT) e de tromboplastina parcial (PTT). O mecanismo postulado foi a diminuição da síntese dos fatores de inibição da coagulação, a diminuição da depuração dos fatores de coagulação ativados ou a liberação de tromboplastina tecidual pelos hepatócitos (Kelly, 1986). A quebra dos produtos da fibrina, detectada na CID, foi encontrada em até 80% dos pacientes com doença hepática que não apresentavam evidências de fibrinólise (Van de Water, 1986). É importante que o diagnóstico da CID seja confirmado pela detecção da elevação dos níveis sanguíneos de D-dímero, como descrito na seção que aborda a hemostasia e a trombose (Parte V). Em alguns casos de insuficiência hepática, as contagens plaquetárias estão diminuídas em decorrência do sequestro em um baço aumentado, em consequência de hepatoesplenomegalia. Essa condição, combinada à elevação de PT e PTT causada pela síntese diminuída dos fatores de coagulação, pode estar mascarada e se apresentar como CID. Em tais circunstâncias, os níveis de D-dímero não se encontram elevados e, portanto, excluem esse diagnóstico.

Conforme descrito na Parte V, o teste de PT e a determinação associada da proporção de sensibilidade internacional talvez constituam o teste laboratorial requisitado com maior frequência para detecção de anormalidades da coagulação associadas ao fígado. O PT mede a eficácia do sistema de coagulação extrínseco em que o fator VII é ativado pelo fator tecidual. Uma vez que o fator VII é sintetizado exclusivamente no fígado, sua quantificação pode ser empregada para avaliar o *status* da função hepática. Muitas vezes, o PT é computado como INR (*international normalized ratio*) – a proporção padronizada internacional que tenta padronizar todas as quantificações de PT em função do método considerado "padrão-ouro" para determinação desse parâmetro, utilizando o índice de sensibilidade internacional (ISI), conforme descrito na Parte V.

Algumas ressalvas quanto à utilização do PT e do INR para avaliar a função hepática. Como PT e PTT determinam o *status* das cascatas de coagulação (extrínseca e intrínseca, respectivamente), quaisquer distúrbios da coagulação produzirão respostas anormais de PT e/ou PTT, independentemente da função hepática. Além disso, em pacientes com colestase (i. e., doença do trato biliar) sem nenhuma disfunção hepatocítica (p. ex., cirrose ou insuficiência hepática fulminante), a absorção intestinal de vitamina K lipossolúvel pode estar comprometida, em razão dos baixos níveis de sais biliares que permitem seu transporte através da membrana. Uma vez que a biossíntese dos fatores II, VII, IX e X pela via da carboxilação depende da vitamina K, anomalias envolvendo a coagulação são frequentes. Por esse motivo, em pacientes com colestase, é possível detectar níveis séricos normais das formas precursoras inativas desses fatores de coagulação, conforme discutido adiante. A correção do PT pela administração de vitamina K usualmente é viável quando o paciente com doença hepática colestática apresenta fator V normal.

Da mesma forma, o uso de INR na avaliação da função hepática pode conduzir a resultados errôneos. Como discutido na Parte V, o INR se baseia nos valores de PT para pacientes tratados com coumadina (que bloqueia principalmente o sistema extrínseco). Sendo assim, sua adequação à avaliação de coagulopatias não induzidas por coumadina tem sido questionada, especialmente diante da constatação de que o PT aumenta bem menos com um ISI menor em pacientes com doença hepática submetidos ao tratamento com coumadina (Kovacs, 1994; Ts'ao, 1994; Johnston, 1996; Robert, 1996).

Os PTs são empregados no cálculo do escore MELD. O PT é parte integral do escore do modelo de doença hepática em estágio terminal (MELD, *model for end-stage liver disease*) utilizado na avaliação da prioridade do transplante de fígado na doença hepática (Trotter, 2004). Esse escore é um número calculado com base nos valores de bilirrubina, creatinina e INR. Embora pareça predizer com acurácia a mortalidade de 3 meses para pacientes que aguardam um transplante de fígado (Farnsworth, 2004), o escore deve ser utilizado com cautela, seja porque os intervalos de referência dos analitos diferem entre os laboratórios e, assim, dificultam sua padronização, seja por causa das ressalvas quanto ao uso dos valores de INR, como descrito anteriormente.

Des-γ-carboxiprotrombina (DCP)

Os fatores de coagulação dependentes de vitamina K (II, VII, IX, X) são sintetizados no fígado e requerem uma modificação pós-traducional mediada por essa vitamina (γ-carboxilação de um determinado número de resíduos terminais de ácido glutâmico em ácido γ-carboxiglutâmico). Tal modificação deve ocorrer antes da secreção no sangue, a qual é necessária à atividade funcional desses fatores na cascata de coagulação. O precursor não modificado da protrombina (DCP) é detectado em alta concentração no soro de pacientes com

carcinoma hepatocelular. O DCP é quantificado utilizando-se dois anticorpos monoclonais (19B7 e MU-3). A elevação dos níveis de DCP em tais pacientes é preditiva da diminuição do tempo de sobrevida (Nagaoka, 2003). Entretanto, os ensaios para DCP não apresentam o mesmo uso geral da α-fetoproteína (discutido a seguir) no diagnóstico e acompanhamento dessa doença.

Testes de lesão hepática

Níveis de enzimas plasmáticas

Como células de alta complexidade metabólica, os hepatócitos contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Quando há uma lesão hepática, pode haver vazamento dessas enzimas para o plasma e, portanto, sua detecção é útil ao diagnóstico e monitoramento da lesão hepática. Embora tais enzimas sejam discutidas de modo mais completo no Capítulo 20, uma compreensão de sua localização celular e dos padrões de alterações enzimáticas torna-se indispensável ao entendimento dos achados associados a diversos tipos de doença hepática.

Localização celular das enzimas

Junto ao hepatócito, as enzimas mais comumente quantificadas são encontradas em locais específicos. O tipo de lesão hepática determina o padrão de alterações enzimáticas. A Figura 21.3 ilustra os locais onde são encontradas as enzimas hepatocíticas mais importantes. As enzimas citoplasmáticas são LDH, AST e ALT. As enzimas mitocondriais, como a isozima mitocondrial da AST, são liberadas diante do dano à mitocôndria. Processos obstrutivos elevam os níveis das enzimas canaliculares, como ALP e GGT.

Mecanismos de liberação de enzimas

As enzimas são liberadas dos hepatócitos como resultado de lesões à membrana celular que causam diretamente a extrusão do conteúdo citoplasmático. Além disso, agentes como o etanol provocam a liberação de AST mitocondrial a partir dos hepatócitos, bem como sua expressão na superfície celular (Zhou, 1998 a). O acúmulo dos sais biliares com obstrução canalicular causa liberação de fragmentos de membrana que contêm enzimas ligadas (Schlaeger, 1982; Moss, 1997). Pode haver aumento da síntese de GGT e, em menor grau, de ALP com o uso de medicação indutora da síntese de enzimas microssomais, notavelmente etanol, fentoína e carbamazepina (Aldenhovel, 1988).

Aminotransferases (transaminases). Nessa categoria, existem duas enzimas que possuem grande utilidade diagnóstica: AST – também conhecida como glutamato oxaloacetato transaminase sérica (SGOT, *serum glutamate oxaloacetate transaminase*) – e ALT – anteriormente denominada glutamato piruvato transaminase sérica (SGPT, *serum glutamate pyruvate transaminase*). Essas enzimas catalisam a transferência reversível de um grupo amino de aspartato (AST) ou de alanina (ALT) ao α-cetoglutarato para formar glutamato mais o cetoácido correspondente do aminoácido inicial (i. e., oxaloacetato ou piruvato, respectivamente). Ambas as enzimas requerem piridoxal fosfato (vitamina B_6) como cofator. Adotando a ALT como exemplo: a alanina reage com o piridoxal fosfato para formar piruvato e piridoxina. Esta, por sua vez, reage com α-cetoglutarato para formar glutamato mais piridoxal fosfato regenerado.

No cerne dessas reações, reside o cofator piridoxal fosfato (vitamina B_6). Em muitos ensaios séricos para ALT e AST, considera-se que o soro do paciente forneça a devida complementação de piridoxal fosfato – uma circunstância que não se aplica. Ilustrando esse aspecto com um caso mais pungente: um paciente, sabidamente alcoólatra, foi admitido em um hospital com provável diagnóstico de hepatite alcoólica (condição pormenorizada adiante). Seu perfil bioquímico clínico obtido no momento da admissão hospitalar acusava níveis séricos normais a baixos de ALT e AST. Esse achado é incomum em casos de hepatite alcoólica, uma vez que os níveis de ambas as enzimas encontram-se significativamente elevados, conforme já discutido, com a concentração de AST ainda mais alta que a de ALT. No decorrer das 24 horas seguintes, o paciente recebeu tratamento para essa condição e, aparentemente, apresentou melhora clínica. No entanto, a repetição do perfil de função hepática apontou uma elevação marcante dos níveis de ambas as enzimas

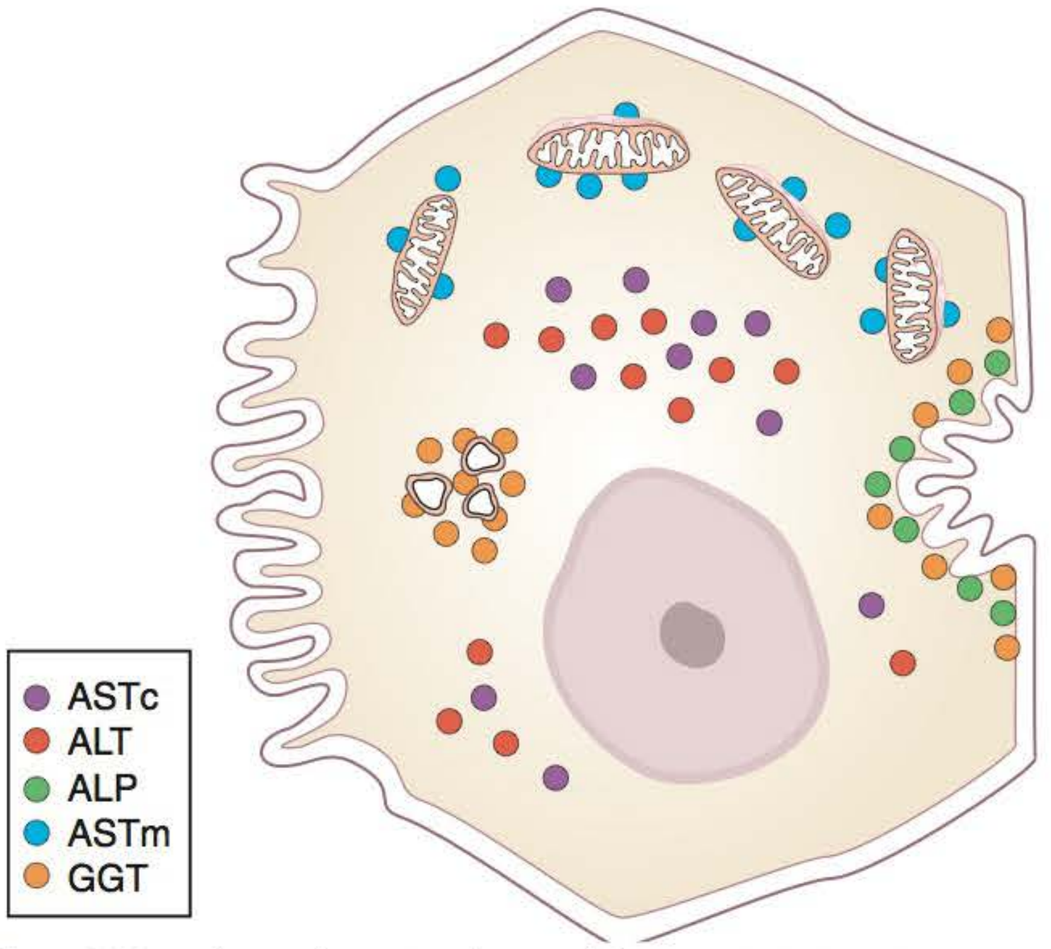


Figura 21.3 Localização das enzimas hepatocelulares. As principais enzimas hepatocelulares utilizadas para fins diagnósticos localizam-se em vários sítios no interior dos hepatócitos e dão origem a diferentes padrões de liberação de enzimas associados a diferentes causas de lesão. A alanina aminotransferase (ALT) e a isozima citoplasmática da aspartato aminotransferase (ASTc) são encontradas primariamente no citosol. Diante de uma lesão na membrana, como ocorre na hepatite viral ou induzida por agentes químicos, essas enzimas são liberadas e entram nos sinusoides, elevando a atividade plasmática de AST e ALT. A enzima aspartato aminotransferase mitocondrial (ASTm) é liberada primariamente em caso de lesão mitocondrial, como aquela causada pelo etanol na hepatite alcoólica. A fosfatase alcalina (ALP) e a γ-glutamil transferase (GGT) são encontradas primariamente na superfície canalicular do hepatócito. Na colestase, os ácidos biliares se acumulam e dissolvem os fragmentos de membrana, liberando no plasma as enzimas anteriormente ligadas. A GGT também é encontrada nos microssomos (anéis). Fármacos indutores de enzimas microssomais, como fenobarbital e dilantina, também podem induzir aumento da síntese e da atividade plasmática da GGT.

(acima de 200 UI/L). Tais resultados deram lugar a um dilema diagnóstico, o qual foi resolvido somente quando se percebeu que, como parte do protocolo para tratamento da hepatite alcoólica, o paciente havia recebido suplementos com vitaminas B_6 e B_{12}. Considerando que os ensaios para ALT e AST requerem, ambos, o fornecimento de vitamina B_6 a partir do soro do paciente, e que o paciente alcoólatra apresentava deficiência dessa vitamina (um achado comum entre alcoólatras), conclui-se que os ensaios detectaram níveis normais a baixos dessas enzimas em decorrência da falta de vitamina B_6. Sob intervenção terapêutica, quando as vitaminas foram administradas, o paciente apresentou níveis séricos de vitamina B_6 que permitiram a atividade enzimática total. Essa história clínica ilustra o papel central do piridoxal fosfato na catálise enzimática da AST e da ALT, bem como a importância da compreensão da base bioquímica dos ensaios enzimáticos.

No sangue, a AST e a ALT apresentam meias-vidas de 17 e 47 horas, respectivamente, e valores máximos de referência em torno de 40 UI/L (ver no Cap. 20 a definição de unidades internacionais ou UI). A AST é encontrada tanto dentro como fora da mitocôndria, enquanto a ALT localiza-se no espaço extramitocondrial. A isozima da AST mitocondrial possui meia-vida de 87 horas (Panteghini, 1990). A AST encontra-se ubiquamente distribuída pelos tecidos corporais, mesmo no coração e nos músculos, enquanto a ALT é encontrada primariamente no fígado, ainda que quantidades significativas da enzima estejam presentes nos rins.

A AST citoplasmática total apresenta elevada atividade nos hepatócitos, cujo conteúdo de AST é aproximadamente 7.000 vezes superior ao do plasma. A ALT também é encontrada em grande concentração nos hepatócitos, onde seus níveis são cerca de 3.000 vezes mais altos que no plasma. Na deficiência de piridoxal fosfato, a síntese de ALT está comprometida. Um fenômeno similar ocorre na fibrose hepática e na cirrose. As alterações enzimáticas observadas na lesão hepática podem ser prontamente explicadas pelos diferentes níveis de atividade e meias-vidas das enzimas hepáticas. Na maioria das formas de lesão

hepatocelular aguda, como a hepatite, os níveis de AST inicialmente se elevam mais que os de AST, em razão da maior atividade de AST nos hepatócitos. Em 24 a 48 horas, principalmente diante de um dano em curso, os níveis de ALT passam a ser maiores que os de AST, em decorrência de sua meia-vida maior.

Uma exceção a essas observações ocorre na lesão hepática aguda induzida por álcool, como no caso da hepatite alcoólica. Estudos sugerem que o álcool induz dano mitocondrial, com consequente liberação de AST a partir das mitocôndrias. Essa AST, além de ser a forma predominante da enzima nos hepatócitos, possui meia-vida significativamente maior que a AST extramitocondrial e a ALT. Como resultado, os níveis de AST frequentemente se tornam maiores que os de ALT e produzem um quociente ALT/AST – também denominado proporção de DeRitis – igual a 3 a 4:1 na doença hepática. Ainda há quem discorde de que a suspensão do consumo de álcool seja capaz de reduzir essa proporção. Em um estudo inicial, os níveis séricos de AST mitocondrial foram quantificados em pacientes cirróticos e não cirróticos que consumiam álcool de modo abusivo (Nalpas, 1986). Pacientes alcoólatras crônicos, independentemente da doença hepática subjacente que apresentavam, demonstraram elevações mais consistentes dos níveis de AST mitocondrial que os demais pacientes. Esses valores duplicaram em mais de 50% dos pacientes que permaneceram em abstinência por mais de 1 semana. Por outro lado, em estudos mais recentes envolvendo mais de 300 pacientes, descobriu-se que uma elevada proporção AST/ALT é sugestiva da existência de doença hepática alcoólica em estágio avançado (Nyblom, 2004). Também é importante notar que muitos indivíduos alcoólatras são deficientes em vitamina B_6 e, em consequência, apresentam taxas diminuídas de síntese de ALT e supressão da atividade de ALT preexistente.

Na lesão crônica do hepatócito, em especial na cirrose, os níveis de ALT elevam-se mais comumente que os de AST. Entretanto, à medida que a fibrose progride, é comum observar a queda da atividade dessa enzima, enquanto a proporção AST/ALT aumenta gradativamente. Desse modo, quando a cirrose se instala, os níveis de AST frequentemente estão mais altos que os de ALT (Williams, 1988; Sheth, 1998). Contudo, no estágio final da cirrose, os níveis de ambas as enzimas, em geral, não estão elevados e podem mesmo ser baixos, em razão da massiva destruição tecidual. Na insuficiência hepática fulminante aguda, como se discute adiante e no Capítulo 8, os níveis séricos de ambas as aminotransferases encontram-se notavelmente elevados, de modo que a proporção AST:ALT muitas vezes é significativamente maior que 1 (Sunheimer, 1994).

Em termos globais, a atividade da ALT é mais específica para detectar a presença de uma doença hepática em pacientes não alcoólatras e assintomáticos. Elevações discretas são detectadas com frequência na hepatite C. A AST é utilizada para monitorar a terapia com fármacos potencialmente hepatotóxicos. A detecção de concentrações três ou mais vezes maiores que o limite normal máximo da enzima deve ser considerada uma indicação de que a terapia precisa ser suspendida. A elevação crônica das atividades das aminotransferases em pacientes assintomáticos pode ter várias causas, entre as quais consumo de álcool ou uso de medicação, hepatite viral crônica ou doença hepática gordurosa não alcoólica. A redução de peso pode diminuir os níveis de ALT nos pacientes com excesso de peso em que a concentração da enzima esteja elevada (Palmer, 1990). O ácido ursodeoxicólico abaixa os níveis de ALT, bem como de GGT (ver adiante), quando estes encontram-se elevados em doadores de sangue (Bellentani, 1989).

Ensaios para AST e ALT. Existem diversas variantes de ensaios para detecção dessas enzimas. Em uma delas, adiciona-se alanina para detecção de ALT ou aspartato para detectar AST, de modo a forçar o deslocamento da reação para a direita e a produção de glutamato. Em seguida, essa produção de glutamato é acoplada à adição da enzima glutamato desidrogenase (reação indicadora), resultando na formação de α-cetoglutarato. Nessa reação, o NAD é convertido a NADH, e este é quantificado como um aumento da absorbância a 340 nm. A avaliação dessas reações não deve se estender por muito tempo, pois um dos substratos das enzimas, o α-cetoglutarato, é regenerado pela reação indicadora. Outra variante de ensaio para AST envolve o acoplamento do oxaloacetato (OAA), que se forma a partir do aspartato na reação, à malato desidrogenase. Essa enzima converte o OAA em malato e também NADH em NAD, cuja concentração é quantificada como uma diminuição da absorbância a 340 nm. No caso da ALT, a conversão da alanina em piruvato permite o acoplamento ao complexo piruvato desidrogenase, onde o piruvato é convertido em acetil coenzima A e o NAD é convertido em NADH, cuja concentração pode ser diretamente medida como um aumento da absorbância a 340 nm. Como já mencionado, é essencial que o piridoxal fosfato esteja presente em quantidade suficiente para possibilitar a ocorrência dessas reações.

Lactato desidrogenase. Conforme descrito no capítulo 20, essa enzima glicolítica citosólica catalisa a oxidação reversível do lactato em piruvato. Existem cinco isozimas de LDH principais, as quais são constituídas por dois tipos de tetrâmeros: H e M. O tetrâmero H apresenta alta afinidade pelo lactato, enquanto o tetrâmero M tem afinidade elevada pelo piruvato. Progressivamente, de HHHH para MMMM, as cinco isozimas possíveis identificadas são LDH_1 a LDH_5. LDH_1 e LDH_2 predominam em músculo cardíaco, rim e eritrócitos. LDH_4 e LDH_5 são as principais isozimas encontradas no fígado e no músculo esquelético. O limite superior do intervalo de referência para a atividade da LDH sérica é de aproximadamente 150 UI/L (ver no Cap. 20 a definição de unidades internacionais ou UI). Os níveis séricos de LDH se elevam na hepatite. Com frequência, essa elevação é passageira e os níveis da enzima já estão normalizados quando ocorre a manifestação clínica (Dufour, 1988 c; Fuchs, 1998; Singer, 1995), visto que as isozimas oriundas do fígado (LDH_4 e LDH_5) apresentam atividade relativamente baixa nos hepatócitos, em comparação à atividade detectada no plasma (cerca de 500 vezes maior), e meia-vida em torno de 4 a 6 horas.

O aspecto mais importante é o grande aumento dos níveis de LDH total, que chegam a ser ≥ 500 UI/L, combinado à elevação significativa da concentração de ALP (discutida adiante e no Cap. 20) a valores > 250 UI/L, na ausência de outras anomalias graves dos níveis das enzimas envolvidas na função hepática, especialmente AST e ALT. Tais aumentos seletivos muitas vezes acompanham lesões hepáticas extensas, como o carcinoma metastático, carcinoma hepatocelular primário, ou lesões benignas, como hemagiomas, mais raramente. A fonte de LDH, mais comumente LDH_5, é incerta, podendo ser tanto hepatócitos como tumores, ou ambos. A elevação dos níveis de ALP se deve ao bloqueio dos ductos e canalículos locais por massas presentes no fígado, conforme discutido adiante. Os ensaios para LDH são descritos no Capítulo 20.

Enzimas que refletem primariamente a lesão canalicular

Conforme mostra a Figura 21.3, essas enzimas localizam-se predominantemente na membrana canalicular do hepatócito. São elas: ALP, GGT e 5'-NT. Contrastando com a atividade das enzimas citoplasmáticas, as atividades enzimáticas canaliculares junto aos hepatócitos são tipicamente baixas. Uma lesão focal afetando os hepatócitos raramente produz elevações significativas dos níveis de enzimas canaliculares.

Fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina está presente em diversos tecidos, tais como fígado, ossos, rim, intestino e placenta. Cada um desses tecidos contém isozimas distintas que podem ser separadas por eletroforese. O conteúdo de ALP total do soro encontra-se principalmente sob a forma não ligada e, em menor extensão, sob a forma complexada às lipoproteínas ou, mais raramente, às Igs.

A ALP hepática, cuja meia-vida é de cerca de 3 dias, é uma enzima hepatocítica encontrada na superfície canalicular e, portanto, atua como marcador de disfunções biliares. A isozima óssea é particularmente termossensível, e essa característica permite sua distinção dentre as outras formas importantes. Além disso, a ALP encontrada no intestino e na placenta diferem, em termos de antigenicidade, da ALP encontrada no fígado, osso e rim. O conjunto de ALP sérica em pacientes normais é constituído das formas hepática e óssea.

Uma obstrução do trato biliar causada pela presença de cálculos nos ductos ou ductulos, ou processos infecciosos que resultem em colangite ascendente ou, ainda, a existência de lesões extensivas são todos fatores que promovem elevação dos níveis da ALP biliar. Essa elevação se dá rapidamente, sendo que os níveis da enzima podem se tornar até 10 vezes mais altos que o limite máximo considerado normal. O motivo que explica esse aumento provavelmente é uma combinação da síntese elevada com a diminuição da excreção da enzima. Na colestase obstrutiva, a concentração de ALP mais comumente aumenta duas ou mais vezes em relação ao limite normal máximo, a grosso modo, em paralelo com a velocidade com que sobem os níveis de bilirrubina sérica.

Se a obstrução é parcial, a concentração de ALP costuma aumentar do mesmo modo que na obstrução total, muitas vezes não correspondendo, em termos de proporção, ao aumento da bilirrubina conjugada (icterícia dissociada). A congestão hepática passiva ocasionalmente pode resultar em elevação moderada dos níveis de ALP, mais que em níveis de bilirrubina anormais. A ALP também encontra-se elevada na maioria dos casos de icterícia resultante de lesão hepática. Quando a consequente colestase é aliviada, os níveis séricos de ALP retornam ao normal mais devagar que os níveis de bilirrubina.

Uma ALP de alto peso molecular é detectada no soro de pacientes com colestase. Essa ALP está ligada a fragmentos de membrana canalicular. Os sais biliares solubilizam as enzimas a partir das membranas sinusoidais e canaliculares. No soro, as enzimas acopladas à membrana agregam-se a lipídeos e lipoproteínas. Essa característica pode explicar a relação que tem sido observada, por exemplo, com a lipoproteína X (LpX) (ver Cap. 17). Outra forma de ALP de alto peso molecular, que apresenta migração eletroforética diferenciada da migração da isozima descrita, foi detectada na doença maligna com envolvimento do fígado (Viot, 1983).

Os níveis de ALP intestinal são maiores em uma variedade de distúrbios do trato intestinal e também na cirrose. A forma intestinal da ALP é detectada em mais de 80% dos pacientes cirróticos, comparativamente a sua detecção em 10% dos controles normais. O uso da determinação da atividade dessa enzima foi sugerido como método para discriminar as formas intra- e extra-hepática de icterícia, uma vez que a ALP intestinal pode não ser detectada na obstrução extra-hepática, contudo não apresenta o grau de sensibilidade e especificidade adequado (Collins, 1987). O Capítulo 20 descreve os ensaios empregados na detecção da ALP.

γ-glutamil transferase (GGT). Essa enzima regula o transporte de aminoácidos através das membranas celulares, catalisando a transferência de um grupo glutamil da glutationa para um aminoácido livre. Seu principal uso se dá na discriminação da fonte de elevação dos níveis de ALP (i. e., se a ALP estiver elevada e os níveis de GGT aumentarem de modo correspondente, então a fonte mais provável da elevação dos níveis de ALP será o trato biliar). Os valores mais altos, frequentemente acima de 10 vezes o limite máximo considerado normal, podem ser detectados em pacientes com colestase crônica decorrente de cirrose biliar primária ou colangite esclerosante. Do mesmo modo, também encontra-se aumentada em 60 a 70% dos indivíduos alcoólatras, havendo uma correlação aproximada entre a quantidade de álcool consumida e a atividade de GGT (Whitehead, 1978). Por vezes, os níveis da enzima declinam devagar na abstenção do álcool, permanecendo elevados pelo menos durante 1 mês após o início da abstinência (Belfrage, 1977; Moussavian, 1985). A GGT possui meia-vida de 10 dias, no entanto esse tempo de meia-vida pode ser de até 28 dias durante a recuperação do consumo abusivo de álcool. Seus níveis tendem a ser mais altos em casos de distúrbio obstrutivo e de lesões hepáticas que ocupam espaço, comparativamente ao observado nos casos de lesão dos hepatócitos (Kim, 1977).

O gene da GGT humana foi clonado, e a sequência de nucleotídeos foi identificada (Rajpert-De Meyts, 1988). É possível detectar três tipos principais de GGT no soro (Wenham, 1985), apesar de ainda não haver métodos prontamente disponíveis para tanto. Existe uma forma de alto peso molecular que é encontrada no soro normal, bem como na obstrução biliar e, mais frequentemente, na infiltração maligna do fígado. Uma forma de peso molecular intermediário é constituída por duas frações: a maior delas é detectada nas doenças hepáticas, enquanto a outra é encontrada na obstrução biliar. Os métodos de determinação dessas formas da enzima carecem do devido grau de sensibilidade e especificidade que fazem sua execução valer a pena (Collins, 1987). A terceira forma da GGT é um composto de baixo peso molecular, cuja importância é desconhecida.

Durante a gravidez, os níveis séricos de GGT e de ALP diferem entre si, sendo que os de GGT permanecem normais mesmo quando a mãe apresenta colestase. A GGT com frequência está aumentada em pacientes alcoólatras, mesmo naqueles que não apresentam doença hepática. Essa elevação também é detectada em indivíduos obesos e naqueles que consomem doses elevadas de certos fármacos terapêuticos, como acetaminofeno e fentoína, além da carbamazepina (os valores chegam a exceder até 5 vezes os limites de referência), mesmo na ausência de qualquer tipo de lesão hepática aparente. É possível que as elevações do conteúdo de GGT sejam uma tentativa do organismo de restaurar a glutationa utilizada no metabolismo desses fármacos, explicando, assim, a elevada atividade de GGT detectada nos ensaios. A glutationa é conjugada a essas substâncias via sistema da glutationa S-transferase e, em seguida, o complexo é excretado.

A maior parte dos ensaios para GGT emprega como substrato γ-glutamil-*p*-nitroanilida. Na reação catalisada pela GGT, a *p*-nitroanilina liberada é cromogênica e, desse modo, o produto colorido formado pode ser quantificado por espectrofotometria.

Outras enzimas. A atividade de 5'-NT aumenta em distúrbios colestáticos, mas permanece virtualmente inalterada em pacientes com doença óssea. A quantificação dessa enzima pode corroborar a elevação dos níveis de ALP a partir de uma fonte hepática. Outras enzimas, como a leucina aminopeptidase (LAP), também podem ser utilizadas com a mesma finalidade, contudo praticamente jamais o são. As atividades de isocitrato desidrogenase e OCT – exclusivamente hepáticas – estão aumentadas na lesão hepatocelular, em paralelo à ALT e à AST. Novamente, assim como a LAP, essas enzimas quase não são empregadas nos ensaios laboratoriais de rotina.

α-fetoproteína (AFP)

A síntese de AFP se dá nos hepatócitos embrionários e nas células do saco amniótico fetal, chegando ao pico no segundo trimestre da gravidez, quando a concentração da proteína representa um terço do conteúdo total de proteínas do soro fetal. A função da AFP é desconhecida, mas talvez seja imunossupressiva, prevenindo a destruição do feto por anticorpos maternos circulantes.

Como discutido no Capítulo 25, a AFP se torna anormalmente elevada nas deficiências envolvendo o tubo neural fetal. O motivo que explica essa correlação permanece indeterminado. É importante salientar que os níveis normais dessa proteína variam consideravelmente de acordo com a idade gestacional. Portanto, a conclusão de que os níveis séricos de AFP encontram-se anormalmente elevados dependerá do intervalo de referência correspondente à idade gestacional da paciente.

Logo após o nascimento, os níveis de AFP começam a cair e, ao redor de 1 ano de idade, atingem os valores normalmente detectados em indivíduos adultos. Após uma lesão hepática aguda, é habitual que os níveis da proteína aumentem (tipicamente, de 100 a 200 ng/dL) a partir dos hepatócitos em regeneração. Muitas vezes, essas elevações características, observadas após a ocorrência de agressões hepáticas agudas, deixam de acontecer após a ressecção cirúrgica do fígado. Portanto, a regeneração não impulsiona suficientemente os níveis de AFP, a ponto de causar a elevação do conteúdo da proteína.

Como discutido no Capítulo 74, constatou-se que a AFP é um importante marcador do carcinoma hepatocelular (HCC, *hepatocellular carcinoma*). Níveis elevados são detectados em mais de 90% dos pacientes com a doença. Conforme mencionado anteriormente, a elevação dos níveis dessa proteína também se dá após a doença hepática aguda e a fibrose, de forma que se trata de um marcador de algo inespecífico. Todavia, concentrações > 400 ng/dL apontam uma alta probabilidade de HCC. Entretanto, quando os níveis de AFP atingem tais valores, significa que o tumor já está amplamente disseminado. Desse modo, a utilização da proteína para detectar o HCC ainda em estágio inicial é limitada. Os níveis séricos de AFP no HCC também dependem da extensão e do grau de diferenciação do tumor, bem como da idade do paciente.

Marcadores autoimunes

O anticorpo antimitocôndria é um marcador da cirrose biliar primária (CBP). Ocasionalmente, uma doença autoimune pode ser a causa primária de uma lesão hepática. A doença hepática autoimune mais comum é a CBP, que acomete principalmente mulheres, em geral durante a quinta década de vida, e é acompanhada de outras doenças autoimunes (em especial, síndrome de Sjögren). Discutida de modo mais abrangente no Capítulo 52, essa condição causa fibrose dos canalículos nas tríades portais. A bile eventualmente infiltra-se nos hepatócitos e causa necrose. Há formação de um tecido de granulação que substitui os hepatócitos, de modo que o processo fibrótico costuma se disseminar pelo parênquima hepático, dando origem ao padrão de

fibrose e nódulos de regeneração. Um curso semelhante é observado na cirrose biliar secundária, em decorrência de outras condições subjacentes, tais como coledocolitíase, carcinoma da cabeça do pâncreas e, ocasionalmente, hepatite e sepse.

Uma diferença vital entre as formas primária e secundária de cirrose biliar é que a primeira somente surge como parte de uma condição autoimune generalizada. Mais de 90% dos pacientes com CBP apresentam anticorpos reativos contra fígado, rim, estômago e tecidos da tireoide, detectados por imunofluorescência em amostras de soro. Tais anticorpos circulantes, que podem ser detectados em amostras de soro por ensaio imunosorvente ligado à enzima (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), são direcionados a antígenos mitocondriais (anticorpo antimitocondrial ou AMA) presentes na membrana interna da mitocôndria e denominados M2. Foi demonstrado que tais antígenos M2 são a di-hidrolipoamida acetiltransferase, que é um dos componentes do complexo multienzimático da piruvato desidrogenase (Krams, 1989; Coppel, 1988; Kaplan, 1984). Os AMAs têm sido detectados em diversos estados patológicos, contudo existem dois tipos de anticorpos anti-M2 detectados primariamente na CBP que reagem de forma exclusiva com proteínas de massa molecular igual a 48 ou 62 kDa (Manns, 1987; Fussey, 1988). Em outros casos, AMAs contra o antígeno M1 foram detectados na sífilis, contra M5 em doenças colágenas vasculares, contra M6 na hepatite induzida por iproniazida, e contra M7 em cardiomiopatias (Berg, 1986). AMAs anti-M2 apresentam especificidade de 100% para CBP.

O ANCA é uma marcador da colangite esclerosante primária (CEP). A CEP é uma doença autoimune associada à destruição dos ductos extra-hepáticos e também dos ductos biliares. Cerca de dois terços dos pacientes com a doença apresentam na circulação anticorpos para antígeno neutrofílico citoplasmático perinuclear (p-ANCA, *perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies*) com especificidade contra antígenos como a proteína de aumento da permeabilidade/bactericida, catepsina G e/ou lactoferrina (Mulder, 1993; Roozendaal, 1998). Até 75% dos pacientes também apresentam outros tipos de autoanticorpos, tais como anticorpos antinucleares (ANAs, *antinuclear antibodies*) ou anticorpos antimúsculo liso (ASMAs, *anti-smooth muscle antibodies*) (Chapman, 1986). Diferentemente da CBP, a CEP acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, desde jovens até adultos de meia-idade, e muitas vezes está associada à enteropatia inflamatória, em particular a colite ulcerativa.

Marcadores séricos da hepatite autoimune. A hepatite autoimune é responsável por 3 a 5% dos casos de hepatite crônica e, ocasionalmente, pode manifestar-se como hepatite aguda. Apresenta diversas variantes que estão associadas a vários marcadores (Czaja, 1995 a,b). Nos EUA, a variante mais comum é a de tipo 1 que, mais comumente, está associada à presença de ANAs, mas também a anticorpos para actina (por vezes detectados como ASMAs). Títulos de AMAs e/ou ASMAs acima de 1:80 sustentam o diagnóstico de pacientes com hepatite (Johnson, 1993). A hepatite autoimune de tipo 2 afeta tipicamente as crianças e é bem mais comum na Europa que nos EUA, onde é raro detectá-la. Os ANAs e ASMAs muitas vezes não são detectados na doença de tipo 2, enquanto os anticorpos contra antígenos microssomais de fígado-rim (anti-LKM_1) são encontrados na maioria dos casos. Baixos títulos desses anticorpos são comumente detectados em outras formas de doença hepática, em particular na hepatite C, quando estão presentes em até 40% dos casos (Czaja, 1995 a, b).

Marcadores de infecção pelo vírus da hepatite

Inúmeros vírus causam dano hepático. Alguns, como os vírus causadores das hepatites A, B e C e o arbovírus, são hepatotóxicos, enquanto outros, como EBV, CMV, VZV, HSV, H116, HIV, adenovírus e ecovírus, induzem uma hepatite que tanto pode ser passageira como moderadamente agressiva. Até a recém-identificada hepatite G causa apenas uma forma autolimitada de hepatite. Na realidade, os vírus constituem a causa de 80 a 90% dos casos de hepatite aguda e crônica. Se, por um lado, vários desses vírus são capazes de afetar o fígado, por outro lado, a maioria das patologias hepáticas induzidas por vírus é causada por cinco tipos virais – os "vírus da hepatite" – que sabidamente causam lesão nos hepatócitos. Tais patologias são denominadas hepatites A, B, C, D e E.

Hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) é um dos membros da família picornavírus de vírus que contêm RNA. É transmitido pela via fecal-oral, e seu tempo de incubação típico é de 15 a 50 dias (média de 1 mês, dependendo do inóculo) (Brown, 2003). Epidemias ou grupos de infecção por HAV ocorrem com frequência diante de condições sanitárias precárias, em creches, nas ações militares e a partir da ingestão de alimentos contaminados. A infecção por HAV é quase sempre autolimitada, embora 5 a 10% dos casos apresentem uma elevação secundária dos níveis enzimáticos. O aparecimento dos marcadores no decorrer da infecção por HAV é mostrado na Figura 21.4. Durante o período de incubação, o HAV-RNA está presente nas fezes e no plasma do indivíduo contaminado, permanecendo detectável por 18 dias, em média, após o início clínico da hepatite (Fujiwara, 1997). A resposta imune inicial ao vírus é mediada pela IgM anti-HAV. Essa resposta se desenvolve tipicamente após 2 a 3 semanas de infecção. Os níveis de AST e ALT aumentam somente *após o desenvolvimento da resposta humoral.* Os anticorpos IgM costumam persistir por 3 a 6 meses após a infecção. Anticorpos IgG aparecem dentro de 1 a 2 semanas após o desenvolvimento da resposta de IgMs, e tipicamente continuam sendo detectados pelo resto da vida do paciente (Skinhoj, 1977). Os ensaios para anti-HAV "total" detectam ambos os anticorpos, IgM e IgG. A prevalência dos anticorpos anti-HAV totais é variável: de 5 a 10% em crianças com menos de 5 anos de idade, até 75% em indivíduos com mais de 50 anos (Koff, 1995). Após a imunização com HAV, títulos detectáveis de anticorpos se desenvolvem em 2 a 4 semanas e perduram por 5 anos em 99% dos indivíduos respondedores (Totos, 1997). Caso seja necessário, para fins epidemiológicos, existem ensaios com PCR que permitem identificar o vírus em amostras de plasma e fezes. Entretanto, é desnecessário incorporar o uso do PCR à rotina para fins diagnósticos.

Hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) faz parte da família hepadnavírus – um grupo de vírus relacionados que causam hepatite em várias espécies

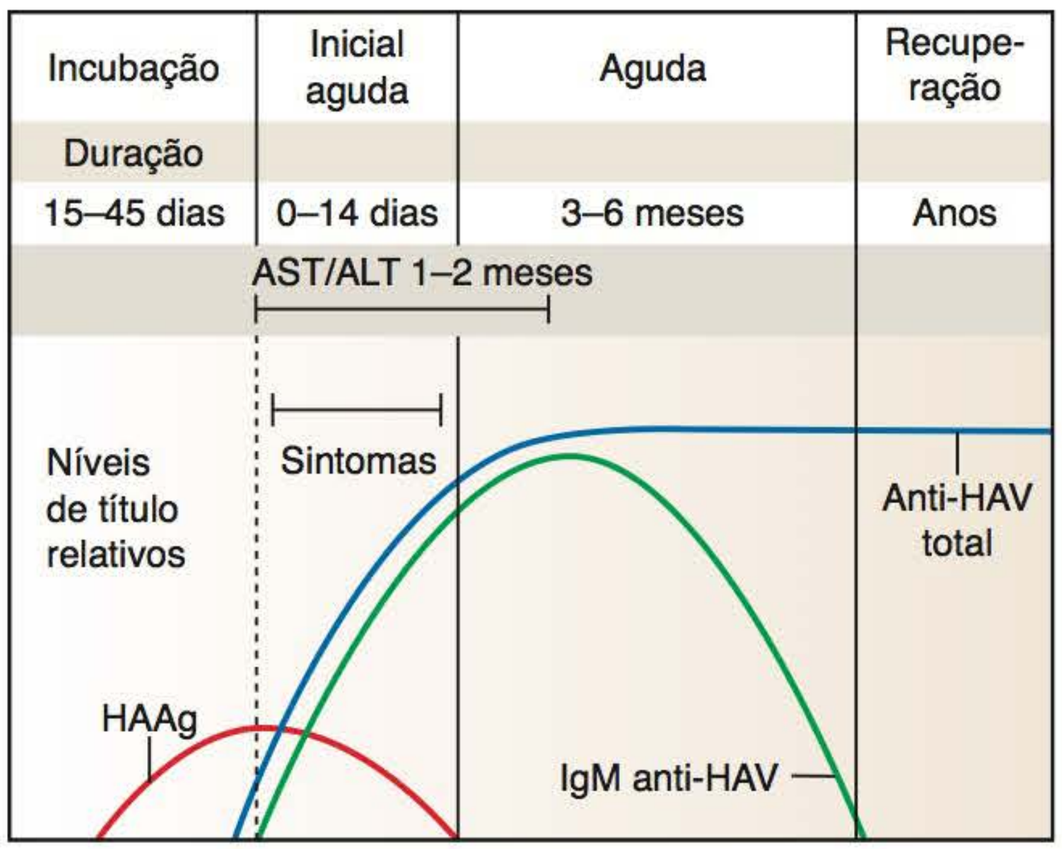


Figura 21.4 Evolução temporal típica do aparecimento dos antígenos virais e dos anticorpos antivirais na hepatite viral de tipo A (infecção por HAV). O antígeno dessa infecção (HAAg) aparece precocemente e está ausente na fase aguda, quando o paciente pode desenvolver icterícia. Durante o período de incubação (em média 2–3 semanas), o HAV-RNA se replica, e é possível detectar as partículas virais nas fezes, por imunomicroscopia eletrônica. Nessa fase, também é possível detectar o RNA viral por PCR-RT. A determinação mais efetiva, em termos diagnósticos, da hepatite A aguda consiste na detecção de IgM anti-HAV. Essa figura também mostra a elevação dos níveis de aminotransferases (AST e ALT), que ocorre no começo da fase aguda inicial e se estende por várias semanas a meses. O paciente deixa de ser contagioso após a queda dos níveis de IgM anti-HAV, que se tornam indetectáveis em 3 a 6 meses após a fase inicial da doença. Ocorrem aumentos permanentes dos níveis de IgG anti-HAV no decorrer de vários meses, sendo que, por muitos anos, tais anticorpos conferem imunidade ao indivíduo exposto ou infectado. (Adaptado de "Hepatitis A Diagnostic Profile", de Abbott Laboratories Diagnostic Educational Services, North Chicago, IL, 1994, com permissão.)

de animais. Esse vírus causa uma infecção hepática cujos aspectos clínicos são extremamente variáveis: a doença pode estar ausente ou ser branda, ou pode manifestar-se como uma severa insuficiência hepática (Horvat, 2003). A hepatite B é transmitida primariamente pelo contato com os líquidos corporais, em especial o soro. Todavia, também pode ser efetivamente disseminada tanto pelo contato sexual como pela transmissão materno-fetal. A hepatite B produz vários antígenos proteicos que podem ser detectados no soro: um antígeno central (HBcAg), um antígeno de superfície (HBsAg ou HBs) e o antígeno *e* (HBeAg), que está relacionado ao antígeno central. Existem testes comerciais disponíveis para detecção de HBsAg e HBeAg. Os anticorpos para cada um desses antígenos também podem ser quantificados, sendo que também existem testes comerciais para sua detecção. O curso da infecção autolimitada causada pelo HBV ao longo do tempo está representado na Figura 21.5. Recomenda-se utilizar grupos de testes diferentes para as três situações clínicas possíveis, do seguinte modo:

1. *hepatite por HBV aguda*: HBsAg, IgM anti-HBc;
2. *hepatite por HBV crônica*: HBsAg, IgG anti-HBc, IgG anti-HBs;
3. *monitoramento da infecção por HBV crônica*: HBs, HBeAg, IgG anti-HBs, IgG anti-HBe e PCR quantitativo ultrassensível.

O marcador sorológico inicial da infecção aguda é o HBsAg, que geralmente se torna detectável de 2 a 3 meses após a infecção. Passadas mais de 4 a 6 semanas, surgem anticorpos IgM anti-HBc acompanhados do aumento dos níveis de AST e ALT. Quando surgem os sintomas da hepatite, a maioria dos pacientes ainda possui HBsAg detectável, embora poucos indivíduos não apresentem títulos detectáveis de HBs nem de anti-HBs, de modo que os anticorpos anti-HBc são os únicos marcadores da infecção em tais casos ("janela central"). A IgM anti-HBc costuma persistir por 4 a 6 meses, entretanto, pode estar presente de modo intermitente em pacientes com infecção por HBV crônica (Czaja, 1988).

Na maioria dos casos, a infecção por HBV é autolimitada, e o paciente consegue se recuperar. Cerca de 1 a 2% dos adolescentes e adultos normais apresentam uma replicação viral persistente que causa hepatite crônica. A frequência da infecção por HBV crônica é de 5 a 10% em pacientes imunocomprometidos, e de 80% em recém-nascidos, com provável declínio gradativo da infecção durante a primeira década de vida. Quando o paciente se recupera de uma infecção aguda, tanto HBsAg como HBcAg desaparecem e surgem anticorpos IgG anti-HBs e IgG anti-HBe. Os anticorpos anti-HBs constituem tipicamente o último marcador a se desenvolver na fase de recuperação, sendo considerados como indicadores da depuração do vírus. Anticorpos anti-HBs e anti-HBc persistem por toda a vida do paciente, embora os anticorpos anti-HBs acabem desaparecendo em cerca de 5 a 10% dos casos (Seeff, 1987). Anticorpos anti-HBc isolados também podem ser produzidos durante os períodos de depuração viral tanto na hepatite aguda como na crônica. Como consequência, são obtidos resultados de teste falso-positivos. O título desses anticorpos determina o grau de sua importância: baixos títulos costumam ser resultados falso-positivos, enquanto títulos elevados quase sempre (50–80% dos casos) indicam imunidade à infecção por HBV, a qual é demonstrada por uma resposta anamnéstica à vacina contra hepatite B (Aoki, 1993).

O ensaio mais moderno para avaliar infecções por HBV é a tecnologia de PCR-RT quantitativo ultrassensível. Esse método é extensivamente discutido na Parte VIII. Esse PCR quantitativo para HBV-DNA é capaz de detectar uma região altamente conservada do gene de superfície em um intervalo de concentração que vai de 200 cópias de genoma viral por mL (0,001 pg/mL) até 2×10^8 cópias/mL. Seu principal uso consiste no monitoramento terapêutico da responsividade de pacientes clinicamente infectados.

Outra técnica disponível é o ensaio de captura híbrida de quantitativo da Digene. Esse ensaio emprega um teste de amplificação de

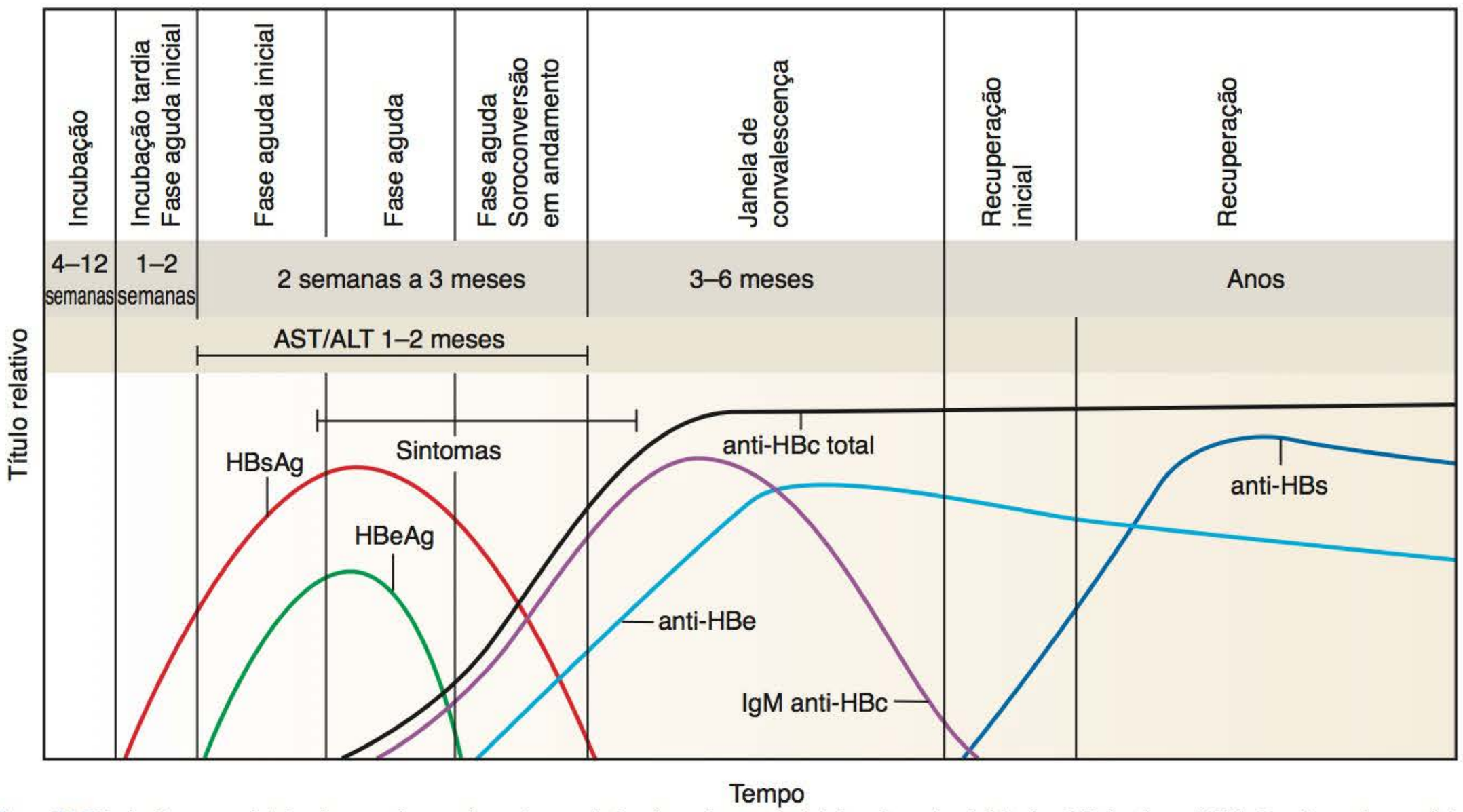


Figura 21.5 Evolução temporal típica do aparecimento dos antígenos virais e dos anticorpos antivirais na hepatite viral de tipo B (infecção por HBV). O antígeno de superfície do HBV (HBsAg) aparece na fase inicial aguda e perdura por vários meses. A detecção desse antígeno indica a ocorrência de uma infecção por HBV aguda. No período entre a queda dos títulos de HBsAg e o aumento dos níveis de IgG anti-HBV (que confere imunidade), há um intervalo de aproximadamente 6 meses. Nesse período, ocorre aumento dos títulos de IgM e IgG antiantígeno central do HBV (anti-HBc), indicando a ocorrência da infecção por HBV aguda. Esse intervalo é a conhecida "janela central". Os níveis de IgG anti-HBV e anti-HBe também aumentam durante o período da janela central. A imunidade permanente é conferida pela presença dos anticorpos IgG anti-HBsAg (anti-HBs, na ilustração). É difícil determinar o momento em que o paciente deixa de ser contagioso. Em geral, o indivíduo passa a ser considerado como tal quando os níveis de HBsAg e HBeAg se tornam indetectáveis, assim como os níveis de IgM anti-HBcAg, enquanto a concentração de IgG anti-HBsAg atinge um platô. Ainda nessa ilustração, são representados os padrões de elevação dos níveis de AST e ALT. Tais alterações ocorrem no início da fase aguda, pouco depois da elevação dos níveis de HBsAg. As concentrações de AST e ALT podem permanecer altas por várias semanas a meses, mas declinam ao fim desse período. Na hepatite B crônica ativa, o HBsAg está presente de modo contínuo. Os níveis de AST e ALT, em geral, permanecem elevados, embora possam oscilar no decorrer da evolução da doença. (Adaptado de "Hepatitis B Diagnostic Profile", de Abbott Laboratories, Diagnostic Educational Services, North Chicago, IL, 1994, com permissão.)

sinal em microplacas preparadas com anticorpo de captura, utilizando detecção quimioluminescente. Entretanto, essa técnica de PCR quantitativo para HBV utiliza um sonda de RNA e apresenta limite de detecção de 5.000 cópias/mL (0,02 pg/mL) e, portanto, é menos sensível que o ensaio ultraquantitativo. Mesmo assim, os ensaios que utilizam DNA ramificado (b-DNA, *branched DNA*) e apresentam limite de detecção de 2.000 cópias/mL, discutidos no Capítulo 67, também são amplamente empregados.

Pacientes que se recuperaram clinicamente de infecção por HBV e são positivos para anticorpos anti-HBs não apresentam HBV-DNA detectável na maioria dos ensaios. Com a técnica de PCR sensível, é possível detectar HBV-DNA circulante em uma grande parcela dessa população de pacientes (Yotsuyanagi, 1998; Cabrerizo, 1997), bem como em pacientes com hepatite C e anticorpos anti-HBc isolados (Cacciola, 1999). A importância da detecção de baixos níveis de HBV-DNA permanece obscura, embora nos pacientes que apresentam hepatite C concomitante a baixa concentração do vírus possa estar associada a um dano hepático mais severo. O antígeno *e* tem sido empregado historicamente para detectar a presença de partículas virais circulantes. Há uma boa correlação entre os níveis de HBeAg e a quantidade de HBV-DNA (Hayashi, 1996). Na infecção crônica por HBV, cerca de 1 a 1,5% dos pacientes apresentará depuração espontânea de HBeAg a cada ano. Alguns pacientes se recuperarão, enquanto outros entrarão em uma fase não replicativa em que o HBV-DNA se integrará ao genoma celular. Essa fase de transição muitas vezes está associada à elevação dos níveis de AST e ALT e, ocasionalmente, à icterícia. Em casos raros, o HBeAg pode novamente se tornar detectável no plasma desses pacientes. A Tabela 21.1 mostra os padrões de marcadores de HBV e suas respectivas interpretações.

Tabela 21.1 Interpretação dos padrões de marcadores de HBV

Interpretação	IgM Anti-HBc	Anti-HBc Total	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe
Período de incubação da infecção por HBV	–	–	+	–	–	–
Infecção aguda por HBV	+	+	+	–	+	–
Infecção por HBV recente, em processo de resolução	+	+	–	+	–	+
Infecção aguda por HBV na "janela central"	+	+	–	–	–	–
Infecção crônica ativa por HBV	–	+	+	–	+	–
Estado de portador crônico de HBV	–	+	+	–	–	+
Infecção por HBV resolvida	–	+	–	+	–	+
Imunidade ao HBV após a vacinação	–	–	–	+	–	–

Hepatite C

O vírus causador da hepatite C (HCV) contém RNA e pertence ao grupo dos flavivírus. Foi o primeiro agente etiológico da hepatite não A e não B a ser transmitido por meio de transfusões sanguíneas e transplantes, antes de 1990. Atualmente, 60% de todos os casos novos são diagnosticados em usuários de drogas injetáveis, ainda que tenham sido observados outros modos de transmissão por meio do soro, como picadas de agulha acidentais em trabalhadores da área da saúde, em pacientes de diálise e, mais raramente, a transmissão materno-fetal. Embora seja considerada um meio de transmissão ineficaz, a transmissão por contato sexual responde, no mínimo, por 10% dos novos casos registrados. Parceiros sexuais monogâmicos de pacientes infectados com o HCV raramente se infectam, enquanto uma história de múltiplos parceiros sexuais é considerada um fator de risco. Em contraste com HAV e HBV, a infecção crônica por HCV ocorre em cerca de 85% dos indivíduos infectados. Somente nos EUA, estima-se que existam 4 milhões de indivíduos cronicamente infectados (Alter, 1999). Os níveis de ALT se elevam em cerca de metade dos indivíduos com infecção crônica por HCV que apresentam viremia persistente. Os sintomas físicos não se manifestam nas primeiras duas décadas após a infecção. À medida que a doença progride, inflamação e morte de células do fígado podem resultar em fibrose, sendo que em cerca de 20% dos pacientes o processo fibrótico evolui para cirrose. O risco de HCC em um paciente com infecção por HCV crônica é de aproximadamente 1 a 5% após 20 anos. O HCC somente é observado em pacientes com cirrose (Shuhart, 2003). A Tabela 21.2 resume os testes laboratoriais para infecção por HCV e seus usos mais comuns.

Tabela 21.2 Interpretação dos padrões de marcadores de HBC

Interpretação	Anti-HCV	RIBA	HCV-RNA
Infecção aguda por HCV	–	–	+
Infecção ativa por HCV	+	+	+
Possível depuração de HCV	+	+	–
Resultado falso-positivo em teste para HCV	+	–	–
Requer mais estudos	+	Indeterminado*	–

* Resultado indeterminado; somente uma banda positiva, ou mais de uma banda e reatividade inespecífica.

O HCV pode ser mantido em cultura. Entretanto, o genoma desse vírus pode ser amplificado graças à tecnologia recombinante. Certo número de antígenos estruturais e não estruturais foi identificado. Foi desenvolvido um imunoensaio para o antígeno central do HCV (Aoyagi, 2001), porém constatou-se que esse teste é menos sensível que os ensaios para HCV-RNA (Krajden, 2004). O principal teste diagnóstico para a infecção por HCV tem sido o ensaio de segunda geração para detecção de anticorpos anti-HCV. Esse teste detecta a presença de anticorpos para um dos quatro antígenos virais diferentes, em 10 a 12 semanas após a infecção (Alter, 1992 a). Um ensaio de terceira geração para anticorpos anti-HCV é capaz de detectar anticorpos, em média, em sete a nove semanas após a infecção (Barrera, 1995). Anticorpos IgM anti-HCV estão presentes tanto na infecção aguda como na crônica e não são úteis ao diagnóstico (Brillanti, 1993). O conteúdo de anticorpos anti-HCV total normalmente persiste por toda a vida do paciente, embora possa desaparecer quando da recuperação da infecção por HCV (Seeff, 1994; Beld, 1999).

Em populações de alto risco, o valor preditivo dos anticorpos anti-HCV para infecções por HCV é superior a 99% e, assim, costuma ser desnecessário realizar testes adicionais que comprovem a exposição ao vírus (Pawlotsky, 1998). Em populações de baixo risco, como é o caso dos doadores de sangue, o valor preditivo dos anticorpos anti-HCV é de apenas 25%. Em pacientes de baixo risco, ou quando é necessário confirmar a exposição ao HCV, devem ser utilizados testes suplementares para detecção dos anticorpos anti-HCV. O teste do imunoensaio recombinante para HCV (RIBA-1) emprega proteínas recombinantes de HCV isoladas por meio de análise de *dot* ou *strip blot*. Esse teste é análogo aos testes de *Western blot* utilizados para confirmar resultados positivos em outros tipos de doenças infecciosas. Utilizando ensaios RIBA-2 de segunda geração, a presença de anticorpos para dois (em um total de quatro) ou mais antígenos de HCV é considerada resultado positivo, enquanto a ausência de anticorpos é considerada resultado negativo. A detecção de anticorpos para um antígeno ou mais, bem como o marcador inespecífico superóxido dismutase, são considerados resultados indeterminados. No ensaio RIBA de terceira geração, o anticorpo para o antígeno NS5 isolado praticamente não está associado à viremia de HCV, sugerindo que sua detecção possa ser indicativa de um resultado falso-positivo (Vernelen, 1994; LaPerche, 1999).

O teste primário empregado na confirmação da persistência da infecção por HCV é o teste para HCV-RNA, que detecta o vírus por meio

de várias técnicas de amplificação. Ensaios quantitativos geralmente detectam apenas 1.000 cópias/mL. Entretanto, resultados obtidos com diferentes ensaios não são intercambiáveis, e os limites de detecção variam para cada método (Ravaggi, 1997; Lunel, 1999). Ensaios para HCV-RNA qualitativos, em geral, possuem limites de detecção menores, se comparados aos métodos quantitativos que empregam a mesma técnica de amplificação, como são também menos caros e mais úteis para detectar a presença ou ausência de infecção.

Foi criado um padrão da Organização Mundial de Saúde (OMS) com o intuito de aprimorar a comparabilidade entre os métodos (Saldanha, 1999). Esse padrão é baseado em uma unidade internacional ou UI/mL de soro ou de plasma, e nas técnicas de PCR-RT recentemente desenvolvidas que apresentam um intervalo de detecção que vai de 5 a 2×10^8 UI/mL e, assim, torna desnecessárias as determinações de níveis qualitativos e quantitativos. Em um estudo recente (Shiffman, 2003), adotando o padrão internacional, constatou-se que cerca de 90% dos valores séricos para HCV-RNA oscilavam em torno de 1 unidade logarítmica, independentemente de qual ensaio virológico fosse realizado. Contudo, os resultados apresentaram algumas diferenças significativas, sendo que poucas amostras exibiram diferenças de, no máximo, 2 unidades logarítmicas (fator de 100). Tais resultados discrepantes podem causar impacto no monitoramento de pacientes que estejam recebendo terapia com interferon. Esses achados sugerem que é importante obter mais de uma determinação de HCV-RNA antes de tomar quaisquer decisões acerca do tratamento (Shiffman, 2003).

Na infecção aguda, é comum que o HCV-RNA seja detectado em 2 semanas após o começo da infecção, porém seus níveis caem com a produção dos anticorpos. Cerca de 15% dos indivíduos com infecção por HCV aguda apresentam resultado negativo nos testes para HCV-RNA (Alter, 1992 b; Villano, 1999). O RNA viral pode estar presente de modo intermitente durante o primeiro ano de infecção, contudo, ao final desse período, se torna persistente (Villano, 1999). Nos estágios mais tardios da infecção, os níveis de HCV-RNA, em geral, flutuam em torno de 0,5 a 1 unidade logarítmica em relação aos valores médios (Nguyen, 1996). O HCV apresenta uma elevada taxa de mutação, similarmente a outros vírus com transcriptase reversa, como o HIV. Essa característica acarreta a produção de certo número de "pseudoespécies" de HCV que podem emergir, muitas vezes associadas a níveis de ALT flutuantes (Yuki, 1997). Existem espécies únicas de HCV que são denominadas genótipos. Nos EUA, o genótipo 1 é o mais comum e encontra-se dividido em subtipos 1a e 1b. Tais subtipos, juntos, respondem por cerca de 65% dos casos de infecção por HCV em caucasianos, e por aproximadamente 90 a 95% das infecções que ocorrem em indivíduos afro-americanos (Reddy, 1999; McHutchison, 1999). Os genótipos 2 e 3, em geral, são mais responsivos ao tratamento (Poynard, 1998; McHutchison, 1998). As demais variedades respondem por cerca de 1 a 2% das infecções. A detecção de sequências de ácido nucleico exclusivas a cada variedade por meio de um dos vários métodos existentes para ácidos nucleicos (Lau, 1995), conforme se discute em profundidade ao longo da Parte VIII, é o modo mais confiável de identificar o genótipo responsável em um dado paciente.

Hepatite D

O vírus causador da hepatite D (agente-Ø, HDV) é um vírus a RNA que consegue se replicar somente na presença de HBsAg. Partículas virais circulantes contêm RNA no interior de uma cápsula de HBsAg. Sendo raro nos EUA, onde costuma ser encontrado em usuários de drogas injetáveis e hemofílicos, o HDV é endêmico em algumas partes do mundo (London, 1996). Em pacientes com infecção por HBV, o HDV pode ocorrer sob duas formas. Quando a infecção com ambos os vírus se dá quase ao mesmo tempo (coinfecção), o curso da doença é mais grave e, muitas vezes, sucede um curso atípico. É causa de insuficiência hepática fulminante aguda (Sunheimer, 1994) e apresenta uma taxa de fatalidade mais alta que a infecção por HBV isolada. Quando a infecção por HDV ocorre na presença de uma infecção por HBV persistente (superinfecção), a doença pode apresentar uma progressão mais rápida. O principal teste diagnóstico é a detecção de anticorpos anti-HDV. Existem testes disponíveis tanto para anticorpos totais como para IgM. Esse dois tipos de anticorpos podem eventualmente desaparecer após uma convalescença. A avaliação simultânea dos anticorpos IgM anti-HBc ajuda a diferenciar coinfecções (presentes) de superinfecções (ausentes).

Hepatite E

O vírus causador da hepatite E (HEV) é um vírus a RNA, e a doença apresenta um curso clínico semelhante ao da infecção por HAV. Sua ocorrência é comum em partes da Ásia, África e do México, porém raramente é observado nos EUA, exceto em indivíduos que viajaram para áreas endêmicas (Erker, 1999). Assim como o HAV, é transmitido pela via fecal-oral. A transmissão do HEV por contato de um indivíduo a outro parece ser incomum. Quando a infecção ocorre durante a gravidez, observa-se um aumento de cerca de 20% na taxa de fatalidade, embora essa taxa geralmente seja de 0,5 a 4%. As infecções por HEV variam desde uma doença inaparente até uma hepatite aguda severa, podendo levar à hepatite fulminante e à morte do paciente. Os sinais e sintomas não podem ser distinguidos daqueles que estão associados aos casos de hepatite aguda causada por outros vírus hepatotróficos (Schlauder, 2003). Embora existam testes disponíveis para detecção de anticorpos para HEV, estes parecem produzir resultados falso-positivos frequentes, dependendo dos antígenos empregados na detecção da reatividade (Mast, 1998). Há dois tipos de testes sorológicos disponíveis, que detectam IgM anti-HEV (para infecções recentes ou em andamento) e IgG anti-HEV (para infecções em andamento ou antigas). Devido à especificidade atualmente questionável dos ensaios sorológicos, é necessário realizar outro teste confirmatório. A amplificação por PCR de um produto específico do HEV-RNA, utilizando amostras de soro, plasma, bile ou fezes, torna-se um indicador definitivo de infecção aguda. No entanto, a janela de detecção do teste de PCR ocorre em 2 a 7 semanas após a infecção.

Hepatite G

Suspeitas foram levantadas acerca da existência de mais dois vírus distintos. Todavia, não foi comprovado se tais vírus causam hepatite pós-transfusional: o vírus da hepatite G (HGV, por vezes denominado G-B) (Laskus, 1997) e o vírus transmitido por transfusão ou TTV (Matsumoto, 1999). Enquanto ambos podem ser isolados a partir de uma elevada parcela da população de indivíduos com hepatite pós-transfusional, e apesar de pelo menos 1% dos doadores de sangue apresentarem viremia, esses vírus aparentemente não causam doença hepática nesses casos. Até o momento, não há testes sorológicos ou ensaios de PCR comercialmente disponíveis para a detecção de tais agentes. Embora seja possível determinar a ocorrência das formas aguda e crônica de infecção por HGV em alguns centros de pesquisa, utilizando o ensaio de PCR qualitativo para HGV-RNA, não se recomenda o uso de nenhum teste de rotina, uma vez que o significado clínico desse vírus permanece obscuro (Shuhart, 2003). Há diversos vírus diferentes que podem causar hepatite, porém tipicamente também costumam afetar outros órgãos. Os testes para tais vírus não serão abordados aqui.

Diagnóstico das doenças hepáticas

No Capítulo 8, foram resumidos os padrões fundamentais dos achados laboratoriais referentes às anomalias da função hepática. Essas informações foram apresentadas na Tabela 8.5. Na presente seção, os principais distúrbios hepáticos são discutidos, enfatizando-se as avaliações laboratoriais que possibilitam a determinação dos diagnósticos, muitas vezes sem necessidade de executar procedimentos invasivos, como as biópsias de fígado.

É importante ter em mente que, na hepatite aguda, as principais alterações observadas são as elevações significativas dos níveis de aminotransferases. Na cirrose, os níveis dessas enzimas tendem a permanecer normais ou se tornar discretamente elevados, enquanto o conteúdo de proteína total e de albumina é menor, e a concentração de amônia no soro encontra-se elevada. Na obstrução biliar pós-hepática, os níveis de bilirrubina e ALP se tornam elevados. Nas doenças hepáticas que ocupam espaço, os níveis de ALP e LDH se tornam altos. Na insuficiência hepática fulminante, são detectadas altas concentrações de aminotransferases e amônia, enquanto o conteúdo de proteína total e albumina é menor.

Hepatite

A hepatite costuma manifestar-se clinicamente com sintomas de fadiga e anorexia. Ao nível microscópico, a lesão celular e a necrose, em geral mínima, são causadas tanto pelo dano celular direto induzido pelo vírus (ou agente tóxico), como pela resposta imune dirigida

contra o vírus. Pode haver icterícia. Sem dúvida, a causa mais comum (> 90% dos casos) de hepatite é a viral: de todas as ocorrências, 50% são de hepatite B, 25% são de hepatite A e 20% são de hepatite C. Em geral, a icterícia muitas vezes manifesta-se inicialmente como icterícia da esclera, quando o paciente apresenta concentração sérica de bilirrubina total acima de 2 mg/dL. A causa da hepatite aguda quase sempre é viral (> 90% dos casos), embora também deva ser considerada a exposição a certos agentes químicos, como o tetracloreto de carbono ou o clorofórmio, ou a fármacos, como acetaminofeno, especialmente no caso de crianças. Uma categoria especial de hepatite induzida por toxinas é a hepatite causada pelo consumo de álcool, conforme se discute a seguir.

O achado mais importante nessa doença é uma elevação da concentração de aminotransferases para valores superiores a 200 UI/L, frequentemente 500 ou mesmo 1.000 UI/L. Uma exceção constitui a hepatite C, em que são observadas apenas elevações modestas dos níveis de ALT (mas não de AST). A proporção AST/ALT em geral favorece a ALT. A bilirrubina, com frequência, encontra-se aumentada e é composta por ambos os tipos – direta e indireta. A icterícia se manifesta em cerca de 70% dos casos de hepatite A aguda (Lednar, 1985), 33% dos casos de hepatite B (McMahon, 1985) e em cerca de 20% dos casos de hepatite C aguda (Hoofnagle, 1997). O aumento dos níveis de bilirrubina indireta se deve à incapacidade dos hepatócitos lesados de conjugar essa substância, enquanto a elevação dos níveis de bilirrubina direta decorre do bloqueio de canalículos comprometidos secundariamente ao processo inflamatório que ocorre durante a fase aguda. Devido ao dano causado aos hepatócitos, os níveis de LDH aumentam discretamente e atingem valores típicos em torno de 300 a 500 UI/L. Por causa da inflamação e/ou necrose e apoptose das células do revestimento dos ductos e canalículos, também pode haver aumento dos níveis de ALP, os quais geralmente atingem valores de 200 a 350 UI/L. A menos que a hepatite seja severa e envolva totalmente o fígado até progredir para uma insuficiência hepática fulminante, o conteúdo de proteínas totais e de albumina permanece nos limites normais. As frações de γ-globulina podem estar elevadas como resultado da infecção (Lotfy, 2006).

Diante do padrão sugestivo de hepatite exibido por esses analitos, é necessário realizar triagens à procura de causas específicas, ou seja, deve ser feita a pesquisa sorológica dos marcadores para hepatite A, B e C. A triagem para anticorpos IgM anti-hepatite A e HBsAg pode ser realizada em 1 dia. Se qualquer um desses testes resultar positivo, o diagnóstico é estabelecido. Caso os testes resultem negativos, deve ser conduzida uma nova triagem para hepatite B, ou seja, devem ser determinados os títulos séricos de IgM e IgG anti-HBcAg ("janela central"), bem como de IgG anti-HBsAg, conforme já descrito. Caso apenas esse último tipo de anticorpo seja detectado, pode ser difícil estabelecer se a hepatite B é a causa da infecção ou se o paciente tem história de exposição antiga ao vírus. A menos que o paciente apresente hepatite crônica ativa ou persistente, em que o HBsAg está continuamente presente, títulos elevados de IgG anti-HBsAg são detectados logo depois que os níveis de aminotransferases retornam ao normal. Também podem ser realizadas triagens para hepatite C. Se estas resultarem negativas, devem ser pesquisadas outras causas virais possíveis (p. ex., citomegalovírus e vírus Epstein-Barr). Em especial, diante de um evento de triagem para hepatite viral negativa, devem ser consideradas causas não virais (p. ex., toxinas químicas). Além disso, devem ser consideradas causas de hepatite menos comuns, como a doença de Wilson – em que a concentração sérica de ceruloplasmina está diminuída e os níveis urinários de cobre estão aumentados – e a hepatite autoimune. Ambas as condições podem se manifestar como doença aguda ou crônica. Na forma crônica, ambas podem dar origem a uma hepatite crônica ativa e, menos comumente, à cirrose. Na forma crônica da hepatite autoimune (muitas vezes acompanhada da elevação dos títulos de ANAs), costumam ser detectados aumentos policlonais da concentração de γ-globulinas.

Hepatite alcoólica. Na hepatite alcoólica, o padrão anteriormente descrito de concentrações anormais de analito se mantém, exceto no caso da AST, principalmente da AST mitocondrial. Os níveis dessa enzima, com frequência, se tornam desproporcionalmente elevados em relação aos níveis de ALT. Além disso, ocorrem aumentos marcantes da concentração de GGT, muitas vezes de modo desproporcional em relação à elevação dos níveis de ALP. A menos que o paciente alcoólatra apresente desnutrição, constata-se que os níveis de proteínas totais e de albumina se mantêm no intervalo de referência.

Hepatite crônica. Na hepatite crônica, o exame da biópsia mostra a presença de dano contínuo e inflamação crônica envolvendo os hepatócitos. Essa condição é causada principalmente pela hepatite B crônica ou por infecções de tipo C, cuja detecção se dá, respectivamente, pela observação da presença persistente de HBsAg ou pelo PCR-RT de sequências específicas para hepatite C. É um dos principais fatores predisponentes de cirrose e carcinoma hepatocelular – as duas causas mais importantes de morte por doença hepática. A hepatite crônica pode ser assintomática ou apresentar sintomas brandos. Usualmente, observa-se um aumento discreto dos níveis de AST e ALT, sendo que na hepatite C, com maior frequência, apenas os níveis de ALT sofrem uma elevação discreta.

Congestão passiva crônica

Na congestão passiva crônica envolvendo o fígado, na maioria das vezes secundária à insuficiência cardíaca congestiva, a pressão retrógrada a partir do lado direito do coração é transmitida aos sinusoides hepáticos por meio da veia cava inferior e das veias hepáticas. O aumento da pressão provoca dilatação dos sinusoides que, por sua vez, pode causar algum tipo de dano físico aos hepatócitos. Como resultado, observa-se um discreto aumento dos níveis de aminotransferases e, ocasionalmente, uma hiperbilirrubinemia branda. Outros analitos utilizados na determinação da função hepática usualmente se mantêm em seus intervalos de referência.

Cirrose

A cirrose hepática é uma condição resultante da fibrose parenquimatosa e da regeneração nodular hepatocítica. Pode ser causada pelo alcoolismo (cirrose macronodular ou de Laennec), hepatite pan-hepática, hepatite crônica ativa, toxinas e fármacos e doenças envolvendo o trato biliar (como nos tipos primário e secundário de cirrose biliar).

Além disso, doenças sistêmicas podem predispor o indivíduo à cirrose. Na *hemocromatose*, por exemplo, o excesso de ferro se deposita em diversos tecidos, incluindo o fígado, onde se torna tóxico aos hepatócitos e predispõe à cirrose. Essa doença é causada por substituições de aminoácidos isolados, mais comumente da tirosina pela cisteína 282, no produto proteico do gene *HFE*, situado no cromossomo 6 (Feder, 1996; Crawford, 1998 a). Considera-se que a proteína codificada por esse gene está envolvida na interação da transferrina com seu receptor (Zhou, 1998 b). Substituições do tipo C282Y comprometem o funcionamento da proteína e resultam na deposição anormal de ferro no fígado e em outros tecidos. Trabalhos mais recentes sugerem que a proteína HFE pode regular o armazenamento intracelular de ferro de modo independente de sua interação com o receptor de transferrina 1 (TfR1) (Carlson, 2005). O teste para detecção dessa condição envolve a determinação do grau de saturação sérica da ligação ao ferro, a qual é ≥ 45%. Esse teste apresenta elevada sensibilidade, porém sua especificidade é baixa e, por isso, reduz seu valor como ferramenta de triagem. Outros testes para essa condição incluem a determinação do conteúdo de ferro por meio do exame de biópsias de fígado e análise genética.

Como já foi discutido, na *doença de Wilson*, a deposição de cobre no fígado também exerce efeitos tóxicos e pode levar à hepatite crônica ativa e à cirrose. Na *deficiência de* α_1*-antitripsina*, em razão da contínua proteólise nos hepatócitos, os pacientes apresentam propensão significativamente maior ao desenvolvimento de cirrose. A hepatite crônica se deve à presença persistente do vírus da hepatite B ou C na circulação, bem como à doença autoimune, em que os elevados níveis de ANA ou ASMA também predispõem à cirrose.

De forma geral, seja qual for a causa, a cirrose é uma condição crônica que piora de modo gradativo e, ocasionalmente, pode progredir para insuficiência hepática fulminante, conforme se discute a seguir (Sunheimer, 1994). Logo no início, com frequência a doença é focal e pode não ser clinicamente evidente.

Diagnóstico e acompanhamento de cirrose, fibrose e inflamação necrotizante do fígado por meio de métodos não invasivos e utilizando analitos séricos

O diagnóstico definitivo de fibrose e/ou necrose e inflamação do fígado é realizado por meio do exame de biópsia hepática. Como esse procedimento invasivo está associado a certo grau de morbidade (p.

ex., pode causar hemorragia e pneumotórax) e a biópsia hepática em si apresenta problemas relacionados a erros de amostragem que podem gerar confusão, tentativas foram empreendidas no sentido de inventar novos métodos para diagnosticar e acompanhar tais processos patológicos de modo não invasivo, por meio da utilização dos níveis séricos de analitos determinantes da função hepática. O primeiro deles foi o "índice PGA" (Poynard, 1991). Esse índice é calculado a partir do PT e dos níveis séricos de γ-glutamil transferase e apoA-I. Os intervalos de valores para cada um desses analitos são divididos em quatro categorias, numeradas de zero a 4, em ordem crescente de grau de severidade. Por exemplo, os valores de GGT situados entre 20 e 49 recebem escore 1. Os valores entre 50 e 99 recebem escore 2, e assim por diante. No caso da apoA-I, o grau de severidade crescente da doença correlaciona-se à diminuição da concentração sérica dessa proteína. O PT aumenta com a gravidade da doença, porque o fígado é o único sítio de síntese dos fatores de coagulação. Em seguida, esses escores são somados para calcular o índice PGA. Constatou-se que escores de PGA mais altos estão correlacionados ao grau de fibrose hepática e à gravidade da cirrose, segundo critérios de gradação clínica e exame de biópsias de fígado (Teare, 1993). Esse índice também apresenta boa correlação com os níveis séricos de pró-peptídeo de pró-colágeno tipo III (PIIIP), também empregados no acompanhamento da cirrose ativa.

Mais recentemente, foram desenvolvidos outros índices que parecem ser mais efetivos. Entre eles, estão o Fibrotest e o índice Actitest (Poynard, 2005), que empregam a quantificação dos níveis de seis analitos (i. e., apoA-I, GGT – ambos também utilizados para calcular o índice PGA –, haptoglobina, bilirrubina total, α_2-macroglobulina e ALT), além de considerarem a idade e o sexo do paciente. Em seguida, são realizadas correlações com os resultados do exame de biópsia hepática, utilizando um algoritmo de inteligência artificial. Os escores para o componente Fibrotest são calculados em uma escala de zero a 1,0, correspondente ao sistema de estadiamento histopatológico denominado METAVIR (METAVIR Cooperative Group, 1994), do seguinte modo: F0 (sem fibrose); F1 (fibrose portal); F2 (pontes fibróticas com poucos septos); F3 (pontes fibróticas com muitos septos); F4 (fibrose manifesta). Os escores do Actitest são calculados de modo análogo, em uma escala de zero a 1,0 e utilizando os mesmos parâmetros. A única exceção é a correlação desses escores à atividade inflamatória necrotizante, com base no sistema METAVIR de gradação (Bedossa, 1996), do seguinte modo: A0 (sem atividade); A1 (atividade mínima); A2 (atividade moderada); A3 (atividade severa). Esses índices são amplamente adotados na Europa, ao contrário do que ocorre nos EUA. Há certo grau de discordância com relação à eficácia do uso desses índices para diagnosticar e acompanhar o processo de fibrose hepática e a atividade necrotizante/inflamatória. Por exemplo, no estudo realizado por Rossi et al. (2003), no qual 125 pacientes com hepatite C foram analisados, amostras de soro foram coletadas e submetidas a testes para avaliação de seis analitos adotando-se os índices Fibrotest e Actitest. Foram utilizados *cutoffs* < 0,1 para representar processos fibróticos mínimos, e > 0,6 para indicar fibrose severa. Dos 33 pacientes com escore de *cutoff* < 0,1, constatou-se que 6 (18%) apresentavam fibrose significativa. Dos 24 pacientes cujos escores tinham *cutoff* > 0,6, observou-se que 5 (21%) apresentavam biópsias com fibrose discreta. Em outro estudo semelhante, envolvendo 300 pacientes com hepatite C, as análises foram realizadas antes e após o regime de tratamento com agentes antivirais. Valores elevados (quase 0,8) para as áreas das regiões localizadas abaixo das curvas receptor-operador (ver Cap. 7) foram encontrados antes e após o tratamento. A sensibilidade global (Cap. 7) do método utilizado nesse estudo era de 90%, com um valor preditivo positivo de 88%. Tais valores indicam que o índice é uma ferramenta valiosa para a detecção da fibrose. Enfatizou-se, contudo, a possibilidade de ocorrerem resultados falso-positivos em consequência do tratamento da hepatite C com ribavirina, uma vez que esse fármaco induz hemólise e, assim, causa redução dos níveis de haptoglobulina e aumento da concentração de bilirrubina não conjugada. Essas alterações, por sua vez, modificam o índice de modo independente do grau de fibrose hepática. Outras condições não relacionadas à fibrose hepática que podem igualmente modificar o índice são a doença de Gilbert, a colestase extra-hepática e a inflamação aguda. Considerando as devidas ressalvas, Poynard estimou que 18% das discordâncias entre os exames de biópsia hepática e os resultados obtidos com o cálculo dos índices Fibrotest e Actitest foram causadas por erros de amostragem das biópsias de fígado – um conhecido problema associado a esse procedimento –, sendo que 2% das discordâncias resultaram do próprio teste (Poynard, 2004). Outros investigadores, a partir de seus estudos, concluíram que há necessidade de padronizar as metodologias para que todos os laboratórios que realizam os testes obtenham resultados individuais semelhantes (Rosenthal-Allieri, 2005). Outra conclusão foi a de que há carência de estudos prospectivos de ampla abrangência (Afdhal, 2004).

Outros índices (revistos e avaliados por Parkes *et al.*, 2006) também foram desenvolvidos. Entre eles, está o índice FIBROSpect II, que se baseia na concentração de inibidores teciduais de metaloproteinases, α_2-macroglobulina e ácido hialurânico. Esse último aparentemente exibe melhor correlação com o grau de fibrose hepática, comparado ao peptídeo de pró-colágeno tipo III (anteriormente mencionado), INR, contagem de plaquetas, proporção AST:ALT, índice da proporção AST-plaquetas (APRI, *AST-platelet ratio index*). Há ainda o índice de Forns, que correlaciona a extensão da fibrose hepática com idade, contagem de plaquetas, GGT e colesterol (Forns, 2002). Em comparação aos índices Fibrotest e Actitest, tais índices parecem apresentar sensibilidades e/ou especificidades menores (Thabut, 2003). Está claro que se trata de testes não invasivos, cujo refinamento adequado promete um diagnóstico confiável da fibrose e da necrose hepáticas, bem como o acompanhamento dessas condições quanto à eficácia do tratamento.

Correlações bioquímicas e clínicas da cirrose

À medida que a cirrose progride e envolve a maior parte (> 80%) do parênquima hepático, a função do fígado se torna comprometida. A síntese de proteínas total cai a níveis baixos, do mesmo modo que a síntese de albumina. A hipertensão porta, aliada à queda da pressão osmótica de coloides, resulta na formação de ascite e até anasarca. A compressão dos ductos biliares intra-hepáticos e colangíolos resulta na diminuição da excreção de bilirrubina e sais biliares, com consequente hiperbilirrubinemia e elevação dos níveis de ALP, GGT e 5'-NT. As concentrações séricas de enzimas dos hepatócitos, tais como AST, ALT e LDH, podem permanecer normais ou diminuir. Caso haja uma lesão em andamento que envolva os hepatócitos, os níveis séricos dessas enzimas podem se tornar discretamente elevados.

Nos estágios mais avançados da cirrose, os níveis de amônia no soro se tornam significativamente elevados e correlacionam-se, a grosso modo, com o grau de encefalopatia. Existem quatro níveis de gradação clínica da encefalopatia hepática: tremores motores detectados como asterixe (as mãos do paciente, quando pressionadas para trás e liberadas em seguida, movem-se oscilando para trás e para a frente); um estado letárgico, de torpor; obtundação severa; e coma manifesto. A diminuição dos níveis de amônia reduz o grau de encefalopatia. Mais recentemente, observou-se que os primeiros sinais de encefalopatia incluem distúrbios do sono e resultados anormais em testes neuropsiquiátricos.

Por ser o fígado o local onde ocorre a síntese de todos os fatores de coagulação (com exceção do fator de von Willebrand) e visto que essa síntese diminui acentuadamente na cirrose, como resultado observa-se o aparecimento de distúrbios da coagulação. Esse assunto foi discutido anteriormente. O TTP e o PT tornam-se prolongados e, muitas vezes, há diminuição da contagem de plaquetas, a qual pode ser causada pelo sequestro decorrente da esplenomegalia que se instala por causa da hipertensão porta. Entretanto, é possível que pacientes com cirrose apresentem coagulopatia intravascular disseminada, evidenciada pelos altos níveis de D-dímero e produtos da quebra de fibrina detectados no soro. Essa coagulopatia pode igualmente ser a causa da referida diminuição da contagem plaquetária. Em razão do desequilíbrio do metabolismo lipídico observado no fígado, as gorduras caem na circulação e se depositam nas membranas dos eritrócitos, fazendo com que estes se transformem em células-alvo.

A perda do volume vascular em decorrência da formação de ascite e anasarca pode acarretar uma baixa perfusão tecidual e causar acidose lática. Os receptores de volume, sensíveis à perda volumétrica, estimulam a secreção de ADH. A água retida dilui o soro e, assim, conduz à hiponatremia.

A cirrose hepática muitas vezes é associada à insuficiência renal, como resultado da síndrome hepatorrenal. Nessa condição (ainda pouco compreendida), a função tubular renal é comprometida. Ocorre acentuada elevação do BUN e dos níveis de creatina no soro, indicando

insuficiência renal. A baixa perfusão tecidual também pode causar necrose tubular aguda. Na síndrome hepatorrenal, a restauração da função hepática geralmente reverte o quadro de insuficiência renal.

Cirrose biliar primária e secundária já foram discutidas neste capítulo. Seu diagnóstico é dificultado pelo padrão variável das concentrações séricas dos analitos utilizados para avaliar o *status* hepático. No início, usualmente apresentam padrão obstrutivo, com elevação dos níveis de ALP e, às vezes, de bilirrubina. Esse padrão, então, se torna semelhante ao padrão da hepatite, devido aos efeitos tóxicos dos sais biliares sobre a função dos hepatócitos. Com o passar do tempo, esse padrão dá lugar a um padrão cirrótico, em que se observam a diminuição dos níveis de aminotransferases, proteína total e albumina e elevação dos níveis de amônia. Em pacientes que apresentam persistência do padrão obstrutivo indicada pelos resultados dos testes laboratoriais, sem evidências de lesões em massa ou presença de cálculos bloqueando o fluxo da bile, deve ser confirmada a presença de AMAs anti-M2. Títulos aumentados desse anticorpo são praticamente 100% de diagnósticos de CPB. Além disso, ensaios para detecção de anticorpos p-ANCA no soro devem ser realizados para determinar a ocorrência de cirrose biliar secundária, que também pode produzir o padrão colestático.

A sobrevida dos pacientes com CBP pode ser calculada utilizando-se uma fórmula empírica, análoga ao escore MELD anteriormente discutido, que considera a idade do paciente, a concentração sérica de albumina e bilirrubina, o PT (como no escore MELD) e a extensão do edema (Dickson, 1989). Essa fórmula fornece uma estimativa do limite de tempo, quando o paciente está sujeito a um transplante de fígado.

Obstrução biliar pós-hepática e pós-hepatocítica

A obstrução biliar pós-hepática se refere ao bloqueio dos ductos intra e extra-hepáticos e/ou ao bloqueio da excreção de bilirrubina oriunda dos hepatócitos para dentro dos canalículos, levando ao refluxo da bile para os hepatócitos e, por fim, de volta à circulação. A causa mais comum dessa condição é a colelitíase. Outras causas possíveis são CBP e colangite esclerosante primária, conforme discutido anteriormente, bem como a inflamação do trato biliar, observada na colangite ascendente e na sepse por bactérias Gram-negativas. Fármacos, como os neurolépticos (p. ex., clorpromazina), podem causar icterícia colestática. Lesões em massa, como ocorre no carcinoma da cabeça do pâncreas ou em linfomas, também podem causar obstrução biliar pós-hepática pelo bloqueio do ducto biliar comum na porta do fígado. Tais condições provocam elevação dos níveis de bilirrubina, principalmente direta, bem como de ALP e GGT. Muitas vezes, contudo, em especial durante condições inflamatórias envolvendo o trato biliar, o fluxo biliar é parcialmente obstruído. Nessas circunstâncias, a concentração de bilirrubina permanece normal ou aumenta apenas discretamente. Entretanto, os níveis de ALP e 5'-NT aumentam de modo significativo.

Ocasionalmente, é possível observar hiperbilirrubinemia em pacientes que, a não ser por esse distúrbio, são normais. A bilirrubina cujos níveis estão aumentados é do tipo indireta e, na maioria dos casos, é oriunda da hemólise que ocorre principalmente na anemia hemolítica. Esse tipo de anemia pode ser desencadeado por uma doença hepática. Exemplificando, a hepatite viral pode precipitar a hemólise em pacientes deficientes de G6PDH. Na síndrome de Zieve, a hemólise ocorre associada à hepatite alcoólica e à hiperlipidemia. A doença de Wilson, às vezes, está associada à hemólise aguda. Pacientes com hepatite crônica secundária à doença autoimune podem desenvolver uma severa doença hemolítica que, em certos casos, requer esplenectomia.

Lesões que ocupam espaço

As lesões hepáticas que ocupam extensas áreas do órgão são causadas em grande parte por cânceres metastáticos. Um pequeno percentual dessas lesões se deve ao aparecimento de linfomas, carcinoma hepatocelular primário e angiossarcoma hepático, bem como de lesões benignas, por exemplo, hemangiomas do fígado. O achado cardinal desse tipo de lesão são os aumentos isolados dos níveis de duas enzimas hepáticas: LDH e ALP. O aumento da concentração de ALP é causado pela invasão por uma ou várias massas dos canalículos e colangíolos, ou até dos principais ductos biliares. As razões que explicam o aumento dos níveis de LDH ainda permanecem indeterminadas. A fração LDH_5 é mais comumente a responsável por essa elevação. Essa fração pode ser produzida não só pelo fígado, como também por tumores. A típica concentração de LDH é de 500 a 1.000 UI/L ou mais, enquanto a de ALP costuma ser > 500 UI/L. Quando um tumor maligno se espalha amplamente pelo fígado, pode haver uma discreta elevação da concentração de aminotransferases e hiperbilirrubinemia, em decorrência da obstrução biliar, bem como diminuição dos níveis de proteínas totais e albumina. Essa redução do conteúdo proteico talvez não seja causada em grande parte pela disfunção hepática, e sim pelo processo de caquexia generalizada associado à disseminação tumoral. Inúmeros cânceres que se originam no fígado podem ser identificados por meio de testes sorológicos. Exemplificando, conforme discutido na seção sobre AFP neste mesmo capítulo, os níveis séricos de AFP encontram-se aumentados no carcinoma hepatocelular. Como discutido na Parte IX, é possível diagnosticar um angiossarcoma utilizando anticorpos específicos para a proteína mutante *ras*-p21.

Insuficiência hepática fulminante

Na insuficiência hepática fulminante – uma condição altamente fatal – a massiva destruição do tecido hepático resulta em falência hepática total. Dependendo da natureza e da extensão da destruição, o processo definitivo de regeneração deixa de ocorrer. Por outro lado, diante de um processo de morte celular limitado, os hepatócitos conseguem se recuperar em casos de lesão aguda, e a função hepática normal é recuperada. As causas que determinam essa condição são pouco compreendidas. A síndrome de Reye é um exemplo de tal condição, em que uma criança com infecção viral e febre é tratada com aspirina. Decorridas 1 a 2 semanas após a dissipação da infecção e da febre, a criança repentinamente apresenta encefalopatia secundária à hiperamonemia como consequência de uma insuficiência hepática aguda. Também foi descrita uma forma adulta da síndrome de Reye. Outras possíveis causas da insuficiência hepática fulminante são a hepatite B aguda com superinfecção por hepatite D, a síndrome de Budd-Chiari e outras condições trombóticas que afetam as veias hepáticas, hipoperfusão vascular do fígado, desvio jejunoileal em casos de obesidade, intoxicação por tilenol, alcoolismo e cirrose. Outra condição predisponente significativa é o fígado gorduroso na gravidez (Sunheimer, 1994).

Existem duas formas histopatológicas de insuficiência hepática fulminante: necrose pan-hepática (em que todos os hepatócitos se tornam necróticos) e esteatose microvesicular (em que ocorre ampliação dos sinusoides e colestase). O segundo tipo é mais comumente observado na síndrome de Reye e no fígado gorduroso durante a gravidez. É importante destacar que, quando o padrão de esteatose microvesicular apresenta alterações histológicas mínimas, o exame de biópsias de fígado não é revelador. Conforme descrito adiante, um diagnóstico definitivo requer o uso de métodos laboratoriais de análise da função hepática.

Uma grande parte das sequelas patofisiológicas deixadas pela cirrose também ocorrem na insuficiência hepática fulminante (Sunheimer, 1994). Os pacientes desenvolvem ascite e se tornam encefalopáticos devido à hiperamonemia. O conteúdo sérico de proteínas totais e de albumina sofre diminuição. Praticamente todos os pacientes que apresentam essa doença exibem coagulopatias severas, em particular a coagulopatia intravascular disseminada, sendo que todos são anêmicos. Do mesmo modo, todos os pacientes com a doença desenvolvem insuficiência renal em decorrência da síndrome hepatorrenal e da necrose tubular aguda.

Além disso, muitos desses pacientes se tornam hipoglicêmicos, possivelmente por causa da ausência das enzimas envolvidas na glicogenólise. Também há desenvolvimento de acidose lática devido à precária perfusão tecidual. É interessante o fato de que, diferentemente da cirrose (em que os pacientes se tornam hiponatrêmicos), os pacientes com insuficiência hepática fulminante podem se tornar *hipernatrêmicos* e hipocalêmicos. Tal observação pode ser explicada pela descoberta de que, em alguns pacientes, os níveis circulantes de aldosterona sérica são bem elevados (Sunheimer, 1994). Talvez a incapacidade do fígado de depurar esse hormônio da circulação resulte nos elevados níveis desse hormônio.

Os achados laboratoriais diagnósticos da insuficiência hepática fulminante são rápidos aumentos dos níveis séricos de aminotransferases,

como a AST, cuja concentração pode se tornar maior que 2×10^4 UI/L – cerca de 1,5 vezes acima da concentração de ALT. Enquanto os níveis dessas enzimas aumentam, o conteúdo de proteínas totais e albumina caem notavelmente. De um modo geral, esse padrão assemelha-se a uma combinação dos padrões de hepatite e cirrose em estágio final, exceto que, usualmente, na hepatite aguda (salvo na hepatite alcoólica), os níveis de AST e ALT aumentados atingem uma proporção de 1:1 ou constituem uma proporção favorável à ALT. Logo em seguida ao aparecimento desses padrões, os níveis séricos de amônia aumentam rapidamente e causam encefalopatia. As concentrações de LDH, ALP e bilirrubina aumentam de modo acentuado. Todas essas alterações já descritas ocorrem em um período de cerca de 1 semana. Após mais outra semana, os níveis séricos de AST e ALT tornam-se novamente baixos e, às vezes, até indetectáveis. Esse achado indica que houve total destruição do tecido hepático viável (Sunheimer, 1994).

Pacientes cujos níveis de AST e ALT sofrem as alterações estereotípicas descritas devem ser muito bem analisados quanto à possibilidade de desenvolverem insuficiência hepática fulminante, em especial se houver qualquer indicação de encefalopatia. Embora a terapia de suporte consiga restaurar a função hepática normal em alguns casos, o transplante de fígado é a cura definitiva para a maioria dos pacientes que apresentam insuficiência hepática fulminante.

Referências bibliográficas

Afdhal NH, Nunes D: Evaluation of liver fibrosis: a concise review. Am J Gastroenterol 2004; 99:1160–1174.

Aldenhovel HG: The influence of long-term anticonvulsant therapy with diphenylhydantoin and carbamazepine on serum gamma-glutamyltransferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase. Eur Arch Psychiatry Neurol Sci 1988; 237:312–316.

Alter HJ: New kit on the block: Evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. Hepatology 1992a; 15:350–353.

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al: The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N Engl J Med 1999; 341:556–562.

Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al: The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. N Engl J Med 1992b; 327:1899–1905.

Aoki SK, Finegold D, Kuramoto IK, et al: Significance of antibody to hepatitis B core antigen in blood donors as determined by their serologic response to hepatitis B vaccine. Transfusion 1993; 33:362–367.

Aoyagi K, Iida K, Matsunaga Y, et al: Performance of a conventional enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen in the early phases of hepatitis C infection. Clin Lab 2001; 47:119–127.

Arvan D, Shirey TL: Conjugated bilirubin: A better indicator of impaired hepatobiliary excretion than direct bilirubin. Ann Clin Lab Sci 1985; 15:252–259.

Barrera JM, Francis B, Ercilla G, et al: Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. Vox Sang 1995; 68:15–18.

Batshaw ML: Inborn errors of urea synthesis. Ann Neurol 1994; 35:133–141.

Beld M, Penning M, van Putten M, et al: Quantitative antibody responses to structural (core) and nonstructural (NS3, NS4, and NS5) hepatitis C virus proteins among seroconverting injecting drug users: Impact of epitope variation and relationship to detection of HCV RNA in blood. Hepatology 1999; 29:1288–1298.

Belfrage P, Berg B, Hagerstrand I, et al: Alterations of lipid metabolism in healthy volunteers during long-term ethanol intake. Eur J Clin Invest 1977; 7:127–131.

Bellentani S, Tabarroni G, Barchi T, et al: Effect of ursodeoxycholic acid treatment on alanine aminotransferase and gamma-glutamyltranspeptidase serum levels in patients with hypertransaminasemia. Results from a double-blind controlled trial. J Hepatol 1989; 8:7–12.

Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos JL: Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. J Hepatol 1986; 2:123–131.

Berk PD, Noyer C: Structure, formation, and sources of bilirubin and its transport in plasma. Semin Liver Dis 1994a; 14:325–330.

Berk PD, Noyer C: Clinical chemistry and physiology of bilirubin. Semin Liver Dis 1994b; 14:346–351.

Berk PD, Noyer C: The familial unconjugated hyperbilirubinemias. Semin Liver Dis 1994c; 14:356–385.

Berk PD, Noyer C: The familial conjugated hyperbilirubinemias. Semin Liver Dis 1994d; 14:386–394.

Berlin NI, Berk PD: Quantitative aspects of bilirubin metabolism for hematologists. Blood 1981; 57:983–999.

Berman DH, Leventhal RI, Gavaler JS, et al: Clinical differentiation of fulminant Wilsonian hepatitis from other causes of hepatic failure. Gastroenterology 1991; 100:1129–1134.

Binder L, Smith D, Kupka T, et al: Failure of prediction of liver function test abnormalities with the urine urobilinogen and urine bilirubin assays. Arch Pathol Lab Med 1989; 113:73–76.

Bloomer JR, Berk PD, Vergalla J, et al: Influence of albumin on the extravascular distribution of unconjugated bilirubin. Clin Sci Mol Med 1973; 45:517–526.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al: The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. N Engl J Med 1995; 333:1171–1175.

Brillanti S, Masci C, Miglioli M, Barbara L: Serum IgM antibodies to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. Arch Virol Suppl 1993; 8:213–218.

Brown EA, Stapleton JT: Hepatitis A virus. *In* Murray PR (ed): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003, pp 1452–1463.

Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al: The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATP-ase similar to the Menkes gene. Nat Genet 1993; 5:327–337.

Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, et al: Ammonia: Key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Neurochem Pathol 1987; 6:1–12.

Cabrerizo M, Bartolome J, De Sequera P, et al: Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. J Am Soc Nephrol 1997; 8:1443–1447.

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, et al: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. N Engl J Med 1999; 341:22–26.

Carey MC, Cahalane MJ: Enterohepatic circulation. *In* Arias IM, Jakoby WB, Popper H, et al: (eds): The Liver: Biology and Pathobiology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1988, pp 573–616.

Carlson H, Zhang AS, Fleming WH, Enns CA: The hereditary hemochromatosis protein, HFE, lowers intracellular iron levels independently of transferrin receptor 1 in TRVb cells. Blood 2005; 105(6):2564–2570. Epub 2004.

Carmel R, Wong ET, Weiner JM, et al: Racial differences in serum total bilirubin levels in health and in disease (pernicious anemia). JAMA 1985; 253:3416–3418.

Chapman RW, Cottone M, Selby WS, et al: Serum autoantibodies, ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. Gut 1986; 27:86–91.

Chappell S, Guetta-Baranes T, Batowski K, et al: Haplotypes of the alpha-1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. Hum Mutat 2004; 24:535–536.

Chowdhury JR, Wolkoff AW, Arias IM: Heme and bile pigment metabolism. *In* Arias IM, Jakoby WB, Popper H, et al: (eds): The Liver: Biology and Pathobiology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1988, pp 419–449.

Collins D, Goold MF, Rosalki SB, et al: Plasma intestinal alkaline phosphatase and intermediate molecular mass gamma glutamyltransferase activities in the differential diagnosis of jaundice. J Clin Pathol 1987; 40:1252–1255.

Coppel RL, McNeilage LJ, Surh CD, et al: Primary structure of the human M2 mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis: Dihydrolipoamide acetyl transferase. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:7317–7321.

Crawford DH, Jazwinska EC, Cullen LM, Powell LW: Expression of HLA-linked hemochromatosis in subjects homozygous or heterozygous for the C282Y mutation. Gastroenterology 1988a; 114:1003–1008.

Crawford JM, Hauser SC, Gollan JL: Formation, hepatic metabolism, and transport of bile pigments: A status report. Semin Liver Dis 1988b; 8:105–118.

Czaja AJ: Autoimmune hepatitis: Evolving concepts and treatment strategies. Dig Dis Sci 1995a; 40:435–456.

Czaja AJ, Ming C, Shirai M, Nishioka M: Frequency and significance of antibodies to histones in autoimmune hepatitis. J Hepatol 1995b; 23:32–38.

Czaja AJ, Shiels MT, Taswell HF, et al: Frequency and significance of immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in corticosteroid-treated severe chronic active hepatitis B. Mayo Clin Proc 1988; 63:119–125.

da Fonseca-Wollheim F: Preanalytical increase of ammonia in blood specimens from healthy subjects. Clin Chem 1990; 36:1483–1487.

Davies SM, Szabo E, Wagner JE, et al: Idiopathic hyperammonemia: A frequently lethal complication of bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1996; 17:1119–1125.

Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, et al: Prognosis in primary biliary cirrhosis: Model for decision making. Hepatology 1989; 10:1–7.

Doumas BT, Wu TW: The measurement of bilirubin fractions in serum. Crit Rev Clin Lab Sci 1991; 28:415–445.

Doumas BT, Wu TW, Jendrzejczak B: Delta bilirubin: Absorption spectra, molar absorptivity, and reactivity in the diazo reaction. Clin Chem 1987; 33:769–774.

Dufour DR: Gender related differences in liver function and integrity tests. Clin Chem 1998a; 44:A137.

Dufour DR: Effects of habitual exercise on routine laboratory tests. Clin Chem 1998b; 44:A136.

Dufour JF, Kaplan MM: Muddying the water: Wilson's disease challenges will not soon disappear. Gastroenterology 1997; 113:348–350.

Dufour DR, Teot L: Laboratory identification of ischemic hepatitis (shock liver). Clin Chem 1988c; 34:A1287.

Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, et al: A hepatitis E virus variant from the United States: Molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. J Gen Virol 1999; 80:681–690.

Farnsworth N, Fagan SP, Berger DH, Awad SS: Child-Turcotte-Pugh versus MELD score as a predictor of outcome after elective and emergent surgery in cirrhotic patients. Am J Surg 2004; 188:580–583.

Trata-se de uma excelente revisão sobre a eficácia de diferentes métodos preditivos para pacientes com cirrose.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 1996; 13:399–408.

Fevery J, Blanckaert N: What can we learn from analysis of serum bilirubin? J Hepatol 1986; 2:113–121.

Forns X, Ampurdance S, Llovet JM, et al: Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. Hepatology 2002; 36:986–992.

Fuchs S, Bogomolski-Yahalom V, Paltiel O, Ackerman Z:

Ischemic hepatitis: Clinical and laboratory observations of 34 patients. J Clin Gastroenterol 1998; 26:183–186.
Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, et al: Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. Hepatology 1997; 26:1634–1639.
Fussey SP, Guest JR, James OFW, et al: Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8654–8658.
Gottesman MM, Ambudkar SV: Overview: ABC transporters and human disease. J Bioenerg Biomembr 2001; 33:453–458.
Discussão sucinta sobre a família de proteínas transportadoras que apresenta homologia com a região do transportador ABC (ATP-binding cassette) *e contém domínios transmembrana envolvidos no reconhecimento de substratos, que são transportados através, para dentro e para fora das membranas celulares, incluindo os glicuronídeos de bilirrubina que são secretados por uma proteína ABC no canalículos.*
Hayashi PH, Beames MP, Kuhns MC, et al: Use of quantitative assays for hepatitis B e antigen and IgM antibody to hepatitis B core antigen to monitor therapy in chronic hepatitis B. Am J Gastroenterol 1996; 91:2323–2328.
Heubi JE, Daugherty CC, Partin JC, et al: Grade 1 Reye's syndrome – outcome and predictors of progression to deeper coma grades. N Engl J Med 1984; 311:1539–1542.
Hoofnagle JH: Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. Hepatology 1997; 26(3 Suppl 1):15S–20S.
Horvat RT, Tegtmeier GE: Hepatitis B and D viruses. *In* Murray PR (ed): Manual of Clinical Microbiology, 8th edition. Washington DC, ASM Press, 2003, pp 1480–1494.
Howanitz JH, Howanitz PJ, Skrodzki CA, Iwanski JA: Influences of specimen processing and storage conditions on results for plasma ammonia. Clin Chem 1984; 30:906–908.
Huizenga JR, Tangerman A, Gips CH: Determination of ammonia in biological fluids. Ann Clin Biochem 1994; 31:529–543.
Ihara H, Nakamura H, Aoki Y, et al: Effects of serum-isolated vs. synthetic bilirubin-albumin complexes on dye-binding methods for estimating serum albumin. Clin Chem 1991; 31:1269–1272.
Ihara H, Shino Y, Hashizume N, et al: Effect of light on total and direct bilirubin by an enzymatic bilirubin oxidase method. J Anal Bio Sci 1997; 20:349–354.
Johnson PJ, McFarlane IG, Alvarez F, et al: Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. Hepatology 1993; 18:998–1005.
Johnston M, Harrison L, Moffatt K, et al: Reliability of the international normalized ratio for monitoring the induction phase of warfarin: Comparison with the prothrombin time ratio. J Lab Clin Med 1996; 128:214–217.
Kaplan MM, Gandolfo JV, Quaroni EG: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antimitochondrial antibody. Hepatology 1984; 4:727–730.
Kelly DA, Summerfield JA: Hemostasis in liver disease. Semin Liv Dis 1987; 7:182–191.
Kelly DA, Tuddenham EGD: Hemostatic problems in liver disease. Gut 1986; 27:339–349.
Kim NK, Yasmineh WG, Freier EF, et al: Value of alkaline phosphatase, 5?nucleotidase, gamma-glutamyltransferase, and glutamate dehydrogenase activity measurements (single and combined) in serum in diagnosis of metastasis to the liver. Clin Chem 1977; 23:2034–2038.
Koff RS: Seroepidemiology of hepatitis A in the United States. J Infect Dis 1995; 171(Suppl 1):S19–S23.
Kovacs MJ, Wong A, MacKinnon K, et al: Assessment of the validity of the INR system for patients with liver impairment. Thromb Haemost 1994; 71:727–730.
Kozaki N, Shimizu S, Higashijima H, et al: Significance of serum delta-bilirubin in patients with obstructive jaundice. J Surg Res 1998; 79:61–65.
Krams SM, Surh CD, Coppel RL, et al: Immunization of experimental animals with dihydrolipoamide acetyltransferase, as a purified recombinant polypeptide, generates mitochondrial antibodies but not primary biliary cirrhosis. Hepatology 1989; 9:411–416.
Kraemer D, Scheurlen M: Gilbert disease and Type I and II Crigler–Najjar syndrome due to mutations in the same UGT1A1 gene locus. Med Klin (German) 2002; 15:528–532.
Krajden M, Shivji R, Gunadasa K, et al: Evaluation of the core antigen assay as a second-line supplemental test for diagnosis of active hepatitis C virus infection. J Clin Microbiol 2004; 42:4054–4059.
Langner C, Denk H: Wilson disease. Virchows Arch 2004; 445:111–118.
LaPerche S, Courouce AM, Lemaire JM, et al: GB virus type C/hepatitis G virus infection in French blood donors with anti-NS5 isolated reactivities by recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. Transfusion 1999; 39:790–791.
Laskus T, Radkowski M, Wang LF, et al: Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfected with hepatitis C and G viruses. J Virol 1997; 71:7804–7806.
Lau JY, Mizokami M, Kolberg JA, et al: Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. J Infect Dis 1995; 171:281–289.
Lauff JJ, Kasper ME, Wu TW, Ambrose RT: Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin that is firmly bound to protein. Clin Chem 1982; 28:629–637.
Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, et al: Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. Am J Epidemiol 1985; 122:226–233.
Lewis M, Howdle PD: The Neurology of Liver Failure. QJM 2003; 96:623–633.
Lo DH, Wu TW: Assessment of the fundamental accuracy of the Jendrassik-Grof total and direct bilirubin assays. Clin Chem 1983; 29:31–36.
London WT, Evans AA: The epidemiology of hepatitis viruses B, C, and D. Clin Lab Med 1996; 16:251–271.
Lotfy M, El-Kady IM, Nasif WA, et al: Distinct serum immunoglob pattern in Egyptian patients with chronic HCV infection analyzed by nephelometry. J Immunoassay Immunochem 2006; 27:103–114.
Lunel F, Cresta P, Vitour D, et al: Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. Hepatology 1999; 29:528–535.
McDonagh AF, Palma LA, Lauff JJ, et al: Origin of mammalian biliprotein and rearrangement of bilirubin glucuronides in vivo in the rat. J Clin Invest 1984; 74:763–770.
McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al: Interferon alfa-2b or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med 1998; 339:1485–1492.
McHutchison JG, Poynard T, Gordon SC, et al: The impact of race on response to anti-viral therapy in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 1999; 30:A302.
McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, et al: Acute hepatitis B virus infection: Relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. J Infect Dis 1985; 151:599–603.
Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, et al: Two different subtypes of antimitochondrial antibodies are associated with primary biliary cirrhosis: Identification and characterization by radioimmunoassay and immunoblotting. Hepatology 1987; 7:893–899.
Maruo Y, Addario C, Mori A, et al: Two linked polymorphic mutations [A(TA) 7TAA and T3279G] of UGT1A1 as the principal cause of Gilbert syndrome. Hum Genet 2004; 115:525–526.
Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH: Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. Hepatology 1998; 27:857–861.
Matsumoto A, Yeo AE, Shih JW, et al: Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. Hepatology 1999; 30:283–288.
Moss DW: Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. Clin Chim Acta 1997; 257:133–140.
Moussavian SN, Becker RC, Piepmeyer JL, et al: Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism. Influence of alcohol ingestion and liver disease. Dig Dis Sci 1985; 30:211–214.
Mulder AH, Horst G, Haagsma EB, et al: Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. Hepatology 1993; 17:411–417.
Nagaoka S, Yatsuhashi H, Hamada H, et al: The des-gamma-carboxy prothrombin index is a new prognostic indicator for hepatocellular carcinoma. Cancer 2003; 98:2671–2677.
Nalpas B, Vassault A, Charpin S, et al: Serum mitochondrial aspartate aminotransferase as a marker of chronic alcoholism: Diagnostic value and interpretation in a liver unit. Hepatology 1986; 6:608–614.
Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, et al: Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. J Viral Hepat 1996; 3:75–78.
Nista EC, Fini L, Armuzzi A, et al: ^{13}C-breath tests in the study of microsomal liver function. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004; 8:33–46.
Notter D: Bilirubin. *In* Siest G, Schiele F, Henny J, et al: (eds): Interpretation of Clinical Laboratory Tests. Foster City, CA, Biomedical Publications, 1985.
Nyblom H, Berggren U, Balldin J, Olsson R: High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. Alcohol Alcohol 2004; 39:336–339.
Onishi S, Isobe K, Itoh S, et al: Metabolism of bilirubin and its photoisomers in newborn infants during phototherapy. J Biochem (Tokyo) 1986; 100:789–795.
Palmer M, Schaffner F: Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. Gastroenterology 1990; 99:1408–1413.
Panteghini M: Aspartate aminotransferase isoenzymes. Clin Biochem 1990; 23:311–319.
Parkes J, Guha IN, Roderick P, et al: Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C 2006; 44:462–474.
Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, et al: A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin–Johnson syndrome. Hepatology 1997; 25:1539–1542.
Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, et al: What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? Hepatology 1998; 27:1700–1702.
Persico P, Persico E, Bakker C, et al: Hyperbilirubinemia in subjects with Gilbert syndrome (GS) mutations is determined by the rate of hepatic uptake of organic anions. Hepatology 1999; 30:A501.
Pincus JH, Cohan JL, Glaser GH: Neurologic complications of internal disease. *In* Baker AB, Baker LH (eds): Clinical Neurology, New York, Harper and Row, 1991, pp 10–13.
Poynard T, Aubert A, Bedossa P, et al: A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. Gastroenterology 1991; 100:1397–1402.
Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al: Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Lancet 1998; 352:1426–1432.
Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, et al: Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. Clin Chem 2004; 50:1344–1355.
Propst T, Propst A, Dietze O, et al: Alpha-1-antitrypsin deficiency and liver disease. Dig Dis 1994; 12:139–149.
Rajpert-De Meyts E, Heisterkamp N, Groffen J: Cloning and nucleotide sequence of human gamma-glutamyl transpeptidase. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8840–8844.
Ravaggi A, Biasin MR, Infantolino D, Cariani E: Comparison of competitive and non-competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA. J Virol Methods 1997; 65:123–129.
Reddy KR, Hoofnagle JH, Tong MJ, et al: Racial differences in response to therapy with interferon in chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. Hepatology 1999; 30:787–793.
Robert A, Chazouilleres O: Prothrombin time in liver failure: Time, ratio, activity percentage, or international

normalized ratio? Hepatology 1996; 24:1392–1394.
Roozendaal C, Van Milligen de Wit AW, Haagsma EB, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis: Defined specificities may be associated with distinct clinical features. Am J Med 1998; 105:393–399.
Rosenthal P, Pincus MR, Fink D: Sex and age-related differences of bilirubin in serum. Clin Chem 1984; 30:1380–1382.
Rosenthal-Allieri MA, Peritore ML, Tran A, et al: Analytical variability of the Fibrotest proteins. Clin Biochem 2005; 38:473–478.
Rossi E, Adams L, Prins A, et al: Validation of the FibroTest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients Clin Chem 2003; 49:450–454.
Rost D, Rudolph G, Kloeters-Plachky P, Stiehl A: Effect of high-dose ursodeoxycholic acid on its biliary enrichment in primary sclerosing cholangitis. Hepatology 2004; 40:693–698.
Saldanha J, Lelie N, Heath A: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. Vox Sang 1999; 76:149–158.
Schlaeger R, Haux P, Kattermann R: Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholestasis: Significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of alkaline phosphatase from rat liver. Enzyme 1982; 28:3–13.
Schlauder GC, Dawson GJ: Hepatitis E virus. *In* Murray PR (ed): Manual of Clinical microbiology, 8th edition. Washington DC, ASM Press, 2003, pp 1495–1511.
Seeff LB, Beebe GW, Hoofnagle JH, et al: A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. N Engl J Med 1987; 316:965–970.
Seeff LB, the NHLBI Study Group: Mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B hepatitis and type C hepatitis: An NHLBI multi-center study. Hepatology 1994; 20:A204.
Shepard RL, Kraus SE, Babayan RK, Sirosky MB: The role of ammonia toxicity in the post transurethral prostatectomy syndrome. Br J Urol 1987; 60:349–351.
Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S: AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. Am J Gastroenterol 1998; 93:44–48.
Shiffman ML, Ferreira-Gonzalez A, Reddy KR, et al: Comparison of three commercially available assays for HCV RNA using the international unit standard: Implications for management of patients with chronic hepatitis C virus infection in clinical practice. Am J Gastroenterol 2003; 98:1159–66.
Resumo importante sobre os aspectos referentes às unidades padronizadas internacionais para hepatite C.
Shuhart MC, Gretch DR: Hepatitis C and G viruses. *In* Murray PR (ed): Manual of Clinical Microbiology, 8th edition. Washington, DC, ASM Press, 2003, pp 1480–1494.
Singer AJ, Carracio TR, Mofenson HC: The temporal profile of increased transaminase levels in patients with acetaminophen-induced liver dysfunction. Ann Emerg Med 1995; 26:49–53.
Skinhoj P, Mikkelsen F, Hollinger FB: Hepatitis A in Greenland: Importance of specific antibody testing in epidemiologic surveillance. Am J Epidemiol 1977; 105:140–147.
Stahl J: Studies of the blood ammonia in liver disease. Its diagnostic, prognostic, and therapeutic significance. Ann Intern Med 1963; 58:1–24.
Sveger T: The natural history of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient children. Acta Paediatr Scand 1988; 77:847–851.
Sunheimer R, Capaldo G, Kashanian F, et al: Serum analyte pattern characteristic of fulminant hepatic failure. Ann Clin Lab Sci 1994; 24:101–109.
Descreve os principais aspectos patofisiológicos da insuficiência hepática fulminante e fornece um resumo dos perfis de função hepática em diferentes estados de doença hepática.
Teckman JH, An JK, Blomenkamp K, et al: Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 286:G851–G862.
Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, et al: Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. Lancet 1993; 342:895–898.
Thabut D, Simon M, Myers RP, et al: Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2003; 37:1220–1221.
Totos G, Gizaris V, Papaevangelou G: Hepatitis A vaccine: Persistence of antibodies 5 years after the first vaccination. Vaccine 1997; 15:1252–1253.
Ts'ao C, Swedlund J, Neofotistos D: Implications of use of low international sensitivity index thromboplastins in prothrombin time testing. Arch Pathol Lab Med 1994; 118:1183–1187.
Trotter JF, Brimhall B, Arjal R, Phillips C: Specific laboratory methodologies achieve higher model for endstage liver disease (MELD) scores for patients listed for liver transplantation. Liver Transpl 2004; 10:995–1000.
Tsujii H, Konig J, Rost D, et al: Exon–intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin–Johnson syndrome. Gastroenterology 1999; 117:653–660.
Turchin A, Wiebe DA, Seely EW, et al: Severe hypercholesterolemia mediated by lipoprotein X in patients with chronic graft-versus-host disease of the liver. Bone Marrow Transplant 2005; 35:85–89.
Van de Water L, Carr JM, Aronson D, McDonagh J: Analysis of elevated fibrinogen degradation product levels in patients with liver disease. Blood 1986; 67:1468–1473.
Van Hootegem P, Fevery J, Blanckaert N: Serum bilirubins in hepatobiliary disease: Comparison with other liver function tests and changes in the post-obstructive period. Hepatology 1985; 5:112–117.
Vernelen K, Claeys H, Verhaert AH, et al: Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. Lancet 1994; 343:853.
Vierling JM, Berk PD, Hoffman AF, et al: Normal fasting-state levels of serum cholyl-conjugated bile acids in Gilbert's syndrome: An aid to the diagnosis. Hepatology 1982; 2:340–343.
Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, et al: Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. Hepatology 1999; 29:908–914.
Viot M, Thyss A, Schneider M, et al: Alpha 1 isoenzyme of alkaline phosphatases. Clinical importance and value for the detection of liver metastases. Cancer 1983; 52:140–145.
Vossler DG, Wilensky AJ, Cawthon DF, et al: Serum and CSF glutamine levels in valproate-related hyperammonemic encephalopathy. Epilepsia 2002; 43:54–59.
Wenham PR, Horn DB, Smith AF: Multiple forms of gamma-glutamyl-transferase: A clinical study. Clin Chem 1985; 31:569–573.
Whitehead TP, Clarke CA, Whitfield AG: Biochemical and haematological markers of alcohol intake. Lancet 1978; 1:978–981.
Williams AL, Hoofnagle JH: Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. Gastroenterology 1988; 95:734–739.
Xu SR, Yao EG, Dong ZR, et al: Plasma ammonia in patients with acute leukemia. Chin Med J 1992; 105:713–716.
Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, et al: Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. Hepatology 1998; 27:1377–1382.
Yuki N, Hayashi N, Moribe T, et al: Relation of disease activity during chronic hepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. Hepatology 1997; 25:439–444.
Zhou SL, Gordon RE, Bradbury M, et al: Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in Hep G2 cells. Hepatology 1998a; 27:1064–1074.
Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, et al: HFE gene knockout produces mouse model of herediatry hemochromatosis. Proc Natl Acad Sci USA 1998b; 95:2492–2497.
Zimmerman HJ: Intrahepatic cholestasis. Arch Intern Med 1979; 139:1038–1045.
Zucker SD, Horn PS, Sherman KE: Serum bilirubin levels in the U.S. population: Gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. Hepatology 2004; 40:827–835.

CAPÍTULO 22

Diagnóstico laboratorial de distúrbios gastrintestinais e pancreáticos

Martin H. Bluth MD PhD, Rosemarie E. Hardin MD, Scott Tenner MD, Michael E. Zenilman MD, Gregory A. Threatte MD

Distúrbios gastrintestinais comuns 327
- Distúrbios gástricos 327
- Distúrbios pancreáticos 328
- Distúrbios intestinais 331

Testes, métodos e aplicações clínicas comuns 337
- Amilase (total sérica e urinária) 337
- Lipase 337
- Isoamilases 338
- Gastrina 339
- Pepsina e pepsinogênio 339
- Tripsinogênio 340
- Peptídeo vasointestinal ativo (VIP) 340
- Cloreto no suor 341
- Teste de Apt para sangramento neonatal 341
- Testes para esteatorreia 342
- Testes para má absorção 342
- Teste e exame de fezes 343
- Teste de tolerância à lactose 346
- Marcadores genéticos da doença gastrintestinal 346

Referências bibliográficas 347

PONTOS-CHAVE

- O *Helicobacter pylori* é reconhecido como principal agente causador de úlceras gastrintestinais (GI) e gastrite. São empregados testes sorológicos para triagem de *H. pylori* e testes respiratórios não invasivos ou biópsia endoscópica para confirmar sua erradicação após o tratamento.
- A amilase sérica é o analito de escolha para o diagnóstico da pancreatite aguda. Outros marcadores, como lipase, tripsinogênio (e metabólitos), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), podem ajudar a determinar a etiologia e/ou o diagnóstico. Os testes laboratoriais de rotina têm pouco valor na identificação de pacientes com pancreatite crônica. O diagnóstico é obtido pelo uso de técnicas de imagem (ERCP, *endoscopic retrograde cholangiopancreatography* ou colangiopancreatografia retrógrada endoscópica).
- A triagem laboratorial para fibrose cística deve se limitar ao teste do cloreto no suor. Casos específicos devem ser confirmados por meio de testes de análise genética.
- Muitas vezes, é possível classificar uma diarreia crônica como sendo de origem inflamatória, osmótica ou secretória, ou resultante de alterações da motilidade intestinal. O exame de fezes inicial para detecção de sangue, micróbios, gordura e leucócitos ajuda a determinar algoritmos de teste subsequentes.
- A deficiência de IgA deve ser considerada ao analisar pacientes com suspeita de espru celíaco, incorporada à interpretação dos resultados de testes para anticorpos antigliadina, antiendomísio, antirreticulina ou antitransglutaminase.
- A intolerância à lactose aumenta com a idade. Os testes de triagem para deficiências reais de dissacarídeos incluem desafio oral com os dissacarídeos suspeitos de estarem reproduzindo a sintomatologia, seguido de exame de fezes. O diagnóstico definitivo dessas deficiências depende da demonstração de uma baixa atividade enzimática específica na mucosa ao exame de biópsia de intestino delgado.
- Anticorpos p-ANCA e ASCA podem ser empregados para distinguir a dor abdominal encontrada na síndrome do intestino irritável daquela observada na enteropatia inflamatória.
- O tumor carcinoide é o tipo mais comum de tumor neuroendócrino no trato GI.
- A quantificação dos níveis de gastrina no intraoperatório é útil para determinar se um tecido anormal foi completamente removido do paciente durante cirurgias para gastrinomas.
- A realização de triagem com testes de detecção de sangue oculto nas fezes pode reduzir a mortalidade por câncer de cólon em 15 a 35%. Diversos fatores podem gerar resultados tanto falso-positivos como falso-negativos.

Ao longo das últimas duas décadas, a prática da gastroenterologia desenvolveu-se muito. O maior grau de especialização proporcionado pelas técnicas endoscópicas permite a visualização direta e a realização de biópsias a partir de lesões patológicas, facilitando a confirmação de diagnósticos clínicos suspeitos, como no caso das doenças ulcerativas gástricas e duodenais. Apesar de as avaliações endoscópicas constituírem modalidades diagnósticas inestimáveis, são caras, invasivas e requerem os conhecimentos práticos especializados de um gastroenterologista. As práticas clínicas continuaram a se desenvolver nos últimos anos, com o advento das novas técnicas de avaliação laboratorial para diagnóstico não invasivo de distúrbios GI e pancreáticos. Alguns exemplos são os testes imunoquímicos de fezes e o teste de DNA para detecção do câncer de cólon, além dos vários testes sorológicos para detecção de anticorpos que auxiliam no diagnóstico da enteropatia inflamatória. Estes, por sua vez, permitem diferenciar a doença de Crohn da colite ulcerativa – tarefa anteriormente impossível diante dos testes laboratoriais de rotina então disponíveis. Além disso, novos testes laboratoriais com maior sensibilidade e especificidade têm substituído os testes mais antigos no diagnóstico das doenças. Um exemplo é a substituição da quimiotripsina fecal pela detecção dos níveis fecais de elastase na determinação da insuficiência pancreática. O conhecimento desses testes, de seus perfis de sensibilidade e especificidade, assim como estar atento à possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos gerados por tais testes, são fatores cruciais à interpretação dos resultados, especialmente para o clínico responsável pela devida supervisão da doença. Novos testes sorológicos não invasivos também estão começando a ser explorados quanto à utilidade clínica como métodos de triagem. É o caso dos testes de pepsinogênio, por exemplo, utilizados para detectar gastrite atrófica e carcinoma gástrico em estágio inicial. Este capítulo aborda os distúrbios clinicamente relevantes e discute a utilidade dos métodos laboratoriais na confirmação de doenças, na orientação de intervenções terapêuticas, na predição prognóstica e no monitoramento terapêutico. Nesta edição, decidiu-se adaptar as avaliações laboratoriais àquelas que mostram mais de perto a prática clínica comum na era da endoscopia e com o advento dos modernos testes diagnósticos.

Distúrbios gastrintestinais comuns

Distúrbios gástricos

Doença ácido-péptica

A abordagem prática da doença ácido-péptica requer a integração dos dados fornecidos pelo clínico, endocopista, radiologista, patologista clínico e cirurgião patologista. O *Helicobacter pylori* foi reconhecido como sendo o principal agente causador de duodenites e úlceras duodenais,

além de estar associado com mais frequência à gastrite antral crônica do tipo B, a úlceras gástricas, à dispepsia não ulcerosa, ao carcinoma gástrico e a MALTomas (Veldhuyzen van Zanten, 1994; Wotherspoon, 1998; Peterson, 1991; Thiede, 1997). O uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) causa ou agrava inflamações e úlceras gástricas e pépticas. Estados hipersecretórios constituem uma causa bem mais rara de doença *ácido*-péptica. Dados obtidos a partir da história e do exame físico podem sugerir inicialmente a presença de doença ácido-péptica. Os diagnósticos são confirmados por meio de técnicas radiológicas e/ou endoscópicas. Os testes para *H. pylori* e estados hipersecretórios envolvem análises laboratoriais. (Para mais informações, consulte o Cap. 56.)

Tendo em vista que *H. pylori* é considerado o principal agente causador de úlceras pépticas e por estar significativamente associado a múltiplos tipos de patologia do trato GI superior, há grande interesse em estudos acerca de sua detecção e do tratamento da doença que causa, bem como dos meios que possibilitam confirmar sua erradicação. Na última década, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou inúmeros produtos para detecção dessa bactéria, que se encontram comercialmente disponíveis. Um argumento convincente para tal medida é que todos os pacientes diagnosticados com *H. pylori* precisam ser tratados (Graham, 1997). Embora o número e os tipos de testes provavelmente continuem a aumentar, a amostragem de tecidos, os testes respiratórios e a sorologia constituem, hoje em dia, o suporte principal de todo o arsenal diagnóstico.

Os testes para *H. pylori* com frequência aproveitam a capacidade de o microrganismo produzir urease. Os testes respiratórios de hidrogênio, tanto radioativos como não radioativos, são exemplos de métodos não invasivos usados para detectar infecções ativas causadas pela bactéria. Cada um deles é sensível e específico anteriormente ao início da terapia. O uso mecânico de inibidores da bomba de prótons, antibióticos ou antiácidos contendo bismuto pode resultar em testes falso-negativos. O tratamento de *H. pylori* pode não proporcionar a erradicação completa da bactéria. Os testes respiratórios de hidrogênio podem fornecer resultados falso-negativos se forem realizados logo após o tratamento, antes que a carga bacteriana seja suficientemente grande para ser detectada (Atherton, 1994).

Os anticorpos séricos dirigidos contra *H. pylori* podem ser utilizados para detectar a exposição do indivíduo à bactéria. Para tanto, existem testes de ELISA disponíveis e confiáveis (Feldman, 1995 a, b; van de Wouw, 1996). Embora atualmente não sejam utilizados de forma rotineira no cenário clínico com o objetivo de determinar se a infecção está ou esteve presente no paciente, os níveis quantitativos desses anticorpos mostraram elevado grau de acurácia (Lerang, 1998). No momento, a sorologia, em geral, é empregada na triagem de *H. pylori*, enquanto os testes respiratórios são utilizados para confirmar a erradicação da bactéria após o tratamento, a menos que a realização de uma endoscopia permita coletar tecidos para testes rápidos de urease ou revisão histológica (Megraud, 1997).

Os testes bioquímicos baseados na detecção de urease são utilizados na rotina para detectar a presença de *H. pylori* em amostras de biópsia obtidas por endoscopia. Amostras de biópsia recentes, obtidas por endoscopia, são imersas em líquidos ou géis contendo ureia. A urease bacteriana quebra a ureia e produz amônia. A mudança do pH no meio afeta o indicador de cor e, assim, tem-se a base que permite a detecção. A carga bacteriana determinará a quantidade de urease presente e pode afetar a velocidade da resposta. Se essa carga for pequena, o teste pode gerar um resultado falso-negativo (Xia, 1994). Esse teste é barato e de fácil execução, contudo requer a realização de endoscopia, que é uma técnica cara e traz riscos potenciais.

Existem, ainda, kits de testes sorológicos rápidos para uso no próprio consultório. Foi demonstrado que a acurácia desses kits depende das preparações de anticorpo utilizadas. As preparações contendo IgG apresentam desempenho mais consistente. Outras qualidades do teste, como reprodutibilidade, custo e facilidade de execução, são fatores a serem considerados quando da revisão de cada uma das inúmeras marcas comercializadas atualmente (Laheij, 1998). A revisão histológica de amostras de biópsia coradas por Warthin-Starry ou Giemsa continua sendo uma das técnicas mais empregadas para determinar a ocorrência de infecções ativas. A cultura de microrganismos pode ser inconsistente e, geralmente, não é realizada na rotina clínica. Exames de fezes com ensaios enzimáticos para antígenos e metodologias de PCR também são disponibilizados comercialmente, porém sua eficácia é motivo de controvérsias (Makristathis, 1998).

Os estados hipersecretórios são sugeridos pela ocorrência de uma extensiva doença *ácido*-péptica, especialmente na ausência de *H. pylori*, e pelo uso de NSAIDs. A falha em responder a doses usuais de agentes bloqueadores do receptor da histamina 2 (receptor H_2), bem como a inibidores da bomba de prótons, também sugere hipersecreção de ácido clorídrico. Embora a análise gástrica continue sendo o " padrão-ouro" da quantidade de ácido secretado, é um método invasivo e utilizado com menor frequência. É preciso ter o cuidado de evitar o uso de medicamentos antissecretórios nos devidos intervalos de tempo, antes da realização desse tipo de teste. O uso de bloqueadores de receptor H_2 também deve ser suspendido por 48 horas, enquanto os inibidores da bomba de prótons devem ser evitados por 7 dias. Existem certos bloqueadores de receptor H_2 que são disponibilizados sem prescrição médica, de modo que a educação dos pacientes é uma consideração importante, e os clínicos devem se lembrar de rever todas as medicações em uso por seus pacientes.

Os níveis de gastrina, com ou sem estimulação de secretina, podem ser empregados para diagnosticar a síndrome de Zollinger-Ellison (ZE) e, em muitos casos, poupar o paciente das análises gástricas. Níveis séricos de gastrina > 150 ng/L (normal < 100 ng/L), em especial quando concomitante a valores de pH gástrico < 3, são altamente sugestivos de gastrinoma. Diante de resultados equivocados, a secretina (2 U/kg) pode ser administrada por via endovenosa, e os níveis seriais de gastrina podem ser determinados em 2, 5, 10, 15 e 20 minutos. Um aumento dos níveis de gastrina superior a 100 ng/L (aumento normal < 50 ng/L ou 50%) é considerado teste positivo. A octreotida – a forma sintética da somatostatina – tem sido utilizada na localização de tumores. A octreotida marcada com radioatividade se liga aos receptores de somatostatina e pode ser subsequentemente localizada com auxílio de cintilografia. Se tais tumores forem removidos cirurgicamente, os níveis de gastrina poderão ser utilizados para avaliar um potencial sucesso ou recaídas futuras.

Distúrbios pancreáticos

Macroamilasemia

Macroamilasemia é o termo utilizado para descrever uma condição em que há elevação persistente da atividade de amilase sérica, sem nenhuma manifestação aparente dos sintomas clínicos de um distúrbio pancreático. É atribuída à presença de um complexo amilase-macromolécula, cujo grande tamanho impossibilita sua excreção urinária e, assim, prolonga seu tempo de meia-vida. A macroamilase é um complexo circulante constituído por amilase normal ligada, na maioria das vezes, a uma imunoglobulina e, em outros casos, a um polissacarídeo. As imunoglobulinas envolvidas são a IgA e a IgG. A composição das microamilases é heterogênea. Análises do complexo após a dissociação ácida revelaram a presença de isoamilases de tipos P e S em proporções variáveis. Estima-se que o peso molecular possa variar de 150.000 a mais de 1.000.000. A macroamilasemia também pode ocorrer em pacientes hiperamilasêmicos com níveis urinários de amilase não diminuídos e naqueles que apresentam atividade normal de amilase sérica e urinária. A lipase sérica pode igualmente formar complexo com imunoglobulinas circulantes, resultando em macrolipasemia (Zaman, 1994). A Tabela 22.1 mostra os aspectos distintivos da hiperamilasemia.

A macroamilasemia pode ocorrer com uma frequência de 1,05% em pacientes selecionados ao acaso, 2,56% em indivíduos com hiperamilasemia e 0,98% em indivíduos com amilase sérica normal (Klonoff, 1980). A macroamilasemia, por si só, não é uma doença, pois não é consistentemente acompanhada de nenhum sintoma clínico. Trata-se de uma condição adquirida e benigna que pode ser observada em indivíduos aparentemente sadios, e que é mais frequente em homens do que em mulheres. A idade do paciente no momento em que a condição é descoberta, na maioria dos casos, situa-se entre 50 e 70 anos. A ocorrência de macroamilasemia pode significar a sinalização precoce de uma doença, seja como marcador ou disproteinemia induzida por doença inespecífica com capacidade de ligação à amilase, além de

Tabela 22.1 Diagnóstico diferencial da hiperamilasemia e da macroamilasemia

Condição	Amilase sérica	Lipase sérica	Amilase urinária	C_{am} : C_{cr}	Macroamilase sérica
Hiperamilasemia pancreática	Alta	Alta	Alta	Alta	Ausente
Hiperamilasemia salivar	Alta	Normal	Baixa ou normal	Baixa ou normal	Ausente
Macroamilasemia de tipo 1	Alta	Normal	Baixa	Muito baixa	Alta
Macroamilasemia de tipo 2	Alta	Normal	Baixa ou normal	Baixa	Moderada
Macroamilasemia de tipo 3	Normal	Normal	Normal	Baixa ou normal	Traços

C_{am} : C_{cr} = proporção depuração de amilase/depuração de creatinina = (amilase urinária/amilase sérica) × (creatinina sérica/creatinina urinária).

Conforme Kleinman DS, O'Brien JF: Macroamylase. Mayo Clin Proc 1986, 61:69, com permissão.

poder ser considerada um distúrbio que envolve enzima complexada a imunoglobulinas.

Do ponto de vista clínico, é importante diferenciar a macroamilasemia de outras condições associadas à hiperamilasemia. A possibilidade de macroamilasemia deve ser considerada para o paciente que apresenta hiperamilasemia, taxa de depuração amilase-creatinina muito baixa (< 1%) e função renal normal. Todavia, a indicação definitiva dessa condição requer a demonstração direta da existência de moléculas de macroamilase por meio de ultracentrifugação, cromatografia ou outras técnicas físicas. Um método de detecção por cromatografia tem sido usado há muitos anos, bem como um ensaio rápido e simples que se baseia na precipitação seletiva da macroamilase em soluções de polietileno glicol (Levitt, 1982).

Pancreatite aguda

Desde a primeira vez em que foi descrita, em 1929, a amilase sérica continua sendo o teste laboratorial diagnóstico universal para a detecção de pancreatite aguda (Elman, 1929). Derivada das células pancreáticas acinares, a amilase sérica sofre uma elevação de sua concentração ao longo das primeiras 2 a 12 horas após o início de uma pancreatite aguda, atinge os valores de pico em 48 horas e volta ao normal em 3 a 5 dias (Zieve, 1964). No cenário clínico apropriado – marcado por um reinício agudo, dor epigástrica "tediosa" que irradia para as costas ou flancos, e associado a náuseas e vômitos – a amilase sérica ajuda a confirmar as suspeitas do diagnóstico de pancreatite aguda com um valor preditivo positivo de aproximadamente 100%.

Apesar dos elevados valores preditivos positivo e negativo, há determinadas situações clínicas em que o médico precisa ser um tanto cético e estar ciente das limitações do ensaio. A sensibilidade é restrita no caso de pacientes com hipertrigliceridemia e alcoólatras. A especificidade é reduzida diante das elevações da amilase oriundas de processos intra-abdominais inflamatórios e inflamação das glândulas salivares parótida e submandibular. Do mesmo modo, a diminuição da depuração pode conduzir à detecção de níveis falsamente elevados em pacientes com insuficiência renal e em indivíduos normais que carregam proteínas ou polipeptídeos não associados à doença (Smotkin, 2002). Seja como for, a avaliação da amilase sérica constitui um método acurado num cenário clínico adequado. A adoção de um *cutoff* com valor três vezes maior que o limite máximo normal provocará um aumento da especificidade (Steinberg, 1985).

Embora a lipase sérica seja derivada das células pancreáticas acinares, sua concentração sofre um aumento discreto antes da elevação dos níveis de amilase, 4 a 8 horas após o início de um episódio de pancreatite aguda, atingindo os valores de pico igualmente antes (em 24 horas) (Steinberg, 1985). A lipase sérica também permanece por mais tempo no soro (8 a 14 dias). Por esses motivos, é mais sensível e específica do que a amilase sérica. Entretanto, a utilidade da lipase sérica na pancreatite aguda mostrou-se variável em decorrência das discrepâncias referentes ao método quantitativo, à seleção do paciente e ao ponto de *cutoff* (Tietz, 1993).

Não há nenhum benefício clínico extra na determinação da lipase sérica em pacientes que apresentam sintomas clínicos de pancreatite aguda e níveis de amilase sérica maiores que três vezes o valor máximo normal. O uso da lipase sérica no diagnóstico de pancreatite aguda deve ser reservado para pacientes cujos sintomas clínicos são consistentes com a doença e nos quais os níveis séricos de amilase parecem ser falsamente baixos. Tais condições são observadas em pacientes alcoólatras, com hipertrigliceridemia, ou que apresentam a doença tardiamente. Devido às despesas adicionais e à falta de benefícios para a maioria dos pacientes, deve ser considerado inadequado o uso da lipase sérica com a amilase sérica como processo de rotina na avaliação laboratorial de suspeitas de pancreatite aguda.

Sabe-se que ambas, lipase e amilase, podem surgir de outras fontes além do pâncreas (Frank, 1999). Assim, a utilização de ambos os ensaios pode otimizar a acurácia (Corsetti, 1993). Há quem considere a determinação de isoamilase pancreática o método mais custo-efetivo (Sternby, 1996). Devido à falta de um "padrão-ouro" de quantificação imediatamente disponível para o diagnóstico de pancreatite aguda, além da variabilidade dos métodos bioquímicos, é difícil calcular com precisão a sensibilidade e a especificidade dessas enzimas. Recentemente, o teste urinário com vareta medidora de nível para tripsinogênio 2 apresentou uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 95%, em comparação com a amilase sérica (sensibilidade de 85% e especificidade de 91%), considerando 300 U/L o valor máximo normal (Kemppainen, 1997). Este pode servir como teste de triagem rápido em circunstâncias clínicas corretas. Um ensaio sensível e capaz de detectar a concentração plasmática dos precursores de calcitonina é outro método que está sendo atualmente investigado quanto ao potencial de determinar o grau de severidade de um episódio de pancreatite aguda. Níveis anormais podem ser detectados na admissão, usualmente algumas horas após o início da dor abdominal (Ammori, 2003). Foi demonstrado que os precursores de calcitonina plasmática aumentam significativamente com o evento inicial de uma infecção severa e de inflamação sistêmica, como se observa na pancreatite aguda. Além disso, essa elevação ocorre de modo gradual e previsível, o que torna possível utilizar o ensaio sorológico como potencial marcador do grau de severidade da doença.

Embora um número considerável de outras enzimas tenha sido examinado quanto ao potencial papel clínico no diagnóstico e no prognóstico da pancreatite aguda, nenhuma delas foi amplamente utilizada na clínica. Além disso, a amilase sérica não oferece nenhuma vantagem em relação ao teste sorológico, e a depuração urinária dessa enzima é inespecífica (Lankisch, 1977).

O teste laboratorial pode ajudar a distinguir a etiologia da pancreatite aguda. As decisões de supervisão a serem tomadas para prevenir a recorrência da doença dependem da capacidade de determinar a etiologia. Em uma metanálise, uma concentração de ALT e/ou AST superior a 150 UI/dL (o triplo do valor normal) apresentou valor preditivo positivo de 95% na previsão de cálculos biliares como causa subjacente da doença. No entanto, apesar da elevada especificidade, somente metade dos pacientes com pancreatite causada por cálculo biliar apresentou elevação significativa de AST/ALT (Tenner, 1994). Devido à combinação da baixa sensibilidade com a baixa especificidade, a bilirrubina e a ALP aparentemente exercem papel limitado no diagnóstico da pancreatite aguda decorrente de cálculos biliares. Entretanto, num paciente com esse tipo de doença, as elevações persistentes dos níveis séricos de bilirrubina podem sinalizar a presença de um cálculo recorrente no ducto biliar comum e, portanto, justificam a realização de uma ERCP e a extração do cálculo. Devido à baixa taxa de depuração, os níveis de ALP permanecem elevados semanas após a ocorrência do evento agudo envolvendo a árvore biliar.

Diferente do pâncreas normal, que inflama em pacientes com pancreatite causada por cálculo biliar, o pâncreas do paciente com pancreatite aguda induzida por álcool é alvo de lesões que ocorrem no decorrer de vários anos, com o consumo de bebidas alcoólicas. Os ductos vão sendo alterados pela deposição de tampões proteináceos. A própria glândula tipicamente sofre alterações em sua arquitetura. Por esse motivo, trata-se de uma doença distinta. Em cada quatro pacientes com pancreatite induzida por álcool, um apresenta níveis normais de amilase (Spechler, 1983). A glândula se torna "queimada". Embora a amilase seja afetada,

o mesmo não ocorre com a lipase. No pâncreas, parece haver de 4 a 5 vezes mais lipase do que amilase (Tietz, 1993). Sendo assim, a proporção lipase/amilase parece ser preditiva da pancreatite induzida por álcool (Tenner, 1992). Utilizando múltiplos do limite máximo normal, uma proporção > 3 é considerada preditiva, enquanto uma proporção > 5 é diagnóstica de pancreatite aguda induzida por álcool.

Além da proporção lipase/amilase, a transferrina deficiente em carboidratos (CDT, *carbohydrate deficient transferrin*) parece ser útil na determinação do alcoolismo. Um indivíduo que consome grande quantidade de álcool apresentará elevação de CDT independentemente de seu consumo de álcool nos últimos dias. Este é, portanto, o marcador ideal num paciente suspeito de alcoolismo que nega ter consumido bebidas alcoólicas quando o nível de álcool está anormal (Le Moine, 1994).

Na pancreatite aguda, a dificuldade para determinar precocemente o grau de severidade da doença complica a supervisão de uma parcela significativa de pacientes. Múltiplos testes laboratoriais foram estudados numa tentativa de definir o grau de severidade ainda no início da doença. Apesar dos estudos intensivos, apenas dois testes – peptídeo ativador de tripsinogênio (TAP, *trypsinogen activation peptide*) e hematócrito – mostraram-se úteis no início do curso da doença.

A ativação precoce e inadequada da tripsina nos ácinos pancreáticos leva à liberação de TAP. Esse produto proteico não costuma ser detectado em níveis significativos no sangue ou na urina. Em pacientes com pancreatite aguda, os níveis de TAP aumentam. Foi demonstrado que uma concentração maior que 30 mmol/L está associada à doença severa, com um valor preditivo negativo de 100% (Tenner, 1997). A Biotrin (Dublin, Irlanda) disponibilizou um novo ELISA que analisa amostras de urina, capaz de auxiliar na determinação do grau de severidade.

Valores de hematócrito acima de 44 ou que apresentem elevação nas primeiras 24 horas estão associados à ocorrência de necrose pancreática (Baillargeon, 1998). Esse fato provavelmente tem a ver com a hemoconcentração, a partir de uma combinação de perdas severas de terceiro espaço, retenção de líquidos e hidratação endovenosa precária. Uma proteína C reativa do soro é útil em fases subsequentes (36 a 48 horas após o início dos sintomas), na determinação da existência de necrose pancreática (Buchler, 1986). Na Tabela 22.2 há um resumo dos testes laboratoriais empregados na avaliação da pancreatite aguda.

Tabela 22.2 Testes laboratoriais para pancreatite aguda

Teste laboratorial	Objetivo	Usos e limitações
Amilase	Diagnóstico	Acurada para concentrações até três vezes acima do limite máximo normal; especificidade diminuída na insuficiência renal; normalmente aumentada na macroamilasemia; interferências no teste em casos de hipertrigliceridemia; elevação a partir de outras fontes, como glândulas salivares e/ou inflamação intra-abdominal (até 3x); pode estar normal na pancreatite aguda induzida por alcoolismo
Lipase	Diagnóstico	Especificidade diminuída na insuficiência renal; o complexo imune produz resultados falso-positivos; elevação a partir da glândula salivar e de inflamação intra-abdominal
Tripsinogênio 2	Diagnóstico	Uso limitado, incerto, se for superior à amilase/lipase
AST/ALT	Etiologia	Se o limite máximo normal for maior que três vezes, a presença de cálculos biliares aparece como etiologia em 95% dos casos; baixa sensibilidade
Proporção lipase/amilase	Etiologia	Sendo > 5, é diagnóstico de pancreatite aguda induzida por alcoolismo; baixa sensibilidade
Transferrina deficiente de carboidrato (CDT)	Etiologia	Útil para pacientes que negam o consumo de bebidas alcoólicas; permanece aumentada semanas após a bebedeira
Peptídeo ativador de tripsinogênio (TAP)	Severidade	Sendo > 30 mmol/L na urina de 6 a 12 horas, tem valor preditivo 100% negativo
Hematócrito	Severidade	Maior que 44 no momento da admissão, ou em elevação durante as primeiras 24 horas, associado à necrose pancreática
Proteína C reativa	Severidade	Valores > 200 UI/L estão associados à necrose pancreática; útil após as primeiras 36 a 48 horas

Pancreatite crônica

A pancreatite crônica é marcada pela destruição progressiva das células das ilhotas e do tecido acinar do pâncreas. Este último fenômeno é o responsável pela má digestão associada à doença, porque acarreta a perda da secreção das enzimas que realizam a digestão dos alimentos no intestino delgado. Os testes laboratoriais têm pouco valor em casos de pacientes com suspeita de pancreatite crônica. Embora os níveis de amilase e lipase possam se elevar em exacerbações agudas, a ausência de aumento da concentração dessas enzimas no soro não exclui a possibilidade de um ataque de dor a partir de pancreatite crônica. Essa doença passa a ser suspeita no cenário clínico apropriado e pode se manifestar como uma discreta intolerância à glicose até diabetes melito, dor abdominal crônica e/ou má digestão/absorção. Como resultado da progressão da doença, também pode haver hiperglicemia e subsequente disfunção endócrina do pâncreas. À medida que a desnutrição evolui, a concentração sérica de albumina diminui. Os níveis séricos de beta-caroteno detectados podem se tornar baixos conforme a má absorção de lipídeos se desenvolve.

O diagnóstico clínico de pancreatite crônica depende da detecção de anomalias estruturais na anatomia ductal através de técnicas de imagem, tipicamente ERCP. O método mais simples para avaliar a função do pâncreas consiste no exame de detecção de gordura nas fezes. Infelizmente, a má digestão das gorduras somente ocorre após uma perda de 90% da capacidade secretória de lipase pancreática. Existem ensaios para tripsinogênio sérico que podem ter utilidade diagnóstica diante de valores abaixo de 20 ng/mL, mas concentrações dessa ordem são detectadas apenas nos pacientes com doença em estágio avançado (tipicamente, quando a esteatorreia já se manifestou) (Jacobsen, 1984). Devido à distribuição inadequada da elastase fecal, a baixa concentração dessa enzima nas fezes pode ser empregada no diagnóstico de pancreatite crônica. Apesar de os estudos iniciais terem sugerido que o teste é incapaz de detectar a pancreatite crônica na ausência de esteatorreia, testes mais modernos demonstraram que se trata de um teste acurado para a avaliação da doença em estágio menos avançado. Um novo teste de ELISA para elastase fecal – uma enzima específica do pâncreas que não é degradada durante o transporte intestinal e atinge uma concentração fecal de 5 a 6 vezes mais alta que a concentração no suco duodenal – foi desenvolvido e comercializado, sendo aparentemente muito sensível à pancreatite crônica (Loser, 1996). Num estudo clínico, o teste apresentou sensibilidades de 63, 100 e 100%, respectivamente, para pacientes com insuficiência pancreática branda, moderada e severa.

Quando os sintomas sugerem esse distúrbio, a anatomia da glândula é revista através de radiografias e realiza-se a substituição de insulina e enzimas pancreáticas exócrinas conforme a necessidade. Há pouca necessidade clínica de estimar o percentual de função exócrina ou endócrina. Diante da suspeita de que a má digestão pancreática esteja causando diarreia, muitos clínicos tentam um procedimento com enzimas pancreáticas exógenas. Se a tentativa for bem-sucedida, é provável que o diagnóstico seja obtido num cenário clínico adequado.

Fibrose cística

A fibrose cística (mucoviscidose) do pâncreas é uma doença autossômica recessiva que apresenta incidência de 1:1.600 nascimentos de caucasianos e 1:17.000 nascimentos de afro-americanos nos Estados Unidos. Aproximadamente, 1 em cada 20 caucasianos é portador da doença. A fibrose cística é caracterizada pela atividade secretória anormal de várias glândulas exócrinas do corpo, incluindo pâncreas, glândulas salivares, peritraqueais, peribrônquicas e peribronquiolares, bem como glândulas lacrimais, sudoríparas, mucosas do intestino delgado e dos ductos biliares. O envolvimento das glândulas intestinais

pode resultar em íleo paralítico meconial ao nascimento. A doença pulmonar crônica e a má absorção resultantes do envolvimento pancreático são os principais problemas clínicos enfrentados por aqueles que conseguem sobreviver além da infância.

Como existem múltiplos alelos do gene da fibrose cística (Cap. 69), o diagnóstico laboratorial ainda depende da demonstração do aumento da concentração de sódio e cloreto no suor. Infelizmente, a menos que seja corretamente executado, o teste do suor é o menos confiável dos testes e apresenta elevada proporção de resultados falso-positivos e falso-negativos. Em crianças, considera-se diagnóstica a detecção de uma concentração de cloreto acima de 60 mmol/L de suor em pelo menos duas ocasiões. Níveis de 50 a 60 mmol/L são sugestivos na ausência de insuficiência suprarrenal. Pacientes com suspeita de fibrose cística baseada em resultados indeterminados de eletrólitos no suor podem ser submetidos à repetição dos testes após a administração de um mineralocorticoide (p. ex., fludrocortisona). Em tais pacientes, os valores de eletrólitos permanecerão inalterados, sendo que nos controles normais esses valores diminuirão. A concentração de sódio no suor tende a ser discretamente menor do que a concentração de cloreto em paciente com fibrose cística; contudo, a situação inversa é observada em indivíduos normais. Concentrações de cloreto acima de 60 mmol/L no suor podem ser detectadas em alguns pacientes desnutridos, com displasia ectodérmica hiper-hidrótica, diabetes insípido nefrogênica, insuficiência renal, deficiência de glicose-6-fosfatase, hipotireoidismo, mucopolissacaridose e fucosidose. Tais distúrbios costumam ser facilmente diferenciados da fibrose cística através de seus sintomas clínicos. Resultados falso-negativos de testes de suor foram obtidos de pacientes com fibrose cística na presença de edema hipoproteinêmico.

Em metade do grupo de mulheres adultas durante a fase pré-menopáusica, os eletrólitos do suor apresentaram flutuações cíclicas. Os níveis de cloreto atingiram valores de pico mais comumente em 5 a 10 dias antes do início da menstruação, sendo discretamente inferiores a 65 mmol/L. Os homens apresentaram flutuações ao acaso, com níveis acima de 70 mEq/L. Por esse motivo, a interpretação dos valores de eletrólitos do suor em indivíduos adultos deve ser abordada com cautela.

Distúrbios intestinais

Diarreia crônica

A diarreia crônica é autolimitada, tipicamente viral e se resolve de forma rápida. É uma queixa comum dos pacientes que procuram atendimento médico. Seu diagnóstico diferencial é complexo, e uma variedade de testes laboratoriais pode ter utilidade. A definição de diarreia crônica consiste na evacuação de fezes moles mais de três vezes ao dia por um período de mais de 4 semanas e/ou a evacuação de uma quantidade de fezes maior que 200 g/dia (Thomas, 2003). Adotando a definição de diarreia crônica como sendo a frequência excessiva de evacuação de fezes não associada à dor abdominal, estima-se que a prevalência desse distúrbio em populações ocidentais seja de aproximadamente 4 a 5% (Thomas, 2003). Os testes laboratoriais iniciam-se com a coleta aleatória de amostras de fezes para realização de testes de detecção de sangue, gordura e microrganismos (ovos e parasitas). Além disso, a demonstração da presença de leucócitos nas fezes é importante para determinar se a diarreia tem natureza inflamatória (colite ulcerativa, doença de Crohn, colite isquêmica ou micróbios invasivos). A detecção de leucócitos fecais através da coloração de Wright, seguida de exame microscópico, é igualmente importante. Entretanto, um novo método que utiliza lactoferrina pode ser mais acurado na identificação dos leucócitos, além de aparentemente ser mais sensível (Guerrant, 1992).

A principal função do cólon é absorver água a partir da corrente fecal. Cerca de 90% da água que entra no cólon é removida ao longo da passagem pelo mesmo. O cólon retossigmoide também armazena as fezes até que seja possível ao indivíduo defecar de modo socialmente aceitável. A diarreia se instala quando a quantidade de água presente no lúmen colônico (que consiste na soma do volume de água que chega proveniente do intestino delgado e do volume de água secretada pela mucosa colônica) excede o volume de água que pode ser absorvido através da mucosa colônica. Também pode resultar de uma irritação ou inflamação do cólon, que interferem na sua capacidade de armazenar fezes. A ausência do cólon ou um cólon significativamente encurtado acarreta fezes soltas e em grande volume.

As causas de diarreia muitas vezes são classificadas em quatro grupos patogênicos principais. Tais grupos são: diarreias inflamatórias, diarreias osmóticas, diarreias secretórias e diarreias resultantes de alteração da motilidade intestinal. As diarreias podem ter causas específicas que atuam por vários modos patogênicos, sendo que um mesmo indivíduo pode ter diarreia associada a mais de uma etiologia ao mesmo tempo. Embora muitos clínicos adotem a categoria "artificial" como uma quinta classificação que engloba os casos de autoindução de diarreia, o(s) método(s) empregado(s) pelo paciente envolve(m) um dos quatro tipos anteriormente referidos.

No entanto, a diarreia artificial merece ser mencionada aqui porque sua ocorrência é comum. A análise para investigar o uso de laxantes deve ser realizada no início da avaliação do caso. O conteúdo de água das fezes deve ser analisado quanto à osmolalidade e a concentração de eletrólitos. O intervalo osmótico é calculado a partir da concentração de eletrólitos na água presente nas fezes, empregando-se a seguinte fórmula: $290 - [2 \times (\text{sódio} + \text{potássio})]$. A soma das concentrações de sódio e potássio é multiplicada pelo fator 2 por causa dos ânions associados. Estima-se que a osmolalidade das fezes junto ao intestino distal seja de 290 mOsm/kg (equilibrando a osmolalidade plasmática). Se os achados sugerirem uma diarreia secretória, com um intervalo osmótico < 50, é possível que o paciente tenha ingerido um laxante (p. ex., fosfato de sódio – *Fleet Phospho-Soda*) e que este tenha causado a diarreia secretória. Caso a análise do conteúdo de eletrólitos das fezes indique uma diarreia osmótica, com um intervalo osmótico > 125 mOsm/kg, o médico deve suspeitar do uso de laxantes à base de magnésio (p. ex., Maalox).

Similarmente, a diarreia iatrogênica não constitui uma categoria patogênica à parte. Embora múltiplos fármacos e outros agentes terapêuticos induzam diarreia como efeito colateral indesejado, o mecanismo pelo qual atuam também envolve inflamação, carga osmótica, alteração da motilidade ou alguma combinação desses fatores. A incontinência retal muitas vezes é relatada de modo incorreto como sendo uma diarreia. No entanto, a diarreia pode precipitar a incontinência no indivíduo que consegue conter a defecação de fezes já formadas. A supervisão da incontinência pode ser bem distinta da supervisão de uma diarreia, portanto é importante distinguir ambos os casos.

A diarreia inflamatória ou exsudativa muitas vezes pode ser – mas não necessariamente é – sanguinolenta. A presença de leucócitos fecais ao exame microscópico pode ser a única evidência de inflamação. Em certos casos de diarreia inflamatória, embora a mucosa intestinal apresente um aspecto geral normal, o exame histológico de biópsias demonstra um processo inflamatório. Tais casos não apresentam uma exsudação manifesta que seja clássica da diarreia inflamatória. Fica claro, assim, que há uma sobreposição dos tipos patogênicos de diarreia. Argumentos semânticos à parte, é mais razoável determinar a presença de sangue ou leucócitos nas fezes do paciente com diarreia. A presença desses componentes sugere que um processo inflamatório tem papel na diarreia apresentada pelo paciente. A doença de Crohn, a colite ulcerativa, a colite isquêmica, a presença de microrganismos infecciosos invasivos e a colite induzida por radiação são causas comuns de diarreia inflamatória. Doenças intestinais atípicas, como colite microscópica ou colite colágena, não produzem diarreia exsudativa. A hipersecreção e a diminuição da absorção de água podem ser os meios através dos quais essas entidades promovem a diarreia. A classificação com base nos microrganismos ainda é controversa.

A diarreia osmótica ocorre quando a carga osmótica da corrente fecal favorece o uma excessiva perda de água. Em outras palavras, o gradiente osmótico direciona a água para dentro do lúmen do cólon e cria, assim, fezes mais soltas e volumosas. É possível calcular o intervalo osmótico fecal medindo-se, primeiramente, a osmolalidade e a concentração de sódio e potássio nas fezes. Um valor > 100 mmol/L sugere a presença de um grande número de partículas osmóticas não quantificadas, direcionando o conteúdo líquido para o lúmen. As amostras das fezes a partir das quais esses valores foram obtidos devem ser bastante frescas. Enquanto a amostra aguarda o processamento, as bactérias fecais continuam a produzir partículas osmóticas como resultado da digestão. Esses produtos da quebra por bactérias podem produzir um falso aumento da carga osmótica fecal. A forma

mais prática de determinar se o tipo de diarreia é osmótico consiste em fazer o paciente jejuar, desde que ele possa cooperar. Um jejum rigoroso faz a diarreia osmótica cessar. Por outro lado, a diarreia persistirá em pacientes incapazes de cooperar ou que apresentam "diarreia artificial" e continuam a ingerir substâncias osmoticamente ativas.

As diarreias secretórias resultam da secreção ativa de água dentro da corrente fecal, que sobrepuja o processo de absorção. Múltiplas toxinas, hormônios e fármacos podem causar uma secreção ativa de água e eletrólitos no lúmen do cólon. Diarreias desse tipo podem provocar desidratação, depleção de eletrólitos e até morte do paciente. O exemplo clássico de diarreia secretória é o cólera. Nos países desenvolvidos, as medicações provavelmente constituem a causa mais comum de diarreia secretória. Foram identificadas diversas causas hormonais, como gastrinoma (síndrome de Zollinger-Ellinson), síndrome carcinoide, carcinoma medular da tireoide, mastocitose, tumores produtores de peptídeo vasointestinal ativo (VIP) (p. ex., síndrome VIPoma) e adenoma viloso do cólon retossigmoide. Raramente é útil analisar a urina para detecção de ácido 5-hidróxi-indolacético na síndrome carcinoide, de ácido vanililmandélico no feocromocitoma, e de histamina na mastocitose. Todavia, diante de uma suspeita clínica, os testes devem ser submetidos à análise. Diferente do que ocorre na maioria dos casos, as condições continuam a provocar esse tipo de diarreia mesmo quando os pacientes passam por jejum rigoroso. Na verdade, esses pacientes podem se tornar desidratados rapidamente se não tomarem líquidos continuamente, de modo que o jejum deve ser monitorado em caso de haver suspeita de diarreia secretória.

Os distúrbios de motilidade aceleram a corrente fecal e impedem que a água seja totalmente absorvida. Na síndrome do intestino irritável, pode haver estimulação neural excessiva com resultante diminuição dos intervalos de trânsito fecal. Na síndrome do intestino curto (p. ex., pós-cirúrgica), há redução da porção absortiva do cólon e, como resultado, o indivíduo pode ter diarreia. Os distúrbios da motilidade são, de longe, os mais difíceis de caracterizar e quantificar. A maioria das metodologias diagnósticas atualmente em uso altera o meio colônico e, provavelmente, também acaba alterando a motilidade. Estudos com bário ou que utilizam a ingestão de marcadores radiopacos podem ser auxiliares na estimação do intervalo de trânsito colônico; entretanto, falta ainda um consenso acerca dos valores considerados normais. A menos que existam defeitos estruturais óbvios ou que haja um claro diagnóstico de síndrome irritável, os distúrbios de motilidade muitas vezes são suspeitos por exclusão.

O diagnóstico de diarreia começa pela obtenção da história completa. Os principais pontos a serem esclarecidos numa avaliação subsequente consistem em descobrir se a diarreia é branda ou sanguinolenta, se o paciente apresenta ou não sintomas constitutivos e qual a duração da doença. Uma diarreia autolimitada e aguda (com duração inferior a 2 semanas), que não apresenta sangramento nem sintomas constitutivos, raramente requer a realização de testes diagnósticos. Por outro lado, uma diarreia crônica, com passagem de sangue e sintomas constitutivos sempre sugere a necessidade de se estabelecer um diagnóstico específico. Ainda que geralmente seja menos útil que a história, é necessário realizar um exame físico bastante abrangente.

Um aspecto clínico referente à avaliação da diarreia diz respeito à imunocompetência. Em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) ou significativamente imunossuprimidos, a avaliação diagnóstica deve considerar infecções inusitadas. Em muitos pacientes com diarreia crônica, é recomendável determinar o *status* do HIV.

Pacientes com diarreia devem ser consultados acerca das medicações que utilizam, da dieta que consomem e com relação ao suprimento de água. Devem ser estimados a duração dos sintomas, a frequência das evacuações, a urgência e a incontinência fecais, bem como o padrão fecal diário, a consistência e o volume das fezes. Histórias de viagens, práticas sexuais e histórias familiares também podem ser úteis. Sintomas constitutivos, como febre, perda de peso, artralgias/artrite, erupções e assim por diante, podem fornecer fortes indícios da etiologia da diarreia. Caso o paciente esteja entre outros que desenvolveram diarreia simultaneamente, deve ser considerada a possível existência de uma fonte infecciosa em comum (ver Cap. 56). O uso de antibióticos, uma cirurgia recente, rádio ou quimioterapia e qualquer alteração do regime usual do paciente podem trazer esclarecimentos sobre a situação. O clínico deve sempre investigar potenciais episódios ocorridos no passado e determinar se a diarreia é recorrente. Esse procedimento ajuda a descobrir se estão ocorrendo surtos de doenças diarreicas na comunidade. Em pacientes com doenças diarreicas semelhantes ocorrendo ao mesmo tempo, pode ser levantada a suspeita de haver uma causa infecciosa ou uma toxina em comum. Podem ser pesquisados agentes infecciosos. Cultura de fezes, enzimas para detecção de rotavírus e giardíase, bem como exames para pesquisa de ovos e parasitas, devem ser realizados em condições clínicas apropriadas (ver Cap. 61). A Tabela 22.3 mostra os testes recomendados para a estratégia de avaliação.

Qualquer medicação que produza efeitos diarreicos deve ser suspensa, em especial se tiver sido começada ou se a dose foi alterada mais ou menos na mesma época em que a diarreia teve início. É preciso lembrar que o agente causador da diarreia nem sempre é o fármaco "ativo", mas pode também ser a substância que atua como carreador (p. ex., sorbitol). É possível alcalinizar as fezes para fazer o teste da fenolftaleína, quando há suspeita do uso ilícito de laxantes. É preciso ter em mente que várias substâncias disponibilizadas já prontas para uso provocam diarreia e que, nesses casos, apesar da vasta literatura existente a respeito do assunto, a alcalinização das fezes muitas vezes tem pouco valor prático. Entretanto, por tratar-se de um teste simples e barato, deve ser considerado quando se dispõem das condições clínicas adequadas.

As fezes podem ser examinadas quanto a presença de sangue, conteúdo de eletrólitos, leucócitos e osmolalidade. Agentes infecciosos podem ser pesquisados por meio de testes enzimáticos, cultura ou avaliação microscópica direta. O teste para detecção de gordura nas fezes também é relativamente simples. Para tanto, o método-padrão utilizado é a coloração por Sudão. O grau de sensibilidade varia de acordo com a habilidade e a experiência do observador. Uma alternativa (semiquantitativa) para avaliar a presença de gordura fecal é o esteatócrito. Esse método apresenta boa correlação com o débito quantitativo de gordura, determinado pelo método de van de Kamer (Sugal, 1994). Embora o "padrão-ouro" da determinação do conteúdo de gordura fecal continue sendo o teste quantitativo de 48 a 72 horas, por questões práticas, o uso desse teste foi significativamente abandonado. O jejum pode ser bastante útil. Uma vez que os dados foram coletados, em geral, torna-se possível classificar a diarreia e iniciar a pesquisa de um diagnóstico específico, caso este ainda não tenha sido evidenciado. As avaliações complicadas e caras para a diarreia secretória geralmente devem ser evitadas, a menos que outras causas mais prováveis tenham sido excluídas ou existam sinais e sintomas sugestivos.

O teste respiratório está se tornando cada vez mais utilizado para avaliar a diarreia crônica, o inchaço e a dor abdominais. Os testes mais comuns utilizam uma sonda para carbono 14 ou um açúcar fermentável não radioativo. Esses testes auxiliam na avaliação da dificuldade do indivíduo para metabolizar lactose, sucrose e glicose (secundária à supermultiplicação bacteriana). A metodologia exata depende do açúcar estudado e do grau desejado de sensibilidade e especificidade. Os testes mais frequentes para insuficiência de lactase baseiam-se na ingestão de 25 g de lactose.

Diarreia associada à infecção pelo HIV

As causas reais da diarreia em pacientes infectados pelo HIV estão associadas aos já mencionados mecanismos patofisiológicos. Todavia, os agentes etiológicos específicos (em especial, os infecciosos) muitas vezes diferem consideravelmente daqueles detectados em pacientes imunocompetentes. Sendo assim, para todos os pacientes com diarreia crônica, recomenda-se que seja considerada a possibilidade de AIDS.

Diarreia nosocomial

O *Clostridium difficile*, um bacilo Gram-positivo anaeróbio formador de esporos, constitui a causa mais importante de diarreia nosocomial em adultos, com mais de 300.000 casos diagnosticados por ano nos EUA (Malnick, 2000). Acredita-se que esteja correlacionado a cerca de 25% de todos os casos de diarreia associada ao uso de antibióticos, bem como de 50 a 75% dos casos envolvendo colite associada a antibióticos (Malnick, 2000). Suas manifestações clínicas vão desde uma diarreia branda e aquosa até a colite pseudomembranosa com risco de morte e megacólon tóxico, quando pode resultar em perfuração colônica e

Tabela 22.3 Testes laboratoriais para o diagnóstico diferencial de diarreia

Teste	Método	Uso
Testes de triagem iniciais		
Leucócitos fecais	Coloração de Wright ou azul de metileno	Identificar diarreia inflamatória
Teste Hemoccult	Reação de peroxidase para hemoglobina	Identificar diarreia hemorrágica
Intervalo osmótico fecal	FOG = osmolalidade fecal – 2 × (Na fecal + K)	Distinguir diarreia secretória *versus* osmótica
Alcalinização das fezes	Alteração da cor após a adição de NaOH às fezes	Ingestão de laxante à base de fenolftaleína
Causas infecciosas		
Cultura bacteriana de fezes	Cultura de rotina e sensibilidade	Identificar *Shigella*, *Salmonella* ou *Campylobacter*
Cultura especial de fezes	Cultura especializada e sorotipagem	Identificar *E. coli* 0157:H7, *Yersinia* ou *Vibrio*
Ensaio para toxina de *C. difficile* nas fezes	Citotoxicidade em cultura de tecido	Colite pseudomembranosa
Sorologia para HIV	ELISA	Enterite por HIV
Triagem para rotavírus nas fezes	Imunoensaio com enzima e antígeno	Enterite por rotavírus
Ovos e parasitas nas fezes	Montagem a fresco	Infecção parasitária entérica
Micobactéria nas fezes	Coloração ácido-resistente e cultura, PCR	*M. tuberculosis* ou MAI
Protozoários nas fezes	Iodo ou coloração ácido-resistente modificada	*Cryptosporidium* ou *Isospora belli*
Títulos de Ac anti-*E. histolytica*	Sorologia	*Entamoeba histolytica*
Antígeno de *Giardia* nas fezes	Imunoensaio enzimático	*Giardia lamblia*
Causas endócrinas		
5-HIAA urinário	HPLC	Síndrome carcinoide
Serotonina sanguínea	HPLC	Síndrome carcinoide
VIP sérico	RIA	VIPoma
TSH e T_4 livre no soro	Imunoensaio	Hipertireoidismo
Gastrina sérica	RIA	Síndrome de Zollinger-Ellison
Calcitonina sérica	RIA	Diarreia associada à hipocalcemia
Somatostatina sérica	RIA	Somatostatinoma
Má digestão		
Teste de tolerância à lactose	Ver no texto	Deficiência de lactato
Cloreto no suor	Ver no texto	Insuficiência pancreática Fibrose cística
Açúcares redutores nas fezes	Tabletes Clinitest	Intolerância a carboidrato
Má absorção		
Teste de absorção da D-xilose	Ver no texto	Avaliar a área de superfície da mucosa intestinal
Conteúdo fecal de gorduras de 72 horas	Saponificação e titulação	Má absorção lipídica
Coloração de gorduras fecais	Coloração com Sudão	Má absorção lipídica
Caroteno sérico	Espectrofotometria	Má absorção lipídica
Teste respiratório com $^{14}CO_2$ como teste para má absorção de lipídeos (gorduras)	Ver no texto	Má absorção lipídica
Anticorpos antiendomísio	Sorologia	Doença celíaca
Anticorpos antigliadina	Sorologia	Doença celíaca
Teste respiratório de H_2	H_2 expirado por cromatografia gasosa	Má absorção de carboidratos
Contagem de colônias de bactérias	Aspirado do intestino delgado e cultura quantitativa	Supercrescimento bacteriano
Outros		
Cálcio ionizado sérico	Eletrodo íon-específico	Diarreia associada à hipocalcemia
Proteínas e albumina no soro	Reação do biureto e corantes aniônicos	EI ou enteropatia perdedora de proteína
α_1-antitripsina nas fezes	Ver no texto	Enteropatia perdedora de proteína
Quantificação de imunoglobulinas	Nefelometria	Agamaglobulinemia
Biópsia de cólon	Biópsia endoscópica	Neoplasia, colite linfocítica ou colite colagenosa
Biópsia intestinal	Biópsia endoscópica ou aberta	Doença de Whipple, MAI, abetalipoproteinemia, linfoma, amiloidose, gastroenterite eosinofílica, agamaglobulinemia, linfangiectasia intestinal, doença de Crohn, tuberculose, doença do enxerto *versus* hospedeiro, *Giardia*, outras infecções parasitárias, colite colagenosa ou colite microscópica

PCR = reação em cadeia da polimerase; HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho; RIA = radioimunoensaio; EI = enteropatia inflamatória; MAI = *Mycobacterium avium-intracellulare*; HIV = vírus da imunodeficiência humana; ELISA = ensaio imunossorvente ligado à enzima; 5-HIAA = ácido 5-hidroxi-indolacético; Ac = anticorpo

peritonite, com uma taxa de mortalidade de 38% (Poutanen, 2004). Os pacientes podem apresentar diarreia aquosa, dor/cãimbras na região inferior do abdômen, sintomas sistêmicos (p. ex., febre e mal-estar) ou sangramento GI oculto. A patogênese dessa doença usualmente envolve o comprometimento da flora colônica, tipicamente após o curso de uma terapia com antibiótico em pacientes hospitalizados, seguida da exposição a cepas toxigênicas de *C. difficile*. Antibióticos de amplo espectro, como penicilina, clindamicina e cefalosporinas, têm sido

particularmente implicados. Contudo, qualquer antibiótico pode conduzir ao desenvolvimento de colite causada por *C. difficile* (Malnick, 2000). A suspeita clínica da doença é confirmada pela detecção dos fatores de virulência das toxinas A ou B de *C. difficile* em amostras de fezes. Ambas as toxinas (A e B) provocam o aumento da permeabilidade vascular e têm potencial de causar hemorragia. Induzem a produção de fator de necrose tumoral α (TNF-α, *tumor necrosis factor α*) e de interleucinas que são responsáveis pela resposta inflamatória e pela formação da pseudomembrana (Poutanen, 2004).

O diagnóstico da colite pseudomembranosa associada ao *C. difficile* requer visualização direta da mucosa colônica com auxílio da endoscopia. Entretanto, a endoscopia deve ser evitada em casos de suspeita de colite fulminante, devido ao risco de perfuração. Existem métodos laboratoriais que permitem a confirmação da infecção por *C. difficile*. Os ensaios de citotoxicidade em cultura de células – que demoram até 48 horas – são considerados o " padrão-ouro" para detecção de citotoxina B de *C. difficile* em amostras de fezes. Esse teste apresenta sensibilidade em torno de 94 a 100% e a especificidade de aproximadamente 99% (Malnick, 2000). Esse ensaio em cultura é capaz de detectar concentrações mínimas de 10 pg de toxina em amostras de fezes (Malnick, 2000). Imunoensaios rápidos – que podem ser realizados em poucas horas – foram desenvolvidos para detecção das toxinas A e B em amostras de fezes. Contudo, a sensibilidade e a especificidade desses imunoensaios é reduzida (65 a 85% e 95 a 100%, respectivamente) em comparação com os ensaios citotóxicos. O ELISA detecta de 100 a 1.000 pg de toxina em amostras de fezes (Malnick, 2000). No caso de pacientes não hospitalizados que evacuam mais de 6 vezes ao dia, o ELISA é o teste diagnóstico de escolha (Malnick, 2000). As culturas de fezes também podem ser realizadas, porém podem demorar até 96 horas para ficarem prontas. Os testes de aglutinação do látex para detecção de glutamato desidrogenase – uma proteína clostrídica comum – também podem ser realizados, embora apresentem sensibilidade e especificidade bem inferiores em comparação a outros testes disponíveis, com consequente limitação de sua utilidade clínica. Atualmente, estão sendo desenvolvidos métodos de PCR para detecção das toxinas A e B de *C. difficile*, cujo perfil de sensibilidade e especificidade é semelhante ao dos ensaios citotóxicos (Poutanen, 2004). Todavia, o PCR é incapaz de distinguir os pacientes portadores assintomáticos dos pacientes infectados sintomáticos. Até o momento, recomenda-se que esses testes sejam realizados com amostras de fezes diarreicas, pois uma única amostra é suficiente para diagnosticar a infecção por *C. difficile* na maioria dos casos (Poutanen, 2004). Por outro lado, talvez sejam necessárias amostras múltiplas para confirmação, enquanto o tratamento empírico com antibióticos orais pode ser indicado para pacientes com evidências clínicas de infecção por *C. difficile*. A Tabela 22.4 lista os testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da diarreia associada ao *C. difficile*.

Tabela 22.4 Testes laboratoriais disponíveis para diarreia associada ao *Clostridium difficile*

Teste	Vantagens	Desvantagens
Ensaio de citotoxicidade para *C. difficile*	Especificidade excelente (99–100%)	Sensibilidade diagnóstica reduzida (80–90%) Resultados do teste indisponíveis antes de 48 horas Requer instalações para cultura de células Detecta somente a toxina B
Imunoensaio para toxina A ou toxinas A e B	Boa especificidade (95–100%) Resultados do teste disponíveis em 4 horas Tecnicamente simples	Sensibilidade reduzida (65–85%), se comparada à do ensaio para citotoxina
Cultura de fezes para isolado de *C. difficile* com subsequente ensaio de citotoxicidade para o isolado	Excelente sensibilidade (> 90%) e especificidade (> 98%) Permite a tipagem da cepa para investigação de surtos	Resultados indisponíveis durante pelo menos 72–96 horas Trabalhoso Requer instalações para cultura de células

"*Clostridium difficile*-Associated diarrhea in adults" – Reproduzido de *CMAJ* 06/0704; 171(1), pp. 51–58, com permissão do editor. 2004 CMA Media Inc.

Síndromes de má absorção

A má absorção resulta da absorção inadequada, a partir da mucosa, de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas ou minerais. Também pode ser resultante da presença de substâncias não absorvíveis no intestino, como certos tipos de açúcar (p. ex., lactulose e sorbitol). A má digestão ocorre em consequência de um defeito intraluminal, que acarreta a quebra incompleta dos nutrientes em seus substratos absorvíveis. Essa situação pode acontecer em casos de insuficiência pancreática e perda da função exócrina. A absorção normal, portanto, é impedida. Essas condições podem resultar no aumento da carga osmótica do cólon e, consequentemente, em diarreia. Além disso, alguns pacientes apresentam má absorção/digestão seletiva de nutrientes específicos e acabam desenvolvendo sequelas clínicas associadas.

A má digestão hepática é causada por uma interferência ou obstrução do fluxo biliar. A perda de sais biliares interfere na emulsificação de gorduras, diminuindo a área de superfície disponível para a ação lipolítica. Além disso, a ativação da lipase por ação dos sais biliares é perdida. Os pacientes costumam apresentar icterícia e produzem urina escura, entre outros sinais de doença hepática. A esteatorreia hepática pode coexistir com a esteatorreia pancreática, como ocorre nos pacientes em que um neoplasma obstrui a ampola de Vater. A má assimilação ou a incapacidade de assimilar gorduras e proteínas devido à má digestão também ocorre em pacientes com vasculite, diabetes mellito, síndrome carcinoide, hipogamaglobulinemia e relativa deficiência de vitaminas B_6 ou B_{12}.

A má absorção entérica abrange uma variedade de condições que compartilham um processo digestivo normal e uma assimilação líquida inadequada dos conteúdos alimentares. Esse distúrbio pode ser resultante de uma competição com bactérias ou alteração da flora bacteriana (como ocorre na síndrome da alça cega ou na diverticulose do intestino delgado) ou pode ser decorrente de uma obstrução do fluxo de linfa (como se observa nos linfomas). Do mesmo modo, também pode ser uma consequência de doenças que afetam a mucosa do intestino delgado (p. ex., amiloidose), de inflamação após irradiação (p. ex., enterite por radiação), de diminuição da área de superfície mucosa, como na gastroileostomia (p. ex., desvio gástrico), ou de ressecção do intestino delgado. Dependendo da localização da patologia no trato intestinal, pode haver perda preferencial de substratos específicos. Um dos cenários clínicos mais comumente encontrados é a enterite regional, localizada no íleo distal – sítio da absorção de vitamina B_{12} e ácidos biliares. Esse distúrbio resulta em deficiência de vitamina B_{12} e diminuição do compartimento de ácidos biliares circulantes destinados ao metabolismo. A seguir, são descritos dois exemplos clássicos de síndromes de má absorção: a doença celíaca e a doença de Whipple.

Pacientes com síndromes de má absorção podem permanecer sintomáticos. Caso os sintomas se tornem mais intensos, a apresentação clínica poderá ser específica do substrato mal absorvido. É isso que ocorre na deficiência de lactase, com resultante intolerância à lactose. Como alternativa, a apresentação clínica pode ser uma consequência geral do aumento da carga osmótica do cólon. Exemplificando, a esteatorreia é a marca registrada dos pacientes que apresentam má absorção, resultando na produção de fezes líquidas, semilíquidas, ou moles e pastosas, descoradas, volumosas e de odor desagradável. Essas fezes podem ser espumosas, devido ao elevado conteúdo de gordura, e podem flutuar na água. Entretanto, essa última característica pode ser observada nas fezes de indivíduos sadios e, portanto, constitui um sinal inespecífico de má absorção. Indivíduos normais, cuja ingestão de gorduras é normal, excretam até 5 g de lipídeos ao dia. A esteatorreia pode ser definida como a presença de mais de 5 g de lipídeos (quantificados como ácidos graxos) nas fezes num período de 24 horas. Embora a fonte de lipídeos fecais seja principalmente dietética, as excreções GI, a descamação celular e o metabolismo bacteriano também contribuem. Os lipídeos normalmente estão presentes sob a forma de sabões e triglicerídeos (TGs). Além disso, também são encontrados lipoides, como alcoóis superiores, parafinas e carotenoides vegetais. Ainda que a dieta exerça algum efeito, o padrão

de lipídeos excretados pode ser muito diferente do padrão de lipídeos ingeridos, sendo que a quantidade de gordura ingerida por um indivíduo normal influencia relativamente pouco o débito gorduroso. Estudos demonstraram que o conteúdo lipídico fecal equivale a uma constante (2,93 g) somada a 2,1% da ingestão dietética de gordura. Numa dieta livre de gorduras, o débito gorduroso normalmente varia de 1 a 4 g/dia.

Outra apresentação clínica da má absorção é o desenvolvimento de deficiências de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). Alterações primárias e secundárias da mucosa intestinal também podem provocar deficiências de vitaminas hidrossolúveis. Outra evidência de deficiências nutricionais (p. ex., hipoprotrombinemia, glossite, anemia, edema, ascite e osteomalácia) também pode ser aparente em tais indivíduos. Esses pacientes estão igualmente sujeitos a sofrer perda de peso acentuada, devido à significativa perda calórica induzida pela diarreia, com consequente caquexia nos casos mais graves.

A clássica má absorção de gorduras é diagnosticada através da detecção do excessivo conteúdo de gordura das fezes. Pequenos volumes de fezes podem ser corados por Sudão para determinar o conteúdo de gordura fecal. A baixa sensibilidade desse teste, no entanto, limita sua aplicação clínica. Mesmo assim, se o teste resultar positivo, possibilita a pronta realização de novas avaliações com amostras de coleta de 72 horas (Romano, 1989). O teste qualitativo com coloração de gorduras por Sudão III pode apresentar uma taxa de resultados falso-negativos de até 25%, em caso de esteatorreia com menos de 10 g a cada 24 horas (Romano, 1989). Por outro lado, o " padrão-ouro" para essa avaliação ainda é a quantificação do conteúdo de gordura fecal de 24 horas em amostras de fezes coletadas 72 horas após a ingestão de uma dieta rica em gorduras. A absorção normal de gorduras requer mucosa, enzimas pancreáticas e ácidos biliares normais. Defeitos intraluminais, como aqueles observados em casos de má digestão ou anomalias envolvendo a mucosa, resultarão na excreção anormal de gorduras, que pode ser detectada através do exame de amostras de fezes. Por esse motivo, a quantificação do conteúdo de gorduras em amostras de fezes de coleta de 72 horas é um teste diagnóstico considerado acurado para identificar a ocorrência de má digestão/absorção com elevado grau de sensibilidade e especificidade. A avaliação das fezes quanto ao conteúdo de gordura continua sendo o teste definitivo para o diagnóstico de esteatorreia, servindo como indicador de má absorção. Todavia, outros testes diagnósticos incluem a determinação dos níveis de caroteno ide – o principal precursor da vitamina A no ser humano –, que requer a absorção normal das gorduras presentes na dieta para ser adequadamente absorvido. Outros métodos são o teste respiratório e os métodos titulométricos, que detectam a má absorção. Há ainda o teste da D-xilose, utilizado para diferenciar a má absorção pancreática da má absorção entérica. Todos esses testes são descritos em detalhes na última parte deste capítulo.

Espru celíaco

O espru celíaco é um distúrbio caracterizado pela má absorção intestinal de nutrientes, em decorrência da sensibilidade à porção do glúten que é solúvel em álcool, conhecida como gliadina. Trigo, centeio, cevada e, em menor grau, aveia contêm essa substância proteica e podem induzir danos à mucosa intestinal, causando o aparecimento de atrofia vilosa inespecífica na mucosa do intestino delgado. A prevalência da doença continua incerta, porém foi estimada como sendo variável de 1:300 a 1:1.000 (Catassi, 1994; Not, 1998). A maioria dos pacientes com espru celíaco é assintomática. O diagnóstico com frequência é estabelecido por um médico astuto que percebe no paciente a baixa estatura, a anemia por deficiência de ferro, a perda de peso, o inchaço crônico e/ou a diarreia. Essa doença possui manifestações clínicas variáveis e pode produzir sintomas graves, como uma profunda má absorção, esteatorreia e debilitação. Existem associações entre espru celíaco e diabetes melito de tipo 1, síndrome de Down, dermatite herpetiforme, deficiência de IgA, doença autoimune da tireoide, entre outras (Barr, 1998). O espru celíaco descontrolado parece predispor os pacientes ao desenvolvimento de carcinomas e linfomas no intestino (Nehra, 1998). Há uma predisposição genética à doença, que é mais comum na população caucasiana de descendentes de norte-europeus.

Devido à enteropatia associada ao distúrbio, múltiplas anormalidades hematológicas e bioquímicas podem ser encontradas em indivíduos com doença celíaca não tratada, como deficiências de ferro, folatos e vitamina D. O exame de um esfregaço de sangue periférico pode revelar a presença de células-alvo inespecíficas, siderócitos, crenócitos, corpúsculos de Howell-Jolly e de Heinz. De modo semelhante, o teste de absorção do intestino delgado resulta anormal, assim como os testes de D-xilose e avaliação do conteúdo fecal de gordura.

O "padrão-ouro" para o diagnóstico da doença ainda é o exame da biópsia da mucosa do intestino delgado, acompanhado da identificação de alterações histológicas clássicas (Trier, 1998). O procedimento é feito via endoscopia. As lesões observadas por vezes são irregulares e podem ocorrer erros de amostragem. A biópsia é reservada para pacientes com suspeita de diagnóstico baseada em sinais ou sintomas da doença, especialmente nas populações de maior risco. O diagnóstico histológico é muito importante para esses pacientes, uma vez que precisam consumir dietas isentas de glúten por toda a vida para poderem controlar os sintomas e reduzir o risco de desenvolver câncer.

Na prática clínica corrente, existem quatro estudos sorológicos que são empregados para auxiliar o diagnóstico de espru celíaco (Tab. 22.5). Esses estudos são testes de detecção de anticorpos para: gliadina (AGA-IgA e AGA-IgG); endomísio (EMA-IgA); reticulina (ARA-IgA); e transglutaminase (tTG-IgA). Todos esses testes são disponibilizados comercialmente. Os resultados dos testes sorológicos para doença celíaca devem ser analisados com cautela, pois essa doença está associada a uma deficiência seletiva de IgA, que gera resultados falso-negativos para anticorpos séricos do tipo IgA (Thomas, 2003). Portanto, a sorologia para IgG ou níveis de IgA total deve ser checada em caso de haver forte suspeita clínica de doença celíaca. O grau de sensibilidade e especificidade desses testes é extremamente elevado, se comparado a um "padrão-ouro" de vilosidades intestinais achatadas em resposta às alterações dietéticas (Farrell, 2001). Os anticorpos para endomísio são os que apresentam melhor sensibilidade e especificidade, porém atualmente são detectados por imunofluorescência de cortes de esôfago de macaco ou de cordão umbilical humano, além de serem caros, inconvenientes e estarem sujeitos à variabilidade de interpretação interobservador.

A proteína de armazenamento do trigo – gliadina – é disponibilizada para o uso como antígeno em testes de ELISA. Embora os níveis séricos de AGA-IgA e AGA-IgG estejam frequentemente elevados em pacientes com espru celíaco não tratado, esses testes apresentam apenas um grau moderado de sensibilidade e especificidade. O teste para AGA-IgG é particularmente útil em 2% dos casos de doença celíaca, em que os pacientes parecem ter deficiência de IgA. Entretanto, esses testes foram amplamente substituídos pelo teste para EMA. Os anticorpos EMA se ligam ao tecido conjuntivo que circunda as células de músculo liso e, para detectá-los, a maioria dos laboratórios utiliza cortes de cordão umbilical humano. A EMA-IgA sérica se liga ao endomísio e produz um padrão característico quando observada por imunofluorescência indireta, sendo um anticorpo bastante sensível e específico. Todavia, após o tratamento da doença, os títulos caem rapidamente e atingem níveis indetectáveis (Volta, 1995). O epítopo reconhecido pelos anticorpos EMA é a transglutaminase tecidual, e o uso de ensaios com IgA anti-tTG mostrou-se altamente sensível e específico para o diagnóstico de espru celíaco (Dieterich, 1998). Existe um ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgA anti-tTG que é amplamente disponibilizado, custa menos e é executado de forma mais fácil do que os antigos ensaios de imunofluorescência para EMA-IgA. Embora os anticorpos IgG antiendomísio e tTG-IgG sejam convenientes para o

Tabela 22.5 Faixas de sensibilidade e especificidades de testes sorológicos para espru celíaco comercialmente disponíveis

	Adultos		Crianças	
	Sensibilidade (%)	**Especificidade (%)**	**Sensibilidade (%)**	**Especificidade (%)**
AGA-IgA	31–100	85–100	90–100	86–100
AGA-IgG	46–95	87–98	91–100	67–100
EMA-IgA	89–100	95–100	100–100	100–100
ARA-IgA	41–92	95–100	29–100	98–100

De Murray JA: Serodiagnosis of celiac disease. Clin Lab Med 1997; 17:452, com permissão.

diagnóstico sorológico de doença celíaca, não podem ser utilizados para monitorar a resposta à modificação da dieta do paciente. Os anticorpos IgA que reconhecem o endomísio desaparecem após o tratamento do espru celíaco com uma dieta livre de glúten.

Doença de Whipple

Trata-se de uma doença multissistêmica muito rara que costuma se manifestar através de artralgias, diarreia e perda de peso. É causada pela bactéria Gram-positiva *Tropheryma whippelii*, ainda não cultivada *in vitro*. Considerando que a doença pode ser tratada e já não é uniformemente fatal, é importante diagnosticá-la. O teste de PCR de tecidos infectados ou de LCE é um modo excelente de confirmar o diagnóstico e monitorar o tratamento (von Herbay, 1997). O exame de uma biópsia de duodeno corada por ácido periódico de Schiff (PAS, *periodic acid-Schiff*) foi considerado patognomônico da doença de Whipple. Atualmente, admite-se que macrófagos PAS-positivos possam ser observados em pacientes com AIDS, os quais apresentam o complexo de *Mycobacterium avium*. Por esse motivo, o PCR adquiriu importância ainda maior na supervisão dessa entidade. A terapia de antibióticos prolongada com penetração do SNC é utilizada no tratamento de pacientes com doença de Whipple (Singer, 1998; Ramzan, 1997).

Deficiência de dissacaridase

Muitas das condições que causam má absorção, anteriormente listadas, podem também estar associadas à intolerância aos dissacarídeos. A absorção dos dissacarídeos sofre diminuição nas deficiências de dissacaridases, tanto primárias (p. ex., deficiência de sucrase-isomaltase, deficiência de lactase, alactasia primária e deficiência primária de trealase) como secundárias à doença celíaca, ao espru tropical, à gastroenterite viral aguda ou a fármacos (p. ex., neomicina, kanamicina e metotrexato – todos administrados por via oral). Essas deficiências de dissacaridase secundárias costumam ser passageiras e, em geral, envolvem mais de uma enzima. Embora a intolerância à lactose devido à deficiência congênita de lactase apresente uma baixa incidência, sua prevalência é bem alta entre os indivíduos adultos. Cerca de 10% dos caucasianos, 70 a 80% dos afro-americanos e um percentual ainda maior de indivíduos asiáticos manifestam algum grau de intolerância à lactose, mesmo quando são capazes de digerir a lactose tão bem quanto os lactentes. Em tais distúrbios, as bactérias intestinais fermentam carboidratos não hidrolisados e não absorvidos, produzindo gás, ácido lático ou outros ácidos orgânicos. Normalmente, a absorção de carboidratos digeridos é rápida e razoavelmente completa no intestino delgado proximal. Dissacarídeos não hidrolisados ou monossacarídeos não absorvidos por causa de deficiências de transporte são osmoticamente ativos e, portanto, levam à secreção de água e eletrólitos tanto no intestino delgado como no intestino grosso. Em consequência, é possível que ocorra diarreia prolongada e queixas de inchaço e flatulência.

Os testes de triagem para deficiências de dissacaridases incluem desafio oral com dissacarídeos suspeitos de reproduzir a sintomatologia abdominal, seguido de exame de fezes. Usualmente, as fezes são aquosas, acídicas, explosivas e fermentativas. Um pH fecal abaixo de 5,5 é sugestivo, porém apenas a medida do pH não é considerada um parâmetro válido quando o paciente está sob tratamento com antibióticos orais. Um pH elevado, por sua vez, não exclui o diagnóstico. Bebês normais, entre 3 a 7 dias de idade, comumente apresentam pH fecal elevado. As fezes podem ser analisadas quanto ao conteúdo de açúcar através de técnicas de cromatografia ou por um dos testes semiquantitativos inespecíficos para açúcares urinários, adaptados para a análise de fezes. O tablete Clinitest (Bayer Diagnostics, Austrália) é conveniente para essa finalidade. A presença de 0,25 g/dL de substâncias redutoras é considerada normal; uma concentração de 0,25 a 0,5 g/dL é considerada suspeita; níveis acima de 0,5 g/dL são considerados anormais. Em pacientes com intolerância a açúcares, a quantidade total de substâncias redutoras nas fezes usualmente excede 0,25 g/dL.

Um teste de tolerância oral que utiliza um açúcar específico (p. ex., lactose ou sucrose) pode ser empregado para estabelecer uma condição de intolerância a carboidratos específica. Embora esse teste seja razoavelmente específico e sensível, em certos casos, foi observada uma taxa de resultados falso-positivos de 23 a 30% após a administração de lactose – ou seja, uma curva de tolerância achatada e um aumento inferior a 20 mg/dL (1,1 mmol/L) dos níveis de açúcar no sangue (Krasilnikoff, 1975). Um retardo do esvaziamento gástrico parece ser a causa dos resultados falso-positivos, pois a instilação duodenal de lactose elimina a curva de tolerância achatada.

O diagnóstico definitivo das deficiências de dissacaridase depende da observação de uma baixa atividade enzimática específica ao exame da biópsia de mucosa do intestino delgado. Existe um ensaio para dissacaridase publicado (Dahlqvist, 1968).

Enteropatia inflamatória

Mecanismos imunológicos junto ao cólon estão envolvidos na patogênese da enteropatia inflamatória. O desafio antígeno subjacente à resposta imunológica ainda é pouco conhecido. Na década passada, dois testes de detecção de anticorpos foram disponibilizados para auxiliar a avaliação laboratorial de pacientes com essa doença. Os anticorpos para antígeno neutrofílico citoplasmático perinuclear (p-ANCA) e anti-*Saccharomyces cerevisae* (ASCA) podem ser utilizados para distinguir a dor abdominal observada na síndrome do intestino irritável daquela observada em pacientes com enteropatia inflamatória, bem como na diferenciação de subtipos desta última – colite ulcerativa e doença de Crohn (Sendid, 1998; Shanahan, 1994) (ver Tab. 22.6). Esses testes apresentam limitações, e a interpretação de um resultado requer cuidadosa compreensão deles. Enquanto são poucos os indivíduos com síndrome do intestino irritável que têm anticorpos p-ANCA, 70% dos pacientes com colite ulcerativa e 20% dos que estão com doença de Crohn apresentam títulos significativos desses anticorpos. Entre os pacientes com enteropatia inflamatória, 65% daqueles que apresentam doença de Crohn têm anticorpos ASCA, enquanto apenas 20% dos pacientes com colite ulcerativa possuem títulos significativos de tais anticorpos. Dada as baixas sensibilidade e especificidade, o uso desses testes deve depender da circunstância clínica. Exemplificando, um indivíduo com diarreia e achados equivocados ao exame de biópsia, desde que apresente resultado positivo para anticorpos ANCA, tem maior propensão à enteropatia inflamatória do que à síndrome do intestino irritável. Do mesmo modo, se um indivíduo que aparenta ter colite ulcerativa apresenta resultados positivos no teste para ASCA, é possível que ele tenha doença de Crohn.

Tumores neuroendócrinos

Os tumores neuroendócrinos do trato GI são lesões neoplásicas relativamente raras que apresentam manifestações clínicas proteicas (Tab.

Tabela 22.6 Marcadores da enteropatia inflamatória

	Percentual de frequência	
	p-ANCA	**ASCA**
Síndrome do intestino irritável (pacientes normais)	< 5	< 5
Colite ulcerativa	70	15
Doença de Crohn	20	65

p-ANCA = anticorpo antiantígeno neutrofílico citoplasmático perinuclear; ASCA = anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 22.7 Tumores neuroendócrinos

APUDomas	Hormônios	Sequelas clínicas
Carcinoide	Serotonina (diversos outros possíveis)	Dor abdominal, eritema, diarreia, asma e edema
Gastrinoma	Gastrina	Úlceras e diarreia
Insulinoma	Insulina	Hipoglicemia
VIPomas	Polipeptídeo intestinal vasoativo	Diarreia, hipocalemia, acidose e hipocloridria
Glucagonoma	Glucagon	Eritema migratório necrolítico, perda de peso, diabetes, depressão e trombose de veia profunda
Somatostatinoma	Somatostatina	Cálculos biliares, diabetes, diarreia e hipocloridria

22.7). Dor abdominal e diarreia são dois dos sintomas clínicos mais comuns. Devido ao fato de exibirem captação e descarboxilação de precursores de amina (APUD, *amine precursor uptake and decarboxylation*), são também conhecidos como APUDomas. Dentre esses tumores, os mais comuns são os tumores carcinoides, que correspondem a 50% do total. Os gastrinomas correspondem a 25% dos APUDomas, enquanto os insulinomas perfazem 15% e os VIPomas, 6%. Os glucagonomas são bastante raros e representam 2 a 5% do grupo. Outros tipos ainda mais raros, como os somatostinomas, também foram identificados (Perry, 1996). A determinação química dos secretagogos desses tumores, em geral, sugere o diagnóstico, mediante condições clínicas apropriadas. Localizar os tumores pode ser um grande desafio. Ultrassonografia, varredura por TC, exploração operatória com imagem por ressonância magnética (IRM), endoscopia, angiografia e varredura com octreotide são todas técnicas que apresentam limitações significativas. Com exceção da ultrassonografia e da IRM, os testes podem estar potencialmente associados a certo grau de morbidade. Embora, no princípio, tenha-se acreditado que a varredura com octreotide fosse capaz de substituir outros modos de localização dos tumores, dados recentes sugeriram que esta é uma técnica útil para determinar a extensão de carcinoides e gastrinomas, ao mesmo tempo em que tem pouca utilidade na localização de insulinomas ou tumores não funcionais (Kisker, 1997). Tumores desse tipo costumam ser pequenos, multifocais e podem ser localizados em diversos órgãos. Além disso, podem ser tanto benignos como malignos. São semelhantes ao exame por coloração histológica, realizado justamente para distinguir os diferentes tipos existentes (Perry, 1996). Assim como para todas as lesões neoplásicas, a realização de biópsias é essencial à confirmação do diagnóstico. A Tabela 22.7 mostra as características distintivas dos vários APUDomas.

Testes, métodos e aplicações clínicas comuns

Amilase (total sérica e urinária)

A amilase é uma enzima estável. Tanto no soro como na urina, permanece estável por 1 semana, à temperatura ambiente, ou por 6 semanas, quando mantida em frascos bem vedados sob refrigeração. Quando congelada, é preservada por períodos bem maiores sem que haja perda considerável de sua atividade. Para a determinação da atividade de amilase, deve ser evitado o uso de amostras de plasma submetidas à anticoagulação pela adição de citrato ou oxalato. A amilase é uma enzima que contém cálcio, e a análise de amostras desse tipo produz valores falsamente diminuídos de atividade enzimática. Amostras de plasma heparinizado não interferem no ensaio da amilase.

Se por um lado há vários métodos disponíveis para avaliação da amilase, seja qual for o método utilizado, é preciso ter cuidado para evitar contaminação das amostras com saliva, uma vez que seu conteúdo de amilase é cerca de 700 vezes o conteúdo existente no soro. Hemácias não contêm amilase; portanto, a hemólise, em geral, não constitui um problema para a maioria dos métodos, com exceção daqueles que são acoplados a métodos enzimáticos, nos quais a concentração de peróxido liberado é determinada por uma reação envolvendo peroxidase.

Interpretação

Elevações dos níveis séricos e urinários de amilase são detectadas em uma ampla variedade de distúrbios. A maior parte das elevações de amilase sérica se deve ao aumento da taxa de entrada da enzima na circulação sanguínea, à diminuição de sua taxa de depuração ou a ambos.

Em cerca de 80% dos casos, a atividade da amilase sérica aumenta dentro de 6 a 48 horas após o início de um episódio de pancreatite, embora esse aumento não seja proporcional à severidade da doença. Valores acima de 600 unidades de Somogyi/dL (ou maiores que quatro vezes o limite máximo considerado normal) são altamente sugestivos do diagnóstico. A atividade da enzima usualmente volta ao normal em 3 a 5 dias nos pacientes que apresentam formas edematosas mais brandas da doença. Valores elevados que persistam por mais tempo sugerem a existência de um contínuo processo necrótico ou a possível formação de pseudocistos.

A atividade da amilase urinária aumenta imediatamente, por vezes ao longo de várias horas e concomitante à elevação da atividade sérica, podendo permanecer elevada mesmo depois de a atividade sérica ter voltado ao normal. Valores acima de 1.000 unidades de Somogyi/dL são detectados quase exclusivamente em pacientes com pancreatite aguda. Resultados falso-negativos são obtidos com frequência, quando amostras de urina são coletadas demasiadamente cedo ou tarde, ou em pacientes com necrose fulminante cuja produção de amilase está diminuída ou interrompida. Na maioria dos pacientes com pancreatite aguda, a atividade de amilase sérica está aumentada e há aumento concomitante da atividade da amilase urinária. Entretanto, pode haver casos em que o aumento da atividade da enzima na urina não é acompanhado pelo aumento concomitante da atividade da enzima no soro.

O aumento da depuração renal de amilase pode ser utilizado no diagnóstico da pancreatite aguda e recorrente, sendo que a proporção entre depuração de amilase e depuração de creatinina expressa como percentual tem sido usada para fins diagnósticos. Essa proporção (C_{am}/C_{cr}) pode ser calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de depuração (\%)} = [(\text{atividade de amilase na urina})/(\text{atividade de amilase no soro})] \times [(\text{concentração sérica de creatinina})/(\text{concentração urinária de creatinina})] \times 100$$

Em média, a taxa normal é de 1 a 4%. Nos pacientes com pancreatite, essa taxa usualmente ultrapassa 4% e, com frequência, chega de 7 a 15%. Infelizmente, cerca de um terço dos pacientes com pancreatite apresenta taxas normais, sendo que taxas elevadas também são encontradas em pacientes com queimaduras, cetoacidose, insuficiência renal, doença cardíaca e perfuração duodenal, bem como após cirurgias torácicas. Desse modo, a proporção tem pouco a acrescentar ao arsenal diagnóstico.

Aproximadamente 20% dos pacientes com pancreatite apresentam atividade de amilase normal ou quase normal. Em pacientes hiperlipêmicos com pancreatite, frequentemente são detectados níveis séricos e urinários de amilase normais. Acredita-se que os níveis falsamente normais sejam resultado da supressão da atividade de amilase por TGs ou ação de inibidor circulante presente no soro.

Uma atividade de amilase sérica abaixo do normal pode ser detectada em pacientes com pancreatite crônica e tem sido igualmente observada em condições tão diversas quanto insuficiência cardíaca congestiva, gravidez (durante o segundo e o terceiro trimestres), câncer GI, fraturas ósseas e pleurisia.

A concentração de amilase sérica pode estar aumentada em pacientes com carcinoma de pâncreas, porém tarde demais para ter utilidade diagnóstica. Com frequência (mais de 60% dos casos), níveis aumentados também são observados em pacientes com cetoacidose diabética. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que, nessa condição, usualmente são os níveis de amilase salivar (em vez da amilase pancreática) que se encontram aumentados. A atividade de amilase sérica também pode estar aumentada em pacientes com colecistite ou úlcera péptica, ou após a realização de ressecção gástrica, transplante renal, ocorrência de hepatite viral ou gravidez ectópica interrompida. Uma atividade enzimática bastante alta foi detectada em pacientes com carcinoma pulmonar. Um pequeno número de pacientes com hiperamilasemia pode apresentar obstrução intestinal, trombose mesentérica e peritonite. Em alguns desses pacientes, as secreções pancreáticas acabam caindo na cavidade peritoneal e são absorvidas pela circulação sanguínea. Em outros, pode haver inflamação com envolvimento do pâncreas.

Níveis aumentados de amilase no líquido ascítico foram detectados em pacientes com pancreatite, pseudocisto pancreático com vazamento, rompimento do ducto pancreático, câncer de pâncreas, tumores abdominais secretores de amilase pancreática e perfuração de vísceras ocas.

Lipase

O pâncreas é a fonte principal e primária de lipase sérica. A lipase pancreática humana é uma glicoproteína com peso molecular de 45.000 Da. Em contraste com a amilase, que está presente tanto no pâncreas como nas glândulas salivares, a lipase não é encontrada nessas glândulas. As lipases são definidas como enzimas que hidrolisam preferencialmente os ésteres de glicerol das cadeias de ácidos graxos longas, nas ligações éster dos carbonos 1 e 3, produzindo 2 mols de ácidos graxos e 1 mol de β-monoglicerídeo por cada mol de TGs.

Após a isomerização, o terceiro ácido graxo pode ser quebrado a uma velocidade mais lenta. A lipólise aumenta proporcionalmente em relação à área de superfície das gotículas lipídicas, sendo que a ausência de sais biliares no líquido duodenal e a consequente falta de emulsificação tornam a lipase inefetiva.

A presença de colipase e sais biliares é necessária tanto para a atividade catalítica integral como para a maior especificidade da lipase pancreática. Proteínas, ácidos biliares e fosfolipídeos inibem a lipase sérica. As colipases revertem essa inibição. Tanto a lipase como a colipase são secretadas pelo pâncreas e, portanto, são encontradas no soro. A colipase está presente no sangue de pacientes com pancreatite, ainda que em concentrações variáveis e usualmente em níveis abaixo do normal e inferiores à concentração necessária para ativar totalmente a lipase pancreática. Para determinar com acurácia e completamente a atividade dessa enzima em pacientes com pancreatite, é essencial adicionar colipase aos reagentes utilizados no ensaio.

A lipase pancreática deve ser diferenciada da lipoproteína lipase, aliesterase e aliéster hidrolase que, embora relacionadas, são enzimas distintas. A atividade dessas enzimas pode ser incluída na determinação da atividade da lipase, a menos que as condições do ensaio sejam devidamente adaptadas para determinação da lipase "pancreática". A lipase também está presente no fígado, no estômago, no intestino, nos leucócitos sanguíneos, nos adipócitos e no leite.

Embora o cálcio seja necessário à máxima ativação da enzima, quando em concentrações acima de 5×10^{-3} M, exerce efeito inibitório. Especula-se que essa ação inibidora seja devido à interferência do cálcio na ação dos sais biliares ao nível da interface água-substrato. Assim como a albumina sérica, os sais biliares previnem a desnaturação da lipase nessa interface. Os metais pesados e a quinina inibem a atividade da enzima.

A lipase é filtrada nos glomérulos graças ao seu baixo peso molecular. Normalmente, sofre total reabsorção nos túbulos proximais renais e está ausente na urina normal. Em pacientes com reabsorção tubular renal defeituosa decorrente de distúrbios renais, a enzima aparece na urina. A atividade da lipase urinária é inversamente proporcional à depuração de creatinina.

A lipase sérica permanece estável por até 1 semana à temperatura ambiente, podendo se manter assim por mais tempo se for resfriada ou congelada. Sua temperatura ótima de reação é aproximadamente 40°C. O pH ótimo é 8,8, embora valores entre 7,0 e 9,0 também tenham sido descritos. Essa diferença provavelmente se deve ao efeito exercido pelos diferentes substratos envolvidos na reação, bem como tampões, temperatura de incubação e concentração dos reagentes utilizados. O soro é a amostra de escolha para realização dos ensaios de lipase sanguínea. Icterícia, lipemia e hemólise não interferem nos ensaios turbidimétricos para lipase.

Na pancreatite aguda, a atividade de lipase sérica tende a aumentar mais ou menos concomitantemente (ou até antes) ao aumento dos níveis de amilase sérica, permanecendo alta por cerca de 7 a 10 dias. O aumento da atividade de lipase raramente se mantém por mais de 14 dias, sendo que aumentos mais prolongados sugerem um mal prognóstico ou a presença de um cisto.

O uso combinado de lipase e amilase séricas é eficaz na exclusão da pancreatite aguda. Embora a determinação dos níveis de lipase sérica proporcione vantagens diagnósticas relativamente à determinação da amilase sérica, é inespecífica para pancreatite aguda. Também pode haver aumento de lipase sérica em pacientes com pancreatite crônica, obstrução do ducto pancreático e certas condições, como doenças renais, diversas doenças abdominais (p. ex., colecistite aguda, obstrução ou infarto intestinal, úlcera duodenal e doença hepática), alcoolismo e cetoacidose diabética, bem como em pacientes que foram submetidos a uma ERCP. Pacientes com trauma abdominal uniformemente apresentam aumentos tanto de amilase como de lipase no soro, enquanto aqueles com lesão primária da cabeça ou que foram submetidos à manipulação da glândula parótida durante uma cirurgia apresentam aumento significativo apenas da amilase. O aumento da atividade de lipase sérica em paciente com caxumba sugere fortemente o envolvimento tanto do pâncreas como das glândulas salivares na doença.

Os testes para detecção de lipase e amilase séricas foram e continuam sendo amplamente utilizados no diagnóstico da pancreatite aguda. Ambas as enzimas encontram-se aumentadas em muitos pacientes que apresentam distúrbios inflamatórios ou de outro tipo com envolvimento de órgãos localizados na cavidade abdominal, mas sem evidências de pancreatite. Conclui-se, portanto, que o pâncreas é agudamente sensível a distúrbios inflamatórios ou metabólicos que ocorram no peritônio e nos órgãos adjacentes.

Isoamilases

A amilase presente no sangue e na urina de indivíduos normais é predominantemente oriunda do pâncreas e das glândulas salivares. Sempre uma distinção se torna necessária; as enzimas são denominadas, respectivamente, amilases (isozima e isoamilase) de tipo P e de tipo S. Essas enzimas, embora sejam bastante relacionadas, apresentam variabilidade órgão-específica. Possuem a mesma composição de aminoácidos e geram mapas de peptídeos semelhantes, ainda que não sejam idênticos. Cada uma parece ser constituída de uma única cadeia polipeptídica sem subunidades. A amilase P tem peso molecular igual a 54.000 Da. Pesos moleculares maiores foram descritos para a amilase S. Ambas contêm grupos sulfidrila. As amilases são metaloenzimas que contêm, ao menos, um átomo de cálcio por molécula e requerem esse metal para a realização de suas atividades catalíticas. Apresentam atividade ótima em pH 6,9 a 7,0. O pH ótimo para a amilase S varia de acordo com o ânion utilizado como ativador, sendo o cloreto o ânion mais importante. A concentração ótima de cloreto é 10 mmol/L, sendo que a ativação é alostérica. Íons de brometo e iodeto também ativam a amilase. Os pontos isoelétricos (pI) descritos são 7,6 e 7,2 para a isoamilase de tipo P e 6,4 e 5,8 para a isoamilase de tipo S.

O fracionamento da amilase em amostras de soro, urina ou outros líquidos corporais pode ser conseguido com o emprego de métodos físicos, como eletroforese, cromatografia e focalização isoelétrica. Em seguida, cada isozima é quantificada por densitometria direta ou utilizando-se técnicas amiloclásticas ou sacarogênicas. Um método cromatográfico simplificado e prontamente adaptável foi descrito por Fridhandler (1980). Há também um ensaio de inibição química comercialmente disponível, que emprega inibidor proteico específico para amilase S e é utilizado para determinar o conteúdo de isozimas. A determinação da concentração de isoamilase por inibição química é simples, rápida e conveniente para o uso em situações emergenciais. Outra técnica descrita é um método de imunoinibição que emprega anticorpo monoclonal para inibir a amilase S e, em seguida, quantificar a amilase P remanescente (Mifflin, 1985). Por seu grau de simplicidade, precisão analítica aceitável e boa correlação com o método de determinação eletroforética de isoamilases, esse método deve ser mais explorado quanto à aplicabilidade clínica.

Inúmeros relatos sustentam o achado de que, na pancreatite aguda, os níveis de amilase P estão invariavelmente aumentados, tanto no soro como na urina. A isozima de tipo S, contudo, está reduzida de 0 a 15% da atividade total detectada na hiperamilasemia sérica em pacientes com pancreatite aguda, de 12 a 25% em pacientes com pancreatite crônica recidivante, e a quase zero em indivíduos com carcinoma de cabeça do pâncreas. A isozima de tipo P também encontra-se aumentada em pancreatite crônica recidivante, hipoparatireoidismo e glomerulonefrite. Os níveis séricos da amilase de tipo S estão aumentados em pacientes com pancreatite crônica, caxumba, insuficiência pancreática, síndrome de Sjögren, colelitíase, estreitamento do ducto comum, ingestão de álcool, gastroenterite aguda, insuficiência respiratória aguda, insuficiência renal crônica, câncer pulmonar, além de outras hiperamilasemias associadas ao câncer. Estudos com isozimas presentes em amostras de soro, urina e líquido duodenal, obtidas de pacientes com fibrose cística, revelaram que dois terços desses pacientes apresentavam pouca ou nenhuma amilase P.

Foi relatado que a atividade relativa da isoamilase de tipo P é altamente útil como índice diagnóstico de pseudocistos pancreáticos (Warshaw, 1980). A isoamilase P1 (que migra mais lentamente, ou a menos anódica) normalmente responde por 80 a 90% da atividade total de amilase. Os tipos P2 e P3 correspondem a cerca de 0 a 4%, tanto no soro como no suco pancreático. As proporções médias de P2/P1 e P3/P1 em amostras frescas de suco pancreático, soro normal, soro de paciente com pancreatite aguda, soro de paciente com pancreatite crônica e soro de paciente com câncer do pâncreas foram sempre inferiores, respectivamente, a 0,25 e 0,04. Essa proporção mostrou-se elevada em cerca de 90% dos soros provenientes apenas de pacientes

que comprovadamente apresentavam pseudocistos. Em vários casos, essa análise de isoamilases foi capaz de excluir de forma correta os pseudocistos, enquanto os métodos de ultrassom e varredura por TC acusaram erroneamente a presença de um pseudocisto.

Gastrina

A gastrina é um hormônio GI primário, produzido principalmente pelas células G do antro gástrico, que regula a secreção ácida e estimula o crescimento da mucosa gástrica, entre outras funções. A gastrina também é produzida, em menor extensão, pelas células G do intestino delgado proximal e pelas células Δ do pâncreas. Atua nas células parietais localizadas no fundo gástrico, estimulando-as a secretar ácido gástrico. A gastrina também aumenta o fluxo sanguíneo para o estômago e é responsável pelo aumento da motilidade gástrica e intestinal. Entre outras funções, estão a estimulação da secreção de pepsinogênios e fator intrínseco, a liberação de secretina a partir do intestino delgado e a secreção de enzimas pancreáticas, bem como de bicarbonato (Henderson, 1994). Esse hormônio é secretado principalmente após a detecção de produtos da digestão proteica, como também a partir da distensão do antro gástrico. A máxima estimulação da secreção de gastrina ocorre em uma faixa de pH que varia de 5 a 7. Um ambiente ácido atua como mecanismo de retroalimentação negativa em relação à liberação de gastrina, causando uma redução de 80% em sua secreção em pH 2,5 (Henderson, 1994). Esse mecanismo serve para proteger o estômago da superacidificação a partir de uma estimulação excessiva pela gastrina. Por essa razão, indivíduos submetidos à terapia de supressão ácida para doença de úlcera péptica podem apresentar níveis de gastrina aumentados.

Existem três formas principais de gastrina no sangue e nos tecidos humanos: G34, G17 e G14, conhecidas como gastrina grande, gastrina pequena e minigastrina, respectivamente. Todas as gastrinas originam-se de um único precursor – a pré-pró-gastrina –, que é clivado pela tripsina. A pré-pró-gastrina gera pró-gastrina, que é subsequentemente processada em gastrina glicina-estendida (G34-Gly e G17-Gly) antes de ser convertida nas formas contendo amido, G34 e G17 (Wang, 1999). É interessante observar nos casos patológicos em que há aumento da produção de gastrina, como na gastrite aclorídrica ou nos gastrinomas, a presença de formas moleculares maiores de gastrina e precursores processados de modo incompleto, cuja detecção está além do escopo dos ensaios convencionais. Em tais casos, apenas a gastrina pequena é detectável no soro (Goetze, 2003).

A determinação laboratorial dos níveis de gastrina por RIA ou ELISA é indicada para confirmar suspeitas da existência de tumores que secretam gastrina, denominados gastrinomas ou síndrome de ZE. Os anticorpos utilizados nesses ensaios são específicos para a porção C-terminal da molécula de gastrina biologicamente ativa e apresentam mínima reatividade cruzada com peptídeos CCK. Para a determinação dos níveis de gastrina, o paciente deve permanecer em jejum por 12 horas antes da realização do ensaio. As concentrações de G34 e G17 aumentam, respectivamente, duas e quatro vezes após as refeições e, assim, podem alterar os resultados do teste. As amostras devem ser congeladas imediatamente após a coleta, pois a gastrina é instável no soro. Devido à ação de enzimas proteolíticas, 50% da imunorreatividade das amostras pode ser perdida num período de 48 horas, à temperatura de 4°C. Caso seja necessário armazenar as amostras por tempo prolongado, recomenda-se que sejam mantidas em um *freezer*, a –70°C, sem exposição a ciclos de autodescongelamento. As amostras devem ser analisadas imediatamente após o descongelamento, evitando-se congelamentos/descongelamentos repetidos.

Os valores de referência individuais para gastrina de jejum podem ser de até 100 ng/L. Entretanto, é preciso ter em mente que os níveis séricos de gastrina de jejum aumentam com o avanço da idade, especialmente em pacientes com mais de 60 anos. Esse fenômeno se deve, em parte, à existência não identificada de um processo atrófico na mucosa gástrica. Aproximadamente, 15% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade podem apresentar níveis de gastrina entre 100 e 800 ng/L (Henderson, 1994). Também é importante notar que os intervalos de referência para bebês e crianças diferem dos intervalos de referência para indivíduos adultos, de modo que é preciso comparar adequadamente os valores obtidos com a faixa referencial específica para a idade do paciente e, assim, garantir a acurácia dos resultados. Concentrações de gastrina acima de 1.000 ng/L acompanhadas de hipersecreção de ácido gástrico (secreção ácida basal > 15 mmol/h) são diagnósticas de gastrinomas. Em pacientes com síndrome de ZE, usualmente há um aumento marcante (até 2.000 vezes o valor normal) dos níveis de gastrina. O teste de estimulação da secretina consiste num teste bioquímico provocativo que pode auxiliar na confirmação do diagnóstico de síndrome de ZE em casos considerados duvidosos. Espera-se que a secretina administrada por infusão provoque uma queda dos níveis de gastrina, como ocorre nos pacientes normais. Todavia, nos pacientes com ZE, os níveis de gastrina aumentam de modo dramático, confirmando o diagnóstico. Ainda é pouco conhecido o mecanismo pelo qual a secretina estimula esse aumento nos pacientes afetados pela síndrome. Contudo, acredita-se que seja devido a um efeito local, sobre o fluxo sanguíneo tumoral (Ashley, 1999). As limitações do método incluem resultados alterados a partir de condições que podem levar ao aumento dos níveis de gastrina, como úlcera gástrica, insuficiência renal crônica, hiperparatireoidismo, obstrução pilórica, vagotomia, retenção do antro gástrico, síndrome do intestino curto e anemia perniciosa. Certos medicamentos, como antiácidos, agentes bloqueadores H_2 e inibidores da bomba de prótons, também podem aumentar os valores medidos pelo teste. Todos esses medicamentos são comumente utilizados no tratamento de pacientes com úlcera péptica. Entretanto, tais elevações são moderadas e certamente não tão significativas quanto as observadas no teste de amostras provenientes de pacientes com tumor secretor de gastrina.

Os ensaios têm sido tradicionalmente utilizados para detectar níveis aumentados de gastrina associados a doenças como síndrome de ZE e gastrinomas. No entanto, o benefício claramente estabelecido dos testes rápidos para PTH intraoperatórios (ver Cap. 15) tem atraído semelhante interesse para a gastrina, como guia intraoperatório de uso na supervisão terapêutica, seja para confirmar a remoção adequada do tecido secretor de gastrina ou indicar a necessidade de realizar nova dissecação e procedimentos possivelmente mais elaborados. O teste intraoperatório tem uso potencial, porque os gastrinomas podem ser múltiplos e frequentemente difíceis de localizar, dada a possibilidade de apresentarem ampla distribuição, por exemplo, no estômago, no pâncreas e no duodeno ou nos linfonodos periaórticos. A gastrina é um hormônio que pode ser utilizado convenientemente em testes rápidos intraoperatórios, porque apresenta curta meia-vida como analito (cerca de 10 minutos). Dessa forma, pode ser detectada logo após a ressecção do tecido hipersecretor, permite a realização de uma análise rápida que pode ser finalizada no decorrer do procedimento operatório e tem utilidade clínica positiva (Sokoll, 2004). A quebra catabólica da maioria dos hormônios peptídicos segue um decaimento exponencial de primeira ordem. Portanto, se o tecido secretor de hormônio for totalmente removido por ressecção cirúrgica, somente cerca de 12,5% da concentração basal deve estar presente no soro após um período equivalente a três meias-vidas (Sokoll, 2004). Num determinado estudo clínico, pacientes com síndrome ZE ou gastrinomas foram avaliados através de ensaios intraoperatórios para gastrina. Uma queda dos níveis de gastrina para valores junto ao intervalo de referência dentro de 20 minutos após a ressecção foi considerada indicação de cura. A sensibilidade estimada para os testes intraoperatórios de gastrina foi de 88%. Esse teste pode ajudar a identificar pacientes que podem ser beneficiados por dissecações ou procedimentos operatórios mais extensos, como duodenopancreatectomia, que não são recomendados para todos os pacientes devido ao grau de morbidade e mortalidade associado (Sokoll, 2004). Todavia, os testes intraoperatórios para gastrina podem ajudar a identificar pacientes que seriam beneficiados por tais procedimentos cirúrgicos, e essa utilidade, por si só, já representa um avanço na supervisão de pacientes com gastrinoma.

Pepsina e pepsinogênio

Os pepsinogênios são as pró-enzimas biologicamente inativas das pepsinas, produzidas pelas células principais, entre outras, na mucosa gástrica. Podem ser de dois tipos distintos: o pepsinogênio I (PGI), também conhecido como pepsinogênio A, e o pepsinogênio II (PGII), também conhecido como pepsinogênio C. A secreção do pepsinogênio é estimulada pelo nervo vago, pela gastrina, pela secretina e pela

CCK, sendo inibida por ação do peptídeo inibidor gástrico (GIP, *gastric inhibitory peptide*), anticolinérgicos, antagonistas de receptor H_2 da histamina e vagotomia (Henderson, 1994). O PGI é produzido nas células principais e nas células mucosas das glândulas oxínticas. O PGII é produzido nas células mucosas das glândulas oxínticas e nas regiões do piloro e do duodeno. A proporção entre as concentrações de PGI e PGII no soro ou no plasma de indivíduos sadios é de aproximadamente 4:1 (Samloff, 1982). O pepsinogênio é convertido em sua forma ativa – a pepsina – por ação do ácido gástrico, que também pode ativar pepsinogênio adicional de modo autocatalítico. Ambos os tipos de pepsinogênio são ativados em pH ácido (abaixo de 5) e destruídos em pH alcalino. Ambos podem ser detectados no sangue. Apenas o PGI é detectado na urina, enquanto o PGII está presente no sêmen (Henderson, 1994). As pepsinas são responsáveis pela hidrólise das proteínas em polipeptídeos. O pepsinogênio liberado a partir da mucosa gástrica é predominantemente secretado e constitui o principal componente do suco gástrico. Apenas cerca de 1% atinge a circulação sanguínea periférica. A pepsina ativa é rapidamente inativada na corrente sanguínea, enquanto o pepsinogênio permanece estável no sangue. Esse pepsinogênio, em seguida, é filtrado pelos rins e excretado pela urina, onde passa a ser denominado uropepsinogênio. O pH urinário levemente acídico o converte em uropepsina (Henderson, 1994). O imunoensaio é o método utilizado para detectar o pepsinogênio sérico; entretanto, o PGI costuma ser analisado no laboratório clínico, por ser a isoforma comumente associada à doença.

Os níveis séricos de PGI fornecem uma estimativa acurada da massa de células parietais e correlacionam-se à capacidade do estômago de secretar ácido gástrico. Níveis aumentados de pepsinogênio e da atividade associada são observados em pacientes com estados patológicos que levam ao aumento do débito gástrico ou que apresentam aumento da massa de células parietais, como ocorre com gastrinoma, síndrome de ZE, úlcera duodenal e gastrite aguda ou crônica (Henderson, 1994). Níveis diminuídos de pepsinogênio estão associados a estados patológicos caracterizados pela diminuição da massa de células parietais, como se observa na gastrite atrófica e no carcinoma gástrico, bem como nos pacientes com mixedema, doença de Addison e hipopituitarismo (Henderson, 1994). A proporção PGI/PGII diminui de modo linear com a piora da gastrite atrófica. A ausência de pepsinogênio é detectada em pacientes com acloridria. É preciso ter essa informação em mente ao analisar os níveis séricos de pepsinogênio, possivelmente limitando a utilidade clínica do ensaio sorológico. Os níveis de PGI determinados por imunoensaio usualmente variam entre 20 e 107 µg/L, enquanto os de PGII costumam variar entre 3 e 19 µg/L.

Os ensaios para pepsinogênio estão sendo explorados por sua utilidade na identificação não invasiva de pacientes com gastrite atrófica crônica, bem como por fornecerem uma estimativa da extensão da gastrite atrófica que sabidamente é um dos precursores do carcinoma gástrico. Em comparação aos indivíduos sadios, a gastrite de corpo atrófico severa aumenta de 4 a 5 vezes o risco de carcinoma gástrico (Sanduleanu, 2003). Espera-se que essa característica permita identificar um subgrupo de indivíduos com gastrite atrófica crônica, o qual poderia ser beneficiado pelas avaliações endoscópicas para detecção de tumores gástricos em estágio inicial. Tais ensaios atualmente são utilizados no Japão – uma área marcada pela alta prevalência de câncer gástrico – como potencial método para a realização de uma ampla triagem de indivíduos que apresentam risco elevado (Miki, 2003). Miki recomendou que os critérios adotados para diagnosticar a gastrite atrófica crônica sejam valores de PGI < 70 µg/L e proporção PGI/PGII < 3,0. Todos os pacientes que obedecem a tais critérios devem, então, ser encaminhados ao gastroenterologista para serem submetidos a novas avaliações endoscópicas. No Japão, foi demonstrado que o teste de triagem sorológica para pepsinogênio é capaz de detectar um percentual maior de cânceres em estágio inicial, quando comparado a outros métodos convencionais. O teste identificou um número considerável de pacientes que subsequentemente se tornaram candidatos ao tratamento com cirurgia endoscópica (Miki, 2003). Considera-se que o teste mais sensível para gastrite atrófica fúndica é a determinação da proporção PGI/PGII no soro, com 99% de sensibilidade e 94% de especificidade (Henderson, 1994). Além disso, os níveis de pepsinogênio II podem atuar como marcador prognóstico útil, servindo de fator preditivo independente da biologia tumoral e da sobrevida dos pacientes com carcinoma gástrico. A ausência de produção de PGII tem sido associada ao comportamento tumoral agressivo e a uma menor expectativa de vida geral em pacientes com câncer (Fernandez, 2000). Dessa forma, é possível que seja comprovada a utilidade dos testes de pepsinogênio como método de triagem sorológica para a detecção de carcinoma gástrico em indivíduos que apresentam alto risco.

Tripsinogênio

O tripsinogênio é produzido pelo pâncreas exócrino sob a forma de duas pró-enzimas – os tripsinogênios 1 e 2. As pró-enzimas são ativadas no duodeno por ação de uma enteroquinase, com consequente produção das tripsinas 1 e 2, respectivamente. A tripsina presente na circulação periférica é inativada pela complexação tanto à α_2-macroglobulina como à α_1-antitripsina (AAT). Diferentemente da amilase, a tripsina é produzida apenas pelas células pancreáticas acinares e, portanto, é um indicador específico de dano pancreático. A ativação precoce da pró-enzima em tripsina ativa no parênquima pancreático é considerada o mecanismo-chave para o desenvolvimento da pancreatite aguda (Andersen, 2001). Atualmente, os níveis de todas as formas de tripsina são determinados através de imunoensaios específicos.

Os testes para detecção de tripsina têm utilidade clínica no diagnóstico da pancreatite aguda. Essa doença, discutida em detalhes na seção anterior, com frequência resulta tanto do consumo excessivo de álcool como de uma sequela de doença causada por cálculos biliares. A diferenciação entre essas duas etiologias é auxiliada pela obtenção cuidadosa da história do paciente e da realização de estudos de imagens, em particular a ultrassonografia. Entretanto, em cerca de 5 a 10% dos casos de pancreatite aguda, a etiologia específica jamais é descoberta. Esse fato é importante, pois, ainda que a supervisão inicial e a ressuscitação de um paciente com pancreatite sigam o mesmo logaritmo de supervisão para ambas as etiologias, pacientes com pancreatite biliar resultante de cálculos biliares podem ser beneficiados por uma intervenção cirúrgica. Tais pacientes devem ser submetidos a uma colecistectomia eletiva após a resolução da pancreatite, a fim de evitar episódios recorrentes de uma doença potencialmente fatal. Por esse motivo, marcadores bioquímicos que diferenciam as etiologias podem ser clinicamente inestimáveis. A determinação dos níveis de ALT, AST, amilase e lipase é útil para o diagnóstico da pancreatite aguda e, às vezes, sugestiva de uma etiologia em detrimento da outra. Contudo, os ensaios para tripsina atualmente são utilizados com o propósito de diferenciar a causa do episódio agudo de pancreatite. Um estudo demonstrou que as concentrações de tripsinogênio 2 e tripsina 2-ATT estão aumentadas em todas as formas de pancreatite aguda, mas parecem estar ainda mais altas na pancreatite associada ao consumo de álcool, em comparação à pancreatite biliar. Foi demonstrado que os níveis de tripsinogênio 1, amilase e lipase eram mais altos nos pacientes com pancreatite biliar. Além disso, a proporção sorológica de tripsina 2-ATT em relação ao tripsinogênio 1 foi considerada o melhor fator de discriminação para as formas biliar e alcoólica de pancreatite (Andersen, 2001). Curiosamente, outro estudo também sustentou o uso dos testes para tripsina no diagnóstico de pancreatite aguda, alegando que o perfil de tripsinogênio 2 e tripsina 2-AAT ao longo do tempo é apropriado para fins diagnósticos. Os níveis dessas enzimas aumentam dentro de algumas horas, após o início do episódio agudo. Portanto, já estão altos no momento da admissão do paciente, sendo acompanhados de uma rápida elevação. Os níveis de ambas as enzimas permanecem altos por mais tempo do que os níveis de amilase, sendo que a magnitude do aumento corresponde ao grau de severidade da inflamação pancreática e, assim, é extremamente útil ao diagnóstico da pancreatite aguda no momento da admissão. A magnitude desse aumento pode predizer o grau de severidade da doença e é útil para o monitoramento de sua progressão (Kemppainen, 2000). Também foi demonstrada a elevação dos níveis de tripsina 1-ATT em pacientes com câncer no trato biliar (Andersen, 2001).

Peptídeo vasointestinal ativo (VIP)

O VIP, um neuropeptídeo, tem peso molecular de 3.381 Da e é formado por 28 aminoácidos. Pertence à família da secretina-glucagon (Radebold, 2003). Inicialmente, é sintetizado como um precursor

constituído por 170 aminoácidos – o pré-pró-VIP. Esse precursor é modificado ao nível pós-traducional e dá origem à molécula de 28 aminoácidos do VIP (Vinik, 2004). Este, por sua vez, é liberado em resposta à distensão das alças intestinais e exerce um potente efeito vasodilatador, sendo responsável pelo relaxamento vascular e não vascular da musculatura lisa do trato intestinal. É também um poderoso estimulante da secreção de água e eletrólitos, atuando por meio da estimulação do cAMP. De modo semelhante ao glucagon, o VIP estimula a quebra do glicogênio das reservas lipídicas e inibe a secreção ácida estimulada pela histamina no estômago, provocando hipo- ou acloridria.

As avaliações laboratoriais para determinação dos níveis de VIP são relevantes do ponto de vista clínico para o diagnóstico de VIPomas, tumores secretores de VIP, mais comumente de origem pancreática, que correspondem a 10% dos tumores neuroendócrinos do trato GI. A maioria desses tumores é esporádica e também pode afetar glândulas suprarrenais, mediastino, retroperitônio, pulmão e jejuno. Estima-se que a incidência dos tumores seja de 0,05 a 0,2/milhão ao ano. Aproximadamente, 60% dos VIPomas são malignos e 6% estão associados a múltiplas neoplasias endócrinas (MEN, *multiple endocrine neoplasia*) de tipo I. Essa síndrome foi descrita pela primeira vez em 1958, por Verner e Morrison, sendo caracterizada por uma diarreia aquosa, hipocalemia e acloridria (WDHA, *watery diarrhea, hypokalemia, achlorhydria*). Posteriormente, descobriu-se que era causada por tumores secretores de grandes quantidades de VIP (Radebold, 2003). As manifestações GI dos VIPomas são abordadas nesta seção.

Os VIPomas produzem uma severa diarreia secretória que tem sido denominada cólera pancreático. A diarreia pode durar vários anos até que o VIPoma seja diagnosticado. Os pacientes tipicamente produzem mais de 3 L de fezes aquosas por dia, embora esse volume possa chegar a 30 L/dia. A diarreia não melhora com jejum, e o indivíduo apresenta uma secreção média de potássio de 300 mmol/24 horas (Vinik, 2004). Um volume de fezes menor que 700 mL/dia exclui o diagnóstico de VIPoma. Se houver falha ou atraso no diagnóstico – como ocorre frequentemente –, o quadro de diarreia crônica acarreta graves desequilíbrios hidreletrolíticos que produzem uma miríade de sintomas clínicos, dos quais o mais grave é a morte súbita decorrente de arritmias cardíacas resultantes dos distúrbios eletrolíticos (depleção de potássio e acidose). O típico perfil metabólico apresentado por esses pacientes é de acidose metabólica hipocalêmica e hiperclorêmica. O diagnóstico de VIPoma é estabelecido mediante confirmação da elevação dos níveis de VIP no indivíduo em jejum, associada à diarreia secretória e à presença de uma lesão, mais comumente localizada no pâncreas, que está associada à produção do VIP. Quando o paciente apresenta sintomas brandos ou intermitentes, que são típicos do estágio inicial de crescimento tumoral, os níveis de VIP podem estar casualmente normais e, com isso, acabam atrasando o diagnóstico da doença. Diante de tais circunstâncias, os níveis desse hormônio devem ser avaliados durante uma crise diarreica, quando é possível detectar a secreção ativa de VIP.

A confirmação bioquímica do diagnóstico de VIPoma envolve a realização de um radioimunoensaio altamente sensível e específico, para detectar o aumento dos níveis de VIP. A concentração normal desse hormônio é menor que 170 pg/mL. Pacientes com tumores que secretam VIP funcional apresentam concentrações que variam de 675 a 965 pg/mL (Thomas, 2003). É importante atentar-se para o fato de que o manuseio adequado das amostras de soro é crítico para a acurácia da detecção do VIP por radioimunoensaio, uma vez que a meia-vida desse hormônio é de 1 minuto. O soro deve ser tratado imediatamente com aprotinina, um inibidor de proteases que previne a quebra do VIP. Além disso, o processo de separação da amostra não pode exceder 10 minutos e, assim que for terminado, a amostra deve ser congelada a –20°C. Alguns produtos não VIP oriundos da molécula precursora são secretados em maior quantidade do que o VIP. Entretanto, não há testes comerciais disponíveis para detectá-los, e sua importância clínica é desconhecida. Elevações que produzem resultados falso-positivos nos testes para VIP podem ser observadas em casos de pacientes que apresentam isquemia no intestino delgado ou estados severos de baixo fluxo resultantes da diarreia, com subsequente desidratação não associada às lesões produtoras do hormônio (Vinik, 2004). Além disso, os níveis séricos de polipeptídeo pancreático devem ser determinados no momento em que o VIP-RIA for realizado. Tais valores estarão aumentados se o VIPoma estiver localizado no pâncreas.

A varredura por TC e a ultrassonografia abdominal são modalidades de análise de imagens úteis para localizar o tumor do VIPoma. A angiografia pode ser empregada para localizar tumores pequenos. Diversas varreduras nucleares têm sido utilizadas para localizar os VIPomas, entre as quais está a cintilografia do receptor de VIP com ^{123}I, atualmente sob investigação.

Cloreto no suor

A pilocarpina é introduzida na pele por iontoforese para estimular localmente o aumento da secreção da glândula sudorípara. O suor produzido é, então, absorvido com papel de filtro ou gaze, pesado, diluído em água e analisado quanto às concentrações de sódio e cloreto. O método é indolor e confiável, desde que executado corretamente. Utilizando o sistema de coleta de suor Macroduct Wescor (Wescor Inc., Logan, UT), é possível coletar volumes de até 100 µL de suor. O cloreto pode ser quantificado diretamente em amostras de 20 µL com auxílio de um analisador de cloreto, como o Corning 925 (Chiron Diagnostics, Ltd., East Walpole, MA). Essa redução do número de etapas envolvidas no procedimento garante maior reprodutibilidade. O teste de avaliação da transpiração corporal total é perigoso para pacientes com fibrose cística, sendo que foram registrados casos de morte decorrentes do procedimento.

Quando realizado de modo correto, em duplicata, o teste de transpiração apresenta uma sensibilidade de 90 a 99%. Taxas inaceitavelmente altas de resultados incorretos foram atribuídas a problemas associados à coleta da amostra de suor e à análise empregada no teste. Falta de confiabilidade metodológica, erros técnicos, coleta de suor inadequada e errada, inexperiência de funcionários do laboratório, ausência de controles de qualidade efetivos e interpretação confusa dos resultados do teste foram as fontes de erro encontradas (LeGrys, 1994). Para fornecer um teste de transpiração com o melhor nível de qualidade possível, os laboratórios são informados sobre um documento – o Sweat Testing Sample Collection and Qualitative Analysis: Proposed Guidelines (documento C34-P, 1993) – desenvolvido pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Villanova, PA), com o intuito de melhorar o desempenho do teste de transpiração para o diagnóstico da fibrose cística (LeGrys, 1994). Esse documento elaborado pelo NCCLS inclui uma discussão acerca da estimulação da transpiração, das medidas qualitativas de cloreto e sódio no suor e dos aspectos relativos ao controle de qualidade. O CAP e a *Cystic Fibrosis Foundation* se uniram a essa iniciativa e criaram o *External Proficiency Testing Survey for Sweat Test Analysis* (SetSW) com o objetivo de melhorar ainda mais a qualidade do teste de transpiração. Aos laboratórios que executam poucos testes de transpiração anualmente, a *Cystic Fibrosis Foundation* recomenda que os pacientes sejam encaminhados ao centro (LeGrys, 1994).

Teste de Apt para sangramento neonatal

Sempre que é encontrado sangue no trato GI ou nas fezes de recém-nascidos, torna-se necessário determinar se o bebê engoliu sangue materno (i. e., o sangue é de origem materna) ou se ele apresenta sangramento secundário a alguma doença (i. e., o sangue é oriundo do próprio bebê) (Guritzky, 1996). O teste de Apt é um teste qualitativo utilizado para fazer essa determinação, a grosso modo, nas fezes sanguinolentas ou na hematêmese (vômito com sangue) provenientes de um recém-nascido. Durante a amamentação, os bebês também podem ingerir sangue materno, caso o mamilo apresente rachaduras ou sangramento. A amostra a ser analisada é, primeiramente, misturada à água e centrifugada. O sobrenadante, que deve apresentar coloração rosa, é misturado em seguida a uma solução de hidróxido de sódio a 1% numa proporção de 5:1. Se o sangue presente na amostra for de origem materna, a mistura adquirirá uma tonalidade castanho-amarelada depois de alguns minutos. O sangue fetal permanece rosa. Esse teste baseia-se no fato de a HbF ser mais resistente à desnaturação álcali do que a hemoglobina de um indivíduo adulto. Sua sensibilidade é relativamente baixa, e os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela (McRury, 1994).

Testes de triagem

Os testes de triagem para detecção de esteatorreia são o exame microscópico de fezes para pesquisa de glóbulos de gordura e a determinação do conteúdo sérico de carotenoides. Os carotenoides constituem um grupo de compostos que são os principais precursores da vitamina A em seres humanos. A absorção intestinal de carotenoides depende da presença e da absorção normal da gordura proveniente da dieta. Como os carotenoides não são suficientemente armazenados no organismo, a falta deles na dieta ou distúrbios envolvendo a absorção de lipídeos no intestino podem resultar da diminuição dos níveis de carotenoide no soro. Essa é uma triagem simples e útil para detecção de esteatorreia. Além da esteatorreia e da precária ingestão dietética, a doença hepática e a febre alta também podem provocar a diminuição dos níveis séricos de carotenoides. Por outro lado, níveis elevados de carotenoides são observados em pacientes com hipotireoidismo, diabetes, hiperlipidemia e que ingerem caroteno em excesso.

Teste respiratório. Esse teste se baseia na quantificação de $^{14}CO_2$ presente no ar expirado após a ingestão de vários TGs marcados com ^{14}C (trioleína, tripalmitina e trioctanoína). A esteatorreia – decorrente tanto de insuficiência pancreática como de outras causas – resulta na diminuição da absorção de TGs pelo sistema digestivo. Esse fenômeno, por sua vez, resulta na diminuição do CO_2 expirado, que deriva do metabolismo dos ácidos graxos oriundos dos TGs.

Procedimento. Depois de permanecer em jejum de um dia a outro, o paciente consome TGs marcados com ^{14}C. Periodicamente, o CO_2 da respiração é coletado em uma solução de captura contendo um indicador que muda de cor diante da presença de uma quantidade predeterminada de CO_2 na solução. Em seguida, a radioatividade do $^{14}CO_2$ é medida com auxílio de um contador de cintilações líquido, e os resultados obtidos são expressos como percentual da dose de $^{14}CO_2$ expirado por hora.

Comentários. Para distinguir a insuficiência pancreática de outras causas de esteatorreia, alguns investigadores desenvolveram um teste respiratório de dois estágios (Goff, 1982). No primeiro estágio do teste, o paciente consome um TG marcado com ^{14}C, e o $^{14}CO_2$ é medido conforme já descrito. O segundo estágio do teste é realizado de 5 a 7 horas mais tarde e é exatamente igual ao primeiro estágio, exceto que o paciente recebe uma dose oral de enzimas pancreáticas com o TG marcado com ^{14}C. Em pacientes com esteatorreia causada por insuficiência pancreática, a quantidade de $^{14}CO_2$ expirado deve aumentar em relação à quantidade de $^{14}CO_2$ expirado no primeiro estágio do teste. Pacientes com esteatorreia de causas diversas não devem apresentar diferença significativa da quantidade de $^{14}CO_2$ expirado após a administração oral das enzimas pancreáticas.

Teste definitivo para esteatorreia

O teste definitivo para esteatorreia é a determinação do conteúdo de gordura presente nas fezes. A quantidade de gordura fecal pode ser quantificada e expressa como percentual do peso úmido fecal, percentual do peso seco fecal, percentual de gordura ingerida e retida (absorvida) ou, ainda, uma quantidade de gordura determinada quimicamente em amostras de fezes coletadas a cada 24 horas. Devido à ampla variação do conteúdo de água presente nas fezes, a concentração de gordura dada pelo peso úmido é a que menos informações fornece. A concentração de gorduras expressa como percentual do peso seco é apenas discretamente menos variável, por causa do efeito da dieta sobre o volume em questão. O débito de gordura total a cada 24 horas, com base nas análises químicas de amostras coletadas em pelo menos 3 dias, é a determinação mais confiável. Para realizá-la, o paciente é submetido a uma dieta padrão que inclui a ingestão diária de 100 g de gorduras. No caso de bebês e crianças pequenas, que não podem receber essa dieta padrão, a melhor expressão é o "coeficiente percentual de retenção de gorduras". Esse parâmetro é dado pela diferença entre o conteúdo de gordura fecal e a quantidade de gordura ingerida, expressa como percentual de gordura ingerida:

$$\text{Coeficiente de retenção de gordura} = [(\text{gordura da dieta} - \text{gordura fecal})/(\text{gordura da dieta})] \times 100$$

Em crianças e adultos normais, o coeficiente de retenção de gordura é ≥ 95%, embora bebês prematuros possam apresentar um coeficiente bem menor do que esse valor. Exceto nesse caso, um coeficiente baixo é indicativo de esteatorreia.

O conteúdo de gordura fecal normal consiste primariamente de ácidos graxos, sais de ácidos graxos (sabões) e gorduras neutras, com maior proporção de alcoóis, parafinas e esteróis, e quantidades significativamente menores de carotenoides vegetais. O fracionamento de lipídeos totais em ácidos graxos livres e gorduras neutras foi, a princípio, considerado auxiliar na avaliação das funções exócrinas do pâncreas. Contudo, devido à presença de lipase bacteriana e à ocorrência de hidrólise espontânea das gorduras neutras, constatou-se que o fracionamento dos lipídeos totais não fornece informações adicionais acerca da causa da esteatorreia.

Existem vários procedimentos laboratoriais disponíveis que podem ser utilizados para avaliar a má absorção de gorduras. Métodos titulométricos quantificam várias formas químicas de ácidos graxos, enquanto os métodos gravimétricos e microscópicos avaliam o conteúdo de gordura fecal total. Os métodos titulométricos constituem o procedimento mais amplamente utilizado no momento para quantificação do conteúdo de gordura fecal. Os testes respiratórios representam uma abordagem mais recente para o diagnóstico da má absorção de gorduras. Nesses testes, a radioatividade específica do $^{14}CO_2$ é medida após a ingestão de uma refeição-teste que contém TGs marcados com ^{14}C.

Método titulométrico. Trata-se de um método que tem utilidade como procedimento laboratorial para diagnóstico definitivo da esteatorreia. Nesse método, as gorduras e os ácidos graxos são convertidos em sabão (saponificados). Para tanto, as fezes são fervidas com hidróxido de potássio alcoólico, sendo produzida uma solução que contém sabões derivados de gorduras neutras e ácidos graxos, além dos sabões originalmente presentes nas fezes. Após o resfriamento, ácido hidroclorídrico em excesso é adicionado à mistura para converter os sabões em ácidos graxos. Estes são extraídos com éter de petróleo, e uma alíquota é evaporada, capturada em álcool neutro e titulada com hidróxido de sódio. O conteúdo de gordura é calculado como concentração de ácidos graxos.

Em certos casos de má absorção, o coeficiente de retenção de gordura pode ser aprimorado pela substituição dos ácidos graxos de cadeia média por ácidos graxos de cadeia longa na dieta. O método titulométrico não proporciona a recuperação quantitativa dos ácidos graxos de cadeia média. Uma melhor recuperação desses ácidos graxos a partir das fezes pode ser obtida introduzindo-se uma discreta modificação no procedimento titulométrico. A quantidade de água utilizada durante a saponificação pode ser reduzida, e o excesso de álcool pode ser destilado antes da extração, resultando na completa recuperação dos ácidos graxos tanto de cadeia média como de cadeia longa.

Testes para má absorção

Quando se cogita um diagnóstico de má absorção, torna-se importante distinguir a má digestão pancreática da má absorção entérica. Em crianças, a causa principal de má absorção pancreática é a fibrose cística e, em tais casos, a determinação do cloreto no suor deve ser utilizada quando há evidências clínicas que a sustentam. Testes de triagem baseados na ausência de tripsina nas fezes também têm sido utilizados. Um dos testes diagnósticos diferenciais mais valiosos, em especial para pacientes adultos, é o teste de absorção de D-xilose. Entretanto, o mau funcionamento renal também pode resultar em baixa excreção e dificultar, assim, a interpretação dos dados fornecidos pelo teste em pacientes que apresentam doença renal. Se o teste for realizado em tais circunstâncias, os valores sanguíneos também devem ser avaliados. Na doença renal, espera-se detectar níveis sanguíneos elevados e valores urinários diminuídos. Como não há valores de referência nessa situação, é melhor evitar utilizar o teste para pacientes com doença renal.

Os testes de permeabilidade a açúcar celobiose-manitol e de lactulose-manitol têm sido utilizados no diagnóstico de doença celíaca. A avaliação moderna desse distúrbio foi descrita anteriormente. Técnicas isotópicas e o teste de tolerância ao amido têm sido empregados como alternativas ao teste de D-xilose. O ensaio quantitativo específico de tripsina fecal e o ensaio para quimiotripsina podem ser

úteis, assim como o teste de Schilling para avaliação da absorção de vitamina B_{12}, que tende a fornecer resultados anormais em casos de pacientes com esteatorreia entérica em que a anomalia não é corrigível com fator intrínseco. Endoscopia, estudos radiológicos e biópsia têm substituído esses métodos em diversos casos.

Teste de D-xilose

O teste de avaliação da absorção de D-xilose é valioso para o diagnóstico diferencial de má absorção. Nesse procedimento, uma dose de 25 g de açúcar pentose em água é administrada por via oral, e é determinada a quantidade de açúcar excretada pela urina num período de 5 horas. Se essa quantidade for inferior a 3 g, o diagnóstico mais provável é a má absorção enterógena, uma vez que as enzimas pancreáticas são desnecessárias à absorção da D-xilose. Esse açúcar é passivamente absorvido no intestino delgado e não sofre metabolização hepática, embora uma parte da dose administrada por via oral ou endovenosa seja destruída. A acurácia do método depende não só da taxa de absorção da D-xilose, mas também da taxa de excreção pelos rins. Portanto, recomenda-se que, no caso de pacientes com doença renal, seja coletada uma amostra de sangue para quantificação da D-xilose 2 horas após a administração.

Teste e exame de fezes

Coleta

Pacientes que não recebem instruções por vezes demonstram considerável ingenuidade ao coletar amostras de fezes. Todavia, com apenas algumas instruções simples, torna-se possível obter amostras mais satisfatórias. Uma comadre desengordurada e bem lavada serve convenientemente como recipiente de coleta. Se o paciente não dispõe de uma comadre, uma alternativa satisfatória é um frasco de vidro limpo, lavado e fervido, de tamanho adequado. É preciso alertar o paciente para que não evacue urina na comadre ou no frasco durante a coleta, pois a urina, entre outros efeitos, pode ser prejudicial aos protozoários. Depressores de língua ou pedaços de papelão podem ser utilizados como instrumentos razoavelmente convenientes para transferir as fezes da comadre para o frasco de transporte, que pode ser de plástico, papelão ou vidro. Nós preferimos usar potes com tampas rosqueadas, com capacidade aproximada de 56 g (2 oz), para pequenas amostras de fezes. Esses frascos detêm o odor, são à prova de vazamentos e fáceis de transportar. Os pacientes devem ser orientados a não contaminar o lado externo do frasco e a não enchê-lo demasiadamente com a amostra. Os gases existentes na amostra, que frequentemente acabam se acumulando, devem ser liberados gradualmente afrouxando-se a tampa do frasco com cuidado. A não observância a essas precauções simples – especialmente no caso do preenchimento exagerado com amostra – pode resultar na liberação explosiva do conteúdo do frasco.

O material fecal que permanece nas luvas utilizadas pelo médico durante o exame retal pode ser transferido a um pedaço de papel de filtro para inspeção e realização de pesquisa de sangue oculto. Devido à ampla variação dos hábitos intestinais, do tempo de trânsito intestinal e do volume de fezes, é necessário dar atenção especial aos métodos de coleta de fezes periódica. Para a coleta periódica de amostras de urina, o paciente pode esvaziar a bexiga antes e ao final do período de coleta. O trato GI, contudo, não pode ser completamente esvaziado conforme a vontade. Por esse motivo, a quantidade de fezes coletadas num período de 24 horas usualmente apresenta uma correlação muito fraca com a quantidade de alimentos ingerida pelo paciente ao longo de um período de tempo semelhante. Para determinar a excreção fecal de 24 horas de qualquer substância, as fezes devem ser coletadas, pelo menos, ao longo de um período de 3 dias, sendo que os cálculos devem se basear na quantidade total de amostra coletada divida pelo número de dias de coleta. A acurácia desse método pode ser melhorada se o paciente ingerir corante carmim (0,3 g) no início do período de coleta e carvão vegetal (1 g) ao término desse período, além de coletar as amostras de fezes desde o momento em que o corante começar a aparecer no material até o surgimento do carvão. No entanto, surtos de *Salmonella cubana* nos estados americanos de Massachusetts e Califórnia foram rastreados com corante carmim. Outro método utilizado para sinalizar o período de coleta envolve o uso de marcadores fecais inertes e não absorvíveis. Esses marcadores são distribuídos em doses uniformes por vários dias, antes e durante o período de coleta. A concentração de material encontrado nas amostras de fezes é, então, utilizada para determinar a quantidade de fezes que contém a dose de marcador ingerida em 1 dia, como indicação do débito de 24 horas. Para tanto, tem sido empregado o sesquióxido de cromo (Cr_2O_3), e sua concentração nas fezes é determinada quimicamente. A substituição desses marcadores por isótopos radioativos de cromo ou zircônio possibilitou a determinação da concentração através da medição da radioatividade presente nas fezes. Contudo, do modo como são empregados atualmente, esses métodos são muito demorados para serem utilizados como medidas de rotina.

A coleta da amostra de fezes em casa pode ser um procedimento fácil e simples, desde que o paciente seja orientado adequadamente. Hoffman (1973) descreveu um método de coleta que conta com a vantagem da facilidade de transporte e armazenamento, a ausência da necessidade de equipamentos especiais e a aceitabilidade por parte dos pacientes e dos funcionários de laboratórios clínicos.

Um método pediátrico descrito por Jelliffe (1973) inclui o uso de um tubo de ensaio de vidro espesso, que é lubrificado por imersão na água e, em seguida, inserido no reto da criança. Em cerca de dois terços dos casos, é possível obter um núcleo de fezes que pode ser fragmentado com auxílio de um bastão aplicador e transferido para o frasco de coleta.

Exame macroscópico de fezes

É importante inspecionar as fezes, porque esse exame pode conduzir ao diagnóstico de infestações parasitárias, icterícia obstrutiva, diarreia, má absorção, obstrução retossigmoide, disenteria, colite ulcerativa ou sangramento do trato GI.

Quantidade, forma, consistência e cor das fezes devem ser observadas. Normalmente, 100 a 200 g de fezes são evacuadas por dia. Quando há diarreia, as fezes se tornam aquosas. A esteatorreia é caracterizada pela evacuação de grandes quantidades de fezes moles, de odor desagradável e cor acinzentada. A constipação pode estar associada à evacuação de pequenas massas de fezes firmes e esféricas (cíbalos), resultando mais frequentemente da síndrome do cólon irritável em pacientes ansiosos ou que fazem uso excessivo de laxantes. Em tais casos, são solicitados repetidos testes para detecção de sangue oculto, visando a descobrir a possível existência de problemas orgânicos mais sérios, como carcinomas, que também podem estar afligindo esses pacientes.

Fezes estreitas, em forma de tiras, sugerem a possibilidade de intestino espasmódico ou estreitamento/estenose retal. A cor de argila indica diminuição ou ausência de bile ou presença de sulfato de bário. A presença de sangue, especialmente se for oriundo da porção inferior do intestino, pode tornar as fezes vermelhas. A ingestão de beterraba na dieta pode mimetizar esse efeito. É mais provável que um sangramento do trato GI superior faça as fezes se tornarem negras e apresentarem consistência alcatroada. Bismuto, ferro e carvão vegetal também tornam as fezes negras. Fezes que permanecem expostas ao ar por tempo prolongado podem se tornar escurecidas na superfície. Fezes esverdeadas podem ser produzidas após a ingestão de espinafre ou outros vegetais de cor verde ou calomelano ou, ainda, como resultado da presença de biliverdina, observada em pacientes que tomam antibióticos orais. É incomum encontrar sementes e cascas de vegetais. A presença de parasitas é abordada no Capítulo 61.

Muco. A presença de muco reconhecível em uma amostra de fezes é anormal e deve ser comunicada. Um muco translúcido e gelatinoso aderido à superfície das fezes formadas é sugestivo de constipação espasmódica ou colite mucosa. É observado nas fezes de pacientes que apresentam perturbações emocionais e pode resultar de esforços excessivos. A aderência de um muco sanguinolento à massa fecal sugere a presença de neoplasia ou processos inflamatórios no canal retal. Muco associado a pus e sangue é encontrado nas fezes de pacientes com colite ulcerativa, disenteria bacilar, diverticulite ulcerativa e tuberculose intestinal. Pacientes com adenoma viloso do cólon podem evacuar copiosas quantidades de muco (cerca de 3 a 4 L num período de 24 horas). Esses pacientes frequentemente desenvolvem desidratação severa e desequilíbrios eletrolíticos, em especial hipocalemia.

Pus. Pacientes com colite ulcerativa crônica e disenteria bacilar crônica frequentemente evacuam com grandes quantidades de pus. O

reconhecimento desse material é feito microscopicamente. A presença de pus também é detectada nas fezes de pacientes que apresentam abscessos ou fístulas localizadas, os quais se comunicam com cólon sigmoide, reto ou ânus. Grandes quantidades de pus raramente acompanham as fezes de pacientes com colite amébica, sendo que sua presença constitui evidência contra o diagnóstico. Exsudatos inflamatórios não ocorrem nas fezes aquosas evacuadas por pacientes com gastroenterite viral.

Exame microscópico de fezes

Gordura. A técnica mais grosseira é o exame microscópico de amostras coradas com Sudão III, Sudão IV ou óleo vermelho O. Por sua simplicidade, esse procedimento tem sido amplamente empregado em triagens. A experiência mostra que os resultados obtidos apresentam boa correlação com medidas quantitativas, quando são analisadas alíquotas da mesma amostra de fezes. Para tanto, uma pequena alíquota de uma suspensão de fezes é colocada sobre uma lâmina de vidro e misturada a gotas de etanol a 95%. Em seguida, duas gotas de solução etanólica saturada de Sudão III são adicionadas e misturadas à amostra. O material é, então, coberto com uma lamínula de vidro. Nessas condições, os ácidos graxos são observados como flocos de cor clara ou cristais em forma de agulha que não se coram e, portanto, podem passar despercebidos. Sabões também não se coram, mas aparecem como flocos bem definidos e amorfos, massas arredondadas ou cristais grosseiros. As gorduras neutras, por outro lado, aparecem como estruturas grandes e alaranjadas ou gotículas de cor vermelha. Quando 60 ou mais gotículas coradas de gorduras neutras são contadas por campo de maior aumento (hpf, *high power field*), é possível afirmar com segurança que o paciente apresenta esteatorreia. Recomenda-se ter cautela ao interpretar os dados, uma vez que o óleo mineral ou o óleo de rícino podem mimetizar a presença de gorduras neutras. Dessa forma, o procedimento é repetido, adicionando-se várias gotas de ácido acético 36% (v/v) à amostra de fezes e aquecendo a lâmina várias vezes com uma chama até observar discreta fervura. Esse procedimento converte gorduras neutras e sabões em ácidos graxos e os derrete, fazendo-os formar gotículas que se coram intensamente com Sudão III. A lâmina é examinada em seguida, enquanto ainda está morna. Depois que esse procedimento é realizado, a presença de até 100 gotículas coradas por campo de maior aumento é considerada normal. Pacientes com esteatorreia de origem pancreática são propensos a apresentar maiores aumentos do conteúdo de ácidos graxos e sabões. Há quem defenda o uso de óleo vermelho O, pois esse corante permite a substituição do isopropanol por etanol.

Fibras de carne. A técnica de amostragem é idêntica àquela utilizada para as preparações coradas por Sudão para detecção de gordura fecal. Em uma lâmina de vidro, as fezes são completamente misturadas a uma solução de eosina em álcool a 10%. Após 3 minutos em repouso, a lâmina é examinada para observação de fibras musculares. Toda a área coberta pela lamínula de vidro é examinada, e somente as fibras retangulares se tornam claramente evidentes, permitindo a contagem do número de estrias transversais. Aparentemente, o exame para observação de fibras de carne nas fezes gera resultados que apresentam boa correlação com a determinação química da excreção de gorduras.

Leucócitos. Uma pequena porção de muco ou uma gota de fezes líquidas é colocada sobre uma lâmina de vidro de microscopia com auxílio de um bastão aplicador de madeira. Duas gotículas de azul de metileno de Loffler são adicionadas e misturadas completamente, com cuidado. Uma lamínula é colocada sobre a mistura e esta permanece em repouso por 2 a 3 minutos, para que seja obtida uma boa coloração nuclear. Fazendo uma varredura com objetivo de pequeno aumento, contagens grosseiras são realizadas pela aproximação da média do número de leucócitos e eritrócitos observado. Todas as contagens diferenciais devem ser realizadas com objetivo de pequeno aumento, sendo contadas 200 células sempre que possível. Somente as células claramente identificadas como sendo mononucleares ou polimorfonucleares são incluídas na contagem diferencial. Macrófagos e células epiteliais que não podem ser claramente identificados são ignorados. As contagens celulares iniciais devem ser realizadas no momento em que a amostra for recebida para análise.

Pesquisa de sangue oculto nas fezes

O câncer de cólon é a principal causa de mortes associadas ao câncer nos EUA, sendo responsável por cerca de 55.000 mortes anualmente. De acordo com as estatísticas recentes do câncer, cerca de 150.000 novos casos de câncer de cólon foram diagnosticados em 2003. Evidências demonstraram que testes para detecção de sangue oculto nas fezes (FOBT, *fecal occult blood testing*) são úteis para detectar esse tipo de câncer ainda no estágio inicial e, com isso, potencialmente acarretam a diminuição da mortalidade. Três triagens aleatórias e controladas demonstraram que o FOBT promove uma redução de 15 a 35% na taxa de mortalidade associada ao câncer de cólon (Clinical Guideline, 1997). Devido à biologia clínica geralmente favorável exibida por esses tumores, quando diagnosticados no início, com uma taxa de sobrevida de 80 a 90% diante do confinamento local da doença (Helm, 2003), e considerando a natureza barata e não invasiva do FOBT, essa técnica pode ser útil para fazer triagens. Diversas organizações profissionais recomendam a realização de um FOBT bienal, porém ainda não foram estabelecidos protocolos de triagem universais. As diretrizes da American Cancer Society (ACS) para triagem de câncer colorretal – adotadas na maioria dos casos – recomendam a realização de um FOBT anual e uma sigmoidoscopia flexível de 3 a 5 anos, a partir dos 50 anos de idade, para indivíduos assintomáticos que apresentam risco elevado de desenvolver a doença (Marshall, 1996). A CAP Laboratory Testing Strategy Task Force também recomenda a realização de um FOBT anual como prática padrão. As limitações desse teste incluem o elevado número de resultados falso-positivos e falso-negativos. Estima-se que a sensibilidade do FOBT seja de 30 a 50%. É difícil determinar qual é a verdadeira sensibilidade desse teste, porque os indivíduos que apresentam resultados negativos não são submetidos a novas avaliações colonoscópicas para determinar se o resultado do FOBT é de fato negativo. Apenas cerca de 5 a 10% das reações positivas são comprovadamente causadas por uma malignidade oculta (Simon, 1998). Entretanto, a adoção de uma abordagem nas etapas de triagem do câncer de cólon deve ser capaz de minimizar os efeitos clínicos das limitações de sensibilidade e especificidade e fornecer informações valiosas.

É possível detectar sangue oculto por meio de métodos químicos (guaiaco), hemoporfirina ou métodos imunológicos. O sangue oculto pode surgir em qualquer parte do trato intestinal e, muitas vezes, representa o primeiro sinal de alerta da presença de uma malignidade GI. Outras potenciais fontes de sangue oculto podem ser sangramentos de varizes esofágicas, pólipos, inflamação esofágica ou gástrica, hemorroidas ou fissuras, enteropatia inflamatória (DII), doença da úlcera péptica (DUP) ou angiodisplasias do cólon. O diagnóstico laboratorial da presença de sangue oculto nas fezes, em geral, envolve a realização de um teste com esfregaço de guaiaco (Hemoccult, Searcult, Coloscreen), mais comumente utilizado. O guaiaco é um composto fenólico de ocorrência natural que sofre oxidação e se transforma em quinona por ação de uma hidrogênio-peroxidase, com consequente alteração detectável da cor do meio. Esses testes detectam a atividade de pseudoperoxidase do heme, seja como hemoglobina intacta ou heme livre (Allison, 1996). São inespecíficos para hemoglobina humana, sendo que a hemoglobina oriunda da carne vermelha, a peroxidase de frutas e vegetais e certos fármacos podem gerar resultados falso-positivos. A presença de mais de 20 mL de sangue/dia nas fezes produz resultados positivos de teste com esfregaço de guaiaco. As amostras de fezes devem ser obtidas a partir de três evacuações seguidas e enviadas para a análise. Devem ser preparadas duas lâminas para cada amostra. Estudos demonstraram que as lâminas não devem ser reidratadas, devendo ser preparadas em até 7 dias após a coleta. Trata-se de um protocolo padrão para o FOBT, recomendado por triagens clínicas aleatórias. É interessante notar que as instituições médicas atualmente exigem que as amostras de fezes sejam enviadas ao laboratório clínico para realização do teste do esfregaço do guaiaco, em vez de serem preparadas por residentes nas enfermarias, a fim de garantir o cumprimento desse protocolo. A maioria dos testes com esfregaço de guaiaco preparados por residentes é concluída após a realização de um único exame digital do reto. A reidratação aumenta a sensibilidade do teste para detecção de câncer colorretal, mas diminui a especificidade, provocando um aumento de mais de 10% na incidência de resultados falso-positivos. Essa situação incentiva a realização desnecessária de mais avaliações colonoscópicas, que são invasivas e caras,

fazendo com que a triagem se torne impraticável. Além disso, o teste deve ser realizado sob condições apropriadas que servem para limitar sua sensibilidade. A presença de sangramento gengival ou a ingestão de grandes quantidades de carne vermelha antes da execução do teste são exemplos de fatores que podem acarretar resultados incorretos. Além disso, alguns pacientes podem usar certos tipos de medicação que influenciam o resultado do FOBT. Exemplificando, fármacos que podem causar irritação GI e subsequente sangramento, como agentes anticoagulantes, aspirina, NSAIDs, colchicinas ou suplementos de ferro, podem produzir resultados falso-positivos. Outros fármacos implicados são a reserpina e os agentes farmacológicos oxidantes (p. ex., iodo). Por outro lado, a ingestão de grandes quantidades de vitamina C pode conduzir a um resultado falso-negativo. Portanto, os pacientes devem ser informados sobre esses efeitos e evitar tais medicações ou produtos alimentares antes da realização do FOBT. Se não for clinicamente possível tomar essas precauções, então, os resultados obtidos com o FOBT devem ser interpretados com cautela ou o próprio teste deve ser totalmente abolido como modalidade de triagem para tais pacientes.

Um resultado positivo de FOBT deve ser definido como positivo em um ou mais campos da lâmina, a fim de maximizar a sensibilidade do procedimento de triagem. Dessa maneira, o resultado positivo de FOBT pode conduzir à realização de novas avaliações de uma possível suspeita de neoplasia colônica. Um paciente de meia-idade considerado FOBT-positivo, sem que a lâmina tenha sido reidratada para realização do teste, tem uma estimativa de probabilidade de 7 a 14% de apresentar câncer de cólon de classificação de Dukes A ou B, ainda em estágio inicial (Clinical Guideline, 1997). Novas avaliações usualmente incluem tanto uma sigmoidoscopia com enema de bário como uma colonoscopia total, das quais a última é a modalidade preferida. Um resultado de FOBT negativo, por outro lado, não exclui definitivamente a presença de uma neoplasia de cólon. Se um paciente apresenta sinais e sintomas sugestivos de câncer de cólon, devem ser realizadas novas avaliações mesmo que ele seja FOBT-negativo.

O teste imunoquímico fecal para imunoglobulina humana, como HemeSelect ou InSure, foi desenvolvido para melhorar a sensibilidade e a especificidade do teste de guaiaco na detecção de neoplasias colônicas. O HemeSelect se baseia na reação antígeno-anticorpo, envolvendo hemácias de galinha fixadas e recobertas com anticorpos anti-hemoglobina humana (Allison, 1996). As amostras que apresentam aglutinação são interpretadas como positivas para sangue humano oculto. O InSure utiliza anticorpos monoclonais de camundongo anti-hemoglobina humana e subsequente detecção colorimétrica, sendo sensível o bastante para detectar 50 μg de Hb/g de fezes (Quest Diagnostics). Esses testes não reagem com hemoglobina que não seja humana nem com peroxidase, tornando desnecessárias as restrições alimentares. Os testes imunoquímicos InSure têm como alvo a globina da hemoglobulina, que não sobrevive à passagem pelo trato GI superior. Por esse motivo, esses testes são mais específicos para sangramentos na parte inferior do trato GI e no cólon (Quest Diagnostics).

O teste de DNA fecal é uma técnica promissora para detecção de sangue oculto. Entretanto, seu uso ainda não se tornou disseminado. O teste envolve a coleta de uma única amostra de fezes que, em seguida, é submetida a uma varredura para detectar a presença de marcadores de DNA oriundos de células cancerosas que possam estar presentes no trato GI e que eventualmente são liberadas com as fezes (Helm, 2003). O PCR é empregado para amplificar o DNA encontrado nas fezes, tornando o ensaio extremamente sensível. O DNA se mantém estável nas fezes, enquanto as células que se soltam do tecido epitelial normal são degradadas pelas enzimas, no processo de morte celular normal (Helm, 2003). Os genes *APC* e *p53* são exemplos de marcadores de DNA utilizados no exame de fezes. Esses genes controlam o crescimento da célula colorretal e, muitas vezes, são afetados pela neoplasia colônica. Estudos clínicos demonstraram que o teste de DNA fecal apresenta especificidade crescente, que varia de 93 a 100%, e sensibilidade variável entre 71 e 91% para determinação do câncer. Tais valores são consideravelmente melhores que os do teste de guaiaco e, portanto, constituem uma promessa de aprimoramento do diagnóstico laboratorial de malignidades colorretais. A Figura 22.1 mostra o algoritmo do teste de sangue oculto nas fezes utilizado para detecção precoce do câncer de cólon.

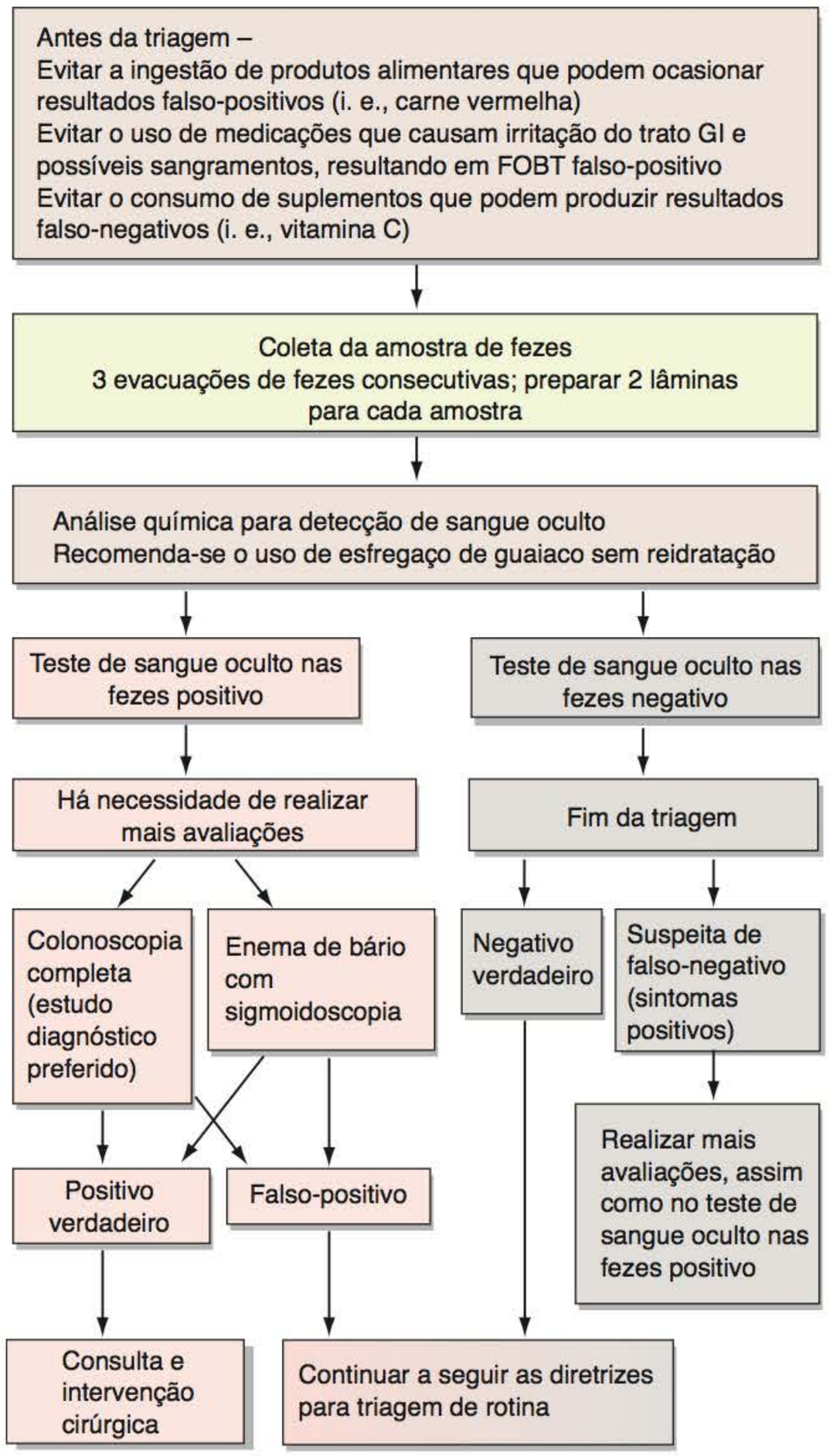


Figura 22.1 Triagem para detecção de malignidade colorretal oculta utilizando teste de sangue oculto nas fezes (FOBT).

Elastase fecal

A elastase 1 é uma enzima proteolítica produzida pelo pâncreas, cujo peso molecular vale 28 kDa. Representa cerca de 6% da secreção enzimática do pâncreas. Foi isolada inicialmente em 1975, sendo denominada protease E (Lankisch, 2004). A elastase pancreática sobrevive ao trânsito intestinal e permanece intacta, aparecendo nas fezes em concentrações de 5 a 6 vezes maiores que sua concentração no suco pancreático (Lankisch, 2004).

A determinação de elastase fecal 1 é um novo teste enzimático fecal, utilizado na avaliação indireta da função pancreática para auxiliar o diagnóstico de insuficiência pancreática exócrina. Pode substituir a determinação dos níveis de quimiotripsina fecal. É interessante notar que a concentração de elastase 1 está aumentada na pancreatite aguda e recidivante na doença crônica, ainda mais intensamente que os níveis de amilase sérica (Henderson, 1994). Além disso, a elevação dos níveis de elastase 1 é mais duradoura do que o aumento dos níveis de amilase sérica e, por esse motivo, pode ser mais específica para a detecção de pancreatite, além de acompanhar com maior acurácia a evolução clínica da doença (Henderson, 1994). A continuidade das investigações provavelmente definirá a devida utilidade da análise do conteúdo fecal de elastase 1 em cenários clínicos particulares. Até isso acontecer, os resultados desse teste devem ser interpretados com cuidado.

O teste de ELISA emprega anticorpos monoclonais que reagem com a elastase pancreática humana (hEP) (Lankisch, 2004). Dessa forma, o teste não é afetado pela terapia de reposição de enzimas pancreáticas, tornando-se útil como teste diagnóstico. É altamente sensível para detecção de insuficiência pancreática severa. Entretanto, não apresenta alta sensibilidade para detectar formas mais brandas da doença – um problema comum dos testes indiretos de avaliação da função pancreática. A elastase fecal apresenta superioridade diagnóstica em relação à determinação dos níveis fecais de quimiotripsina, bem como aos testes mais antigos de avaliação da função pancreática exócrina – ácido para-aminobenzoico (PABA), bentiromida e pancreolauril (Lankisch, 2004).

Uma única análise de uma amostra de 100 mg de fezes é adequada para determinar os níveis fecais de elastase. Se forem detectados valores duvidosos, pode ser útil repetir a análise da amostra. Esse teste deve utilizar somente fezes formadas – detalhe importante a ser considerado na coleta e no processamento das amostras. Com base em testes anteriores, valores acima de 200 µg de hEP-1/g são considerados normais, valores entre 100 a 200 µg de hEP-1/g indicam a existência de insuficiência pancreática de grau suave a moderado, e valores abaixo de 100 µg de hEP-1/g apontam indivíduos com insuficiência pancreática severa (Lankisch, 2004). Adotando esses valores de *cutoff*, estima-se que o teste para elastase fecal apresente uma especificidade de 57 a 90%. A sensibilidade desse teste baseia-se no grau de severidade da insuficiência pancreática. Estima-se que sua sensibilidade seja de 100% para a detecção de doença severa. No entanto, a sensibilidade cai para 33 a 89% nos casos de doença moderada, e para 0 a 65% na insuficiência pancreática branda, segundo estudos preliminares atualmente em curso. Adotando um *cutoff* de 200 µg/g de fezes, estima-se que o valor preditivo da determinação do conteúdo fecal de elastase seja de aproximadamente 50% (Luth, 2001).

A determinação da concentração de elastase nas fezes pode ser mais útil que a determinação dos níveis fecais de quimiotripsina no diagnóstico da insuficiência pancreática. Entretanto, o teste é pouco sensível para detectar as formas branda e moderada da doença e, assim, não pode diagnosticar casos de pancreatite crônica com segurança. Além disso, a utilidade clínica do teste é ainda mais limitada por sua incapacidade de diferenciar a esteatorreia pancreática da não pancreática. A Tabela 22.8 resume a aplicação clínica da estimação do conteúdo fecal de elastase 1 no diagnóstico da pancreatite crônica e da insuficiência pancreática exócrina.

Tabela 22.8 Valores estimados para elastase 1 fecal no diagnóstico de pancreatite crônica e insuficiência pancreática exócrina

Estimativa para elastase 1 fecal	Procedimentos morfológicos (US, USE, TC, ERCP)	Interpretação da estimativa para elastase 1 fecal*
Normal	Normal	Insuficiência pancreática exócrina severa excluída; possibilidade de comprometimento de grau suave a moderado
Anormal	Normal	Insuficiência pancreática exócrina pode ou não estar presente; o teste é inútil, especialmente na diferenciação de esteatorreia/diarreia
Anormal	Anormal	O teste confirma a pancreatite crônica, porém não indica se há esteatorreia e, assim, insuficiência que requeira substituição de enzimas pancreáticas
Normal	Anormal	Há duas interpretações possíveis: O paciente apresenta pancreatite crônica, baseando-se nos procedimentos morfológicos, porém não foi detectada insuficiência pancreática exócrina de grau suave a moderado; estimativa falsamente normal de elastase 1 fecal Exame morfológico anormal devido às cicatrizes resultantes da pancreatite aguda; estimativa corretamente normal de elastase 1 fecal

* Interpretação com base na sugestão de que o diagnóstico de pancreatite crônica deva ser dado por uma combinação de resultados anormais obtidos em exames morfológicos e em testes de avaliação da função pancreática exócrina anormal.

TC = tomografia computadorizada; USE = ultrassonografia endoscópica; ERCP = colangiopancreatografia retrógrada endoscópica; US = ultrassonografia.

Conforme Lankisch PG: Now that fecal elastase is available in the United States, should clinicians start using it? Curr Gastroenterol Rep 2004; 6:126–131, com permissão.

Teste de tolerância à lactose

Depois de jejuar de um dia a outro, o paciente recebe 50 g de lactose dissolvida em 400 mL de água por via oral. Amostras de sangue são coletadas com o paciente em jejum e aos 30, 60 e 120 minutos após a ingestão da solução de lactose, assim como é feito no teste de avaliação da tolerância à glicose. Como opção, uma amostra pode ser coletada em 5 horas e, em seguida, examinada e registrada em termos de aparência, consistência e pH.

Pacientes com deficiência de lactase exibem um pico de aumento inferior a 20 mg/dL na redução de substâncias expressas como glicose. Para todos os indivíduos que apresentarem curvas de tolerância achatadas, o teste deve ser repetido dentro de 2 dias para obtenção de outra curva. Dentre as duas curvas, a menos anormal deve ser utilizada na interpretação. Recomenda-se realizar um teste-controle, com 25 g de glicose e 25 g de galactose, caso o teste de lactose acuse má absorção. Alguns pesquisadores empregam doses de 100 g que, segundo relatos, produz resultados mais definitivos. O teste pode provocar o aparecimento de sintomas em pacientes com deficiência branda de lactase. Para crianças, a dose de lactose ou outros açúcares deve ser de 2 g/kg de peso corporal.

Marcadores genéticos da doença gastrintestinal

O defeito molecular subjacente à fibrose cística resulta em alterações do transporte eletrolítico nas células epiteliais. Trata-se de uma condição autossômica recessiva, determinada por uma mutação no gene *CFTR*, localizado no cromossomo 7. O grau de severidade do defeito depende da natureza da mutação. Diversas mutações foram caracterizadas, as quais estão associadas ao aparecimento da forma mais branda da doença. A clássica mutação Δ-F508 causa fibrose cística quando ambas as cópias do gene mutado são herdadas. Indivíduos heterozigotos para a mutação R117H podem desenvolver insuficiência pancreática. Tais indivíduos podem apresentar pancreatite crônica idiopática (Durie, 2000).

A enzima central, envolvida na ativação de todas as pró-enzimas, é a tripsina. Essa enzima é sintetizada e mantida como tripsinogênio inativo dentro dos grânulos de secreção das células pancreáticas acinares. A tripsina é estabilizada nos ácinos do pâncreas por ação de um inibidor de serina proteases, o SPINK1. Após ser liberado no ducto pancreático, o tripsinogênio é clivado por uma enteroquinase na borda em escova do duodeno, transformando-se em tripsina ativa. Várias mutações que afetam a tripsina e o SPINK1 recentemente ganharam importância na avaliação da pancreatite e do câncer pancreático.

Mutações catiônicas no tripsinogênio (PRSS1) envolvendo os códons 29 e 122 levam ao aparecimento de formas autossômicas dominantes de pancreatite hereditária (Whitcomb, 2000). O número de mutações é limitado, e o tipo de mutação parece alterar a proteína, acarretando a diminuição da capacidade de prevenir a ativação enzimática. Como resultado, ocorre uma série de eventos que leva ao aparecimento de tripsina intra-acinar ativa.

Mutações que afetam a molécula de SPINK1 causam um problema semelhante, uma vez que a forma nativa dessa molécula é responsável pela estabilidade da tripsina. Foram descritas mutações (N34S) que reduzem a capacidade de promover a degradação da tripsina. A maior concentração de tripsina acinar resulta em ativação das pró-enzimas e, consequentemente, em pancreatite.

Pacientes com tais distúrbios tipicamente apresentam pancretite aguda recorrente, às vezes, no período que vai da infância até a

quarta década de vida. Esses indivíduos desenvolvem pancreatite crônica e câncer de pâncreas quando ainda são relativamente jovens. Não há nenhuma terapia específica para prevenção ou tratamento da pancreatite hereditária. Existem testes clínicos disponíveis para detecção dos distúrbios descritos (Etemad, 2001), sendo que o FDA desenvolveu normas para a realização desses testes. A solicitação para realização de testes genéticos requer que o médico saiba claramente interpretar os resultados e prever os efeitos desses resultados na supervisão do paciente.

Embora existam diversos marcadores atualmente sendo avaliados, nenhum deles teve seu uso disseminado até o momento. O Capítulo 74 traz uma discussão mais extensiva acerca dos marcadores tumorais.

Referências bibliográficas

Allison J, Tekawa I, Ransom LJ, et al: A comparison of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. N Engl J Med 2004; 334:155–159.

Avaliação de três testes de triagem comumente utilizados para detecção de sangue oculto nas fezes, em termos de sensibilidade, especificidade e valor preditivo em relação aos achados obtidos por colonoscopia e biópsia.

Ammori BJ, Becker KL, Kite P: Calcitonin precursors in the prediction of severity of acute pancreatitis on the day of admission. Br J Surg 2003; 90(2):197–204

Andersen JM, Hedstrom J, Kemmpainen E, et al: The ratio of trypsin-2-alpha1-antitrypsin to trypsinogen-1 discriminates biliary and alcohol-induced acute pancreatitis. Clin Chem 2001; 47:231–236.

Ashley SW, Evoy D, Daly JM: Stomach. *In* Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, et al: (eds): Principles of Surgery. New York, McGraw Hill, 1999, pp 1195–1196.

Atherton JC, Spiller RC: The urea breath test for *H. pylori* . Gut 1994; 35:723–725.

Baillargeon JD, Orav J, Ramagopal V, et al: Hemoconcentration as an early risk factor for necrotizing pancreatitis. Am J Gastroenterol 1998; 83:2130–2136.

Barr GD, Grehan MJ: Coeliac disease. Med J Aust 1998; 169:109–114.

Buchler MW, Malfertheiner P, Schoetensack C, et al: Sensitivity of antiprotease and complement factors and C reactive protein in detecting pancreatic necrosis. Results of a prospective clinical study. Int J Pancreatol 1986; 1:227–235.

Clinical Guideline: Part 1: Suggested technique for fecal occult blood testing and interpretation in colorectal cancer screening. Ann Intern Med 1997; 126(10):808–810.

Diretrizes que tratam da técnica de triagem utilizando testes de sangue oculto nas fezes, enfatizando a interpretação de resultados positivos e negativos do teste, bem como o subsequente work-up *de indivíduos com resultados positivos.*

Corsetti JP, Cox C, Schulz TJ, Arvan DA: Combined serum amylase and lipase determinations for diagnosis of suspected acute pancreatitis. Clin Chem 1993; 39:2495–2499.

Dahlqvist A: Assay of intestinal disaccharides. Anal Biochem 1968; 22:99–107.

Dieterich W, Laag E, Schopper H, et al: Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterology 1998; 115:1317–1324.

Durie PR: Pancreatic aspects of cystic fibrosis and other inherited causes of pancreatic dysfunction. Med Clin North Am 2000; 84:609–620.

Elman R, Arneson I, Graham EA. Value of blood amylase estimations in the diagnosis of pancreatic diseases. Arch Surgery 1929; 19:943–948.

Etemad B, Whitcomb DC: Chronic pancreatitis. Diagnosis, classification, and new genetic developments. Gastroenterology 2001; 120:682–707.

Farrell RJ, Kelly CP: Diagnosis of celiac sprue. Am J Gastroenterol 2001; 96:3237–3246.

Feldman RA, Deeks JJ, Evans SJW, et al: Multi-laboratory comparison of eight commercially available *Helicobacter pylori* serology kits. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995a; 14:428–433.

Feldman RA, Evans SJW: Accuracy of diagnostic methods used for epidemiological studies of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 1995b; 9(Suppl 2):21–31.

Fernandez R, Vizoso F, Rodriguez JC: Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. Ann Surg Oncol 2000; 7(7):508–514.

Frank B, Gottlieb K: Amylase normal, lipase elevated: is it pancreatitis? A case series and review of the literature. Am J Gastroenterol 1999; 94:463–469.

Fridhandler L, Berk JE: Simplified chromatographic method for isoamylase analysis. Clin Chem Acta 1980; 101:135–138.

Goff JS: Two-stage triolein breath test differentiates pancreatic insufficiency from other causes of malabsorption. Gastroenterology 1982; 83:44–46.

Graham DY: Can therapy ever be denied for *Helicobacter pylori* infection? (editorial). Gastroenterology 1997; 113:S113–S117.

Goetze JP, Rehfeld JF: Impact of assay epitope specificity in gastrinoma diagnosis. Clin Chem 2003; 49(2):333–334.

Guerrant RL, Araujo V, Soares E, et al: Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. J Clin Microbiol 1992; 30:1238–1242.

Guritzky RP, Rudnitsky G: Bloody neonatal diaper. Ann Emerg Med 1996; 27:662–664.

Helm J, Choi J, Sutphen R, et al: Current and evolving strategies for colorectal cancer screening. Cancer Control 2003; 10(3):193–204.

Henderson AR, Tietz NW, Rinker AD. Gastric, pancreatic and intestinal function. *In:* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia, WB Saunders Co., 1994, pp 1576–1644.

Hoffman NE, LaRusso NF, Hoffman AF: An improved method for fecal collection: The field-kit. Lancet 1973; 1:1422.

Jacobsen DG, Currington C, Connery K, Toskes PP: Trypsin like immunoreactivity as a test for pancreatic insufficiency. N Engl J Med 1984; 310:1307–1312.

Jelliffe DB, Jelliffe EFD: Collection of a stool sample. Lancet 1973; 2:618.

Kemppainen EA, Hedstrom JI, Puolakkainen PA, et al: Rapid measurement of urinary trypsinogen-2 as a screening test for acute pancreatitis. N Engl J Med 1997; 336:1788–1793.

Kemppainen E, Hietaranta A, Puolakkainen P, et al: Time course profile of serum trypsinogen-2 and trypsin-2-alpha 1-antitrypsin in patients with acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 2000; 35(11):1216–1220.

Kisker O, Bartsch D, Weinel RJ, et al: The value of somatostatin-receptor scintigraphy in newly diagnosed endocrine gastroenteropancreatic tumors. J Am Coll Surg 1997; 184:487–492.

Klonoff DC: Macroamylasemia and other immunoglobulin-complexes enzyme disorders. West J Med 1980; 133:392–407.

Krasilnikoff PA, Gudman-Hoyer E, Moltke HH: Diagnostic value of disaccharide tolerance tests in children. Acta Paediatr Scand 1975; 64:693–698.

Laheij RJF, Straatman H, Jansen JBMJ, Verbeek ALM: Evaluation of commercially available *Helicobacter pylori* serology kits: A review. J Clin Microbiol 1998; 36:2803–2809.

Lankisch PG: Now that fecal elastase is available in the United States, should clinicians start using it? Curr Gastroenterol Rep 2004; 6:126–131.

Lankisch PG, Koop H, Otto J, et al: Specificity of increased amylase to creatinine clearance ratio in acute pancreatitis. Digestion 1977; 16:160–164.

LeGrys VA, Burnett RW: Current status of sweat testing in North America. Results of the College of American Pathologists Needs Assessment Survey. Arch Pathol Lab Med 1994; 118:865–867.

Le Moine O, Devaster JM, Deviere et al: Trypsin activity. A new marker of acute alcoholic pancreatitis. Dig Dis Sci 1994; 39:2634–2638.

Lerang F, Huag JB, Moum B, et al: Accuracy of IgG serology and other tests in confirming *Helicobacter* eradication. Scand J Gastroenterol 1998; 33:710–715.

Levitt MD, Ellis C: A rapid and simple assay to determine if macroamylase is the cause of hyperamylasemia. Gastroenterology 1982; 83:378–382.

Loser C, Mollgaard A, Folsch UR: Fecal elastase 1: a novel highly sensitive and specific tubeless pancreatic function test. Gut 1996; 39:580–586.

Luth S, Teyssen S, Forssmann K, et al: Fecal elastase-1 determination: 'gold standard' of indirect pancreatic function tests? Scand J Gastroenterol 2001; 36(10):1092–1099.

McRury JM, Barry RC: A modified Apt test: a new look at an old test. Pediatr Emerg Care 1994; 10(3):189–191. Erratum in: Pediatr Emerg Care 1994; 10(4):248.

Makristathis A, Pasching E, Schutze K, et al: Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1998; 36:2772–2774.

Malnick S, Zimhony O: Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Ann Pharmacother 2000; 36:1767–1775.

Marshall JB: Colorectal cancer screening: present strategies and future prospects. Postgrad Med 1996; 99(3):253–264.

Megraud F: Diagnosis and candidates for treatment of *Helicobacter pylori* infection: How should *Helicobacter pylori* be diagnosed? Gastroenterology 1997; 113:S93–S98.

Mifflin TE, Benjamin DC, Bruns DE: Rapid quantitative, specific measurement of pancreatic amylase with the use of a monoclonal antibody. Clin Chem 1985; 31:1283–1288.

Miki K, Morita M, Sasajima M, et al: Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. Am J Gastroenterol 2003; 98(4):735–739.

Murray JA: Serodiagnosis of celiac disease. Clin Lab Med 1997; 17:445–464.

Nehra V: New clinical issues in celiac disease. Gastroenterol Clin North Am 1998; 27:453–465.

Not T, Horvath K, Hill ID, et al: Celiac disease risk in the USA. Scand J Gastroenterol 1998; 494:33–39.

Perry RR, Vinik AI: Endocrine tumors of the gastrintestinal tract. Annu Rev Med 1996; 47:57–68.

Peterson WL: *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N Engl J Med 1991; 324:1043–1048.

Poutanen SM, Simor AE: *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ 2004; 171(1):51–58.

Radebold K: VIPomas. eMedicine, 2003. Online. Available: http://www.emedicine.com.

Ramzan NN, Loftus E Jr, Burgart LJ, et al: Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. Ann Intern Med 1997; 126:520–527.

Romano TJ, Dobbins JW: Evaluation of the patient with suspected malabsorption. Gastroenterol Clin North Am 1989; 18(3):467–483.

Samloff IM: Pepsinogens I and II: Purification from gastric mucosa and radioimmunoassay in serum. Gastroenterology 1982; 82:26–33.

Sanduleanu S, Bruine A, Biemond I, et al: Ratio between serum IL-8 and pepsinogen A/C: a marker for atrophic body gastritis. Eur J Clin Invest 2003; 33(2):147–154.

Sendid B, Quinton JF, Charrier G, et al: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. Am J Gastroenterol 1998; 93:1306–1312.

Shanahan F: Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: are they important. Gastroenterology 1994; 107:586–590.

Simon JB: Fecal occult blood testing: clinical value and limitations. Gastroenterologist 1998; 6(1):66–78.

Singer R: Diagnosis and treatment of Whipple's disease. Drugs 1998; 55:699–704.

Smotkin J, Tenner S: Laboratory diagnostic tests in acute pancreatitis. J Clin Gastroenterol 2002; 34:459–464.

Sokoll LJ, Wians FH, Remaley AT: Rapid intraoperative immunoassay of parathyroid hormone and other hormones: A new paradigm for point-of-care testing.

Clin Chem 2004; 50(7):1126–1135.
Spechler SJ, Dalton JW, Robins AH, et al: Prevalence of normal serum amylase levels in patients with acute alcoholic pancreatitis. Dig Dis Sci 1983; 28:865–875.
Steinberg W, Goldstein SS, Davis ND, et al: Diagnostic assays in acute pancreatitis: a study of sensitivity and specificity. Ann Intern Med 1985; 102:576–580.
Sternby B, O'Brien JF, Zinsmeister AR, DiMagno EP: What is the best biochemical test to diagnose acute pancreatitis? A prospective clinical study. Mayo Clin Proc 1996; 71:1138–1144.
Sugal E, Srur G, Vazquez H, et al: Steatocrit: a reliable semiquantitative method for detection of steatorrhea. J Clin Gastroenterol 1994; 19:206–209.
Tenner SM, Steinberg W: The admission serum lipase/amylase ratio. A new index that distinguishes acute episodes of alcoholic from non-alcoholic pancreatitis. Am J Gastroenterol 1992; 87:755–1761.
Tenner S, Dubner H, Steinberg W: Predicting gallstone pancreatitis with laboratory parameters: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 1994; 89:1863–1866.
Tenner S, Fernandez-del Castillo C, Warshaw A, et al: Urinary trypsinogen activation peptide (TAP) predicts severity in patients with acute pancreatitis. Int J Pancreatol 1997; 21:105–110.
Thiede C, Morgner A, Alpen B, et al: What role does *Helicobacter pylori* eradication play in gastric MALT and gastric MALT lymphoma? Gastroenterology 1997; 113:S61–S64.
Thomas PD, Forbes A, Green J, et al: Guidelines for the investigation of chronic diarrhea, 2nd ed. Gut 2003; 52(Suppl V):v1–v15.
Fornece diretrizes para estabelecer um esquema investigativo ideal destinado a pacientes que apresentem diarreia crônica, com o intuito de maximizar os diagnósticos positivos e ao mesmo tempo minimizar o número e o grau de invasividade das investigações. Também contém sumário/tabelas de recomendações dedicadas a testes não invasivos
Tietz NW, Shuey DF: Lipase in serum: the elusive enzyme: an overview. Clin Chem 1993; 39:746–756.
Trier JS: Diagnosis of celiac sprue. Gastroenterology 1998; 115:211–216.
van de Wouw BAM, de Boer WA, Jansz AR, et al: Comparison of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assays and biopsy-dependent diagnosis for detecting *Helicobacter pylori* infection. J Clin Microbiol 1996; 34:94–97.
Veldhuyzen van Zanten SJ, Sherman PM: *Helicobacter pylori* infection as a cause of gastritis, duodenal ulcer, gastric cancer and nonulcer dyspepsia: A systematic overview. CMAJ 1994; 150:177–185.
Vinik A: Vasoactive intestinal peptide tumor (VIPoma). *In* Vinik A (ed): Diffuse Hormonal Systems and Endocrine Tumor Syndromes, Ch 6. Endotext.com, 2004. Online. Available: http://www.endotext.com.
Volta U, Molinaro N, de Franceschi L, et al: IgA anti-endomyseal antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. Save both money and monkeys. Dig Dis Sci 1995; 40:1902–1908.
von Herbay A, Ditton HJ, Schuhmacher F, Maiwald M: Whipple's disease: Staging and monitoring by cytology and polymerase chain reaction analysis of cerebrospinal fluid. Gastroenterology 1997; 113:434–441.
Wang TC, Dockray GJ: Lessons from genetically engineered animal models. I. Physiological studies with gastrin in transgenic mice. Am J Physiol 1999; 277:G6–G11.
Warshaw AL, Lee KH: Aging changes of pancreatic isoamylases and the appearance of 'old amylase' in the serum of patients with pancreatic pseudocysts. Gastroenterology 1980; 79:1246–1251.
Whitcomb DC: Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis. Med Clin North Am 2000; 84:531–547.
Wotherspoon AC: Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. Annu Rev Med 1998; 49:289–299.
Xia HX, Keane CT, O'Morain CA: Pre-formed urease activity of *Helicobacter pylori* as determined by a variable cell count technique – clinical implications. J Med Microbiol 1994; 40:435–439.
Zaman Z, Van Orshoven A, Marien G, et al: Simultaneous macroamylasemia and macrolipasemia. Clin Chem 1994; 40:939.
Zieve L: Clinical value of determinations of various pancreatic enzymes in serum. Gastroenterology 1964; 46:62–71.

CAPÍTULO 23

Toxicologia e monitoramento de fármacos terapêuticos

Matthew R. Pincus MD PhD, Naif Z. Abraham Jr. MD PhD

Técnicas básicas para detecção de fármacos no soro e na urina 349
Métodos imunoquímicos 349
Ligação de fármacos a anticorpos 350
Técnicas cromatográficas 350
Triagem de drogas de abuso 355
As drogas de abuso 356
Aspectos gerais dos mecanismos de ação 356
Cocaína 358
Opiáceos (morfina, codeína, heroína) 358
Metadona 359
Anfetaminas 359
Benzodiazepínicos 359
Fenilciclidina (PCP) 360
Barbitúricos: sedativos hipnóticos 360
Propoxifeno (Darvon) 360
Metaqualona (Quaalude) 360
Maconha (*Cannabis*) 361
Dietilamida do ácido lisérgico (LSD, lisergida) 361
Monitoramento de fármacos terapêuticos 361
Farmacocinética (Gerson, 1987a, b) 361
Cardiotrópicos 363
Anticonvulsivos 365
Antiasmáticos 368
Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos 370
Imunossupressores (Dancey, 2002; Drosos, 2002; Dunn, 2001; Mueller, 2004; Scott, 2003) 372
Fármacos utilizados no tratamento da depressão maníaca: lítio e antidepressivos tricíclicos 373
Neurolépticos, principais tranquilizantes antipsicóticos 375
Agentes quimioterápicos: metotrexato e busulfan 375
Toxinas e envenenamento agudo 376
Carcinógenos ambientais 376
Cianeto 376
Monóxido de carbono 377
Álcool e glicóis 377
Arsênico 378
Mercúrio 378
Ferro 379
Chumbo 379
Organofosfatos e carbamatos 380
Referências bibliográficas 381

PONTOS-CHAVE

- O número de testes de detecção de fármacos no sangue e em outros líquidos corporais de pacientes sofreu um vasto aumento nos últimos 20 anos.
- A realização de testes para detecção de drogas de abuso e/ou agentes tóxicos em pacientes tornou-se obrigatória tanto nas unidades de atendimento emergencial como na seleção de candidatos a vagas de emprego.
- A maioria dos fármacos pode ser analisada por meio de técnicas imunológicas homogêneas.
- A cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS, *gas chromatography-mass spectroscopy*), que envolve a separação de compostos derivados na fase gasosa e sua detecção a partir das proporções massa/carga e padrões de fragmentação, é considerada o "padrão-ouro" da detecção e quantificação de drogas em líquidos corporais.
- Os mecanismos de ação de muitos fármacos terapêuticos já foram ao menos parcialmente elucidados. Muitos deles (p. ex., fármacos anti-inflamatórios, antiasmáticos e imunossupressores) bloqueiam pontos específicos das vias de transdução de sinal.
- A ingestão de substâncias tóxicas (venenos) causa distúrbios que ameaçam a vida. Entre essas substâncias, incluem-se: cianeto, monóxido de carbono e inúmeros metais, como chumbo, mercúrio, ferro e arsênico. Quando são detectados, os efeitos desses venenos, com frequência, são revertidos.

A toxicologia é o estudo de substâncias introduzidas exogenamente no corpo. Em outros momentos deste livro, os métodos analíticos apresentados se referem à detecção e à quantificação dos níveis dos compostos naturais envolvidos na função normal do organismo. Neste capítulo, em particular, são discutidos os efeitos biológicos e os métodos disponíveis para detecção de compostos químicos exógenos que influenciam profundamente as funções corporais, por vezes de modo deletério, mas também para produzir efeitos terapêuticos.

No decorrer dos anos, à medida em que foi se desenvolvendo, a toxicologia passou a ser dividida em quatro áreas. As duas primeiras são: detecção de drogas de abuso e determinação dos níveis de fármacos terapêuticos administrados a pacientes. Reconheceu-se ainda que certos compostos ambientais de natureza mutagênica e carcinogênica, como os benzopirenos e o acetaminofeno, provocam mutações em sequências críticas do DNA humano, levando ao franco desenvolvimento de câncer. Ante a atual revolução por que passa a biologia molecular, esse campo foi expandido para a detecção de alguns marcadores, como sequências anormais de DNA e presença de proteínas mutantes ou de carcinógenos ligados ao DNA.

Concluindo, os indivíduos se expõem a uma variedade de toxinas (p. ex., monóxido de carbono, cianeto, metais etc.), cuja detecção é vital para que os médicos consigam reverter os efeitos fisiológicos agudos adversos. Neste capítulo, cada uma das divisões da toxicologia é discutida, dando-se especial atenção à detecção de fármacos e toxinas em líquidos corporais.

Técnicas básicas para detecção de fármacos no soro e na urina

As técnicas envolvidas na detecção da presença e/ou quantificação dos níveis de determinadas substâncias – sejam drogas de abuso ou fármacos terapêuticos – são de dois tipos básicos: imunoquímicas e cromatográficas.

Métodos imunoquímicos

Atualmente, grande parte dos testes de detecção de drogas corresponde aos conhecidos imunoensaios homogêneos. O termo "homogêneo" se refere ao fato de tais ensaios serem realizados em uma única etapa (i. e., somente um anticorpo é utilizado no procedimento). Essa tecnologia revolucionou a toxicologia, permitindo realizar análises rápidas dos constituintes do sangue e da urina. A Figura 23.1 ilustra a técnica esquematizada. Nesta seção, são mostrados exemplos de dois tipos de

ensaio. No primeiro, a técnica imunológica mediada (ou multiplicada) por enzima (EMIT, *enzyme-mediated [or multiplied] immunologic technique*), o próprio composto é covalentemente acoplado a uma enzima, como a ALP (Fig. 23.1A-1). Quando o complexo composto-enzima é incubado com um anticorpo (em geral, monoclonal) para o composto, a atividade enzimática diminui de modo acentuado, em decorrência do bloqueio do sítio ativo da enzima pelo anticorpo. Quando um composto exógeno (como no soro) é adicionado ao imunocomplexo (Fig. 23.1A-2), esse complexo compete com o componente composto-enzima pela ligação ao anticorpo. A existência de componentes composto-enzima livres resulta no aumento da atividade enzimática. A elevação da concentração de composto no soro acarreta o aumento da atividade enzimática. Essa metodologia foi extensivamente explorada pela Syva Corporation (uma divisão da Behring Diagnostics Inc., San Jose, CA), sendo aplicada tanto no monitoramento farmacológico terapêutico como na detecção de drogas de abuso. O imunoensaio de fluorescência por polarização (FPIA, *fluorescence polarization immunoassay*) é o segundo tipo de ensaio homogêneo para detecção de drogas e fármacos, conforme mostra a Figura 23.1B. Trata-se de um método particularmente sensível e elegante. Em vez de estar associado a uma enzima, como na Figura 23.1A, o composto está acoplado à molécula de uma sonda por ligação covalente. Se uma molécula fluorescente for excitada com luz polarizada e permanecer em estado estacionário (i. e., ela não "tomba" em uma solução), emitirá luz polarizada como se fosse um fluoróforo. Essa luz emitida exibe a mesma polarização que a luz de excitação. Sendo assim, por exemplo, se uma luz de excitação é polarizada para a esquerda, a luz emitida também será polarizada para a mesma direção. Entretanto, se um fluoróforo tombar livremente em uma solução, a polarização estará perdida. A luz emitida será polarizada tanto para a esquerda como para a direita, igualmente. A ligação do fluoróforo a uma macromolécula como um anticorpo, no entanto, fortalece a polarização. Isso ocorre porque o fluoróforo, acoplado ao anticorpo estacionário, também permanece relativamente estacionário. Nesses ensaios, o composto marcado com sonda é incubado com o anticorpo. A polarização fluorescente desse composto, sem dúvida, é intensa, pois a sonda fluorescente permanece relativamente imobilizada e ligada ao anticorpo que a reconhece (Fig. 23.1B-1). A adição de um composto exógeno, como no soro, à mistura incubada resulta no deslocamento de algumas moléculas de composto marcadas com sonda fluorescente, como ilustrado na Figura 23.1B-2. Essas moléculas deslocadas podem, então, tombar livremente em uma solução. Como consequência, há diminuição da fluorescência polarizada. Essa redução está diretamente associada à concentração do composto no soro.

O ensaio é capaz de detectar concentrações nanomolares de fármacos e drogas, sendo altamente sensível e específico. Tanto a Abbott Laboratories (Chicago, IL), com os analisadores TDX e AXSYM, como a Roche Diagnostic Laboratories (Nutley, NJ), com os analisadores COBAS e INTEGRA, foram pioneiras na exploração dessa técnica mais efetiva no monitoramento de uma ampla variedade de fármacos terapêuticos e também de drogas de abuso.

Ligação de fármacos a anticorpos

Em ambos os métodos homogêneos já discutidos, existe uma relação não linear entre a concentração de composto no soro e a resposta do sistema – ou seja, a cor produzida a partir da reação enzimática (Fig. 23.1A) ou a diminuição da polarização fluorescente (Fig. 23.1B). Essa falta de linearidade da resposta se deve ao fenômeno da ligação (i. e., o composto deve se ligar ao anticorpo antes de ser detectado). Esse fenômeno pode ser expresso através do seguinte equilíbrio:

$$D + D^* - Ab \rightleftharpoons D - Ab + D^* \tag{23.1}$$

Onde D é a concentração de composto no soro, D^* é o composto marcador (i. e., o composto marcado com uma enzima ou sonda fluorescente), e Ab é o anticorpo. A concentração de D^* livre é uma medida de $(D-Ab)$, visto que ambas são equimolares. O valor $(D-Ab)$, por sua vez, está relacionado a D, ou seja, quanto maior a concentração D, mais $(D-Ab)$ é formado. Entretanto, como a concentração de Ab é fixa em um experimento, diante de concentrações de D suficientemente altas, todo o Ab será saturado. Desse modo, em concentrações maiores de D, não há formação de mais $(D-Ab)$. A relação entre D e $(D-Ab)$ é dada pela expressão de Langmuir:

$$r = (D - Ab)/(Ab_0) = nkD/(kD + 1) \tag{23.2}$$

Onde, (Ab_o) é a concentração total de anticorpo, k é a constante de equilíbrio da formação do complexo $(D-Ab)$, n é o número de sítios de ligação de anticorpo por molécula de anticorpo, e D é a concentração de composto livre, conforme anteriormente definido. A equação (23.2) é muito semelhante à equação de Michaelis-Menten discutida no Capítulo 20, exceto por não envolver uma etapa catalítica. Essa equação mostra que a concentração de $(D-Ab)$ não é linear em D, a menos que $kD << 1$. Quando $kD >> 1$ ocorre saturação. Essa equação pode ser linearizada na forma empregada para um gráfico de Scatchard:

$$r/D = kn - kr \tag{23.3}$$

Onde r/D é representado em função de r. Obtidos os resultados de um conjunto de experimentos, traça-se a reta dos quadrados mínimos que melhor se ajusta aos pontos, e os valores de n e k são determinados. Uma vez conhecidos os valores de n e k, o valor de D para qualquer valor medido de r pode ser *diretamente calculado* por meio da equação 23.3.

Quando se emprega a equação 23.3, por vezes é possível encontrar dois problemas: a falta de homogeneidade dos anticorpos (de modo que o gráfico de Scatchard não é linear) e o possível bloqueio dos sítios livres dos anticorpos por moléculas de composto em imunoensaios de fase sólida. O primeiro problema foi resolvido por Rodbard (1971), com a aplicação da referida análise a equilíbrios de ligações múltiplas. Essa análise é comumente utilizada pelos microprocessadores que avaliam as curvas de calibração dos imunoensaios. O segundo problema tem sido estudado por meio de uma abordagem teórica diferente (Pincus, 1981). A equação 23.3 ilustra o princípio básico da conversão dos resultados obtidos no imunoensaio farmacológico em concentrações de composto no soro.

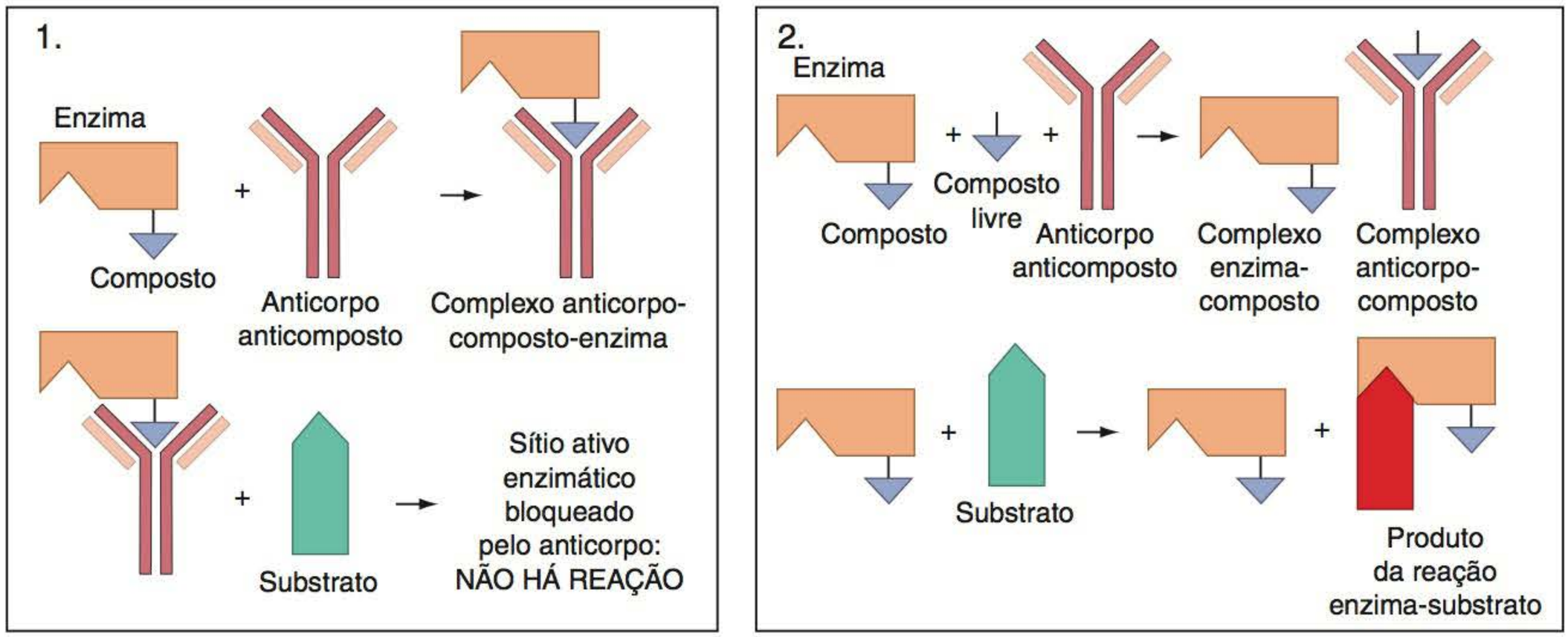
Técnicas cromatográficas

Procedimentos cromatográficos (Engelhardt, 2004: um excelente resumo da história da cromatografia líquida) têm sido aplicados principalmente na detecção qualitativa de drogas de abuso e toxinas e, em menor escala, na determinação dos níveis de fármacos terapêuticos. Os três principais métodos são: cromatografia em camada delgada (TLC, *thin-layer chromatography*), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS). Embora a GC-MS seja considerada o "padrão-ouro" da detecção e quantificação de drogas e venenos voláteis, também foram desenvolvidas novas técnicas analíticas, como eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*) e cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (LC-MS, *liquid chromatography-mass spectroscopy*). Todas essas técnicas serão discutidas na presente seção.

Cromatografia em camada delgada

Diversos compostos podem ser separados por esse método, com base em suas afinidades relativas em relação a uma fase estacionária sólida polar (em geral, de silicato hidratado) e a uma fase móvel líquida apolar (como uma solução de metanol a 10% em clorofórmio). Dependendo dessas afinidades, diferentes compostos adsorvem na superfície de silicato hidratado em posições distintas, à medida em que o solvente apolar migra até a fase estacionária. O princípio do método é ilustrado na Figura 23.2. Para um dado sistema de solventes, a proporção da distância percorrida pelo composto em relação à percorrida pela frente de solvente é dada por uma constante atribuída ao composto. Essa constante pode ser utilizada para identificar o composto na mistura, sendo denominada r_f. Trata-se de uma técnica central na identificação de diferentes drogas de abuso, muitas das quais podem ser isoladas umas dos outras pela TLC. O método atualmente é disponibilizado sob a forma de kits – os kits Toxi-lab (Irvine, CA) –, que fornecem ao usuário tiras discretas de silicato, solventes para extração e soluções que desenvolvem cor.

A. Esquema do EMIT



B. Esquema do FPIA

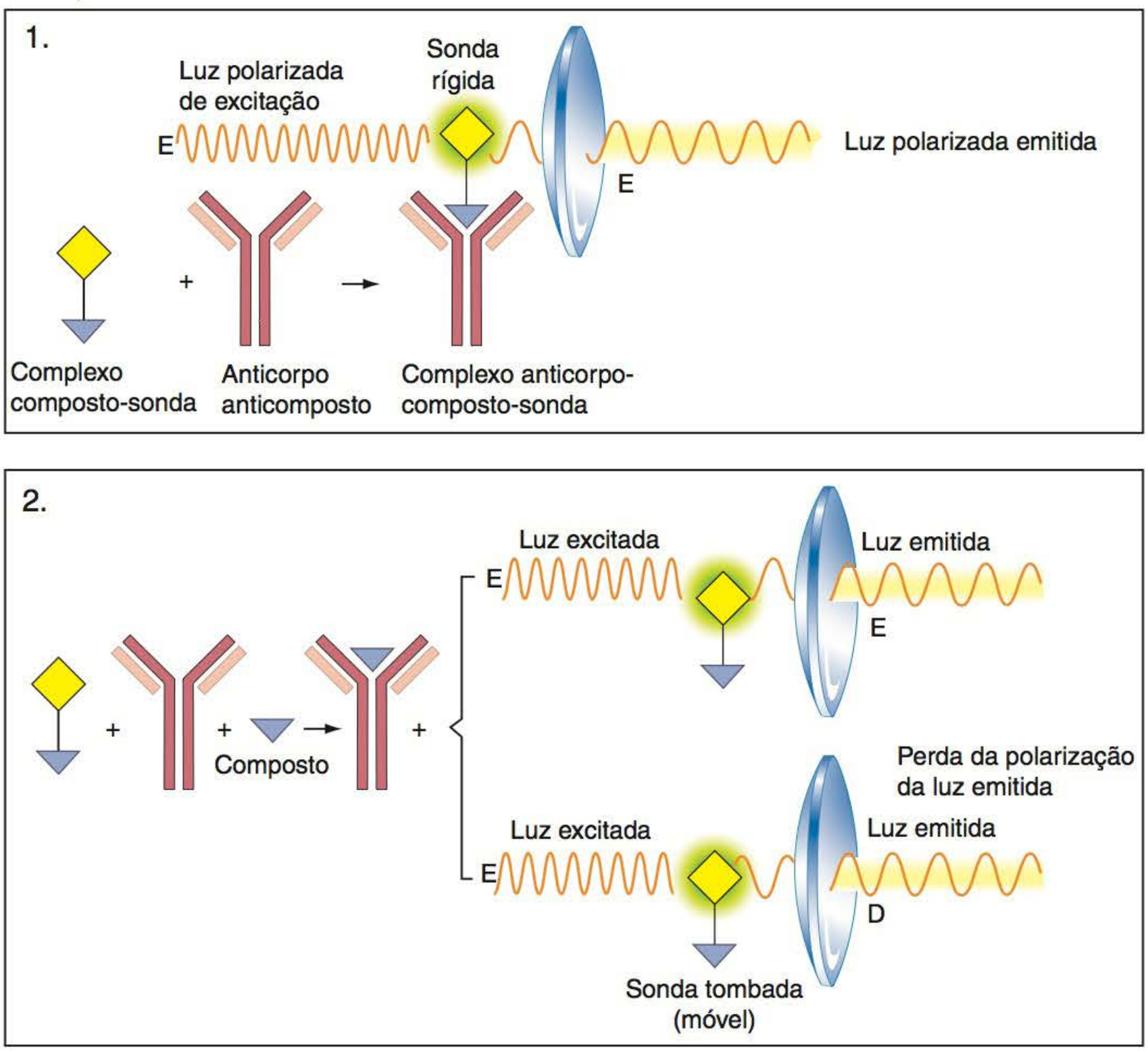


Figura 23.1 Métodos homogêneos para detecção qualitativa ou quantitativa dos níveis de drogas e fármacos em líquidos corporais. A, no método que utiliza a técnica imunológica mediada por enzimas (EMIT), o complexo composto-enzima é utilizado como marcador. Quando ligado ao anticorpo anticomposto, o sítio ativo da enzima (relacionado ao composto) fica bloqueado. Assim, quando o substrato é adicionado, não ocorre nenhuma reação conforme ilustrado na parte 1. Entretanto, quando o composto está livre no meio (como ocorre no soro), alguns ou a maioria dos complexos enzima-composto é deslocada do anticorpo anticomposto. Como os sítios ativos dos complexos enzima-composto liberados ficam livres, o substrato reage conforme indicado na parte 2. B, no método da fluorescência por polarização (FPIA), é empregada a mesma abordagem geral utilizada em A, exceto que nesse método o composto é acoplado a um marcador fluorescente ou fluoróforo. Conforme mostrado no esquema de cima, quando está ligado ao anticorpo anticomposto, o complexo composto-marcador fica imobilizado ("sonda rígida", na ilustração). Ao ser excitado com luz polarizada (na ilustração, polarizada para a esquerda ou "E"), o fluoróforo emite luz também polarizada (na ilustração, para a esquerda). Como se observa no esquema debaixo, ao ser deslocado pelo composto livre (como ocorre no soro ou na urina), o complexo composto-sonda é deslocado do anticorpo anticomposto. Assim, esse complexo deixa de estar imóvel e passa a tombar livremente em solução. Como resultado, perde a polarização da luz emitida ("E" e "D", para polarização à esquerda e à direita, respectivamente), ou seja, a fluorescência por polarização é diminuída.

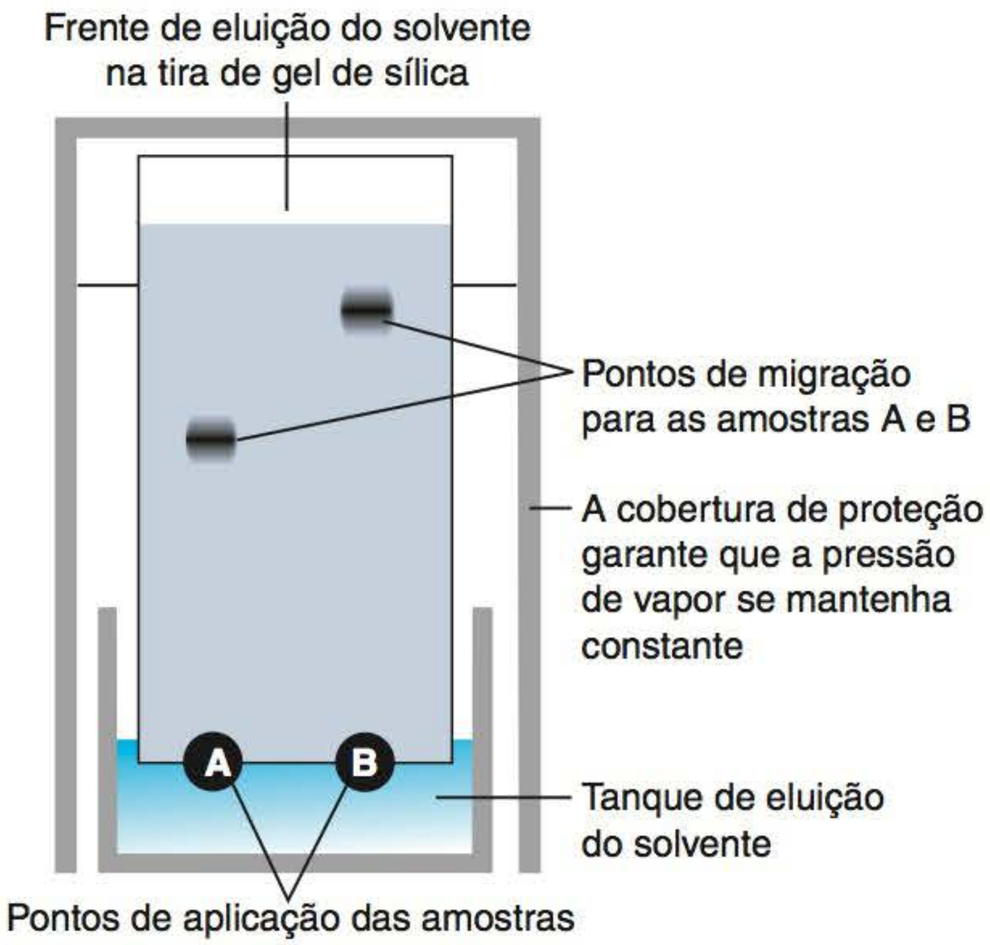


Figura 23.2 Ilustração do princípio da cromatografia em camada delgada (TLC). Dois solutos, A e B, são aplicados a tira de silicato polar. A é mais polar que B e, portanto, possui maior afinidade pela fase estacionária polar que pela fase móvel apolar (usualmente metanol em clorofórmio). Essa afinidade relativa de A também é mais alta que a afinidade de B pela fase polar. Sendo assim, A é separado antes na tira, enquanto B ainda migra um pouco mais.

Procedimentos do kit Toxi-lab

A urina é a melhor amostra para detecção de drogas por cromatografia devido ao grande volume de amostra que pode ser obtido de modo não invasivo. Uma vez coletada, a amostra de urina é submetida a procedimentos de concentração e extração. No processamento para extração, as drogas acídicas são separadas das basídicas. Quase todas as drogas de abuso são básicas (derivadas de aminas), sendo que as importantes drogas "ácidas" compreendem quase exclusivamente os barbitúricos. Em solução aquosa, as drogas básicas apresentam carga elétrica, devido ao equilíbrio da equação 23.4A:

$$R-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons R-NH_3^+ \qquad (23.4A)$$

$$RNH_3^+ OH^- \rightleftharpoons RNH_2 + H_2O \qquad (23.4B)$$

Em que uma amina primária (aminas secundárias e terciárias exibem o mesmo equilíbrio) é representada por RNH_2. A forma de íon amônio (lado direito da equação [23.4A]) é solúvel em água, mas insolúvel em solventes orgânicos apolares. Entretanto, a base livre de aminas (lado esquerdo da equação [23.4A]) é solúvel em solventes orgânicos apolares. Os procedimentos de extração utilizados para isolar drogas básicas têm como objetivo tratar a urina com uma base, de modo que quantidades significativas de drogas básicas apresentem carga neutra como bases isentas de aminas (equação 23.4B). Essa forma, então, pode ser extraída em uma fase orgânica apolar e, em seguida, aplicada à tira de silicato. O processo reverso é empregado para drogas acídicas (i. e., elas são tratadas com ácido e extraídas em solventes apolares). Na prática, um pequeno disco de papel é adicionado à mistura de extração orgânica e o solvente é evaporado, de modo que todas as drogas básicas adsorvam nesse disco de papel. A seguir, o disco é aplicado a uma das extremidades da tira de silicato que é exposta ao solvente apolar em migração. Uma tira à parte (A) é utilizada para drogas básicas, e a tira B, para drogas acídicas. A principal utilidade da tira B consiste na identificação de barbitúricos, conforme será discutido a seguir.

Identificação de drogas específicas

Após a separação das drogas na placa, é necessário identificá-las. Elas, então, são submetidas à reações de cor padrão, separadamente, para cada composto. Nesse procedimento para drogas básicas, a tira é apenas imersa sucessivamente em três solventes diferentes, resultando no aparecimento de padrões de cores característicos para cada droga. A tira também é submetida à luz ultravioleta (UV), que excita a fluorescência em compostos selecionados. Procedimentos similares são empregados para as drogas acídicas extraídas na tira B. Conforme mostra a Figura 23.3, obtida de um livro de referência padrão do Toxi-lab, cada droga pode ser identificada não apenas por seu r_f, mas também por sua cor e alteração de cor característica frente a diferentes reagentes. Tais padrões são reforçados pelas características de fluorescência. Para exemplificar, na planilha de trabalho do Toxi-lab A mostrada na Figura 23.3, observe que a morfina – o principal metabólito da heroína – possui um r_f de 0,14 e uma cor vermelho-escuro ou púrpura característica no primeiro solvente que diminui de intensidade e muda de tonalidade no segundo solvente (água). Não é fluorescente. Se uma ou mais dessas características fugirem a esse padrão, deve haver grande dúvida acerca da identificação da mancha como sendo morfina. Quando todos os critérios são atendidos, a sensibilidade e a especificidade do método se tornam maiores.

Confiabilidade do método

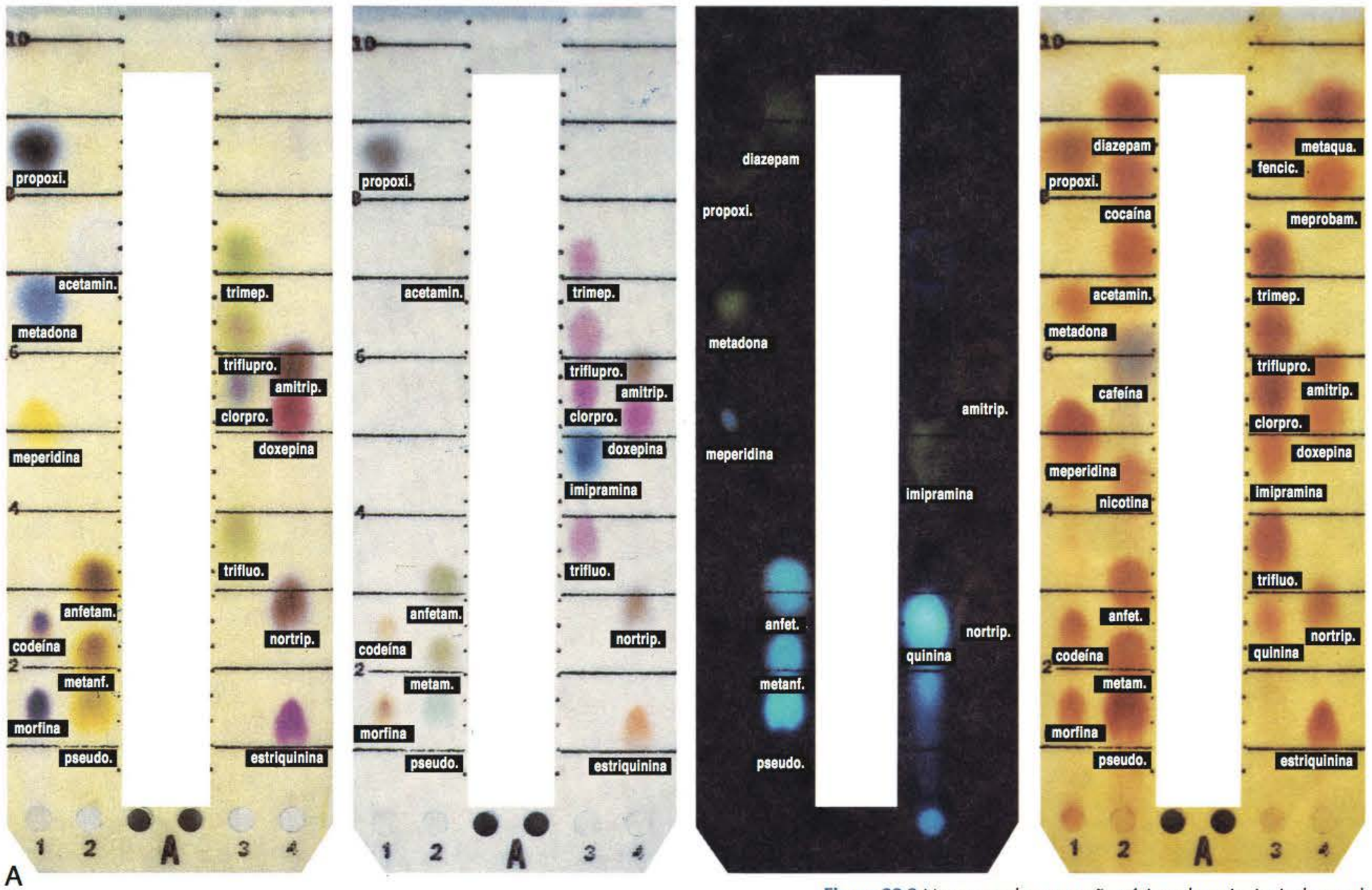
Como a identificação de cada grupo varia de acordo com o uso das alterações qualitativas de cor e/ou da existência de fluorescência, a sensibilidade do método é limitada pela capacidade de detectar tais alterações a olho nu. Praticamente, o nível de detecção é da ordem de 1 μg/mL de composto presente na tira. O valor do método cromatográfico é, sobretudo, confirmatório (i. e., para confirmar resultados positivos de testes de imunoensaio). Muitas vezes, uma única amostra é analisada por ambos os métodos.

Os principais problemas associados a essa metodologia residem na ocasional ineficácia dos procedimentos de extração, que resulta na adsorção de quantidades insuficientes de droga no disco. Do mesmo modo, os procedimentos de extração e evaporação são demorados e requerem cerca de meia hora para serem finalizados. Além disso, a cocaína gera inúmeros metabólitos polares (p. ex., ecgonina), que mal se deslocam de sua origem e por vezes dificultam a detecção dessa droga de abuso, pois ela é completamente convertida em metabólitos polares antes de ser excretada. Também pode haver certo grau de dificuldade para distinguir os vários opiáceos existentes, como na diferenciação entre a morfina e seus opiáceos, uma vez que os valores de r_f dessas drogas podem ser muito próximos entre si (ver a planilha de trabalho do Toxi-lab A na Fig. 23.3). Todavia, uma equipe de funcionários experientes é capaz de fazer essa distinção na maioria dos casos. Da mesma forma, algumas drogas não tóxicas podem produzir alterações de cor e valores de r_f característicos que são similares aos da droga de abuso. Um desses casos é, sem dúvida, o de certos anti-histamínicos que aparecem na tira A e são muito parecidos com as anfetaminas.

Cromatografia líquida de alto desempenho

A TLC permite a detecção qualitativa direta das drogas de modo panorâmico. O HPLC, além de possibilitar a detecção qualitativa das drogas, proporciona uma separação mais fina. No HPLC, a fase estacionária pode ser *tanto* polar (ácido sílico) como apolar (colunas C-18). Na cromatografia de fase reversa, essa fase é composta de partículas uniformes e ultrafinas, que aumentam enormemente a área da superfície de adsorção. Essa fase estacionária é empacotada dentro de uma coluna. Como a resistência ao fluxo é alta na coluna, pressões maiores se tornam necessárias para manter velocidades de fluxo constantes. No equipamento de HPLC da Waters (Waters Corporation, Milford, MA), uma pressão positiva e constante é aplicada à coluna por duas bombas. Essas bombas operam de tal modo que uma delas afasta e a outra empurra (i. e., ambas operam a 180° em relação à fase). O eluato que sai da coluna é monitorado por uma variedade de detectores, que podem ser desde detectores para comprimentos de onda múltiplos na faixa do UV até detectores com eletrodos que medem o potencial redox. Na análise quantitativa por HPLC, é comum incluir um padrão interno – ou seja, um composto estruturalmente semelhante à(s) droga(s) de interesse, que é adicionado à amostra em concentração conhecida para ser analisado. Conhecendo-se a quantidade de composto marcador (ou padrão interno) dentro da coluna e a quantidade recuperada no eluato que a deixa, é possível calcular o percentual de recuperação a partir da coluna para esse composto e, por extrapolação, para todas as drogas de interesse cujas concentrações estão sendo determinadas. Assim, as perdas relativas à coluna (além das que ocorrem nos procedimentos de extração) podem ser corrigidas quando essa técnica é utilizada. O HPLC, em geral, é utilizado na quantificação de

PLANILHA DE TRABALHO TOXI-LAB A



PLANILHA DE TRABALHO TOXI-LAB B

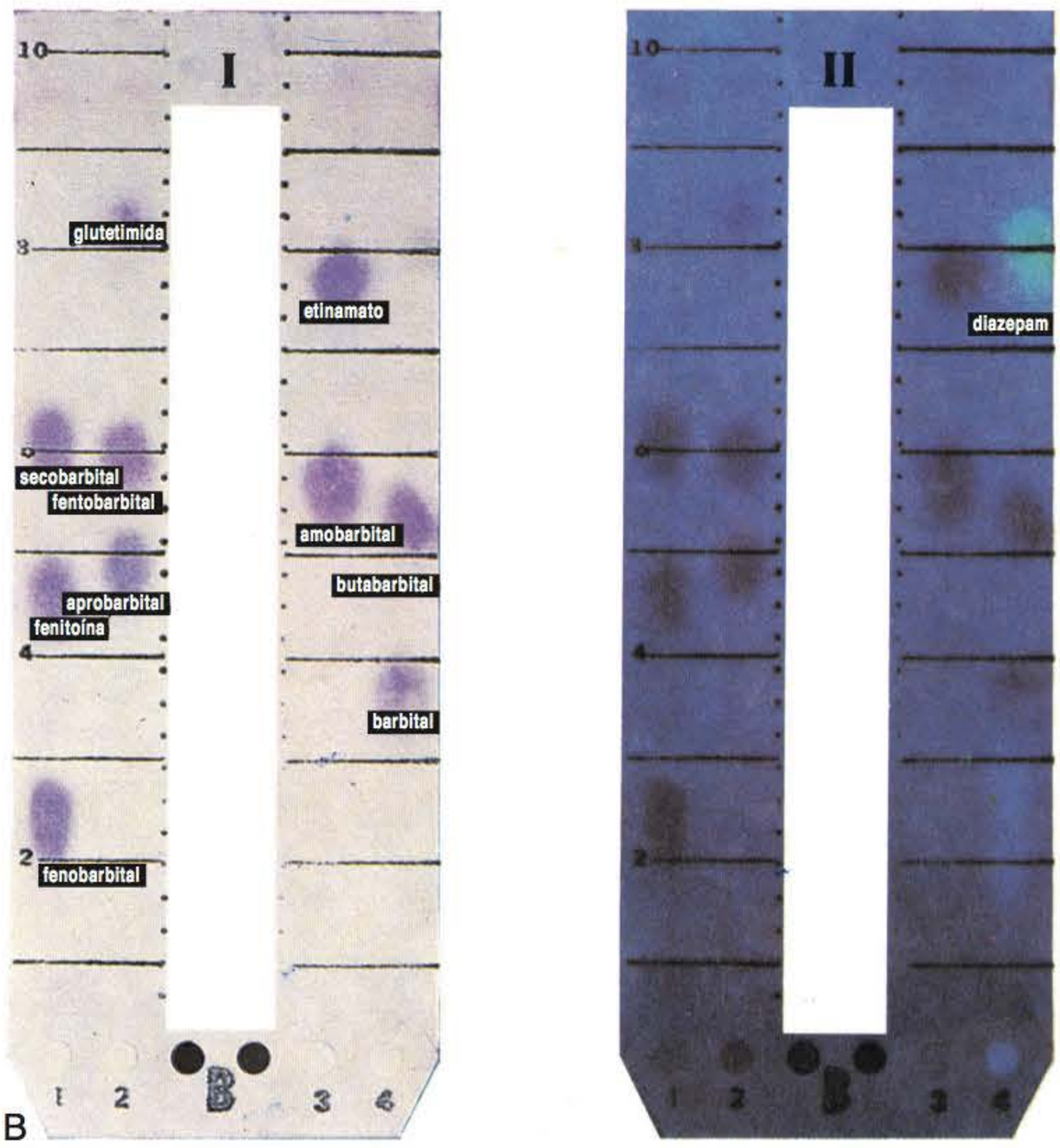


Figura 23.3 Um grupo de separações típicas das principais drogas de abuso (e de alguns fármacos) por cromatografia de camada delgada em *Toxi-lab*. *Planilha de trabalho Toxi-lab A*: separação típica de drogas básicas na tira A com alterações de cor características. A terceira tira *Toxi-lab A* apresenta a fluorescência característica de diferentes drogas. Observe que a anfetamina e a metanfetamina, a porção inferior esquerda, estão ambas fluorescentes. *Planilha de trabalho Toxi-lab B*: esquerda – separação de drogas mais acídicas na tira B, com alterações de cor características. O principal uso da tira B consiste na identificação da presença de barbitúricos; direita – padrões de fluorescência das drogas presentes na tira B.

fármacos terapêuticos específicos, mas também tem sido empregado na detecção de cocaína e heroína em amostras de urina. A sensibilidade do método é da ordem de nano- a micromolares.

Um dos maiores usos do HPLC se dá na separação e quantificação dos antidepressivos tricíclicos e seus metabólitos. Tais fármacos estão entre os mais prescritos e também são utilizados como drogas de abuso, em concentrações excessivas, por indivíduos que tentam o suicídio. Muitas vezes é necessário determinar os níveis não só do antidepressivo tricíclico original como também de seus metabólitos ativos e inativos. Estes, por sua vez, são revisados adiante. A Figura 23.4 mostra uma típica separação em coluna de silicato. O padrão interno adotado foi a protriptilina, um composto tricíclico inativo. Fica claro que a separação entre os metabólitos e os compostos primários é bastante fina. Essa separação é completamente reproduzível. Uma recente variação da TLC, que inclui as vantagens do HPLC, é a eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*) (Tagliaro, 1998; Shihabi, 1993). Nesse método, um tubo capilar revestido com silicato, cujas dimensões são 10 a 100 μm de diâmetro interno e 100 a 1.000 mm de comprimento, é empregado como suporte sólido em um aparato de eletroforese. A força que determina a separação é a voltagem (da ordem de 25 kV), em vez da pressão utilizada no sistema de HPLC. Devido à vasta área de superfície, as separações são bastante refinadas. O sistema é altamente versátil e pode ser utilizado para separar proteínas e pequenas moléculas existentes no soro. A CE dispõe de um amplo espectro analítico (incluindo biopolímeros, pesticidas, compostos aromáticos, fármacos, íons inorgânicos etc.), graças à sua alta versatilidade em termos de modos de separação. A seletividade para diferentes analitos baseia-se em princípios físico-químicos de separação também diferentes, com a vantagem de não requerer alterações de *hardware* instrumental – uma característica distintiva do método. A eletroforese de zona capilar, cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECK, *micellar electrokinetic capillary chromatography*), isotacoforese capilar, focalização isoelétrica, eletrocromatografia capilar e eletroforese capilar em gel são modos alternativos utilizados nas separações por CE. Exemplificando, a adição de um detergente ao sistema tampão, como na MECK, provoca formação de micelas. Um composto neutro (p. ex., pesticida) sofrerá partição no detergente e formará micelas, sendo que o complexo irá se separar com base na mobilidade/carga das micelas formadas. Adicionalmente, estão sendo desenvolvidas novas plataformas, como a CE à base de chip e a CE por imunoafinidade. A CE ainda teve seu uso amplamente disseminado na toxicologia clínica, ao contrário das técnicas de imunoensaio (já discutidas), porém é comumente empregada em estudos toxicológicos de análises forenses, bem como nos de diagnóstico molecular, e futuramente poderá exercer efeito significativo na medicina laboratorial clínica (consulte as referências Petersen, 2003 e Boone, 2003).

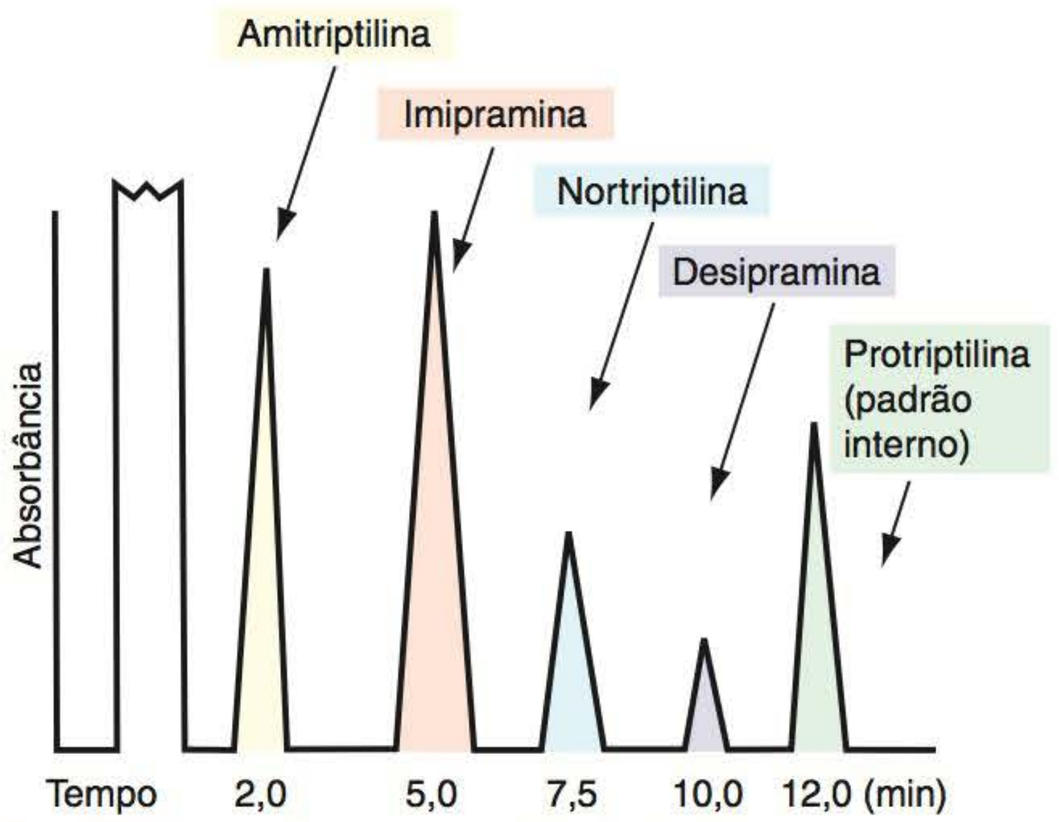


Figura 23.4 Esquema de uma separação típica dos principais agentes antidepressivos tricíclicos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Uma separação completa pode ser concluída em 12 minutos. A concentração de cada droga é da ordem de 100 μg/mL.

Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa

O teste para drogas de abuso é uma das áreas do laboratório clínico que tem se desenvolvido mais rapidamente, devido ao uso amplo e crescente de tais substâncias nos grandes segmentos da população de trabalhadores. Em vista à demanda cada vez maior por triagens de drogas, tornou-se necessário estabelecer um padrão-ouro para as técnicas, que pudesse ser utilizado na confirmação dos resultados obtidos com os métodos de triagem, como EMIT e TLC.

Foi comprovado que a GC-MS deveria ser esse padrão-ouro, por seu alto grau de sensibilidade e confiabilidade. Essa metodologia – como o próprio nome indica – envolve duas técnicas: cromatografia líquida-gasosa e espectroscopia de massa. Na primeira delas, os compostos são aquecidos diretamente na fase gasosa ou derivatizados para se tornarem lábeis e, assim, serem mais facilmente aquecidos na fase gasosa. Em seguida, são passados em uma coluna que contém a fase estacionária – muitas vezes, um líquido, usualmente hidrocarboneto ou óleo de silicone, que cobre um suporte sólido dentro da coluna e oferece uma vasta área de superfície para adsorção. A separação se baseia, como ocorre em grande parte na TLC, na capacidade de cada composto de adsorver na fase estacionária. Essa capacidade depende das solubilidades relativas dos compostos na fase gasosa *versus* na fase líquida. Como já discutido, os compostos que eluem da coluna, normalmente, podem ser detectados por meio de técnicas convencionais, exceto aqueles que permanecem na fase gasosa, onde são aquecidos. É possível tirar proveito de mais uma característica desse sistema: a capacidade dos compostos perderem ou ganharem elétrons quando aquecidos.

Em temperaturas elevadas, os elétrons mais energizados de um composto (i. e., aqueles com menor potencial de ionização) podem ser excitados de tal modo que a molécula pode perder elétrons e se tornar carregada. Esse processo pode ser auxiliado por técnicas como o bombardeamento de elétrons em uma câmara especialmente projetada, que cria diretamente moléculas-íons. A maioria dessas moléculas-íons são cátions únicos. Em geral, diferentes moléculas-íons apresentam tamanhos e pesos moleculares distintos. Elas se decompõem em fragmentos característicos, cujas proporções relativas e posições de migração relativas entre si são também constantes. As moléculas-íons, então, são submetidas à passagem por um campo elétrico gerado por quatro hastes que são rapidamente percorridas por correntes alternadas – o conhecido detector quadripolo. Dependendo do modo como o campo é "acionado", certas moléculas-íons com proporções massa/carga específicas podem atravessá-lo e passar pelo detector. Dessa forma, é possível separar as moléculas-íons com base no peso molecular ou, mais exatamente, de acordo com suas proporções de massa/carga. O esquema geral de um projeto de GC-MS é mostrado na Figura 23.5.

A presença da molécula-íon na placa é detectada por um sistema detector multiplicador de carga. A GC-MS se transformou em uma técnica altamente refinada. Cada molécula-íon criada na fase gasosa pode sofrer mais alterações, tais como reações de eliminação e rearranjos, além de ser degradada a fragmentos pequenos que, por sua vez, são ionizados e conferem os padrões de decomposição característicos. Os padrões de milhares de compostos já foram determinados. A posição da molécula-íon original do composto e os fragmentos de decomposição criam um padrão único de "impressão digital" para o composto. Tais padrões são armazenados em computador, para serem comparados com padrões de compostos ou de grupos de compostos desconhecidos que possam vir a ser obtidos. Essa comparação permite identificar o(s) composto(s) de interesse. O uso da metodologia como um todo foi muito bem-sucedido na detecção de níveis ainda mais baixos de cocaína e/ou seus metabólitos em amostras de líquidos corporais. Um padrão típico de cocaína é mostrado na Figura 23.6. Como as amostras de molécula-íon isoladas geram correntes significativas no detector, é possível detectar níveis de drogas muito baixos. Essa característica faz da técnica o método de referência definitivo e o melhor procedimento de teste de confirmação disponível na atualidade.

Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (Marquet, 2002; Maurer, 1998; Niessen, 1995, 2003)

Como discutido anteriormente, a GC-MS é considerada o padrão-ouro para identificação de compostos voláteis. Por outro lado, os compostos não voláteis podem ser detectados por LC-MS. Diferente

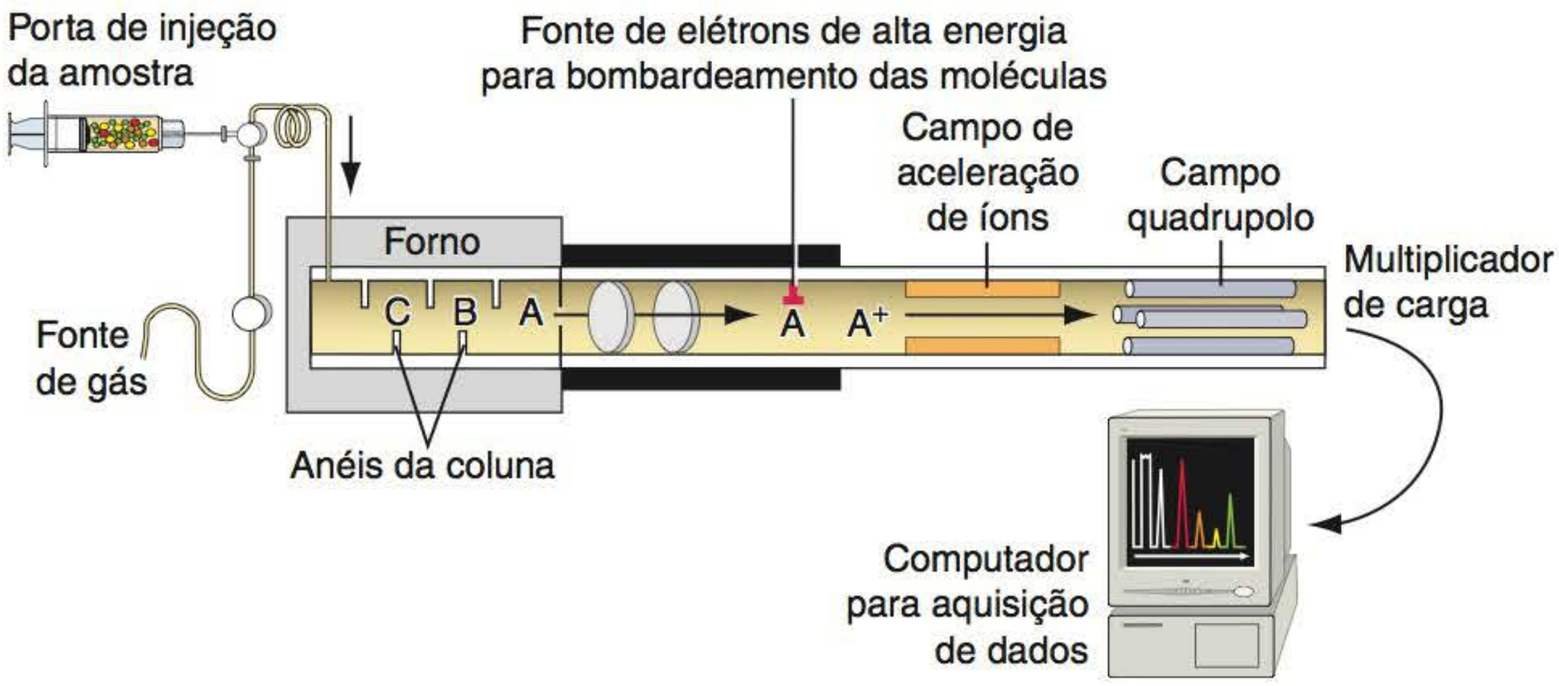


Figura 23.5 Visão esquemática dos componentes de um equipamento de cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS). À esquerda da ilustração, está o sistema de cromatografia gasosa no qual um composto volatilizado se move através de um gás inerte, ao longo de uma coluna constituída de anéis recobertos com líquido. Os compostos C, B e A são separados nessa coluna e mantidos na fase gasosa graças ao forno que circunda a coluna. Os compostos separados, em seguida, entram no espectrômetro de massa (à direita da ilustração), onde são submetidos ao bombardeamento de elétrons. Como resultado, são formadas espécies de moléculas iônicas. Essas espécies iônicas são, então, aceleradas em um campo e atravessam um campo elétrico quadrupolo. Somente os íons com faixas estreitas de proporções massa/carga (proporções m/c) passam pelo campo ajustado e atingem o detector. As correntes elétricas resultantes são digitalizadas e armazenadas num computador que analisa os dados (ver Davis, 1989).

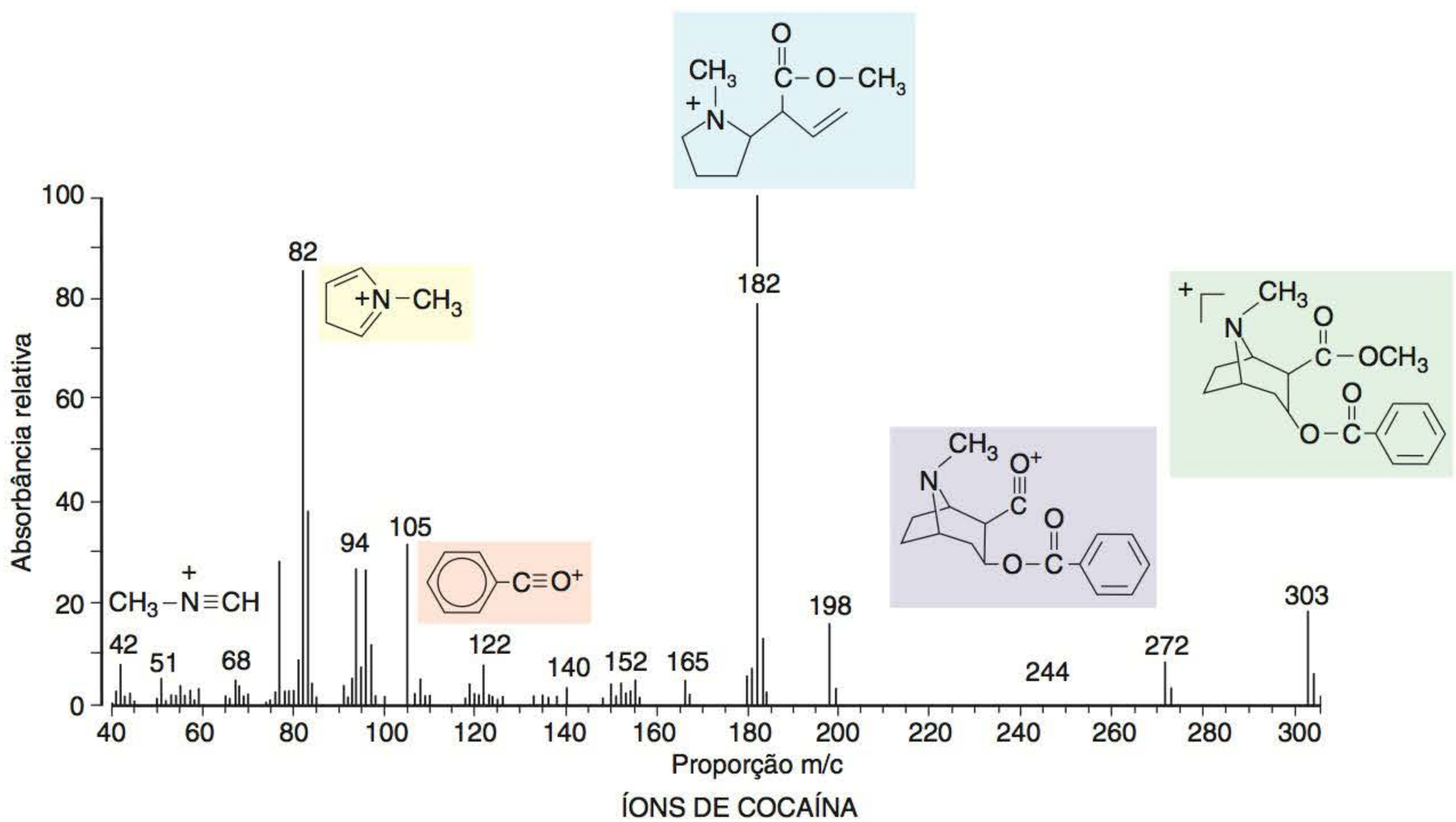


Figura 23.6 Fragmentograma para cocaína utilizando cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS). A amostra analisada é urina. Essa ilustração mostra os picos característicos dos metabólitos da cocaína. (Cortesia do Dr. Chip Walls, Onondaga County, NY, Medical Examiners Office.)

da GC-MS, contudo, o acoplamento da LC à MS requer interfaces sofisticadas entre os dois componentes. Essa interface precisa volatilizar os compostos não voláteis que foram separados na LC, remover o solvente líquido da LC e corrigir a incompatibilidade de velocidade de fluxo existente entre a LC e a MS. Recentemente, dois métodos utilizados na interface – *electrospray* (ES) e ionização química da pressão atmosférica (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) – parecem ter se tornado padrões-ouro da LC-MS. Ambos os métodos de interface são utilizados com dispositivos de ionização da pressão atmosférica para facilitar a remoção da fase móvel. São primariamente diferentes quanto à gama de analitos que podem ser acomodados e ao modo como a fase do solvente é nebulizada.

Enquanto analitos ionizáveis de alto peso molecular e/ou alta polaridade podem ser acomodados por ES, a APCI pode ser utilizada em analitos de polaridade inferior e peso molecular menor. Atualmente, a ES parece ter mais aplicações clínicas e forenses na toxicologia do que a APCI. A LC-MS pode ser empregada na confirmação de resultados positivos obtidos em testes de triagem, sendo utilizada para confirmar análises para drogas de abuso, detecção de envenenamento em casos de intoxicação aguda ou crônica, identificação e quantificação de fármacos terapêutico, bem como em estudos de farmacocinética e metabolismo farmacológico. Embora a LC-MS apresente algumas limitações, quando comparada à GC-MS, é uma técnica que se tornou poderosa – "amadurecida e validada" (Marquet, 2002) – na toxicologia analítica, e também um método complementar para a própria GC-MS.

Triagem de drogas de abuso

Na maioria dos estados americanos, dois níveis de testes para drogas de abuso se tornaram conhecidos: os testes realizados na unidade de atendimento emergencial e os testes forenses/triagem para contratação de funcionários. Os primeiros envolvem métodos de triagem rápidos e imediatos: em particular, EMIT (ou FPIA) e TLC. O propósito desse tipo de teste de triagem é detectar a presença de uma ou várias drogas de abuso na urina coletada do paciente. Para tanto, raramente são utilizados procedimentos cromatográficos mais sofisticados, como HPLC e GC-MS.

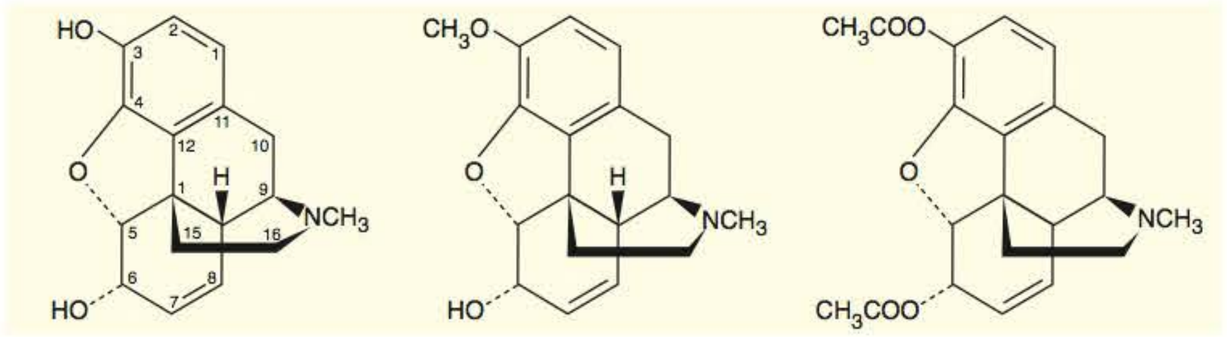
Os testes forenses, por outro lado, requerem não só uma triagem, mas também a realização de um método confirmatório independente, quase sempre GC-MS ou, com menor frequência, HPLC. É preciso notar que, em termos estritamente legais, qualquer método confirmatório é considerado válido, desde que seja 100% diferente do método primário. Assim, uma TLC pode confirmar um resultado obtido por EMIT, mas este não pode ser confirmado por um FPIA, uma vez que tanto EMIT como FPIA são métodos imunoquímicos. Outra consideração importante do ponto de vista legal, com relação aos testes forenses, é a chamada cadeia de custódia (Poklis, 2001; DeCresce, 1989). Esse processo é utilizado na coleta de urina de indivíduos dos quais as amostras devem ser obtidas. Pode começar pela observação da coleta da amostra por alguém e, em seguida, esse mesmo indivíduo ou outro que tenha sido especialmente designado – usualmente um policial (quando se trata de prisioneiros ou suspeitos) ou outro oficial – acompanha o mensageiro que leva a amostra coletada para o laboratório. Esse indivíduo é considerado uma testemunha associada ao teste (e deve assinar um documento legal para esse efeito) da amostra de urina coletada, especificamente. Mais de uma pessoa pode ser implicada como testemunha nessa cadeia.

As drogas de abuso (Goldfrank, 2002; Sweetman, 2002)

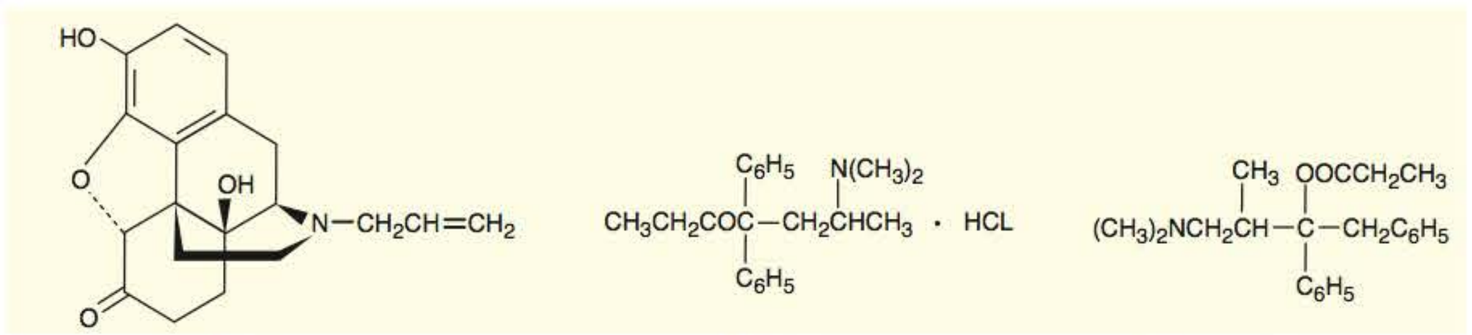
Aspectos gerais dos mecanismos de ação

As principais drogas de abuso são mostradas na Figura 23.7. Como pode ser notado na ilustração, todas essas drogas (exceto os barbitúricos) são compostos que contêm grupos amino básicos com anéis benzênicos. No que se refere aos anéis benzênicos aromáticos, a relação estérica do grupo amino é bastante semelhante em especial na cocaína, opiáceos e metadona. Como é de se esperar, tais compostos podem apresentar reação cruzada com os receptores uns dos outros.

1. OPIÁCEOS

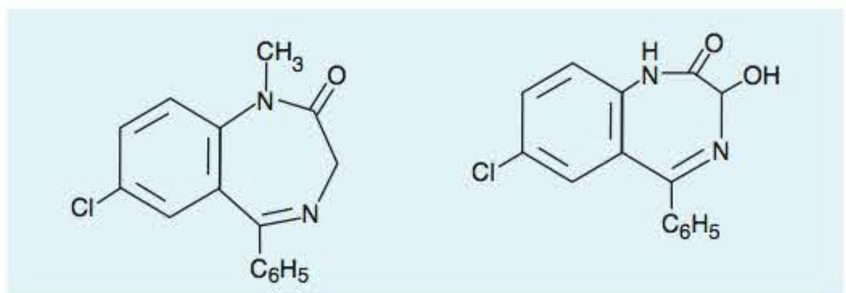


Morfina | Codeína | Heroína



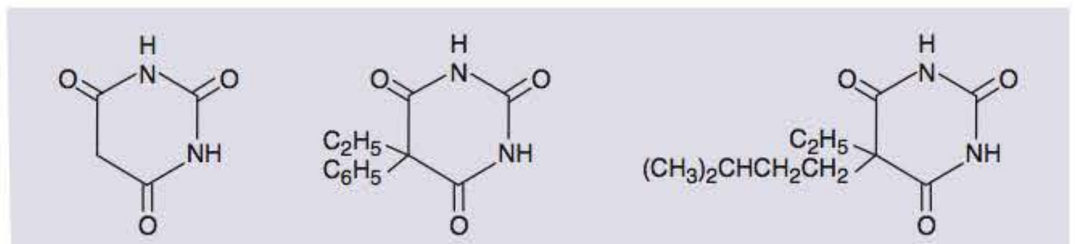
Naloxona (Narcan) | Metadona | Propoxifeno (Darvon)

2. TRANQUILIZANTES

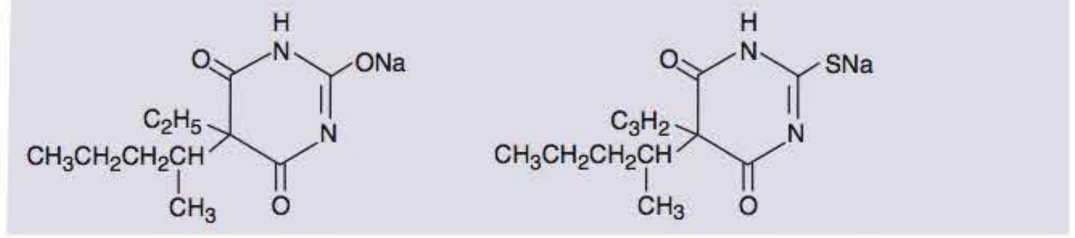


Diazepam (Valium) | Oxazepam

3. BARBITÚRICOS; SEDATIVO-HIPNÓTICOS



Ácido barbitúrico | Fenobarbital (ação prolongada) | Amobarbital (ação intermediária)



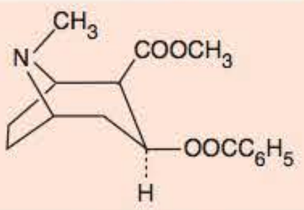
Pentobarbital (ação de curta duração) | Tiopental (ação de duração ultra curta)

Figura 23.7 Estruturas químicas das principais drogas de abuso. Todos os opiáceos são vistos no grupo dos compostos básicos – os que são aminas terciárias e os que contêm anéis benzênicos. Observe que, na série dos barbitúricos, o ácido barbitúrico pode ser considerado um produto da condensação da ureia e do ácido malônico.

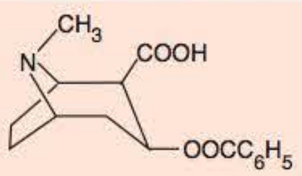
Os mecanismos de ação fisiológicos primários dessas drogas são desconhecidos, porém alguns conhecimentos rudimentares foram adquiridos ao longo dos anos. Atualmente, sabe-se, por exemplo, quais são os principais alvos dessas drogas. Muitas atuam diretamente nos sistemas dopaminérgicos de neurotransmissão, em especial no sistema límbico (às vezes, referido como rinencéfalo ou cérebro do olfato). Esse sistema é mais primitivo e está associado à busca pelo prazer. Na Figura 23.8, são mostrados os possíveis efeitos de várias das drogas mais importantes sobre esse sistema. Parece que as anfetaminas – cuja estrutura é muito parecida com a da dopamina e a das catecolaminas – atuam diretamente como neurotransmissor em sinapses críticas *e também* podem provocar liberação de dopamina a partir das

Figura 23.7 (*continuação*)

4. ESTIMULANTES DA VIA DOPAMINÉRGICA

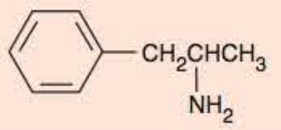


Cocaína

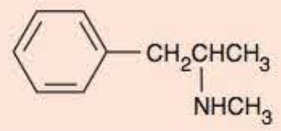


Benzoilecgonina
(metabólito menos ativo)

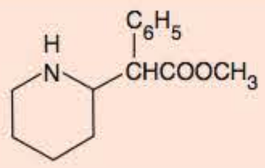
ANFETAMINAS



Anfetamina

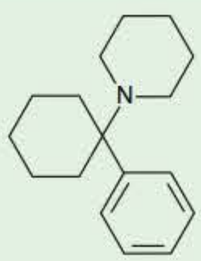


Metanfetamina

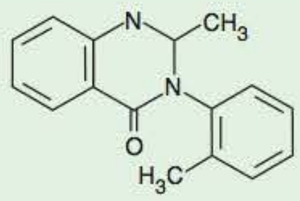


Metilfenidato
(Ritalina – utilizado
no tratamento de
crianças hiperativas)

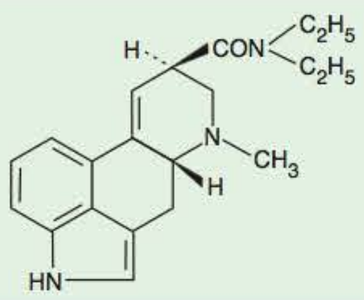
5. ALUCINÓGENOS



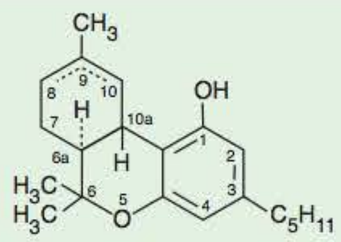
Fenciclidina



Metaqualona



Dietilamina do
ácido lisérgico
(LSD)



Tetra-hidrocanabinol

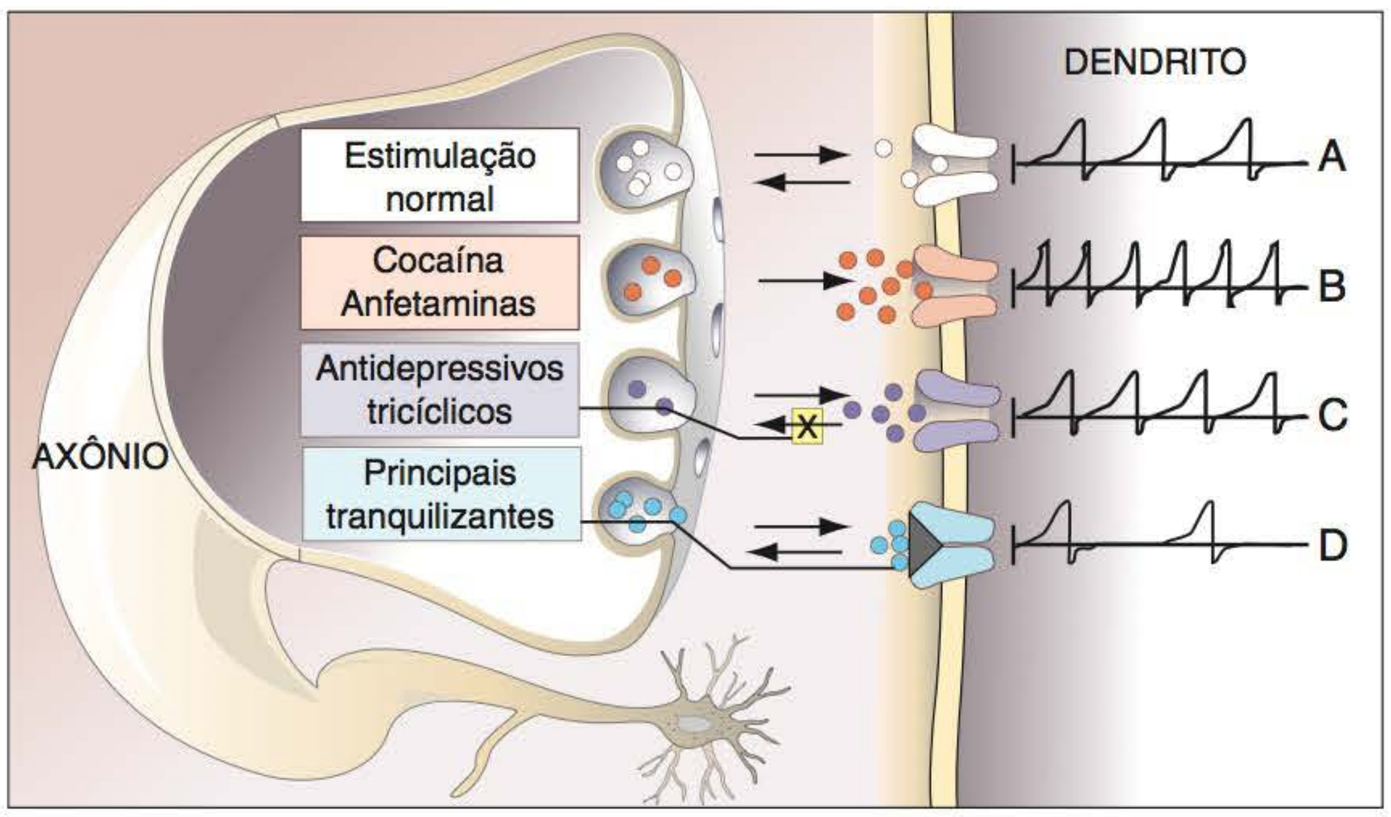


Figura 23.8 Ilustração dos possíveis mecanismos de ação de drogas de abuso e de alguns fármacos nas vias dopaminérgicas. *A*, transmissão neural normal. Um impulso nervoso é conduzido ao longo do axônio até os botões terminais, na terminação nervosa. As vesículas representadas por círculos cinza liberam seus conteúdos de neurotransmissor – no caso, a dopamina, representada por pequenos círculos brancos. As moléculas de dopamina atravessam a fenda sináptica e se ligam aos receptores dendríticos, iniciando os potenciais de ação (representados à direita da ilustração, abaixo de "dendrito") nos dendritos. Repare que as setas mostram a dopamina sendo tanto liberada como captada pelas vesículas. *B*, na presença de cocaína e anfetaminas, ocorre intensificação da liberação de neurotransmissores das vesículas (círculos vermelhos), com aumento da frequência de disparos nos dendritos. As anfetaminas também podem atuar diretamente como neurotransmissores. *C*, os antidepressivos tricíclicos bloqueiam (seta com "X" no quadrado amarelo) a recaptação do neurotransmissor (círculos de cor púrpura), fazendo que mais dopamina "recircule" para os receptores dendríticos, resultando em aumento dos disparos. *D*, alguns neurolépticos atuam bloqueando (cunha em cinza) os receptores dendríticos pós-sinápticos para dopamina (círculos azuis), diminuindo os disparos.

vesículas contidas no lado axonal da sinapse. A cocaína, além disso, parece estimular a liberação de dopamina nesse sistema e essa ação pode ser parcialmente responsável por seu efeito gerador de sensação de prazer ("estar alto") em muitos indivíduos (Hurd, 1988). Os antidepressivos tricíclicos também estimulam as vias dopaminérgicas, com uma única diferença: em vez de promoverem a liberação de neurotransmissores, bloqueiam a recaptação da dopamina nas vesículas contidas nos axônios sinápticos. É muito interessante saber que, paradoxalmente, o uso dos antidepressivos tricíclicos (p. ex., imipramina [Tofranil]) tem sido bem-sucedido no tratamento dos efeitos da cocaína. Os principais agentes tranquilizantes, como o haloperidol (Haldol) e a clorpromazida, parecem bloquear a ligação da dopamina nos receptores dendríticos localizados nas sinapses e, assim, inibem os efeitos estimulatórios da dopamina. Associados a muitos neurônios dopaminérgicos, existem neurônios inibitórios, cujo principal neurotransmissor é o ácido γ-aminobutírico (GABA). Acredita-se que existam muitos receptores benzodiazepínicos em tais neurônios, que promovem a liberação de GABA nas sinapses desse sistema, acarretando a redução dos efeitos dopaminérgicos das vias estimulatórias existentes no sistema límbico. Esse mecanismo pode explicar alguns dos efeitos tranquilizantes promovidos pelo diazepam (Valium) e outros benzodiazepínicos. Amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), há uma variedade de receptores opioides classificados principalmente como κ-, Δ-, μ- (os três tipos clássicos de receptores opioides) e ε- (ainda pouco caracterizado; ver nas referências Tseng, 2001; Snyder, 2003). Os receptores μ parecem ser altamente específicos para morfina e heroína – ambas produtoras de um estado geral de analgesia. Nenhuma relação direta entre esses receptores e as vias dopaminérgicas foi constatada até o momento. É interessante notar que o peptídeo opiáceo naturalmente produzido – a metaencefalina –, cuja sequência de aminoácidos é Tir-Gli-Gli-Fe-Met, apresenta significativa reação cruzada com receptores μ, embora seu "alvo" primário seja os receptores ε. Foi demonstrado que o Valium pode ser estruturalmente relacionado à encefalina e esta, por sua vez, pode ser estruturalmente relacionada à morfina (Pincus, 1987; Murphy, 1992). Portanto, é possível que esses compostos promovam efeitos semelhantes, ao menos de forma indireta, sobre as vias dopaminérgicas.

Cocaína

A cocaína é derivada da planta da coca e se tornou bastante popular como aditivo em certos alimentos. No início do século XX, passou a ser empregada na Coca-Cola, mas essa prática foi descontinuada devido aos seus efeitos aditivos. A cocaína é um derivado do alcaloide ecgonina (i. e., um metil éster da benzoilecgonina), conforme mostra a Figura 23.7. Infelizmente, o uso da cocaína foi retomado de um modo particularmente perverso nos dias atuais. Os Estados Unidos passam por uma verdadeira epidemia de uso abusivo e vício em cocaína. Estima-se que existam pelo menos 5 milhões de viciados nesse país, sendo relatado um total de 30 milhões de usuários da droga (Hollander, 2002; DeCresce, 1989). As fatalidades decorrentes do uso abusivo de cocaína são atualmente a principal causa de morte nos EUA. Tais fatalidades são de dois tipos: toxicidade direta causada pela droga (Johanson, 1989) e crimes associados à sua aquisição ilícita. A via normal de administração da cocaína é a nasal (i. e., por inalação – a conhecida "cheirada"), de modo que a droga atravessa as membranas nasais. A forma prevalente da cocaína na atualidade – o "crack" – é uma base livre que transpõe rapidamente as membranas nasais e, por esse motivo, apresenta alta potência (i. e., uma dose inteira ou a maior parte dela consegue atingir a circulação sanguínea com muita rapidez). Sua meia-vida é de 1-2 horas. O composto original e seus metabólitos usualmente são depurados do corpo em 2 dias.

O uso médico da cocaína é como anestésico local para cirurgias nasofaríngeas. Entretanto, quando em doses maiores, induz um estado eufórico e pode provocar alucinações e comportamento violento (Goldfrank, 2002). Muitas dessas ações podem ser explicadas pelos efeitos dopaminérgicos da cocaína. Um estudo (Azmitia, 1990) sugeriu que a cocaína induz aumento do influxo de cálcio em neurônios dopaminérgicos. O aumento da concentração intracelular de cálcio ativa fosfolipases, que podem atuar como segundos mensageiros e provocar a liberação final da dopamina nas sinapses. A ação prolongada dessas fosfolipases, contudo, resulta em morte celular. No estudo mencionado, a cocaína mostrou-se neurotóxica. Essa droga também exerce um efeito citotóxico geral decorrente da formação de radicais livres N-óxidos, que são produzidos durante a metabolização do composto no fígado. Conclui-se, portanto, que a cocaína parece induzir perda neuronal ao longo do tempo. Além disso, a ligação da cocaína a receptores celulares existentes no sistema límbico induz a síntese de cAMP que, por sua vez, é crítico aos processos de ativação celular envolvidos na liberação de dopamina (Cami, 2003).

Alguns estudos (Lange, 1989, 2001; Frishman, 2003) indicaram, ainda, que o uso prolongado da cocaína resulta em cardiocitotoxicidade – ou seja, a droga é capaz de causar aterosclerose progressiva e constrição das artérias coronárias que, então, provocam isquemia miocárdica e por vezes infarto. A patogênese da doença arterial coronariana induzida pela cocaína continua desconhecida. Um aspecto altamente perturbador do uso abusivo dessa droga reside em sua capacidade de atravessar a placenta com rapidez e, do mesmo modo, a glândula mamária em lactação, podendo ser prontamente transmitida da mãe para o bebê em fase de amamentação. No cenário hospitalar, muitas vezes as mães recebem drogas de traficantes e amamentam seus bebês recém-nascidos que, por consequência, tornam-se dependentes da droga. A cocaína causa retardo mental, atraso no desenvolvimento e forte dependência em recém-nascidos. Também é capaz de provocar malformações uterinas. A cocaína não é considerada classicamente uma droga que vicia, uma vez que não causa a verdadeira dependência física típica dos usuários de barbitúricos e opiáceos. Todavia, o estado de "alto" que produz é extraordinariamente reforçador, sendo que o comportamento de busca pela droga apresentado pelo usuário de cocaína é semelhante ao exibido pelos usuários de opiáceos. Evidências recentes obtidas com modelos de experimentação animal sugerem que a cocaína pode induzir liberação de β-endorfinas, as quais se ligam aos receptores ∝ localizados no sistema límbico (Gianoulakis, 2004). Como resultado, a sensação positiva e de prazer é intensificada. Em termos clínicos, os pacientes que sofrem *overdose* de cocaína podem se tornar violentos e irracionais, a ponto de necessitarem de sedação. É interessante que muitos indivíduos que se tornam usuários dessa droga percebem o estado de hiperexcitação em que se encontram, bem como as palpitações, e passam a consumir doses elevadas de Valium para se acalmar. Por esse motivo, é comum detectar cocaína e Valium na urina de viciados em cocaína. Pacientes que passaram por um episódio de *overdose* ocasionalmente tornam-se embotados ou comatosos. O tratamento desses pacientes costuma ser de suporte. Como observado na seção anterior, foi demonstrado que os antidepressivos – inclusive os tricíclicos e a fluoxetina (Prozac) – inibem as ações da cocaína. Assim, o tratamento com esses agentes é instituído com frequência.

Metabolismo

A cocaína, como já dito, apresenta meia-vida de aproximadamente 1 a 2 horas. é metabolizada a compostos mais polares, cuja potência é significativamente menor do que a potência do composto original. Esses metabólitos possuem meia-vida mais longa, podendo ser detectados por GC-MS em até 48 horas após a administração da droga. Os métodos de imunoensaio conseguem detectar a droga após 24 a 36 horas da administração. Quando o paciente inala a base livre da cocaína ("crack"), é possível detectar o composto original (cocaína) por TLC várias horas depois do consumo, porque a droga continua presente em níveis elevados.

Opiáceos (morfina, codeína, heroína)

A Figura 23.7 mostra as estruturas desses compostos, as quais são bastante semelhantes entre si. A morfina é empregada como poderoso agente analgésico e exerce suas ações ao ligar-se a receptores ∝ do sistema límbico no SNC. Como resultado, há produção de um estado de analgesia. Ao nível molecular, a ligação da morfina a esses receptores ativa a cascata de sinalização celular via ativação da proteína G. Em consequência, há elevação da expressão de muitas proteínas transcricionalmente ativas, como ERK, *jun* e *fos*, bem como superativação da adenilato ciclase, resultando no aumento dos níveis intracelulares de cAMP (Tso, 2003). Além de seu uso como um dos principais analgésicos, a

morfina se tornou importante no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva aguda, por reduzir o retorno venoso ao coração (i. e., atua como um poderoso agente redutor de pré-carga ao promover aumento da coleção de sangue no baço). A codeína é utilizada como analgésico de ação discreta e como antitussígeno. A heroína induz um estado prazeroso e eufórico, sendo altamente viciante tanto física como psicologicamente. A retirada dessa droga é extremamente difícil. O usuário apresenta uma miríade de sintomas, como hipotermia, palpitações, suor frio e pesadelos. Trata-se de uma dependência física verdadeira, cujas bases moleculares ainda precisam ser elucidadas. Essa dependência parece estar fortemente associada ao número de receptores ∝ expressos na superfície celular (Tso, 2003).

Essa classe de compostos exibe efeitos paradoxais importantes sobre o sistema nervoso parassimpático. Tais drogas exercem um efeito pró-colinérgico nos olhos e vasos sanguíneos periféricos (i. e., causam contração das pupilas e vasodilatação periférica). Em contraste, reduzem a motilidade GI (i. e., apresentam efeitos anticolinérgicos sobre o trato GI). Essa característica permite o rápido diagnóstico de consumo abusivo de heroína ou de opiáceos em geral por pacientes que chegam à unidade de emergência em estado de embotamento ou comatose. É típico esses pacientes apresentarem uma severa miosite (contração pupilar). Embora não seja um sinal útil para um diagnóstico agudo, tais pacientes costumam apresentar constipação.

A administração de heroína é feita por via endovenosa. Indivíduos viciados são prontamente identificados pela observação de várias marcas de picada de agulha em seus braços e mãos, além de uma extensa trombose nas veias periféricas. A meia-vida da heroína endovenosa é de cerca de 3 minutos, sendo que seus efeitos duram aproximadamente 3 horas. Os principais metabólitos da droga são a N-acetilmorfina e a morfina. A morfina possui meia-vida aproximada de 3 horas. *Overdoses* de heroína são extremamente perigosas e podem levar ao embotamento severo, coma, parada respiratória e arritmias cardíacas. Uma das modalidades terapêuticas mais comuns em casos de *overdose* por heroína é o tratamento endovenoso com naloxona (Narcan), um forte antagonista competitivo da ação da droga. A estrutura da naloxona é mostrada na Figura 23.7. O vício por heroína, como problema crônico, é tratado farmacologicamente com metadona, um agonista parcial da droga.

Metadona

Esse composto interessante, cuja estrutura pode ser observada na Figura 23.7, é uma droga não bicíclica, que compete com a morfina pela ligação aos receptores ∝ existentes no cérebro. Embora possa causar dependência, seus efeitos viciantes são menos intensos do que os produzidos por concentrações equivalentes de heroína, possivelmente porque a afinidade de sua ligação ao receptor é menor e, em consequência, os efeitos produzidos são menos intensos que os da heroína. Por isso, a administração de metadona a dependentes de heroína proporciona os mesmos efeitos dessa droga, porém de forma controlada. Com a diminuição gradual da dose de metadona, a dependência física é reduzida. Níveis séricos de metadona acima de 100 ng/mL são considerados adequados à manutenção efetiva dessa droga (Bell, 1988). Por outro lado, é importante ter em mente que a metadona também pode levar ao vício. Nos laboratórios de toxicologia, as solicitações de triagem mais frequentes para metadona são recebidas de clínicas de tratamento, para investigar se um paciente administrou a droga ou se retomou o vício em heroína. Como pode ser observado na Figura 23.3, a TLC é uma técnica simples e que pode ser usada para distinguir a metadona dos opiáceos. Similarmente, as técnicas de EMIT ou FPIA detectam cada droga com alta especificidade.

Anfetaminas

Como se observa na Figura 23.7, as anfetaminas apresentam grande semelhança com as aminas adrenérgicas, como a epinefrina e a noraepinefrina, e podem exercer efeitos simpatométicos. Também são semelhantes à dopamina e, portanto, podem afetar as vias dopaminérgicas. Causam euforia e aumento do estado de alerta mental como consequência de sua interferência nessas vias. Entretanto, esse grupo de drogas também exerce efeitos estimulatórios pronunciados ao interagir com receptores α e β localizados no sistema cardiovascular e nos rins, provocando a manifestação de efeitos adrenérgicos intensos como aumento da frequência cardíaca, da pressão sanguínea, palpitações, broncodilatação, ansiedade, palidez e tremores. Estudos indicam que as anfetaminas também atuam como inibidores competitivos da enzima monoamina oxidase, responsável pela inativação dos neurotransmissores adrenérgicos por meio de remoção oxidativa de seus grupos amino. O bloqueio dessa enzima prolonga o efeito da epinefrina e da noraepinefrina, resultando na produção de sequelas neurológicas e cardiovasculares. Uma anfetamina em particular – a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA ou "ecstasy") –, derivada da metanfetamina (ver a Fig. 23.7), tornou-se popular como droga de abuso recreativa, devido aos efeitos de euforia e psicodelismo que provoca, embora seus efeitos alucinógenos sejam mínimos (Gill, 2002).

Sintomas clínicos

As ações farmacológicas das anfetaminas incluem a estimulação do SNC e do sistema respiratório, bem como da atividade simpatomimética (p. ex., broncodilatação, resposta pressora e midríase). O usuário pode apresentar perda de peso em decorrência de um efeito anoréxico. Também pode haver estimulação psíquica e excitabilidade, levando ao aumento temporário da atividade física e mental e nervosismo.

Toxicidade aguda

As manifestações iniciais de uma *overdose* podem ser de natureza cardiovascular. Os sintomas podem ser rubor ou palidez, taquipneia, palpitação, tremores, pulsação e pressão sanguínea instáveis (hiper- e hipotensão), arritmias cardíacas, bloqueio atrioventricular, colapso circulatório e angina. O indivíduo pode apresentar distúrbios mentais, como delírio, confusão, desorientação e alucinações. Síndromes psicóticas agudas podem se manifestar e caracterizam-se por vívidas alucinações auditivas e visuais, agitação, tendências homicidas ou suicidas, estado de pânico, ideação paranoica, comprometimento das associações, disposição para a luta e alterações afetivas. A hiperpirexia é um sinal frequente e potencial de intoxicação aguda. A rabdomiólise também foi associada à *overdose* aguda por anfetaminas. O colapso cardiovascular é a causa usual de morte.

Uso crônico

Com apenas algumas semanas de uso, o usuário pode desenvolver tolerância. O uso prolongado pode levar à dependência física ou psíquica. Os sintomas de abuso crônico são instabilidade emocional, sonolência, perda de apetite, deterioração ocupacional, comprometimento mental e isolamento social. Pode haver traumatismo e formação de úlceras na língua e nos lábios como resultado de movimentos repetitivos de mascar ou ranger de dentes. É possível que o usuário manifeste uma síndrome com características de esquizofrenia paranoica com o consumo de doses elevadas por tempo prolongado. Anemia aplásica e pancitopenia fatal são complicações raras.

Tratamento

Não há nenhum antídoto específico para a *overdose* de anfetaminas. Nesse caso, o tratamento é sintomático, com implementação de medidas de suporte fisiológico geral. Conforme discutiremos adiante, para tratar os sintomas cardiovasculares, é possível administrar propranolol (Inderal) como antídoto.

Detecção

Ambos os procedimentos, Toxi-lab (Irvine, CA) e EMIT (Syva, San Jose, CA), são efetivos na detecção dessas drogas de abuso. Ocasionalmente, quando se usa a tira A do Toxi-lab, as anfetaminas podem ser confundidas com anti-histamínicos (p. ex., difenidramina).

Benzodiazepínicos

Entre os compostos desse grupo, mostrados na Figura 23.7, o mais proeminente é o Valium. São utilizados para fins terapêuticos, sendo conhecidos como tranquilizantes menores. Seus mecanismos de ação parecem envolver indução da secreção de GABA – um neurotransmissor que inibe a condução nos neurônios dopaminérgicos. Empregado, em geral, como medicação terapêutica para produzir efeitos calmantes (doses a 2,5 – 10 mg) e relaxantes musculares (doses maiores), o Valium tem sido utilizado em doses elevadas por viciados em drogas, para contrapor os efeitos excitatórios de outras drogas

de abuso ou como forma de induzir estados de tranquilidade. Alguns usuários de drogas de abuso utilizam benzodiazepínicos para potenciar os efeitos da heroína (Fraser, 1998). Inúmeros usuários de drogas se tornaram viciados em Valium, após fazerem uso de doses elevadas do composto várias vezes ao dia. Em casos graves, uma *overdose* de benzodiazepínicos pode causar sonolência, confusão, convulsões e coma. Em poucas situações, também causa hipotensão, depressão respiratória e parada cardíaca. O uso crônico induz dependência física e psicológica. A suspensão repentina do uso da droga pode provocar ansiedade, sudorese, irritabilidade, alucinações, diarreia e convulsões. O usuário recebe tratamento de suporte. A diminuição gradativa do consumo de benzodiazepínicos elimina a dependência física. A meia-vida do Valium é de 20 a 70 horas, porém um de seus metabólitos ativos apresenta meia-vida de 50 a 100 horas.

Fenilciclidina (PCP)

O interessante composto tricíclico mostrado na Figura 23.7 exerce inúmeros efeitos em diversas vias neurais. Utilizado, quase que com exclusividade, como droga de abuso, esse composto é comercializado nas ruas com o nome de "pó de anjo" ou "cabelo de anjo". Uma de suas peculiaridades é o uso periódico. Os efeitos fisiológicos da PCP parecem ser analgésicos e anestésicos, ao mesmo tempo em que são paradoxalmente estimulantes. Foi demonstrado que essa droga interage com receptores neuronais colinérgicos, adrenérgicos, secretores de GABA, serotonérgicos e de opiáceos. Sendo assim, o paciente pode apresentar uma variedade de sintomas bizarros a aparentemente parodoxais ao mesmo tempo. Descobriu-se que a droga se liga a regiões específicas dos canais de cloreto internos existentes nos neurônios, afetando profundamente o transporte dessa molécula. A PCP também se liga fortemente a uma classe de receptores denominados receptores δ (Schuster, 1994). Como tais receptores também se ligam fortemente ao haloperidol (Haldol), uma droga neuroléptica e antipsicótica, é possível que estejam implicados em alguns dos achados clínicos de psicose severa apresentados por pacientes que sofreram episódio de *overdose* por PCP.

Devido à ampla variedade de suas ações, essa droga induz manifestações clínicas que vão de depressão à euforia e podem envolver catatonia, violência, ira e alucinações auditivas e visuais. Vômitos, hiperventilação, taquicardia, calafrios, convulsões, coma e morte também estão entre as ocorrências comuns resultates do uso abusivo de PCP. A maioria das fatalidades decorre dos efeitos hipertensivos da droga, em especial, nas grandes artérias cerebrais (Bayorh, 1984). Como é possível inferir a partir desse espectro de sintomas, o diagnóstico baseado nos achados clínicos é impossível. Somente o resultado de um teste de triagem para a droga pode ser utilizado como diagnóstico. O tratamento do uso abusivo da PCP é suportivo, com o paciente sendo mantido em isolamento em um quarto escuro e quieto. A acidificação da urina aumenta a taxa de excreção da droga. Como esperado, tendo em vista os achados relativos ao receptor δ, o tratamento com Haldol resulta em sedação do paciente violento e alucinado.

Barbitúricos: sedativos hipnóticos

Essas drogas de importante ação sedativa apresentam uma variedade quase desconcertante. Entretanto, são todas derivadas do ácido barbitúrico, que pode ser considerado um produto de condensação da ureia e do ácido malônico, conforme mostra a Figura 23.7. Dependendo dos substituintes no grupo $-CH_2$ da porção do ácido malônico, a ação da droga poderá ter diferentes durações: prolongada, se os substituintes do carbono forem um anel benzênico e um grupo etil, a exemplo do fenobarbital; de curta duração, se houver grupos neopentil e etil nessa posição, como no pentobarbital; ou de duração ultracurta, como é o caso do tiopental. O barbitúrico de longa duração fenobarbital possui uso terapêutico como anticonvulsivante, diferenciando-se das drogas com ação de curta ou ultracurta duração, e será discutido adiante, com os fármacos terapêuticos. Todos os barbitúricos são lipossolúveis e, portanto, atravessam facilmente a barreira hematoencefálica. Acredita-se que promovam a estabilização das membranas e, assim, dificultem sua despolarização. Por razões desconhecidas, os barbitúricos com ação de curta e ultracurta duração parecem inibir seletivamente o sistema reticular ativador, que está associado ao despertar – daí seus efeitos sedativos e hipnóticos. Os barbitúricos com ação ultracurta se difundem com rapidez para fora do SNC e, por isso, atuam rapidamente. O fenobarbital, contudo, reduz de modo seletivo a excitabilidade dos neurônios de disparo rápido e, como resultado, apresenta ação anticonvulsiva altamente eficaz. Talvez seja mais do que uma simples coincidência o fato de o fenobarbital e a fentoína (Dilantina) – outro anticonvulsivo igualmente efetivo – apresentarem semelhanças estruturais e exercerem efeitos similares sobre os neurônios de disparo rápido. O mecanismo de ação da fentoína será discutido adiante.

Em termos clínicos, quando em baixas doses, os barbitúricos com ação de curta e ultracurta duração causam sedação, prostração e sono. Também comprometem a capacidade de julgamento. Quando em doses mais altas, produzem anestesia. Em doses ainda maiores, essas drogas podem causar estupor, coma e morte. As manifestações tóxicas associadas a tais drogas são depressão, respiração de Cheyne-Stokes, cianose, hipotermia, hipotensão, taquicardia, arreflexia e contração da pupila.

O tratamento de casos de *overdose* é suportivo e envolve o trato padrão para choque. Quando administrado em até 30 minutos após a ingestão da droga, o carvão ativado apresenta ação quimioadsorvente efetiva para barbitúricos.

No caso dos barbitúricos com ação de curta e ultracurta duração, o diagnóstico de uso de drogas de abuso é obtido por meio de procedimentos de triagem com TLC. O HPLC parece ter utilidade diagnóstica, contudo não é o método padrão. Os barbitúricos são ácidos fracos, com seus prótons N-H algo acídicos, portanto são extraídos com ácidos e transferidos para as tiras B nos procedimentos do Toxi-lab (Irvine, CA). Sua presença é facilmente detectada por TLC para Toxi-lab, como mostra a planilha de trabalho Toxi-Lab B da Figura 23.3. Os imunoensaios para essas drogas constituem igualmente em excelentes opções, exceto pelo fato de que elevadas concentrações de fenobarbital na urina produzam reação cruzada com anticorpos para barbitúricos com ação de curta duração. Assim, é importante confirmar por TLC os resultados positivos obtidos em imunoensaios para barbitúricos sedativo-hipnóticos.

Propoxifeno (Darvon)

Esse composto analgésico apresenta propriedades farmacológicas muito semelhantes àquelas dos opiáceos, entre os quais a morfina. Essa droga pode ser administrada por via oral, de modo que os efeitos de sedação e sensação de bem-estar induzidos pelos opiáceos podem ser obtidos sem utilizar o aparato endovenoso necessário à infusão da heroína. Uma das principais causas de morte associada ao uso de drogas é a *overdose* de propoxifeno, seja isoladamente ou combinado a depressores do SNC, como barbitúricos e álcool. Os sintomas tóxicos são similares aos observados em casos de *overdose* por opiáceos (depressão respiratória, arritmias cardíacas, convulsões, edema pulmonar e coma). O usuário também pode desenvolver diabetes insípido nefrogênico. O tratamento para *overdose* de propoxifeno é de suporte, sendo que a administração de naloxona (Narcan) reverte o efeito tóxico da droga.

Metaqualona (Quaalude)

A metaqualona é uma quinazolina com dupla substituição 2,3 (Fig. 23.7) que possui propriedades sedativo-hipnóticas. Também apresenta ações anticonvulsiva, antiespasmódica, anestésica local, antitussígena e anti-histamínica (fraca). Quando administrada por via oral é rápida e completamente absorvida, sendo que 80% do total se liga às proteínas plasmáticas. A concentração da droga no plasma atinge o pico em 2 a 3 horas e quase todo o seu conteúdo parece ser metabolizado pelo sistema enzimático microssomal hepático do citocromo P450. Apenas um pequeno percentual (< 5%) é excretado pela urina sem sofrer modificações. A meia-vida da droga no soro varia de 20 a 60 horas.

Para obtenção de seus efeitos hipnótico-sedativos, são utilizadas doses de 150 a 300 mg/dia. Concentrações séricas tóxicas, em geral, correspondem a 10 μg/mL. O usuário tanto pode desenvolver tolerância a algumas de suas ações como se tornar dependente, sendo que as doses abusivas chegam a ser de 6 a 7 vezes maiores que as doses empregadas para fins terapêuticos. Os sintomas da *overdose* podem ser semelhantes aos da toxicidade por barbitúricos, produzindo depressão

do SNC acompanhada de letargia, depressão respiratória, coma e morte. Entretanto, diferente da *overdose* por barbitúricos, pode haver espasmos musculares, convulsões e sinais piramidais (hipertonicidade, hiper-reflexia e mioclônus) em casos de intoxicação severa por metaqualona. O tratamento, em tais casos, inclui terapia de suporte e uso de carvão ativado para retardar a absorção da droga remanescente, além de lavagem gástrica para remoção da droga.

Maconha (*Cannabis*)

Trata-se de uma das drogas indutoras de alteração mental de uso mais antigo e amplamente disseminado. A maconha consiste em uma mistura de porções cortadas, secas e moídas da fibra da planta *Cannabis sativa*. Haxixe é o nome que designa um composto mais potente produzido a partir da resina extraída da planta. O principal agente psicoativo contido na maconha é o Δ-9-tetra-hidrocanabinol (THC), um composto lipossolúvel, que invade prontamente o cérebro e promove seu efeito induzindo alterações nas membranas celulares. O THC se liga ao receptor neural para canabinoides pré-sináptico – o CB1. Essa ligação resulta na liberação do neurotransmissor inibitório GABA no hipocampo, amígdala e córtex cerebral (Iversen, 2003). A maconha pode ser introduzida tanto pelos pulmões, pela fumaça, como pelo trato GI, por meio de sua ingestão com alimentos por via oral. Uma vez no organismo, o THC é imediatamente armazenado no tecido adiposo e apresenta meia-vida aproximada de 1 semana. Sua biotransformação é complexa e extensa, sendo que menos de 1% da dose ingerida é excretada sem sofrer modificações. Cerca de um terço é eliminado pela urina, primariamente, sob a forma de Δ-9-carboxi--TCH e 11-hidroxi-Δ-9-THC. Esses metabólitos podem ser detectados na urina a partir de 1 a 4 semanas da ingestão da droga, dependendo da dose e da frequência de consumo. De uma forma geral, a maconha aparentemente não causa dependência fisiológica. Contudo, o usuário pode desenvolver tolerância (ver na referência Martin, 2004) e dependência psicológica, enquanto certa proporção de usuários crônicos desenvolve dependência fisiológica da droga (Iversen, 2003). Os dois efeitos fisiológicos principais da maconha são a vermelhidão da conjuntiva e o aumento da frequência da pulsação. Fraqueza muscular e deterioração da coordenação motora também são efeitos possíveis. As alterações preponderantes observadas na intoxicação por maconha afetam a percepção e o estado psíquico do usuário. Com baixas doses, pode haver euforia, relaxamento, passividade e alteração do tempo de percepção. Diante de doses elevadas, o indivíduo psicologicamente suscetível pode apresentar paranoia, alucinações e desorientação. A dose, a via de administração, o preparo psicológico individual e o contexto são determinantes importantes da reação de cada usuário à intoxicação por maconha. Portanto, em indivíduos despreparados ou que consomem a droga sem saber, doses elevadas podem provocar uma experiência perturbadora. Usuários mais experientes costumam relatar uma discreta euforia, intensificação ou alteração das sensações físicas, introspecção com alteração da ênfase ou do grau de importância dos pensamentos, além de intensificação das experiências subjetivas. O uso crônico e intenso pode acarretar distúrbios broncopulmonares e – embora a relativa segurança do uso crônico seja controversa – em menor frequência reações de pânico agudas, delírio e psicoses (Bryson, 1989). Poucos usuários procuram tratamento e, quando isso ocorre, a intervenção médica dispensada ao paciente angustiado costuma ser conservativa. Todavia, após um episódio agudo, pode ser necessário submeter a uma avaliação psicológica aqueles usuários que apresentem distúrbios psiquiátricos subjacentes. Em raras ocasiões, a maconha é consumida por meio de infusão endovenosa de um concentrado fervido. Essa via de administração pode causar uma severa toxicidade multissistêmica. Nesse caso, a sintomatologia inclui insuficiência renal aguda, gastroenterite, hepatite, anemia e trombocitopenia.

Dietilamida do ácido lisérgico (LSD, lisergida)

O LSD é uma indolalquilamina semissintética e alucinógena. Trata-se de um dos compostos farmacológicos mais potentes conhecidos até o momento, produzindo efeitos a doses mínimas de 20 μg, e igual efetividade, quando administrado por injeção ou por via oral. Acredita-se que o LSD afete múltiplos sítios do SNC e que pode atuar no receptor de serotonina pré-sináptico, inibindo a liberação da serotonina e, consequentemente, diminuindo sua atividade. Esse processo, por sua vez, pode provocar um estado de hipervigilância no SNC. Tanto o sistema nervoso simpático como o parassimpático são afetados. Entretanto, o efeito simpático parece ser maior e os sintomas que se manifestam são hipertensão, taquicardia, midríase e piloereção.

A dose usual de LSD é 1 a 2 μg/kg. Essa droga produz uma experiência que se inicia 1 hora após a ingestão, atinge o pico em 2 a 3 horas e costuma durar 8 a 12 horas após ser ingerida. O metabolismo ocorre no fígado, enquanto a excreção se dá principalmente pela bile.

Em sua classe, o LSD é a droga de abuso de consumo mais comum e seus usuários acreditam que seu uso é fonte de novas ideias e soluções de problemas. Os efeitos físicos produzidos costumam ser intensos e variáveis, dependendo da personalidade do usuário, de suas expectativas e das circunstâncias. O LSD atua sobre os sentidos do corpo, porém os efeitos visuais são mais fortes. Anomalias comuns envolvendo a percepção incluem alterações da percepção temporal, ilusões visuais organizadas ou alucinações, visão desfocada ou "ondulante" e sinestesias. O humor pode se tornar bastante instável e há a possibilidade de dissolução e desorganização do ego. Os níveis de LSD que causam toxicidade são baixos. Os casos de morte, em geral, decorrem de traumas secundários a erros de julgamento por parte do usuário. As reações de pânico – "*bad trip*" – são as reações adversas mais comuns. Elas podem afetar qualquer usuário e não são previstas nem evitadas com segurança. Indivíduos psicóticos e deprimidos limítrofes (*borderline*) estão associados ao risco de tentativas precipitadas de suicídio ou episódios psicóticos prolongados decorrentes do uso do LSD. O retorno dos efeitos (*flashbacks*), ainda pouco compreendido, também ocorre dias ou meses após a ingestão da droga. Tais episódios ocorrem quando o usuário sofre recaídas a partir de uma experiência alucinógena anterior, sem ter ingerido a droga.

Reações de pânico agudas podem ser tratadas e proporcionar ao usuário tranquilização frequente e um ambiente calmo. A administração de diazepam também pode ser eficaz. Contudo, exceto quando se trata complicações específicas, não há um programa sistemático de tratamento para o consumo abusivo de LSD.

Monitoramento de fármacos terapêuticos

Atualmente, é reconhecida a grande importância da determinação frequente dos níveis séricos de muitos dos fármacos terapêuticos administrados aos pacientes, seja devido aos possíveis efeitos colaterais tóxicos de várias dessas medicações ou porque a frequente falta de complacência por parte dos pacientes resulta em níveis subterapêuticos de fármacos. Além disso, é importante que o médico, ao iniciar a terapia com fármacos, estabeleça quando os níveis séricos do fármaco prescrito alcançam um nível terapêutico estável. Por esse motivo, torna-se igualmente importante compreender os princípios da terapia farmacológica (i. e., farmacocinética). Nessa seção, são apresentados alguns dos princípios básicos de farmacocinética e, em seguida, os efeitos fisiológicos de classes específicas de fármacos terapêuticos. Os fármacos discutidos são aqueles cujos níveis são mais comumente acompanhados pelos médicos, bem como ensaiados com maior frequência nos laboratórios clínicos. É preciso notar que, virtualmente, todos os fármacos terapêuticos são testados em amostras de soro – e não de urina –, em geral por meio de técnicas de imunoensaio (p. ex., FPIA).

Farmacocinética (Gerson, 1987a, b)

A Figura 23.9 resume as duas formas existentes de administrar fármacos terapêuticos a pacientes: contínua ou incontínua. A primeira (administração contínua) representa a forma mais comum. A maioria dos pacientes é tratada com medicações administradas por via oral ao longo de períodos fixos. Exemplificando, para obter efeitos anti-inflamatórios, são prescritos 2 comprimidos de 350 mg de aspirina a cada 4 – 6 horas. Nesse caso, a aspirina é tomada a intervalos de tempo determinados entre os quais certa quantidade do fármaco será excretada antes da administração da próxima dose. Em determinadas situações, o paciente pode receber uma infusão do fármaco por via endovenosa, como na administração de lidocaína (xilocaína) para pacientes com arritmia cardíaca na unidade de terapia intensiva (UTI), ou na administração de heparina para prevenção de

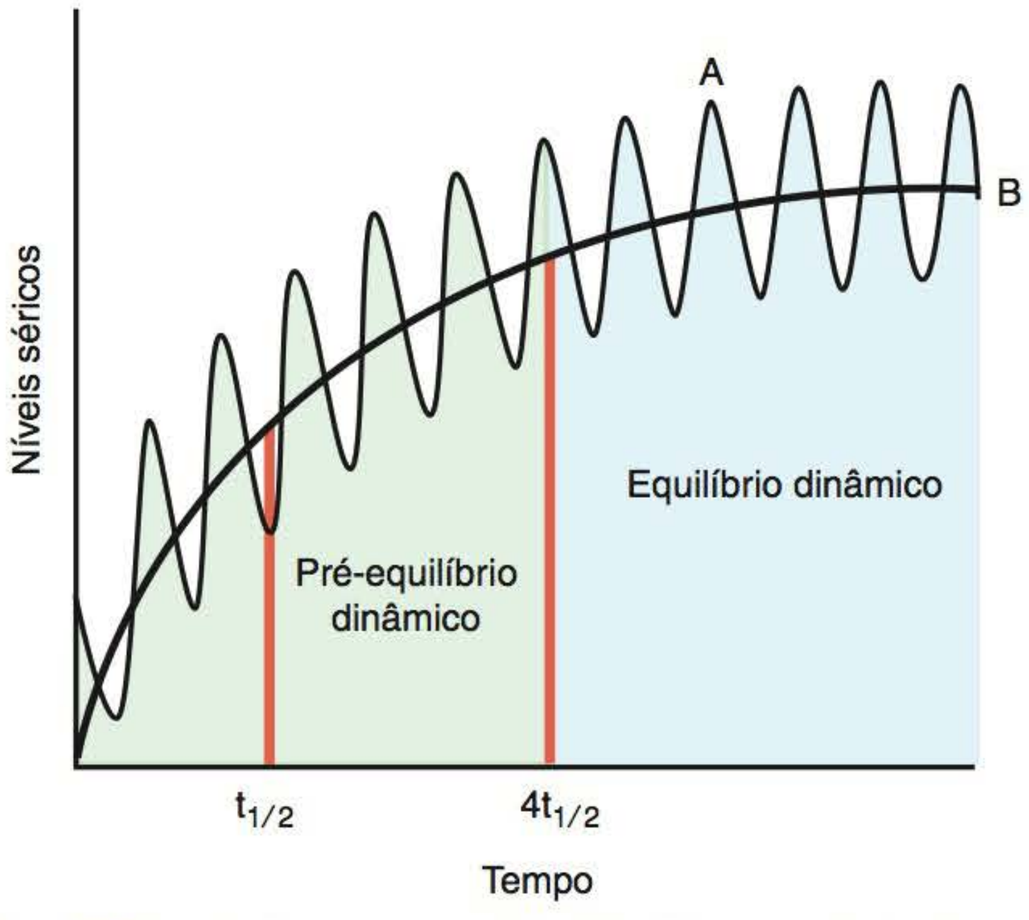


Figura 23.9 Ilustração da escala temporal dos níveis de fármaco em função do método de administração adotado. *A*, método descontínuo. Uma dose constante de fármaco é administrada a cada meio-período. Após 4 meios-períodos ($4t_{1/2}$), os níveis de fármaco flutuam em torno de uma concentração constante de equilíbrio dinâmico. *B*, método contínuo (infusão endovenosa). A convergência para o limite de equilíbrio dinâmico é alcançada em A.

eventos tromboembólicos. Nesses casos, ao mesmo tempo em que uma parte do fármaco é metabolizada, uma quantidade constante é infundida. Eventualmente, com a infusão contínua, a concentração de equilíbrio dinâmico do fármaco é atingida quando a quantidade infundida na unidade de tempo se torna igual à quantidade eliminada na mesma unidade de tempo. Quando o fármaco é infundido de forma *descontínua*, uma concentração de equilíbrio dinâmico também é alcançada. Entretanto, a administração de doses repetidas (doses iguais a intervalos regulares) produz pico e declínios das concentrações séricas, que tendem a variar em torno do equilíbrio dinâmico ou da concentração média.

Tanto para infusões descontínuas como contínuas, o nível de fármaco definitivo é determinado em função da quantidade de fármaco infundida *versus* a quantidade excretada. Todos os fármacos eventualmente são excretados pela urina, seja como composto original e sem modificações ou sob a forma de metabólitos do fármaco original. Essas conversões metabólicas ocorrem no fígado. Em determinadas ocasiões, alguns fármacos entram na circulação enteropática e são eliminados com as fezes. Seja qual for o modo de excreção, uma boa parte desses fármacos apresenta uma meia-vida que mais ou menos é independente de suas concentrações. A meia-vida de um fármaco é o tempo que o organismo demora para excretar metade da concentração deste fármaco inicialmente presente no soro. Essa meia-vida independe da concentração porque muitos desses compostos são excretados segundo uma cinética de primeira ordem. O processo pode ser resumido da seguinte forma:

$$D \xrightarrow{k} E \tag{23.5}$$

Em que D é a concentração de fármaco e E é sua forma excretada. A constante k é a constante de velocidade do desaparecimento de D. A meia-vida, denominada $t_{1/2}$, está associada à constante k por intermédio da seguinte relação:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k \tag{23.6}$$

Como é possível notar a partir dessa equação, $t_{1/2}$ é uma constante e não depende da concentração de fármaco. Assim, a meia-vida do fármaco determina o tempo necessário para ser alcançado o equilíbrio dinâmico ou a concentração média.

O objetivo de qualquer terapia farmacológica é alcançar um nível sérico constante de fármaco que produza o efeito terapêutico esperado. Se a meia-vida do fármaco é desconhecida, é possível calcular a dose repartida que deve ser administrada e o devido intervalo de tempo entre cada dose, para que esse nível constante seja alcançado. Conforme se observa na Figura 23.9, na curva A, o período inicial de administração do fármaco é marcado por grandes flutuações dos níveis de fármaco. Passado algum tempo, essas flutuações convergem em torno de um nível constante. De uma forma geral, no caso das doses descontínuas, o nível de fármaco ao final do período de administração de n doses pode ser expresso como a soma de uma série geométrica:

$$D = (D_o r \cdot r^n - D_o r)/(1 - r) \tag{23.7}$$

Em que D_o é o nível desejado de equilíbrio dinâmico do fármaco; r é a fração restante de fármaco, após o intervalo de tempo constante entre as doses; e n é o número da dose (p. ex., segunda, terceira dose etc.). Se for estabelecido que o intervalo de tempo entre as doses é $t_{1/2}$, então $r = {}^1/_2$. Caso seja determinado que esse intervalo deva ser igual a ${}^3/_4$ da quantidade de fármaco remanescente, então $r = {}^3/_4$. (Esse tempo pode ser calculado diretamente a partir de $t_{1/2}$, como sendo ${}^1/_2 t_{1/2}$.) Após quatro doses cronometradas, se $r = {}^1/_2$, por exemplo, o primeiro termo do numerador da equação 23.7 será pequeno e, em efeito:

$$D = (D_o/2)/(1/2) = D_o \tag{23.8}$$

Depois de 4 meias-vidas ou mais, quando r^n for igual a $({}^1/_2)^4$ ou 1/16 (0,06), ou seja, quando r^n for pequeno, o nível de equilíbrio dinâmico é alcançado.

Nas infusões contínuas (Fig. 23.9, curva B), considerando o caso mais simples em que a distribuição do fármaco é instantânea, a velocidade da infusão é constante e a excreção do composto é de primeira ordem. Sendo assim, é possível demonstrar que o nível de fármaco, a qualquer momento, pode ser dado pela seguinte equação:

$$D = (k_1/k_2)(1 - e^{-k_2 t}) \tag{23.9}$$

Em que D é a concentração de fármaco, k_1 é a constante da velocidade de infusão, k_2 é a constante de velocidade de primeira ordem para excreção do fármaco, e t é o tempo. De acordo com a equação 23.6, como $k_2 = 0{,}693/t_{1/2}$, após 4 meias-vidas, quando $t = 4t_{1/2}$:

$$D = (k_1/k_2)(1 - e^{-2{,}772}) \tag{23.10}$$

Em que, em efeito, D se aproxima de k_1/k_2. Dessa forma, para infusões contínuas, pressupondo-se que nenhuma carga de dose tenha sido administrada, a proporção entre k_1 (velocidade de infusão do fármaco na unidade de tempo) e k_2 (constante de velocidade para o desaparecimento de primeira ordem do fármaco) corresponde ao nível de equilíbrio dinâmico desejado do fármaco (i. e., em que a quantidade de fármaco administrada equivale à quantidade excretada, sempre no decorrer da mesma unidade de tempo).

Existem dois pontos fundamentais referentes a essa apresentação. Em primeiro lugar, é uma boa medida esperar que 4 meias-vidas ou mais atinjam o nível de equilíbrio dinâmico de um determinado fármaco. Em segundo lugar, é preciso interpretar com extrema cautela os resultados de um teste para determinação dos níveis de fármaco ao longo do período em que o equilíbrio dinâmico está sendo alcançado – regra essa que muitas vezes é esquecida na prática clínica. Analisando a Figura 23.9, observe que a realização dos ensaios, durante o período de pré-equilíbrio dinâmico (antes de 4 meias-vidas ou mais), acarreta a produção de resultados altamente erráticos, em decorrência das flutuações da concentração do fármaco observadas na infusão descontínua, e da elevação dos valores (ainda que persistentemente baixos) observada no infusão contínua.

As considerações constantes nos parágrafos anteriores destacam a implementação de uma terapia farmacológica efetiva, sem produção de efeitos colaterais sérios, em que é sempre necessário permanecer dentro dos limites terapêuticos para não causar toxicidade ao

paciente. Além disso, níveis subterapêuticos devem ser evitados. A equação 23.8 mostra que, no estado de equilíbrio dinâmico observado no início do período de administração das doses, a dose D_o é adicionada ao valor D_o do estado de equilíbrio dinâmico, produzindo níveis séricos iguais a $2D_o$. Em consequência, pode haver toxicidade. Por esse motivo, pode ser desejável diminuir a dose periódica a uma concentração inferior a D_o, mediante administração mais frequente dessas doses, a intervalos regulares, até ser alcançado o mesmo valor de equilíbrio dinâmico (D_o, no exemplo). Embora essa medida resulte em maior demora para se alcançar o valor-alvo do estado de equilíbrio dinâmico, os aumentos dos níveis de fármaco serão menores no estado de equilíbrio, bem como as flutuações entre os níveis de pico (logo após a administração do fármaco) e declínio (exatamente antes da administração da próxima dose).

Volume de distribuição

Quando se administra fármacos, é de vital importância saber se o composto é armazenado no tecido adiposo ou em outro tecido corporal, ou se permanece totalmente no soro. Como a dose de fármaco é conhecida e é possível determinar a concentração desse composto no soro, o volume total de líquido corporal em que o fármaco é dissolvido pode ser calculado pela seguinte relação:

$$D = D_o/V_d, \text{ ou } V_d = D_o/D \qquad (23.11)$$

Onde, D é a concentração do fármaco no soro, D_o é a quantidade de fármaco administrada e V_d é o volume em que D_o deve ser dissolvido para ser alcançada a concentração D. V_d é referido como volume de distribuição. Se todo o fármaco estiver presente no soro, V_d é o volume de sangue que pode ser determinado a partir das tabelas de conversão que relacionam o peso corporal ao volume de sangue. Por outro lado, se uma parte do fármaco é armazenada em algum tecido corporal, significa que uma quantidade menor permanece no soro. Portanto, o denominador da equação 23.11 ($V_d = D_o/D$) é reduzido e V_d se torna maior do que o volume de sangue esperado, indicando que uma parte do fármaco foi armazenada em tecido corporal. Caso seja esse o resultado obtido, significa que o fármaco está sendo continuamente liberado a partir de seus depósitos no corpo (i. e., tecidos), e que seus níveis séricos podem aumentar de modo anormal e se tornar potencialmente tóxicos. Por esse motivo, é preciso saber o volume de distribuição, antes de administrar qualquer fármaco.

Metabolismo no fígado

Muitos fármacos são convertidos a metabólitos, alguns farmacologicamente ativos e outros, inativos. Grande parte dessa conversão ocorre ao nível do sistema microssomal extramitocondrial existente nos hepatócitos. Esse sistema metabólico é principalmente oxidativo, utilizando uma série de enzimas oxidativas. Estas, por sua vez, utilizam um sistema especial de citocromos: o citocromo P450 (Hardman, 2001). Esse sistema de citocromo extremamente crítico está implicado de forma significativa na predisposição de certos indivíduos ao desenvolvimento de câncer, por intermédio da metabolização de determinados compostos ambientais, como o benzopireno, em francos carcinógenos (ver adiante). Além disso, o polimorfismo genético das enzimas do citocromo P450 afeta em particular a reposta do indivíduo ao fármaco, incluindo toxicidade e reações adversas (Ingelman-Sundberg, 2004). A excreção de muitos fármacos depende da integridade do fígado e do sistema de citocromo P450. Em pacientes que apresentam insuficiência hepática decorrente de congestão passiva, hepatite, cirrose e outros distúrbios semelhantes, a meia-vida efetiva do fármaco é maior. Como consequência, torna-se necessário *reduzir* a dose repartida de fármaco. Ao contrário, alguns fármacos induzem síntese intracelular de enzimas microssomais e causam *diminuição* dos valores de meia-vida. Como resultado, pode ser necessário *aumentar* a dose repartida.

Um exemplo de fármaco indutor de enzimas microssomais é o fenobarbital. Esse composto induz sua própria metabolização (de modo que os níveis de sua concentração não seguem uma cinética de primeira ordem). Nos casos em que os níveis de um fármaco metabolizado no fígado se tornam maiores do que o maior valor terapêutico, é possível reduzir esses níveis por meio de administração de baixas concentrações de fenobarbital para indução do sistema microssomal.

Esse resumo de alguns dos princípios gerais da administração de fármacos deve ser útil na interpretação clínica de valores, além de permitir uma melhor compreensão da discussão subsequente acerca de fármacos terapêuticos específicos, mais comumente quantificados ou determinados nos laboratórios. As Tabelas 23.1 a 23.7 resumem informações farmacológicas críticas referentes aos compostos testados com mais frequência.

Na apresentação que se segue, são discutidas sete classes de fármacos mais comumente analisados: cardiotrópicos, anticonvulsivantes, antiasmáticos, anti-inflamatórios, imunossupressores, psicotrópicos e quimioterápicos. (Os antibióticos são abordados na Parte VII – Microbiologia Médica.) A presente discussão enfatiza os mecanismos de ação desses fármacos. A maioria deles interfere em etapas específicas das vias de transdução de sinal celulares, as quais frequentemente apresentam notável semelhança. Apesar desse fenômeno, há fármacos específicos que bloqueiam etapas da transdução de sinal envolvendo apenas células específicas, sem afetar a transdução de sinal nas demais células.

Cardiotrópicos (Opie e Gersh, 2001)

O uso dos agentes cardiotrópicos é mais comum no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e das arritmias cardíacas. Embora os fármacos apresentem diferenças em termos de estrutura e propriedades, além dos usos específicos, todos atuam em uma ou outra fase dos potenciais de ação nas células que fazem parte do sistema de condução e nos miócitos. Seu efeito final consiste em *retardar a condução elétrica*. Ademais, é importante ter em mente que o tecido condutor é inervado tanto pelo sistema nervoso simpático, como pelo parassimpático (em especial, o vagal). O primeiro aumenta a velocidade de condução, enquanto o outro tende a retardar a condução. As ações promovidas por cada fármaco cardiotrópico são descritas de forma resumida na Figura 23.10. Conforme se observa nessa figura, várias correntes de íons importantes controlam os potenciais de ação das células que constituem o tecido marca-passo do nodo AV e as fibras de condução ventricular (compostas pelas células de Purkinje): primeiramente, uma corrente rápida de influxo de sódio e, em seguida, um fluxo diminuído (desligamento dos canais de condutância de sódio), conforme destacado na área vermelha da Figura 23.10. Em terceiro lugar, há um efluxo de íons potássio, que promove a repolarização da célula. Conforme mostra a Figura 23.10, existem quatro classes de fármacos que atuam em uma ou mais dessas fases do potencial de ação e que resultam em seu prolongamento. Os fármacos de classe I bloqueiam o influxo de sódio na fase I e incluem quinidina, procainamida e lidocaína. Tais agentes – em especial a lidocaína – atuam bloqueando o influxo rápido de sódio na fase I e, assim, diminuindo a velocidade de despolarização ventricular diastólica. Os fármacos de classe II incluem

Tabela 23.1 Digoxina

Propósito	Tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e fibrilação-*flutter* atrial
Dose geral para adultos	Oral: 0,75 – 1,5 mg para digitalização; 0,125 – 0,5 mg/dia para manutenção
Biodisponibilidade usual	Aprox. 60 – 85% para comprimidos ou elixir; 90 – 100% para cápsulas contendo líquido
Meia-vida	Aprox. 35 – 40 horas; porém, prolongada em pacientes com função renal diminuída
Faixa terapêutica geral	0,5 – 2 ng/mL
Concentração tóxica geral	> 2 ng/mL, contudo pode variar um pouco
Transporte	Aprox. 20 – 25% ligada a proteínas do plasma
Metabolismo	Em geral, somente pequenas quantidades são metabolizadas (fígado, lúmen do intestino grosso)
Eliminação	Aprox. 50 – 75% pela urina, sem modificação
Equilíbrio dinâmico	Aprox. 7 dias em pacientes não digitalizados e com função renal normal
Mecanismo de ação	Causa liberação de íons de cálcio no sistema T do miocárdio; retarda a condução no nodo AV
Efeitos tóxicos	Distúrbios gástricos, náusea, vômitos, arritmias atrial e ventricular; pulsação irregular

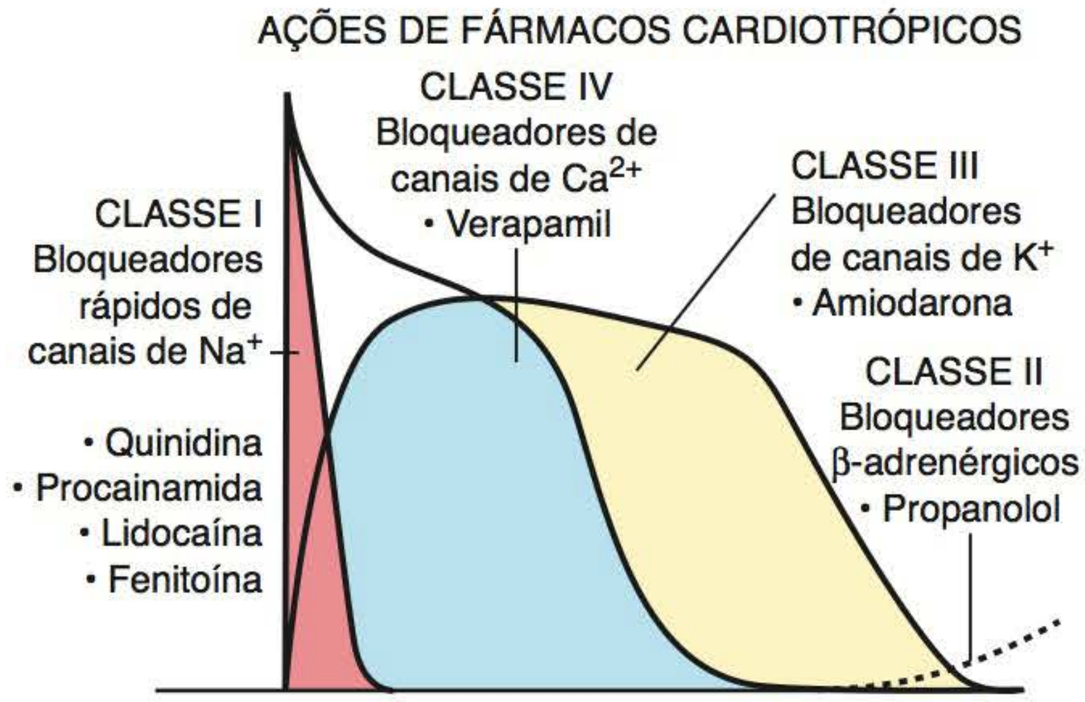


Figura 23.10 Visão geral dos efeitos de diferentes agentes antiarrítmicos sobre o sistema condutor do miocárdio. O potencial de ação normal é representado pela linha preta que forma o primeiro pico com a aplicação de uma alta voltagem. Essa resposta é produzida principalmente por um rápido influxo de sódio nas células do sistema condutor. Esse componente do potencial de ação, devido ao influxo de íons sódio, é mostrado sob a área em vermelho. O potencial de ação real é prolongado por um subsequente influxo de íons cálcio representado pela área azul, a qual apresenta certa sobreposição em relação à área vermelha (influxo de sódio). A seguir, quando termina o influxo de íons cálcio, o influxo de íons potássio resulta na repolarização mostrada pela curva que contorna as áreas em azul e amarelo. Os agentes bloqueadores de classe I, conforme lista a figura, bloqueiam o influxo de sódio, diminuindo a taxa de despolarização. Os bloqueadores de classe II, como o propanolol, bloqueiam estímulos β-adrenérgicos (epinefrina e noraepinefrina), diminuindo a taxa de despolarização diastólica. Os bloqueadores de classe III, como a amiodarona, bloqueiam canais de potássio e induzem a consequente redução do efluxo desse íon, retardando a repolarização. Esse efeito resulta no prolongamento do potencial de ação, como mostra a continuação da curva de voltagem sobre a área amarela na ilustração. Os agentes bloqueadores de classe IV, como o verapamil, bloqueiam os canais de cálcio, prolongando novamente o potencial de ação (azul), embora esse prolongamento não seja explicitado na figura. Ao estender o potencial de ação, os agentes de classes III e IV retardam a condução nodal, devido ao prolongamento da refratariedade das células afetadas. (De Opie LH; Gersh BJ: Drugs for the Heart, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001.)

os bloqueadores de receptores β, como o propranol, que inibem os efeitos cronotrópicos de neurotransmissores adrenérgicos, entre os quais a epinefrina e a noraepinefrina. Os fármacos de classe III, como a amiodarona, bloqueiam as correntes de potássio repolarizantes e aumentam a duração do potencial de ação (conforme representa a curva preta sobre a área amarela da Fig. 23.10), além de aumentar o período refratário. Por fim, os agentes de classe IV, cujo membro mais importante é o Verapamil, retardam o influxo de íons de cálcio e prolongam o potencial de ação. Além dessas quatro classes de fármacos cardiotrópicos, os glicosídeos digitálicos cardíacos exercem efeitos parassimpáticos-símiles sobre as células do nodo AV, resultando em retardo da condução. Tanto os digitálicos como a amiodarona produzem efeitos inotrópicos marcantes sobre o miocárdio. Dessa forma, ambos são empregados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. No miocárdio lesionado, os digitálicos bloqueiam a ATPase de sódio e potássio, provocando aumentos transitórios dos níveis de íons sódio ao redor do sarcolema e a consequente liberação de íons de cálcio citosólico no sistema T. Como resultado, a contratilidade miocárdica aumenta. As propriedades e ações fundamentais desses fármacos cardiotrópicos são discutidas a seguir.

Glicosídeos digitálicos

Digoxina. Por retardarem a condução no nodo AV, os glicosídeos digitálicos são utilizados no tratamento de arritmias atriais, em particular no flúter e na fibrilação atrial. A estratégia do tratamento é bloquear os sinais rápidos de condução atrial para os ventrículos e, assim, retardar a resposta ventricular. O efeito inotrópico positivo direto que exercem aumenta o débito cardíaco na insuficiência cardíaca.

A digoxina (Tab. 23.1) apresenta uma ação de início rápido (em 1 a 2 horas, quando administrada por via oral) e meia-vida relativamente curta (35 a 40 horas). A maioria dos pacientes excreta cerca de 50 a 75% de uma dose de digoxina, sem modificações, pela urina. Os níveis séricos terapêuticos encontram-se em uma faixa que varia de 0,5 a 2 ng/mL. Altas concentrações desse fármaco são detectadas nos músculos esquelético e cardíaco, bem como no fígado, cérebro e rins.

Digitoxina. Diferente da digoxina, a digitoxina apresenta meia-vida mais longa (4 a 6 dias) e ação de início relativamente mais demorado (dentro de 1 a 4 horas, quando administrada por via oral, com efeito máximo em 8 horas). 90 a 100% de uma dose são absorvidos, sendo que cerca de 95% do composto se liga à proteínas plasmáticas. Os níveis terapêuticos de digitoxina estão na faixa de 9 a 25 ng/mL. Esse fármaco é extensivamente metabolizado no fígado (90%), sendo a digoxina seu metabólito ativo.

Os efeitos colaterais tóxicos produzidos pelos glicosídeos digitálicos incluem distúrbios gástricos, náusea, vômito e arritmias atriais e ventriculares. É fundamental que os níveis de digoxina (ou digitoxina) sejam monitorados de perto e corretamente ao administrar inicialmente o fármaco para o paciente. Como já mencionado, a faixa terapêutica da digoxina varia de 0,5 a 2 ng/mL (i. e., uma faixa de variação estreita). Os níveis tóxicos excedem 2 ng/mL e, portanto, é pequena a diferença existente entre a dose terapêutica e a tóxica.

A toxicidade por digoxina costuma ser tratada com Digibind (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC), que contém fragmentos Fab de ovinos. Esse antídoto pode provocar interferências na determinação dos níveis séricos de digoxina (Valdes, 1998). Foi demonstrado que alguns ensaios determinam apenas os níveis de digoxina "livre", ou seja, que não estão ligados aos fragmentos Fab, inativadores do fármaco. Para outros ensaios, que determinam o conteúdo total de digoxina (i. e., digoxina livre + digoxina ligada ao Fab), é recomendável utilizar ultrafiltrados de soro para determinar os níveis de digoxina livre ou ativa. Alternativamente, considerando que o Digibind pode causar resultados espúrios e incorretos, recomenda-se que os níveis terapêuticos de digoxina sejam determinados 2 a 4 dias após a última dose de Digibind, cuja meia-vida é de 15 a 20 horas.

Procainamida (Pronestil) (Tab. 23.2). Trata-se de um agente antiarrítmico de classe I, útil para o tratamento de arritmias supreventriculares ou ventriculares. Um de seus principais efeitos é o aumento da refratariedade do átrio e a diminuição da excitabilidade miocárdica. A biodisponibilidade da procainamida é de 75 a 95%. Cerca de 15% do total se liga a proteínas plasmáticas e aproximadamente 50% é excretado pelos rins. A meia-vida desse fármaco é de 3,5 horas e seus níveis terapêuticos, em geral, variam de 4 a 10 μg/mL. A *N*-acetilação que dá origem ao metabólito ativo – *N*-acetilprocainamida (NAPA) – é a principal via metabólica de biotransformação. Entre os efeitos colaterais tóxicos observa-se a síndrome lúpus-símile reversível, com títulos elevados de anticorpos ANA, urticária, erupção cutânea, agranulocitose e síndrome nefrótica.

A síndrome lúpus-símile pode ser iniciada pela metabolização da procainamida por leucócitos, que resulta na formação de metabólitos quimicamente reativos. Esses metabólitos, por sua vez, ligam-se de modo covalente às proteínas existentes na membrana de monócitos/

Tabela 23.2 Procainamida

Propósito	Tratamento de arritmias supraventricular ou ventricular
Dose geral para adultos	Oral: 4 g/dia, em doses repartidas, para terapia de manutenção
Biodisponibilidade usual	75 – 95%
Meia-vida	Aprox. 3,5 horas em pacientes com função renal normal
Faixa terapêutica geral	4 – 10 μg/mL
Concentração tóxica geral	> 12 μg/mL
Transporte	Aprox. 15% ligada a proteínas do plasma
Metabolismo	Hepático: *N*-acetilprocainamida (ativa), com $t_{1/2}$ de aprox. 7 horas em pacientes com função renal normal
Eliminação	Aprox. 50 – 60% pela urina, sem modificações
Equilíbrio dinâmico	Mínimo de 12 horas
Mecanismo de ação	Prolongamento do período refratário atrial e diminuição da excitabilidade do miocárdio
Efeitos tóxicos	Síndrome lúpus eritematoso-símile reversível, pulsação irregular, hipotensão, erupção cutânea, agranulocitose

macrófagos e estimulam a produção de autoanticorpos. Além disso, no metabólito de procainamida ligado de modo covalente, a porção que contém aminoácidos terciários é capaz de mimetizar uma parte da molécula de proteína histona e levar à produção de anticorpos ANA anti-histonas (Uetrecht, 1988).

Quinidina. É também um agente antiarrítmico de classe I, assim como a procainamida, utilizado no tratamento de arritmias supraventriculares e ventriculares, bem como de taquiarritmias. Seus principais usos consistem na prevenção da taquicardia ventricular ou de contrações ventriculares prematuras frequentes, além da manutenção do ritmo sinusal após a conversão do flúter ou fibrilação atrial (Valdes, 1998).

A biodisponibilidade da quinidina é de 90 a 100%. Cerca de 85% do conteúdo desse fármaco encontra-se ligado à proteínas plasmáticas. A quinidina é metabolizada em cerca de 60 a 85% no fígado, por intermédio de reações de hidroxilação, com formação de alguns metabólitos ativos. A excreção urinária é de aproximadamente 20%. A meia-vida da quinidina é de 5 a 12 horas e os níveis terapêuticos, em geral, variam entre 2,3 a 5 μg/mL. Níveis séricos máximos são alcançados em 1 a 3 horas. Os efeitos colaterais da quinidina são cinchonismo (vertigem, zumbido, dor de cabeça, distúrbios visuais e desorientação), febre, hepatite e discrasia sanguínea. Também pode haver arritmias ventriculares, bloqueio AV e fibrilação ventricular, levando à síncope e à morte repentina.

Lidocaína (Xilocaína). Outro agente antiarrítmico de classe I tem utilidade adicional como anestésico local. É empregado principalmente como antiarrítmico no controle e prevenção agudos de arritmias ventriculares após um episódio de IM agudo. Uma dose de carga endovenosa de 50 a 100 mg é administrada em 2 a 3 minutos no tratamento de arritmias ventriculares em adultos. Essas doses podem ser repetidas a intervalos de 5 a 10 minutos com 25 a 50 mg, até uma dose máxima de 300 mg ao longo de um período de 1 hora. Após a carga, a infusão prossegue a uma velocidade de 1,4 a 3,5 mg/min em indivíduos com 70 kg. Em crianças, pode ser feita a administração de 0,5 a 1 mg/kg a cada 5 minutos, até o número máximo de 3 doses.

A lidocaína não apresenta percentual elevado de ligação com proteínas plasmáticas nem é significativamente armazenada nos tecidos corporais. Tem meia-vida de cerca de 2 horas e seus níveis séricos terapêuticos variam entre 1,2 e 5,5 μg/mL. Os níveis séricos, geralmente, atingem valores máximos em 5 a 8 horas. 90% de uma dose de lidocaína é metabolizada no fígado por N-dealquilação. A excreção urinária corresponde a 10%. Os efeitos colaterais tóxicos incluem convulsões, coma e depressão respiratória (efeitos sobre o SNC), além de bradicardia e hipotensão.

Propranolol. Trata-se de um fármaco antiarrítmico de classe II, bloqueador de receptores β, que antagoniza os efeitos da epinefrina sobre o coração, artérias e arteríolas da musculatura esquelética e dos brônquios. Exerce grande parte de seus efeitos no nodo AV e é utilizado no tratamento de taquicardia sinusal, taquicardia atrial e arritmias ventriculares. De uma forma geral, o bloqueio dos receptores β_1 provoca aumento do tempo de condução AV e redução da frequência cardíaca, da contratilidade e do débito miocárdicos, bem como diminuição da automaticidade cardíaca. Por ser um agente vasodilador, também é utilizado no tratamento da angina pectoris, hipertensão e doença arterial coronariana sintomática, em particular após eventos de IM agudo. As doses orais variam de 40 a 320 mg/dia, para produção de efeitos antiarrítmicos em indivíduos adultos. A dose máxima de 480 mg/dia é empregada no controle da hipertensão. Também promove redução da pressão sanguínea tanto em posição supina como no indivíduo em pé. A biodisponibilidade do propranolol é de cerca de 30%. A meia-vida desse fármaco é de 3 horas e seus níveis terapêuticos variam de 50 a 100 ng/mL no soro. Níveis máximos são atingidos em aproximadamente 6 horas. Cerca de 93% do fármaco se liga a proteínas. É metabolizado no fígado e 0,5% de seu conteúdo total é excretado pela urina, sem sofrer nenhuma modificação. Entre os efeitos tóxicos produzidos pelo propranolol estão a bradicardia, insuficiência arterial (tipo de Raynaud), hipotensão, bloqueio AV, náusea, vômitos, faringite, broncoespasmo e púrpura trombocitopênica trombótica. É raro haver supressão da medula óssea.

Amiodarona. É o principal agente antiarrítmico de classe III. Prolonga notavelmente o potencial de ação ao bloquear os canais de potássio no músculo cardíaco (Fig. 23.10). Como consequência, o período refratário efetivo também é prolongado. Sua atividade é complexa, pois também implica o bloqueio significativo dos canais de sódio inativos – uma ação de agentes de classe I – e efeitos fracamente adrenérgicos e bloqueadores sobre os canais de cálcio. A indicação do uso da amiodarona consiste no tratamento de arritmias ventriculares em que há risco de vida. Sua dose de carga oral é 1.200 a 1.600 mg/dia, com uma dose de manutenção de 200 a 400 mg/dia. Esse fármaco apresenta uma biodisponibilidade aproximada de 35 a 65%. No decorrer de seu tempo de meia-vida, são detectados dois componentes: um componente rápido (duração de 3 a 10 dias), que envolve cerca de 50% do conteúdo, e outro lento (duração de 25 a 110 dias). Ainda que não muito bem definida, a faixa terapêutica, em geral, varia de 1 a 2,5 μg/mL. Níveis > 2,5 μg/mL produzem efeitos tóxicos, embora essa associação esteja igualmente pouco definida. Cerca de 96% do conteúdo total de amiodarona encontra-se ligado à proteínas plasmáticas. Esse fármaco é metabolizado no fígado e, graças a sua estrutura hidrofóbica (lipossolúvel), extensivamente distribuído ao longo do corpo. Sua excreção é bastante demorada e ocorre pela pele, trato biliar e glândulas lacrimais. Os efeitos tóxicos podem ser profundos e incluem bradicardia sintomática, bloqueio cardíaco, fibrose pulmonar fatal, hepatite, distúrbios envolvendo o campo visual, fotodermatite e – de modo mais significativo – hipotireoidismo. Às vezes, provoca hipertireoidismo.

Verapamil. É um fármaco antiarrítmico de classe IV. Bloqueia canais de cálcio ativos e inativos, que são proeminentes em especial no tecido nodal (particularmente, nodo AV). Suas indicações de uso incluem angina, hipertensão e arritmias supraventriculares. A dose oral é de 120 a 480 mg/dia, repartidas em 3 a 4 doses. Apresenta uma biodisponibilidade aproximada de 10 a 20%. Sua meia-vida é de 2 a 8 horas, mas aumenta para 4,5 a 12 horas após a administração repetida das doses orais. A faixa terapêutica geral vai de 80 a 400 ng/mL, embora sua definição seja precária. Em torno de 90% do total de verapamil liga-se à proteínas plasmáticas, sendo que o fármaco é extensivamente metabolizado no fígado. Como resultado dessa metabolização, é produzido um metabólito ativo – o norverapamil. Aproximadamente 75% dos componentes ativos são eliminados pelo rim e os 25% restantes são excretados via trato GI. Os efeitos tóxicos incluem hipotensão, fibrilação ventricular, constipação e edema periférico.

Anticonvulsivos

Os anticonvulsivos são utilizados no tratamento de distúrbios convulsivos, em particular a epilepsia (grande mal e pequeno mal), bem como de distúrbios psicomotores e outros tipos especializados de distúrbios, como o tique doloroso (neuralgia trigeminal). Os mecanismos de ação desses fármacos ainda não foram elucidados, no entanto, parece que todos bloqueiam o influxo de sódio para os neurônios que apresentam danos na membrana celular, conforme mostra a Figura 23.11. A única exceção possível é o fenobarbital. Vários desses agentes, em especial a fenitoína, também bloqueiam influxos de cálcio secundários e, assim, aparentemente inibem o disparo rápido nessas células. Um efeito associado ao fenobarbital, e possivelmente também à fenitoína, é a estabilização da membrana por meio da intercalação (Fig. 23.11). Diversos anticonvulsivantes são efetivos contra ataques de grande mal, porém não produzem nenhum efeito sobre os ataques de pequeno mal. Contra essa condição, *são efetivos apenas a etosuximida (Zarontin) e o ácido valproico (Depakote)*. Esses fármacos, portanto, apresentam mecanismos de ação semelhantes e especificidades diferentes.

Fenobarbital. (Tab. 23.3) Trata-se de um barbitúrico de ação prolongada, utilizado no tratamento de ataques tônico-clônicos generalizados e de ataques parciais simples com sintomas motores ou somatossensoriais. Também é empregado no tratamento da ansiedade e da insônia. Não é utilizado no tratamento de ataques convulsivos com ausência (i. e., pequeno mal), os quais podem ser exacerbados pelo composto. Também não é empregado no tratamento de convulsões parciais complexas, pois os pacientes respondem de modo insatisfatório. O fenobarbital pode ser administrado para tratar sintomas de abstinência em bebês nascidos de mães viciadas em opiáceos ou barbitúricos. Como intensifica a metabolização da bilirrubina ao promover indução enzimática, tem sido empregado no tratamento de casos de hiperbilirrubinemia congênita (icterícia não obstrutiva e não hemolítica familiar).

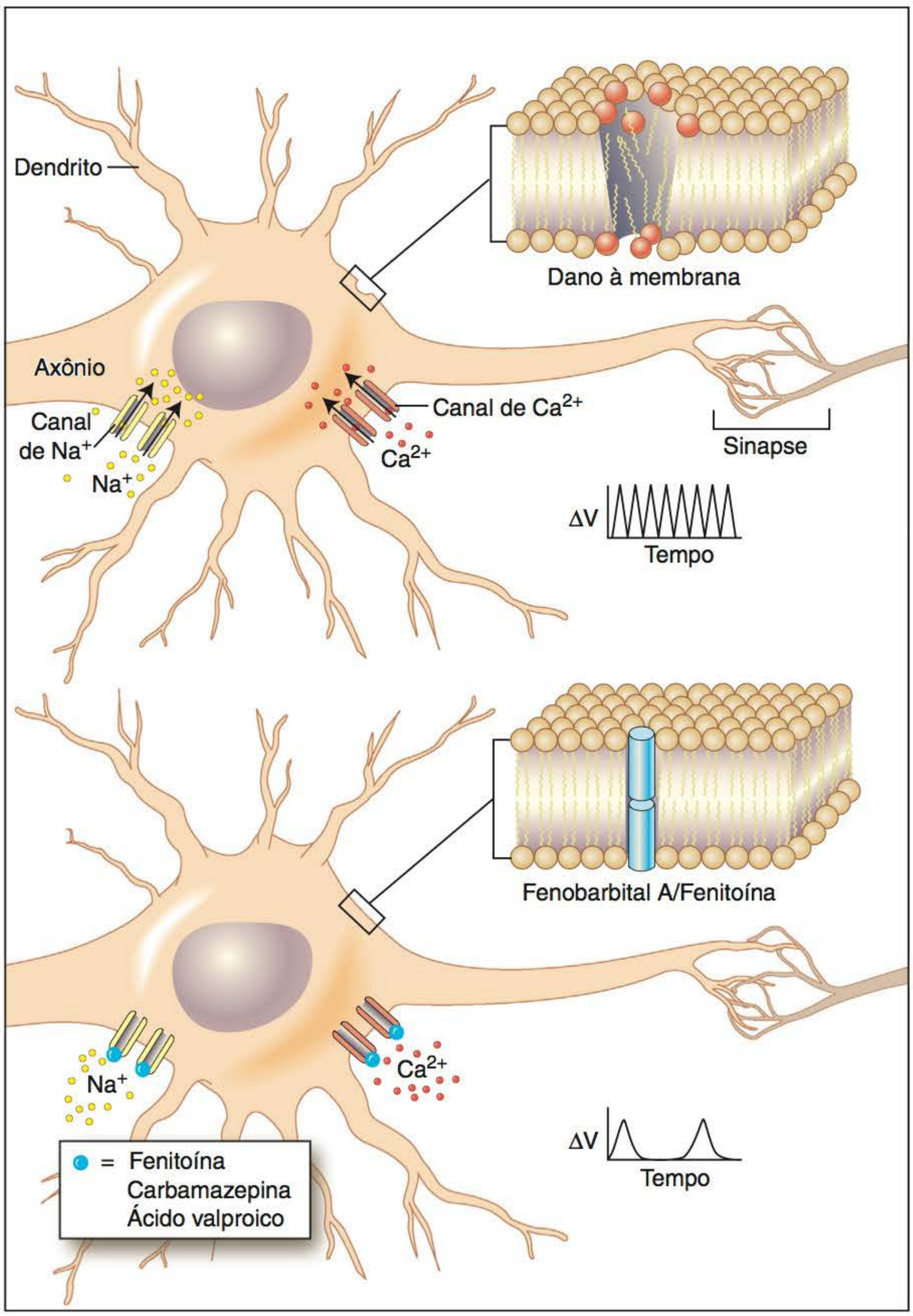


Figura 23.11 Efeitos dos anticonvulsivantes sobre os neurônios. *Figura de cima*: as membranas neuronais danificadas, como ilustra o corte à direita da figura, resulta em influxos de sódio (círculos amarelos) e cálcio (círculos vermelhos) via seus respectivos canais, com a consequente produção de disparos repetidos representada pela curva de voltagem-tempo localizada do lado direito da mesma figura. *Figura de baixo*: anticonvulsivantes como fenitoína (Dilantina), carbamazepina (Tegretol) e ácido valproico (Depakote), representados pelos pequenos círculos azuis, bloqueiam os canais de sódio e cálcio e, como resultado, diminuem substancialmente a frequência dos disparos, conforme representado na curva voltagem-tempo localizada à direita da figura. Acredita-se que tanto a fenitoína como o fenobarbital (cilindros azuis) estabilizam a membrana neuronal danificada, conforme ilustra o corte esquematizado à direita, na parte superior da figura debaixo.

Além de induzir enzimas microssomais hepáticas, acredita-se que os barbitúricos estabilizam membranas danificadas (Fig. 23.11), bem como elevam o limiar da despolarização da membrana neuronal. Pacientes adultos com ansiedade são tratados com uma dose oral de 30 a 120 mg de fenobarbital/dia, repartida em duas doses. Para a indução do sono em paciente adultos, costuma ser administrada uma dose de 100 a 320 mg/dia. No controle de crises convulsivas, adultos são tratados com doses repartidas de 100 a 200 mg/dia, enquanto as crianças, em geral, recebem 30 a 100 mg de composto/dia.

O fenobarbital apresenta meia-vida longa de 4 a 6 dias. As doses orais são quase totalmente absorvidas (biodisponibilidade de 90 a 100%) e a concentração sérica ótima para o controle dos ataques é, em geral, 15 a 30 μg/mL. 40 a 60% do composto é metabolizado no fígado, enquanto 10 a 40% pode ser eliminado pela urina sem sofrer modificações. Em torno de 40 a 60% do conteúdo total do composto está ligado à proteínas plasmáticas e seu principal sítio de armazenamento é o cérebro. Um estado de equilíbrio dinâmico é atingido em 14 a 21 dias. Os efeitos colaterais tóxicos são nistagmo, ataxia, estupor, depressão respiratória, coma e hipotensão. Os barbitúricos são contraindicados para pacientes que sofrem de porfiria intermitente aguda (i. e., deficiência parcial da deaminase de porfobilinogênio), pois intensificam a síntese da sintetase do ácido Δ-aminolevulínico e, consequentemente, a produção de intermediários da via do heme no fígado.

Fenitoína (Dilantina). É utilizada no tratamento de ataques tônico-clônicos generalizados, ataques parciais simples e ataques parciais complexos (Tab. 23.4). É ineficaz no tratamento do mioclônus, dos ataques com ausência (pequeno mal) e dos ataques atônicos. Usualmente, é administrada por via endovenosa, somando-se à administração endovenosa de diazepam, na eliminação do *status* epilético. De forma notável, a fenitoína não produz efeitos aparentes em neurônios em repouso ou em neurônios que disparem normalmente. É, portanto, específica aos focos epiletogênicos existentes no SNC (Yaari, 1986). Como será discutido adiante, a carbamazepina (Tegretol) exerce efeitos similares. Dados existentes sobre o mecanismo de ação desse fármaco sugerem fortemente que a fenitoína bloqueia influxos de

Tabela 23.3 Fenobarbital

Propósito	Tratamento de ataques convulsivos tônico-clônicos, ataques convulsivos parciais simples, ansiedade, insônia
Dose geral para adultos	Oral: 100 – 200 mg/dia, para controle dos ataques convulsivos; 30 – 120 mg/dia para ansiedade; 100 – 320 mg/dia para indução do sono
Biodisponibilidade usual	Aprox. 90 – 100%
Meia-vida	Aprox. 5 – 6 dias em adultos; aprox. 3 – 4 dias em crianças
Faixa terapêutica geral	15 – 30 μg/mL para controle de epilepsia
Concentração tóxica geral	> 40 μg/mL, embora possa vir a desenvolver tolerância
Transporte	Aprox. 40–60% ligado a proteínas do plasma
Metabolismo	Aprox. 75% hepático: *p*-hidroxifenobarbital, inativo
Eliminação	Aprox. 25% pela urina, sem modificações
Equilíbrio dinâmico	Aprox. 14–21 dias
Mecanismo de ação	Estabiliza membranas danificadas e aumenta o limiar de despolarização da membrana neuronal
Efeitos tóxicos	Sonolência, depressão, depressão respiratória, coma, sedação, hipotensão; a depressão respiratória pode ser causada por uma administração endovenosa rápida

Tabela 23.4 Fenitoína (Dilantina)

Propósito	Tratamento de ataques convulsivos tônico-clônicos, ataques convulsivos parciais simples, ataques convulsivos parciais complexos
Dose geral para adultos	Oral: 300 – 400 mg/dia, dose de manutenção
Biodisponibilidade usual	Variável: 30 – 95%
Meia-vida	24 ± 12 horas, e dependente da dose
Faixa terapêutica geral	10 – 20 μg/mL
Concentração tóxica geral	> 20 μg/mL
Transporte	Aprox. 90 – 95% ligada a proteínas do plasma
Metabolismo	Hepático: 5-(*p*-hidroxifenil)5-fenilidantoína, inativo
Eliminação	Aprox. 5% pela urina, sem modificações
Equilíbrio dinâmico	Aprox. 7 – 8 dias
Mecanismo de ação	Parece bloquear os influxos de sódio e cálcio para neurônios do SNC que despolarizam repetidamente
Efeitos tóxicos	Nistagmo, ataxia, diplopia, sonolência, coma; uma administração endovenosa rápida pode provocar colapso cardiovascular e/ou depressão do SNC

sódio e cálcio para dentro dos neurônios que despolarizam repetidamente no SNC e também para neurônios parcialmente despolarizados. Ao reduzir o influxo de sódio e cálcio para essas células, também reduz sua excitabilidade e prolonga o período refratário (Yaari, 1986). De fato, a fenitoína parece se ligar de modo seletivo aos canais de sódio de disparo rápido durante seus estados refratários e, assim, prolongar seus períodos refratários (Bazil, 1998). Essa constatação ajuda a explicar sua capacidade de bloquear apenas neurônios que estejam disparando rápida e repetidamente.

Embora a dose média de manutenção diária para adultos seja de 300 a 400 mg, essa dose deve ser ajustada de acordo com a resposta do paciente e a concentração do fármaco no soro. A concentração sérica terapêutica usual é de 10 a 20 μg/mL, sendo que o estado de equilíbrio dinâmico é atingido em 5 a 10 dias (para o platô; ver a Fig. 23.9). Sua meia-vida no soro em geral é de 24 horas, no entanto depende da dose. Portanto, a excreção não é um processo de primeira ordem. A fenitoína é armazenada no cérebro, metabolizada no fígado (95%) e encontrada sob a forma ligada a proteínas plasmáticas em cerca de 90 a 95%. Tanto a aspirina como a fenilbutazona são capazes de deslocar a fenitoína ligada à albumina sérica e podem aumentar significativamente sua concentração sérica. Assim como ocorre com o fenobarbital, a fenitoína é um indutor enzimático relativamente potente e, por esse motivo, certos antibióticos, anticoagulantes orais, quinidina e contraceptivos orais podem ser mais rapidamente metabolizados, com consequente diminuição de sua efetividade.

Como a relação existente entre as concentrações séricas e a dose diária não é linear, pequenos aumentos da dose podem resultar em grandes aumentos das concentrações séricas terapêuticas. Os sintomas de toxicidade, em geral, se manifestam diante de concentrações séricas acima de 20 μg/mL. Os efeitos colaterais tóxicos incluem nistagmo, ataxia, estupor e coma. Arritmias podem ser produzidas por uma rápida administração endovenosa.

Fosfenitoína. Trata-se de uma formulação parenteral hidrossolúvel da fenitoína que é rapidamente convertida (meia-vida de 8 – 15 minutos) a fenitoína *in vivo*. Sua meia-vida independe da concentração plasmática e suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e clínicas são idênticas às da fenitoína. Comparado à fenitoína endovenosa, esse pró-fármaco oferece melhor flexibilidade e tolerabilidade ao paciente, sendo indicado para o tratamento de ataques convulsivos parciais ou generalizados em adultos nos casos em que a administração endovenosa é indicada (Bazil, 1998).

Primidona (Mysoline). É um fármaco utilizado no tratamento de ataques tônico-clônicos generalizados, ataques parciais simples e ataques parciais complexos. Sua estrutura química está bastante relacionada à estrutura básica dos barbitúricos. Ao ser metabolizada no fígado, dá origem a dois metabólitos ativos: fenobarbital e feniletilmalonamida (PEMA). Assim, uma parte dos efeitos anticonvulsivos que exerce se deve à atividade do fenobarbital. Diferente deste, contudo, a primidona pode aumentar o limiar de despolarização das membranas junto ao SNC.

As doses orais variam de 250 mg/dia a 2 g diárias em doses repartidas. É rápida e totalmente absorvida (100%), sendo que as doses terapêuticas usuais equivalem a concentrações séricas de 5 a 21 μg/mL. O estado de equilíbrio dinâmico é alcançado em 4 a 7 dias e sua meia-vida é de aproximadamente 12 horas. A frequência com que se liga às proteínas plasmáticas é baixa (20%), de modo que a maioria do composto permanece livre no soro e apenas uma pequena parcela é armazenada nos tecidos corporais.

A sedação é um de seus efeitos tóxicos comuns. Outros são tontura, ataxia e erupções cutâneas. A primidona, assim como o fenobarbital, é contraindicada para pacientes com porfiria intermitente aguda.

Etosuximida (Zarontin). Esse é o fármaco de escolha para o tratamento de ataques convulsivos com ausência (pequeno mal), que não são acompanhados de outros tipos de convulsões. Pelo menos inicialmente, é preferível ao ácido valproico (ver adiante), devido à séria hepatotoxicidade que ele pode causar (ainda que raramente). A etosuximida pode deprimir o córtex motor e reduzir a frequência de disparos neuronais, porém seu sítio molecular de ação permanece pouco conhecido.

A dose oral para adultos costuma ser de 500 a 1.000 mg/dia. Sua absorção é bem rápida e total (100%). As concentrações séricas atingem o pico em 1 a 4 horas, enquanto o estado de equilíbrio dinâmico é atingido em 8 a 10 dias. A concentração sérica terapêutica usual varia de 40 a 100 μg/mL, mas pode chegar a 170 a 190 μg/mL em crianças. Em adultos, a meia-vida no soro, em geral, é de 60 horas. Em crianças, essa meia-vida é de 30 horas. A etosuximida permanece essencialmente livre no soro, sem se ligar às proteínas. É metabolizada principalmente no fígado (60–90%), transformando-se em desmetilmetsuximida. Distúrbios envolvendo o trato GI estão entre os efeitos tóxicos mais comuns: náusea, vômito e sofrimento gástrico. Outros efeitos adversos incluem tontura e ataxia. São raros os relatos de efeitos colaterais mais graves, tais como SLE (lúpus eritematoso sistêmico), anemia aplásica e pancitopenia.

Carbamazepina (Tegretol) (Tab. 23.5). É um fármaco antiepilético primário, utilizado no tratamento de ataques tônico-clônicos generalizados, ataques parciais simples e parciais complexos, bem como em ataques envolvendo combinações de diferentes tipos de convulsão. Por exacerbar ataques com ausência (pequeno mal), mioclônicos e atônicos podem ser exacerbados. Também é utilizado no tratamento do tique doloroso (neuralgia trigeminal) e da neuralgia glossofaríngea, sendo de fato o fármaco de escolha nesses casos.

A carbamazepina é um composto tricíclico (i. e., iminostilbeno), quimicamente relacionado ao antidepressivo tricíclico imipramina.

Tabela 23.5 Carbamazepina (Tegretol)

Propósito	Tratamento de ataques convulsivos tônico-clônicos generalizados, ataques convulsivos parciais simples, ataques convulsivos parciais complexos; neuralgias trigeminal e glossofaríngea
Dose geral para adultos	Oral: 0,8 – 1,2 g/dia como manutenção para controle de ataques convulsivos; 0,2 – 1,2 g/dia para neuralgia
Biodisponibilidade usual	70%
Meia-vida	No início, aprox. 35 horas; aprox. 8 – 20 horas após 3 – 4 semanas de administração
Faixa terapêutica geral	4 – 12 µg/mL
Concentração tóxica geral	> 12 µg/mL
Transporte	60 – 70% ligada a proteínas do plasma
Metabolismo	Hepático: carbamazepina-10,11-epóxido (ativo); carbamazepina-10,11-transdi-hidrodiol (inativo)
Eliminação	1 – 2% pela urina, sem modificações
Equilíbrio dinâmico	3 – 7 dias
Mecanismo de ação	Diminui os influxos de sódio e cálcio para neurônios do SNC que despolarizam repetidamente; reduz a transmissão sináptica excitatória no núcleo trigeminal espinhal
Efeitos tóxicos	Sonolência, ataxia, tontura, náuseas, vômitos, movimentos involuntários, reflexos anormais, pulsação irregular

Acredita-se que uma redução da transmissão excitatória sináptica no núcleo trigeminal espinhal constitua a base da ação antineuralgênica desse fármaco. Sua ação antiepilética é bastante semelhante à da fenitoína, ou seja, diminui os influxos de sódio e cálcio em neurônios hiperexcitáveis (Yaari, 1986; Bazil, 1998).

Doses orais de carbamazepina são completamente absorvidas e a dose de manutenção usual para adultos é 0,8 a 1,2 g/dia. 98% do conteúdo desse fármaco é transformado no fígado em dois metabólitos ativos: as formas 10,11-epoxida e 10,11-di-hidroxi carbamazepina. A concentração sérica terapêutica usualmente é 4 a 12 µg/mL, sendo que o estado de equilíbrio dinâmico é alcançado em 3 a 4 dias. A meia-vida do Tegretol no soro é de 8 a 20 horas (decorridas 3 a 4 semanas da administração), sendo que 60 a 70% do fármaco se liga às proteínas plasmáticas. As reações tóxicas mais comuns ao uso desse composto são tontura, ataxia, vertigem, náusea e vômito, além de desmaios. Embora seja raro, é possível ocorrer reações hematológicas e estas, por sua vez, podem ser graves (anemia aplásica, trombocitopenia e agranulocitose).

Ácido valproico (Depakene). É empregado no tratamento de ataques tônico-clônicos generalizados, com ausência, mioclônicos e atônicos. É ineficaz no tratamento de espasmos infantis. Apesar de seu mecanismo de ação ainda não estar definitivamente estabelecido, o ácido valproico é conhecido por aumentar a atividade do sistema inibitório mediado pelo GABA. Além disso, sua ação é similar à ação da fenitoína e da carbamazepina, no sentido que todos prolongam o estado refratário dos canais de sódio (Hardman, 2001). A absorção do ácido valproico é rápida e completa. Para adultos, a dose de manutenção diária média é de 15 a 30 mg/kg, quando o composto administrado sozinho, ou 30 a 45 mg/kg, quando empregado de forma combinada a outros agentes antiepiléticos. A concentração sérica terapêutica habitual é de 50 a 100 µg/mL, enquanto o estado de equilíbrio dinâmico é alcançado em 1 a 4 dias. A maior parte do fármaco (90 a 100%) é metabolizada no fígado. No fígado, um elevado percentual (90%) de todo o ácido valproico se liga à proteínas plasmáticas. Sua meia-vida no soro é de 8 a 15 horas.

Foi demonstrado que o ácido valproico produz efeitos teratogênicos em animais de experimentação. Tais efeitos incluem anomalias relacionadas ao desenvolvimento e defeitos esqueléticos. Por esse motivo, o ácido valproico deve ser utilizado com cautela em pacientes grávidas. Entre os efeitos tóxicos que apresenta, estão sedação, distúrbios gástricos, reações hematológicas, ataxia, sonolência e coma. Foram descritos casos raros de hepatotoxicidade fatal, bem como de pancreatite severa ou fatal (ver Sztajnkrycer, 2002).

Anticonvulsivos recentes

Topiramato, lamotrigina (Lamictal), gabapentina (Neurontina) e felbamato são quatro agentes anticonvulsivos, recentemente aprovados para uso nos EUA, que estão sendo administrados em pacientes cujas respostas a anticonvulsivos mais bem estabelecidos situam-se abaixo da reposta considerada ótima. O topiramato e a lamotrigina são empregados como adjuvantes no tratamento de ataques parciais em adultos. A meia-vida do topiramato é de aproximadamente 21 horas, sendo que em média 15% do fármaco se liga a proteínas plasmáticas. A lamotrigina apresenta meia-vida variável, dependendo de seu uso monoterápico ou com um agente indutor.

Cerca de 55% da lamotrigina é encontrada sob a forma acoplada a proteínas. A gabapentina também é utilizada como adjuvante no tratamento de ataques parciais e tem meia-vida de 5 a 7 horas, com menos de 3% do total ligado a proteínas. As faixas terapêuticas e concentrações tóxicas desses fármacos ainda precisam ser determinadas. Os efeitos colaterais comuns produzidos pelo topiramato são fadiga, retardo psicomotor, sonolência e dificuldades de concentração e de fala. Também pode causar glaucoma angular agudo (Asconape, 2002). A lamotrigina tem como efeitos colaterais mais comuns ataxia, depressão do SNC, diplopia, tontura, anormalidades do raciocínio, náusea, irritação, erupções cutâneas e sonolência. Um dos principais efeitos tóxicos desse fármaco é a síndrome de Stevens-Johnson (Warner, 1998; Brodtkorb, 1998). Os efeitos adversos típicos da gabapentina são ataxia, tontura, fadiga e sonolência. Constatou-se que o felbamato está associado a uma incidência relativamente alta de anemia aplásica e insuficiência hepática (Asconape, 2002). Por esse motivo, sua utilização foi limitada aos casos em que o paciente falha em responder a outros tratamentos e os potenciais benefícios clínicos proporcionados pelo felbamato se sobrepõem aos potenciais riscos clínicos (Bazil, 1998; Brodtkorb, 1998; Ascopenape, 2002).

Antiasmáticos

A asma é uma forma de doença obstrutiva pulmonar crônica (COPD, *chronic obstructive pulmonar disease*) cujas causas são variadas, sendo que algumas são de natureza alérgica. Como indica a Figura 23.12, no cerne da asma está a broncoconstrição, que decorre da contração das fibras de musculatura lisa existentes nos bronquíolos. Essa contração pode ser induzida por processos alérgicos em que a inflamação acarreta a liberação de histamina a partir dos mastócitos. A histamina, ao se ligar aos receptores H_1 existentes nas células de músculo liso, induz a formação de segundos mensageiros, como o inositol trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG), que promovem a estimulação definitiva da contração muscular (Fig. 23.12). Opondo-se a esse processo, a ligação da epinefrina aos receptores β_2 resulta na estimulação da adenilato ciclase, com consequente indução da síntese de cAMP – um segundo mensageiro que bloqueia a contração muscular. Como parte de um processo regulatório, a fosfodiesterase induz hidrólise do cAMP e, assim, ajuda a anular a inibição da contração do músculo liso.

Como indica a Figura 23.12, existem ao menos três estratégias terapêuticas distintas para bloquear a contração da musculatura lisa bronquiolar. A primeira consiste em bloquear a liberação de histamina a partir dos mastócitos, por meio da utilização de fármacos como a cromolina.

Este não é o único processo inflamatório capaz de induzir a broncoconstrição asmática. Outros componentes inflamatórios também podem ser ativos na indução desse efeito. Tais componentes são resumidos na Figura 23.13, que destaca os leucotrienos e as prostaglandinas como agentes significativamente proeminentes na promoção da broncoconstrição. Foi demonstrado que os agentes anti-inflamatórios orais, como os inibidores de leucotrienos zileuton e zafirlukast, são eficazes na contraposição desses efeitos na asma. Tais agentes interrompem as vias de leucotrieno/ácido araquidônico envolvidas na inflamação e na reatividade brônquica. De forma significativa, demonstrou-se que os esteroides são altamente efetivos em bloquear os broncoespasmos. Como se observa na Figura 23.13, tais agentes promovem uma potente inibição da produção de leucotrienos, prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (não indicado na Fig. 23.13), pela inibição da fosfolipase A_2 e da ciclo-oxigenase 2 (a isoforma induzida da ciclo-oxi-

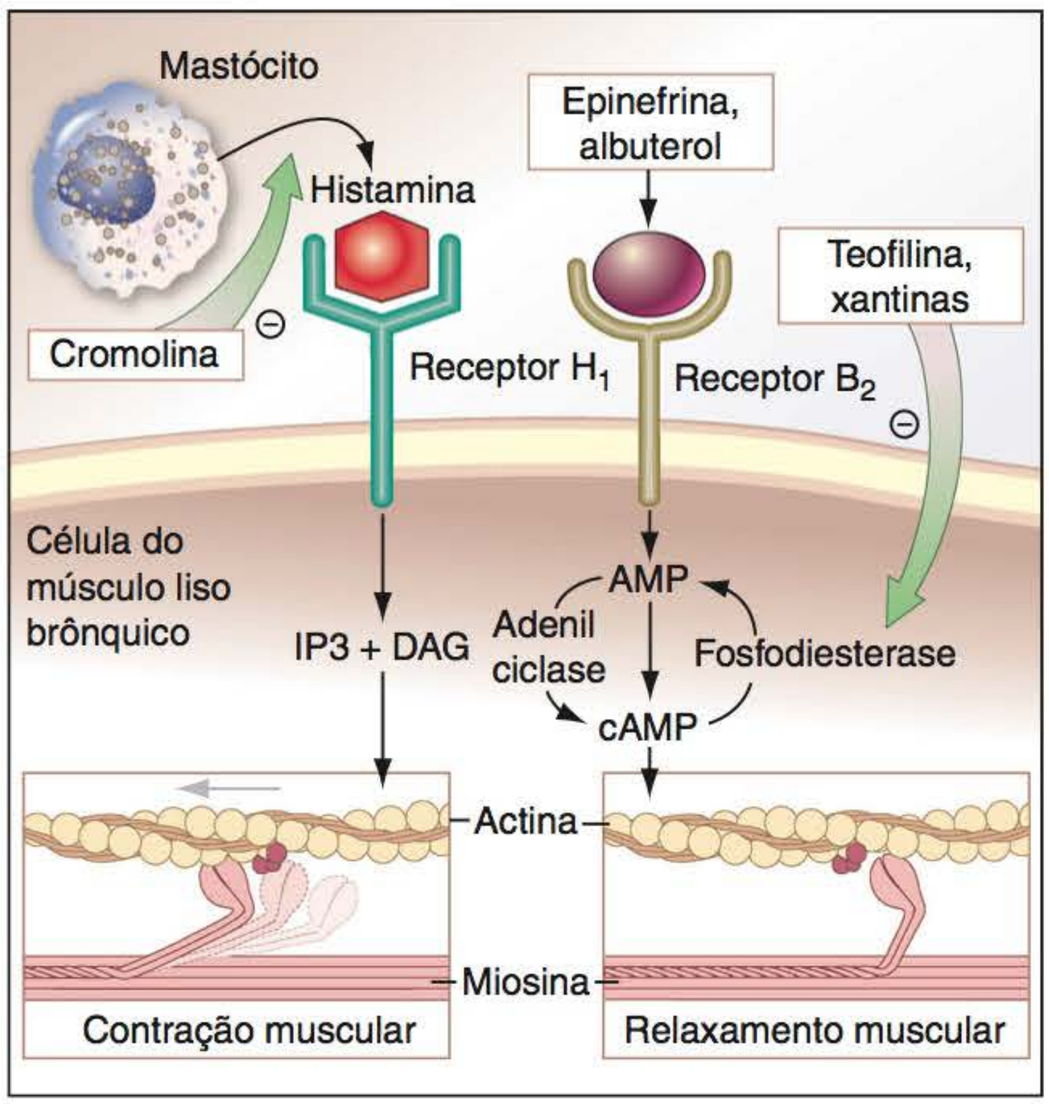


Figura 23.12 Resumo dos mecanismos de ação dos agentes antiasmáticos. A figura mostra três mecanismos básicos. Observe que todos os três mecanismos resultam na promoção do relaxamento do músculo liso nas vias aéreas menores, ou seja, menos pontes cruzadas de actina-miosina, conforme ilustrado na parte inferior da figura. À esquerda, a liberação de histamina a partir dos mastócitos em resposta à estimulação alergênica resulta na formação de complexos histamina-receptor H_1 que promovem a ativação de uma via de transdução de sinal em que o inositol trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG), ambos mensageiros secundários, são induzidos e promovem a contração da musculatura lisa. A liberação de histamina é bloqueada ("–" ao lado da seta verde) pelo fármaco cromolina. Na região central da figura, a epinefrina e o albuterol formam complexos com β-receptores. Esses complexos induzem atividade de adenil ciclase e, em consequência, a síntese de AMP cíclico (na ilustração, cAMP). Esse segundo mensageiro *bloqueia* a contração dos músculo liso. À direita da figura, foram representadas xantinas, como a teofilina, bloqueando ("–" ao lado da seta verde) a enzima fosfodiesterase, com o consequente prolongamento da duração do cAMP. Este, por sua vez, pode atuar por períodos prolongados no bloqueio da contração do músculo liso.

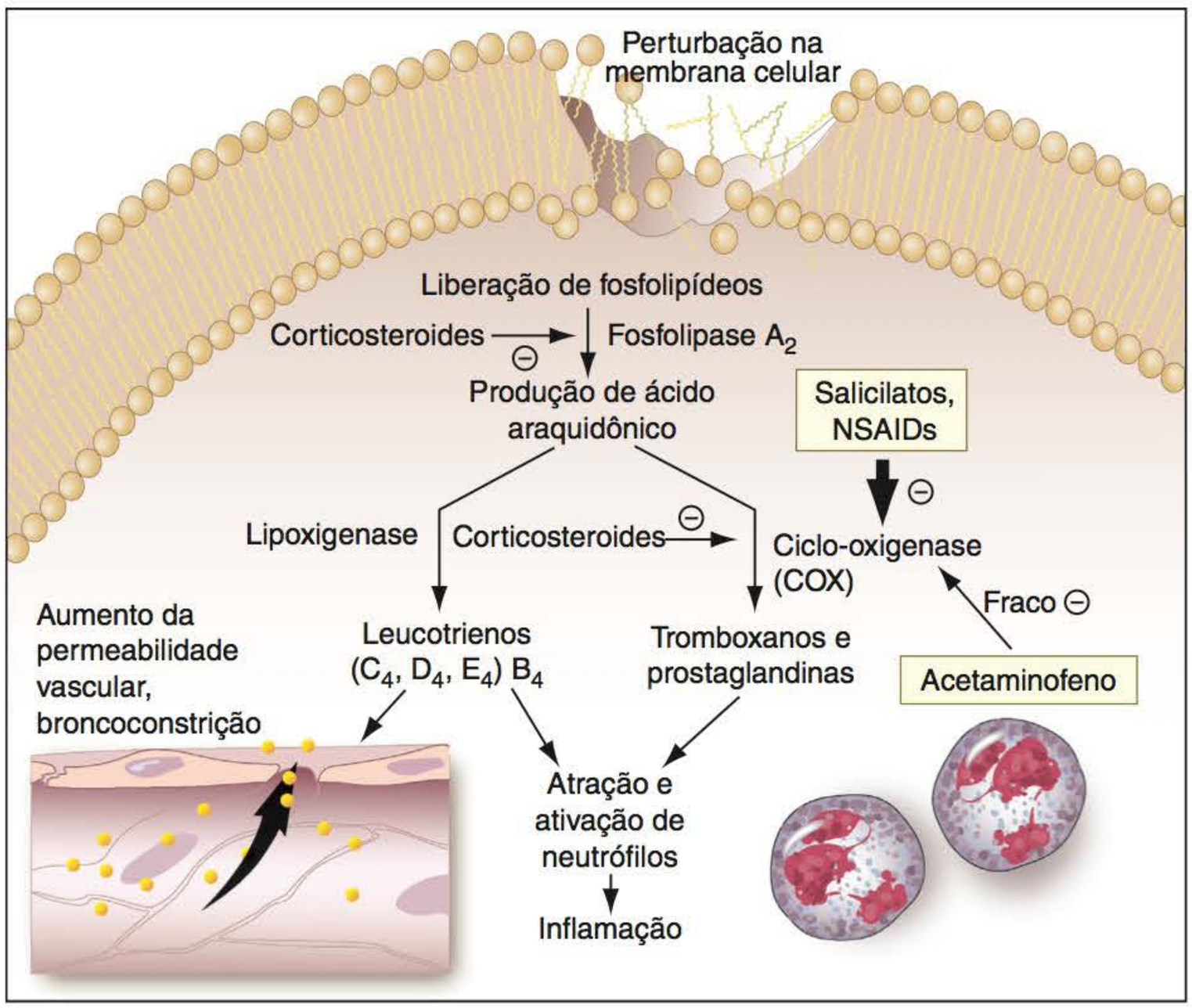


Figura 23.13 Mecanismos de ação dos fármacos anti-inflamatórios. A ilustração mostra que o evento fundamental na morte celular induzida pela inflamação é o dano à membrana das células, que resulta na ativação da fosfolipase A_2. Essa enzima promove a síntese de ácido araquidônico. Este é um substrato para duas enzimas críticas: lipoxigenase, que promove a síntese de leucotrienos, e ciclo-oxigenase (COX), que promove a síntese de tromboxanos e prostaglandinas. Ambas as classes de compostos promovem quimiotaxia para neutrófilos (representada à direita, na parte inferior da figura), com resultante fagocitose das células danificadas e continuação da resposta inflamatória destrutiva. Os leucotrienos, por si só, induzem aumento da permeabilidade vascular, provocando intensificação da migração de neutrófilos em direção às células lesadas, bem como contração da musculatura lisa (à esquerda e abaixo, na figura). Nessa ilustração, corticosteroides, como a prednisona e a cortisona, bloqueiam ("–" ao lado das setas) as duas enzimas-chave dessa cadeia de transdução de sinal inflamatória: fosfolipase A_2 e COX. Acredita-se que os corticosteroides também estabilizam membranas danificadas. Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) bloqueiam principalmente a COX; o acetaminofeno (Tylenol) bloqueia predominantemente a COX localizada no sistema nervoso central e exercem um bloqueio fraco da COX periférica. Portanto, atua mais como agente antipirético do que como fármaco anti-inflamatório.

genase). Esteroides lipossolúveis, em especial na forma de aerossóis, que evitam efeitos colaterais sistêmicos, estão entre os agentes mais eficazes contra a asma. Tais agentes incluem beclometasona, flunisolida e triancinolona. Agonistas β_2 lipossolúveis de ação prolongada, como formoterol e salmeterol, também encontram-se disponíveis e o efeito duradouro parece ser devido à capacidade desses agentes de se dissolverem na membrana da musculatura lisa bronquial.

A segunda estratégia empregada nas crises asmáticas severas, consiste na aplicação de uma injeção subcutânea de epinefrina. Como resultado, há um alívio eficaz da broncoconstrição com base aguda, por meio do mecanismo ilustrado na Figura 23.12. Para um tratamento crônico, são utilizados agentes que se ligam aos receptores β_2, como albuterol (Proventil, Ventolin) e terbutalina (Brethine), que são efetivos em reverter esse processo através do mesmo mecanismo. Ambos os agentes estimulam a produção de cAMP, conforme mostra a via central ilustrada na Figura 23.12. A terceira estratégia, como é possível notar pela observação da Figura 23.12, envolve o bloqueio da fosfodiesterase por fármacos como a teofilina e as xantinas. Essa estratégia visa prevenir a hidrólise do cAMP e permitir, assim, a inibição contínua da broncoconstrição.

Embora ainda seja comumente prescrita, a teofilina vem sendo substituída por outros agentes antiasmáticos, como os esteroides e os inaladores bronquiais adrenérgicos, que são utilizados principalmente em casos de crises asmáticas agudas e subagudas em pacientes adultos.

Esses últimos agentes, por sua vez, apresentam menos efeitos colaterais tóxicos (Pesce, 1998). Todavia, a realização de ensaios laboratoriais para determinação dos níveis terapêuticos de agentes antiasmáticos tem se restringido apenas à teofilina, em grande parte porque sua faixa de concentrações terapêuticas é estreita e seus potenciais efeitos colaterais são graves, conforme se discute a seguir.

Teofilina. (Tab. 23.6) Esse fármaco é utilizado como agente broncodilatador no tratamento da asma de grau moderado ou severo, sempre visando a prevenção das crises e para tratamento das exacerbações sintomáticas. A teofilina também exerce ações adicionais, como vasodilatação, diurese, efeitos inotrópicos cardíacos positivos e estimulação da contração diafragmática. Devido a esse último efeito estimulador, a teofilina pode produzir algum benefício para pacientes com enfisema. Esse fármaco também é efetivo no tratamento da apneia primária da prematuridade, em que a ausência de esforço respiratório dura mais de 20 segundos em recém-nascidos. Acredita-se que o mecanismo de ação desse efeito seja decorrente da estimulação medular promovida pelo fármaco. Foi constatado que a cafeína é mais efetiva para essa finalidade por apresentar menor grau de toxicidade (Pesce, 1998). No tratamento da asma, a dose é calculada com base no peso corporal e depende da via de administração e da idade do paciente. Como o índice terapêutico (i. e., a proximidade entre os níveis tóxicos e os níveis terapêuticos) da teofilina é baixo, é essencial que tais cálculos sejam realizados com atenção. É necessário monitorar cuidadosamente a resposta do paciente e os níveis séricos de teofilina, pois a velocidade de metabolização desse fármaco varia para cada paciente. Os níveis de teofilina podem ser estimados em até 1 hora após a administração endovenosa, 1 a 2 horas após a administração oral, ou geralmente em 3 a 8 horas após a administração por liberação lenta. Para tanto, amostras de sangue devem ser obtidas da maneira correta.

Sua concentração sérica terapêutica é 10 a 20 μg/mL. A meia-vida é de aproximadamente 8,7 horas em indivíduos adultos não fumantes ou 5,5 horas em adultos fumantes. Entretanto, o tempo de meia-vida pode variar bastante de um indivíduo para outro, indicando mais uma vez a necessidade de supervisionar o paciente e de monitorar as concentrações séricas do fármaco individualmente. Cerca de 60% do fármaco liga-se à proteínas e em torno de 90% é metabolizado no fígado, com produção de cafeína inativa. A teofilina atravessa a placenta e pode produzir efeitos teratogênicos em pacientes grávidas. Outros efeitos adversos comuns associados a esse fármaco são taquicardia, arritmias, convulsões e sangramento GI.

Tabela 23.6 Teofilina

Propósito	Tratamento e prevenção da asma de grau moderado a severo
Dose geral para adultos	Depende do peso corporal, da via de administração, da idade e da condição do paciente
Biodisponibilidade usual	Varia de acordo com a forma, sendo quase 100% para líquidos orais e comprimidos sem revestimento
Meia-vida	Varia: 8–9 horas em adultos não fumantes; 5–6 horas em adultos fumantes; 3–4 horas em crianças, porém a variação pode ser ampla
Faixa terapêutica geral	10–20 μg/mL
Concentração tóxica geral	> 20 μg/mL
Transporte	60% ligada a proteínas do plasma
Metabolismo	Hepático: cafeína; ácido 1,3-dimetilúrico; ácido 1-metilúrico; 3-metilxantina
Eliminação	10% pela urina, sem modificações
Equilíbrio dinâmico	5 meias-vidas; 90% do equilíbrio dinâmico é alcançado em 3 meias-vidas
Mecanismo de ação	Aumenta o cAMP intracelular ao inibir a fosfodiesterase; essa ação provoca o relaxamento do músculo liso das vias aéreas brônquicas e dos vasos sanguíneos pulmonares
Efeitos tóxicos	Hipotensão, síncope, taquicardia, arritmias, ataques convulsivos, sangramento GI

Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos

Conforme observado na seção anterior e ilustrado na Figura 23.13, a liberação de fosfolipídeos, entre outros eventos, é induzida por danos causados à membrana celular a partir de imunocomplexos, trauma ou outro tipo de estresse. Os fosfolipídeos liberados, por sua vez, servem de substratos para a fosfolipase A_2 produzir ácido araquidônico. Este é um composto de importância central por ser convertido tanto em leucotrienos, por ação da lipoxigenase, como em tromboxano e prostaglandinas, por ação da ciclo-oxigenase (COX). Todos esses agentes provocam quimiotaxia de neutrófilos, resultando na ativação dessas células e, por fim, em inflamação. Essas substâncias também aumentam a permeabilidade vascular (induzindo o influxo de mais neutrófilos) e a contração da musculatura lisa. Conforme observado na seção anterior e mostrado na Figura 23.13, os corticosteroides são poderosos agentes anti-inflamatórios que atuam bloqueando a via da COX.

Por outro lado, ao mesmo tempo que atuam como potentes agentes anti-inflamatórios, os esteroides provocam inúmeros efeitos colaterais indesejáveis, tais como retenção de líquidos, ganho de peso, osteoporose, sangramento GI e alterações mentais. Outros fármacos não esteroidais – os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) – se mostraram efetivos no bloqueio da inflamação por meio de mecanismos similares, como mostra a Figura 23.13, e sem produzir os indesejáveis efeitos adversos típicos dos corticosteroides. A maioria desses agentes bloqueia especificamente a COX, como é o caso do naproxeno (Naprosyn), ibuprofeno (Advil, Motrin) e piroxicam (Feldene). Tais agentes inibem duas formas de COX – COX-1 e COX-2. A COX-1 está envolvida na manutenção da integridade da membrana das células mucosas no trato GI, enquanto a COX-2 atua no processo inflamatório. Uma vez que todos esses agentes inibem ambas as formas da enzima, acabam produzindo efeitos colaterais indesejáveis no trato GI, com toxicidade e sangramento. Há pouco tempo, foram disponibilizados agentes mais modernos que inibem a COX-2 com maior seletividade, como celecoxib (Celebrex) e rofecoxib (Vioxx). Entretanto, a constatação de que alguns pacientes tratados com Vioxx apresentaram diagnóstico de IM levou à retirada desse fármaco do mercado.

A aspirina, um potente inibidor da COX, um eficaz agente anti-inflamatório, também produz efeitos antipiréticos e analgésicos resultantes da inibição dessa enzima. Considera-se que esses efeitos antipiréticos e analgésicos sejam decorrentes da inibição da COX ao nível do SNC (ou seja, da isoforma COX-3), principalmente no hipotálamo.

O acetaminofeno (Tylenol) inibe a COX-3, porém exerce pouco efeito sobre a COX-1 e a COX-2. Por isso, não é considerado anti-inflamatório, embora também não provoque sangramento GI e produza efeitos analgésicos e antipiréticos eficientes.

Dentre esses fármacos, somente a aspirina e o tilenol têm seu uso monitorado. Por esse motivo, são discutidos mais a fundo a seguir.

Ácido acetil salicílico (aspirina). Trata-se de um composto anti-inflamatório que é utilizado como analgésico, antipirético e, em altas doses, como agente anti-inflamatório. Em doses mais baixas, a aspirina exibe uma atividade anticoagulante decorrente da atividade antiplaquetária produzida pela inibição da COX nas plaquetas. O resultado final é o bloqueio da formação do tampão plaquetário. É um fármaco que pode ser efetivo no tratamento de febre, neuralgia, dor de cabeça, mialgia e artralgia, bem como no monitoramento de algumas doenças reumáticas.

Em geral, para obtenção dos efeitos analgésicos e antipiréticos em adultos, são administradas doses de aspirina oral que variam de 500 mg, conforme a necessidade, até o máximo de 4 g/dia. Doses maiores (3,5–5,5 g/dia) são utilizadas em casos de artrite reumatoide e osteoartrite em pacientes adultos, e também na artrite juvenil (até 3,5 g/dia) em crianças.

O intestino delgado é o sítio primário de absorção da aspirina. Essa absorção usualmente ocorre de modo rápido, logo após a administração oral, sendo que os níveis séricos atingem o pico em 1 a 2 horas. Antes de entrar na circulação sanguínea, a aspirina é rapidamente hidrolisada a ácido acético e ácido salicílico. Essa hidrólise é mediada em parte por uma esterase plasmática e em parte pelo fígado. Tanto a aspirina como o ácido salicílico entram no SNC.

Em torno de 70 a 90% do ácido salicílico encontrado no plasma está ligado a proteínas plasmáticas. Sua meia-vida no soro depende e aumenta proporcionalmente com a dose: de 3 horas, com 500 mg, até cerca de 15 horas, com 4 g. O ácido salicílico é depurado não só por meio de sua metabolização, mas também pela excreção urinária. A taxa de excreção urinária diminui, à medida que sua meia-vida aumenta. Essa situação pode acarretar efeitos tóxicos, caso o intervalo entre as doses não seja devidamente aumentado. Entretanto, a taxa de eliminação pode apresentar variações significativas de acordo com o paciente e, por isso, a dose precisa ser individualizada, quando a quantidade de fármaco a ser administrada é muito grande. Zumbido, audição abafada e sensação de ouvido tapado são os sinais mais comuns da toxicidade crônica por aspirina. Em bebês, crianças pequenas e pacientes com prévia perda auditiva, os sintomas óticos não se manifestam e a hiperventilação costuma ser o sinal mais comum de *overdose*. Conforme discutido no Capítulo 14, *overdoses* de aspirina podem causar acidose metabólica. Como o próprio salicilato estimula os centros respiratórios, *overdoses* desse fármaco induzem aumento da frequência respiratória, levando à alcalose primária. A intoxicação aguda por aspirina constitui causa comum de envenenamento farmacológico fatal em crianças. Doses tóxicas acarretam distúrbios acidobásicos, estimulação direta da respiração ao nível do SNC, hiperpirexia e hipoglicemia, sangramento GI, náusea e vômitos. O paciente pode desenvolver insuficiência renal aguda, disfunção do SNC com estupor e coma, e edema pulmonar. A Figura 23.14 resume os níveis tóxicos de aspirina para crianças em função do tempo decorrido após a administração de uma dose tóxica.

Principalmente em crianças, mas também reconhecido em adultos, um sério efeito tóxico inerente à aspirina é a hepatotoxicidade com consequente insuficiência hepática fulminante, ou seja, a síndrome de Reye. Essa síndrome aparece quando o paciente febril é tratado com aspirina, durante um episódio de infecção viral. Após uma aparente recuperação, o paciente se torna gravemente doente em decorrência de uma severa insuficiência hepática, com sinais e sintomas de encefalopatia hepática (descritos nos Caps. 8 e 21). Embora o quadro seja quase sempre fatal, medidas de suporte recentes têm mostrado um aumento significativo no tempo de sobrevida a partir dessa condição prejudicial à vida, sendo que a causa dessa melhora permanece desconhecida.

Acetaminofeno (Tylenol). É um fármaco utilizado como analgésico e antipirético no tratamento da febre, dor de cabeça e mialgias/artralgias de grau brando a moderado. O acetaminofeno é tão eficaz quanto a aspirina em suas ações analgésicas e antipiréticas, sendo preferido no tratamento de pacientes com sangramentos/distúrbios de coagulação ou de crianças necessitando apenas ações antipiréticas ou analgésicas, pois nenhuma associação entre esse fármaco e a incidência da síndrome de Reye em crianças foi demonstrada. Além disso, em crianças, uma *overdose* acidental de acetaminofeno pode ser menos tóxica que se for de aspirina, uma vez que a hepatotoxicidade raramente está associada à *overdose* de acetaminofeno em crianças com menos de 6 anos de idade.

Doses orais desse fármaco são rápida e completamente absorvidas a partir do trato GI. Em geral, 325 a 650 mg a intervalos de 4 horas costuma ser a prescrição feita a paciente adultos e crianças com mais de 12 anos de idade, sendo a dose máxima 4 g/dia. A meia-vida do fármaco no plasma é de cerca de 2 horas, com concentrações plasmáticas de pico de 5 a 20 μg/mL sendo atingidas em 30 a 60 minutos. O percentual de ligação a proteínas plasmáticas é de cerca de 20% mediante doses terapêuticas. Os principais metabólitos do acetaminofeno produzidos pelo fígado são

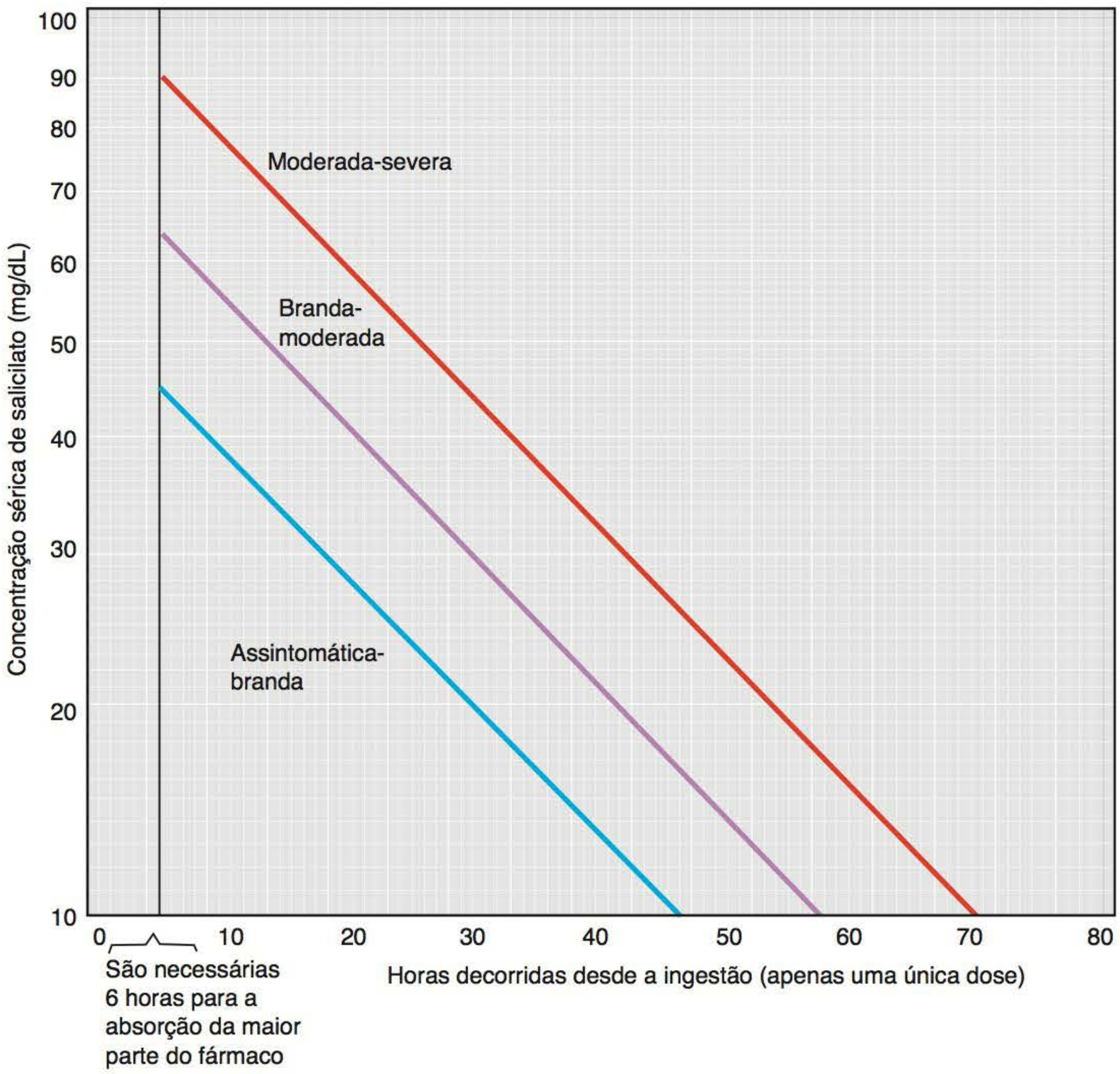


Figura 23.14 Níveis de toxicidade de aspirina em crianças em função do tempo. (Howanitz, 1984, modificado de Done AK: Pediatrics 1960; 26:800, com permissão.)

conjugados de glucoronida e sulfato, com menor formação de metabólitos deacetilados e hidroxilados. Acredita-se que estes últimos, por sua vez, produzem hepatotoxicidade em casos de *overdose*.

Doses tóxicas de acetaminofeno são atingidas com a ingestão aguda de concentrações equivalentes a 140 mg/kg (White, 1998). As manifestações agudas de doses tóxicas em geral surgem 2 a 3 horas após a ingestão do fármaco e incluem náusea, vômitos e dor abdominal. Um sinal característico de toxicidade é a cianose da pele, mucosa e unhas dos dedos da mão, devido à presença de meta-hemoglobina. Contudo, a esse fenômeno é observado com maior frequência no envenenamento por fenacetina. Pode haver estimulação seguida de depressão do SNC em casos de envenenamento severo, acompanhadas de colapso vascular, choque e convulsões totais. O coma, em geral, precede a morte do paciente. Diante de doses muito altas (como as utilizadas em tentativas de suicídio), pode haver insuficiência hepática fulminante em que o dano hepático máximo permanece inaparente até 2 a 4 dias após a ingestão do fármaco (Sunheimer, 1994).

O uso abusivo crônico do acetaminofeno pode resultar em toxicidade crônica e morte. Essa toxicidade crônica usualmente está associada à anemia, lesão renal e distúrbios GI.

Imunossupressores (Dancey, 2002; Drosos, 2002; Dunn, 2001; Mueller, 2004; Scott, 2003)

Se por um lado tanto a imunidade humoral como a celular intactas são essenciais à prevenção de infecções, há circunstâncias em que a supressão do funcionamento desses sistemas se torna crítica. Alguns exemplos são as aberrações que afetam o sistema imune, como a doença autoimune (p. ex., lúpus eritematoso, síndrome de Sjögren etc.), e mesmo em determinadas respostas funcionalmente normais desse sistema, como na transplantação de tecidos. Nos casos envolvendo transplantes, o componente mais importante do sistema imune é a imunidade celular. Conforme ilustra a Figura 23.15, tanto na reação hospedeiro *versus* enxerto como na reação enxerto *versus* hospedeiro, as células T CD4+ se tornam ativadas quando um antígeno estranho se liga à proteína Ia (MHC de classe II) na superfície de macrófagos (células apresentadoras de antígeno). Clones de células T específicas se ligam ao antígeno por intermédio de seus receptores (CD3), que reconhecem o complexo antígeno-Ia. A ativação do receptor da célula T desencadeia uma cascata de transdução de sinal que culmina na internalização do antígeno pelo macrófago, via endocitose mediada por receptor, e subsequente destruição no interior dos lisossomos. Nessa cascata, há mobilização de íons de cálcio e consequente ativação da calcineurina – uma fosfatase que forma complexo com a calmodulina. A calcineurina ativada defosforila o fator nuclear de células T ativadas citosólico ($NF\text{-}AT^C$, *cytosolic nuclear factor of activated T cells*). Como resultado, o $NF\text{-}AT^C$ é ativado e translocado para o núcleo, onde se liga ao fator nuclear de células T ativadas ($NF\text{-}AT^N$). O complexo formado é transcricionalmente ativo e promove a síntese de interleucina-2 (IL-2), a qual passa a ser secretada e atua como mitógeno extracelular. A IL-2 se liga ao receptor da célula T e induz sua ativação mediante ligação à "proteína-alvo da rapamicina" (TOR, *target of rapamycin*). A proteína TOR ativa as ciclina quinases responsáveis pela progressão G1-S do ciclo celular e estimula a síntese de nucleotídeos. O efeito final dessa ligação é a proliferação da célula T e a destruição do antígeno.

Ao observar a Figura 23.15, nota-se a existência de agentes específicos (Isoniemi, 1997; Braun, 1998; Kahan, 1989; Hess, 1988; McEvoy, 2004), que bloqueiam uma ou mais dessas etapas e, em consequência, inibem a destruição do antígeno. Os fármacos ciclosporina e tacrolimus são polipeptídeos cíclicos que se ligam a proteínas intracelulares denominadas imunofilinas. A ciclosporina se liga à imunofilina ciclofilina, enquanto o tacrolimus se liga à imunofilina FKBP12. Esses complexos bloqueiam a ativação do NF-AT induzida pela calcineurina e, assim, impedem a síntese de IL-2, de modo a impossibilitar a destruição do antígeno. Entretanto, outro agente imunossupressor – a rapamicina (Sirolimus) – não atua sobre as células T e, em vez disso, se liga à proteína TOR. Como resultado, impede a ativação das ciclina quinases e, consequentemente, também a ativação das células T. Por fim, o antibiótico micofenolato de mofetil (MMF) é hidrolisado a ácido micofenólico livre na célula. Esse agente é um poderoso inibidor das enzimas ionosina monofosfato desidrogenase e guanosina monofosfato sintase. Sua ação inibitória impede a síntese de deoxipurina nucleotídeo que, por sua vez, inibe a síntese de DNA. Atuando nessa mesma linha, alguns agentes alquilantes geralmente utilizados como quimioterápicos, como a ciclofosfamida (Cytoxan), podem ser empregados para suprimir a síntese de DNA nas células T.

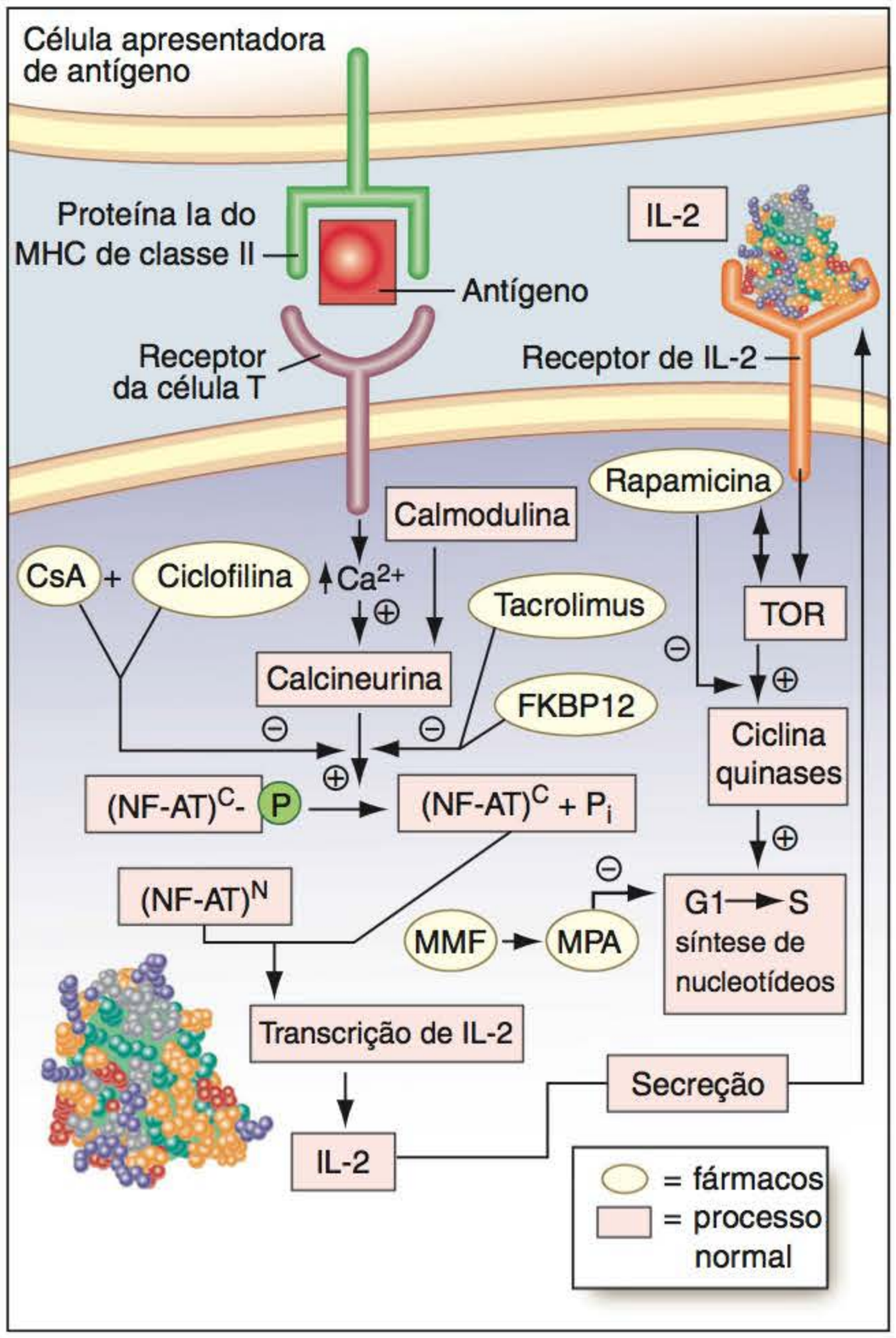


Figura 23.15 Mecanismos e sítios de ação dos agentes imunossupressores. Essa ilustração mostra duas vias de sinalização de importância central, induzidas pelo antígeno – no caso, de um transplante de células estranhas – para ativação da imunidade mediada por células. Na primeira via, o antígeno é "apresentado" a células T antígeno-específicas (clonais), por meio de sua ligação à molécula Ia (proteína do MHC de classe II – ou DR humana). A formação de um complexo ternário constituído pelo antígeno (quadrado vermelho), Ia (receptor verde na célula apresentadora de antígeno, i. e., macrófago) e receptor de célula T (receptor púrpura, à esquerda, na parte superior da ilustração) resulta na ativação de uma cascata de transdução de sinal que, por sua vez, leva à síntese de interleucina-2 (IL-2), mostrada como modelo de preenchimento de espaço na parte inferior esquerda da figura. Nessa via, um evento crítico é a ativação da fosfatase (calcineurina) pela calmodulina cálcio-ativada. A calcineurina desfosforila e ativa o fator nuclear citosólico das células T ativadas $(NF\text{-}AT)^C$. O $(NF\text{-}AT)^C$ ativado é translocado para o núcleo e se liga ao NF-AT nuclear $(NF\text{-}AT)^N$, promovendo diretamente a transcrição de IL-2. Na segunda via de transdução de sinal (conectada à primeira) (à direita da figura), a recém-sintetizada IL-2 é, então, secretada pela célula T e atua como fator autócrino na ligação ao domínio extracelular do receptor de IL-2 das células T para formar um complexo, conforme representado na parte superior direita da figura. Esse complexo induz ativação de uma outra cascata de transdução de sinal, em que a proteína-alvo da rapamicina (TOR) é estimulada e, por sua vez, ativa ciclinas quinases que promovem ativação de ciclinas. Estas, por sua vez, promovem a progressão do ciclo celular de G1 para S, necessária à transformação blástica das células T clonais que, aliadas aos macrófagos, internalizam e destroem o antígeno.

Todos os elementos das vias de sinalização normais são representados como quadrados rosa. Os fármacos imunossupressores e suas proteínas-alvo bloqueiam diferentes etapas dessas duas vias, sendo representados como elipses amarelas. A ciclosporina (CsA) e o tacrolimus se acoplam, respectivamente, à ciclofilina e ao FKBP12 para formar complexos inibitórios que bloqueiam a calcineurina na primeira via. Por outro lado, a rapamicina bloqueia a TOR e, assim, impede a transformação blástica induzida pela IL-2 na segunda via. O micofenolato de mofetil (MMF) bloqueia a síntese de nucleotídeos e, desse modo, impede a progressão G1-S na segunda via. MPA = ácido micofenólico.

É preciso ter em mente que os corticosteroides também exercem efeitos imunossupressivos sobre a imunidade mediada por células, mas são bem menos específicos e – como já discutido na seção anterior – produzem múltiplos efeitos colaterais indesejáveis. Por esses fatores, os corticosteroides não são os fármacos de escolha em casos de transplante.

Na próxima seção, são discutidas as propriedades dos fármacos imunossupressivos mais específicos que, em sua maioria, requerem monitoramento dos níveis séricos (plasma).

Ciclosporina (CsA). Trata-se de um polipeptídeo cíclico, composto por 11 aminoácidos, dos quais 5 são metilados. O máximo efeito supressor da CsA é atingido nas primeiras 24 horas de estimulação antigênica pelo aloenxerto. Assim, esse fármaco deve ser administrado durante a fase inicial da resposta imune para obtenção de uma supressão ótima da função da célula T e garantir o sucesso do transplante (McEvoy, 2004).

A CsA é indicada para prevenção da rejeição de órgãos em transplantes alogênicos de rim, coração e fígado, sendo o fármaco de escolha para manutenção de aloenxertos de rins, fígado, coração e coração-pulmão. Também pode ser empregada como fármaco de primeira ou segunda linha no tratamento da doença do transplante *versus* hospedeiro aguda que ocorre após transplantes de medula óssea, bem como de casos severos de artrite reumatoide e psoríase de placa recalcitrante. Outros usos possíveis da CsA são no tratamento de doenças autoimunes diversas e no transplante de órgãos.

Como a CsA é absorvida de modo variável a partir do trato GI, sua dose ótima deve ser determinada com cuidado, individualmente para cada paciente, e seus níveis sanguíneos precisam ser monitorados com frequência. Ocasionalmente, descobriu-se que um nível terapêutico é mantido pela presença de metabólitos (alguns ativos) no soro enquanto os níveis do fármaco original se mantêm baixos. Portanto, é necessário determinar a concentração de metabólitos da CsA no soro dos pacientes que aparentemente apresentam baixos níveis séricos do fármaco original. A concentração de CsA no sangue atinge o pico em aproximadamente 3,5 horas após a administração. Cerca de 20 a 40% da dose é absorvida, sofrendo metabolização hepática de primeira passagem. O citocromo P450 III A3 humano, membro da família do gene *p450* III, parece ser a enzima primária responsável pelo metabolismo da CsA. Uma vez que inúmeros compostos tanto induzem como são metabolizados por essa isozima do citocromo P450, a coadministração de tais compostos pode acarretar alterações nos níveis de CsA e, assim, provocar o surgimento de complicações na terapia com esse fármaco (Kronbach, 1988). Concentrações no sangue total ou no plasma, em 24 horas, equivalentes a 250 a 800 ng/mL ou 50 a 300 ng/mL (determinadas por imunoensaio), respectivamente, são consideradas minimizadoras da rejeição de enxertos e, ao mesmo tempo, produzem efeitos tóxicos.

Os efeitos adversos produzidos pela CsA podem afetar todos os sistemas orgânicos do corpo. Níveis séricos totais (determinados por RIA) maiores que 500 ng/mL estão associados à *nefrotoxicidade induzida por ciclosporina*, que é a reação tóxica mais frequentemente induzida por esse fármaco. Esse distúrbio é acompanhado de hipercalemia e hiperuricemia, hipertensão e hiperplasia da gengiva.

Outros efeitos tóxicos são neurológicos (tremores, dor de cabeça, parestesia, rubor, confusão), dermatológicos (hirsutismo, hipertricose, erupções cutâneas), hepatotoxicidade, efeitos GI (diarreia, náusea, vômitos, anorexia, desconforto abdominal), complicações infecciosas, efeitos hematológicos (leucopenia, anemia, trombocitopenia) e reações de sensibilidade, incluindo anafilaxia (Philip, 1998). Um fato importante é o risco aumentado de desenvolvimento de estados imunossuprimidos. A ocorrência de linfomas, especialmente no SNC, também pode estar associada à imunossupressão induzida pela CsA. Há bem pouco tempo, descobriu-se que esse fármaco induz aumento da invasividade de células de adenocarcinoma in vitro, de modo independente do sistema imune e, aparentemente, por meio da ativação do fator transformador do crescimento β (TGF-β, *transforming growth factor β*) (Hojo, 1999). Esse comportamento é bloqueado pela adição de anticorpos monoclonais para TGF-β.

Existem preparações de CsA disponíveis, tanto orais como endovenosas. A absorção da formulação oral apresenta variação inter e intrapaciente, podendo ser afetada por diversos fatores. Em geral, recomenda-se que o monitoramento dos níveis de fármaco seja feito no sangue total, utilizando-se um método de ensaio que possua alta especificidade para o fármaco não modificado (em vez dos metabólitos). Portanto, a dose ótima deve ser determinada com cautela e individualmente para cada paciente. Os níveis sanguíneos devem ser monitorados com frequência, com qualificação da concentração de CsA no sangue de acordo com o líquido biológico (sangue total *vs.* plasma *vs.* soro) e o método de ensaio (imunoensaio *vs.* HPLC) utilizados. Até o momento, nenhum dos métodos de imunoensaio existentes (RIA, FPIA, EMIT) é aceitável para ser utilizado no monitoramento de rotina, embora seja importante adotar laboratórios e métodos consistentes (McEvoy, 2004).

O Neoral é uma formulação de CsA em microemulsão miscível em água. Essa formulação aumenta a solubilidade da CsA no intestino delgado (Miller, 1998). Sua farmacocinética é superior, com uma biodisponibilidade melhorada e segurança equivalente, sem nenhum aumento aparente da toxicidade. Em relação à formulação oral, o Neoral parece oferecer como vantagem um menor nível de variabilidade sanguínea intra e interpaciente. O uso da CsA endovenosa é reservado aos pacientes com intolerância à administração oral. Essa via de aplicação está associada a um risco baixo (0,1%) – porém definitivo – de anafilaxia, inexistente quando o fármaco é administrado por via oral.

Tacrolimus (FK-506). Esse fármaco é um antibiótico macrolídeo lactona, cujo mecanismo de ação é semelhante ao da CsA, embora produza um efeito inibitório muito mais potente (McEvoy, 2004). Atualmente, é utilizado em casos de cirurgia de transplante, na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Similar à CsA, uma concentração total maior de tacrolimus parece estar associada ao risco relativo aumentado de toxicidade. Por esse motivo, recomenda-se que seus níveis sejam monitorados. O mesmo anticorpo monoclonal é utilizado nos dois métodos disponíveis para monitoramento: um imunoensaio enzimático de micropartículas e um ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). A amostra de escolha é o sangue total. O potencial tóxico desse fármaco parece ser semelhante aos efeitos tóxicos produzidos pela CsA, sendo que os mais comuns incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade (p. ex., tremores e dor de cabeça), efeitos GI (p. ex., diarreia e náusea), hipertensão, alterações envolvendo o metabolismo da glicose (diabetes melito), hipercalemia e complicações infecciosas. Entretanto, diferentemente da CsA, não ocorre hiperplasia gengival nem hirsutismo. Sua administração por via endovenosa pode resultar em anafilaxia, sendo recomendado usar a via oral sempre que possível. O tacrolimus é mais indicado para ser utilizado em combinação com outros agentes imunossupressores novos.

Rapamicina (Sirolimus). A rapamicina é um antibiótico similar ao tacrolimus. Seus principais efeitos colaterais são sintomas GI (níveis lipídicos anormais) e trombocitopenia. Aparentemente, não é nefrotóxico.

Micofenolato de mofetil. É um derivado do ácido micofenolato, um antibiótico fúngico. O uso desse fármaco pode reduzir a taxa de rejeição de aloenxertos renais, contudo diferenças definitivas entre a sobrevida de pacientes e aloenxertos ainda estão para ser demonstradas (Isoniemi, 1997). Pode ser útil em casos de pacientes que apresentam certo grau de intolerância à CsA ou ao tacrolimus (FK-506). Os principais efeitos colaterais produzidos pelo fármaco são sintomas GI (como diarreia e náusea) e mielossupressão. Até o momento, não foram demonstrados efeitos nefrotóxicos nem neurotóxicos.

Leflunamida (LFM). Além de ser um agente inibidor da síntese de deoxinucleotídeos (pirimidinas), é um derivado isoxazola que inibe a proliferação de linfócitos. Atualmente, é empregado no tratamento da artrite reumatoide – a única condição para cujo tratamento seu uso foi aprovado. Não há demonstrações de que o LFM cause nefrotoxicidade ou mielossupressão em seres humanos.

Fármacos utilizados no tratamento da depressão maníaca: lítio e antidepressivos tricíclicos

Tanto o lítio como os antidepressivos tricíclicos são empregados no tratamento de distúrbios afetivos psiquiátricos.

Lítio

O lítio é um cátion monovalente que faz parte do grupo de metais alcalinos. É comercializado sob a forma de sais de citrato e carbonato. Os sais de lítio são considerados agentes antimaníacos e são empregados na profilaxia e tratamento do transtorno bipolar

(psicose maníaco-depressiva). Alguns investigadores adotam o lítio como fármaco de escolha na prevenção da cefaleia em salvas crônica, podendo ser efetivo também nas formas episódicas ou periódicas de cefaleia em salvas.

Em casos de mania aguda, as doses orais iniciais de lítio variam de 0,6 a 1,8 g/dia (dose máxima de 2,4 g) e são utilizadas para obter um nível sérico terapêutico de 0,75 a 1,5 mEq/L. Com a reversão das crises, a dose é reduzida rapidamente para obter uma concentração sérica de 0,4 a 1,0 mEq/L. Em casos de cefaleia em salvas, a dose oral para adultos em geral varia de 0,6 a 1,2 g/dia em doses repartidas. Os níveis séricos e a resposta do paciente costumam ser considerados para determinar doses individuais e devem ser monitorados com cuidado.

A completa absorção do lítio ocorre em 6 a 8 horas após a administração oral. A meia-vida no plasma varia de 17 a 36 horas, sendo que o início da ação do fármaco é lento (5 a 10 dias). Sua eliminação se dá inteiramente pelos rins, com uma reabsorção de cerca de 80% do lítio filtrado. O lítio não se liga a proteínas e é distribuído no conteúdo de água corporal total, porém apresenta uma distribuição tecidual tardia e variável. Assim, os sintomas de intoxicação aguda às vezes não apresentam boa correlação com os níveis séricos, visto que a distribuição do fármaco nos diferentes órgãos pode ser lenta e/ou variável. O exato mecanismo de ação do lítio é desconhecido. Entretanto, sendo um cátion monovalente, o lítio compete com outros cátions mono- e divalentes (p. ex., sódio, potássio, cálcio e magnésio) pelos canais iônicos existentes nas membranas celulares e em sítios de ligação proteica (como em receptores de membrana e moléculas de transporte proteína/peptídeo, além de enzimas críticas para síntese, armazenamento, liberação e captação de neurotransmissores centrais). O fármaco exerce ainda um marcante efeito inibitório sobre a inositol monofosfatase, a síntese de fosfatidilinositídeos – segundos mensageiros envolvidos na neurotransmissão – e a síntese de cAMP. Também está envolvido na neurotransmissão (Phiel, 2001).

A toxicidade pode se manifestar de forma aguda, como resultado de uma única dose tóxica, ou de forma crônica, em decorrência da administração de doses altas e/ou por tempo prolongado ou devido a alterações envolvendo a farmacocinética do lítio. A perda de água (resultante de febre, diminuição da ingestão, condições GI anormais como a diarreia, vômitos, uso de diuréticos ou pielonefrite) é o principal fator contribuinte subjacente à intoxicação crônica. A toxicidade renal e o hipotireoidismo também são possíveis efeitos colaterais produzidos pelo lítio. Em casos de pacientes submetidos ao tratamento contínuo com esse fármaco, recomenda-se que os níveis de creatinina e TSH sejam monitorados periodicamente.

O grau de severidade da intoxicação não está claramente associado aos níveis séricos de lítio. Todavia, pode ser feita uma tentativa imprecisa de prever a gravidade da intoxicação, considerando-se os níveis séricos de lítio obtidos 12 horas após a administração da última dose. Assim, haveria intoxicação de grau brando a moderado diante de concentrações da ordem de 1,5 a 2,5 mEq/L; intoxicação severa com 2,5 a 3,5 mEq/L; e intoxicação potencialmente letal diante de níveis séricos de lítio acima de 3,5 mEq/L. A gravidade da intoxicação também depende da extensão do período em que a concentração sérica de lítio permanece tóxica.

Os sintomas mais comuns de intoxicações brandas a moderadas incluem náuseas, mal-estar, diarreia e leves tremores das mãos. O paciente pode ainda apresentar sede, polidipsia e poliúria, bem como tontura, fraqueza muscular, ataxia e fala arrastada. No caso da intoxicação de grau moderado e severo, os sintomas são reflexos de hiperatividade dos tendões profundos, movimentos coreoatetoides, náusea e vômitos persistentes, fasciculações, ataques convulsivos generalizados e movimentos clônicos dos membros por inteiro. Nos indivíduos que apresentam níveis séricos de lítio acima de 3,5 mEq/L, tais sintomas podem evoluir rapidamente para convulsões generalizadas, oliguria, insuficiência circulatória e morte.

Antidepressivos tricíclicos

As estruturas de vários desses compostos relacionados são representadas na Figura 23.16. Outros dois fármacos antidepressivos tricíclicos efetivos são a doxepina (Fig. 23.16) e o desyrel (Trazadone). Esse último é um antidepressivo tricíclico de segunda geração, no qual está ausente o sistema de três anéis fundidos encontrado nos demais. O mecanismo de ação desses antidepressivos tricíclicos consiste em bloquear a recaptação dos neurotransmissores adrenérgicos e dopaminérgicos, conforme discutido na seção intitulada "As drogas de abuso" (ver a Fig. 23.8). Em consequência, a ação desses transmissores excitatórios é prolongada, ao se permitir que os mesmos permaneçam mais tempo no sítio de seus respectivos receptores. Além de estimular as vias dopaminérgicas, os tricíclicos – principalmente a amitriptilina – exercem efeitos anticolinérgicos.

Os efeitos colaterais farmacológicos dos antidepressivos tricíclicos refletem, na verdade, suas atividades anticolinérgicas. Estas incluem boca seca, constipação, visão embotada, hipertermia, íleo adinâmico, retenção urinária e retardo da micção. Outros efeitos ao nível do SNC incluem tontura, fraqueza, fadiga e letargia, que são mais comuns, bem como agitação, inquietação, insônia e confusão. Ataques convulsivos e coma também podem ocorrer, assim como sintomas extrapiramidais, incluindo um tremor leve e persistente das mãos, rigidez, distonia e opistótonos.

Mais recentemente, foram desenvolvidos outros fármacos não tricíclicos com forte atividade antidepressiva, dentre os quais a fluoxetina (Prozac) é o mais proeminente. Esse fármaco bloqueia a recaptação da serotonina nas vias serotonérgicas centrais, sendo referido como agente inibidor seletivo da recaptação de serotonina (SSRI, *selective serotonin reuptake inhibitor*). A fluoxetina pode produzir alguns dos efeitos colaterais próprios ao uso dos antidepressivos tricíclicos, como os efeitos anticolinérgicos, contudo há relatos indicando que pode causar náusea e diminuição da libido e da função sexual. Também há relatos de alguns casos de pacientes submetidos ao tratamento com o fármaco que tentaram o suicídio.

É importante ter em mente que os antidepressivos tricíclicos são utilizados com frequência em tentativas suicidas por indivíduos deprimidos submetidos ao tratamento com esses fármacos. Os sinais cardinais da *overdose* por antidepressivos tricíclicos são sintomas anticolinérgicos: pupilas dilatadas e pele seca.

Toxicidade. A *overdose* produz sintomas que são primariamente extensões de reações adversas comuns, com estimulação excessiva do SNC e da atividade anticolinérgica. Esses sintomas incluem convulsões, coma, hipotensão, depressão respiratória, arreflexia, choque e parada cardiorrespiratória. Também pode haver agitação, confusão, hipertensão e síndrome parkinsoniana, bem como alucinações e

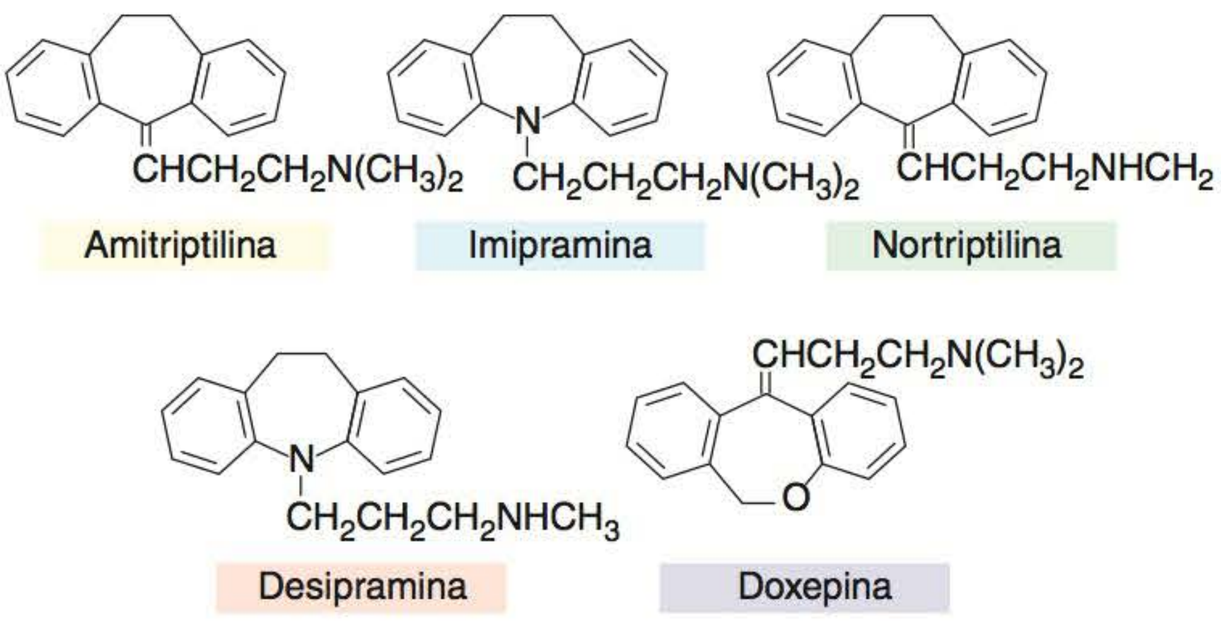


Figura 23.16 Estruturas dos antidepressivos tricíclicos mais comumente utilizados.

delírio. Entre as manifestações ocasionais estão a ataxia, insuficiência renal, disartria e vômitos.

Tratamento. Cuidados sintomáticos e de suporte constituem, em termos gerais, a forma de tratamento aplicada. Usualmente, recomenda-se a realização de uma lavagem gástrica acompanhada da instilação de carvão ativado para remoção dos compostos tricíclicos do trato GI. Os ataques convulsivos são tratados em geral pela administração endovenosa de diazepam. Em casos de *overdose* por amitriptilina (Fig. 23.16), foi demonstrado que o uso de inibidores da colinesterase (p. ex., neostigmina) é efetivo na reversão dos sintomas anticolinérgicos.

Neurolépticos, principais tranquilizantes antipsicóticos

Fármacos desse tipo são usados principalmente no tratamento da esquizofrenia aguda e suprimem o estado de agitação. Todos os neurolépticos parecem bloquear a ação da dopamina e da serotonina ao nível pós-sináptico no sistema límbico e no córtex motor (ver a Fig. 23.8). Essas áreas são conectadas à substância negra do mesencéfalo por vias dopaminérgicas específicas denominadas vias mesolímbicas-mesocorticais. Adicionalmente, a substância negra se conecta aos gânglios basais por meio da via nigroestriatal. A depleção da dopamina dessa via resulta no aparecimento da doença de Parkinson. Portanto, espera-se que os antagonistas da dopamina afetem essa última via além das vias mesolímbicas-mesocorticias. De fato, muitos agentes neurolépticos estão associados a efeitos indesejados como distonias, discinesias tardias e franco parkinsonismo – com esse último, felizmente, sendo bem menos comum. Duas classes de neurolépticos eram, originalmente, os fármacos de escolha: as fenotiazidas, representadas pela clorpromazina, e as butirofenonas, tipificadas pelo haloperidol (Haldol). Além do bloqueio da dopamina ao nível pós-sináptico, sabe-se também que o Haldol se liga com alta afinidade aos receptores δ existentes no SNC, e que essa ação pode estimular vias inibitórias moduladoras da atividade das vias dopaminérgicas. Todos os compostos de ambas as classes apresentavam os indesejáveis efeitos colaterais extrapiramidais mencionados anteriormente.

Recentemente, foram desenvolvidos novos agentes neurolépticos que afetam a via nigroestriatal em menor extensão e atuam como potentes bloqueadores pós-sinápticos da dopamina nas vias mesolímbicas-mesocorticais. Tais agentes são eficazes e produzem menos efeitos extrapiramidais do que os fármacos neurolépticos mais antigos. Esses fármacos modernos (ver também Burns, 2001) incluem o riperdal (Risperidona) (há alguns registros de efeitos colaterais extrapiramidais associados ao seu uso), olonzapina (Zyprexa), quetiapina (Seroquel) e aripiprazola (Abilify).

Tem sido difícil monitorar os níveis séricos de qualquer um desses fármacos, devido ao grande número de metabólitos produzidos a partir da extensiva metabolização hepática de cada um deles. A clorpromazina, por exemplo, possui cerca de 150 metabólitos. A eficácia terapêutica da maioria desses metabólitos é desconhecida. Essa situação dificulta bastante a determinação das faixas de níveis séricos normais desses fármacos. Os métodos de ensaios analíticos são FPIA e HPLC. Com relação ao FPIA, ainda é preciso esclarecer se há e quais são os metabólitos que apresentam reação cruzada com o anticorpo do teste. No caso da clorpromazina, a faixa terapêutica estimada é ampla (50–300 ng/mL). Sua meia-vida é de 16 a 30 horas e a biodisponibilidade, 25 a 35%. As doses consideradas normais para a clorpromazina variam entre 200 e 600 mg/dia, sendo administradas em doses repartidas. Outros fármacos da série da fenotiazina são a tioridazina e a flufenazina (Prolixin).

Além dos efeitos extrapiramidais, as fenotiazinas, sobretudo, podem causar hipotensão ortostática, colestase e, mais raramente, anemia aplásica. Em certas ocasiões, foi relatado que as fenotiazinas podem causar dermatite. Merece consideração especial o subgrupo de pacientes submetidos ao tratamento crônico com esses fármacos e que desenvolvem discinesia tardia. Na maioria desses pacientes, os distúrbios motores são irreversíveis.

Os agentes neurolépticos podem causar uma reação adversa rara e importante denominada síndrome neuroléptica maligna. Essa síndrome afeta pacientes que são extremamente sensíveis aos efeitos extrapiramidais produzidos pelos neurolépticos, podendo inclusive ser fatal. O primeiro sintoma a surgir é uma marcante rigidez muscular, à qual pode se seguir febre alta, alteração da pulsação e da pressão sanguínea e leucocitose. Acredita-se que uma inibição excessivamente rápida dos receptores de dopamina pós-sinápticos seja a responsável pela manifestação da síndrome. O tratamento consiste na suspensão do fármaco.

Agentes quimioterápicos: metotrexato e busulfan

Os níveis séricos desses dois agentes são monitorados para avaliar se os níveis séricos terapêuticos foram alcançados.

Metotrexato. Trata-se de um antimetabólito constituído por uma mistura que contém até 85% de ácido 4-amino-10-metilfólico e compostos relacionados, com ação ácido fólico-antagonista (ver a Tab. 23.7). Inibe a enzima dihidrofolato redutase e, como consequência, promove o bloqueio da síntese de ácido tetrahidrofólico. Este, por sua vez, é necessário à formação de *N*-5,10-tetrahidrofolato – um intermediário da transferência de um grupo metil para o desoxiuridilato na formação de timidilato, necessário à síntese de DNA. Também foi sugerido que o metotrexato pode causar um aumento dos níveis intracelulares de ATP, que resulta no bloqueio da redução de ribonucleotídeo e, igualmente, da síntese de DNA. Esse fármaco também parece inibir a polinucleotídeo ligase envolvida na síntese e reparo do DNA.

Da mesma forma, o metotrexato é um importante agente imunossupressor e, como tal, seu uso é indicado em casos de psoríase recalcitrante severa e artrite reumatoide severa ativa. Nesse último caso, pode ser utilizado combinado à CsA (Tugwell, 1995). Também é utilizado como agente anticâncer na terapia de algumas doenças neoplásicas. Dependendo da doença que está sendo especificamente tratada, as doses e os níveis terapêuticos variam. A Tabela 23.17 mostra as doses e concentrações farmacológicas terapêuticas para diversas condições patológicas. Os níveis séricos foram determinados por FPIA.

A cinética dos níveis de equilíbrio dinâmico do metotrexato é bifásica: uma fase rápida, em que $t_{1/2}$ é de 2 a 3 horas, e uma fase lenta, em que $t_{1/2}$ é de 8 a 10 horas. A excreção desse fármaco também é bifásica: 92% do fármaco é excretado em 24 horas, enquanto o restante é excretado no decorrer de alguns dias. Cerca de 50% do fármaco presente no sangue encontra-se ligado a proteínas séricas.

Os efeitos tóxicos do metotrexato incluem efeitos hematológicos (i. e., leucopenia e trombocitopenia) e GI (i. e., ulceração, glossite, estomatite, náusea, vômitos); lesões hepáticas (p. ex., cirrose) e pulmonares (p. ex., fibrose pulmonar); efeitos dermatológicos (p. ex., urticária e vasculite); e efeitos sobre o SNC a partir do metotrexato intratecal (p. ex., aracnoidite, leucoencefalopatia e aumento da pressão do LCE). Ocasionalmente, é necessário administrar doses elevadas de metotrexato a indivíduos com tumores que não respondem a doses normais

Tabela 23.7 Metotrexato

Condição	Dose usual	Concentração sérica
Psoríase	i.m. ou i.v.: 7,5 – 50 mg/sem. Oral: 7,5 – 30 mg/sem.	< 10 nM (ver Roenigk, 1998)
Artrite reumatoide refratária	i.m.: 5 – 25 mg/sem. Oral: 7,5 – 15 mg/sem.	(ver Tugwell, 1987a e b)*
Doenças neoplásticas malignas†	i.m. ou i.v.: 25 mg/m², 1 – 2 vezes/sem. Oral: 2,5 – 5 mg/dia dose i.v. alta: 1,5 g/m² com recuperação a cada 3 semanas (há diferentes regimes disponíveis)	Aprox. 50 nM

* Monitoramento basal dos parâmetros do paciente (hemoglobina; contagem de células brancas do sangue; volume corpuscular médio; contagem de plaquetas; urinálise; nitrogênio ureico sanguíneo; e níveis séricos de creatinina, transaminase e fosfatase alcalina) é defendido.

† Com a terapia de doses altas, os níveis de metotrexato são acompanhados e as doses de leucovorina são ajustadas até que os níveis séricos de metotrexato se tornem menores que 50 nM (ver em Grem, 1995).

desse fármaco. Em casos como esses, a leucovorina (fator citrovorum) é administrada de 18 a 36 horas após a dose inicial de metotrexato, durante o monitoramento dos níveis de metotrexato. A leucovorina é um N-5-formiltetra-hidrofolato, produto da di-hidrofolato redutase. Esse composto sobrepuja o bloqueio exercido pelo metotrexato. O fundamento desse regime parte do princípio de que as células tumorais em proliferação rápida são mortas por uma dose alta de metotrexato, enquanto as muitas células normais que não entraram em processo de divisão celular frequentemente podem ser "salvas" pela leucovorina. Esse tipo de regime farmacológico, em especial, é essencial a um monitoramento cuidadoso dos níveis séricos de metotrexato. A leucovorina deve ser administrada imediatamente aos pacientes que estejam recebendo doses baixas de metotrexato, mas que mesmo assim apresentam indícios de *overdose* por esse fármaco (Roenigk, 1998). Os níveis séricos de metotrexato devem ser monitorados durante esse período (Grem, 1995).

Busulfan. Esse agente alquilante é utilizado no tratamento de uma variedade de leucemias e linfomas, antes da realização de um transplante de medula óssea. Exibe citotoxicidade para as células da medula e é utilizado em combinação com a ciclofosfamida. Esta, por sua vez, é citotóxica para os linfócitos maduros que podem estar envolvidos na reação enxerto *versus* hospedeiro (Slattery, 1998). Seu índice terapêutico é estreito. Concentrações plasmáticas elevadas aumentam a possibilidade de desenvolvimento de doença veno-oclusiva hepática (VOD), uma complicação potencialmente fatal. Por esse motivo, o monitoramento terapêutico dos níveis de busulfan por meio de HPLC ou GC-MS, com determinação do seu intervalo de dose, atualmente é realizado na rotina dos centros de transplante de medula de óssea. Esse procedimento diminui a incidência de VOD em pacientes com níveis iniciais de busulfan muito altos e permite aumentar as doses administradas aos pacientes que apresentam níveis iniciais muito baixos do fármaco. Com isso, os níveis terapêuticos são otimizados para cada paciente.

Toxinas e envenenamento agudo

A presente seção aborda os agentes que causam lesões agudas ou crônicas ao paciente. Tais lesões podem ser diretas – como nos casos de envenenamento (p. ex., cianeto e monóxido de carbono) – ou indiretas – como as provocadas por carcinógenos indutores de mutações em genes que codificam proteínas críticas ao controle do ciclo celular.

Carcinógenos ambientais

Há cerca de 10 anos, as atenções têm se voltado para os efeitos dos carcinógenos – agentes químicos ambientais que predispõem os indivíduos a eles expostos ao desenvolvimento de tumores nos vários tecidos onde se acumulam. Muitos daqueles que se expõem a tais agentes trabalham nas indústrias que os produzem. O benzopireno, um composto aromático produzido por cigarros e também pelo escapamento de motores, é um conhecido carcinógeno potente que foi implicado como agente causador de câncer de pulmão. Os nitritos, utilizados como conservantes de carnes vermelhas, foram associados ao câncer de cólon. A aflatoxina, produzida pelo fungo *Aspergillus*, foi implicada como causa do carcinoma hepatocelular. Os hidrocarbonetos aromáticos, como o benzeno e a radiação ionizante, foram implicados como agentes causadores de leucemias agudas. O cloreto vinílico e o corante Thorotrast, que costumava ser utilizado antigamente como contraste para exames de raios X, foram associados ao angiossarcoma. Corantes de benzidina, β-naftilamina, dimetilbenzantraceno e outros compostos aromáticos foram correlacionados a múltiplas malignidades observadas em seres humanos. A exposição ao asbesto foi fortemente implicada como carcinogênica para o câncer de pulmão e o mesotelioma. Em estudos animais, os bifenilpoliclorados (PCB, *polychlorinated biphenyls*) – produzidos em incêndios – e a dioxina foram pesadamente implicados como agentes causadores de uma variedade de cânceres. Inúmeros carcinógenos, entre os quais o benzopireno, são inativos em sua forma original e se transformam em agentes carcinogênicos ao serem submetidos às reações oxidativas catalisadas por sistemas dependentes do citocromo P450. Assim, para ser um carcinógeno ativo, o benzopireno precisa ser convertido em benzopireno diol epóxido. Como somente certas isoformas de citocromo P450 são capazes de reagir com determinados carcinógenos em particular, apenas os indivíduos portadores dos genes codificadores dessas isoformas são suscetíveis (ver, p. ex., Caraco, 1998). Atualmente, um grande esforço está sendo empreendido para identificar indivíduos que apresentam fenótipos de risco (ver revisão em Peto, 2001).

Um interesse significativo tem sido concentrado em trabalhadores que exercem suas ocupações onde existem carcinógenos presentes em grandes quantidades. Fundições de aço, indústrias de construção naval e fábricas de borracha, entre outros estabelecimentos industriais, podem produzir quantidades significativas de tais carcinógenos. Em algumas dessas indústrias, as taxas de ocorrência de certos tipos de câncer são mais elevadas do que na população em geral (Brandt-Rauf, 1998; Pincus, 2003). Assim, nesses grupos de indivíduos expostos, tornou-se desejável determinar os níveis de exposição a certos carcinógenos conhecidos.

Acredita-se que os agentes carcinogênicos se ligam ao DNA e, como resultado final, acarretam mutações que afetam o código genético e muitas vezes levam à síntese de proteínas mutantes envolvidas no controle do ciclo celular (Brandt-Rauf, 1998; Pincus, 2003). Essas proteínas são denominadas proteínas codificadas por oncogenes ou oncoproteínas. O Capítulo 75 aborda a mutagênese, os oncogenes e as oncoproteínas.

Em populações com história de exposição a carcinógenos, foram desenvolvidos ensaios para detectar a presença tanto dos próprios carcinógenos como de seus adutos de DNA. Para a detecção de agentes carcinogênicos menos modificados, atualmente o método de escolha é a GC-MS. No caso de certos compostos carcinogênicos, como os PCBs, utiliza-se o método de captura de elétrons. Compostos alogenados, como os PCBs, são separados em uma coluna de GC empregando gás ionizado como transportador. Esses compostos alogenados "capturam" os elétrons conduzidos pelo gás transportador e são detectados pelas correntes reduzidas.

Muitas vezes, detectar diretamente a presença de carcinógenos no sangue ou na urina é uma tarefa árdua. Entretanto, esses compostos podem estar ligados a proteínas ou ao DNA no meio intracelular. Esses adutos podem ser detectados por análise de *Western blot*, que conta com a vantagem de poder utilizar anticorpos monoclonais para adutos de carcinógeno-DNA (Santella, 1987; Perera, 1988). Trata-se de uma técnica sensível, capaz de detectar nanogramas de adutos de ácido nucleico convenientemente coletadas de linfócitos periféricos. Também é muito útil na detecção de oncoproteínas em amostras de líquidos corporais obtidas de pacientes expostos a agentes carcinogênicos (De Vivo, 1994), conforme descrito no Capítulo 75.

Cianeto

O ânion cianeto se liga avidamente ao ferro em estado férrico ou trivalente. Como o cianeto forma um complexo cianoférrico relativamente estável, consegue ativar enzimas que contêm ferro e que alternam entre os estados ferroso e férrico em reações de oxidorredução.

O cianeto produz hipóxia tecidual e celular, primariamente através da ligação ao citocromo A_3 e da inibição de sua reoxidação. Em consequência, o sistema de transporte de elétrons é inibido e a respiração celular é interrompida, assim como a formação de ATP (fosfato altamente energético). Esses efeitos impedem a utilização do oxigênio e o metabolismo aeróbio, provocando uma severa acidose metabólica (lática). Embora o cianeto se ligue preferencialmente ao ferro férrico, também pode se ligar ao ferro ferroso da hemoglobina e produzir uma ciano-hemoglobina incapaz de transportar oxigênio. Do mesmo modo, o cianeto forma complexos com outras enzimas que contêm ferro, porém seu efeito de envenenamento agudo é atribuível à inibição do transporte de elétrons e à morte celular, em especial no SNC.

Os principais sintomas de *overdose* por cianeto são taquipneia (inicialmente), seguida de depressão respiratória e cianose, hipotensão, convulsões e coma. A morte pode ocorrer em questão de minutos, pois o cianeto é uma toxina de ação rápida. O diagnóstico pode ser difícil, sendo necessário um índice de suspeita elevado para estabelecer o diagnóstico correto. Os indícios incluem odor de amêndoas amargas, ocorrência de *status* mental alterado e taquipneia na ausência de cianose, além de uma acidose metabólica inexplicável (com intervalo aniônico aumentado).

A terapia com antídoto baseia-se numa estratégia de duas etapas. Na primeira, para expulsar os íons CN^- do citocromo A_3, a hemoglobina é convertida em meta-hemoglobina (estado Fe^{3+}) com auxílio de agentes oxidantes específicos (i. e., nitrito de amila e nitrito de sódio; o primeiro é administrado antes, pois pode ser inalado). A metemoglobina compete diretamente com o ferricitocromo A_3 para formar um complexo meta-hemoglobina-CN^-. Esse complexo cianometa-hemoglobina é relativamente atóxico. Na segunda etapa, o tiossulfato de sódio é administrado por via endovenosa. Essa substância reage com a cianometa-hemoglobina e forma tiocianato, um produto inócuo que é excretado pela urina. A primeira etapa é necessária simplesmente para remover o CN^- da cadeia respiratória. Cerca de 25 a 40% do conteúdo total de hemoglobina do paciente é convertido em meta-hemoglobina nessa etapa. A meta-hemoglobina, por sua vez, é rapidamente reconvertida a oxi-hemoglobina pelas hemácias. Os antídotos envolvidos em cada etapa são comercializados como kits de antídoto para cianeto pela Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN).

Monóxido de carbono

A intoxicação por monóxido de carbono (CO) produz hipóxia tecidual como resultado da diminuição do transporte de oxigênio. O CO interrompe esse transporte ligando-se à hemoglobina para formar um complexo reversível – a carboxiemoglobina. Também produz toxicidade ao diminuir ou inibir a saturação da oxi-hemoglobina promovendo um deslocamento de sua curva de dissociação para a direita e ligando-se a outras proteínas que contêm heme, como mioglobina e citocromo A_3. A ligação ao citocromo A_3 inibe a respiração celular e o transporte de elétrons, enquanto a ligação à hemoglobina diminui as reservas de oxigênio disponibilizadas para os músculos cardíaco e esquelético, afetando principalmente o miocárdio.

Como o cérebro e o coração são mais suscetíveis ao envenenamento por CO, a intoxicação por essa substância costuma se manifestar através de sintomas respiratórios, neurológicos e cardíacos, sendo a dispneia o principal deles. Outros sintomas incluem dor de cabeça, distúrbios visuais, taquicardia, sincope, taquipneia, coma, convulsões e morte. A sintomatologia apresenta certa correlação com a concentração sanguínea de carboxiemoglobina. Entretanto, o diagnóstico é difícil, pois o único sintoma patognomônico observado é a cor vermelho-cereja da face, que constitui forte indício de envenenamento agudo por CO. O envenenamento por CO deve fazer parte do diagnóstico diferencial de um estado encefalopático agudo mediante circunstâncias ou condições apropriadas.

O co-oxímetro é utilizado para estabelecer o diagnóstico definitivo, pela determinação da concentração sanguínea de carboxiemoglobina. Esse instrumento consiste num espectrofotômetro que faz uma varredura simultânea em quatro comprimentos de onda diferentes para determinar a concentração total de hemoglobina e os percentuais de carboxi-, oxi- e meta-hemoglobina. A análise rápida e acurada é obrigatória para estabelecer o diagnóstico e deve ser realizada com o mínimo de atraso possível após a exposição ao CO. O tratamento consiste principalmente na administração de oxigênio a 100%, sendo aplicado um tratamento de apoio sempre que necessário.

Álcool e glicóis

Etanol. (Tab. 23.8) É provavelmente a droga de abuso mais comum, com frequência responsável pela alteração do status mental apresentada pelos pacientes que chegam aos hospitais e unidades de atendimento emergencial. É rapidamente absorvido pelo trato GI, tem um volume de distribuição quase igual ao volume de água corporal total e se difunde livremente nos tecidos do corpo. É metabolizado de modo preferencial pela enzima hepática álcool desidrogenase, transformando-se em acetaldeído e ácido acético e, em seguida, na via do ciclo de Krebs, em dióxido de carbono e água. A dose letal em geral é 300 a 400 mL de etanol puro (600 a 800 mL de uísque com 100% de teor alcoólico) consumido em um período de menos de 1 hora. As concentrações plasmáticas de pico usualmente são atingidas 1 hora depois da ingestão. A Tabela 23.8 resume os efeitos de diferentes níveis séricos de etanol sobre as funções humanas.

O etanol atua como sedativo-hipnótico e deprime o SNC de modo irregular, em ordem descendente do córtex para a medula. A intoxicação aguda pode se manifestar através da diminuição do comportamento inibido, falta de coordenação, visão turva, fala arrastada, estupor, coma, convulsões e morte. A maioria das intoxicações fatais ocorre a concentrações sanguíneas acima de 400 mg/dL. Amostras de sangue capilar e arterial refletem com maior acurácia as concentrações de etanol no cérebro. As concentrações séricas de etanol costumam ser determinadas por técnicas enzimáticas, de cromatografia gasosa ou de oxidação eletroquímica. Nos ensaios mais acurados para detecção de etanol, a amostra de soro é incubada com a álcool desidrogenase, que oxida o etanol a acetaldeído, e o NAD é convertido em NADH. Assim, o simples monitoramento da absorbância a 340 nm da amostra de soro incubada fornece uma estimativa direta da quantidade de álcool presente. O envenenamento agudo em geral é tratado com terapia de suporte, lavagem gástrica com água de torneira, ou hemodiálise, caso haja indicação (concentrações > 500 mg/dL). Os sintomas da intoxicação crônica, como a mania alcoólica aguda, podem ser tratados com diazepam. A fenitoína pode ser utilizada em pacientes com história de ataques convulsivos.

Tabela 23.8 Influência da ingestão aguda de etanol sobre os níveis de etanol e o comportamento

Volume ingerido (mL)	Concentração no sangue	Influência
30 – 60	10–50 mg/dL (2,2 – 10,9 mmol/L)	Euforia discreta ou ausente
90 – 120	50–100 mg/dL (10,9–21,7 mmol/L) ou > 100 mg/dL (21,7 mmol/L)	Influência discreta na visão estereoscópica e na adaptação ao escuro
120 – 180	100–150 mg/dL (21,7–32,6 mmol/L)	Legalmente intoxicado Euforia; desaparecimento da inibição; tempo de reação prolongado
180 – 210	150–200 mg/dL (32,6–43,4 mmol/L)	Envenenamento de grau moderado a severo; tempo de reação significativamente prolongado; perda da inibição e perturbações discretas envolvendo o equilíbrio e a coordenação
240 – 270	200–250 mg/dL (43,4–54,3 mmol/L)	Envenenamento grave; perturbações do equilíbrio e da coordenação; retardo dos processos do raciocínio e obscuração da consciência
300 – 450	250–400 mg/dL (54,3–86,8 mmol/L)	Coma profundo, possivelmente fatal

Metanol. O envenenamento por metanol (álcool da madeira) é observado em pacientes que ingerem bebidas alcoólicas metiladas ou anticongelantes contendo metanol. É rapidamente absorvido a partir do trato GI, metabolizado e excretado a uma taxa equivalente a 20% da taxa de excreção do etanol. Considera-se que sua faixa de níveis tóxicos varie entre 60 e 250 mL, embora 15 mL sejam suficientes para causar morte em certos casos. A álcool desidrogenase metaboliza o metanol a formaldeído e ácido fórmico, responsável pela toxicidade ocular (diminuição da sensação luminosa ou cegueira franca) e pela acidose metabólica com intervalo aniônico, que são os principais sintomas de intoxicação. Outros sintomas incluem náusea, vômitos, dor de cabeça, distúrbios convulsivos e coma. A GC-MS é empregada na determinação dos níveis sanguíneos de metanol, cujas concentrações de pico acima de 50 mg/dL são consideradas tóxicas. Além disso, a osmolalidade sérica aumenta para valores acima de 300 mOsm. O envenenamento por metanol (ou etilenoglicol) deve ser considerado em pacientes com doença aguda que apresentam hiperosmolaridade e acidose metabólica e intervalo aniônico aumentado.

Etilenoglicol. O etilenoglicol (1,2-etanodiol) é utilizado como anticongelante em radiadores de automóveis. Sua meia-vida dura em torno de 3 horas. Sofre metabolização e dá origem a três compostos tóxicos principais: glicoaldeído, ácido glicólico e ácido glioxílico. A oxidação do

etilenoglicol a glicoaldeído é catalisada pela álcool desidrogenase hepática. Há formação de pequenas quantidades de ácido oxálico e de ácido fórmico. O ácido oxálico é um composto altamente tóxico que precipita rapidamente como cristais de oxalato de cálcio em vários tecidos, bem como na urina. A formação desses cristais na urina, embora seja pouco comum, constitui importante indício diagnóstico do envenenamento por etilenoglicol. O ácido glicólico é o metabólito que se acumula em maior quantidade no sangue, e suas concentrações no sangue e na urina parecem estar diretamente correlacionadas com a sintomatologia e a mortalidade. Trata-se do principal contribuinte para o intervalo aniônico observado na acidose metabólica. A dose letal de etilenoglicol é de aproximadamente 100 g e os principais sintomas de envenenamento agudo são a anúria e a necrose. Outros sintomas incluem náusea e vômitos, mioclônus, ataques convulsivos, reflexos deprimidos e coma. o diagnóstico definitivo de intoxicação por etilenoglicol pode ser estabelecido através da quantificação do conteúdo sérico de etilenoglicol e ácido glicólico por HPLC.

O tratamento da toxicidade por etilenoglicol e por metanol é semelhante, e se baseia na sintomatologia e nos níveis séricos. O ponto de apoio do tratamento é a terapia com etanol, uma vez que este compete tanto com o metanol como com o etilenoglicol na metabolização pela álcool desidrogenase. Se essa enzima for saturada pelo etanol, o metabolismo do metanol e do etilenoglicol diminui, seus produtos tóxicos não se acumulam nos tecidos e os compostos originais são excretados pela urina sem serem modificados. Além do etanol, a terapia endovenosa com substâncias alcalinas (bicarbonato) geralmente é iniciada em pacientes acidóticos, para correção da acidose metabólica. A diálise, seja hemodiálise ou diálise peritoneal, também é empregada para remoção tanto do composto original como de seus metabólitos tóxicos correspondentes.

Álcool isopropílico. Apresenta meia-vida aproximada de 3 horas e volume de distribuição semelhante ao do etanol. É prontamente absorvido via trato GI, sendo metabolizado a uma taxa equivalente a cerca de 50% da taxa de metabolização do etanol. O metabolismo do isopropanol se dá principalmente por ação da álcool desidrogenase, com produção de acetona, dióxido de carbono e água. A dose letal corresponde a uma ingestão de 250 mL. Tanto o álcool isopropílico como seu principal metabólito – a acetona – são depressores do SNC.

A depressão do SNC é o sintoma mais importante da intoxicação aguda por isopropanol. O indivíduo com essa condição também apresenta uma significativa irritação do trato GI que pode se manifestar como náuseas e vômitos, incluindo hematêmese e melena, dor abdominal gastrite. Outros sintomas incluem confusão, coma, hipertensão, insuficiência respiratória e morte.

É difícil estabelecer um diagnóstico de intoxicação por isopropanol. Os indícios diagnósticos são acetonúria, acetonemia e hiperosmolaridade sem glicosúria, hiperglicemia ou acidose. A cromatografia gasosa em geral é considerada a melhor técnica para determinar a concentração de isopropanol no sangue. O tratamento inclui cuidados de suporte, carvão ativado e lavagem gástrica, e hemodiálise para casos de envenenamento severo.

Arsênico

O arsênico é utilizado como veneno para formigas, rodenticidas, herbicidas e exterminadores de ervas daninhas, inseticidas, tintas, conservantes de madeira, cerâmicas, na produção de várias ligas metálicas, ração de gado, como curtidor e em medicamentos. As principais formas tóxicas de arsênio são: os arsênicos inorgânicos, incluindo arsenato de sódio e o arsenito de chumbo ou cobre; os arsênicos orgânicos, como carbarsona e triparsamida; e o gás arsina. O envenenamento por gás arsina geralmente ocorre no cenário industrial, onde esse composto é produzido a partir a ação de um ácido ou da água sobre metais que contêm arsênico.

É rapidamente absorvido no trato GI e nos pulmões, sendo que a absorção através da pele é um processo mais lento. O arsênico é distribuído a todos os tecidos corporais 24 horas após ser ingerido. A principal via de excreção é a renal. O arsênico atravessa a placenta.

A principal preocupação associada à ingestão dessa substância consiste no envenenamento sistêmico, provavelmente através de sua interação reversível com múltiplos grupos sulfidril enzimáticos. Como resultado dessa interação, múltiplos sistemas metabólicos são comprometidos.

O gás arsina – a forma mais perigosa do arsênico – pode acoplar-se de modo irreversível aos grupos sulfidril existentes na hemoglobina, causando hemólise intravascular, hemoglobinemia e consequente insuficiência renal aguda, além de exercer nefrotoxicidade direta.

A dose letal aguda de trióxido de arsênico é aproximadamente 120 mg, enquanto menos de 30 partes por milhão (ppm) de gás arsênico são suficientes para causar envenenamento. Os arsênicos orgânicos liberam o arsênico devagar e apresentam uma dose letal de aproximadamente 0,1 a 0,5 g/kg.

A toxicidade aguda usualmente se manifesta dentro de 1 hora após a ingestão e em geral reflete o envolvimento de múltiplos órgãos. A sintomatologia GI é a apresentação mais comum, com queimação e secura da boca e da garganta, dificuldade de deglutição, vômitos e diarreia aquosa ou sanguinolenta, contendo fragmentos de revestimento intestinal ou muco. O paciente pode apresentar hálito com odor semelhante ao de alho e gosto metálico na boca. Cianose, hipotensão, taquicardia e arritmias ventriculares podem se desenvolver. A neuropatia costuma ocorrer tardiamente após a ingestão (1–2 semanas), ou pode ser sofrer intensificação durante esse período. Pode haver depleção volumétrica grave e necrose tubular renal aguda que levam o paciente à morte por insuficiência circulatória. É usual os sintomas de envenenamento com gás arsina se manifestarem em cerca de 2 a 24 horas após a exposição, podendo inicialmente envolver náusea e vômitos, dor de cabeça, anorexia e parestesias. Hematêmese e dor abdominal também são sintomas comuns, e o paciente pode desenvolver insuficiência renal, lesão cardíaca, anemia e hemólise ou edema pulmonar. Usualmente, é difícil estabelecer o diagnóstico de intoxicação crônica, o qual deve ser considerado para pacientes que apresentam uma combinação de sintomatologia GI, neuropatia e distúrbios cutâneos, cardiovasculares e renais.

A análise da urina, cabelo e unhas por espectroscopia de emissão iônica é importante para determinar o diagnóstico de envenenamento crônico por arsênico. O tratamento de envenenamento agudo inclui a remoção do arsênico residual por lavagem gástrica ou êmese, e tratamento com dimercaprol, ou British anti-Lewisite (BaL), que se combina ao arsênico através de seus grupos sulfidril e produz complexos cíclicos hidrossolúveis. Entretanto, a toxicidade inerente a esse composto limita sua utilidade terapêutica. Existem derivados de BaL menos tóxicos, como 2,3-ditioeritritol, que é menos tóxico em culturas celulares e, ao mesmo tempo, é mais eficaz do que o BaL no resgate das células de cultura que foram envenenadas pelo arsênico (Boyd, 1989). Em casos de envenenamento severo, a hemodiálise pode ser utilizada para remoção de complexos arsênico-dimercaprol.

Mercúrio

Existem quatro tipos diferentes de compostos de mercúrio, os quais estão associados a diferentes potenciais toxicológicos: elementares ou metálicos (Hg^{o}); mercurosos (Hg^{+}); mercúricos (Hg^{2+}); e de alquil mercúrio (i. e., organomercuriais). O mercúrio elementar apresenta fraca absorção no trato GI, desde que a integridade da mucosa esteja preservada, e comente produz efeitos tóxicos se for convertido à forma divalente. Embora seja incomum, essa conversão pode ocorrer através de um lento processo de oxidorredução em presença de água e íons cloreto, caso exista um sítio GI de estase para o mercúrio. O mercúrio elementar produz envenenamentos significativos ao ser inalado ou absorvido através da pele. Pode atravessar a barreira hematoencefálica e acumular-se no SNC, onde uma oxidação produz íons de mercúrio. Desse modo, são produzidas toxicidades primariamente ao nível dos pulmões e do SNC.

Entre os dois sais inorgânicos do mercúrio, os sais mercurosos (Hg^{+}) apresentam baixa solubilidade e, em consequência, são pouco absorvidos. Entretanto, o sal mercúrico (Hg^{2+}) é prontamente solúvel e absorvido após a ingestão oral ou a inalação. Pode provocar inflamação severa na boca, bem como outros sintomas GI. Os rins são também os sítios preferidos de acúmulo dos compostos mercúricos inorgânicos, onde provocam lesões agudas tubulares renais e glomerulares. Tanto o mercúrio elementar como os compostos de mercúrio inorgânicos são excretados principalmente através da urina.

Em contraste com as formas de mercúrio elementar e inorgânica, os compostos de mercúrio orgânicos que contêm grupos alquil, aril e alcoxialquil são considerados poluentes ambientais. Esses compostos

possuem ao menos uma ligação covalente entre mercúrio e carbono. Tanto os compostos alcoxialquil como mercuriais sofrem quebra metabólica e biotransformação para produzirem mercúrio inorgânico. Este, por sua vez, exerce ação tóxica e provoca manifestação de intoxicação, exatamente como fazem os compostos de mercúrio inorgânico anteriormente referidos. De outro modo, as ligações mercúrio-carbono existentes nas formas metil e etil são extremamente estáveis e produzem maior grau de toxicidade do que as formas aril e alcoxialquil. As formas alquil são mais lipossolúveis, atravessam prontamente as membranas e, ao serem ingeridas, em geral apresentam maior absorção corporal. Seu principal efeito químico se dá no SNC, sendo que tais compostos apresentam meia-vida biológica de 70 a 90 dias. Como a bile é a principal via de excreção, o metil mercúrio pode ser reabsorvido para o sangue através do sistema enteropático e, em parte, é por esse motivo que apresenta meia-vida estendida. Acredita-se que o principal mecanismo de ação do envenenamento pode mercúrio esteja associado à ligação covalente dos grupos sulfidril das proteínas, que leva uma disfunção enzimática ampla e inespecífica, inativação e desnaturação.

Dependendo da forma em que se encontra, o mercúrio pode causar toxicidade sistêmica ou lesões locais na pele e nas membranas mucosas. Tanto o mercúrio orgânico como o elementar produzem efeitos no SNC, enquanto a sintomatologia GI é produzida primariamente pelos sais inorgânicos. O mercúrio elementar também pode produzir reações pulmonares severas.

De um modo geral, a partir de amostras de urina de 24 horas é possível diagnosticar a toxicidade aguda produzida pelas formas elementar, inorgânica ou pela maioria das formas orgânicas. Os níveis sanguíneos podem subir rapidamente após a exposição aguda, porém caem com igual rapidez e podem não refletir a carga corporal total. Em contraste, como os compostos alquil mercúricos orgânicos de cadeia curta são excretados principalmente pela bile, os níveis sanguíneos são os melhores indicadores das concentrações teciduais e de uma exposição aguda significativa. A realização de análises de amostras de cabelo para detecção de mercúrio ajudam a identificar a exposição crônica ao mercúrio.

O tratamento inclui lavagem gástrica ou êmese para remover o veneno ingerido, bem como administração de dimercaprol e succímero. Todavia, no envenenamento por metil- e alquilmercúrio, o dimercaprol é contraindicado, pois foi demonstrado que induz aumento da concentração desses compostos no cérebro (Bryson, 1989). Em casos como esse, o tratamento é sintomático, embora novos agentes estejam sendo avaliados clinicamente.

Ferro

O envenenamento agudo por ferro é comum entre crianças pequenas e usualmente resulta da ingestão de produtos que contêm o metal. Embora os íons férricos provenientes dos alimentos normalmente seja reduzidos a íons ferrosos e absorvidos no estômago, o intestino grosso e o intestino delgado promovem a rápida absorção de quantidades tóxicas (> 30 mg/kg) de ferro elementar. Uma vez absorvido pelo corpo, o ferro quase nunca é removido. Acredita-se que doses altas de ferro causam dano agudo às células mucosas, e que há uma significativa absorção de ferro tão logo a capacidade de ligação da transferrina seja excedida. O ferro livre no soro provoca toxicidade ao induzir lesão celular hepática, choque e acidose lática. A hepatotoxicidade parece apresentar correlação com a dose, ocorre em 1 a 2 dias após a ingestão e foi associada à detecção de níveis ≥ 1.700 μg/dL (Tenenbein, 2001).

O vômito é uma provável manifestação inicial da intoxicação pelo ferro, acompanhado de uma gastroenterite severa, melena, dor abdominal e hematêmese. Tais sintomas se manifestam em até 6 horas após a ingestão. Nas próximas 10 horas, o paciente pode aparentar melhora. No entanto, esse estado é decepcionante, pois podem surgir manifestações de toxicidade sistêmica (cianose, convulsões, choque, coagulopatia, insuficiência renal e hepática) que levam o paciente a óbito. Tanto os pacientes que desenvolvem como os que não desenvolvem sintomatologia sistêmica severa podem desenvolver complicações tardias, incluindo obstruções ou estenoses GI.

O diagnóstico definitivo é estabelecido com base nas medidas da concentração sérica de ferro e na capacidade total de ligação ao ferro (TIBC, *total iron-binding capacity*) da transferrina. Somando-se ao tratamento de suporte, é realizada êmese ou lavagem gástrica para prevenir a absorção de ferro. A terapia de quelação com deferoxamina também é aplicada nos casos graves de intoxicação aguda.

Chumbo

Os compostos do chumbo, tanto orgânicos como inorgânicos, podem ser altamente tóxicos, produzindo efeitos mais sérios no sistema nervoso central e periférico. Podem ser absorvidos após a inalação ou a ingestão. Acredita-se que a absorção de doses acima de 0,5 mg de chumbo/dia leva ao acúmulo e à toxicidade pelo metal. A absorção de 0,5 g de chumbo é considerada uma dose letal. Por outro lado, casos de toxicidade aguda são incomuns e, em geral, observados em pacientes que foram expostos a altas concentrações de pó de chumbo. O envenenamento é observado em crianças, que vivem nas grandes cidades e consomem chumbo em forma de tinta seca (pica). As manifestações agudas são primariamente sintomas envolvendo o SNC (encefalopatia, convulsões, estupor) e sintomatologia GI (p. ex., cólicas). A toxicidade crônica com acúmulo de chumbo no sangue, tecidos moles e ossos é mais comum. O maior compartimento para o chumbo são os ossos, que contêm em torno de 96% da carga corporal total. Sua meia-vida é de 32 anos nos ossos, que podem servir de reservatório para intoxicação endógena. A toxicidade crônica pode se manifestar através da uma variedade de efeitos sistêmicos, tais como mal-estar geral, perda de peso, anorexia, constipação; encefalopatia por chumbo manifestada como mal-estar com apatia, sonolência, estupor e convulsões; neuropatia periférica com punho ou pé caído; e nefrose por chumbo com albuminúria, hematúria e piúria, além de anemia (hipocrômica, micro ou normocítica) com pontilhado basofílico – esse último achado muitas vezes é um forte indício.

Além disso, as alterações patológicas induzidas pelo chumbo podem ocorrer diante de níveis de exposição ainda menores ao metal. Needleman e Gatsonis (1990) revisaram 24 casos de exposição ao chumbo na infância, com o objetivo de obter evidências estatísticas de que baixas doses de chumbo podem acarretar déficits intelectuais em crianças. Schwartz *et al.* (1990) avaliaram a ocorrência de anemia induzida por chumbo em crianças com 1 a 5 anos de idade, empregando um estudo transversal epidemiológico. Eles constataram a existência de uma relação entre idade, concentração de chumbo no sangue e hematócrito, de tal modo que as crianças mais novas apresentaram maior risco de desenvolver anemia a concentrações sanguíneas menores, do que as crianças que eram apenas alguns anos mais velhas. Assim, é possível concluir que o chumbo produz efeitos deletérios especialmente em crianças, mesmo diante de baixos níveis de exposição. De um modo geral, concentrações séricas de chumbo ≥ 10 μg/dL indicam a ocorrência de uma absorção excessiva do metal em crianças, enquanto concentrações acima de 25 μg/dL indicam a possibilidade de considerar uma terapia de quelação para um pacientes pediátrico. O CDC (Centers for Disease Control) recomenda a realização de triagens universais para crianças, a partir dos 6 meses de idade (Klaassen, 2001; Bernard, 2003).

Os organocompostos de chumbo, como o tetraetil chumbo e o tetrametil chumbo, são lipossolúveis e, assim como os compostos organomercuriais já discutidos, produzem seus principais efeitos tóxicos no SNC. A encefalopatia por chumbo pode ocorrer no início da intoxicação e não apresenta boa correlação com as concentrações sanguíneas do metal. Reflexos de hiperatividade em tendões profundos, tremores de intenção, reflexo mandibular anormal e anomalias posturais e da marcha são as manifestações neurológicas da toxicidade por organocompostos de chumbo observadas de forma mais consistente.

O chumbo interage com grupos tiol, carboxílico e fosfato para formar complexos estáveis com enzimas e outras proteínas (Bryson, 1989). Essa interação é particularmente conhecida no caso da síntese do heme, em que o chumbo bloqueia a ação das enzimas ácido Δ-aminovulínico (ALA) sintase, da Δ-ALA desidratase (ALAD), coproporfirinogênio descarboxilase e ferroquelatase, causando anemia. Essas interrupções na síntese do heme permitem realizar testes objetivos para avaliação do grau de exposição ao chumbo inorgânico. Concentrações aumentadas de ALA na urina, diminuição da atividade de ALAD nas CVS, níveis aumentados de protoporfirina eri-

trocitária livre e quantidades aumentadas de zinco protoporfirínico são detectadas em casos de envenenamento por chumbo inorgânico. O teste para detecção de zinco protoporfirínico consiste num ensaio fluorimétrico particularmente simples de ampla utilização e que pode ser empregado como excelente teste de triagem. Em casos de envenenamento por organocompostos de chumbo, o teste de triagem mais sensível é o ensaio para detecção da atividade diminuída de ALAD em amostras de urina. Esse teste é mais sensível devido à inconsistência das alterações que ocorrem nas atividades de outras enzimas e nos níveis de produtos da síntese de heme. Embora as concentrações de chumbo no sangue sejam consideradas um indicador confiável de exposição recente ao metal, a curta meia-vida do chumbo circulante faz com que as estimativas da carga corporal total não sejam seguras. Entretanto, o emprego da técnica de fluorescência de raios X *in vivo* para análise dos ossos permite a determinação da carga cumulativa do metal (Kosnett, 1994). O tratamento do envenenamento inclui uma terapia de suporte, bem como a remoção dos compostos de chumbo solúveis por meio de lavagem gástrica. Soluções diluídas de sulfato de magnésio ou sulfato de sódio costumam ser utilizadas. Adicionalmente, sempre que houver necessidade, podem ser utilizados agentes quelantes, como dimercaprol, edetato de cálcio dissódico e succímero.

Quantificação de chumbo no soro. Os níveis séricos de chumbo podem ser determinados diretamente por espectroscopia de absorção atômica, ou por um método mais moderno e prontamente acessível denominado voltimetria de remoção *anódica*. Neste, uma célula voltaica é ajustada de tal modo que o ânodo consiste de uma haste de grafite revestida com mercúrio. Quando um potencial negativo é aplicado a esse ânodo, metais catiônicos (como o chumbo) "deslocam-se" do ânodo em suas formas metálicas. Em seguida, a voltagem aplicada é suspendida. Como há um excesso de elétrons no ânodo, a corrente flui para o cátodo. Cada um dos metais que se deslocaram do ânodo são, então, oxidados e retornam a suas respectivas formas iônicas (i. e., são removidos do ânodo). Os metais que apresentam menor potencial de oxidação são removidos primeiro. Cada metal é removido do ânodo de acordo com seu potencial de oxidação, registrado como potencial de meia-onda que, por sua vez, é uma constante para um determinado metal. A corrente total associada à remoção de cada metal é proporcional à concentração do metal removido.

Organofosfatos e carbamatos

Os *organofosfatos* são ésteres do ácido fosfórico ou do ácido tiofosfórico, enquanto os *carbamatos* são derivados sintéticos do ácido carbâmico. Embora sejam dois tipos diferentes de compostos, ambos interferem na neurotransmissão e são amplamente utilizados como pesticidas na agricultura. Os dois compostos inibem a enzima AChE, que normalmente hidrolisa o neurotransmissor ACh após a efetivação de um potencial de ação e subsequente liberação do sítio de ligação de seu receptor. Ambos produzem efeitos inibitórios ao reagirem com o sítio ativo da AChE. Essa interação ocorre por meio da fosforilação com organofosforados – resultando na formação de uma ligação éster-fosfato relativamente estável – e por carbamoilação com os carbamatos – com consequente formação de uma ligação éster-carbamato, que é mais lábil e facilmente reversível. Ambos os compostos provocam acúmulo de ACh nas sinapses neuronais e nas junções mioneurais, causando toxicidade.

A ACh é um importante neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico. É encontrada em inúmeras sinapses diferentes no SNC; nas sinapses ganglionares localizadas entre as fibras pré e pós-ganglionares simpáticas e parassimpáticas; nas junções existentes entre as fibras pós-ganglionares parassimpáticas e os órgãos efetores; e nas junções localizadas entre neurônios motores somáticos e células musculares lisas. Desse modo, os sinais e sintomas de envenenamento por organofosfatos incluem manifestações parassimpáticas, como salivação, lacrimação, micção e defecação (SLUD, *salivation, lacrimation, urination, defecation*); constrição pupilar; bradicardia; e broncoconstrição, que pode predominar em casos de envenenamento com doses baixas. As manifestações ganglionares autonômicas e motores somáticas (fraqueza muscular, contração, arreflexia, taquicardia e hipertensão), bem como as manifestações envolvendo o SNC (confusão, fala arrastada, ataxia, convulsões e depressão do centro respiratório e/ou cardiovascular) podem predominar nos casos de intoxicação severa. A morte usualmente é consequência de uma insuficiência respiratória, como resultado da combinação de depressão central, broncoespasmo, excesso de secreções brônquicas e paralisia do músculo respiratório.

É preciso observar que a morbidade e mortalidade associadas ao envenenamento por carbamato são menos severas, uma vez que esses compostos não penetram o SNC tão efetivamente quanto os organofosfatos e, assim, produzem efeitos colinérgicos mínimos. Além disso, a labilidade significativamente maior da ligação éster-carbamato permite a reativação espontânea da AChE. Essa reativação, por sua vez, diminui a inclinação da curva dose-resposta de toxicidade – em comparação à curva dos organofosfatos –, tornando menos provável que pequenos incrementos na dose de carbamato acarretem graves aumentos na toxicidade.

Além do envenenamento agudo, os organofosfatos podem produzir uma síndrome intermediária em 1 a 4 dias após o envenenamento, e/ou neurotoxicidade tardia usualmente em 2 a 5 semanas após a exposição aguda. A primeira síndrome se desenvolve após a manifestação de uma crise colinérgica aguda e parece envolver paralisias do nervo cranial, fraqueza dos membros proximais e paralisia respiratória, com necessidade de ventilação de suporte para o paciente (Senanayake, 1987, 1998). Em contraste, a neurotoxicidade tardia – que não é provocada por todos os compostos de organofosfato – parece ser causada pela inibição da esterase neurotóxica e usualmente provoca nos membros uma polineuropatia sensório-motora distal simétrica (Davies, 1987; Tafuri, 1987).

O diagnóstico de envenenamento por organofosfatos depende da existência de uma história de exposição pouco antes do início da doença, de manifestação dos sinais e sintomas de estimulação parassimpática difusa e da confirmação laboratorial da exposição através de medidas da atividade de AChE eritrocitária e PChE plasmática. Enquanto a AChE é encontrada primariamente no tecido nervoso e nos eritrócitos, a PChE é encontrada no plasma. A PChE apresenta ação bem menos específica do que a AChE, de modo que, além da hidrólise mediada pela AChE, a PChE hidrolisa diversos ésteres naturais e sintéticos. As atividades de ambas as enzimas podem ser diminuídas e medidas em laboratório. Entretanto, apenas a inibição da AChE é considerada especifica para o envenenamento por organofosfatos, visto que inúmeras condições podem produzir baixos níveis plasmáticos de PChE (Tafuri, 1987). Dessa forma, em casos de envenenamento por compostos organofosforados, essa última quantificação é mais sensível, porém menos específica do que a determinação dos níveis de colinesterase de CVS. Concentrações equivalentes a 30 a 50% da concentração normal geralmente indicam exposição, enquanto as manifestações tóxicas são induzidas por inibições superiores a 50%. Entretanto, é possível que os sintomas não apareçam até que concentrações equivalentes a 20% ou menos sejam atingidas. Atualmente, a confirmação – em vez do diagnóstico – de envenenamento é obtida por meio de determinações laboratoriais. Considerando a indisponibilidade dos valores basais dos níveis de colinesterase anteriores à exposição, determinações sequenciais dos níveis dessa enzima após a exposição parecem ser a melhor forma de confirmar o envenenamento por organofosfatos (Coye, 1987).

O tratamento de casos de envenenamento agudo envolve suporte respiratório (se necessário), descontaminação do paciente e realização de lavagem gástrica ou êmese. Diante da manifestação dos sintomas, é feita a administração de atropina para melhorar a excessiva estimulação parassimpática por meio do bloqueio competitivo da ação da ACh ao nível dos receptores muscarínicos. A pralidoxima também é administrada como antídoto específico para o envenenamento por organofosfatos. Se esse fármaco for administrado em 24 a 48 horas após a exposição, pode reativar a colinesterase fosforilada ao remover o grupo fosfato covalentemente ligado ao sítio ativo da enzima. Entretanto, esse intervalo de tempo é variável e pode ser indicada a utilização da pralidoxima depois de 48 horas (Clark, 2002; Howland, 2002). O tratamento usual dos casos de envenenamento crônico consiste em evitar novas exposições até que os níveis de colinesterase voltem ao normal.

Referências bibliográficas

Referências gerais

Bryson PD (ed): Comprehensive Review in Toxicology. Rockville, Aspen Publishers, 1989.

Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al: (eds): Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 2002.

O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, et al: (eds): The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th ed. Whitehouse Station, Merck and Co, 2001.

Sweetman SC, Blake PS, McGlashan JM, et al: (eds): Martindale: The Complete Drug Reference, 33rd ed. London, The Pharmaceutical Press, 2002.

Técnicas básicas para detecção de fármacos

Boone CM, Ensing K: Is capillary electrophoresis a method of choice for systematic toxicological analysis? Clin Chem Lab Med 2003; 41:773–781.

Davis IM, Bousquet RW, Childs PS: Gas chromatography/mass spectroscopy in clinical and forensic toxicology. *In* Service Training and Continuing Education, Vol 10, No 12. Washington, DC, American Association for Clinical Pathology, 1989, pp 7–21.

Engelhardt H: One century of liquid chromatography: From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. J Chromatogr B 2004; 800: 3–6.

Trata-se de uma excelente visão geral acerca do desenvolvimento e da história da cromatografia no século XX. Descreve os sucessos inicialmente obtidos na "análise bioquímica de adsorção", bem como a recente revolução moderna na análise.

Marquet P: Progress of liquid chromatography–mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. Ther Drug Monit 2002; 24:255–276.

Maurer HH: Liquid chromatography–mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. J Chromatogr B 1998; 713:3–25.

Niessen WMA: Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. J Chromatogr A 2003; 1000:413–436.

Niessen WMA, Tinke AP: Liquid chromatography–mass spectrometry: general principles and instrumentation. J Chromatogr A 1995; 703:37–57.

Petersen JR, Okordudu AO, Mohammad A, Payne DA: Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. Clin Chim Acta 2003; 330:1–30.

Pincus MR, Rendell M: General quantitative treatment for the binding of divalent antibodies to antigens immobilized on a solid phase. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:5924–5927.

Rodbard D, Ruder HJ, Vaitukaitis J, et al: Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: Improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. J Clin Endocrinol Metab 1971; 33:343–355.

Shihabi ZK: Applications of Capillary Electrophoresis in the Clinical Laboratory, Check Sample, Vol. 33. Clinical Chemistry No. CC 94-4 (CC-242). Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1993.

Tagliaro F, Turrina S, Pisi P, et al: Determination of illicit and/or abused drugs and compounds of forensic interest in biosamples by capillary electrophoretic/electrokinetic methods. J Chromatogr B 1998; 713:27–49.

Drogas ilícitas

Azmitia EC, Murphy RB, Whitaker-Azmitia PM: MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: Evidence for Ca^{2+}-dependent toxicity linked to release. Brain Res 1990; 510:97–103.

Bayorh MA, Zokowska-Grojec Z, Palkovits M, et al: Effect of phencyclidine (PCP) on blood pressure and catecholamine levels in discrete brain nuclei. Brain Res 1984; 321:315–318.

Bell J, Seres V, Bowron P, et al: The use of serum methadone levels in patients receiving methadone maintenance. Clin Pharmacol Ther 1988; 43:623–629.

Cami J, Farre, M: Drug addiction. N Engl J Med 2003; 349:975–986.

Discussão sobre o vício em drogas e os diversos fatores envolvidos no consumo de drogas de abuso, mecanismos moleculares de ação de diversas drogas, além da neurobiologia e neuroadaptação da droga.

DeCresce RP, Mazura AC, Lifshitz MS, Tilson JE: Drug Testing in the Workplace. Chicago, American Society of Clinical Pathology Press, 1989.

Fraser AD: Use and abuse of the benzodiazepines. Ther Drug Monit 1998; 20:481–489.

Frishman WH, Del Vecchio A, Sanal S, Ismail A: Cardiovascular manifestations of substance abuse Part 1: Cocaine. Heart Disease 2003; 5:187–201.

Gianoulakis C: Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. Curr Topics Med Chem 2004; 4:39–50.

Gill JR, Hayes JA, deSouza IS, et al: Ecstasy (MDMA) deaths in New York City: A case series and review of the literature. J Forensic Sci 2002; 47:121–126.

Hollander JE, Hoffman RS: Cocaine. *In* Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al: (eds): Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 1004–1019.

Hurd YL, Kehr J, Ungerstedt U: In vivo microdialysis as a technique to monitor drug transport: Correlation of extracellular cocaine levels and dopamine outflow in the rat brain. J Neurochem 1988; 51:1314–1316.

Iversen L: Cannabis and the brain. Brain 2003; 126:1252–1270.

Johanson CE, Fischman MW: The pharmacology of cocaine related to its abuse. Pharmacol Rev 1989; 41:3–52.

Lange RA, Hillis LD: Cardiovascular complications of cocaine use. N Engl J Med 2001; 345:351–358.

Lange RA, Cigarroc RO, Yancy CW, et al: Cocaine-induced coronary artery vasoconstriction. N Engl J Med 1989; 321:1557–1562.

Martin BR, Sim-Selley LJ, Selley DE: Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance. Trends Pharmacol Sci 2004; 25:325–330.

Murphy RB, Pincus MR, Beinfeld MC, et al: Enkephalin is a competitive antagonist of cholecystokinin in the gastrointestinal tract, as predicted from prior conformational analysis. J Protein Chem 1992; 11:723–729.

Pincus MR, Carty RP, Chen JM, et al: On the biologically active structures of cholecystokinin, little gastrin and enkephalin in the gastrointestinal system and in brain. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:4821–4825.

Poklis A: Analytic/forensic toxicology. In Klaassen CD (ed): Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, pp 1089–1108.

Schuster DI, Ehrlich GK, Murphy RB: Purification and partial amino acid sequence of a 28 kDa cyclophilin-like component of the rat liver sigma receptor. Life Sci 1994; 55:PL151–156.

Snyder SH and Pasternak GE: Historical review: Opioid receptors. Trends Pharmacol Sci 2003; 24:198–205.

A biologia molecular inicial dos receptores de opioides é historicamente revisada, incluindo a localização, identificação e clonagem dos receptores.

Tseng LF: Evidence for epsilon-opioid receptor-mediated beta-endorphin-induced analgesia. Trends Pharmacol Sci 2001; 22:623–630.

Tso PH, Wong YH: Molecular basis of opioid dependence: Role of signal regulation by G-proteins. Clin Exp Pharm Phys 2003; 30:307–316.

Fármacos terapêuticos

Asconape JJ: Some common issues in the use of antiepileptic drugs. Semin Neurol 2002; 22:27–39.

Bazil CW, Pedley TA: Advances in the medical treatment of epilepsy. Annu Rev Med 1998; 49:135–162.

Braun F, Lort T, Ringe B: Update of current immunosuppressive drugs used in clinical organ transplantation. Transpl Int 1998; 11:77–81.

Brodtkorb E: Antiepileptic drug treatment: Clinical considerations and concerns. Progr Brain Res 1998; 116:395–406.

Burns MJ: The pharmacology and toxicology of atypical antipsychotic agents. J Toxicol Clin Toxicol 2001; 39:1–14.

Dancey JE: Clinical development of mammalian target of rapamycin inhibitors. Hematol Oncol Clin N Am 2002; 16:1101–1114.

Drosos AA: Newer immunosuppressive drugs: Their potential role in rheumatoid arthritis therapy. Drugs 2002; 62:891–907.

Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, et al: Cyclosporin: An updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral) in organ transplantation. Drugs 2001; 61:1957–2016.

Gerson B (ed): Therapeutic drug monitoring I: Pharmacokinetics, technology, and methodology. Clin Lab Med 1987a; 7:267–492.

Gerson B (ed): Therapeutic drug monitoring II: Patient care and applications. Clin Lab Med 1987b; 7:499–714.

Grem JL, de Carvalho M, Wittes RE, Allegra CJ: Chemotherapy: The properties and uses of single agents: Methotrexate. *In* Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ (eds): Manual of Oncologic Therapeutics, 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1995, p 108.

Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. New York, McGraw-Hill, 2001.

Hess AD, Esa AH, Colombani PM: Mechanisms of action of cyclosporine: Effect on cells of the immune system and on subcellular events in T cell activation. Transplant Proc 1988; 20(Suppl 2):29–40.

Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. Nature 1999; 397:530–534.

Howanitz PJ, Howanitz JH: Therapeutic drug monitoring and toxicology. *In* Henry JB (ed): Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1984, pp 362 and 370.

Ingelman-Sundberg M: Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: The past, present and future. Trends Pharmacol Sci 2004; 25:193–200.

Visão geral da farmacogenética do citocromo P450, sua relevância clínica e possíveis benefícios futuros para maximização de uma terapia farmacológica efetiva.

Isoniemi H: New trends in maintenance immunosuppression. Ann Chir Gynaecol 1997; 86:164–170.

Kahan BD: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. Transplant Proc 1989; 21(Suppl 1):9–15.

Kronbach T, Fischer V, Meyer VA: Cyclosporine metabolism in human liver: Identification of a cytochrome P-450 III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. Clin Pharmacol Ther 1988; 43:630–635.

McEvoy GK, Miller J, Litvak K (eds): American Hospital Formulary Service Drug Information 2004. Bethesda, MD, American Society of Health-System Pharmacists, 2004.

Miller BW, Brennan DC: Clinical experience with Neoral (cyclosporine for microemulsion) in renal transplantation. Today's Therapeutic Trends 1998; 16:73–86.

Mueller XM: Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: Immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. Ann Thorac Surg 2004; 77:354–362.

Opie, LH, Gersh, BJ: Drugs for the Heart, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001.

Pesce AJ, Rashkin M, Kotagal U: Standards of laboratory practice: theophylline and caffeine monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem 1998; 44:1124–1128.

Phiel CJ, Klein PS: Molecular targets of lithium action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001; 41:789–813.

Philip AT, Gerson B: Toxicology and adverse effects of drugs used for immunosuppression in organ transplantation. Clin Lab Med 1998; 18:755–765.

Roenigk Jr. HH, Auerbach R, Maibach HI, et al: Methotrexate in psoriasis: Consensus conference. J Am Acad Dermatol 1998; 38:478–485.

Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL: Tacrolimus: A further update of its use in the management of organ transplantation. Drugs 2003; 63:1247–1297.

Slattery JT, Risler LJ: Therapeutic monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. Ther Drug Monit 1998; 20:543–549.

Sunheimer R, Capaldo G, Kashanian F, et al: Serum analyte pattern characteristic of fulminant hepatic failure. Ann Clin Lab Sci 1994; 24:101–109.
Sztajnkrycer MD: Valproic acid toxicity: Overview and management. J Toxicol Clin Toxicol 2002; 40:789–801.
Tugwell P, Bennett K, Gent M: Methotrexate in rheumatoid arthritis: Indications, contraindications, efficacy, and safety. Ann Intern Med 1987a; 107:358–366.
Tugwell P, Bennett K, Gent M: Position paper: Methotrexate in rheumatoid arthritis. Ann Intern Med 1987b; 107:418–419.
Tugwell P, Pincus T, Yocum D, et al: Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis. N Engl J Med 1995; 333:137–141.
Uetrecht JP: Mechanism of drug-induced lupus. Chem Res Toxicol 1988; 1:133–143.
Valdes R, Jortani SA, Gheorghiade M: Standards of laboratory practice: Cardiac drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem 1998; 44:1096–1109.
Warner A, Privitera M, Bates D: Standards of laboratory practice: Antiepileptic drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem 1998; 44:1085–1095.
White S, Wong SHY: Standards of laboratory practice: Analgesic drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem 1998; 44:1110–1123.
Yaari Y, Selzer ME, Pincus JH: Phenytoin: Mechanism of its anticonvulsant action. Ann Neurol 1986; 20:171–184.

Toxinas e venenos

Clark RF: Insecticides: Organic phosphorus compounds and carbamates. *In* Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al: (eds): Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 1346–1360.
Bernard SM: Should the Centers for Disease Control and Prevention's childhood lead poisoning intervention level be lowered? Am J Public Health 2003; 93:1253–1260.
Boyd VL, Harbell JW, O'Connor RJ, et al: 2,3-Dithioerythritol, a possible new arsenic antidote. Chem Res Toxicol 1989; 2:301–306.
Brandt-Rauf PW, Pincus MR: Molecular markers of carcinogenesis. Pharmacol Ther 1998; 77:135–148.
Caraco Y: Genetic determinants of drug responsiveness and drug interactions. Ther Drug Monit 1998; 20:517–524.
Coye MJ, Barnett PG, Midtling JE, et al: Clinical confirmation of organophosphate poisoning by serial cholinesterase analyses. Arch Intern Med 1987; 147:438–442.
Davies JE: Changing profile of pesticide poisoning. N Engl J Med 1987; 316:807–808.
De Vivo I, Marion MJ, Smith SJ, et al: Mutant c-K-ras-p21 in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl chloride. Cancer Causes Control 1994; 5:273–278.
Howland MA, Aaron CK: Antidotes in depth: Pralidoxime. *In* Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al. (eds): Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 1361–1365.
Klaassen CD (ed): Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001.
Kosnett MJ, Becker CE, Osterloh JD, et al: Factors influencing bone lead concentration in a suburban community assessed by non-invasive K x-ray fluorescence. JAMA 1994; 271:197–203.
Needleman HL, Gatsonis CA: Low-level lead exposure and the IQ of children: A meta-analysis of modern studies. JAMA 1990; 263:673–678.
Perera FP, Hemminki K, Young TL, et al: Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adducts in white blood cells of foundry workers. Cancer Res 1988; 48: 2288–2291.
Peto J: Cancer epidemiology in the last century and the next decade. Nature 2001; 411:390–395.
Revisão sobre o uso efetivo da epidemiologia do câncer no século XX, para identificação de diversas causas de câncer em seres humanos.
Pincus, MR, Friedman, FK: Oncoproteins in the diagnosis of human malignancies. Molecular Diagnostics 2003; 1:23–38.
Santella R, Hatch M, Pirastu R, et al: Carcinogen evaluation: In vitro testing, in vivo testing, and epidemiology. Semin Occupational Med 1987; 2:245–255.
Schwartz J, Landrigan PJ, Baker EL Jr, et al: Lead-induced anemia: Dose–response relationships and evidence for a threshold. Am J Public Health 1990; 80:165–168.
Senanayake N: Organophosphorus insecticide poisoning. Ceylon Med J 1998; 43:22–29.
Excelente atualização sobre o envenenamento agudo e crônico por organofosfatos, e também sobre a fisiopatologia e efeitos comportamentais do envenenamento.
Senanayake N, Karalliedde L: Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: An intermediate syndrome. N Engl J Med 1987; 316:761–763.
Tafuri J, Roberts J: Organophosphate poisoning. Ann Emerg Med 1987; 16:193–202.
Tenenbein, M: Hepatotoxicity in acute iron poisoning. J Toxicol Clin Toxicol 2001; 39:721–726.

CAPÍTULO 24

Avaliação da função endócrina

Helena A. Guber MD, Amal F. Farag MD, James Lo PhD, James Sharp MD

Hipófise	**383**
Prolactina	385
Hormônio do crescimento (GH)	386
Hormônios da neuro-hipófise	388
Glândula tireoide	**391**
Síntese e metabolismo do hormônio da tireoide	394
Eixo hipotálamo–hipófise–tireoide (HHT)	394
Glândula suprarrenal	**401**
Hormônios da medula suprarrenal	401
Hormônios do córtex da suprarrenal	404
Eixo renina–aldosterona	**417**
Renina e hipertensão	418
Quantificações de aldosterona	421
Quantificações de renina	421
Referências bibliográficas	**421**

PONTOS-CHAVE

- O sistema endócrino é um sistema finamente integrado no qual o hipotálamo, a hipófise e as glândulas-alvo mantêm comunicação contínua por meio da inibição e estimulação por retroalimentação, para controlar todos os aspectos relacionados ao metabolismo, ao crescimento e à reprodução. A compreensão dessa interface e a manipulação cuidadosa desses sistemas por meio de estímulos provocativos e supressivos permitem caracterizar anomalias subjacentes e fornecer tratamento direcionado.
- Os níveis de PRL podem sofrer elevação em decorrência de uma variedade de estímulos farmacológicos e fisiológicos; entretanto, valores acima de 200 ng/mL quase sempre estão associados à existência de um tumor hipofisário.
- Para indivíduos com suspeita de acromegalia, a triagem inicial deve ser a detecção de IGF-1 no soro.
- Muitas vezes, é desnecessário realizar testes de estimulação provocativa para registrar deficiência de GH em pacientes que apresentam uma história conhecida de doença da hipófise ou evidências de deficiência de três ou mais hormônios dessa glândula.
- Uma vez que o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide esteja intacto, o teste ultrassensível de TSH constitui o melhor método para detecção de uma disfunção tireoidiana clinicamente significativa.
- Todas as vezes em que a tireoglobulina for quantificada como marcador tumoral para o câncer da tireoide, uma outra amostra deve ser sempre checada simultaneamente quanto à presença de anticorpos para tireoglobulina.
- A determinação cromatográfica do conteúdo plasmático de metanefrinas e normetanefrinas constitui o melhor teste de triagem para o feocromocitoma. O paciente deve evitar o uso de cafeína, álcool e acetaminofeno, inibidores da monoamina oxidase e antidepressivos tricíclicos ao menos por 5 dias antes da realização dos testes.
- Com frequência, é desnecessário realizar o teste de estimulação com ACTH em pacientes com doença grave. Uma concentração aleatória de cortisol acima de 25 μg/dL (700 nmol/L) em situação de estresse torna altamente improvável a existência de uma insuficiência suprarrenal no paciente.
- A quantificação dos níveis de FSH nos dias 2 e 3 é um bom indicador da reserva folicular, enquanto os níveis de progesterona dos dias 21 e 22 são utilizados para avaliar se os ciclos são ovulatórios.

Hipófise

O sistema endócrino é um servossistema finamente ajustado, pelo qual o hipotálamo, a hipófise e várias glândulas endócrinas se comunicam por meio de um intrincado esquema de inibição/estimulação por retroalimentação. De acordo com o sentido clássico, um hormônio é definido como uma substância que atua em um sítio distante do local de sua produção original. Na denominação de hormônios, atualmente, estão incluídos os grupos que exercem ação autócrina (atuam diretamente sobre si próprios), parácrina (atuam em células adjacentes às células de origem) e intrácrina (atuam junto às células de origem sem nem mesmo saírem delas). É por meio dessa interação íntima entre sinais que o sistema endócrino controla o metabolismo, o crescimento, a fertilidade e as respostas ao estresse.

A hipófise está localizada junto aos confins da sela turca. Conecta-se pelo pedúnculo infundibular à eminência média do hipotálamo. Está dividida em dois lobos: anterior (adeno-hipófise) e posterior (neuro-hipófise). Pesa aproximadamente 0,6 g e mede cerca de 12 mm, no diâmetro transversal, por 8 mm, no diâmetro anteroposterior. A adeno-hipófise possui cinco populações de células distintas que sintetizam e secretam hormônios. Esses grupos celulares incluem somatotrofos secretores de GH, lactotrofos secretores de PRL, tireotrofos secretores de TSH, gonadotrofos secretores das subunidades α e β do FSH e do LH, e corticotrofos secretores de pró-opiomelanocortina (POMC). O POMC é clivado na hipófise e dá origem à adenocorticotrofina (ACTH) e β-lipotropina (β-LPH). O hipotálamo se comunica com a adeno-hipófise ao secretar seu próprio conjunto de hormônios tróficos específicos para cada população celular (Fig. 24.1). Esses hormônios tróficos viajam pelo pedúnculo infundibular e seguem para a adeno-hipófise por meio de um sistema de vasos porta.

Em contraste com a adeno-hipófise, a neuro-hipófise não sintetiza hormônios. Os hormônios que secreta – arginina vasopressina (AVP) (também conhecida como hormônio antidiurético [ADH]) e ocitocina – são sintetizados nos núcleos paraventricular e supraótico do hipotálamo, transportados ao longo dos axônios e armazenados nas terminações nervosas que acabam na neuro-hipófise. A Tabela 24.1 fornece um resumo dos diferentes hormônios secretados pela hipófise.

As anomalias que afetam a função hipofisária são classificadas em duas categorias amplas: excesso e deficiência de hormônios. O excesso de hormônios usualmente resulta da expansão clonal de uma população celular distinta, contudo, também pode resultar de um aumento dos níveis de hormônios tróficos tanto do hipotálamo como de sítios ectópicos. As causas da deficiência hormonal são mais variadas (Tab. 24.2) e podem acarretar a deficiência de um ou mais hormônios, muitas vezes com a perda contínua e progressiva de outros hormônios ao longo do tempo.

Tumores hipofisários

Os tumores hipofisários são classificados como microadenomas (< 1 cm de maior diâmetro e confinados à sela) ou macroadenomas (≥ 1 cm no maior diâmetro). São também subclassificados em variedades secretoras e não secretoras (Tab. 24.3). Todos os tumores apresentam potencial de crescimento e, ao crescer, podem comprimir o quias-

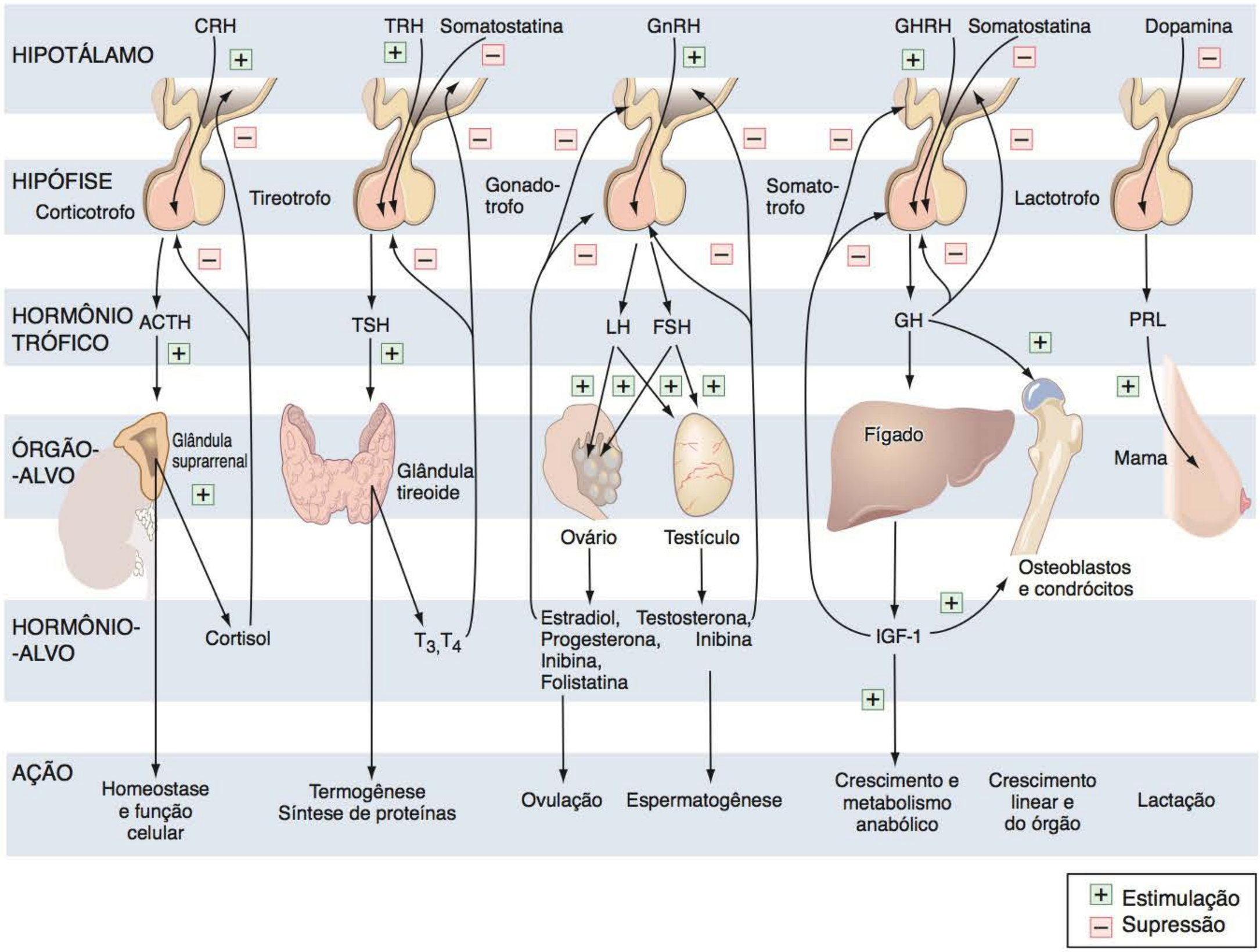


Figura 24.1 Eixo hipotálamo-hipófise-órgão-alvo. (Reproduzido a partir de Melmed, S; Kleinberg, D: Anterior Pituitary. In: Larsen, PR; Kronenberg, HM; Melmed, S et al. (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10. ed. Philadelphia, Saunders, 2003: 181, com permissão.)

Tabela 24.1 Hormônios da hipófise

Adeno-hipófise
Hormônio do crescimento (GH) (somatotropina)
Hormônio estimulador da tireoide (TSH) (tireotropina)
Gonadotrofinas:
Hormônio folículo-estimulante (FSH)
Hormônio luteinizante (LH)
Pró-opiomelanocortina (POMC)
Adrenocorticotropina (ACTH)
β-lipotropina
Prolactina (PRL)
Neuro-hipófise
Arginina vasopressina (AVP) = hormônio antidiurético (ADH)
Oxitocina

Tabela 24.2 Causas da deficiência hormonal hipofisária

Neoplasma hipofisário:
Adenoma hipofisário
Craniofaringioma
Metástases ou carcinoma primário (raramente)
Iatrogênicas:
Radiação
Hipofisectomia
Ressecção peduncular
Doença granulomatosa:
Sarcoidose
Infecção:
Tuberculose
Sífilis
Fungos
Hemorragia e infarto:
Necrose pós-parto (síndrome de Sheehan)
Trauma na cabeça
Apoplexia
Aneurismas da artéria carótida interna
Hipofisite linfocítica autoimune
Hemocromatose
Distúrbios hipotalâmicos primários:
Tumor
Granulomas
Deficiências hormonais idiopáticas ou genéticas envolvendo a hipófise ou o hipotálamo

ma óptico e causar defeitos envolvendo o campo visual, dos quais a hemianopia bitemporal é o mais frequente. A invasão do seio cavernoso pode provocar compressão dos nervos cranianos III, IV, VI, V_1, V_2 e da porção intracavernosa da artéria carótida interna. Do mesmo modo, pode causar hidrocéfalo decorrente da obstrução do terceiro ventrículo. À parte da hipersecreção de um hormônio em particular e da extensão até as regiões adjacentes, esses tumores também acarretam deficiência hormonal resultante da compressão de células de outras linhagens junto à hipófise.

Tabela 24.3 Frequência relativa da ocorrência de tumores hipofisários

Lactotrofo (PRL)	30%
Somatotrofo (GH)	15%
Combinado GH/PRL	8%
Corticotrofo (ACTH)	15%
Tireotrofo (TRH)	1%
Pleuri-hormonal	4%
Não funcional	27%

Prolactina

A PRL é um polipeptídeo produzido pelos lactotrofos da hipófise. É responsável pela iniciação e manutenção da lactação. Sua secreção normalmente é mantida em níveis baixos por meio das ações inibitórias da dopamina (Do) produzida pelo hipotálamo. Assim como ocorre com diversos hormônios hipofisários, a PRL é secretada de modo circadiano e os níveis mais altos são atingidos durante o sono e o nadir, entre as 10 horas da manhã e o período da tarde (Sassin, 1972). A secreção da PRL é pulsátil, com uma amplitude e frequência que não só variam ao longo do dia, como também são impactadas por uma variedade de estímulos fisiológicos (p. ex., estresse, no pós-prandial, exercícios). Em razão de tais fatores e da meia-vida sérica de 26 a 47 minutos, recomenda-se obter dos pacientes três amostras a intervalos de 20 a 30 minutos para realização da triagem para hiperprolactinemia. Essas amostras podem ser analisadas separadamente para cálculo da média dos resultados obtidos, ou alíquotas iguais de cada amostra podem ser misturadas para compor uma única amostra final que, em seguida, é analisada.

A principal forma circulante da PRL é um monômero não glicosilado. Inúmeras formas diferentes ocorrem, entre as quais a PRL "grande" e a macroprolactina (PRL "grande, grande"), que é considerada uma PRL acoplada a uma imunoglobulina (Yazigi, 1997; Conner, 1998). Como todas essas formas reagem com imunoensaios, podem gerar resultados de PRL falsamente elevados em amostras de pacientes cuja elevação patológica da concentração de PRL não é confirmada por TC nem IRM. Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para eliminar essa confusão, tais como o desempenho do imunoensaio após a extração com polietileno glicol e ultrafiltração centrífuga (Amadori, 2003; Diver, 2001; Fahie-Wilson, 2003; Toldy, 2003; Prazeres, 2003; Suliman, 2003).

Em certos casos de prolactinoma, os valores de PRL podem estar extremamente altos. Como é habitual usar uma única diluição nos testes para detecção desse hormônio, as concentrações extremamente altas podem saturar os sítios de ligação e produzir falsos resultados baixos (Barkan, 1998). Esse efeito de "gancho" pode conduzir ao erro diagnóstico do paciente, com indicação da existência de um adenoma cromófobo não funcional. Diante de uma elevada probabilidade de pré-teste de que o paciente apresente macroprolactinoma, recomenda-se que a amostra sérica seja submetida a uma diluição mínima de 1:100.

A PRL atua no tecido da mama e, nesse local, ao ajustar o condicionamento pelo estrógeno, estimula a lactação. A PRL também atua no hipotálamo para inibir a secreção do GnRH. A inibição desse hormônio resulta em diminuição da liberação de LH e de FSH a partir da adeno-hipófise. Na mulheres, esse efeito provoca a diminuição da síntese e da secreção de estrógenos e progesterona pelos ovários, bem como falha da maturação folicular ovariana (ovulação). Nos homens, uma deficiência de FSH e LH causa diminuição da produção testicular e síntese de testosterona, além de cessar a espermatogênese. Adicionalmente, foi sugerido que a hiperprolactinemia também pode estimular a produção suprarrenal, bem como afetar a responsividade imunológica (Lobo, 1980; Walker, 1993).

Os valores séricos de referência da PRL variam de 1 a 25 ng/mL (1 – 25 μg/L) para mulheres, e 1 a 20 ng/mL (1 – 20 μg/L) para homens. Nas mulheres, os maiores níveis de PRL aparecem na pós-puberdade e é provável que decorram do efeito estimulatório do estrógeno (Eastman, 1996). Durante a gravidez, ocorre uma progressiva elevação dos níveis séricos de PRL que podem chegar a 500 ng/mL em torno do terceiro trimestre (Rigg, 1977). Esse fenômeno se deve em grande parte a um aumento do número de células secretoras do hormônio e pode estar associado a um acréscimo de duas vezes ou mais no tamanho da hipófise (Scheithauer, 1990). Os níveis de PRL retornam aos valores basais em cerca de 3 semanas pós-parto nas mulheres que não estão amamentando. Em mães que amamentam, os níveis basais de PRL permanecem moderadamente elevados e apresentam explosões episódicas de secreção em resposta à sucção do mamilo.

Os níveis de PRL aumentam em decorrência de muitos fatores fisiológicos e patológicos, bem como por ação de uma ampla variedade de medicamentos (Tab. 24.4). A elevação dos níveis de PRL consequente à estimulação fisio- e farmacológica raramente excede 200 ng/mL.

Pode haver deficiência de PRL diante da necrose ou infarto da hipófise e, em alguns casos, no pseudo-hipoparatireoidismo. Distúrbios menstruais e infertilidade foram observados em mulheres com total deficiência do hormônio (Kauppila, 1997). É o excesso de PRL que está associado à patologia clínica. A hiperprolactinemia leva à inibição da secreção de GnRH, cuja manifestação típica é a disfunção sexual com infertilidade em indivíduos de ambos os sexos. As mulheres podem apresentar anormalidades envolvendo a fase lútea, oligomenorreia ou amenorreia franca, com ou sem galactorreia. Os homens apresentarão hipoandrogenemia, diminuição da libido e impotência.

Os adenomas hipofisários constituem uma causa importante de hiperprolactinemia. No entanto, qualquer processo que envolva a sela ou o espaço parasselar, comprima o pedúnculo hipofisário e interrompa a distribuição tônica de Do pode acarretar a desinibição da secreção de PRL. O grau de elevação dos níveis séricos de PRL costuma ter correlação com a possibilidade da presença de um tumor hipofisário. Níveis séricos acima de 200 ng/mL quase sempre indicam a existência de um prolactinoma (Frantz, 1998; Freda, 1999; Kleinberg, 1977). Diferente do que se observa em outros tumores hipofisários funcionais, o grau de elevação da PRL apresenta uma boa correlação com o tamanho do tumor.

Cerca de 20 a 40% dos pacientes com acromegalia apresentam hiperprolactinemia. Essa incidência decorre da presença de um tumor misto (contendo lactotrofos e somatotrofos) ou de uma interferência nos mecanismos inibidores de PRL que normalmente estão ativos (p. ex., interrupção da distribuição de Do em razão da compressão do pedúnculo por um tumor, com resultante desinibição da secreção de PRL). Outra causa importante de hiperprolactinemia é o hipotireoidismo. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) estimula a

Tabela 24.4 Causas de hiperprolactinemia

Fisiológicas:
Sono, estresse, pós-prandialmente, dor
Coito, gravidez, estimulação do mamilo ou amamentação
Distúrbios sistêmicos:
Lesões na parede torácica ou na medula espinal torácica
Hipotireoidismo primário ou secundário
Insuficiência suprarrenal
Insuficiência renal crônica
Cirrose
Medicamentos:
Medicações de uso psiquiátrico:
fenotiazinas, haloperidol, tioxantinas, buspirona, olanzapina, risperidona, domperidona, inibidores da MAO, fluoxetina, amitriptilina
Netoclopramida
Anti-hipertensivos: labetolol, α-metildopa, reserpina, verapamil
Cimetidina, ranitidina
Estrógenos, contraceptivos orais, suspensão de contraceptivos orais
Opiáceos: heroína, metadona, morfina, apomorfina
Tumor hipofisário secretor de prolactina: prolactinoma, acromegalia
Macroadenoma (compressão do pedúnculo da hipófise)
Macroprolactinemia
Compressão no ou transecção do pedúnculo da hipófise – interrupção da transmissão da dopamina aos receptores D2 nos lactotrofos
Secreção ectópica da prolactina por tumores não hipofisários
Idiopático
Doença dos ovários policísticos
Ataques epiléticos

secreção não só de TSH como também de PRL, explicando a discreta hiperprolactinemia observada tanto no hipotireoidismo primário (tireoide) como secundário (hipófise). O tratamento de reposição com hormônio da tireoide usualmente faz com que os níveis de PRL retornem ao normal. Em raras ocasiões, a hiperprolactinemia pode ser causada pela produção ectópica de hormônio.

É importante avaliar todos os pacientes cujos níveis de PRL encontram-se anormalmente elevados. Testes de função da tireoide (tiroxina livre [T_4L] e TSH) são sempre indicados para excluir a possibilidade de hipotireoidismo. Como a hiperprolactinemia pode estar presente em mais de 40% dos casos de acromegalia, é conveniente quantificar os níveis de fator de crescimento da insulina-símile 1 (IGF-1, *insulin-like growth factor*), discutido adiante. Outros hormônios que podem ser testados incluem FSH, LH testosterona, estradiol e, havendo indicação clínica, testes de função do eixo suprarrenal. Todos os pacientes devem ser submetidos a exames de TC ou IRM para avaliação da sela, com e sem contraste. A IRM proporciona melhor contraste e detalhamento anatômico, além de ser a melhor forma de visualizar microadenomas. O exame formal do campo visual também é uma ferramenta de monitoramento essencial na supervisão de pacientes com tumores hipofisários e deve ser realizado ao menos anualmente em pacientes com doença estável.

Hormônio do crescimento (GH)

O GH é sintetizado, armazenado e secretado pelos somatotrofos hipofisários em resposta à secreção de hormônio liberador de GH (GHRH, *growth hormone-releasing hormone*) pelo hipotálamo. A somatostatina, também produzida pelo hipotálamo, inibe a liberação de GH. Embora haja evidências da ação direta do GH sobre os ossos longos em crianças, a maioria de suas ações anabólicas e metabólicas é mediada de forma indireta, por meio de uma substância intermediária – a IGF-1 (também conhecido como somatomedina C). A IGF-1 é sintetizado no fígado e em certos tecidos-alvo, em resposta à estimulação pelo GH. Circula no sangue complexado a proteínas ligadoras de IGF (IGF-BP, IGF-*binding proteins*). Dentre essas proteínas, a IGF-BP3 é a variedade predominante na circulação. Como ocorre com todos os hormônios, é a forma livre (não ligada) que apresenta atividade biológica. De modo semelhante à somatostatina, a IGF-1 exerce retroalimentação negativa sobre a hipófise e inibe a secreção de GH.

A secreção do GH é pulsátil. A frequência e a amplitude dos picos são maiores durante a puberdade e exibem um declínio estável com o avanço da idade (Casanueva, 1992). Uma vez que até 70% da secreção de GH ocorre durante o 4º estágio (ondas lentas) do sono, foi sugerido que um declínio do GH nesse estágio associado à idade pode ser o responsável pela queda dos níveis desse hormônio observada no decorrer do envelhecimento (Van Cauter, 1998, 2000). Além do GHRH e da somatostatina, vários fatores modulam regularmente a secreção de GH (Fig. 24.2). O estresse intenso (p. ex., cirurgia, sepse), jejum, esteroides sexuais, desnutrição crônica, apomorfina, levodopa e refeições ricas em proteína são todos fatores estimulantes da secreção de GH. Em comparação aos homens, as mulheres tendem a apresentar níveis de GH mais altos, talvez em decorrência da sensibilização do hipotálamo por outros fatores estimulantes do GH (Eastman, 1996).

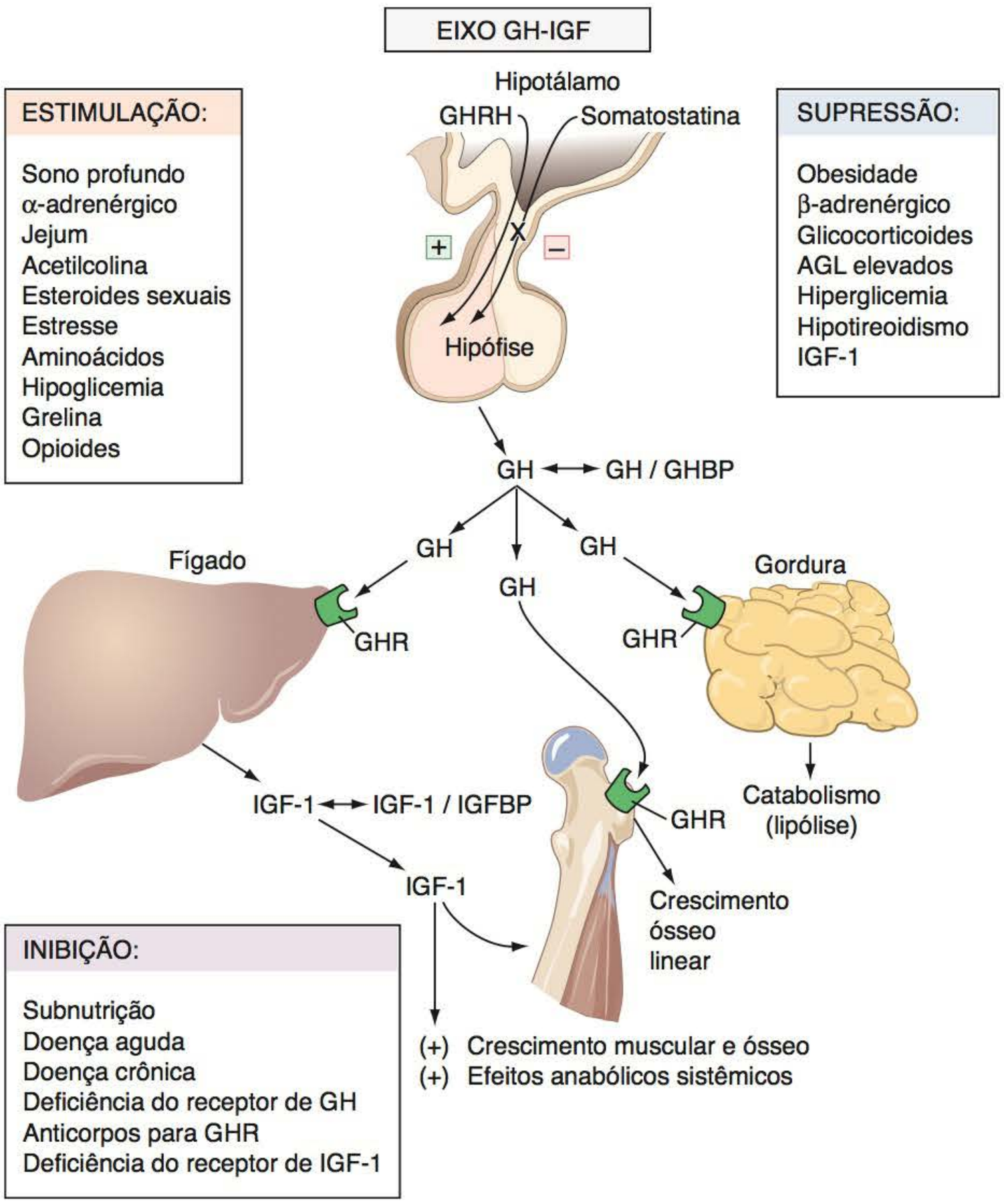


Figura 24.2 Eixo hipotálamo-hipófise-hormônio do crescimento. Alça de retroalimentação influenciando a secreção e a ação de GH-IGF-1. GHRH = hormônio liberador do GH; GH = hormônio do crescimento; GHBP = proteína ligadora do GH; GHR = receptor do GH; IGF-1 = hormônio de crescimento insulina-símile 1 (somatomedina C); IGFBP = proteína ligadora do IGF; AGL = ácidos graxos livres. (De Melmed, S; Kleinberg, D: Anterior Pituitary. In: Larsen, PR; Kronenberg, HM; Melmed, S et al. (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10 thed. Philadelphia, Saunders, 2003:221, com permissão.)

Os níveis séricos de GH são indetectáveis durante a maior parte do dia em indivíduos sadios e não estressados. Esse fato, aliado à natureza episódica da secreção de GH, dificulta a interpretação de amostras únicas. Em consequência, o diagnóstico da deficiência desse hormônio é feito com base em quantificações realizadas mediante estimulação farmacológica, sendo que o excesso de GH é confirmado pela falha em suprimir o hormônio após uma carga oral de glicose. O GH costuma ser quantificado por imunoensaio de quimioluminescência.

Deficiência de hormônio do crescimento

A deficiência idiopática de GH é a causa mais comum de deficiência desse hormônio (DGH) em crianças, enquanto o adenoma hipofisário constitui a causa mais frequente da DGH em adultos. Não há um método simples e reproduzível que seja capaz de determinar padrões secretórios anormais de GH. Em indivíduos sadios, 70 a 80% dos resultados de GH são inferiores a 1 ng/mL (< 1 g/L), contudo, os picos de secreção tipicamente alcançam de 20 a 40 ng/mL (20–40 g/L) (Baumann, 1987). Assim, em crianças que apresentam retardo da velocidade de crescimento, uma concentração de GH baixa ou indetectável não necessariamente indica DGH. De modo semelhante ao GH, o IGF-1 sofre declínio com o envelhecimento. O IGF-1 tem maior utilidade diagnóstica para pacientes com menos de 40 anos de idade e, mesmo assim, não é sensível o bastante para ser empregado como teste independente no diagnóstico de DGH (Almeretti, 2003).

A manipulação do sistema endócrino por meio da estimulação e supressão de vários eixos é frequentemente necessária para diagnosticar condições de deficiência e excesso de hormônios. Nesse sentido, a DGH é diagnosticada pela demonstração da falha dos níveis de GH para aumentar de maneira adequada em resposta à estimulação farmacológica. O teste de tolerância à insulina (TTI) há muito é considerado o "padrão-ouro" do diagnóstico da DGH. Entretanto, é mais desagradável ao paciente, requer o acompanhamento de um médico no decorrer de todo o procedimento do teste e é contraindicado àqueles que possuem história de ataques convulsivos ou doenças cardíacas ou cerebrovasculares. A falha em elevar a concentração de GH acima de 5 ng/mL em adultos, e acima de 10 ng/mL em crianças, é considerada anormal. Em casos de indivíduos impossibilitados de submeterem-se ao TTI ou para aqueles que necessitam passar por um segundo teste confirmatório, a próxima etapa costuma ser a estimulação com arginina, seja isolada ou combinada ao GHRH. O teste preferido é uma combinação de GHRH mais arginina, uma vez que muitos indivíduos adultos falham na estimulação com arginina isolada (Biller, 2002). A falha em aumentar os níveis de GH acima de 4,1 está associada a uma sensibilidade de 95% e especificidade de 91% no diagnóstico da DGH (Biller, 2002). Outros métodos utilizados na avaliação da DGH são: monitoramento de GH por 24 horas ou durante o período noturno e testes provocativos com clonidina, L-dopa ou glucagon (em seguida ao condicionamento com propranolol). Todos esses testes trazem uma significativa variabilidade individual e ainda não foram sistematicamente estudados. Seu uso é destinado principalmente à população pediátrica (Rose, 1988). As mesmas faixas de normalidade são atribuídas a esses testes, como descrito para o TTI. Existem duas situações em que é possível argumentar contra a necessidade de realizar testes para DGH. A primeira diz respeito aos pacientes com doença hipofisária conhecida e baixos níveis de IGF-1. A outra situação é representada pelos pacientes com evidências de três ou mais deficiências de hormônios hipofisários – estudos demonstraram que tais pacientes apresentam uma probabilidade > 96% de terem DGH (Hartman, 2002).

Para crianças, é comum empregar testes de exercícios na triagem para DGH. A realização de mais testes é contraindicada quando os resultados obtidos nessa triagem são normais. Entretanto, se não for observado o devido aumento dos níveis de GH, o paciente certamente deve ser submetido ao teste farmacológico (Eddy, 1974). Uma vez que crianças sadias podem não responder isoladamente a qualquer teste provocativo de GH, a DGH na infância é definida pela ausência de elevação dos níveis séricos de GH em resposta a pelo menos dois estímulos farmacológicos. Quantificações de IGF-1 têm sido utilizadas na triagem de crianças com DGH, porém, como são vários os fatores que podem causar diminuição dos níveis de IGF-1, essas medidas não são empregadas na confirmação do diagnóstico de DGH. Os níveis de IGF-1 declinam em condições de desnutrição, hipotireoidismo, doença hepática, diabetes melito descompensado e envelhecimento. Os níveis de IGFBP-3 usualmente se mantêm em paralelo com os de IGF-1 e com frequência são baixos na DGH. Entretanto, os resultados que caem na faixa de referência não excluem o diagnóstico, no caso da DGH. Até 18% dos indivíduos que apresentam essa deficiência podem exibir níveis normais de IGF-1. É preciso ter cuidado ao interpretar os valores de IGF-1 e IGFBP-3, uma vez que os próprios ensaios e os cutoffs utilizados para definir a condição normal diferem consideravelmente entre os laboratórios.

É importante compreender a diferença acerca dos aspectos fisiológicos por trás do teste com GHRH, em contraposição aos demais secretagogos. O TTI e a arginina estimulam a produção de GHRH. A clonidina inibe a somatostatina. Para que esses agentes provocadores desencadeiem o aumento dos níveis de GH, o hipotálamo deve estar intacto. Ao utilizar o GHRH, desvia-se do hipotálamo e estimula-se diretamente a hipófise. Portanto, é possível que até 50% dos casos de pacientes com DGH terciária (hipotalâmica) não sejam detectados.

Excesso de hormônio do crescimento

A superprodução de GH possa resultar em uma condição denominada acromegalia. Se essa condição se desenvolver antes do fechamento das epífises, os indivíduos afetados podem ser tornar excessivamente altos – é o "gigantismo". Esse distúrbio é mais comum durante a idade adulta e causa alargamento difuso dos tecidos moles e órgãos no corpo inteiro. Algumas de suas características incluem prognatismo, formação de bossa frontal e mãos em forma de pá. O teste de triagem para casos de suspeita clínica de acromegalia consiste na coleta aleatória para detecção de IGF-1. Se os níveis desse fator estiverem altos em relação à faixa de valores de referência para a idade e o sexo, torna-se necessário confirmar o diagnóstico por meio de um teste de tolerância à glicose oral (TTGO). Esse teste consiste em administrar 75 g de glicose por via oral e coletar amostras de sangue no estado basal e a intervalos de 30 minutos, durante as 2 horas subsequentes, para determinação dos níveis de glicose e GH. A resposta normal reflete a supressão de GH, com concentrações < 1 ng/mL (1 μg/L) em qualquer momento no decorrer da realização do teste. Se não for observada essa queda dos níveis de GH, o paciente recebe o diagnóstico de acromegalia (American Association of Clinical Endocrinologists, 2004). A dificuldade reside no diagnóstico da doença branda. Freda et al. estudaram 60 pacientes com acromegalia em período pós-operatório, 22 pacientes com doença ativa (níveis elevados de IGF-1), 38 pacientes em processo de remissão (IGF-1 normal) e 25 pacientes-controle sadios. A maior concentração de GH de nadir foi 0,13 μg/L no grupo controle, e 0,30 μg/L no grupo de pacientes com doença ativa. Cerca de 50% dos pacientes com doença ativa apresentaram valores < 1 μg/L e tais resultados conduziram a erros de classificação de tais indivíduos, foram considerados pacientes normais segundo os critérios adotados, mencionados anteriormente (Freda, 1998; Trainer, 2002). Em um estudo mais recente de 16 pacientes com a forma branda da doença, a maioria com microadenomas, Dimaraki et al. (2002) também constataram que 50% dos pacientes com acromegalia eram capazes de suprimir os níveis de GH a valores < 1 μg/L após um TTGO (Dimaraki, 2002). Um dos motivos propostos seria que os pacientes com doença ativa e supressão normal podem ter sofrido alterações sutis na secreção de GH que podem não ter sido desencadeáveis com esse teste de supressão de curta duração. Para avaliar essa possibilidade, adotou-se preferencialmente a seguinte sugestão (Trainer, 2002): se os resultados aleatórios de IGF-1 são normais e GH < 0,3 μg/L, significa que a acromegalia pode ser excluída. Por outro lado, se o teste resultar anormal, a determinação de IGF-1 deve ser repetida e deve ser realizado um TTGO. A falha da supressão dos níveis de GH para valores < 0,3 μg/L acompanhada de níveis elevados de IGF-1 é diagnóstica de acromegalia. A supressão do GH com queda para níveis < 0,3 μg/L e IGF-1 normal exclui a possibilidade de acromegalia. O acompanhamento de perto é indicado no caso de pacientes que suprimem adequadamente o GH e apresentam níveis de IGF-1 elevados (Trainer, 2002).

Pacientes com acromegalia podem mostrar um aumento paradoxal, ausência de resposta ou declínio parcial dos níveis de GH em resposta ao TTGO (Ezzat, 1997). A amostragem aleatória para GH é considerada inadequada quando se deseja estabelecer o diagnóstico de acromegalia, pois existe uma considerável sobreposição dos níveis desse hormônio entre indivíduos sadios e com doença. Além disso, os níveis de GH podem estar aumentados em pacientes com diversos distúrbios,

incluindo doença renal, cirrose e desnutrição, bem como em pacientes expostos ao estresse físico ou emocional.

Apesar de haver uma associação entre adenomas maiores e níveis mais altos de GH, considera-se fraca a correlação existente entre os níveis desse hormônio e as manifestações de acromegalia. Na maioria dos pacientes com acromegalia não tratada, os níveis de GH permanecem acima dos valores basais no decorrer do dia, com uma variação de 10 a 100 ng/mL (10 – 100 μg/L). Níveis séricos excessivos de GH da ordem de 50 a 100 ng/mL (50 – 100 μg/L) são virtualmente jamais observados em indivíduos sem acromegalia (Barkan, 1989).

Outras manobras diagnósticas que empregam TRH, GnRH e GHRH fornecem resultados discordantes para cerca de 50% dos pacientes com acromegalia. Por isso, o uso desses testes para fins diagnósticos ou no monitoramento da doença não é recomendado (American Association of Clinical Endocrinologists, 2004).

No caso de pacientes com diagnóstico de acromegalia que não apresentam evidências de um tumor hipofisário, os níveis de GHRH devem ser determinados para detectar uma fonte hipotalâmica ou ectópica da acromegalia.

Pacientes tratados para a acromegalia requerem monitoramento permanente da atividade dessa doença. A meta da terapia consiste em normalizar os níveis de IGF-1 e suprimir a resposta de GH ao TTGO para valores < 1 ng/mL (1 μg/L). Vários estudos demonstraram que o cumprimento dessa meta resulta em taxas de mortalidade comparáveis àquelas observadas na população normal (Swearingen, 1998; Holdaway, 2004; Rajasoorya, 1994; Orme, 1998).

Hormônios da neuro-hipófise

A ocitocina e a AVP (também denominada ADH e discutida nos Caps. 8 e 14) são os principais hormônios da neuro-hipófise. Cada um deles possui papéis fisiológicos distintos, com sobreposição parcial de efeitos na estimulação da contração da musculatura lisa e na manutenção da homeostasia hídrica. São ambos oligopeptídeos pequenos, cada um é composto por nove resíduos de aminoácidos e apresenta massa total de aproximadamente 1 kDa. São sintetizados nos corpos celulares nervosos ao nível do hipotálamo e transportados ao longo dos axônios até os terminais nervosos situados na neuro-hipófise, onde são estocados em grânulos de secreção. Os potenciais de ação neuronais originados no hipotálamo são conduzidos ao longo dos axônios, resultando na degranulação das vesículas e liberação de ocitocina e AVP no espaço perivascular e, por fim, na circulação. Diferente da adeno-hipófise, a neuro-hipófise é algo mais do que um repositório onde os hormônios permanecem até serem secretados. Desse modo, o rompimento do pedúnculo infundibular ou a remoção da neuro-hipófise não necessariamente resultam em perda total desses hormônios, cuja produção ocorre no hipotálamo.

Ocitocina

A secreção de ocitocina é estimulada pelo estiramento da cérvix e da vagina durante o parto; isso é conhecido como reflexo de Fergusson. A ocitocina contribui para as contrações uterinas tardias que ocorrem durante o trabalho de parto, atuando diretamente na decídua (Fuchs, 1982). Também tem papel na homeostasia no sítio placentário após o parto. No decorrer da gestação, o estrógeno regula positivamente a expressão dos receptores de ocitocina no útero e na decídua, resultando em aumento da sensibilidade a esse hormônio ao final do termo gestacional.

A ocitocina estimula a contração das células mioepiteliais que circundam as glândulas mamárias e os ductos lactíferos, provocando a ejeção do leite. Em resposta à sucção, os estímulos neurogênicos são transmitidos a partir do mamilo até os III, IV e V nervos torácicos, a medula espinal, o mesencéfalo e o hipotálamo, onde a liberação de ocitocina é desencadeada. Estímulos psicológicos podem desviar essa via, de modo que explosões de secreção de ocitocina podem ocorrer quando a mãe antecipa a amamentação ou escuta um bebê chorar (Jenkins, 1991; Yokoyama, 1994). Situações estressantes podem inibir a secreção do hormônio, resultando na diminuição da ejeção de leite.

Condições patológicas associadas ao excesso ou à deficiência de ocitocina são raras e limitam-se a relatos de caso. Nos homens, a função do hormônio permanece desconhecida. A demanda clínica pela determinação dos níveis de ocitocina é bastante escassa. Como possui meia-vida de 3 a 5 minutos e está sujeita à rápida degradação pela ocitocinase, um procedimento laboratorial de referência individual para sua coleta deve ser seriamente adotado para obtenção de resultados significativos.

Arginina vasopressina (AVP)/Hormônio antidiurético (ADH)

A AVP – também conhecida como ADH – é sintetizada junto aos núcleos paraventricular e supraótico do hipotálamo. Sua principal função consiste em manter a homeostase osmótica por meio da regulação do equilíbrio hídrico.

Para tanto, a AVP estimula os receptores V2 localizados nas células principais que delimitam os ductos coletores corticais dos rins. Como já discutido no Capítulo 14, o ADH induz um aumento da produção de cAMP, que, por sua vez, promove a fusão dos canais de água (aquaporinas) com a membrana apical das células principais, aumentando a permeabilidade e a reabsorção da água. Em concentrações sanguíneas bem maiores, o AVP também atua como pressor potente e causa vasoconstrição (receptor V1), promove a secreção de ACTH a partir da adeno-hipófise e estimula a produção do fator de coagulação VIII.

A secreção de ADH é modulada por alterações na osmolalidade sérica e no volume intravascular. As modificações na osmolalidade plasmática são detectadas pelos osmorreceptores localizados junto ao hipotálamo anterior. Os níveis plasmáticos de ADH sobem e caem de modo diretamente proporcional à osmolalidade sérica. Existe uma relação linear de concordância entre o ADH e a osmolalidade da urina (Uosm). A Uosm tem seu limite em torno de 1.200 mOsm/kg, que é a máxima Uosm tolerada pelo gradiente de concentração medular renal.

A máxima estimulação da secreção de ADH ocorre a osmolalidades séricas > 295 mOsm/kg, sendo suprimida quando a osmolalidade cai a menos de 284 mOsm/kg. A sede pode ser considerada um mecanismo à prova de falhas para manutenção da homeostase líquida e osmótica, iniciado a osmolalidades plasmáticas (Posm) maiores do que aquelas necessárias para estimulação da secreção de ADH. Os receptores da sede estão localizados no hipotálamo e diferem dos osmorreceptores que estimulam a secreção desse hormônio.

As alterações do volume intravascular são detectadas pelos barorreceptores, que estão distribuídos em dois grupos: os receptores de volume de baixa pressão, localizados no átrio direito e no sistema venoso pulmonar; e os barorreceptores arteriais de alta pressão, localizados no seio carótico e no arco aórtico. Tais receptores normalmente são mantidos sob inibição tônica. A diminuição do volume intravascular remove essa inibição e resulta em aumento da concentração de ADH, provocando aumento da reabsorção da água. A secreção de ADH é bem mais sensível às alterações de osmolalidade do que às alterações do volume intravascular. Um aumento de 1 a 2% da osmolalidade é suficiente para causar elevação da secreção do hormônio, enquanto um estímulo muito mais intenso (p. ex., uma queda de 5 a 10% no volume ou pressão sanguínea) é necessário para que o disparo dos barorreceptores provoque liberação de ADH.

Além das alterações da osmolalidade e do volume intravascular, outros fatores fisiológicos capazes de estimular a secreção do ADH incluem náusea, citocina IL-6, hipoglicemia e nicotina (Masrorakos, 1994; Reihman, 1985).

Os níveis plasmáticos basais de vasopressina normalmente variam entre 0,5 e 2 pg/μL. Em concerto com o hormônio natriurético atrial, a sede e o eixo renina-angiotensina-aldosterona, o ADH atua na manutenção da pressão, do volume e da tonicidade do sangue. Do mesmo modo, é preciso considerar esses múltiplos fatores interativos ao avaliar um paciente quanto à existência de distúrbios da homeostase hídrica. A osmolalidade plasmática normal varia de 280 a 295 mOsm/kg, enquanto a concentração de sódio no plasma oscila entre 135 a 145 mmol/L. Essa osmolalidade pode ser medida diretamente, por meio da determinação da depressão do ponto de congelamento do plasma ou da pressão de vapor plasmática. De modo indireto, é possível determinar a osmolalidade pela quantificação da concentração plasmática de sódio, do BUN e da glicose, bem como pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Osmolalidade plasmática} = \{2 \cdot [\text{Na}]\ (\text{mEq/L})\} + \{\text{glicose (mg/dL)}/18\} + \{\text{BUN (mg/dL)}/2{,}8\} \quad (24.1)$$

Essa equação é discutida em detalhes nos Capítulos 8 e 14.

Como o sódio é o principal soluto do plasma, a hiponatremia é equi-

valente à hipo-osmolalidade. É usual haver uma excelente concordância entre a osmolalidade determinada de modo direto e a calculada. Entretanto, existem duas situações em que essa concordância está ausente: na pseudo-hiponatremia (também denominada hiponatremia "artificial") e na presença de altas concentrações de outros solutos efetivos. Na pseudo-hiponatremia, o volume de plasma é deslocado pela presença de altas concentrações de lipídeos ou proteínas (p. ex., hiperglobulinemia) e resulta na concentração plasmática de Na^+ falsamente baixa, detectada por espectrofotometria de chama. Essa possibilidade é pouco preocupante nos dias atuais, visto que a maioria dos laboratórios utiliza eletrodos íon-específicos na quantificação do Na^+. É importante ter em mente que a Posm medida não é afetada pela presença de hiperlipidemia ou de paraproteinemia, uma vez que a concentração de partículas de soluto por volume de líquidos não sofre alterações.

A presença de altas concentrações de solutos osmoticamente ativos, tais como glicose, agentes de contraste radiológico, manitol e etilenoglicol, faz a água sair do espaço intracelular para o compartimento extracelular, causando hiponatremia por diluição. Uma hiponatremia "por translocação" semelhante ocorre com a absorção de glicina durante a ressecção transuretral da próstata, bem como na execução de procedimentos ginecológicos e ortopédicos (Hahn, 2001; Ayus, 1997). Em tais circunstâncias, a Posm calculada não é confiável e deve ser medida diretamente. Uma diferença > 10 mOsm/kg entre Posm calculada e Posm medida sustenta a ocorrência de pseudo-hiponatremia ou de outros solutos osmolares (Kumar, 1998).

Na hiperglicemia, a concentração de Na^+ medida deve ser corrigida com a adição de 1,6 mEq/L para cada aumento de 100 mg/dL nos níveis séricos de glicose acima do normal (100 mg/dL). Uma análise mais recente sugeriu que essa fórmula pode subestimar a diminuição dos níveis de Na^+ promovida pela hiperglicemia, e defendeu o uso de um fator de correção valendo 2,4 mEq/L (Hillier, 1999). Trata-se de um caso de hiponatremia verdadeira se, após aplicada a fórmula de correção, a concentração sérica de Na^+ ainda for < 135 mEq/L.

Durante a gravidez, ocorre uma reconfiguração dos centros de regulação osmótica (osmostat), em que a osmolalidade sofre uma queda de aproximadamente 10 mOsm/kg (Lindheimer, 1995). O mecanismo preciso por meio do qual esse fenômeno ocorre permanece desconhecido. Todavia, estudos sugeriram um papel para o hormônio relaxina e para a enzima ocitocinase. Durante a gestação, há um aumento progressivo da produção placentária de ocitocinase, que, além de quebrar a ocitocina, também quebra a vasopressina, possivelmente acarretando uma modificação da alça de retroalimentação da osmolalidade da AVP hipotalâmica.

Diabetes insípido

O diabetes insípido (DI) pode ser classificado como central (em razão da ausência ou diminuição da secreção de ADH a partir do hipotálamo ou da neuro-hipófise) ou nefrogênico (em função da resistência renal às ações do ADH). Cada tipo de diabetes é ainda subclassificado como completo ou parcial. Todas as variantes são caracterizadas pela passagem de grandes volumes de urina diluída (> 2,5L/dia), em face de uma osmolalidade plasmática inadequadamente elevada. Contanto que o mecanismo da sede permaneça intacto e que haja livre acesso à água, a maioria dos indivíduos pode evitar a desidratação e manter a osmolalidade plasmática normal (Posm), assim como os níveis séricos de Na^+.

O teste de deprivação da água é o teste preferido para o diagnóstico de DI (Tab. 24.5). É possível distinguir as formas de DI central e nefrogênica por meio da resposta à vasopressina, tanto endógena como exógena (Tab. 24.6). Na DI neurogênica, os níveis de ADH são baixos e os rins atuam rapidamente no sentido de conservar a água em resposta à administração exógena de ADH. Em contraste, a DI nefrogênica está associada a níveis normais ou aumentados de ADH e a administração de ADH adicional exerce pouco ou nenhum efeito sobre a reabsorção renal de água. A diferenciação da DI nefrogênica parcial da polidipsia primária (PP) pode ser mais difícil. Enquanto no DI o problema subjacente reside na dificuldade de manter o conteúdo de água livre, na PP a patofisiologia advém de um aumento da ingestão de líquidos. A PP pode ser decorrente tanto de um DI dipsogênico como de uma polidipsia psicogênica. Na DI dipsogênica, o ponto de ajuste para a secreção de ADH é normal, entretanto, ocorre uma reconfiguração do limiar da sede que passa a ser inferior ao limiar para secreção do ADH. Na polidipsia psicogênica, os osmostat para secreção de ADH são normais, contudo, em razão da doença psiquiátrica subjacente, o indivíduo apresenta compulsão para beber volumes excessivos de lí quido. Essa ingestão de grandes volumes de

Tabela 24.5 Teste de deprivação hídrica para diagnóstico e classificação do diabetes insípido

Nos casos de poliúria suave, é possível instruir o paciente a abster-se da ingestão de líquidos a partir das 10 h da noite em diante. Para indivíduos com poliúria de grau mais severo (8 a 10 L/dia), a deprivação da água deve ser iniciada de manhã cedo, sob estreita observação.

1 Durante o teste, o paciente fica proibido de ingerir qualquer coisa pela boca.
2 Obtenha a medida dos parâmetros basais: volume (Uvol) e osmolalidade da urina (Uosm), osmolalidade plasmática (Posm) e níveis plasmáticos de sódio (P_{Na}). Registre também o peso (Pe) e a pressão sanguínea (PS)/pulsação (P) com o paciente sentado e em pé.
3 Amostras de urina e plasma são coletadas a cada hora para avaliação de Uvol, Uosm e Posm. Os valores de Pe, PS e P também são registrados, bem como os pedidos de líquido.
4 Obtenha amostras para avaliação de Uvol, Uosm, Posm, P_{Na} e AVP (plasma) diante de qualquer uma das seguintes situações: quando a Uosm atingir um platô (p. ex., a cada hora, um aumento < 30 mOsm/kg durante 3 h consecutivas) ou o peso corporal diminuir em 3 – 5%, ou quando o paciente desenvolver uma queda > 20 mmHg na PS sistólica.
5 Administrar 1 µg de desmopressina por via i.v. ou i.m.; ou 5 µg de vasopressina aquosa (AVP) por via s.c. A produção de urina e a osmolalidade do plasma devem ser registradas em 30, 60 e 120 minutos após a injeção. O maior valor de Uosm é utilizado para avaliar a resposta do paciente à AVP.

Precauções	
Quando possível, descontinuar qualquer medicação que possa influenciar a secreção de ADH. Observe se o paciente apresenta hipotensão e náuseas, que podem estimular a secreção desse hormônio. O paciente deve ser proibido de fumar durante a realização do teste.	
Interpretação	
Normal	A Uosm final antes do desafio com AVP é maior do que a Posm. Após o desafio, a Uosm se torna menos de 10% mais alta do que o valor máximo de Uosm alcançado apenas com a restrição hídrica.
DI neurogênico	A Uosm final antes do desafio com AVP é menor do que Posm. Após a administração de AVP, a Uosm sofre um aumento superior a 50%.
DI nefrogênico	A Uosm final antes do desafio com AVP é menor do que Posm. Após a administração de AVP, a Uosm sofre um aumento inferior a 10%.
DI central parcial	A Uosm pode ser maior do que a Posm após a desidratação; entretanto, há um aumento de apenas 10 – 50% da Uosm após a administração de AVP.
DI nefrogênico parcial	A Uosm pode ser maior do que a Posm após a desidratação; entretanto, há um aumento superior a 10% na Uosm após a administração de AVP.

A representação gráfica, em nomogramas de Zerbe e Robertson, dos valores de Uosm basais e pós-desidratação, e também dos valores de ADH plasmático permitirá distinguir entre DI nefrogênica parcial, DI central parcial e polidipsia primária (Figs. 24.3 e 24.4).

Uosm = osmolalidade da urina; Posm = osmolalidade do plasma.

Tabela 24.6 Testes de diagnóstico diferencial dos distúrbios da hemostasia hídrica

Distúrbio	Basal			Após 12 h de restrição líquida			Osmolalidade da urina após desafio com AVP
	Na^+ e osmolalidade no soro	Na^+ e osmolalidade na urina	ADH sérico	Na^+ e osmolalidade no soro	Na^+ e osmolalidade na urina	ADH sérico	
Controle normal	N	N	N	N	Alta	Alto	Inalterada
SIADH	Baixa	N–Alta	Alto	Baixa-N	Alta	Alto	
DI neurogênica	N–Alta	Baixa	Baixo	Alta	Baixa–N	Baixo	Aumentada
DI nefrogênica	N–Alta	Baixa	N–Alto	Alta	Baixa–N	Alto	Inalterada
Polidipsia psicogênica	Baixa–N	Baixa	Baixo	N	N–Alta	N–Alto	Inalterada

SIADH = síndrome da secreção inadequada de ADH; DI = diabetes insípido; ADH = hormônio antidiurético; AVP = arginina vasopressina; N = normal.

líquido, assim como na PP, lava o gradiente de concentração medular existente nos rins e resulta na diminuição da habilidade de concentrar a urina em resposta à desidratação. Diferenciar entre DI nefrogênica e PP, bem como entre aqueles que apresentam resposta equivocada ao ADH, é uma tarefa que pode ser melhor realizada por meio da representação gráfica dos valores basais e pós-desidratação de Uosm e ADH plasmático em nomogramas criados por Zerbe e Robertson (Figs. 24.3 e 24.4) (Zerbe, 1981, 1987). A quantificação direta dos níveis plasmáticos de ADH pode ser útil na confirmação do diagnóstico de uma deficiência ou excesso patológicos de ADH na presença de um distúrbio conhecido ou suspeito envolvendo a função renal ou a homeostasia de líquidos e eletrólitos, ou quando um paciente é incapaz de tolerar testes fisiológicos. Nos casos de DI congênita, os familiares portadores heterozigotos de mutações do gene do ADH podem ser identificados pela demonstração da diminuição dos níveis desse hormônio, que talvez seja a única manifestação subclínica da deficiência de ADH.

A DI nefrogênica pode ser tanto congênita como adquirida. Um defeito no receptor com herança ligada ao cromossomo X é a etiologia mais comum da DI nefrogênica congênita. A causa mais comum de DI nefrogênica adquirida são os medicamentos (Holtzman, 1994). Sabe-se que os medicamentos associados a essa doença são o lítio, demeclociclina e anestésico metoxiflurano. Outras causas de DI nefrogênica adquirida são a hipercalcemia, hipocalemia, anemia falciforme e uropatia pós-obstrutiva (Tab. 24.7).

A DI neurogênica pode ser congênita por causa da ocorrência de mutações autossômicas dominantes no peptídeo sinalizador ou nos éxons codificadores de neurofisinas (McLeod, 1993; Yuasa, 1993). É mais comumente o resultado de lesões que afetam o hipotálamo, incluindo tumores metastáticos, trauma e distúrbios granulomatosos. Os fármacos que causam a doença ao suprimir a liberação de ADH são a fenitoína, a clorpromazina e os agonistas α-adrenérgicos. Suspeita-se de que autoanticorpos dirigidos contra as células produtoras de ADH hipotalâmicas possam ser os responsáveis por alguns casos de DI neurogênica idiopática (De Bellis, 1994, 1999; Maghnie, 2000). Esses anticorpos são detectáveis por imunofluorescência indireta com anticorpos (Tab. 24.7).

Outra condição comum na qual os níveis de ADH encontram-se diminuídos é a enurese noturna primária em crianças. Embora esses pacientes apresentem níveis de ADH apenas discretamente menores do que no grupo controle (2,9 ng/L *versus* 3,6 ng/L), a terapia com vasopressina permite melhorar com segurança os sintomas clínicos (Willie, 1994). A determinação dos níveis de ADH nem sempre é útil ao diagnóstico dessa condição, por causa da sobreposição moderada entre as populações de crianças enuréticas e normais. A determinação da gravidade específica de uma amostra da primeira urina da manhã é um método mais confiável para identificar crianças que podem ser beneficiadas pela suplementação com ADH. A urina dessas crianças terá gravidade específica abaixo de 1,015 (Mevorach, 1995).

Síndrome da secreção inadequada de ADH (SIADH)

A síndrome da secreção inadequada de ADH (SIADH, syndrome of inappropriate secretion of ADH) é caracterizada por uma hiponatremia hipo-osmolar euvolêmica, associada a uma urina hiperosmolar (resultante de uma natriurese inadequada contínua). Por definição, não é possível diagnosticar a SIADH sem antes excluir a possibilidade de um estímulo não osmótico para secreção de ADH, bem como de outras patologias que interferem na depuração de água livre (Vistorina, 2002). Os fatores fisiológicos que desencadeiam a secreção de ADH são náusea, gravidez, hipoglicemia, hipertensão intracraniana, ventilação mecânica e hipóxia. Hipotireoidismo e deficiência de glicocorticoides causam diminuição da depuração de água livre e levam à hiponatremia por diluição. A deficiência de mineralocorticoides pode conduzir à hiponatremia, em razão do aumento da perda renal de sódio. Portanto, é extremamente importante realizar testes para detecção de deficiências envolvendo esses eixos e para instituir uma terapia de reposição hormonal apropriada antes de estabelecer o diagnóstico de SIADH. Outros fatores que causam confusão e podem prejudicar o diagnóstico da síndrome incluem doença renal, doença cardíaca e medicamentos, como os diuréticos. Em tais casos, é preciso realizar com cautela um teste de carga de água (Tab. 24.8). Na ausência de fármacos ou outras condições que possam comprometer a diurese, considera-se consistente com o diagnóstico de SIADH uma falha em excretar cerca de 80 a 90% da carga de água administrada em 4 horas, além da supressão da Uosm a níveis < 100 mOsm/kg.

Em um cenário clínico apropriado, o diagnóstico de SIADH por vezes é estabelecido de forma confiável com base somente na determinação da concentração de eletrólitos no soro e na urina. Considerando um pequeno volume de urina, uma concentração de sódio < 30 mEq/L em geral é capaz de distinguir indivíduos com hiponatremia decorrente de depleção volumétrica, daqueles com SIADH, nos quais a concentração de sódio é > 30 mEq/L (Chung, 1987). Em contraste, uma tarefa que pode ser bem mais difícil é a diferenciação de um paciente com euvolemia e SIADH de outro com hipovolemia e perda de sal renal concomitante (p. ex., nefropatia perdedora de sal, uso de diurético). Além da hiponatremia, ambos apresentam (em um pequeno volume de urina) $U_{Na}{}^+ > 30$ mEq/L e uma excreção fracional de $Na^+ > 1$. A excreção fracional do sódio ($EF_{Na}[\%]$) é calculada por meio da seguinte equação:

$$\frac{U_{[Na^+]} \cdot P_{[Cr]}}{P_{[Na^+]} \cdot U_{[Cr]}} \cdot 100 \qquad (24.2)$$

Em que $U_{[Na^+]}$ = concentração de sódio na urina; $P_{[Na^+]}$ = concentração de sódio no plasma; $U_{[Cr]}$ = concentração de creatinina na urina; e $P_{[Cr]}$ = concentração de creatinina no plasma.

Um modo de diferenciar esses dois pacientes consiste em administrar 1 L de NaCl 0,9% por via intravenosa durante 24 horas, por 2 dias. Um aumento dos níveis séricos de Na^+ em mais de 5 mEq/L é sugestivo de hipovolemia. Na SIADH, não se observa alteração nem aumento superior a 5 mEq/L. Alternativamente, a restrição de líquidos para 600 a 800 mL/dia durante 2 a 3 dias conduz à melhora do quadro de hiponatremia na SIADH, porém, não afeta a perda de sal renal (Tab. 24.6).

A etiologia da perda de sal renal na SIADH é dupla. No início da doença, há uma expansão volumétrica que inibe o eixo renina-aldosterona e que também leva a uma maior distribuição de sódio aos túbulos distais. A perda continuada de sódio se deve à secreção da proteína natriurética atrial (Kamoi, 1990).

Em virtude da hiperfiltração e das ações locais do ADH nos receptores renais V2, a SIADH constitui um dos dois estados em que se observa os menores níveis de ácido úrico; o outro é a gravidez. Na SIADH, os níveis

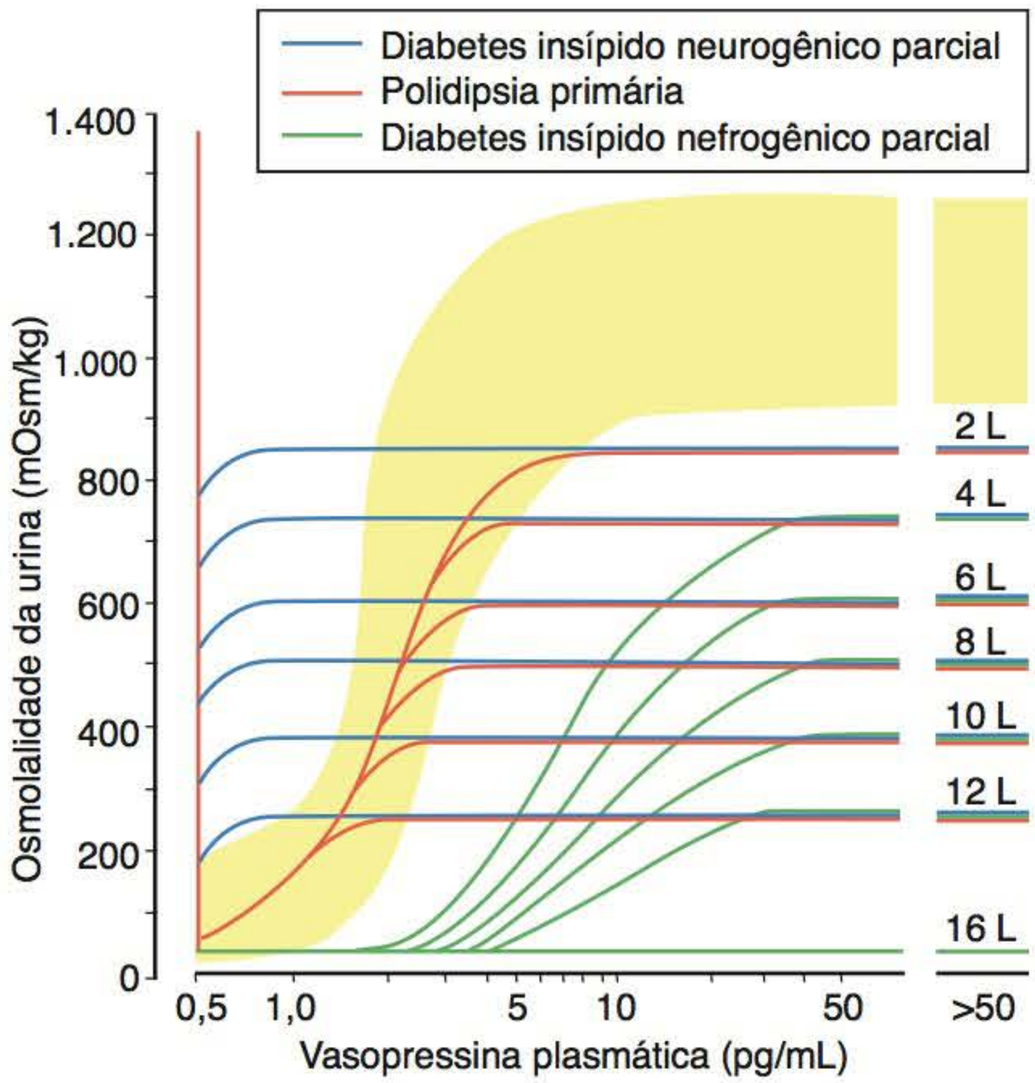


Figura 24.3 Relação entre osmolalidade urinária e vasopressina plasmática (ADH) em pacientes com poliúria de etiologias e grau de severidade diversos. Cada uma das três categorias de poliúria é descrita por sua própria família de curvas sigmoides de diferentes alturas. Essas diferenças de altura entre as famílias reflete as diferenças relativas à capacidade máxima de concentração, por causa da "lavagem" do gradiente de concentração medular. São proporcionais ao grau de severidade da poliúria (indicado em L/dia na extremidade direita de cada platô). A resposta normal é representada em amarelo. As três categorias de poliúria diferem principalmente quanto à porção ascendente da curva dose-resposta. Nos pacientes com diabetes insípido neurogênico parcial, a curva segue à esquerda do normal, refletindo a sensibilidade aumentada aos efeitos antidiuréticos das concentrações bastante reduzidas de ADH no plasma. Em contraste, nos pacientes com diabetes insípido nefrogênico parcial, a curva segue à direita do normal, refletindo a sensibilidade diminuída ao ADH. Na polidipsia primária, a relação de Uosm para ADH permanece relativamente normal. (Redesenhado a partir de Bichet, DG: Diabetes Insipides and Vasopressin. In: Moore, WT; Eastman, RC (eds.): Diagnostic Endocrinology, 2. ed., St Louis: Mosby; 1996: 158, com permissão.)

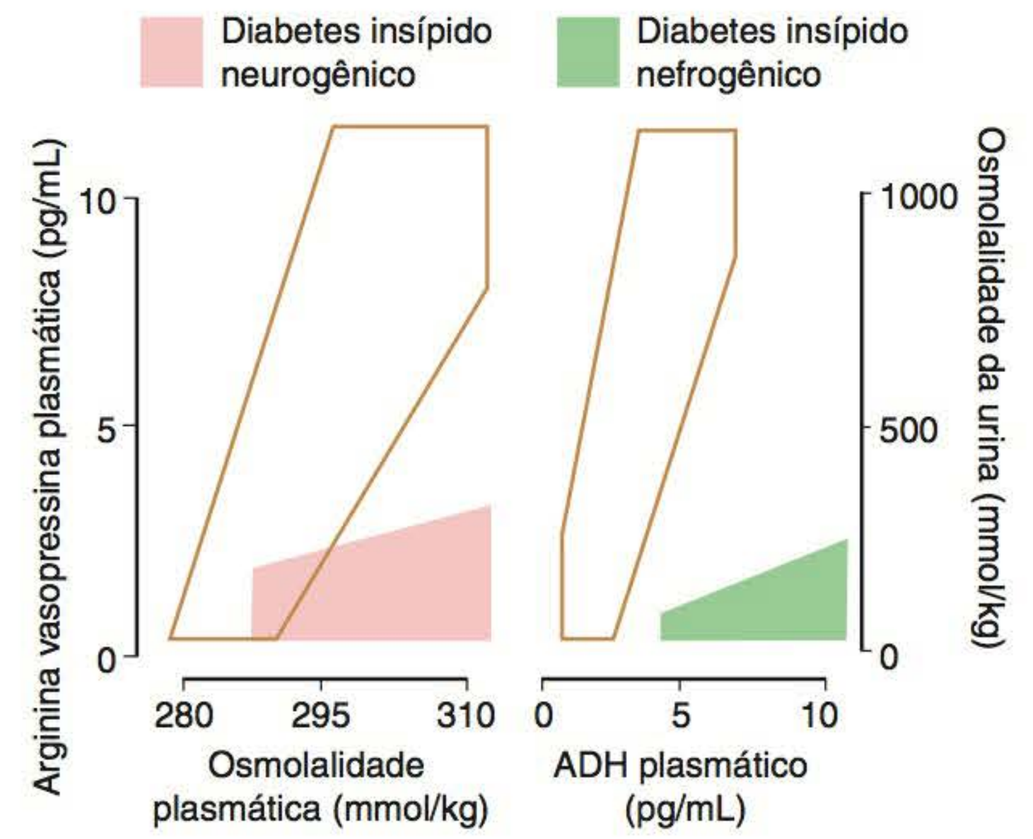


Figura 24.4 Esquerda: relação entre arginina vasopressina plasmática (ADH) e osmolalidade plasmática durante a infusão de salina hipertônica. Pacientes com polidipsia primária e diabetes insípido nefrogênico apresentam valores junto à faixa de referência normal (área aberta), ao contrário dos pacientes com diabetes insípido neurogênico, que mostram uma resposta subnormal de ADH plasmático à elevação da osmolalidade (rosa). Direita: relação entre osmolalidade urinária e ADH durante a desidratação e a carga hídrica. Pacientes com polidipsia primária e diabetes insípido neurogênico exibem valores junto à faixa de referência normal (área aberta), ao contrário dos pacientes com diabetes insípido nefrogênico, que têm urina hipotônica apesar da elevada concentração plasmática de ADH (verde). (Redesenhado a partir de Bichet, DG: Diabetes Insipides and Vasopressin. In: Moore, WT; Eastman, RC (eds.): Diagnostic Endocrinology, 2nd ed., St Louis: Mosby; 1996: 168, com permissão.)

Tabela 24.7 Causas do diabetes insípido

Central	
Primário:	
	Familiar
	Idiopático
Adquirido:	
	Tumores – craniofaringioma, tumores hipofisários, metástases (i. e., pulmão, seios), cisto da fenda de Rathke, leucemia não linfocítica
	Distúrbios granulomatosos – sarcoidose, histiocitose da célula de Langerhans, granulomatose de Wegener
	Traumático – trauma na cabeça, cirurgia
	Infeccioso – tuberculose, meningite, encefalite
	Vascular – aneurisma cerebral, anemia falciforme, síndrome de Shehan
	Fármacos – álcool, difenil-hidantoína, clorpromazina e agonistas α-adrenérgicos
	Outros – hipofisite linfocítica, encefalopatia hipóxica
Nefrogênico	
Hereditário:	
	Mutação no receptor V2
	Mutação no gene da aquaporina
Adquirido:	
	Fármacos – lítio, fenitoína, demeclociclina, vimblastina, cisplatina, propoxifeno, colchicina, gentamicina, anfotericina, etanol, hormônio natriurético atrial, noraepinefrina, anestésicos à base de metoxifluorano, furosemida
	Distúrbios eletrolíticos – hipercalcemia, hipocalemia
	Doenças sistêmicas – anemia falciforme, mieloma múltiplo, amiloidose, sarcoidose, síndrome de Sjögren, doença renal policística
	Outros – dieta pobre em proteínas, uropatia pós-obstrutiva

Tabela 24.8 Teste da carga hídrica

1 Basal: o paciente deve ser euvolêmico e deve ter níveis séricos de Na^+ entre 125 – 150 mmol/L, e Posm > 275 mOsm/kg.

2 O paciente deve beber 20 mL de água/kg de peso corporal seco (máx. = 1.500 mL) em 30 minutos.

3 Com o paciente em posição reclinada, coleta-se a produção de urina a cada hora, durante as próximas 5 horas. O volume e a osmolalidade de cada amostra devem ser registrados.

Interpretação	
Normal	Excreta de 80–90% da carga hídrica administrada em 4 horas, e suprime a Uosm a níveis < 100 mOsm/kg.
SIADH	A falha em cumprir os critérios na ausência de medicação ou outras condições que possam impedir a diurese é consistente com o diagnóstico de SIADH.

séricos de ADH podem estar variavelmente aumentados, com frequência desproporcional à Posm. Entretanto, cerca de 20% dos casos que correspondem ao diagnóstico fisiológico da síndrome não apresentam níveis detectáveis de ADH (Zerbe, 1980). Esse fenômeno pode acontecer em função da insensibilidade do ensaio a baixos níveis de ADH, um aumento da sensibilidade renal ao ADH ou, talvez, à presença de outro hormônio com atividade antidiurética (Kamoi, 1997).

Em grande parte, o diagnóstico de SIADH se baseia na exclusão, sendo estabelecido depois de descartada a possibilidade de outras causas de hiponatremia (Fig. 24.5). Com mais frequência, manifesta-se como uma síndrome paraneoplásica, mas também pode ocorrer em casos de infecção ou trauma envolvendo o sistema nervoso central (SNC), doença pulmonar ou a partir do uso de certos fármacos (alcaloides da vinca, antidepressivos tricíclicos, inibidores da captação de receptores de serotonina [SSRIs, *serotonin receptor uptake inhibitors*) (Tab. 24.9).

Glândula tireoide

A glândula tireoide normal pesa cerca de 15 a 25 gramas. Ela é dividida em lóbulos que são compostos por 20 a 40 folículos separados

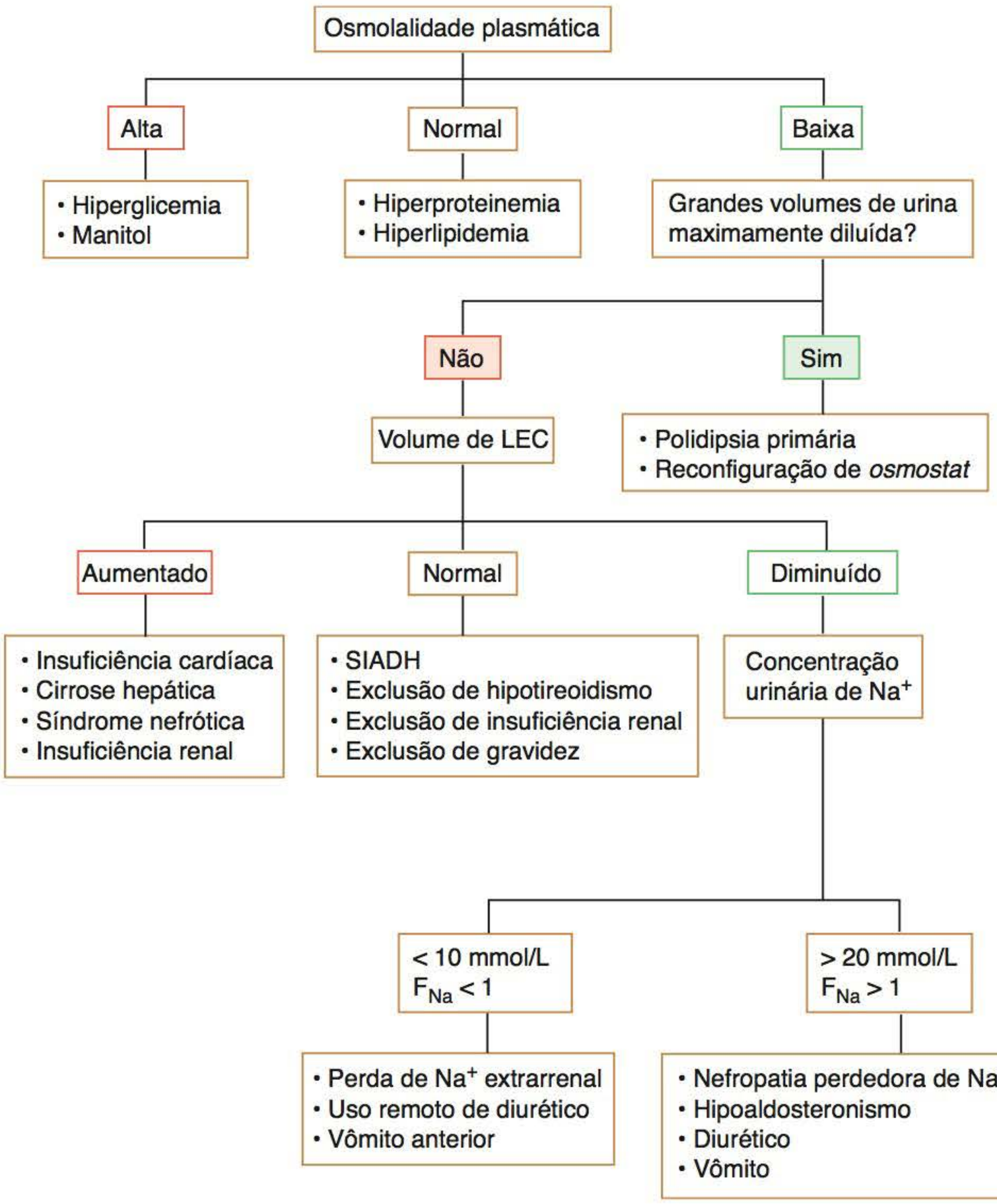


Figura 24.5 Algoritmo para avaliação da hiponatremia. (De Singer, GG: Fluid and electrolyte management. In: Carey, CF; Lee, HH; Woeltje, KF (eds.): The Washington Manual of Medical Therapeutics, 29th ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1998, p.44, com permissão.)

Tabela 24.9 Causas de SIADH

Doença no SNC:
Neoplasma, infecção, trauma, acidente cerebral vascular
Neoplasma:
Carcinoma de pequenas células e adenocarcinoma pulmonar, câncer de pâncreas, linfoma
Infecção pulmonar:
TB, pneumonia, pressão positiva de ventilação
Idiopática
Medicações:
Hipoglicêmicos orais – clorpropamida, tolbutamida
Antineoplásicos – vincristina, ciclofosfamida
Diuréticos – hidroclorotiazida
Psicotrópicos – amitriptilina, fenotiazinas, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs), inibidores da MAO
Outros – morfina, barbitúricos, clofibrato, nicotina, acetilcolina, agentes anestésicos, estimulantes β-adrenérgicos, metoclopramida, desmopressina

por tecido conjuntivo altamente vascularizado. Os folículos são estruturas com forma anelar, nas quais uma única faixa celular de células foliculares circunda um centro que contém coloide, hormônio tireoidiano, tireoglobulina (Tg) e várias glicoproteínas. Os folículos constituem o local de síntese e armazenamento do hormônio da tireoide. A glândula tireoide também possui células parafoliculares ou células C, que são responsáveis pela síntese e secreção da calcitonina, um importante hormônio no metabolismo do cálcio.

A síntese normal do hormônio da tireoide requer um eixo HPT intacto e uma fonte de iodo prontamente disponível. O hipotálamo secreta TRH que, por sua vez, estimula os tireotrofos da adeno-hipófise a secretarem TSH. Como indica o próprio nome, o TSH estimula a síntese e a secreção de hormônio da tireoide pela glândula tireoide. Esse hormônio atua na periferia, onde media inúmeras atividades metabólicas, além de promover a retroalimentação negativa no hipotálamo e na hipófise para manter as concentrações hormonais dentro de limites estreitos.

Mediante estimulação pelo TSH, o iodo entra nas células foliculares como iodo inorgânico e é transformado em hormônios tireoidianos: tiroxina (T_4) e 3,5,3'-tri-iodotironina (T_3) em uma série de etapas metabólicas. A sequência de eventos, conforme ilustra a Figura 24.6, pode ser dividida em: (1) transporte ativo de iodo para dentro da célula; (2) iodinação dos resíduos de tirosil na tireoglobulina (Tg); (3) acoplamento de moléculas de iodotirosina livre junto ao Tg para formar T_4 e T_3; (4) proteólise de Tg com liberação de iodotirosina livre, T_4 e T_3, e secreção de iodotironina na circulação; (5) deiodinação das iodotirosinas junto à tireoide e reutilização do iodo liberado; e (6) deiodinação de T_4 a T_3.

Cem por cento da T_4 circulante tem origem tireoidiana, contra apenas 20% de T_3. Oitenta por cento do T_3 é produzido enzimaticamente em tecidos não tireoidianos por meio da 5'-monodeiodinização de T_4 (Lum, 1984). Cerca de 110 nmol (85 μg) de T_4 e 10 nmol (8,5 μg) de T_3 são pro-

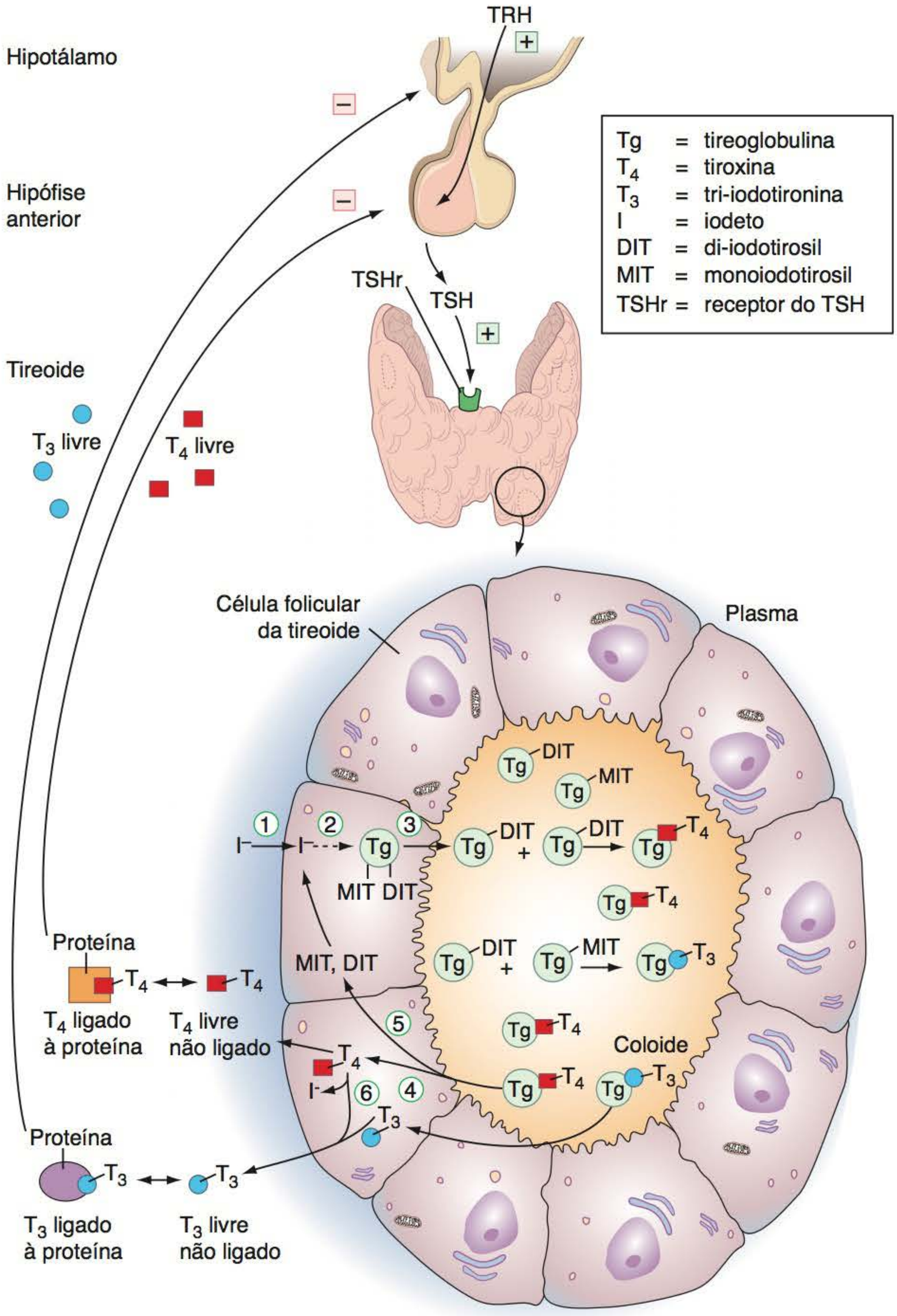


Figura 24.6 Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e síntese do hormônio da tireoide. As etapas da síntese e liberação do hormônio da tireoide são detalhadas no texto.

duzidos diariamente pela tireoide. Os hormônios da tireoide circulam acoplados a proteínas plasmáticas. Cerca de 70% do T_4 se liga à globulina ligadora de tirotoxina (TBG, *thyroxine-binding globulina*), 20% se liga à transferrina (antigamente, denominada pré-albumina de ligação) e 10% à albumina. Se por um lado a maior parte do T_3 circulante está ligada à TBG, essa ligação apresenta uma afinidade 10 vezes menor se comparada à de T_4 (Braverman, 2000; Robbins, 1996). Uma pequena porcentagem de T_4 e T_3 permanece sem se ligar a nenhuma proteína, sendo que cerca de 0,03% de T_4 e 0,3% de T_3 são oriundos da deiodinação periférica. O fígado e o rim exercem papel importante nessa transformação. Assim como para os demais hormônios, o componente livre é metabolicamente ativo.

A doença da tireoide pode ser classificada em hiper, hipo e eutireoidismo. Os sinais e sintomas de hipertireoidismo incluem intolerância ao calor, taquicardia, perda de peso, fraqueza, labilidade emocional e tremor. A síndrome clínica mais comumente associada ao hipertireoidismo é a doença de Graves (DG). Essa doença é causada por anticorpos circulantes que reconhecem o receptor de TSH. Outros distúrbios que levam ao hipertireoidismo são o adenoma tóxico e, mais raramente, os tumores hipofisários secretores de TSH e o carcinoma da tireoide.

O hipotireoidismo resulta em rouquidão, sensibilidade ao frio, ressecamento da pele, constipação, bradicardia e fraqueza muscular. O coma por mixedema é um estágio avançado da deficiência de hormônio da tireoide, caracterizado pelo estupor, hipotermia e hipoventilação progressivos. A falha da própria tireoide em secretar uma quantidade

adequada de hormônio da tireoide é denominada hipotireoidismo primário. Essa condição costuma ter origem iatrogênica, sendo resultado tanto da ablação com iodo radioativo como do tratamento cirúrgico do hipertireoidismo. O hipotireoidismo secundário ocorre quando a secreção de TSH diminui em decorrência de um distúrbio hipofisário. O hipotireoidismo terciário resulta de uma disfunção hipotalâmica.

Doenças envolvendo a tireoide, tais como gota, adenoma e carcinoma de tireoide, tipicamente ocorrem em indivíduos eutireóideos. O desenvolvimento de ensaios mais sensíveis possibilitou o diagnóstico de hiper e hipotireoidismo subclínicos: pacientes que apresentam tais condições parecem ser clinicamente eutireóideos. Entretanto, seus níveis de TSH encontram-se, respectivamente, suprimidos ou elevados. Há diversas situações clínicas que podem dificultar a interpretação dos resultados dos testes de função da tireoide: a presença de proteínas ligadoras de proteína anormais (sejam congênitas, sejam induzidas por fármacos); e alterações do metabolismo do hormônio da tireoide, do tipo que se observa em pacientes hospitalizados com doença psiquiátrica aguda, ou nos casos em que o paciente utiliza fármacos que afetam tanto a ligação do hormônio da tireoide como o eixo HPT, diretamente. O problema mais importante e mais comum enfrentado pelos testes de função da tireoide provavelmente reside nos pacientes com várias doenças que podem não ter envolvimento direto com a tireoide – as chamadas doenças não tireoidianas (DNTs).

Síntese e metabolismo do hormônio da tireoide

O iodo é o principal componente do hormônio da tireoide. A principal fonte de iodo é a dieta. Outra fonte é a deiodização dos grupos contendo iodo que ocorre na glândula. O iodo inorgânico é transportado para dentro das células foliculares pelo simportador sódio-iodo (NIS, *sodium-iodide symporter*), localizado na membrana basolateral (Chambard, 1983). O TSH modula a atividade do NIS: o aumento da secreção de TSH aumenta a captação do iodo pela célula folicular. O transporte de iodo para dentro da tireoide também é influenciado pelos níveis séricos de iodo. A deficiência de iodo aumenta a atividade da bomba, enquanto o excesso inibe sua captação.

A Tg é uma glicoproteína sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, nas regiões basal e perinuclear da célula folicular. Sofre influência do complexo de Golgi na porção apical da célula folicular, onde os resíduos tirosil são iodados e formam-se mono- e di-iodotirosilas (MIT e DIT). A Tg é transferida para dentro do coloide para armazenamento (Vassart, 1973a; Roth, 1985). Essa transformação da Tg em hormônio da tireoide requer duas reações oxidativas isoladas e catalisadas pela peroxidase da tireoide (TPO, *thyroid peroxidase*), a ligação do iodo aos resíduos tirosil de Tg para formação das iodotirosilas MIT e DIT, e o acoplamento subsequente de MIT e DIT para produção de T_4 e T_3 (Deme, 1976; Bjorkman, 1981). T_4 é formada pelo acoplamento de duas moléculas de DIT, enquanto a formação de T_3 resulta da união de um MIT a um DIT. T_4 e T_3 são liberadas a partir de Tg via degradação lisossômica e, em seguida, secretadas na circulação ao nível da membrana basal. Todas essas reações são controladas pelo TSH.

Cerca de metade de todo o conteúdo de T_4 sofre monodeiodização na posição 5' para formar T_3-3,5,3'-tri-iodotironina, cerca de 40% sofre deiodização no anel interno de T_4 para dar origem ao T_3 reverso (rT_3-3,3',5-tri-iodotironina). A formação de rT_3 – a terceira forma circulante mais importante do hormônio da tireoide – é catalisada pela enzima 5-deiodinase. O T_3 reverso não apresenta atividade biológica, possui uma meia-vida curta de 4 horas, circula ligado à TBG e sua formação é considerada uma via de descarte do metabolismo periférico de T_4 (LoPresti, 1989).

A ingestão de iodo influencia a proporção DIT/MIT na Tg. A iodotirosina preferencialmente formada é a DIT e, assim, havendo abundância de iodo, o T_4 é a forma de hormônio sintetizada e secretada de modo predominante. Por outro lado, quando as fontes de iodo são reduzidas, a MIT é produzida em quantidades maiores e conduz à formação e liberação de mais T_3. Além disso, a glândula tireoide possui uma 5'-deiodinase que converte T_4 em T_3. Esse processo é controlado pelo TSH, de modo que a secreção de T_3 é intensificada durante os períodos de estimulação por TSH (i. e., no hipotireoidismo primário e diante da presença de imunoglobulinas estimuladoras de TSH [TSHI, TSH-*stimulating immunoglobulin*]) (Ishii, 1983).

A monodeiodização de T_4 em T_3 e o rT_3 correspondem a 70% do metabolismo periférico de T_4 (LoPresti, 1989). O restante do metabolismo de T_4 se dá por conjugação de T_4 em sulfato, deaminação e descarboxilação para formação do tetrac (análogo do ácido acético), e pela clivagem da ligação éter (Engler, 1989) (Tab. 24.10). T_3, e não rT_3, pode ser conjugado ao sulfato para dar origem ao T_3-sulfato e também pode ser convertido em seu análogo triac (Engler, 1989). As enzimas responsáveis por essas reações são as fenolsulfotransferases, que estão presentes em muitos tecidos corporais, e a L-aminotransferase, localizada no fígado, respectivamente (Engler, 1984).

Os hormônios tireoidianos ligados a proteínas não entram nas células e são considerados biologicamente inertes, além de atuarem como reservatórios de hormônios tireoidianos circulantes. Em contraste, para exercerem efeitos biológicos, níveis de minuto das frações de hormônio livre entram prontamente nas células por um mecanismo de transporte através da membrana. Esses efeitos são mediados pelos receptores de T_3 localizados no núcleo celular.

Foram descritas quatro isoformas de receptores para T_3: α_1, α_2, β_1 e β_2 (Brent, 1991). Os receptores α_1 e β_1 estão presentes na maioria dos tecidos. A ligação de T_3 a tais receptores promove a ação de hormônio tireoidiano, provavelmente por meio do aumento de mRNA e da síntese proteica. O receptor β_2 é exclusivo da hipófise e tem papel central na regulação do TSH por retroalimentação negativa pelos hormônios tireoidianos. O receptor α_2 é inibitório e atua como regulador negativo da ação hormonal tireoidiana.

Na síndrome da resistência ao hormônio da tireoide, foram descritas mutações que afetam os receptores β e causam diminuição da capacidade de T_3 se ligar ao núcleo. Indivíduos com essa síndrome apresentam graus variáveis de crescimento e retardo mental, bem como hipotireoidismo (Refetoff, 1991).

Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT)

Os reguladores fisiológicos responsáveis pela integração da função da glândula tireoide à periferia são: hormônio hipotalâmico, TRH, hormônio da hipófise, TSH (também denominado tirotropina) e concentrações séricas de T_4 e T_3 livres. O TRH aumenta a síntese de TSH, estimula a secreção de qualquer TSH pré-formado a partir dos tireotrofos e modula a bioatividade do TSH, resultando na secreção do hormônio bioativo (Shupnik, 1986; Beck-Peccos, 1985). O próprio TRH está sob influência do mecanismo de retroalimentação negativa dos hormônios tireoidianos circulantes (os níveis de mRNA do TRH estão inversamente associados aos valores de T_3 circulante) (Kakucska, 1992). A mesma inibição por retroalimentação ocorre ao nível dos tireotrofos.

Hormônio liberador de tireotrofina (TRH)

Os hormônios tireoidianos regulam sua própria produção por meio da inibição por retroalimentação da síntese de ambos, TRH e TSH, ao nível do hipotálamo e da hipófise, respectivamente. O TRH atua também na produção de outros hormônios hipofisários, em especial da PRL. A leptina exerce papel significativo na regulação do gene do TRH

Tabela 24.10 Dinâmica metabólica de T_4 e T_3

	T_4	T_3
Velocidade de produção (nmol/dia)	110	50
Fração de hormônio circulante de origem tireoidiana	100%	20%*
Concentração sérica		
Total (nmol/L)	100	1,8
Livre (pmol/L)	20	5
Fração de hormônio total na forma livre	0,0002	0,003
Meia-vida (dias)	~ 7	0,75
Potência metabólica relativa	0,3	1,0

* 80% do T_3 circulante é proveniente da deiodinização periférica de T_4. Para converter T_4 total a partir de nmol/L para µg/dL ou T_4 livre a partir de pmol/L para ng/dL, divida por 12,87. Para converter T_3 total a partir de nmol/L para ng/dL ou T_3 livre a partir de pmol/L para pg/dL, multiplique por 65,1.

De Larsen, PR; Davies, TF; Schlumberger, MJ; Hay, ID: Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: Larsen, PR; Kronenberg, HM; Melmed, S; Polonsky, KS (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, Saunders, 2003, p. 342.

(Bjobeck, 2004), afetando no indivíduo o desejo de ingerir alimentos. Testes laboratoriais não têm utilidade em casos de distúrbios da tireoide, em razão da dificuldade para desenvolver anticorpos específicos.

Hormônio estimulador da tireoide (TSH)

O TSH é uma glicoproteína constituída por duas subunidades, α e β, ligadas de modo monoconvalente. A subunidade α possui as mesmas sequências de aminoácidos que os hormônios LH, FSH e GCH. A subunidade β carrega a informação específica para a ligação aos receptores e consequente expressão das atividades hormonais.

O radioimunoensaio utilizado na quantificação do TSH foi desenvolvido em 1965, por Odell et al. No meio da década de 1980, foi desenvolvido um método imunométrico "sensível" para TSH, utilizando anticorpos mono- ou policlonais, cuja sensibilidade aprimorada era de 0,1 a 0,2 mU/L. Uma terceira geração de ensaios imunométricos para TSH, empregando marcador quimioluminescente, foi desenvolvida na década de 1990. O método desses ensaios tem sido comumente utilizado até os dias atuais. Sua sensibilidade foi reduzida para cerca de 0,005 mU/L, que representa um aumento de sensibilidade de 100 vezes em comparação ao ensaio antes considerado o mais "sensível" para o TSH, e de 1.000 vezes em relação aos métodos de radioimunoensaio. Uma quarta geração de ensaios para TSH foi desenvolvida recentemente e, embora apresente uma sensibilidade de 0,0004 mU/L, não é amplamente disponibilizado. Além disso, os ensaios de terceira geração fornecem um grau de sensibilidade adequado à vasta maioria das aplicações clínicas. As recomendações da American Thyroid Association (ATA) estabelecem que os ensaios de terceira geração devem ser capazes de quantificar níveis de TSH na faixa de 0,010 a 0,020 mU/L, segundo uma base interensaios, com coeficiente de variação ≤ 20%. No que se refere ao relato dos resultados do ensaio, a ATA recomenda fazer uso da sensibilidade funcional, que, por sua vez, é definida como o ponto em que a precisão interensaios apresenta coeficiente de variação igual ≤ 20% (Spencer, 1996).

Em virtude do aprimoramento de sua sensibilidade, o ensaio para TSH isolado é capaz de identificar virtualmente todas as instâncias de hiper- e hipotireoidismo, exceto em casos de dano ao hipotálamo ou à hipófise, resistência ao hormônio da tireoide ou interferência de medicamentos no funcionamento normal do eixo HPT. Os resultados de TSH situados dentro do intervalo de referência usualmente excluem a disfunção da tireoide e ajudam a distinguir uma profunda supressão de TSH, típica da tireotoxicose severa da DG (TSH < 0,01 mUI/L), de graus mais modestos de supressão desse hormônio (0,01 – 0,1 mUI/L), observada no hipotireoidismo primário (subclínico) discreto e em alguns casos de DNT. Conforme observado, uma vez que a sensibilidade do ensaio melhorou, a faixa de valores normais permaneceu a mesma (0,5–5,0 mUI/L) na maioria dos laboratórios. Entretanto, a concentração sérica detectada em pacientes com tireotoxicose severa tem se tornado menor a cada aprimoramento sucessivo dos ensaios para TSH: ao utilizar ensaios de quarta geração, os níveis séricos de TSH são < 0,004 mUI/L em pacientes com hipertireoidismo severo. Pacientes com hipertireoidismo apresentam supressão de TSH, exceto nos poucos casos de indivíduos cuja doença é causada por um tumor produtor do hormônio ou por outras patologias, tais como resistência hipofisária ao hormônio da tireoide. O hipertireoidismo subclínico é definido pela presença de baixos níveis de TSH com níveis normais de T_4 e T_3 (Tab. 24.11).

Na maioria dos indivíduos com hipotireoidismo, os resultados de TSH sérico estão claramente aumentados, porém, os resultados referentes aos níveis de T_4 e T_3 podem estar indevidamente normais naqueles que apresentam distúrbios hipofisários ou hipotalâmicos. A denominação "hipotireoidismo subclínico" é utilizada para descrever pacientes que apresentam alta concentração de TSH, porém níveis normais de T_4, T_3 e T_4L. A DNT constitui uma causa importante de resultados de TSH tanto aumentados como diminuídos. Pacientes com DNT tendem a apresentar resultados de TSH baixos durante sua doença aguda, então os níveis desse hormônio se elevam e atingem valores próximos ou acima dos valores da faixa de referência com a resolução da doença subjacente. Por fim, a normalidade é alcançada com a resolução da doença aguda. Trata-se de uma situação complicada, pois o TSH é suprimido por certos medicamentos, como glucagons, opioides, glicocorticoides e Do. Ensaios sensíveis para TSH são úteis na avaliação do tratamento com hormônio da tireoide, seja para terapia de reposição ou de supressão.

Apesar da sensibilidade clínica do TSH, uma estratégia centrada nesse hormônio apresenta duas limitações primárias. Em primeiro lugar, considera que a função hipotalâmica-hipófise permanece intacta e normal. Em segundo, assume que a condição do paciente é estável (i. e., que o

Tabela 24.11 Caracterização dos distúrbios da tireoide conforme os resultados dos testes de função tireoidiana

Distúrbio	TSH	T_4	T_3	T_4L	Tg	TBG	rT_3	ATPO	ATG	TBII	TSI	TBA
Hipotireoidismo primário	↑	↓	N ou ↓	↓	N ou ↓	N	↓	N ou ↑	N ou ↑	N ou ↑	n	n ou ↑
Hipotireoidismo neonatal transiente	↑	↓	↓	↓	N ou ↓	N	↓	N	N	↑	n	↑
Hipotireoidismo da tireoidite de Hashimoto	↑	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N	↓	↑	↑	n ou ↑	n	n ou ↑
Doença de Graves	↓	↑	↑	↑	↑	N	↑	↑	↑	↑	↑	n ou ↑
Doença de Graves neonatal	↓	↑	↑	↑	↑	N	↑	n ou ↑	n ou ↑	↑	↑	n ou ↑
Deficiência de TSH	N ou ↓	↓	↓	↓	↓	N	↓	n	n	n	n	n
Desormogênese tireoidiana	↑	↓	↓	↓	N, ↓ ou ↑	N	↑	n	n	n	n	n
Resistência ao hormônio da tireoide	N ou ↑	↑	↑	↑	↑	N	↑	n	n	n	n	n
Hipertireoidismo dependente de TSH	↑	↑	↑	↑	↑	N	↑	n	n	n	n	n
Anomalias da proteína ligadora de T_4*	N	V	V	N	N	V+	V	n	n	n	n	n
Doença não tireoidiana	V	N ou ↓	↓	V	N	N	N ou ↑	n	n	n	n	n
Tireoidite subaguda†	↓ ou ↑	↑ ou ↓	↑ ou ↓	↑ ou ↓	↑ ou ↓	N	↑ ou ↓	n	n	n	n	n

TSH = hormônio estimulador da tireoide; T_4 = tiroxina; T_3 = tri-iodotironina; T_4L = tiroxina livre; Tg = tireoglobulina; TBG = globulina ligadora de tiroxina; rT_3 = T_3 reversa; ATPO = peroxidase antitireoide; ATG = antitireoglobulina; TBII = imunoglobulina ligadora de TSH inibitória; TSI = imunoglobulina estimuladora da tireoide; TBA = anticorpo bloqueador do receptor de TSH; N = normal; n = negativo; V = variável.

* O espectro de anormalidades da proteína ligadora inclui aumento ou diminuição da ligação à transtiretina, e ↑ ligação à albumina.

† A tireoidite subaguda envolve um período transiente de hipertireoidismo, seguido de um estado transitório de hipotireoide.

De Fisher, DA (ed): Disorders of Thyroid Function, versão on line do Quest Diagnostic Manual, 3rd ed, p. 268.

paciente não foi submetido recentemente a nenhuma terapia para hiper- ou hipotireoidismo) (Wardle, 2001). Se qualquer um desses critérios não forem atendidos, o resultado referente aos níveis séricos de TSH pode ser enganoso (Tab. 24.11). Em tais circunstâncias, para confirmar a existência de disfunção da tireoide, pode ser útil quantificar os níveis de T_4L com ou sem T_4 total, além de determinar os níveis de TSH. A concentração sérica de T_3 livre aliada às quantificações de TSH sérico são apropriadas para casos de pacientes com suspeita de hipertireoidismo, pois estes podem apresentar tireotoxicose por T_3 caracteristicamente associada a níveis baixos a normais de T_4.

Tiroxina

Após a liberação de seus folículos tireoidianos, a tiroxina irá se ligar a várias proteínas existentes no sangue (TBG, albumina, tiretina). A tiroxina pode ser quantificada por imunoensaio, após separar o hormônio da sua proteína transportadora. A faixa de referência é de 5 a 12,5 μg/dL em adultos, com resultados discretamente mais baixos em determinados grupos pediátricos. Embora o teste de TSH seja o mais importante na avaliação da função tireoidiana, as determinações dos níveis de tiroxina são frequentemente empregadas com o teste de TSH, podendo ser importantes para a interpretação dos resultados de TSH. A combinação de baixos níveis de T_4 e aumento da concentração de TSH indica hipotireoidismo primário, enquanto a elevação de T_4 e T_3 com diminuição dos níveis de TSH são características do hipertireoidismo primário. Contudo, há relatos de casos de hipertireoidismo em pacientes altos níveis séricos de T_4 e níveis séricos de T_3 junto ou abaixo da faixa de referência. Essa tireotoxicose por T_4 pode ocorrer em pacientes com tireotoxicose induzida por iodo, em pacientes que fazem uso de β-bloqueadores, amiodarona ou grandes doses de esteroides, e naqueles tireotóxicos com DNT. A supressão dos níveis de TSH associada a níveis normais a baixos de T_4 e níveis aumentados de T_3 caracteriza a tireotoxicose por T_3. Essa condição é mais comum em casos de nódulos tóxicos (Tab. 24.11).

A DNT severa está associada a níveis baixos de T_4 e de T_3 – também chamada de síndrome do T_4 e T_3 baixos (uma resposta adaptativa para reduzir as demandas metabólicas e conservar as reservas de proteína) (LoPresti, 1995) – e é também associada a um prognóstico ruim (Chopra, 1997). Acredita-se que sua manifestação seja causada pelo desajuste da inibição central exercida pelo TRH (Van den Berghe, 1998; 2000) (Fig. 24.7).

A hipertireoxinemia eutireóidea é distinguida pela presença de níveis séricos de T_4 aumentados e associados a uma concentração normal de TSH, em um indivíduo eutireóideo. Essa entidade apresenta causas variadas, incluindo intensificação da ligação a proteínas, conforme se observa com o uso de certos fármacos (p. ex., estrógeno) ou em algumas condições médicas (p. ex., doença hepática). Também é observada em pacientes submetidos à hospitalização aguda em decorrência de doença psiquiátrica, e naqueles com disalbuminemia familiar. Quando medicamentos ou outros fatores provocam aumento da ligação a proteínas, há um aumento dos níveis séricos de T_4 total. Ao contrário, uma diminuição da capacidade de ligação conduz à diminuição dos níveis de T_4 total no soro. Essas perturbações não apresentam nenhum efeito fisiológico, assim como no caso do hormônio livre, sendo que o componente ligado à proteína é o responsável pela atividade biológica. Em situações semelhantes, o T_4 livre apresenta melhor correlação com o status funcional da tireoide, se comparado ao T_4 sérico total.

É necessário determinar ao mesmo tempo a "captação" de T_3 (T_3-UP, T_3-uptake) e a concentração de T_4 total, a fim de refletir com acurácia o status da T_4 livre biologicamente ativo. Um resultado de teste de captação consiste na determinação relativa do número de sítios de ligação desocupados existentes em todas as proteínas circulantes. O índice de tiroxina livre (ITL) é calculado em seguida (T_3-UP do paciente/média de T_3-UP do laboratório de referência, multiplicado pela concentração de T_4 total do paciente). O ITL (faixa de referência de 5,4 a 9,7) é apenas uma estimativa da concentração de T_4 livre. De um modo geral, durante a tireotoxicose, tanto T_4 total como T_3-UP estão aumentadas. Por outro lado, no hipotireoidismo, ambas estão diminuídas e, havendo uma anormalidade de ligação à globulina, podem divergir (p. ex., T_4 total aumenta e T_3-UP diminui ou vice-versa). O ITL foi significativamente substituído pela quantificação direta de T_4 livre, seja por imunoensaio, seja por diálise de equilíbrio.

Tiroxina livre (T_4L)

A T_4 livre é a fração biologicamente ativa da tiroxina no sangue circulante. Nos últimos 10 a 15 anos, a quantificação direta de T_4 livre adquiriu maior sensibilidade e precisão. É possível determiná-la por diálise de equilíbrio, um método que não é afetado pelas alterações da concentração de proteínas de ligação nem por DNTs. Primeiramente, a amostra é dialisada em um tampão não proteico e contra uma fina membrana ultrafiltrante. Durante a incubação, o equilíbrio é alcançado entre as concentrações de T_4 livre em ambos os lados da membrana. A tiroxina presente na solução isenta de proteínas é, então, coletada e analisada por seu conteúdo de T_4. Trata-se de um método demorado e que não atende à demanda de grandes volumes dos laboratórios clínicos. Níveis comerciais de T_4L costumam ser medidos com técnicas de

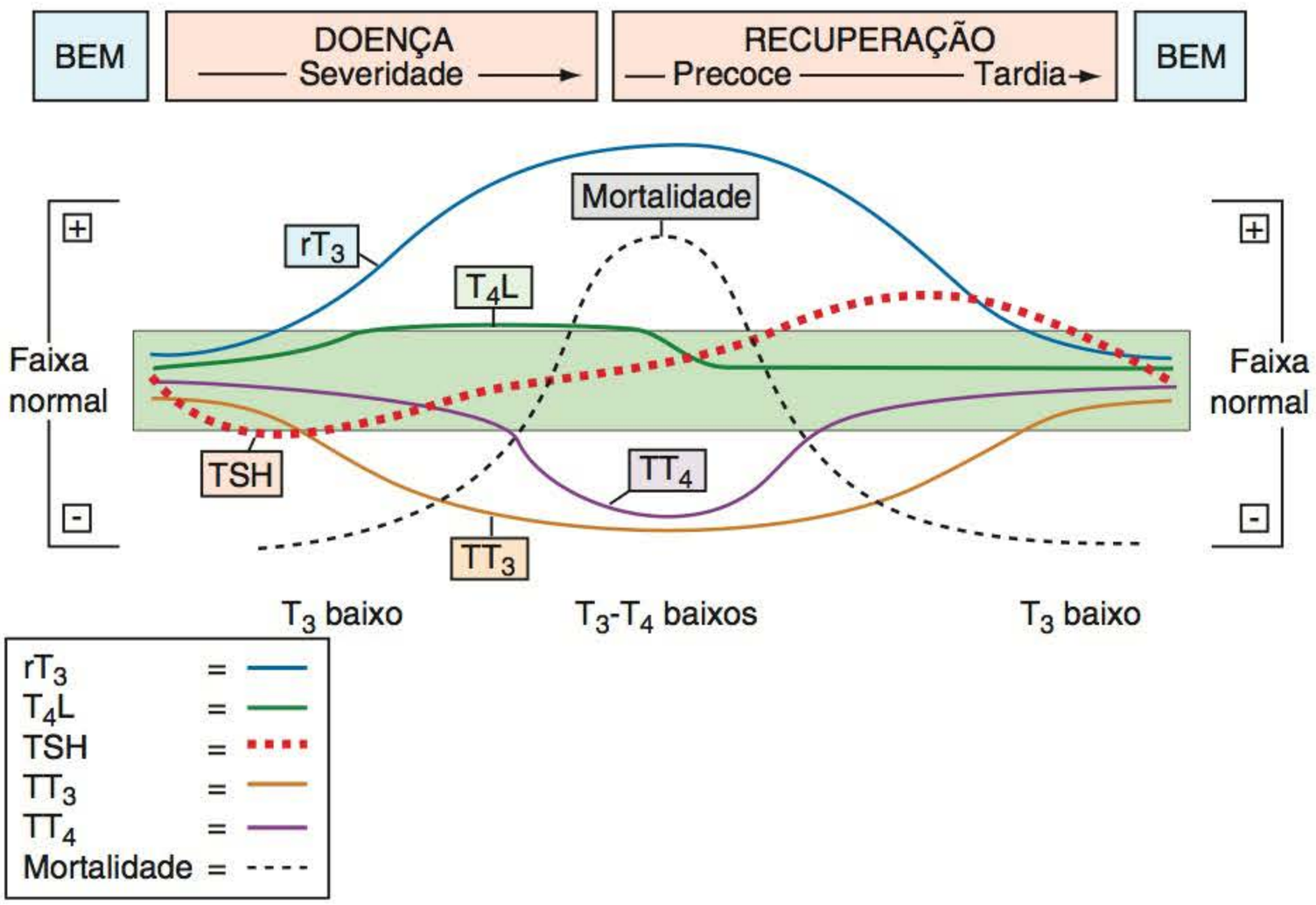


Figura 24.7 Alterações dos hormônios da tireoide na doença severa. (De Demers, LM; Spencer, CA (eds): NACB Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. 2003, p.11, com permissão.)

imunoensaio, entretanto esses métodos são menos confiáveis, porque podem ser afetados por doenças ou alterações envolvendo proteínas de ligação (Spencer, 1986; Hay, 1991). Métodos mais novos, que utilizam anticorpo com alta afinidade pelo hormônio, quantificam os níveis de hormônio livre em função do grau de ocupação funcional dos sítios de ligação do anticorpo ao hormônio (o número de sítios de ligação do anticorpo desocupados é inversamente proporcional à concentração de hormônio livre). A quantificação é realizada utilizando um hormônio marcado com fluorescência ou quimioluminescência. Em seguida, com auxílio de calibradores, o sinal produzido é convertido em concentração de hormônio livre, sendo que os valores correspondentes ao hormônio livre são atribuídos por um método que emprega separação física. Essa abordagem atualmente é o método de teste de hormônio livre preferido para uso na maioria das plataformas automatizadas.

Na prática, o uso de "T_4 livre direta" é suficiente para a maioria das situações clínicas. Entretanto, nos casos em que alterações marcantes afetam a ligação de hormônios, a quantificação de T_4 livre mais acurada deve ser realizada por "diálise de equilíbrio". A hipertireotoxinemia disalbuminêmica familiar é causada por uma variante da albumina que se liga à T_4 de modo anormal. Esses pacientes apresentam níveis séricos de tiroxina elevados e níveis de TSH normais. Nesse cenário, a quantificação direta fornece respostas que variam de acordo com o laboratório. Sendo assim, a T_4 livre deve ser medida por diálise de equilíbrio. Dependendo do ensaio utilizado, também podem ocorrer resultados espúrios para T_4 livre diante de anormalidades envolvendo TBG, transtiretina (pré-albumina ligadora de T_4), albumina e na presença de autoanticorpos para T_4 ou T_3 (Langsteger, 1997). Há relatos de elevações ou quedas da concentração sérica de T_4 livre sem alterações concomitantes do estado metabólico na gravidez, com DNTs e em pacientes sob tratamento com certos fármacos. Por exemplo, a administração prolongada de fenitoína ou carbamazepina resulta em uma diminuição de 15 a 30% dos níveis séricos, tanto de T_4 como de T_4 livre. Essa é mais uma situação em que a quantificação de T_4 deve ser realizada por diálise de equilíbrio.

A T_4 livre também pode ser determinada por espectroscopia de massa, após a separação de T_4L do complexo proteína-hormônio por meio de ultracentrifugação a 37°C, evitando-se efeitos de diluição (De Brabandere, 1998).

Tri-iodotironina

A tri-iodotironina sérica (T_3), quantificada por imunoensaio, apresenta um intervalo de referência que varia tipicamente entre 60 a 160 μg/dL (0,9 a 2,46 nmol/L). Comparada à T_4, a T_3 liga-se bem menos às proteínas séricas e, em consequência, há uma proporção relativamente maior de T_3 na forma livre e em estado difundível. A quantificação da T_3 sérica total é útil para confirmar o diagnóstico de hipertireoidismo, em especial para pacientes cujos níveis de T_4 apresentam elevação mínima ou nula, ou manifestações clínicas ambíguas. Em 90% dos pacientes com hipertireoidismo, os valores de T_3 e T_4 estão aumentados, sendo usual os níveis de T_3 exibirem maior elevação do que os níveis de T_4. Entretanto, nos pacientes com hipertireoidismo, os níveis de T_3 podem se manter baixos ou na faixa de referência caso haja uma DNT coexistente ou se esses pacientes estiverem utilizando fármacos que causam diminuição da conversão de T_4 em T_3 (p. ex., propranolol e amiodarona).

O hipertireoidismo com elevação dos níveis séricos de T_3 e níveis normais de T_4 e T_4 livre caracteriza uma condição denominada tireotoxicose por T_3 (Bitton, 1990). Pacientes com essa síndrome constituem um grupo heterogêneo sem sinais nem sintomas distintivos. Apesar da maioria dos pacientes apresentar DG, a tireotoxicose por T_3 pode acometer pacientes com hipertireoidismo de causas diversas, entre as quais gota nodular tóxica ou adenoma tóxico. Cerca de 1 a 4% dos pacientes tireotóxicos apresentam tireotoxicose por T_3, exceto nas regiões de deficiência de iodo, onde essa condição é mais comum.

Níveis séricos de T_3 elevados e níveis de T_4 normais também podem ser observados em pacientes com hipertireoidismo ainda no início do curso do tratamento com fármacos antitireoide, ou nos casos de recaída após o tratamento. Níveis elevados de T_3 são detectados em pacientes com níveis elevados de TBG.

Em geral, a quantificação da concentração sérica de T_3 não tem utilidade na avaliação de pacientes com suspeita de hipotireoidismo, pois os níveis séricos de T_3 encontram-se junto ao intervalo de referência em 15 a 30% dos pacientes que apresentam esse distúrbio (Surks, 1990). Por outro lado, níveis de T_3 diminuídos são observados em pacientes com hipotireoidismo severo, ou seja, naqueles cujos níveis de T_4 são inferiores a cerca de 2 μg/dL (32 nmol/L) (Bigos, 1978). Baixos níveis séricos de T_3 ocorrem em pacientes com uma ampla variedade de DNTs. Nos casos de doença aguda, como infarto do miocárdio (IM), a diminuição de T_3 sérica acontece rapidamente, declinando em alguns dias a níveis equivalentes a cerca de 50% do valor de referência (Utiger, 1980). As concentrações séricas de T_3 também são baixas no sangue de cordão, porém, aumentam de forma rápida durante as primeiras horas de vida.

Pacientes que estejam recebendo preparações contendo T_3, como tireoide desidratada e combinações de T_3 e T_4 sintéticas, ou aqueles tratados com T_3 apresentarão resultados de T_3 sérica sem sentido, a menos que seja conhecido o horário da administração do hormônio. A administração de T_3 (Ctyomel™) resulta em uma rápida elevação da concentração desse hormônio, a qual atinge o pico em 2 a 4 horas e, em seguida, passa a declinar. Em contraste, esse pico de T_3 não ocorre nos pacientes tratados diariamente com T_4 (levotiroxina). Em vez de atingirem valores de pico, os níveis de T_3 derivados da conversão periférica de T_4 tornam-se estáveis nesses pacientes somente após algumas semanas de terapia. Inúmeros agentes farmacológicos estão associados à diminuição dos níveis de T_3 e de T_3 livre com níveis séricos normais ou mesmo altos de T_4 e T_4 livre. Entre esses agentes estão os glicocorticoides, amiodarona e doses altas de propranolol. Tais pacientes usualmente apresentam resultados de TSH normais, contudo, a amiodarona pode induzir hiper- ou hipotireoidismo e, nesses casos, os valores de TSH estarão suprimidos ou elevados, respectivamente. As concentrações de T_3 total são quantificadas por meio de métodos de imunoensaio, que, em sua maioria, são atualmente não isotópicos e utilizam enzimas, fluorescência ou moléculas quimioluminescentes como sinais (Nelson, 1996).

Tri-iodotironina reversa (rT_3)

A rT_3 é o principal metabólito da tiroxina e é produzida por 5-deiodinização de T_4.

Em muitas situações clínicas, demonstrou-se que T_3 e rT_3 presentes no soro variam de modo recíproco. No entanto, as quantificações de rT_3 se mostraram clinicamente pouco úteis. Esse metabólito é detectado em altas concentrações no soro de pacientes com DNT, cujos níveis de T_3 total encontram-se diminuídos. Os níveis de rT_3 também são aumentados em recém-nascidos sadios, em pacientes com hipertireoidismo (incluindo hipertireoidismo artificial) e naqueles que fazem uso de certos medicamentos, como amiodarona e propranolol.

Tireoglobulina (Tg)

A Tg é sintetizada e secretada pelos folículos. Está presente no soro de indivíduos normais em uma faixa de concentração de até 30 ng/mL (45 pmol/L). A concentração sérica de Tg reflete a massa da tireoide, lesões nessa glândula e estimulação do receptor de TSH (Spencer, 1995). O aumento dos níveis de Tg ocorre em vários distúrbios, tais como DG, tireoidite e gota nodular. Pacientes com tireotoxicose artificial exibem níveis de Tg indetectáveis, em contraste com as altas concentrações de Tg observadas nos pacientes com tireotoxicose de outras causas. A quantificação de Tg na rotina jamais é indicada e sua utilidade reside no monitoramento da recorrência de certas variantes do câncer da tireoide, diagnóstico de disgênese da tireoide no hipotireoidismo congênito e, conforme mencionado anteriormente, distinção entre tireoidite subaguda e tireotoxicose artificial.

O papel mais importante da quantificação de Tg consiste no acompanhamento pós-operatório de pacientes que apresentam malignidades tireoidianas (Ericsson, 1984). É útil em casos de pacientes com carcinoma de tireoide bem diferenciado, mas não para aqueles com tumores indiferenciados ou câncer de tireoide medular. O valor clínico de sua determinação é limitado por vários problemas técnicos, como a presença de anticorpos em 20% dos pacientes com carcinoma de tireoide (Spencer, 1999). Esses anticorpos interferem na quantificação de Tg e provocam super- ou subestimação dos níveis séricos dessa molécula. Sendo assim, todas as vezes em que os níveis de Tg forem determinados para monitoramento da recorrência/persistência de câncer de tireoide, é extremamente importante obter ao mesmo tempo uma amostra para detecção de anticorpos para Tg (TgAc).

Em casos de pacientes positivos para TgAc, o uso de métodos de PCR (com amostras de soro) para amplificar o mRNA de TgAc pode eliminar esse problema.

TSH humano recombinante (rhTSH) é comumente empregado para testar pacientes com câncer de tireoide quanto à presença de doença residual/recorrente. Esse método é bem mais prático, conveniente e significativamente menos incômodo para o paciente do que frear a supressão hormonal da tireoide no decorrer de várias semanas para aumentar os níveis de TSH. São necessários níveis elevados de TSH para haver captação de RAI (iodo radioativo) em qualquer tumor residual ou recorrente que o paciente ainda possa ter. A determinação dos níveis de Tg 72 horas após a última dose de rhTSH apresenta alta correlação com a recorrência, sendo que algumas autoridades apoiam o uso isolado desse teste, sem triagem para iodo corporal, em casos de pacientes com tumores de "baixo risco" (idade < 40 anos, sem metástases distantes, tamanho < 1 cm, bem diferenciado). Todos os demais pacientes com câncer de tireoide precisam ser submetidos a triagens de corpo total, além da quantificação do TSH. O uso concomitante de ambos os testes resulta em uma sensibilidade igual a da triagem realizada após a retirada do hormônio da tireoide, que é de cerca de 97%. Em pacientes com câncer de tireoide submetidos à ablação residual e que estejam sob tratamento com terapia de supressão hormonal, qualquer aumento pós-rhTSH dos níveis séricos de Tg acima de 2 ng/mL levanta a suspeita de doença recorrente/persistente e aponta a necessidade de um trabalho de acompanhamento condizente (i. e., reestadiamento completo, com a hipotireoide fora da terapia de supressão).

Tumores bem diferenciados tipicamente exibem um aumento de 10 vezes na concentração de Tg em resposta ao TSH alto (Spencer, 1999). Tumores pouco diferenciados, que não concentram iodo, podem exibir uma resposta fraca à estimulação por TSH (Schlumberger, 1980). Nas primeiras semanas após a realização de uma tireoidectomia, é típico haver uma queda dos níveis de TSH, cuja meia-vida é de 2 a 4 dias. O padrão de alteração dos valores séricos de Tg frente ao tratamento com T4 indica melhor a ocorrência de uma alteração na carga tumoral, comparado a qualquer valor sérico de Tg isolado (Spencer, 1995). Em razão da variabilidade de interensaios, é extremamente importante que o monitoramento seja realizado sempre pelo mesmo laboratório (ensaio de TSH).

Globulina ligadora de tiroxina (TBG)

A TBG é a principal proteína transportadora sérica para T_4 e, também, T_3. Sua quantificação pode ser útil em casos de pacientes cujos níveis séricos desses hormônios estão em desacordo com outros parâmetros laboratoriais da função da tireoide, ou são incompatíveis com os achados clínicos. Quantificada por imunoensaio, a TBG encontra-se na faixa de 13 a 39 μg/dL (150 – 360 nmol/L) em indivíduos sadios. As anomalias congênitas envolvendo essa proteína incluem deficiências total e parcial, bem como variantes com menor afinidade por T_4 ou T_3 e excesso de TBG (Langsteger, 1997). Entre as etiologias adquiridas das anomalias de concentração de TBG estão vários fármacos e condições médicas (Tab. 24.12). Medicamentos, como salicilatos, fenitoína, penicilina e heparina, podem deslocar T_4 da ligação à proteína.

Autoanticorpos antitireoide

A doença autoimune da tireoide causa dano celular e altera a função da glândula. O dano celular ocorre quando os autoanticorpos ou os linfócitos T sensibilizados se ligam às membranas das células tireoidianas, provocando lise celular e reações inflamatórias. Existem três autoantígenos tireoidianos responsáveis pelos distúrbios autoimunes envolvendo a tireoide: TPO, Tg e receptor de TSH (TSH-R). Os anticorpos para TPO (TPOAc) estão envolvidos no processo de destruição tecidual associado ao hipotireoidismo nas tireoidites de Hashimoto e atrófica. Alguns estudos sugerem que o TPOAc pode ser citotóxico para a tireoide (Cheovato, 1993; Guo, 1997). TgAc, mesmo presente em baixas concentrações no soro, pode interferir na atuação dos anticorpos anti-Tg utilizados no imunoensaio para quantificação de Tg. Assim, a concentração de TgAc deve ser determinada em todos os pacientes antes de iniciar a análise de Tg. Nas áreas com deficiências de iodo, a quantificação do TgAc pode ser empregada na detecção da doença autoimune tireoidiana em casos de pacientes com gota, ou no monitoramento da terapia com iodo em áreas endêmicas.

Tabela 24.12 Algumas causas de alterações na globulina ligadora de tiroxina

Aumentos	Diminuições
Fármacos/drogas	Fármacos/drogas
Clofibrato	Andrógenos
Estrógenos, contraceptivos orais	Glicocorticoides
5-fluoracil	Genética
Heroína	Deficiência total
Metadona	Deficiência parcial
Genética	Insuficiência hepática
Hepatite aguda ou crônica ativa	Desnutrição
Gravidez	Síndrome nefrótica
Idiopática	Idiopática

Os anticorpos para TSH-R (TSH-RAc) eram previamente conhecidos como imunoglobulinas estimuladoras da tireoide (TSI, *thyroid-stimulating immunoglobulin*) ou estimulantes tireoidianos de ação prolongada (LATS, *long-acting thyroid stimulators*). Os TSH-RAc são classificados como anticorpos estimulantes ou bloqueadores. A DG é uma condição autoimune em que gota e hipertireoidismo são induzidos por anticorpos estimuladores da tireoide (ETAc) que mimetizam a ação do TSH. O alvo da resposta autoimune é o TSH-R. Embora haja anticorpos tanto estimuladores como bloqueadores na DG, estes em geral não produzem sintomas. Contudo, em alguns casos escassos, esses anticorpos podem levar ao desenvolvimento de hipotireoidismo. Cerca de 85% dos pacientes com DG são positivos para TSH-RAc. A quantificação desses anticorpos tem sido utilizada para predizer o resultado da terapia farmacológica aplicada aos pacientes com DG. Se o título de TSH-RAc estiver baixo antes do início da terapia, significa que os pacientes contam com melhores chances de remissão após 6 a 12 meses de terapia.

A quantificação de TSH-RAc também tem sido empregada na predição do risco de disfunção da tireoide em recém-nascidos de mães com DG, em decorrência da passagem transplacentária de TSH-RAc materno (Radetti, 1999; Heithorn, 1999). Nesses casos, são clinicamente importantes os ensaios que distinguem anticorpos bloqueadores de anticorpos estimulantes (Davies, 1998).

Estudos longitudinais sugerem que os TPOAc podem constituir fatores de risco para o desenvolvimento futuro de disfunção tireoidiana, incluindo tireoidite pós-parto, complicações autoimunes advindas do tratamento com amiodarona, interferon-α e lítio (Martino, 2001; Johnson, 1999; Bell, 1999; Ward, 2001; Feldt-Rasmussen, 1994).

Quantificação de iodo urinário

O iodo é necessário para a produção normal dos hormônios da tireoide. As quantificações são utilizadas principalmente para avaliar sua ingestão dietética junto a certas populações. Essa avaliação é muito importante, uma vez que os distúrbios associados à deficiência de iodo afetam mundialmente 2,2 bilhões de indivíduos, inclusive nos EUA (Delange, 1995; Dunn, 1998). Como a maior parte do iodo ingerido é excretada pela urina, a determinação da excreção urinária de iodo (IU) fornece uma estimativa acurada da ingestão dietética de iodo (Dunn, 1998). A excreção de IU é expressa em μg de iodo por volume de urina (pg/dL). As faixas sugeridas de excreção IU são mostradas na Tabela 24.13.

Programas de triagem para detecção de hipotireoidismo neonatal

Estima-se que a prevalência de hipotireoidismo em recém-nascidos seja de 1 a cada 3.000 a 5.000. Essa prevalência é maior em certos grupos étnicos e nas regiões do planeta com deficiência de iodo. A detecção precoce do hipotireoidismo durante o período neonatal é crítica para eliminar o severo retardo mental associado à deficiência de hormônio da tireoide. A quantificação de T_4 e TSH é utilizada na triagem, que, por sua vez, é realizada com manchas de sangue secas ou soro de cordão. A taxa de detecção depende dos testes utilizados e o momento da coleta da amostra. A quantificação apenas de T_4 está associada a uma alta incidência de resultados falso-positivos, tornando necessária

a reconvocação de um grande número de bebês para repetição dos testes. Esses resultados falso-positivos são produzidos pelos baixos níveis de T_4, que ocorrem tanto em bebês prematuros como naqueles com ausência congênita de TBG. A triagem apenas de T_4 pode não detectar bebês que apresentam insuficiência tireoidiana compensada ou parcial. Considerando que cerca de 15% dos bebês que apresentam distúrbios primários da tireoide têm hipotireoidismo compensado (níveis séricos normais de T_4 associados à elevação de TSH), a detecção do aumento dos níveis de TSH constitui o teste mais sensível para diagnóstico do hipotireoidismo congênito. Entretanto, ocasionalmente são observados resultados falso-positivos, como é o caso dos bebês prematuros ou submetidos ao estresse severo. Ao realizar a triagem isolada de T_4, também deixarão de ser detectados os casos de bebês com doença hipotalâmica ou hipofisária. Bebês que apresentam peso corporal muito baixo ao nascimento devem ser submetidos novamente aos testes em 2 e 4 a 6 semanas para detecção de hipotireoidismo transiente de início tardio (Frank, 1996). No caso de recém-nascidos, se o valores iniciais de TSH forem < 10 mUI/L, é desnecessário realizar qualquer ação. Se esses valores estiverem em uma faixa de 10 a 20 mUI/L, então será necessário repetir o teste em 2 a 6 semanas. Por fim, se os valores iniciais de TSH obtidos no teste da mancha de sangue forem > 20 mUI/L, torna-se necessário realizar uma avaliação endocrinológica para estabelecer o diagnóstico de hipotireoidismo.

Doença não tireoidiana (DNT)

Pacientes seriamente doentes podem apresentar testes de tireoide anormais sem que haja nenhuma patologia tireoidiana subjacente (DeGroot, 1992; Kaptein, 1996). É típico observar o desenvolvimento de um rápido declínio dos níveis de T_3 livre e total no cenário de uma doença grave (p. ex., IM, sepse) (Piketty, 1996). À medida que o grau de severidade da doença aumenta, os níveis séricos de T_4 total diminuem em razão da quebra da proteína ligadora de T_4 por ação de inibidores presentes na circulação (Wartofsky, 1982; Docter, 1993; Wilcox, 1994). Pacientes com DNT cujos níveis de T_4 caem a valores abaixo de 2 ng/dL apresentam um prognóstico excepcionalmente ruim. As alterações ocorridas nos testes de função da tireoide durante uma DNT são denominadas "síndrome do doente eutireoideo" ou "síndrome do T_4 baixo". A Figura 24.7 mostra o espectro de alterações dos testes de tireoide, conforme a relação com o grau de severidade e o estágio da doença. Na doença aguda, os pacientes com DNT tendem a apresentar níveis de TSH e de T_4 baixos ou normais reduzidos, porém níveis muito baixos de T_3. Com a resolução da doença subjacente, os níveis de TSH se elevam e atingem valores normais ou acima do normal, retornando finalmente à faixa normal (Faber, 1987). Essa situação pode ser agravada pelo uso de certos fármacos para tais doenças, como glucagon, Do e altas doses de corticosteroides, que suprimem o TSH e podem mascarar o status da tireoide enquanto estiverem em uso (Brabant, 1989; Samuels, 1997; Kaptein, 1980; Skamene, 1984).

Na uremia, o acúmulo de ácido indolacético interfere na ligação ao hormônio da tireoide (Iitaka, 1998).

Variáveis fisiológicas

Por questões práticas, variáveis como idade, gênero, raça, estação, fase do ciclo menstrual, hábito de fumar, exercícios, jejum ou estase induzida por flebotomia exercem efeitos mínimos sobre os testes de função da tireoide de pacientes adultos ambulatoriais (Hollowell, 2002). Estudos sugeriram que cada indivíduo possui um ponto de ajuste de T_4L geneticamente determinado (Meikle, 1988; Andersen, 2002), e qualquer desvio em relação a esse ponto de ajuste é percebido pela hipófise e provoca uma alteração correspondente na secreção de TSH. Nos estágios iniciais do desenvolvimento de uma disfunção tireoidiana, uma anormalidade envolvendo os níveis séricos de TSH precede o desenvolvimento de T_4L anormal, uma vez que o TSH responde de modo exponencial a alterações mínimas de T_4L, conforme esquematizado na Figura 24.8.

Apesar da variabilidade do TSH sérico ser mais ampla em indivíduos mais velhos, parece não haver uma justificativa para a adoção de uma faixa de valores de referência ampliada ou ajustada de acordo com a idade do paciente. Essa abordagem conservativa é justificada por relatos que apontam a existência de uma associação entre níveis de TSH discretamente suprimidos ou elevados e aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular (Sawin, 1991; Parle, 2001). Em crianças, o eixo HPT passa por um processo de maturação e modulação progressivo. A proporção TSH/T_4L declina de modo contínuo a partir do meio da gestação até após a puberdade (Nilson, 1993; Adams, 1995; Lu, 1999; Zurakowski, 1999; Fisher, 2000a,b) e, como resultado, concentrações mais altas de TSH são tipicamente observadas em crianças.

Tabela 24.13 Excreção urinária e deficiência de iodo

Excreção urinária de iodo (μg/L)	> 100	50–99	20–49	< 20
Grau de deficiência*	nula	branda	moderada	severa
Prevalência da gota	< 5%	5–19,9%	2–29,9%	> 30%

* IDD Newsletter Aug 1999; 15:33–48.

De Demers LM, Spencer CA (eds.): NACB Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. 2003, p. 75.

Durante a gestação, a produção de estrógeno aumenta progressivamente e eleva a concentração de TBG, de modo que ao redor da 16ª semana observa-se um aumento da faixa de referência de T_3 e T_4 totais equivalente a quase 1,5 vezes os valores referenciais máximos observados na ausência de gravidez (Weeke, 1982; Pedersen, 1993; Nohr, 2000). Embora o excesso de TBG conduza a um aumento das concentrações séricas de T_4 e T_3 totais, os níveis séricos de T_3 e T_4 livres permanecem inalterados.

A GCH sérica, que apresenta semelhança estrutural com o TSH, exibe uma fraca atividade estimulatória da tireoide (Talbot, 2001). O aumento dos níveis de GCH que ocorre logo após a fertilização resulta em um pequeno aumento das concentrações de T_3 e T_4 livres, usualmente ainda dentro da faixa de referência normal. Tais alterações provocam uma queda dos níveis séricos de TSH no primeiro trimestre. Uma concentração sérica de TSH abaixo do normal pode ser observada em cerca de 20% das mães cuja gravidez é normal (Glinoer, 1990, 1997; Panesar, 2001). O pico do aumento dos níveis de GCH e o nadir do TSH ocorrem juntos, em torno da 10ª a 12ª semana de gestação. Em 2% das gestações, o aumento de T_4L atinge níveis supranormais e, se for prolongado, pode levar a uma síndrome denominada "tireotoxicose transiente gestacional" (GTT, *gestational transient thyrotoxicosis*). Essa síndrome é caracterizada pela manifestação de sintomas e sinais pronunciados de tireotoxicose, sendo uma condição frequentemente associada à hiperêmese da gravidez de primeiro trimestre (Goodwin, 1992; Hershman, 1999).

Medicamentos e testes de função da tireoide

Fármacos podem produzir efeitos tanto in vitro como in vivo nos testes da tireoide. Como consequência, pode haver erro de interpretação dos resultados obtidos nesses testes, diagnósticos incorretos e realização de novos testes desnecessários (Surks, 1995; Kailajarvi, 2000). O aumento dos níveis de TBG induzido pelo estrógeno resulta em níveis anor-

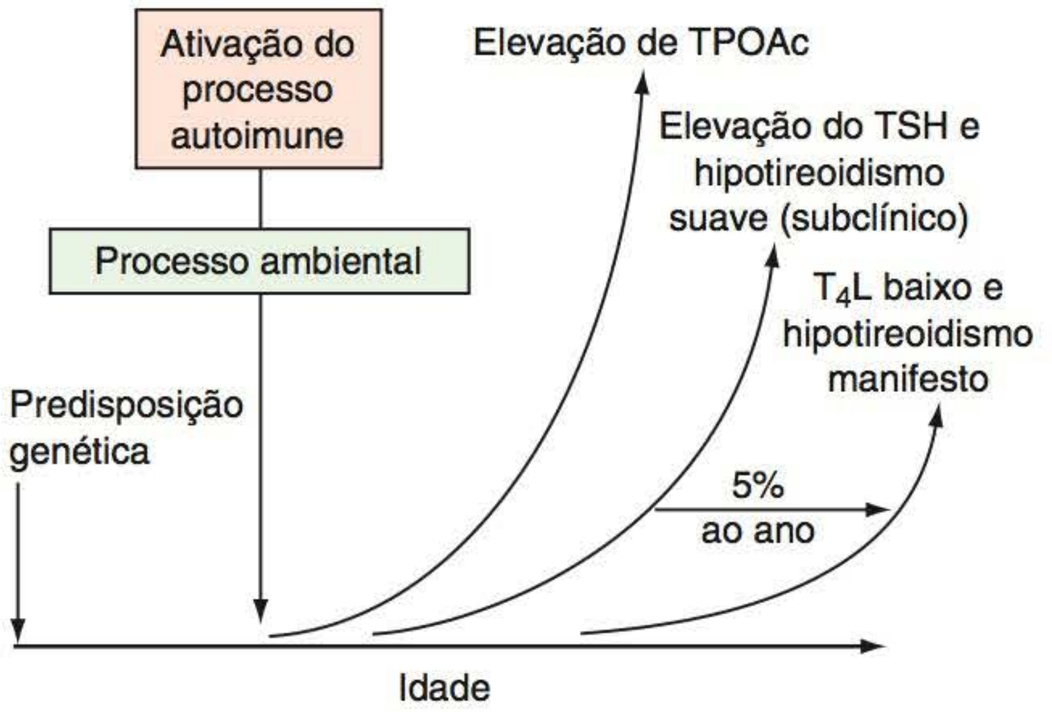


Figura 24.8 Representação da evolução do hipotireoidismo primário de etiologia autoimune (De Demers, LM; Spencer, CA (eds.): NACB Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. 2003, p.47.)

malmente altos de T_4 e T_3 totais, mas não afeta o TSH nem as formas livres de T_3 e T_4. Altas doses de glicocorticoides podem suprimir o TSH e diminuir a conversão de T_4 em T_3 (Samuels, 1997; Kaptein, 1980). A Do inibe o TSH e pode moderar o esperado aumento dos níveis de TSH em pacientes hospitalizados com hipotireoidismo primário (Kaptein, 1980). O propranolol inibe a conversão de T_4 em T_3 (e esse é um dos motivos pelo qual é usado no tratamento da tireotoxicose).

O iodeto é encontrado em diversos meios de contraste à base de iodeto utilizados nas varreduras de TC e na angiografia coronariana, bem como em soluções empregadas para esterilizar a pele e em corantes radiopacos. Pode causar tanto hiper- como hipotireoidismo em pacientes suscetíveis (Meurisse, 2000). Fármacos que contêm iodo, como a amiodarona (utilizada como agente antiarrítmico), produzem efeitos complexos sobre a função da tireoide e podem causar tanto hiper- (10% dos pacientes) como hipotireoidismo (1–2%) em indivíduos suscetíveis e positivos para anticorpos (TPOAc) (Martino, 1987, 2001; Daniels, 2001; Harjai, 1997; Caron, 1995).

O lítio inibe a síntese e liberação do hormônio da tireoide e pode causar hipotireoidismo em cerca de 15 a 50% dos pacientes, especialmente naqueles que são positivos para TPOAc (Lazarus, 1998; Kusalic, 1999; Oakley, 2000). Seu mecanismo de ação é similar ao do iodeto. O lítio é concentrado pela tireoide e inibe a captação de iodo por essa glândula, bem como o acoplamento à iodotirosina. Também altera a estrutura da tireoglobulina e suprime a secreção do hormônio da tireoide. Esse último efeito é essencial para o desenvolvimento de hipotireoidismo e gota (Lazaraus, 1998).

Fármacos como a fenitoína, carbamazepina e furosemida inibem por competição a ligação da tireoide a proteínas séricas in vitro, e causam elevação artificial dos níveis de T_4L, redução da concentração de T_4 total e do índice de T_4L. Doses terapêuticas de fenitoína também podem induzir aceleração da eliminação de T_4 e, talvez, inibam diretamente o TSH ao nível central, sendo que todos esses mecanismos são responsáveis pela redução dos níveis de T_4 (Surks, 1995). A heparina pode estimular a lipoproteína lipase in vitro e liberar ácidos graxos livres, que, por sua vez, inibem a ligação do T_4 a proteínas séricas e promovem uma falsa elevação dos níveis de T_4L (Mendel, 1987).

Medicamentos como fenobarbital, fenitoína, rifampina e carbamazepina aumentam a taxa de depuração do hormônio da tireoide, por meio da indução do aumento da deiodinização de T_4 e T_3. Pacientes com hipotireoide submetidos ao tratamento com qualquer um desses fármacos devem ter seus níveis hormonais monitorados de perto, visto que pode ser necessário aumentar a dose de levotiroxina (L-T_4). As alterações no status do hormônio da tireoide, por sua vez, afetam a depuração de muitos fármacos, incluindo aqueles listados anteriormente (p. ex., o hipertireoidismo pode acarretar o aumento da depuração do fenobarbital, enquanto o hipotireoidismo tem efeito contrário). Em razão dessas várias alterações envolvendo parâmetros relacionados ao hormônio da tireoide, considera-se que o melhor indicador do status da tireoide é a quantificação de TSH com a de T_4L. No caso dos indivíduos com doença hipofisária ou que façam uso de dilantina, o T_4 deve ser quantificado por diálise de equilíbrio.

A somatostatina (ou seu análogo octreotida), que é empregada no tratamento da acromegalia (Itoh, 1988) e a Do (Kaptein, 1980) inibem, ambas, a síntese de TSH, tornando os níveis desse hormônio indetectáveis em pacientes com DNT severa.

Doença da tireoide

Pacientes com hipertireoide podem apresentar um ou todos os seguintes sinais e sintomas: perda de peso, sudorese, intolerância ao calor, palpitações, insônia, aumento da motilidade intestinal, tremores, infertilidade ou amenorreia. Os níveis de TSH estão suprimidos nesses pacientes, exceto nos poucos indivíduos com hipertireoidismo secundário causado por tumores hipofisários produtores de TSH, ou naqueles que apresentam distúrbios raros (p. ex., resistência hipofisária aos hormônios da tireoide). O hipertireoidismo subclínico é definido como uma condição em que os níveis de TSH são baixos (< 0,1 μUI/mL) e os de T_3 e T_4 permanecem junto à faixa de valores de referência, sem haver manifestação de quaisquer sinais ou sintomas de hipertireoidismo (Ross, 1991). A detecção do hipertireoidismo subclínico é particularmente importante para pacientes com mais de 60 anos de idade, que apresentam maior risco de fibrilação atrial, maior mortalidade cardiovascular (Sawin, 1994) e osteoporose. O mínimo excesso de hormônio da tireoide pode causar fibrilação atrial e estimular atividade osteoclástica nos ossos, causando osteoporose.

Pacientes com hipotireoidismo primário podem apresentar um ou todos os seguintes sinais e sintomas: intolerância ao frio, constipação, retenção hídrica, hipercolesterolemia, depressão, mixedema pré-tibial, edema periorbital e elevação de TSH com níveis baixos de T_4 e T_3. Os níveis de TSH são baixos em pacientes com hipotireoidismo secundário causado por distúrbios hipotalâmicos ou hipofisários. Pacientes com hipotireoidismo subclínico apresentam elevação de TSH (> 4,5 μU/mL), no entanto T_4 e T_3 encontram-se junto à faixa de referência. Em 2004, o conselho de especialistas composto por 13 membros liderados por Surks publicou seus achados na edição de janeiro da JAMA, onde recomendou limites de referência de TSH de 0,4 a 4,5 μU/mL e que os pacientes com TSH na faixa de 4,5 a 10 mU/L não recebessem tratamento de rotina. As diretrizes de 2002 da AACE (American Association of Clinical Endocrinologists, 2002) recomendou o tratamento de pacientes com TSH > 10 μU/mL ou daqueles com gota e positividade para TPOAc, cujos níveis de TSH estivessem na faixa de 4,5 a 10 μU/mL. A quantificação de TPOAc é útil para estabelecer a presença de autoimunidade. Indivíduos com títulos elevados de anticorpos apresentam maior probabilidade de desenvolver insuficiência tireoidiana manifesta (clínica).

Triagem para doença da tireoide

A American Thyroid Association, em suas diretrizes, recomenda a realização da triagem aos 35 anos de idade e, subsequentemente, a cada 5 anos (Ladenson, 2000). Aparentemente, essa é uma estratégia custo-efetiva, em especial para as mulheres (Parle, 2001) e os idosos (Ladenson, 2000; Vanderpump, 1995; Parle, 2001). A tireoidite de Hashimoto é uma doença autoimune da tireoide causada pela ligação de linfócitos T sensibilizados e/ou autoanticorpos à membrana celular, com consequente lise da célula e produção de reação inflamatória que provoca dano celular. É uma condição associada a níveis elevados de TSH e positividade para TPOAc, apresentando incidência crescente conforme a idade aumenta (Vanderpump, 1995).

Existem evidências de suporte indicando que uma anomalia persistente de TSH pode conduzir a riscos aumentados se não for devidamente tratada. Um estudo relatou a ocorrência de maior taxa de mortalidade cardiovascular entre pacientes que apresentavam níveis de TSH cronicamente baixos (Parle, 1991). Há ainda inúmeros relatos indicando que o hipotireoidismo suave no início da gestação provoca aumento da incidência de perda fetal e compromete o QI da descendência (Pop, 1995, 1999; Haddow, 1999). É importante sempre confirmar a existência de qualquer anomalia relacionada ao TSH utilizando amostras frescas (obtidas após 3 semanas), antes de estabelecer o diagnóstico de anormalidades discretas.

Usos da L-tiroxina (L-T_4)

Uma dose média de reposição para adultos é 1,6 μg/kg de peso corporal/dia. Para crianças, essa dose é de até 4,0 μg/kg de peso corporal/dia, sendo que para indivíduos com idade mais avançada são utilizadas doses médias de reposição mais baixas (1,0 μg/kg de peso corporal/dia) (Sawin, 1983; Davis, 1984). A dose inicial e o tempo ótimo necessário para estabelecer uma dose de reposição integral dependem da idade, peso e status cardíaco de cada paciente. As exigências talvez aumentem durante a gravidez e em mulheres na pós-menopausa que estejam iniciando a reposição hormonal (Arafah, 2001). Uma concentração sérica de TSH entre 0,5 e 2,0 μU/mL é o nível de meta terapêutica da reposição com L-T_4 nos casos de hipotireoidismo primário. Para os casos de hipotireoidismo central, o alvo da terapia é uma concentração sérica de T_4L situada no terço superior do intervalo de referência.

O TSH deve ser utilizado para monitorar pacientes que estejam recebendo terapia de reposição de hormônio da tireoide, bem como aqueles tratados com hormônio para suprimir doenças tireoidianas malignas (Spencer, 1990). Ambos, TSH e T_4L, devem ser utilizados no monitoramento de pacientes com hipotireoide que apresentam suspeita de falta de complacência intermitente. É necessário aguardar um período mínimo de 6 semanas antes de repetir o teste de TSH, após a mudança da dose de L-T_4. Medidas anuais de TSH são recomendadas para pacientes que estejam recebendo uma dose estável de T_4. Quando estão sendo rea-

lizados ensaios para T_4L, o paciente deve suspender a aplicação de sua dose de levotiroxina no dia da execução do teste. Essa medida é necessária porque os níveis de T_4L estarão acima (um aumento de aproximadamente 13%) do valor basal durante um período de 9 horas após a ingestão da última dose (Ain, 1993). O TSH, contudo, provavelmente se manterá inalterado. No procedimento ideal, o L-T_4 deve ser tomado antes das refeições, sempre no mesmo horário todos os dias e com um intervalo de pelo menos 4 horas em relação a quaisquer outras medicações ou vitaminas/suplementos dietéticos.

O L-T_4 é utilizado para suprimir o TSH em pacientes com carcinoma de tireoide bem diferenciado, para os quais a tireotropina é considerada um fator trófico (Dulgeroff, 1994). É recomendável adotar como alvo níveis de TSH de 0,05 a 0,1 μU/mL para pacientes com baixo risco, e valores < 0,1 μU/mL para pacientes de alto risco. Se os níveis de tireoglobulina forem indetectáveis e não houver evidências de recorrência em 5 a 10 anos após a realização de uma tireoidectomia, a dose de L-T_4 pode ser reduzida para produzir valores de TSH baixos-normais < 0,4 μU/mL.

Calcitonina

O carcinoma de tireoide medular (CTM) se origina das células C da tireoide. Esse tipo de tumor representa cerca de 5 a 8% dos cânceres de tireoide e 0,57% dos nódulos tireoidianos (Pacini, 1994).

Vinte e cinco por cento dos CTMs são hereditários (neoplasia endócrina múltipla de tipos 2A e 2B) (Cobin, 2001; Brandi, 2001; Dunn, 1994), os quais são síndromes multiglandulares de herança autossômica dominante. Uma importante mutação genética recorrente, associada ao CTM, foi localizada na sub-banda cromossômica 10q11.2 (Mulligan, 1993; Hofstra, 1994).

A célula C secreta calcitonina. Níveis elevados de calcitonina no sangue circulante indicam a presença de CTM. A calcitonina madura resulta da modificação pós-traducional de um precursor maior (pré-pró-calcitonina), composto por 141 aminoácidos, junto às células C parafoliculares. A pré-pró-calcitonina sofre clivagem de um único peptídeo e dá origem à pró-calcitonina. Esta tem 116 aminoácidos residuais. O peptídeo da calcitonina imatura, constituído de 33 aminoácidos, está localizado centralmente na molécula de pró-calcitonina. A forma madura e ativa da calcitonina, composta por 32 aminoácidos, é produzida a partir da calcitonina imatura por ação da enzima peptidilglicina-amidante mono-oxidase (PAM). A quantificação da calcitonina é feita por meio de ensaios imunométricos de dois sítios empregando anticorpos monoclonais: um reconhece a região N-terminal, e o outro, a região C-terminal. Esse método é mais sensível e mais específico (van Heyningen, 1994; Becker, 1996; Motte, 1988). O nível de *cutoff* em indivíduos adultos é de aproximadamente 10 ng/L.

As quantificações da calcitonina sérica são utilizadas como marcadores tumorais para detecção de tecido tireoidiano residual ou metástases em pacientes com CTM. Devem ser realizadas antes e 6 meses após a cirurgia. A presença de tecido residual ou a recorrência de CTM somente podem ser excluídas caso ambas – a calcitonina basal e pós-pentagastrina ou a calcitonina estimulada pelo cálcio – forem indetectáveis. Estímulos provocativos, como cálcio e pentagastrina (Pg) ou omeprazol, foram utilizados na detecção de anomalias da célula C, uma vez que aumentam os níveis de calcitonina em todos os estágios do CTM (Wells, 1978; Gagel, 1996; Wion-Barbot, 1997; Barbot, 1994; Erdogan, 1997; Vieira, 2002; Vitale, 2002).

No teste de estimulação da Pg para diagnóstico de CTM, a Pg é infundida por via endovenosa (0,5 μg/kg de peso corporal) em 5 segundos. Amostras de sangue são coletadas no estado basal, 1, 2, 5 e 10 minutos após o início da infusão. A interpretação dos resultados é resumida na Tabela 24.14.

No teste de estimulação com cálcio, o paciente recebe uma injeção endovenosa de 2,5 mg de gliconato de cálcio/kg em 30 segundos e as amostras de sangue são coletadas no estado basal, 1, 2 e 5 minutos. A elevação dos níveis plasmáticos de calcitonina a valores acima de 100 ng/L é uma indicação de hiperplasia da célula C. Segundo relatos, o teste de infusão de cálcio é menos sensível do que o teste de Pg para o diagnóstico do CTM. No entanto, quando ambos os testes são combinados, o teste de infusão de cálcio intensifica a sensibilidade do teste de Pg (Wells, 1978).

A calcitonina também pode estar aumentada em outras condições não relacionadas às condições de neoplasia da tireoide, como mostra a Tabela 24.15.

Glândula suprarrenal

As glândulas suprarrenais são estruturas piramidais que se posicionam em cima de cada um dos rins. Cada uma delas pesa aproximadamente de 4 a 6 g. Em termos anatômicos, a suprarrenal é dividida em duas partes distintas: a medula (camada interna) e o córtex (camada externa). A medula, originária da crista neural (ectoderme), armazena e secreta catecolaminas. O córtex tem origem mesenquimal e é subdividido em três zonas: a zona glomerulosa, que é mais externa e produz mineralocorticoides; a zona fasciculada, responsável pela produção de glicocorticoides; e a zona reticular interna, que sintetiza andrógenos. O córtex representa cerca de 80 a 90% da glândula suprarrenal. As glândulas contam com um suprimento arterial muito rico que forma o plexo subcapsular e se esvazia no interior de uma veia central. Considerando o peso, essas glândulas exibem a maior perfusão sanguínea por grama de tecido e tal característica assegura a rápida disseminação de seus hormônios por todo o corpo em resposta ao estresse.

Hormônios da medula suprarrenal

A medula suprarrenal faz parte do eixo simpatosuprarrenal. Tendo origem na crista neural, possui a capacidade de sintetizar catecolaminas por meio de um processo de captação e descarboxilação de precursor de amina (APUD, amina precursor uptake and decarboxilation). A etapa inicial e limitante do processo na síntese das catecolaminas é a conversão da tirosina em 3,4-di-hidroxifenilalanina (dopa) pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Por meio de uma série de etapas, a L-dopa é subsequentemente convertida em dopamina (Do), noraepinefrina (NEp) e epinefrina (Ep) (Fig. 24.9). A Ep é quase exclusivamente produzida e secretada pela medula suprarrenal, onde a proporção NEp:Ep é de 1:4. Entretanto, uma vez que todas as catecolaminas também são sintetizadas no SNC e no sistema nervoso simpático (SNS), a proporção NEp:Ep na periferia é de aproximadamente 9:1.

Tabela 24.14 Interpretação do teste da pentagastrina (Pg)

Pico de calcitonina (CT) em ng/L (pg/mL)	Interpretação
< 10	Normal (80% dos adultos)
> 30, porém < 50	5% dos adultos normais
> 50, porém < 100	Possibilidade de MTC ou outra patologia da tireoide
> 100	MTC provável
Basal ou valor CT pós-Pg > 10 pg/mL	Patologia da célula C ou tecido residual em pacientes com MEN 2 e em pacientes com MTC após a cirurgia

MTC = câncer de tireoide medular; MEN 2 = neoplasia endócrina múltipla 2.

De Demers LM, Spencer CA (eds.): NACB Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. 2003, p. 69.

Tabela 24.15 Outras condições, além da MTC, nas quais a calcitonina pode estar elevada

Tumores neuroendócrinos	Câncer pulmonar de células pequenas; carcinoides intestinal e brônquico; e todos os tumores neuroendócrinos
Hiperplasia benigna de células C (HCC)	Doença tireoidiana autoimune, câncer de tireoide diferenciado
Outras doenças	Doença renal; hipergastrinemia; hipercalcemia

De Demers LM, Spencer CA (eds.): NACB Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. 2003, p. 70.

As catecolaminas são metabolizadas tanto pela catecol-O-metiltransferase (COMT) como pela monoamina oxidase (MAO). A COMT converte a Do em metoxitiramina, bem como a Ep em metanefrina (MN) e a NEp em normetanefrina (NMN), sendo que todos esses produtos de conversão podem ser oxidados a ácido vanililmandélico (VMA) por ação da MAO. Esta última também converte a Ep e a NEp em ácido 3,4-di-hidroximandélico, que sofre ação da COMT e dá origem ao VMA. O ácido 3-metóxi-4-hidroxifenilacético (ácido homovanílico [HVA]) é o produto final do metabolismo da Do.

Feocromocitoma

Feocromocitomas são tumores raros que produzem catecolaminas, cuja incidência aproximada é de 500 a 1.600 casos ao ano (Pacak, 2001a). Correspondem a < 1% de todas as causas secundárias de hipertensão. Embora 90% dos feocromocitomas sejam benignos, são quase invariavelmente letais se não forem diagnosticados e tratados da forma correta (Pacak, 2001a). Cerca de 90% dos tumores surgem na medula suprarrenal e de 10 a 15% são de origem extrassuprarrenal (paraganglioma). A maioria dos feocromocitomas é esporádica, entretanto de 10 a 20% são familiares e ocorrem como parte de uma neoplasia endócrina múltipla de tipo 2A ou 2B (MEN-2A ou MEN-2B), doença de von Hippel-Lindau (VHL), neurofibromatose de tipo 1 (NF-1) ou paraganglioma familiar. As formas hereditárias tendem a aparecer no indivíduo jovem e os tumores costumam ser intra-suprarrenais e bilaterais. O teste genético deve ser realizado quando o diagnóstico de feocromocitoma é estabelecido para indivíduos com menos de 50 anos de idade. A seleção do teste genético é guiada pela história médica e familiar do paciente.

A hipertensão sustentada ou paroxística é a manifestação mais comum dessa doença e está presente em cerca de 90% dos pacientes. Notavelmente, 10% dos pacientes são normotensos. Mais de 90% irão apresentar ataques paroxísticos caracterizados pela manifestação de pelo menos dois dos três sintomas seguintes: dores de cabeça associadas a palpitações e diaforese (Sheps, 1994). Outros sintomas incluem hipotensão ortostática, pressão arterial instável, sudorese excessiva, ansiedade, nervosismo, perda de peso, fadiga, palidez e tremores. A duração desses sintomas pode ser de poucos segundos a várias horas, com um intervalo bastante variável entre as crises, que pode ser de diversas vezes ao dia a uma vez em alguns meses. A Tabela 24.16 lista as indicações da triagem para feocromocitoma.

Há muita discussão sobre qual teste é a melhor opção para o diagnóstico do feocromocitoma. O aprimoramento da técnica do ensaio forneceu evidências que apoiam, para uso como teste inicial, a quantificação cromatográfica dos níveis plasmáticos das formas livres de MN e NMN. O diagnóstico de feocromocitoma é estabelecido se as concentrações plasmáticas tanto de MN livre como NMN livre forem equivalentes a cerca de 4 vezes o limite de referência superior. É necessário realizar testes adicionais em casos de pacientes que apresentam níveis altos, porém inferiores a 4 vezes o limite de referência superior (Sheps, 1994; Eisenhofer, 2004a,b).

Nos centros onde falta o acesso a esse teste, deve ser adotada como teste inicial a quantificação cromatográfica de NMN, MN, catecolaminas livres fracionadas (Ep, Nep, Do) e creatinina em uma coleção de urina de 24 horas (Eisenhofer, 2004a,b; Lenders, 2002). A MN é o mais sensível e específico dentre esses metabólitos (Heron, 1996). O diagnóstico de feocromocitoma também pode ser estabelecido pela quantificação das catecolaminas plasmáticas. Todavia, uma vez que possuem meia-vida curta e são secretados ocasionalmente, sua quantificação é útil somente se a amostra for coletada durante um paroxismo. De modo geral, são diagnósticos de feocromocitoma valores obtidos a partir de coleções de urina de 24 horas ou de catecolaminas plasmáticas equivalentes a 2 a 3 vezes o limite de referência superior considerado normal.

Ao lidar com casos de feocromocitoma "esporádico", a escolha e interpretação dos testes diagnósticos depende do nível pré-teste de suspeita da doença. Em situações como essa, a quantificação de MN e catecolaminas na urina de 24 horas apresenta um grau clinicamente aceitável de sensibilidade e uma especificidade bem melhor do que a obtenção de valores de MN livre fracionada no plasma (Sawka, 2003). Em razão das dificuldades para coletar uma amostra completa de urina de 24 horas de pacientes pediátricos, a determinação dos níveis plasmáticos de MN livre fracionada deve ser considerada o teste de escolha para essa população (Weise, 2002) (Tab. 24.17).

Existem inúmeros fatores que causam resultados falso-positivos por estimularem a secreção de catecolaminas e/ou interferirem no ensaio (Tab. 24.18). Para o ensaio de avaliação de MNs livres no plasma, os pacientes devem se abster de bebidas à base de cafeína e álcool durante um período de 24 horas antes da realização do teste. Também devem evitar o uso de acetaminofeno, antidepressivos tricíclicos, fenoxibenzamina, α-agonistas (p. ex., aldomet) e inibidores de MAO durante um período mínimo de 5 dias antes da realização do teste (Lenders, 1995). Para testar catecolaminas, além das MNs, o paciente também deve evi-

Tabela 24.16 Indicações da triagem para feocromocitoma

1	Hipertensão com características episódicas sugestivas de feocromocitoma
2	Hipertensão refratária
3	Labilidade da pressão sanguínea proeminente
4	Resposta pressora severa durante a anestesia, parto, cirurgia ou angiografia
5	Hipotensão inexplicável causada por anestesia, cirurgia ou gravidez
6	História familiar de feocromocitoma, MEN-2A ou 2B, doença VHL, neurofibromatose
7	Massa suprarrenal incidentalmente descoberta
8	Cardiomiopatia dilatada idiopática
9	Acessos ou ataques que ocorrem durante o esforço, torção ou giro do torso, tensão, coito ou micção

De Dluhy RG, Lawrence JE, Williams G: Endocrine hypertension. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003, p. 557.

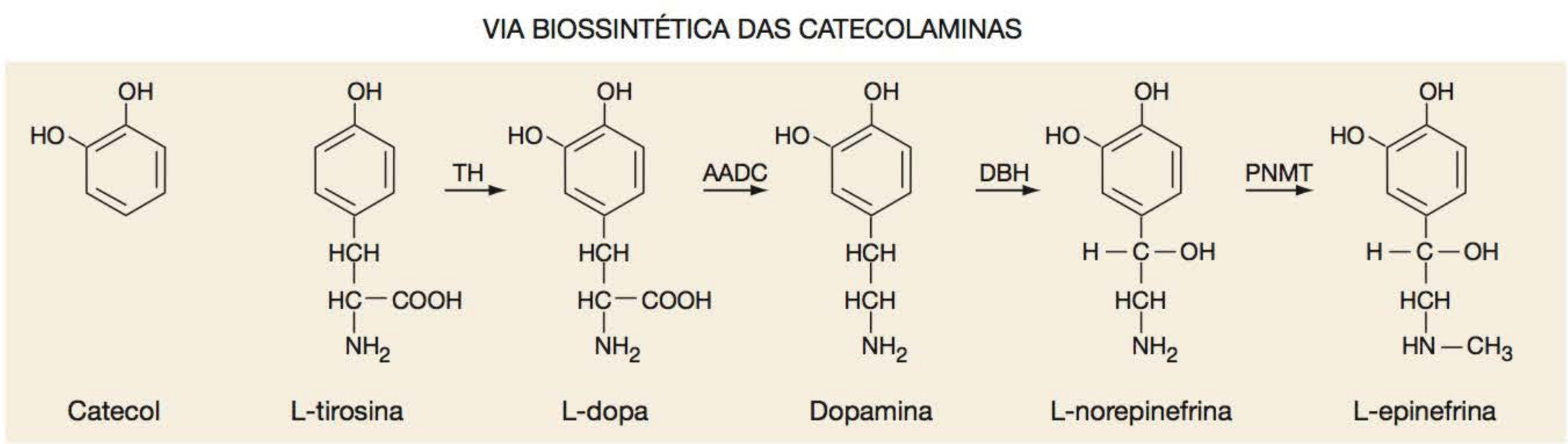


Figura 24.9 Catecolaminas: via biossintética. A etapa limitante do processo é a conversão da L-tirosina em L-3-4-di-hidrofenilalanina (L-dopa) por meio das ações da tirosina hidroxilase. AADC = L-aminoácido aromático descarboxilase; DBH = dopamina β-hidroxilase; PNMT = feniletanolamina N-metiltransferase; TH = tirosina hidroxilase. (Redesenhado a partir de Dluhy, RG; Lawrence JE; Williams, GH: Endocrine hypertension. In: Larsen, PR; Kronenberg, HM; Melmed, S; Polansky, KS (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2003, p. 555, com permissão.)

tar o consumo de nicotina, agentes simpatomiméticos (teofilina, pseudoefedrina), α-agonistas (p. ex., albuterol) e levodopa/carbidopa. Se o paciente necessitar de medicamentos anti-hipertensivos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE-I), bloqueadores do receptor de angiotensina e bloqueadores seletivos do α_1-adrenorreceptor (p. ex., prazocina) podem ser utilizados sem medo de obter resultados falso-positivos (Eisenhofer, 2003).

Apesar de os níveis urinários de catecolaminas estarem elevados na insuficiência e na falência renais, a quantificação de MNs livres no plasma pode ser utilizada para estabelecer com segurança o diagnóstico de feocromocitoma nessas duas condições (Eisenhofer, 2004b). Estresses, como IM agudo, insuficiência cardíaca congestiva, cirurgia e acidente cerebral vascular (AVC) agudo, estão todos associados à elevação dos níveis de catecolaminas. Em tais situações, há duas abordagens possíveis: aplicar tratamento empírico e realizar o teste com o paciente estável; ou adotar outros testes diagnósticos, incluindo análises de imagem. As concentrações plasmáticas de NMN aumentam com a idade e, em consequência, pacientes idosos são particularmente suscetíveis a apresentar resultados falso-positivos nos testes. O uso das MNs fracionadas urinárias e das catecolaminas pode ser mais adequado a essa população (Sawka, 2003).

Níveis plasmáticos de NMN abaixo de 112 ng/L (0,61 nmol/L) e níveis de MN abaixo de 61 ng/L (0,31 nmol/L) virtualmente excluem o diagnóstico de feocromocitoma, de modo a tornar desnecessária a imediata realização de testes adicionais para detecção de tumores.

Tabela 24.17 Sensibilidade e especificidade dos níveis hormonais no diagnóstico do feocromocitoma

	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	Hereditário	Esporádico	Hereditário	Esporádico
Plasma				
Metanefrinas livres	97	99	96	82
Catecolaminas	69	92	89	72
Urina				
Metanefrinas fracionadas	96	97	82	45
Catecolaminas	79	91	96	75
Metanefrinas totais	60	88	97	89
Ácido vanililmandélico	46	77	99	86

De Pacak, 2004; Lenders, 2002.

Tabela 24.18 Efeitos de medicamentos sobre o teste para feocromocitoma

	Plasma				Urina			
Classe de medicamento	NMN	NEp	MN	Ep	NMN	NEp	MN	Ep
Tricíclicos	+	+	−	−	+	+	−	−
Fenoxibenzamina	+	+	−	−	+	+	−	−
Buspirona	−	−	−	−	−	−	+	−
Bloqueadores α-adrenérgicos	−	−	−	−	−	+	−	−
Bloqueadores β-adrenérgicos	−	−	+	−	+	+	+	+
Bloqueadores de canais de cálcio	−	+	−	−	−	+	−	+
Simpatomiméticos	+	+	−	−	+	+	−	−

* Diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor de angiotensina II exercem pouca influência sobre a frequência de resultados falso-positivos.

NMN = normetanefrina; NEp = noraepinefrina; MN = metanefrina; Ep = epinefrina.

De Eisenhofer, 2003.

Diante de concentrações plasmáticas de NMN acima de 400 ng/L (2,19 nmol/L) ou concentrações de MN acima de 236 ng/L (1,20 nmol/L), a probabilidade de haver feocromocitoma é tão alta que a tarefa imediata consiste em localizar o tumor (Eisenhofer, 2003).

Na maioria das vezes, os resultados dos testes retornam equivocados e é necessário realizar testes confirmatórios, como o de supressão da clonidina, de estimulação por glucagon ou a quantificação das catecolaminas fracionadas urinárias. A clonidina é um agonista α-adrenérgico de ação central, que inibe a liberação das catecolaminas a partir do sistema nervoso, mas não exerce efeito em sua liberação pelo tumor (Bravo, 1981). Nos indivíduos com feocromocitoma, a clonidina falha em suprimir adequadamente os níveis plasmáticos de NEp. O teste de supressão da clonidina é indicado somente quando a concentração de catecolaminas no plasma ultrapassa 1.000 pg/mL (5,9 nmol/L). Para aqueles cujos níveis plasmáticos de catecolaminas estão normais ou discretamente aumentados, esse teste não é confiável (Taylor, 1986; Elliott, 1988; Sjoberg, 1992). Eisenhofer et al. (2003) demonstraram que se os níveis plasmáticos de NMNs pré- e pós-clonidina forem quantificados, o grau de sensibilidade e especificidade desse teste aumenta, em especial nos casos em que a NEp sofre apenas elevações modestas. O teste de estimulação por glucagon pode provocar aumentos perigosos na pressão sanguínea e raramente é utilizado. Deve ser realizado somente em pacientes cuja pressão sanguínea é bem controlada, mediante a presença de um médico até o final da execução do teste. Um aumento de mais de 3 vezes dos níveis plasmáticos de NEp ou acima de 2.000 pg/mL é diagnóstico de feocromocitoma (Tab. 24.19). O mecanismo de ação proposto seria a estimulação dos receptores de adenilato ciclase sensíveis ao glucagon expressos nos tumores.

A menos que haja uma história convincente ou o paciente seja classificado em uma das categorias de distúrbios geneticamente herdados, com frequência, é desnecessário repetir os testes de pacientes com resultados discretamente positivos.

A cromogranina A (CgA) é uma proteína armazenada e secretada com as catecolaminas a partir da medula da suprarrenal e do SNS. Embora seus níveis estejam elevados em mais de 80% dos casos de feocromocitomas, não é uma proteína específica para esse distúrbio e também pode ser secretada por outros tecidos cromafins (Hsiao, 1991). A CgA inicialmente era considerada útil ao diagnóstico do feocromocitoma, pois as medicações que se costumava utilizar no tratamento da condição não exerciam impacto em sua secreção nem na quantificação. Apesar da sensibilidade relativamente alta (86%), sua especificidade diagnóstica é fraca. Essa falta de especificidade se deve, em grande parte, ao fato de os rins desempenharem um papel essencial na depuração da CgA a partir da circulação, de modo que até mesmo graus mínimos de comprometimento renal (p. ex., depu-

Tabela 24.19 Testes farmacológicos para diagnóstico do feocromocitoma

Teste de supressão com clonidina	
Indicações	Pacientes com hipertensão e achados clínicos ou história familiar altamente sugestivos de feocromocitoma, cujos níveis de catecolaminas estejam elevados, mas não a ponto de confirmar o diagnóstico de feocromocitoma.
Interpretação	Normal: diminuição dos níveis de NEp a valores abaixo do normal ou declínio > 50% em relação ao basal. Redução dos níveis de normetanefrinas a valores abaixo do normal ou declínio de 40% em relação ao basal. Feocromocitoma: os níveis de NEp falham em cair a valores abaixo do normal ou o equivalente a 50% em relação ao basal. Os níveis de normetanefrinas falham em cair a valores abaixo do normal ou ao equivalente a 40% em relação ao basal.
Teste de estimulação com glucagon	
Indicações	Quando os achados clínicos ou história familiar são altamente sugestivos de feocromocitoma, porém, a pressão sanguínea se mantém normal e as catecolaminas estão apenas modestamente elevadas.
Interpretação	Feocromocitoma: um aumento mínimo equivalente a três vezes a concentração plasmática de NEp, ou a elevação dos níveis a valores > 2.000 pg/mL.

ração de creatinina [CrC] < 80 mg/mL/min) podem acarretar aumentos significativos na concentração sérica dessa proteína (Bravo, 2003). Entre os pacientes hipertensos que apresentam depuração de creatinina abaixo de 80 mL/min, a sensibilidade geral, especificidade, acurácia e valores preditivos positivo e negativo da CgA sérica caem para 85, 50, 59, 38 e 90%, respectivamente. Todavia, ao ser combinada às elevadas concentrações plasmáticas de catecolaminas em pacientes com depuração de creatinina mínima de 80 mL/min, a especificidade diagnóstica e os valores preditivos positivos melhoram, aumentando para 98% e 97%, respectivamente (Canale, 1994). Seu principal uso se dá no monitoramento pós-operatório da recorrência dos tumores.

Procedimentos do teste. Para coletas de urina de 24 horas, a creatinina é quantificada para verificar a adequação da coleção. A fim de preservar a adequação da amostra, a urina deve ser coletada em um frasco contendo 25 mL de HCl 6 N.

As catecolaminas plasmáticas são coletadas após o paciente jejuar de um dia a outro (a ingestão de água é permitida). Em um ambiente tranquilo, o paciente é colocado em posição inclinada e uma trava de heparina é inserida por via intravenosa. Decorridos 20 a 30 minutos, o sangue do paciente é coletado em um tubo pré-resfriado contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) e de tampa cor de lavanda. A amostra de sangue total deve ser mantida em água com gelo até o momento da centrifugação (de preferência, a 4°C). A separação do plasma deve ser realizada dentro de 2 horas após a realização da flebotomia. A amostra, em seguida, deve ser congelada imediatamente.

Tanto as amostras de urina como de plasma devem ser analisadas por HPLC acoplada à espectrometria de massa em tandem, pois essa técnica elimina uma grande parte dos problemas causados por substâncias interferentes (Taylor, 2002). No caso dos metabólitos urinários, ao interpretar os resultados, é importante adotar faixas de referência apropriadas para a idade do paciente. Do mesmo modo, é importante atentar para o fato de que as faixas de referência não só podem variar amplamente de um laboratório para outro como também dentro do mesmo laboratório, à medida que metodologias mais novas vão substituindo os ensaios menos sensíveis.

Testes de acompanhamento adicionais. Uma vez confirmado o diagnóstico bioquimicamente, o tumor deve ser localizado tanto por varredura de TC como por análise de IRM das suprarrenais. Se os resultados obtidos forem negativos, o abdome, o tórax e a pelve devem ser analisados. A TC apresenta maior sensibilidade, enquanto a IRM é mais específica. A IRM é superior à TC na detecção de lesões extra-suprarrenais e proporciona a vantagem de dispensar o uso de radiação ionizante e a necessidade de contraste iônico.

Se um tumor não puder ser localizado por TC nem por IRM, ou se há suspeita de doença metastática, deve ser realizada uma varredura empregando meta-iodobenzil-guanidina (MIBG) marcada com ^{131}I ou ^{123}I. A cintigrafia com octreotide (OctreoScan) e a tomografia com emissão de pósitron são técnicas reservadas para o caso de as anteriores falharem.

Após a ressecção bem-sucedida do tumor, o prognóstico em geral é excelente. Decorridas várias semanas da cirurgia, as MNs urinárias devem ser novamente testadas para garantir que a ressecção tenha sido total. Também devem ser quantificadas periodicamente, como marcadores iniciais de doenças recorrentes (Werbel, 1995).

Eisenhoffer et al. (2003) propuseram um algoritmo para avaliação do feocromocitoma (Fig. 24.10).

Neuroblastoma

De modo semelhante ao feocromocitoma, o neuroblastoma tem origem na crista neural, surgindo junto às suprarrenais ou na cadeia simpática. É o segundo tumor sólido maligno mais comum na infância, ocorrendo geralmente antes dos 3 anos de idade. Os sintomas estão primariamente relacionados à massa tumoral, em vez da hipertensão, que muitas vezes é branda ou está ausente. No momento do diagnóstico, 70% dos casos apresentam metástases em regiões distantes. Cerca de 90% dos pacientes apresentam níveis urinários elevados de HVA no momento do diagnóstico, enquanto quase 75% dos pacientes apresenta níveis urinários elevados de VMA (Tuchman, 1985). Ambos os testes devem ser solicitados ao realizar a triagem para detecção da doença. Em crianças sadias, pelo menos até os 15 anos de idade, os níveis urinários de VMA e MNs tendem a ser mais altos (por mg de creatinina) e mais variáveis do que nos adultos. As MNs urinárias também podem estar elevadas nos pacientes com neuroblastoma, porém não constituem medida sensível de tumor residual. O HVA urinário também está aumentado na disautonomia familiar (síndrome de Riley-Day) e em alguns pacientes com feocromocitoma.

Hormônios do córtex da suprarrenal

O córtex da suprarrenal é composto por três zonas distintas: a mais externa é a zona glomerulosa, seguida pela zona fasciculada intermediária que, por sua vez, circunda a zona reticular (a mais interna de todas). Em termos mais amplos, cada zona é responsável pela síntese e secreção de um conjunto único de hormônios: a zona glomerulosa está associada aos mineralocorticoides (aldosterona); a zona fasciculada é responsável pelos glicocorticoides (cortisol); e a zona reticular abrange os esteroides sexuais (DHEAS e andrógenos). Entretanto, sob certas condições patológicas e fisiológicas, tais distinções se tornam obscuras.

Eixo mineralocorticoide

A aldosterona é o mais importante dos mineralocorticoides. Promove reabsorção de sódio e água pelos rins para ajudar a manter a pressão sanguínea e a tonicidade. A enzima CYP11B2 (aldosterona sintase) é expressa de modo sítio-específico na zona glomerulosa. Como resultado, a síntese da aldosterona e seus metabólitos 18-hidroxilados intermediários é restrita à zona glomerulosa. As moléculas precursoras de aldosterona, 11-desoxicorticosterona (DOC) e 11-desoxicortisol, similarmente possuem atividade mineralocorticoide. Entretanto, diferente da aldosterona, esses precursores podem ser sintetizados na zona fasciculada, além da zona glomerulosa. Esse fato explica a hipertensão e os distúrbios eletrolíticos observados em algumas formas de hiperplasia suprarrenal congênita. Embora a aldosterona responda às alterações agudas envolvendo o ACTH, é controlada principalmente pelo sistema renina-angiotensina.

A zona fasciculada, que corresponde a até 75% do córtex, é responsável pela síntese e secreção dos glicocorticoides e, em menor extensão, dos andrógenos e estrógenos. Os glicocorticoides são compostos esteroides contendo 21 átomos de carbono e um grupo hidroxila no carbono 17, que confere o sinônimo 17-hidroxicorticosteroides. O cortisol é o glicocorticoide-chave, que regula sua própria secreção por retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPA), inibe a liberação de ACTH a partir da hipófise e a do hormônio liberador de corticotropina (CRH, corticotropin-releasing hormone) a partir do hipotálamo. Ambos, CRH e AVP (ADH), são produzidos pelos neurônios parvocelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo. A secreção do ACTH é estimulada pelo CRH e, em grau bem menor, pela AVP. O ACTH, por sua vez, estimula a produção de cortisol pelas suprarrenais. O cortisol é necessário em momentos de estresse, para manutenção da pressão sanguínea, dos níveis de açúcar no sangue e para prevenir o choque. Embora o cortisol seja o glicocorticoide mais importante, a corticosterona – um hormônio da via dos mineralocorticoides – também possui atividade de glicocorticoide.

Andrógenos e estrógenos são produzidos pela zona reticular. Os andrógenos são esteroides compostos por 18 átomos de carbono e contendo anéis A saturados, que contrastam com os estrógenos. Estes são esteroides constituídos por 17 átomos de carbono e contêm anéis A insaturados.

A Tabela 24.20 resume as funções desses hormônios.

Distúrbios congênitos das deficiências de enzimas corticais suprarrenais

Os hormônios do córtex da suprarrenal são derivados esteroides, sintetizados a partir do colesterol LDL. A LDL é distribuída às suprarrenais e captada pelos receptores de LDL. A proteína regulatória aguda de esteroides (StAR, steroid acute regulatory protein), em seguida, a transporta através da membrana mitocondrial, onde tem início sua jornada pela via esteroidogênica (Fig. 24.11). As enzimas que catalisam essas reações sintéticas estão classificadas em quatro tipos gerais: hidroxilases, desidrogenases, desmolases e isomerases. Como a maioria dos erros inatos do metabolismo que afetam a síntese dos hormônios esteroides no córtex suprarrenal envolve deficiências de hidrolases, estas constituem o grupo de enzimas de maior importância clínica.

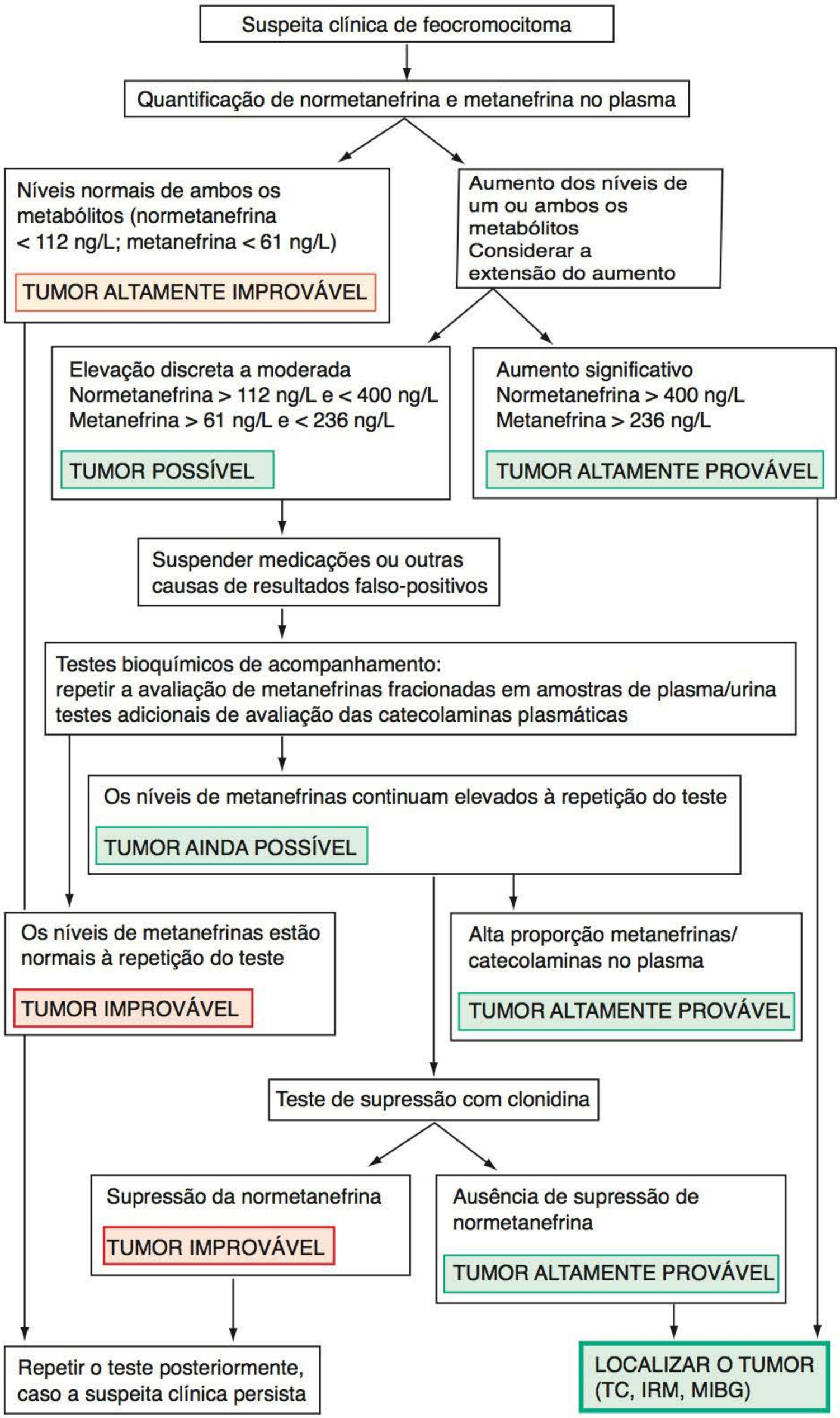


Figura 24.10 Algoritmo para avaliação do feocromocitoma. MIBG = ^{131}I-metaiodobenzilguanidinina. (Redesenhado a partir de Eisenhofer, G; Goldstein, DS; Walther, MM et al: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: How to distinguish true- from false-positive test results. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(6):2656-2666, com permissão.)

Foram descritos ao menos oito defeitos metabólicos diferentes envolvendo a síntese de cortisol e aldosterona, cada um deles caracterizado pela deficiência de uma enzima específica da suprarrenal. A vasta maioria dessas deficiências enzimáticas é herdada como traço autossômico recessivo, com graus variáveis de penetrância. Os defeitos enzimáticos que afetam unicamente a biossíntese do cortisol são agrupados sob a denominação de hiperplasia suprarrenal congênita (HSC). As cinco enzimas afetadas são: $P450_{SCC}$ (defeito na StAR), 3β-hidroxiesteroide desidrogenase, 21-hidroxilase, 11-hidroxilase e 17-hidroxilase. A síntese e secreção de CRH e ACTH normalmente são controladas pelo cortisol por meio de um mecanismo de retroalimentação negativa. Na HSC, os defeitos que afetam as enzimas necessárias à produção de cortisol causam deficiência desse hormônio. A deficiência de cortisol resulta na eliminação da inibição exercida pela retroalimentação negativa sobre a produção de CRH e ACTH. Em consequência, os níveis de CRH e ACTH aumentam, induzindo hiperplasia suprarrenal e forçando a esteroidogênese adiante,

Tabela 24.20 Efeitos fisiológicos dos esteroides

Hormônio representativo	Efeitos biológicos
Cortisol (representando glicocorticoides nitrogenadas)	Aumento do catabolismo de proteínas Gliconeogênese Aumento da concentração de glicose no sangue Diminuição da tolerância à glicose Aumento do glicogênio hepático Aumento da glicogenólise hepática Diminuição da captação periférica e utilização da glicose Diminuição da síntese de mucopolissacarídeos sulfatados ácidos Síntese e redistribuição de gorduras Efeitos ao nível celular e tecidual Anti-inflamatórios Dissolução do tecido linfoide Linfopenia Eosinopenia Eritropoiese aumentada Alteração da permeabilidade celular, em especial diminuição da permeabilidade da membrana à água Aumento da secreção gástrica (HCl e pepsina)
Aldosterona (representando mineralocorticoides)	Regulação eletrolítica Retenção de sódio (Na^+) Excreção de potássio (K^+) Retenção de água e expansão do volume de líquidos extracelulares Aumento da pressão sanguínea
Andrógenos (representando hormônios sexuais)	Anabolismo de proteínas nitrogenadas Crescimento e maturação – óssea e muscular Pelos corporais (pubianos e axilares)

enquanto o organismo tenta compensar e normalizar a produção de cortisol. Esse cenário não só resulta em acúmulo dos precursores hormonais diretamente precedentes ao defeito enzimático, como também causa um desvio massivo desses precursores para as etapas ainda funcionais da via metabólica. As manifestações clínicas da HSC são heterogêneas, dependendo do grau de severidade e da localização dos defeitos enzimáticos, de quais hormônios estão deficientes e quais estão sendo produzidos em excesso. Os sintomas vão desde choque, perda de sal e desenvolvimento sexual anômalo na infância até hirsutismo e infertilidade no adulto. Em alguns casos, como nas deficiências enzimáticas parciais da síntese de cortisol, é possível haver uma síntese hormonal quase adequada, se a hipersecreção de ACTH for capaz de estimular a hiperplasia suprarrenal a compensar a deficiência. As manifestações clínicas de várias deficiências de enzimas corticais suprarrenais e seus respectivos achados laboratoriais estão resumidos na Tabela 24.21.

O diagnóstico é estabelecido por meio da quantificação dos níveis séricos de vários hormônios e pela avaliação de quais esteroides estão sendo produzidos em excesso, e quais estão deficientes, bem como calculando a proporção precursor/produto e comparando esses resultados com dados normativos emparelhados conforme a idade e o gênero. Como os níveis de hormônios distais ao bloqueio (hormônio-produto) podem estar elevados em consequência da conversão periférica de hormônios precursores, cujos níveis estão acentuadamente aumentados, o uso de proporções precursor/produto é importante para evitar erros de diagnóstico decorrentes da elevação enganosa dos níveis de hormônios-produto (Levine, 2002). Se os níveis hormonais retornarem como limítrofes, porém, a suspeita clínica de HSC ainda for alta, é preciso repetir a quantificação dos níveis de esteroides 60 minutos após a administração endovenosa de 0,25 mg de ACTH. O ACTH impulsiona a esteroidogênese adiante, acentuando o bloqueio. Havendo uma pró-banda, o diagnóstico pode ser mais acuradamente determinado por genotipagem.

A HSC é classificada de acordo com o grau de severidade da doença nas formas clássica (neonatal, severa) e não clássica (de início tardio, criptogênica). A forma clássica é subdividida nas variantes perdedora de sal e não perdedora de sal (virilizante simples).

Deficiência de 21-hidroxilase

A enzima 21-hidroxilase (também referida como CYP21, CYP21A2, $P450_{c21}$) está localizada junto ao retículo endoplasmático mitocondrial. Sua deficiência é a causa mais comum de HSC, sendo observada em cerca de 95% dos casos. A triagem de recém-nascidos utilizando sangue capilar obtido do calcanhar em discos de papel de filtro tem identificado esse distúrbio em cerca de 1 a cada 14 mil indivíduos na América do Norte, e em 1 a cada 300 esquimós Yupik, no Alasca (Pang, 1988, 1982). A forma clássica é detectada em aproximadamente 1 a cada 16 mil bebês nascidos vivos, enquanto a forma não clássica é vista em cerca de 0,2% da população branca em geral, podendo ser encontrada em 1 a 2% da população descendente de judeus oriundos do leste europeu (Therrell, 2001; Speiser, 1985).

Tabela 24.21 Hiperplasia suprarrenal congênita: características clínicas e bioquímicas

Característica	Deficiência de 21-hidroxilase	Deficiência de 11β-hidroxilase	Deficiência de 17β-hidroxilase	Deficiência de 3β-hidroxiesteroide	Hiperplasia lipoide	Deficiência de aldosterona sintase
Gene defeituoso	CYP21	CYP11B1	CYP17	HSD3B2	StAR	CYP11B2
Incidência	1 : 15.000	1 : 100.000	Rara	Rara	Rara	Rara
Genitália ambígua	+ (feminina)	+ (feminina)	+ (masculina) ausência de puberdade (feminina)	+ (masculina) suave no sexo feminino	+ (masculina) ausência de puberdade (feminina)	Normal
Insuficiência suprarrenal aguda	+	Rara	Não	+	++	Apenas perda de sal
Achados laboratoriais	↑ 17-OHP e pregnanetriol no plasma Acentuado ↑ de pregnanetriol e 17-KS na urina	↑ DOC e 11-desoxicortisol no soro ↑ 17-OHCS e 17-KS na urina	↑ níveis séricos de DOC, 18-OH DOC, 18-OHB e B	↑ níveis séricos de 17OH-pregnenolona, pregnenolona e DHEA ↑ 17-KS na urina ↑ Δ5/Δ4 esteroides no soro e na urina	Diminuição de todos os esteroides no soro e no plasma	↑ níveis séricos de B, 11-DOC e 18-OHB
Glicocorticoides	↓	↓	↓	↓	↓	Normal
Mineralocorticoides	↓	↑	↑	↓	↓	↓
Andrógenos	↑	↑	↓	↓ masculino, ↑ feminino	↓	Normal

B = corticosterona; 18-OHB = 18-hidroxicorticosterona; DOC = 11-desoxicorticosterona; 17-KS = 17-cetosteroides; 17-OHP = 17α-hidroxiprogesterona; 17-OHCS = 17-hidroxicorticosteroides; DHEA = desidroepiandrosterona.

De Stewart PM: The suprarrenal cortex. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, Saunders, 2003, p. 533.

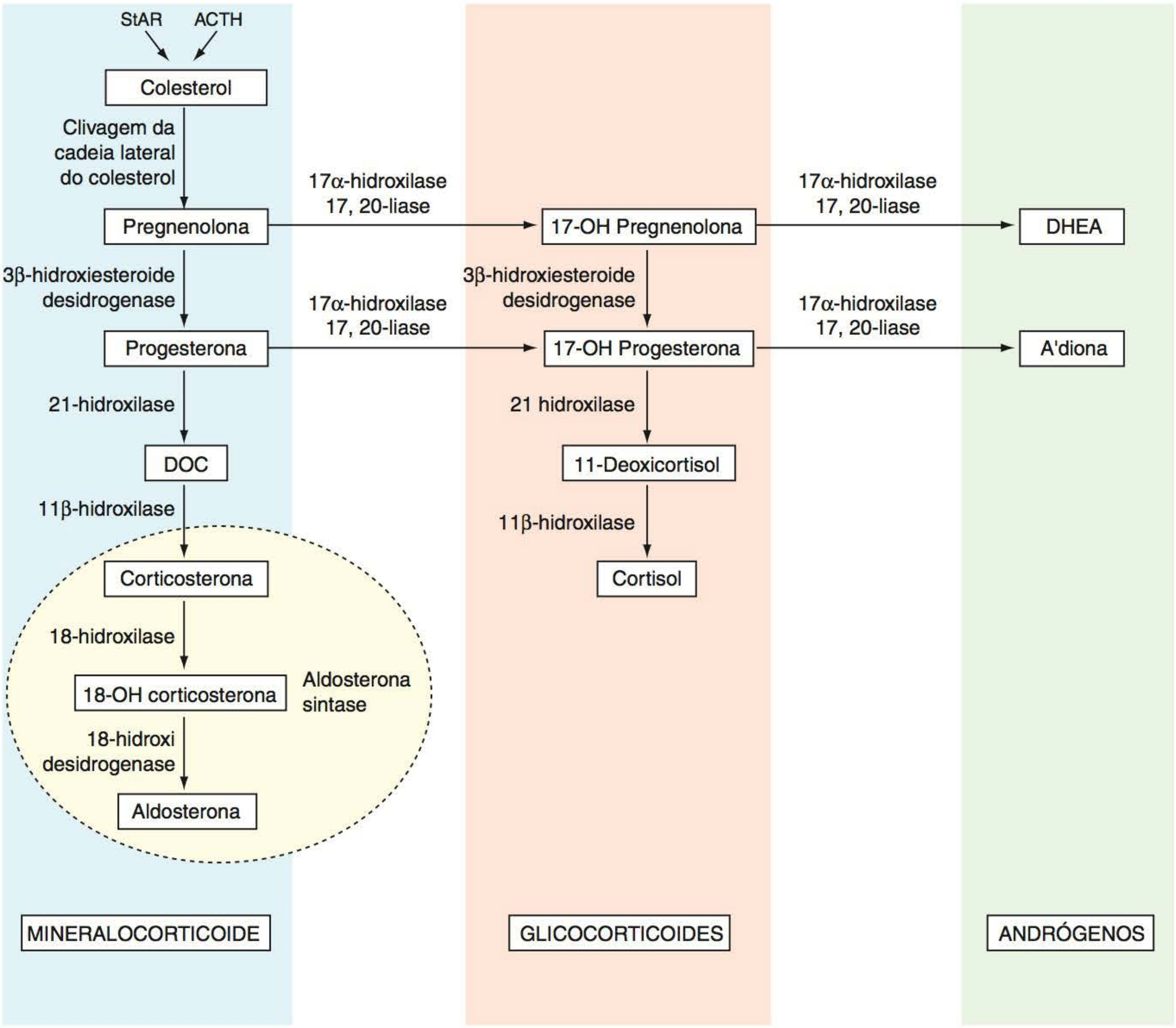


Figura 24.11 Vias esteroidogênicas do córtex suprarrenal. Os esteroides suprarrenais são classificados em mineralocorticoides, glicocorticoides ou andrógenos, de acordo com o tipo de atividade. StAR = proteína reguladora de esteroide aguda; ACTH = adenocorticotropina; A'diona = androstenediona; DHEA = desidroepiandrosterona; DOC = desoxicorticosterona. As estruturas químicas desses esteroides são mostradas na Figura 25.1, no próximo capítulo.

A 21-OH catalisa a conversão da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em 11-desoxicortisol (composto S), e da progesterona em 11-DOC. Portanto, sua deficiência acarreta a elevação dos níveis dos precursores esteroides 17-OHP e pregnanetriol na urina, e de 17-OHP no soro. Esses precursores são desviados pela via metabólica adiante e causam produção excessiva de androstenediona e testosterona (Fig. 24.12). A apresentação clínica muitas vezes está correlacionada ao grau de severidade da disfunção enzimática. A variedade clássica se manifesta na fase de recém-nascido ou no início da infância, como insuficiência suprarrenal e virilização, com ou sem perda de sal. A forma não clássica se manifesta no final da infância, como adrenarca precoce, ou na fase de adulto-jovem, como hirsutismo, amenorreia e infertilidade. Nas mulheres, as manifestações são bastante similares àquelas da doença dos ovários policísticos. Os homens podem desenvolver puberdade precoce, remanescentes da suprarrenal nos testículos e infertilidade.

Há uma íntima relação funcional entre o córtex e a medula das suprarrenais. Foram descritos casos de displasia medular e hipossecreção de catecolaminas na deficiência clássica de 21-OH. Em um estudo realizado com 38 crianças que apresentavam a forma clássica (CYP21A2) da doença, constatou-se que os níveis plasmáticos de Ep e MN, e os níveis urinários de Ep eram de 40 a 80% mais baixos nos indivíduos afetados, em comparação aos indivíduos normais (Merke, 2000). Em um outro estudo, aqueles com doença clássica (CYP21A2) apresentaram uma significativa redução da resposta de catecolaminas ao exercício que não foi afetada pela administração de doses de carga de glicocorticoides (Weise, 2004). Foi sugerido que o grau de comprometimento medular pode ser um biomarcador da severidade da HSC (Merke, 2002).

Diagnóstico. O diagnóstico pré-natal é importante porque o tratamento supressor com esteroides pode anular o desenvolvimento da virilização do feto de gênero feminino. O diagnóstico pode ser estabelecido por meio da quantificação dos níveis de 17-OHP no líquido amniótico ou por genotipagem de células obtidas por amostragem das vilosidades coriônicas. Os genes responsáveis pela deficiência de 21-OH – CYP21 (CYP21A2) e CYP21P (CYP21A) – estão localizados no cromossomo 6. Entre esses dois genes homólogos, apenas o CYP21 é ativo, sendo que mutações deletérias em CYP21P interferem na expressão genética normal. Essas mutações podem ser identificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) e por *Southern blotting* utilizando amostras de vilosidades coriônicas (New, 1995; White, 1994a).

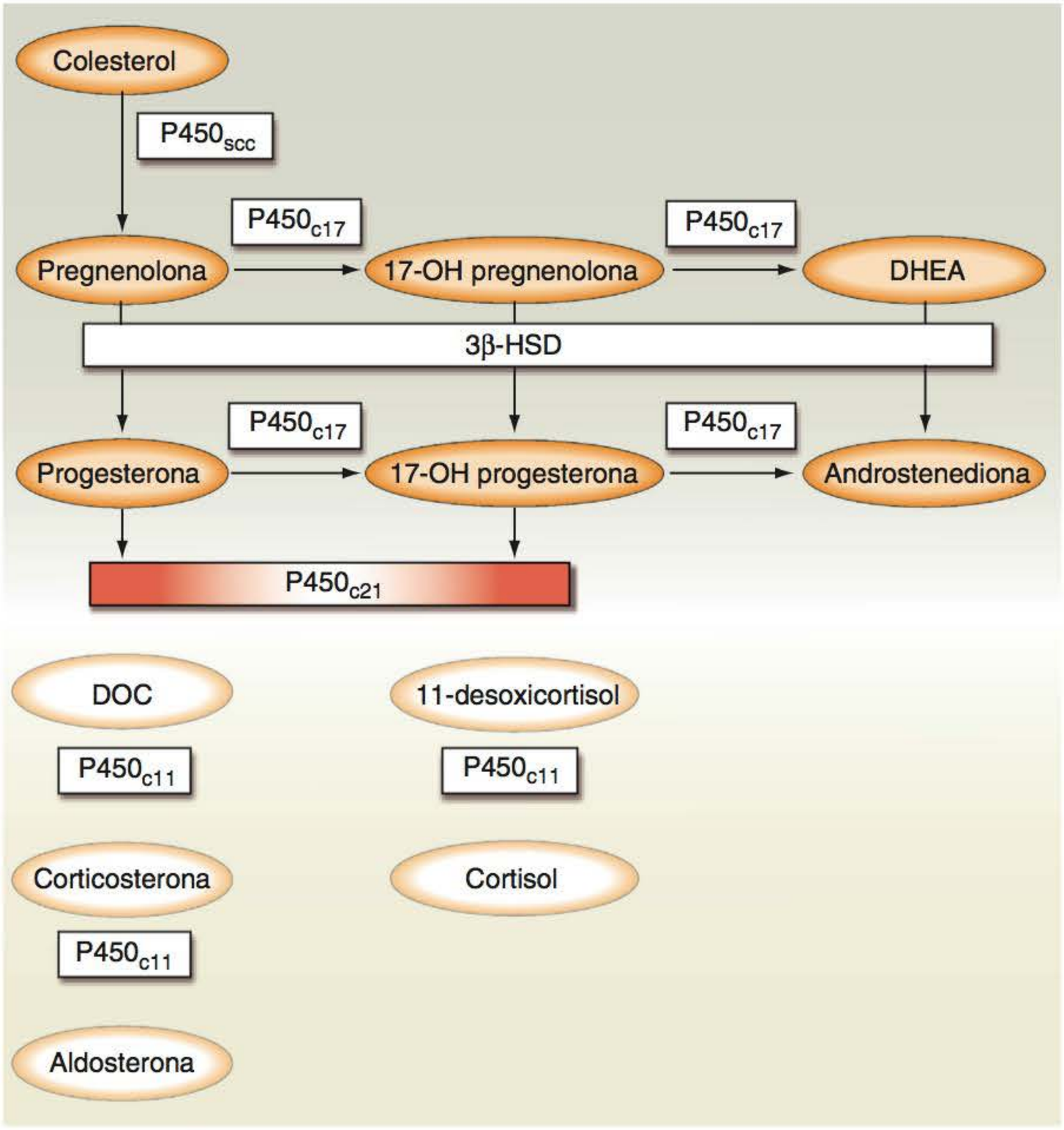


Figura 24.12 Esteroidogênese defeituosa decorrente da deficiência de 21-hidroxilase. O aumento relativo da concentração de hormônios proximal ao bloqueio é representado em cor mais intensa. Quanto mais grave é o defeito enzimático, maior é a concentração de hormônios precursores. DHEA = desidroepiandrosterona; DOC = desoxicorticosterona; $P450_{SCC}$ = enzima de clivagem da cadeia lateral dependente do citocromo P450.

A triagem neonatal – atualmente obrigatória em muitos estados americanos – consiste na quantificação de 17-OHP ou na genotipagem de sangue obtido com uma picada no calcanhar e coleta em papel de filtro. Além de a genotipagem ser o teste mais definitivo para o diagnóstico de HSC, o fato de o genótipo apresentar uma boa correlação com o grau de severidade da doença significa que também pode ser utilizado como ferramenta prognóstica (Nordenstrom, 1999).

Em recém-nascidos com perda de sal, os níveis de 17-OHP não estimulados são tipicamente > 8.000 ng/dL, sendo que aumentam para 100.000 ng/dL (3.000 nmol/L) após a administração de ACTH. Na variante virilizante simples, os níveis variam de 10.000 a 30.000 ng/dL (300 a 1.000 nmol/L). Indivíduos com doença não clássica tipicamente apresentam níveis de 17-OHP que variam de 1.500 a 10.000 ng/dL (50 a 300 nmol/L) (New, 1983). É interessante observar que os níveis hormonais determinados ao acaso podem se mostrar normais em indivíduos com a forma não clássica da doença. Portanto, é importante que o teste seja realizado de manhã cedo. Se os resultados obtidos forem equivocados, o diagnóstico pode ser confirmado por meio da comparação dos níveis séricos de 17-OHP antes e 60 minutos após a administração de 0,25 mg de ACTH (Cortrosyn). Esse hormônio ajuda a estimular a esteroidogênese e serve para aumentar dramaticamente o estreitamento no sítio de bloqueio enzimático, resultando em um dramático aumento dos precursores – nesse caso, 17-OHP. Valores de 17-OHP pós-ACTH abaixo de 330 ng/dL são considerados normais; valores entre 330 e 1.000 ng/dL indicam portadores heterozigotos e níveis > 2.000 ng/dL são diagnósticos da forma não clássica da HSC. Caso haja uma pró-banda disponível, o método de genotipagem é superior a esses testes bioquímicos antigos em termos de identificação de indivíduos heterozigotos (Honour, 1993).

A meta da terapia de reposição com glicocorticoides e mineralocorticoides para crianças consiste em fazer o paciente atingir níveis normais de crescimento, peso e desenvolvimento puberal, bem como otimizar a altura final na fase adulta. Por outro lado, os objetivos mais importantes do tratamento para indivíduos adultos são a redução dos sinais de virilização e a retomada da fertilidade. O objetivo da reposição de mineralocorticoides é normalizar a atividade da renina plasmática. Já a reposição de glicocorticoides tem como finalidade manter os níveis de 17-OHP parcialmente suprimidos, em torno de 100 a 1.000 ng/dL (3 a 30 nmol/L), e os níveis de ACTH abaixo de 100 ng/L, visando a prevenir desvios na direção da síntese de testosterona e normalizar os níveis de androstenediona e testosterona. Devem ser evitadas tentativas de normalizar os níveis de 17-OHP, pois essa ação requer níveis suprafisiológicos de glicocorticoides e pode levar à síndrome de Cushing (Speiser, 2003).

Deficiência de 11β-hidroxilase (11-OH)

Trata-se da segunda deficiência enzimática mais comum do córtex suprarrenal, que corresponde a cerca de 7% de todos os casos de HSC. Um defeito na enzima 11-OH bloqueia a conversão final do 11-desoxicortisol em cortisol e da DOC em corticosterona. Assim como na deficiência da 21-OH, ocorre um aumento compensatório da secreção de ACTH que causa hiperplasia suprarrenal e desvio em massa de precursores esteroides para a síntese de testosterona, resultando no aparecimento de sinais de virilização. Esse bloqueio também resulta no acúmulo de DOC. A atividade mineralocorticoide da DOC conduz ao desenvolvimento de hipertensão e hipocalemia, de modo semelhante ao que se observa no hiperaldosteronismo (Fig. 24.13).

A deficiência de 11-OH é um distúrbio autossômico recessivo causado por mutações nos genes CYP11B1 e CYP11B2, localizados no cromossomo 8q21-q22 (White, 1994b). Em neonatos, o diagnóstico é estabelecido pela presença de níveis elevados de 11-desoxicortisol, tanto basais como estimulados por ACTH. Esses bebês também apresentarão concentrações elevadas de tetra-hidro-11-desoxicortisol (THS) na urina. Durante a infância e na fase de adulto-jovem, o diagnóstico da deficiência de 11-OH é dado pela presença de níveis séricos elevados de 11-desoxicortisol no início da manhã e também estimulados por ACTH, que atinjam valores equivalentes a três vezes

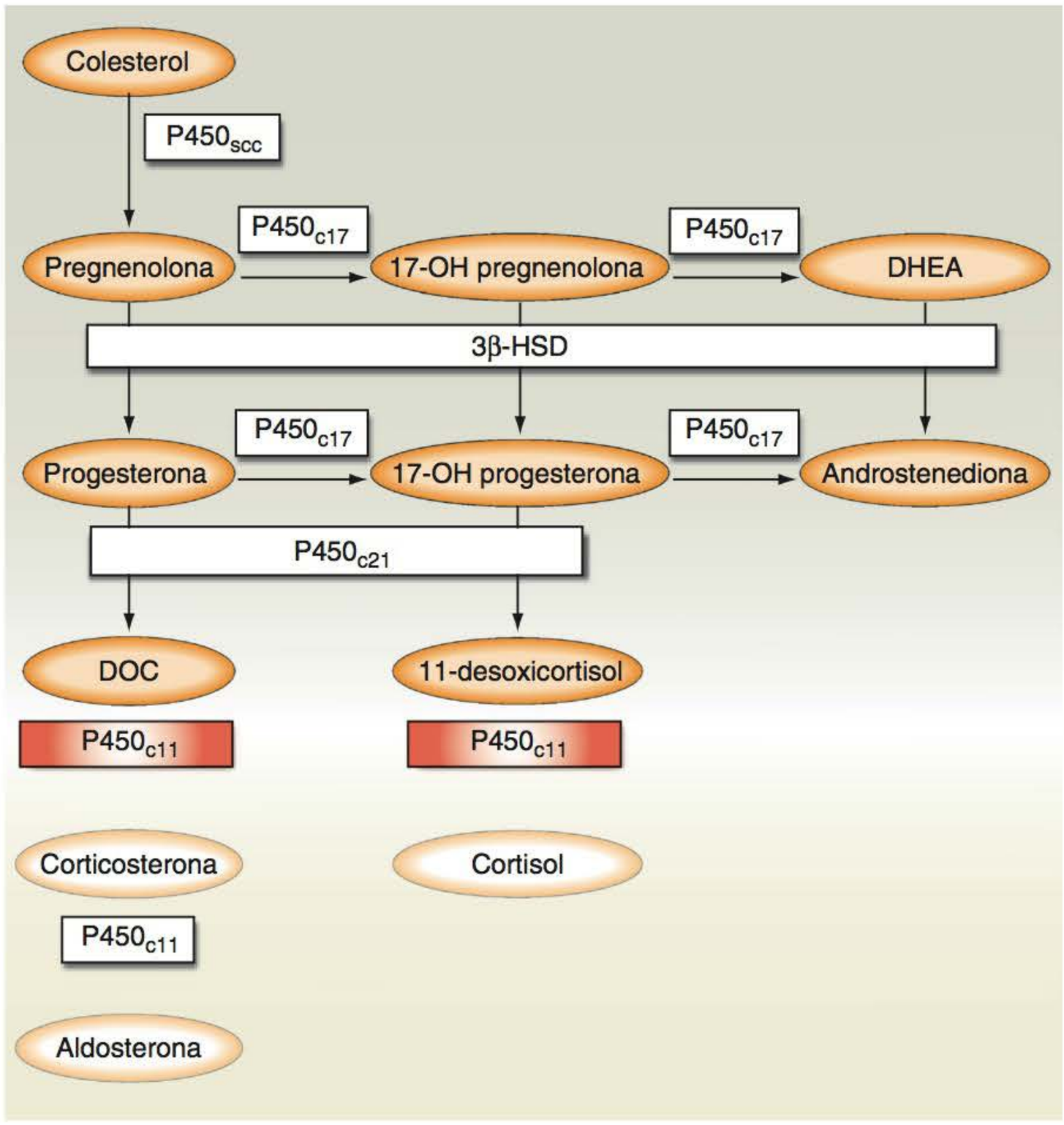


Figura 24.13 Esteroidogênese defeituosa decorrente da deficiência de 11β-hidroxilase. O aumento relativo da concentração de hormônios proximal ao bloqueio é representado em cor mais intensa. Quanto mais grave é o defeito enzimático, maior é a concentração de hormônios precursores. Os níveis elevados de 11-desoxicorticosterona (DOC) gerados pelo bloqueio produzem um estado de excesso de mineralocorticoides. DHEA = desidroepiandrosterona; DOC = desoxicorticosterona; $P450_{SCC}$ = enzima de clivagem da cadeia lateral dependente do citocromo P450.

o limite superior normal correspondente à faixa etária do paciente. Os níveis de DOC e andrógenos da suprarrenal (androstenediona, desidroepiandrosterona e sulfato de desidroepiandrosterona) também estão aumentados. A atividade da renina plasmática e a aldosterona muitas vezes encontram-se suprimidas em decorrência das elevações da DOC, que causam retenção de sais e água. Diferentemente dos indivíduos heterozigotos com deficiência de 21-OH, aqueles que são deficientes de 11-OH com frequência falham em mostrar aumento dos níveis de precursores após a estimulação com ACTH (Pang, 1980). Entretanto, uma resposta exuberante foi observada em indivíduos com hirsutismo (Gabrilove, 1965).

O diagnóstico pré-natal da deficiência de 11-OH é estabelecido com base na quantificação dos níveis de THS na urina materna ou no líquido amniótico. Os níveis dessa substância começam a cair no primeiro trimestre de gestação. Além do THS, também há aumento dos níveis de 11-desoxicortisol e da proporção THS/(tetra-hidrocortisol + tetra-hidrocortisona) (Rosler, 1988).

O tratamento consiste na reposição de glicocorticoides, com consequente normalização da DOC e da atividade da renina plasmática.

Deficiência de 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3β-HSD)

A 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3β-HSD), que catalisa a segunda etapa enzimática da esteroidogênese, é codificada por dois genes: HSD3BI e HSD3BII. O HSD3BII é expresso nas suprarrenais e gônadas, enquanto o HSD3BI é expresso na placenta, pele e outros tecidos periféricos, e usualmente permanece intacto na HSC. Um defeito afetando 3β-HSD leva ao bloqueio da conversão de Δ-5 esteroides (pregnenolona, 17-OH pregnenolona e di-hidroepiandrosterona) em Δ-4 esteroides (progesterona, 17-OHP, androstenediona), resultando no aumento dos níveis circulantes de Δ-5 esteoroides (Fig. 24.14). Entretanto, como HSD3BI usualmente se mantém intacto, os níveis de Δ-4 esteroides podem estar normais ou mesmo aumentados.

Pacientes com a forma clássica da doença apresentam manifestações de deficiência de glicocorticoides, com ou sem perda de sais. Homens afetados exibem masculinização incompleta, enquanto as mulheres afetadas podem ser tanto normais como ter genitália ambígua. Foi descrita uma variante de início tardio que está associada a características típicas de PCOS, tais como hirsutismo, oligomenorreia e infertilidade (Pang, 1985).

Os critérios anteriores para o diagnóstico da deficiência de 3β-HSD examinavam as proporções entre Δ-4 basal e Δ-4 estimulado por ACTH *versus* Δ-5 esteroides, 17-OH-pregnenolona (17-OHP) versus cortisol, bem como os níveis de pregnenolona, 17-OH-pregnenolona e desidroepiandrosterona na urina e no sangue. O padrão para o diagnóstico desse distúrbio foi revisto recentemente, a fim de que fosse alcançada uma correlação mais próxima com os estudos genotípicos. Os níveis de Δ-5-17P estimulados pelo ACTH e a proporção Δ-5-17P/cortisol mostraram-se os melhores índices de diagnóstico definitivo da deficiência de 3β-HSD (Lutfallah, 2002). A aplicabilidade desses novos critérios aos pacientes com a variante não clássica da doença ainda é objeto de discussão.

O tratamento consiste na administração de glicocorticoides e mineralocorticoides, bem como de esteroides sexuais, em conformidade com um crescimento e desenvolvimento normais.

Deficiência de 17-hidroxilase

A 17-hidroxilase (CYP17, $P450_{c17}$) é expressa tanto nas suprarrenais como nas gônadas e codifica duas enzimas: 17α-hidroxilase e 17,20-liase. A 17α-hidroxilase catalisa a conversão da pregnenolona e da progesterona em seus respectivos derivados 17-OH. A 17,20-liase converte a 17-OH pregnenolona em DHEA, e a 17-OH progesterona em androstenediona. A deficiência de CYP17 bloqueia a conversão da pregnenolona e da progesterona em derivados 17-OH, provocando um desvio da síntese de testosterona e cortisol na direção da aldosterona (Fig. 24.15). Sendo assim, esses pacientes desenvolvem hipertensão e alcalose hipocalêmica em associação a uma masculinização incompleta (no homem)

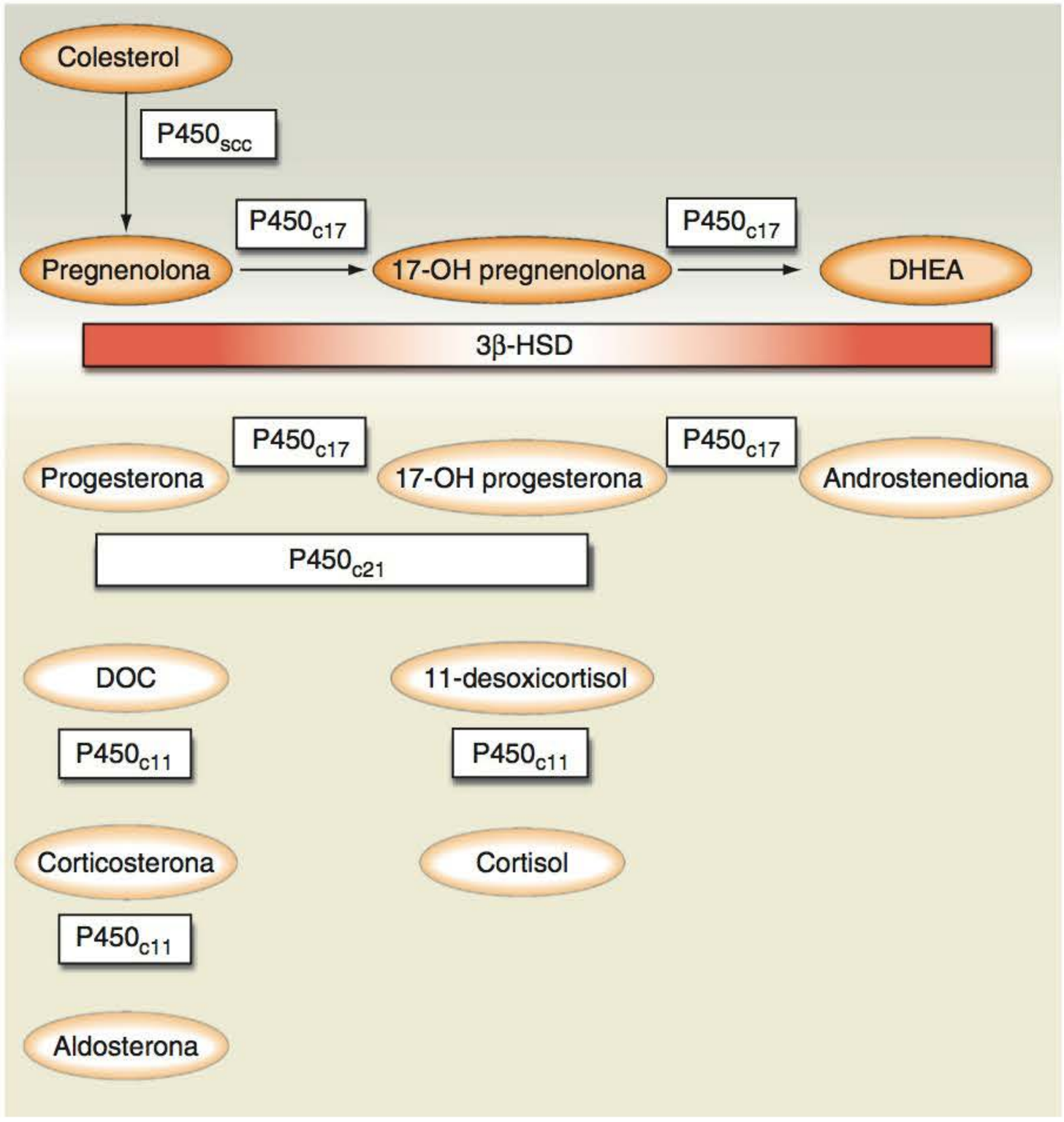


Figura 24.14 Esteroidogênese defeituosa decorrente da deficiência de 3β-hidroxiesteroide desidrogenase. O aumento relativo da concentração de hormônios proximal ao bloqueio é representado em cor mais intensa. Quanto mais grave é o defeito enzimático, maior é a concentração de hormônios precursores. Os níveis de 17α-hidroxiprogesterona podem estar aumentados em razão da conversão periférica da 17α-hidroxipregnenolona. DHEA = desidroepiandrosterona; DOC = 11-desoxicorticosterona; $P450_{SCC}$ = enzima de clivagem da cadeia lateral dependente do citocromo P450.

e à diminuição dos níveis de testosterona e cortisol. A deficiência de 17-OH é diagnosticada por meio da demonstração de níveis altos de DOC, pregnenolona e progesterona, acompanhados da diminuição da concentração urinária de 17-cetoesteroides e 17-hidroxicorticosteroides. O gene associado a essa condição (CYP17) foi localizado no cromossomo 10q e é o mesmo gene da 17,20-desmolase (Kater, 1994).

Hiperplasia suprarrenal congênita lipoide

A hiperplasia suprarrenal congênita lipoide (HSC lipoide) é a forma mais severa da HSC, em que há comprometimento marcante da síntese de todos os esteroides gonadais e suprarrenais. A HSC lipoide pode ser causada por um defeito afetando a StAR ou a $P450_{SCC}$ (Fujieda, 2003). A StAR, cujo gene localiza-se no cromossomo 8p11, controla a etapa limitante do processo na esteroidogênese, sendo responsável pelo desvio do colesterol a partir da membrana mitocondrial externa para a interna. A 20,22-desmolase (CYP11A1, $P450_{SCC}$ [scc = *side chain cleavage* ou clivagem da cadeia lateral]) converte o colesterol em pregnenolona (Fig. 24.16). Em termos patológicos, o córtex suprarrenal exibe um grande acúmulo de colesterol e outros lipídeos. Essa característica primária possibilita a distinção em relação à hipoplasia suprarrenal congênita.

A manifestação desse distúrbio extremamente raro é a mesma da insuficiência suprarrenal severa, com hipotensão, perda de sais e feminilização da genitália externa nos homens. Ocasionalmente, as mulheres podem não apresentar o distúrbio antes do início da puberdade. O diagnóstico é estabelecido pela detecção de concentrações extremamente baixas de cortisol e aldosterona, elevação do ACTH e atividade da renina plasmática.

Deficiência da aldosterona sintetase (CYP11B2)

A aldosterona sintetase (CYP11B2) atua na etapa final da via de síntese de esteroides, conduzindo à produção de aldosterona. Estimula um processo de etapas múltiplas: a 11-hidroxilação da DOC em corticosterona, a 18-hidroxilação da corticosterona em 18-hidroxicorticosterona e, por fim, a 18-desidrogenação à aldosterona. A deficiência isolada da enzima leva à perda de sais, hipercalemia e acidose metabólica. Essa condição pode ser diagnosticada pela demonstração da presença da metabólitos da corticosterona e 11-desoxicorticosterona na urina, elevação dos níveis séricos de DOC e deficiência de corticosterona, 18-hidroxicorticosterona ou aldosterona no soro.

Cortisol e glicocorticoides

O córtex suprarrenal secreta cortisol em resposta ao ACTH, ritmo diurno e estresse. O ACTH, sintetizado na adeno-hipófise, é formado a partir da clivagem de uma molécula precursora bem maior: a pró-opiomelanocortina (POMC). Além da produção de ACTH, a clivagem da POMC resulta na liberação de β-lipotropina (β-LPH) que, por sua vez, é clivada para render γ-LPH e β-endorfina. Na sequência do ACTH, estão a α-MSH e a proteína do lobo intermediário corticotropina-símile (CLIP, *corticotropin-like intermediate lobe protein*). As endorfinas, que atuam nos neurônios cerebrais, compreendem um sistema peptidérgico distinto associado à percepção da dor. Embora a β-endorfina seja secretada em paralelo ao ACTH, a importância desse fenômeno permanece desconhecida.

O ACTH é constituído por 39 resíduos de aminoácidos, sendo que os resíduos 1 a 24 situados na região aminoterminal possuem toda a atividade hormonal. Ocasionalmente, a POMC é processada de modo incompleto e, em consequência, há formação de outras formas de ACTH que costumam exibir baixa atividade biológica, ainda que possam reter a imunorreatividade. Essas formas podem ser predominantes em condições malignas, tais como produção ectópica a partir de câncer de pulmão primário ou metastático, e em alguns pacientes com síndrome de Nelson, um distúrbio caracterizado pela ocorrência de tumor hipofisário e hiperpigmentação cutânea subsequente à suprarrenalectomia bilateral. Defeitos que afetem as enzimas de clivagem da POMC também podem ser responsáveis pela manifestação de formas raras de deficiência de ACTH isoladas (Nussey, 1993).

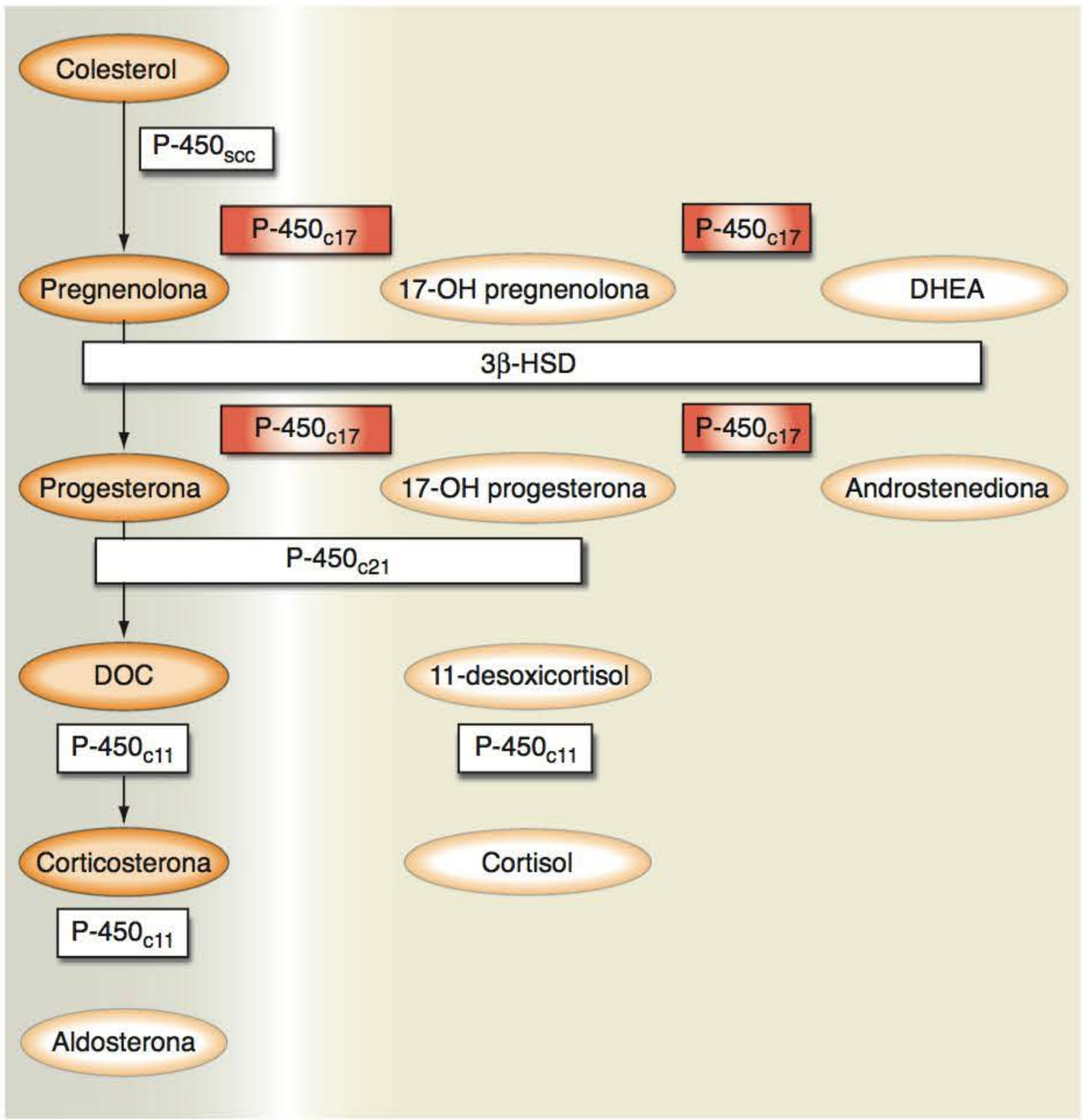


Figura 24.15 Esteroidogênese defeituosa decorrente da deficiência de 17β-hidroxilase. O aumento relativo da concentração de hormônios proximal ao bloqueio é representado em cor mais intensa. Quanto mais grave é o defeito enzimático, maior é a concentração de hormônios precursores. Os níveis elevados de 11-desoxicorticosterona (DOC) e de corticosterona gerados pelo bloqueio produzem um estado de excesso de mineralocorticoides. DHEA = desidroepiandrosterona; $P450_{SCC}$ = enzima de clivagem da cadeia lateral dependente do citocromo P450.

O ACTH é secretado em resposta a vários fatores, dos quais o CRH e a AVP são os mais importantes. Entre outros grupos descritos como estimuladores da secreção de ACTH, estão o fator natriurético atrial (ANF, *atrial natriuretic factor*), angiotensina II, IL-6, IL-1 e TNF-α (Rivier, 1983; Chrousos, 1998).

O CRH, além de exibir um padrão circadiano de liberação, também é secretado em resposta a estímulos fisiológicos, tais como estresse e hipoglicemia. Formas sintéticas de CRH são utilizadas para testar as reservas de ACTH da adeno-hipófise por meio da comparação dos níveis de ACTH ou cortisol antes e uma hora depois da estimulação por CRH (Grodum, 1993). Esse teste é útil para distinguir lesões afetando o hipotálamo, hipófise e glândulas suprarrenais (Fukata, 1993). Quando uma lesão ocorre no hipotálamo, após certo atraso, os níveis de ACTH aumentam em seguida à administração de CRH. Se a lesão ocorre ao nível da hipófise, não há nenhuma resposta significativa de ACTH. Diante de uma insuficiência suprarrenal primária, a administração de CRH provoca um novo aumento dos níveis já elevados de ACTH, contudo, os níveis de cortisol sofrem uma pequena elevação ou não são afetados.

O eixo HPA é constituído por várias alças de retroalimentação que controlam a síntese e secreção do cortisol. Quando os níveis plasmáticos de cortisol aumentam, há supressão da liberação de ACTH, CRH e AVP que, por sua vez, leva à diminuição dos níveis de cortisol. Ao contrário, quando os níveis séricos de cortisol atingem o nadir, a hipófise responde aumentando a produção do ACTH, com consequente estimulação da formação de cortisol. Por meio desse mecanismo, o ACTH e o cortisol controlam a concentração um do outro, mantendo-as junto a um limite bem estreito, de tal modo que uma pequena alteração na concentração de um resulta na alteração concomitante da concentração do outro. Quando a suprarrenal é incapaz de responder ao ACTH em razão de um dano ou doença, os níveis de cortisol abaixam e os de ACTH aumentam. Nas condições em que há destruição da hipófise, o ACTH deixa de ser formado e os níveis de cortisol, em consequência, diminuem. O dano ao hipotálamo também está associado a níveis baixos de ACTH e cortisol. O teste com CRH permite distinguir essas duas condições. Se o eixo HPA for interrompido pela administração de altas doses de glicocorticoides exógenos, estes exercerão um efeito inibitório sobre o hipotálamo e a hipófise, suprimindo a secreção de CRH e ACTH. Se essa supressão se estender por um período de semanas, a hipófise pode se tornar persistentemente suprimida e acarretar a atrofia das suprarrenais. Como resultado, o eixo HPA se torna incapaz de secretar cortisol diante de situações de estresse.

A segunda influência atuante sobre os níveis de cortisol é o padrão diurno, que se deve ao padrão circadiano de secreção do ACTH. Entre as 4 h e as 8 h, observam-se aumentos significativos da secreção, seguidos da queda dos níveis de ACTH pelo resto do dia. Em indivíduos com ciclo de dormir-despertar normal, as menores concentrações de ACTH ocorrem logo após a meia-noite. Mudanças repentinas nos padrões de dormir-despertar produzem pouco efeito sobre o padrão diurno, no entanto mudanças permanentes nos hábitos de sono diários resultam em modificação gradual dos padrões secretórios diurnos. Sobreposto à periodicidade circadiana, há um ritmo ultradiano de 10 a 18 explosões secretórias/24 horas (Horrocks, 1990).

A terceira influência mais importante sobre a secreção de cortisol é o estresse. Estímulos como trauma cirúrgico, pirógenos, hipoglicemia e hemorragia podem acarretar um aumento agudo da secreção de ACTH e cortisol. Essa resposta ao estresse pode estar ausente ou exibir menor magnitude em pacientes que receberam altas doses de esteroides durante certo tempo. A iniciação da resposta a qualquer estresse depende da integridade do sistema nervoso. Exemplificando, traumas normalmente resultam em liberação aguda de ACTH e cortisol. Entretanto, em pacientes com transecção da medula espinal – que interrompe a transmissão normal dos estímulos neurológicos –, a aplicação do mesmo

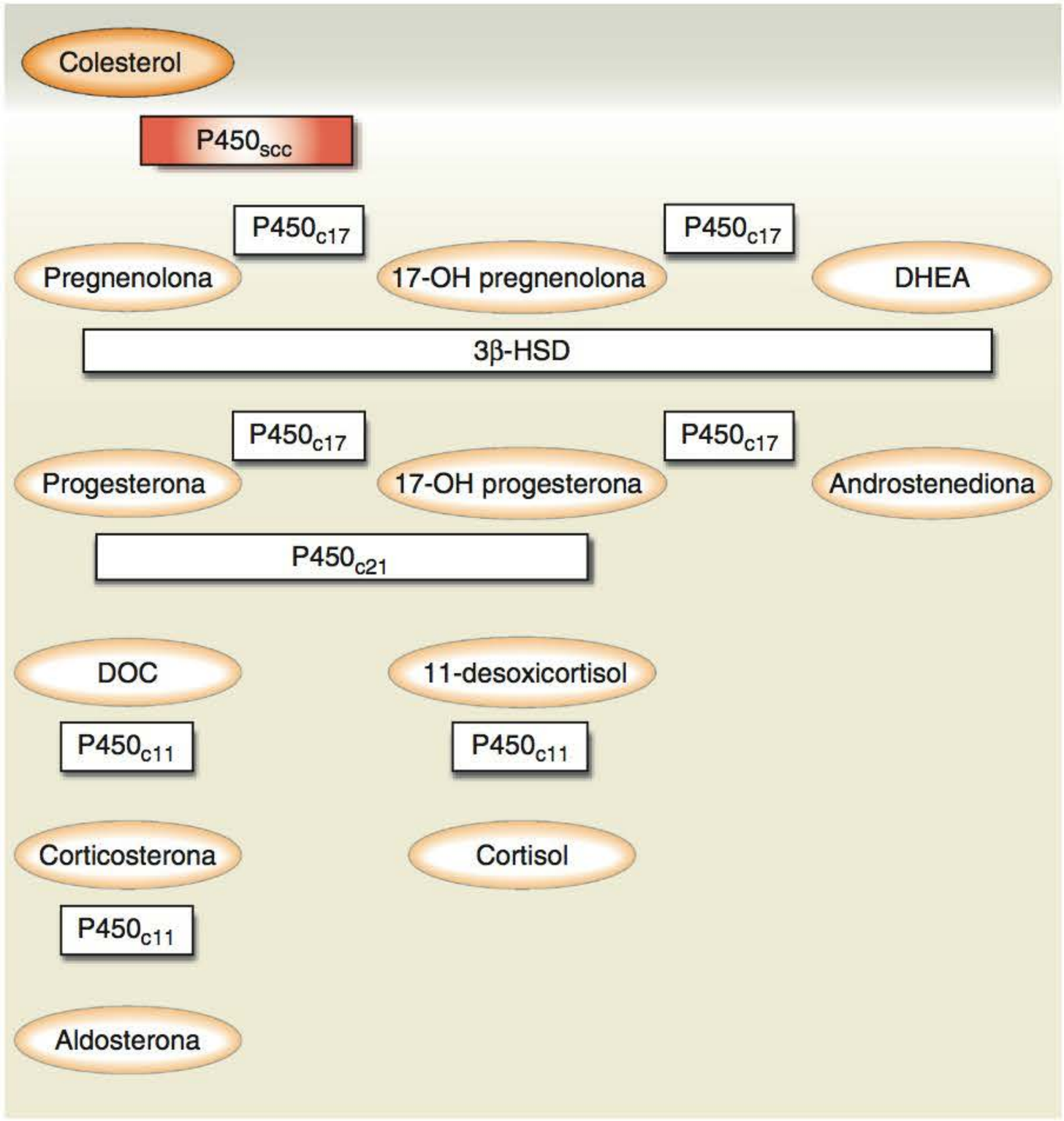


Figura 24.16 Esteroidogênese defeituosa na hiperplasia suprarrenal lipoide congênita decorrente de defeito envolvendo tanto a proteína esteroidogênica regulatória aguda (StAR) como a enzima de clivagem da cadeia lateral dependente do citocromo P450 ($P450_{SCC}$). O aumento relativo da concentração de hormônios proximal ao bloqueio é representado em cor mais intensa. Nesse distúrbio, a síntese de todas as classes de esteroides é defeituosa. DHEA = desidroepiandrosterona; DOC = 11-desoxicorticosterona.

trauma em um membro não desencadeará nenhuma resposta de ACTH ou cortisol. Evidências indicam que a resposta de cortisol ao estresse é mediada pela chegada de estímulos excitatórios e inibitórios que se integram ao nível do hipotálamo e modulam a secreção de CRH. Os níveis de cortisol também aumentam após as refeições, em especial as ricas em proteínas, e nos estados de depressão (Linkowski, 1987).

A maioria dos distúrbios pode ser classificada de acordo com os padrões de resposta de três hormônios à supressão e à estimulação: ACTH, cortisol plasmático e cortisol livre urinário (Snow, 1992).

Quantificação laboratorial do ACTH

O ACTH plasmático é quantificado tanto por RIA de dois sítios como por ensaio de imunoquimioluminescência (ICMA). Para prevenir a degradação do hormônio, a amostra deve ser coletada em tubo pré-resfriado contendo EDTA (com tampa cor de lavanda). A amostra deve ser mantida em banho de gelo e processada o quanto antes. Após o processamento em centrífuga refrigerada, a amostra deve ser separada, transferida para um tubo de plástico e mantida sob congelamento a – 20 °C até o momento da análise. A faixa de referência normal é de 2 a 12 pmol/L (9–52 pg/mL) das 7 h às 10 h. O ACTH plasmático é uma ferramenta útil para distinguir a forma primária (suprarrenal) de insuficiência suprarrenal da forma secundária (hipófise) ou da terciária (hipotálamo). Na insuficiência suprarrenal primária, são detectados níveis baixos de cortisol e níveis aumentados de ACTH. Nas insuficiências suprarrenais secundária ou terciária, espera-se que os níveis de ambos, ACTH e cortisol, estejam baixos. Os níveis de ACTH discriminam melhor entre indivíduos sadios e aqueles com insuficiência suprarrenal quando as amostras para sua determinação são coletadas pela manhã, entre 8 e 10 h.

O ACTH tem menor utilidade nos casos de doenças por excesso de cortisol. Até 50% dos pacientes podem apresentar níveis normais de ACTH na doença de Cushing. Embora os valores tendam a ser maiores (> 20 pmol/L [> 90 pg/mL]) em indivíduos com síndrome de Cushing, graças à produção ectópica do ACTH, há uma sobreposição com os valores observados na doença em cerca de 30% dos casos (Findling, 1992). Por causa da variação diurna normal da secreção de ACTH e cortisol, a quantificação desses valores durante seu esperado nadir (das 23 h à 1 h) ajuda a confirmar o diagnóstico de Cushing dependente de ACTH. Esse diagnóstico também é confirmado por uma concentração de ACTH que, à meia-noite, seja maior do que 5 pmol/L (23 pg/mL) em face de uma elevada concentração sérica de cortisol. Pacientes com tumores secretores de ACTH ectópico apresentam como característica uma elevação marcante dos níveis plasmáticos de ACTH (usualmente, > 200 pg/mL) e níveis séricos de cortisol elevados. A quantificação do ACTH por extração a partir do plasma – que detecta precursores e fragmentos de ACTH – pode ser útil para distinguir pacientes com síndromes relacionadas ao câncer ou tumores secretores de ACTH daqueles com doença de Cushing, uma vez que os primeiros mais provavelmente produzem tais formas distintas de ACTH (White, 1993). A possível existência de neoplasmas secretores ocultos cria mais dificuldades para estabelecer o diagnóstico. Diante dessa situação, observou-se que a quantificação dos níveis de ACTH em amostras venosas seletivas é útil à localização da lesão.

Em pacientes que apresentam níveis aumentados de glicocorticoides circulantes em decorrência de adenomas ou carcinomas suprarrenais, a secreção de ACTH está inibida. Portanto, nesses indivíduos, os níveis de ACTH circulante são baixos ou indetectáveis. Nos pacientes com hiperplasia suprarrenal induzida pela hipófise, a concentração de ACTH plasmático pode estar junto ou acima da faixa de referência superior às 9 h da manhã. No entanto, não se observa a esperada queda de seus valores após a meia-noite. Outro uso dos ensaios para ACTH consiste na determinação do grau de adequação da reposição de cortisol em casos de hiperplasia suprarrenal congênita. Quando a terapia de reposição é ótima, os valores de ACTH se assemelham àqueles observados na população de referência.

Hormônio liberador de corticotropina plasmático (CRH)

As quantificações do CRH são realizadas por cromatografia líquida e espectrofotometria de massa em tandem, e continuam sendo largamente uma ferramenta de pesquisa.

O CRH circula sob uma ou duas formas, tanto livre como ligado à proteína ligadora de CRH. A concentração dessa proteína de ligação aumenta durante a gravidez. Os níveis de CRH estão aumentados em pacientes com síndrome de Cushing por causa da à produção ectópica do hormônio. A faixa de referência para a concentração plasmática de CRH em homens e mulheres que não estejam grávidas é < 34 pg/mL. A faixa normativa varia ao longo de toda a gestação: no primeiro trimestre, é < 40 pg/mL; no segundo trimestre, é < 153 pg/mL; e no terceiro trimestre, < 847 pg/mL (Goland, 1986).

Quantificações de cortisol sérico

Cerca de 90% do cortisol circulante está ligado a proteínas séricas. Desse grupo, entre 10 e 20% se liga fracamente à albumina e o restante está ligado à proteína transcortina (globulina ligadora de cortisol [CBG, *cortisol-binding globulin*]). Os 10% restantes do cortisol circulante permanece como hormônio livre, não ligado. Acredita-se que somente o cortisol livre seja ativo e que a fração ligada a proteínas seja inerte em termos metabólicos, servindo provavelmente de reservatório de cortisol livre. A ligação a proteínas também pode proteger o cortisol da desativação hepática ou da filtração renal.

Um dos métodos mais antigos e simples utilizados para determinar os níveis séricos de cortisol era o ensaio fluorimétrico desenvolvido por Nelson e Samuels, baseado em uma técnica desenvolvida pela primeira vez por Porter e Silber (Nelson, 1952; Porter, 1950). O imunoensaio é um método mais específico para estimar o cortisol. Entre as vantagens desse método estão o pequeno volume de amostra e o rápido tempo de retorno. Alguns dos anticorpos utilizados apresentam elevado grau de reatividade cruzada com outros esteroides, tais como 11-desoxicortisol, desoxicorticosterona e esteroides sintéticos, como a dexametasona. Embora a reatividade cruzada não atrapalhe o teste basal, pode levar à obtenção de falsos resultados elevados nas manobras estimulatórias e supressivas, como na supressão por metirapona ou dexametasona. Com a deterioração da função renal, vários esteroides e seus glicuronídeos se acumulam no sangue. Em virtude da estrutura que possuem, os conjugados podem apresentar reação cruzada com alguns anticorpos para cortisol e produzir uma interferência cuja magnitude pode ser a mesma exercida pela concentração de cortisol real. Na HSC, concentrações elevadas de precursores de cortisol são encontradas no soro, em razão da ocorrência de um defeito enzimático. Como esses precursores enzimáticos exibem reação cruzada com os anticorpos do ensaio, podem ser detectadas elevações espúrias do níveis de cortisol. O grau de interferência varia de acordo com o ensaio e não pode ser facilmente previsto. Métodos de imunoensaio não isotópicos empregando traçadores organometálicos, fluorescência polarizada e técnicas de imunoensaio enzimático também foram desenvolvidos para as determinações de cortisol (Bacaresse-Hamilton, 1992; Lentjes, 1993; Philomin, 1994). A maior desvantagem dos ensaios de cortisol continua sendo a falta de especificidade.

A quantificação do cortisol por RIA e técnicas imunométricas de quimioluminescência foi amplamente suplantada pelo HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem, que parece oferecer o devido grau de especificidade. A maioria dos sistemas de HPLC para quantificação do cortisol empregam a cromatografia líquida de fase reversa com detecção na faixa da luz ultravioleta (Volin, 1992). Esse método é altamente sensível e também isento de muitas fontes de interferência encontradas nos imunoensaios (Samaan, 1993).

O cortisol sérico é coletado em um tubo sem aditivos (tampa vermelha). Os valores de referência para o cortisol sérico em indivíduos de ambos os gêneros variam, a grosso modo, entre 5 e 25 μg/dL (140 a 690 nmol/L) das 8 h às 10 h, caindo para cerca de 3 a 12 μg/dL (80 a 330 nmol/L) às 16 h. Por causa da ampla oscilação dos níveis basais de cortisol em decorrência de seu padrão de secreção diurno e ultradiano, os ensaios para cortisol são mais úteis quando avaliados no contexto da manipulação dinâmica (i. e., estimulação ou supressão suprarrenal).

Cortisol salivar

Até 30% dos testes de triagem de cortisol livre urinário (UFC, *urinary free cortisol*) e de supressão por dexametasona (TSD) podem gerar resultados incorretos. Estudos recentes mostraram que o uso do cortisol salivar da meia-noite (MSC, *midnight salivary cortisol*) constitui uma alternativa viável.

Um estudo comparou a sensibilidade da detecção da síndrome de Cushing por quantificação dos níveis de cortisol salivar noturno e por determinação simultânea dos níveis de cortisol sérico e excreção urinária de glicocorticoides em paciente interno. Constatou-se que as quantificações de cortisol salivar funcionaram tão bem quanto as quantificações plasmáticas, e apresentaram melhor desempenho do que a determinação da excreção urinária de glicocorticoides. Os autores do estudo concluíram que a quantificação do cortisol salivar no momento de deitar era uma forma prática e acurada de teste de triagem para o diagnóstico da síndrome de Cushing (Papanicolaou, 2002). Outro estudo comparou a quantificação do MSC, a quantificação dos níveis séricos de cortisol da meia-noite (MNC, *midnight serum cortisol*) e a determinação do UFC quanto ao desempenho diagnóstico, na diferenciação entre 41 pacientes com síndrome de Cushing, 33 pacientes com estado pseudo-Cushing, 199 pacientes com obesidade simples e 27 voluntários sadios com peso corporal normal. Na população total estudada, os testes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em termos de sensibilidade, especificidade, acurácia diagnóstica e valores preditivos. Em particular, a acurácia diagnóstica geral para o MSC foi similar àquelas associadas ao UFC e ao MNC (Putignano, 2003).

Quantificações de cortisol livre urinário (UFC)

Apenas cerca de 1% da secreção suprarrenal total aparece na urina como cortisol, porém, é essa fração que fornece valioso auxílio no diagnóstico da doença suprarrenal. Nos rins, a filtração glomerular do cortisol livre é acompanhada da reabsorção tubular passiva sem que haja uma reabsorção máxima demonstrável. A urina coletada em 24 h constitui a melhor amostra a ser submetida para análise, pois fornece um padrão integrado da secreção de cortisol total. A urina também deve ser avaliada quanto ao conteúdo de creatinina para garantir o envio de uma amostra adequada. A confiabilidade do teste pode ser melhorada por meio da submissão da urina coletada em 2 a 3 dias, pois sabe-se que a excreção de cortisol flutua dia a dia.

A níveis séricos de cortisol da ordem de 20 a 25 μg/dL (o valor de referência superior às 8 h da manhã), a capacidade de ligação da transcortina é excedida. Em consequência, há um aumento muito rápido e desproporcional da fração não ligada em comparação ao cortisol sérico total. Por exemplo, um aumento equivalente ao dobro dos níveis de cortisol (de 20 para 40 μg/dL) resulta em um aumento mínimo de 5 vezes dos níveis séricos de cortisol não ligado. Diante desses valores, a depuração de cortisol livre pelos rins é diretamente proporcional à concentração sérica de cortisol não ligado e conduz a uma elevação abrupta da depuração do cortisol. Assim, quando se utiliza a excreção urinária do cortisol livre, em vez do cortisol sérico, torna-se mais fácil discriminar pacientes com hiperfunção suprarrenal da população de referência.

Os níveis urinários de cortisol livre permanecem inalterados pelas modificações que ocorrem no metabolismo hepático do cortisol. Embora a produção de cortisol total e de 17-hidroxicorticosteroides (17-OHCS) urinários possa estar aumentada, os níveis séricos de cortisol e os níveis urinários de cortisol livre se mantêm junto ao intervalo de referência. Como a depuração renal do cortisol depende da função renal normal, não surpreende que os pacientes com doença renal possam apresentar valores urinários baixos. O UFC não é confiável quando a depuração de creatinina (CrC) é < 20 mL/min, sendo pouco confiável quando CrC < 60 mL/min (Chan, 2004). O aumento da concentração de transcortina durante a gravidez e na terapia com estrógenos resulta em aumento dos níveis séricos de cortisol. Esse aumento não é refletido por uma elevação da concentração de metabólitos do cortisol na urina, porém o cortisol livre urinário pode estar aumentado. As condições em que níveis ilusoriamente aumentados são observados incluem jejum, uso de esteroides tópicos e, talvez, hidratação sob a forma de carga hídrica.

Método. O HPLC acoplado à espectrometria de massa é atualmente considerado o método de referência para quantificação do UFC. Apresenta uma sensibilidade diagnóstica de 100% e uma especificidade de 98% para distinguir pacientes com síndrome de Cushing de indivíduos normais (Rudd, 1985). Os ensaios antigos (como RIA)

eram menos específicos e tendiam a superestimar a quantidade de cortisol presente na amostra. Na determinação do UFC por RIA, constatou-se que os intervalos de referência variavam de acordo com o sexo do paciente (homens apresentam valores de intervalo de referência maiores do que os das mulheres), a aplicação do procedimento de extração e o kit de teste de RIA utilizado (Lamb, 1994).

A faixa normal varia de acordo com a técnica de ensaio utilizada. Entretanto, valores equivalentes a quatro vezes o limite de referência superior são diagnósticos da síndrome de Cushing. Um baixo valor de UFC é sugestivo de hipofunção da suprarrenal. Por outro lado, como há uma considerável sobreposição com o intervalo de referência normal, esse teste não é empregado para estabelecer o diagnóstico de insuficiência suprarrenal.

Hipercortisolismo: síndrome de Cushing

A síndrome de Cushing constitui um grupo de distúrbios clínicos e metabólicos caracterizado por hiperfunção adrenocortical. Está associada à produção excessiva de glicocorticoides, ou de glicocorticoides e andrógenos. Pacientes com formas severas da síndrome são facilmente reconhecíveis quando o distúrbio é dito florido. Nos indivíduos menos afetados, pode ser mais difícil reconhecer os sinais e sintomas vagos observados como sendo causados por hipercortisolismo. Embora muitos pacientes com tumores ectópicos produtores de ACTH apresentem níveis elevados de ACTH e glicocorticoides, em razão do rápido crescimento tumoral, a morte pode ocorrer antes do aparecimento dos sinais clínicos da síndrome.

Na síndrome de Cushing, os achados laboratoriais são: (1) produção excessiva e persistente de cortisol, quantificada como níveis elevados de cortisol sérico, UFC ou 17-OHCS; (2) perda do ritmo circadiano do ACTH e do cortisol; (3) perda da supressão da produção de cortisol por ação da administração do glicocorticoide sintético dexametasona, e (4) hiperglicemia. Entre os achados clínicos sugestivos da síndrome de Cushing, os mais comuns são a obesidade central, hipertensão e hirsutismo.

A doença de Cushing é um estado de excesso de glicocorticoide resultante da existência de um adenoma hipofisário secretor de ACTH. A síndrome de Cushing é um termo mais global, que abrange uma ampla variedade de entidades associadas à hipercortisolemia. A avaliação de um paciente suspeito de ter a síndrome é dividida em duas fases. A primeira fase consiste na real documentação do hipercortisolismo, enquanto a segunda fase consiste na identificação do processo patofisiológico por trás do hipercortisolismo. A síndrome de Cushing é mais comumente de origem iatrogênica, contudo, também pode ser em razão da produção ectópica de CRH ou ACTH por um tumor, ou decorrente de uma malignidade suprarrenal primária. A síndrome de Cushing suprarrenal é um distúrbio que envolve a produção autônoma excessiva de cortisol pelas suprarrenais, com consequente supressão do eixo hipotálamo-hipófise. O Cushing suprarrenal (adenoma ou carcinoma) corresponde a menos de 20% dos casos, enquanto o Cushing hipofisário corresponde a cerca de 68% e a produção ectópica de ACTH fora do eixo hipófise-suprarrenal constitui a causa de aproximadamente 12% dos casos (Orth, 1995). Como o tratamento e o prognóstico diferem dependendo da causa, é importante estabelecer um diagnóstico específico.

Testes utilizados no diagnóstico da síndrome de Cushing (Fig. 24.17)

Testes de triagem. Existem três testes de triagem utilizados para avaliar pacientes suspeitos de apresentarem síndrome de Cushing: UFC de 24 h, TSD de um dia a outro e determinação dos níveis de cortisol à meia-noite, tanto no plasma como na saliva. Cada um tem seus próprios méritos e desvantagens.

O teste de UFC de 24 h reflete o cortisol não ligado circulante, que é livremente filtrado pelo glomérulo. Diferente do cortisol sérico, não é afetado pelos níveis de CBG circulante. O HPLC ou a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa proporcionam a melhor especificidade possível para quantificação do UFC. A faixa de referência superior considerada normal para esses métodos é de 110 a 138 nmol/24 h (40 – 50 μg/h) (Raff, 2003). A creatinina deve ser medida em todas as amostras coletadas, a fim de garantir a adequação das mesmas. A excreção de cortisol urinário diminui quando a taxa de filtração glomerular é inferior a 30 mL/min e, assim, pode se manter normal mesmo diante de uma produção excessiva de cortisol (Arnaldi, 2003). Valores superiores ao equivalente a quatro vezes o limite superior normal são diagnósticos da síndrome de Cushing. Entretanto, de 10 a 15% dos pacientes com síndrome de Cushing apresentam retorno normal de pelo menos uma em cada quatro amostras de urina de 24 h coletadas para análise de cortisol livre (Nieman, 1990). Se a excreção de cortisol for normal, mas a suspeita clínica for alta, pode-se tanto repetir o estudo como utilizar um método de triagem diferente. Elevações mais brandas podem ser observadas em casos de pseudo-Cushing e na gravidez normal. O pseudo-Cushing é uma entidade caracterizada pela hiperatividade do eixo HPA, porém, não se observa uma síndrome de Cushing verdadeira. Foi descrito em casos de depressão, distúrbios da ansiedade, alcoolismo e obesidade mórbida.

O TSD de um dia a outro é de execução bem mais simples. O paciente toma 1 mg de dexametasona por via oral entre as 23 h e a meia-noite. O plasma contendo cortisol é coletado na manhã seguinte, entre 8 e 9 h. O critério original para uma resposta anormal era a falha em suprimir os níveis de cortisol matinais a valores < 5 μg/dL (138 nmol/L). Todavia, esses valores foram revistos e foram estabelecidos níveis ainda menores, com valores < 1,8 μg/dL (50 nmol/L) (Arnaldi, 2003; Findling, 1999). A falha da supressão pode ser causada pela síndrome de Cushing ou pelo pseudo-Cushing, podendo ocorre até mesmo em alguns pacientes normais. A taxa de resultados falso-positivos pode ser de até 30%, sendo atribuída a causas diversas: a medicação pode ter sido tomada antes do momento certo; o paciente faz uso de fenobarbital, dilantina ou outro fármaco que sabidamente provoque aceleração do metabolismo da dexametasona; má absorção; alcoolismo; ou obesidade mórbida. Gravidez e fármacos como o estrógeno, que elevam os níveis séricos de transcortina (a proteína ligadora de cortisol), também podem acarretar elevação dos níveis de cortisol. Por causa desses e de outros fatores, cerca de 1% dos indivíduos sadios, 13% dos pacientes obesos e 25% dos pacientes hospitalizados e cronicamente doentes apresentam resultados falso-positivos nos TSDs de um dia a outro. Os resultados falso-negativos, por outro lado, ocorrem em menos de 2% dos pacientes.

A determinação dos níveis de cortisol na saliva tarde da noite (11 h) é um teste simples, que apresenta alta sensibilidade e especificidade diagnósticas. O paciente pode coletar a amostra em casa. Há dois métodos de coleta de amostras: o paciente pode mascar um tubo de algodão durante 2 a 3 minutos e, em seguida, colocá-lo dentro de um tubo de plástico; de modo alternativo, o paciente pode expectorar diretamente dentro de um tubo de ensaio. A amostra é, então, enviada por correio ao laboratório de referência. Como o cortisol da saliva é bastante estável, há pouca preocupação no que diz respeito a uma possível degradação durante o transporte. A amostra é analisada por ensaio imunosorvente ligado a enzimas (ELISA) ou RIA, sendo que os valores normativos variam de acordo com o laboratório de referência.

Testes confirmatórios para o diagnóstico da síndrome de Cushing. Uma triagem positiva para síndrome de Cushing é seguida da realização de testes confirmatórios, seja para determinação dos níveis de cortisol plasmático à meia-noite, seja o TSD com baixas doses realizado isoladamente ou combinado à administração de CRH.

A avaliação do cortisol plasmático da meia-noite requer a internação hospitalar do paciente por no mínimo 48 h, inserção de uma linha de acesso i.v. antes das 10h da noite, o paciente deve dormir durante a coleta de sangue e deve haver uma equipe de funcionários disponível para coletar a amostra à meia-noite. Níveis de cortisol plasmático de meia-noite > 7,5 μg/dL (207 nmol/L) são diagnósticos de Cushing. Esse resultado apresenta uma especificidade de 100% para casos normais e para indivíduos com pseudo-Cushing (Papanicolaou, 1998). Mais recentemente, várias autoridades sugeriram adotar o valor de 1,8 μg/dL (50 nmol/L) como cutoff para a normalidade. Esse valor apresenta um alto grau de sensibilidade (Newell-Price, 1995).

A baixa dose de dexametasona (2 dias, 2 mg) do TSD requer a coleta de duas amostras de urina de 24 h basais para determinação do UFC. O paciente então recebe 0,5 mg de dexametasona por via oral, a cada 6 h, durante os próximos 2 dias. No segundo dia de administração de dexametasona, coleta-se mais uma amostra de urina de 24 h para determinação do UFC. A resposta normal consiste em uma diminuição do UFC a valores abaixo de 10 μg/24 h (27 nmol/24 h) no segun-

do dia de administração da dexametasona. Esse teste apresenta uma sensibilidade de 97 a 100% para discriminação entre indivíduos com síndrome de Cushing e indivíduos normais (Newell-Price, 1998). Em vez de quantificar o UFC, pode-se medir os níveis séricos de cortisol às 9 h da manhã e 48 h após a administração da primeira dose de dexametasona. Nesse caso, a resposta normal consiste na supressão dos níveis plasmáticos de cortisol a valores abaixo de 1,8 μg/dL (50 nmol/L), sendo que o teste possui uma sensibilidade e especificidade maiores que 95% (Newell-Price, 1998). O desempenho do TSD com CRH foi supostamente melhor em termos de distinção entre síndrome de Cushing e pseudo-Cushing (Yanovski, 1993).

Testes para definição da causa do Cushing. Uma vez estabelecido o diagnóstico da síndrome de Cushing, a próxima etapa consiste em determinar sua causa. Essa síndrome é classificada como sendo dependente ou independente do ACTH. Para tanto, pode-se medir os níveis plasmáticos de ACTH, realizar um TSD com doses elevadas ou aplicar um teste de estimulação com CRH (Tab. 24.22).

A síndrome de Cushing independente de ACTH resulta da produção autônoma de cortisol que, por sua vez, exerce retroalimentação ao nível do hipotálamo e da hipófise, e provoca supressão da secreção de ACTH e de CRH. A técnica para quantificar o ACTH plasmático foi descrita anteriormente. Valores abaixo do nível de detecção ou abaixo de 10 pg/mL (2 pmol/L) às 9h da manhã, acompanhados de uma elevação concomitante dos níveis de cortisol, sustentam uma causa independente de ACTH para a síndrome de Cushing. Por outro lado, níveis plasmáticos acima de 20 pg/mL (4 pmol/L) em face do hipercortisolismo são fortemente sugestivos de uma causa dependente de ACTH. Recomenda-se realizar o teste de estimulação por CRH com quantificação de ACTH nos casos em que forem detectados valores entre 10 e 20 pg/mL (2 e 4 pmol/L) (Orth, 1995). Apesar de os pacientes com produção ectópica de ACTH tenderem a exibir níveis de ACTH acentuadamente elevados, há uma grande sobreposição com os níveis observados na síndrome de Cushing. Portanto, essa quantificação não é um método seguro para distinguir essas entidades.

O TSD com doses elevadas (2 dias, 8 mg) é útil na distinção entre doença de Cushing e Cushing suprarrenal ou ectópico. É importante notar que tumores neuroendócrinos, tais como o tumor carcinoide bronquial, também podem induzir supressão no teste com doses elevadas de dexametasona. O TSD com doses elevadas requer a coleta de uma amostra de urina de 24 h basal para avaliação do UFC. A partir do primeiro dia, o paciente recebe 2 mg de dexametasona por via oral, a cada seis horas, durante 48 h. A urina para determinação do UFC é coletada nos dias 1 e 2. Uma alternativa à quantificação do UFC consiste em coletar plasma antes, durante e após a administração de dexametasona para avaliar o cortisol. A doença de Cushing é diagnosticada pela detecção de uma supressão, tanto do UFC como do cortisol plasmático, equivalente a pelo menos 50% do valor basal. A maioria dos pacientes com adenomas suprarrenais, carcinomas ou síndromes ectópicas envolvendo ACTH não apresenta supressão. Esse teste conta com uma sensibilidade e especificidade de 60 a 85%. Quanto maior o grau de supressão, maior a especificidade.

Segundo relatos de vários autores, o TSD de um dia a outro com administração de 8 mg de dexametasona apresenta níveis de sensibilidade e especificidade semelhantes aos do TSD com doses elevadas (Dicheck, 1994). Determina-se os níveis de cortisol plasmático às 8 h e o paciente recebe 8 mg de dexametasona por via oral às 23 h. Na manhã do dia seguinte, às 8 h, os níveis plasmáticos de cortisol são determinados. A detecção de uma redução do cortisol a valores abaixo de 5 μg/dL constitui forte indicação da existência de doença de Cushing (Fig. 24.17).

A maioria dos indivíduos com tumores hipofisários e poucos com tumores secretores de ACTH ectópicos irão responder à estimulação pelo CRH com um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e cortisol. Aqueles com Cushing suprarrenal, no entanto, apresentarão apenas uma resposta fraca. Para o teste de estimulação por CRH, são coletadas duas amostras de plasma para avaliação do cortisol basal e dos níveis de ACTH. Essas coletas devem ser feitas com um intervalo de 5 minutos entre ambas e, em seguida, injeta-se CRH ovino sintético (oCRH) por via intravenosa, a uma concentração de 1 μg/kg de peso corporal ou uma quantidade equivalente a 100 μg. Amostras de sangue são obtidas a cada 15 minutos durante 1 a 2 horas, para avaliação

Tabela 24.22 Diagnóstico diferencial dos valores hormonais observados na síndrome de Cushing

Causa	ACTH plasmático	Cortisol plasmático (PM)	Supressão com dose alta de dexametasona ou de um dia a outro
Dependente da hipófise	N – ↑ discreto	↑	Sim
Doença suprarrenal	↓ – indetectável	↑	Não
Cushing ectópico*	↑↑↑	↑↑	Usualmente não
Pseudo-Cushing	N – ↑ discreto	N – ↑	Usualmente sim

* Os níveis de ACTH podem se sobrepor aos valores observados na doença dependente da hipófise.

N = normal.

do cortisol e do ACTH. Indivíduos normais apresentam uma elevação de aproximadamente 15 a 20% nos níveis desses hormônios, enquanto é típico daqueles com doença de Cushing apresentar aumentos superiores a 50 e 20% nos níveis de ACTH e cortisol, respectivamente, em relação aos níveis basais (Stewart, 2003; Kaye, 1990; Newell-Price, 2002). O oCRH é superior ao CRH humano em termos de distinção das diferentes causas da síndrome de Cushing (Nieman, 1989). A AVP estimula liberação de ACTH ao atuar nos receptores V3 localizados na adeno-hipófise. A administração de 10 unidades de AVP por via intramuscular normalmente faz com que os níveis de ACTH atinjam o dobro da concentração, além de provocar um aumento de 150 μg/L nos níveis séricos de cortisol, em relação aos valores basais. Portanto, esse procedimento não oferece nenhuma vantagem em relação ao teste com CRH, exceto pelo fato de ser útil na diferenciação entre doença de Cushing e síndrome pseudo-Cushing, e também na avaliação pós-operatória da doença de Cushing (Newell-Price, 2002).

Em raros casos, pode ser necessário realizar amostragem seletiva de sangue a partir do seio petroso inferior da dura-máter, para registrar que a hipófise constitui a fonte do excesso de ACTH. Esse procedimento invasivo e difícil em termos técnicos está associado a um custo e a uma incidência de complicações relativamente altos, de modo que somente deve ser executado em centros que tenham muita experiência com essa técnica. A concentração do ACTH no sague do seio petroso da dura-máter deve exceder o dobro da concentração no sangue periférico para assegurar uma sensibilidade e especificidade diagnósticas de 100% (Orth, 1995). Nos indivíduos com produção ectópica, a proporção costuma ser inferior a 1,4:1. O uso do CRH durante a amostragem aumenta a sensibilidade e a especificidade.

Considerando os relatos de que o "incidentaloma" das suprarrenais e da hipófise apresenta uma incidência de 10%, análises de imagem devem ser realizadas somente após o estabelecimento do diagnóstico hormonal da doença ou da síndrome de Cushing. Na doença, a visualização da sela pode ser feita tanto por IRM como TC, com ou sem contraste. Para o Cushing suprarrenal, o teste de escolha é a TC do abdome. Nos casos de doença ectópica, é possível que também seja necessário realizar TC do tórax.

Síndrome pseudo-Cushing

O excesso de atividade do eixo hipotálamo-hipófise semelhante ao observado na síndrome de Cushing hipófise foi detectado em alguns pacientes com alcoolismo, depressão significativa e obesidade. A resolução do problema subjacente resulta na normalização do eixo HPA. Esses pacientes talvez não apresentem supressão no TSD com doses baixas e podem ter UFC elevado. Pacientes deprimidos que falham em suprimir a secreção de cortisol em resposta à dexametasona também apresentam comprometimento da resposta de ACTH ao CRH exógeno. No entanto, nesses indivíduos a resposta de cortisol usualmente se mantém normal (Thalen, 1993; Gold, 1986). Foi demonstrado que uma única detecção de níveis séricos de cortisol acima de 7,5 μg/dL à meia-noite discrimina a síndrome de Cushing do pseudo-Cushing com uma especificidade de 100% (Papanicolaou, 1998). Um teste mais definitivo para distinguir essas duas entidades consiste na combinação

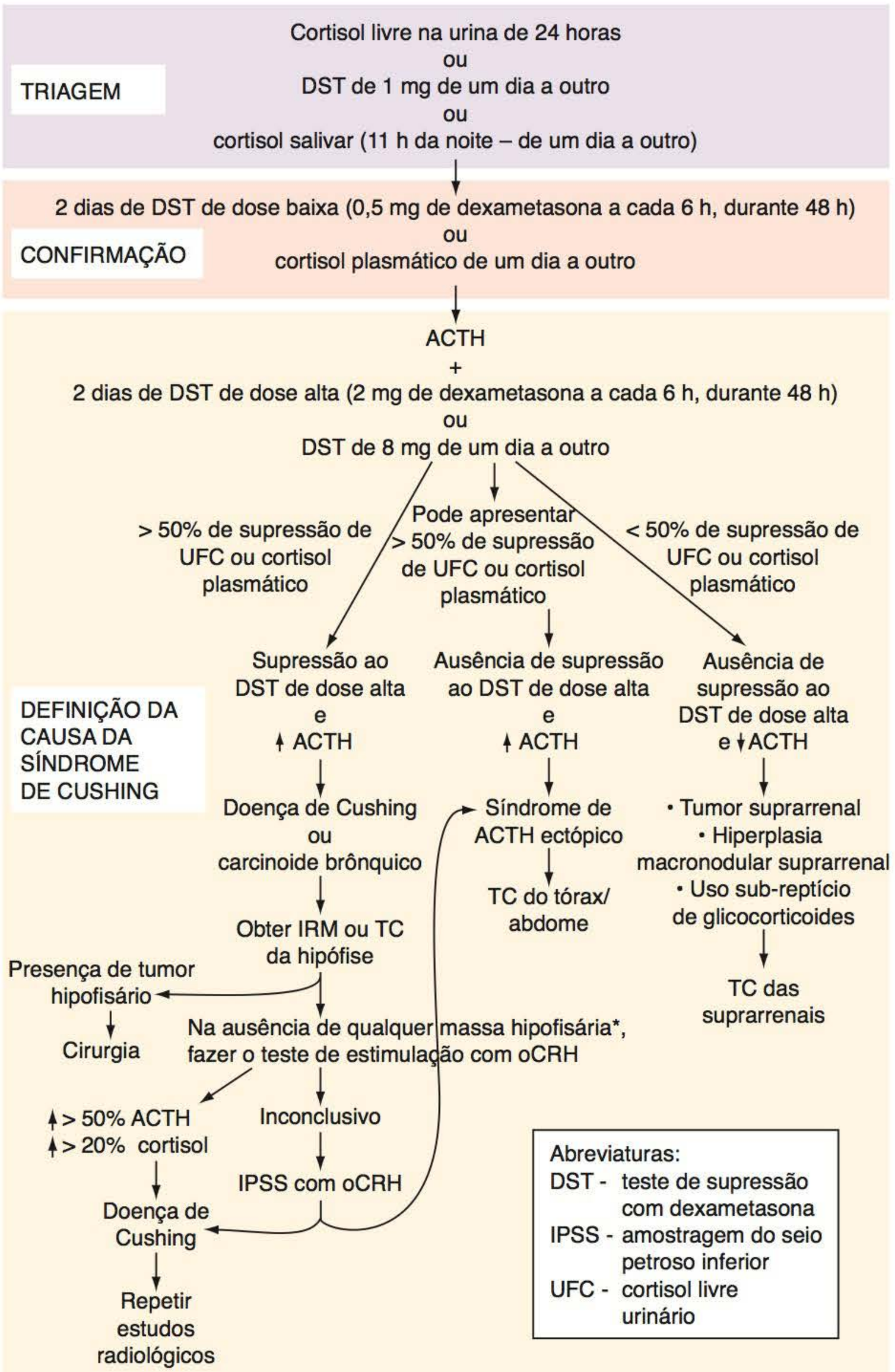


Figura 24.17 Algoritmo para avaliação da síndrome de Cushing. Todos os testes de triagem devem ser acompanhados de um teste confirmatório. ACTH = hormônio adenocorticotrófico; oCRH = hormônio liberador de corticotropina ovino.

da dexametasona ao oCRH. O oCRH é infundido 2 h após a realização do TSD com doses baixas de dexametasona. Uma concentração plasmática de cortisol acima de 38 nmol/L detectada 15 minutos após a administração do oCRH identifica corretamente todos os casos de síndrome de Cushing e de pseudo-Cushing com uma especificidade, sensibilidade e acurácia diagnósticas de 100% (Yanovski, 1993).

Insuficiência suprarrenal

A insuficiência suprarrenal é classificada de acordo com o sítio crítico de disfunção junto ao eixo HPA: primária (suprarrenal); secundária (hipófise); e terciária (hipotálamo). Uma importante distinção entre insuficiência suprarrenal primária e quaisquer uma das causas centrais consiste no fato de a doença primária estar associada à deficiência de mineralocorticoides. No ocidente, a insuficiência suprarrenal primária – também conhecida como doença de Addison – ocorre mais comumente em razão da suprarrenalite autoimune (70–90% de todos os casos), sendo que as demais causas incluem tuberculose (causa mais comum ao nível internacional), distúrbios granulomatosos, doença metastática, hemorragia, HIV-AIDS e infecção. A causa mais comum de insuficiência suprarrenal central é a supressão do eixo HPA decorrente do tratamento prolongado com doses farmacológicas de esteroides.

Testes para diagnóstico de insuficiência suprarrenal.

Quantificações hormonais basais. Uma concentração de cortisol plasmático < 3 μg/dL (83 nmol/L) das 8 às 9 h indica insuficiência suprar-

renal e torna óbvia a necessidade de realizar mais testes. Embora a maioria dos pacientes com hipocortisolismo apresente baixos níveis de cortisol sérico, uma concentração medida durante um momento de estresse que esteja dentro da faixa de referência não exclui o diagnóstico. Em vez disso, pode até sustentá-lo, pois uma concentração de cortisol subótima pode ter sofrido aumento e atingido a faixa de referência em resposta a uma elevação significativa dos níveis de ACTH induzida pelo estresse. Uma concentração aleatória de cortisol > 25 μg/dL (700 nmol/L) em situação de estresse torna improvável o paciente apresentar insuficiência suprarrenal (Burke, 1985).

Teste de estimulação com ACTH. O procedimento mais conveniente para estudar pacientes com suspeita de hipocortisolismo é o teste de estimulação com ACTH. Esse teste, que pode ser realizado a qualquer momento do dia, consiste na determinação dos níveis basais de cortisol sérico, seguida da administração de 250 μg de Cosyntropin (um análogo do ACTH comercialmente disponível) por via intravenosa ou intramuscular. Amostras de soro para avaliação do cortisol são novamente coletadas em 30 e 60 minutos após a administração do Cosyntropin. A resposta considerada normal é a detecção de níveis de cortisol acima de 18 a 20 μg/dL (500 a 550 nmol/L) em qualquer momento no decorrer do tempo (Burke, 1985; Speckart, 1971). Delinear os níveis de ACTH basais pode ajudar a distinguir a insuficiência suprarrenal primária (associada a elevações do ACTH usualmente acima de 50 a 100 pg/mL) da forma secundária ou terciária (nas quais os baixos níveis de ACTH devem ser < 10 pg/mL) (Oelkers, 1992) (Consultar a seção sobre Quantificação laboratorial do ACTH, na p. 412.) A resposta de aldosterona ao ACTH também pode ajudar nessa distinção. A falha em aumentar os níveis de aldosterona em mais de 4 ng/dL acima do nível basal sugere a existência de uma disfunção suprarrenal primária.

Jamais se deve retirar esteroides de um paciente criticamente doente com suspeita de insuficiência suprarrenal. Pode ser obtida uma amostra aleatória para avaliação do cortisol e do ACTH e deve ser iniciado o tratamento com dexametasona, que não interfere no ensaio de cortisol. Testes formais devem ser realizados assim que possível, dentro de 72 horas, antes da supressão do eixo HPA pelo tratamento com esteroide.

Vários estudos sustentam o uso de uma dose de 1 μg de ACTH, em vez da dose integral de 250 μg, para o diagnóstico da insuficiência suprarrenal. A premissa é a de que uma dose massivamente suprafisiológica de 250 μg induz uma resposta normal em indivíduos com insuficiência suprarrenal parcial que falham em apresentar o devido aumento nos níveis de cortisol em resposta à dose de 1 μg. Esse procedimento ainda não ganhou ampla aceitação nem teve padronizada uma faixa de referência normal.

O teste de tolerância à insulina (TTI) há muito tempo vem sendo considerado o padrão-ouro da avaliação do eixo HPA. Diferente do teste de estimulação com ACTH, o TTI avalia a integridade de todo o eixo. Se este estiver intacto, a hipoglicemia induzida pela insulina estimula o hipotálamo e a hipófise a secretarem CRH e ACTH, respectivamente, que, por sua vez, leva ao aumento dos níveis de cortisol. Esse teste é contraindicado para indivíduos com doença cardíaca isquêmica, idosos (idade > 70 anos) e indivíduos com história de ataques convulsivos. Pacientes com elevada suspeita de insuficiência suprarrenal central (i. e., anterior à cirurgia hipófise ou radioterapia) devem receber uma dose de insulina menor (0,05 U/kg). A glicose e o cortisol são quantificados no momento basal e, então, aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração de insulina. Para que o teste seja válido, um nível adequado de hipoglicemia deve ser alcançado (sinais e sintomas de hipoglicemia e níveis de glicose < 40 mg/dL [2,2 mmol/L]). Uma resposta normal consiste na elevação dos níveis de cortisol a valores ≥ 18 μg/L ou 20 μg/L a qualquer momento no decorrer do teste (Burke, 1985; Grinspoon, 1994; Nelson, 1978). A resposta de cortisol à hipoglicemia pode ser prevista de forma confiável pela resposta à estimulação aguda com ACTH – um teste mais seguro, econômico e rápido (Stewart, 2003). O TTI é mais utilizado como medida de segunda linha para novas avaliações de pacientes que apresentaram respostas limítrofes no teste de estimulação por ACTH.

Antes da comercialização de um ensaio confiável para quantificação do ACTH, era comum realizar um longo teste de estimulação com esse hormônio (o ACTH era infundido no paciente durante 2 dias) para distinguir as formas central e primária da insuficiência suprarrenal. Em outros sistemas hormonais, a falta de estimulação normalmente conduz à regulação positiva (aumento) dos receptores em órgãos terminais. Entretanto, as suprarrenais regulam negativamente (inibem) seus receptores de ACTH em resposta à falta de estimulação. Um teste curto de estimulação com ACTH tipicamente produziria uma resposta inadequada. Por meio do condicionamento do sistema com a exposição prolongada ao Cortrosyn, indivíduos com doença hipotalâmica exibem um aumento tardio, porém normal, dos níveis de cortisol.

Teste de metirapona de um dia a outro. A metirapona também tem sido utilizada na avaliação da integridade do eixo HPA. Ela inibe a 11β-hidroxilase e previne a conversão do 11-desoxicortisol (composto S) em cortisol. Sob circunstâncias normais, a queda dos níveis de cortisol induzida pela metirapona é detectada ao nível do hipotálamo e da hipófise, e ocorre um aumento compensatório da secreção de CRH e ACTH que estimula a esteroidogênese e leva ao acúmulo de 11-desoxicortisol, o hormônio que precede o bloqueio. Pacientes com insuficiência suprarrenal central falham em aumentar a secreção de CRH e/ou ACTH, de modo que a esteroidogênese não é estimulada e não ocorre aumento dos níveis de 11-desocortisol. A metirapona é administrada na concentração de 30 mg/kg, por via oral, à meia-noite. Na manhã seguinte, às 8 h, é coletada uma amostra de sangue para avaliação do cortisol e do 11-desoxicortisol. A detecção de um aumento dos níveis de 11-desoxicortisol para mais de 7 μg/dL (200 nmol/L) é considerada normal (Grinspoon, 1994; Fiad, 1994). Uma resposta anormal é definida pela detecção de níveis de 11-desoxicortisol abaixo de 7 μg/dL, acompanhada da detecção de níveis de cortisol abaixo de 5 μg/dL. Esse teste deve ser realizado com cuidado, pois pode provocar uma crise adissoniana em indivíduos com hipocortisolismo central.

Teste do hormônio liberador de corticotropina (CRH). O teste do oCRH pode ser empregado não só para o diagnóstico de hipocortisolismo, mas também para localizar o sítio de dano (Schutte, 1984). Trata-se de um teste seguro, entretanto é caro. Após a coleta de uma amostra de sangue para determinação dos níveis basais de ACTH e cortisol, 100 μg de oCRH são administradas por via intravenosa. O sangue, então, é coletado novamente a cada 15 minutos, durante 60 a 90 minutos, para determinar os níveis desses hormônios. A resposta normal corresponde a uma concentração de cortisol > 20 μg/dL. Os níveis basais de ACTH e suas alterações na resposta ao oCRH são utilizados para localizar o sítio da patologia. Os níveis plasmáticos de corticotropina usualmente atingem o pico em 15 a 30 minutos, enquanto o cortisol chega ao pico mais ou menos em 30 a 40 minutos após a injeção do oCRH (Oelkers, 1996).

Anticorpos contra o antígeno da 21-hidroxilase devem ser testados em casos de indivíduos cuja doença de Addison (insuficiência suprarrenal hipófise) não possui explicação óbvia. A positividade para os anticorpos confirmam a existência de suprarrenalite autoimune, sendo que esses pacientes devem ser submetidos a uma triagem e monitorados quanto ao desenvolvimento de outros distúrbios autoimunes.

O uso de esteroides para tratamento de muitos distúrbios malignos e imunológicos constitui causa iatrogênica comum de insuficiência suprarrenal. O grau de supressão suprarrenal depende especificamente da dose de glicocorticoide, duração, frequência e via de administração. Para avaliar a função suprarrenal em um paciente submetido ao afunilamento de esteroides exógenos, omite-se a dose matinal de glicocorticoide e quantifica-se os níveis de cortisol às 8 h da manhã. Se forem detectados níveis acima de 10 μg/dL, a suplementação de esteroides de rotina pode ser finalizada. Como o córtex suprarrenal apresenta um retardo em relação à hipófise na recuperação da supressão induzida pelos esteroides, a completa recuperação da suprarrenal também pode ser demonstrada pelo devido aumento dos níveis séricos de cortisol após uma infusão de Cosyntropin às 8 h da manhã.

Eixo renina-aldosterona

Nos Estados Unidos, há pelo menos 20 milhões de indivíduos hipertensos, sendo que 90 a 98% dos casos são classificados como hipertensão essencial. A mortalidade e morbidade associadas às complicações miocárdicas, cerebrovasculares e renais requerem o tratamento agressivo desse distúrbio. Investigações acerca da etiologia da hipertensão revelaram a importância do sistema renina-angiotensina-aldosterona, não só na origem e persistência da hipertensão, mas também como

guia do tratamento. O papel do eixo renina-aldosterona consiste em manter a pressão sanguínea dentro dos limites normais, por meio da percepção do volume de plasma, do equilíbrio salino e da pressão de perfusão renal e subsequente ajuste desses parâmetros.

A renina é uma enzima proteolítica que, embora seja formada em outros tecidos ao longo do corpo, é produzida e armazenada principalmente nas células justaglomerulares (JG), junto à mácula densa do rim. A renina é sintetizada a partir de uma proteína precursora maior denominada pró-renina (renina grande) e convertida em sua forma ativa junto às células JG. A liberação da renina na circulação se dá em resposta a uma variedade de estímulos desencadeadores: queda da pressão hidrostática renal, hiponatremia, hipercalemia, diminuição das catecolaminas, angiotensina II ou hormônio natriurético atrial. A renina possui diversas isozimas, cuja liberação é controlada pelo cAMP. A renina atua sobre o angiotensinogênio (substrato da renina) – uma α_2-globulina formada pelo fígado – convertendo-o em angiotensina I. Esta, por sua vez, é convertida em angiotensina II por ação da enzima conversora de angiotensina (ACE, *angiotensin-converting enzyme)*. A ACE é encontrada no endotélio pulmonar e vascular, bem como nas membranas celulares no rim, coração e cérebro (Brewster, 2004). Acredita-se que a angiotensina II seja o peptídeo responsável pelos efeitos fisiológicos sobre o tecido-alvo. A angiotensina II não só estimula a liberação da aldosterona, como também é um potente agente vasoconstritor, estimula a liberação de catecolaminas a partir das suprarrenais, a de NEp a partir do SNS e, ainda, a de vasopressina. O octapeptídeo angiotensina II sofre nova quebra e dar origem a um heptapeptídeo denominado angiotensina III, ou a angiotensina I pode se modificada diretamente a angiotensina III, sem ser convertida em angiotensina II. Embora ainda existam especulações acerca das funções exercidas pela angiotensina III, esta parece modular a secreção da aldosterona. As angiotensinas ativas são rapidamente eliminadas pela ação de várias aminopeptidases (angiotensinases) presentes na circulação e também durante o trânsito pelos tecidos. Essas relações são esquematizadas na Figura 24.18.

A renina, por meio de seu produto, a angiotensina II, estimula diretamente a síntese e secreção da aldosterona pela zona glomerulosa suprarrenal. A liberação da renina, que constitui a etapa limitante do processo no eixo renina-aldosterona, depende das alterações no volume plasmático efetivo, que, por sua vez, dependem da reabsorção tubular de sódio nos rins. Um volume plasmático baixo e uma baixa concentração sérica de sódio estimulam a secreção da renina, resultando na liberação de aldosterona. Esta, por sua vez, causa retenção de sódio com consequente aumento do volume plasmático, pressão sanguínea e perda de potássio. De modo inverso, um aumento do volume de sangue efetivo ou uma elevação aguda da pressão sanguínea resultam em baixas concentrações de renina, níveis reduzidos de aldosterona e perda de sódio subsequente. Em oposição à aldosterona, a secreção de renina é inibida pela hipercalemina (Fig. 24.19).

A aldosterona (e os glicocorticoides) atua no receptor de mineralocorticoides localizado nas células limitantes dos ductos coletores do rim e promove reabsorção de sódio, levando ao aumento do volume intravascular. A aldosterona também causa perda de potássio renal. Estudos sugeriram um papel para a aldosterona no desenvolvimento e perpetuação de vasculopatias. Foi demonstrado que a aldosterona estimula genes para a síntese de colágeno, fatores de crescimento teciduais, fatores inflamatórios e inibidor do ativador de plasminogênio de tipo 1 (Brilla, 1994; Schunkert, 1997; Luft, 2002; Rocha, 2000; Brown, 2000). A síntese da aldosterona é restrita à zona glomerulosa. É nesse local que a enzima aldosterona sintase converte corticosterona em aldosterona. O principal estímulo para a secreção da aldosterona são a angiotensina II e a hipercalemia, enquanto o ACTH é um estímulo bem mais fraco. Somatostatina, hormônio natriurético atrial, Do e heparina inibem diretamente a síntese da aldosterona. O cortisol circula em concentrações bem mais altas do que as de aldosterona e, embora se ligue com igual afinidade ao receptor de mineralocorticoides, normalmente não atua como um mineralocorticoide importante. O motivo é que a enzima 11β-hidroxiesteroide desidrogenase II (11-HSD-2, também conhecida como CYP11B2), expressa nas células-alvo dos mineralocorticoides nos túbulos coletores, converte o cortisol em cortisona inativa.

Renina e hipertensão

O trabalho de Laragh indicou que a hipertensão essencial pode ser classificada com base na quantificação de renina, como sendo de alta,

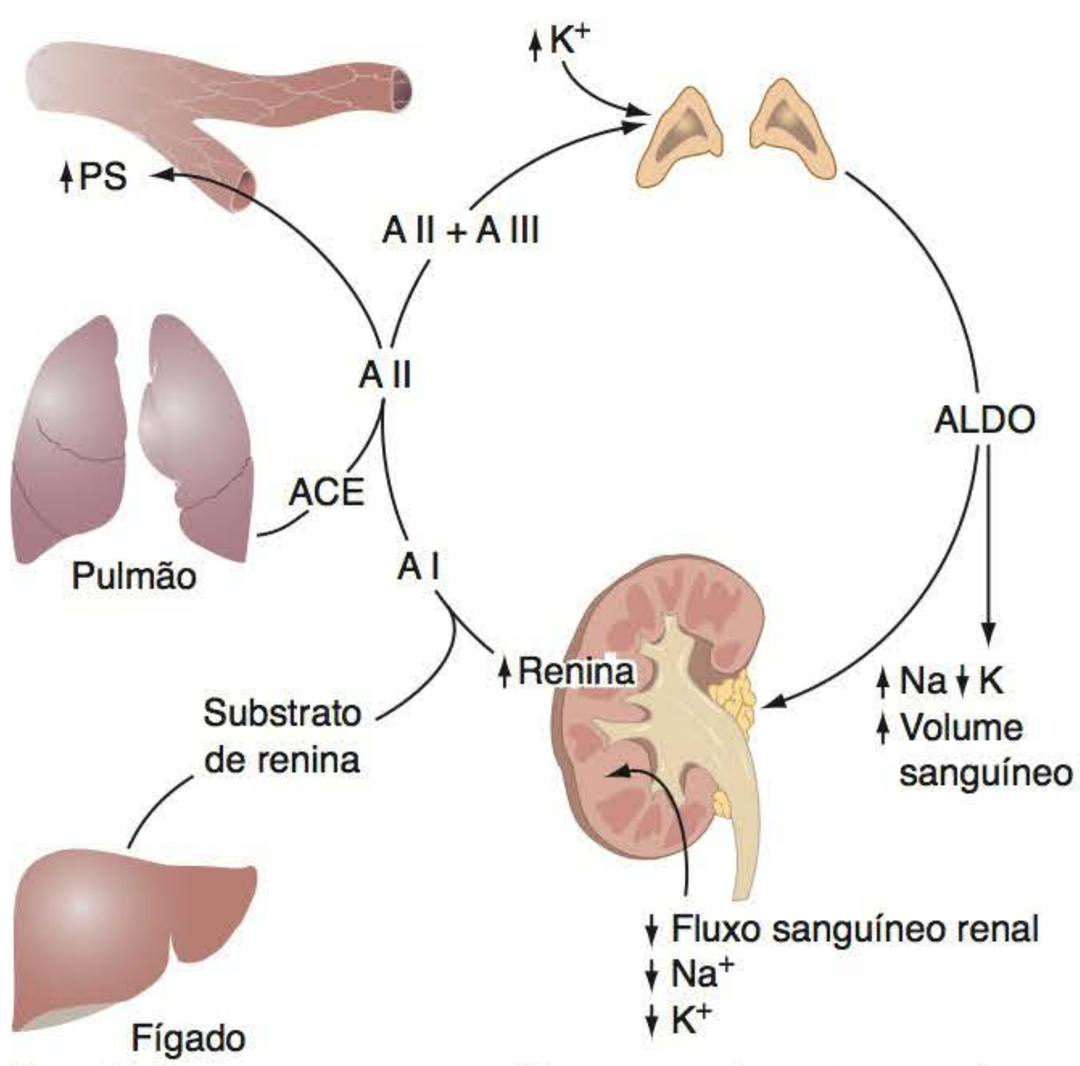


Figura 24.19 Eixo renina-angiotensina-aldosterona normal. A renina, secretada pelo rim, cliva a angiotensina I a partir do substrato de renina (angiotensinogênio), o qual é produzido pelo fígado. A angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ACE), principalmente no pulmão. A angiotensina II aumenta a resistência vascular periférica e, aliada à angiotensina III, estimula a secreção de aldosterona, com consequente retenção de sódio e aumento do volume plasmático. (Adaptado de Stewart PM: The Suprarrenal Cortex. In: Larsen, PR; Kronenberg, HM; Melmed, S; Polansky, KS (eds.): Williams Textbook of Endocrinology, 10. ed. Philadelphia, Saunders, 2003, p. 499.)

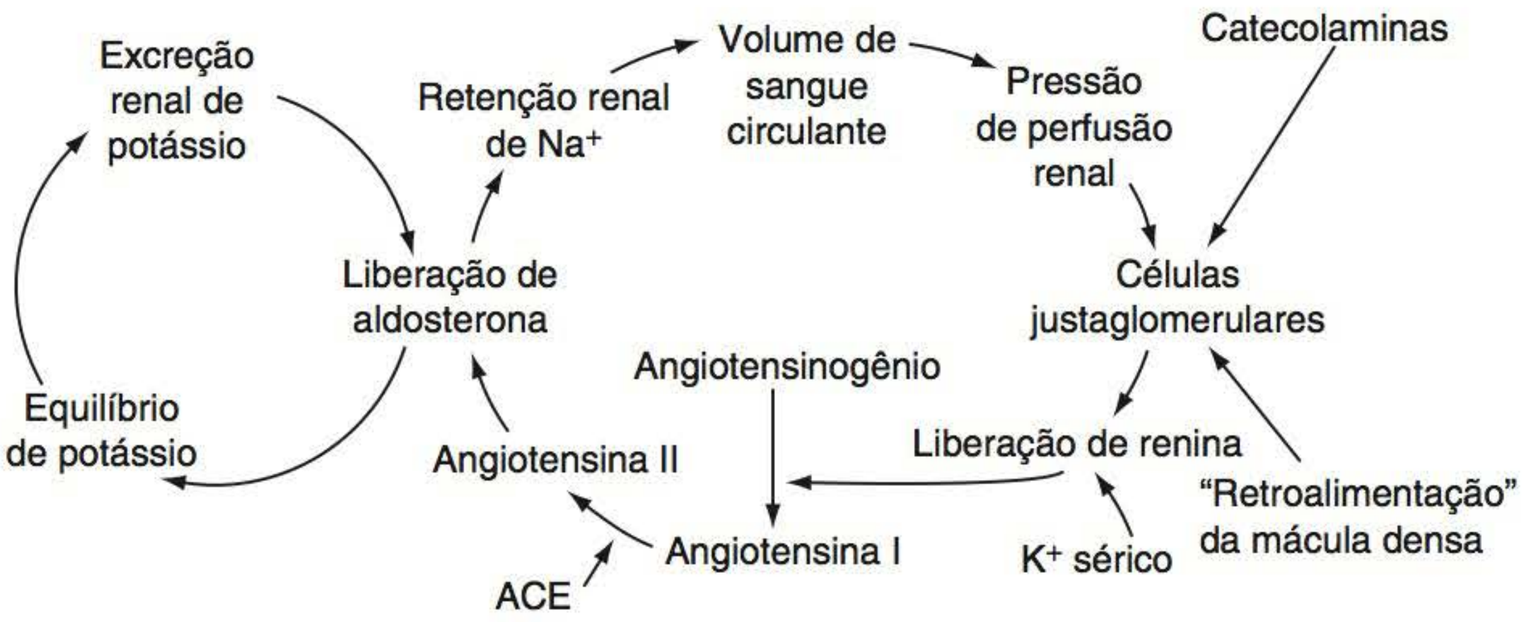


Figura 24.18 Eixo renina-aldosterona. Os níveis elevados de K^+ inibem a secreção de renina, porém exercem efeito estimulatório sobre a aldosterona. A influência catecolaminérgica é variável, enquanto a atividade β-adrenérgica é estimulante e a α-adrenérgica inibe a secreção de renina a partir das células justaglomerulares. (Redesenhado a partir de Braunwald, E; Fauci, AD; Kasper, D et al (eds): Harrison's Principles of Internal Medicine, 15. ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p. 2087.)

baixa ou normal, e também que a escolha dos fármacos pode ser feita de acordo com essa classificação (Laragh, 1972; Laragh, 1993). Cerca de 15% dos pacientes com hipertensão essencial apresenta hipertensão de renina alta. A hiper-reninemia resultante de uma doença parenquimatosa renal ou de vasculopatia renal conduz ao aumento da produção de aldosterona e à subsequente retenção de sódio com excreção de potássio aumentada. Pacientes com essa condição são hipervolêmicos, intensamente vasoconstritivos e mais propensos a sofrerem lesão isquêmica. O perfil da renina demonstrou que a mesma constitui um fator de risco independente de IM. Mesmo que as pressões sejam controladas por agentes anti-hipertensivos, se estes não forem direcionados à atividade da renina plasmática, o paciente piora bem mais do que os indivíduos que apresentam menores níveis de renina (Alderman, 1991). A aldosterona aumentada (aldosteronismo secundário) pode contribuir de forma significativa para os sintomas e curso da hipertensão de renina alta. Algumas das causas desse tipo de hipertensão são listadas na Tabela 24.23.

Tumores secretores de renina são extremamente raros e pode ser difícil diagnosticá-los. Esses tumores podem ser benignos ou malignos, renais ou extrarrenais. A localização mais comum é o aparelho justaglomerular. Um paciente jovem com atividade de renina plasmática acentuadamente elevada, hiperaldosteronismo e hipocalemia na ausência de lesão renovascular exemplifica a apresentação clínica associada ao tumor (Corvol, 1994). A hipertensão maligna também está associada à aldosterona e à atividade de renina plasmática aumentada. Quando tais pacientes recebem medicações que interrompem o eixo renina-aldosterona, como os inibidores de ACE (ACE-Is), a pressão sanguínea com frequência é normalizada. Na hipertensão vascular renal, os níveis de renina e aldosterona também estão aumentados. Entretanto, ao contrário do que ocorre na hipertensão maligna, o tratamento com ACE-Is costuma resultar em maior deterioração da função renal. Pacientes com suspeita de estenose da artéria renal devem ser submetidos a mais testes, por exemplo, o renograma induzido pelo Captopril, ultrassonografia dúplex renal ou angiografia por RM. Um teste positivo conduz ao cateterismo e angiogramas venosos para amostragem de sangue seletiva. Na doença renal unilateral, tanto a renina plasmática como a aldosterona estão elevadas. A assimetria dos níveis de renina obtida durante a cateterização da veia renal proporciona uma das melhores medidas para avaliar a probabilidade de resposta da pressão sanguínea à cirurgia corretiva. Quando a proporção de renina plasmática na veia renal do lado afetado em relação ao lado não afetado é igual a no mínimo 1,5:1, significa que a cirurgia pode trazer benefícios. Com a supressão da liberação de renina a partir do lado não afetado, os níveis de renina na veia renal próximos daqueles observados nas amostras de sangue obtidas da veia cava inferior também indicam um provável sucesso da cirurgia curativa. Entretanto, quase 40% desses pacientes apresenta atividade de renina plasmática no sangue periférico dentro da faixa de referência (Streeten, 1979). Em consequência, a renina plasmática periférica é um preditor fraco da resposta à cirurgia. É possível detectar secreção de renina em cânceres de pulmão, hamartoma hepático e outras condições pouco usuais (Anderson, 1989).

Diante de uma aceleração da hipertensão, a renina costuma estar acentuadamente aumentada. Todavia, com a insuficiência renal crônica, espera-se detectar quase qualquer nível de renina. Um pequeno número de pacientes hipertensos submetidos à diálise apresentam hipertensão acelerada intratável. Em pacientes cuja hipertensão não pode ser controlada pela diálise, os níveis acentuadamente elevados de renina podem ser reduzidos por nefrectomia ou, no caso de uma estenose da artéria renal, angioplastia ou revascularização (Sonkodi, 1990; Tullis, 1999; Whitehouse, 1981). Os ACE-Is podem ser empregados para mitigar a elevação da aldosterona. Em pacientes submetidos ao transplante renal que apresentaram rejeição, os elevados níveis plasmáticos de renina podem ser indicativos de isquemia renal. A hipertensão sistêmica ocorre em pacientes com síndrome de Cushing, sendo que alguns desses pacientes apresentam níveis elevados de renina e de seus substrato. Outros pacientes com essa síndrome apresentam hipocalemia associada à secreção de um mineralocorticoide de menor importância (p. ex., DOC ou corticosterona) que provoca hipertensão (Krakoff, 1975). Em outros pacientes, ainda, os níveis de cortisol severamente elevados sobrepujam a capacidade da 11-hidroxiesteroide desidrogenase (11-HSD) de converter o cortisol em cortisona, levando a um quadro de atividade excessiva de mineralocorticoide com supressão da atividade da renina plasmática. Outras causas de hipertensão com elevação da renina incluem o tratamento com medicamentos como diuréticos, vasodilatadores ou outros agentes anti-hipertensivos. Agentes hormonais, como os glicocorticoides, e alguns contraceptivos orais que contêm estrógeno parecem aumentar a atividade do substrato da renina.

Tabela 24.23 Causas de hipertensão associadas a níveis elevados de renina plasmática

Tumor secretor de renina	Síndrome de Cushing
Hipertensão acelerada maligna	Iatrogênica
Hipertensão renovascular	Agentes depletadores de volume
Lesões arteriais importantes	Agentes vasodilatadores
Lesões segmentares	Glicocorticoides
Insuficiência renal crônica	Estrógenos
Estágio terminal	
Rejeição de transplante	

Embora a atividade da renina plasmática, aldosterona e excreção urinária de sódio possam estar normais em 60% dos pacientes hipertensos, o acúmulo crescente de evidências indica que o sistema renina-angiotensina exerce participação significativa na hipertensão com renina normal. Em muitos pacientes hipertensos cujos níveis de renina permanecem normais, a resposta aos ACE-Is ou aos antagonistas da angiotensina II (saralasina) tem implicado a renina e a angiotensina II na manutenção da hipertensão. Além disso, Ames demonstrou que, se a pressão sanguínea for elevada por uma infusão de angiotensina, pode ser mantida com apenas 1/5 da dose original (Ames, 1965).

Descobriu-se que a hipertensão essencial com baixos níveis de renina – envolvendo expansão crônica do volume de plasma e de líquidos extracelulares – é caracterizada pela hipersecreção de aldosterona e responde à terapia diurética. Pelo menos 25% dos pacientes com hipertensão essencial apresentam hipertensão com níveis baixos de renina. A maioria dos investigadores caracterizou esse estado como sendo hiporresponsivo, no sentido de que os pacientes hipertensos com renina diminuída falham em responder tão bem quanto os indivíduos sadios quando em posição ereta, à restrição ao sódio, uso de diuréticos, vasodilatadores ou a uma combinação desses fatores. O peptídeo natriurético atrial pode estar elevado nesses pacientes, assim como a resposta da aldosterona à renina pode ser exagerada (Sergev, 1990). A supressão da renina aumenta com o avanço da idade e parece ser mais comum em mulheres e na população negra.

A Tabela 24.24 lista um grupo de síndromes associadas a níveis baixos de renina plasmática. Esse grupo foi subdividido em dois subgrupos: um com origem suprarrenal (primária) e outro cuja origem das síndromes não é suprarrenal (secundária). O aldosteronismo primário é incomum, se comparado à hipertensão associada à renina, e caracteriza-se por (1) hipertensão sistólica e diastólica causada pela hipersecreção de aldosterona por um adenoma suprarrenal (adenoma produtor de aldosterona [APA, aldosterone-producing adenoma]) ou hiperplasia da glândula (hiperaldosteronismo idiopático [IHA, *idiopathic hyperaldosteronism*]); (2) níveis baixos de renina ou elevada proporção aldosterona/renina (> 50); (3) perda de potássio renal; e (4) retenção de sódio. Vários testes com potencial de uso têm sido empregados na triagem para detecção de aldosteronismo primário e para separar os adenomas unilaterais produtores de aldosterona de outras causas de aldosteronismo primário. Dietas com baixo conteúdo de sais (< 2 g/dia), estresse, postura ereta e diuréticos são fatores que aumentam a aldosterona plasmática, enquanto dietas com elevado teor de sal e a posição deitada em supino suprimem a secreção de aldosterona em indivíduos sadios. A combinação dessas manobras tem sido utilizada no diagnóstico da secreção excessiva de aldosterona, embora não permita distinguir com segurança APA de IHA. Quando indivíduos sadios ingerem uma dieta rica em sais e se deitam em supino, apresentam supressão dos níveis de aldosterona a valores inferiores a 10 ng/dL (278 pmol/L).

Tabela 24.24 Causas de hipertensão associadas a baixos níveis de renina plasmática

Excesso "primário" de mineralocorticoides
Aldosteronismo primário
Aldosteronismo pseudoprimário (idiopático)
Aldosteronismo suprimível com glicocorticoides
Excesso de 11-desoxicorticosterona (HSC devido a deficiência de 11β-hidroxilase)
Excesso de 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona
Carcinoma suprarrenal (excesso de mineralocorticoides e/ou glicocorticoides)
Excesso "secundário" de mineralocorticoides
Ingestão de alcaçuz
Ingestão excessiva de sódio
Hipoaldosteronismo hiporrenina
Hipertensão essencial duradoura
Diabetes melito

Hiperaldosteronismo primário – triagem e testes de confirmação

O algoritmo proposto por Blumenfeld para avaliação de pacientes hipertensos com suspeita de hiperaldosteronismo primário consiste em quantificar inicialmente os níveis séricos de potássio (Blumenfeld, 1994). Quando esses níveis são menores do que 3,6 mmol/L, a atividade da renina plasmática é, então, determinada. Diante de uma atividade de renina plasmática < 1,0 ng/mL/h, é realizada a coleta de urina de 24 horas para avaliação da aldosterona e da excreção de potássio. Achados de urina de 24 horas acima de 30 mEq/24 h em face de hipocalemia e níveis de aldosterona > 15 μg/24 h conduzem à localização da patologia suprarrenal.

Embora os pacientes com hiperaldosteronismo primário classicamente apresentem hipocalemia tanto espontânea como de fácil indução, na verdade, muitos apresentam níveis séricos de potássio dentro da faixa de referência normal. Sendo assim, o teste de triagem preferido é a determinação da proporção PAC/PRA: concentração plasmática de aldosterona/atividade de renina plasmática. A PAC é expressa em ng/dL e a PRA, em ng/mL/h. Esse teste é realizado após o paciente permanecer no mínimo 2 horas em posição vertical e, de modo ideal, com o uso suspenso de espirolactona e esplerenona por um período de 4 a 6 semanas, bem como de quaisquer agentes anti-hipertensivos por ao menos 2 semanas. Similarmente, é preciso corrigir a hipocalemia e o paciente não deve estar sob dieta com restrição de sódio. Uma proporção PAC/PRA maior do que 30 é sugestiva de hiperaldosteronismo primário, sendo que um valor acima de 50 é virtualmente diagnóstico (Blumenfeld, 1994; Weinberger, 1993). É importante notar que o limite inferior normal do teste de PRA varia de acordo com o laboratório. Portanto, o diagnóstico ganha suporte apenas quando há elevação tanto da proporção PAC/PRA como da PAC.

O diagnóstico do hiperaldosteronismo primário é confirmado por meio de um teste de supressão com salina. Para tanto, o paciente pode ser submetido a uma infusão com 2 L de salina a 0,9% por 4 horas, ou pode ingerir comprimidos de 10 a 12 g de cloreto de sódio diariamente, durante 3 dias. Ao final do período de infusão, uma concentração plasmática de aldosterona maior que 5 ng/dL (140 pmol/L) confirma o diagnóstico – há autores que defendem o uso de um cutoff > 10 ng/dL (280 pmol/L). No último dia de administração de sódio por via oral, coleta-se uma amostra de urina de 24 horas para avaliação da aldosterona, creatinina (para verificar a adequação da amostra) e sódio (> 200 mEq/dia confirmam a ingestão de sódio adequada). Níveis de aldosterona acima de 10 μg/24 horas (28 nmol/24 h) após os 3 dias de carga de sódio também confirmam o diagnóstico (Bravo, 1983, 1994; Holland, 1984).

Diferenciação de causas diversas do hiperaldosteronismo primário

O APA difere do hiperaldosteronismo idiopático decorrente de IHA graças a pressões sanguíneas mais extremas, maior perda de potássio e níveis mais altos de peptídeo natriurético atrial. Indivíduos com APA também tendem a apresentar maiores níveis urinários e séricos de 18-oxocortisol, 18-hidroxicortisol (soro > 300 ng/dL) e 18-hidroxicorticosterona (soro > 100 ng/dL). Um resultado positivo no teste de estimulação postural (aldosterona plasmática: deambulação < 130% em supino) apresenta um grau moderado de sensibilidade e especificidade para casos de adenoma, mas não para hiperplasia. Uma vez confirmado o diagnóstico de hiperaldosteronismo primário, a etapa seguinte consiste em realizar análise de imagem das suprarrenais tanto por TC como por IRM, em busca de uma hiperplasia bilateral ou de um adenoma hipodenso unilateral. A especificidade da análise de imagens na correta classificação dos pacientes com APA *versus* IHA varia entre 67% e 84% (Doppmann, 1992; Gleason, 1993; Harpe, 1999; Magill, 2001). A remoção do adenoma é curativa em 35% dos casos e leva à melhora em outros 55% (Blumenfeld, 1994). A hiperplasia nem sempre é bilateral. A cirurgia pode curar ou melhorar a hipertensão nos pacientes com doença unilateral. Para aqueles com doença bilateral, o tratamento médico com fármacos (p. ex., espironolactona) conduz à melhora em 76% dos casos.

A amostragem bilateral a partir da veia suprarrenal é um procedimento tecnicamente exigente e arriscado. Contudo, quando realizado por um radiologista experiente, constitui o padrão ouro para distinção dos casos de adenoma e hiperplasia. Para tanto, 30 minutos antes da amostragem, inicia-se uma infusão de 50 μg de ACTH/h que continua durante todo o procedimento. Essa infusão serve para acentuar a diferença existente entre as suprarrenais esquerda e direita nos casos de adenoma. A partir de cada veia suprarrenal e da periferia, são obtidas amostras para avaliação da aldosterona e do cortisol. A quantificação do cortisol garante que as amostras sejam oriundas das veias suprarrenais. Entre ambas as suprarrenais, deve haver uma diferença < 20% dos níveis de cortisol. No lado que contém o adenoma, a proporção aldosterona/cortisol (A/C) na veia suprarrenal é maior do que na periferia. Uma proporção A/C > 1 bilateralmente indica hiperplasia. Usualmente, a PAC é no mínimo cinco vezes maior no lado que contém o adenoma. Na hiperplasia, nenhum gradiente é observado (Doppmann, 1996). Vários estudos mostraram que até 1/3 de todos os casos apresentam uma discrepância entre os achados radiológicos e os cirúrgicos. Entretanto, ainda falta definir de forma clara os critérios que determinam quais pacientes devem ser submetidos à amostragem venosa.

Dada a prevalência aumentada (5–10%) dos incidentalomas suprarrenais (tumores suprarrenais não funcionais) com o avanço da idade, algumas autoridades recomendaram o uso da amostragem a partir da veia suprarrenal para pacientes com hiperaldosteronismo que tenham idade acima de 40 anos e nódulo suprarrenal hipodenso unilateral (> 1 cm) detectado em varredura por TC (Young, 1999). Com base nos achados de estudos prospectivos amplos, foi sugerido que a principal força dessa técnica pode residir na avaliação dos pacientes que, apesar de estarem associados a uma alta probabilidade de AHA, apresentam tanto achados normais como doença bilateral à TC. Novamente, é preciso destacar que trata-se de um teste tecnicamente difícil e, mesmo quando realizado pelos melhores profissionais, é bem-sucedido em apenas 92 a 96% dos casos (Young, 1999; Radin, 1992; Doppman, 1992).

A renina pode ser suprimida pela ingestão de alcaçuz (que é rico em ácido glicirrízico), pelo ato de mascar tabaco e pela ingestão excessiva de sódio. Também está suprimida na síndrome do hiperaldosteronismo hiporrenina, que é mais comum em pacientes com diabetes melito e doença renal. O aldosteronismo secundário resulta de uma doença não suprarrenal, em que ambas as glândulas suprarrenais são estimuladas (Tab. 24.25). Pacientes com esse distúrbio tipicamente não são hipertensos. Condições como nefrose, cirrose e insuficiência cardíaca constituem causas usuais, sendo que em todas há um aumento dos níveis de renina e aldosterona. Durante a gravidez, a resposta do sistema renina-aldosterona é especialmente complexa, parecendo haver elevação dos níveis de renina e de seu substrato, de angiotensina II e de aldosterona.

Os casos familiares de aldosteronismo tratável com glicocorticoides sabidamente apresentam herança mendeliana (Kurtz, 1993; Lifton, 1992). Esse distúrbio herdado de forma dominante é caracterizado pelo hiperaldosteronismo, hiporreninemia e hipertensão resultante da translocação da aldosterona sintase (CYP18) para a sequência do promotor sensível ao ACTH do gene da 11β-hidroxilase (CYP11B), junto à zona fasciculada. Assim, a síntese de aldosterona é estimulada pelo ACTH. O diagnóstico dessa condição é confirmado pela normalização da aldosterona após 4 a 6 semanas de supressão de esteroides.

Tabela 24.25 Diferenciação entre as várias causas de hiperaldosteronismo

Distúrbio	Aldosterona	Renina	K^+ sérico
Hiperaldosteronismo primário	↑	↓	↓
Tumor secretor de renina	↑	↑	↓ – N
Hiperaldosteronismo suprimível com dexametasona	↑	↓	↓
Hipertensão renovascular	N – ↑	N – ↑	↓ – N
Síndrome de Bartter	↑	↑	↓
Uso de diuréticos, insuficiência cardíaca, cirrose, síndrome nefrótica	↑	↑	N – ↓

N = normal.

Tabela 24.26 Diferenciação entre as várias causas de hipoaldosteronismo

Distúrbio	Aldosterona	Renina	K^+ sérico
Doença de Addison	↓	↑	↑
Síndrome de Cushing	↓	↓	N ou ↓
Síndrome de Liddle	↓	↓	↓
Hipoaldosteronismo hiporrenina	↓	↓	↑
Aparente excesso de mineralocorticoides	↓	↓	↓
Hipoaldosteronismo isolado	↓	↑	↑

N = normal.

A síndrome de Liddle é outro distúrbio autossômico dominante raro. Caracteriza-se por hipertensão e hipocalemia, com PRA e PAC baixas. O defeito se deve a uma mutação que afeta os canais de sódio junto aos ductos coletores renais, acarretando o aumento da reabsorção de sódio e da excreção de potássio.

Quantificações de aldosterona

Uma quantificação isolada de aldosterona sem considerar a preparação do paciente tem pouco valor clínico. Mesmo quando o momento da amostragem, a postura e a ingestão dietética de sódio e potássio são controladas, é difícil discriminar com certeza os casos de aldosteronismo primário das demais formas de hipertensão utilizando apenas medidas isoladas da aldosterona plasmática. Os ensaios são realizados com amostras de plasma, utilizando método de extração para remover a aldosterona das proteínas plasmáticas, seguido de cromatografia e RIA. Amostras de urina são testadas por hidrólise ácida, extração e RIA. Existem valores normativos para diferentes grupos de faixa etária, postura e ingestão de sódio (Tab. 24.26).

Quantificações de renina

Existem diferenças técnicas importantes referentes à determinação da renina empregando as metodologias atuais. São dois os tipos de quantificação da renina: PRA e ensaio de renina direto. O PRA é um bioensaio em que uma amostra de plasma contendo renina reage com seu substrato (angiotensinogênio). Após um período de tempo estabelecido, a reação é finalizada e a angiotensina I produzida é quantificada por RIA. Para a estimação da atividade da renina plasmática, o substrato endógeno não é eliminado. Desse modo, a taxa de geração de angiotensina I é influenciada pela concentração tanto de renina endógena como de seu substrato. Esse tipo de ensaio é o método mais amplamente utilizado para determinação da renina. Não é possível comparar os resultados de diferentes laboratórios, em razão das variações de pH, força iônica, duração do ensaio, inibidor de angiotensina empregado, falta de preparação específica referencial e condições de obtenção da amostra. Além disso, a literatura existente sobre os ensaios de renina é confusa no que diz respeito às unidades de medida empregadas. Mesmo quando se tenta expressar nos mesmos termos (ng de angiotensina liberada/mL/h) as diversas unidades arbitrárias, existem amplas faixas de referência descritas para a atividade de renina plasmática humana nas populações de referência.

Ao determinar a concentração de renina, em vez da PRA, elimina-se o efeito do substrato. O ensaio de renina direto utiliza anticorpos direcionados contra a própria molécula da renina. A amostra é, então, analisada por técnicas de ICMA ou RIA.

Os ensaios de PRA e determinação da concentração plasmática de renina fornecem informações semelhantes, exceto em algumas situações clínicas. Diante do uso de contraceptivos orais, a concentração de renina plasmática permanece junto à faixa de referência, enquanto a PRA aumenta em decorrência do aumento da concentração de substrato. Foi demonstrado que outros procedimentos, como congelamento, descongelamento e acidificação, convertem a pró-renina em renina e, assim, aumentam os valores de renina plasmática nos ensaios de determinação da concentração.

Como a liberação de renina é controlada por muitas variáveis fisiológicas e farmacológicas, é extremamente importante conhecer as condições de obtenção das amostras de sangue. Condições como postura ereta, administração de diuréticos ou dietas pobres em sódio, constituem estímulos potentes da liberação de renina e devem ser devidamente controladas antes da quantificação da renina plasmática. Esta, por sua vez, também parece ser extremamente lábil e, por esse motivo, é preciso exercer um controle vigoroso das variáveis envolvidas no processamento da amostra. O sangue deve ser coletado em tubos resfriados contendo EDTA, que inativa enzimas (p. ex., angiotensinases). Em seguida, deve ser centrifugado a 4°C e o plasma deve ser prontamente separado da fração celular, congelado e mantido no *freezer* até o momento da análise. Essa técnica preserva a estabilidade das amostras por vários meses, a –20°C.

A medida direta do substrato da renina, angiotensina I, ou da angiotensina II não é amplamente utilizada na prática clínica, por causa das tediosas etapas de extração ou concentração, e pela dificuldade de eliminar a formação ou degradação desses compostos por ação das proteases e demais enzimas envolvidas no sistema da renina. Embora seja possível determinar facilmente os níveis de ACE, essa informação tem pouco valor para o diagnóstico de distúrbios hipertensivos.

Referências bibliográficas

Adams LM, Emery JR, Clark SJ, et al: Reference ranges for new thyroid function tests in premature infants. J Pediatr 1995; 126:122–127.

Ain KB, Pucino F, Shiver T, et al: Thyroid hormone levels affected by time of blood sampling in thyroxine-treated patients. Thyroid 1993; 3:81–85.

Alderman MH, Hadavan S, Oor WI, et al: Association of the renin–sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. N Engl J Med 1991; 324:1098.

Almeretti G, Corneli G, Baldelli R, et al: Diagnostic reliability of a single IGF-I measurement in 237 adults with total anterior hypopituitarism and severe GH deficiency. Clin Endocrinol (Oxf) 2003; 59(1):56–61.

Amadori P, Dilberis C, Marcolla A, et al: Macroprolactinemia: predictability on clinical basis and detection by PEG precipitation with two different immunometric methods. J Endocrinol Invest 2003; 26(2):148–156.

American Association of Clinical Endocrinologists: Medical Guidelines for Clinical Practice for the Evaluation and Treatment of Hyperthyroidism and Hypothyroidism. Endocr Pract 2002; 8(6):457–469.

Excelente referência para diagnóstico e tratamento de distúrbios de tireoide comumente observados, criada por um painel de consenso de especialistas no assunto.

American Association of Clinical Endocrinologists: Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Treatment of Acromegaly. Endocrine Practice 2004; 10(3): 213–225.

Excelente referência para o diagnóstico e tratamento da acromegalia, criada por um painel de consenso de especialistas em acromegalia.

Ames RP, Borkpwski AJ, Sicinski AM, et al: Prolonged infusion of angiotensin II and norepinephrine and blood pressure, electrolyte balance, aldosterone and cortisol secretion in normal man and in cirrhosis with ascites. J Clin Invest 1965; 44:1171.

Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH, Laurberg P: Narrow individual variations in serum T4 and T3 in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:1068–1072.

Anderson PW, Macaulay L, Do S, et al: Extrarenal renin-secreting tumors: Insights into hypertension and ovarian renin production. Medicine 1989; 68:257.

Arafah BM: Estrogen therapy may necessitate and increase in thyroxine dose for hypothyroidism. N Engl J Med 2001; 344:1743–1749.

Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, et al: Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: A consensus statement. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:5593–5602.

Ayus JC, Arieff AI: Glycine induced hypo-osmolar hyponatremia. Arch Intern Med 1997; 157(2):223–226.

Bacarese-Hamilton T, Cattini R, Shandley C, et al: A fully automated enzyme immunoassay for the measurement of cortisol in biologic fluids. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30:531.

Ballabio M, Posyyachinda M, Ekins RP: Pregnancy-induced changes in thyroid function: role of human chorionic gonadotropin as a putative regulator of maternal thyroid. J Clin Endocrinol Metab 1991; 73:824.

Barbot N, Calmettes C, Schuffenecker I, et al: Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:114–120.

Barkan A: Acromegaly, diagnosis and therapy. Endocrinol Metab Clin North Am 1989; 18:277–310.

Barkan AL, Chandler WF: Giant pituitary prolactinoma with falsely low serum prolactin: the pitfall of the 'high-dose hook effect': case report. Neurosurgery 1998; 42:913–915.

Baumann G: Acromegaly. Endocrinol Metab Clin North Am 1987; 16:685–703.

Beck-Peccos P, Amr S, Menezes-Ferreira M, et al: Decreased receptor binding of biologically inactive thyrotropin in central hypothyroidism: effect of treatment with thyrotropin releasing hormone. N Engl J Med 1985; 312:1085–1089.

Becker KL, Nylen ES, Cohen R, Snider RH: Calcitonin: structure, molecular biology and actions. In Beleziakin JP, Raisz LE, Rodan GA (eds): Principle of Bone Biology. San Diego, Academic Press, 1996, pp 471–474.

Bigos R, Ridgeway E, et al: Spectrum pituitary alterations with mild and severe thyroid impairment. J Clin Endocrinol Metab 1978; 46:317.

Biller BMK, Samuels MH, Zagar A, et al: Sensitivity and specificity of six tests for the diagnosis of adult GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:2067–2079.

Bitton RN, Wexler CI: Free triiodothyronine toxicosis: a distinct entity. Am J Med 1990; 88:531–533.

Bjorbeck C, Kahn BB: Leptin signalling in the central nervous system and the periphery. Recent Prog Horm Res 2004; 59:305–331.

Bjorkman U, Ekholm R, Denef J-F: Cytochemical localization of hydrogen peroxidase in isolated thyroid follicle. J Utrastruct Res 1981; 71:105–115.

Blumenfeld JD, Sealey JE, Schussel Y, et al: Diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism. Ann Intern Med 1994; 121:877–885.

Brabant A, Brabant G, Schuermeyer T, et al: The role of glucocorticoids in the regulation of thyrotropin. Acta Endocrinol 1989; 121:95–100.

Brandi ML, Gagel RJ, Angeli A, et al: Consensus guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:5658–5671.

Braverman LE, Utiger RD (eds): Werner and Ingbar's 'The Thyroid.' A Fundamental and Clinical Test. Philadelphia, Lippincott-Raven, 2000.

Bravo EL: Primary aldosteronism. Endocrinol Metab Clin North Am 1994; 23:271.

Bravo EL, Tagle R: Pheochromocytoma: State-of-the-art and future prospects. Endocr Rev 2003 24(4):539–553.

Bravo EL, Tarazi RC, Fouad FM, et al: Clonidine-suppression: a useful aid in the diagnosis of pheochromocytoma. N Engl J Med 1981; 305:623.

Bravo EL, Tarazi RC, Dustan HP, et al: The changing clinical spectrum of primary aldosteronism. Am J Med 1983; 74:641–651.

Brent GA, Moore DD, Larsen PR: Thyroid hormone regulation of gene expression. Ann Rev Physiol 1991; 53:17–35.

Brewster UC, Perazella MA: The renin–angiotensin–aldosterone system and the kidney: Effects on kidney disease. Am J Med 2004; 116:263–272.

Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, et al: Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin I and aldosterone. J Mol Cell Cardiol 1994; 26:809–820.

Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, et al: Synergistic effect of suprarrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:336–344.

Burke CW: Suprarrenal insufficiency. Clin Endocrinol Metab 1985; 14(4):947–976.

Canale MP, Bravo EL: Diagnostic specificity of serum chromogranin-A for pheochromocytoma in patients with renal dysfunction. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:1139–1144.

Caron P: Effect of amiodarone on thyroid function. Press Med 1995; 24:1747–1751.

Casanueva FF: Physiology of growth hormone secretion and action. Endocrinol Metab Clin North Am 1992; 21:483–517.

Chan KC, Lit LC, Law EL, et al: Diminished free cortisol excretion in patients with moderate and severe renal impairment. Clin Chem 2004; 50:757–759.

Chiovato L, Bassi P, Santini F, et al: Antibodies producing compliment-mediated thyroid toxicity in patients with atrophic or goiterous autoimmune thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77:1700–1705.

Chopra I: Euthyroid sick syndrome: is it a misnomer? J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:329–334.

Chrousos GP: The hypothalamic–pituitary–suprarrenal axis and immune mediated inflammation. N Engl J Med 1998; 332;1351–1362.

Chung HM, Kluge R, Schrier RW, Anderson RJ: Clinical assessment of extracellular fluid volume in hyponatremia. Am J Med 1987; 83:905–908.

Cobin RH, Gharib H, Bergman DA, et al: AACE/AAES medical/surgical guidelines for clinical practice: Management of thyroid carcinoma. Endocrine Pract 2001; 7:203–220.

Conner P, Fried G: Hyperprolactinemia: etiology, diagnosis and treatment alternatives. Acta Obstet Gynecol Scand 1998; 77:249–262.

Corvol P, Pinet F, Plouin PF, et al: Renin-secreting tumors. Endocrinol Metab Clin North Am 1994; 23:255.

Daniels GH: Amiodarone-induced thyrotoxicosis. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:3–8.

Davies T, Roli E, et al: Thyroid controversy: Stimulating antibodies. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 3777–3780.

Davis FB, LaMantia RS, Spaulding FW, et al: Estimation of a physiologic replacement dose of levothy-roxine in elderly patients with hypothyroidism. Arch Int Med 1984; 144:1752–1754.

De Bellis A, Bizzarro A, Amoresano Paglionico V, et al: Detection of vasopressin cell antibodies in some patients with autoimmune endocrine diseases without overt diabetes insipidus. Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 40:173–177.

De Bellis A, Colao A, Di Salle F, et al: A longitudinal study of plasma vasopressin cell antibodies, posterior pituitary function and magnetic resonance imaging evaluations in subclinical autoimmune central diabetes insipidus. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:3047–3051.

De Brabandere VI, Hou P, Stockl D, et al: Isotope dilution--liquid chromatography/electrospray ionization--tandem mass spectrometry for the determination of serum thyroxine as a potential reference method. Rapid Commun Mass Spectrom 1998; 12:1099–1103.

DeGroot LJ, Major G: Admission screening by thyroid function tests in an acute general care teaching hospital. Amer J Med 1992; 93:558–564.

Delange F: Correction of iodine deficiency: benefits and possible side effects. Eur J Endocrinol 1995; 132:542–543.

Deme D, Pommier J, Nunez J: Kinetics of thyroglobulin iodination of hormone synthesis catalized thyroid peroxidase. Role of iodide in the coupling reaction. Eur J Biochem 1976; 70:435–440.

Demers LM, Spencer CA: NACB: Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease, 2003, pp 1–78.

Excelente compilação das últimas recomendações para o diagnósticos e monitoramento da doença tireoidiana.

Dicheck HL, Nieman LK, Oldfield EH, et al: A comparison of the standard high-dose dexamethasone suppression test and the overnight 8mg dexamethasone suppression test for the diagnosis of Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:418–422.

Dimaraki EV, Jaffe CA, DeMott-Friberg R, et al: Acromegaly with apparently normal GH secretion: Implications for diagnosis and follow-up. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:3537–3542.

Diver MJ, Ewins DL, Worth RC, et al: An unusual form of big, big (macro) prolactin in a pregnant patient. Clin Chem 2001; 47(2):346–348.

Docter R, Van Toor H, Krenning EP, et al: Free thyroxine assessed with three assays in sera of patients with non-thyroidal illness and of subjects with abnormal concentrations of thyroxine-binding proteins. Clin Chem 1993; 39:1668–1674.

Doppmann JL, Gill JR Jr: Hyperaldosteronism: sampling the renal veins. Radiology 1996; 198:309–312.

Doppmann JL, Gill JR Jr, Miller DL, et al: Distinction between hyperaldosteronism due to bilateral suprarrenal hyperplasia and unilateral aldosteronoma: reliability of CT. Radiology 1992; 184:677–682.

Dulgeroff AJ, Hershman JM. Medical therapy for differentiated thyroid carcinoma. Endocrinol Rev 1994; 15:500–515.

Dunn JT: What happens to our iodine? J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:3398–3400.

Dunn JT: When is thyroid nodule a sporadic medullary carcinoma? J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:824–825.

Eastman RC, Merriman GR, Moore WT, Tanjuatco AJP: Acromegaly, hyperprolactinemia, gonadotropin-secreting tumors and hypopituitarism. In Moore WT, Eastman RC (eds): Diagnostic Endocrinology, 2nd edition. St. Louis, Mosby-Year Book, 1996, p 73.

Eddy RL, Gilliland PF, Ibarra JD, et al: Human growth hormone release: comparison of provocative test procedures. Am J Med 1974 56: 179.

Eisenhofer G, Pacak K: Diagnosis of pheochromocytoma. In Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill. Online. Available: http://www.accessmedicine.com/, 2004a.

Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther, et al: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true from false-positive test results. J Clin Endocrinol Metab 2003, 88:2656–2666.

Eisenhofer G, Lenders JW, Pacak K: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma. Front Horm Res 2004b; 31:76–106.

Elliott W, Murphy MB: Reduced specificity of the clonidine suppression test in patients with normal plasma catecholamine levels. Am J Med 1988; 84:419–424.

Engler D, Burger AG: The deiodination of the iodothyronines and their derivatives in man. Endocrine Rev 1984; 5:151–184.

Erdogan MF, Gullu S, Baskal N, et al: Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary carcinoma of the thyroid gland. Ann Surg 1997; 188:139–141.

Ericsson UB, Tegler L, Lennquist S, et al: Serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma. Acta Chir Scand 1984; 150:367–375.

Ezzat S: Acromegaly. Endocrinol Metab Clin North Am 1997; 26:703–723.

Faber J, Kirkegaard C, Rasmussen B, et al: Pituitary–thyroid axis in critical illness. J Clin Endocrinol Metab 1987; 65:315–320.

Fahie-Wilson M: In hyperprolactinemia, testing for macroprolactin is essential. Clin Chem 2003; 49(9):1434–1436.

Fiad TM, Kirby JM, Cunningham SK, McKenna TJ: The overnight single-dose metyrapone test is a simple and reliable index of the hypothalamic–pituitary axis. Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 40:603–609.

Findling JW: Clinical application of a new immunoradiometric assay for ACTH. Endocrinologist 1992; 2:360–365.

Findling JW, Raff H: Newer diagnostic techniques and problems in Cushing's disease. Endocrinol Metab Clin North Am 1999; 28:191–210.

Fisher DA, Nelson JC, Carlton EI, Wilcox RB: Maturation of human hypothalamic–pituitary–thyroid function control. Thyroid 2000a; 10:229–234.

Fisher DA, Schoen EJ, La Franchi S, et al: The hypothala-

mic–pituitary–thyroid negative feedback control axis in children with treated congenital hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab 2000b; 85:2722–2727.
Frank J, Faix J, Hermos RJ, et al: Thyroid function in very low birth weight infants: effects on neonatal hypothyroidism screening. J Pediatr 1996; 128:548–554.
Frantz AG: Hyperprolactinemia. In Collu R, Brown GM, Van Loon GR (eds): Clinical Neuroendocrinology. Boston, Blackwell Scientific Publications, 1998, pp 311–332.
Freda PU, Wardlaw SL: Clinical Review 110: Diagnosis and treatment of pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84(11):3859–3866.
Freda PU, Post KD, Powell JS, Wardlaw SL: Evaluation of disease status with sensitive measures of growth hormone secretion in 60 post-operative patients with acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:3808–3816.
Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P: Oxytocin receptors and human parturition: A dual role for oxytocin in the initiation of labor. Science 1982; 215:1396.
Fujieda K, Okuhara K, Abe S, et al: Molecular pathogenesis of lipoid suprarrenal hyperplasia and suprarrenal hypoplasia congenita. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 85(2–5):483–489.
Fukata J, Shimizu N, Imura H, et al: Human corticotrophin-releasing hormone test in patients with hypothalamo-pituitary–adrenocortical disorders. Endocrinol J 1993: 40:597.
Gabrilove JL, Sharma DC, Dorfman RI: Adrenocortical 11-β-hydroxylase deficiency and virilism first manifest in an adult woman. N Engl J Med 1965; 272:1189–1194.
Gagel RF: The abnormal pentagastrin test. Clin Endocrinol 1996; 44:221–222.
Gleason PE, Weinberger MG, Pratt JH, et al: Evaluation of diagnostic tests in the differential diagnosis of primary aldosteronism: unilateral adenoma versus bilateral micronodular hyperplasia. J Urol 1993; 150:1365–1368.
Glinoer D: The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. Endocrinol Rev 1997; 18:404–433.
Glinoer D, De Nayer P, Bourdoux P, et al: Regulation of maternal thyroid function during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1990; 71:276–287.
Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, et al: High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1986; 63:1199–1203.
Gold PW, Loriaux L, Roy A, et al: Responses to corticotrophin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. N Eng J Med 1986; 314(21):1329–1335.
Goodwin TM, Monotoro M, Mestman JH, et al: The role of chorionic gonadotropin in transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:1333–1337.
Grinspoon SK, Biller BMK: Laboratory assessment of suprarrenal insufficiency. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79:923–931.
Grodum E, Petersen PH, Hangaard J, et al: Biological description of the cortisol response to corticotrophin releasing hormone (CRH) stimulation. An optimization and simplification of the test. Ups J Med Sci 1993; 98:311.
Guo J, Jaume JC, Rapoport B, et al: Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G (IgG) molecules: evidence for thyroid cell damage IgG, but not IgG_4 autoanti-bodies. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:925–931.
Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al: Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. N Engl J Med 1999; 341:549–555.
Hahn RG: Natriuresis and 'dilutional' hyponatremia after infusion of glycine 1.5%. J Clin Anesth 2001; 13:167–174.
Harjai KJ, Licata AA: Effects of arniodarone on thyroid function. Ann Intern Med 1997; 126:63–73.
Harpe R, Ferrett CG, McKnight JA, et al: Accuracy of CT scanning and suprarrenal vein sampling in the pre-operative localization of aldosterone-secreting suprarrenal adenomas. Q J Med 1999; 92:643–650.
Hartman MC, Crowe BJ, Biller BM, et al: Which patients do not require a GH stimulation test for the diagnosis of adult GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:477–485.
Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, et al: American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. Clin Chem 1991; 37:2002–2008.
Heithorn R, Hauffa BP, Reinwein D: Thyroid antibodies in children of mothers with autoimmune thyroid disorder. Eur J Pediatr 1999; 158:24–28.
Heron E, Chatellier G, Billaud E, et al: The urinary metanephrine-to-creatinine ratio for the diagnosis of pheochromocytoma. Ann Intern Med 1996; 125:300–303.
Hershman JM: Human chorionic gonadotropin and the thyroid: hyperemesis gravidarum and trophoblastic tumors. Thyroid 1999; 9:653–657.
Hillier TA, Abbott RD, Barrett EJ: Hyponatremia: Evaluating the correction factor for hyperglycemia. Am J Med 1999; 106:399–403.
Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al: A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature 1994; 367:375–376.
Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD: Factors influencing mortality in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:667–674.
Holland OB, Brown H, Kuhnert L, et al: Further evaluation of saline infusion for the diagnosis of primary aldosteronism. Hypertension 1984; 6:717–723.
Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, et al: Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). J Clin Endocrinol 2002; Metab 87:489–499.
Holtzman EJ, Ausiello DA: Nephrogenic diabetes insipidus: Causes revealed. Hosp Pract (Off ed) 1994; 29(3):89–93, 97–98, 103–104.
Honour JW, Rumsby G: Problems in diagnosis and management of congenital suprarrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Steroid Biochem Mol Biol 1993; 45:69.
Horrocks PM, Jones AF, Ratcliffe WA, et al: Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty four hours in normal males and females. Clin Endocrinol 1990; 32:127–134.
Hsiao RJ, Parmer RJ, Takiyyuddin MM, et al: Chromogranin A storage and secretion: Sensitivity and specificity for the diagnosis of pheochromocytoma. Medicine (Baltimore) 1991; 70:33–45.
Iitaka M, Kawasaki S, Sakurai S, et al: Serum substances that interfere with thyroid hormone assays in patients with chronic renal failure. Clin Endocrinol 1998; 48:739–746.
Ishii H, Inada M, Tanaka K, et al: Induction of outer and inner ring monodeiodinases in human thyroid gland by thyrotropin. J Clin Endocrinol Metab 1983; 57:500–505.
Itoh S, Tanaka K, Kimagae M, et al: Effect of subcutaneous injection of a long acting analogue of somatostatin (SMS 201-995) on plasma thyroid stimulating hormone in normal human objects. Life Sci 1988; 42:2691–2699.
Jenkins JS, Nussey SS: The role of oxytocin: present concepts. Clin Endocrinol (Oxf) 1991; 34:515–525.
Johnson AM, Eegles JM: Lithium associated clinical hypothyroidism: prevalence and risk factors. Br J Psychiatry 1999; 175:336–339.
Kailajarvi M, Takala T, Gronroos P, et al: Reminders of drug effects on laboratory test results. Clin Chem 2000; 64:1395–1400.
Kakucska I, Rand W, Lechan RM: Thyrotropin-releasing hormone gene expression in hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by both triiodothyronine and thyroxine. Endocrinology 1992; 130:2845–2850.
Kamoi K: Syndrome of inappropriate antidiuresis without involving inappropriate secretion of vasopressin in an elderly woman: Effect of intravenous administration of the nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist OPC-31260. Nephron 1997; 76:111–115.
Kamoi K, Ebe T, Kobayashi O, et al: Atrial natriuretic peptide in patients with the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion and with diabetes insipidus. J Clin Endocrinol Metab 1990; 70:1385–1390.
Kaptein EM: Thyroid hormone metabolism and thyroid diseases in chronic renal failure. Endocrinol Rev 1996; 17:45–63.
Kaptein EM, Spencer CA, Kamiel MB, Nicoloff JT: Prolonged dopamine administration and thyroid hormone economy in normal and critically ill subjects. J Clin Endocrinol Metab 1980; 51:387–393.
Kater CE, Biglieri EG: Disorders of steroid 17 alpha-hydroxylase deficiency. Endocrinol Metab Clin North Am 1994; 23:341.
Kauppila A: Isolated prolactin deficiency. Curr Ther Endocrinol Metab 1997; 6:31–33.
Kaye TB, Crapo L: The Cushings syndrome: an update on diagnostic tests. Ann Intern Med 1990; 112:434–444.
Kleinberg DL, Noel GL, Frantz AG: Galactorrhea: a study of 235 cases, including 48 with pituitary tumors. N Engl J Med 1977; 296(11):589–600.
Krakoff L, Nicolis G, Amsel B: Pathogenesis of hypertension in Cushing's syndrome. Am J Med 1975; 58:216.
Kumar S, Berl T: Sodium. Lancet 1998; 352:220–228.
Kurtz TW, Spence MA; Genetics of essential hypertension. Am J Med 1993; 94:77.
Kusalic M, Engelsmann F: Effect of lithium and maintenance therapy on thyroid and parathyroid function. J Psych Neurosci 1999; 24:227–233.
Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, et al: American Thyroid Association Guidelines of detection of thyroid dysfunction. Arch Intern Med 2000; 160:1573–1575.
Lamb EJ, Noonan KA, Burrin JM: Urine-free cortisol excretion: Evidence of sex-dependence. Ann Clin Biochem 1994; 31:455.
Langsteger W: Clinical aspect and diagnosis of thyroid hormone transport protein anomalies. Curr Top Pathol 1997; 91:129–161.
Laragh JH: Renin profiling for the diagnosis, risk assessment and the treatment of hypertension. Kidney Int 1993; 44:1163.
Laragh JH, Baer L, Brunner HR, et al: Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. Am J Med 1972; 52:633.
Lazarus JG: The effects of lithium therapy on thyroid and thyrotropin-releasing hormone. Thyroid 1998; 8:909–913.
Lenders JW, Keiser HR, Goldstein DS, et al: Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. Ann Int Med 1995; 123:101–109.
Lenders JW, Pacak K, Walther MM, et al: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? JAMA 2002; 287:1427–1434.
Lentjes EG, Romijn F, Massen RJ, et al: Free cortisol in serum assayed by temperature-controlled ultrafiltration before fluorescence polarization immunoassay. Clin Chem 1993; 39:2518.
Levine LS: Congenital suprarrenal hyperplasia. In Lavin N (ed): Manual of Endocrinology and Metabolism, 3rd ed, Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2002, pp 147–162.
Lifton RP, Dluhy RG, Powers M: A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. Nature 1992; 355(6357):262–265.
Lindheimer MD, Davison JM: Osmoregulation, the secretion of arginine vasopressin and its metabolism during pregnancy. Eur J Endocrinol 1995; 132:133–143.
Linkowski P, Medlwicz J, Kerlhofs M, et al: 24-hr profiles of adrenocorticotropin, cortisol and growth hormone in major depressive illness: effect of anti-depressant treatment. J Clin Endocrinol Metab 1987; 65:141–152.
Lobo RA, Kletzky OA, Kaptein EM, et al: Prolactin modulation of dehydroepiandrosterone sulfate secretion. Am J Obstet Gynecol 1980; 138:632.
LoPresti JS, Eigen A, Kaptein E, et al: Alterations in 3,3′,5′-triiodothyronine metabolism in response to propylthiouracil, dexamethasone and thyroxine administration in man. J Clin Invest 1989; 84:1650–1656.
LoPresti JS, Nicoloff JT: Non-thyroidal illness in endocrinology, 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 665–675.
Lu FL, Yau KI, Tsai KS, et al: Longitudinal study of serum free thyroxine and thyrotropin levels by chemiluminescent immunoassay during infancy. Taiwan Erh K'o I Hseh Hui Tsa Chih 1999; 40:225–227.
Luft FC: Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 2002; 11:59–66.

Lum SM, Nicoloff JT: Peripheral tissue mechanism for maintenance of serum triiodothyronine values in a thyroxine-deficient state in man. J Clin Invest 1984; 73:570–575.

Lutfallah C, Wang W, Mason JI, et al: Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3-β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2002 87(6):2611–2622.

McLeod JF, Kovacs L, Gaskill MB, et al: Familial neurohypophyseal diabetes insipidus associated with a signal peptide mutation. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77:599A–599G.

Maghnie M, Cosi G, Genovese E, et al: Central diabetes insipidus in children and young adults. N Engl J Med 2000; 343:998–1007.

Magill SB, Raff H, Shaker JL, et al: Comparison of suprarrenal vein sampling and computed tomography in the differentiation of primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:1066–1071.

Martino E, Aghini-Lombardi F, Mariotti S, et al: Amiodarone: a common source of iodine-induced thyrotoxicosis. Horm Res 1987; 26:158–171.

Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE: The effects of amiodarone on the thyroid. Endoc Rev 2001; 22:240–254.

Masrorakos G, Weber JS, Magiakou MA, et al: Hypothalamic–pituitary–suprarrenal axis and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans: potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion. J Clin Endocrinol Metabol 1994; 79:934–939.

Meikle AW, Stringham JD, Woodward MG, Nelson JC: Hereditary and environmental influences on the variation of thyroid hormones in normal male twins. J Clin Endocrinol Metab 1988; 66(3):588–592.

Mendel CM, Frost PH, Kunitake ST, Cabalieri RR: Mechanism of the heparin-induced increase in the concentration of free thyroxine in plasma. J Clin Endocrinol Metab 1987 65:1259–1264

Merke DP, Bornstein SR, Avila NA, Chrousos GP: Future directions in the study and management of congenital suprarrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Intern Med 2002; 136:320–334.

Merke DP, Chrousos GP, Eisenhofer G, et al: Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. N Engl J Med 2000; 343:1362–1368.

Meurisse M, Gollogly MM, Degauque C, et al: Iatrogenic thyrotoxicosis: causal circumstances, pathophysiology and principles of treatment – review of the literature. World J Surg 2000; 24:1377–1385.

Mevorach RA, Bogaert GA, Kogan BA: Urine concentration and enuresis in healthy pre-school children. Arch Pediatr Adolesc Med 1995; 149(3):259–262.

Motte P, Vauzelle P, Garder P, et al: Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for mature calcitonin using monoclonal anti-peptide antibodies. Clin Chim Acta 1988; 174:35–54.

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature 1993; 363:458–460.

Nelson DH, Samuels LT: A method for the determination of 17-hydroxycorticosteroids in blood: 17-Hydroxycorticosterone in the peripheral circulation. J Clin Endocrinol Metab 1952; 12:519–526.

Nelson JC, Tindall DJ: A comparison of the suprarrenal responses to hypoglycemia, metyrapone and ACTH. Am J Med Sci 1978; 275:165–172.

Nelson JC, Wilcox RB: Analytical performance of free and total thyroxine assays. Clin Chem 1996; 42:146–154.

Nelson JC, Clark SJ, Borut DL, et al: Age-related changes in serum free thyroxine during childhood and adolescence. J Pediatr 1993; 123:899–905.

New MI: Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital suprarrenal hyperplasia). Am J Med 1995; 98:2S–8S.

New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, et al: Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. J Clin Endocrinol Metab 1983; 57:320–326.

Newell-Price J, Morris DG, Drake WM, et al: Optimal response criteria for the human CRH test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:1640–1645.

Newell-Price J, Trainer P, Besse M, Grossman A: The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. Endocr Rev 1998; 19:647–672.

Newell-Price J, Trainer PJ, Perry LA, et al: Single sleeping mid-night cortisol has 100% sensitivity for the diagnosis of Cushing's syndrome. Clin Endocrinol 1995; 43:545–550.

Nieman LK, Cutler GB Jr: The sensitivity of the urine free cortisol measurement as a screening test for Cushing's syndrome (abstract). In Programs and Abstracts of the Endocrine Society 72nd Annual Meeting, Atlanta, GA. Endocrine Soc, 1990, p 822.

Nieman LK, Cutler GB Jr, Oldfield EH, et al: The ovine corticotrophin-releasing hormone (CRH) stimulation test is superior to the human CRH stimulation test for the diagnosis of Cushing's disease. J Clin Endocrinol Metab 1989; 69:165–159.

Nilson JC, Clarke SJ, Borat DI, et al. Age related changes in serum free thyroxine during childhood and adolesence. J Pediatr 1993; 123:899–905.

Nohr SB, Jorgensen A, Pedersen KM, Laurberg P. Postpartum thyroid dysfunction in pregnant thyroid peroxidase antibody-positive women living in an area with mild to moderate iodine deficiency: Is iodine supplementation safe? J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:3191–198.

Nordenstrom A, Thilen A, Hadenfeldt L, et al: Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital suprarrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:1505.

Nussey SS, Soo SC, Gibson S, et al: Isolated congenital ACTH deficiency: A cleavage enzyme defect? Clin Endocrinol 1993; 39:381.

Oakley PW, Dawson AH, Whyte IM: Lithium: Thyroid effects and altered renal handling. Clin Toxicol 2000; 38:333–337.

Oelkers W: Suprarrenal Insufficiency. N Eng J Med 1996; 335(16):1206–1212.

Oelkers W, Diederich S, Bahr V: Diagnosis and therapy surveillance in Addison' s disease: Rapid adrenocorticotropin (ACTH) test and measurement of plasma ACTH, renin activity and aldosterone. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:259–264.

Orme SM, McNally RJ, Cartwright RA, Belchetz PE: Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:2730–2734.

Orth DN: Cushing's syndrome. N Engl J Med 1995; 332:791.

Pacak K, Chrousos GP, Koch CA, et al: Pheochromocytoma: progress in diagnosis, therapy and genetics. In Margioris A, Chrousos GP (eds): Suprarrenal Disorders, Vol 1. Totawa, Humana Press, 2001a pp 479–523.

Pacak K, Eisenhofer G, Carrasquillo JA, et al: 6-[^{18}F] fluorodopamine positron emission tomography (PET) scanning for diagnostic localization of pheochromocytoma. Hypertension 2001b 38:6–8.

Pacak K, Eisenhofer G, Ilias I: Diagnostic imaging of pheochromocytoma. Front Horm Res 2004; 31:76–106.

Pacini F, Fontanelli M, Fugazzola L, et al: Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:826–829.

Panesar NS, Li CY, Rogers MS: Reference intervals for thyroid hormones in pregnant Chinese women. Ann Clin Biochem 2001; 38:329–332.

Pang S, Lerner AJ, Stoner E: Late-onset suprarrenal steroid 3-β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. J Clin Endocrinol Metab 1985; 60:428–439.

Pang S, Levine LS, Lorenzen F, et al: Hormonal studies in obligate heterozygotes and siblings of patients with 11-β-hydroxylase deficiency congenital suprarrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 1980; 50:586–589.

Pang S, Murphey W, Levine LS, et al: A pilot newborn screening for congenital suprarrenal hyperplasia in Alaska. J Clin Endocrinol Metab 1982; 55:413–420.

Pang SY, Wallace MA, Hofman L: Worldwide experience in newborn screening for classical congenital suprarrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics 1988; 81:866–874.

Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I, Nieman L: Nighttime salivary cortisol: A useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:4515–4521.

Papanicolaou DA, Yanovski JA, Cutler GB Jr, et al: A single mid-night serum cortisol measurement distinguishes Cushing's disease from pseudo-Cushing state. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:1163–1167.

Parle JV, Masisonneuve P, Sheppard MC, et al: Prediction of all-cause and cardiovascular mortality in elderly people from one low serum thyrotropin result: a 10-year study. Lancet 2001; 358:861–865.

Pedersen KM, Laurberg P, Iversen E, et al: Amelioration of some pregnancy associated variation in thyroid function by iodine supplementation. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77:1078–1083.

Philomin V, Vassieres A, Jaouen G: New applications of carbonylmetalloimmunoassay (CMIA): A non-radioisotopic approach to cortisol assay. J Immuno Methods 1994; 171:201.

Piketty ML, D'Herbomez M, Le Guillouzic D, et al: Clinical comparison of three labeled-antibody immunoassays of free triiodothyronine. Clin Chem 1996; 42:933–941.

Pop VJ, De Vries E, Van Baar AL, et al: Maternal thyroid peroxidase antibodies during pregnancy: a marker of impaired child development? J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:3561–3566.

Pop VJ, Kuijpens JL, van Baar Al, et al: Low maternal free thyroxine concentrations during pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. Clin Endocrinol 1999; 50:147–148.

Porter CC, Silber RH: A quantitative color reaction for cortisone and related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids. J Biol Chem 1950; 185:201–207.

Prazeres S, Santos MA, Ferreira HG, Sobrinho LG: A practical method for the detection of macroprolactinaemia using ultrafiltration. Clin Endocrinol (Oxf) 2003; 58(6):686–690.

Putignano P, Toja P, Dubini A, et al: Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:4153–4157.

Radetti G, Persani L, Moroder W, et al: Transplacental passage of anti-thyroid auto-antibodies in a pregnant woman with auto-immune thyroid disease. Prenat diagn 1999; 19:468–471.

Radin DR, Manoogian C, Nadler JL: Diagnosis of primary hyperaldosteronism: Importance of correlating CT findings with endocrinologic studies. AJR Am J Roentgenol 1992; 158:553.

Raff H, Findling JW: A physiologic approach to diagnosis of the Cushing syndrome. Ann Intern Med 2003; 138:980–991.

Rajasoorya C, Holdaway IM, Wrightson P, et al: Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:95–102.

Refetoff S: Thyroid hormone resistance syndrome. In The Thyroid, 6th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1991.

Reihman DH, Farber MO, Heath DA: Effect of hypoxemia on sodium and water excretion in chronic obstructive lung disease. Am J Med 1985; 78:87–94.

Rigg LA, Lein A, Yen SSC: Pattern of increase in circulating prolactin levels during human gestation. Am J Obstet Gynecol 1977; 129:454–456.

Rivier C, Vale W: Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotrophin-releasing factor. Regul Pept 1983; 7:253–258.

Robbins J: Thyroid hormone transport protein and the physiology of hormone binding. In Gray CH, James VHT (eds): Hormones in Blood. London, Academic Press, 1996, pp 96–110.

Robertson GL: The use of vasopressin assays in physiology and pathophysiology. Semin Nephrol 1994; 14(4):368–383.

Rocha R, Steir CT, Kifor I, et al: Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. Endocrinology 2000; 141:3871–3878.

Rose S, Ross J, et al: The advantage of measuring stimulated as compared with spontaneous growth hormone levels in the diagnosis of growth hormone deficiency. N Engl J Med 1988; 319:201–207.

Rosler A, Weshler N, Leiberman E, et al: 11 Beta-hydroxylase deficiency congenital suprarrenal hyperplasia: update of prenatal diagnosis. J Clin Endocrinol Metab 1988; 66:830–838.

Ross DS: Subclinical hyperthyroidism. In Braverman LE, Utiger RD (eds): Werner and Jngbar's The Thyroid: a Fundamental and Clinical Text, 6th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1991, pp 1249–1255.

Roth J, Taatjes D, Lucocq J, et al: Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. Cell 1985; 43:287–295.

Rudd BT: Measurement of urine 17-oxogenic steroids, 17-hydroxycorticosteroids, and 17-oxosteroids has been superseded by better tests. Br Med J 1985; 291:805.

Samaan GJ, Porquet D, Demelier JF, et al: Determination of cortisol and associated glucocorticoids in serum and urine by an automated liquid chromatographic assay. Clin Biochem 1993; 26:153.

Samuels MH, Veldhuis JD, Henry PM, et al: Pathophysiology of pulsatile and copulsatile release of thyroid-stimulating hormone, and alpha subunit. J Clin Endocrinol Metab 1990; 71:425.

Sapin R, Schliener JL, Kaltenbach G, et al: Determination of free triiodothyronine by six different methods in patients with non-thyroid illness and in patients treated with amiodarone. Ann Clin Biochem 1993; 32:314–324.

Sassin JF, Frantz AG, Weitzman ED, Kapen S. Human prolactin: 24-hour pattern with increased release during sleep. Science 1972; 177:120–1207.

Sawin CT, Geller A, Kaplan MM, et al: Low serum thyrotropin (thyroid stimulating hormone) in older persons with hyperthyroidism. Arch Intern Med 1991; 151:165–168.

Sawin CT, Geller A, Wolf PA, et al: Low serum thyrotropin concentrations as risk factor for atrial fibrillation in older persons. N Engl J Med 1994; 331:1249–1252.

Sawin CT, Herman T, Molitch ME, et al: Aging and the thyroid: decreased requirement for thyroid hormone in older hypothyroid patients. Am J Med 1983; 75:206–209.

Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, Young WF Jr: A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: Measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:553–558.

Scheithauer BW, Sano T, Kovacs KT, et al: The pituitary gland in pregnancy: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. Mayo Clin Proc 1990; 65:461–474.

Schlumberger MCP, Fragu P, Lumbroso J, et al: Circulating thyrotropin and thyroid hormones in patients with metastases of differentiated thyroid carcinoma: Relationship to serum thyrotropin levels. J Clin Endocrinol Metab 1980; 51:513–519.

Schunkert H, Hense HW, Muscholl M, et al: Associations between circulating components of the renin–angiotensin–aldosterone system and left ventricular mass. Heart 1997; 77:24–31.

Schutte HM, Chrousos GP, Avergerinos P, et al: The corticotrophin-releasing hormone stimulation test: a possible aid in the evaluation of patients with suprarrenal insufficiency. J Clin Endocrinol Metab 1984; 58:1064–1067.

Sergev O, Racz K, Varga I, et al: Atrial natriuretic peptide in normal and low renin essential hypertension. Kidney Int 1990 30:S107–S108.

Sheps SG, Jiang NS, Klee GG, et al: Recent developments in the diagnosis and treatment of pheochromocytoma. Endo Rev 1994; 15:356–368.

Shupnik MA, Greenspan SL, Ridgway EC: Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine pituitary cell cultures. J Biol Chem 1986; 261:12675–12679.

Sjoberg RJ, Simcic KJ, Kidd GS: The clonidine suppression test for pheochromocytoma. A review of its utility and pitfalls. Arch Int Med 1992; 152:1193–1197.

Skamene A, Patel YC. Infusion of graded concentrations of somatostatin in man: pharmaco-kinetics and differential inhibitory effects on pituitary and islet hormones. Clin Endocrinol 1984; 20:555–564.

Snow K, Jiang N, Kao PC, et al: Biochemical evolution of suprarrenal dysfunction: The laboratory perspective. Mayo Clin Proc 1992; 67:1055.

Sonkodi S, Abraham G, Mohacsi G: Effects of nephrectomy on hypertension, renin activity and total renal function in patients with chronic renal artery occlusion. J Hum Hypertens 1990; 4(3):277–279.

Speckart PF, Nicoloff JT, Bethune JE: Screening for adrenocortical insufficiency with Cosyntropin (synthetic ACTH). Arch Intern Med 1971; 128:761–763.

Speiser PW, White P: Congenital suprarrenal hyperplasia. N Engl J Med 2003; 349:776–788.

Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, et al: High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet 1985; 37:650–667.

Spencer CA: Clinical evaluation of free T4 techniques. J Endocrinol Invest 1986; 9:57–66.

Spencer CA, Nicoloff JT: Serum TSH measurement: A 1990 status report. Thyroid Today 1990; 13:1–12.

Spencer CA, Wang CC: Thyroglobulin measurement: Techniques, clinical benefits and pitfalls. Endocrinol Metab Clin N Amer 1995; 24:841–863.

Spencer CA, LoPresti JS, Fatema S, Nicoloff JT: Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurement. Thyroid 1999; 9:435–441.

Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, et al: Applications of new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurements. J Clin Endocrinol Metab 1990; 70:453–460.

Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M: Current status and performance goals for serum thyroglobulin (TSH) assays. Clin Chem 1996; 42:140–145.

Stewart PM: The suprarrenal cortex. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (eds): Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, Saunders, 2003, pp 491–551.

Um dos livros-textos de referência em endocrinologia geral mais bem escritos e respeitados. O capítulo sobre as suprarrenais é claro, conciso e contém boas referências.

Streeten DHP, Tomycz N, Anderson GH: Reliability of screening methods for the diagnosis of primary aldosteronism. Ann J Med 1979; 67:403.

Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ: Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemia in patients before the introduction of macroprolactin screening: Application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. Clin Chem 2003; 49(9):1504–1509.

Surks MI, Chopra IJ, Maraish CN, et al: American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. JAMA 1990; 263:1529–1532.

Surks MI, Sievert R: Drugs and thyroid function. N Engl J Med 1995; 333:1688–1694.

Swearingen B, Barker FG II, Katznelson L, et al: Long-term mortality after transphenoidal surgery and adjunctive therapy for acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:3419–3426.

Talbot JA, Lambert A, Anobile CJ, et al: The nature of human chorionic gonadotrophin glycoforms in gestational thyrotoxicosis. Clin Encrinol 2001; 55:33–39.

Taylor HC, Mayes D, Anton AH: Clonidine suppression test for pheochromocytoma: Examples of misleading results. J Clin Endocrinol Metab 1986; 63:238–242.

Taylor RL, Singh RJ: Validation of liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for analysis of urinary conjugated metanephrine and normetanephrine for screening of pheochromocytoma. Clin Chem 2002; 48:533–539.

Thalen BE, Kjellman BF, Ljunggren JG, et al: Release of corticotrophin after administration of corticotrophin releasing hormone in depressed patients in relation to the dexamethasone suppression test. Acta Psychiatr Scand 1993; 87:133.

Therrell BL: Newborn screening for congenital suprarrenal hyperplasia. Endocrinol Metab Clin North Am 2001; 21:245–291.

Toldy E, Locsei Z, Szabolcs I, et al: Macroprolactinemia: the consequences of a laboratory pitfall. Endocrine 2003; 22(3): 267–273.

Trainer P: Editorial: Acromegaly – consensus, what consensus? J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(8):3534–3536.

Tuchman M, Morris C, et al: Value of random urinary homovanillic acid levels in the diagnosis and management of patients with neuroblastoma. Comparison of 24-hour urine collections. Pediatrics 1985; 75:324–328.

Tullis MJ, Caps MT, Zierler RE: Blood pressure, antihypertensive medication and atherosclerotic renal artery stenosis. Am J Kidney Dis 1999; 33(4):675–681.

Utiger R: Decreased extrathyroidal triiodothyronine production and nonthyroidal illness: Benefits or harm? Am J Med 1980; 69:807–810.

Van Cauter E: Slow wave sleep and release of growth hormone. JAMA 2000; 284:2717–2718.

Van Cauter E, Plat L, Copinschi G: Interrelations between sleep and the somatotropic axis. Sleep 21:553–566.

Van den Berghe G, De Zegher F, Bouillon R: Acute and prolonged critical illness as different neuroendocrine paradigms. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:1827–1834.

Van den Berghe G: Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. Eur J Endocrinol 2000; 143:1–3.

Van Heyningen V: One gene – four syndromes. Nature 1994; 367:319–20.

Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, et al: The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty year follow up of the Whickham survey. Clin Endocrinol 1995; 43:55–68.

Vassart G, Dumont JE: Identification of polysomes synthesizing thyroglobulin. Eur J Biochem 1973a; 32(2):322–330.

Vassart G, Brocas H, Nokin P, Dumont JE: Translation in Xenopus oocytes of thyroglobulin mRNA isolated by poly(U)-Sepharose affinity chromatography. Biochim Biophys Acta 1973b; 324(4):575–580.

Vieira AEF, Mello MP, Elias LLK, et al: Molecular and biochemical screening for the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type 2A. Horm Metab Res 2002; 34:202–206.

Vistorina WM, Rydstedt LL, Sowers JR: Clinical disorders of vasopressin. In Lavin N (ed): Manual of Endocrinology and Metabolism, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2002, pp 68–82.

Vitale G, Ciccarelli A, Caraglia M, et al: Comparison of two provocative tests for calcitonin in medullary thyroid carcinoma: omeprazole vs pentagastrin. Clin Chem 2002; 48(9):1505–1510.

Volin P: Simultaneous determination of serum cortisol and cortisone by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. J Chromatogr 1992; 584:147.

Walker SE, Allen SH, McMurray RW: Prolactin and autoimmune disease. Trends Endocrinol Metab 1993; 4:47–151.

Wardle CA, Fraser WD, Squire CR: Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid-function test. Lancet 2001; 357:1013–1014.

Wartofsky L, Burman KD: Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the 'euthyroid sick syndrome.' Endocrinol Rev 1982; 3:164–217.

Weeke J, Dybkjaer L, Granlie K, et al: A longitudinal study of serum TSH and total and free iodothyronines during normal pregnancy. Acta Endocrinol 1982; 101:531–57.

Weinberger MH, Fineberg NS: The diagnosis of primary aldosteronism and separation of two major subtypes. Arch Intern Med 1993; 153:2125.

Weise M, Drinkard B, Mehlinger SL, et al: Stress dose of hydrocortisone is not beneficial in patients with classic congenital suprarrenal hyperplasia undergoing short--term, high-intensity exercise. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3679.

Weise M, Merke DP, Pacak K, et al: Utility of plasma free metanephrines for detecting childhood pheochromocytoma. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:1955–1960.

Wells SA, Baylin SB, Linehan W, et al: Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. Ann Surg 1978; 188:139–141.

Werbel SS, Ober KP: Pheochromocytoma. Update on diagnosis, localization and management. Med Clin North Am 1995; 79(1):131–153.

White MC, Clark AJL: The cellular and molecular basis of the ectopic ACTH syndrome. Clin Endocrinol 1993; 39:131.

White PC, Curnow KM, Pascoe L: Disorders of steroid 11-beta-hydroxylase isoenzymes. Endocr Rev 1994b; 15:421–438.

White PC, Tusie-Lina MT, New MI, et al: Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). Hum Mutat 1994a; 3:373.

Whitehouse WM Jr, Kazmers A, Zelenock GB: Chronic

total renal artery occlusion: effects of treatment of secondary hypertension and renal function. Surgery 1981; 89(6):753–763.

Wilcox RB, Nelson JC, Tomei RT: Heterogeneity in affinities of serum proteins for thyroxine among patients with non-thyroidal illness as indicated by the serum free thyroxine response to serum dilution. Eur J Endocrinol 1994; 131:9–13.

Willie S, Aili M, Harris A, et al: Plasma and urinary levels of vasopressin in enuretic and non-enuretic children. Scand J Urol Nephrol 1994; 28:119–122.

Wion-Barbot N, Schuffenecker I, Niccoli P, et al: Results of the calcitonin stimulation test in normal volunteers compared with genetically unaffected members of MEN 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. Ann Endocrinol 1997; 58:302–308

Yanovski JA, Cutler GB Jr, Chrousos GP, Nieman LK: Corticotropin-releasing hormone stimulation following low-dose dexamethasone administration. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. JAMA 1993; 269:2232–2238.

Yazigi R, Quinero C, et al: Prolactin disorders. Fertil Steril 1997; 7:215–225.

Yokoyama Y, Ueda T, Irahara M, et al: Release of oxytocin and prolactin during breast massage and suckling in puerperal women. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1994; 53:17–20.

Young WF Jr: Primary aldosteronism: A common and curable form of hypertension. Cardiol Rev 1999; 7(4):207–214.

Yuasa H, Ito M, Nagasaki H, et al: Glu-47, which forms a salt bridge between neurophysin II and arginine vasopressin is deleted in patients with familial central diabetes insipidus. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77:600–604.

Zerbe RL, Robertson GL: Vasopressin function in the syndrome of inappropriate antidiuresis. Ann Rev Med 1980; 31:315–327.

Zerbe RL, Robertson GL: Osmotic and nonosmotic regulation of thirst and vasopressin secretion. In Maxwell MH, Kleeman CR, Narins RG (eds): Clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism, 4th ed, New York, McGraw-Hill, 1987.

Zerbe RL, Robertson GL: A comparison of plasma vasopressin measurements with a standard indirect test in the differential diagnosis of polyuria. New Eng J Med 1981; 304:1539–1546.

Zurakowski D, Di Canzio J, Majzoub JA: Pediatric reference intervals for serum thyroxine, triiodothyronine, thyrotropin and free thyroxine. Clin Chem 1999; 45:1087–1091.

CAPÍTULO 25

Função reprodutiva e gravidez

Robert A. Webster PhD

Fisiologia normal	**427**
Esteroides sexuais	427
Regulação da reprodução masculina	429
Regulação da reprodução feminina	429
Gravidez	430
Avaliação laboratorial da função reprodutiva	**431**
Avaliação do homem	431
Avaliação da mulher	434
Tecnologia reprodutiva assistida (TRA)	435
Avaliação laboratorial da gravidez	**436**
GCH e gravidez precoce	436
Defeitos do tubo neural	437
Síndrome de Down	438
Eritroblastose fetal	439
Diabetes gestacional	440
Maturidade pulmonar fetal	440
Toxemia da gravidez (pré-eclâmpsia)	441
Rompimento precoce das membranas	441
Asfixia fetal	442
Outras avaliações	442
Referências bibliográficas	**442**

PONTOS-CHAVE

- A função reprodutiva e a gravidez são reguladas por interações complexas que envolvem uma variedade de hormônios, os quais são sintetizados e secretados pelos testículos (testosterona), ovários (estradiol e progesterona), hipófise (FSH e LH), hipotálamo (GnRH) e placenta (GCH, estrógenos e progesterona).
- A avaliação laboratorial da função reprodutiva masculina normalmente começa com a análise do sêmen. Se os resultados forem normais, uma avaliação mais aprofundada pode ser desnecessária. Se os resultados forem anormais, torna-se importante determinar os níveis séricos hormonais, em particular da testosterona, do FSH e do LH.
- Na mulher, uma disfunção reprodutiva, muitas vezes, é indicada pela presença de anorreia e/ou infertilidade. A avaliação laboratorial, assim como para o homem, envolve a determinação dos níveis séricos de hormônios, em particular do GCH, PRL, TSH, FT4, FSH e andrógenos.
- A infertilidade pode ser tratada por meio de várias tecnologias de reprodução assistida (TRAs). Estas envolvem uma variedade de manipulações clínicas, todas direcionadas ao máximo controle externo possível do processo reprodutivo, a fim de alcançar a elevar a termo a gravidez. O monitoramento dos níveis séricos hormonais (estradiol, progesterona e GCH) exerce importante papel nesses protocolos.
- A gravidez precoce é monitorada pela determinação da concentração sérica de GCH e detecção de um padrão acentuadamente aumentado durante o primeiro semestre, conforme as expectativas.
- O risco de ocorrência das deformidades inatas mais comuns, defeitos de tubo neural (DTNs) e síndrome de Down (SD) é determinado no início do segundo trimestre, por meio de triagem do soro materno para quantificação dos níveis de AFP, GCH e estradiol não conjugado (uE3).
- A doença fetal hemolítica (eritroblastose fetal) é monitorada por estimação espectrofotométrica da concentração de bilirrubina no líquido amniótico.
- O status da maturação pulmonar fetal é estimado a partir da avaliação do surfactante pulmonar no líquido amniótico. Essa avaliação pode ser realizada por meio de vários métodos, incluindo a determinação (1) da proporção lecitina/esfingomielina (L/E) e fosfatidilglicerol (FG) por cromatografia, ou (2) da microviscosidade por fluorescência polarizada.
- A toxemia da gravidez – ou pré-eclâmpsia – é caracterizada por hipertensão e proteinúria, portanto, pode ser monitorada de acordo com a determinação da concentração de proteína na urina.
- O rompimento precoce de membranas pode ser avaliado por imunoensaio para fibronectina em amostras de líquido amniótico.

Fisiologia normal

A função reprodutiva normal é mediada por vários hormônios sintetizados e secretados pelas gônadas (testículos e ovários), suprarrenais, hipófise, hipotálamo e placenta. Além disso, os tecidos periféricos não glandulares também podem contribuir com a síntese hormonal. Mediadores parácrinos e autócrinos também estão envolvidos, porém quase sempre suas funções exatas são desconhecidas.

Esteroides sexuais

Os testículos e ovários sintetizam esteroides sexuais (andrógenos e estrógenos) a partir do colesterol, pela via inicial também utilizada pelas glândulas suprarrenais para sintetizar mineralocorticoides, glicocorticoides e andrógenos (Fig. 25.1). O hormônio secretado especificamente pela glândula endócrina está sujeito à presença e atividades relativas de várias enzimas atuantes na via de esteroides. Enquanto as suprarrenais sintetizam andrógenos, como a deidroepiandrosterona (DHEA), o sulfato de DHEA (DHEAS) e a androstenediona, os testículos metabolizam esses esteroides primariamente em testosterona. O ovário converte a testosterona em estradiol e a androstenediona em estrona. Os tecidos periféricos (incluindo aqueles que são alvo dos andrógenos) reduzem a testosterona a deidrotestosterona (DHT). Como a DHT é 2 ou 3 vezes mais potente do que a testosterona, esse processo resulta em um efeito androgênio aumentado ou ativado. Os tecidos periféricos, entre os quais o fígado, também hidroxilam o estradiol a estriol, cuja potência estrogênica equivale a apenas um centésimo da potência de seu precursor. Durante a gravidez, o estriol é sintetizado por uma via diferente e pode exercer papel igualmente distinto daquele do estradiol (ver adiante). Os tecidos periféricos também convertem andrógenos suprarrenais em testosterona e andrógenos em estrona e estradiol, sendo que esse último está presente no tecido adiposo. A potência da estrona equivale a cerca de um décimo da potência do estradiol. Repare que, embora a progesterona atue como intermediária na síntese de todos os hormônios esteroides, também atua como esteroide sexual por si só nas mulheres.

Como ocorre com qualquer hormônio, os esteroides sexuais atuam em sítios teciduais distantes aos de seus sítios de síntese e secreção. Uma vez no sangue, a maioria dos esteroides sexuais hidrofóbicos se liga tanto de modo reversível e não covalente às proteínas plasmáticas. Essa interação inclui ligação inespecífica de baixa afinidade aos sítios hidrofóbicos da albumina, bem como ligação de alta afinidade a proteínas transportadoras específicas sintetizadas pelo fígado. A globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG, *sex hormone-binding globulin*) transporta andrógenos e estrógenos, enquanto a globulina ligadora de corticosteroides

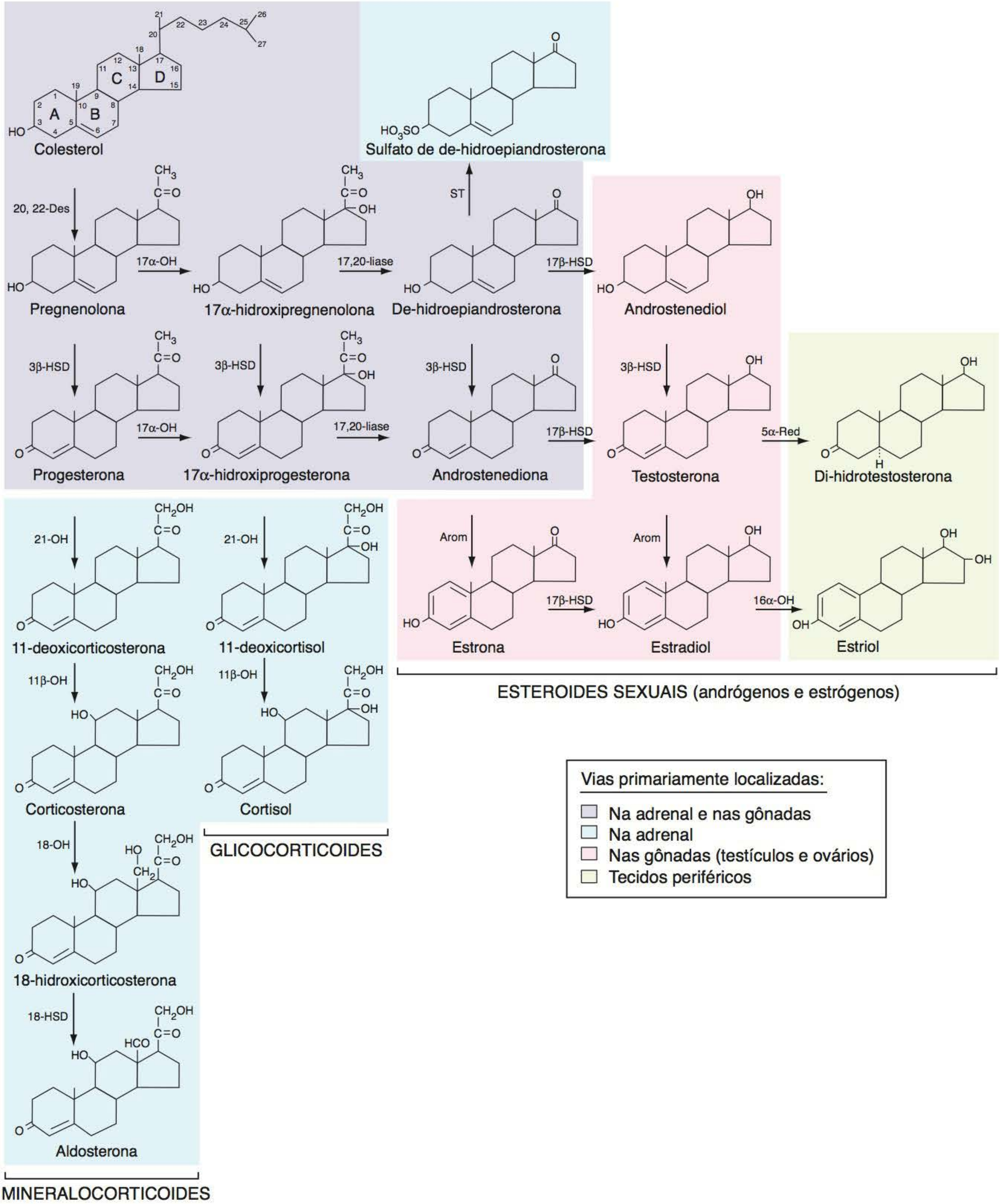


Figura 25.1 Síntese de hormônios esteroides. Abreviações dos nomes das enzimas: 20,22-Des = 20,22 desmolase; 3β-HSD = 3β-hidroxiesteroide desidrogenase; 21-OH = 21-hidroxilase; 11β-OH = 11β-hidroxilase; 18-OH = 18-hidroxilase; 18-HSD = 18-hidroxiesteroide desidrogenase; 17α-OH = 17α-hidroxilase; 17β-HSD = 17β-hidroxiesteroide desidrogenase; ST = sulfotransferase; Arom = aromatase; 5α-Red = 5α-redutase; 16α-OH = 16α-hidroxilase.

(CBG, corticosteroid-binding globulin) transporta a progesterona (e também os glicocorticoides). No sangue, somente cerca de 1 a 2% dos esteroides sexuais estão na forma livre (não ligados). Cerca de metade do conteúdo restante está ligado a SHBG ou a CBG, e o restante está ligado à albumina. Somente a fração livre é biologicamente ativa, visto que só o hormônio livre pode estar presente no sistema vascular (por difusão) e interagir com as células-alvo.

Cada esteroide se liga com alta afinidade aos receptores proteicos específicos que ativam ou inativam genes na célula-alvo. Assim, um mesmo hormônio é capaz de desencadear respostas diferentes, conforme o tipo

de célula-alvo. A potência do efeito de um hormônio esteroide (p. ex., efeito androgênico) é uma função primária de sua afinidade pelo receptor proteico específico e da afinidade do complexo pelos sítios aceptores de cromatina. Desse modo, o DHT é um andrógeno mais potente do que a testosterona. DHEA e androstenediona ligam-se apenas fracamente, quando se ligam, ao receptor de andrógenos. Em consequência, produzem baixo efeito androgênico e a maior parte de sua atividade androgênica (senão toda) deriva da conversão periférica da testosterona.

Regulação da reprodução masculina

A Figura 25.2 resume a regulação da reprodução no homem. O hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH, gonadotropin-releasing hormone) é um decapeptídeo sintetizado e secretado por células neuroendócrinas do hipotálamo, principalmente do núcleo arqueado. O GnRH se liga a receptores específicos existentes na membrana celular dos gonadotrofos localizados na adeno-hipófise, resultando na síntese e secreção de dois hormônios proteicos, hormônio folículo-estimulante (FSH, follicle-stimulating hormone) e hormônio luteinizante (LH), nomeados segundo os efeitos que exercem nas mulheres. Ambos, FSH e LH, são semelhantes aos hormônio estimulador da tireoide (TSH, thyrotrophin-stimulating hormone), sendo constituídos por duas subunidades e compartilhando a mesma subunidade α. Entretanto, diferem quanto à subunidade β que lhes confere a especificidade funcional.

Os túbulos seminíferos dos testículos contêm células em vários estágios de espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides), além das células de Sertoli e das células de Leydig. O FSH induz as células de Sertoli a sintetizarem e secretarem a proteína ligadora de andrógenos (ABP, androgen-binding protein) no lúmen dos túbulos seminíferos. A secreção de ABP, então, mantém elevada a concentração de testosterona para atender às necessidades do processo de espermatozoidogênese normal. O LH induz as células de Leydig a sintetizarem testosterona. Parte segue para a circulação geral e é transportada a outros tecidos, como o músculo esquelético, onde exerce efeito anabólico. Um pouco da testosterona é transportada até o hipotálamo e a glândula adeno-hipófise, onde exerce retroalimentação (feedback) negativa – diminui a síntese e secreção de GnRH, FSH e LH, com consequente redução da síntese de testosterona pelas células de Leydig.

As células de Sertoli também sintetizam e secretam outro hormônio proteico – a inibina. Este hormônio, por sua vez, interage com as gonadotrofinas na adeno-hipófise, onde exerce efeito de retroalimentação negativa: diminui a síntese e a secreção de FHS, mas não a de LH. O papel exato da inibina no processo regulatório é desconhecido.

Regulação da reprodução feminina

A Figura 25.3 resume a regulação da reprodução feminina. Assim como no homem, o GnRH oriundo do hipotálamo aumenta a síntese e secreção de FSH e LH a partir da adeno-hipófise. Por outro lado, diferente do que ocorre no homem, o processo regulatório feminino é cíclico e referido como ciclo menstrual. As alterações que ocorrem na hipófise, ovários e útero ao longo dos 28 dias do ciclo menstrual estão ilustradas de forma resumida na Figura 25.4. De acordo com a ilustração, o ciclo tem início com a menstruação ou desprendimento do endométrio uterino. Durante esse período, no ovário, um grupo de folículos é "recrutado" para crescer e se desenvolver. Nesse grupo, um folículo (usualmente) é "selecionado" para ser o folículo dominante e, assim, continua a crescer e a se desenvolver. Os demais folículos recrutados sofrem regressão ou atresia. Esses processos ocorrem durante a fase folicular do ciclo ovariano como resultado da ação do FSH. Na medida em que o folículo cresce, quantidades maiores de estradiol são sintetizadas e secretadas. O estradiol restaura o endométrio, promovendo proliferação e crescimento celular – tem início a fase proliferativa do ciclo endometrial uterino. Esse hormônio também exerce retroalimentação negativa no hipotálamo e na adeno-hipófise, provocando o declínio dos níveis de FSH tardiamente durante a fase folicular.

Perto do final da fase folicular, quando os níveis de estradiol atingem seu pico, o efeito de retroalimentação no hipotálamo e na adeno-hipófise é revertido e se torna positivo. O mecanismo dessa reversão negativo-positivo da retroalimentação é desconhecido. Seu efeito, contudo, é dramático: provoca uma onda de secreção de GnRH, FSH e, principalmente, de LH, que culmina na ovulação. O oócito entra no oviduto.

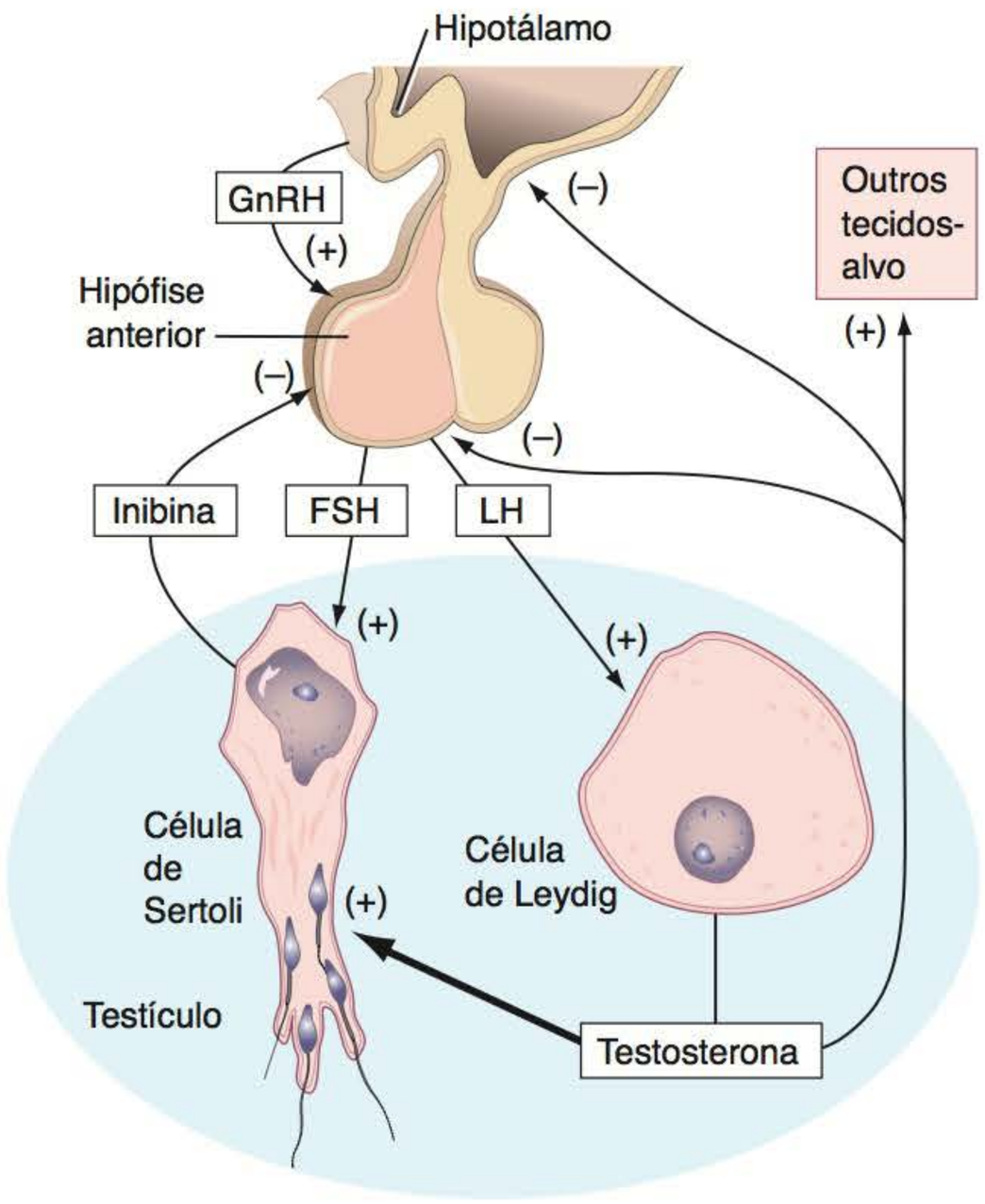


Figura 25.2 Regulação da reprodução no homem.

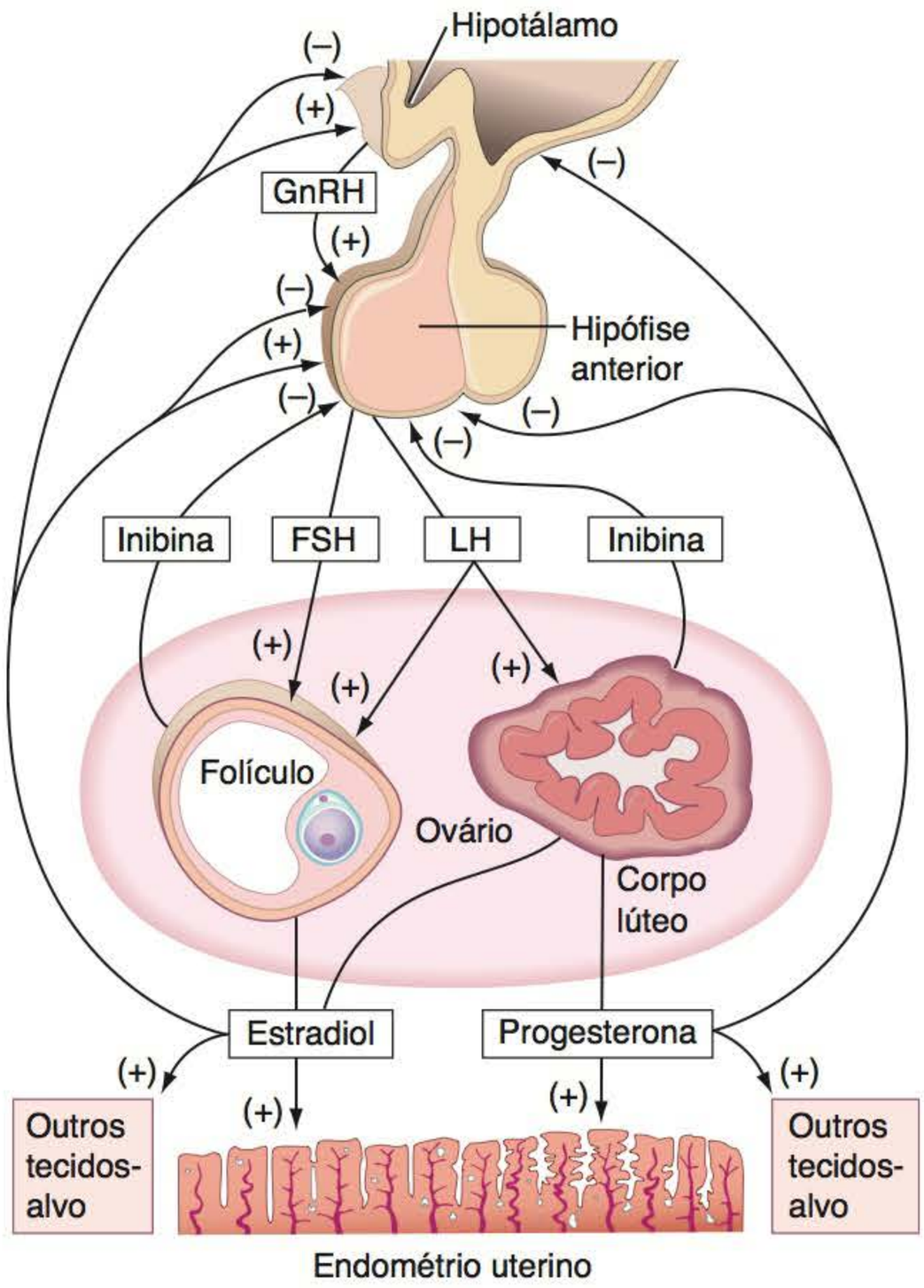


Figura 25.3 Regulação da reprodução na mulher.

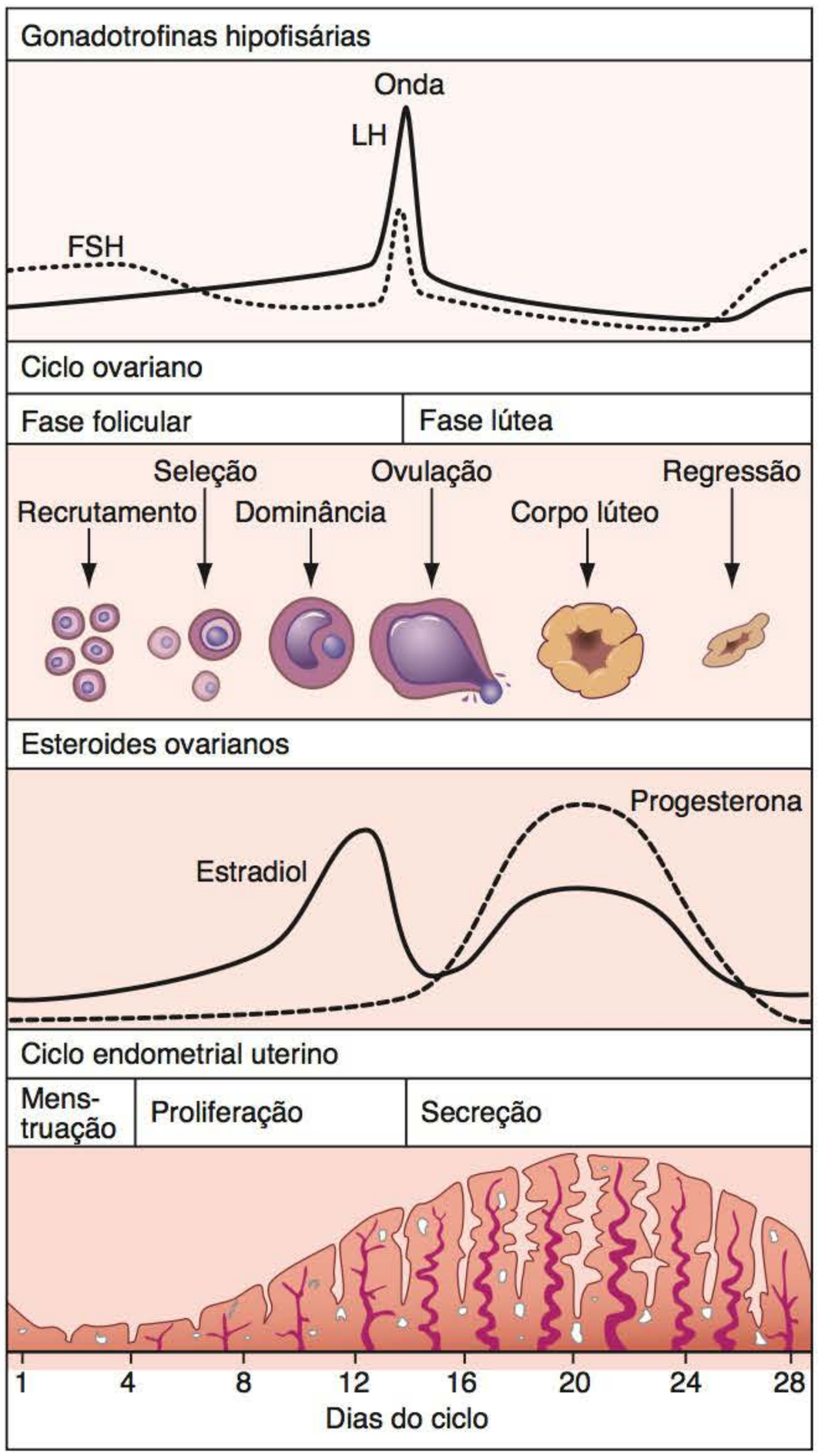


Figura 25.4 Alterações hipofisárias, ovarianas e uterinas, durante o ciclo menstrual.

Devido à ruptura do folículo, a síntese e secreção do estradiol sofrem uma queda marcante. O folículo rompido começa a se diferenciar em corpo lúteo – tem início a fase lútea do ciclo ovariano. O corpo lúteo sintetiza estradiol e progesterona em decorrência da ação do LH. Os dois esteroides combinados atuam sobre o endométrio uterino e promovem o desenvolvimento de inúmeras glândulas exócrinas, dando início à fase secretória do ciclo endometrial uterino. Essa fase prepara o endométrio para a implantação, caso ocorra fertilização e desenvolvimento precoce. Os níveis de LH declinam gradualmente durante a fase lútea, indicando a restauração da regulação por retroalimentação negativa do estradiol e da progesterona no hipotálamo e na adeno-hipófise.

Assim como no homem, a inibina exerce retroalimentação negativa seletiva sobre o FSH. Entretanto, na mulher, existem duas formas diferentes. Uma delas é sintetizada e secretada por folículos em desenvolvimento (inibina B),a outra é oriunda do corpo lúteo (inibina A) (Welt, 1999). Mais uma vez, são desconhecidos os papéis regulatórios exatos desempenhados por esses hormônios.

No ciclo em que não há fertilização, o corpo lúteo começa a regredir ao final da fase lútea. Como resultado, há diminuição da síntese e secreção de estradiol e progesterona. Como esses esteroides são necessários à manutenção do endométrio secretor, eles começam a se deteriorar, até serem eliminados durante a menstruação. Com a queda dos níveis de estradiol e progesterona, os efeitos de retroalimentação negativa desses hormônios também diminuem, enquanto os níveis de FSH e LH aumentam para iniciar um novo ciclo.

Gravidez

Quando é fertilizado ao transitar oviduto abaixo, o oócito se desenvolve num blastocisto multicelular, no momento em que atinge o útero. No momento da implantação (cerca de 9 dias após a ovulação), e antes do corpo lúteo começar a regredir, quantidades crescentes de um hormônio análogo ao LH – a gonadotrofina coriônica humana (GCH) – são detectadas no sangue materno. A GCH é sintetizada e secretada pelas células trofoblásticas da placenta em desenvolvimento. Trata-se de um hormônio proteico dimérico, que possui a mesma subunidade α do LH, FSH e TSH, cuja subunidade β é diferente. Sua subunidade β é muito parecida com a do LH, porém é maior. Sendo assim, a GCH consegue interagir com os receptores de LH existentes nas células lúteas. Essa interação previne a regressão do corpo lúteo e garante a manutenção da síntese e secreção de estradiol e progesterona, que são necessários à manutenção apropriada do endométrio uterino no decorrer de toda a gravidez.

Durante o primeiro trimestre de gravidez, a concentração de GCH sobe de < 5 mUI/mL de soro para > $1 \cdot 10^5$ mUI/mL de soro (Fig. 25.5). Tal aumento é responsável pelos aumentos marcantes e semelhantes dos níveis de estradiol e progesterona. Ao fim do primeiro trimestre, contudo, os níveis de GCH declinam significativamente. Os níveis de estradiol e progesterona continuam a aumentar, pois a placenta, a partir desse momento, passa a ser a fonte mais significativa de estrona e estriol. Diferente do observado com a GCH, os níveis desses esteroides aumentam à medida em que a placenta cresce. Esteroides intermediários provenientes da glândula suprarrenal e fígado fetais também contribuem para o processo. Exemplificando, o estriol não é sintetizado a partir da hidroxilação do estradiol (Fig. 25.1), mas pela conversão a partir de 16-hidroxi-DHEAS. Isso explica o porquê de as quantificações do estriol materno serem historicamente utilizadas para avaliar o bem-estar do feto ao final da gestação (Carr, 2004). A potência estrogênica do estriol equivale apenas a cerca de um centésimo da potência do estradiol e somente a um décimo da potência da estrona. No entanto, o estriol promove um fluxo sanguíneo útero-placenta de modo quase tão potente quanto os demais estrógenos, e isso pode explicar a dramática elevação de seus níveis, observada durante os dois últimos trimestres (Resnik, 1974).

O lactógeno plancetal humano (HPL, human placental lactogen) é outro hormônio sintetizado em grande quantidade pela placenta durante os dois trimestres finais. Apresenta semelhança estrutural com a prolactina (PRL) e o hormônio do crescimento. Possui atividades tanto lactogênicas como promotoras do crescimento, embora sejam relativamente fracas. Além disso, o HPL é antagonista da insulina e, como tal, atua na utilização da glicose materna. Por outro lado, seu papel exato permanece desconhecido, uma vez que foram descritas gestações aparentemente normais em que esse hormônio não é detectado no sangue ou na placenta materna (Sideri, 1983). Diferente da GCH, também ocorre aumento dos níveis de HPL paralelamente ao crescimento da massa placentária (Carr, 2004).

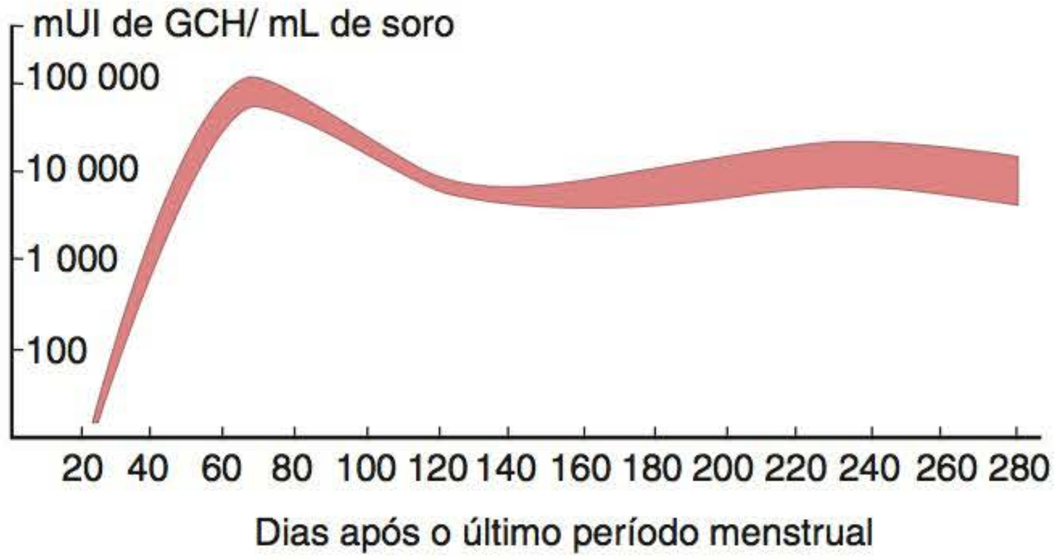


Figura 25.5 Níveis de GCH durante a gravidez normal. (De Lau, HL: Testing for pregnancy. In: Hagerstown, MD: Practice of Medicine, Vol II. Harper & Row, 1975, Ch 29; and Braunstein GD, Rasor J, Adler D, Danzer H, Wade ME: Am J Obstet Gynecol 1976; 126:678.)

A placenta também sintetiza inibina. Enquanto a inibina gonadal (testículos e ovários) atua como inibidor endócrino da secreção hipofisária de FSH, a inibina placentária pode atuar como inibidor parácrino ou autócrino da secreção de GCH placentária (Mesiano, 2004). Seu papel regulatório exato, contudo, ainda precisa ser elucidado.

O parto é o processo pelo qual o feto é expulso do ambiente interno – o útero materno – para o ambiente externo. Ocorre como resultado de uma alteração da atividade do miométrio uterino (musculatura lisa), em que as contrações irregulares, prolongadas e incontínuas passam a ser regulares, fortes e muito frequentes. A iniciação desse processo nos seres humanos é ainda pouco compreendida, e parece ser diferente daquela observada em outros mamíferos. A progesterona, por exemplo, inibe as contrações uterinas durante a gestação e, na maioria dos outros mamíferos, o início do trabalho de parto é precedido por uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de progesterona materna. Nos serem humanos, entretanto, isso não ocorre. Foi postulada a existência de uma "cascata de parto" nas mulheres, a qual envolve múltiplos e redundantes mediadores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Acredita-se que tais mediadores sejam: DHEAS e cortisol fetal; estriol placentário, ocitocina, prostaglandinas e hormônio de liberação da corticotrofina; além da ocitocina materna. Os efeitos desses mediadores podem ser modulados por alterações no nível de expressão de seus receptores (Norwitz, 2004).

Seguindo-se ao parto, há a lactação. O desenvolvimento primário das glândulas mamárias ocorre durante a puberdade, quando o estradiol promove o crescimento e ramificação dos ductos, e a progesterona induz a formação dos alvéolos. De modo similar, durante a gravidez, as elevadas concentrações de estrógenos e progesterona causam mais ramificações dos ductos e crescimento dos alvéolos. A capacidade secretória das células epiteliais alveolares é induzida pela PRL, cujos níveis aumentam durante a gravidez, e pelo HPL. No parto, a diminuição dos níveis de estrógeno e progesterona elimina seus efeitos inibitórios sobre a secreção de leite que, por sua vez, ainda requer PRL. A ejeção do leite, contudo, requer a ocitocina, como parte de um reflexo neuroendócrino. Esse reflexo é iniciado pelo estímulo produzido pela sucção, gerando impulsos nervosos que viajam do mamilo até o hipotálamo. Neste, os impulsos causam secreção de ocitocina, a partir das células neuroendócrinas da neuro-hipófise. A ocitocina viaja até a glândula mamária e estimula a contração das células de músculo liso que cercam os alvéolos, provocando a ejeção do leite. A PRL também participa desse reflexo neuroendócrino, de modo que os impulsos nervosos que alcançam o hipotálamo também inibem a síntese e secreção de dopamina, cuja atuação é semelhante a de um hormônio inibidor da liberação de PRL. Como resultado, a PRL é secretada a partir da adeno-hipófise e segue para as glândulas mamárias, onde estimula a secreção do leite. O objetivo, nesse caso, é repor o leite que foi ejetado. A concentração plasmática de PRL permanece alta enquanto houver lactação. Essa hiperprolactinemia pós-parto provoca amenorreia pós-parto devido à interferência na regulação normal da secreção de FHS e LH realizada pela GnRH. Embora esse estado hipogonadotrófico previna a gravidez, não é considerado um modo seguro de contracepção, em particular nas sociedades modernas com amamentação variável.

Avaliação laboratorial da função reprodutiva

A Tabela 25.1 descreve os achados laboratoriais obtidos de vários homens e mulheres que apresentavam doença reprodutiva, tipicamente classificada de acordo com a presença de (1) deficiência ou excesso de hormônio, e (2) disfunção primária (gonadal) ou secundária (hipofisária). Nos estados de doenças primárias, os níveis de esteroides gonadais apresentam uma correlação inversa aos níveis de gonadotrofinas hipofisárias, enquanto nos estados de doenças secundárias essa correlação é diretamente proporcional (p. ex., ambos aumentam ou diminuem). Essas alterações ocorrem porque os esteroides gonadais exercem retroalimentação negativa sobre as gonadotrofinas. Na insuficiência ovariana primária, por exemplo, a diminuição dos níveis de estradiol reduz seu efeito de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotálamo-hipofisária, resultando na elevação de FSH e LH.

Avaliação do homem

A avaliação da disfunção reprodutiva no homem costuma ser iniciada pela análise do sêmen, pois trata-se de um procedimento custo-efetivo relativamente simples. Com frequência, quando os resultados obtidos são normais, outras avaliações são desnecessárias. Por outro lado, quando os resultados são anormais, são realizadas análises hormonais.

Análise de sêmen. Além do uso na avaliação da disfunção reprodutiva, em particular nos casos de infertilidade, a análise de sêmen também é empregada na seleção de doadores para inseminação terapêutica e no monitoramento do sucesso de procedimentos cirúrgicos, como varicocelectomia e vasectomia. A análise de sêmen é composta por componentes microscópicos e macroscópicos, sendo que estes últimos incluem a determinação das propriedades físicas (p. ex., volume) e químicas (p. ex., pH). Existem guias e referências úteis, que abordam o procedimento (Gilbert, 1992; Mortimer, 1994; Tomlinson, 1999; World Health Organization, 1999).

Coleta da amostra. O paciente deve ser instruído a coletar o sêmen após 3 dias de abstinência sexual. Períodos de abstinência maiores costumam resultar em volumes de sêmen também maiores, porém com reduzida motilidade do espermatozoide. Nesse caso, deve ser coletada uma segunda amostra de sêmen 2 horas após a primeira

Tabela 25.1 Alterações dos níveis de hormônios reprodutivos em diversas doenças

Doença		Níveis de hormônio			
Classificação	**Exemplo**	**FSH**	**LH**	**Testosterona**	**Estradiol**
Homem					
Deficiência primária	Síndrome de Klinefelter	Alto	Alto	Baixo	–
Deficiência secundária	Pan-hipo-hipofisarismo	Baixo	Baixo	Baixo	–
Excesso primário	Tumor testicular	Baixo	Baixo	Alto	–
Excesso secundário	Puberdade precoce	Alto	Alto	Alto	–
Outros	Insuficiência de túbulos seminíferos	Alto	Normal	Normal	–
Outros	Insensibilidade parcial a andrógenos	Normal	Alto	Alto	–
Mulheres					
Deficiência primária	Menopausa	Alto	Alto	–	Baixo
Deficiência secundária	Síndrome de Sheehan	Baixo	Baixo	–	Baixo
Excesso primário	Tumor ovariano feminilizante	Baixo	Baixo	–	Alto
Excesso secundário	Tumor produtor de gonadotrofina (raro)	Alto	Alto	–	Alto
Outros	Síndrome dos ovários policísticos	Normal	Alto	Alto	–
Outros	Tumor ovariano masculinizante	Baixo	Baixo	Alto	–

De: Nickel KL: The gonads. In: Kaplan LA, Pesce AJ (eds): Clinical Chemistry – Theory, Analysis, and Correlation, 3. ed., St Louis, Mosby, 1996, pp. 892–911, com permissão.

coleta. O paciente deve esvaziar a bexiga urinária antes de ejacular. O laboratório deve fornecer ao paciente um frasco de coleta pré-pesado, de plástico estéril (polipropileno) e com tampa de rosca. A amostra de sêmen deve ser entregue ao laboratório dentro de 1 hora após a coleta e mantida aquecida durante o transporte. Em caso de suspeita de ejaculação retrógrada, pode ser solicitada nesse momento a coleta pós-ejaculação de uma amostra de urina. Duas amostras coletadas a intervalos de 2 a 3 semanas devem ser analisadas e, caso apresentem diferenças marcantes, devem ser obtidas amostras adicionais. Na situação ideal, as amostras de sêmen devem ser coletadas com privacidade, num recinto adjacente ao laboratório, porque em algumas amostras o espermatozoide precisa ser isolado do plasma seminal o quanto antes. As tecnologias reprodutivas assistidas (TRAs – ver adiante), tais como a fertilização in vitro (FIV), requerem que um espermatozoide móvel seja isolado do plasma seminal em até 1 hora após a ejaculação, a fim de proteger o espermatozoide dos efeitos inibitórios do plasma seminal sobre a fertilização. O sêmen deve ser obtido por meio de masturbação. Caso as circunstâncias impeçam a coleta, preservativos Silastic especiais devem ser disponibilizados para a coleta durante o coito. Amostras de sêmen incompletas não devem ser analisadas.

Exame macroscópico. Deve ser realizado após a liquefação, que usualmente ocorre em menos de 20 minutos, à temperatura ambiente. Se a amostra falhar em se liquefazer, pode ter havido secreção prostática inadequada. O sêmen deve ser totalmente homogeneizado antes do exame, bem como sua viscosidade deve ser registrada. O volume ejaculado pode ser medido pesando-se o copo que será analisado antes e após a coleta da amostra. O aparecimento de uma tonalidade amarelada está associado à pirospermia, enquanto uma cor de ferrugem indica sangramento na vesícula seminal. O pH varia entre 7,2 e 7,8, contudo pode chegar a 8,0, ou até mais, em decorrência de infecções agudas da próstata, vesícula seminal ou epidídimo. O pH será ≤ 7,0 se a amostra estiver contaminada com urina, em caso de obstrução dos ductos ejaculatórios ou quando a amostra consiste, principalmente, em líquido prostático.

Exame microscópico. Deve ser realizado para obtenção de estimativas de concentração, motilidade e aglutinação do espermatozoide. Outros elementos celulares, como as células poligonais do trato uretral e as "células arredondadas" (p. ex., células espermatozoidogênicas e leucócitos) também podem ser observados na contagem de espermatozoides em hemocitômetro. Uma vez que a motilidade e a velocidade dos espermatozoides dependem da temperatura, esses parâmetros devem ser avaliados em microscópio, com placa de aquecimento. Uma lamínula de vidro de 22 × 22 mm cobre, em geral, 8 µL de sêmen (com viscosidade normal), rendendo uma preparação a fresco com profundidade de 16,5 µm. Alternativamente, alíquotas de 4 µL de amostra são transferidas para lâminas de vidro descartáveis contendo dois poços (utilizados com lamínulas de vidro espessas), resultando na obtenção de preparações com 20 µm de profundidade. Um hemocitômetro ou um microcâmara pode ser empregado na contagem de espermatozoides. Ao menos quatro campos distintos para cada uma das duas alíquotas de amostra devem contados. A média de oito leituras separadas deve ser registrada. Em seguida, a contagem total de espermatozoides é calculada multiplicando-se o fator de diluição (faixa de concentração normal: 20–50 milhões/mL) pelo volume normal (faixa de volume normal: 2–5 mL). A motilidade (faixa normal: ≥ 50%) é expressa como percentual de espermatozoide que se move e o movimento para a frente é classificado em graus. Assim, espermatozoides que se movem rapidamente em linha reta, com poucos desvios e movimentos laterais, são classificados como sendo de grau 4. Espermatozoides que se movem mais lentamente são considerados de grau 3, enquanto aqueles que se movem ainda mais devagar e, por vezes, desviam da trajetória são classificados como sendo de grau 2. Os espermatozoides de grau 1 não se movem para frente. Uma progressão nula denota ausência de qualquer motilidade. Quando a motilidade é inferior a 50%, realiza-se a determinação da viabilidade por meio de coloração com eosina Y, utilizando nigrosina como contracoloração. À microscopia de campo luminoso, os espermatozoides mortos aparecem corados em vermelho, enquanto os vivos excluem os corantes e se mostram não corados. Em amostras sem nenhum espermatozoide visível, como nas de sêmen pós-vasectomia, a amostra inteira deve ser centrifugada e o precipitado obtido deve ser examinado quanto à presença de fragmentos de espermatozoides danificados ou intactos. A análise deve ser repetida em 4 a 6 meses.

A aglutinação ocorre quando espermatozoides móveis aderem uns aos outros, segundo uma orientação que pode se repetir numa dada amostra, como cabeça com cabeça, cauda com cauda, peça intermediária com perça intermediária ou formas mistas, dependendo da especificidade dos anticorpos do espermatozoide. A presença de aglutinação sugere uma causa imunológica para casos de infertilidade, sendo recomendável registrar o tipo de aglutinação observado. O tipo de aglutinação usualmente pode ser distinguido da aglutinação decorrente de infecção bacteriana ou debris teciduais, que tipicamente envolve uma orientação inespecífica dos espermatozoides.

As células arredondadas devem ser diferenciadas em duas classes: células germinativas imaturas, que apresentam um ou dois núcleos altamente condensados e uma área de citoplasma relativamente ampla; e leucócitos polimorfonucleares, que são menores do que as células germinativas e apresentam proporção núcleo/citoplasma também inferiores. A coloração com peroxidase identifica de forma específica os leucócitos polimorfonucleares em presença de linfócitos e outras células normalmente encontradas no sêmen. É preciso observar a existência de contaminação por bactérias, bem como a presença ou ausência de células epiteliais. Se for constatada a existência de uma associação entre ausência de espermatozoide e obtenção de um pequeno volume de sêmen, deve ser realizado o teste de frutose para confirmar a presença de líquido proveniente da vesícula seminal. Esse mesmo teste deve ser realizado em amostras de urina de pós-ejaculação, com a finalidade de excluir a possibilidade de ejaculação retrógrada. Todavia, a importância do resultado do teste de frutose tem declinado com o passar dos anos devido à disponibilidade de ferramentas diagnosticas mais diretas, como a ultrassonografia transretal.

A morfologia do espermatozoide pode predizer a fertilidade (Ombelet, 1997). Em geral, mais de 50% dos espermatozoides presentes em uma amostra de sêmen deve exibir morfologia normal. Espermatozoides morfologicamente anormais costumam apresentar múltiplos defeitos. A média do número de defeitos por espermatozoide – denominada índice teratozoospérmico – é um fator significativamente preditivo da função do espermatozoide, tanto in vivo como in vitro. A característica mais óbvia do espermatozoide anormal é a ampla variabilidade do tamanho do capuz acrossômico. Um capuz acrossômico que envolva menos de um terço da superfície da cabeça é considerado anormal, assim como a retenção de uma gotícula citoplasmática, cujo tamanho seja maior que o equivalente à metade do tamanho da cabeça ou de uma cauda com menos de 45 µm de comprimento. Uma particularidade a ser notada é a relação direta existente entre o tamanho do acrossomo e a frequência de fertilizações ou episódios de gravidez. A varredura morfológica auxiliada por computador é especialmente útil em casos de amostras que apresentem números muito baixos de espermatozoides normais que, de outro modo, talvez não fossem detectados.

Testes imunológicos. A ligação de anticorpos para espermatozoides aos antígenos da cabeça ou da cauda é considerada uma característica específica de infertilidade imunológica. Esses anticorpos usualmente pertencem às classes IgA e IgG, e é raro que sejam IgM. Os anticorpos IgA são os que possuem maior importância clínica. Os métodos modernos detectam anticorpos ligados a espermatozoides por meio de testes de reação de aglutinação mista direta e indireta (MAR, mixed agglutination reaction) para IgG e IgA, ou por intermédio de ensaio com imunobeads, que detecta todas as classes de anticorpos com diferentes graus de sensibilidade. Ambos os testes podem ser realizados com amostras de sêmen frescas e fornecem resultados em poucos minutos, com auxílio de um microscópio de luz. O sêmen é misturado a partículas de látex revestidas com anticorpos IgG humanos inespecíficos e, em seguida, é adicionado um antissoro monoespecífico para IgG humana. Os anticorpos anti-IgG atuam como pontes entre a IgG ligada ao espermatozoide – caso esteja presente – e a IgG ligada à partícula, formando aglutinados mistos. Quando não há IgG ligada a espermatozoides, os anticorpos anti-IgG apenas aglutinam as partículas de látex. À microscopia de luz, a ligação localizada das partículas identifica o anticorpo como sendo específico para a cabeça, cauda ou qualquer outra região da estrutura do espermatozoide. Também é possível realizar um teste indireto com esse reagente para detectar a presença de anticorpos para espermatozoide em amostras de sêmen, muco cervical ou soro.

O ensaio com *imunobeads* consegue detectar anticorpos das três classes de imunoglobulina, mediante revestimento das pérolas *(beads)*

com antissoro monoespecífico para cada classe. Dessa forma, antes da adição das pérolas, os espermatozoides são lavados, para a remoção de todas as imunoglobulinas livres presentes. Também é possível conduzir um ensaio indireto utilizando esse reagente. Leituras melhores são obtidas por microscopia de fase. Entre os homens, observa-se que o risco de desenvolver anticorpos contra espermatozoides é maior em casos de vasectomia, infecções repetidas, obstrução de ductos, criptorquidismo, varicocele, biópsias testiculares, trauma, torção, câncer e predisposição genética (Gilbert, 1992). Entre as mulheres, o aparecimento de anticorpos contra espermatozoides costuma estar associado à existência de um intenso processo inflamatório na mucosa do trato genital.

Infecções envolvendo o trato genital (ver "Parte VII – Microbiologia médica") podem ter efeitos colaterais significativos sobre a fertilidade masculina e feminina. A Echerichia coli, por exemplo, pode causar aglutinação e imobilização de espermatozoides. A aderência dessa bactéria a espermatozoides é mediada por manoses e estruturas de ligação à manose existentes na superfície celular encontrada em ambos os tipos de célula (Wolff, 1993; Sarkar, 1974). É preciso adotar medidas preventivas especiais ao coletar amostras de sêmen para detectar bactérias ou leveduras, visando eliminar possíveis fontes externas de contaminação. Culturas de plasma seminal podem auxiliar no diagnóstico da infecção de glândulas acessórias masculinas, em particular da próstata. Quando a concentração de bactérias excede 1.000 unidades formadoras de colônia/mL, as colônias devem ser identificadas e testadas quanto à sensibilidade a antibióticos.

Glândulas acessórias. A função da vesícula seminal, próstata e epidídimo pode ser avaliada por meio de uma análise de constituintes únicos a cada uma dessas estruturas. Exemplificando, as secreções da próstata são acídicas e contêm fosfatase ácida. Um líquido seminal mais alcalino do que o normal (pH > 8,0) com conteúdo de fosfatase ácida diminuído é sugestivo de disfunção prostática. A frutose é uma medida da função secretória da vesícula seminal. Na azoospermia decorrente da ausência congênita dos vasos deferentes, a detecção de baixos níveis de frutose pode indicar uma disgenia associada às vesículas seminais. A obstrução do ducto ejaculatório, ou agênese dos vasos deferentes e vesículas seminais, pode resultar na produção de um baixo volume de sêmen, com pH baixo, falta de coagulação e ausência do odor característico do sêmen. A α-glucosidase neutra se origina unicamente do epidídimo e sua quantificação, quando considerada com achados hormonais e testiculares, possui valor diagnóstico para obstrução do ducto distal.

Análise de imagens. A avaliação de rotina do sêmen pode ser conduzida com auxílio de um sistema de análise de imagens automatizado, que utiliza o movimento da cabeça do espermatozoide para derivar a magnitude de vários parâmetros natatórios. Contudo, o espermatozoide humano é extremamente heterogêneo no que se refere à morfologia, características natatórias e conteúdo de DNA. Assim, não existem referências que permitam avaliar as amostras como sendo normais ou anormais, férteis ou inférteis. A avaliação do sêmen por métodos manuais executados por técnicos treinados continua, portanto, sendo a prática padrão nos laboratórios de andrologia.

Análise hormonal. Se múltiplas análises de sêmen demonstrarem azoospermia (ausência de espermatozoides), oligoespermia (< 20 milhões de espermatozoides/mL) ou outra anormalidade, então, são realizadas análises hormonais que ajudem a identificar especificamente a disfunção. Um exemplo de algoritmo diagnóstico é mostrado na Figura 25.6.

Diminuição dos níveis de testosterona com aumento dos níveis de FSH e LH indica insuficiência testicular primária. Esta pode ser uma doença tanto adquirida como genética (síndrome de Klinefelter). A diminuição da concentração de testosterona acompanhada por níveis diminuídos ou anormais de FSH e LH indicam doença hipotalâmica-hipofisária, com consequente insuficiência testicular secundária. Quando os níveis de LH e FSH estão anormais, a ocorrência de uma doença secundária pode ser confirmada por um teste de estimulação da GCH. A GCH interage com os receptores de LH e, no homem, essa interação estimula as células de Leydig (normais) a sintetizar e secretar testosterona. Assim, espera-se que a administração de GCH provoque um aumento nos níveis de testosterona no indivíduo com insuficiência testicular secundária, mas não naqueles que apresentem insuficiência testicular primária.

Se houver suspeita de doença hipotalâmica-hipofisária, também pode ser realizada a quantificação dos níveis de PRL. A hiperprolactinemia interfere na regulação normal da secreção de FSH e LH pelo GnRH, sendo que os prolactinomas são o tipo mais comum de tumor da hipófise. Entretanto, quando os níveis de PRL estão aumentados, o hipotireoidismo primário deve ser excluído como possível causa subjacente. No hipotireoidismo primário, os níveis de TSH e hormônio liberador de tireotrofina (TRH) estão elevados. Embora a função do TRH seja estimular a síntese e secreção de TSH, esse hormônio também estimula a síntese e secreção da PRL. Dessa forma, uma alta concentração de TSH aponta o hipotireoidismo primário como causa da hiperprolactinemia, enquanto níveis normais sugerem que a causa subjacente é um prolactinoma. Diante dessa última situação, devem ser empregadas técnicas de imagem para avaliar o eixo hipotálamo-hipófise.

Quando níveis normais de testosterona, LH e FSH acompanham a oligoespermia ou a azoospermia, o líquido seminal deve ser submeti-

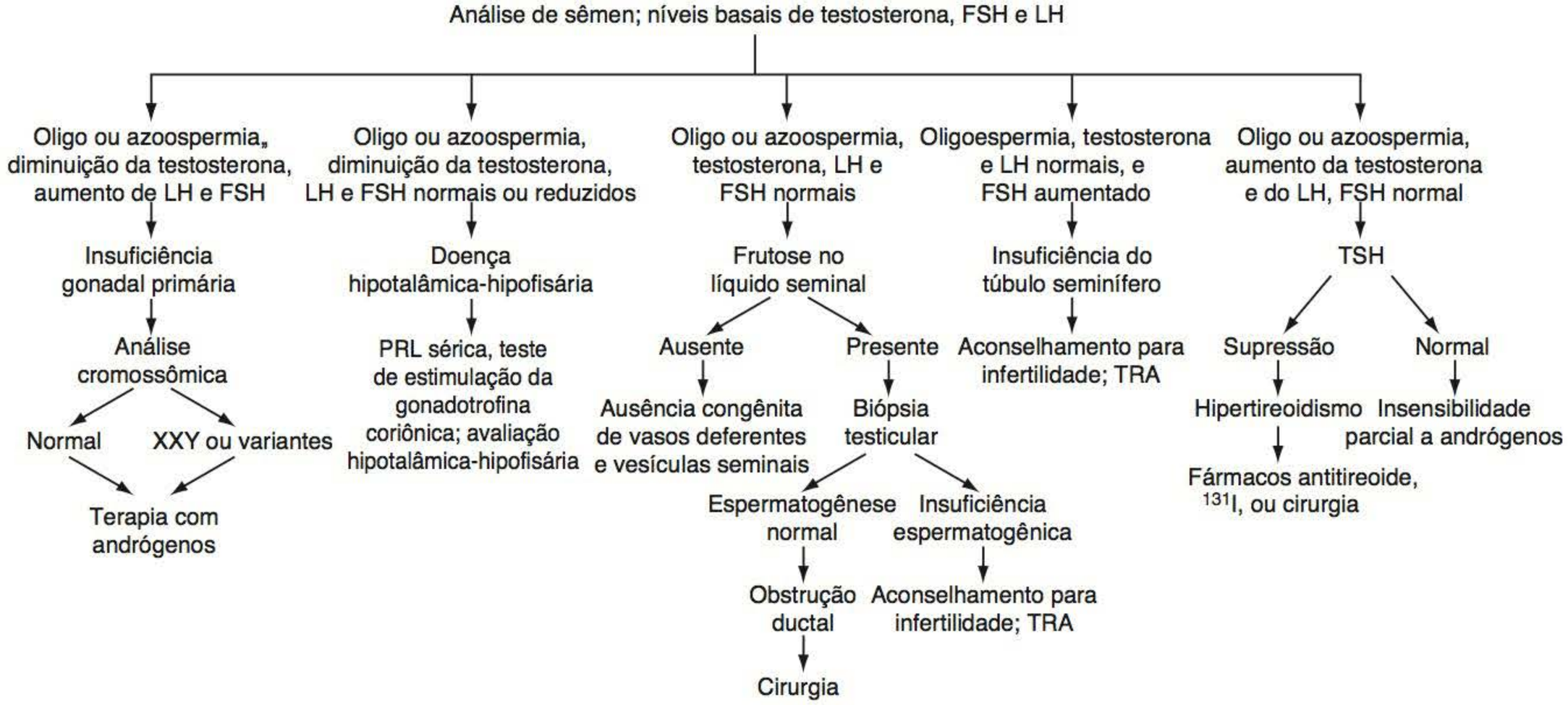


Figura 25.6 Um algoritmo diagnóstico para o hipogonadismo masculino. TRA = tecnologia reprodutiva assistida; PRL = prolactina. (De Braunstein GD: Testes. In: Greenspan FS, Gardner DG (eds): Basic and Clinical Endocrinology, 7.ed. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004, pp. 478-510, com permissão.)

do à análise para avaliação da frutose. A falta do açúcar sugere ausência congênita de vasos deferentes e vesículas seminais. A presença de frutose sugere tanto uma obstrução ductal como uma insuficiência espermatogênica, a qual pode ser distinguida por biópsia testicular. Oligoespermia acompanhada de níveis normais de testosterona e LH com elevação da concentração de FSH sugere insuficiência dos túbulos seminíferos. É provável que esse aumento de FSH se deva à diminuição da ação inibitória da retroalimentação negativa em decorrência da diminuição da concentração de inibida proveniente das células de Sertoli. Níveis aumentados de testosterona e LH com concentração normal de FSH sugerem tanto hipertireoidismo primário como insensibilidade parcial a andrógenos, que podem ser distinguidas pela quantificação dos níveis de TSH. Em tais condições, é provável novamente que o efeito diferencial do LH sobre o FSH se deva a um efeito seletivo da inibina sobre o FSH.

Em protocolos de avaliação como o ilustrado na Figura 25.6, tem se tornado mais comum determinar não apenas a testosterona total, mas também a testosterona livre e/ou biodisponível. Essa última representa a soma da testosterona livre com a testosterona fracamente ligada à albumina. O restante do hormônio está fortemente ligado à SHBG. A testosterona livre ou biodisponível representa com maior acurácia o hormônio biologicamente ativo nas condições em que os níveis de SHBG estão alterados. Exemplificando, quando os níveis de SHBG estão aumentados, os de testosterona estão diminuídos, os de estrógeno estão aumentados, há hipertireoidismo e doença hepática. Por outro lado, quando os níveis desse hormônio diminuem enquanto os de testosterona aumentam, há hipotireoidismo e acromegalia. Portanto, se a concentração de SHBG estiver alta, os níveis de testosterona total podem estar normais, porém os de hormônio livre ou biodisponível podem estar baixos. Na situação inversa, se a concentração de SHBG estiver baixa, os níveis de testosterona total podem estar normais, contudo os de hormônio livre ou biodisponível podem estar altos (Ismail, 1986). Os analisadores automáticos utilizados nos imunoensaios contam com métodos prontamente disponíveis para determinar os níveis de testosterona total, no entanto, os métodos para determinação dos níveis de testosterona livre e biodisponível são significativamente mais trabalhosos. Em consequência, as análises para testosterona livre e biodisponível costumam ser realizadas em laboratórios de referência. As mesmas considerações se aplicam às quantificações de testosterona em mulheres (ver adiante).

Acredita-se que a ginecomastia, ou desenvolvimento de seios em homens, ocorra por um desequilíbrio relativo entre andrógenos (diminuição) e estrógenos (aumento) que atuam sobre as glândulas mamárias. A diminuição da ação dos andrógenos pode ser decorrente tanto de uma concentração deficiente como de uma deficiência envolvendo o receptor (insensibilidade). A condição é comum durante o período neonatal e a puberdade. Foram identificadas várias outras causas, entre as quais anomalias endócrinas, tumores, doenças sistêmicas e devido à utilização de diversos fármacos. A redução do uso ou a suspensão de determinadas medicações pode excluir a doença induzida por fármacos. A doença hepática ou renal pode ser identificada por meio de triagens bioquímicas com amostras de sangue. A determinação dos níveis séricos de testosterona, estradiol, LH, GCH, PRL e TSH identifica uma anormalidade endócrina ou um tumor secretor de hormônio. Os resultados desses testes aliados aos métodos de análise de imagem podem ajudar a diferenciar as seguintes causas prováveis de ginecomastia: insuficiência testicular primária ou secundária; hipertireoidismo; resistência aos andrógenos; prolactinoma; tumor testicular ou de célula germinativa; tumor de células de Leydig ou de Sertoli; ou tumor suprarrenal (Braunstein, 2004).

Avaliação da mulher

A amenorreia pode ser definida como ausência de fluxo menstrual. Em pacientes que ainda não menstruaram tendo completado 16 anos de idade, esse fenômeno com frequência se deve a uma anomalia genética e/ou anatômica. Nesses casos, entretanto, ainda é possível que a causa seja uma anormalidade endócrina, e a presença ou ausência de características sexuais secundárias (p. ex., desenvolvimento dos seios) constitui importante indicador para avaliação. Uma anomalia endócrina é a causa mais provável em pacientes com histórico de menstruação e que estejam sem menstruar há mais de 3 meses. Uma abordagem em etapas para avaliação da amenorreia (Fig. 25.7) baseia-se na determinação da concentração de GCH, PRL, TSH, tiroxina livre (FT_4), FSH, LH e andrógenos, e na avaliação do status de estrógenos. Etapa 1: quantifica-se a GCH para excluir uma gravidez. Embora um resultado > 5 mUI/mL seja indicativo de gravidez, a detecção de concentrações aumentadas também pode ocorrer em casos de doença trofoblástica ou tumor secretor de GCH. Etapa 2: quantifica-se PRL, TSH e FT_4 para excluir prolactinomas e doença da tireoide. Níveis aumentados de PRL acompanhados de níveis normais de TSH e FT_4 sugerem a existência de um prolactinoma, o qual pode ser melhor investigado por meio de técnicas de análise de imagem. No entanto, a hiperprolactinemia também pode ser causada pelo hipotireoidismo primário, sendo indicada por níveis altos de TSH e baixos de FT_4 (ver em "Avaliação do homem"). O mecanismo pelo qual a elevação da PRL causa amenorreia é o mesmo discutido anteriormente, para a amenorreia pós-parto em mulheres e para o hipogonadismo nos homens. Níveis baixos de TSH e FT_4 são sugestivos de hipotireoidismo secundário e, nesse caso, o paciente deve ser avaliado quanto à possibilidade de ter pan-hipo-hipofisarismo – uma deficiência envolvendo todos os hormônios da adeno-hipófise. O hipertireoidismo (aumento de FT_4) também pode estar associado à amenorreia. Etapa 3: se os níveis de GCH, PRL, TSH e FT_4 estiverem normais, será necessário avaliar o status de estrógenos endógenos por meio de teste de remoção de progestina. Para tanto, a progestina é administrada oralmente entre 5 a 7 dias ou por injeção intramuscular (dissolvida em óleo). A presença de sangramento à remoção em 7 dias após o tratamento indica que: (1) o fluxo de saída do trato está intacto, e (2) havia no início uma concentração de estrógeno suficiente para estimular o crescimento endometrial. Se não houver sangramento à remoção, o trato genital deve ser avaliado com auxílio de técnicas de imagem e, na etapa 4, os níveis séricos de FSH e LH devem ser determinados. A elevação dos níveis de FSH e LH indica insuficiência ovariana primária, enquanto níveis baixos ou inadequadamente normais desses hormônios apontam para a existência de insuficiência ovariana secundária. Esta, por sua vez, tem origem hipotalâmica-hipofisária e pode ser resultado de uma variedade de distúrbios clínicos, tais como síndrome de Sheehan, distúrbios alimentares, perda de peso e estresse. Diante da ausência de sangramento à remoção, então, na etapa 5, são determinados os níveis séricos de andrógenos. Níveis elevados de testosterona indicam tanto a presença de um tumor de ovário, como da síndrome dos ovários policísticos (PCOS, polycistic ovarian syndrome). Essa síndrome é uma entidade clínica associada à observação de ovários aumentados e infertilidade, bem como amenorreia, com frequencia. Níveis de DHEAS aumentados são sugestivos de tumor suprarrenal. A 17-OH progesterona é um precursor de andrógeno (Fig. 25.1) e um aumento de seus níveis séricos pode indicar hiperplasia suprarrenal congênita ou início da vida adulta, decorrente da deficiência de 21-hidroxilase. As anormalidades mencionadas podem ser acompanhadas de hirsutismo, isto é, padrão masculino de crescimento de pelos na mulher. Os testes da etapa 5 também podem ser utilizados para avaliar o hirsutismo em sua apresentação clínica primária.

Uma vez que a amenorreia ou a oligomenorreia com frequência estão associadas à infertilidade (Lobo, 1997), essa última pode ser avaliada segundo o mesmo tipo de algoritmo diagnóstico daquele reapresentado na Figura 25.7. A infertilidade, no entanto, pode ocorrer diante da menstruação aparentemente normal. Isso ocorre na deficiência da fase lútea, quando a maturação do endométrio secretório é retardada, de modo que a implantação do blastocisto não ocorre. Em muitos casos (mas não em todos), esse endométrio "fora de fase" pode ser demonstrado por meio da avaliação histológica de uma biópsia endometrial obtida a partir da fase lútea. O mecanismo responsável por essa condição é desconhecido, contudo sabe-se que pode envolver desenvolvimento folicular, ovulação e/ou função lútea anormais, resultando na síntese e secreção subótimas de estradiol e/ou progesterona. Diversas causas clínicas foram identificadas, incluindo certos medicamentos, estados de doenças sistêmicas e anormalidades endócrinas. Além da biópsia de endométrio "fora de fase", o diagnóstico se baseia tanto na detecção de baixos níveis séricos de progesterona durante a fase lútea como no encurtamento da fase lútea. Esse encurtamento da fase é determinado por um moni-

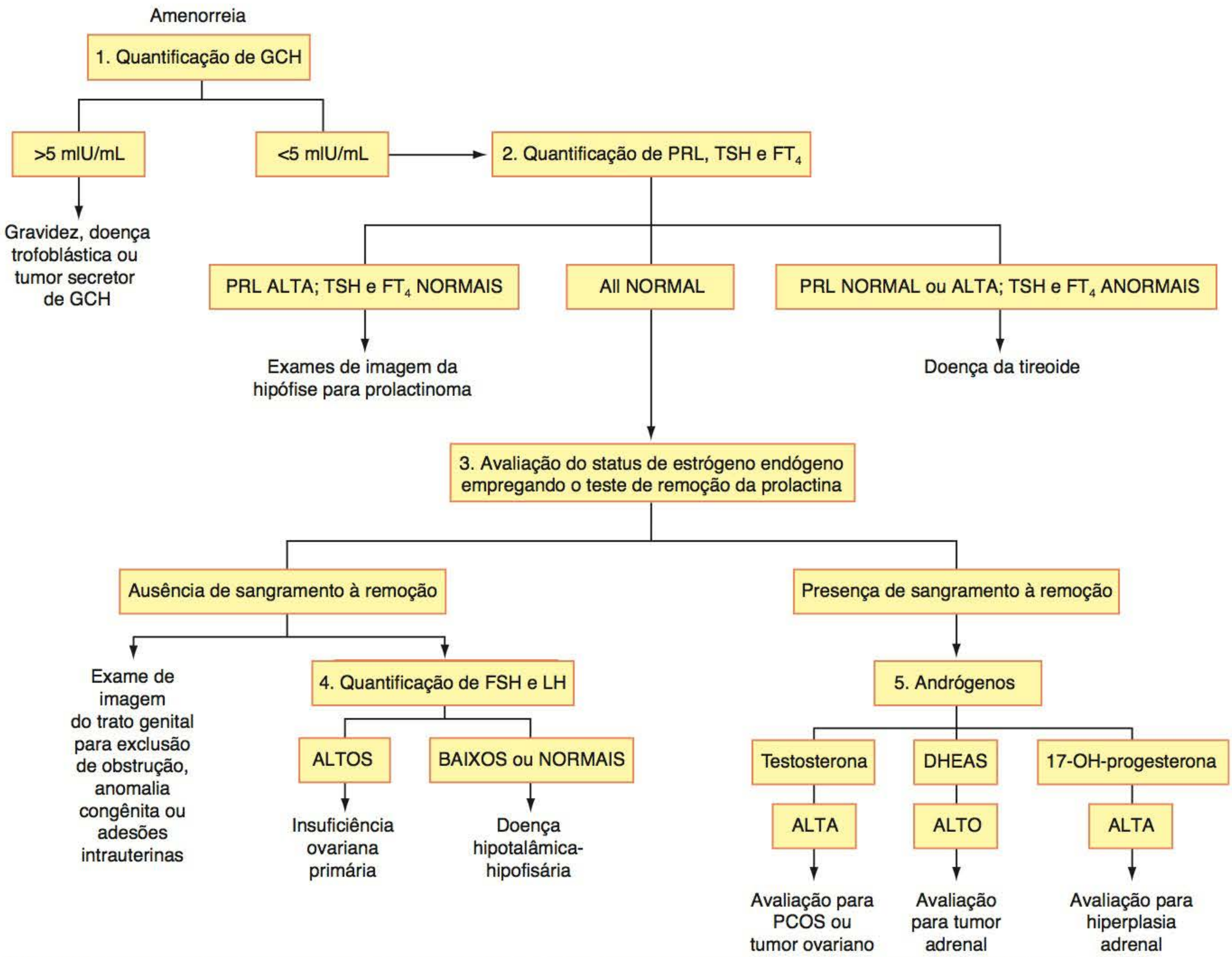


Figura 25.7 Um algoritmo diagnóstico para amenorreia. As etapas sequenciais da avaliação estão numeradas. PCOS = síndrome dos ovários policísticos.

toramento cuidadoso da temperatura corporal basal no decorrer do ciclo menstrual, pois ela aumenta e diminui de acordo com os níveis de progesterona (Strauss, 2004).

Tecnologia reprodutiva assistida (TRA)

Um casal é considerado infértil quando a concepção não ocorre após 6 meses de relações sexuais sem a utilização de métodos contraceptivos. Os tratamentos iniciais podem incluir inseminação artificial com espermatozoides lavados ou concentrados e/ou indução de ovulação com citrato de clomifeno. Quando essas medidas falham, então, há a possibilidade de utilizar uma das várias TRAs. Estas envolvem não apenas a indução da ovulação, mas também a recuperação de oócitos e outras manipulações que visam controlar, o máximo possível, os processos reprodutivos, a fim de alcançar a gravidez e levá-la a termo. Boa parte desse controle externo requer monitoramento significativo por meio de análises laboratoriais.

As indicações para o tratamento com TRA incluem casos de infertilidade andrológica, imunológica e idiopática, bem como doença tubária e endometriose. Não raro, um casal pode apresentar várias causas de infertilidade. A TRA também pode ser aplicada a casais inférteis, que requeiram doação de oócito. Nesse caso, estão envolvidos dois tipos distintos de pacientes: (1) mulheres com ausência de função gonadal decorrente de disgênese gonadal, menopausa precoce (que pode ocorrer de forma espontânea ou após castração cirúrgica ou induzida por quimio-/radioterapia) ou síndrome do ovário resistente; e (2) mulheres cujos ovários são funcionais e que não desejam utilizar os próprios oócitos para engravidar, devido ao risco de transmissão de anomalias cromossômicas aos descendentes (p. ex., caso haja história de doença autossômica dominante ou doença ligada ao X, ou quando ambos os parceiros são portadores de uma doença autossômica recessiva) (Van Steirteghem, 1992; Pados, 1994).

Um típico protocolo de TRA possui três componentes básicos: administração de medicações, execução de procedimentos clínicos e monitoramento (Trounson, 2000). Inicialmente, um análogo de GnRH (Lupron) pode ser administrado para suprimir a síntese e secreção normais de FSH e LH, ainda que essa medida nem sempre seja necessária. A etapa seguinte consiste em estimular o crescimento folicular utilizando uma preparação de gonadotrofina menopáusica humana (HMG, human menopausal gonadotropin), cuja atividade pode ser tanto de FSH e LH, como predominantemente de FSH, dependendo especificamente do material empregado. Diferente do ciclo reprodutivo normal, em que tipicamente apenas um folículo sofre maturação, no ciclo da TRA múltiplos folículos crescem e amadurecem. O número e o aumento de tamanho dos folículos são monitorados com análises de ultrassom regulares. A função dos folículos em desenvolvimento é monitorada por meio da realização de determinações sequenciais dos níveis séricos de estradiol. Quando um nível suficiente de maturação folicular é alcançado, com base nas análises de ultrassom e de estradiol, o paciente recebe um bolo de GCH. Essa GCH atua substituindo a onda de LH, interagindo com receptores foliculares de LH para dar início ao processo de ovulação. A continuidade desse processo é bloqueada, impedindo sua finalização. A ovulação normalmente ocorre em 48 horas após a administração de GCH. Assim, 12 horas antes da

ovulação induzida, os oócitos são "recuperados" a partir dos folículos estimulados. Cada oócito é, em seguida, misturado aos espermatozoides. Dependendo do tipo de TRA adotada, os gametas tanto podem ser transferidos imediatamente para a trompa de Falópio como podem ser incubados juntos por até 48 horas, sendo que os zigotos ou embriões resultantes são transferidos para a trompa de Falópio ou para o útero.

A recuperação de oócitos acarreta o rompimento dos folículos, assim como ocorre na ovulação normal, e os níveis de estradiol consequentemente caem logo em seguida. Conforme os folículos se diferenciam em corpos lúteos, todavia, os níveis de estradiol religado e de progesterona sérica aumentam. Esse processo, no entanto, pode necessitar de um "reforço"com injeções extras de GCH (doses menores que aquela utilizada na recuperação dos oócitos) e/ou injeções de progesterona. Assim como no ciclo normal, a combinação de estradiol mais progesterona é necessária para preparação do endométrio uterino para o evento da implantação. Por isso, os níveis séricos de ambos os esteroides são monitorados após a transferência. A quantificação da concentração sérica de GCH tem início em cerca de 10 dias após a realização da transferência e objetiva determinar se a gravidez foi alcançada. Em aproximadamente 20 dias após a transferência, pode ser realizado um exame de ultrassom para confirmar a presença do saco gestacional.

Avaliação laboratorial da gravidez

Durante a primeira visita da paciente ao obstetra – idealmente, no primeiro trimestre de gravidez – uma bateria de vários testes laboratoriais clínicos é solicitada para identificar possíveis distúrbios que podem ser tratados ou mesmo evitados (Willet, 1994). Testes de sangue e urina, simples e de baixo custo, são realizados para detecção de anemia, aloimunização por células vermelhas e infecções bacterianas ou virais suspeitas. Em certos casos, a história clínica, o exame físico ou os resultados obtidos nos testes indicam a necessidade de realizar estudos adicionais para detecção de doença genética, distúrbios da coagulação ou trombose, causas de aborto espontâneo e outras condições. Os procedimentos laboratoriais empregados na rotina para monitoramento da gravidez são resumidos na Figura 25.8.

GCH e gravidez precoce

A elevação do níveis de GCH no sangue e na urina materna são indicadores confiáveis de gravidez. Ensaios imunométricos ("sanduíche") são empregados em ambos os casos. Atualmente, a maioria dos ensaios séricos quantifica o conteúdo de subunidade β livre e de GCH intacta (subunidade α + subunidade β) utilizando dois anticorpos diferentes que reconhecem diferentes epítopos presentes na subunidade β. Tais ensaios podem quantificar concentrações de GCH da ordem de 1 a 2 mUI/mL. Tipicamente, os ensaios para amostras de urina empregam um anticorpo direcionado contra a subunidade β e outro que reconhece a subunidade α. O uso desses dois anticorpos permite que os ensaios quantifiquem tanto a GCH intacta como seus fragmentos que aparecem na urina. Os níveis séricos de GCH aumentam e ultrapassam o limite máximo do intervalo de referência (tipicamente, 4 – 6 mUI/mL) no momento da implantação, 6 a 12 dias (média = 9,1 dias) após a ovulação (Wilcox, 1999). Os níveis urinários de GCH costumam ser determinados com kits de testes de imunoensaio, cujos limites de detecção são de aproximadamente 20 mUI/mL. Esses métodos conseguem detectar níveis elevados de GCH na urina 2 a 3 dias mais tarde que os métodos séricos. Os ensaios qualitativos destinados ao uso domiciliar possuem limites de detecção em torno de 50 mUI/mL e, assim, conseguem detectar níveis urinários elevados vários dias mais tarde, ou logo após a primeira falta de menstruação.

A concentração sérica de GCH aumenta dramaticamente durante o primeiro trimestre, atingindo o pico em cerca de 10 semanas de gestação (Fig. 25.5). Ao longo de toda a gravidez, a forma intacta desse hormônio é a predominante. Entretanto, uma pequena quantidade de subunidade β livre é detectada no primeiro trimestre. A subunidade α livre aparece no segundo trimestre e seus níveis sobem de modo estável até o último trimestre (Ozturk, 1987).

Após 10 semanas, se os níveis de GCH continuarem a subir, deve ser considerada a possibilidade de haver um tumor trofoblástico. Outros tipos de tumores, em particular tumores de células germinativas testiculares, também produzem GCH. A produção tumoral com frequência inclui quantidades significativas de subunidade β livre, além da GCH intacta. O uso de GCH como marcador tumoral é discutido em mais detalhes no Capítulo 75. Os resultados quantitativos de GCH são indicativos nos casos em que a paciente apresenta sinais gestacionais

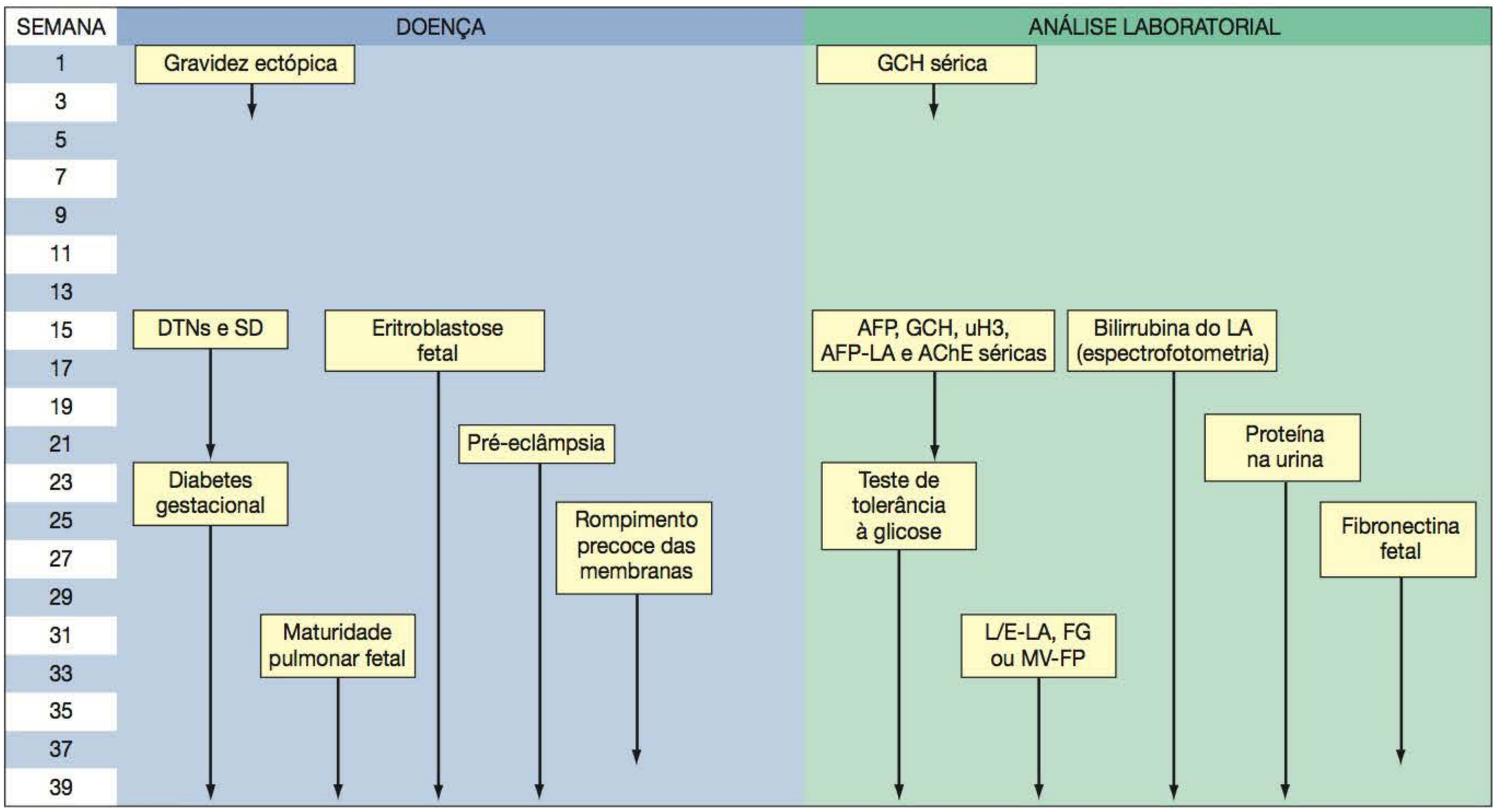


Figura 25.8 Aproximação do número de semanas gestacionais para avaliação laboratorial dos principais estados doentios na gravidez (quando houver indicação clínica). LA = líquido amniótico; AFP = α-fetoproteína; AChE = acetilcolinesterase; SD = síndrome de Down; GCH = gonadotrofina coriônica humana; L/E = proporção lecitina/esfingomielina; MV-FP = microviscosidade por fluorescência polarizada; DTNs = defeitos do tubo neural; FG = fosfatidilglicerol; uE3 = estriol não conjugado.

iniciais de sangramento vaginal ou dor abdominal que possam sugerir a presença de gravidez ectópica ou aborto espontâneo. Um protocolo simples, que utiliza apenas os exames de ultrassom e quantitativo de GCH, proporciona diagnóstico e monitoramento de sons de forma mais acurada do que o julgamento clínico isolado (Koh, 1997). Uma vez que as concentrações de GCH sobem rapidamente no início da gravidez normal, medidas seriadas podem ser realizadas para garantir que, de fato, houve implantação intrauterina. Uma elevação equivalente a duas vezes os níveis de GCH em 2 a 3 dias corresponde a uma probabilidade de mais de 80% de ter havido implantação intrauterina de um ovo fertilizado. Quando as concentrações de GCH excedem 1.500 a 2.000 μUI/mL, um saco gestacional se torna visível ao exame de ultrassom na gravidez normal. A ausência desse saco ou a presença de uma massa adnexa indica a possibilidade de uma gravidez ectópica. Além disso, a falha em detectar a duplicação dos níveis séricos de GCH sugere perda da gravidez.

Quantificações de estradiol e progesterona podem fornecer informação adicional. Baixos níveis séricos de progesterona (< 15 ng/mL) ou de estradiol (< 200 ng/mL) indicam a presença de um ovo anembrionado, com uma probabilidade de 90%. Se a concentração de GCH estiver abaixo de 1.000 mUI/mL numa paciente que apresenta sangramento vaginal, uma concentração de progesterona < 5 ng/mL corresponde a um valor preditivo de 94% para gravidez anormal.

A intervenção médica com metotrexato intramuscular para gravidez ectópica sem rompimento é uma alternativa menos onerosa do que a cirurgia, pode ser um procedimento menos complicado e pode melhorar a fertilidade da paciente no futuro. A seleção dos casos a serem tratados com metotrexato deve ser realizada através de um exame de ultrassom, com o intuito de confirmar a implantação tubária e para diferenciá-la de uma implantação intestinal – caso em que não há indicação para o metotrexato. O ultrassom também confirma um pequeno volume (< 3 cm) de tecido de concepto com movimentação cardíaca fetal. A queda dos níveis de progesterona para concentrações abaixo de 1,5 ng/mL pode ser um fator preditivo mais adequado de resolução, pois as concentrações de GCH não declinam de modo tão rápido após a cirurgia (podendo até aumentar, em alguns casos) (Saraj, 1998).

O laboratório pode fornecer testes que ajudam a determinar o motivo que levou a um aborto espontâneo ainda no início de uma gravidez. Por exemplo, nos casos de aborto recorrente, a síndrome antifosfolipídeo pode ser identificada pela presença de anticorpos anticardiolipina e de anticorpos específicos para fosfolipídeos no primeiro trimestre. Se a gestação for interrompida no segundo trimestre, um teste para detecção de células fetais no sangue materno pode demonstrar a ocorrência de uma hemorragia feto-maternal significativa.

Defeitos do tubo neural

A triagem para detecção de defeitos estruturais utilizando marcadores bioquímicos do soro materno tornou-se uma prática obstétrica rotineira. Programas de triagem foram iniciados para encontrar defeitos no tubo neural (DTNs) por meio da detecção de concentrações aumentadas de α-fetoproteína (AFP) no soro materno. Um achado importante foi a constatação de que a suplementação com ácido fólico reduz o risco de recorrência de DTNs em cerca de 70%, entre as mulheres que já tiveram um filho afetado (ACOG, 1993).

Os DTNs constituem um dos casos de má formação congênita severa mais comuns (Botto, 1999). Ocorrem ao redor do 27º dia após a concepção, mediante uma falha envolvendo a placa neural e seu revestimento em fundirem-se adequadamente. A anencefalia envolve a ausência da calvária, abóbada craniana e hemisférios cerebrais, sendo letal ante ou logo após o nascimento. A espinha bífida apresenta-se mais comumente sob a forma de meningomielocele lombar (ou cervical), com herniação das meninges, medula espinhal e raízes nervosas. A severidade das complicações, entre as quais paralisia ou fraqueza muscular, incontinência fecal e/ou urinária e comprometimento intelectual, dependem ao menos parcialmente do nível vertebral e da extensão da espinha bífida. Esta, por sua vez, pode ser aberta (se refere ao defeito estar completamente descoberto ou coberto somente por uma membrana bem delgada) ou fechada (revestida com pele ou membrana espessa). Aproximadamente 80% dos defeitos de espinha bífida são abertos. Essa distinção é importante, uma vez que a triagem do soro materno detecta somente defeitos abertos.

Nos Estados Unidos, a incidência de DTNs é de 1 a 2 em cada 1.000 gestações. Algumas populações (p. ex., Irlanda do Norte) apresentam uma frequência de 6 a 8 em cada 1.000 gestações. Descendências raciais e étnicas parecem influenciar a incidência. Os caucasianos que vivem nos EUA apresentam uma ocorrência média de 1,6:1.000, enquanto os afro-americanos exibem uma incidência de 0,9:1.000 (Myrianthopoulos, 1987).

Os DTNs são esporádicos em 90% dos casos e apresentam defeitos isolados com etiologia multifatorial, envolvendo tanto fatores genéticos como não genéticos. Entretanto, as famílias apresentam maior risco de recorrência. Exemplificando, quando um casal teve um descendente com DTN, o risco de ocorrer qualquer tipo de DTN numa próxima gestação aumenta em aproximadamente 1 a 3% (Toriello, 1983).

Apesar dos DTNs serem tipicamente defeitos isolados, é importante realizar a avaliação completa de fetos ou bebês afetados, visando excluir a existência de outros distúrbios que possam estar associados a um prognóstico e/ou risco de recorrência diferentes. Fetos que possuem certas anomalias cromossômicas podem apresentar DTNs. Embora sejam poucos, há distúrbios envolvendo um único gene que também produzem DTNs. Condições adquiridas, como a síndrome da banda amniótica, podem resultar nesses defeitos, porém não estão associadas a um maior risco de recorrência. Por outro lado, a exposição teratogênica, como no caso da ingestão de valproato pela mãe, está associada a um risco aumentado de DTNs. Mulheres com diabetes melito dependente de insulina (IDDM, *insulin dependent diabetes mellitus*) também apresentam um risco 3 a 5 vezes maior de DTNs comparativamente à população geral (ACOG, 1993).

A triagem para detecção de DTN consiste em determinar a concentração sérica de AFP no sangue materno, tipicamente, utilizando um imunoensaio com analisador automático. A AFP é a proteína mais abundante no soro fetal durante o desenvolvimento do feto. A produção hepática de AFP se mantém constante ao longo de aproximadamente 30 semanas de gestação e, então, diminui. A concentração máxima de AFP no soro fetal é de cerca de 3 mg/mL, alcançada em 12 a 14 semanas de gestação. Após esse período, passa a declinar no decorrer de toda a gestação. Os níveis de AFP continuam a cair após o nascimento e, com 1 ano de idade, são de aproximadamente 1 ng/mL. Essa concentração permanece por toda a vida adulta. A AFP se difunde através das membranas amnióticas, produzindo uma concentração no líquido amniótico (LA) que é quase 100 vezes menor do que concentração no soro fetal. A AFP-LA atinge o pico em 13 a 14 semanas e, em seguida, no segundo trimestre de gestação, diminui a uma taxa de 10%/semana. Pequenas quantidades de AFP também são transferidas através da placenta (a partir do soro fetal) e através das membranas amnióticas (a partir do LA) para o soro materno (SM), onde as concentrações de AFP são quase 1.000 vezes mais baixas do que no LA. No segundo trimestre, quando é realizada a triagem materna, os níveis de AFP-SM aumentam em torno de 15%/semana de gestação. Esse aumento da AFP-SM, ao mesmo tempo em que os níveis no LA estão caindo, se deve a alterações combinadas envolvendo a transferência para o SM e a depuração materna (Ashwood, 1999).

A associação de uma concentração aumentada de AFP-SM com DTNs fetais abertos foi descrita pela primeira vez em 1974 (Brock, 1974). A AFP encontra-se aumentada porque o soro fetal, a partir das membranas neurais expostas e dos vasos sanguíneos, vaza para o LA. Sendo a AFP de origem exclusivamente fetal, a AFP-LA pode ser utilizada como marcador para detectar DTNs. Os níveis aumentados de AFP no LA também se refletem no SM, ainda que em menor extensão. Esse aumento mensurável constitui a base da triagem de AFP-SM realizada no trimestre intermediário para detecção de DTNs (UK Collaborative Study, 1977).

A triagem do SM baseia-se na comparação dos níveis séricos de AFP de mulheres grávidas, no trimestre intermediário de gestação, com os valores médios de AFP de mulheres cujos fetos são normais e apresentam idade gestacional comparável. Tais comparações são subsequentemente expressas como múltiplos da mediana (MoM). Os valores de mediana se baseiam em dados oriundos de uma população referencial submetida à triagem. A expressão dos resultados do paciente

em MoMs normaliza os valores, permitindo estabelecer comparações diretas de resultados entre laboratórios, além de evitar a variação decorrente das diferenças entre os procedimentos realizados.

Os fatores clínicos que devem ser considerados ao calcular resultados paciente-específicos (Ashwood, 1999) estão descritos a seguir:

1. *Peso da mãe:* a concentração de AFP-SM diminui com o aumento do peso da mãe. Enquanto o feto, por si só, produz uma quantidade constante de AFP, o volume de sangue materno varia de acordo com o peso da mãe. A falha em fazer os devidos ajustes considerando o peso da mãe resulta em aumento da incidência de resultados tanto falso-positivos como falso-negativos, além de afetar a sensibilidade e a especificidade do teste (Johnson, 1990a). Rotineiramente, os laboratórios costumam ajustar a MoM de AFP-SM de acordo com o peso da mãe. Correções matemáticas similares também se aplicam aos cálculos da MoM para GCH e estriol em casos de síndrome de Down (ver adiante).
2. *Raça:* por razões desconhecidas, as mulheres afro-americanas apresentam valores de AFP-SM cerca de 10 a 15% mais altos do que os valores apresentados pelas mulheres caucasianas (Johnson, 1990b). É necessário efetuar a correção matemática dessa diferença ou corrigi-la através da comparação dos valores de mediana das pacientes afro-americanas com as medianas normais obtidas da população referencial.
3. *Diabetes melito dependente de insulina (IDDM):* em mulheres que seriam consideradas normais se não apresentassem IDDM, os níveis de AFP-SM são aproximadamente 20% mais baixos do que na população geral. Portanto, os valores de MoM devem ser corrigidos para cima no ajuste para esse fenômeno. Essa correção é tipicamente obtida multiplicando-se o valor inicial de MoM por um fator, empregando uma constante matemática para aumentar o resultado de MoM inicial.
4. *Gestação múltipla:* a gestação múltipla (p. ex., gêmeos) está associada a níveis maiores de AFP-SM, uma vez que cada feto contribui transferindo sua própria AFP para o sangue materno. Os níveis de AFP-SM são aproximadamente proporcionais ao número de fetos, e o efeito pode ser factorado no cálculo laboratorial e na interpretação dos resultados. A triagem para defeitos fetais não é tão confiável quanto nas gestações de feto único, uma vez que não é possível determinar as contribuições individuais de AFP de cada feto. Portanto, quando comparada à gravidez de feto único, a gravidez múltipla apresenta uma taxa de detecção de DTN menor. O mesmo princípio se aplica aos ajustes de MoM para GCH e estriol não conjugado na realização de análises com múltiplos marcadores para síndrome de Down (ver adiante).
5. *Determinação da idade gestacional:* para estabelecer um valor de MoM válido, é essencial estimar a idade gestacional com segurança. O motivo mais comum de resultados anormais de triagem de SM é a estimação incorreta da idade gestacional. Tipicamente, os laboratórios seguem protocolos específicos baseados na informação obtida junto ao prestador de cuidados obstétricos, a fim de determinar a idade gestacional mais confiável. Quando a gravidez é inicialmente datada por ultrassonografia, a sensibilidade e a especificidade da triagem são acuradas (Wald, 1994). Entretanto, as informações dessa análise frequentemente não estão disponíveis no momento em que a triagem de SM é realizada. Gestações com resultados de triagem positivos e que foram originalmente datadas com base na última menstruação devem ter a idade gestacional confirmada por ultrassonografia. Se as duas estimativas de idade gestacional apresentarem uma diferença definida (os protocolos laboratoriais variam, porém usualmente em mais de 9 dias), então os resultados devem ser recalculados com base nos dados da análise de ultrassom.

A meta de qualquer programa de triagem de soro materno é identificar as mulheres com risco suficiente de apresentarem um distúrbio fetal, a fim de garantir a realização de novas avaliações e acompanhamento do caso. Os níveis de AFP-SM são utilizados como uma das principais ferramentas de triagem na identificação dessas mulheres, consideradas expostas a um risco elevado de DTNs abertos. Os valores de AFP-SM obtidos a partir de gestações com DTNs abertos são altos (MoM = 7 em casos de anencefalia, e MoM = 4 em casos de espinha bífida). É importante destacar que o teste para AFP-SM é um teste de triagem, e não uma ferramenta diagnóstica, portanto não permite discriminar todas as gestações afetadas de todas as gestações não afetadas. Assim, foram estabelecidos programas para identificar indivíduos que apresentam risco suficientemente alto e garantir, para tais casos, novas avaliações diagnósticas.

O cutoff da triagem é estabelecido pela escolha de um valor de MoM que maximize a taxa de detecção para DTNs e, ao mesmo tempo, mantenha uma taxa baixa e aceitável de resultados falso-positivos. Dependendo do laboratório, os cutoffs variam de 2,0 a 2,5 MoM, de modo que a taxa de detecção (sensibilidade) para casos de espinha bífida aberta é de 75 a 85% (muito maior para os casos de anencefalia), enquanto a taxa de resultados falso-positivos varia de 2 a 4%.

Apesar dos programas de triagem para AFP-SM tenham sido originalmente estabelecidos para detectar DTNs fetais, qualquer defeito fetal aberto que permita o vazamento de soro fetal para o LA circundante ou que acarrete o aumento da perda de proteínas através da urina fetal também pode resultar em níveis elevados de AFP-SM. Defeitos da parede ventral abertos (gastrosquise e onfalocele) podem ser detectados através da elevação dos níveis de AFP. A nefrose congênita, uma doença autossômica recessiva, pode se manifestar através de níveis muito altos de AFP-SM e AFP-LA, devido ao funcionamento anormal dos rins fetais. Do mesmo modo, anomalias cutâneas fetais podem permitir que o soro fetal vaze para o LA e, em consequência, causar a elevação dos níveis de AFP-SM.

Anormalidades envolvendo a placenta podem acarretar aumento dos níveis de AFP-SM, devido ao comprometimento das membranas feto-maternas ou da estrutura placentária. A elevação dos níveis de AFP-LA que não é explicada por um problema genético ou congênito com frequência está associada a complicações obstétricas no decorrer da gestação, tais como ameaça de aborto, baixo peso ao nascimento, pré-eclâmpsia e oligoidrâmnio (Burton, 1988).

Se a triagem de AFP-SM sugere risco aumentado para DTN, porém os resultados do exame de ultrassom são normais, a paciente pode ser indicada para uma amniocentese. Nesse caso, é realizada a quantificação de AFP no LA. Devido, em parte, à maior concentração de AFP no LA do que no SM (ver anteriormente), a AFP-LA é um fator preditivo mais apropriado de DTNs. Laboratórios que analisam os níveis de AFP-LA também devem medir a AChE no LA, em qualquer amostra cujos níveis de AFP estejam aumentados (> 2,0 MoM). Conforme discutido no Capítulo 20, sobre Enzimologia, a AChE é uma enzima que deriva exclusivamente do tecido neural e, em consequência, está presente em concentrações bastante altas no LCE. Por isso, essa enzima pode ser utilizada como marcador sensível e específico para DTNs abertos. Ademais, a AChE permite discriminar entre DTNs e outros defeitos fetais nos quais os níveis de AFP também estejam aumentados, excluindo resultados falso-positivos de AFP.

Síndrome de Down

Os programas de triagem para AFP-SM foram iniciados com o objetivo de identificar gestações associadas a um risco aumentado de DTNs. Subsequentemente, foi descrita uma associação entre valores baixos de AFP-SM e a SD (Merkatz, 1984). Quando se utiliza o valor de AFP-SM e a idade para avaliar mulheres que apresentam alto risco de ter um feto com SD, a taxa de detecção é duas vezes maior do que quando se utiliza apenas a idade da mãe. Entretanto, essa triagem não é considerada um protocolo suficientemente sensível ou específico. Foi demonstrado que inúmeros outros marcadores séricos maternos apresentam alterações da concentração na SD fetal. Os dois analitos mais testados com a AFP-SM no segundo trimestre são o estriol não conjugado (uE3) e a GCH (Palomaki, 1997). Assim como a AFP-SM, os níveis de uE3 caem no segundo trimestre em casos de gestação com SD, segundo uma ordem de magnitude semelhante a da AFP-SM. A GCH, ao contrário, está aumentada nas gestações afetadas. De fato, a GCH é isoladamente o melhor discriminante dentre as três quantificações séricas, em termos de separar as gestações afetadas das não afetadas. Apresenta níveis de MoM de mediana de aproximadamente 2,0, nos casos de gestação afetada. O risco específico de SD em determinada paciente deve ser calculado utilizando-se todos os três marcadores (AFP-SM, uE3 e GCH) combinados à idade materna (Ashwood, 1999). A taxa de detecção (sensibilidade) desse método de triagem é

de cerca de 60%, com uma incidência de resultados falso-positivos de aproximadamente 5% (Palomaki, 1996). A Figura 25.9 destaca um protocolo para triagem simultânea de SD e DTN. Mais recentemente, alguns laboratórios incorporaram a inibina A como 4º marcador na triagem do SM para SD. Assim como ocorre com a GCH, a inibina A está amentada nas gestações afetadas pela SD. Estima-se que a inclusão da análise da inibina A ao atual protocolo de três marcadores pode elevar a taxa de detecção da SD para quase 75%, com uma taxa de falsos-positivos de 5% (Haddow, 1998).

Eritroblastose fetal

Trata-se de uma severa doença hemolítica fetal, marcada por anemia com hiperplasia monoblástica (eritroblastose), que pode ser seguida de insuficiência cardíaca congestiva (hidropsia) e morte intrauterina. O papel da medicina transfusional na supervisão de mães imunizadas Rh_{0-} negativas é revisto no Capítulo 35.

A hemoglobina, liberada por hemólise, é catabolizada à bilirrubina não conjugada. No entanto, o feto com doença hemolítica não desenvolve hiperbilirrubinemia nem se torna ictérico, porque a placenta, em geral, remove a bilirrubina. Ao mesmo tempo, um pouco dessa bilirrubina aparece no LA. Portanto, o monitoramento da concentração de bilirrubina no LA por espectrofotometria (teste de Liley) é uma maneira de determinar o grau e a progressão da doença hemolítica.

A absorção luminosa máxima da bilirrubina se dá a 450 nm, conferindo uma cor amarela ao LA. Este pode ser tanto de origem materna como fetal, portanto, a pigmentação é incapaz de distinguir se o processo hemolítico ocorre na mãe ou na criança. Na eritroblastose, o grau de severidade da anemia (ou taxa hemolítica) apresenta correlação com a absorbância luminosa líquida a 450 nm. A bilirrubina está ligada à albumina, sua concentração depende da renovação proteica e

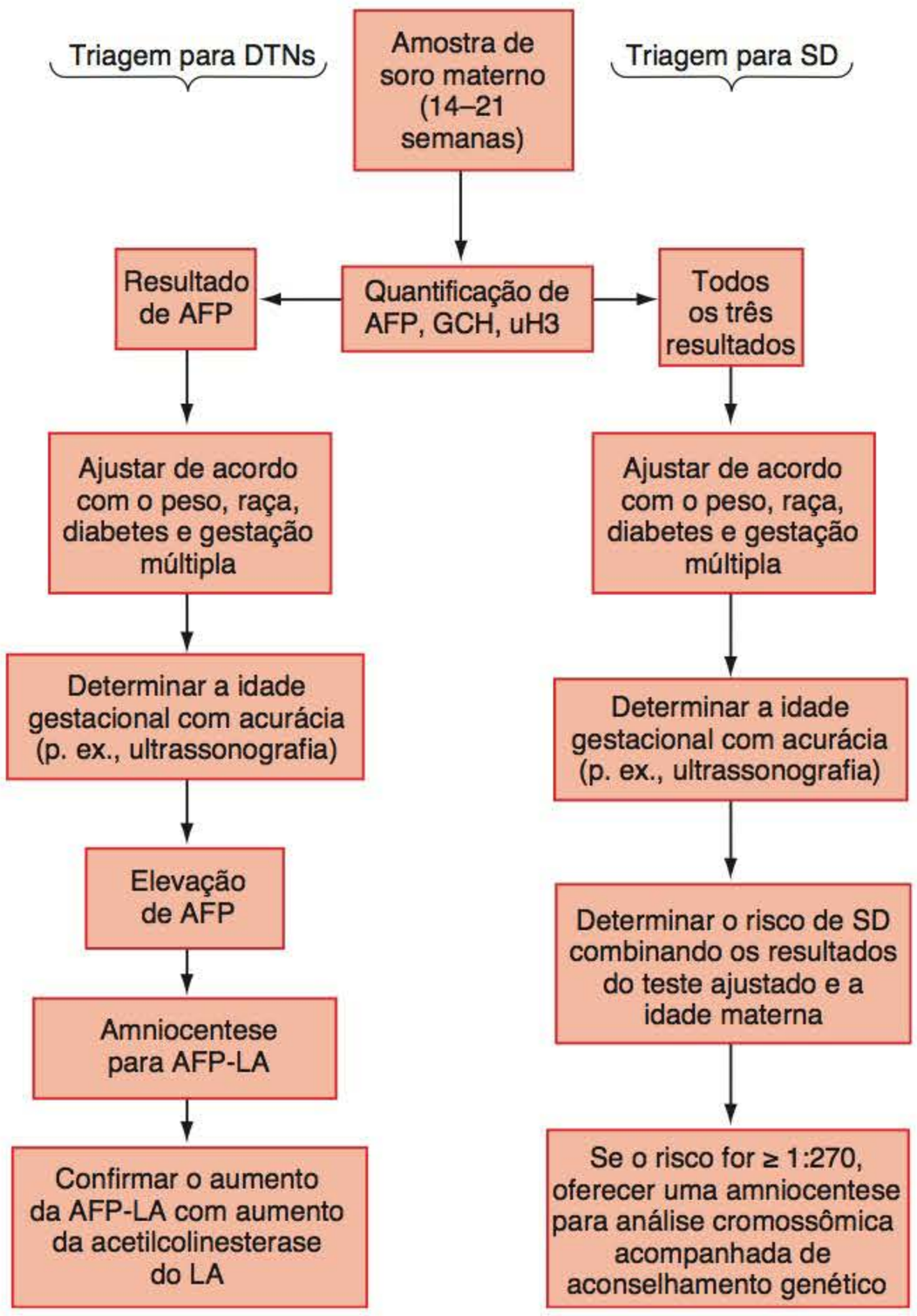


Figura 25.9 Algoritmo diagnóstico para triagem simultânea de fetos com defeitos do tubo neural (DTNs) e síndrome de Down (SD).

não é alterada rapidamente no LA. Se uma gestação anterior resultou em morte fetal por eritroblastose, o LA da gestação atual deve ser inicialmente amostrado, aproximadamente 10 semanas antes da semana gestacional em que ocorreu a morte do outro feto. A análise espectrofotométrica do líquido aspirado é mais acurada quando realizada após 26 a 28 semanas. Antes desse período, uma anemia fetal branda pode ser monitorada pela determinação dos títulos de anticorpos ou, possivelmente, da máxima velocidade de fluxo na veia umbilical, de acordo com a ultrassonografia (Iskaros, 1998). Uma anemia severa pode ser detectada pela determinação do pico da velocidade sistólica do sangue na artéria cerebral média (Mari, 2000).

Uma amostra de LA (5 mL) é coletada, mantida ao abrigo da luz e centrifugada ou filtrada. A absorbância luminosa do líquido entre 350 a 700 nm é representada em um gráfico de modo contínuo. A resultante curva espectrofotométrica pode ser utilizada para: (1) determinar se o material contém ou não bilirrubina e/ou outros produtos pigmentados oriundos de hemólise; e (2) quantificar o pigmento bilirrubina que esteja presente.

A curva inicial pode representar o comprimento de onda (abcissa) em função da absorbância total (ordenada) em coordenadas lineares. A absorbância "real" a 450 nm é observada a partir do gráfico original (linear). Em seguida, a curva do pigmento é transformada em uma reta, transferindo-se dois valores de absorbância a 365 e 550 nm para um gráfico em papel com escala semilogarítmica (o eixo y é logarítmico). Esses dois pontos estão bem acima e abaixo do pico de absorbância a 450 nm do pigmento bilirrubina, de modo que a reta traçada entre ambos representa a absorbância de fundo (background) do próprio líquido sem pigmentação. A absorbância "esperada" a 450 nm é, então, registrada a partir da reta traçada no gráfico em logaritmo. A diferença existente entre os valores de absorbância reais e esperados corresponde à absorbância "líquida" a 450 nm. Esse valor é corrigido para a interferência da hemoglobina, que também absorve a 450 nm. Para calcular a correção devida à hemoglobina, a absorbância da amostra a 410 nm (comprimento de onda em que apenas a hemoglobina – e não a bilirrubina – absorve luz) é determinada. A absorbância "esperada" a 410 nm é subtraída do valor obtido. A 450 nm, a absorbância da hemoglobina equivale a 5% de sua absorbância a 410 nm. Assim, a absorbância líquida da hemoglobina a 410 nm é multiplicada por 0,05 e subtraída de sua absorbância líquida a 450 nm. A absorbância líquida é registrada num gráfico de Liley, onde as semanas gestacionais são representadas na abscissa linear e a absorbância líquida, na ordenada de escala logarítmica (Ashwood, 1999).

A absorbância líquida a 450 nm diminui na medida em que a duração de uma gestação normal avança após 28 semanas. (Antes de 26 semanas, a absorbância de fundo se mantém relativamente constante.) A absorbância decrescente reflete a diluição do líquido pela urina fetal e responde pelas curvas negativas das linhas que demarcam as zonas preditivas de Liley (inferior = zona 1; intermediária = zona 2; superior = zona 3) para hemólise branda, moderada e severa, respectivamente. Quanto maior a absorbância líquida a 450 nm, maior a hemólise. Embora o método de Liley originalmente se aplique apenas ao terceiro trimestre de gestação, foram obtidos dados que mostram a possibilidade de expandir o uso da técnica para o segundo trimestre (Queenan, 1993). Nesse período, as amostras de LA também podem ser obtidas para avaliação de DTNs e/ou SD (Fig. 25.10).

A realização de testes seriados (a cada 14 dias ou menos) é prática comum e permite estabelecer uma tendência para os valores de absorbância líquida. Valores altos e crescentes podem indicar a necessidade de análises de LA mais frequentes, entrega mais cedo ou cordocentese com determinação do hematócrito fetal e, se for o caso, transfusão intrauterina (Queenan, 1993). As tendências costumam ser unidirecionais, tanto paralelas às retas de inclinação negativa do gráfico de Liley como exibindo uma inclinação positiva. Em certos casos, as curvas das linhas de tendência podem sofrer mudanças, às vezes, dramáticas. Exemplificando, quando valores de absorbância líquida iniciais encontram-se na zona intermediária, a absorbância líquida pode sofrer um aumento agudo se a hemólise piorar. Após 30 semanas de gestação, o resultados do teste de Liley é, em geral, combinado à uma avaliação da maturidade pulmonar fetal: análises da pigmentação e do surfactante amnióticos auxilia, em ambos os casos, a decisão clínica de induzir ou não o parto (ver adiante).

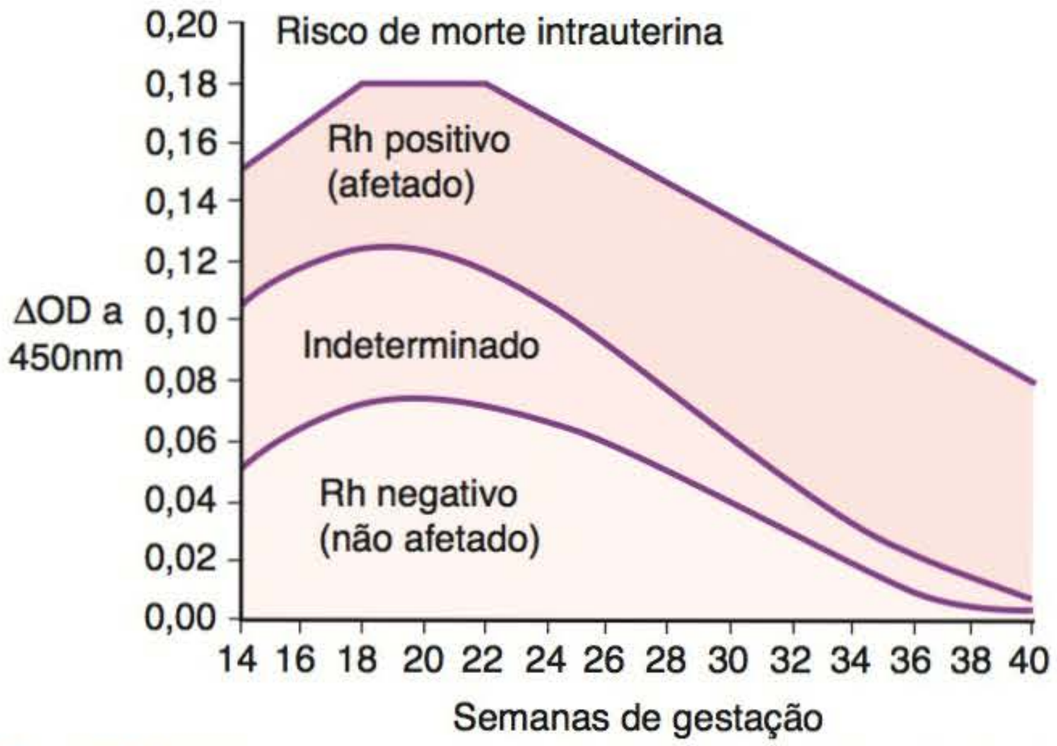


Figura 25.10 Gráfico para interpretação da absorbância líquida a 450 nm do líquido amniótico. As quatro zonas indicam os níveis relativos de doença hemolítica fetal. (De Queenan, JT, Tomai, TP, Ural SH, et al: Deviation in amniotic fluid optical density (OD) at a wavelenght of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14-40 weeks' gestation: A proposal for clinical management. Am J Obstet Gynecol 168:1370-1376, 1993, com permissão.)

Os resultados do teste de Liley devem ser interpretados por um médico experiente, capacitado a integrar achados clínicos, histórico, informação de banco de sangue e outros dados laboratoriais. Desiquilíbrios ácidobásicos maternais e fetais podem alterar o pH do LA e mudar o comprimento de onda em que o pigmento apresenta absorção máxima. Além da bilirrubina, outros pigmentos que possam estar presentes e que afetam os resultados são hemoglobina (como já discutido), meta-hemealbumina e mecônio. Cada um desses pigmentos produz um efeito espectrofotométrico característico. A contaminação do sangue (com interferência causada por hemólise) é observada com frequência. Menos comum, a icterícia ou hemólise materna in vivo podem causar erros de interpretação. A presença de células vermelhas fetais no LA indica piora da anemia decorrente da perda de sangue ou pode explicar um aumento do título de anticorpos maternos (resposta anamnésica a uma nova hemorragia feto-maternal), desenvolvimento de novos anticorpos e aumento subsequente da absorbância do LA a 450 nm. A coloração do LA pelo mecônio é sinal de angústia fetal. A exposição do LA à luz, o uso materno de esteroides, concentração de hemoglobina acentuadamente aumentada no LA e calibração precária do espectrofotômetro são fatores que podem acarretar medidas inacuradas de absorbância líquida.

As tentativas de amniocentese ocasionalmente resultam na obtenção de aspirados que não são LA. Amostras de ascite fetal, LA de um gêmeo, conteúdos de cistos amnióticos e (com maior frequência) urina materna podem ser submetidas por engano como sendo LA. Uma varredura espectrofotométrica da urina materna assemelha-se a uma curva de LA normal, a não ser pela maior inclinação negativa da curva. A urina materna contém nitrogênio ureico em concentrações da ordem de 300 mg/dL, bem como creatinina em níveis acima de 10 mg/dL. No LA, a concentração de nitrogênio ureico usualmente é de cerca de 30 mg/dL, enquanto a de creatinina é inferior a 3,5 mg/dL. Medidas de precaução dos níveis de creatinina ou nitrogênio ureico do LA podem ser obtidas para distinguir amostras de LA e de urina. O uso de varetas medidoras de nível para detectar proteína e glicose no LA é menos útil, visto que ambas as substâncias podem estar presentes tanto no LA como na urina de mulheres grávidas. É preciso notar que a presença de hemoglobina fetal pode provocar interferência em muitos métodos baseados na creatinina.

O sangue torna-se visivelmente evidente quando diluído 1.000 vezes em LA (v:v). Punções sanguinolentas são obtidas em cerca de 2 ou 3% dos aspirados de amniocenteses iniciais, e em 20% dos aspirados mais tardios. A presença de sangue pode causar interferência nos testes de absorbância líquida, surfactantes e outros. Em alguns casos, o sangue é oriundo do feto, levantando possibilidades subsequentes de anemia fetal e aloimunização anamnésica ou primária.

Diabetes gestacional

Qualquer intolerância à glicose em uma mulher grávida é denominada diabetes gestacional (ver o Cap. 16), independentemente de o estado de tolerância à glicose ser ante- ou pós-parto. O pronto diagnóstico e tratamento do diabetes gestacional pode ajudar a evitar a pré-eclâmpsia materna, bem como a morte fetal após 32 semanas e a macrossomia neonatal (tamanho do corpo anormalmente grande), hipoglicemia, policitemia ou icterícia.

Maturidade pulmonar fetal

A maturação pulmonar fetal é marcada pela produção de um material similar ao detergente – o surfactante – que forma uma película sobre as superfícies alveolares. A presença de surfactante reduz a tensão superficial na interface entre o tecido dos pulmões e o ar. O surfactante diminui o esforço realizado na respiração ao reduzir a resistência à expansão dos pulmões durante a inspiração e prevenir o colapso alveolar durante a expiração. A deficiência de surfactante acarreta a síndrome da angústia respiratória (RDS, respiratory distress syndrome), um distúrbio que resulta em hipóxia, acidemia e transudação proteica vascular para o interior dos espaços alveolares de ar (doença da membrana hialina).

Antes de 35 semanas de gestação, o principal componente do surfactante é a lecitina α-palmítica β-mirística. Após esse período, a lecitina dipalmítica passa a predominar e o fosfatidil glicerol (FG) aparece cerca de 1 semana depois. Os níveis de FG continuam a aumentar até o final da gestação e mantêm a estabilidade alveolar. Os componentes minoritários do surfactante são fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielinas.

O processo de amadurecimento pulmonar é rápido (1–2 dias). Uma vez que a concentração de esfingomielina (E) no LA permanece constante ao longo do terceiro trimestre, pode ser utilizada como material de referência contra o qual a lecitina do surfactante (L) pode ser comparada. A determinação da proporção L/E (ver adiante) evita problemas associados à variabilidade das extrações químicas e à inacurácia das estimativas da concentração absoluta por volume de LA.

Embora exista surfactante exógeno disponível para profilaxia e terapia de recém-nascidos com RDS, há casos em que a doença pode ser evitada pelo retardo da distribuição até que os pulmões do feto estejam maturados ou por meio de medicação dada à mãe, para induzir produção de surfactante em seu feto. A produção de surfactante fetal pode ser avaliada por meio de testes com amostras de LA. Antes do parto, os movimentos respiratórios do feto fazem com que o surfactante se difunda nos pulmões não expandidos, por intermédiodo líquido contido na árvore brônquica e dentro do espaço amniótico. O surfactante no LA pode ser monitorado durante o terceiro trimestre. A análise de surfactante é importante na supervisão de distúrbios associados à RDS: parto prematuro, ruptura precoce das membranas, diabetes materno, hipertensão materna crônica, retardo do crescimento fetal, doença hemolítica aloimune e parto prematuro por cesariana.

A quantidade de surfactante no LA pode ser determinada por métodos físicos ou químicos. O grande número de procedimentos disponíveis sugere que nenhum deles é ideal na predição da ocorrência ou ausência de RDS. A utilidade clínica de um método está relacionada ao grau de simplicidade, disponibilidade ao longo de 24 horas, tempo de renovação, baixo custo e acurácia clínica. O método referencial continua sendo a determinação da proporção L/E, que é feita por cromatografia em camada delgada. Por outro lado, os testes de microviscosidade (fluorescência polarizada) são métodos de baixo custo, acurados e populares. Também tem sido defendido um teste de "clique" de cabeceira, em que são feitas observações microscópicas das alterações do tamanho de uma bolha induzidas pelo surfactante (Osborn, 1998).

O teste de proporção L/E foi o primeiro teste químico prático a avaliar o status pulmonar fetal (Gluck, 1971) e continua sendo o teste de referência. Existem kits para determinações de L/E sendo comercializados. Após a extração e purificação com solventes, os lipídeos presentes na amostra de surfactante de LA são analisados por cromatografia em camada delgada (TLC) de sílica (ver os Caps. 4 e 23, que abordam os princípios da instrumentação e toxicologia, e o monitoramento de fármacos terapêuticos, respectivamente). Os fosfolipídeos se tor-

nam visíveis quando submetidos à carbonização por aquecimento ou coloração. A quantificação densitométrica determina a proporção L/E. Proporções L/E > 2,0, em geral, indicam maturidade; proporções entre 1,5 e 2,0 indicam maturação limítrofe e proporções < 1,5 apontam imaturidade. Para esse teste, foram descritas sensibilidades e especificidades que variam de 80 a 85%. Alguns consideram o teste insatisfatório para casos de mulheres com diabetes, cujos recém-nascidos podem apresentar RDS diante de proporções L/E acima de 2,0 (Dubin, 1992). A presença de FG no cromatograma de TLC, cuja proporção L/E é > 2,0 representa uma indicção certa de maturidade pulmonar para qualquer paciente.

O método empregado no teste de proporção L/E é lento, trabalhoso e insensível, além de apresentar variabilidades pré-analíticas que afetam sua acurácia. Uma dessas variabilidades se refere à diluição por secreção de líquidos (p. ex., quando o LA é aspirado a partir da vagina, em vez da utilização de amniocentese). O erro analítico resulta da supercentrifugação (velocidade e tempo), contaminação com sangue (hemólise) e imprecisão da TLC. O mecônio também interfere, por impedir que a lecitina se separe da esfingomielina.

Os testes rápidos para FG foram desenvolvidos, porque a cromatografia é um método embaraçoso e frequentemente indisponível quando se faz necessário (p. ex., durante a noite, fins de semana). O método da aglutinação rápida do látex para detecção de FG é disponibilizado e pode ser utilizado na triagem da maturidade pulmonar. O método cromatográfico é indicado para os casos em que são obtidos resultados imaturos ou equivocados (Ashwood, 1992). A contaminação com glicerol (lubrificante) pode provocar interferências nas análises de FG.

A microviscosidade do LA apresenta correlação com os resultados do teste de referência da proporção L/E obtidos em estudos clínicos, podendo ser determinado por fluorescência polarizada. Mistura-se um corante fluorescente ao LA e esse corante interage tanto com o surfactante como com a albumina. A viscosidade é menor, quanto maior for a concentração de surfactante em relação a uma concentração de albumina relativamente constante. O grau de polarização de fluorescência apresenta uma correlação inversa com a concentração de surfactante e sua menor viscosidade. O método pode fornecer resultados errados para amostras de LA concentradas (p. ex., na obstrução do trato urinário fetal) e para amostras que contenham quantidades visíveis de sangue. As amostras de LA são preparadas por filtração para evitar a perda de surfactante causada pela centrifugação. Há um aparelho automático comercializado para execução de ensaios de fluorescência polarizada (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que tem sido amplamente utilizado. Suas análises são rápidas e parecem ser acuradas para a maioria das situações clínicas (Bender, 1994).

Toxemia da gravidez (pré-eclâmpsia)

A pré-eclâmpsia é uma doença que ocorre ao final da gestação (> 20 semanas), caracterizada por hipertensão com proteinúria acima de 0,3 g/L em amostra de urina de 24 horas, ou acima de 1,0 g/L em amostras colhidas ao acaso. A pré-eclâmpsia afeta cerca de 1 em cada 10 mulheres grávidas e é mais frequente nas primeiras gestações, pacientes diabéticas, gestações múltiplas e mulheres que já apresentaram o distúrbio em gestações anteriores.

A pré-eclâmpsia pode ser prevenida com a administração oral de salicilatos ou cálcio. Entretanto, além da urinálise, o monitoramento laboratorial, em geral, é desnecessário em casos brandos. A doença severa ou convulsiva (eclâmpsia) requer intervenção e monitoramento ativos.

A toxemia da gravidez pode mimetizar outros distúrbios, incluindo hipertensão, doença renal ou hepática, lúpus eritematoso sistêmico, púrpura trombocitopênica idiopática, anemias microangiopáticas e, em especial, púrpura trombocitopênica trombótica. Essa última condição raramente ocorre nos estágios tardios da gestação, contudo, diferente da pré-eclâmpsia, persiste após o parto.

A proteinúria da toxemia é do tipo glomerular (na maior parte, albumina) e o sedimento da urina contém finos cálculos granulares e hialinos. É isento de bactérias, hemácias ou cálculos grandes ou cerosos. A concentração de proteína na urina é monitorada para determinar o progresso ou controle da doença. A depuração da creatinina sofre diminuição e cai a valores abaixo de 130 mL/min (ver no Cap. 14).

Em geral, o sangue apresenta trombocitopenia e uma relativa eritrocitose, quando o volume de plasma não aumenta como deveria, como ocorre na gestação normal. As concentrações de ureia (> 15 mg/dL) e creatinina (> 0,8 mg/dL) sofrem aumentos de grau brando a moderado, sendo que há um aumento marcante dos níveis de ácido úrico. A concentração de lactato desidrogenase (LDH) aumenta, primariamente em decorrência da doença hepática (na maior parte LDH_5). Às vezes, devido à hemólise (p. ex., na síndrome HELLP – hemólise [hemolysis], elevação das enzimas hepáticas [elevated liver enzymes] e redução das plaquetas [low platelets]), LDH_1 e LDH_2 aumentam. A concentração de ALT, usualmente, corresponde ao dobro do valor normal, a bilirrubina apresenta discreta elevação (> 1,2 mg/dL) e o D-dímero está aumentado. A excreção urinária de cálcio pode estar diminuída (< 12 mg/dL/24 horas) e esse achado pode preceder a toxemia clínica.

A toxemia termina com o parto, de modo que este pode ser terapeuticamente induzido em casos de doença severa em que a gestação passa das 36 semanas, ou mediante evidência de maturidade pulmonar fetal (ver anteriormente). Antes de 36 semanas, a paciente com pré-eclâmpsia é tratada com repouso. Testes de função renal e hepática usualmente são monitorados diariamente, acompanhados de determinação da contagem plaquetária, esfregaços sanguíneos e teste quantitativo do D-dímero.

A piora do quadro de pré-eclâmpsia é caracterizada por oligúria (< 400 mL/24 horas), trombocitopenia severa (plaquetas < 50.000/μl), aumento dos níveis séricos de creatinina e concentração se LDH total > 1.000 U/L.

Rompimento precoce das membranas

O rompimento precoce das membranas ocorre diante do escape de LA antes do início do trabalho de parto. Pode ser seguido de uma variedade de complicações, tais como corioamnionite, hipoplasia pulmonar fetal, ruptura da placenta e angústia respiratória neonatal.

O LA constitui parte dos líquidos vaginais posteriores e a identificação do componente amniótico é idealmente conduzida em 2 horas após o rompimento das membranas. Diferente das secreções vaginais, cujo pH é acídico (4,5 a 5,0), o LA é alcalino e exibe um pH de 7,0 a 7,5. O aspirado vaginal de uma grávida que apresenta descarga aquosa pode ser testado com papel de nitrazina, a fim de estimar o pH visualmente. Um teste positivo é indicado pelo aparecimento da cor azul, enquanto o resultado negativo é indicado pela cor amarelo-esverdeada. Um tampão cervical não deve contaminar o aspirado. Há uma incidência de 5% de resultados falso-positivos, associada à presença de sangue, muco, sêmen, urina alcalina ou sabão. Resultados falso-negativos são menos frequentes (1%), porém são possíveis em casos de rompimento de membrana que tenham ocorrido a mais de 24 horas ou quando a amostra é inadequada. O teste de nitrazina costuma ser executado na cabeceira e sua acurácia tem sido descrita como sendo de 90% na ausência de evento hemorrágico, descarga vaginal ou rompimento de membrana por tempo prolongado (Friedman, 1969).

Uma alíquota de líquido aspirado também pode ser transferida a uma lâmina de vidro para microscopia, deixada para secar por 5 minutos e examinada ao microscópio para detecção de um padrão em "samambaia" (fern), indicativo da presença de LA na coleção de líquidos vaginais. Um resultado falso-positivo com ferning é observado em menos de 2% dos casos e está associado à presença de sangue, urina ou muco cervical. Resultados falso-negativos ocorrem em menos de 5% dos casos.

A fibronectina fetal é uma proteína trofoblástica coriônica que normalmente se acumula no espaço virtual situado entre a placenta e a decídua uterina. Se a concentração dessa proteína estiver aumentada no plasma materno, no LA ou nas secreções cervicovaginais entre 22 a 34 semanas de gestação, significa que houve perda da integridade das membranas fetais, decorrente de infecção, pré-eclâmpsia ou rompimento precoce. Resultados falso-positivos (< 5%) podem estar relacionados a relações sexuais recentes.

Quando as membranas estão intactas e mesmo assim é detectado um aumento da concentração de fibronectina fetal no líquido vaginal (> 0,05 μg/mL), há probabilidade de que o parto seja prematuro (Ascarelli, 1997). Nesses casos, aumenta em 25 vezes o risco relativo de parto em 7 dias entre mulheres que apresentem sintomas de parto antes do tempo, entre a 24ª e a 34ª semana de gestação. O teste da

fibronectina parece ter valor para gestações em que o feto se desenvolve sozinho e na gestação de gêmeos, porém, não apresenta valor nos casos de gestação prolongada (> 42 semanas). Existe um imunoensaio comercializado para detecção de fibronectina fetal (Adeza Biomedical Corp., Sunnyvale, CA).

Asfixia fetal

Embora recém-nascidos usualmente não sofram efeitos adversos por acidose até quando o pH sanguíneo está abaixo de 7,1, a acidemia com pH abaixo de 7,2 tem sido empregada como limite de ação obstétrica para prevenir danos neurológicos decorrentes de hipóxia. No momento do parto, o pH do sangue fetal é determinado em uma amostra de sangue capilar coletada a partir da pele de uma parte exposta (p. ex., escalpo). A coleta de sangue muitas vezes é um procedimento difícil e as amostras podem ser rejeitadas pelo laboratório devido ao volume insuficiente, contaminação com bolhas de ar e coagulação. Amostragens repetidas são usuais e proporcionam a vantagem de demonstrar uma tendência de valores e de detectar alguns resultados espúrios. O desequilíbrio ácidobásico materno pode afetar o pH do sangue fetal e provocar erros de interpretação. Problemas técnicos, baixo valor preditivo para dano neurológico e baixa adesão às diretrizes práticas (Skelton, 1997) têm levantado dúvidas acerca do valor das determinações de pH realizadas com amostras de escalpo fetal.

Nos partos de rotina, um segmento de cordão umbilical preso com pinça pode ser removido e armazenado até que a condição do recém-nascido seja avaliada após 5 minutos. Se o bebê estiver clinicamente estável e vigoroso, e o escore de Apgar for "satisfatório", a amostra de cordão é descartada. Caso contrário, se houver razão clínica para se realizar análises de gases sanguíneos, uma artéria umbilical (a veia, se necessário) pode ser amostrada e submetida à análise (ACOG Committee, 1994). O benefício proporcionado pela quantificação de gases no sangue reside na possibilidade de determinar um déficit basal, de modo a permitir que os componentes respiratório e metabólico da acidose possam ser avaliados.

Outras avaliações

Infecções durante a gravidez. Infecções virais, bacterianas e parasíticas podem exercer um impacto significativo sobre a mãe, o feto ou ambos. Exemplos importantes são os casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite (A, B e C), da rubéola, da catapora, parvovírus B19, citomegalovírus (CMV), Chlamydia trachomatis, estreptococos do grupo B (GBS), Neisseria gonorrheae, sífilis, tuberculose, toxoplasmose e malária. Essas infecções são discutidas na Parte VII.

Distúrbios hematológicos e da coagulação. vários distúrbios podem exercer efeito negativo sobre a mãe, o feto ou ambos, entre os quais anemias maternas (nutricionais, falciforme), trombocitopenias maternas e fetais (púrpura trombocitopênica idiopática, trombocitopenia aloimune fetal, púrpura trombocitopênica trombótica), coagulopatias maternas (coagulação intravascular disseminada aguda, doença de von Willebrand) e trombofilias maternas. Essas doenças são abordadas nas Partes IV e V deste livro.

Referências bibliográficas

American College of Obstetrics and Gynecology: Committee Opinion No. 120: Folic Acid for the Prevention of Recurrent Neural Tube Defects. Washington, DC, ACOG, 1993.

American College of Obstetrics and Gynecology: Committee Opinion No. 138: Utility of Umbilical Cord Blood Acid–Base Assessment. Washington, DC, ACOG, 1994.

Ascarelli MH, Morrison JC: Use of fetal fibronectin in clinical practice. Obstet Gynecol Surv 1997; 52:S1–S12.

Ashwood E: Evaluating health and maturation of the unborn; the role of the clinical laboratory. Clin Chem 1992; 38:1529.

Ashwood ER: Clinical chemistry of pregnancy. In Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999.

Inclui descrições detalhadas de: (1) cálculo do risco de desenvolvimento de defeitos no tubo neural e síndrome de Down a partir dos resultados do teste de triagem do soro materno; e (2) espectrofotometria de líquido amniótico para detecção de bilirrubina e determinação da ocorrência de eritroblastose fetal (teste de Liley).

Bender TM, Stone LR, Amenta JS: Diagnostic power of lecithin/sphingomyelin ratio and fluorescence polarization assays for respiratory distress syndrome compared by relative operating characteristic curves. Clin Chem 1994; 40:541.

Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, et al: Neural-tube defects. N Engl J Med 1999; 241:1509–1518.

Braunstein GD: Testes. In Greenspan FS, Gardner DG (eds): Basic and Clinical Endocrinology, 7th ed. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004, pp 478–510.

Brock DJ, Bolton AE, Scringeour RA: Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly through maternal plasma α-fetoprotein. Lancet 1974; i:767–769.

Burton BK: Outcome of pregnancy in patients with unexplained elevated or low levels of maternal serum α-fetoprotein. Obstet Gynecol 1988; 72:709–713.

Carr BR, Rehman KS: Fertilization, implantation, and endocrinology of pregnancy. In Griffin JE, Ojeda SR (eds): Textbook of Endocrine Physiology, 5th ed. New York, Oxford University Press, 2004, pp 249–273.

Dubin S: Assessment of fetal lung maturity by laboratory methods. Clin Lab Med 1992; 12:603.

Friedman ML, McElin TW: Diagnosis of ruptured fetal membranes: Clinical study and review of the literature. Am J Obstet Gynecol 1969; 104:544–550.

Gilbert BR, Cooper GW, Goldstein M: Semen analysis in the evaluation of male factor subfertility. AUA Update Series 1992; 11:250–255.

Gluck L, Kulovich MV, Borer R, et al: Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. Am J Obstet Gynecol 1971; 109:440–445.

Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, et al: Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin A. J Med Screen 1998; 5:115–119.

Iskaros J, Kingdom J, Morrison JJ, et al: Prospective noninvasive monitoring of pregnancies complicated by red cell alloimmunization. Ultrasound Obstet Gynecol 1998; 11:432–437.

Ismail AA, Astley P, Burr WA, et al: The role of testosterone measurement in the investigation of androgen disorders. Ann Clin Biochem 1986; 23:113–134.

Johnson AM, Palomaki GE, Haddow JE: The effect of adjusting maternal serum α-fetoprotein levels for maternal weight in pregnancies with fetal open spina bifida. A United States Collaborative Study. Am J Obstet Gynecol 1990a; 163:9–11.

Johnson AM, Palomaki GE, Haddow JE: Maternal serum α-fetoprotein levels in pregnancies among black and white women with fetal open spina bifida. A United States Collaborative Study. Am J Obstet Gynecol 1990b; 162:328–331.

Koh GH, Yeo GS: Diagnosis of ectopic pregnancy – why we need a protocol. Singapore Med J 1997; 38:369–374.

Lobo RA, Mishell DR, Paulson RJ, et al: (eds): Mishell's Textbook of Infertility, Contraception, and Reproductive Endocrinology, 4th ed. Malden, MA, Blackwell Science, 1997.

Referência geral para avaliação clínica da função reprodutiva em mulheres.

Mari G: Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. N Engl J Med 2000; 342:9–14.

Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, et al: An association between low maternal serum α-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. Am J Obstet Gynecol 1984; 148:886–894.

Mesiano S, Jaffe RB: The endocrinology of human pregnancy and fetal-placental neuroendocrine development. In Strauss JF, Barbieri RL (eds): Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, 5th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004, pp 327–366.

Mortimer D: Practical Laboratory Andrology. New York, Oxford University Press, 1994.

Guia descritivo e referência para avaliação clínica da função reprodutiva no homem.

Myrianthopoulos NC, Melnick M: Studies in neural tube defects. 1. Epidemiology and etiologic aspects. Am J Med Genet 1987; 26:783–796.

Norwitz ER: Endocrine diseases of pregnancy. In Strauss JF, Barbieri RL (eds): Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, 5th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004, pp 735–785.

Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, et al: Semen parameters in a fertile versus subfertile population: A need for a change in the interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12:987–993.

Osborn DA, Lockley C, Jeffery HE, et al: Interobserver reliability of the click test: A rapid bedside test to determine surfactant function. J Paediatr Child Health 1998; 34:544–547.

Ozturk M, Bellet D, Manil L, et al: Physiological studies of human chorionic gonadotropin (hCG), αhCG, and βhCG as measured by specific monoclonal immunoradiometric assays. Endocrinology 1987; 120:549–558.

Pados G, Camus M, Van Steirteghem A: The evolution and outcome of pregnancies from oocyte donation. Hum Reprod 1994; 9:538–542.

Palomaki GE, Knight GJ, McCarthy JE, et al: Maternal serum screening for Down's syndrome in the United States: A 1995 survey. Am J Obstet Gynecol 1997; 176:1046–1051.

Palomaki GE, Never LM, Haddow JE: Can reliable Down's syndrome detection rates be determined from prenatal screening intervention trials? J Med Screen 1996; 3:12–17.

Queenan JT, Tomai TP, Ural SH, et al: Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14–40 weeks gestation: A proposal for clinical management. Am J Obstet Gynecol 1993; 168:1370–1376.

Resnik R, Killam AP, Battaglia FC, et al: The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. Endocrinology 1974; 94:1192.

Saraj AJ, Wilcox JH, Najmabadi S, et al: Resolution of hormonal markers of ectopic gestation: A randomized trial comparing single-dose intramuscular methotrexate with salpingostomy. Obstet Gynecol 1998; 92:989–994.

Sarkar S, Jones OW, Shioura N: Constancy in human sperm DNA content. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71:3512–3516.

Sideri M, De Virgiliis G, Guidobono F, et al: Immunologically undetectable human placental lacto-

gen in a normal pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 1983; 90:771.

Skelton AK, Madan MP, Thompson WD, et al: Utilization patterns of cord blood gas analysis. Obstet Gynecol 1997; 90:538–541.

Strauss JF, Barbieri RL (eds): Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, 5th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004.

Referência abrangente para todos os aspectos da função reprodutiva e da gravidez.

Strauss JF, Lessey BA: The structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. In Strauss JF, Barbieri RL (eds): Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, 5th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004, pp 255–305.

Tomlinson MJ, Effrossini K, Barratt CR: The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. J Androl 1999; 20:588–593.

Toriello HV, Higgins JV: Occurrence of neural tube defects among first-, second-, and third-degree relatives of probands: Results of a United States study. Am J Med Genet 1983; 15:601–606.

Trounson AO, Gardner DK: Handbook of In Vitro Fertilization, 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, 2000.

Referência geral para tecnologias reprodutivas assistidas (TRAs).

UK Collaborative Study on α-Fetoprotein in Relation to Neural Tube Defects. Maternal serum α-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Lancet 1977; i:1323–1332.

Van Steirteghem AC, Pados G, Devroey P: Oocyte donation for genetic indications. Reprod Fertil Dev 1992; 4:681–688.

Wald NJ, Kennard A, Smith D: First trimester biochemical screening for Down's syndrome. Ann Med 1994; 26:23–29.

Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, et al: Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:105–111.

Wilcox A, Baird DD, Weinberg CR: Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. N Engl J Med 1999; 340:1796–1799.

Willett GD (ed): Laboratory Testing in Ob/Gyn. Boston, Blackwell Scientific Publications, 1994.

Resumo abrangente e conciso da avaliação laboratorial da mulher.

Wolff H, Panhans A, Stolz W, et al: Adherence of Escherichia coli to sperm: A mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and E. coli. Fertil Steril 1993; 60:154–158.

World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction. London, Cambridge University Press, 1999.

CAPÍTULO 26

Vitaminas e oligoelementos

Martin J. Salwen MD

Vitaminas	445	Oligoelementos	451
Vitaminas hidrossolúveis	447	Cobre (Cu)	452
Vitaminas lipossolúveis	449	Zinco (Zn)	453
		Referências bibliográficas	455

PONTOS-CHAVE

- Quantidades muito pequenas de vitaminas e oligoelementos são necessárias para satisfazer as demandas metabólicas.
- As vitaminas são substâncias orgânicas essenciais que o corpo não consegue sintetizar ou não sintetiza suficientemente. Isso é específico para a espécie. As vitaminas podem atuar de várias maneiras, como cofatores enzimáticos, antioxidantes ou hormônios, e são ativas no metabolismo energético, no metabolismo proteico, na maturação de células sanguíneas e na formação óssea. As vitaminas não estão relacionadas quimicamente e apresentam atividades fisiológicas e fontes alimentares diferentes.
- As vitaminas podem ser substâncias químicas simples (p. ex., ácido ascórbico) ou incluir uma família de compostos intimamente relacionados (p. ex., vitaminas A, D, E, K e cobalamina). Elas podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade em água ou em lipídeos, a qual afeta a sua absorção e transporte, armazenamento, toxicidade, excreção e doenças que causam deficiências mesmo quando há ingestão nutricional suficiente.
- A avaliação da ingestão dietética e das reservas corporais exige diferentes estratégias de teste para diagnóstico de deficiência ou toxicidade. As deficiências são especialmente importantes nas idades extremas da vida e na desnutrição por qualquer causa. Frequentemente, um estudo terapêutico do nutriente considerado deficiente é a abordagem mais confiável para o diagnóstico e o tratamento.
- Oligoelementos essenciais possuem funções metabólicas específicas, que não podem ser substituídas por outros minerais.
- Deficiências de oligoelementos podem ser decorrentes da ingestão insuficiente porque o solo, a água ou as plantas da região são inadequados a um elemento específico; outras substâncias dietéticas interferem na absorção; há ausência da proteína necessária para a absorção ou o metabolismo; ou há suplementação inadequada em um paciente submetido à nutrição parenteral total.
- Os oligoelementos possuem funções estruturais, de transdução de sinal e catalíticas. Alguns são componentes de metaloenzimas, ou atuam como cofatores enzimáticos, fornecem elétrons e transportam oxigênio, ou são ativos na manutenção da conformação de macromoléculas.
- Para evitar a contaminação, os oligoelementos devem ser analisados com cuidado considerável, pois encontram-se amplamente distribuídos no ambiente e estão presentes nos líquidos e tecidos corporais em quantidades mínimas. Por isso, as técnicas devem ser suficientemente sensíveis para analisar concentrações de µg/L ou mesmo ng/L.
- As concentrações de oligoelementos nos líquidos corporais apresentam pouca correlação com a quantidade de reservas corporais. Os níveis séricos não são confiáveis, por causa da influência de condições não relacionadas. Não existem ensaios particularmente bons para a condição dietética de oligoelementos. Os resultados dos exames devem ser interpretados com cautela.
- O único exame definitivo de deficiência humana de oligoelemento é a avaliação da resposta clínica à suplementação controlada do elemento considerado deficiente.
- A ingestão necessária para causar toxicidade é muito variável para os diferentes oligoelementos.

Vitaminas e oligoelementos são um grupo heterogêneo de ingredientes dietéticos necessários para a saúde e a sobrevivência. Coletivamente, são descritos como micronutrientes por causa das quantidades muito pequenas necessárias para satisfazer os seus diversos papéis fisiológicos, e suas funções são tão variadas quanto suas composições (Mason, 1996). As quase duas dúzias de nutrientes essenciais são de catalisadores orgânicos não relacionados e elementos que não são sintetizados de maneira endógena (Rubin, 2005). Estados de deficiência e toxicidade são comumente insidiosos para ambos e podem ser atribuídos a uma ingestão inapropriada ou à utilização inadequada. Com frequência, as deficiências ocorrem por causa da desnutrição (McLaren, 1994). Inicialmente, o interesse era a prevenção de doenças carenciais e a elucidação dos papéis bioquímicos desses micronutrientes como coenzimas e cofatores. A pesquisa sobre o impacto nutricional de vitaminas e oligoelementos identificou ainda mais suas muitas outras importantes funções como a atividade antioxidante, a estimulação similar à de hormônios e seus papéis reguladores (Machlin, 1992).

Ingestão dietética de referência (DRI, dietary reference intake) é uma expressão abrangente que inclui valores de referência ou estimativas do nível dietético de cada nutriente essencial. A DRI foi introduzida pelo Food and Nutrition Board, do Institute of Medicine of the National Academy of Sciences (Institute of Medicine, 1997, 1998, 2000, 2002) e fornece quatro valores dietéticos de referência, originalmente destinados aos nutricionistas (Barr, 2002). A ingestão dietética recomendada (RDA, recommended dietary allowance) é a quantidade dietética diária média suficiente para as demandas nutricionais da maioria (97 – 98%) dos indivíduos saudáveis categorizados por idade, sexo e necessidade fisiológica. A RDA deriva do requerimento médio estimado (EAR, estimated average requirement), o nível estimado de ingestão diária média do nutriente para suprir as demandas da metade dos indivíduos saudáveis em um determinado estágio da vida e sexo. A ingestão adequada (AI, adequate intake) é uma estimativa do valor da ingestão diária recomendada média quando a RDA não puder ser determinada. O nível de ingestão máxima tolerada (UL, tolerable upper intake level) é o nível mais alto da ingestão diária de um nutriente que não apresenta risco de causar efeitos adversos à saúde na maioria dos indivíduos da população geral (Institute of Medicine, 1998). Quando a ingestão é acima do UL, a possibilidade de efeitos adversos aumenta.

Os micronutrientes foram envolvidos por uma aura mágica. Existe uma crença comum pouco judiciosa de que "megadoses" podem se tornar um elixir que cura tudo. Talvez isso ocorra por causa da extraordinária proeza fisiológica gerada pela ingestão de quantidades mínimas dessas substâncias. Contudo, eles podem ser perigosos. Embora sejam seguros dentro do nível de ingestão máxima tolerada (UL) (Institute of Medicine, 1998), existe o risco de overdose tóxica.

Vários grupos de indivíduos justificam o uso de suplementação seletiva de micronutriente. Eles incluem: gestantes, neonatos e lactentes; idosos; pacientes submetidos durante muito tempo à nutrição parenteral ou à hipernutrição; e aqueles com alterações nutricionais ou metabólicas. A pobreza e as idiossincrasias alimentares são causas persistentes de deficiências. Para a população geral, com raras exce-

ções, a suplementação de vitaminas e oligoelementos não é requerida, sendo mesmo desnecessária ou inútil, por causa de sua distribuição onipresente e de sua pronta disponibilidade a partir de várias fontes.

Esta seção irá abordar os micronutrientes, que incluem as vitaminas e os oligoelementos minerais. As 13 vitaminas estão listadas na Tabela 26.1, acompanhadas de um resumo de suas funções, deficiências e estados de toxicidade; os 10 oligoelementos minerais essenciais estão apresentados de maneira semelhante na Tabela 26.4, onde há também um resumo de suas funções, efeitos da deficiência e toxicidade.

Vitaminas

As vitaminas são moléculas orgânicas necessárias em quantidades pequenas (miligramas a microgramas) para a saúde, crescimento e reprodução (McCormick, 1994). Com exceção da vitamina D, o corpo depende completamente da ingestão dietética de vitaminas, embora haja alguma produção bacteriana entérica de vitamina K, ácido nicotínico, riboflavina, biotina, cobalamina e ácido fólico (Eastwood, 2003; Grodner, 2004). Entretanto, essas sínteses ocorrem principalmente no

Tabela 26.1 Vitaminas: funções, síndromes de deficiência e toxicidade

Vitaminas	Funções	Síndromes de deficiência	Toxicidade
Hidrossolúveis			
Ascorbato (vitamina C)	Muitas reações de oxidorredução, hidroxilação do colágeno	Escorbuto	Megadoses crônicas de 10–150 vezes a RDA (1–15 g), cãibras, diarreia, náusea, litíase renal. Megadoses, o corpo acelera o metabolismo de drogas. Pode produzir escorbuto quando a megadose é bruscamente interrompida
Biotina	Cofator em reações de carboxilação	Rara. Causada por falta de biotina na nutrição parenteral total. Além disso, a avidina na clara de ovo crua liga a biotina no intestino, impedindo a absorção. Dermatite, glossite, queda de cabelo, anorexia, depressão e hipercolesterolemia	Nenhuma toxicidade conhecida
Cobalamina (vitamina B_{12})	Metabolismo do folato e síntese de DNA, manutenção da mielinização do trato espinal	Anemia megaloblástica, neuropatia periférica	Nenhuma toxicidade registrada
Folato	Transferência e uso de unidades 1-carbono no DNA e síntese de aminoácidos	Anemia megaloblástica, defeitos do tubo neural	Efeito teratogênico em roedores Nenhum efeito adverso com doses orais elevadas
Niacina (ácido nicotínico)	Incorporada no NAD e no NAD-fosfato, reações de oxidorredução	Pelagra: demência, dermatite, diarreia	O excesso de niacina pré-formada e ácido nicotínico causa dilatação vascular, "rubor"; hepatotoxicidade
Tiamina (vitamina B_1)	Como o pirofosfato, é uma coenzima em reações de descarboxilação	Beribéri seco (neuromuscular) e úmido (insuficiência cardíaca), síndrome de Wernicke-Korsakoff	Somente quando administrada pela via parenteral. Cefaleia, fraqueza muscular, arritmia cardíaca, convulsões
Ácido pantotênico (vitamina B_3)	Incorporado na coenzima A	Nenhuma síndrome reconhecida	Doses muito altas: diarreia
Piridoxina (vitamina B_6)	Derivados são coenzimas em muitas reações intermediárias; metabolismo de aminoácidos, fosfolipídeos e glicogênio	Queilose, glossite, dermatite, neuropatia periférica, convulsões	Suplementação prolongada com megadose causa ataxia e neuropatia sensorial. O UL é de 100 mg/dia
Riboflavina (vitamina B_2)	Convertido em coenzimas flavina; cofator de muitas enzimas no metabolismo intermediário	Ariboflavinose, queilose, estomatite angular, glossite, dermatite, vascularização corneana	Não existe relato de toxicidade da riboflavina. Absorção limitada normalmente
Lipossolúveis			
Vitamina A (retinol)	Um componente do pigmento do bastão retineano. Papel na visão na luz tênue; crescimento; reprodução; manutenção da resistência a infecções	Metaplasia escamosa, especialmente glandular, hiperqueratose folicular; xeroftalmia; cegueira noturna; distúrbios da reprodução; vulnerabilidade a infecções	O fígado de urso polar e animais grandes apresenta níveis muito altos de vitamina A Aguda: pode causar tontura, cefaleia, vômitos, estupor, descamação cutânea e papiledema Crônica: teratogênica, osteoporose, hepatotoxicidade. Carotenoides em excesso: cor da pele laranja-amarelada distinta
Vitamina D (colecalciferol)	Promove a absorção de cálcio e fósforo; mineralização óssea e dental	Raquitismo em crianças; osteomalacia em adultos; hipocalcemia, tetania	Alta ingestão de vitamina D: hipercalcemia e hipercalciúria, toxicidade com UL superior a 50 µg. Desmineralização óssea, constipação, fraqueza muscular, litíase renal
Vitamina E (tocoferol)	Antioxidante, elimina radicais livres; respiração celular, principalmente no músculo; integridade dos eritrócitos	Degeneração espinocerebelar, ataxia	Desconforto gastrintestinal leve, náusea; coagulopatias em pacientes que fazem uso de anticonvulsivantes
Vitamina K (fitomenadiona)	Cofator de pró-coagulantes — fatores hepáticos II (protrombina), VII e X, proteína C e proteína S	Defeito da coagulação, distúrbio hemorrágico	Alimentos que contêm vitamina K não causam problemas de toxicidade. Quantidades excessivas podem diminuir o tempo de coagulação

Dados de Berdanier, 1998; Combs, 1998; Eastwood, 2003; Grodner, 2004; Kane, 2005; Katz, 2001.

Tabela 26.2 Vitaminas: RDA, fontes alimentares e análise de níveis corporais

Vitaminas	RDA	Fontes alimentares	Avaliação laboratorial para estados de deficiência subclínicos
Hidrossolúveis			
Ácido ascórbico (vitamina C)	H: 90 mg M: 75 mg Tabagistas: 125 mg	Frutas e vegetais: frutas cítricas, pimentas vermelhas e verdes, morangos, tomates, brócolis, batatas, verduras de folhas verdes	É necessária a coleta de amostra em jejum Ácido 5-ascórbico; deficiência < 11,4 O ácido ascórbico nos leucócitos por HPLC reflete as reservas tissulares Preparação e exame difíceis. < 11,4 nmol/10^8 células associado ao escorbuto; Ácido ascórbico na urina de 24 horas; reflete a ingestão dietética recente Exame de urina com carga de vitamina C
Biotina	AI: 30 ∝g	Fígado, rins, manteiga de amendoim, gema de ovo, levedura	Exame microbiológico
Cobalamina (vitamina B_{12})	H/M: 2,4 ∝g	Carne vermelha, peixes, aves, ovos e laticínios	Vitamina B_{12} no soro por RIE; deficiência < 74–59 pmol/L Ácido metilmalônico na urina
Folato	H/M: 400 ∝g Gestação: 600 ∝g Lactação: 500 ∝g	Verduras de folhas verdes, legumes, cereais, algumas frutas e sucos	A hemólise interfere no folato nos eritrócitos e folato no soro O metiltetra-hidrofolato no soro reflete a ingestão recente, não as reservas Ponto de cutoff, balanço negativo de folato < 6,8 nmol/L Formas de poliglutamato de folato presentes refletem as reservas de folato do corpo Folato (nmol/L): Depleção < 368 Deficiente < 322 Anemia < 227 Ácido formiminoglutâmico na urina Exame de urina com carga de histidina
Niacina (ácido nicotínico)	Niacina equivalente (NE) = 1 mg de niacina ou 60 mg de triptofano H: 16 mg NE/dia M: 14 mg NE/dia	Alimentos que contêm proteínas são boas fontes de niacina e triptofano. Carnes vermelhas, aves, peixes, legumes, cereais enriquecidos, leite, café e chá	Relação nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e NADP nucleotídeo nos eritrócitos: < 1 pode indicar risco de deficiência de niacina Relação 2-piridona (40–60%) e N′-metil nicotinamida (20–30%): deficiência de niacina quando a relação for < 1
Ácido pantotênico	AI 5 mg	Grãos integrais, legumes, carnes vermelhas, peixes, aves	Ácido pantotênico no sangue total: ingestão inadequada < 100 µg/dL Ácido pantotênico na urina: anormalmente baixo < 1 mg/dia
Piridoxina (vitamina B_6)	H/M: 1,3 mg	Grãos integrais, cereais, legumes, frangos, peixes, porcos e ovos	P-piridoxal-5′-fosfato, HPLC de troca de cátions, ensaio fluorimétrico Condição da vitamina B_6: Adequada: > 30 nmol/L Aceitável: ≥ 0,8 Limítrofe ou inadequada: < 0,5 Aminotransferases nos eritrócitos refletem a condição a longo prazo da piridoxina; a ALT é mais sensível à deficiência de vitamina B_6 que a AST Ácido 4-piridóxico na urina, ingestão dietética de B_6 Ácido xantenúrico na urina, metabólito do triptofano Exame de urina com carga de triptofano
Riboflavina (vitamina B_2)	H: 1,3 mg M: 1,1 mg A riboflavina é destruída pela luz	Leite, grãos enriquecidos, brócolis, aspargos, verduras de folhas verde-escuras, grãos integrais, pães enriquecidos, cereais. Além de laticínios, carnes vermelhas, peixes, aves e ovos	Glutátion redutase nos eritrócitos, expresso como relações em exames com e sem flavina adenina dinucleotídeo Dosagem de riboflavina na urina de 24 horas mensura a ingestão recente, e não as reservas no organismo, inespecífica; varia com a atividade física
Tiamina (vitamina B_1)	H: 1,2 mg M: 1,1 mg	Grãos integrais ou enriquecidos, farinha, carne de porco magra, legumes, sementes e nozes	Atividade da transcetolase nos eritrócitos, expresso como relação em exames com e sem tiamina pirofosfato Dosagem de tiamina na urina de 24 horas mensura a ingestão dietética recente, e não as reservas do organismo
Lipossolúveis			
Vitamina A (retinol)	Equivalentes da atividade do retinol (RAE, retinol activity equivalents) H = 900 µg RAE M: 700 µg RAE	Vitamina A natural pré-formada somente na gordura de alimentos de origem animal: leite integral, manteiga, fígado, gema de ovo e peixe gorduroso. Carotenoides são encontrados em frutas e vegetais de cor verde-escura, amarela e laranja: brócolis, melão, batata-doce, cenouras, tomates, espinafre	A hemólise interfere Reservas hepáticas de retinol: retinol no soro, exame insensível Resposta à dose: retinol e de-hidrorretinol no soro por HPLC, 4–6 horas após a administração oral de 3,4-didehidroretinil acetato (100 µg/kg); índice mais sensível da condição limítrofe do retinol que o retinol sérico Resposta relativa à dose: proteína ligadora do retinol, índice de retinol, baixa especificidade. Na deficiência de vitamina A, a proteína ligadora do retinol acumula-se no fígado como apoproteína ligadora do retinol (proteína não ligada ao retinol). Após a dose de retinol, ele se liga à apoproteína ligadora do retinol no fígado; holoproteína ligadora do retinol (proteína ligada ao retinol) é liberada do fígado e provoca aumento do retinol sérico. Coleta de amostra de sangue no início e 5 horas após a dose oral de vitamina A. Calcular a resposta relativa à dose (%): 14 a 20%, condição limítrofe da vitamina A Carotenoides no soro indicam a ingestão atual de carotenoides Adaptação rápida ao escuro para cegueira noturna

Tabela 26.2 Vitaminas: RDA, fontes alimentares e análise de níveis corporais (continuação)

Vitaminas	RDA	Fontes alimentares	Avaliação laboratorial para estados de deficiência subclínicos
Vitamina D	AI H/M: 5 ∝g Idades: 51–70 anos 10 ∝g > 70 anos 15 ∝g	Manteiga, gema de ovo, fígado e peixes gordurosos. Leite fortificado com vitamina D A exposição à luz solar converte o precursor em vitamina D ativa	25-hidróxi vitamina D no soro: Deficiência: < 3 nmol/L Toxicidade: > 500 nmol/L Dosagem separada de 25-OH-vitamina D no soro por HPLC, exame por CPBA (competitive protein binding assay), indica a quantidade total de vitamina D endógena e exógena; reflete o conteúdo de vitamina D no fígado
Vitamina E (tocoferol)	Equivalentes de α-tocoferol (a-TE): H/M: 15 mg a-TE	Óleos vegetais, milho, soja, açafroa. Grãos integrais, sementes, nozes, germe de trigo, vegetais de folhas verdes	Relação tocoferol/lipídeos no soro: HPLC de fase reversa com detector de fluorescência da alta sensibilidade; os níveis correlacionam-se com o colesterol sérico; deficiência quando a relação for < 0,6 mg de tocoferol total/g de lipídeos séricos
Vitamina K	AI H: 120 µg M: 90 µg	A vitamina K é sintetizada por bactérias no jejuno e no íleo; a ingestão dietética ainda é necessária. Vegetais de folhas verde-escuras	Tempo de protrombina

H = homem; M = mulher; HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho; CPBP = ensaio competitivo de proteína ligadora.

Dados de Grodner, 2004; Gibson, 2002; Brewster, 1996; McCormick, 1994.

cólon e não são significativas do ponto de vista nutricional porque as vitaminas produzidas são mal absorvidas. A falta de uma determinada vitamina causa um déficit metabólico claramente definível. Isso é específico para a espécie, uma vez que existem diferenças na capacidade de síntese entre diferentes espécies. Muitos animais inferiores podem produzir seu próprio ácido ascórbico. No entanto, os humanos não conseguem fazê-lo e necessitam de ácido ascórbico para prevenir o escorbuto (Combs, 1998).

As vitaminas podem ser classificadas de acordo com as suas propriedades, como função, fonte nutricional ou solubilidade na água. Ver a Tabela 26.1: Vitaminas: funções, síndromes de deficiência e toxicidade. Nesta discussão, as vitaminas são divididas em dois grupos baseados em sua solubilidade. A solubilidade afeta a absorção e o transporte. Vitaminas hidrossolúveis são facilmente absorvidas, o que permite um armazenamento mínimo. Contudo, deficiências podem se desenvolver rapidamente, em semanas (Grodner, 2004). Tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cobalamina, vitamina C, folato, ácido pantotênico e biotina são vitaminas hidrossolúveis. As vitaminas A, D, E e K são consideradas não hidrossolúveis, ou lipossolúveis, e dependem da digestão lipídica normal e da solubilização micelar para a absorção, assim como da presença de bile. A má absorção de gorduras pode causar deficiências de vitaminas lipossolúveis, mesmo quando há ingestão dietética adequada.

As vitaminas são encontradas em quase todos os alimentos, mas nenhum grupo alimentar é uma boa fonte de todas as vitaminas (Grodner, 2004). Ver a Tabela 26.2: Vitaminas: RDA, fontes alimentares e análise de níveis corporais. O complexo de vitaminas B inclui: tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e cobalamina. A cobalamina está presente somente em produtos animais, os quais incluem carne vermelha (especialmente o fígado), leite, queijo, ovos e outras proteínas animais. Todos os outros membros do complexo de vitaminas B são encontrados em verduras, leite e fígado. A vitamina A e a niacina têm substâncias precursoras que podem ser convertidas na forma ativa da vitamina nos seres humanos. A vitamina K e a biotina são produzidas pela microflora intestinal, mas em quantidades insuficientes para manter o metabolismo. A niacina e a vitamina D podem ser produzidas no corpo humano. Tanto a tiamina quanto a biotina possuem antagonistas naturais (Williams, 2002).

Deficiências são particularmente importantes nos extremos da vida, uma preocupação para o feto em desenvolvimento, para o lactente e o idoso (Seymour, 2000). As deficiências também são frequentes naqueles com desnutrição proteica e energética em países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, as condições que levam a deficiências vitamínicas incluem a diminuição da ingestão, da absorção ou da produção. A diminuição da ingestão ocorre caracteristicamente em pacientes alcoolistas (tiamina); com doenças do intestino delgado (folato e as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K); vegetarianos (vitamina D, cobalamina); e idosos (vitamina D, folato). Condições que causam diminuição da absorção são doenças hepáticas e do trato biliar (vitaminas A, D, E e K); e doença ou ressecção ileal (cobalamina). Condições que causam diminuição da produção são as doenças renais (vitamina D); e drogas como o metotrexato (folato). Também podem ocorrer deficiências naqueles indivíduos com doenças crônicas como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A avaliação das reservas do corpo e do estado nutricional crônico relacionada aos micronutrientes continua a apresentar dificuldades. Geralmente, os exames indicam somente a ingestão nutricional recente. Um ensaio terapêutico do nutriente considerado deficiente é, com frequência, a abordagem mais fácil e mais confiável. Estratégias diagnósticas específicas são úteis (Feldman, 1994; Gibson, 2002). Ver Tabela 26.2.

A toxicidade raramente é decorrente da ingestão dietética excessiva. É comum que ela seja causada por overdoses de suplementos vitamínicos. Altas doses únicas de vitaminas hidrossolúveis raramente são tóxicas, pois são rapidamente excretadas, mas doses repetidas podem causar toxicidade. A vitamina A apresenta um potencial tóxico maior que o das outras hipervitaminoses, embora a incidência real seja baixa. Ingestões de 25 vezes a RDA são consideradas potencialmente tóxicas para a vitamina A. Os carotenoides possuem baixa toxicidade. A vitamina D é a outra vitamina com potencial relativamente alto de toxicidade. Ingestões de aproximadamente 50 vezes a RDA têm sido relatadas como tóxicas em humanos. As crianças demonstraram ser particularmente sensíveis quando altas doses de vitamina D foram administradas na profilaxia ou no tratamento do raquitismo, e a hipervitaminose D foi exacerbada por altas ingestões de cálcio e fósforo (Combs, 1998).

Vitaminas hidrossolúveis

Tiamina (vitamina B_1). A tiamina pirofosfato é um cofator essencial de enzimas envolvidas no metabolismo intermediário de carboidratos e aminoácidos e é importante na função cerebral. Boas fontes de tiamina incluem leveduras, legumes, produtos com grãos enriquecidos e carne de porco. Os sinais iniciais de deficiência incluem a anorexia, perda de peso, fraqueza muscular, apatia, confusão mental e irritabilidade. As consequências tardias incluem o edema e a insuficiência cardíaca com débito alto (beribéri úmido), polineuropatia com diminuição de reflexos, parestesias, fraqueza e atrofia muscular (beribéri seco), e psicose (síndrome de Wernicke-Korsakoff) caracterizada por demência, ataxia e oftalmoplegia. Lesões dos corpos mamilares e da área contígua ao terceiro ventrículo são achados característicos (Rubin, 2005). A forma infantil ocorre em lactentes que são amamentados por meses sem suplementação. A insuficiência cardíaca em lactentes de baixa idade pode ser súbita e rapidamente fatal. O alcoolismo em

adultos está frequentemente associado à deficiência, talvez porque o álcool interfira na captação e no metabolismo da tiamina. A deficiência de tiamina também é observada naqueles com má nutrição. Não foi descrita toxicidade com altas doses orais. Fatores antitiamina estão presentes na noz de betel, no chá e em alguns alimentos. Nos Estados Unidos, todos os pães e farinhas são enriquecidos com tiamina. Existe uma perda importante de tiamina quando os alimentos são cozidos em água, pois ela se torna instável em altas temperaturas. A tiamina é produzida no cólon por enterobactérias normais, mas a contribuição é aparentemente discreta. A tiamina é absorvida através do intestino delgado e liga-se à albumina no plasma. Em ingestões altas, o excesso é excretado na urina (Kohlmeier, 2003). A atividade da transcetolase eritrocitária com ou sem tiamina pirofosfato adicionada é um exame útil para a avaliação de deficiência de tiamina. O sangue total heparinizado é necessário, e o exame é mais bem processado em uma amostra fresca (Truswell, 2002a). O teste mais confiável para a deficiência de tiamina é a resposta à administração parenteral dessa vitamina (Rubin, 2005).

Riboflavina (vitamina B_2). Normalmente, ela forma duas coenzimas, a flavina mononucleotídeo e a flavina adenina dinucleotídeo. Elas têm um papel importante no transporte de elétrons em vários sistemas oxidativos. As fontes dietéticas incluem leite e laticínios, carnes vermelhas, aves, peixes e vegetais verdes. Pães e cereais são fortificados com riboflavina. A absorção ocorre predominantemente no jejuno. Nos humanos, a riboflavina é tão prevalente na dieta que uma deficiência grave o suficiente para causar debilidade acentuada não é conhecida. Deficiências leves de riboflavina são provavelmente o lugar comum. A deficiência frequentemente ocorre em associação com a falta de tiamina e/ou niacina (Guyton, 1997). Na deficiência prolongada, ocorre fissura e edema de lábios (queilose), fissura e inflamação dos ângulos da boca (estomatite angular), língua lisa e com cor vermelho-escura (glossite, atrofia), descamação gordurosa das bochechas e das áreas atrás das orelhas (dermatite seborreica) e anemia normocítica (Kohlmeier, 2003). A ceratite intersticial da córnea é a lesão mais perturbadora. Ela causa opacificação e ulceração da córnea (Rubin, 2005). Deficiências durante a lactação e a infância comprometem o crescimento. Existe pouco perigo de toxicidade, porque o excesso de riboflavina é rapidamente excretado. Uma amostra de urina de 24 horas indicará a ingestão recente de riboflavina (Kohlmeier, 2003).

Niacina (ácido nicotínico). Tem um papel importante na formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e de seu fosfato NADP, que são importantes no metabolismo intermediário e em um grande número de reações de oxidorredução. Proteínas animais são alimentos ricos em triptofano, assim como carnes vermelhas, ovos e leite. Elas são boas fontes de niacina sintetizada de maneira endógena. A urina é a principal via de excreção de metabólitos da niacina. A niacina é encontrada em muitos grãos. Sua deficiência causa pelagra, que é pouco comum atualmente, mas observada em alcoolistas desnutridos e em pessoas com idiossincrasias alimentares que não consomem proteínas suficientes, que apresentam deficiência de triptofano e que não fazem uso de niacina exógena. A má absorção de triptofano, como a observada na doença de Hartnup ou na síndrome carcinoide, onde o triptofano é consumido para produzir serotonina, pode produzir sintomas leves de pelagra. Deficiências de piridoxina e riboflavina aumentam a demanda de niacina, porque ambos são cofatores necessários para a síntese de niacina. O milho é uma fonte ruim de triptofano, e a niacina no milho está ligada e possui disponibilidade ruim. A pelagra é prevalente em áreas onde o milho é o alimento básico, como em certos países da África (Guyton, 1997).

A pelagra é caracterizada por dermatite, diarreia, demência e, quando não tratada, provoca morte. Ocorre dermatite descamativa das áreas expostas a luz ou pressão, como joelhos e cotovelos. As mãos apresentam dermatite descamativa áspera com uma distribuição do tipo luva e um padrão de hiperqueratose, vascularização e inflamação crônica. Lesões similares são observadas na boca e na mucosa vaginal (Rubin, 2005). A ingestão excessiva de niacina causa rubor (sensação de queimação e formigamento na face, tórax e membros superiores). A lesão hepática pode ocorrer com o uso continuado de doses muito altas, que costumam ser utilizadas com o objetivo de reduzir o colesterol.

Piridoxina (vitamina B_6). É uma coenzima e participa em mais de 100 reações de transaminação, descarboxilação e outras, incluindo a etapa inicial da síntese de porfirinas, mobilização de glicogênio, trans-sulfuração de aminioácidos e síntese de neurotransmissores. Boas fontes alimentares incluem cereais fortificados, vísceras, alimentos para os músculos, batatas e frutas, exceto as cítricas. O cozimento acarreta a liberação da piridoxina na água que será descartada. A urina é a principal via excretora. Deficiências geralmente são observadas com outras deficiências vitamínicas ou proteicas e ocorrem em alcoolistas. A deficiência de piridoxina é pouco comum e pode causar anemia hipocrômica microcítica, com reservas de ferro saturadas, crises convulsivas, anormalidades eletrocardiográficas, depressão, confusão mental, dermatite seborreica e possivelmente anormalidades plaquetárias e da coagulação. Vários erros congênitos do metabolismo de aminoácidos respondem a doses muito altas de piridoxina. A homocisteinúria, onde ocorre um maior risco de doença cardiovascular, responde à suplementação de folato, cobalamina e, algumas vezes, piridoxina.

Exames bioquímicos (TRUSWELL, 2002)

- Dosagem do nível plasmático de piridoxal 5'-fosfato (PLP). Trata-se da principal forma de coenzima no corpo e a forma primária da vitamina B_6 circulante no plasma. O valor normal >30 nmol/L indica uma condição adequada no adulto.
- Dosagem de ácido 4-piridóxico na urina de 24 horas. O nível reflete a ingestão dietética recente de vitamina B_6. Ela varia com idade, sexo e gestação. Mais de 0,8 mg/dia é aceitável para a vitamina B_6.
- A dosagem de ácido xanturênico na urina após uma carga oral de triptofano (ou metionina) é uma mensuração indireta da deficiência de vitamina B_6 funcional.
- Atividade da alanina aminotrasferase do eritrócito (RBC-ALT), com ou sem PLP in vitro. A RBC-ALT diminui na deficiência.

Ingestão excessiva. Doses muito altas de piridoxina (>100 mg/dia nos adultos) podem causar neuropatia sensorial periférica e possivelmente lesões cutâneas (Kohlmeier, 2003).

Cobalamina (vitamina B_{12}). Contém cobalto. Sua estrutura é complexa e sintetizada apenas por bactérias. É produzida por bactérias colônicas, mas não é absorvida. Possui muitas funções metabólicas como coenzima receptora de hidrogênio. Sua função mais importante é atuar como coenzima para reduzir ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, uma etapa na formação dos genes. As duas principais funções da cobalamina são a promoção do crescimento e a promoção da maturação dos eritrócitos. A ingestão dietética inadequada não é a causa usual de deficiência de cobalamina. A mais comum é a má absorção por causa da atrofia da mucosa gástrica, com consequente quantidade inadequada de fator intrínseco, ou por doença do íleo terminal. A deficiência de cobalamina causa anemia megaloblástica, na qual os eritrócitos não amadurecem adequadamente. Também ocorre a desmielinização de fibras nervosas grandes da medula espinal, especialmente das colunas posteriores e laterais. A desmielinização causa perda da sensibilidade e da potência motora nos membros inferiores. As reservas do corpo são suficientes para 3 a 6 anos. As fontes são fígado, frutos do mar, peixes, carne vermelha, ovos, leite, queijos e iogurte. Os vegetarianos apresentam risco de deficiência de cobalamina (Eastwood, 2003). O nível plasmático de cobalamina < 80 pg/mL indica deficiência. O nível sérico ou urinário elevado de metilmalonato e o nível plasmático aumentado de homocisteína indicam que a cobalamina está baixa. O teste de Schilling mensura a absorção de cobalamina, com ou sem fator intrínseco, em dias diferentes (West, 2002). A toxicidade da cobalamina é extremamente baixa, e doses altas, de até 3 mg/dia, são toleradas sem efeitos tóxicos. A ingestão dietética média de cobalamina é inferior a 1 μg/dia (Eastwood, 2003).

Ascorbato (Vitamina C). É um potente agente redutor envolvido em muitas reações de oxidorredução e na transferência de prótons. A vitamina C participa na síntese do sulfato de condroitina e na formação da hidroxiprolina do colágeno. Ela tem um papel importante na cicatrização, na biossíntese de alguns neurotransmissores e na função imune (Rubin, 2005). É essencial para as gengivas, artérias e outros tecidos moles, ossos (síntese de colágeno), função cerebral e nervosa (síntese de neurotransmissores e hormônios). Também é importante para o metabolismo de nutrientes (especialmente ferro, proteínas e gorduras) e na defesa antioxidante e eliminação de radicais livres (diretamente e pela ativação da vitamina E). A vitamina C está em alta concentração em leucócitos, glândulas suprarrenais, hipófise e cérebro. As fontes alimentares são as frutas cítricas, frutas vermelhas, tomates e muitas frutas e vegetais.

O armazenamento e cozimento prolongados provocam perda significativa da vitamina. A RDA é de 90 mg/dia para os homens e 75 mg/dia para as mulheres. A deficiência causa escorbuto, com sangramento gengival (se houver dentes), articulações doloridas e aumentadas de volume, má cicatrização, confusão mental, fadiga e diminuição da função imune. O escorbuto é atualmente observado com maior frequência em alcoolistas e em idosos pobres que vivem sozinhos. Os sintomas do escorbuto foram descritos desde a antiguidade. A doença era disseminada entre marinheiros nos séculos XVI a XVIII, e o padrão típico era o de sangramento gengival, articulações doloridas e aumentadas de volume e fraqueza muscular. O início ocorria meses após o início da viagem. Expedições britânicas sofreram perdas devastadoras de homens por causa do escorbuto. Isso levou o Ministério da Marinha a buscar uma cura e, em 1747, James Lind, um cirurgião escocês, realizou um experimento clínico de nutrição a bordo de um navio, testando seis diferentes suplementos nutricionais administrados em seis pares de marinheiros com escorbuto. Laranjas e limões curaram o escorbuto, foi o que ele descreveu, em 1753, no seu livro Treatise of the scurvy (Jacob, 1994). Ele acreditava que o escorbuto era causado pela umidade e pela aglomeração. Apenas posteriormente foi compreendido que o escorbuto surgia por causa da deficiência de vitamina C. A ingestão excessiva de 2.000 mg ou mais por dia pode causar irritação gástrica e intestinal, litíase renal e interferir no metabolismo do cobre. Diferentemente dos outros vertebrados, os seres humanos não são capazes de completar a síntese da vitamina C (Kohlmeier, 2003). Exames para avaliar a condição da vitamina C podem ser realizados no soro ou nos leucócitos. Ambos correlacionam-se bem com a ingestão dietética. Testes de urina tendem a refletir a ingestão dietética recente (Skeaff, 2002).

Folato. É o nome genérico de compostos relacionados ao ácido fólico (ácido pteroilglutâmico). Sua função mais importante é a síntese de purinas e pirimidinas, que são necessárias para a formação de ácido desoxirribonucleico (Guyton, 1997). Ele também é importante para a maturação dos eritrócitos. Está amplamente disponível em plantas e, em menor extensão, em vísceras. Mais da metade do conteúdo de folato nos alimentos é perdida durante o cozimento. A deficiência causa anemia megaloblástica e leucopenia. Na gestação, defeitos do tubo neural fetal estão associados ao baixo nível de folato, e a suplementação durante a gestação reduz acentuadamente a incidência (Wildman, 2000).

Ácido pantotênico. Faz parte da coenzima A (CoA) e da proteína transportadora de acil (ACP, acyl carrier protein). Ambas são transportadoras de grupos acil. A acetil-CoA está envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico, e a CoA, na síntese de lipídeos. Ele é transportado nos eritrócitos como CoA. As maiores concentrações tissulares são observadas no fígado, suprarrenais, rins, cérebro, coração e testículos. A CoA e a ACP são metabolizadas em ácido pantotênico livre e excretadas na urina. O nível urinário indica a ingestão dietética e varia de 2 a 7 mg/dia. O ácido pantotênico está amplamente presente nos alimentos, e a deficiência dietética ocorre somente na desnutrição grave com outras deficiências nutricionais. A "síndrome do ardor nos pés" observada em prisioneiros de guerra desnutridos durante a Segunda Guerra Mundial respondia a altas doses de Ca-pantotenato (Truswell, 2002a).

Biotina. É uma coenzima para várias enzimas carboxilase: piruvato carboxilase (fornece oxaloacetato para o ciclo do ácido tricarboxílico), acetil-CoA (coenzima A) e carboxilase (síntese de ácidos graxos). A deficiência de biotina é rara, porque ela está amplamente distribuída nos alimentos e a produção bacteriana intestinal suplementa a ingestão dietética. A avidina, uma antivitamina, é encontrada na clara de ovo crua e pode causar uma deficiência de biotina quando ingerida em grande quantidade, uma vez que se liga à biotina no intestino, prevenindo sua absorção. A deficiência de biotina em humanos ocorre da falha em incluir a biotina na nutrição parenteral total e é caracterizada por dermatite descamativa, glossite, perda de cabelo, anorexia, depressão e hipercolesterolemia (Truswell, 2002a).

Vitaminas lipossolúveis

Vitamina A (retinol). A atividade da vitamina A é obtida de duas classes de compostos: vitamina A pré-formada, retinol e compostos relacionados, e os precursores do β-caroteno e carotenoides relacionados. Estes últimos são pró-vitaminas, encontrados em pigmentos vegetais amarelos e vermelhos abundantes em vegetais e em algumas frutas. O retinol é essencial para a visão em intensidades luminosas baixas, na síntese de "sulfato ativo" e na reprodução. As funções nas quais o ácido retinoico também participa incluem a diferenciação celular, envolvimento na morfogênese; síntese de glicoproteínas; expressão genética; imunidade; crescimento; e prevenção de cânceres e de doenças cardíacas (Truswell, 2002b). A vitamina A é necessária para manter certas membranas celulares especializadas; para a maturação esquelética; para participar na formação dos bastões sensíveis à luz da retina; e na estrutura de membranas celulares. A deficiência de vitamina A é pouco comum em países desenvolvidos, mas continua sendo uma causa frequente de cegueira por lesão corneana nas regiões mais pobres do mundo, particularmente em partes da África, Oriente Médio e Sudeste Asiático. O retinol é encontrado em grande concentração no fígado de peixes, e vegetais verdes com folhas são uma rica fonte de caroteno (Rubin, 2005). Hipócrates (466-377 a.C.) escreveu que o fígado poderia curar a cegueira noturna (West, 2002). A deficiência de vitamina A é observada onde a dieta não inclui laticínios e vegetais por longo período ou em síndromes de má absorção (Eastwood, 2003). A deficiência causa metaplasia escamosa e, como consequência, obstrução de glândulas sudoríparas e lacrimais por restos escamosos. Epitélios da traqueia, brônquios, pelve renal, ductos pancreáticos, útero e glândulas salivares são comumente afetados. O sinal mais precoce da deficiência de vitamina A é a perda da visão na luz tênue (cegueira noturna). A toxicidade é usualmente produzida pela suplementação excessiva de vitamina A, especialmente em crianças. A toxicidade da vitamina A ocorreu em exploradores que consumiram fígado de urso polar, o qual possui uma concentração excepcionalmente alta de vitamina A. Na toxicidade, o fígado e o baço aumentam de volume com macrófagos carregados de lipídeos. A vitamina A é encontrada nos hepatócitos, e a toxicidade prolongada causa cirrose. Os sintomas iniciais são cefaleia, hiperexcitabilidade e dor óssea. No início, a maioria das lesões é reversível com a interrupção da ingestão excessiva. Altas doses de derivados sintéticos do ácido retinoico são teratogênicas. O excesso de caroteno é benigno e causa uma descoloração na pele semelhante à icterícia (Rubin, 2005).

Vitamina D. A exposição da pele à luz ultravioleta converte naturalmente o 7-de-hidrocolesterol em colecalciferol ou vitamina D_3. Como o corpo consegue produzir vitamina D, alguns a designaram como um hormônio. Trata-se de uma vitamina para aqueles que vivem principalmente em ambientes fechados, especialmente no hemisfério norte, assim como para aqueles cujas roupas cobrem completamente a pele, bloqueando a luz solar. O colecalciferol é derivado da dieta de fontes animais, particularmente fígado e óleo de peixes. O ergocalciferol, ou vitamina D_2, possui potência igual nos humanos e é derivado da sua pró-vitamina, o ergosterol, que ocorre em fungos e plantas e é a principal forma sintética utilizada para fortificar o leite e a margarina. Tanto a vitamina D_2 quanto a D_3 exigem hidroxilação para a forma ativa, a qual ocorre no fígado e nos rins. A vitamina D promove a absorção de cálcio e fosfato do intestino delgado (DeLuca, 1992; Truswell, 2002b). A deficiência é decorrente de uma dieta inadequada; luz solar insuficiente atingindo a pele; absorção inadequada, como a que ocorre nas síndromes de má absorção de lipídeos; ou falha na conversão para o metabólito ativo por causa de doença hepática ou renal crônica. Em crianças, antes do fechamento epifisário, a síndrome da lesão óssea é denominada raquitismo; nos adultos, ela é chamada osteomalacia. A incidência diminuiu com a adição de ergosterol ao leite e outros alimentos (Rubin, 2005). A principal função da vitamina D é a homeostasia do Ca^{2+} e do fosfato, regulando a adsorção intestinal, a mineralização e mobilização ósseas e a excreção renal (Combs, 1998). A hipervitaminose D ocorre, com frequência, por causa da ingestão excessiva de preparações com vitamina D. A conversão anormal de metabólitos ativos ocorre algumas vezes na sarcoidose. A hipervitaminose D causa hipercalcemia. Os sintomas iniciais são fraqueza e cefaleia. As sequelas de hipercalcemia incluem a hipercalciúria, a nefrocalcinose, a nefrolitíase e a calcificação ectópica de vasos sanguíneos, coração e pulmões (Rubin, 2005). A superexposição à luz ultravioleta acarreta queimadura solar, mas não causa hipervitaminose D. Os níveis plasmáticos de cálcio e fósforo caem na deficiência de vitamina D, e o nível de fosfatase alcalina (isoenzima óssea) aumenta no raquitismo e na osteomalacia. A maneira mais direta de se determinar a condição da vitamina D é a dosagem da 25-OH-vitamina D (Truswell, 2002b).

Vitamina E (tocoferol). É um antioxidante lipossolúvel ou eliminador de radicais livres que inativa radicais livres de oxigênio. Existem oito formas naturais. A vitamina E é o único antioxidante lipossolúvel encontrado no plasma e na membrana de eritrócitos. O milho e a soja são ricos em vitamina E. A deficiência é pouco comum, mas pode ocorrer como consequência da má absorção, na nutrição parenteral total ou em lactentes prematuros. Os achados clínicos em deficiências são inconsistentes, com relatos de ataxia e perda de reflexos. Não existe toxicidade conhecida (Eastwood, 2003).

Vitamina K (fitomenadiona). Está envolvida na ativação de proteínas importantes na coagulação sanguínea, protrombina (II), fator VII, fator IX e fator X, assim como as proteínas C e S. A deficiência dos fatores listados pode causar defeitos da coagulação e distúrbios hemorrágicos. O tempo de protrombina monitora funcionalmente a atividade da vitamina K. A vitamina K ocorre sob duas formas: a K_1 está presente em vegetais verdes frescos (p. ex., brócolis, repolho e espinafre) e fígado; a K_2 é produzida por bactérias intestinais. A deficiência dietética é pouco comum. Ela ocorre na má absorção de gorduras, como na doença celíaca e na obstrução biliar. Além disso, a esterilização da flora intestinal com antibiótico pode causar deficiência de vitamina K.

Oligoelementos

Os oligoelementos minerais são metais, com exceção de selênio e halogenados, do fluoreto e do iodeto. Individualmente, estão presentes nos tecidos em concentrações < 1 μg/g de tecido molhado (Kane, 2005) e constituem menos de 0,01% do peso corporal seco (Gibson, 1990; Taylor, 1996). Foram designados oligoelementos porque sua quantificação com os métodos analíticos disponíveis na época era impossível (O'Dell, 1997). Os oligoelementos essenciais são aqueles que causam comprometimento da saúde, da função ou do desenvolvimento normal quando há uma deficiência, que é corrigida quando é realizada uma suplementação com níveis fisiológicos do elemento em questão (Mertz, 1981a; Gibson, 1990), e apresentam funções metabólicas específicas in vivo que não podem ser efetivamente substituídas por outros elementos similares (Milne, 1994).

Os diversos oligoelementos essenciais foram descobertos por vários meios diferentes. Foram observadas deficiências de alguns desses elementos em áreas onde o solo, a água ou as plantas possuíam quantidades inadequadas de um elemento específico, como o iodo, o flúor, o cobalto ou o cobre. Deficiências também foram identificadas quando elementos essenciais tornaram-se biologicamente indisponíveis por causa da interferência de outras substâncias ingeridas. Por exemplo, a deficiência de zinco observada especialmente em homens do Oriente Médio e em hispânicos de Denver por causa do consumo de pão sem levedura e rico em fitato, o qual é composto por um alto conteúdo de fibras, e do baixo consumo de carne vermelha em suas dietas (Wildman, 2000); e a anemia da deficiência de cobre induzida pelo zinco (Milne, 1994). Outras deficiências são causadas por uma mutação que causa a falta de uma proteína necessária para absorver ou metabolizar o elemento. Os sintomas de outras deficiências foram identificados em pacientes cujas dietas não supriam o elemento necessário ou naqueles submetidos à nutrição parenteral total não suplementada com um oligoelemento essencial (O'Dell, 1997).

Geralmente, dez oligoelementos minerais são reconhecidos como essenciais nos seres humanos – ver Tabela 26.3: "Classificação de oligoelementos minerais". Somente cobre, iodo, selênio e zinco estão associados a deficiências bem definidas (Kane, 2005). Ainda não foi demonstrado de modo conclusivo um papel bioquímico necessário para o cromo, o flúor ou o manganês, embora tenham sido descritos sinais de deficiência (Mertz, 1981b). É difícil criar um modelo de deficiência, por causa da distribuição generalizada desses elementos no ambiente e nos suprimentos alimentares, o que frequentemente causa contaminação do sistema de teste, e porque apenas quantidades mínimas são necessárias para suportar os processos fisiológicos. Permanece incerto se outros oligoelementos minerais são essenciais nos animais e nos humanos. Alguns autores concluíram que o arsênico, o boro, o lítio, o níquel, o silício e o vanádio, que mostraram ter um papel bioquímico essencial em algumas espécies animais, são supostamente essenciais também nos humanos (Milne, 1994).

Tabela 26.3 Classificação de oligoelementos minerais

Essenciais em humanos e animais	Essenciais em alguns animais e, possivelmente, nos humanos	Possivelmente essenciais em alguns animais	Não essenciais
Cromo	Arsênico	Bromo	Alumínio
Cobalto	Boro	Cádmio	Antimônio
Cobre	Lítio	Chumbo	Bismuto
Flúor	Níquel	Estrôncio	Germânio
Iodo	Silício	Estanho	Mercúrio
Ferro	Vanádio		Selênio
Manganês			Prata
Molibdênio			Tálio
Selênio			Titânio
Zinco			

Segundo Gibson, 1990; O'Dell, 1997.

Os papéis dos oligoelementos minerais incluem propriedades estruturais, de transdução de sinal e, especialmente, catalíticas – ver Tabela 26.4: "Função, deficiência e toxicidade dos oligoelementos minerais essenciais". Alguns dos oligoelementos minerais são componentes de metaloenzimas, atuam como cofatores de enzimas, proveem o transporte de elétrons e de oxigênio, são ativos na manutenção da conformação de macromoléculas ou na atividade de vitaminas e hormônios. Esses oligoelementos são avidamente acumulados pelas células sob o controle de várias famílias de proteínas (Finney, 2003). Normalmente, a homeostasia desses elementos é rigorosamente controlada. Somente alguns dos mecanismos bioquímicos dos efeitos clínicos da deficiência de oligoelementos foram determinados (Mertz, 1981b).

Em geral, deficiências de oligoelementos ocorrem por causa de deficiência nutricional; suplementação inadequada na nutrição parenteral total ou uma doença na qual ocorre absorção intestinal insuficiente ou excreção ou utilização aumentada. As deficiências também podem ocorrer por causa de interações entre oligoelementos (p. ex., zinco e cobre) e com outros nutrientes (p. ex., zinco e vitamina A) que interferem na absorção ou afetam de modo adverso a sua utilização metabólica. Grandes quantidades de zinco na dieta interferem na absorção intestinal de cobre e causam deficiência de cobre e anemia (Milne, 1994; Willis, 2005).

Os defeitos genéticos do metabolismo de oligoelementos incluem a síndrome do pelo enroscado de Menkes (cobre), atransferrinemia congênita (ferro), acrodermatite enteropática (zinco) e deficiências de xantina e sulfito oxidase (molibdênio) (Gibson, 1990).

Os oligoelementos devem ser analisados com um cuidado considerável porque estão amplamente distribuídos no ambiente (p. ex., água, ar) e em dispositivos biológicos (p. ex., agulhas, seringas, tampas) e, como consequência, podem contaminar imediatamente uma amostra (McNeely, 1986). Devem ser utilizadas técnicas de ambiente limpo e reagentes ultrapuros. Materiais de referência e controle de qualidade rigoroso são requisitos em cada processamento para garantir a acurácia analítica. É especialmente importante que o exame seja realizado por técnicos treinados (Mertz, 1975; Veillo, 1986). Atualmente, existem materiais melhores para coleta, processamento e análise de oligoelementos que reduzem a contaminação. Eles incluem seringas sem oligoelementos, tubos a vácuo com seringas siliconadas encaixadas, materiais de vidro lavados com ácido e materiais de referência padrão com valores certificados (Casey, 1983; Gibson, 1990).

Os principais avanços na compreensão e manutenção da dinâmica dos oligoelementos durante as duas últimas décadas foram obtidos por meio da extraordinária precisão e sensibilidade dos instrumentos analíticos aperfeiçoados. O espectrômetro de absorção atômica (AAS) é o instrumento mais amplamente utilizado para a análise clínica de oligoelementos em amostras biológicas. A fornalha de grafite AAS melhorou o limite de quantificação para partes por bilhão (ppb, μg/L) e permite a mensuração simultânea de múltiplos elementos. A correção de fundo do efeito Zeeman melhora a mensuração do sinal do elemento quan-

Tabela 26.4 Função, deficiência e toxicidade de oligoelementos minerais essenciais

Elemento	Função/componente de enzima	Efeitos da deficiência	Efeitos da toxicidade
Cromo	Potencializa a ação da insulina, o metabolismo da glicose e dos lipídeos, a baixa toxicidadedo Cr(III), mal absorvido Componente do fator de tolerância à glicose	Nenhum método para determinar a deficiência em humanos; comprometimento da tolerância à glicose no diabetes tipo 2, resistência à insulina, hiperglicemia, neuropatia periférica, hiperlipidemia	Cr(VI) tóxico, lesão oxidativa, úlceras cutâneas, dermatite de contato, asma, necrose renal e hepática, câncer de pulmão
Cobalto	Síntese de hemoglobina Componente da vitamina B_{12}	Não ocorre deficiência de cobalto em humanos; os sintomas são devidos à falta de vitamina B_{12}: anemia, anorexia, inibição do crescimento	Cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, bócio, hipotireoidismo; sensação de calor, vômitos, diarreia
Cobre	Respiração celular, regulador de neurotransmissores, reação de oxidação, transporte de elétrons, síntese de colágeno, desenvolvimento de estruturas vasculares e esqueléticas e do SNC, antioxidante Componente da CuZnSOD, metalotioneína, citocromo c, tirosinase, dopamina β-hidroxilase, lisil oxidase	Síndrome de Menkes: ligado ao X; falha congênita na absorção do cobre; ligação cruzada do colágeno anormal, fraqueza muscular, anemia hipocrômica refratária ao ferro, leucopenia, defeitos neurológicos, hipopigmentação. Na prematuridade: fraturas ósseas, defeitos esqueléticos Ocorre em crianças desnutridas e em lactentes prematuros que não recebem suplementação	Relativamente não tóxico Doença de Wilson: autossômica recessiva; falha em excretar cobre na bile; excesso de cobre em fígado, rins, cérebro e olhos; necrose hepática, hipertensão arterial, anéis de Kayser-Fleischer nos olhos; o cobre interfere na absorção de ferro e zinco
Flúor	Previne cáries dentais	Aumento de cáries dentais	Esmalte moteado, fluorose
Iodo	Componente de hormônios tireoidianos	Bócio, hipotireoidismo, cretinismo em lactentes, mixedema em adultos	Bócio, tireotoxicose
Ferro	Transporte de oxigênio, respiração, metabolismo de aminoácidos e radicais livres, lipídeos, fosforilação oxidativa Componente da hemoglobina, metaloenzimas, vitamina A	Anemia microcítica hipocrômica, glossite, estomatite angular, queilose, coiloníquia Perda de sangue ou ingestão inadequada de ferro; anemia ferropriva: < 7 g/100 mL de sangue	Hemocromatose: Genética, primária, autossômica recessiva adquirida, secundária, sobrecarga de ferro Depósito de ferro no fígado, pâncreas, coração e pele
Manganês	Osso e tecido conjuntivo Componente de metaloenzimas: hidrolases, oxidorredutases e lipases, piruvato carboxilase, superóxido dismutase e arginase	Não é bem definida em humanos; defeitos esqueléticos e cartilaginosos	O menos tóxico dos oligoelementos Distúrbios psiquiátricos: memória, fala, alucinações; síndrome semelhante às doenças de Parkinson e de Wilson
Molibdênio	Metabolismo do DNA, essencial para a produção de ácido úrico Componente da sulfito e da xantino oxidase	A deficiência natural não é conhecida; inibição do crescimento, hipercupremia, formação defeituosa de queratina, bócio, cretinismo	Anemia, bócio, tireotoxicose, hipouricemia, hiperoxipurinemia
Selênio	Protege contra a lesão oxidativa dos lipídeos, expressão genética, tiroxina deiodinase Componente da glutationa peroxidase	Doença de Keshan: cardiomiopatia, cardiomegalia, insuficiência cardíaca, catarata, osteoartrite em crianças, miopatia, unhas com alteração da cor/espessadas, comprometimento do crescimento	Perda de cabelo e unhas, selenose, cáries dentais, neuropatia, insuficiência hepática, odor de alho no hálito
Zinco	Síntese proteica, proteínas dedos de zinco – expressão genética, imunidade, necessário para pele, ossos e cabelo normais Componente da metalotioneína, ~300 enzimas	Acrodermatite enteropática; causa cardiomiopatia em crianças Em crianças, baixo peso, hipogeusia, retardo do crescimento, infertilidade, déficits imunes, retardo da cicatrização, glossite, dermatite seborreica, osteoporose	Relativamente não tóxico, náusea, vômitos e irritação gastrintestinal, causa deficiência de cobre

Segundo Fausto da Silva, 1991; Alcock, 1996; Kane, 2005.

do o teste for de amostras complexas como soro, plasma ou sangue. Outros avanços na manipulação de amostras melhoraram ainda mais a sensibilidade e a precisão. A chama AAS apresenta um limite de quantificação de partes por milhão (ppm, mg/L) A espectrometria de emissão atômica consiste na chama AES e espectrometria de emissão de fonte do plasma, a qual mensura o débito de fótons em vez da absorção de fótons como na AAS. As linhas de emissão de elétrons excitados são mensuradas. O limite de quantificação é em ppm (mg/L). A amostra na análise de ativação de nêutrons (NAA, neutron activation analysis) é irradiada com nêutrons de baixa energia para a produção de radionuclídeos. Na NNA, ocorre excitação do núcleo atômico, de modo que o oligoelemento é determinado independentemente de seu estado físico ou químico. O radionuclídeo recém-formado emite raios X ou γ. O limite de quantificação é em ppb (μg/L) a partes por trilhão (ppt, ng/L) com detecção de múltiplos elementos, mas com uma faixa dinâmica limitada. Esta técnica é especialmente adequada para a determinação de oligoelementos in vitro em matrizes biológicas. Na análise de ativação de nêutrons instrumental (INAA, instrumental neutron activation analisys), ocorre uma mensuração direta da radiação X ou γ emitida. A espectroscopia de massa com plasma acoplado (ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectroscopy) é um método altamente sensível e específico para mensuração de múltiplos oligoelementos em um único processamento com uma faixa dinâmica especialmente ampla e baixa interferência de fundo, e seu limite de quantificação é em ppb (μg/L) a ppt (ng/L). Um padrão interno é utilizado para aumentar a precisão (Milne, 1994; Chan, 1998a).

Uma avaliação da condição de oligoelementos requer a mensuração da concentração em tecidos acessíveis (cabelo, unhas) e em líquidos corporais (soro, urina), ou da atividade de uma enzima dependente do oligoelemento. Não existem indicadores particularmente bons para a determinação da condição dietética de um oligoelemento por causa da má correlação com as reservas totais do corpo. O único teste definitivo de deficiência de oligoelemento mineral no ser humano é a resposta clínica à suplementação controlada com o elemento em questão, por meio da avaliação da melhoria da função comprometida (Milne, 1994; Eastwood, 2003). A combinação de exames permite uma interpretação mais confiável, especialmente quando os achados forem concordantes. A interpretação de níveis plasmáticos ou séricos pode ser decepcionante, por causa da resposta ao estresse ou quando há expansão do volume sanguíneo ou diminuição da albumina sérica como ocorre, por exemplo, no terceiro trimestre de gestação. Além disso, a hemólise interfere nos exames. Os níveis séricos de zinco, cobre, manganês, cromo e molibdênio não são confiáveis para se avaliar a condição nutricional ou a ingestão dietética porque os resultados não refletem as reservas do organismo. Tanto a concentração sérica quanto a urinária indica a ingestão dietética recente. Ver Tabela 26.5: "Propriedades dos oligoelementos minerais essenciais".

Amostras de cabelo e unhas devem ser coletadas com cuidado e lavadas para evitar a contaminação da superfície.

Exames de oligoelementos em sangue, soro ou urina geralmente refletem a condição nutricional atual. A primeira urina da manhã é menos afetada pela ingestão dietética recente. Testes de carga mensuram a alteração da concentração na urina após uma dose de carga do elemento mineral. Quando os níveis tissulares são baixos, a deficiência causará retenção do elemento. De modo similar, os testes de tolerância mensuram a alteração da concentração plasmática após uma dose de desafio. Geralmente, a dose encontra-se dentro da faixa farmacológica e não do nível fisiológico normalmente apresentado. Análises do cabelo e de unhas (das mãos e dos pés) fornecem um quadro retrospectivo ou uma avaliação da exposição crônica durante o período de crescimento do cabelo ou das unhas (Gibson, 2002). Por causa do risco de contaminação ambiental, amostras de cabelo e unhas têm um uso limitado na determinação da ingestão dietética ou do estado do organismo, exceto quando ela for reduzida (Eastwood, 2003).

"Todas as substâncias são venenos... a dose diferencia um veneno."
Paracelso (1493-1541).

A toxicidade nunca é uma questão de presença, somente de quantidade. Cada oligoelemento mineral essencial e não essencial pode ser tóxico quando presente em alta concentração. Um veneno é o excesso de qualquer coisa. A toxicidade é muito variável para os diferentes oligoelementos. Alguns apresentam alta toxicidade. Os efeitos tóxicos do selênio são produzidos pela ingestão de apenas 10 vezes a demanda nutricional. Em contraste, a toxicidade do cromo nunca foi relatada após doses farmacológicas orais (Gibson, 1990).

Cobre (Cu)

O cobre é o terceiro oligoelemento mais abundante no corpo humano, após o zinco e o ferro. É um cátion muito eficaz em reações que envolvem a transferência de elétrons e a ligação a moléculas orgânicas (Samman, 2002).

Bioquímica. O cobre está envolvido no transporte de elétrons e em reações de oxidação e é essencial para a respiração celular, regulação de neurotransmissores, síntese de colágeno, metabolismo de nutrientes (especialmente o ferro) e como antioxidante contra radicais livres (Kohlmeier, 2003).

O cobre está presente em todas as células vivas (Marston, 1952) e atua principalmente como um componente das cuproenzimas e proteínas que contêm cobre. As amino-oxidases plasmáticas que contêm cobre catabolizam algumas aminas ativas, como a tiramina, a histidina e as poliaminas, e inativam as catecolaminas (norepinefrina, tiramina, dopamina e serotonina). Uma outra cuproenzima, a lisil oxidase, ajuda na ligação cruzada de proteínas do colágeno em fibras grandes. Além disso, o cobre é um componente da citocromo c oxidase, que catalisa a utilização celular de oxigênio (Wildman, 2000). A superóxido dismutase extracelular é encontrada em alta concentração nos pulmões, na tireoi-

Tabela 26.5 Propriedades dos oligoelementos minerais essenciais

Elemento	Distribuição nos tecidos	Conteúdo corporal	Transporte (valor de referência)	Excreção
Cromo	Baço, coração	4–6 mg de Cr (III)	Transferrina-P 0,15 µg/mL de Cr (0,12–2,1 µg/L)	Urina: 100-–200 ng/dia
Cobalto	Músculo, fígado, gordura	1,1 mg	Albumina (0,11–0,45 µg/L)	Urina: 80%
Cobre	Músculo e fígado Fígado: 30–50 µg/g de tecido seco; 50-70% do Cu total	50–80 mg (1,2–2,5 ∝g/g de tecido magro)	Ceruloplasmina: 60–95%, albumina, transcuprina (Cu-S: 70–140 ∝g/dL AAS)	Fezes incluem o cobre biliar e o dietético não absorvido
Iodo	Tireoide: 70–80% do I corporal total na tiroxina ligada à tireoglobulina	15–20 mg (11–15 mg na tireoide)	Proteína ligadora da tiroxina, 80% pré-albumina ligadora da tiroxina (transtiretina)	Urina: 100–150 µg/dia
Ferro	Hb nos eritrócitos: 400–600 mg/L, fígado, baço, medula óssea: 25%, mioglobina	4–5 g (3/4 na Hb) 50 mg/kg 2,5 g nos eritrócitos	Transferrina-P (2–2,5 g/L) Ferritina-S 1 µg/L = 10 mg tecido reservas de ferro Hemossiderina: 1 g de ferro	Bile: 84 µg/kg, perda sanguínea, menstruação, células da mucosa gastrintestinal
Manganês	Fígado, osso, pâncreas	12–20 mg	(Mn-sangue: 200 nmol/L)	Secreções biliares e intestinais
Molibdênio	Fígado, rins, osso, suprarrenais	Sangue: 30-700 nmol/L	Proteína do eritrócito, α_1-macroglobulina (S: 8–34 ∝g/L)	Urina: 90%, bile: 10%
Selênio	Fígado, rins, músculo	15 mg	Proteína (Se-P: 7–30 µg/dL)	Urina: 60%, fezes: 40%
Zinco	Músculo: 60%, osso: 30%, fígado, próstata, sêmen	1,2–2,3 g	Albumina: 60–70%, α_2-macroglobulina (Zn-P: 11–22 ∝mol/L)	Fezes, secreções intestinais, células da mucosa gastrintestinal

P = plasma; S = soro; AAS = espectrometria de absorção atômica.

Dados de Fausto da Silva, 1991; Milne, 1994; O'Dell, 1997; Kohlmeier, 2003.

de e no útero. As cobre/zinco dismutases estão presentes no citoplasma da maioria das células, especialmente no cérebro, tireoide, fígado, hipófise e eritrócitos. Ambas eliminam e reduzem radicais superóxidos. As proteínas que contêm cobre incluem a ceruloplasmina, albumina e transcupreína, que transportam o cobre; metalotioneína, que sequestra e armazena cobre; e o fator de coagulação V (Chan, 1998).

Fontes dietéticas. Fontes ricas em cobre incluem fígado, frutos do mar, chocolate, nozes e sementes. Canos ou vasilhas de cobre não aumentam o conteúdo de cobre da água, exceto quando expostos a ácidos (Kohlmeier, 2003). A ingestão diária média de cobre dos norte-americanos adultos é de aproximadamente 1,6 mg para os homens e 1,2 mg para as mulheres. Os adultos devem consumir pelo menos 0,9 mg/dia (Institute of Medicine, 2002). O tabagismo, o exercício extenuante, infecções e lesões aumentam a necessidade de cobre.

Metabolismo. A absorção do cobre ocorre no estômago e especialmente no intestino delgado (Wapnir, 1998). A bile adiciona cerca de 5 mg/dia ao cobre ingerido. A absorção diminui com a ingestão excessiva de zinco ou ferro. O excesso de cobre pode causar deficiência de ferro. A histidina e também o gluconato e o citrato aumentam a absorção de cobre (Wildman, 2000). O ácido ascórbico diminui a absorção de cobre reduzindo o Cu^{2+} em Cu^{+} (Kohlmeier, 2003).

O cobre recém-absorvido é transportado ligado à albumina e à transcupreína e é rapidamente removido da circulação sanguínea pelo fígado. Quando retorna à circulação, é sob a forma de ceruloplasmina, que transporta 65-90% do cobre plasmático, e metalotioneína e outras proteínas que contêm cobre. A ceruloplasmina não é uma proteína transportadora porque o cobre não é intercambiável (Eastwood, 2003). Metalochaperonas são proteínas ligadoras específicas que proveem o transporte do cobre intracelular para liberá-lo para suprir as demandas metabólicas (Kohlmeier, 2003). O cobre em excesso é ligado à tioneína, diminuindo o risco de toxicidade (Wildman, 2000). Íons cobre livres são uma fonte de radicais livres de oxigênio, e o cobre livre intracelular é mantido em uma concentração muito baixa.

A excreção é principalmente nas fezes, que inclui o cobre dietético não absorvido e secreções biliares e gastrintestinais, embora pequenas quantidades também sejam eliminadas no suor, na urina e na saliva.

Teste. O cobre total em um indivíduo adulto é de 50 a 80 mg, concentrado principalmente no músculo e no fígado. O fígado possui a maior concentração de cobre, em média entre 30 e 50 mg/g de tecido seco. As faixas de referência da concentração sérica de cobre dependem da idade e do sexo e são mais altas na gestação. Há variação diurna com valores máximos pela manhã. As faixas são: para as mulheres, 49-184 mg/dL (7,7–29,0 µmol/L); para os homens, 59 a 118 mg/dL (9,3–18,6 µmol/L) pelo ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectroscopy) (Chan, 1998b). O método analítico clínico mais amplamente utilizado é o de chama AAS. O nível sérico ou plasmático de cobre é insensível para o diagnóstico de deficiência de cobre e diminui somente na deficiência grave (Gibson, 2002). Concentrações mais baixas podem indicar depleção das reservas de cobre. No entanto, o nível de cobre circulante é afetado por fatores não relacionados à nutrição. Gestação, infecções, condições inflamatórias, estresse ou uso de contraceptivos orais aumentam o nível de cobre circulante. Corticosteroides e corticotropina o diminuem (Jacob, 1993). A diminuição de proteínas séricas por causa de nefrose, má absorção ou desnutrição reduzem a concentração sérica de cobre, sem refletir reservas hepáticas de cobre inadequadas. A ceruloplasmina, uma proteína que contém cobre, é um indicador útil da condição do cobre. Trata-se de uma α_2-globulina, um reagente da fase aguda. A ceruloplasmina é sensível aos mesmos fatores que afetam o cobre plasmático e pode ser mensurada por meio de métodos imunoquímicos ou por sua atividade de oxidase (Milne, 1994). Ela aumenta em pacientes com infecções, neoplasias, gestantes e em uso de contraceptivos orais (Kohlmeier, 2003). A mensuração da superóxido dismutase do eritrócito é útil para avaliar a condição do cobre. A atividade é reduzida em condições de deficiência de cobre.

Doenças genéticas. A síndrome de Menkes e a doença de Wilson são defeitos genéticos do metabolismo do cobre. A síndrome de Menkes é um defeito congênito raro da absorção de cobre ligado que comumente manifesta-se clinicamente em torno dos 3 meses de idade. Ela é caracterizada por um desenvolvimento mental ruim, falha de queratinização do cabelo, problemas esqueléticos e alterações degenerativas da aorta. O cabelo quebradiço é crespo ou torcido, e há pouca pigmentação cutânea e capilar. Além disso, o indivíduo pode apresentar hipotermia e crises convulsivas. O cabelo assemelha-se à lã do carneiro que se alimenta de pastos com falta de cobre. Os lactentes afetados apresentam deficiência de cobre e diminuição das concentrações sérica e hepática. O cobre nos eritrócitos é normal (Wildman, 2000).

A doença de Wilson (degeneração hepatolenticular) é uma doença autossômica recessiva resultante da diminuição da excreção biliar de cobre. Ela afeta crianças e adultos jovens, com idades entre 6 e 40 anos. O excesso de cobre é depositado no fígado e nos núcleos basais do cérebro, provocando esclerose e anormalidades renais, corneanas e encefálicas. Com frequência, o padrão dos sintomas iniciais é o de uma hepatite aguda, crônica ou fulminante. Os sintomas incluem distúrbios neurológicos, cirrose hepática e anéis de Kayser-Fleischer, por causa da deposição de cobre nas córneas. O cobre urinário aumenta (> 100 mg/24 h), e a ceruloplasmina comumente diminui. A gravidade clínica da doença apresenta uma má correlação com o nível de ceruloplasmina, pois esta pode estar normal ou aumentada em resposta à inflamação hepática. Geralmente, o cobre sérico está diminuído por causa da ceruloplasmina baixa, e o nível sérico de cobre não é útil do ponto de vista diagnóstico. Uma concentração sérica de ceruloplasmina < 20 mg/dL com aumento do cobre hepático (> 250 mg/g de tecido seco) é diagnóstica. A quelação é um tratamento efetivo para promover a excreção do cobre (Milne, 1994).

A deficiência é improvável, exceto em indivíduos com distúrbios genéticos raros ou submetidos à desnutrição ou ao jejum prolongados. Deficiências foram observadas em prematuros, lactentes e adultos desnutridos; em pacientes submetidos à hiperalimentação prolongada com infusões deficientes em cobre; em pacientes com doença falciforme submetidos à terapia com zinco; e naqueles tratados com agentes quelantes do cobre, como a penicilamina (Milne, 1994). Foram observadas reduções do nível de cobre em pacientes idosos com fraturas do colo do fêmur (Conlan, 1990). Os sintomas da deficiência de cobre incluem anemia hipocrômica, ataxia, neutropenia, osteoporose e anormalidades ósseas e articulares, diminuição da pigmentação cutânea e distúrbios neurológicos. As reservas do organismo duram apenas algumas poucas semanas quando a ingestão é baixa.

A toxicidade do cobre decorrente da ingestão alimentar não foi relatada. Doses superiores a 10 mg/dia causam náusea, vômitos, cólicas abdominais e diarreia, e podem causar lesão hepática, especialmente em lactentes. A intoxicação aguda pode se manifestar com hemólise e lesão celular encefálica e hepática (Eastwood, 2003). Doses mais elevadas podem causar coma e morte. A suplementação excessiva ou a ingestão de água contaminada são as fontes mais comuns. A ingestão de fungicidas que contêm sulfato de cobre ou a exposição industrial algumas vezes causa intoxicação aguda pelo cobre (Williams, 1982).

Zinco (Zn)

Depois do ferro, o zinco é o oligoelemento mais abundante no corpo. Ele é o íon metal catalítico mais comum no citoplasma das células. A reserva corporal total de zinco em mulheres adultas é de 1,5 g e, nos homens, é de 2,5 g. Ela é distribuída em todos os tecidos. O zinco é quase totalmente intracelular (King, 1994). A maior parte do zinco está no músculo esquelético (~60%) e no osso (~30%) (Wildman, 2000). Ele é um cofator para quase 300 enzimas e está envolvido em quase todos os aspectos do metabolismo. É importante na síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Ele é essencial para a ativação genética (Kohlmeier, 2003) e para a síntese e ação da insulina (Samman, 2002). O zinco está presente apenas no estado divalente em sistemas biológicos, e funções de oxidorredução não são possíveis. São importantes metaloenzimas que contêm zinco: anidrase carbônica, fosfatase alcalina, RNA e DNA polimerases, transcriptase reversa, timidina cinase, carboxipeptidases, álcool desidrogenase e superóxido dismutase (SOD).

Fontes dietéticas. O zinco está onipresente nos alimentos. As ostras são especialmente ricas em zinco. Outros frutos do mar e carnes vermelhas também são boas fontes. As plantas apresentam uma concentração muito menor. O fitato de grãos integrais e alguns vegetais interferem na absorção do zinco (Kohlmeier, 2003). A demanda média estimada para manutenção de reservas adequadas é de 8 mg/dia para as mulheres que consomem uma dieta mista e de 11 mg/dia para os homens (Institute of Medicine, 2002). Vegetarianos e gestantes ou mulheres em fase de aleitamento necessitam de uma quantidade dis-

cretamente maior. O zinco é excretado principalmente pelo intestino.

Metabolismo. O zinco é absorvido principalmente no duodeno, embora uma parte seja absorvida no intestino delgado. Parte do zinco entra no lúmen intestinal com secreções pancreáticas. A digestão intraluminal por proteases, DNAses e RNAses libera o zinco, e complexos com histidina, cisteína e nucleotídeos são formados para aumentar a absorção. O fitato reduz a absorção. A absorção de zinco também é diminuída pelo consumo dietético alto de cálcio e baixo de proteínas (Samman, 2003). A metalotioneína regula a transferência do zinco para o sangue portal. No sangue, o zinco liga-se à albumina e à α_2-macroglobulina, com concentrações sanguíneas de zinco de 10 a 17 μmol/L.

Músculos e ossos, que contêm a maior parte das reservas de zinco do organismo, apresentam turnover lento, com meia-vida de 300 dias (Wastney, 2000). A meia-vida do zinco ligado à metalotioneína no fígado é de aproximadamente 2 semanas; ele pode ser prontamente mobilizado e compensar uma ingestão dietética insuficiente. Entretanto, a reserva hepática é pequena e contém menos de 170 mg. A deficiência de zinco pode se tornar importante do ponto de vista funcional em uma semana (Miller, 1994).

Quase todo o zinco no sangue forma complexo com proteínas grandes, albumina ou α_2-macroglobulina, de modo que existe pouco zinco no filtrado glomerular. A urina excreta aproximadamente 0,5 mg/dia (Kohlmeier, 2003). Cerca de 1 mg/dia é excretado pelo suor, pele e cabelo. As perdas fecais, que incluem dieta e secreções endógenas, podem ser inferiores a 1 mg/dia (Sian, 1996). Cada ejaculação contém aproximadamente 0,5 mg, provavelmente oriunda das secreções prostáticas.

O nível inadequado de zinco compromete a replicação do DNA, digestão e absorção alimentar, paladar e apetite, crescimento e cicatrização, transmissão sináptica, expressão genética, resposta ao estresse oxidante, função imune e outras funções.

Zinc fingers são proteínas ligadoras de DNA looped com especificidade de sequência que atuam como mediadores da transcrição de ácidos nucleicos. O zinco é quelado com a cisteína e/ou histidina, ligando-se a uma região específica do DNA e controlando a expressão ou repressão genética, visando principalmente às regiões promotoras dos genes (Wildman, 2000).

Deficiência. A deficiência de zinco é comum em pacientes com diabetes melito, que fazem uso abusivo de álcool, com síndromes de má absorção e com doenças hepáticas e renais. Os sintomas são gerais por causa das muitas enzimas e tecidos afetados. Nas deficiências graves, ocorre hipogonadismo, nanismo, deformação óssea, má cicatrização, cabelo e unhas anormais, perda do paladar, distúrbios gastrintestinais, má formação de quilomicron, anormalidades do SNC, imunodeficiências e má absorção. A deficiência de zinco pode ser teratogênica durante a gestação, com má formações congênitas, peso fetal baixo para a idade gestacional, prematuridade, defeitos do tubo neural e espinha bífida (Chan, 1998).

A deficiência nutricional de zinco é bem prevalente, apesar de sua ampla disponibilidade nos alimentos. Ela produz uma síndrome caracterizada por retardo do crescimento, hipogonadismo masculino, alterações cutâneas, letargia mental, hepatoesplenomegalia, anemia ferropriva e geofagia (ingestão de terra). Foi observada principalmente em crianças do sexo masculino no Irã e no Egito, como consequência de uma dieta pobre em zinco e alto conteúdo de fibras, que diminuem a absorção do zinco disponível. E também foi relatada na Turquia, Portugal, Marrocos e antiga Iugoslávia (Milne, 1994). Em algumas áreas do Oriente Médio, as pessoas frequentemente consomem pão sem fermento, que é rico em fitato. A levedura contém fitato. No entanto, a receita para a massa do pão não contém levedura. O alto conteúdo de fibras e o baixo consumo de carne vermelha e proteínas nessa população resultam na deficiência de zinco. Eles respondem bem à suplementação dietética de sulfato de zinco (Eastwood, 2003). A falha de crescimento, a redução do paladar e o hipogonadismo em adultos jovens de New York e do Tennessee e em estudantes do primeiro grau do Colorado foram imputados à deficiência de zinco (Milne, 1994). A deficiência de zinco também foi relatada em indivíduos idosos; gestantes; mulheres no período de aleitamento; indivíduos com esteatorreia, queimaduras extensas, doença renal e em terapia com diuréticos e drogas antimetabólicas. Na deficiência de zinco em alcoolistas e em indivíduos com cirrose, a concentração sérica de zinco está baixa e a excreção urinária aumenta (Eastwood, 2003; Prasad, 1982).

A acrodermatite enteropática é um distúrbio autossômico recessivo raro com comprometimento da absorção intestinal e do transporte de zinco. Os sintomas incluem lesões cutâneas hiperpigmentadas, dermatite pustulosa ou bolhosa, alopécia, retardo do crescimento, diarreia, infecção secundária, irritabilidade, letargia e depressão. O nível plasmático ou sérico é inferior a 40 mg/mL. A terapia oral com zinco causa uma remissão rápida e completa (Chan, 1998b).

Um caso de deficiência de zinco, chamado "acrodermatite enteropática adquirida", foi descrito em uma mulher de 41 anos, com história de alcoolismo e diabetes mellitus tipo 1, complicada com retinopatia e nefropatia em estágio final. Ela apresentava uma história de 5 meses com alopécia, cabelo quebradiço, diarreia, queilite angular e erupção cutânea eritematosa, descamativa e pruriginosa nas extremidades, no períneo e nas nádegas. Uma biópsia cutânea revelou paraqueratose confluente com ausência de camada granulosa. O nível sérico de zinco estava acentuadamente reduzido: 0,35 μg/mL (5,4 μmol/L) (normal: 0,66–1,10 μg/mL [10,1–16,8 μmol/L]). A terapia oral com sulfato de zinco eliminou a diarreia, a erupção cutânea desapareceu, e o cabelo voltou a crescer (Wang, 2005).

A toxicidade do zinco é rara nos humanos. Animais que receberam altas doses de suplementação apresentaram disfagia. Os outros efeitos, como perda de peso, são atribuídos à redução da ingestão alimentar.

A inalação de fumaça de óxido de zinco é a causa mais comum de febre relacionada à fumaça de metais. Os sintomas são os de uma doença similar ao resfriado, com início 4 a 6 horas após a exposição à fumaça. Essa doença autolimitada e com resolução dos sintomas em 36 horas é caracterizada por fadiga, tremores, mialgia, tosse, dispneia, leucocitose, sede, sabor metálico e sialorreia.

Teste. Não existe um único exame que seja definitivo para a condição das reservas de zinco. Existem dois grupos de exames: análise do zinco em um tecido do corpo ou líquido corporal, como plasma, soro, células sanguíneas ou urina, e o exame de uma função dependente do zinco, como a acuidade do paladar ou a mensuração da atividade de enzimas que contêm zinco. Na maioria das vezes, os exames revelarão uma diminuição na deficiência de zinco. Os resultados dos exames devem ser interpretados com cautela, pois os níveis podem ser afetados por condições não relacionadas. Existe uma variação diurna do nível de zinco. Ele diminui após as refeições e aumenta após o jejum. O nível de albumina afeta significativamente o nível de zinco circulante. Além disso, muitos esteroides, incluindo os adrenocorticais e gonadais, diminuem o nível de zinco. O nível nos eritrócitos é 10 vezes maior que o do soro, e a hemólise é um problema sério que afeta a utilidade dos resultados.

A espectrometria de absorção atômica de chama (FASS, flame atomic absorption spectrometry) é o método de escolha para o teste clínico do zinco em líquidos corporais. A espectroscopia de massa com plasma acoplado (ICP-MS) é o método de referência utilizado para o teste do zinco no soro ou no plasma.

O valor de referência do nível plasmático do zinco é de 70 a 120 μg/dL (10,7–18,4 μmol/L), do qual um terço está ligado à α_2-macroglobulina e o restante, à albumina: 10 a 20% do zinco sanguíneo estão no plasma. O restante está associado à anidrase carbônica nos eritrócitos. A hemólise deve ser evitada. O nível matinal em jejum de zinco inferior a 70 mg/dL (10,7 mmol/L) sugere deficiência limítrofe. O valor do zinco sérico é 5 a 10% maior do que o valor plasmático. O nível de zinco é inferior quando o indivíduo não está em jejum; em infecções e inflamações; quando o indivíduo está em uso de esteroide; na gestação; ou quando existe hipoalbuminemia.

O zinco nos eritrócitos e no cabelo fornece uma avaliação de longo prazo da condição do zinco no organismo. A diminuição do zinco no cabelo foi demonstrada em várias condições diferentes de deficiência de zinco. Deve-se ter cuidado para evitar a contaminação ambiental e coletar amostras de cabelo durante o estudo, e não antes do mesmo ser iniciado (Milne, 1994). Os valores de referência da excreção urinária de zinco são de 0,15 a 1,00 mg/dia (2,3 a 15,3 μmol/dia). A excreção urinária de zinco comumente diminui na deficiência de zinco. Em algumas condições associadas à deficiência de zinco, como cirrose, alcoolismo grave, doença falciforme, períodos pós-operatórios e nutrição parenteral total, o aumento da excreção urinária de zinco está frequentemente presente (Jacob, 1993).

A hiperzincemia é um distúrbio familiar que causa aumento do nível sérico de zinco, mas não causa qualquer toxicidade aparente. Sabe-se que overdoses de zinco que resultam em um nível similar são fatais (Wildman, 2000).

Referências bibliográficas

Alcock NW: Trace elements. In Kaplan LA, Pesce AJ (eds): Clinical Chemistry, 3rd ed. St Louis, Mosby, 1996, pp. 746–759.

Barr SI, Murphy SP, Poos MI: Interpreting and using the dietary references intakes in dietary assessment of individuals and groups, Am Diet Assoc 2002; 102:780–788.

Berdanier CD: CRC Desk Reference for Nutrition. Boca Raton, CRC Press, 1998.

Brewster MA: Vitamins. In Kaplan LA, Pesce AJ (eds): Clinical Chemistry, 3rd ed. St Louis, Mosby, 1996, pp 760–792.

Casey CE, Robinson MF: Some aspects of nutritional trace element research. In Siegel H (ed): Metal Ions in Biological Systems, Vol 16. New York, Marcel Dekker, 1983, pp 1–26.

Chan S, Gerson B, Reitz RE, Sadjadi S: Technical and clinical aspects of spectrophotometric analysis of trace elements in clinical samples. In Gerson B (ed): Clinics in Laboratory Medicine 1998a; 18(4):615–629.

Chan S, Gerson B, Subramaniam S: The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. Clinics in Laboratory Medicine 1998b; 18(4):673–685.

Combs, GF Jr: The Vitamins, 2nd ed. San Diego, Academic Press, 1998.

Conlan D, Korula R, Tallentire D: Serum copper levels in elderly patients with femoral-neck fractures. Age Ageing 1990; 19:212–214.

DeLuca HF: New concepts of vitamin D function. In Sauberlich HE, Machlin LJ (eds): Beyond Deficiency. Ann N Y Acad Sci 1992; 669:59–69.

Eastwood M: Principles of Human Nutrition, 2nd ed. Oxford, Blackwell, 2003.

Fausto da Silva JJR, Williams RJP: The Biological Chemistry of the Elements. Oxford, Clarendon Press, 1991.

Feldman EB: Assessment of nutritional status. In Noe DA, Rock RC (eds): Laboratory Medicine. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994.

Finney LA, O'Halloran TV: Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. Science 2003; 300:931–936.

Gibson R: Determining nutritional status. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd edition. Oxford, Oxford University Press, 2002, 467–497.

Gibson RS: Principles of Nutritional Assessment. Oxford, Oxford University Press, 1990.

Grodner M, Long S, DeYoung S: Foundations and Clinical Applications of Nutrition, 3rd ed. St Louis, Mosby, 2004.

Guyton AC, Hall JE: Human Physiology and Mechanisms of Disease, 6th edition. Philadelphia, WB Saunders, 1997.

Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC, National Academy Press, 1997.

Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B_6, Folate, Vitamin B_{12}, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC, National Academy Press, 1998.

Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids,. Washington, DC, National Academy Press, 2000.

Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (Micronutrients). Washington, DC, National Academy Press, 2002.

Jacob RA: Vitamin C. In Shils ME, Olsen JA, Shike M: Modern Nutrition in Health and Disease, 8th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1994, pp 432–448.

Jacob RA, Milne DB: Biochemical Assessment of Vitamins and Trace Metals. Labbe RF (ed): Clinics in Laboratory Medicine 1993; 13(2):371–385.

Kane AB, Kumar V: Environmental and nutritional pathology. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds): Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th ed. Philadelphia, Saunders, 2005, pp 415–468.

Katz DL: Nutrition in Clinical Practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

King JC, Keen CL: Zinc. In: Shils ME, Olsen JA, Shike M (eds): Modern Nutrition in Health and Disease, 8th edn. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1994; 214–230.

Kohlmeier M: Nutrient Metabolism. San Diego, Academic Press, 2003.

Este texto fornece uma apresentação sistemática do metabolismo das vitaminas e dos oligoelementos com uma integração magistral do vasto assunto do metabolismo nutricional e da bioquímica no contexto da fisiologia humana normal. Também são fornecidas inúmeras referências atuais.

McCormick DB, Greene HL: Vitamins. In Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1994, pp 1275–1316.

Machlin LJ: Introduction. In Sauberlich HE, Machlin LJ (eds): Beyond Deficiency. Ann N Y Acad Sci 1992; 669:1–6.

McLaren DC: Clinical manifestations of human vitamin and mineral disorders: A résumé. In Shils ME, Olsen JA, Shike M: Modern Nutrition in Health and Disease, 8th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1994, pp 909–923.

McNeely MDD: Nutrition, vitamins, and trace elements. In Gornall AG (ed): Applied Biochemistry of Clinical Disorders, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott, 1986, pp 487–501.

Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 2002.

Os oligoelementos e as vitaminas são apresentados com o foco nas deficiências, toxicidade e testes bioquímicos, e há um apêndice com inúmeros testes bioquímicos estáticos e dinâmicos padrão e recentemente introduzidos, testes de carga e tolerância, os achados, a utilidade e sua interpretação.

Marston HR: Cobalt, copper and molybdenum in the nutrition of animals and plants. Physiol Rev 1952; 32:153–157.

Mason JB: Consequences of altered micronutrient status. In Bennett JC, Plum F (eds): Cecil Textbook of Medicine, 20th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1996, pp 1144–1154.

Mertz W: Trace-element nutrition in health and disease: Contributions and problems of analysis. Clin Chem 1975; 21:468–475.

Mertz W: The essential trace elements. Science 1981a; 213(4514):1332–1338.

Mertz W: The scientific and practical importance of trace elements. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1981b; 294:9–18.

Milne DB: Trace elements. In Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1994, pp 1317–1353.

O'Dell BL, Sunde RA: Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. New York, Marcel Dekker, 1997.

Prasad AS: Clinical and biochemical spectrum of zinc deficiency in human subjects. In Prasad AS (ed): Clinical, Biochemical, and Nutritional Aspects of Trace Elements. New York, NY, Alan R Liss, 1982, pp 3–62.

Rubin E, Strayer DS: Environmental and nutritional pathology. In Rubin E, Gorstein F, Rubin R, et al: (eds): Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine, 4th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005, pp 312–355.

Samman S: Trace elements. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 2002, pp 159–188.

Seymour CA: Trace metal disorders. In Ledingham JGG, Warrell DA (eds): Concise Oxford Textbook of Medicine. Oxford, Oxford University Press, 2000, pp 710–718.

Sian L, Mingyan X, Miller LV, et al: Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young Chinese women with marginal zinc intakes. Am J Clin Nutr 1996; 63:348–353.

Sies H, Stahl W, Sundquist AR: Antioxidant functions of vitamins. In Sauberlich HE, Machlin LJ (eds): Beyond Deficiency, Ann N Y Acad Sci 1992; 669:7–20.

Skeaff M: Vitamin C and E. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 2002, pp 231–247.

Taylor A: Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. Ann Clin Biochem 1996; 33: 486–510.

Apresenta os achados em deficiências de oligoelementos essenciais originadas por distúrbios metabólicos, com descrição dos distúrbios clínicos, sinais clínicos e resultados de testes para o conhecimento das condições dos oligoelementos, as descobertas, interpretação e utilidade dos dados; distúrbios não ocupacionais associados ao acúmulo de oligoelementos; protocolos para testes genéticos e terapêuticos e as condições da doença, incluindo fatores não analíticos que afetam a interpretação e as técnicas analíticas.

Truswell S: Vitamins D and K. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 2002b, pp 249–258.

Truswell S, Milne R: The B vitamins. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 2002a, pp 209–230.

Veillon C: Trace element analysis of biological samples. Anal Chem 1986; 58:851A–866A.

Wang LC, Bushey S: Acquired acrodermatitis enteropathica. N Engl J Med 2005; 352:1121.

Wapnir RA: Copper absorption and bioavailability. Am J Clin Nutr (Suppl) 1998; 67:1054S–1060S.

Wastney ME, House WA, Barnes RM, et al: Kinetics of zinc metabolism: variation with diet, genetics and disease. J Nutr 2000; 130(5S Suppl): 1355S–1359S.

West CE: Vitamin A and carotenoids. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd edition. Oxford, Oxford University Press, 2002, pp 188–207.

Wildman REC, Medeiros DM: Advanced Human Nutrition. Boca Raton, CRC Press, 2000.

Apresenta a bioquímica e a fisiologia das vitaminas e dos oligoelementos essenciais, incluindo tabelas com funções, conteúdo do tecido e excreção, deficiência e sintomas de toxicidade e as fontes alimentares com seu conteúdo de micronutrientes.

Williams DM: Clinical significance of copper deficiency and toxicity in the world population. In Prasad AS (ed): Clinical, Biochemical, and Nutritional Aspects of Trace Elements. New York, Alan R Liss, 1982, pp 277–299.

Williams P: Food toxicity and safety. In Mann J, Truswell AS (eds): Essentials of Human Nutrition, 2nd edition. Oxford, Oxford University Press, 2002, pp 416–432.

Willis MS, Monaghan SA, Miller ML, et al: Zinc-induced copper deficiency. Am J Clin Pathol 2005; 123:125–131.

PARTE III

Urina e outros fluidos corporais

Editado por

Richard A. McPherson MD, Gregory A. Threatte MD,
Matthew R. Pincus MD PhD, Mark S. Lifshitz MD

CAPÍTULO 27

Exame de urina básico

Richard A McPherson, MD, Jonathan Ben-Ezra, MD, Shourong Zhao, MD

Formação de urina 460

Componentes da urinálise básica (rotina) 460
- Avaliação da amostra 460
- Exame geral/físico 460
- Triagem bioquímica 464

Exame do sedimento urinário 480
- Métodos de exame do sedimento urinário 480
- Componentes microscópicos no sedimento urinário 481

Métodos de urinálise 491
- Procedimento da urinálise básica (rotina) 491
- Urinálise automatizada 491

Testes especiais e técnicas de monitoramento 492
- Cálculos urinários 492
- Testes laboratoriais utilizados para investigar agentes formadores de cálculos 495
- Triagem urinária de doenças metabólicas hereditárias 495
- Outras modalidades de exames de urina 497

Referências bibliográficas 497

PONTOS-CHAVE

- Muitas doenças podem exibir anormalidades na urina. Por isso, o exame de urina tem importante função laboratorial.
- A urinálise consiste basicamente em um exame de urina geral e análise com vareta medidora de nível para detecção de sangue, leucócitos, açúcar e outras substâncias. A leitura dos dados obtidos com a vareta pode ser realizada manualmente ou por instrumento automatizado.
- Um exame microscópico de urina pode ser necessário em muitos casos. Esse exame é empregado para detectar elementos celulares, cilindros e cristais. A presença de cada um desses componentes pode estar associada a diferentes estados patológicos.
- Embora o exame microscópico de urina na maioria das vezes seja manual, existem diversos instrumentos automatizados que podem realizar essa análise.
- Hemácias eventualmente presentes na urina podem ser oriundas de qualquer ponto ao longo do trato urinário. Eritrócitos dismórficos com frequência sinalizam a existência de doença glomerular.
- A primeira urina de esvaziamento matinal, por ser a mais concentrada, costuma ser a melhor amostra para realização das análises. Alguns procedimentos podem requerer amostras de urina de 12 ou 24 horas.
- As medidas de gravidade específica e osmolalidade refletem a capacidade de concentração dos rins. Após um período de desidratação, a osmolalidade deve ser equivalente a 3 ou 4 vezes a osmolalidade plasmática.
- Níveis de proteinúria acima de 4 g/dia são observados na síndrome nefrótica. Embora essa síndrome usualmente seja observada em casos de doença renal primária, há situações em que pode acompanhar uma doença sistêmica e afetar os rins.
- Indivíduos com diabetes podem apresentar cetonúria, a qual também pode estar presente em outros estados, como doenças febris e caquexia.
- O teste de nitrito com vareta medidora de nível e o de esterase leucocitária são auxiliares no diagnóstico das infecções do trato urinário. Resultados positivos devem ser confirmados com exame microscópico de urina.
- Cálculos urinários são mais comumente formados a partir do cálcio. O *work up* dos habituais agentes de formação de pedras deve incluir tanto a análise dessas estruturas quanto o exame de urina.

O exame de urina pode fornecer uma quantidade significativa de informações. O exame cuidadoso permite a detecção de processos patológicos intrínsecos ao sistema urinário, sejam funcionais (fisiológicos), sejam estruturais (anatômicos). A progressão ou a regressão de várias lesões também pode ser monitorada, causando o mínimo de perturbações possível ao paciente. Ademais, processos patológicos sistêmicos, como anomalias endócrinas ou metabólicas, podem ser detectados por meio do reconhecimento de quantidades anormais de metabólitos doença-específicos excretados na urina. Os testes laboratoriais de urina continuarão a exercer papel essencial na medicina clínica.

O propósito do presente capítulo é destacar as informações pertinentes que podem ser fornecidas pelos exames de urina mais comuns. Atualmente, são realizados dois tipos principais: (1) a urinálise com vareta medidora de nível (tira reativa), que costuma ser utilizada de maneira habitual nas triagens em laboratórios, em consultórios médicos e em testes realizados pelo próprio paciente em casa; e (2) a urinálise básica (rotina), que acrescenta o exame microscópico do sedimento urinário à avaliação com tira reativa de urinálise. Esses exames envolvem diversas disciplinas laboratoriais, principalmente bioquímica e microscopia. Além desses procedimentos diagnósticos de primeira linha, novas tecnologias de imunocitoquímica, diagnóstico molecular, DNAploidia e análise do ciclo celular estão sob desenvolvimento constante para fornecer informações diagnósticas e prognósticas extras. Os estudos microbiológicos de urina – cruciais ao diagnóstico de patógenos infecciosos no trato urinário – são abordados ao longo do texto. É importante ter em mente que cada uma dessas modalidades possui um certo grau de utilidade clínica. A Tabela 27.1 lista os benefícios proporcionados pelos exames laboratoriais de urina mais solicitados.

A urinálise com vareta medidora de nível apresenta informações sobre múltiplas propriedades fisioquímicas da urina. Utilizado de forma predominante nas triagens, o teste com vareta medidora de nível requer treinamento de pessoal menos sofisticado e gera resultados em poucos minutos. Foi demonstrado que em certos casos, particularmente na avaliação de pacientes com sinais ou sintomas que urgem a realização de uma urinálise para detecção de sangue ou infecção, é possível substituir as varetas empregadas na urinálise por uma urinálise de rotina integral, reservando-se a microscopia da urina para aqueles pacientes com discordância entre apresentação clínica e resultados de teste com vareta (Jou, 1998). A urinálise de rotina é constituída por dois componentes principais: (1) determinações físico-químicas (aparência, gravidade específica e medidas com tiras reativas); e (2) exame microscópico do sedimento urinário em campo claro ou com contraste de fase para evidenciar hematúria, piúria, cilindros (cilindrúria) e cristalúria. Este último é tipicamente mais demorado e necessita de conhecimentos especializados de microscopia para interpretação correta das leituras. Entretanto, atualmente existem equipamentos disponíveis que automatizam a urinálise de rotina de modo parcial ou total. O exame citopatológico do sedimento urinário também requer

Tabela 27.1 Benefícios dos exames de urina laboratoriais comuns

Tipo de teste	Objetivo	Utilidade clínica			
		Triagem	Diagnóstico	Monitoramento	Prognóstico
Bioquímica da urina (tira reativa)	Glucosúria Proteinúria Hematúria Leucocitúria Infecção	+++	±	+	+
Urinálise a fresco (rotina)	Diabetes Proteinúria Hematúria Leucocitúria Infecções Cilindrúria Cristalúria	++++	++	++	+
Microbiologia urinária	Infecções	++	++++	++	+
Citologia urinária (convencional)	Câncer Inflamação Infecções virais	+	++	+	–
Urinálise citodiagnóstica	Distúrbios glomerulares e tubulares renais Distúrbios do TUI Infecções não bacterianas Litíase	+	++++	+++	++
Citometria de imagem e análise do DNA	Câncer urotelial	–	++	+++	+++
Citometria de fluxo	Câncer urotelial	–	+	+++	++

TUI = trato urinário inferior.

De Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N: Cytodiagnostic Urinalysis of Renal and Lower Urinary Tract Disorders. New York, Igaku-Shoin Medical Publishers, 1995, com permissão.

treinamento especial e constitui o ponto de apoio do diagnóstico e do seguimento de neoplasias envolvendo o trato urinário, bem como de algumas condições não neoplásicas em particular, como a rejeição de alotransplante renal.

Neste capítulo, são detalhados os componentes pertinentes da urinálise de rotina. As diversas metodologias são brevemente revistas e incluem preparo das amostras, reações com tiras reativas, testes confirmatórios e métodos microscópicos. Maior ênfase foi dispensada à correlação clinicopatológica referente aos achados laboratoriais obtidos a partir desses testes de urina.

Formação de urina

No adulto normal, cerca de 1.200 mL de sangue perfundem os rins a cada minuto, o que corresponde a 25% do débito cardíaco. Os glomérulos (normalmente, pelo menos 1 milhão/rim) recebem sangue das arteríolas aferentes, enquanto um ultrafiltrado de plasma atravessa cada glomérulo e entra no espaço de Bowman. A partir daí, o filtrado atravessa os túbulos e os ductos coletores, nos quais podem ocorrer reabsorção ou secreção de várias substâncias e concentração da urina. Por fim, o volume de filtrado glomerular original de aproximadamente 180 L é reduzido a 1 ou 2 L em 24 horas, dependendo do status da hidratação. A urina formada nos rins segue dos ductos coletores para a pelve renal, ureteres, bexiga urinária e uretra durante o esvaziamento.

Os rins exercem várias funções regulatórias. Por meio da filtração glomerular e da secreção tubular, inúmeros produtos residuais são eliminados do corpo, incluindo compostos nitrogenados oriundos do catabolismo proteico, assim como ácidos e bases tanto orgânicos quanto inorgânicos. Líquidos, eletrólitos (incluindo sódio, potássio, cálcio e magnésio) e o *status* acidobásico são regulados na homeostasia. Além disso, os rins promovem importante regulação hormonal com produção de eritropoetina e renina, bem como ativação de vitamina D. Qualquer desorganização dessas funções por ação de doenças renais ou sistêmicas pode se refletir em uma urina que apresenta alterações bioquímicas ou citológicas.

Componentes da urinálise básica (rotina)

A urinálise básica (rotina) é composta por quatro partes: avaliação da amostra, exame geral/físico, triagem bioquímica e exame do sedimento.

Avaliação da amostra

Antes de iniciar qualquer exame, a amostra de urina deve ser avaliada em termos de aceitabilidade. Os aspectos a serem considerados incluem identificação correta, amostra apropriada para o exame solicitado, conservação adequada, sinais de contaminação visíveis e se eventuais atrasos de entrega podem ter causado deterioração significativa. Cada laboratório deve possuir suas próprias diretrizes por escrito e fazê-las cumprir para aceitar ou rejeitar amostras. Na correta identificação de uma amostra, devem constar o nome completo do paciente, a data e o horário da coleta do material. A necessidade de incluir informações adicionais fica a critério da instituição, contudo esses três dados atendem aos requisitos mínimos para identificação da amostra.

A urina do primeiro esvaziamento matinal, que é a mais concentrada, é a melhor amostra para urinálise de rotina. Às vezes, são recebidas amostras de urina coletadas por cateterismo ou da região suprapubiana. Se uma única amostra tiver de ser submetida a múltiplas quantificações, o exame bacteriológico deve ser realizado antes de qualquer outro, contanto que a coleta de urina tenha sido adequadamente realizada. No caso de pacientes pediátricos e indivíduos com insuficiência renal aguda, é provável que apenas um pequeno volume de urina seja disponibilizado para processamento e análise. Em tais circunstâncias deve ser feita uma observação e os exames mais pertinentes ao diagnóstico devem ser priorizados. Para análises quantitativas, é preferível utilizar amostras coletadas em tempos predeterminados (12 ou 24 horas) do que amostras obtidas ao acaso.

Aspecto macroscópio/físico

Aspecto

Algumas das alterações mais importantes na aparência da urina são descritas nesta seção. A Tabela 27.2 fornece uma lista abrangente.

Cor

A cor amarela da urina é devida, em grande parte, à presença do pigmento urocromo, cuja excreção costuma ser proporcional à taxa metabólica. Essa excreção aumenta durante a febre, a tireotoxicose e o jejum. Quantidades pequenas de urobilina e uroeritrina (pigmento cor-de-rosa) também contribuem para a coloração da urina. Indivíduos normais podem produzir urina de cor amarela pálida ou escura, e essas diferenças de tonalidade são indicações grosseiras de hidratação e concentração da urina. A urina de cor clara, tipicamente de baixa gravidade específica, é excretada logo após uma alta ingestão de líquidos, enquanto a urina de cor escura é observada na retenção líquida. Note que uma urina de alta gravidade específica pode ser produzida por indivíduos com diabetes melito. A referência de Cone (1968) trata das alterações de cor da urina em pacientes pediátricos. A Tabela 27.3 lista as alterações de cor da urina associadas aos fármacos mais utilizados.

Urina vermelha. A cor anormal mais comum é a vermelha ou castanho-avermelhada. Quando observada na urina das mulheres, é preciso considerar uma possível contaminação com sangue do fluxo menstrual. Hematúria (presença de hemácias – CVS), hemoglobinúria e mioglobinúria podem produzir colorações rósea, vermelha ou castanho-avermelhada. Embora essas três condições sejam facilmente detectadas pelo teste da tira reativa, é necessário realizar análises adi-

Tabela 27.2 Aspecto e cor da urina

Aspecto	Causa	Considerações
Incolor	Urina muito diluída	Poliúria, diabetes insípido
Turva	Fosfatos, carbonatos	Solúvel em ácido acético diluído
	Uratos, ácido úrico	Dissolve a 60°C e em álcali
	Leucócitos	Insolúvel em ácido acético diluído
	Hemácias ("turva")	Lise em ácido acético
	Bactérias, leveduras	Insolúvel em ácido acético diluído
	Espermatozoides	Insolúvel em ácido acético diluído
	Líquido prostático	
	Mucina, filamentos de muco	Pode estar floculenta
	Cálculos, "pedras"	Fosfatos, oxalato
	Grumos, pus, tecidos	
	Contaminação fecal	Fístula retovesical
	Corante radiográfico	Na urina ácida
Leitosa	Muitos neutrófilos (piúria)	Insolúvel em ácido acético diluído
	Gordura	
	Lipidúria, opalescente	Nefrose, lesão por esmagamento – solúvel em éter
	Quilúria, leitosa	Obstrução linfática – solúvel em éter
	Parafina emulsificada	Cremes vaginais
Amarela	Acriflavina	Fluorescência verde
Amarelo-alaranjada	Urina concentrada	Desidratação, febre
	Urobilina em excesso	Sem espuma amarela
	Bilirrubina	Com espuma amarela, se houver bilirrubina suficiente
Amarelo-esverdeada	Bilirrubina-biliverdina	Com espuma amarela
Castanho-amarelada	Bilirrubina-biliverdina	Com espuma amarela, marrom "cerveja"
Vermelha	Hemoglobina	Positiva (tira reativa para detecção de sangue)
	Eritrócitos	Positiva (tira reativa para detecção de sangue)
	Mioglobina	Positiva (tira reativa para detecção de sangue)
	Porfirina	Pode ser incolor
	Fuscina, corante anilina	Alimentos, doces
	Beterraba	Alcalina amarela, genética
	Contaminação com menstruação	Coágulos, muco
Púrpura-avermelhada	Porfirinas	Pode ser incolor
Castanho-avermelhada	Eritrócitos	
	Hemoglobina, em repouso	
	Metemoglobina	pH ácido
	Mioglobina	Lesão muscular
	Bilifuscina (dipirrol)	Resultante de hemoglobina instável
Castanho-negra	Metemoglobina	Sangue, pH ácido
	Ácido homogentísico	Alcalina, em repouso; alcaptonúria
	Melanina	Em repouso, rara
Azul-esverdeada	Indicans	Infecções no intestino delgado
	Infecções por *Pseudomonas*	
	Clorofila	Refrescantes bucais

Tabela 27.3 Alterações da cor da urina com fármacos comumente utilizados*

Fármaco	Cor
Álcool, etil	Pálida, diurese
Laxantes à base de antraquinona (senna, cáscara)	Avermelhada, alcalina; castanho-amarelada, ácida
Clorzoxazona (Paraflex) (relaxante muscular)	Vermelha
Mesilato de deferoxamina (Desferal) (quelante de ferro)	Vermelha
Etoxazeno (Serenium) (analgésico urinário)	Alaranjada, vermelha
Fluoresceína sódica (por via i.v.)	Amarela
Furazolidona (Furoxona) (Tricofuron) (nitrofurano antibacteriano, antiprotozoárico)	Marrom
Corante índigo carmim (função renal, citoscopia)	Azul
Sorbitol de ferro (Jectofer) (possibilidade de haver na urina outros compostos de ferro formadores de sulfeto de ferro)	Marrom, em repouso
Levodopa (L-dopa) (para parkinsonismo)	Vermelha e, em seguida, marrom, alcalina
Mepacrina (Atabrine) (antimalárico) (vermes intestinais, *Giardia*)	Amarela
Metocarbamol (Robaxina) (relaxante muscular)	Castanho-esverdeada
Metildopa (Aldomet) (anti-hipertensivo)	Escura; se houver agentes oxidantes, avermelhada a marrom
Azul de metileno (utilizado para delinear fístulas)	Azul, azul-esverdeada
Metronizadol (Flagyl) (para infecções por *Trichomonas*, amebíase, *Giardia*)	Escura, castanho-avermelhada
Nitrofurantoína (Furadantina) (antibacteriana)	Castanho-amarelada
Fenazopiridina (pirídio) (analgésico urinário), também composta com sulfonamidas (Azo Gantrisina etc.)	Vermelho-alaranjada, pH ácido
Fenindiona (Hedulina) (anticoagulante) (importante na distinção da hematúria)	Alaranjada, alcalina; a cor desaparece com a acidificação
Envenenamento com fenol	Marrom; oxidado a quinonas (verde)
Fenolftaleína (purgante)	Púrpura-avermelhada, pH alcalino
Fenolsulfonftaleína (também sulfobromoftaleína)	Vermelho-rosado, pH alcalino
Rifampina (Rifadina, Rimactane) (terapia da tuberculose)	Vermelho-alaranjada brilhante
Riboflavina (multivitamínico)	Amarela brilhante
Sulfassalazina (Azulfidina) (para colite ulcerativa)	Amarelo-alaranjada brilhante, pH alcalino

* Outros fármacos comumente utilizados que produzem alteração de cor uma única vez ou ocasionalmente: amitriptilina (Elavil) – azul-esverdeada; fenotiazinas – vermelha; triamtereno (Direnium) – azul-claro (fluorescência azul na urina ácida). Uma extensa lista é disponibilizada por Young et al. Clin Chem 1975; 21: 379.

cionais para uma diferenciação absoluta (ver adiante, na seção Sangue, hemoglobina, hemossiderina e mioglobulina na urina).

Nas porfirias, a coloração da urina é variável. Indivíduos com porfiria eritropoiética e porfiria cutânea tarda costumam apresentar urina de cor vermelha, enquanto aqueles com porfirinúria por chumbo geralmente produzem urina de cor normal. Na porfiria hepática aguda intermitente, a urina produzida tem cor normal, mas acaba escurecendo ao permanecer em repouso. A cor vermelha da urina também pode estar associada ao uso de fármacos e corantes nos testes diagnósticos. Por exemplo, a fenolsulfoftaleína, às vezes empregada na avaliação da função renal, provoca o aparecimento da cor vermelha na urina alcalina. Pacientes com hemoglobina instável podem produzir urina de cor castanho-avermelhada que não constitui indicação positiva da presença de hemoglobina nem de bilirrubina. É provável que o pigmento seja dipirrol ou bilifuscina. Uma urina vermelha inócua associada à ingestão de beterrabas pode ser produzida por indivíduos geneticamente suscetíveis.

Urina castanho-amarelada ou castanho-esverdeada. Uma urina de cor castanho-amarelada ou castanho-esverdeada em geral é associada aos pigmentos biliares, principalmente a bilirrubina. Ao agitar a amostra de urina, é possível observar a formação de uma espuma amarela. Essa espuma distingue a urina que contém bilirrubina da urina normal, concentrada e de tonalidade escura, na qual aparece uma espuma de cor branca. Na icterícia obstrutiva severa, a urina pode assumir uma cor verde-escura.

Urina vermelho-alanrajada ou castanho-alaranjada. O urobilinogênio excretado é incolor, porém na presença de luz e pH baixo é convertido em urobilina, cuja cor varia do amarelo-escuro ao alaranjado. A urobilina não irá colorir a espuma que se forma quando a amostra é agitada, por isso pode haver confusão com a urina normal concentrada. A dúvida pode ser esclarecida por meio do teste com tira reativa.

Urina castanho-escura ou negra. A urina ácida com hemoglobina irá escurecer ao permanecer em repouso, em razão da formação de metaemoglobina. A urina "cor-de-cola" pode ser produzida nos casos de rabdomiólise (Keverline, 1998) e por alguns pacientes que fazem uso de L-dopa. Causas raras de formação de urina castanho-escura são a presença de ácido homogentísico (alcaptonúria) e melanina. A urina que contém ácido homogentísico escurece mais rapidamente se estiver alcalina.

Limpidez (característica)

A urina normalmente é clara, portanto a presença de qualquer material em amostra não submetida à rotação merece ser investigada. O diagnóstico diferencial de uma urina turva está associado a várias possibilidades, que incluem diversas entidades não patológicas. A turbidez pode ser devida simplesmente à precipitação de cristais ou sais não patológicos referidos como amorfos. Fosfato, urato de amônio e carbonato podem precipitar na urina alcalina e redissolvem-se quando ácido acético é acrescentado à amostra. O ácido úrico e os uratos provocam o aparecimento de uma névoa branca, rósea ou alaranjada na urina ácida e sofrem redissolução quando a amostra é aquecida a 60°C.

A turbidez da urina pode ser atribuída à presença de vários elementos celulares. Leucócitos podem formar uma névoa branca similar àquela produzida por fosfatos, mas que permanece após a acidificação. Do mesmo modo, o crescimento bacteriano pode causar uma opalescência que resiste à acidificação e à filtração. Por esse motivo, foi sugerido que a avaliação turbidimétrica que emprega um turbidímetro de feixe duplo pode ser útil na triagem de infecções urinárias (Livsey, 1995). A turbidez também pode ser decorrente da presença de CVS, células epiteliais, espermatozoides ou líquido prostático. Este, por sua vez, normalmente contém poucos leucócitos e outros elementos formados.

Entre as diversas etiologias que podem ser atribuídas à produção de uma urina turva, estão a presença de muco proveniente do trato urinário inferior ou do trato genital, coágulos sanguíneos, sangue de menstruação e outros materiais particulados, como fragmentos de tecido, pequenos cálculos, acúmulos de pus e material fecal. A presença de material fecal na urina pode ocorrer diante de conexões fistulares entre o cólon ou o reto e a bexiga urinária. A contaminação com pó ou agentes antissépticos que se tornam opacos em contato com a água (fenóis) também faz a urina tornar-se turva.

Quilúria. Trata-se de uma condição rara em que a urina apresenta linfa. Está associada à obstrução do fluxo de linfa e ao rompimento dos vasos linfáticos na pelve renal, nos ureteres, na bexiga urinária ou na uretra. Embora a etiologia predominante seja a infecção parasítica por *Wuchereria bancrofti* (filariose) (Cortvriend, 1998), o alargamento dos linfonodos abdominais e a presença de tumores também foram associados à quilúria. Essa condição é rara até mesmo em indivíduos com filariose.

A aparência da urina varia com a quantidade de linfa presente, podendo exibir aspecto límpido a opaco ou leitoso. Pode haver formação de coágulos e, contanto que haja quantidade suficiente de linfa, a urina pode se assentar em camadas com quilomícrons no topo e deposição de fibrina e células inferiormente. Os quilomícrons podem permanecer indetectáveis à microscopia, a menos que coalesçam formando microglóbulos. Esse material gorduroso pode ser extraído da amostra de urina pela adição de igual volume de éter ou clorofórmio. Os fosfatos urinários, por outro lado, não são eliminados por esse método. A pseudoquilúria ocorre com o uso de cremes vaginais à base de parafina para tratamento de infecções por *Candida*.

Lipidúria. O aparecimento de glóbulos de gordura na urina é mais frequente em indivíduos com síndrome nefrótica. Esse material é constituído de gorduras neutras (triglicerídeos) e colesterol. A lipidúria também pode estar presente em pacientes submetidos ao trauma esquelético contínuo, com fraturas nos principais ossos longos ou na pelve. É provável que a fonte de lipídeos seja a exposição da medula rica em gorduras. Tenha em mente que, além desses lipídeos endógenos, contaminantes oleosos (p. ex., parafina) também podem flutuar na superfície da urina. Talvez seja necessário realizar o exame microscópico da urina para classificar materiais gordurosos como gotículas positivas para Oil Red O ou ésteres de colesterol com polarização.

Odor

A urina normal apresenta um leve odor aromático de origem desconhecida. Amostras com extensivo supercrescimento bacteriano podem ser reconhecidas pelo odor amoniacal e fétido. A ingestão de aspargos ou timol também confere um odor distintivo à urina.

Os odores de urina característicos dos distúrbios de aminoácidos são:

Pé suado – acidemias isovalérica e glutárica

Xarope de bordo – doença da urina em xarope de bordo (*maple syrup urine disease* – MSUD)

Repolho, lúpulo – má absorção de metionina

Pardacenta – fenilcetonúria

Peixe podre – trimetilaminúria

Rançosa – tirosinemia

A urina inodora dos pacientes com insuficiência renal aguda sugere a ocorrência de necrose tubular aguda, em vez de insuficiência pré-renal.

Volume de urina

Nas condições normais, o principal fator determinante do volume de urina é a ingestão de água. Um indivíduo adulto, em média, produz entre 600 e 2.000 mL de urina/dia, e a produção noturna de urina geralmente não ultrapassa 400 mL. Durante a gravidez, a variação diurna usual pode ser revertida. Em comparação aos adultos, as crianças pequenas podem excretar cerca de 3 a 4 vezes mais urina por kg de peso corporal. A determinação do débito urinário a intervalos estabelecidos pode ser valiosa para o diagnóstico clínico.

Aumento do volume de urina

A produção de mais de 2.000 mL de urina em 24 horas é denominada poliúria. A noctúria é a excreção noturna de mais de 500 mL de urina, com uma gravidade específica inferior a 1,018. Em geral, grandes volumes de urina tendem a resultar em baixa gravidade específica.

A ingestão excessiva de água (polidipsia) resulta em poliúria, assim como o consumo de certos fármacos que apresentam efeito diurético, como a cafeína, o álcool, as tiazidas e outros diuréticos. Soluções endovenosas podem aumentar o débito urinário. A ingestão aumentada de sais e dietas ricas em proteína também requerem mais água para serem excretadas.

Os estados patológicos que resultam em excesso de perda renal de líquidos/excreção urinária podem ser distribuídos em três grupos:

Regulação hormonal defeituosa da homeostasia volumétrica. O diabetes insípido pode ser devido tanto a uma deficiência (variedade pituitária/central) quanto a uma ausência (nefrogênica) de resposta renal ao hormônio antidiurético. Em ambas as situações, o indivíduo apresenta sede e ingestão de água excessivas, além de poliúria e noctúria acentuadas. A produção diária de urina pode chegar a 15 L.

Absorção renal defeituosa de sais/água. Esse defeito pode ser decorrente da administração de agentes diuréticos ou de anormalidade dos túbulos renais, resultando na perda de sódio ou no comprometimento do mecanismo de contracorrente. Na insuficiência renal crônica progressiva, há diminuição do funcionamento renal e perda gradual da capacidade de concentrar a urina. Para que ocorra a excreção renal diária da carga de solutos e água, o volume de urina por néfron residual aumenta e a urina eventualmente se torna iso-osmótica em relação ao ultrafiltrado plasmático.

Diurese osmótica. No diabetes melito com hiperglicemia, observa-se uma excreção excessiva de glicose que provoca a diurese de solutos.

Diminuição do volume de urina

A oligúria é a excreção de menos de 500 mL de urina em 24 horas, enquanto a anúria é a supressão quase total da formação de urina. A deprivação de água causa uma redução do volume de urina mesmo antes do aparecimento de sinais e sintomas de desidratação. A oligúria pode ter início abrupto, como observa-se na insuficiência renal aguda,

ou pode ser decorrente de uma doença renal crônica progressiva. Em ambos os casos, pode haver retenção de produtos nitrogenados residuais (azotemia) (ver Cap. 14).

As causas de insuficiência renal aguda são classicamente categorizadas em:

Pré-renal. A perda do volume intravascular pode resultar de hemorragias ou desidratação associada a diarreia prolongada, vômitos, sudorese excessiva ou queimaduras graves. O fenômeno conhecido como terceiro espaço consiste na transferência dos líquidos intravasculares para os espaços extracelulares. Condições como insuficiência cardíaca congestiva, sépsis, anafilaxia ou oclusão embólica da artéria renal podem acarretar a diminuição do fluxo sanguíneo renal.

Pós-renal. A hidronefrose bilateral, que resulta de uma obstrução de alto grau ou prolongada do trato urinário, pode estar associada a uma diminuição marcante do fluxo urinário e, até mesmo, à anúria. Essa condição pode ocorrer em casos de carcinoma e hiperplasia da próstata. A obstrução ureteral bilateral causada por cálculos, coágulos e tecido fragmentado, assim como a obstrução uretral decorrente de estenose ou válvulas, são outras formas de obstrução. A anúria associada à terapia com sulfonamida e à desidratação deve-se à obstrução causada pela precipitação de cristais nos túbulos renais quando o pH urinário se torna acídico.

Doença do parênquima renal. A possível existência dessa doença deve ser considerada somente após a exclusão de outras causas pré e pós-oligúria. A lista de condições é extensa e inclui vários distúrbios vasculares, glomerulonefrite aguda, nefrite intersticial e necrose tubular aguda (NTA). A isquemia renal é causa comum de NTA, em razão tanto da insuficiência cardíaca quanto da hipotensão. Inúmeros agentes nefrotóxicos podem produzir NTA, tais como antibióticos diversos, mercúrio, cádmio, tetracloreto de carbono e glicerol. Outras etiologias incluem hemoglobinúria e mioglobinúria associadas à hemólise e ao dano muscular, respectivamente, bem como presença de quantidades excessivas de proteínas ou cristais no interior dos túbulos.

A insuficiência renal crônica – uma perda progressiva e irreversível da função renal – resulta de várias entidades patológicas. Entre elas, estão a nefrosclerose hipertensiva e associada ao diabetes, a glomerulonefrite crônica, a doença renal policística e outros distúrbios urológicos. A gravidade específica da urina é baixa e pode haver evidências de proteinúria, cilindros e células renais. Pielonefrite ou nefrite intersticial causam principalmente disfunção tubular com poliúria no início da doença, contudo, subsequentemente, surge uma oligúria tardia decorrente da insuficiência renal crônica.

Gravidade específica e osmolalidade

O volume excretado e a concentração de solutos da urina são parâmetros modificados pelos rins com o intuito de manter a homeostasia hídrica e eletrolítica corporal. As medidas de gravidade específica e osmolalidade refletem o grau relativo de concentração ou diluição da amostra de urina. Esses dados ajudam a avaliar a capacidade renal de concentração e diluição. Foi demonstrado que ambos os índices, bem como a cor da urina, são indicadores confiáveis dos status de hidratação (Armstrong, 1998).

A gravidade específica da amostra indica a proporção relativa de componentes sólidos dissolvidos em relação ao volume total da amostra. Portanto, essa medida reflete a densidade da amostra. A osmolalidade, por outro lado, indica o número de partículas de soluto por unidade de solução. Partículas maiores, como proteínas e açúcares, tendem a aumentar a gravidade específica de forma mais intensa do que os eletrólitos menores. Em situações críticas, a determinação da osmolalidade da urina (e do plasma) é preferível à determinação da gravidade específica.

Gravidade específica

Ureia (20%), cloreto de sódio (25%), sulfato e fosfato contribuem para a maior parte da gravidade específica da urina normal. Adultos normais com ingestão adequada de líquidos produzem urina com gravidade específica entre 1,016 e 1,022 em um período de 24 horas. Entretanto, rins normais têm a capacidade de produzir urina com gravidade específica variável entre 1,003 e 1,035. Se uma amostra de urina obtida ao acaso apresenta gravidade específica de 1,023 ou mais, a capacidade de concentração da urina pode ser considerada normal. A gravidade específica mínima após uma carga de água deve ser menor que 1,007.

Urinas com baixa gravidade específica (menor que 1,007) são denominadas hipostenúricas. No diabetes insípido, a perda da capacidade de concentração (como já descrito) resulta na geração de grandes volumes de urina com gravidade específica de até 1,001 (a gravidade específica da água vale 1,000). A excreção prolongada de urina com baixa gravidade específica também pode ser observada em várias anomalias renais, tais como pielonefrite e glomerulonefrite. Gravidades específicas altas podem ser encontradas após desidratação/perda de quantidades excessivas de água, insuficiência suprarrenal, doença hepática ou insuficiência cardíaca congestiva. Uma condição denominada isostenúria tem lugar quando várias amostras de urina obtidas de um mesmo paciente apresentam pouca ou nenhuma variabilidade e gravidade específica com valor fixo de aproximadamente 1,010. A detecção dessa condição é indicativa da existência de uma lesão renal severa com comprometimento das capacidades renais de concentração e diluição.

Métodos. Existem vários métodos que permitem determinar a gravidade específica: tiras reativas, refratômetro, urinômetro e método do gotejamento.

Tiras reativas. Trata-se de um método indireto para medir a gravidade específica. A área reativa contém três ingredientes principais: polieletrólito, substância indicadora e tampão. O princípio dessa metodologia baseia-se na mudança de pK_a de polieletrólitos pré-tratados em relação à concentração iônica da urina. Quando essa concentração é alta, o pK_a diminui, assim como ocorre com o pH. A substância indicadora, então, muda de cor conforme a concentração iônica, e esse fenômeno é traduzido em valores de gravidade específica. Esse método não é afetado por quantidades elevadas de glicose, proteínas ou contraste radiológico, que tendem a elevar as leituras de gravidade específica obtidas com refratômetros e urinômetros descritos a seguir.

Refratômetro. Esse é igualmente um método indireto. O índice refrativo de uma solução está relacionado ao seu conteúdo de sólidos dissolvidos. Esse índice corresponde à proporção entre velocidade da luz no ar e velocidade da luz na solução. Varia diretamente com a proporção de partículas em solução e, portanto, com a gravidade específica.

O refratômetro clínico é um dispositivo que requer apenas algumas gotas de urina (diferente do urinômetro, que requer 15 mL de urina). Embora o refratômetro determine o índice refrativo de uma solução, a escala adotada é válida somente para a urina e não pode ser utilizada para indicar a gravidade específica de soluções de sais ou açúcares. É preciso lembrar desse detalhe caso sejam utilizadas soluções salinas para calibração. Devem ser elaborados gráficos especiais para converter os números da escala do índice refrativo em concentração de soluto de soluções aquosas, caso essa conversão seja necessária (American Optical Catalog, nº 10403). A leitura da gravidade específica no refratômetro em geral é discretamente menor (em aproximadamente 0,002) do que a leitura feita com urinômetro utilizando a mesma amostra de urina.

Procedimento. Existe um modelo manual com compensação de temperatura. O instrumento conta com mecanismo de compensação da temperatura entre 15,6ºC (60ºF) e 37,8ºC (100ºF), que é danificado por temperaturas acima de 65,6ºC (150ºF) e pela imersão da ocular e do anel de focalização na água. Sua leitura deve ser igual a zero para água destilada, e a leitura do zero pode ser reconfigurada sempre que necessário. Para tanto, remove-se o lacre localizado sobre o parafuso de ajuste e gira-se este com auxílio de uma pequena chave de fenda, recolocando o lacre em seguida. A calibração deve sempre ser checada diariamente. Como forma adicional de checagem, uma solução de sulfato de cobre pode ser ajustada para monitorar o elevado nível de gravidade específica.

Para determinar a gravidade específica da urina, as superfícies da cobertura e do prisma devem ser limpas com algumas gotas de água destilada e pano umedecido e, depois, deixadas para secar. Em seguida, a cobertura deve ser fechada. Segurando em posição horizontal, aplica-se uma gota de urina na parte inferior chanfrada da cobertura, de modo que a amostra corra sobre a superfície do prisma por ação capilar. Então, aponta-se o instrumento na direção de uma fonte de luz, em um ângulo que ofereça contraste ideal. A ocular deve ser girada até a focalização da escala. O operador faz a leitura diretamente na escala de gravidade específica, a fina linha divisória entre o contraste

de claro e escuro. O processo deve ser integralmente repetido com um segunda gota de urina proveniente da mesma amostra.

Urinômetro. Trata-se de um hidrômetro adaptado para medir diretamente a gravidade específica da urina à temperatura ambiente. Esse aparelho deve ser checado todos os dias, medindo-se a gravidade específica da água destilada. Se o urinômetro não fornecer uma leitura igual a 1,000, significa que é necessário aplicar a devida correção a todas as leituras obtidas com o aparelho. A acurácia de um urinômetro pode ser ainda avaliada utilizando-se soluções com gravidade específica conhecida.

Como a temperatura influencia a gravidade específica, as amostras de urina devem atingir a temperatura ambiente antes de serem submetidas à leitura. Alternativamente, utiliza-se um fator de correção igual a 0,001 para cada 3°C acima ou abaixo da temperatura de calibração indicada no urinômetro. Também devem ser implantadas as devidas correções considerando o conteúdo de proteínas ou glicose presente, subtraindo-se 0,003 a cada 1 g/dL para proteínas e 0,004 a cada 1 g/dL para glicose.

Procedimento. Cerca de três quartos do reservatório do urinômetro são preenchidos com urina (o volume mínimo necessário é 15 mL). O aparelho é inserido em movimentos giratórios para garantir que flutue livremente. (Ao fazer a leitura no urinômetro, certifique-se de não tocar em ambas as laterais nem na parte inferior do cilindro. Evite a formação de bolhas de ar, pois elas dificultam a visualização do menisco.) É a parte inferior do menisco que deve ser lida.

Método do gotejamento. Trata-se de um método direto para medir a gravidade específica. É mais acurado do que o refratômetro e mais preciso do que o urinômetro. Esse método emprega uma coluna especialmente projetada que é preenchida com óleo imiscível em água. Uma gota de urina previamente medida é introduzida na coluna e, ao cair e se deslocar por ela, encontra dois feixes de luz. Ao atingir o primeiro feixe, a gota aciona o cronômetro e, ao atingir o segundo feixe, o desliga. O tempo de queda é medido eletronicamente e expresso como gravidade específica (Free, 1996).

Osmolalidade

Um indivíduo adulto normal cuja ingestão de líquidos é normal irá produzir uma urina com cerca de 500 a 850 mOsm/kg de água. O rim normal é capaz de produzir uma osmolalidade urinária na faixa de 800 a 1.400 mOsm/kg de água no estado de desidratação e uma osmolalidade urinária mínima de 40 a 80 mOsm/kg de água na diurese hídrica. Após um período de desidratação, a osmolalidade da urina deve ser entre 3 e 4 vezes a do plasma (p. ex., diante de uma osmolalidade plasmática de 285 mOsm/kg de água, a urina deve apresentar uma osmolalidade de no mínimo 855 mOsm/kg de água).

Métodos. O método da depressão do ponto de congelamento é comumente empregado. Uma solução com 1 osmol ou 1.000 mOsm/kg de água causa uma depressão do ponto de congelamento equivalente a 1,86°C abaixo do ponto de congelamento da água. Para saber mais sobre o método, consulte o Capítulo 4.

Triagem bioquímica

As tiras reativas constituem a metodologia primária para o exame bioquímico da urina. Apesar da fácil utilização, essas tiras representam reações químicas múltiplas e complexas que envolvem conhecimentos avançados. A Tabela 27.4 lista as recomendações tanto para armazenamento quanto para uso das tiras reativas. Embora a leitura das tiras seja tradicionalmente realizada de forma manual, hoje existem aparelhos automatizados, como o Bayer Atlas, que aspiram um volume preciso de urina, depositam-no em uma vareta medidora de nível e fazem a leitura por reflectância das reações químicas que ocorrem na tira (Lyon, 2003; Penders, 2002). Tais sistemas fornecem uma excelente reprodutibilidade de resultados e não estão sujeitos a algumas das inconsistências que ocorrem quando mãos humanas tentam cronometrar as reações e olhos humanos se esforçam para discriminar as diferentes nuances de cor produzidas pelas reações.

Com relação às tiras reativas, é preciso notar que os métodos mudam periodicamente, suas sensibilidades e reações de cor sofrem alterações e novas determinações são adicionadas. Os fabricantes fornecem tabelas que contêm as substâncias interferentes mais comuns que devem ser consultadas. É possível encontrar a interferência causada pelo ácido ascórbico e os compostos que levam à produção de urina colorida, como a fenazopiridina (Piridínio) e outros compostos azo, bem como o cloreto de metiltionínio (azul de metileno). Informações mais detalhadas acerca das interferências produzidas por compostos químicos são listadas por Young (1990).

As medidas bioquímicas mais encontradas com as tiras reativas serão discutidas primeiro, seguidas da discussão dos parâmetros bioquímicos cuja determinação é menos frequente. Uma discussão da aplicação clínica de cada analito precede a das tiras reativas, bem como a de outras metodologias. Os métodos confirmatórios são incluídos quando disponíveis e necessários.

Tabela 27.4 Recomendações referentes às tiras reativas

Armazenamento
Proteger contra umidade e calor excessivo
Armazenar em ambiente frio, porém fora da geladeira
A cada vez que for usar, verificar se houve descoloração; a ocorrência de descoloração pode indicar perda da reatividade
Não usar tiras nem pastilhas descoradas
Manter o frasco hermeticamente fechado
A cada novo lote, verificar as instruções do fabricante quanto a alterações de procedimento
Teste
Sempre que possível, testar a urina logo após o recebimento
Retirar apenas um número de tiras reativas que seja suficiente para o uso imediato; em seguida, fechar o frasco hermeticamente
Testar uma amostra de urina bem homogeneizada e livre de espuma
As amostras de urina devem estar à temperatura ambiente antes de iniciar o teste
Não tocar a área de teste com os dedos
Não utilizar as tiras reativas em presença de ácidos voláteis ou vapores alcalinos
Mergulhar rapidamente a tira reativa na urina (por 1 segundo, no máximo)
Drenar o excesso de urina – deslizar a extremidade da tira reativa ao longo da borda do tubo ou pressionar sua extremidade contra um pedaço de papel absorvente
Não deixar que os reagentes escorram juntos
Não deixar a tira reativa diretamente sobre a superfície da bancada
Siga exatamente as recomendações de tempo para cada teste bioquímico
Segurar a tira reativa próxima da cartela de cores e fazer a leitura sob iluminação adequada
Conhecer as fontes de erro, sensibilidade e especificidade de cada teste com a tira reativa
Estabelecer correlações entre a história do paciente e o teste individual e, então, seguir em frente

pH da urina

Os rins e os pulmões normalmente trabalham em harmonia para manter o equilíbrio acidobásico. O pulmão secreta dióxido de carbono, enquanto a contribuição renal consiste em recuperar e gerar bicarbonato e secretar íons amônio. O túbulo proximal renal é responsável pela parcela correspondente à reabsorção/geração de bicarbonato, enquanto o túbulo distal exerce as funções remanescentes.

As células tubulares trocam íons hidrogênio pelo sódio do filtrado glomerular. A atividade metabólica do corpo produz ácidos não voláteis, principalmente sulfúrico, fosfórico e hidroclorídrico, mas também pequenas quantidades de ácidos pirúvico, lático e cítrico, além de corpos cetônicos. Estes são excretados pelo glomérulo sob a forma de sais (de sódio, potássio, cálcio e amônio) e, com a amônia produzida pelos túbulos proximais, podem seguir adiante para capturar os íons hidrogênio secretados para eliminação via urina (ver Cap. 14).

pH normal

Um indivíduo adulto que consome dieta normal excreta, em média, cerca de 50 a 100 mEq de íons hidrogênio em 24 horas para produzir urina com pH em torno de 6. Nos indivíduos sadios, o pH urinário pode variar entre 4,6 e 8.

Urina ácida

Uma urina ácida pode ser produzida por meio da ingestão de dietas ricas em proteína oriunda de carnes e com algumas frutas, como cranberries (oxicoco). Durante a acidose respiratória do sono, pode ser formada uma urina mais ácida. Do mesmo modo, a acidificação terapêutica da urina por vários agentes farmacológicos, incluindo cloreto de amônio, metionina e mandelato de metenamina, é utilizada no tratamento de alguns cálculos, como os de fosfato e carbonato de cálcio, que tendem a se desenvolver em urinas alcalinas.

Nos distúrbios acidobásicos, o pH da urina reflete as tentativas de compensação por parte dos rins. Pacientes com acidose metabólica ou respiratória devem produzir urina ácida, com concentração de íons amônio e acidez titulável. Na cetoacidose diabética, grandes quantidades de íons hidrogênio são excretadas, em grande parte sob a forma de íons amônio. Nos casos de depleção de potássio, como ocorre na alcalose hipovolêmica por vômito prolongado ou no hipercorticismo, ou diante do uso prolongado de diuréticos, pode haver acidúria paradoxal com produção de uma urina discretamente ácida na presença de alcalose metabólica.

Urina alcalina

A urina alcalina pode ser induzida pelo consumo de uma dieta rica em certas frutas e vegetais, especialmente frutas cítricas. A urina tende a se tornar menos ácida após uma refeição (a conhecida maré alcalina). Há muito tempo, acredita-se que esse fenômeno seja uma compensação urinária da secreção gástrica. Todavia, estudos recentes contestaram essa ideia (Johnson, 1995). Bicarbonato de sódio, citrato de potássio e acetazolamida podem ser utilizados para induzir a produção de uma urina alcalina no tratamento de alguns tipos de cálculo, em particular daqueles compostos de ácido úrico, cistina ou oxalato de cálcio. Esses agentes também podem ser empregados em alguns casos de infecção urinária (os antibióticos neomicina, canamicina e estreptomicina são mais ativos na urina alcalina), na terapia com sulfonamidas e no tratamento do envenenamento por salicilatos.

A capacidade de trocar íons hidrogênio por cátions e a formação de amônia são reduzidas diante do comprometimento da função tubular. Na acidose tubular renal clássica, a filtração glomerular permanece normal, porém a capacidade tubular distal de formar amônia e trocar íons hidrogênio por cátions é defeituosa. A urina é relativamente alcalina e, mesmo com a administração de uma substância de carga ácida, não se pode diminuir o pH a valores abaixo de 6 a 6,5. Além disso, a acidez titulável e a concentração de amônia estão diminuídas (Singh, 1995). Há perda de bicarbonato na acidose tubular renal proximal, e o mesmo pode ocorrer na síndrome de Fanconi.

Na alcalose metabólica, há produção de uma urina alcalina com níveis elevados de bicarbonato urinário e diminuição da produção de amônia. Os rins podem formar urina com pH de até 7,8. Na alcalose respiratória, a urina alcalina produzida está associada ao aumento da excreção de bicarbonato.

Métodos

Tiras reativas. Os indicadores vermelho de metila e azul de bromotimol produzem cores que variam entre alaranjado, verde e azul conforme o pH aumenta, permitindo estimar valores de pH de até meia unidade na faixa de 5 a 9. A leitura deve ser realizada imediatamente, ainda que o tempo não seja um fator crítico. É preciso ter cautela para que as tiras reativas não fiquem excessivamente úmidas onde o tampão ácido da parte correspondente à proteína corre para dentro da parte correspondente ao pH, fazendo-a se tornar alaranjada.

A determinação do pH e da acidez da urina deve ser sempre realizada com amostras obtidas de esvaziamentos recentes. Havendo necessidade de obter medidas precisas, o frasco deve ser preenchido a fim de minimizar o espaço morto, e a urina deve ser hermeticamente vedada. O frasco deve ser mantido resfriado, de preferência no gelo, mas não deve ser congelado. Enquanto a amostra permanece em repouso, o pH tende a aumentar em razão da perda de dióxido de carbono e da produção de amônia a partir de ureia associada ao crescimento bacteriano.

Eletrodo de pH. Apesar de as estimativas de pH obtidas com tiras reativas serem suficientes na maioria dos casos, quando se trata de pacientes com distúrbios do equilíbrio acidobásico, o pH urinário pode ser avaliado com maior acurácia se for medido com um medidor de pH com eletrodo de vidro. Como o medidor de pH tende a produzir flutuações, deve ser calibrado imediatamente antes do uso com três tampões de pH conhecido. Após a calibração, o eletrodo deve ser borrifado com água destilada, limpo e seco com pano. Em seguida, esse eletrodo é imerso na amostra de urina e fornece a leitura do pH urinário de acordo com a temperatura em que a medição é realizada.

Acidez urinária titulável. O pH da urina é bastante dependente da quantidade de fosfatos mono e dibásico presente. A acidez titulável é determinada titulando-se uma alíquota de urina de 24 horas (coletada no gelo) com uma solução de NaOH 0,1 N, tendo o pH 7,4 como ponto final. Essa quantificação pode ser utilizada de forma conjunta com a determinação da amônia urinária em casos de pacientes com acidose crônica de origem obscura. A acidez titulável considerada normal consome cerca de 200 a 500 mL da solução de titulação de NaOH 0,1 N (ou 6 mL de NaOH 0,1 N/kg de peso corporal), ou 20 a 40 mEq/24 horas. Informações acerca desse procedimento podem ser encontradas nas edições anteriores deste livro (Henry, 1996).

Proteína na urina

Na situação normal, até 150 mg de proteína são excretadas diariamente pela urina, com uma concentração proteica urinária média que varia de 2 a 10 mg/dL, dependendo do volume de urina. Anderson et al. (1979) demonstraram a existência de mais de 200 proteínas urinárias distintas, derivadas tanto do plasma quanto do trato urinário. Cerca de um terço do total corresponde à fração da albumina, enquanto as demais proteínas plasmáticas incluem as pequenas globulinas (α, β e γ). Proteínas plasmáticas com peso molecular inferior a 50.000 a 60.000 atravessam a membrana basal glomerular e são normalmente reabsorvidas pelas células dos túbulos proximais renais. A albumina, cujo peso molecular vale 69.000, parece ser filtrada, ainda que apenas em quantidades muito pequenas. A proteína ligadora de retinol, a β_2-microglobulina, as cadeias leves das imunoglobulinas e a lisozima são secretadas em pequenas quantidades. A glicoproteína de Tamm-Horsfall (uromucoide), secretada pelas células dos túbulos distais e da alça de Henle ascendente, constitui cerca de um terço ou mais do conteúdo de proteína normalmente perdido. A IgA presente nas secreções do trato urinário, as enzimas e proteínas originárias das células epiteliais tubulares, outras células descamadas e os leucócitos também contribuem para o componente proteico da urina.

A detecção de uma quantidade anormal de proteína na urina é um indicador importante de doença renal, uma vez que as proteínas apresentam uma taxa de reabsorção tubular máxima (Tm) muito baixa. O aumento da filtração de proteínas satura rapidamente o mecanismo de reabsorção. Métodos de triagem são empregados na rotina para diferenciação entre excreção proteica normal e anormal, não devendo, portanto, detectar menos de 8 a 10 mg/dL em um indivíduo adulto normal com taxa normal de fluxo urinário. O método da tira reativa é sensível à albumina. Como os métodos que utilizam precipitação ácida detectam todas as proteínas, também indicam a presença de globulinas além da albumina. É importante notar que uma amostra de urina bastante diluída coletada ao acaso pode apresentar valores de proteína falsamente baixos. Como um resultado positivo para detecção de proteínas é significativo, deve ser confirmado por um segundo método e pela análise repetida de várias amostras. Dependendo dos dados obtidos com a história e o exame do paciente, as determinações confirmatórias da elevação do conteúdo proteico talvez tenham de ser acompanhadas de avaliação da função renal, exame do sedimento urinário e cultura de urina.

A proteinúria funcional costuma ser inferior a 0,5 g/dia e pode ser observada em diversas situações, nas quais a desidratação contribui para a elevação dos níveis de proteína quantificados na urina. Com a prática de exercícios extenuantes, surge na urina uma mistura de proteínas com pesos moleculares altos e baixos, bem como muitos cilindros, tanto hialinos quanto granulares. A proteinúria funcional também pode acompanhar a insuficiência cardíaca congestiva, a exposição ao frio e a febre. Seja qual for o evento, a proteinúria resolve-se com o tratamento adequado do paciente ou o repouso em 2 ou 3 dias.

A proteinúria transitória intermitente é observada ocasionalmente em pacientes com história normal, exame físico e função renal também normais. Exceto pela proteinúria ocasional, os resultados da urinálise também são normais. Esses pacientes são tipicamente acom-

panhados a cada 6 meses para detectar uma possível hipertensão ou outras anormalidades, e o prognóstico geral é bom. Uma proteinúria transitória também pode ocorrer durante a gravidez normal, contudo qualquer evento de proteinúria durante a gestação é um achado importante e requer investigação. Uma proteinúria persistente de 1 a 2 g/dia em indivíduo assintomático, ou quando acompanhada de hematúria, está associada a um prognóstico pior do que aquele da proteinúria intermitente (transiente) ou da proteinúria postural.

Proteinúria postural

A proteinúria postural (ortostática) acomete entre 3 e 5% da população de adultos jovens aparentemente sadios. Nessa condição, a proteinúria é detectada somente durante o dia, e não à noite, quando o paciente assume a posição recumbente (deitado). Alguns desses indivíduos sadios podem desenvolver proteinúria persistente mais adiante. Biópsias renais demonstraram a existência de anormalidades envolvendo o glomérulo em certos casos (Robinson, 1961). A proteinúria aparentemente está relacionada a uma posição lordótica exagerada e pode resultar de isquemia ou congestão renal. A excreção total de proteínas diária raramente excede 1 g e, na maioria dos casos, nenhuma outra evidência de doença renal desenvolve-se.

Para avaliar a possibilidade de uma proteinúria postural, o paciente é instruído a esvaziar a bexiga urinária no momento em que for se deitar para dormir, à noite. Pela manhã, assim que se levantar, o paciente deve esvaziar a bexiga e coletar amostra dessa urina. Depois de permanecer em pé e caminhar por 2 horas, o paciente esvazia a bexiga novamente e também coleta amostra dessa urina. As duas amostras de urina coletadas pelo paciente são analisadas quanto ao conteúdo proteico. O paciente apresenta proteinúria postural se a primeira amostra for negativa e a segunda, positiva. O paciente deve ser examinado com frequência para reavaliação dessa condição.

Proteinúria no idoso

A incidência de uma proteinúria significativa detectada por urinálise na população idosa é substancialmente maior se comparada ao observado na população de indivíduos com menos de 60 anos de idade. Estima-se que a população de idosos, em geral, apresente uma incidência 3 a 4 vezes maior de glomerulonefrite, e aproximadamente um quarto desses indivíduos afetados apresenta um distúrbio semelhante a uma alteração mínima, que pode responder à terapia com esteroides. Nessa população, a existência de malignidades ocultas também pode causar o aparecimento de glomerulonefrite com consequente proteinúria (Threatte, 1986).

Quantificação da proteinúria

Mais informações úteis para o diagnóstico de doença renal e o acompanhamento da resposta ao tratamento podem ser obtidas por meio da análise quantitativa do conteúdo proteico excretado durante um período de 24 horas. É preciso notar que a acurácia das medidas de qualquer determinação quantitativa urinária depende do grau de adequação e perfeição da coleta da amostra de urina. A obtenção de resultados errôneos muitas vezes está relacionada a problemas de coleta. Pode ser necessário repetir as medidas para decidir se a proteinúria é intermitente ou persistente.

Proteinúria intensa (> 4 g/dia). Uma perda intensa de proteínas é caracteristicamente observada na síndrome nefrótica. Na situação clássica, baixos níveis séricos de albumina, edema generalizado e aumento dos níveis séricos de lipídeos (colesterol, triglicerídeos e fosfatídeos) acompanham esse distúrbio. A concentração sérica de lipoproteínas – LDL e VLDL – está aumentada, enquanto a presença de HDL (uma molécula menor) foi demonstrada na urina (de Mendoza, 1976). Foi sugerido que a perda de lipoproteína lipase pela urina contribui para a elevação dos níveis séricos de lipídeos. A γ-globulina também é perdida pela urina, e essa perda pode contribuir para a suscetibilidade a infecções bacterianas comumente encontradas em pacientes nefróticos. Quando há perda urinária de lipídeos, muitos cilindros granulares, cilindros de gordura e células epiteliais tubulares renais repletas de gordura (corpos adiposos ovais) são encontrados no sedimento. Gotículas de éster de colesterol podem ser demonstradas por polarização.

A síndrome nefrótica está associada principalmente a dano/disfunção glomerular decorrente de (1) doenças renais primárias (incluindo doença idiopática) e (2) doenças sistêmicas com envolvimento renal. As causas transitórias ou mecânicas incluem insuficiência cardíaca congestiva severa, pericardite constritiva e trombose na veia renal. Esta última causa pode ser uma consequência da síndrome nefrótica, em razão das perdas de fatores anticoagulantes por meio da urina e da elevação dos níveis séricos de fibrinogênio. Em crianças, uma causa comum de síndrome nefrótica é a doença de alterações mínimas (também conhecida como lesão nula), um distúrbio glomerular responsivo a esteroides. A glomerulonefrite em suas formas aguda, rapidamente progressiva e crônica constitui causa de proteinúria intensa e pode ser acompanhada da presença de eritrócitos urinários ou de cilindros eritrocitários. O diabetes melito e o lúpus eritematoso são doenças sistêmicas que com frequência provocam lesão glomerular e forte proteinúria. O sedimento urinário pode ser "telescopado", ou seja, exibir todos os tipos de células e cilindros na nefrite lúpica ou com uma reação de hipersensibilidade. Malária, hipertensão maligna, toxemia da gravidez, metais pesados (ouro, mercúrio), fármacos (penicilamina), neoplasias em geral, amiloidose, anemia falciforme, rejeição de transplante renal e, mais raramente, síndrome antifosfolipídica primária (Levy, 1998) constituem causas adicionais de proteinúria intensa.

Proteinúria moderada (1 a 4 g/dia). A proteinúria moderada pode ser encontrada na vasta maioria das doenças renais, incluindo aquelas já mencionadas, bem como na nefrosclerose, no mieloma múltiplo e nas nefropatias tóxicas. Também incluídas estão as condições degenerativas, malignas e inflamatórias que afetam o trato urinário inferior, entre as quais as condições causadoras de irritação, como a presença de cálculos.

Proteinúria mínima (< 1 g/dia). Uma proteinúria mínima pode ser notada na pielonefrite crônica e, nesse caso, poderá ser intermitente. Nas fases relativamente inativas das doenças glomerulares, também é possível observar essa condição. Nefrosclerose, nefrite intersticial crônica, doenças congênitas (p.ex., doença policística e doença cística medular) e doenças tubulares renais são outras situações em que uma proteinúria mínima pode ser detectada. O sedimento urinário costuma estar normal nas doenças tubulares, contudo é possível encontrar eritrócitos, leucócitos e células tubulares na nefrite intersticial. Achados significativos no sedimento urinário às vezes são acompanhados de resultados que indicam traços de proteínas. Uma proteinúria mínima também ocorre nas proteinúrias posturais e na proteinúria transitória.

Categorias qualitativas de proteinúria

A detecção dos tipos de proteinúria presentes na urina requer a separação eletroforética das proteínas urinárias. Com base nesses e em outros achados clínicos, é possível separar a proteinúria em padrões glomerular e tubular, indicando qual parte do néfron está primariamente envolvida. Entretanto, essas entidades anatômicas tendem a se misturar à medida que a doença avança.

Padrão glomerular. A doença glomerular causa uma proteinúria que pode ser intensa (> 3 – 4 g/dia). Uma perda ou redução da carga negativa fixa da membrana basal glomerular permite que grande quantidade de albumina permeie o espaço de Bowman, ultrapassando a quantidade que pode ser reabsorvida pelas células tubulares proximais. Quando a albumina sérica é perdida pela urina, outras proteínas de tamanho ou carga similares também são perdidas (p. ex., antitrombina, transferrina, pré-albumina, glicoproteína-α_1 ácida, α_1-antitripsina). Como a função tubular ainda pode estar normal, as proteínas plasmáticas de tamanho bem pequeno são intensamente reabsorvidas. As proteínas grandes, por outro lado, não são observadas na urina enquanto o glomérulo permanecer seletivo (p. ex., α_2-macroglobulina e β-lipoproteína). Conforme as proteínas maiores vão aparecendo, a proteinúria torna-se menos seletiva, indicando a existência de um dano glomerular maior (p. ex., com nefropatia membranosa e glomerulonefrite proliferativa).

Padrão tubular. Esse padrão está associado à perda de uma pequena quantidade de proteínas urinárias que, de outro modo, seriam amplamente reabsorvidas. Essas proteínas, em geral, são de baixo peso molecular (p. ex., α_1-microglobulina, β-globulinas, como a β_2-microglobulina, cadeias leves de imunoglobulinas e lisozimas), e não apresentam nenhuma predileção por moléculas com tamanho aproximado ao da albumina. O radioimunoensaio possibilita quantificar a excreção urinária de β_2-microglobulina em microgramas, como indicação de dano tubular.

A excreção normal dessa proteína é de aproximadamente 100 μg/dia. Um padrão de proteinúria tubular é observado nos casos de doença tubular renal, como na síndrome de Fanconi, na cistinose, na doença de Wilson e na pielonefrite, bem como na rejeição de transplante renal. A quantidade de proteinúria é tipicamente menor do que a observada nas doenças glomerulares, sendo de cerca de 1 a 2 g/dia. A proteinúria tubular pode não ser detectada por meio do teste com tiras reativas, em razão da ausência ou da escassez de albumina, porém certamente pode ser detectada pelo método da precipitação ácida.

Proteinúria por extravasamento. A proteinúria por extravasamento decorre do transbordamento dos níveis excessivos de uma proteína na circulação, e pode envolver a perda urinária de hemoglobina, mioglobina ou imunoglobulina. Essas proteínas inicialmente não estão associadas a doenças glomerulares ou tubulares, contudo podem causar dano renal por si mesmas. A mioglobina pode causar necrose tubular aguda (ver Mioglobina). A hemoglobina, quando em pequena quantidade, não é considerada tóxica, desde que na ausência de hipovolemia.

Proteinúria de Bence Jones. A proteinúria de Bence Jones está associada a mieloma múltiplo, macroglobulinemia e linfomas malignos. A incidência desse tipo de proteinúria no mieloma múltiplo foi estimada em 50 a 80%, no entanto sua demonstração depende bastante da técnica utilizada. A proteína de Bence Jones pode passar completamente desapercebida se for utilizado apenas um único teste com tira reativa para proteínas. Os métodos de eletroforese e eletroforese por imunofixação (*immunofixation electrophoresis* - IFE) são os melhores métodos para sua detecção e quantificação.

A excreção de grandes quantidades de proteína de Bence Jones, por vezes muitas gramas em 24 horas, faz com que as células tubulares sofram deterioração em razão dos elevados níveis de proteínas reabsorvidas. Pode haver formação de inclusões dentro dessas células, e células descamadas podem gerar cilindros no lúmen tubular. Os cilindros também se formam a partir da mistura de imunoglobulinas com proteína de Tamm-Horsfall. Com a insuficiência renal, diminui a reabsorção proteica e aumenta a concentração urinária de proteínas de Bence Jones, entre outras. O dano renal por vezes é denominado rim de mieloma, que pode ser acompanhado de síndrome nefrótica.

Microalbuminúria. Trata-se da presença de albumina na urina em concentração acima do normal, porém abaixo da faixa detectável por meio dos métodos convencionais que empregam vareta medidora de nível de urina. Diversos autores sugeriram que esses níveis urinários de albumina mais baixos, com uma variação entre 20 e 200 mg/L (ou com taxa de excreção próxima de 20 – 200 μg/min), atuam como indicadores da existência de um dano glomerular ainda inicial e possivelmente reversível (Mogensen, 1984; Viberti, 1982). Em pacientes diabéticos, a microalbuminúria está associada a um aumento de 4 a 6 vezes da taxa de mortalidade cardiovascular e constitui um fator de risco independente de mortalidade renal (Zelmanovitz, 1998; Bakris, 1996). É também mais prevalente em indivíduos hipertensos (Gerber, 1998). Várias metodologias foram introduzidas, entre as quais sistemas de testes imunológicos e tiras de reações químicas para fixação de corantes, ambas discutidas a seguir.

Métodos

Existem diversos métodos para triagem e quantificação disponíveis para analisar o conteúdo proteico da urina. Em razão das sérias implicações de um resultado positivo de triagem, é importante confirmar os resultados por meio de um segundo método, distinto do anterior. Os testes de triagem comuns incluem o teste com tiras reativas colorimétrico qualitativo/semiquantitativo, bem como o teste baseado no método da precipitação (ver a Tab. 27.5).

Resultados acurados são obtidos utilizando-se tiras reativas somente quando a concentração de albumina está aumentada. Em razão da falta de sensibilidade da tira reativa às globulinas, pode ser necessário utilizar o método da precipitação ácida para fins de triagem. Isso irá depender da população de pacientes analisada e das doenças que estão sendo pesquisadas na triagem. As tiras reativas proporcionam a vantagem de evitar reações falso-positivas com iodetos orgânicos, como aqueles utilizados como contrastes para exames de raios X, tolbutamidas ou outros compostos.

A maioria dos demais métodos de triagem qualitativos baseia-se na precipitação de proteínas (p. ex., com calor e ácido acético, com ácido nítrico e com ácidos sulfossalicílico [SSA] e tricloroacético). Esses métodos precipitam tanto as globulinas quanto a albumina. Na prática, a negatividade para tiras reativas com positividade para metodologia de SSA das amostras de urina são atribuíveis à coloração para exame de raios X, às penicilinas e apenas raramente a um aumento isolado dos níveis de globulinas. O SSA e o ácido tricloroacético são utilizados para precipitar proteínas a frio e também como métodos de triagem convenientes. A sensibilidade permite detectar concentrações de até 0,25 mg/dL, dependendo da técnica adotada.

Tabela 27.5 Teste de triagem para detecção de proteinúria

Constituintes ou condição da urina	Tira reativa	Precipitação ácida
Urina alcalina altamente tamponada	Pode causar FP	Pode causar FN
Metabólitos de fármacos	Sem efeito	Pode causar FP
Contraste radiográfico	Sem efeito	Pode causar FP
Turbidez	Sem efeito	Pode causar FP
Grupos de amônio quarternário ou clorexidina	Pode causar FP	Sem efeito

FP = falso-positivo; FN = falso-negativo.

Tiras reativas. Este método tira vantagem do erro proteína-relacionado dos indicadores de pH. Como as proteínas possuem carga em pH fisiológico, sua presença modifica o pH. A tira reativa é impregnada com azul de tetrabromofenol tamponado a um pH ácido de valor igual 3, ou com tetracolorofenol-tetrabromossulfoftaleína. Na ausência de proteínas, a tira exibe cor amarela. Decorridos 30 a 60 segundos da aplicação da amostra de urina, observa-se o desenvolvimento de várias nuances verdes, dependendo do tipo e da concentração de proteínas presentes na amostra. Os resultados podem ser lidos, em um sistema "extra", como negativos, traços e de intensidade 1+ a 4+. A maioria dos métodos irá detectar entre 5 e 20 mg de albumina/dL.

Como já mencionado, as tiras reativas tendem a ser mais sensíveis à albumina do que às globulinas, à proteína de Bence Jones ou às mucoproteínas. Os resultados que indicam "traços" podem ser obtidos diante da excreção fisiológica normal de proteínas em amostra de urina concentrada provenientes de indivíduos sadios. Níveis altos de sais geram resultados com leituras menores. Amostras de urina excepcionalmente alcalinas e/ou altamente tamponadas podem produzir resultados positivos na ausência de proteinúria significativa (p. ex., nos casos de pacientes que utilizam medicamentos alcalinos ou apresentam contaminação bacteriana). Resultados falsamente positivos podem ser produzidos em presença de compostos de amônio quarternário, amidoaminas que entram na composição de amaciantes de roupas, cloro-hexidina e com a lavagem excessiva em tampão ácido pela umidificação exagerada das tiras de teste. O método não é afetado pela turbidez da amostra, pelos meios radiológicos nem pela maioria das dos fármacos e seus metabólitos.

Método do ácido sulfossalicílico – qualitativo. Este método depende da formação de um precipitado para determinação da presença de proteínas.

Procedimento. As amostras devem ser centrifugadas, e o sobrenadante límpido deve ser utilizado. Um volume aproximado de 3 mL de sobrenadante de urina em um tubo de ensaio limpo deve receber um volume equivalente de alíquota de uma solução de SSA a 3%. Para misturar os compostos, o tubo de ensaio deve ser invertido e, em seguida, deixado em repouso por exatamente 10 minutos. Então, o tubo de ensaio deve ser invertido mais duas vezes. Sob a iluminação comum do quarto (sem acender uma lâmpada), observa-se o grau de turbidez e/ou precipitação da mistura, e os resultados são classificados conforme as seguintes características:

Negativo = ausência de turbidez (~ 5 mg/dL ou menos)
Traços = turbidez perceptível (~ 20 mg/dL)
1+ = Turvação distinguível, porém ausência de granulação (~ 50 mg/dL)
2+ = Turbidez com granulação, porém sem floculação (~ 200 mg/dL)
3+ = Turbidez com granulação e floculação (~ 500 mg/dL)

4+ = Acúmulos de proteína precipitada ou precipitado sólido (~1 g/dL ou mais)

Esse método irá detectar concentrações da ordem de 5 a 10 mg/dL. Albumina, globulinas, glicoproteínas e proteínas de Bence Jones são todas detectadas. Altas concentrações de detergentes podem levar a resultados menores. Na presença de corante radiológico, a precipitação de SSA aumenta durante o repouso e é possível observar cristais ao exame microscópico do precipitado. Nessa situação, é preciso testar outra amostra de urina do paciente. Os efeitos do meio radiológico, no entanto, podem permanecer por até 3 dias. O teste com tira reativa pode ser substituído ou pode ser utilizado o método que emprega calor e ácido acético. Nesse método, o meio de contraste é eliminado pela ação do calor, enquanto a detecção de proteínas é intensificada.

Determinações quantitativas de proteínas e métodos confirmatórios. As determinações quantitativas do conteúdo proteico da urina são tipicamente adaptações de um dentre os vários métodos de precipitação, ou são ensaios colorimétricos por natureza. O SSA e o ácido tricloroacético (TCA) são empregados com frequência como agentes precipitantes. A turbidez produzida pode ser quantificada com auxílio de um fotômetro ou nefelômetro. Caso seja realizada uma interpretação visual, é possível utilizar um conjunto de padrões em forma de géis, comercialmente disponível, com concentrações correspondentes a 10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mg/dL. Nesse caso, os resultados são expressos em mg/dL, diferentemente do método "extra" empregado nos testes de precipitação para triagem. Com o SSA, a turbidez produzida com albumina é 2,4 vezes maior do que aquela produzida com globulina, e polipeptídeos, glicoproteínas e proteínas de Bence Jones também são precipitadas por esse método. Historicamente, o reagente de Exton contém ácido sulfossalicílico, sulfato de sódio e indicador azul de bromofenol. O TCA, por outro lado, faz as γ-globulinas precipitarem com maior turbidez do que a albumina, embora a diferença observada não seja marcante.

Existem métodos quantitativos mais adequados à quantidade menores de proteínas. Nesses métodos, um precipitado de TCA é dissolvido em hidróxido de sódio e quantificado pela reação com biureto. O método quantitativo do TCA-biureto é cansativo, porém apresenta uma boa precisão. Utiliza-se um blank para correção da cor. Lizana et al. (1977) comparam os métodos do biureto com o método da turbidez pelo SSA.

Existem diversos métodos colorimétricos de fixação de corantes para quantificação da concentração de proteínas na urina. Entre esses, estão os métodos de azul de Coomassie, Ponceau S e o da turbidez com cloreto de benzetônio (McElderry, 1982). O molibdato de pirogalol vermelho também reage com proteínas para formar um complexo de cor púrpura-azulada que absorve luz a 600 nm.

Os métodos utilizados para quantificar proteínas urinárias são considerados insatisfatórios. Os participantes dos testes de proficiência do College of American Pathologists (CAP) devem ser alertados sobre a variação de aproximadamente duas vezes das médias entre os métodos, com o método do SSA produzindo valores altos. O grau de precisão é fraco, e o método turbidimétrico do SSA apresenta o coeficiente de variação mais precário. Os métodos de turbidez de TCA-biureto, azul de Coomassie e TCA apresentam maior concordância e um coeficiente de variação equivalente à metade do coeficiente de variação associado ao método do SSA. Os problemas decorrem da falta de padronização dos métodos. No que se refere aos métodos de turbidez, a falta de padronização reflete-se no uso de concentrações de ácido e intervalos de tempo diferentes, assim como na variação do padrão de proteína.

Métodos para determinação da microalbuminúria. Concentrações muito pequenas de proteínas, como albumina e β_2-microglobulina, são quantificadas por métodos imunológicos com utilização de anticorpos direcionados às proteínas, métodos nefelométricos ou RIA. O teste com tiras reativas Micra II (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) é um sistema de teste imunológico que faz determinações semiquantitativas quase imediatas de pequenas concentrações urinárias de albumina (Kutter, 1998). A oxitetraciclina pode causar interferências nesse método, o que faz as leituras serem altas. O pH não produz interferências. O Clinitek Microalbumin (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) é um método mais moderno, que envolve a ligação a corantes e possui alta sensibilidade. Esse método também traz como vantagem um teste adicional com adesivo para quantificação simultânea da concentração de creatinina. A especificidade desse método pela albumina não é absoluta, uma vez que o corante também reage com a mucoproteína de Tamm-Horsfall.

Métodos para determinação da proteinúria de Bence Jones. O melhor método para detecção da proteína de Bence Jones na urina é a eletroforese de proteínas. O procedimento tradicional de eletroforese emprega o corante negro de amida e uma amostra de urina concentrada 200 vezes. Métodos mais modernos, que utilizam amostras de urina menos concentradas, incluindo uma modificação da coloração por azul de Coomassie brilhante, apresentam sensibilidade e especificidade comparáveis (Wong, 1997). A presença da globulina de Bence Jones ou a produção clonal de imunoglobulinas são indicadas pelo aparecimento de único pico pontiagudo na região correspondente à globulina da eletroforese de proteínas. A globulina de Bence Jones representa as cadeias leves κ ou λ das imunoglobulinas.

A proteína de Bence Jones precipita a temperaturas entre 40 e 60°C, e é redissolvida a aproximadamente 100°C. Outros métodos dependem da precipitação da proteína a frio com sais, sulfato de amônio e ácidos. Diante de uma intensa proteinúria de Bence Jones, a maioria dos métodos produz resultados positivos. Quando há apenas uma pequena quantidade dessa proteína ou se outras globulinas estiverem presentes, os resultados obtidos podem ser duvidosos. Reações falso-positivas são observadas quando outras globulinas precipitam por ação do ácido acético no método da precipitação pelo calor. Pode ocorrer uma reação falso-negativa caso a proteína de Bence Jones esteja demasiadamente concentrada e a fervura não redissolva o precipitado.

Glicose e outros açúcares na urina

Vários açúcares podem ser encontrados na urina sob certas circunstâncias, sejam patológicas ou fisiológicas. Esses açúcares são glicose, frutose, galactose, maltose, pentose e sacarose. A glicose, discutida a seguir, é sem dúvida o açúcar mais comum.

Glicose

A presença de quantidades detectáveis de glicose na urina é denominada glicosúria. Essa condição ocorre sempre que os níveis de glicose no sangue excedem a capacidade de reabsorção dos túbulos renais. A presença de glicose na urina ocorre diante de diferentes níveis sanguíneos do açúcar, e não só em casos de hiperglicemia concomitante. O fluxo sanguíneo glomerular, a taxa de reabsorção tubular e o fluxo urinário também influenciam no seu aparecimento. Havendo hiperglicemia, contudo, a glicosúria costuma ocorrer diante de níveis sanguíneos acima de 180 a 200 mg/dL. A glicosúria pode ser observada nas várias condições distintas descritas a seguir.

Diabetes melito. Embora a hiperglicemia isolada não seja necessariamente indicativa de diabetes melito, o aparecimento de glicose na urina precisa ser investigado. Quando o paciente apresenta glicosúria, esta é tipicamente acompanhada de poliúria e sede. A utilização inadequada dos carboidratos pelo organismo desses pacientes resulta na elevação dos níveis de cetona no sangue e na urina, em razão do aumento do metabolismo lipídico.

No caso dos indivíduos diabéticos, o método que utiliza amostras de urina em vez de sangue para detectar glicose traz como vantagens a ausência de dor e o baixo custo. A quantificação de glicose na urina é mais útil para indivíduos com diabetes bem controlada, que não precisam ajustar com frequência a insulina e os agentes hipoglicêmicos. No diabetes insulino-dependente, um resultado negativo de quantificação de açúcar na urina pode corresponder a uma ampla faixa de níveis séricos de glicose que, por sua vez, pode ser atribuída à grande variação do limiar renal apresentada pelos pacientes com diabetes. Sendo assim, as determinações realizadas com amostras de urina podem conduzir ao erro e, por esse motivo, é preferível que o paciente monitore em casa os próprios níveis sanguíneos de glicose.

O monitoramento da glicosúria em paciente diabéticos não está livre de problemas. Pode ser difícil interpretar as tiras reativas diante de níveis de glicose de 1 g/dL (1%) e 2 g/dL (2%), de modo que pode ser mais eficaz adotar testes de redução de cobre ou testes mais modernos, bem como usar tiras reativas mais sensíveis. Com o método do comprimido Clinitest, pacientes com diabetes podem estimar níveis de substâncias redutoras presentes na urina de até 10 g/dL, utilizando apenas uma gota

de amostra em vez de 2 a 5. Em algumas clínicas, a quantificação de glicose na urina de 24 horas é considerada útil para o monitoramento dos pacientes. Esse método representa um intervalo de tempo maior e, aliado à determinação dos níveis sanguíneos de hemoglobina glicada, contribui para a supervisão geral e prolongada da doença.

Vários estudos concentraram-se na utilidade do exame de urina com vareta medidora de nível para determinação da glicosúria como método de triagem para o diabetes, e os resultados obtidos foram mistos. Bullimore & Keyworth (1997) voltaram-se para o acompanhamento de pacientes com mais de 50 anos de idade, no cenário da prática geral, e constataram que esse método é pratico e efetivo. Friderichsen & Maunsbach (1997) chegaram a uma conclusão oposta. Esses pesquisadores sugeriram que, se a triagem do diabetes é realizada na prática geral, a quantificação da glicose no sangue deve ser realizada nos casos de pacientes que pertencem aos grupos de risco aumentado para diabetes gestacional. A análise de rotina da glicose com vareta medidora de nível pode identificar mulheres grávidas com risco aumentado de desenvolver diabetes gestacional (Gribble, 1995).

Outras causas de glicosúria. A glicosúria com hiperglicemia concomitante é observada em vários distúrbios endócrinos (ver Tab. 16.3), que incluem distúrbios envolvendo a pituitária e a suprarrenal, tais como acromegalia, síndrome de Cushing, hiperadrenocorticismo, tumores funcionais de células pancreáticas α ou β, hipertireoidismo e feocromocitoma. A doença pancreática com perda de células das ilhotas funcionais também está associada à glicosúria – exemplificando, carcinoma, pancreatite e fibrose cística.

Inúmeras outras causas de glicosúria com hiperglicemia foram identificadas. Entre estas, distúrbios afetando o sistema nervoso central (SNC), incluindo tumores ou hemorragia, doença hipotalâmica e asfixia. Distúrbios metabólicos associados a queimaduras, infecções, fraturas, infarto do miocárdio e uremia, bem como doença hepática, doenças do armazenamento de glicogênio, obesidade e alimentação após o jejum, podem estar associados à glicosúria. O mesmo ocorre com certos fármacos (p. ex., tiazidas, corticosteroides e hormônio adenocorticotrófico [ACTH], e pílulas anticoncepcionais).

Na gravidez, há um aumento da taxa de filtração glomerular, e toda a glicose filtrada pode não ser reabsorvida. Nessa situação, a glicosúria pode aparecer diante de níveis sanguíneos de glicose relativamente baixos. É preciso investigar a glicosúria persistente ou as concentrações urinárias de glicose maiores do que apenas traços. Em alguns pacientes, o diabetes ocorre somente durante a gravidez. A tolerância à glicose também pode diminuir com o avanço da idade, em especial nos pacientes com ingestão deficiente de carboidratos, contudo nem sempre é acompanhada de glicosúria.

A glicosúria sem hiperglicemia usualmente está associada à disfunção tubular renal. A glicosúria renal hereditária é incomum e está associada à redução da reabsorção da glicose. Nas doenças do transporte tubular renal, a glicosúria pode ser acompanhada do comprometimento da reabsorção de água, aminoácidos, bicarbonato, fosfato e sódio, segundo um padrão observado na síndrome de Fanconi. Galactosemia, cistinose, envenenamento por chumbo e mieloma são outros exemplos de condições associadas à disfunção tubular renal e à possível glicosúria.

Outros açúcares na urina

Pequenas quantidades de dissacarídeos são normalmente excretadas na urina – cerca de 50 mg em 24 horas. Nas doenças intestinais, como o espru severo ou a enterite aguda, a concentração de dissacarídeos pode subir para 250 mg ou mais. Frutose, galactose, lactose, maltose e L-xilose são encontradas na urina de pacientes com distúrbios metabólicos hereditários (Scriver, 1989). Diante da suspeita de um distúrbio herdado, é possível identificar o açúcar por cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography*, TLC). Os testes qualitativos confirmatórios em geral são insatisfatórios quando se trata de açúcares.

Frutose. A frutose aparece na urina associada a deficiências enzimáticas hereditárias que causam frutosúria essencial benigna e uma séria intolerância à frutose, associada a vômitos severos e doença renal e hepática. A frutosúria também pode ocorrer diante de alimentação parenteral que inclua frutose. A frutose urinária pode ser igualmente utilizada como marcador da ingestão de sacarose em estudos de intervenção dietética (Luceri, 1996).

Galactose. A galactose é encontrada na urina de indivíduos que apresentam distúrbios genéticos envolvendo seu metabolismo, associados à deficiência da enzima galactose-1-fosfato uridil transferase ou galactoquinase. Nesses indivíduos, a galactose proveniente da lactose da dieta não é convertida em glicose, e a detecção precoce do distúrbio seguida da restrição dietética pode controlar a doença.

Lactose. A lactose pode aparecer na urina nos estágios finais da gestação normal ou durante a lactação. Na intolerância à lactose, níveis elevados de açúcares se acumulam no intestino, enquanto a lactose é absorvida e excretada pela urina sem sofrer modificações.

Pentose. A pentosúria pode acompanhar a ingestão de grandes quantidades de frutas, causando a excreção de L-xilulose e L-arabinose em concentrações de até 0,1 g/dia. Essa condição também pode ser observada na terapia com certos fármacos e na pentosúria essencial benigna.

Sacarose. A sacarose pode aparecer na urina após a ingestão de quantidades extremamente grandes desse tipo de açúcar. A deficiência de sacarose está associada à ocorrência de doenças intestinais, como espru, do mesmo modo que na deficiência de lactase. A intolerância à sacarose é um distúrbio hereditário que está associado às deficiências de sacarose e α-dextrinase (isomaltase). Os sintomas são semelhantes àqueles observados na deficiência de lactase e aparecem nas primeiras semanas de vida, quando o bebê ingere alimentos adoçados. É possível que a tolerância se desenvolva, contudo a sacarose pode ser permanentemente evitada. A sucrosúria artificial pode levar à produção de uma urina com alta gravidade específica que é negativa nos testes de detecção de glicose oxidase e redução de cobre.

Métodos

Tiras reativas. Baseia-se no método específico da peroxidase e glicose oxidase, em que há uma dupla reação sequencial. As tiras reativas diferem apenas quanto ao cromógeno utilizado. O método é específico para a glicose, portanto não reage com lactose, galactose, frutose nem metabólitos da redução de fármacos. As tiras reativas podem ser utilizadas para obtenção de resultados semiquantitativos, e os resultados devem ser expressos em g/dL aproximadas. O uso combinado de tiras reativas para glicose e cetona não só permite detectar cetonúria, mas também auxilia na detecção da supressão da reação de glicose por ação das cetonas, que ocorre em algumas tiras reativas.

Leituras falso-positivas podem ser produzidas por ação de agentes fortemente oxidantes às vezes presentes no frasco de coleta de urina. A baixa gravidade específica pode provocar a falsa elevação dos resultados. O fluoreto de sódio utilizado como conservante pode levar à obtenção de leituras falso-negativas, assim como fazem a alta gravidade específica e o ácido ascórbico, ocasionalmente. As enzimas glicolíticas oriundas de células e bactérias reduzem os níveis de glicose urinários durante o repouso. É necessário que as amostras sejam prontamente mantidas sob refrigeração ou testadas.

Bioquímica.

$$\text{Glicose} + O_2 \xrightarrow{\text{glicose oxidase}} \text{ácido glicônico} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{cromógeno} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{cromógeno oxidado} + H_2O$$

Entre os cromógenos utilizados em alguns testes comuns com vareta medidora de nível, estão:

Clinistix – cromógeno à base de o-toluidina. A cor muda do rosa para o púrpura. Essa formulação detecta concentrações de glicose de 100 mg/dL e, comparada às demais, é mais sensível à ação de substâncias interferentes, como ácido ascórbico.

Multistix – cromógeno à base de iodeto de potássio. A cor muda do azul para o castanho aos 30 segundos.

Chemstrip – cromógeno à base de aminopropil-carbazol. A cor muda do amarelo para o castanho-alaranjado aos 60 segundos.

Testes de redução de cobre. Como teste de triagem, o método da glicose oxidase não irá detectar o aumento dos níveis de galactose nem de quaisquer outros açúcares presentes na urina. Sendo assim, é importante utilizar o método da redução de cobre, em especial nos casos que envolvem pacientes pediátricos. Esse método é capaz de detectar quantidades suficientes de quaisquer substâncias redutoras presentes na urina, incluindo os açúcares redutores, como lactose, frutose, galactose, maltose e pentoses. Nas situações em que o método do cobre é positivo e o método da glicose oxidase é negativo, exclui-se a possibilidade de glicosúria. No

entanto, antes de investigar outros açúcares, é preciso avaliar os achados clínicos e a história farmacológica do paciente. Embora o método da redução de cobre detecte outros açúcares diferentes da glicose, o rendimento é extremamente baixo nesses casos.

Recém-nascidos normais, durante os primeiros 10 a 14 dias de vida, podem produzir uma urina que apresenta reação positiva em decorrência da presença de glicose, galactose, frutose e lactose. Mulheres normais grávidas ou no período pós-parto também podem apresentar reação positiva em razão da presença de lactose.

Entre os métodos de redução de cobre utilizados para fins de triagem, o método qualitativo de Benedict é mais sensível para detecção de substâncias redutoras na urina do que o método de redução de cobre de um comprimido (Clinitest). Muitas substâncias encontradas na urina, metabólitos ou metabólitos relacionados a certos fármacos influenciam os métodos de avaliação de açúcares urinários (Tab. 27.6). Substâncias fortemente redutoras, como ácido ascórbico, ácido gentísico ou ácido homogentísico, podem inibir o método enzimático e, ao mesmo tempo, contribuir para a positividade do método de redução de cobre. O método do comprimido não é tão afetado quanto o método de Benedict. Doses muito altas de ácido ascórbico não afetam o método de redução do cobre de duas gotas. Compostos químicos conduzem a resultados falso-positivos ou provocam o aparecimento de cores não usuais no Clinitest, em especial as cefalosporinas e os meios radiológicos. Embora altas doses de ácido ascórbico não afetem o Clinitest de duas gotas para açúcares (i. e., não provocam o aparecimento de resultados falso-positivos), o método da glicose oxidase pode apresentar retardo no desenvolvimento da dor.

Bioquímica. Em cada comprimido do Clinitest são incorporados sulfato de cobre, hidróxido de sódio, carbonato de sódio e ácido cítrico. O sulfato de cobre reage com substâncias redutoras presentes na urina, convertendo o sulfato cúprico em óxido cuproso. Com base na reação de Benedict de redução do cobre:

$$Cu^{2+} \xrightarrow{\text{solução alcalina quente}} Cu^{+}$$

$$Cu^{+} + OH^{-} \longrightarrow CuOH \text{ (amarelo)}$$

$$2CuOH \xrightarrow{\text{calor}} Cu_2O \text{ (vermelho)} + H_2O$$

O calor é produzido pela reação do hidróxido de sódio com a água e o ácido cítrico.

Procedimento. Os comprimidos reativos do Clinitest detectam concentrações de substâncias redutoras da ordem de 250 mg/dL de urina. Ambos os métodos Clinitest, de cinco e duas gotas, podem ser utilizados, e há gráficos de cor correspondentes disponíveis (Belmonte, 1967). O método de duas gotas foi desenvolvido em resposta ao conhecido fenômeno de passagem, que pode ocorrer se uma concentração de açúcares acima de 2 g/dL estiver presente na urina. Nesse fenômeno de passagem, após a adição do comprimido Clinitest, a solução resultante apresenta uma variação de cores que abrange todo o espectro colorido e depois retorna à cor escura castanho-esverdeada. Essa cor final não é comparável a nenhuma seção do gráfico de cores. Por outro lado, aproxima-se mais de um resultado significativamente menor. É importante observar toda a reação e também por 15 segundos após a finalização da fervura no interior do tubo, a fim de detectar uma possível reversão a uma cor diferente e, assim, evitar comunicar um resultado falsamente baixo.

Método de cinco gotas. Cinco gotas de urina são transferidas a um tubo de ensaio seco e, em seguida, 10 gotas de água são adicionadas. O comprimido Clinitest deve ser adicionado à mistura, tomando-se o cuidado de não tocar no tubo – pois este contém um álcali forte. A mistura deve ser observada durante a fervura, mas não se deve agitar nem tocar a parte inferior do tubo que estará quente. Terminada a fervura, aguardam-se 15 segundos para, em seguida, agitar o tubo com cuidado e comparar imediatamente a cor da solução com a escala de cores. Os resultados correspondem às seguintes concentrações aproximadas: negativo; 0,25 g/dL; 0,5 g/dL; 0,75 g/dL; 1 g/dL; 2 g/dL; passagem. É importante observar a solução com cuidado durante a fervura. Se a cor dessa solução mudar de alaranjada para uma tonalidade escura de castanho-esverdeado, significa que a concentração de açúcar presente na amostra é superior a 2 g/dL. Esse valor deve ser registrado como > 2 g/dL, sem referência à escala de cores. Amostras de urina que apresentem efeito de passagem devem ser submetidas novamente ao teste pelo método de duas gotas.

Tabela 27.6 Reações de substâncias no teste de glicosúria

Constituinte	Tira reativa para glicose oxidase	Teste com comprimido de redução do cobre
Glicose	Positivo	Positivo
Outros açúcares		
Frutose	Sem efeito	Positivo
Galactose		
Lactose		
Maltose		
Pentose		
Sacrose		
Cetona (grandes quantidades)	Pode enfraquecer a cor	Sem efeito
Creatina	Sem efeito	Pode causar falso-positivo
Ácido úrico		
Ácido homogentísico (alcaptonúria)	Sem efeito	Positivo
Fármacos*		
Ácido ascórbico (grandes quantidades)	Pode retardar a cor	Positivo (traços)
Cefalosporinas (Keflin), etc.	Sem efeito	Positivo, cor marrom
L-dopa (grande)	Falso-negativo	Sem efeito
Glicoronídeo do ácido nalidíxico	Sem efeito	Positivo
Probenecida	Sem efeito	Positivo
Pirídio	A cor alaranjada pode afetar o resultado	
Salicilatos (grande)	Pode diminuir a leitura	Sem efeito
Corante de raios X (diatrizoatos)	Sem efeito	Cor negra
Contaminantes		
Peróxido de hidrogênio	Falso-positivo	Pode inibir teste positivo
Hipoclorito (alvejante)	Falso-positivo	
Fluoreto de sódio	Falso-negativo	Sem efeito

* Outros fármacos implicados na redução do cobre são aminoácidos, caronamida, cloral, clorofórmio, cloranfenicol, formaldeído, ácido hipúrico, isoniazida, tiazidas, oxitetraciclina, ácido *p*-aminossalicílico, penicilina, fenóis, estreptomicina, fenotiazina e sulfonamidas.

Dados de Caraway (1962), Wirth (1965), Young (1975).

Método de duas gotas. Duas gotas de urina são transferidas a um tubo de ensaio seco e, em seguida, 10 gotas de água são adicionadas. O comprimido Clinitest deve ser adicionado à mistura, que deve ser observada durante a fervura, mas não deve ser agitada. Terminada a fervura, aguardam-se 15 segundos para, em seguida, agitar o tubo com cuidado e comparar imediatamente a cor da solução com a escala de cores fornecida para o método de duas gotas. O fenômeno de passagem também pode ocorrer com esse método, diante de altas concentrações de açúcar (> 5 g/dL). Os resultados devem ser expressos em 1 g/dL; 2 g/dL; 3 g/dL; 5 g/dL; e, caso haja fenômeno de passagem, > 5 g/dL. As amostras que apresentarem resultados negativos ou baixas concentrações de açúcar devem ser testadas pelo método das cinco gotas.

Precauções. Observe as precauções constadas na literatura que acompanha os comprimidos Clinitest. A garrafa deve ser sempre mantida hermeticamente fechada, para prevenir a absorção de umidade, e protegida contra a exposição direta ao calor e à luz solar, em um ambiente refrigerado e seco. Os comprimidos normalmente possuem cor branca com manchas azuladas. Se não forem armazenados adequadamente, absorverão umidade ou sofrerão deterioração pela ação do calor, e sua cor se tornará azul-escura ou castanho. Nesse estado, os comprimidos não geram resultados confiáveis. Esses reagentes também são disponibilizados embrulhados em papel-alumínio, o qual ajuda a evitar a absorção de umidade. Embora resulte em um custo maior, essa embalagem de alumínio é útil quando se realiza um número limitado de determinações.

Testes adicionais para açúcares. Conforme mencionado anteriormente, o método de redução do cobre detecta a maioria dos açúcares diferentes da glicose que podem estar presentes na urina, à parte da sacarose, que não é um açúcar redutor. No entanto, esse método não diferencia entre si os açúcares que detecta e, portanto, necessita da realização de testes adicionais mais complicados. Os testes confirmatórios adicionais são discutidos a seguir.

Frutose. A frutose é identificada por TLC. O teste do resorcinol, uma medida qualitativa, é útil. A frutose também reduz o reagente de Benedict a baixas temperaturas.

Galactose. A TLC é utilizada para identificar a galactose na urina. Entretanto, sempre que há suspeita, a doença costuma ser identificada pelo ensaio da enzima eritrocitária.

Lactose. A lactose é identificada por TLC ou pelo teste qualitativo de lactose, como descrito a seguir.

Procedimento. Quinze mL de urina são transferidos para um tubo de ensaio, e são adicionados 3 g de acetato de chumbo. A mistura é agitada e filtrada, e o filtrado é fervido. Em seguida, são adicionados 2 mL de NH_4OH concentrado, e a mistura é novamente fervida. A lactose presente na amostra provocará a formação de uma solução vermelha (da cor de tijolo) e, em seguida, de um precipitado vermelho com sobrenadante límpido.

Pentose. A concentrações de 250 a 300 mg/dL, a L-xilose reduz o reagente qualitativo de Benedict a 50°C (banho-maria) em 10 minutos, ou à temperatura ambiente em várias horas. As pentoses geralmente são identificadas por TLC.

Sacarose. A sacarose fermenta leveduras e pode ser isolada por cromatografia, porém precisa ser corada com uma substância que independa de propriedades redutoras.

Cetonas na urina

Sempre que há um defeito envolvendo o metabolismo ou a absorção de carboidratos, ou diante de uma dieta com quantidade inadequada de carboidratos, o organismo tenta compensar metabolizando quantidades maiores de ácidos graxos. Quando esse aumento é significativo, corpos cetônicos (produtos do metabolismo lipídico incompleto) começam a aparecer no sangue e, consequentemente, são excretados pela urina. Na cetonúria, os três tipos de corpos cetônicos encontrados na urina são ácido acetoacético (diacético) (20%), acetona (2%) e 3-hidroxibutirato (cerca de 78%). A acetona é formada de modo irreversível a partir do ácido acetoacético. O ácido β-hidroxibutírico (3-hidroxibutirato) forma-se de modo reversível a partir do ácido acetoacético.

$$\text{Ácido acetoacético} \xrightarrow{-CO_2} \text{acetona}$$

$$\text{Ácido acetoacético} \underset{-2H}{\overset{+2H}{\rightleftharpoons}} \text{3-hidroxibutirato}$$

Dependendo dos métodos utilizados, a concentração total de corpos cetônicos (como a acetona) pode variar entre 17 e 42 mg/dL. De acordo com Killander (1962), uma concentração de ácido acetoacético de até 2 mg/dL é considerada normal. A cetonemia e a cetonúria são comumente observadas no diabetes melito descompensado, bem como nas diversas condições discutidas a seguir.

Cetonúria diabética

A cetonúria implica a presença de cetoacidose (cetose) e pode sinalizar um aviso de coma iminente. Uma concentração de ácido acetoacético de até 50 mg/dL pode ser detectada sem que haja evidências clínicas de cetose. Pacientes com diabetes tipo 1 são mais propensos a episódios de cetose, muitas vezes associados a infecções, estresse ou outros problemas relativos à supervisão. Enquanto grandes quantidades de cetonas e glicose são encontradas na urina de pacientes com cetoacidose por diabetes, a cetonúria não é observada no coma hiperglicêmico hiperosmolar que por vezes ocorre no diabetes tipo 2.

Cetonúria não diabética

Em bebês e crianças, é comum haver cetonúria em diversas condições, como doenças febris agudas e estados de intoxicação acompanhados de vômito e diarreia. Deve ser levantada a suspeita de doença metabólica hereditária diante de uma cetose neonatal persistente severa. Pode haver cetonúria na hiperêmese da gravidez, na caquexia e após a anestesia. Nesses casos, é provável que a cetonúria esteja relacionada ao catabolismo tecidual (principalmente adiposo), que encontra-se aumentado em face da limitada ingestão alimentar. Na gravidez, uma paciente normal apresenta baixos níveis de glicose no sangue e cetonúria suave. Ocasionalmente, a cetonúria é observada após a exposição ao frio ou a prática vigorosa de exercícios, ou ainda diante do consumo de dietas para redução de peso com baixo teor de carboidratos.

Acidose lática

A acidose lática pode coexistir com diversas condições, incluindo choque, diabetes melito, insuficiência renal, doença hepática e infecções, bem como ocorrer na resposta a certos fármacos, especialmente fenformina e envenenamento por salicilato. Os níveis de acetoacetato e 3-hidroxibutirato podem estar elevados, ainda que os níveis de butirato usualmente sejam altos e os de acetoacetato, baixos. Nessas circunstâncias, é possível que a cetonúria não seja detectada pelo teste de nitroprussiato habitual.

Métodos

Como a acetona, o ácido acetoacético e o 3-hidroxibutirato são encontrados na urina de indivíduos com cetonúria, os métodos que indicam a presença de qualquer um desses três corpos cetônicos em geral são satisfatórios para a detecção dessa condição. Comumente utilizados, os testes com comprimido e tira de nitroprussiato baseados no método de Rothera detectam ácido acetoacético e acetona. Métodos distintos quantificam o ácido acetoacético isolado ou com a acetona. O cloreto férrico (teste de Gerhardt) detecta ácido acético. Esses métodos não quantificam 3-hidroxibutirato, que é o corpo cetônico predominante.

Em amostras de urina e plasma, os comprimidos e tiras reativas reagem com ácido acetoacético a uma concentração de 10 mg/dL, sendo menos sensíveis à acetona. Os níveis sanguíneos de corpos cetônicos podem ser estimados por meio do teste de detecção de cetona urinária com vareta medidora de nível realizado na cabeceira do paciente. Esse teste é especialmente útil para determinar o grau de severidade da cetose no tratamento da acidose diabética.

Quando o paciente está sob acompanhamento com determinações qualitativas de acetona e ácido acetoacético, relatos repetidos de elevações acentuadas não refletem a mudança que realmente está ocorrendo no organismo. Nessa situação, é possível obter resultados semiquantitativos tanto com o teste de tira reativa quanto pelo teste com comprimido de Rothera, por meio da realização de várias determinações mediante a diluição de cada amostra.

Pode haver problemas com resultados falso-negativos, uma vez que os reagentes são instáveis e as cetonas são lábeis. A ação bacteriana irá acarretar a perda do ácido acetoacético, seja *in vitro* ou *in vivo*. A acetona é perdida à temperatura ambiente, a menos que seja mantida em um frasco bem fechado, na geladeira. As amostras refrigeradas devem ser trazidas à temperatura ambiente para a realização dos testes. A adição de conservantes não evita o decaimento das cetonas. Se os resultados forem inesperados, é preciso utilizar reagentes frescos, checando-os previamente contra controles positivos e negativos conhecidos.

Tira reativa. Esse método baseia-se na reatividade do nitroprussiato (nitroferrocianeto de sódio) pelas cetonas. Existem várias formulações disponíveis. Tiras reativas sem álcalis reagem ao ácido acetoacético, e não à acetona. Diante da obtenção de resultados intensos (3+), a urina pode ser diluída e novamente quantificada, sendo relatado um resultado "moderado" e o devido fator de diluição.

As tiras reativas Chemtrip contêm ácido nitroferrocianeto e glicina, os quais reagem com o ácido acetoacético e a acetona em meio alcalino, produzindo uma cor violeta. Um resultado positivo é indicado pela mudança da cor bege para a cor violeta, cuja leitura deve ser feita em 60 segundos. Esse método detecta cerca de 10 mg/dL de ácido acetoacético e 70 mg/dL de acetona, com grau de sensibilidade e reação da tira reativa similares àqueles do teste com comprimido (Acetest), descrito a seguir.

O Multistix contém tampões e nitroferrocianeto de sódio, os quais reagem com ácido acetoacético e produzem uma cor castanho-rosa em 15 segundos. A área reativa detecta entre 5 e 10 mg de ácido acetoacético/dL de urina. Não há reação com a acetona.

As tiras reativas apresentam uma correlação moderadamente boa com o acetoacetato quantitativo plasmático e uma correlação fraca com os níveis sanguíneos de cetonas totais. As reações de cor (falso-positivas) são observadas após o uso de ftaleínas (corantes BSP ou PSP) ou diante de concentrações extremamente altas de fenilcetonas e em presença do conservante 8-hidroxiquinolina ou de metabólitos da L-dopa. A acetilcisteína (aerossol) produz uma cor vermelha intensa. Os fármacos anti-hipertensivos metildopa e captopril geram resultados positivos. A perda da reatividade dos reagentes acarreta a produção de resultados falso-negativos.

Teste do nitroprussiato. Um método de teste que utilize comprimido pode ser útil nos casos em que a urina apresentar uma coloração capaz de causar interferência. Tais comprimidos são bastante sensíveis à umidade e sofrem deterioração se não forem adequadamente armazenados. O comprimido do Acetest contém nitroprussiato de sódio, glicina e um tampão fortemente alcalino. Pode ser utilizado na análise de amostras de sangue total, plasma, soro ou urina.

Em amostras de urina, o Acetest detecta uma concentração de ácido acetoacético de 5 a 10 mg/dL e uma concentração de acetona de 20 a 25 mg/dL. Assim como as tiras reativas, o comprimido não reage com 3-hidroxibutirato. Resultados positivos são produzidos em presença de L-dopa e de grandes quantidades de fenilcetonas, bem como em presença dos corantes BSP e PSP, que reagem com as bases contidas nos comprimidos.

Procedimento. O comprimido deve ser colocado sobre uma superfície limpa, de preferência em um pedaço de papel branco. Aplique sobre o comprimido uma gota de urina, soro, plasma ou sangue total. Para exames de urina, compare a cor do comprimido com a cartela de cores aos 30 segundos. Na análise de amostras de soro ou plasma, compare a cor do comprimido com a cartela de cores aos 2 minutos. Para medidas em amostra de sangue total, remova o sangue coagulado do comprimido e compare a cor dele com a cartela de cores 10 minutos após a aplicação da amostra.

Se houver acetona e ácido acetoacético na amostra, o comprimido exibirá uma cor que varia de lavanda a púrpura-escuro. Os resultados devem ser relatados como negativos, fracos, moderados ou intensos. Caso sejam intensos, a amostra pode ser diluída. Essas análises devem ser relatadas da seguinte forma: "intensa" não diluída; "intensa" com diluição 1:2; "moderada" com diluição 1:4; e assim por diante.

Outros testes para cetonas. O teste de cloreto férrico de Gerhardt foi empregado durante muitos anos para quantificação do ácido acetoacético. No entanto, os métodos com cloreto férrico são pouco específicos e apresentam baixa sensibilidade (cerca de 25 – 50 mg/dL). Esse método fornece resultados positivos para amostras que contêm salicilato e L-dopa. O teste em tubo de ensaio com nitroprussiato pelo método de Rothera é sensível ao ácido acetoacético (cerca de 1 – 5 mg/dL) e à acetona (com uma sensibilidade de 10 – 25 mg/dL).

Sangue, hemoglobina, hemossiderina e mioglobulina na urina

A presença de um número anormal de células sanguíneas na urina é denominada hematúria, enquanto o termo hemoglobinúria designa a presença de hemoglobina livre em solução na urina. A hematúria é relativamente comum, a hemoglobinúria é incomum e a mioglobinúria é rara.

Hematúria

Embora a hematúria microscópica assintomática possa ser detectada pelo teste com vareta medidora de nível em até 16% das populações submetidas à triagem (Rockall, 1997), em muitas doenças sérias envolvendo o trato urinário há liberação de hemácias na urina. Uma investigação retrospectiva da hematúria microscópica por biópsia renal revela diversos achados histopatológicos, tais como nefropatia membranácea, nefropatia de IgA, glomerulonefrite mesangioproliferativa não IgA, glomerulosclerose focal e anormalidades glomerulares discretas. Mais de 15% dos pacientes estudados mostraram histologia normal (McGregor, 1998). A hematúria também pode ocorrer em certas doenças (tanto neoplásicas quanto não neoplásicas) ou em traumas que afetam qualquer região dos rins ou do trato urinário, bem como em casos de distúrbios de sangramento e uso de anticoagulantes e ainda uso de outros fármacos, como a ciclofosfamida. Foi descrito um caso raro de arterite de células gigantes em que há manifestação de febre e hematúria (Govil, 1998). A hematúria também pode ser observada em indivíduos sadios que praticam exercícios físicos em excesso (maratonistas), nos quais o sangramento tem início a partir da mucosa da bexiga urinária.

Em virtude da importância diagnóstica de pequenas quantidades de hematúria e dada a tendência dos eritrócitos de sofrerem lise na urina, o teste de triagem para detecção de hemoglobina atua como adjuvante útil do exame microscópico do sedimento. De fato, alguns estudos sugerem que a triagem com teste de tiras reativas para detecção de hemoglobina pode ser mais sensível do que a microscopia de urina na detecção da hematúria (Ooi, 1998). Entretanto, há um problema comum relacionado a esse método: a inibição da tira reativa de hemoglobina por ação de substâncias interferentes, frequentemente o ácido ascórbico. Esse problema enfatiza a necessidade do exame microscópico de rotina para a triagem dos casos de hematúria. Um resultado positivo no teste para detecção de hemoglobina acompanhado de um sedimento urinário normal sugere que uma amostra de urina fresca deve ser examinada quanto à presença de eritrócitos, uma vez que o pH alcalino ou uma gravidade específica de urina abaixo de 1,010 podem causar a lise dessas células.

Hemoglobinúria

Qualquer causa de hemólise é também uma potencial causa de hemoglobinúria. No entanto, a presença de hemoglobinúria indica a ocorrência de um processo intravascular de hemólise significativo, em oposição a uma hemólise extravascular. A hemoglobina se liga à haptoglobina plasmática, enquanto a hemoglobina livre atravessa o glomérulo na forma de dímeros $\alpha\beta$ (PM = 32.000), uma vez que sua capacidade de ligação está saturada. Uma parte da hemoglobina é reabsorvida pelas células tubulares proximais, enquanto o restante é excretado.

A hemoglobinúria pode seguir-se à prática vigorosa de exercícios, em que há trauma direto a pequenos vasos sanguíneos. Muitas outras causas de lise eritrocitária aguda estão resumidas na Tabela 27.7. O plasma adquire uma tonalidade rósea diante de concentrações de hemoglobina de aproximadamente 50 mg/dL, e em casos de hemólise acentuada, os níveis plasmáticos podem chegar a 1 g/dL. Os níveis plasmáticos de hemoglobina aumentam com mais frequência nas anemias hemolíticas adquiridas severas do que nas anemias hemolíticas hereditárias. Entretanto, níveis moderadamente altos são observados na anemia falciforme e nas talassemias homozigotas. É preciso notar que a presença de hemoglobinas instáveis pode levar à produção de uma urina com pigmentos marrons. Acredita-se que esse fenômeno deva-se à dipirrola ou à bilifuscina, e não há reação com a tira reativa no teste para detecção de heme. A Tabela 27.8 contém uma comparação da urina esperada com os achados que mostram uma hemólise de grau moderado ou severo.

Hemossiderina na urina

A hemoglobina livre é prontamente filtrada pelos glomérulos e pode, mais adiante, ser reabsorvida pelas células tubulares renais, nas quais é catabolisada em ferritina e hemossiderina. A hemossiderina será detectada entre 2 e 3 dias após a ocorrência do episódio hemolítico agudo que causou a hemoglobinúria. Nesse momento, o método da tira reativa para detecção de hemoglobina costuma ser negativo. Entretanto, é possível detectar a hemossiderina sob a forma de grânulos castanho-amarelados livres ou nas células epiteliais e ocasionalmente em cilindros (Fig. 27.1). A hemossiderina também aparece no sedimento urinário em certas doenças, como na siderose verdadeira do parênquima renal (hemocromatose). Embora a existência de hemossidenúria aponte um estado hemolítico crônico, sua presença raramente é necessária para estabelecer o diagnóstico de hemólise. Outros testes, como os de quantificação dos níveis de bilirrubina sérica, lactato desidrogenase e haptoglobina, em geral indicam o diagnóstico correto.

Em razão da presença intermitente de hemossidenúria, os níveis de ferro urinário podem ser quantificados para estabelecer a ocorrência de um processo intravascular de hemólise crônica. A excreção urinária normal de ferro é de cerca de 0,1 mg/dia, porém aumenta diante da hemocromatose e em associação com o traumatismo de eritrócitos por válvulas cardíacas protéticas. Os níveis urinários de ferro mantêm-se normais na anemia perniciosa e na esferocitose hereditária.

Tabela 27.7 Algumas causas de hemólise e hemoglobinúria

Trauma eritrocitário	Prótese de válvulas cardíacas (em especial na aorta) Reparo do óstio primário com placa causando turbulência Queimaduras extensas Exercício vigoroso Marcha Trauma severo que afeta músculos ou outros tecidos vasculares
Organismos	Malária *Bartonella* Toxina de *Clostridium welchii* Picada de aranha marrom reclusa
Deficiências de enzimas eritrocitárias	Indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato nas seguintes situações: exposição a fármacos oxidantes (acetanilida, sulfametoxazol, nitrofurantoína), antimaláricos (primaquina etc.), feijão de fava (*Vicia fava*) em grupos suscetíveis, com acidose diabética e com infecções
Doenças da hemoglobina instável	Diante da exposição a fármacos oxidantes
Imunomediada (ver Caps. 31 e 35)	Síndrome urêmica hemolítica Púrpura trombocitopênica trombótica Transfusões sanguíneas incompatíveis Anticorpos reativos ao calor (autoimune – transiente após infecções, induzido por fármacos) Anticorpos reativos ao frio: IgM – viral, anti-i micoplasma anti-I IgG – paroxística, Donath-Landsteiner anti-P Sensibilidade da membrana, mediada por complemento (hemoglobinúria paroxística noturna) Fármacos Que atuam como haptenos (penicilinas) Complexo imune (quinidina, fenacetina) α-metildopa
Indivíduos normais	Hemólise oxidativa devida ao uso de fármacos, doses elevadas ou exposição ao naftaleno (naftalina), algumas sulfonamidas, sulfonas, nitrofurantoína

Tabela 27.8 Achados na urina e no plasma diante da hemólise intravascular

Teste	Hemólise moderada	Hemólise marcante
Urina		
Bilirrubina (conjugada)	Ausente	Ausente
Urobilinogênio	Normal ou elevada	Elevada
Hemoglobina	Ausente	Presente
Hemossiderina	Ausente	Presente (tardia)
Plasma		
Bilirrubina (conjugada)	Elevada	Elevada
Haptoglobina	Diminuída	Ausente
Hemoglobina	Elevada	Elevada (marcante)

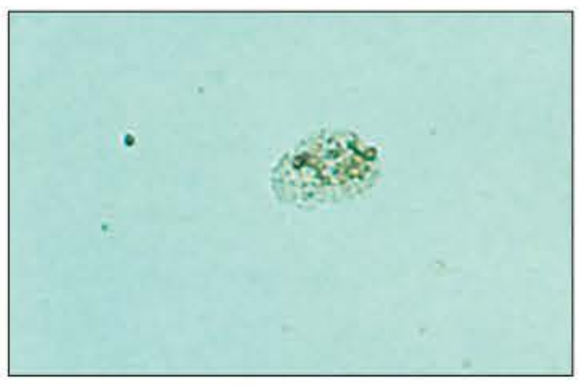


Figura 27.1 Célula epitelial tubular renal (não corada) com pigmento marrom de ferro (× 260).

Mioglobinúria

Nos casos em que há destruição aguda de fibras musculares (rabdomiólise), como no trauma, a mioglobina é liberada, rapidamente eliminada do sangue e excretada pela urina sob a forma de pigmento castanho-avermelhado. A mioglobina livre, um monômero com peso molecular igual a 17.000, é rapidamente excretada. O complexo hemoglobina-haptoglobina, por outro lado, é removido de forma mais lenta. A mioglobinúria tem sido observada após a prática de alguns exercícios extenuantes, como maratonismo e caratê. Outras condições menos comuns associadas à mioglobinúria persistente ou recorrente são a dermatomiosite (Rose, 1996), defeitos de fosfofrutoquinase muscular e deficiências de adenosina monofosfato deaminase (Bruno, 1998) e proteína mitocondrial trifuncional (Miyajima, 1997).

O diagnóstico da rabdomiólise e da mioglobinúria costuma ser feito a partir da história do paciente e de outros achados laboratoriais, conforme descrito a seguir. Na situação típica, o paciente apresenta sensibilidade muscular ou câimbras e produz urina com pigmentação castanho-avermelhada 1 a 2 dias após a prática de exercícios físicos. O exame de urina com tira reativa para detecção de hemoglobina resulta fortemente positivo, sendo encontradas proteínas e um pequeno número de hemácias na amostra. O soro é límpido e apresenta níveis acentuadamente altos de creatina quinase (CK), aldolase e níveis normais de haptoglobina. A creatinina sérica pode estar aumentada. A urina em geral se torna límpida em 2 ou 3 dias, e os níveis séricos de CK declinam. As determinações séricas e a história do paciente ajudam a distinguir a mioglobinúria da hemoglobinúria.

Ao exame de urina, pode ser difícil diferenciar entre hematúria, hemoglobinúria e mioglobinúria. Em todos os casos, a urina pode apresentar uma coloração escura que varia do vermelho ao castanho, e alguns eritrócitos são observados no sedimento (em grau bem maior diante da hematúria). O teste com tira reativa para detecção de sangue também é positivo em todas essas condições. Ao ser examinado, o soro com frequência apresenta tonalidade rosa e hemoglobinemia, porém sua cor se mantém normal nos casos de mioglobinemia, uma vez que o pigmento é eliminado muito rapidamente. Também é possível realizar quantificações acuradas dos níveis urinários de mioglobina por meio de imunoensaio. Embora possa haver alguma interferência discreta da hemoglobina, trata-se de um modo excelente para detectar e quantificar a presença de mioglobinúria (Loun, 1996). Na Tabela 27.9, há uma comparação entre hemoglobinúria, mioglobinúria e hematúria.

Métodos

Tira reativa para detecção de compostos heme (hemoglobina, mioglobina). Este método baseia-se na liberação do oxigênio a partir do peróxido na tira reativa por ação da atividade peroxidase-símile do heme sobre a hemoglobina livre, os eritrócitos lisados ou a mioglobina. Os eritrócitos intactos são lisados na tira e, em consequência,

Tabela 27.9 Diferenciação entre hematúria, hemoglobinúria e mioglobinúria

Condição	Achados no plasma	Achados na urina
Hematúria	Cor – normal	Cor – normal, turva, rosa, vermelha, marrom Eritrócitos – muitos Renal – cilindros de eritrócitos Proteína – aumento marcante TUI – ausência de cilindros Proteína – presente ou ausente
Hemoglobinúria	Cor – rosa (início) Haptoglobina – baixa	Cor – rosa, vermelha, marrom Eritrócitos – ocasionais Cilindros pigmentados – ocasionais Proteína – presente ou ausente Hemossiderina – tardia
Mioglobinúria	Cor – normal Haptoglobina – normal Creatina quinase – aumento acentuado Aldolase – aumentada	Cor – vermelha, marrom Eritrócitos – ocasionais Cilindros densos e marrons – ocasionais Proteína – presente ou ausente

fazem a hemoglobina reagir. Desse modo, é preciso testar uma amostra de urina bem homogeneizada, pois há possibilidade de não detectar a presença de eritrócitos intactos caso seja utilizado somente o sobrenadante da urina. A área reativa é impregnada com uma mistura tamponada de peróxido orgânico e cromógeno tetrametilbenzidina.

$$H_2O_2 + \text{cromógeno} \xrightarrow{\text{atividade de peroxidase do heme}} \text{cromógeno oxidado (mudança de cor)} + H_2O$$

O heme catalisa a oxidação da tetrametilbenzidina e há produção de uma cor verde. A tira é lida 60 segundos após a aplicação da amostra.

Os testes Multistix e Chemstrip detectam uma concentração urinária de hemoglobina da ordem de 0,05 a 0,3 mg/dL. Note-se que 0,3 mg de hemoglobina/dL equivale à concentração de hemoglobina proveniente da lise de 10 eritrócitos/μL. Cada eritrócito normal contém aproximadamente 30 pg de hemoglobina por célula.

A sensibilidade do teste é menor diante de amostras de urina de alta gravidade específica – que podem não apresentar lise de eritrócitos – e também quando os níveis de proteína estão aumentados. Grandes concentrações de ácido ascórbico podem gerar resultados falso-negativos, assim como a formalina, quando utilizada como conservante de amostras de urina. A presença de grandes quantidades de nitrito irá retardar a reação. Substâncias oxidantes contaminantes, como hipoclorito (alvejante) ou iodo contidos em soluções de limpeza de pele, podem produzir resultados falso-positivos. Associada à infecção do trato urinário, a peroxidase microbiana é uma potencial causa de leituras falso-positivas.

Outros testes para hemoglobina e mioglobina. Os testes qualitativos, de uma forma geral, têm se mostrado insatisfatórios na separação da mioglobina e da hemoglobina, sendo que ambas as condições podem estar presentes após a produção de lesões por esmagamento. A hemoglobina e a mioglobina podem estar ligadas a proteínas na urina, e essa ligação contribui para dificultar sua separação por precipitação em sais ou eletroforese em acetato. O método da precipitação em sais de Blondheim (1958) é descrito a seguir.

Teste qualitativo para mioglobulina.

1. Deve ser utilizada uma amostra de urina fresca. Observe sua cor. A urina do paciente com mioglobinúria, quando fresca, tem como característica a coloração avermelhada e torna-se castanha ao ser deixada em repouso. No entanto, é possível que haja certa concentração de mioglobina sem haver alteração de cor. A mioglobina é menos estável em pH ácido. A amostra deve ser neutralizada e mantida sob refrigeração enquanto se aguarda a realização do teste.
2. Para o teste de detecção de proteínas, 1 mL de urina é misturado a 3 mL de ácido sufossalicílico a 3%. Se o pigmento precipitar, significa que é uma proteína. A mistura deve ser filtrada em seguida. Se o filtrado obtido apresentar cor normal, significa que a amostra não contém nenhum pigmento não proteico anormal. (Nota: o teste de calor e ácido acético não precipita a mioglobina nem a hemoglobina.)
3. Em um tubo de ensaio com 5 mL de urina, são adicionados 2,8 g de sulfato de amônio, que é dissolvido por homogeinização. A amostra de urina, então, torna-se saturada em 80% com sulfato de amônio, que é uma condição ótima à precipitação da hemoglobina. Em seguida, a mistura deve ser filtrada ou centrifugada. Se o sobrenadante apresentar cor normal, significa que o pigmento precipitado é hemoglobina. Caso o líquido sobrenadante seja colorido, trata-se de uma evidência presumível de mioglobina.

Esse teste de precipitação foi substituído em grande parte por imunoensaios específicos para mioglobina.

O uso da eletroforese capilar tem sido bem-sucedido na separação da hemoglobina urinária da mioglobina, com base nas diferenças de mobilidade eletroforética (Shihabi, 1995).

Detecção de hemossiderina na urina. A reação com azul da Prússia é empregada para demonstrar o ferro contido na hemossiderina (Fig. 27.2). Um esfregaço seco e uma preparação a fresco alternativa são descritos a seguir.

Procedimento a seco. Quando corada pelo reagente azul da Prússia, a hemossiderina é visualizada como grânulos azuis, medindo entre 1 e 3 μm, isolados ou agrupados, nas células tubulares epiteliais renais, como sedimento amorfo ou como grânulos azuis em cilindros. Uma coloração para ferro também é convenientemente utilizada na detecção de siderócitos no sangue ou na medula óssea. A coleta da urina é feita em um frasco de vidro isento de ferro, de um dia a outro. A amostra coletada deve ser deixada em repouso por 2 horas. Depois da decantação de 3/4 da amostra, o restante é centrifugado. Com o sedimento, prepara(m)-se o(s) esfregaço(s) que é(são) deixado(s) secar ao ar. (Nota: toda a vidraria utilizada, lâminas, lamínulas etc. devem ser isentas de ferro. A água deve ser desmineralizada.)

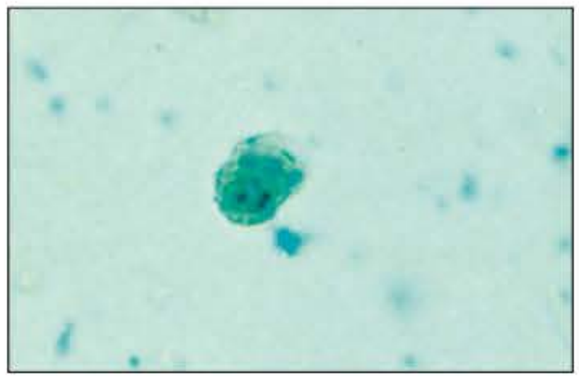


Figura 27.2 Célula epitelial tubular renal positiva para hemossiderina, corada com azul da Prússia (× 260).

Reagentes. O reativo azul da Prússia deve ser preparado no momento do uso (fresco).

Coloração com azul da Prússia: HCl concentrado é adicionado a uma alíquota de solução de ferrocianeto de potássio (20% em água desmineralizada), até a formação de um precipitado branco que permanece estável à agitação. Em seguida, a mistura é filtrada em papel de filtro nº 5.

Contracorante de trabalho: 1 mL de corante safranina O (0,5 g em 100 mL de água destilada) é diluído a 50 mL com tampão fosfato (pH entre 6,4 e 4,7).

Procedimento

1. Fixar o esfregaço com álcool metílico por 10 minutos.
2. Lavar com água isenta de ferro (desmineralizada) e secar ao ar.
3. Corar com reagente azul da Prússia por 30 minutos.
4. Lavar delicadamente com água isenta de ferro por 4 minutos, e deixar secar ao ar.
5. Contracorar com safranina O por 1 a 5 minutos.
6. Lavar com água isenta de ferro. Secar ao ar.
7. Montar a lamínula.

Procedimento a fresco

1. Uma amostra inteira de urina matinal ou de urina coletada ao acaso deve ser centrifugada por 5 minutos. Deve ser feito um agrupamento de sedimentos, e várias gotas de sedimento devem ser observadas ao microscópio, para detecção de grânulos castanho-amarelados grosseiros, em especial nas células epiteliais tubulares renais ou nos cilindros.
2. Se esses grânulos forem observados, o restante do sedimento deve ser ressuspendido em uma mistura fresca com 5 mL de uma solução de ferrocianeto de potássio a 2% e 5 mL de HCl a 1%, seguido de repouso por 10 minutos.
3. Em seguida, a mistura deve ser centrifugada e o sobrenadante, descartado. O sedimento deve ser examinado microscopicamente. Grânulos grosseiros de hemossiderina aparecem em azul nas células, nos cilindros e no material amorfo nas preparações por esse método. Caso os grânulos não sejam corados, repita o exame após 30 minutos (às vezes, a reação é retardada).

Bilirrubina na urina

A bilirrubina é um produto da quebra da hemoglobina que se forma nas células reticulares endoteliais do baço, do fígado e da medula óssea. Inicialmente, é transportada no sangue acoplada à albumina. Essa bilirrubina não conjugada (ou bilirrubina indireta) é insolúvel em água e, portanto, incapaz de atravessar a barreira glomerular dos rins. A bilirrubina não conjugada é transportada para o fígado, no qual é conjugada ao ácido glicurônico para formar bilirrubina glicuronida. Essa forma conjugada da bilirrubina (bilirrubina direta) é hidrossolúvel e consegue transpor o glomérulo nos rins, indo parar na urina. A bilirrubina conjugada normalmente é excretada na bile dentro do duodeno, e a urina normal de um indivíduo adulto contém apenas 0,02 mg de bilirrubina/dL. Essa pequena concentração não é

detectada pelos métodos de teste usuais. A excreção da bilirrubina é intensificada pela alcalose.

O aparecimento de bilirrubina conjugada na urina em geral indica sua presença em excesso na circulação sanguínea. Isso ocorre em casos de (1) obstrução do fluxo biliar proveniente do fígado (intra ou extra-hepático), ou de (2) doença hepatocelular, com resultante incapacidade dos hepatócitos de excretar suficientemente a bilirrubina conjugada na bile. Exemplificando, pode haver bilirrubinemia quando a pressão intracanalicular eleva-se de forma secundária a inflamação periportal, fibrose ou inchaço de hepatócitos. A presença de cálculos biliares no ducto biliar comum ou a existência de carcinoma da cabeça do pâncreas são possíveis fontes de obstrução biliar extra-hepática que leva à bilirrubinúria. Esta, por sua vez, é observada com frequência na hepatite viral aguda ou na colestase induzida por fármacos antes do aparecimento de icterícia, e tipicamente acompanha a icterícia da hepatite alcoólica aguda. Em indivíduos expostos a toxinas ou fármacos hepatotóxicos, um resultado positivo no teste para detecção de bilirrubinúria pode constituir indicação inicial de colestase ou lesão hepática. Nas hiperbilirrubinemias congênitas, a bilirrubina aprece na urina de indivíduos com doença de tipos Dubin-Johnson e Rotor, mas está ausente naqueles com doença de Gilbert ou doença de Crigler-Najjar.

A bilirrubinúria está associada à produção de uma urina cuja cor varia de castanho-amarelada a castanho-esverdeada e que pode apresentar um espuma amarela. Nessa condição, também se observa elevação dos níveis séricos de bilirrubina (conjugada), icterícia e produção de fezes de cor pálida. Essas fezes são denominadas alcoólicas em virtude da ausência de pigmentos derivados da bilirrubina. Um resultado positivo de teste para detecção de bilirrubina urinária acompanhado de um resultado negativo de teste para detecção de urobilinogênio na urina indicam a existência de uma obstrução biliar intra ou extra-hepática. Esse teste é valioso para estabelecer o diagnóstico diferencial da icterícia, uma vez que a bilirrubinemia está ausente na icterícia hemolítica. A Tabela 27.10 resume os achados típicos de urina e fezes associados à icterícia de diversas etiologias.

Métodos

Tira reativa. O teste baseia-se na reação de acoplamento da bilirrubina a um sal de diazônio em meio ácido. Quando esse método é utilizado, a urina normal contém concentrações indetectáveis de bilirrubina. Testes específicos diferem quanto ao sal de diazônio empregado. O Multistix usa 2,4-dicloroanilina diazotada como sal diazo, cuja cor muda do amarelo-creme ao amarelo-queimado após 20 segundos. Esse sistema irá detectar na urina uma concentração de 0,8 mg/dL. Entretanto, pode ser difícil ler a mudança de cor. O Chemstrip usa 2,6-diclorobenzeno-diazônio tetrafluoroborato, e sua cor muda de rosa para violeta entre 30 e 60 segundos. Esse teste detecta na urina concentrações da ordem de 0,5 mg/dL.

A amostra de urina deve ser fresca, pois a bilirrubina glicuronida nela contida é rapidamente hidrolisada em sua forma livre e menos reativa. A oxidação da bilirrubina em amostras colhidas há muito tempo e que permaneceram em repouso nesse período, especialmente se ficaram expostas à luz, acarretará a geração de resultados falso-negativos. Grandes quantidades de ácido ascórbico e nitrito também podem levar à obtenção de resultados com níveis mais baixos de bilirrubina. Metabólitos de certos fármacos, como a fenazopiridina (Piridínio), conferem uma cor avermelhada diante do baixo pH da tira reativa e mascaram o resultado do teste. A rifampina e grandes quantidades de metabólitos da clorpromazina podem gerar resultados falso-positivos, enquanto os salicilatos não causam interferência. O urobilinogênio não afeta o resultado.

Testes confirmatórios para bilirrubina. É comum utilizar o método do teste diazo, em que a bilirrubina é acoplada ao p-nitrobenzeno diazônio p-tolueno sulfonato para dar origem a uma cor azul ou púrpura (na forma de comprimido ou tira reativa). O teste com tira reativa é bem menos reativo à bilirrubina livre do que o teste com comprimido, de modo que uma diferença de resultados torna-se mais aparente à medida que a urina envelhece. Outro teste emprega um reagente à base de cloreto férrico que oxida a bilirrubina à biliverdina verde. O método do comprimido diazo é descrito a seguir.

Método do comprimido diazo. Os comprimidos contêm p-nitrobenzeno diazônio p-tolueno, bem como ácido sulfossalicílico e bicarbonato de sódio. Essas duas últimas substâncias fornecem um meio ácido para a reação e uma mistura efervescente que garantirá a solução de uma parte do comprimido quando a água for adicionada. (O kit Ictotest, que inclui tecidos absorventes e comprimidos reagentes, é comercializado pela Bayer Corporation, Tarrytown, NY.)

Nota: os comprimidos reagentes são higroscópicos e devem ser, portanto, protegidos contra a hidratação ou a alta umidade. São fornecidos em um frasco marrom, visto que a exposição direta e prolongada à luz intensa resulta na decomposição do composto diazônio estabilizado. A exposição prolongada durante várias semanas a uma temperatura de 37,8°C (100°F) ou superior também acarreta a deterioração dos comprimidos. Uma cor castanho-desbotada indica que esses comprimidos estão deteriorados. Cada vez que o frasco for aberto, é necessário checar se os comprimidos apresentam reação positiva ou negativa.

Procedimento

1. 10 gotas de amostra são aplicadas no tecido de asbesto-celulose fornecido com o kit. Caso esteja presente, a bilirrubina será adsorvida na superfície do tecido.
2. Um comprimido reagente deve ser colocado sobre a área umedecida do tecido.
3. Em seguida, uma gota de água é aplicada sobre o comprimido. Após 5 segundos, uma segunda gota é aplicada, de modo que a água escape do comprimido e caia sobre o tecido. Se houver bilirrubina na amostra, ela se acoplará ao p-nitrobenzeno diazônio p-tolueno sulfonato contido no comprido, e a reação será indicada pela formação de uma cor que varia do azul ao púrpura dentro de 30 segundos. É necessário mover o comprimido para revelar a cor púrpura. O aparecimento das cores rosa ou vermelho indica um teste com resultado negativo.

O teste diazo reage positivamente com a bilirrubina em quantidades da ordem de 0,05 a 0,1 mg/dL. Não há reação com aparecimento de cor púrpura envolvendo a urobilina ou outros pigmentos, embora níveis elevados de urobilina ou indicana resultam no aparecimento da cor vermelha. Os compostos azo induzem uma cor atípica (p. ex., piridínio). A rifampina também pode causar interferências. Os metabólitos da clorpromazina, quando em alta concentração, induzem o aparecimento de uma cor púrpura. Os metabólitos dos fármacos anti-inflamatórios ácido mefenâmico e ácido flufenâmico geram resultados falso-positivos.

Método do comprimido com lavagem. Quando há suspeita de reações falso-positivas (p. ex., com a clorpromazina), o contaminante pode ser diluído com água no tecido.

Procedimento. São preparados tecidos em duplicata e 10 gotas de urina são aplicadas em cada um deles. Em um dos tecidos, são adicionadas 10 gotas de água. Em seguida, um comprimido é colocado sobre cada tecido e 2 gotas de água são aplicadas sobre cada comprimido. Se estiver presente, a bilirrubina será adsorvida nas fibras do tecido e aparecerá do mesmo modo em ambos os tecidos. A presença de uma substância interferente resulta na produção de uma cor clara ou na ausência de cor no tecido com água extra.

Tabela 27.10 Achados na urina e nas fezes diante da icterícia

Achado	Normal	Obstrução do fluxo biliar	Hemólise, anemia hemolítica	Dano hepático, hepatite, colestase
Bilirrubina urinária	Ausente	Aumentada, urina escura	Ausente	Inicialmente aumentada
Urobilinogênio urinário	Presente	Neoplasma – baixo ou ausente; cálculos biliares – variável	Aumentada	Inicialmente diminuído; aumentado na fase tardia
Cor fecal	Escura	Pálida; intermitente, com cálculos biliares no ducto biliar comum; persistente, com neoplasma no ducto ou pâncreas	Escura	Inicialmente pálida; escura na fase tardia; pálida na colestase

Urobilinogênio na urina

A bilirrubina conjugada proveniente do fígado eventualmente alcança o duodeno, complexada a colesterol, sais biliares e fosfolipídeos contidos na bile. A bilirrubina conjugada não é absorvida a partir do intestino delgado, mas atravessa-o e chega ao interior do cólon, no qual as bactérias residentes hidrolisam o conjugado. A bilirrubina livre é, então, reduzida a urobilinogênio, mesobilirrubinogênio e estercobilinogênio. Até 50% do urobilinogênio é reabsorvido na circulação porta e re-excretado na bile, sob a forma não conjugada. A vasta maioria do urobilinogênio remanescente é excretada pelas fezes como urobilinas ou estercobilina colorida, as quais são formadas após a remoção adicional do hidrogênio. Uma pequena quantidade é excretada pela urina.

O urobilinogênio representa um grupo de compostos tetrapirrol intimamente relacionados e, como na verdade é uma mistura de substâncias que se quantifica, o termo "unidades" é frequentemente preferido à terminologia mg/dL, mais precisa. Essas medidas são grosseiramente equivalentes. O débito normal de urobilinogênio na urina pode ser de 0,5 a 2,5 mg ou unidades/24 horas. Essas substâncias são incolores e lábeis, ao contrário das urobilinas, que são produtos de oxidação do urobilinogênio que conferem a cor amarelo-alaranjada à urina normal. O débito de urobilinogênio está aumentado na urina alcalina e diminuído na urina ácida.

Sempre que o fígado é incapaz de remover eficientemente o urobilinogênio reabsorvido a partir da circulação porta, uma quantidade de urobilinogênio acima do normal é desviada para os rins e, assim, excretada pela urina. Esse fenômeno pode ocorrer em caso de lesão hepatocelular decorrente de hepatite viral, fármacos ou substâncias tóxicas, ou em alguns casos de cirrose. Na insuficiência cardíaca congestiva, a congestão hepática previne o processamento efetivo do urobilinogênio, e a reexcreção na bile fica comprometida. Se houver infecção, como na colangite associada à obstrução, grandes quantidades de urobilinogênio são eliminadas com a bilirrubina por meio da urina.

Em contraposição, o excesso de urobilinogênio na urina aliado à ausência de bilirrubina está tipicamente associado à ocorrência de hemólise. Essa condição pode ser observada após uma lise eritrocitária aguda, como também na destruição dos precursores eritrocitários na medula óssea de indivíduos com anemia megaloblástica. Há também um aumento dos níveis de urobilinogênio acompanhado de sangramento nos tecidos e subsequente formação excessiva de bilirrubina. Esses pacientes ictéricos produzem fezes escuras em razão do excesso de urobilinogênio eliminado com elas. Havendo febre, o urobilinogênio urinário pode estar aumentado, associado a um quadro de desidratação e produção de urina concentrada.

A ausência persistente de urobilinogênio urinário ocorre diante da completa obstrução do fluxo biliar no intestino e é acompanhada da produção de fezes pálidas. Os antibióticos de amplo espectro, que suprimem a flora intestinal normal, podem prevenir a conversão da bilirrubina em urobilinogênio e, assim, reduzir sua excreção pelas fezes e urina.

O pigmento marrom mesobilifuscina é um dipirrol que normalmente contribui para a cor das fezes e da urina. Não apresenta reação nos testes para detecção de sangue ou bilirrubina. Embora não seja derivado da bilirrubina, como é o caso do urobilinogênio, é provavelmente um subproduto da síntese do heme. Seu excesso causa a produção de uma urina castanho-escura que pode ser observada na β-talassemia homozigota ou sempre que houver formação dos corpúsculos de Heinz nos eritrócitos (p. ex., diante de hemoglobinas instáveis).

Métodos

Tira reativa. O teste baseia-se tanto na reação do aldeído de Ehrlich quanto na formação de corante azo vermelho a partir de um composto diazônio.

O Multistix utiliza o primeiro método. Sua área de teste é impregnada com uma solução tampão ácida e p-dimetilaminobenzaldeído, que produz uma cor castanho-avermelhada com o urobilinogênio. A cor pode variar do amarelo-claro até nuances de castanho-avermelhado, e valores da ordem de 0,2 a 1 mg/dL são considerados normais. A metodologia desse teste é inespecífica para detecção do urobilinogênio e detectará substâncias que sabidamente reagem com o reagente de Ehrlich, tais como porfobilinogênio, metabólitos do ácido p-aminossalicílico, sulfonamidas, procaína, ácido 5-hidroxi-indolacético, indol e metildopa (Aldomet). Não é um método confiável para detecção de porfobilinogênio.

O Chemstrip para detecção de urobilinogênio possui uma área de teste que é impregnada com 4-metoxibenzeno-diazônio-tetrafluoroborato, que se acopla ao urobilinogênio em meio ácido para formar um corante azo azul. Os resultados são lidos em 10 a 30 segundos, e o teste é capaz de detectar aproximadamente 0,4 mg/dL. Esse teste é específico para o urobilinogênio, diferindo das metodologias baseadas no reagente de Ehrlich.

Uma amostra de urina recém-produzida é a melhor para uso nos testes, uma vez que o urobilinogênio é bastante lábil e potencialmente forma urobilina não reativa na urina ácida. Ambas as tiras reativas são afetadas por metabólitos de certos fármacos, como a fenazopiridina (Piridínio), que confere à urina uma cor vermelho-alaranjada em meio ácido, além de outros compostos, como Azo-Gantrisina. Essas interferências podem mascarar a reação com o urobilinogênio ou gerar resultados falso-positivos. A bilirrubina e o sangue usualmente não afetam o teste, contudo a bilirrubina às vezes produz uma cor esverdeada.

Outros testes para urobilinogênio e porfobilinogênio. Os testes qualitativos para urobilinogênio e porfobilinogênio podem ser realizados quando os testes com tiras reativas indicarem a presença na urina de mais de 1 mg/dL de substância reagindo com reagente de Ehrlich (ver na seção sobre Porfirinas mais informações sobre essas modalidades de teste).

Os testes quantitativos para detecção de urobilinogênio na urina raramente são realizados. Consulte na edição de 1979 deste livro a descrição do método quantitativo para urobilinogênio de 2 horas, bem como dos métodos de Davidsohn (1974) ou Schwartz (1944) para quantificações de 24 horas. Para fins de comparação quantitativa de amostras de um mesmo paciente, utiliza-se um teste de 2 horas com amostra de urina coletada entre as 14 e as 16 h, após o almoço. Esse período, após a refeição, coincide com a excreção aumentada do urobilinogênio, visto que o pH da urina encontra-se mais próximo da neutralidade. Outros períodos de 2 horas também podem ser testados para fins de comparação.

Testes indiretos para detecção de infecção no trato urinário

Não raro, infecções significativas envolvendo o trato urinário podem estar presentes em pacientes que não apresentam nenhuma sintomatologia típica. Uma vez que essas infecções podem causar sério dano renal, caso permaneçam sem tratamento, muitos médicos consideram prudente solicitar testes para detecção de bacteinúria em indivíduos sob alto risco. Entre estes, estão os pacientes idosos, as grávidas, os diabéticos e aqueles com história prévia de infecções do trato urinário. As duas modalidades de teste mais utilizadas para avaliação indireta da bacteinúria e da leucocitúria são a tira reativa de nitrito e a esterase leucocitária, respectivamente. Esses testes serão discutidos a seguir. Um teste de tiras reativas imunocromatográfico para quantificação dos níveis urinários de lactoferrina também pode se mostrar útil para o diagnóstico rápido de infecção do trato urinário (Arao, 1999). A urinálise microscópica serve de teste confirmatório rápido para a presença de leucócitos e bactéria, enquanto a cultura bacteriológica continua sendo o padrão-ouro para detecção de bacteinúria.

Nitrito

Muitas bactérias que são patógenos do trato urinário são capazes de reduzir nitrato em nitrito e, assim, gerar resultados positivos no teste de detecção de nitrito na urina quando presente em número significativo ($> 10^5$–10^6/mL de urina oriunda da bexiga urinária). Entre os organismos mais comuns, estão a *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus* e espécies de *Pseudomonas*. O *Enterococcus* é incapaz de reduzir nitrato em nitrito. Se o teste de detecção de nitrito for positivo, deve ser considerada a realização de uma cultura, desde que a amostra tenha sido adequadamente coletada e armazenada antes da execução do teste. A melhor amostra é a primeira urina da manhã, colhida no jato intermediário.

Segundo Kunin & Degroot (1975), testes de detecção de nitrito repetidamente autoadministrados (três testes) em um pequeno grupo de pacientes revelaram, em geral, cerca de 70% de resultados positivos,

em comparação às culturas. Quando somente *E. coli* estava presente, a bacteinúria detectada por meio de um resultado positivo para teste de detecção de nitrito em qualquer uma das três amostras de urina matinais apresentou uma concordância de 93% com os resultados das culturas. Não houve resultados de nitrito falso-positivos no grupo de testes maior. Outros pesquisadores relataram resultados menos satisfatórios na triagem de nitrito com vareta medidora de nível para detecção de infecções no trato urinário, em particular entre pacientes sob internação hospitalar (Zaman, 1998).

Métodos. O teste depende da conversão do nitrato em nitrito por ação das bactérias presentes na urina. Como é tipicamente necessário haver incubação de um dia a outro (mínimo de 4 horas) na bexiga urinária, para que a população de bactérias infectantes converta o nitrato urinário em nitrito, a primeira urina da manhã é a melhor amostra. Um resultado positivo é indicação para a realização da cultura, a menos que a amostra tenha sido armazenada de forma indevida após a coleta, permitindo o crescimento de bactérias contaminantes.

Tira reativa. A área de teste de nitrito do Multistix é impregnada com ácido p-arsanílico, que forma um sal de diazônio ao reagir com o nitrito presente na urina. Esse composto, então, é capaz de acoplar-se à benzoquinolina para formar um corante azo cor-de-rosa. Esse método detecta nitrito em solução em concentrações da ordem de 0,075 mg/dL, gerando leituras em 40 segundos. O Chemstrip contém uma benzoquinolina e uma sulfanilamida, que produzem um corante azo cor-de-rosa com o nitrito em 30 segundos. É capaz de detectar concentrações de nitrito da ordem de 0,05 mg/dL. Repare que o aparecimento de manchas ou bordas cor-de-rosa é interpretado como resultado negativo.

Resultados falso-negativos são mais frequentes quando se analisa amostras coletadas/armazenadas indevidamente, em razão da presença de contaminantes e da proliferação bacteriana pós-coleta. Resultados falso-positivos também podem ser produzidos por medicamentos, os quais conferem à urina uma cor vermelha ou tornam-se vermelhos em meio ácido (p. ex., fenazopiridina).

Resultados falso-negativos para nitrito podem ser gerados em consequência da presença de ácido ascórbico, urobilinogênio ou baixo pH (< 6). Amostras coletadas ao acaso durante o dia, bem como a urina obtida de pacientes com cateteres de drenagem, não apresentam boa correlação entre teste de detecção de nitrito e bacteinúria significativa, provavelmente por causa do tempo necessário para que ocorra redução química a nitrito na urina da bexiga urinária. Além disso, alguns resultados falso-negativos se devem à ação de certos organismos redutores de nitrato que formam compostos diferentes do nitrito, como amônia, ácido nítrico, hidroxilamina e nitrogênio, gerando, portanto, resultados falso-negativos no teste de detecção de nitrito. A falta de nitrato na dieta também pode levar a resultados falso-negativos, mesmo quando um número significativo de organismos está presente.

Esterase leucocitária

Extratos de grânulos (primários) azurofílicos de neutrófilos humanos contêm até 10 proteínas que mostram atividade esterolítica. Essa atividade de esterase é comumente empregada como marcador para detecção dessas células. Como os neutrófilos e outras células são lábeis na urina, a atividade de esterase leucocitária pode ser indicativa de resquícios de células invisíveis ao microscópio.

A presença de um número significativo de neutrófilos na urina sugere a existência de infecção no trato urinário. Todavia, dificuldades têm sido encontradas na determinação de pontos de *cutoff* adequados para números normais e anormais dessas células. Como as contagens quantitativas são demasiadamente baixas, a precisão é insatisfatória. Resultados positivos para detecção de esterase leucocitária correlacionam-se com números "significativos" de neutrófilos, sejam intactos ou lisados, e também com o número de resultados falso-negativos e falso-positivos que é baixo quando se usa como ponto de cutoff uma contagem em câmara de cerca de 10 neutrófilos/μL de urina fresca. Do mesmo modo, utilizando-se um sedimento urinário concentrado (10:1) em uma preparação citocentrifugada e corada, um resultado negativo de teste com tira reativa apresenta uma associação com menos de 100 neutrófilos em 10 campos de maior aumento (hpf) (450 ×). O teste da esterase leucocitária também pode ser útil no acompanhamento de uma suspeita de uretrite em pacientes do sexo masculino, e possui um alto valor preditivo negativo nesse cenário diagnóstico (Bowden, 1998).

Métodos.

Tira reativa. O princípio do teste é semelhante ao da reação com cloroacetato de naftol utilizada para detecção da esterase de granulócitos na hematologia. As esterases neutrofílicas catalisam a hidrólise de ésteres para produzir seus respectivos álcoois e ácidos. Exemplificando, o Multistix utiliza como substrato o éster de 3-hidroxi-5-fenilpirrol-N-tosil-L-alanina, o qual reage em presença da esterase leucocitária e forma álcool pirrol. Esse álcool, então, reage com um sal de diazônio para produzir uma cor púrpura. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de enzima presente na amostra que, por sua vez, está associada ao número de neutrófilos também presente.

As células originárias do trato urinário (i. e., urotélio) e os eritrócitos não contribuem para os níveis de esterase. A alta gravidade específica da urina e a concentração de proteínas e de glicose são fatores que alteram os resultados do teste, do mesmo modo que o ácido bórico e certos antibióticos, como tetraciclina, cefalexina e cefalotina. O ácido ascórbico inibe essa reação, quando em concentrações muito altas.

A contaminação da amostra de urina com líquido vaginal pode levar à obtenção de resultados positivos, enquanto grandes números de células epiteliais escamosas e bactérias podem ser observados ao exame microscópico. Ainda, Trichomonas e eosinófilos podem representar fontes celulares alternativas de esterases e, assim, gerar resultados falso-positivos. Agentes oxidantes e formalina podem produzir cores que indicam resultados falsamente positivos, enquanto a nitrofurantoína e outras cores fortes podem afetar a interpretação da cor.

Testes de triagem bioquímica diversos

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ocasionalmente pode ser encontrado em grandes concentrações na urina de indivíduos que consomem doses terapêuticas de vitamina C ou outras preparações ricas em ácido ascórbico. Em razão de suas propriedades redutoras, o ácido ascórbico pode inibir várias reações em tiras reativas (i. e., glicose, sangue, bilirrubina, nitrito e esterase leucocitária). As tiras reativas fornecidas pelos vários fabricantes diferem quanto à suscetibilidade a essa substância, tornando necessário investigar os resultados suspeitos. Por exemplo, quando o exame microscópico do sedimento urinário indica a presença de mais de 2 eritrócitos por campo de maior aumento, porém o heme não é detectado pelo método da tira reativa, pode ser útil checar a amostra quanto à presença de ácido ascórbico.

Os testes de urina para detecção de ácido ascórbico também têm sido utilizados como indicação do grau de adequação da terapia com essa substância. Com a dieta ocidental habitual, um indivíduo excreta entre 2 e 10 mg/dL diariamente. Por outro lado, após a ingestão de grandes quantidades de ácido ascórbico, os níveis urinários podem se tornar maiores que 200 mg/dL. O oxalato e o sulfato são metabólitos do ácido ascórbico e, diante da ingestão de grandes quantidades dessa substância (≥ 1 g/dia), pode haver formação de cálculos de oxalato em indivíduos suscetíveis.

Métodos. Diversos fabricantes desenvolveram métodos de tiras reativas para detecção do ácido ascórbico, os quais serão discutidos a seguir. A quantificação por cromatografia a gás/espectometria de massas (CG-EM) é um método quantitativo mais acurado (Deutsch, 1997).

Tiras reativas. A área de teste para ácido ascórbico das tiras reativas do C-Stix é impregnada com fosfomolibdatos tamponados em meio ácido. Os fosfomolibdatos são reduzidos pelo ácido ascórbico a azul de molibdênio, e o teste detecta 5 mg/dL de ácido ascórbico na urina após 10 segundos. O ácido gentísico e a L-dopa podem gerar resultados falso-positivos.

As tiras reativas Stix não são tão sensíveis quanto as do C-Stix, e detectam cerca de 25 mg/dL de ácido ascórbico em 60 segundos. O reagente contido no Stix é o verde de metileno, que é reduzido a sua forma incolor pelo ácido ascórbico. O vermelho neutro fornece uma coloração de fundo, e a cor geral muda de azul para púrpura diante de concentrações da ordem de 150 mg/dL. Esse mesmo método de teste também está incorporado às tiras reativas múltiplas do Multistix. Grandes quantidades de bilirrubina e pH acima de 7,5 são fatores que interferem no desenvolvimento da cor. A presença de uratos, salicilatos, ácido gentísico ou creatinina não está associada à ocorrência de resultados falso-positivos.

Ácido 5-hidroxi-indolacético

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é produzida a partir do triptofano pelas células argentafins do intestino, e é transportada no sangue pelas plaquetas. Tumores carcinoides (argentafinoma) podem produzir quantidades excessivas de serotonina, em especial quando metastáticos. Os sintomas característicos incluem distúrbios intestinais e vasomotores, além de broncoconstrição. Edema, doença cardíaca valvular à direita e sintomas neurológicos também podem estar presentes.

Embora a serotonina urinária possa ser analisada diretamente por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Panholzer, 1999), os testes de triagem que detectam o ácido 5-hidroxi-indolacético – um metabólito da serotonina – em amostras de urina são empregados com mais frequência. O método quantitativo é mais sensível, pois elimina os cetoácidos e o ácido indolacético interferentes. A excreção normal de ácido 5-hidroxi-indolacético em 24 horas é de 1 a 5 mg.

Teste de triagem. Uma amostra de urina coletada ao acaso usualmente é suficiente para fins de triagem. Quando é feita uma cultura de 24 horas, a amostra deve ser acidificada com HCl. O ácido bórico também pode ser utilizado como conservante. Os pacientes devem ser instruídos a não consumir nenhum tipo de fármaco durante um período de 72 horas, antes da realização do teste. As fenotiazinas, fármacos acetanilida e mefenesina (relaxante muscular) causam interferência no teste.

O princípio do teste baseia-se no desenvolvimento de uma cor púrpura que é específica para 5-hidroxi-indóis com ácido nitroso e 1-nitroso-2-naftol. O cloreto de etileno é utilizado na remoção de cromógenos interferentes. O procedimento completo é descrito na edição de 1984 deste livro.

Melanina

Melanócitos normais convertem tirosina em di-hidroxifenilalanina (DOPA), em seguida em dopaquinona e, por meio de etapas oxidativas, em melanina. A enzima tirosina é necessária à primeira etapa de conversão e é encontrada em organelas específicas existentes nos melanócitos, denominadas melanossomas. Sua formação é intensificada pelo hormônio estimulador da melanina. Os melanossomas com pigmento são normalmente transferidos dos melanócitos para as células da pele e das membranas mucosas. Melanossomos com tamanho aumentado são observados em algumas células neoplásicas (p. ex., nevo, melanoma).

À medida que o melanoma maligno produz metástases, aumenta a excreção urinária de metabólitos da melanina, embora seja raro pacientes com essa doença produzirem uma urina de cor escura, mesmo quando amostras são deixadas em repouso por 24 horas, à temperatura ambiente. Esses melanógenos urinários incluem indóis, catecóis e catecolaminas. A DOPA não aparece em grandes quantidades na urina de pacientes com melanoma.

Não há um teste específico para detecção de melanúria. Os testes de triagem para melanina devem utilizar amostras de urina fresca e incluir testes baseados em reações de cor inespecíficas produzidas com cloreto férrico, aldeído reagente de Ehrlich e nitroferricianeto. A edição de 1984 deste livro aborda os procedimentos dos testes com cloreto férrico e nitroferricianeto.

Um método cromatográfico com coluna de troca iônica permite a detecção de metabólitos da melanina na urina. Outra abordagem consiste em quantificar os níveis urinários de DOPA oxidase. A concentração dessa enzima encontra-se aumentada na urina de pacientes com melanoma e aumentada acentuadamente diante de metástases hepáticas.

Em raros casos, células com pigmento melanina são encontradas no sedimento urinário quando há melanúria com captação de pigmento pelas células tubulares renais e nos casos de melanoma metastático para a bexiga. Uma coloração para captação de íons ferrosos pode ser utilizada para colorir de azul-escuro a melanina contida nas células.

Porfirinas

As porfirias são um grupo de doenças que resultam de defeitos na síntese do heme. Trata-se de deficiências enzimáticas herdadas em que o substrato da enzima usualmente é excretado em excesso pela urina e/ou fezes. Durante o ataque porfírico agudo, são excretados altos níveis de porfobilinogênio, contudo, entre os ataques, os níveis de porfobilinogênio podem estar aumentados ou normais. Os padrões de excreção das várias porfirinas variam de acordo com as diversas doenças existentes e, junto com os achados clínicos, ajudam a estabelecer o diagnóstico.

As porfirinas são excretadas na maioria das porfirias e no envenenamento por chumbo. Além disso, o metabolismo das porfirinas pode estar anormal nos pacientes com infecção por HIV estabelecida, particularmente quando há infecção concomitante pelo vírus da hepatite C (O'Connor, 1996).

A fotossensibilidade cutânea e o aparecimento de lesões na pele frequentemente acompanham níveis altos de porfirina. A entidade sem lesões na pele é a porfiria intermitente aguda. Em pacientes que apresentam doença neurológica e dor abdominal aguda – o grupo hepático –, há aumento da produção e da excreção de ácido δ-aminovulínico (ALA) e porfobilinogênio durante o ataque porfírico agudo. Esse fenômeno provavelmente se deve ao aumento da atividade de ALA sintase e subsequente intensificação da produção de precursores. Exacerbações de doenças hepáticas são precipitadas por fármacos que sabidamente induzem atividade enzimática hepática (p. ex., barbitúricos e certos esteroides).

Métodos. Em pacientes com suspeita de estarem tendo um ataque pofírico agudo, o porfobilinogênio é pesquisado em amostras de urina. O teste de Watson-Schwartz é utilizado para separar as causas de um resultado positivo no teste de reatividade de Ehrlich e para dar uma indicação da presença de porfobilinogênio ou grandes quantidades de urobilinogênio. Um resultado positivo para porfobilinogênio no teste de Watson-Schwartz pode ser confirmado pelo teste de Hoesch, pois o primeiro pode gerar resultados falso-positivos para porfobilinogênio em decorrência da ação de certos fármacos, como a metildopa. Diante de uma solicitação específica para realização de um teste qualitativo de porfobilinogênio ou no acompanhamento de um paciente porfírico, o teste de Hoesch – mais simples – pode ser utilizado em substituição ao teste de Watson-Schwartz.

As amostras de urina para detecção de urobilinogênio ou porfobilinogênio precisam ser frescas. Se houver atraso na execução do teste, o pH deve ser ajustado a um valor próximo da neutralidade (pH 7) e a amostra deve ser mantida na geladeira, na qual permanecerá estável por aproximadamente 1 semana. A urina pode escurecer caso o paciente tenha porfiria, em especial se mantida à temperatura ambiente.

Teste de Watson-Schwartz. Os testes de reação do aldeído de Ehrlich e de Watson-Schwartz baseiam-se nas diferenças de solubilidade existentes entre o urobilinogênio e o porfobilinogênio. O urobilinogênio pode ser extraído com clorofórmio e/ou butanol, enquanto o porfobilinogênio permanecerá na fase aquosa.

Procedimento

1. 2,5 mL de reagente de Ehrlich são adicionados a 2,5 mL de urina fresca e, em seguida, a mistura é homogeneizada.
2. 5 mL de acetato de sódio saturado são adicionados à mistura, seguindo-se a homogeneização. Com auxílio de uma fita medidora de pH, verifica-se o pH da solução que deve estar na faixa de 4 a 5. Esse valor deve ser ajustado, caso haja necessidade.
3. Em seguida, a mistura recebe 5 mL de clorofórmio. Uma tampa é colocada no frasco que contém a mistura e esta é vigorosamente agitada durante 1 minuto. Feito isso, aguarda-se algum tempo até que as fases estejam separadas.
4. A fase de cima (aquosa) é examinada. Se estiver incolor, considera-se que o resultado do teste de triagem é negativo, e o processo é interrompido.
5. Se apresentar coloração, a fase aquosa deve ser isolada e tratada com 5 mL de butanol. O frasco com a solução é tampado e agitado vigorosamente durante 1 minuto. Em seguida, aguarda-se até que as fases se separem.
6. O aparecimento de uma coloração variável entre "rosa e rosa-avermelhado" na fase de baixo (aquosa) indica um resultado positivo e sugere a existência de uma concentração de porfobilinogênio equivalente a várias vezes a concentração normal. O aparecimento de cor na fase de cima (que contém butanol) indica que houve aumento da concentração de urobilinogênio (Fig. 27.3).

Teste de Hoesch. O teste de Hoesch se baseia no inverso da reação de Ehrlich (i. e., na manutenção da solução ácida por meio da adição de um pequeno volume de urina a um volume relativamente grande de reagente), eliminando o problema da reatividade do urobilinogênio. A

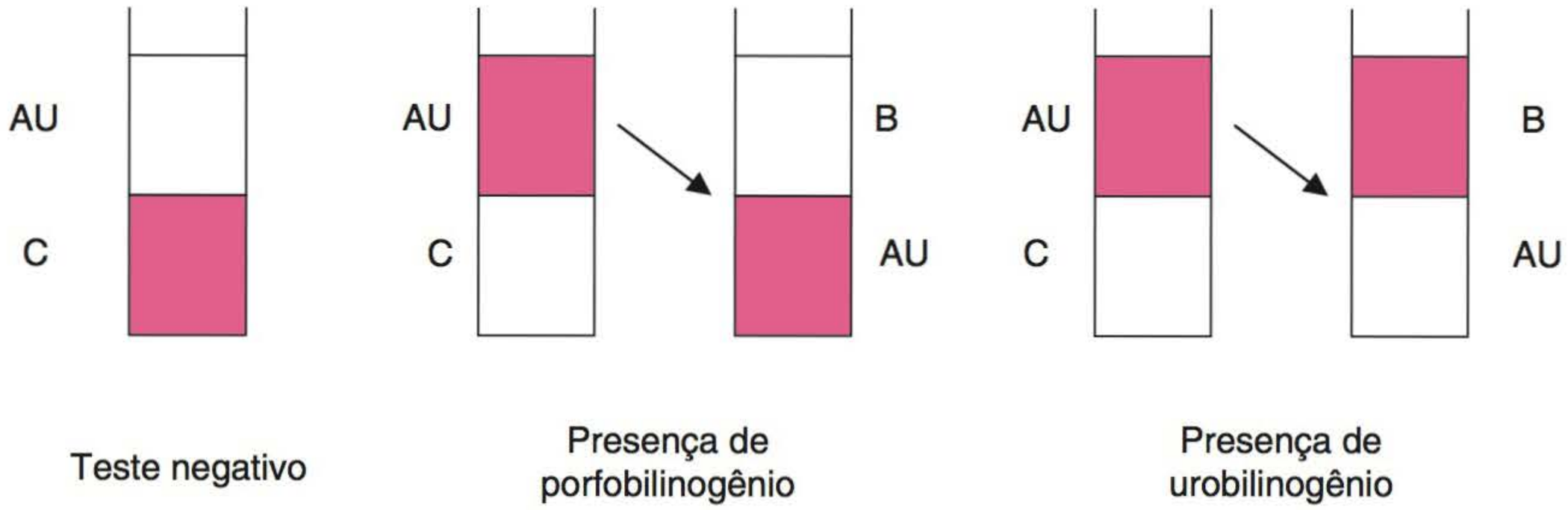


Figura 27.3 Teste de Watson-Schwartz. Interpretação do método de triagem para urobilinogênio e porfobilinogênio urinários.

sensibilidade desse teste é semelhante à do teste de Watson-Schwartz, porém a reação é provocada pelo porfobilinogênio. O teste detecta concentrações de porfobilinogênio da ordem de 20 a 100 mg/L, e concentrações de urobilinogênio de até 200 mg/L não geram resultado positivo (cor vermelha). O aparecimento de uma cor amarela pode ser causado pela presença de ureia.

O pigmento urinário uroseína, relacionado ao ácido indolacético, produz resultados positivos no teste de Hoesch (em resposta ao HCl forte), e a cor rosa produzida pode ser confundida com um resultado positivo para porfobilinogênio. Alguns dos problemas falso-positivos podem ser excluídos testando-se separadamente a amostra com HCl concentrado (6 mol/L) de forma conjunta com o teste de Hoesch. A urina proveniente de um indivíduo com ataque porfírico agudo pode exibir uma cor vermelho-escura, necessitando ser diluída na proporção de 1:10 com água antes de iniciar o teste.

O teste de Watson-Schwartz detecta níveis acima de 6 mg/L, enquanto o teste de Hoesch detecta porfobilinogênio em concentrações acima de 11 mg/L. O teste de Watson-Schwartz é mais sensível do que o de Hoesch na detecção de porfobilinogênio e pode gerar resultado positivo entre a ocorrência dos ataques de porfiria intermitente aguda. Há relatos de que doses mais altas de metildopa (Aldomet) geraram resultados positivos, assim como os indóis em alguns pacientes com íleo paralítico e o fármaco fenazopiridina (Piridínio) que se torna alaranjado em presença de HCl. Um teste qualitativo de porfobilinogênio torna-se necessário quando ambos os testes, de Watson-Schwartz e de Hoesch, geram resultados questionáveis. Essa situação pode ser decorrente da instabilidade do porfobilinogênio.

Foram descritos exames de urina alternativos para triagem de porfobilinogênio. Estes incluem um método cromatográfico capilar eletrocinético micelar (Luo, 1996), bem como um kit semiquantitativo com o qual a amostra de urina é pré-tratada com resina de troca iônica e a cor do aduto Ehrlich-porfobilinogênio é comparada a um conjunto de padrões (Deacon, 1998).

A uroporfirina e a coproporfirina podem ser detectadas por fluorescência. Uma fluorescência vermelho-alaranjada é observada quando uma amostra positiva é colocada próximo a uma fonte de luz ultravioleta (UV).

Procedimento de triagem por fluorescência para porfirina. Neste método, a urina é acidificada e a porfirina extraída é exposta à luz UV.

1. 5 mL de urina são transferidos para um tubo de centrífuga com tampa. Em seguida, adicionam-se 3 mL de uma solução que consiste em uma mistura de ácido acético glacial e acetato de etila na proporção de 1:4.
2. A mistura é agitada e deixada em repouso para que ocorra a separação das fases. A centrifugação acelera a separação.
3. Com o auxílio de uma lâmpada de Wood, observa-se a camada de cima quanto à fluorescência. O tubo com a mistura deve ser inspecionado em um recinto escuro, apenas com a luz UV refletida. Uma cor com tonalidade entre lavanda e violeta indica a presença das porfirinas. Uma fluorescência variável entre rosa e vermelho indica níveis mais altos de porfirina. Uma cor azul-clara e a ausência da cor rosa representam um resultado negativo. A urina normal apresenta fluorescência azul.

Para aumentar a sensibilidade do teste e remover metabólitos de fármaco interferentes, a camada de cima da mistura deve ser transferida para um tubo de vidro e acidificada com 0,5 mL de HCl 3 M (25 mL de HCl concentrado diluído com água a um volume de 100 mL). Após a homogeneização, as porfirinas são extraídas na camada aquosa inferior e apresentarão fluorescência vermelho-alaranjada.

Um método de triagem alternativo utiliza coluna com resina de troca iônica. As porfirinas são adsorvidas, eluídas e expostas à luz fluorescente. Esse método remove substâncias interferentes, e seu princípio é similar ao do método quantitativo para porfirinas totais e para copro e uroporfirinas.

Os testes de triagem aliados aos achados clínicos indicarão se há necessidade de realizar testes quantitativos. Estes últimos são realizados por laboratórios de referência ou de pesquisa.

Amostras de urina para avaliação de porfobilinogênio devem ser mantidas com pH próximo ao neutro (entre 6 e 7) e ao abrigo da luz. Amostras congeladas são bastante estáveis, embora o ALA permaneça mais estável se a urina estiver acídica. Caso a urina precise ser testada quanto à presença de ambas as substâncias, é preferível que o pH esteja próximo ao neutro e a alíquota de urina esteja congelada. Essas substâncias são quantificadas por meio da eluição em diferentes colunas e da reação com reagente de Ehrlich. Foi descrito um método cromatográfico capilar eletrocinético micelar que permite a separação de ALA e porfobilinogênio (Luo, 1996).

Amostras de urina para avaliação quantitativa de porfirinas são coletadas em um frasco escuro com 5 g de carbonato de sódio, para que a amostra de 24 horas forneça uma concentração de carbonato de sódio a 0,1% ou seja produzida uma amostra com pH neutro. A copro e a uroporfirina podem ser separadas por TLC ou por extração

e fluorometria, seguidas da quantificação em colunas de troca iônica. Métodos adicionais incluem o teste com coluna (porfirina) da Bio-Rad, espectrofotometria (Zuijderhoudt, 1998), eletroforese capilar (Chiang, 1997), espectrofotometria de massa com bombardeamento rápido de íons (Luo, 1997) e espectrofotometria de massa por tempo de voo com dessorção/ionização a laser (Jones, 1995).

As porfirinas fecais podem ser qualitativamente estimadas por meio de extração e luz UV, ou quantificadas. Em algumas porfirias, os eritrócitos podem apresentar fluorescência ao exame microscópico de um esfregaço sanguíneo não corado. Os eritrócitos nucleados da medula óssea apresentam fluorescência mais intensa.

Exame do sedimento urinário

O exame microscópico da urina, somado à análise bioquímica com vareta medidora de nível, auxilia na detecção de processos patológicos renais e do trato urinário. A microscopia possibilita a detecção dos elementos celulares e acelulares da urina que não produzem reações bioquímicas distintas. A microscopia também pode servir de teste confirmatório em algumas circunstâncias (p. ex., eritrócitos, leucócitos e bactéria).

Para realizar uma avaliação microscópica da urina de forma competente é preciso conhecer as inúmeras entidades morfológicas existentes (p. ex., organismos, células hematopoéticas e epiteliais, cristais e cilindros). Do mesmo modo, o microscopista deve estar atento à relevância clínica dos achados urinários, bem como das anomalias bioquímicas comumente associadas às interpretações microscópicas. As discrepâncias devem ser investigadas antes de comunicar os resultados.

O sedimento urinário centrifugado deve conter todos os materiais insolúveis (comumente referidos como elementos formados) acumulados na urina após a filtração glomerular e durante a passagem de líquidos pelos túbulos renais e pelo trato urinário inferior. Os elementos celulares são oriundos de duas fontes: (1) células de revestimento epiteliais descamadas/esfoliadas espontaneamente, provenientes dos rins e do trato urinário inferior; e (2) células de origem hematógena (leucócitos e eritrócitos). Cilindros celulares e acelulares podem ser observados, os quais são formados nos túbulos renais e nos ductos coletores. Também pode haver cristais de significados clínico-patológicos variados. Organismos (bactérias, fungos, células com inclusão viral, parasitas) e células neoplásicas constituem elementos tipicamente estranhos na urina, de modo que sua detecção precisa ser investigada.

Os valores "normais" ou de referência para elementos formados variam de um laboratório a outro, em virtude da (1) variação da concentração de amostras de urina coletadas ao acaso e (2) diferentes métodos empregados para concentrar o sedimento por centrifugação. Não há um procedimento padronizado específico. Os laboratórios estabelecem individualmente seus próprios valores de referência, muitas vezes unindo-se a nefrologistas e nefropatologistas.

Métodos de exame do sedimento urinário

De uma forma geral, as amostras de urina coletadas ao acaso são satisfatórias para a avaliação microscópica. Entretanto, recomenda-se que o exame seja realizado enquanto a amostra estiver fresca, particularmente se não tiver sido tratada com conservante. Células e cilindros começam a sofrer lise 2 horas após a coleta. A refrigeração (entre 2 e 8°C) ajuda a prevenir a lise de entidades patológicas, contudo pode acarretar o aumento da precipitação de vários materiais amorfos e cristalinos. A coleta do jato intermediário de urina é recomendada para as mulheres, visando a reduzir a contaminação com elementos vaginais.

Microscopia de campo claro

Embora a microscopia de campo claro possa ser realizada a uma extensão limitada utilizando preparações de urina não coradas, pode ser difícil identificar leucócitos, histiócitos, células epiteliais e cilindros celulares. A luz menos intensa é mais eficaz no delineamento das estruturas mais translúcidas presentes na urina, tais como cilindros hialinos, cristais e filamentos de muco. A coloração com cristal violeta de safranina é comumente utilizada para auxiliar no delineamento dos elementos formados presentes na urina.

Reagentes de coloração supravital

Solução I:	Cristal violeta	3 g
	Álcool etílico (95%)	20 mL
	Oxalato de amônio	0,8 g
Solução II:	Safranina O	1 g
	Álcool etílico (95%)	40 mL
	Água destilada	400 mL

Três partes da solução I e 97 partes da solução II são misturadas e filtradas. A mistura deve ser clareada por filtração a cada 2 semanas e desprezada após 3 meses. À parte, as soluções I e II podem ser mantidas indefinidamente à temperatura ambiente.

Vários reagentes para coloração são comercializados e encontram-se disponíveis. Uma solução a 2% de azul de metileno e azul de toluidina também pode ser utilizada como coloração rápida simples e supravital.

Procedimento. Uma a 2 gotas de corante são adicionadas a cerca de 1 mL de sedimento urinário concentrado. A mistura é homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e uma gota dessa suspensão é aplicada sobre uma lâmina de vidro, sendo coberta com lamínula.

Microscopia de contraste de fase

A microscopia de contraste de fase é benéfica para a detecção de elementos formados mais translúcidos presentes no sedimento urinário, notavelmente cilindros que podem escapar à detecção pela microscopia de campo claro convencional. A microscopia de contraste de fase possui a vantagem de enrijecer os contornos até mesmo dos elementos formados mais transparentes, simplificando sua detecção (Figs. 27.4 A e B). O tempo de varredura é reduzido, e o rendimento aumenta. Existem diversos microscópios que foram projetados para permitir que o operador realize exames tanto em campo claro quanto em contraste de fase, dependendo de quais objetivas ou condensadores são utilizados.

Microscopia polarizada

Trata-se de um tipo de microscopia que é empregada para distinguir cristais e fibras de cilindros celulares e proteicos. Gotículas lipídicas ou esferocristais com ésteres de colesterol são anisotrópicas à luz polarizada, mostram-se brilhantes em campo escuro e formam cruzes de Malta com polarização cruzada. As evidências visíveis de anisotropia dependem da orientação do cristal no campo, mas nem todos são vistos. Se for inserida uma placa de retardo vermelha, a gotícula de colesterol mostrará quadrantes azuis e amarelos típicos contra o fundo vermelho. Grânulos de amido apresentam aspecto semelhante quando são polarizados, porém são maiores. Cristais, cabelo e fibras de roupa também aparecem brilhantes, porém não formam as cruzes de Malta. Ácidos graxos e triglicérides não formam esferocristais líquidos e não mostram anisotropia, contudo os glicoesfingolipídeos observados na doença de Fabry são birrefringentes e podem ser vistos em sedimentos urinários.

Contagens quantitativas

O hemocitômetro é utilizado em muitos laboratórios para quantificar os elementos do sedimento urinário. As células e os cilindros presentes em amostras de urina bem homogeneizadas e não diluídas são quantificados e expressos em número de células/μL. Os valores normais para neutrófilos variam de 5 a 30/μL entre diferentes profissionais. Os limites superiores para eritrócitos variam de 3 a 20/μL, enquanto os valores para cilindros são da ordem de 1 a 2/μL. A con-

Figura 27.4 A, cristais hialinos. Campo claro (× 100). *B*, cristais hialinos. Microscopia de contraste de fase (× 100).

tagem de células em amostras de urina livres de pus com auxílio de hemocitômetro oferece vantagens em relação ao exame de amostras centrifugadas de urina purulenta. Entre essas vantagens estão a redução da variabilidade causada pela centrifugação e suspensão da amostra, o uso de um volume fixo de urina para os exames e um campo visual marcante que possibilita realizar contagens acuradas. Kesson et al. (1978) forneceram evidências de que a realização de contagens em câmara utilizando amostras centrifugadas de sedimento urinário são mais confiáveis na predição de anomalias funcionais renais do que um método convencional que considere células/campo de maior aumento. A recuperação das células pode variar dependendo da velocidade da centrífuga, da gravidade específica e do pH.

Componentes microscópicos no sedimento urinário

Células

Eritrócitos

Sob maior aumento, os eritrócitos não corados são visualizados como discos bicôncavos pálidos que, embora possam apresentar certo grau de variação de tamanho, usualmente medem 7 μm de diâmetro. Quando a amostra examinada não é fresca, os eritrócitos podem aparecer como círculos tênues, incolores ou "células-fantasmas" ("célula-sombra"), pois a hemoglobina pode se dissolver. Em urinas hipertônicas, podem se tornar crenados e aparecer como células pequenas e rugosas com bordas onduladas. Na urina diluída, as células sofrem tumefação e lisam rapidamente, liberando hemoglobina e deixando apenas estruturas vazias constituídas de membrana celular, denominadas "células-fantasma".

Em determinadas ocasiões, os eritrócitos podem ser confundidos com gotículas de óleo ou células de levedura. Entretanto, as gotículas de óleo exibem maior variação de tamanho e são altamente refringentes, enquanto as leveduras usualmente formam brotamentos. Caso a identificação seja difícil, podem ser realizadas duas preparações, e algumas gotas de ácido acético são adicionadas a apenas uma delas. Os eritrócitos sofrem lise na preparação acidificada.

Na urina normal, os eritrócitos são encontrados em pequeno número (0 – 2 células/hpf), e mais de 3 células/hpf é considerada uma concentração anormal. A presença de eritrócitos em números aumentados na urina pode indicar uma variedade de condições sistêmicas ou envolvendo o trato urinário. Estas incluem: (1) doença renal – glomerulonefrite, nefrite lúpica, nefrite intersticial associada a reações farmacológicas, cálculos, tumores, infecção aguda, tuberculose, infarto, trombose de veia renal, trauma (incluindo biópsia renal), hidronefrose, rim policístico e, ocasionalmente, necrose tubular aguda e nefrosclerose maligna; (2) doença do trato urinário inferior – infecção aguda e crônica, cálculo, tumor, estenose e cistite hemorrágica após a terapia com ciclofosfamida; (3) doença extrarrenal – apendicite aguda, salpingite, diverticulite, episódios febris agudos, malária, endocardite bacteriana subaguda, poliarterite nodosa, hipertensão maligna, discrasias sanguíneas, escorbuto e tumores de cólon, reto e pelve; (4) reações tóxicas causadas por fármacos, tais como sulfonamidas, salicilatos, metenamina e terapia anticoagulante; e (5) causas fisiológicas, entre as quais o exercício. Quando números aumentados de eritrócitos são detectados na urina acompanhados de cilindros de eritrócitos, é possível afirmar que o sangramento tem origem renal.

Eritrócitos dismórficos. Inúmeros estudos têm-se concentrado na morfologia variável dos eritrócitos urinários, na tentativa de localizar a origem da hematúria. Hemácias (CVSs) com protrusões celulares ou fragmentação são denominadas dismórficas (Fig. 27.5), e alguns autores sugeriram que sua presença em amostras de urina constitui forte indicação de sangramento glomerular renal (Fracchia, 1995). Outros pesquisadores, no entanto, não encontraram nenhuma morfologia dismórfica que fosse confiável para predizer casos de hematúria renal primária (Favaro, 1997; Ward, 1998). A conhecida "célula G_1" – que possui formato de rosca com um ou mais brotamentos vesiculares na membrana – pode ser mais específica do que as células dismórficas para o diagnóstico da hematúria glomerular (Dinda, 1997). Outro estudo descreve a coloração imunocitoquímica de eritrócitos urinários com a proteína de Tamm-Horsfall em casos de hematúria renal, a qual parece ser ainda mais confiável do que a morfologia celular em termos de distinção entre fontes de eritrócitos renais e não renais (Fukuzaki, 1996). Indivíduos normais também podem apresentar uma mistura de eritrócitos distorcidos e não distorcidos na urina.

Leucócitos

Neutrófilos. O leucócito polimorfonuclear (neutrófilo) é o tipo predominante de leucócito (CBS) encontrado na urina. Sob o maior aumento, essas células são vistas como esferas granulares com diâmetro aproximado de 12 μm e núcleo multilobulado. Os segmentos nucleares podem, às vezes, aparecer como núcleos pequenos, redondos e discretos. Quando a degeneração celular tem início, os detalhes nucleares podem ser perdidos e, então, torna-se difícil distinguir os neutrófilos das células epiteliais tubulares renais. Ácido acético diluído pode melhorar o detalhamento nuclear, de modo que ainda seja possível obter um grau de definição sutil (Fig. 27.6). Por fim, no entanto, com o avanço da degeneração, os segmentos nucleares neutrofílicos fundem-se e dificultam ou impossibilitam distinguir essas células das células mononucleares. A coloração supravital também pode ser útil para enfatizar os detalhes nucleares. O cristal violeta de safranina colore os núcleos neutrofílicos em púrpura-avermelhado e o citoplasma em violeta. A reação citoquímica com peroxidase é igualmente útil na distinção entre neutrófilos e células tubulares.

Na urina diluída ou hipotônica, os neutrófilos incham e seus grânulos citoplasmáticos exibem movimento browniano. Em virtude da refratilidade dos grânulos em movimento, os neutrófilos nessa condição são denominados células glitter (células cintilantes). Essas células têm pouca afinidade por corantes supravitais e apresentarão perda da fragmentação nuclear. A tira reativa para esterase leucocitária é valiosa para confirmar a piúria em amostras de urina hipotônicas.

Além disso, os leucócitos entram rapidamente em processo de lise quando estão em urina hipotônica ou alcalina. Cerca de 50% se perdem após 2 a 3 horas de repouso à temperatura ambiente. Diante dessa situação, torna-se necessário proceder ao exame do sedimento urinário imediatamente após a coleta.

Piúria. É típico encontrar menos de 5 leucócitos/hpf em amostras de urina normais, ainda que as mulheres não raro apresentem concentrações discretamente maiores. A presença de leucócitos (principalmente neutrófilos) em números aumentados na urina é denominada piúria e indica a ocorrência de infecção ou inflamação no trato urinário. Quando acompanhada de cilindros de leucócitos ou cilindros mistos contendo leucócitos e células epiteliais, considera-se que o número aumentado de leucócitos na urina tem origem renal.

Uma infecção, seja ou não bacteriana, pode estar concentrada no parênquima renal (pielonefrite), ou pode permanecer localizada sob a forma de cistite, prostatite, uretrite ou balanite. Nas mulheres, a síndrome uretral aguda (síndrome da disúria-piúria) está regularmente associada a uma concentração acima de 8 neutrófilos/μL em amostras de urina limpas (*clean-catch*). Entretanto, as contagens de colônias

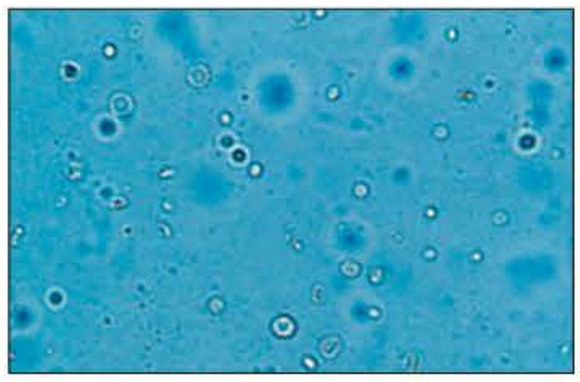


Figura 27.5 Eritrócitos dismórficos (× 160).

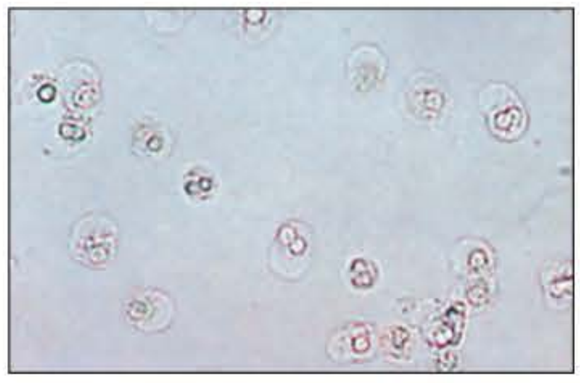


Figura 27.6 Neutrófilos com ácido acético diluído (× 100).

bacterianas são menores do que o esperado. A *Chlamydia trachomatis*, o estafilococos e os coliformes são agentes causativos. Contagens de neutrófilos urinários acima de 30 células/hpf sugerem infecção aguda, e a repetição de culturas estéreis nessa situação pode indicar a ocorrência de tuberculose ou nefrite. A piúria grosseira pode refletir o rompimento de um abscesso renal ou do trato urinário. É preciso ter em mente que, em termos de indicação de infecção do trato urinário, a detecção de leucócitos na urina não é um achado tão confiável quanto a detecção de bacteinúria por coloração de Gram ou cultura de amostra fresca colhida de jato intermediário.

Um número aumentado de leucócitos pode ser detectado em diversas doenças que afetam o trato urinário, tais como glomerulonefrite, lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e nefrite intersticial. A doença com cálculo, qualquer que seja o nível, pode levar ao aumento dos números de leucócitos urinários em decorrência de uma infecção ascendente ou de uma reposta inflamatória localizada na mucosa. Tumores de bexiga urinária, bem como uma variedade de processos inflamatórios localizados crônicos ou agudos, também podem causar elevação dos níveis de leucócitos na urina. Essas células podem se tornar mais numerosas, de forma transiente, durante episódios febris e após a prática extenuante de exercícios físicos.

Eosinófilos. Estas são células comumente ausentes na urina, considera-se significativa a detecção de 1% de eosinófilos na população de leucócitos urinários (Fig. 27.7). Para determinar corretamente se os eosinófilos estão presentes, é necessário avaliar uma amostra de urina concentrada e corada. Costuma-se utilizar preparações obtidas por citocentrifugação e coradas por Wright, Diff-Quick ou Papanicolaou, e a coloração de Hansel para secreções (azul de metileno e eosina Y em metanol, Libe Labs, Florissant, MO) também tem se mostrado uma excelente coloração para reconhecimento da eosinofilúria. Eosinófilos bilobulados, adequadamente corados, foram detectados em pacientes com doença túbulo-intersticial associada à hipersensibilidade a certos fármacos, como penicilina e análogos. Na nefrite intersticial alérgica, o padrão celular tipicamente inclui muitos eritrócitos e algumas células epiteliais tubulares renais. A eosinofilúria também é observada em outras doenças agudas que envolvem o trato geniturinário, com pequenos números sendo observados em casos de infecções no trato urinário e de rejeição a transplantes renais.

Linfócitos e leucócitos mononucleares. Pequenos linfócitos normalmente estão presentes na urina e, ao lado dos histiócitos, são mais facilmente diferenciados em esfregaços corados. Quando as células mononucleares (histiócitos, linfócitos ou células plasmáticas) constituem 30% ou mais de uma contagem diferencial, há indicação de um processo de inflamação crônica. Muitos linfócitos pequenos podem ser encontrados na urina em casos de rejeição a transplante renal. As células plasmáticas e os linfócitos atípicos devem ser detectados sempre que estiverem presentes, de modo a assegurar a realização de novas investigações.

Células epiteliais

Células epiteliais escamosas. Essas células são o tipo mais frequentemente observado de células epiteliais na urina normal, além de serem igualmente as menos significativas. O terço distal da uretra é delimitado por células epiteliais escamosas. Na urina, essas células são grandes e achatadas, com citoplasma abundante e núcleo central pequeno e redondo (Fig. 27.8). Suas bordas muitas vezes apresentam dobras. À coloração com cristal violeta de safranina, exibem núcleos corados em púrpura e citoplasma cuja cor varia do rosa ao violeta. Muitas células escamosas presentes na urina proveniente de mulheres podem ser derivadas da vagina ou da vulva.

Células epiteliais de transição (uroteliais). As células epiteliais de transição delimitam o trato urinário a partir da pelve renal até o terço inferior da uretra. Essas células são menores do que as células escamosas, com tamanho variável entre 40 e 200 μm. Seu formato é arredondado ou em pera, com um núcleo redondo localizado no centro. Formas binucleadas ocasionais podem ser notadas. Quando coradas, as células de transição exibem núcleo azul-escuro e quantidades variáveis de citoplasma corado de azul-claro (Fig. 27.9). Outra pista adequada à identificação dessas células é a característica borda "endo-ecto citoplasmática".

São encontradas poucas células uroteliais na urina, como reflexo de um processo normal de descamação. Assim como as células escamosas, elas raramente possuem significado patológico. A única exceção é a presença de grandes agregados ou lâminas de células de transição na ausência de instrumentação (i. e., cateterização). Essa situação requer um exame citológico com coloração de Papanicolaou para avaliar a possível existência de um carcinoma de células de transição.

Células epiteliais tubulares renais. Este é o tipo de células epiteliais mais significativo encontrado na urina, pois a detecção da elevação de sua concentração indica a existência de dano tubular (Figs. 27.10 e 27.11). Células tubulares em pequeno número podem ser detectadas na urina normal, refletindo o desprendimento das células envelhecidas. Tais células podem estar presentes em números um pouco maiores na urina de recém-nascidos normais.

A coloração de Papanicolaou mostrou-se especialmente útil na distinção entre células tubulares renais e outras células mononucleares encontradas na urina. As células epiteliais renais oriundas dos túbulos convolutos proximal e distal ocorrem de maneira isolada. São células

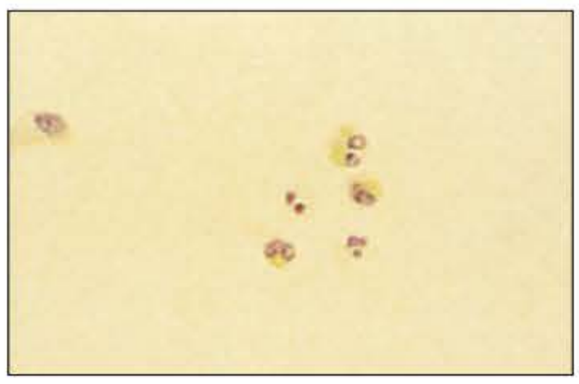


Figura 27.7 Eosinófilos (× 500).

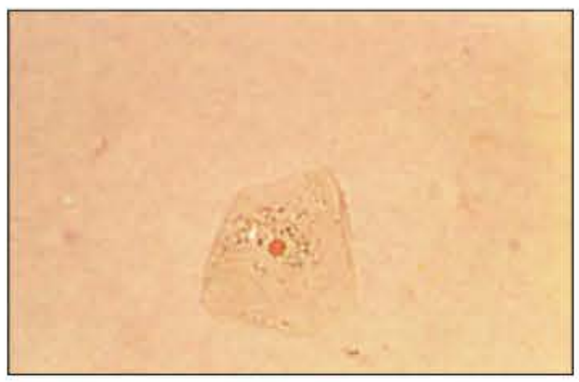


Figura 27.8 Célula epitelial escamosa. Corada com Pirídio (× 200).

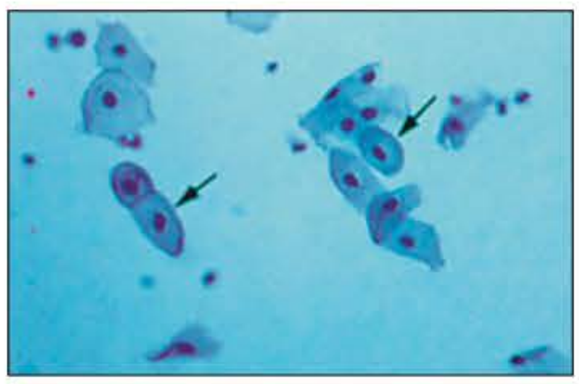


Figura 27.9 Células epiteliais de transição. Coradas por Papanicolaou (× 430).

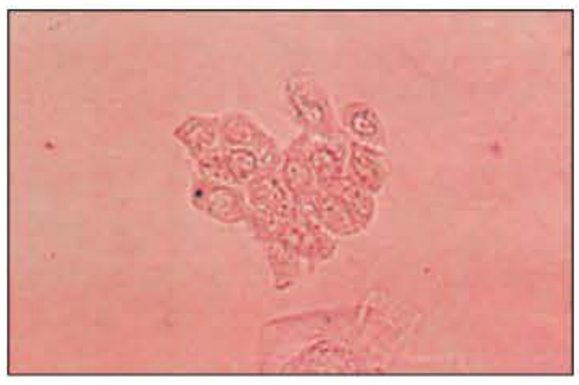


Figura 27.10 Células epiteliais tubulares renais (× 200).

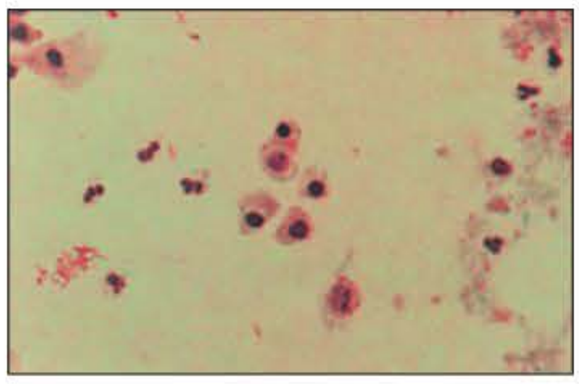


Figura 27.11 Células epiteliais tubulares renais e neutrófilos. Coradas por Papanicolaou (× 200).

grandes (de 14 – 60 μm), oblongas e possuem um citoplasma característico que é eosinofílico e grosseiramente granular. Podem apresentar múltiplos núcleos, mas estes são pequenos e contêm cromatina densa, enquanto os nucléolos raramente ocorrem. Números aumentados de células epiteliais renais dos túbulos convolutos proximal e distal são observados em casos de necrose tubular aguda e de toxicidade causada por certos fármacos e metais pesados.

As células epiteliais dos ductos coletores medem de 12 a 20 μm e são identificadas por seu formato cuboide ou poligonal e pelo núcleo amplo, que costuma ser discretamente excêntrico. As propriedades citoplasmáticas incluem uma margem endo-ecto citoplasmática basofílica, em geral encontrada nas células epiteliais de transição. Números aumentados de células epiteliais oriundas dos ductos coletores são encontradas nos casos de rejeição a transplante renal, necrose tubular aguda (fase diurética) e outras lesões isquêmicas envolvendo o rim. Do mesmo modo, números aumentados podem ser encontrados na nefrosclerose maligna e também nos casos de glomerulonefrite aguda acompanhada de dano tubular. O consumo de vários fármacos e compostos químicos pode acarretar em descamação tubular significativa. As células tubulares dos ductos coletores são facilmente detectadas na urina após a intoxicação por salicilatos.

Foram descritos fragmentos de epitélio renal originários do ducto coletor. A presença de três ou mais células renais oriundas do ducto coletor constituem um fragmento epitelial, e sua presença indica a existência de uma forma mais severa de lesão tubular renal, em que há rompimento da membrana basal. Os fragmentos de epitélio renal são indicativos de necrose isquêmica, e é comum encontrá-los acompanhando graus variáveis de lesão tubular renal e cilindros patológicos. As células dos túbulos convolutos distal e proximal não ocorrem sob a forma de fragmentos. A identificação adequada dos fragmentos epiteliais renais é essencial, não apenas para o diagnóstico de uma forma mais severa de lesão tubular renal, mas também para evitar o diagnóstico falso-positivo de carcinoma de células de transição de baixo grau.

Lipídeos em células epiteliais tubulares renais. Os corpos adiposos ovais são células tubulares que absorveram lipoproteínas com colesterol e triglicerídeos que vazaram de glomérulos nefróticos (Fig. 27.12). Portanto, os corpos adiposos ovais são uma forma de lipidúria. Os lipídeos também podem aparecer na urina como gotículas de ácidos graxos livres, ou nos histiócitos, como material ingerido. A presença de qualquer uma ou de todas essas formas de lipídeos aliada a uma proteinúria marcante é característica da síndrome nefrótica.

Antes de estabelecer o diagnóstico de lipidúria, é necessária a identificação positiva de lipídeos. Quando gotículas livres ou incorporadas contêm grande quantidade de colesterol, exibem a formação em cruz de Malta à observação sob luz polarizada (Figs. 27.13 e 27.14). Quando essas gotículas contêm grandes quantidades de triglicerídeos, torna-se necessário utilizar colorações para gordura (Óleo Vermelho O ou Sudão III) a fim de obter a identificação positiva dos lipídeos.

Pigmentos em células epiteliais tubulares renais. Diante da hemoglobinúria ou da mioglobinúria, o pigmento heme é absorvido pelas células e convertido em hemossiderina. As células carregadas de ferro descamam e são encontradas no sedimento urinário. Os grânulos citoplasmáticos exibem uma coloração castanho-amarelada e coram-se por azul da Prússia para ferro. Essas células também podem estar incorporadas em cilindros (Figs. 27.1 e 27.2).

A absorção dos grânulos de melanina no interior das células tubulares ocorre nos raros casos de melanúria. As células pigmentadas descamadas podem ser demonstradas no sedimento. Células tumorais pigmentadas também são encontradas quando há metástases de melanoma para a bexiga urinária.

O pigmento bilirrubina confere a cor amarela a todos os elementos do sedimento, incluindo células epiteliais tubulares renais e cilindros. Repare que a urobilina não cora células nem cilindros.

Cilindros

Os cilindros são os únicos elementos formados da urina que têm nos rins o único sítio de origem. A proteína de Tamm-Horsfall é uma glicoproteína secretada pela parte espessa da alça ascendente de Henle (e possivelmente pelo túbulo distal), que constitui cerca de um terço do conteúdo total de proteínas urinárias em indivíduos normais. Há um consenso geral de que a proteína de Tamm-Horsfall compõe a matriz de todos os cilindros. A proteína forma uma rede de fibrilas que tem o potencial de capturar quaisquer elementos presentes no filtrado tubular, incluindo células, fragmentos celulares ou material granular.

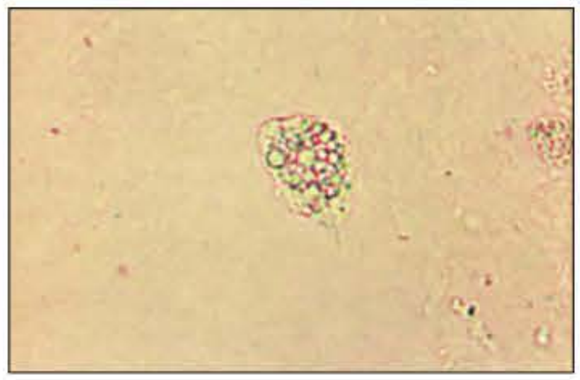


Figura 27.12 Corpo adiposo oval (× 160).

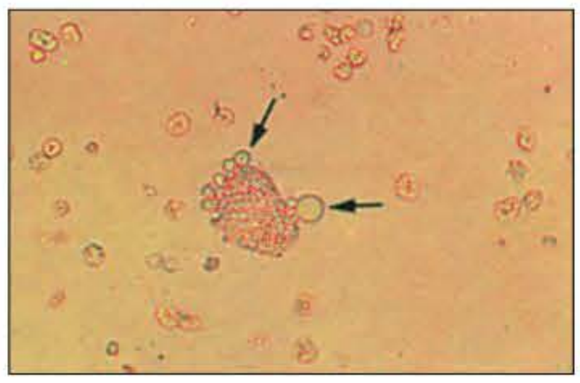


Figura 27.13 Corpo adiposo oval com gotículas de gordura fixas. Campo claro (× 160).

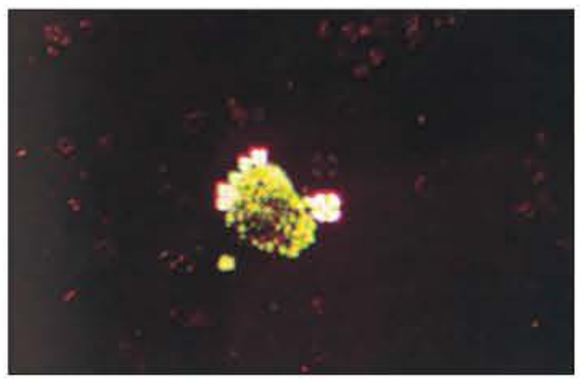


Figura 27.14 Corpo adiposo oval com gotículas de gordura fixas. Polarizado (× 160).

Os cilindros podem ser bastante variáveis quanto à aparência, tamanho, forma e estabilidade. Essa variabilidade talvez seja um fator contribuinte para a aparente baixa precisão na identificação de cilindros em alguns laboratórios (Yoo, 1995; Rasoulpour, 1996). A largura de um cilindro depende do tamanho do túbulo no qual ele se forma. Cilindros amplos são observados em túbulos dilatados ou diante de estase nos ductos coletores. Cilindros estreitos ocorrem em túbulos comprimidos por tecido intersticial inchado ou por causa da desintegração. Os cilindros podem ser curtos e grossos, ou longos e convolutos. Essa última variedade aparece na diurese após a estase urinária. Os cilindros tipicamente apresentam laterais paralelas e extremidades cegas, no entanto começam a sofrer desintegração e mostram adelgaçamento e irregularidades com o avanço da idade. As fibrilas podem se separar, conferindo um aspecto puído. Caudas e extremidades afuniladas podem ser observadas, e essas formas em desintegração são referidas como cilindroides.

No indivíduo normal, são observados muito poucos cilindros no sedimento urinário. Nas doenças renais, é possível observar cilindros em grande número e de vários formatos. O aumento do número de cilindros usualmente indica a disseminação da doença renal, com envolvimento de muitos néfrons. Grandes números de cilindros também podem ser observados em indivíduos sadios após a prática extenuante de exercícios físicos, acompanhados de proteinúria.

A formação de cilindros aumenta na presença de pH mais baixo, concentração iônica aumentada e estase ou obstrução de néfron por células ou debris celulares. Também aumenta diante da entrada de quantidades excessivas de proteínas plasmáticas nos túbulos. Usualmente, a proteína em excesso é a albumina, contudo as globulinas, como a imunoglobulina de Bence Jones, provocam formação de cilindros, a exemplo da hemoglobina e da mioglobulina. É possível que as proteínas plasmáticas reajam ou se combinem à proteína de Tamm-Horsfall para formar cilindros menos translúcidos e cilindros granulares.

Os cilindros podem ser classificados de acordo com a matriz, as inclusões, os pigmentos e as células que apresentam, conforme mostra

a Tabela 27.11. A seguir, é apresentada uma discussão detalhada com inclusão do significado clínico.

Matriz do cilindro

Cilindros hialinos. Estes são o tipo de cilindro observado com maior frequência. São quase completamente constituídos de proteína de Tamm-Horsfall. A detecção de 0 a 2 cilindros hialinos por campo de menor aumento (lpf) é considerada normal. Os cilindros hialinos são translúcidos à microscopia de campo claro, coram-se de rosa com colorações supravitais e são mais facilmente visualizados por microscopia de contraste de fase (Figs. 27.4 A e B). Aumentam em número nas doenças renais e, de forma passageira, na prática de exercícios, exposição ao calor, desidratação, febre, insuficiência cardíaca congestiva e terapia com diuréticos.

Cilindros céreos. Nas doenças renais crônicas, alguns cilindros adquirem um aspecto mais denso e são denominados céreos (cerosos). Diferem dos cilindros hialinos por serem mais facilmente visualizados graças ao índice refrativo mais alto. À observação por microscopia de campo claro, os cilindros céreos apresentam aspecto homogeneamente liso e bordas pontiagudas, extremidades cegas e ranhuras ou convoluções ao longo das margens laterais, como indicação da medida de sua fragilidade (Fig. 27.15).

Os cilindros céreos estão comumente associados à inflamação e à degeneração tubular. São observados com mais frequência em pacientes com insuficiência renal crônica, e também são encontrados em casos de rejeição aguda e crônica de transplante renal. Antigamente, alguns pesquisadores acreditavam que os cilindros céreos refletiam a fase final de dissolução de grânulos finos de cilindros granulares (Fig. 27.16). Como é necessário certo tempo para que os grânulos sofram lise, os cilindros céreos implicam obstrução localizada de néfrons e oligúria. Quando são descomunalmente grandes, esses cilindros são conhecidos como cilindros da insuficiência renal. Sua presença implica atrofia e/ou dilatação tubular avançada e, por sua vez, reflete a doença renal em estágio final e extrema estase do fluxo urinário.

Cilindros celulares

Cilindros de eritrócitos (CVS). A detecção desses cilindros na urina é um achado bastante significativo, pois indica a existência de sangramento no néfron. O dano glomerular possibilita o escape de eritrócitos para o interior do túbulo e, se houver proteinúria concomitante e condições ótimas à formação de cilindros, formam-se cilindros de CVS no néfron distal. Na urina, esses cilindros exibem cor amarela ao serem observados com objetivas de menos aumento. Um pré-requisito para a identificação do cilindro de eritrócitos é que essas células apresentem contornos francamente definidos em pelo menos uma parte do cilindro (Fig. 27.17). A quantidade de material de matriz visível varia de uma matriz escassa a uma matriz hialina delicada e proeminente em que apenas 1 a 2 CVSs podem ser vistas. Esses cilindros são mais bem visualizados ao microscópio de contraste de fase ou com coloração supravital, em que os eritrócitos apresentam-se incolores ou exibem uma matriz cor-de-lavanda ou rosada. Com a estase prolongada, os cilindros de CVSs podem sofrer degeneração e aparecer na urina como cilindros (sangue) que contêm grânulos grosseiros de hemoglobina e de cor castanho-avermelhada.

Entre as doenças em que há aparecimento de cilindros eritrocitários no sedimento estão diversas glomerulonefritides agudas, nefropatia de IgA, nefrite lúpica, endocardite bacteriana subaguda e infarto renal. Raramente, a doença tubulointersticial pode permitir a entrada de eritrócitos com subsequente incorporação em um cilindro. Esse fenômeno pode ocorrer na pielonefrite severa. Além disso, foi observado que a aparência dos cilindros de eritrócitos e de leucócitos coincide com recidiva renal em pacientes com SLE (Herbert, 1995).

Cilindros de leucócitos (CBSs). Cilindros de CBSs são refráteis, exibem grânulos e frequentemente possuem núcleos multilobulados visíveis (Fig. 27.18), a menos que a degranulação já tenha sido iniciada. A microscopia de contraste de fase pode auxiliar no delineamento da segmentação nuclear. Colorações supravitais também intensificam sua visualização.

Em geral, os leucócitos adentram na lâmina tubular a partir do interstício e, na maioria dos cilindros leucocitários (Fig. 27.19), refletem a existência de uma doença tubulointersticial com exsudação neutrofílica e inflamação intersticial. Nessa categoria, a doença mais comum é a pielonefrite. Os cilindros leucocitários também podem estar presentes na doença glomerular em razão do efeito quimiotático do complemento. São também observados na nefrite intersticial, nefrite lúpica e até mesmo na síndrome nefrótica.

Cilindros de células epiteliais tubulares renais. Pode ser bastante difícil diferenciar entre cilindros de células epiteliais tubulares renais

Figura 27.15 Cilindro céreo (× 200).

Figura 27.16 Cilindro granular delgado tornando-se céreo (× 200).

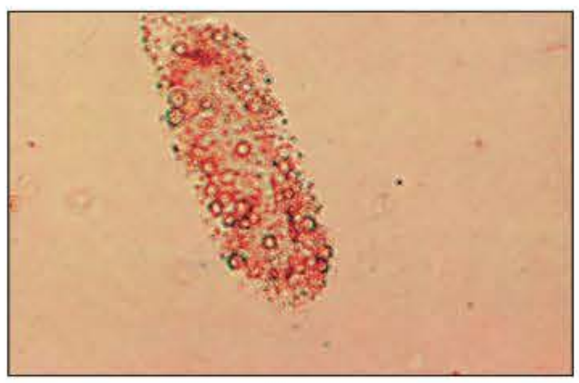


Figura 27.17 Cilindro de eritrócito (× 200).

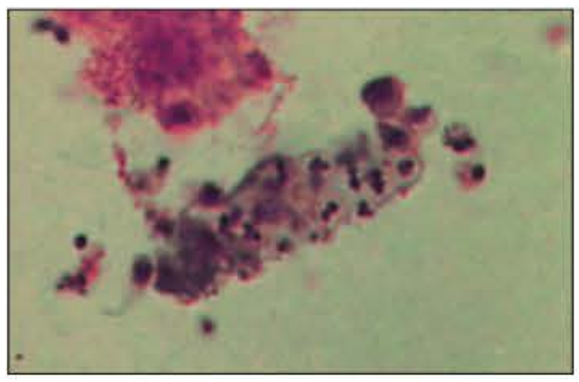


Figura 27.18 Cilindro de leucócitos. Corado por Papanicolaou (× 200).

Tabela 27.11 Classificação dos cilindros

Matriz
Hialina – tamanho variável
Céreo – frequentemente de uso amplo
Inclusões
Grânulos – proteínas, debris celulares
Glóbulos de gordura – triglicerídeos, ésteres de colesterol
Grânulos de hemossiderina
Cristais – incomuns
Grânulos de melanina – raros
Pigmentos
Hemoglobina, mioglobina, bilirrubina, fármacos
Células
Eritrócitos e seus remanescentes
Leucócitos – neutrófilos, linfócitos, monócitos e histiócitos
Células epiteliais tubulares renais
Células mistas – eritrócitos, neutrófilos e células tubulares renais
Bactérias

e cilindros de leucócitos, em particular à observação por microscopia de campo claro de preparações não coradas. A coloração supravital, a microscopia de contraste de fase e a coloração de Papanicolaou (Figs. 27.19 e 27.20) são úteis ao delineamento distintivo desses dois tipos de cilindros. A característica distintiva mais confiável das células tubulares renais é o núcleo arredondado e único.

Os cilindros de células epiteliais tubulares renais são observados na urina em casos de necrose tubular aguda, doença viral (p. ex., doença por citomegalovírus) ou exposição a uma variedade de fármacos. O envenenamento por metais pesados, etileno glicol e intoxicação por salicilatos podem provocar o aparecimento tanto de cilindros quanto das próprias células tubulares na urina. Nas unidades de transplante, essas células e cilindros constituem um dos critérios mais confiáveis para detecção da rejeição de aloenxerto aguda no terceiro dia de pós--operatório.

Cilindros celulares mistos. Não raro, é possível que dois tipos celulares estejam presentes em um único cilindro. Cilindros como esse têm sido denominados cilindros mistos, e alguns exemplos incluem leucócito/renal, eritrócito/leucócito e eosinófilo/renal (Fig. 27.21). Quando não é possível estabelecer com certeza todos os tipos celulares o cilindro resultante é chamado de cilindro celular (Fig. 27.22). Algumas inferências quanto aos tipos de células podem ser extraídas da população dominante de células livres no sedimento circunjacente.

Cilindros de inclusão

Cilindros granulares. Os cilindros granulares são bastante comuns e podem aparecer em condições tanto patológicas quanto não patológicas (Fig. 27.23). Os grânulos podem ser pequenos ou grandes, e podem se originar a partir de agregados de proteínas plasmáticas que atravessam os túbulos de glomérulos danificados, bem como de remanescências de leucócitos, eritrócitos ou células tubulares renais danificadas. Precipitados de sais finos e lisossomos também podem ser componentes granulares. Os agregados proteicos incluem fibrinogênio, imunocomplexos e globulinas. Com a estase prolongada, os grânulos grandes presentes nos cilindros tornam-se menores, e aparentemente não há nenhuma vantagem em separar os tipos de cilindros granulares.

Os cilindros granulares surgem com as doenças glomerulares e tubulares, porém também são característicos da doença tubulointersticial e da rejeição a aloenxertos renais. Podem acompanhar pielonefrite, infecções virais e envenenamento crônico por chumbo. Os cilindros grosseiramente granulares são observados com a hematúria, nos casos de necrose papilar renal. É possível que alguns grânulos finos representem precipitados de fosfato de cálcio em pacientes com hiperparatireoidismo. Do mesmo modo, os cilindros granulares podem ser vistos após períodos de estresse extremo ou prática extenuante de exercícios físicos.

Cilindros gordurosos. O material gorduroso é incorporado à matriz do cilindro, a partir de células tubulares renais carregadas de lipídeos. Estas são comumente observadas em casos de proteinúria severa e são características da síndrome nefrótica (Figs. 27.24 e 27.25).

Cilindros de cristais. Cilindros que contêm uratos, oxalato de cálcio e sulfonamidas (sulfametoxazola) são às vezes detectados. Uma matriz pode ser visualizada em cilindros de cristal verdadeiros, e o cristal pode polarizar. Esses cilindros indicam a ocorrência de deposição de cristais no túbulo ou ducto coletor. A hematúria, provavelmente associada ao dano tubular, acompanha com regularidade os cilindros de cristal. Estes, por sua vez, devem ser distinguidos com cuidado dos agregados de cristais que se formam à temperatura ambiente ou durante a refrigeração.

Cilindros pigmentados

Cilindros de hemoglobina (sangue). Os cilindros de hemoglobina tipicamente exibem coloração que varia do amarelo ao vermelho. Algumas vezes, no entanto, essa coloração se torna bastante pálida (Fig. 27.26). Os cilindros de hemoglobina (também conhecidos como

Figura 27.19 Cilindro celular (× 200).

Figura 27.20 Cilindro de células epiteliais tubulares renais. Corado por Papanicolaou (× 430).

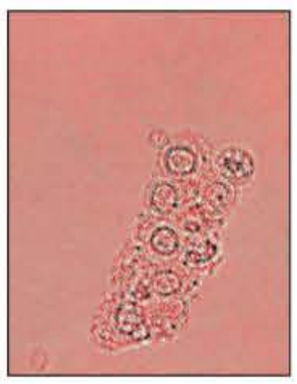


Figura 27.21 Cilindro misto (leucócitos e células epiteliais tubulares renais) (× 200).

Figura 27.22 Cilindro celular (× 200).

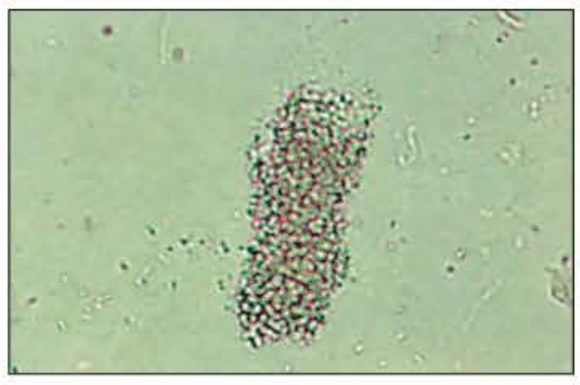


Figura 27.23 Cilindro granular (× 200).

Figura 27.24 Cilindro de gordura. Campo claro, não polarizado (× 160).

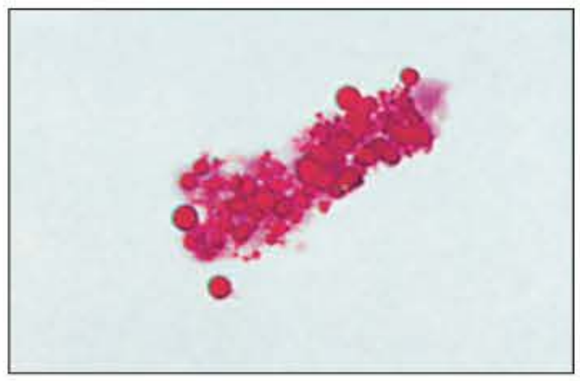


Figura 27.25 Cilindro de gordura. Positivo para Óleo Vermelho O (× 200).

cilindros de sangue) são vistos com mais frequência acompanhados de cilindros de eritrócitos e doença glomerular. É menos comum serem observados em casos de sangramento tubular e em raros casos são acompanhados de hemoglobinúria.

Cilindros de hemossiderina. Os grânulos de hemossiderina contidos nos cilindros derivam das células tubulares renais carregadas de pigmento.

Cilindros de mioglobina. Esses cilindros possuem cor castanho-avermelhada e ocorrem na mioglobinúria, após o dano muscular agudo. Podem estar associados à insuficiência renal crônica.

Cilindros de bilirrubina e outros de fármacos. A bilirrubina é detectada na urina de indivíduos com icterícia obstrutiva, conferindo-lhe uma escura cor castanho-amarelada. Fármacos, como a fenazopiridina (Piridínio), promovem o aparecimento de uma cor brilhante amarela a alaranjada à urina ácida e coram cilindros e células presentes.

Cilindros grandes

Os cilindros grandes são definidos como aqueles cujo diâmetro equivale de 2 a 6 vezes o diâmetro dos cilindros normais. Indicam a presença de uma dilatação tubular e/ou estase no ducto coletor distal. Todos os tipos de cilindros podem ocorrer sob a forma de cilindros grandes, sendo tipicamente observados em indivíduos com insuficiência renal crônica. Indicam mal prognóstico.

Outros tipos de cilindros e estruturas semelhantes

Bactérias podem ser incorporadas às matrizes dos cilindros e, mediante coloração supravital, são vistas na cor púrpura-escura com uma matriz rosa-claro. Filamentos de muco são comumente confundidos com cilindros. Entretanto, são maiores, longos e apresentam forma de fita, com bordas pouco definidas e extremidades pontudas ou fendidas, em oposto aos cilindros que tendem a exibir bordas bem definidas e extremidades cegas.

Sedimento telescopado

Esse termo é empregado para descrever a ocorrência simultânea de elementos de glomerulonefrite e de síndrome nefrótica na mesma amostra de urina. Um sedimento telescopado pode, portanto, conter CVSs, cilindros de CVSs, cilindros celulares, cilindros céreos grandes, gotículas de lipídeos, corpos adiposos ovais e cilindros de gordura. Tal sedimento pode ser encontrado na doença vascular do colágeno (notavelmente, nefrite lúpica) e na endocardite bacteriana subaguda.

Cristais

Os cristais formam-se pela precipitação de sais urinários, em que alterações de fatores múltiplos afetam suas solubilidades. Tais alterações envolvem mudanças de pH, temperatura e concentração. Os precipitados podem aparecer na urina sob a forma tanto de cristais verdadeiros quanto de material amorfo. Na maioria das vezes, a formação de cristais ocorre em amostras submetidas à refrigeração e naquelas deixadas em repouso por várias horas à temperatura ambiente. *In vivo*, o aumento da concentração de soluto é o fator tipicamente responsável pela formação de cristais.

Embora a maioria dos cristais presentes na urina tenha significado clínico limitado, é essencial que sejam identificados de maneira correta para evitar a não detecção dos relativamente escassos cristais anormais associados a condições patológicas diversas. O conhecimento do pH da urina é valioso para auxiliar na identificação dos cristais, pois é o pH que determina qual composto químico irá precipitar. Muitos desses cristais encontrados com frequência apresentam morfologia característica. Contudo, a variabilidade existente por vezes leva à confusão entre estruturas cristalinas patológicas e não patológicas. Com o intuito de separar os cristais anormais daqueles de ocorrência mais comum e "incômoda", é apresentado um resumo da morfologia dos cristais na Tabela 27.12.

Cristais encontrados na urina ácida normal

Uratos amorfos (uratos de cálcio, magnésio, sódio e potássio). Os uratos amorfos precipitam quando submetidos ao repouso em urina com pH discretamente ácido. Havendo grandes concentrações, o sedimento urinário pode ser visto com uma cor variável entre rosa-alaranjada e castanho-avermelhada ao exame microscópico. Esse aspecto tem sido referido como "poeira de tijolo". No microscópio, esse material amorfo aparece como pequenos grânulos castanho-amarelados que podem formar grumos e aderir a fibras e filamentos de muco. Os uratos amorfos são convertidos em cristais de ácido úrico mediante a acidificação com ácido acético, e se dissolvem quando expostos a calor (60°C) e diluição álcali.

Uratos cristalinos (sódio, potássio e amônio). Na urina com acidez discreta, esses biuratos e uratos ácidos formam pequenas esferas de cor marrom (Fig. 27.27) ou estruturas em agulha incolores. As esferas podem se agrupar em pares ou tríades. Assim como os uratos amorfos, essas formas cristalinas são lentamente revertidas em placas de ácido úrico mediante a acidificação com ácido acético.

Ácido úrico cristalino. Os cristais de ácido úrico formam-se diante de pH baixo (entre 5 e 5,5) e apresentam uma variedade de formas, tais como placas rômbicas ou placas achatadas de quatro lados, prismas, formas ovais com extremidades pontudas (em forma de limão), cunhas, rosetas e placas irregulares (Figs. 27.28 e 27.29). A maioria das formas é colorida, variando tipicamente do amarelo ao castanho-avermelhado. Em raros casos, são incolores e apresentam forma hexagonal, semelhante à cistina (Fig. 27.30). Diferentes desta, contudo, apresentam birrefringência com luz polarizada (Fig. 27.31).

A presença de cristais de ácido úrico e urato em grande número pode refletir aumento da renovação de nucleoproteínas, em especial durante

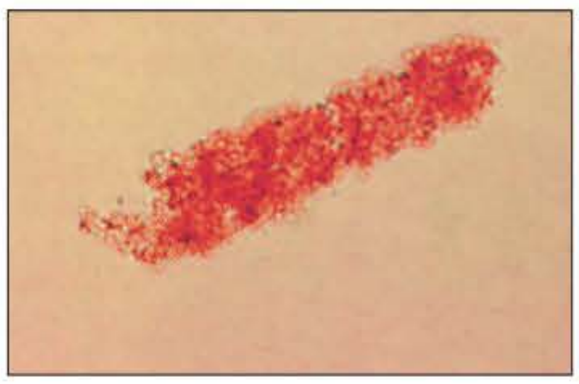


Figura 27.26 Cilindro de hemoglobina (× 200).

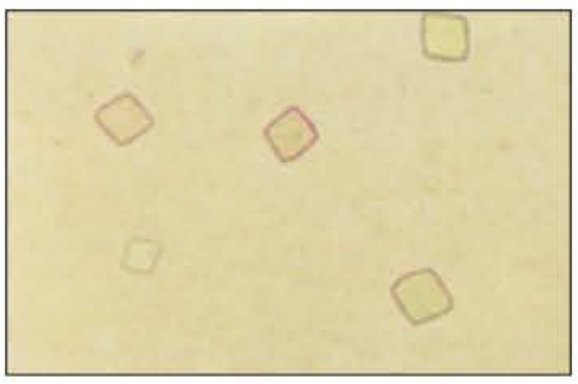


Figura 27.28 Cristais de ácido úrico (× 160).

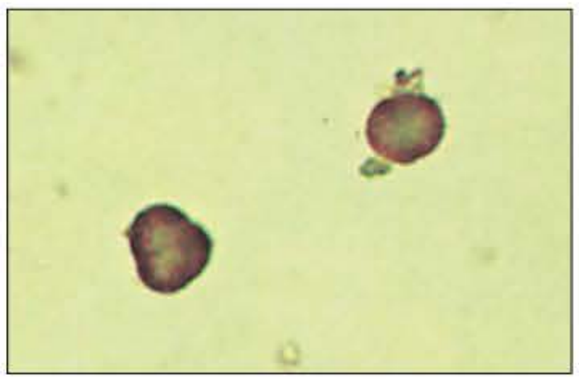


Figura 27.27 Uratos ácidos (× 160).

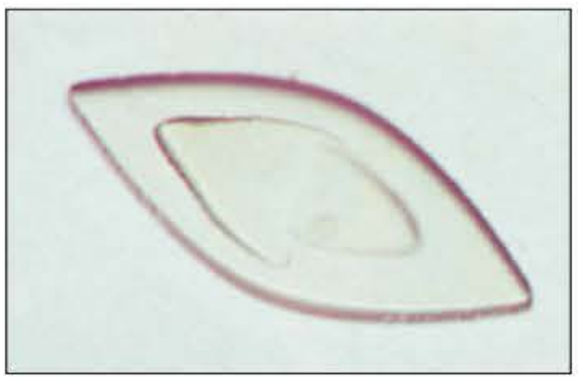


Figura 27.29 Grande placa de ácido úrico, laminada (× 160).

Tabela 27.12 Características de sedimentos urinários amorfos e cristalinos

Substância	Descrição	pH urinário quando encontrados			Características de solubilidade e comentários
		Ácido	Neutro	Alcalino	
Ampicilina	Incomum – por dose alta; incolor; prismas longos que se aglomeram, formam feixes	+	–	–	
Bilirrubina	Castanho-avermelhado; agulhas amorfas, cubos ou placas rômbicas; podem colorir cristais de ácido úrico	+	–	–	Solúvel em álcali, ácido, acetona e clorofórmio
Colesterol	Raro; incolor; placas achatadas com cantos chanfrados; acompanham cilindros de gordura e corpos adiposos ovais	+	+	–	Muito solúvel em clorofórmio, éter e álcool quente
Carbonato de cálcio	Incolor; grânulos pequenos em pares, tétrades; esferas; raramente, agulhas	–	+	+	Solúvel em ácido acético com efervescência
Oxalato de cálcio	Di-hidrato – comum; incolor; octaedro pequeno e refrátil Mono-hidrato – incomum; em forma de haltere e retângulo ovoide	+	+	–	Solúvel em HCl diluído
Cistina	Incolor; placas hexagonais, frequentemente laminadas; rapidamente destruídas por bactérias; pode ser confundida com ácido úrico, porém a cistina é solúvel em ácido hidroclorídrico	+	–	–	Solúvel em álcali (especialmente amônia) e HCl diluído; insolúvel em água fervente, ácido acético, álcool, éter; aplica-se à reação cianeto-nitroprussiato
Hematina	Pequena, do tipo de uma "pedra de amolar" biconvexa encontrada na hemoglobinúria	+	–	–	
Hemossiderina	Castanho-dourada; grânulos em grumos, células, cilindros	+	+	–	Azul com azul da Prússia
Ácido hipúrico	Raro; incolor; agulhas, placas rômbicas e prismas de quatro lados; distinção dos fosfatos	+	+	+	Solúvel em água quente e álcali; insolúvel em ácido acético
Indigotina	Rara; azul; cristais amorfos ou pequenos; colore outros cristais	+	+	+	Muito solúvel em clorofórmio; solúvel em éter; insolúvel em acetona
Fosfatos					
Fosfato amorfo (magnésio, cálcio)	Incolor; precipitados finos, granulares	–	+	+	Insolúvel no calor; solúvel em ácido acético, HCl diluído
Fosfato de cálcio hidrogenado	Menos comum; incolor; formato de estrela, prismas alongados e finos, ou de agulhas; forma rosetas	dis	+	dis	Discretamente solúvel em ácido acético, solúvel em HCl diluído
Trifosfato (amônio, magnésio)	Forma comum: incolor; prismas com 3–6 lados; "tampas de caixão" Menos comum: forma de folha de samambaia achatada, lâminas, flocos	–	+	+	Solúvel em ácido acético diluído
Meio radiográfico (diatrizoato de meglumina)	Endovenoso: incolor; placas finas e rômbicas, algumas chanfradas, parecidas com placas de colesterol; cristais alongados Retrógrado: incolor; cristais longos e pontudos	+	–	–	Solúvel em NaOH a 10%; insolúvel em éter e clorofórmio; diante da alta gravidade específica da urina, polariza com cores interferentes
Sulfonamidas					
Acetilsulfadiazina	"Feixes de trigo" com amarra excêntrica	+	–	–	
Acetilsulfametoxazol	Marrom; esferas densas ou esferas partidas irregulares	+	–	–	
Sulfadiazina	Marrom; glóbulos densos	+	–	–	Solúvel em acetona
Tirosina	Rara; incolor ou amarela, aparece negra ao ser focalizada; agulhas finas e sedosas em feixes ou rosetas	+	–	–	Solúvel em álcali, ácido mineral diluído; relativamente solúvel no calor; insolúvel em álcool e éter
Uratos					
Amorfos (cálcio, magnésio, sódio, potássio)	Comuns; podem ser desde incolores a castanho-amarelados; precipitados granulares amorfos	+	+	–	Solúveis em álcali diluído; solúveis a 60°C ou menos; mudam para cristais de ácido úrico em presença de HCl concentrado ou ácido acético
Urato monossódico	Incolor; precipitados amorfos ou em agulha	+	–	–	
Uratos (sódio, potássio, amônio)	Marrons; pequenos, esféricos; os grumos parecem biuratos	dis	+	–	Solúveis a 60°C; mudam para ácido úrico na presença de ácido acético glacial
Biurato de amônio	Comum na urina "velha"; amarelo-escuro ou marrom; esferas ou "estramônios" (esferas com cornos)	–	+	+	Solúvel a 60°C com ácido acético; solúvel em álcali forte; muda para ácido úrico com ácido acético ou HCl concentrado
Ácido úrico	Comum; amarelo, castanho-avermelhado, marrom; grande variedade de formas – rômbica, placas de quatro lados, rosetas, "pedra de amolar" com formato de limão; raramente, hexágonos incolores	+	–	–	Solúvel em álcali; insolúvel em álcool e ácidos; polariza com cores interferentes
Xantina	Rara; incolor; placas pequenas e rômbicas	+	+	–	Solúvel em álcali; solúvel no calor; insolúvel em ácido acético

dis = discreto.

a quimioterapia de leucemias ou linfoma. Concentrações aumentadas podem ser observadas em indivíduos com síndrome de Lesch-Nyhan, e fornecem evidência circunstancial da natureza de pequenos cálculos alojados nos ureteres, sobretudo se forem radiotransparentes e detectados com níveis séricos aumentados de ácido úrico concomitantes. Também podem prenunciar a nefropatia por urato da gota.

Oxalatos de cálcio. Os di-hidratos podem aparecer em pH 6 ou na urina neutra. Sua forma clássica é a de um pequeno octaedro incolor, semelhante a um envelope (Fig. 27.32). Podem ocorrer formas de Dumbbell e formas ovoides (Fig. 27.33). O mono-hidrato de oxalato de cálcio produz formas mais longas. Os cristais de oxalato são insolúveis em ácido acético.

Quando em grandes concentrações, os cristais de oxalato podem refletir a existência de uma doença renal crônica severa ou uma toxicidade por etileno glicol ou metoxiflurano. A oxalúria é proeminente como reflexo de um aumento da absorção de oxalatos oriundos da dieta após doenças e ressecção do intestino delgado, de modo notável na doença de Crohn. A oxalúria também pode estar presente em indivíduos geneticamente suscetíveis após a ingestão de grandes doses de ácido ascórbico.

Cristais encontrados na urina alcalina normal

Fosfatos amorfos (cálcio e magnésio). Assim como os uratos amorfos, os fosfatos amorfos apresentam um aspecto granular ao microscópio. Diferente daqueles, tendem a ser incolores e produzem um precipitado macroscopicamente fino ou rendado. Grumos ou massas podem ser observadas com frequência por meio da microscopia de luz (Fig. 27.34). Grandes quantidades desse material podem precipitar após o repouso prolongado à temperatura ambiente ou na geladeira.

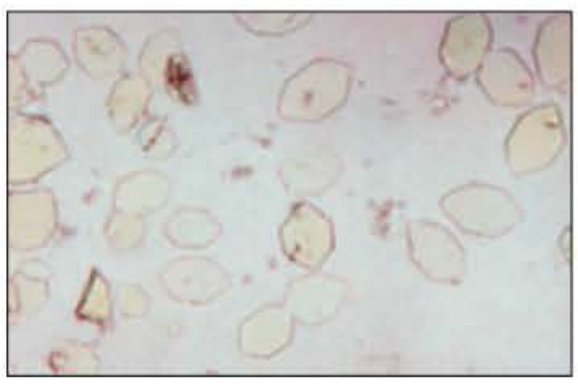


Figura 27.30 Cristais de ácido úrico hexagonais. Campo claro (× 50).

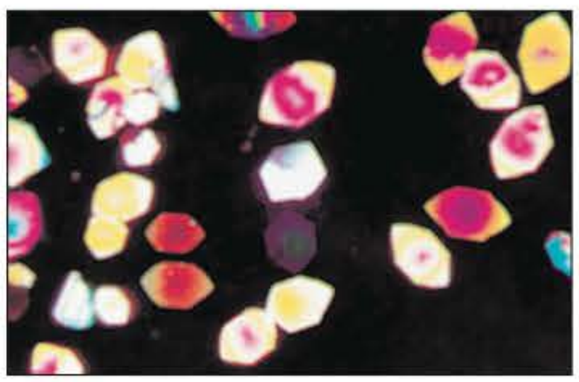


Figura 27.31 Cristais de ácido úrico hexagonais. Polarizado (× 50).

Figura 27.32 Cristais de oxalato de cálcio (× 200).

Figura 27.33 Oxalato de cálcio. Forma oval incomum (× 200).

Os fosfatos mono-hidrogenados de cálcio e magnésio são menos solúveis na urina alcalina, embora os fosfatos di-hidrogenados possam ser solúveis em pH semelhante. Os fosfatos em geral são dissolvidos em ácidos, como os ácidos hidroclorídrico e nítrico diluídos, e apresentam solubilidade variável em ácido acético. São insolúveis em soluções diluídas de hidróxido de sódio ou álcool.

Fosfatos cristalinos. Os cristais trifosfatados (fosfato de magnésio e amônio) são um dos cristais urinários mais facilmente identificáveis, ainda que seja comum apresentarem certa variação de tamanho. São primas incolores que possuem entre 3 e 6 lados e extremidades oblíquas, referidas como "tampas de caixão" (Fig. 27.35). Podem formar lâminas ou flocos incolores (Fig. 27.36). O fosfato de magnésio forma romboides sem cor, alguns dos quais apresentam cantos ou extremidades chanfradas. É raro detectar tais estruturas. Os cristais de fosfato hidrogenado de dicálcio, por outro lado, podem ser encontrados na urina neutra ou levemente acídica. Esses cristais são prismas longos com três lados e extremidades pontudas. Podem formar grumos ou rosetas. De uma forma global, os cristais de fosfato possuem pouco ou nenhum significado clínico e muitas vezes são observados na urina infectada com pH alcalino.

Carbonato de cálcio. Esses cristais pouco comuns são pequenos e incolores, e apresentam formas em haltere ou esféricas. Podem formar pares, tétrades ou grumos. São distinguidos dos demais cristais/materiais amorfos por sua produção de dióxido de carbono em presença de ácido acético.

Biurato de amônio. Assim como os típicos cristais de urato, os cristais de biurato têm cor castanho-amarelada e possuem forma de esfera, com estriações radiais ou concêntricas e projeções irregulares ou espinhos (Fig. 27.37). Referidos como "estramônio", também podem ser observados na urina neutra e, em alguns casos, na urina levemente ácida. São dissolvidos quando expostos ao calor (60°C) e ao ácido acético, reaparecendo como típicos cristais de ácido úrico após cerca de 20 minutos.

Cristais encontrados na urina anormal

Cistina. Os cristais de cistina são placas hexagonais incolores e refrátivas (Fig. 27.38), que aparecem na urina ácida. São solúveis na água

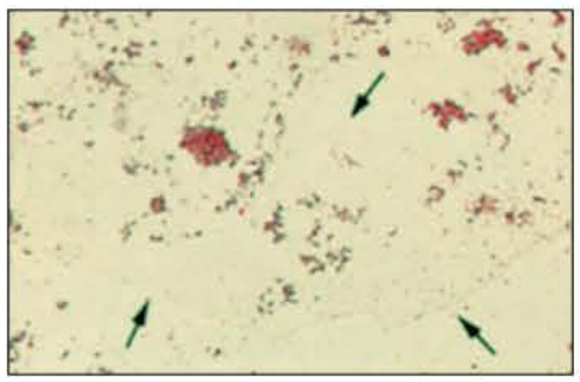


Figura 27.34 Fosfato de cálcio (grande placa clara). Fosfatos quase amorfos (× 64).

Figura 27.35 Trifosfato (× 50).

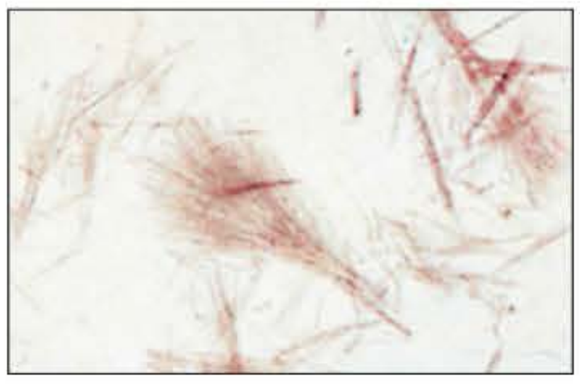


Figura 27.36 Fosfato de cálcio (feixes finos) (× 160).

em pH < 2 ou > 8 e podem ser confundidos com as formas hexagonais do ácido úrico (Fig. 27.30). Enquanto os cristais de ácido úrico polarizam (Fig. 27.31), os finos cristais de cistina não o fazem, embora suas formas laminadas mais espessas sejam capazes de polarizar. Além disso, tanto a cistina quanto o ácido úrico são solúveis em água amoniacal, porém somente a cistina também se dissolve em ácido hidroclorídrico diluído.

Os cristais de cistina estão entre os cristais mais importantes a serem identificados no sedimento urinário. Ocorrem em pacientes com cistinúria e podem estar associados à presença de cálculos de cistina. O teste confirmatório consiste na reação cianeto-nitroprussiato (ver adiante, em "Cistinúria").

Tirosina. Na urina acídica, a tirosina forma estruturas em agulha finas e sedosas que podem estar dispostas em feixes ou grumos, especialmente após a refrigeração. Tais estruturas podem ser incolores ou apresentar cor amarela, aparecendo negras quando o microscópio é focalizado (Fig. 27.39). São solúveis em álcali (hidróxido de amônia e de potássio) e em ácido hidroclorídrico diluído. São insolúveis em álcool e em éter.

Esses cristais são bastante incomuns. São menos solúveis do que a leucina e, portanto, precipitam na urina com mais frequência (ver adiante, em "Tirosinúria"). Os cristais de tirosina e leucina às vezes são encontrados na urina de pacientes com doença hepática severa (ver adiante, em "Triagem urinária de doenças metabólicas hereditárias").

Leucina. Esses cristais também são raros. Aparecem como esferas amarelas, de aspecto oleaginoso, com estriações radiais e concêntricas (Fig. 27.40). São solúveis tanto em ácidos quanto em álcalis. Os cristais de leucina e de tirosina podem ser encontrados juntos, e a leucina pode precipitar-se com os cristais de tirosina mediante a adição de álcool à urina.

Cristais de sulfonamida (sulfadiazina). Esses cristais podem ser encontrados na urina de pH ácido, podendo apresentar morfologias variadas, dependendo da forma do fármaco envolvido. Podem ser vistos com aspecto semelhante ao de feixes de trigo castanho-amarelados com amarras centrais, feixes estriados com amarras excêntricas (Fig. 27.41), rosetas, cabeças de seta, pétalas, agulhas e formas arredondadas com estriações radiais. Em alguns casos, são incolores. O teste confirmatório consiste na reação diazo, e também foram descritos os métodos de HPLC e colorimétrico (Simo-Alfonso, 1995; Mount, 1996).

Com o advento das sulfonamidas solúveis, os cristais de sulfa não são encontrados na urina com tanta frequência, sobretudo quando esta é examinada a 37°C. Até então, esses cristais podiam ser observados na urina de pacientes submetidos à terapia com sulfonamida, os quais eram hidratados de forma inadequada. Como resultado, poderia haver lesão tubular renal mediante a formação de cristais no néfron. Atualmente, a sulfametoxazola (Bactrim, Septa) é detectada com certa regularidade.

Ampicilina (dose alta). A ampicilina pode sofrer cristalização na urina sob condições de dose alta. Os cristais formados aparecem na urina de pH ácido, como estruturas alongadas, finas e incolores (Fig. 27.42). Podem formar feixes grosseiros após a refrigeração.

Meio radiográfico (diatrizoato de meglumina). A formação de cristais urinários segue-se ao exame radiográfico com corantes à base de diatrizoato. Podem ser encontrados na urina de pH ácido logo após a realização dos estudos radiográficos endovenosos (em particular, se o paciente não tiver recebido uma boa hidratação), aparecendo como placas rômbicas chanfradas, sem cor, claras e achatadas, ou como retângulos finos e mais longos. São facilmente polarizados, mostrando cores interferentes (Figs. 27.43 e 27.44). Também são observados após a realização de cistogramas retrógrados, sob a forma de agulhas alongadas e sem cor, formando agrupamentos após a refrigeração. A presença de cristais radiográficos deve estar correlacionada com uma alta gravidade específica (> 1.040).

Outros fármacos. É preciso lembrar de verificar a terapia farmacológica à qual o paciente está submetido sempre que forem encontrados cristais incomuns na urina. Há relatos sobre diversos fármacos que causam cristalúria ao serem administrados segundo esquemas de altas dosagens ou após uma superdosagem. Alguns exemplos são a terapia com altas doses de 6-mercaptopurina, superdosagem de primidona e di-hidroxiadenina proveniente de transfusão sanguínea em massa.

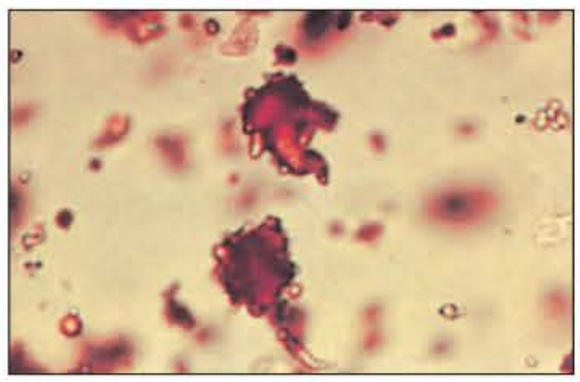


Figura 27.37 Biurato de amônio (× 160).

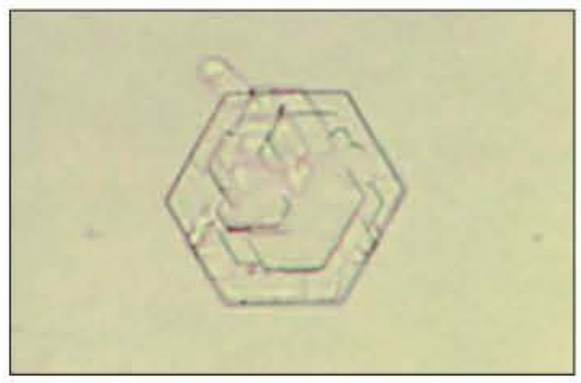


Figura 27.38 Cistina (hexagonal, laminada) (× 200).

Figura 27.39 Cristais de tirosina (× 160).

Figura 27.40 Cristais de leucina (× 160).

Figura 27.41 Sulfadiazina (× 160).

Figura 27.42 Ampicilina (× 160).

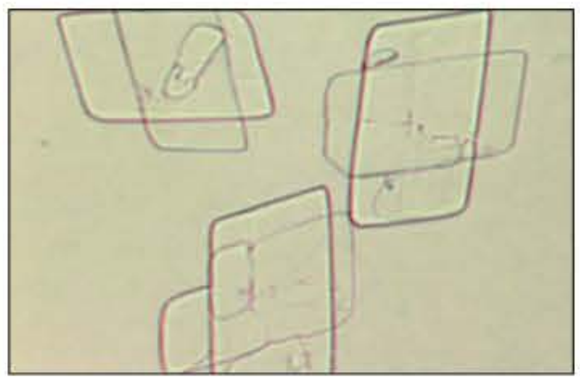


Figura 27.43 Renografina (diatrizoato de meglumina). Campo claro (× 160).

Células tumorais. Células tumorais malignas esfoliadas a partir da pelve renal, ureter, parede da bexiga urinária e uretra são mais bem identificadas com o auxílio de técnicas citológicas. Células de mieloma também já foram detectadas na urina, havendo ou não comprometimento renal. Para ter acesso a uma discussão abrangente acerca dos tipos de doença e morfologias citológicas, o leitor deve consultar as referências padrão sobre citologia urinária (Bibbo, 1997).

Células de inclusão viral. Células epiteliais com corpos de inclusão podem ser encontradas no sedimento urinário em diversas infecções virais que envolvem o trato urinário. As células sinciciais gigantes com inclusões intranucleares eosinofílicas são observadas em pacientes com infecções herpéticas. Nas crianças ou em pacientes imunossuprimidos infectados pelo citomegalovírus, as células afetadas aumentam de tamanho e contêm inclusão intranuclear basofílica e/ou corpos citoplásmicos. As células infectadas por poliomavírus contêm inclusões intranucleares homogêneas, basofílicas e densas que muitas vezes preenchem totalmente o núcleo. As técnicas citológicas são bem mais sensíveis na detecção de todos os efeitos citopáticos virais anteriormente mencionados.

Plaquetas. Essas estruturas foram demonstradas na urina. Concentrações de até 30.000/μL têm sido demonstradas por microscopia de contraste de fase e confirmadas por microscopia eletrônica de amostras de urina provenientes de pacientes com síndrome hemolítica-urêmica.

Bactérias. A detecção de bactérias em amostras de urina pode ser um achado significativo, dependendo do método de coleta de urina utilizado e do quão prontamente essa coleta foi realizada. Se a bactéria foi identificada por meio de uma coloração de Gram em amostra de urina não centrifugada e sob observação com objetivas de imersão, esse achado sugere a presença de mais de 100.000 organismos/mL (i. e., bacteinúria significativa). Bactérias com forma de bastonete são mais observadas, uma vez que os organismos entéricos atuam como agentes causativos da maioria das infecções que envolvem o trato urinário (Fig. 27.45). Os leucócitos, do mesmo modo, são encontrados no sedimento urinário.

Bacilos ácido-resistentes podem ser encontrados no sedimento urinário. No entanto, como a flora uretral pode conter organismos ácido-resistentes não patogênicos, a suspeita da presença do bacilo da tuberculose na urina deve ser levantada por meio da realização de cultura e/ou pela utilização da metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Fungos. As leveduras (mais comumente, as espécies de *Candida*) podem ser agentes causais de infecção do trato urinário (p. ex., no diabetes melito). Contudo, as leveduras também são contaminantes comuns da pele, do trato genital feminino e do ar. Ao exame microscópico, podem ser confundidas com eritrócitos. A presença de brotamentos ajuda a identificá-las como células de levedura (Fig. 27.46). Ocasionalmente, são também encontradas as pseudo-hifas da *Candida* (Fig. 27.47).

Parasitas. Parasitas e seus ovos podem ser observados no sedimento urinário, como resultado de contaminação fecal ou vaginal. Quando tais estruturas são detectadas, o exame deve ser repetido utilizando-se amostras de urina fresca e limpa. Embora o *Trichomonas vaginalis* possa estar presente na urina em consequência de uma contaminação vaginal, é possível que haja infecção da uretra ou da bexiga urinária. Nesse caso, quando houver suspeita, é necessário pesquisar o protozoário imediatamente em uma preparação a fresco do sedimento. A motilidade dos organismos é útil à sua correta identificação. Em pacientes com esquistossomíase causada por *Schistosoma haematobium*, ovos típicos são liberados diretamente na urina, acompanhados de eritrócitos provenientes da bexiga urinária. É raro encontrar amebas na urina, que podem alcançar a uretra a partir dos linfáticos ou, mais provavelmente, a partir da contaminação fecal da uretra. A *Entamoeba histolytica* patogênica costuma ser acompanhada de eritrócitos e leucócitos.

Contaminantes e artefatos

Fibras musculares ou células vegetais parcialmente digeridas podem ser encontradas diante de contaminação fecal (Fig. 27.48). Espermatozoides às vezes estão presentes, enquanto os grãos de pólen contaminam as amostras de forma sazonal (Fig. 27.49). Fibras de fontes diversas podem ser observadas, incluindo fibras de algodão, cabelo, fibras de madeira provenientes de palitos aplicadores e fibras sintéticas oriundas de fraldas descartáveis. Diferentes dos cilindros, essas fibras polarizam com luminosidade.

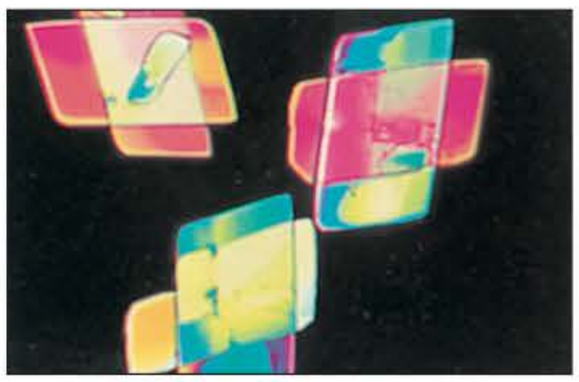


Figura 27.44 Renografina (diatrizoato de meglumina). Polarizado (× 160).

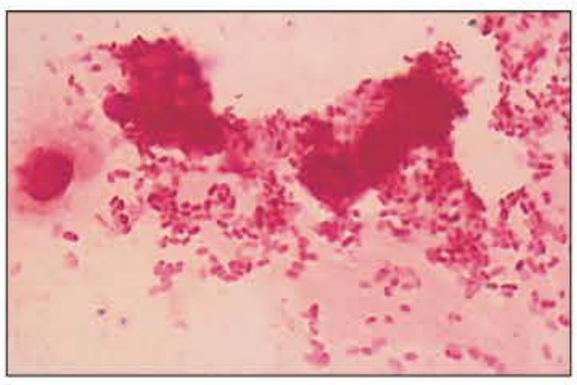


Figura 27.45 Bactérias (× 200).

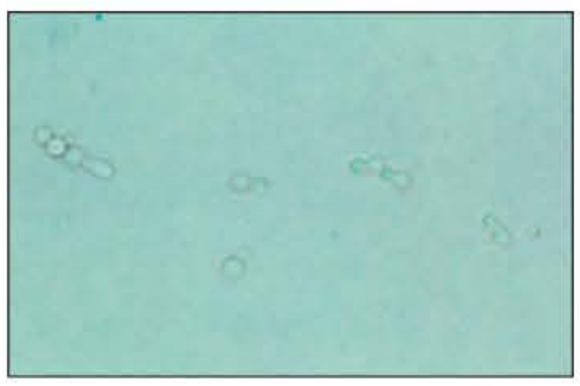


Figura 27.46 *Candida*. Leveduras em brotamento (× 200).

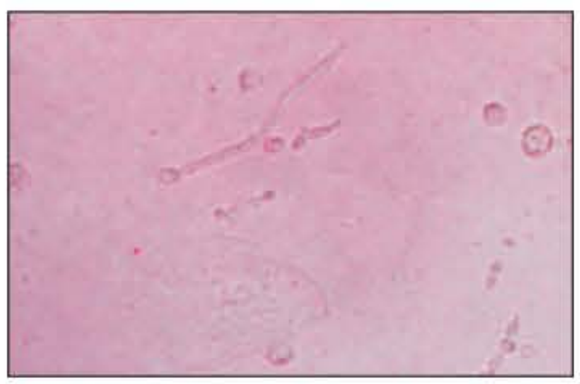


Figura 27.47 *Candida*. Pseudo-hifas (× 200).

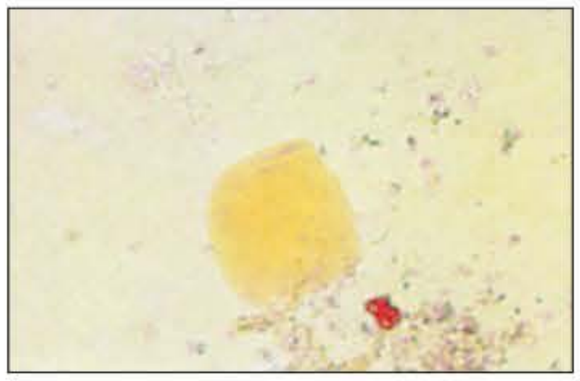


Figura 27.48 Fibra muscular (× 200).

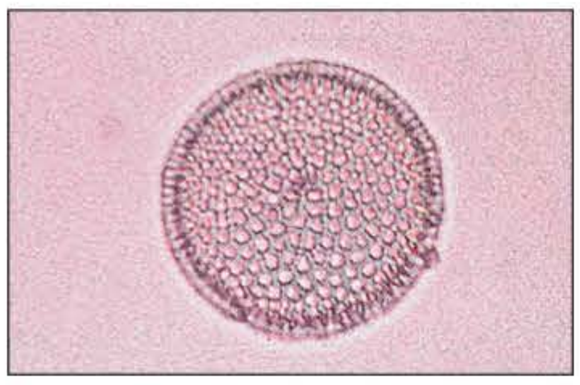


Figura 27.49 Grão de pólen (× 160).

Grânulos de amido provenientes de luvas cirúrgicas constituem o contaminante mais comum da urina e de outros líquidos corporais. Ao microscópio, são vistos como estruturas brilhantes, levemente estriadas, com contornos irregulares e depressão central (Fig. 27.50). Com os filtros de polarização cruzada, os grânulos de amido exibem um padrão típico em cruz de Malta e, em razão do grande tamanho (equivalente a várias vezes o tamanho de um eritrócito), é improvável confundi-los com gotículas de colesterol. Gotículas de óleo provenientes de lubrificantes de cateteres podem ser confundidas com células, especialmente CVSs. O material lipídico oriundo de cremes vaginais também forma gotículas na urina e pode formar grandes agregados amorfos.

Métodos de urinálise

Procedimento da urinálise básica (rotina)

1. Despejar de 10 a 15 mL de amostra de urina bem homogeneizada em um tubo de centrífuga graduado descartável. Proceder ao exame físico e às avaliações bioquímicas com tiras reativas. Centrifugar a 450 g por 5 minutos.
2. Remover com cuidado e preservar o sobrenadante. O volume final utilizado para ressuspender o sedimento pode variar de acordo com o sistema padronizado adotado, porém deve permanecer constante em um dado laboratório. Utilizar pipeta descartável, tubos especiais ou sistema de pipetagem para concentrar o sedimento.
3. Ressuspender delicadamente o sedimento no sobrenadante remanescente e, caso deseje, adicionar 1 gota de corante supravital. Com o auxílio de uma pipeta apropriada, carregar a câmara de exame de uma lâmina padronizada. Deixar a urina sedimentar durante 30 a 60 segundos.
4. Examinar a amostra com objetivas de menor e maior aumento. Uma iluminação suave ou de contraste de fase será necessária para detecção das entidades presentes no sedimento com baixo índice de refração. O ajuste fino deve ser alterado de modo contínuo, enquanto se faz a varredura. Avançar sistematicamente por toda a câmara de exame, tomando o cuidado de checar as margens à procura de cilindros.
5. Contar o número de cilindros ao menos em 10 lpf, em média, e expressar o resultado em número de cilindros/lpf. Para tanto, pode ser adotada uma faixa razoável de valores (p. ex., 0–2, 2–5, 5–10). Utilizar o maior aumento para identificar cilindros de acordo com o tipo. O uso de microscopia de contraste de fase impedirá que os cilindros escapem à detecção (ver Figs. 27.4 A e B).
6. Identificar e contar eritrócitos, leucócitos e células epiteliais renais com o auxílio da objetiva de maior aumento. Contar no mínimo 10 hpf, em média, e expressar os resultados em células/hpf. Adotar uma faixa de valores razoável para descrever os resultados.
7. Comentar os seguintes aspectos:
   a. presença de células escamosas ou de transição, se em grande número ou como fragmentos (células de transição);
   b. bactérias, leveduras e microrganismos. Bacteinúria detectável ao menor aumento deve ser descrita como de no mínimo 2+;
   c. cristais (quantificados em menor aumento). A presença de cristais anormais deve ser bioquimicamente confirmada e correlacionada com a história do paciente;
   d. presença de muco em grande quantidade.
8. Os autores recomendam confirmar os resultados a seguir por meio de exame citopatológico ou testes bioquímicos específicos (cristais):
   a. mais de 2 células epiteliais renais/hpf;
   b. cilindros patológicos;
   c. células mononucleares atípicas, em particular as células uroteliais;
   d. fragmentos teciduais;
   e. cristais patológicos.

O relato dos achados deve ser inteiramente revisto – incluindo os dados físicos, bioquímicos e microscópicos – e correlacionado à informação clínica disponível. As discrepâncias devem ser resolvidas antes da liberação do resultado. Os valores normais do procedimento são: 0 a 10 CVSs/hpf, 0 a 10 CBSs/hpf, 0 a 2 cristais hialinos/lpf. Os valores variam, dependendo do sistema padronizado adotado.

A urinálise de rotina é uma ferramenta diagnóstica útil no *work up* e acompanhamento de vários distúrbios que envolvem o sistema urinário. A Tabela 27.13 apresenta um resumo dos achados obtidos macroscopicamente, com tiras reativas e por microscopia, os quais são típicos das entidades encontradas com maior frequência.

Urinálise automatizada

Foram desenvolvidos diversos instrumentos para automatização parcial ou total da urinálise de rotina. Além de intensificar o fluxo de trabalho, a automatização também permite padronizar alguns aspectos da urinálise manual. A maioria desses instrumentos pode ser integrada aos sistemas de informação laboratoriais, facilitando tanto a emissão quanto a recuperação dos resultados.

Existem vários instrumentos disponíveis para automatização tanto das análises microscópicas/bioquímicas quanto dos componentes microscópicos da urinálise de rotina. Exemplificando, produzidos por diversos fabricantes, os analisadores automáticos de tiras reativas para exames de urina bioquímicos são equipados para realizar automaticamente a pipetagem ou a imersão das tiras de teste, bem como fornecer medidas fotométricas de campos das tiras reativas.

As estações de trabalho IRIS Urinalysis combinam vários subsistemas automatizados, com o objetivo de realizar uma urinálise completa. A gravidade específica é determinada por um medidor de gravidade de massas. Os componentes bioquímicos da urina são quantificados por um espectrofotômetro de refletância padrão. A análise microscópica é facilitada por sistema inteligente de microscopia automatizada. A centrifugação é dispensada, e o manuseio da amostra é mínimo. O uso de uma tela de vídeo sensível ao toque elimina a necessidade de digitar dados por meio do teclado. Na análise, a amostra de urina é transferida para a porta de entrada do aparelho, sobre uma tira reativa para bioquímica urinária. Essa tira é, então, colocada na plataforma de um fotômetro de refletância. As informações bioquímicas urinárias são automaticamente cronometradas, lidas e verificadas pelo computador interno. Uma parte da amostra é desviada para o medidor de gravidade de massas com oscilador harmônico para determinação da gravidade específica. O restante da amostra é corado e transferido a uma câmara de fluxo laminar, na qual os elementos formados são detectados e registrados por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio, enquanto uma lâmpada estroboscópica permite a obtenção de imagens em pausa-movimento. As imagens de células, cilindros, cristais, leveduras e bactérias encontradas no sedimento são, em seguida, separadas de acordo com o tamanho e apresentadas ao operador na tela sensível ao toque para identificação. Como o volume da câmara de fluxo laminar é conhecido, as imagens podem ser contadas e relacionadas ao volume de urina com uma precisão que ultrapassa aquela obtida com amostras centrifugadas e montadas entre lâmina e lamínula de vidro. Na maioria dos casos, o sistema pode eliminar a necessidade de realizar exame microscópico (Hughes, 2003). O computador, então, consolida a emissão do resultado imprimindo-o ou enviando-o ao sistema de informação do laboratório (SIL).

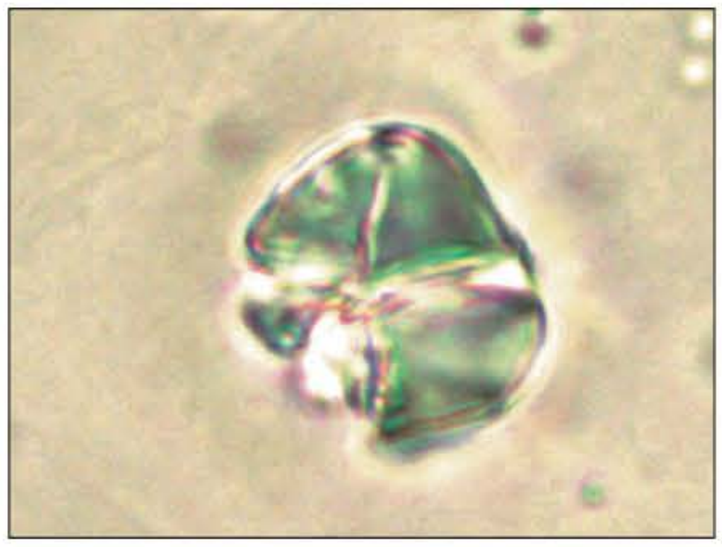


Figura 27.50 Grão de amido (× 160).

Tabela 27.13 Diversas doenças do sistema urinário e respectivas anormalidades à urinálise

Doenças	Urinálise macroscópica	Urinálise microscópica
Glomerulonefrite aguda	Hematúria grosseira Turbidez "esfumaçada" Proteinúria	Cilindros de eritrócitos e sangue Cilindros epiteliais Cilindros hialinos e granulares Cilindros céreos Neutrófilos Eritrócitos
Glomerulonefrite crônica	Hematúria Proteinúria	Cilindros granulares e céreos Cilindros de sangue ocasionais Eritrócitos Leucócitos Cilindros epiteliais Gotículas de lipídeos
Pielonefrite aguda	Turbidez Odor ocasional Proteinúria ocasional	Inúmeros neutrófilos (muitos em aglomerados) Poucos linfócitos e histiócitos Cilindros de leucócitos Cilindros epiteliais Células epiteliais renais Eritrócitos Cilindros granulares e céreos Bactérias
Pielonefrite crônica	Proteinúria ocasional	Leucócitos Cilindros céreos amplos Cilindros granulares e epiteliais Cilindros de leucócitos ocasionais Bactérias Eritrócitos
Síndrome nefrótica	Proteinúria Gotículas de gordura	Cilindros gordurosos e céreos Cilindros granulares e celulares Corpos adiposos ovais e/ou células epiteliais renais vacuolizadas ocorrendo isoladas ou em aglomerados celulares
Necrose tubular aguda	Hematúria Proteinúria ocasional	Células epiteliais renais necróticas ou degeneradas Neutrófilos e eritrócitos Cilindros granulares e epiteliais Cilindros céreos Cilindros amplos Fragmentos de tecido epitelial
Cistite	Hematúria	Inúmeros leucócitos Eritrócitos Células epiteliais de transição ocorrendo isoladamente ou como fragmentos Histiócitos e células gigantes Bactérias Ausência de cilindros
Síndrome da disúria-piúria	Turvação discreta	Inúmeros leucócitos, bactérias Eritrócitos Ausência de cilindros
Rejeição aguda a aloenxerto renal (nefrose inferior)	Hematúria Proteinúria ocasional	Células epiteliais renais Linfócitos e células plasmáticas Neutrófilos Cilindros epiteliais renais Fragmentos epiteliais renais Cilindros granulares, sanguinolentos e céreos
Neoplasia no trato urinário	Hematúria	Células mononucleares atípicas, com núcleos aumentados, irregulares e hipercromáticos, às vezes com nucléolos
Infecção viral	Hematúria Proteinúria ocasional	Células mononucleares aumentadas e/ou células multinucleadas com proeminentes inclusões intranucleares e/ou citoplasmáticas Neutrófilos Linfócitos e células plasmáticas Eritrócitos

(Continua)

Tabela 27.13 Diversas doenças do sistema urinário e respectivas anormalidades à urinálise (continuação)

Doenças	Urinálise macroscópica	Urinálise microscópica
		proeminentes que ocorrem isoladamente ou como fragmentos teciduais Neutrófilos Eritrócitos Células epiteliais de transição

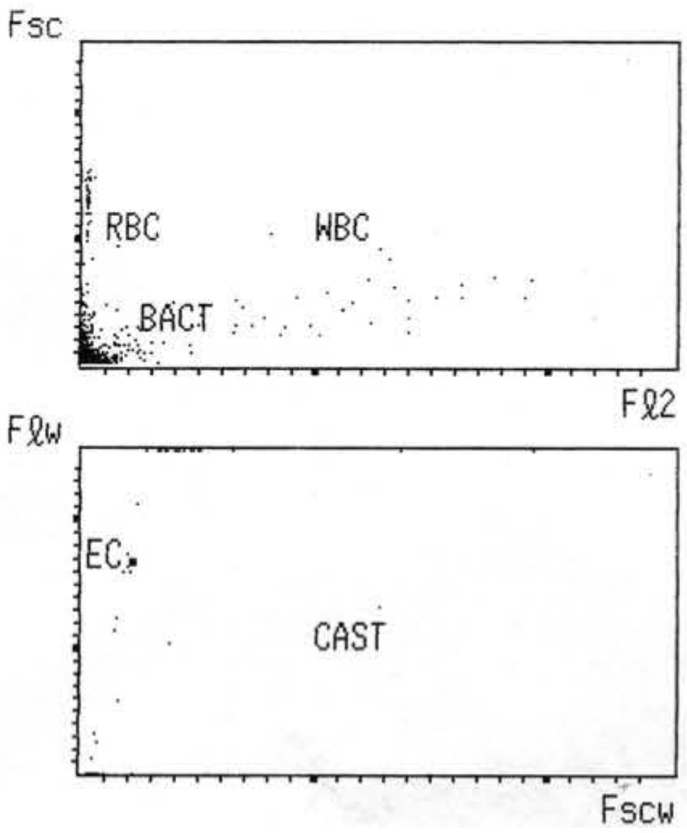
O sistemas IRIS baseia sua análise na análise de imagens de células. Outra forma de analisar as células e os cilindros presentes na urina é por citometria de fluxo. Nesse caso, os analisadores coram o DNA e as membranas dos elementos formados presentes na urina nativa, passando-os sob a forma de fluxo laminar por um feixe de laser e medindo a dispersão da luz, a fluorescência e a impedância. O UF-100 (Sysmex) analisa as células urinárias por citometria de fluxo e fornece resultados quantitativos para CVSs e CBSs, células epiteliais, cilindros e bactérias (Fig. 27.51). Esse aparelho detecta leveduras, cristais, hemácias dismórficas e cilindros patológicos (Fig. 27.52) presentes na urina (Ben-Ezra, 1998; Ottinger, 2003). Essa tecnologia pode ser útil para diminuir o número de amostras de urina que necessita de análise microscópica na rotina (Fenili, 1998). Os valores normais são inferiores a 20 CVSs/μL, menores que 25 CBSs/μL e abaixo de 2.000 bactérias/μL. De modo semelhante ao exame microscópico de amostras de urina não centrifugadas, os sistemas automatizados não são propensos aos artefatos característicos do exame de amostras de sedimento urinário centrifugadas.

Testes especiais e técnicas de monitoramento

Cálculos urinários

A nefrolitíase é uma condição comum que afeta cerca de 5 em cada 1.000 indivíduos. Trata-se de um distúrbio heterogêneo em que há formação de cálculos como consequência de uma variedade de distúrbios metabólicos ou ambientais. Apesar de a maioria dos estudos concentrar-se nos componentes inorgânicos, foi demonstrado que muitos cálculos estão associados a uma matriz orgânica que contêm lipídeos e proteínas, sugerindo o envolvimento das membranas celulares na nucleação dos cristais (Khan, 1996). Um dos estudos mostrou que um antissoro contra essas proteínas da matriz dos cálculos apresentou reação cruzada com proteínas isoladas de diferentes cálculos, independentemente de sua composição mineral (Siddiqui, 1998). Muitos pacientes com cálculos também apresentaram elevação dos níveis de IL-6, e essa molécula futuramente poderá ser útil como marcador da doença por cálculos (Rhee, 1998).

Os cálculos superiores (renais) são comuns entre as populações dos países industrializados ocidentais, enquanto os cálculos na bexiga urinária costumam ser pouco frequentes. A descida dos cálculos pelos ureteres causa cólicas renais, que se caracterizam por uma dor severa no flanco que irradia para a virilha. A passagem do cálculo frequentemente é acompanhada de hematúria. Pode haver hidronefrose diante da obstrução da pelve renal ou do ureter pelos cálculos, sendo a infecção uma consequência comum. As recaídas são frequentes, porém a devida identificação dos cálculos e dos fatores de risco associados pode reduzir consideravelmente a formação dessas estruturas.



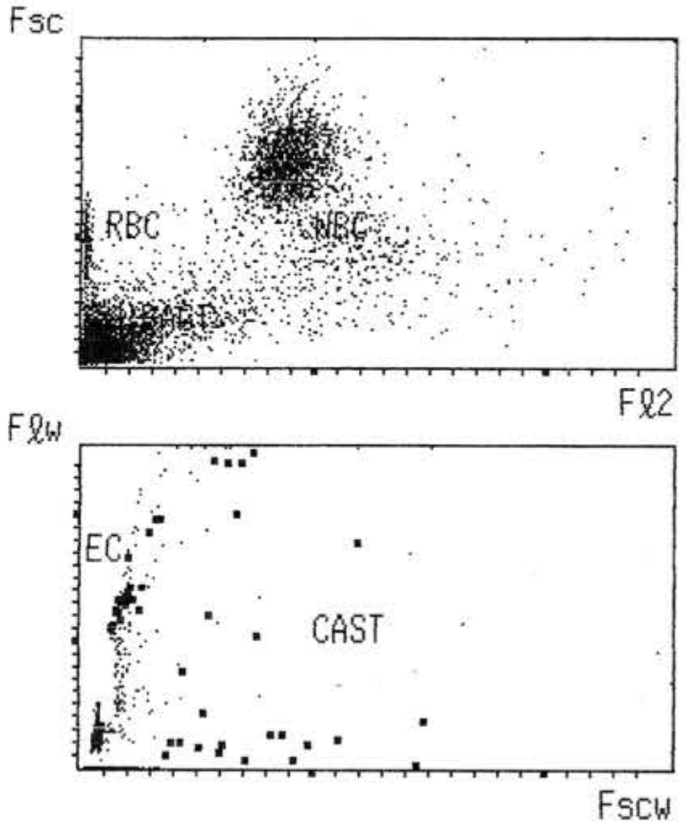
RBC	9.8	[/μL]	1.8[/HPF]
WBC	4.2	[/μL]	0.8[/HPF]
EC	4.1	[/μL]	0.7[/HPF]
CAST	0.00	[/μL]	0.00[/LPF]
BACT	607.5	[/μL]	-

Path.CAST	X'TAL
SRC	SPERM
YLC	

RBC-Info.

OB/Hb	PRO
L.Est.	NIT

Figura 27.51 Impresso do analisador de urina automatizado UF-100, que mostra dados de uma urina normal. Note a ausência de CVSs, CBSs, bactérias e cilindros.



RBC	226.8	[/μL]	40.8[/HPF]
WBC	766.1	[/μL]	137.9[/HPF]
EC	27.0	[/μL]	4.9[/HPF]
CAST	3.07	[/μL]	8.90[/LPF]
BACT	12500.4	[/μL]	5+

Path.CAST	X'TAL
SRC	SPERM
YLC	

RBC-Info. Dysmorphic ?

OB/Hb	PRO
L.Est.	NIT

Figura 27.52 Impresso do analisador de urina automatizado UF-100, que mostra dados de uma urina anormal. Compare com a Figura 27.51. Note o número significativo de CVSs, CBSs, bactérias e cilindros.

Os cálculos muitas vezes apresentam oxalato de cálcio ou uma mistura de oxalato e fosfato de cálcio (~ 80%). Seguindo-se a estes, os constituintes mais comuns são uma mistura de fosfato de cálcio, fosfato de magnésio e amônio, e ácido úrico (entre 3 e 10% de cada). Por fim, há também os cálculos de cistina (1–2%). A presença de carbonato, com frequência detectada na análise bioquímica, provavelmente resulta da absorção de dióxido de carbono para os cristais de fosfato de cálcio. Os homens apresentam formação de cálculos de cálcio com maior frequência do que as mulheres, enquanto nas crianças o aparecimentos desses cálculos é pouco comum.

O oxalato de cálcio precipita em meio ácido ou com pH neutro, e o fosfato de cálcio – hidroxiapatita $Ca_{10}(PO)_6(OH)_2$ – forma cálculos em pH urinário normal (entre 6 e 6,5). O ácido úrico, sendo pouco solúvel, sofre cristalização em pH baixo (5,3) e forma cálculos. O fosfato de magnésio e amônio (estruvita) forma cálculos em pH alcalino, em que os níveis de amônio são altos. Esses cálculos tendem a se formar na pelve renal, contudo parecem não se fixar às papilas, diferindo dos cálculos de cálcio. Entretanto, os cálculos de estruvita tendem a desenvolver-se em núcleos preexistentes, nos quais há infecção por organismos como Proteus e consequente alcalinização da urina. Esses cálculos podem tornar-se grandes, formar cilindros da pelve renal e apresentar aspecto coraliforme. Pode haver formação de cálculos mistos diante da obstrução causada por cristais de cálcio ou ácido úrico (ou cálculos) seguida de infecção e subsequente deposição de sais de amônio.

Hipercalciúria e cálculos de cálcio

A homeostasia do cálcio é mantida pelo hormônio da paratireoide (PTH) e pelo 1,25-di-hidroxicolecalciferol [$1,25(OH)_2D$]. Ambos afetam a reabsorção óssea pelos osteoclastos. O PTH diminui a reabsorção de fósforo e aumenta a de cálcio pelas células tubulares renais. Também provoca o aumento da síntese de $1,25(OH)_2D$, que atua na mucosa do intestino delgado induzindo o aumento da absorção de cálcio e fósforo. Baixos níveis séricos de cálcio ionizado aumentam a secreção de PTH, enquanto baixos níveis séricos de fósforo estimulam a síntese de $1,25(OH)_2D$.

Cerca de 40% dos pacientes com cálculos de cálcio apresentarão hipercalciúria. Esta, por sua vez, é definida como a excreção urinária diária de cálcio com um excesso de 0,1 mmol/kg (Houillier, 1998). A elevação da concentração urinária de cálcio pode resultar de um aumento da absorção intestinal de cálcio, da falta de uma reabsorção tubular renal adequada de cálcio, da reabsorção ou da perda de cálcio a partir dos ossos ou de uma combinação desses fatores. São poucos os casos de hipercalciúria em que é possível identificar um processo patológico subjacente. Na maioria das vezes, contudo, trata-se de uma hipercalciúria primária ou idiopática (HI). Embora o mecanismo exato da hipercalciúria permaneça desconhecido nesse distúrbio, é mais provável que ocorra uma combinação de fatores, incluindo aqueles anteriormente listados. Foram propostas três hipóteses para explicar a patofisiologia da HI: a possível existência de defeitos no conteúdo de ácidos graxos das membranas celulares, o aumento da expressão de receptores

de vitamina D ou de cálcio da 25-hidroxivitamina $D_1\alpha$-hidroxilase ou uma doença nos monócitos (Bataille, 1998).

A perda excessiva de cálcio pela urina e a possível formação de cálculos podem ser eventos secundários a uma variedade de condições. A hipercalciúria, por exemplo, pode ocorrer diante do aumento da absorção de cálcio a partir do intestino. Isso acontece quando há perda excessiva de fósforo a partir dos rins e os níveis séricos de fósforo estão baixos, bem como diante do aumento dos níveis séricos de $1,25(OH)_2D$ com níveis séricos de fósforo normais. O aumento da reabsorção óssea pode se dar com imobilização do esqueleto, doença óssea de progressão rápida, tireotoxicose e doença de Cushing, conduzindo à hipercalciúria. O cálcio pode ser perdido a partir dos ossos como resultado da existência de tumores osteolíticos e também de doença renal, como acidose tubular renal distal e medula renal esponjosa. Sarcoidose, vitamina D em excesso e furosemida também podem causar hipercalciúria renal.

Cerca de 5 a 10% dos cálculos de cálcio estão associados ao hiperparatireoidismo primário. Nesse distúrbio, o aumento da renovação mineral óssea e a hipercalcemia constituem causas importantes de hipercalciúria. Os pacientes afetados por vezes apresentam sintomas associados aos cálculos, podendo haver depósitos de fosfato de cálcio no tecido renal, na córnea e em outros órgãos.

A hipercalciúria dietética é causa incomum de formação de cálculos de cálcio. Está associada à ingestão de grandes quantidades de cálcio (da ordem de 3 a 4 g/dia) e proteínas. A ingestão normal recomendada para indivíduos adultos é de 800 mg/dia.

Conforme já mencionado, os cálculos de oxalato de cálcio são os mais comuns. Podem se formar a partir de um excesso de oxalato e ácido úrico na urina, e este último serve de ninho para abrigar sua formação. Os agregados de oxalato de cálcio recém-formados têm diâmetro aproximado de 20 a 25 µm e, portanto, são bem menores do que o canal de passagem dos ductos coletores. A aderência à superfície epitelial aparentemente permite aos cálculos continuarem crescendo, em vez de serem excretados. A formação de cálculos de fosfato de cálcio é favorecida por uma urina menos ácida, conforme se observa na acidose tubular renal, nos casos de infecção e em indivíduos que consomem grandes quantidades de álcali. Tais cálculos são também observados no hiperparatireoidismo primário, ainda que a urina apresente pH dentro da faixa considerada normal. Em um paciente exposto ao calor e à desidratação, esses fatores podem contribuir para que haja um aumento dos níveis urinários de solutos, seguido da cristalização e formação de cálculos.

Hiperoxalúria

A maior parte dos cálculos de cálcio (70–80%) contém oxalato. Uma parte do oxalato contido na urina provém de bebidas (chá, chocolate, café, Coca-Cola), vegetais (feijão, ruibarbo, espinafre), nozes, frutas em bagas e cítricos. O oxalato também deriva do ácido ascórbico.

O sistema gastrintestinal (GI) exerce papel importante na homeostasia do oxalato. A absorção de oxalato aumenta com a diminuição da ingestão de cálcio e magnésio. Enfermidades que afetam o intestino delgado, como a doença de Crohn, a ressecção do íleo e a cirurgia de desvio intestinal, podem resultar em absorção excessiva de oxalato, com subsequente excreção pela urina. A má absorção aliada à esteatorreia provoca perda de cálcio sob a forma de sabão, enquanto a má absorção com aumento concomitante da quantidade de sais biliares que permanecem no intestino é considerada promotora da absorção de oxalato no cólon. Além disso, a ausência de *Oxalobacter formigenes* do trato intestinal de pacientes com fibrose cística parece conduzir ao aumento da absorção de oxalato e, em consequência, ao risco aumentado de hiperoxalúria (Sidhu, 1998).

Outras causas de hiperoxalúria incluem deficiência de piridoxina e hiperoxalúria primária. Esta, por sua vez, é uma rara condição de herança autossômica recessiva associada à deficiência de oxoglutarato carboligase. Na fase de adulto de jovem, o indivíduo apresenta oxalose sistêmica e insuficiência renal. Para o tratamento desses pacientes, têm sido realizadas tentativas de transplante renal e administração de altas doses de piridoxina ou nicotinamida.

Hiperuricúria

A excreção excessiva de ácido úrico pode ser devida à ingestão dietética excessiva de purinas (fígado, feijão desidratado, certos tipos de peixe, carne) ou a diversos processos patológicos. A produção endógena de ácido úrico está aumentada na gota, nas doenças de armazenamento de glicogênio, na síndrome de Lesch-Nyhan, em muitas leucemias e nos tumores tratados com necrose celular associada. A quimioterapia e a irradiação podem levar ao aumento da destruição de células tumorais (nucleotídeo/purinas formam ácido úrico), que pode causar insuficiência renal aguda secundária à obstrução tubular e ureteral por massas de cristais de ácido úrico.

Na gota, cerca de 20% dos pacientes apresentam formação de cálculos que, em sua maioria, são constituídos por ácido úrico puro ou uma mistura de ácido úrico com cálcio. Calor, desidratação e produção de urina descomunalmente ácida são fatores que contribuem para a formação de cálculos. A nefropatia da gota ocorre com a deposição de urato de sódio na medula, mesmo na ausência de cálculos, e as massas de cristais podem causar obstrução dos ductos coletores terminais nos rins. Fármacos uricosúricos causam potenciais problemas com um débito massivo de ácido úrico nos primeiros 3 a 4 dias de tratamento.

Normalmente, cerca de um terço do ácido úrico formado é degradado por ação de bactérias no cólon. Ausência de bactérias ou desvios intestinais podem provocar o aumento da absorção de ácido úrico a partir do intestino. Como os pacientes com ileostomia perdem grandes volumes de líquido alcalino a partir do intestino, secretam uma urina ácida e concentrada e são propensos a produzir cálculos de ácido úrico.

A excreção de ácido úrico para indivíduos adultos é, em média, de 500 a 600 mg/24 horas. Tanto a concentração de solutos quanto o pH parecem ser importantes para a solubilidade do ácido úrico e do urato. Sendo um ácido fraco, o ácido úrico dá origem à forma livre insolúvel e não dissociada do próprio ácido úrico e a um urato (que é mais solúvel em presença de um pouco de sódio e potássio) em pH 5,5. A quantidade de ácido úrico livre presente na urina irá diminuir à medida que o pH aumentar, de modo que em pH 7 o ácido úrico torna-se mais solúvel do que o urato. Diante de altas concentrações de sais, o urato passa a ser menos solúvel. Se o volume de urina for pequeno, a solubilidade do ácido úrico em pH ácido será excedida.

Enquanto grandes quantidades de cristais de ácido úrico são regularmente observadas no sedimento urinário, a formação de cálculos de ácido úrico é incomum. Esses cristais formam um sedimento que pode obstruir o néfron sem haver formação de um cálculo. Por outro lado, cristais de ácido úrico e de urato ácido de sódio são encontrados em núcleos de cálculos de cálcio. Os indivíduos mais normais, com pH 6, produzem uma urina saturada de ácido úrico e, no entanto, não formam cálculos. Aparentemente, a formação dos cálculos requer mais acidez ou desidratação.

Cálculos de cistina

Os cálculos de cistina formam-se em pacientes com distúrbios hereditários envolvendo o transporte de aminoácidos (ver adiante, em "Cistinúria"). Subsequentemente, cistina, ornitina, lisina e arginina são excretadas em grandes quantidades pela urina. Entre esses aminoácidos, somente a cistina forma cristais e cálculos. A cistina permanece insolúvel até o pH chegar a 7,4, enquanto os cálculos formam-se na faixa de pH urinário normal. Portadores heterozigotos dos genes dessa doença apresentam níveis urinários aumentados de cistina, porém não formam cálculos. Indivíduos homozigotos, por outro lado, formam cálculos. É necessário medir os níveis de cistina na urina de 24 horas para identificar potenciais pacientes produtores de cálculos, e essa medida deve ser obtida sempre que forem encontrados cristais de cistina em amostras colhidas ao acaso.

Cálculos raros

Cálculos com sulfonamidas já foram descritos, e há relatos de cálculos de sílica em pacientes que ingeriram gel de sílica por tempo prolongado. O Triamterene (Dyazida, Dyrenium), um agente diurético relativamente insolúvel, pode contribuir para a formação de cálculos. Esse composto pode formar cálculos de 1 a 2 mm e de cor mostarda, que exibem um fluorescência azul ao serem dissolvidos em butanol e expostos à luz UV. Há raras descrições da formação de cálculos de adenina em crianças com deficiência enzimática hereditária e hiperuricemia. Cálculos de xantina são incomuns e podem estar associados a um distúrbio genético com ausência de xantina oxidase.

Testes laboratoriais utilizados para investigar agentes formadores de cálculos

Exames de urina

1. Urinálise de rotina, teste qualitativo para cistina e cultura de urina. A hematúria é um achado constante diante da presença de cálculos, mesmo nos casos assintomáticos. A proteinúria não constitui uma característica usual da doença por cálculos, contudo, diante do dano tubular renal, pode haver aumento da excreção de proteínas plasmáticas de baixo peso molecular, tais como β_2-microglobulina e um pouco de albumina. É incomum encontrar cilindros de eritrócitos, bem como outros tipos de cilindros. Os leucócitos estão presentes em número aumentado quando há infecção, de modo que podem ser obtidos resultados elevados no teste com tiras reativas para nitrito e esterase leucocitária. Múltiplos aglomerados de células de transição não malignas podem ser encontrados na urina de pacientes com doença por cálculos, podendo ser úteis no diagnóstico dos cálculos na ausência de suspeitas.
2. Amostra de urina de 24 horas: sódio, cálcio, fósforo, ácido úrico, oxalato e depuração da creatinina. Foi demonstrado que os valores de supersaturação para amostras de urina de 24 horas refletem de forma acurada as composições dos cálculos (Asplin, 1998). Alguns autores sugerem que manchas de amostras de urina são suficientes para realizar a avaliação metabólica de formadores de cálculos, ainda que seja necessário obter três amostras de urina em razão da variação de um dia a outro, para eliminar as dúvidas significativas de um único resultado (Strohmaier, 1997).
3. A determinação do pH urinário de uma amostra fresca é importante para determinar os tipos de cristais que podem precipitar, por exemplo, ácido úrico com baixo pH (de 5–5,5) e trifosfato com urina alcalina.

Bioquímica do soro

Os testes adequados incluem determinações de cálcio, fósforo, ácido úrico e eletrólitos.

Análise do cálculo

Os cálculos podem exibir tamanhos variados e em geral são descritos como grãos de areia, cascalho ou pedras. As características físicas dos vários cálculos em raros casos permitem identificá-los, contudo alguns pontos merecem atenção. Os cálculos de ácido úrico e urato são tipicamente amarelos a castanho-avermelhados, e apresentam dureza moderada. Os cálculos de fósforo costumam ser pálidos e friáveis. Os de oxalato de cálcio são bastante duros, muitas vezes exibem cor escura e sua superfície é tipicamente rugosa. E os de cistina têm cor castanho-amarelada e parecem um pouco gordurosos.

Existem diversos métodos disponíveis para análise dos cálculos, tais como cristalografia óptica, difração de raios X e espectroscopia por infravermelho. A análise por feixe de elétrons e a espectroscopia de massa também são utilizadas. Um método simplificado para análise de cálculos renais foi apresentado por Farrington et al. (1980). Um método quantitativo para 5 em cada 8 substâncias medidas com frequência foi descrito utilizando os métodos de bioquímica clínica disponíveis: cálcio, fósforo, magnésio, amônio e ácido úrico. Cistina, oxalato e carbonato são detectados por meios qualitativos e interpretados com resultados quantitativos para caracterizar os cálculos. A maioria dos laboratórios envia amostras de cálculos para laboratórios mais especializados para serem submetidos a análises bioquímicas, nos quais são realizados tanto testes bioquímicos quanto testes especiais para determinar a composição dos cálculos.

Método para exame geral dos cálculos

1. Lavar o(s) cálculo(s) para eliminar resíduos de sangue, muco, soluções conservantes e assim por diante. Colocar os cálculos em um béquer cobrir com várias camadas espessas de gaze mantidas firmemente no lugar com elásticos de borracha e lavar sob água corrente fria. Remover o excesso de água, retirar as gazes com cuidado e secar o becker com os cálculos em estufa. Enxaguar os cálculos menores com água com o auxílio de uma pisseta (não usar água corrente).
2. Registrar as dimensões do(s) cálculo(s).
3. Descrever brevemente a cor e a textura da superfície externa do cálculo. Ele deve ser fotografado para fins de registro.
4. Cortar, triturar ou partir o cálculo para examiná-lo internamente. Verificar se há algum corpo estranho que possa ter atuado como núcleo de sua formação. Descrever a cor e a textura da parte interna, bem como das camadas interiores, caso existam.
5. Reduzir os cálculos pequenos a pó fino, pulverizando-os com auxílio de almofariz e pilão.
6. Recomenda-se, sempre que possível, quando houver um cálculo muito grande, fazer análises separadas das camadas que aparentemente apresentarem constituição diferente.

Como os cálculos mais pequenos são constituídos de oxalato de cálcio, a melhor forma de analisá-los é transferir todo o pó disponível para um tubo de ensaio. (Se o cálculo for muito pequeno, pode ser colocado diretamente no tubo de ensaio e esmagado com o auxílio de uma espátula.) Os reagentes utilizados na determinação química de cálculos raros são descritos na edição de 1996 deste livro. É importante contar com material sabidamente correto para testar os reagentes.

Exame radiológico

Cálculos assintomáticos às vezes são encontrados. A maioria dos cálculos é radiopaca, com exceção do ácido úrico puro e da rara xantina. Os cálculos de cistina são opacos em razão de seu conteúdo de enxofre.

Triagem urinária de doenças metabólicas hereditárias

Há muitos anos, a urina vem sendo utilizada na triagem de doenças metabólicas, em particular daquelas que resultam de uma predisposição genética. Em diversas doenças, tanto um metabólito anormal quanto uma quantidade excessiva de metabólito normal são excretados pela urina. Por serem incomuns, tais condições estão associadas a sintomas frequentemente inespecíficos, alguns dos quais são tratáveis mediante a confirmação do diagnóstico inicial, sendo necessário realizar exames de sangue e urina utilizando técnicas que apresentam alta seletividade e sensibilidade. Foram identificados inúmeros erros inatos do metabolismo, de modo que a presente seção descreve apenas algumas das doenças mais comuns.

Aminoacidúrias

A excreção de um ou mais aminoácidos pela urina pode ser decorrente tanto de um bloqueio de uma das principais vias metabólicas (tipo do fluxo excessivo) quanto de uma deficiência na função tubular renal (tipo renal). A fenilcetonúria é um exemplo de aminoacidúria por fluxo excessivo, em que há acúmulo de um substrato enzimático e de outros metabólitos na via, acarretando aumento dos níveis de líquidos corporais e intensificação da excreção urinária do substrato. Diferentemente das demais doenças por fluxo excessivo, nas aminoacidúrias do tipo renal não se observa elevação dos níveis de aminoácidos no sangue, pois o defeito primário afeta o mecanismo de reabsorção tubular renal. Um exemplo de aminoacidúria no transporte renal é a cistinúria.

Fenilcetonúria. A fenilcetonúria é um distúrbio de herança autossômica recessiva, em que há ausência da enzima fenilalanina hidroxilase. Indivíduos de ambos os sexos são igualmente afetados, e a doença apresenta uma incidência de 1 em 11.000. A heterogeneidade alélica pode ser bastante extensa, em particular nos Estados Unidos (Guldberg, 1996). O retardo mental constitui o principal achado clínico, e a restrição alimentar à fenilalanina mostrou-se eficaz no tratamento dos pacientes afetados.

Como não é convertida em tirosina nessa condição, a fenilalanina e outros metabólitos normais acumulam-se em quantidades anormais. Os níveis plasmáticos de fenilalanina e ácido fenilpirúvico tornam-se elevados. Os níveis urinários de ácido fenilpirúvico (os mais altos), ácido fenilacético e fenilalanina também aumentam. Os níveis urinários de ácido indolacético e de outros indóis oriundos do metabolismo alterado do triptofano, além dos níveis de indicam (um indol), também encontram-se aumentados. Há diminuição da excreção do ácido 5-hidroxi-indolacético, paralelamente aos níveis séricos diminuídos de 5-hidroxitriptamina. A urina e o suor desses pacientes exibem um odor característico de rato ou mofo, em razão da presença do ácido fenilacético.

Métodos. As tiras reativas Phenistix contêm sulfato férrico de amônio, sulfato de magnésio e ácido ciclo-hexilsulfâmico. Trinta segundos após a imersão na urina, a cor da área de teste é comparada com as cores da cartela fornecida pelo fabricante. O resultado do teste é positivo quando a cor observada varia entre cinza e cinza-esverdeado. Esse teste detecta concentrações da ordem de 5 a 10 mg/dL. Salicilatos e metabólitos de derivados da fenotiazina podem provocar o aparecimento de uma cor que varia do rosa ao púrpura. O método do HPLC com coluna de troca iônica tem-se mostrado conveniente como teste quantitativo confirmatório de amostras anormais (Reilly, 1998).

Alcaptonúria. Normalmente, a fenilalanina e a tirosina são metabolizadas a ácido homogentísico (ácido di-hidroxifenilacético) que, em seguida, é oxidado a ácido maleilacetoacético. Na alcaptonúria, há deficiência da enzima ácido homogentísico oxidase (homogentisic acid oxidase, HAO), e o ácido homogentísico é excretado pela urina em grande concentração. A urina adquire uma cor marrom-negra característica quando deixada em repouso ou em pH alcalino. Os pacientes com alcaptonúria produzem uma pigmentação que varia do azul ao negro nas cartilagens e no tecido conjuntivo, e a doença com frequência não é diagnosticada até o desenvolvimento de uma artrite.

Métodos. Os métodos de triagem incluem testes com cloreto férrico e nitrato de prata. Observa-se o aparecimento de uma coloração azul-escura quando 2 gotas de uma solução de cloreto férrico a 10% são adicionadas a 2 mL de urina com ácido homogentísico. O teste com nitrato de prata envolve a adição de 4 mL de nitrato de prata a 3% a 0,5 mL de urina, a homogeinização e, em seguida, a adição de várias gotas de NH_4OH a 10%. O ácido homogentísico irá causar o aparecimento de uma cor negra. Os métodos confirmatórios incluem cromatografia em papel ou TLC e eletroforese capilar. Esses métodos devem distinguir o ácido homogentísico do ácido gentísico, que é um metabólito da aspirina.

Tirosinúria. A tirosinemia com tirosinúria ocorre diante do metabolismo anormal da tirosina proveniente da dieta ou da fenilalanina. Essa condição pode ser parte de um distúrbio de aminoácidos generalizado associado à doença hepática, ou pode representar um dos vários distúrbios genéticos que envolvem o metabolismo da tirosina. Os cristais de tirosina podem aparecer na urina sob a forma de cristais finos e sedosos, dispersos ou agregados que formam feixes. Apresentam cor que varia do marrom ao negro, precipitam em pH ácido e são solúveis em álcali. Pequenas quantidades de tirosina podem ser detectadas na urina de indivíduos normais.

A hipertirosinemia transitória pode ocorrer em bebês que nascem com baixo peso corporal ou em bebês prematuros, como condição benigna. Essas crianças são tipicamente assintomáticas e não apresentam doença hepática nem renal. Os níveis elevados de tirosina ocasionalmente podem ser acompanhados pela elevação passageira dos níveis de fenilalanina. A tirosina e os ácidos fenólicos, p-hidroxifenillático e p-hidroxifenilpirúvico, são excretados pela urina em concentrações acima do normal. A natureza do defeito enzimático ainda não foi caracterizada, e os níveis de tirosina desses pacientes usualmente voltam ao normal em poucas semanas ou meses.

A tirosinemia hereditária de tipo I (tirosinose) é um distúrbio autossômico recessivo caracterizado por defeitos nas enzimas fumarilacetoacetato hidrolase e maleilacetoacetato hidrolase. A succinilacetoacetona e a succinilacetona acumulam-se e inibem a função renal, a atividade de várias enzimas hepáticas e a porfobilinogênio sintetase. Os pacientes podem apresentar insuficiência hepática, disfunção renal, raquitismo e sintomas similares aos da porfiria intermitente aguda. O hepatoma é uma complicação tardia. Pode haver aminoacidúria generalizada, fosfatúria, glicosúria e uricosúria. A terapia baseia-se em uma dieta com baixo teor de tirosina/fenilalanina.

A tirosinemia de tipo II (síndrome de Richner-Hanhart) é uma deficiência associada à herança autossômica recessiva da enzima tirosina aminotransferase. Os pacientes apresentam tirosinemia, tirosinúria e aumento dos níveis de ácidos fenólicos urinários. O metabolismo dos demais aminoácidos, a função renal e a função hepática permanecem normais. É comum os pacientes apresentarem erosão da córnea, da sola dos pés e das palmas das mãos e, às vezes, retardo mental. A terapia é centralizada em uma dieta com baixo teor de tirosina/fenilalanina.

Métodos. O teste do nitrosonaftol para tirosina é um método de triagem inespecífico e deve ser confirmado por cromatografia ou ensaio sorológico quantitativo para esse aminoácido. A tirosina e a tiramina formam complexos vermelhos solúveis com o nitrosonaftol.

Doença da urina em xarope de bordo (MSUD). A MSUD faz parte de um grupo de doenças associadas ao metabolismo anormal dos aminoácidos de cadeia ramificada. Entre elas, estão a hipervalinemia, a acidemia isovalérica causadora do odor de "pés suados" e outras doenças raras. Foram descritas várias formas clínicas diferentes da MSUD, bem como diversos sítios de desarranjo bioquímico. O tipo clássico da MSUD – a condição de herança autossômica recessiva – é marcada por vômitos neonatais severos, ataques convulsivos, estupor, respirações irregulares e, por vezes, hipoglicemia. Se não for tratada, os pacientes rapidamente entram em coma e morrem. Leucina, isoleucina, valina e seus respectivos cetoácidos estão aumentados no plasma e são excretados pela urina. Acredita-se que as descarboxilases defeituosas, entre outras enzimas, previnem a conversão dos cetoácidos em ácidos graxos. Também foram descritas formas de MSUD intermitente, intermediária, tiamina-responsiva e com deficiência de di-hidrolipoil desidrogenase (E3) (Holmes, 1997).

A urina dos pacientes com MSUD apresenta odor semelhante ao xarope de bordo, açúcar caramelizado ou caril (curry), cuja fonte é incerta. A presença dos cetoácidos na urina pode ser demonstrada na primeira semana de vida.

Métodos. O teste de triagem com dinitrofenil-hidrazina indica a presença de α-cetoácidos na urina. As hidrazonas insolúveis formam-se a partir da reação dos grupos carbonila com a dinitrofenil-hidrazina. O resultado é positivo em casos de MSUD e possivelmente na fenilcetonúria (ácido fenilpirúvico), na histidinemia (ácido pirúvico imidazol) e na má absorção de metionina (oasthouse syndrome). O teste é positivo na cetonúria decorrente de outras doenças hereditárias e causas diversas. É preciso realizar um teste de triagem preliminar para detecção de cetonas.

Procedimento

1. Os reagentes e os controles (ácido cetoglutárico, 25 mg em 100 mL de urina normal) devem estar à temperatura ambiente.
2. Adicionar 10 gotas de reagente (100 mg de 2,4-dinitrofenil-hidrazina a 100 mL de HCl 2 N) a 1 mL de urina limpa.
3. Dentro de 10 minutos, o aparecimento de um precipitado amarelo ou branco-calcário indica uma reação positiva. Sua intensidade deve ser igual ou maior do que a precipitação do controle.

Como métodos confirmatórios, podem ser utilizadas as análises de urina por cromatografia gasosa, TLC ou espectroscopia por ressonância nuclear magnética (NMR) (Holmes, 1997).

Cistinúria. Trata-se de um distúrbio de aminoácidos comum que afeta igualmente indivíduos de ambos os sexos, com uma incidência estimada em cerca de 1:10.000 (homozigotos) e em proporções maiores na população heterozigota. Nos programas de triagem em massa para crianças, a forma homozigota é detectada quase com a mesma frequência que a fenilcetonúria. O transporte defeituoso da cistina pelas células epiteliais dos túbulos renais e do intestino é transmitido como caráter autossômico recessivo. O defeito básico permanece desconhecido. Embora grandes quantidades de ácidos dibásicos, ornitina, lisina e arginina também sejam excretadas nessa doença, a cistina é o único aminoácido que sofre cristalização e forma cálculos como manifestação clínica.

A cistinose, um distúrbio de herança recessiva cuja causa é desconhecida, caracteriza-se pela deposição intracelular de cristais de cistina nos lisossomos. Esses cristais podem se acumular nos rins, nos olhos, na medula óssea e no baço. Na forma severa da doença, o paciente apresenta fotofobia, insuficiência renal, raquitismo e falha de crescimento. Diante do comprometimento tubular renal, há desenvolvimento da síndrome de Fanconi, aminoacidúria generalizada e glicosúria. Foram descritas as variáveis benigna e intermediária da cistinose. Diferentemente da cistinúria, a perda de cistina observada na cistinose é concomitante à perda de outros aminoácidos pelas urina.

Em certos casos, a cistina é detectada na urina de pacientes com diversas doenças tubulares renais. A cistina é excretada com outros aminoácidos na doença de Wilson, na doença de Lowe e na aminoacidúria da doença de Hartnup.

Métodos. A primeira urina da manhã deve ser examinada quanto à presença de cristais hexagonais incolores de cistina. Esse aminoácido nem sempre sofre cristalização na urina concentrada, ainda que ocorra em grande concentração.

O teste do cianeto-nitroprussiato utilizado para determinação qualitativa da cistina urinária é a modificação de Brand da reação de nitroprussiato de Legal. A cistina é reduzida à cisteína pelo cianeto de sódio, e os grupos sulfidrila livres, então, reagem com o nitroprussiato e produzem uma cor púrpura-avermelhada. Reações positivas são produzidas pela cisteína, cistina, homocistina e cetonas (vermelho-escuro). O teste qualitativo separa as faixas de excreção normal, heterozigota e homozigota. O limite inferior desse teste era de 35 a 60 µmol de cistina/mol de creatinina, que corresponde à faixa de excreção heterozigota. Indivíduos formadores de cálculos homozigotos usualmente excretam mais de 300 mg/g de creatinina e também são detectados por esse teste.

Procedimento

1. Transferir entre 3 e 5 mL de urina para um tubo de ensaio e adicionar 2 mL de uma solução de cianeto de sódio (5 g/dL em água), deixando a mistura em repouso por 10 minutos. É importante controlar o tempo. Uma solução controle deve ser tratada da mesma forma. Para um controle positivo, dissolver 5 mg de cistina em 10 mL de HCl 0,1 N, diluindo a 100 mL com urina normal.
2. Adicionar a solução aquosa de nitroprussiato de sódio (5 g/dL) recentemente preparada, gota a gota (cerca de 5 gotas), e misturar.
3. Ler imediatamente, determinando se a reação é positiva ou negativa. Uma cor púrpura-avermelhada irá surgir na presença da cistina. Resultados que indicam apenas "traços" do aminoácido também devem ser comunicados. Uma amostra de urina normal deve fornecer um resultado fracamente positivo, indicando "traços" de aminoácido.

É possível refinar a identificação e a quantificação da cistina por TLC ou cromatografia de troca iônica, ou ainda por eletroforese de alta voltagem.

Homocistinúria. A forma clássica da homocistinúria deve-se a uma deficiência de cistationina β-sintase, que é a enzima catalisadora da formação de cistationina a partir da homocistina e da serina na via da metionina. A homocisteína é rapidamente oxidada à homocistina. Esta se acumula com a metionina e é excretada pela urina. Crianças com essa doença podem apresentar ataques convulsivos, trombose, retardo mental, aracnodactilia e sifoescoliose. As manifestações que envolvem o tecido conjuntivo são consideradas resultantes do acúmulo da homocisteína intermediária, que interfere nas ligações cruzadas do colágeno.

A amostra de urina a ser analisada deve ser recém-colhida, uma vez que a homocistina é lábil. O teste do cianeto-nitroprussiato, anteriormente descrito, é positivo. A análise bioquímica quantitativa revela a presença de níveis elevados de homocistina, metionina e dissulfeto de cisteína-homocisteína. Os níveis urinários são monitorados para acompanhar os efeitos da dieta com restrição de metionina utilizada no tratamento dessa doença.

Outras modalidades de exames de urina

Foi desenvolvido um imunoensaio nefelométrico de aglutinação em látex para determinar os níveis de fetoproteína básica (BFP) na urina. Os níveis dessa substância podem estar elevados em casos de cálculos no ureter, infecções e cânceres de próstata e bexiga urinária, tornando a BFP um marcador inespecífico de inflamação e de tumores (Itoh, 1998).

O teste urinário da mancha de Trinder, realizado por médicos na sala de emergências, é um teste de triagem sensível para detecção de salicilatos.

Rendl et al. (1998) descreveram um teste semiquantitativo rápido para detecção de iodo urinário cujo uso é conveniente para estudos epidemiológicos da deficiência de iodo, particularmente em países em desenvolvimento.

Por fim, um ensaio com anticorpo monoclonal para detecção de ligações cruzadas de piridina livre na urina pode ajudar a identificar a reabsorção óssea em pacientes com osteoporose, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo e doença óssea de Paget (Gomez, 1996).

O exame citopatológico da urina é comumente realizado para detecção de malignidades. Hoje em dia, existem testes de ELISA e FISH que detectam carcinoma de bexiga urinária. Esses testes são discutidos com maior detalhamento no Capítulo 75.

Referências bibliográficas

Anderson NG, Anderson NL, Tollaksen SL: Proteins of human urine. I. Concentration and analysis by two--dimensional electrophoresis. Clin Chem 1979; 25:119.

Arao S, Matsuura S, Nonomura M, et al: Measurement of urinary lactoferrin as a marker of urinary tract infection. J Clin Microbiol 1999; 37:553–557.

Armstrong LE, Soto JA, Hacker FT Jr, et al: Urinary indices during dehydration, exercise, and rehydration. Int J Sport Nutr 1998; 8:345–355.

Asplin J, Parks J, Lingeman J, et al: Supersaturation and stone composition in a network of dispersed treatment sites. J Urol 1998; 159:1821–1825.

Bakris DL: Microalbuminuria: Prognostic implications. Curr Opin Nephrol Hypertens 1996; 5:219–223.

Bataille P, Fardellone P, Ghazali A, et al: Pathophysiology and treatment of idiopathic hypercalciuria. Curr Opin Rheumatol 1998; 10:373–388.

Belmonte MM, Sarkozy E, Harpur E: Urine sugar determination by the two drop Clinitest method. Diabetes 1967; 16:557.

Ben-Ezra J, Bork L, McPherson RA: Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. Clin Chem 1998; 44: 92–95.

Neste estudo, os autores comparam o analisador de urinálise automático Sysmex UF-100 à microscopia manual. O UF-100 apresentou boa correlação com a microscopia para detecção de elementos celulares e cilindros na urina.

Bibbo M (ed): Comprehensive Cytopathology, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1997.

Blondheim SH, Margoliash E, Shafur E: A simple test for myohemoglobinuria (myoglobinuria). JAMA 1958; 167:453.

Bowden FJ: Reappraising the value of urine leukocyte esterase testing in the age of nucleic acid amplification. Sex Transm Dis 1998; 25:322–326.

Bruno C, Minetti C, Shanske S, et al: Combined defects of muscle phosphofructokinase and AMP deaminase in a child with myoglobinuria. Neurology 1998; 50:296–298.

Bullimore SP, Keyworth C: Finding diabetes – a method of screening in general practice. Br J Gen Pract 1997; 47:371–374.

Chiang SC, Li SF: Separation of porphyrins by capillary electrophoresis in fused-silica and ethylene vinyl acetate copolymer capillaries with visible absorbance detection. Biomed Chromatogr 1997; 11:366–370.

Cone TE Jr: Diagnosis and treatment: Some syndromes, diseases and conditions associated with abnormal coloration of the urine or diaper. Pediatrics 1968; 41:654.

Cortvriend J, Van Nuffel J, Van den Bosch H, et al: Nonparasitic chyluria: A case report and review of the literature. Acta Urol Belg 1998; 66:11–15.

Davidsohn I, Henry JB (eds): Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, 15th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1974.

de Mendoza SG, Kashyap ML, Chen CY, et al: High density lipoproteinuria in nephrotic syndrome. Metabolism 1976; 25:1143.

Deacon AC, Peters TJ: Identification of acute porphyria: Evaluation of a commercial screening test for urinary porphobilinogen. Ann Clin Biochem 1998; 35:726–732.

Deutsch JC: Gas chromatographic/mass spectrometric measurement of ascorbic acid and analysis of ascorbic acid degradation in solution. Methods Enzymol 1997; 279:13–24.

Dinda AK, Saxena S, Guleria S, et al: Diagnosis of glomerular haematuria: Role of dysmorphic red cell, G1 cell, and bright-field microscopy. Scand J Clin Lab Invest 1997; 57:203–208.

Este estudo mostra que a presença de células sanguíneas vermelhas dismórficas nas urina apresenta sensibilidade (82%) e especificidade (100%) excelentes para o diagnóstico de doença glomerular.

Farrington CJ, Liddy ML, Chalmers AH: A simplified sensitive method for analysis of renal calculi. Am J Clin Pathol 1980; 73:96.

Favaro S, Bonfante L, D'Angelo A, et al: Is the red cell morphology really useful to detect the source of hematuria? Am J Nephrol 1997; 17:172–175.

Fenili D, Pirovano B: The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100). Clin Chem Lab Med 1998; 36:909–917.

Fracchia JA, Motta J, Miller LS, et al: Evaluation of asymptomatic microhematuria. Urology 1995; 46:484–489.

Free HM (ed): Modern Urine Chemistry. New York, Bayer Corporation, 1996.

Friderichsen B, Maunsbach M: Glycosuric tests should not be employed in population screening for NIDDM. J Public Health Med 1997; 19:55–60.

Fukuzaki A, Kaneto H, Ikeda S, et al: Determining the origin of hematuria by immunocytochemical staining of erythrocytes in urine for Tamm–Horsfall protein. J Urol 1996; 155:248–251.

Gerber LM, Johnson K, Alderman MH: Assessment of a new dipstick test in the screening for microalbuminuria in patients with hypertension. Am J Hypertens 1998; 11:1321–1327.

Os autores examinaram a aplicabilidade de um método de exame de urina com vareta medidora de nível para detecção de microalbuminemia. Esse teste apresentou especificidade de 90%, com valor preditivo negativo de 93 a 97%. A comparação entre a urina obtida ao acaso e a urina de 24 horas apresentou boa correlação.

Gomez B Jr, Ardakani S, Evans BJ, et al: Monoclonal antibody assay for free pyridinium cross-links. Clin Chem 1996; 42:1168–1175.

Govil YK, Sabanathan K, Scott D: Giant cell arteritis presenting as renal vasculitis. Postgrad Med J 1998; 74:170–171.

Gribble RK, Meier PR, Berg RL: The value of urine scree-

ning for glucose at each prenatal visit. Obstet Gynecol 1995; 86:405–410.
Guldberg P, Levy HL, Hanley WB, et al: Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: Report from the Maternal PKU Collaborative Study. Am J Hum Genet 1996; 59:84–94.
Henry JB (ed): Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 16th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1979.
Henry JB (ed): Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1984.
Henry JB (ed): Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 19th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1996.
Herbert LA, Dillon JJ, Middendorf DF, et al: Relationship between appearance of urinary red blood cell/white blood cell casts and the onset of renal relapse in systemic lupus erythematosus. Am J Kidney Dis 1995; 26:432–438.
Holmes E, Foxall PJ, Spraul M, et al: 750 MHz 1H NMR spectroscopy characterization of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease. J Pharm Biomed Anal 1997; 15:1647–1659.
Houillier P, Boulanger H: Hypercalciuria. Rev Prat 1998; 48:1213–1217.
Hughes C, Roebuck MJ: Evaluation of the IRIS 939 UDx flow microscope as a screening system for urinary tract infection. J Clin Pathol 2003; 56:844–859.
Itoh Y, Sakabe K, Kawai T: Basic fetoprotein in normal and pathologic urine. Ren Fail 1998; 20:239–241.
Johnson CD, Mole DR, Pestridge A: Post prandial alkaline tide: Does it exist? Digestion 1995; 56:100–106.
Jones RM, Lamb JH, Lim CK: Urinary porphyrin profiles by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry without the use of classical matrices. Rapid Commun Mass Spectrom 1995; 9:921–923.
Jou WW, Powers RD: Utility of dipstick urinalysis as a guide to management of adults with suspected infection or hematuria. South Med J 1998; 91:266–269.
Kesson AM, Talbolt JM, Gyory AZ: Microscopic examination of urine. Lancet 1978; 2:809.
Keverline JP: Recurrent rhabdomyolysis associated with influenza-like illness in a weight-lifter. J Sports Med Phys Fitness 1998; 38:177–179.
Khan SR, Atmani F, Glenton P, et al: Lipids and membranes in the organic matrix of urinary calcific crystals and stones. Calcif Tissue Int 1996; 59:357–365.
Killander J, Sjolin S, Zaar B: Rapid tests for ketonuria. Scand J Clin Lab Invest 1962; 14:311.
Kunin CM, Degroot JE: Self-screening for significant bacteriuria. JAMA 1975; 231:1349.
Kutter D: A chemical test strip to determine low concentrations of albumin and creatinine in urine. Lab Med 1998; 29:769–772.
Levy Y, George J, Ziporen L, et al: Massive proteinuria as a main manifestation of primary antiphospholipid syndrome. Pathobiology 1998; 66:49–52.
Livsey SA: Turbidimetric urine screening. Br J Biomed Sci 1995; 52:71–73.
Lizana J, Brito M, Davis MR: Assessment of five quantitative methods for determination of total proteins in urine. Clin Biochem 1977; 10:89.
Loun B, Astles R, Copeland KR, Sedor FA: Adaptation of a quantitative immunoassay for urine myoglobin. Predictor in detecting renal dysfunction. Am J Clin Pathol 1996; 105:479–486.
Luceri C, Caderni G, Lodovici M, et al: Urinary excretion of sucrose and fructose as a predictor of sucrose intake in dietary intervention studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5:167–171.
Luo JL, Deka J, Lim CK: Determination of 5-aminolaevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes and porphobilinogen in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. J Chromatogr A 1996; 722:353–357.
Luo J, Lamb JH, Lim CK: Analysis of urinary and faecal porphyrin excretion patterns in human porphyrias by fast atom bombardment mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 1997; 15:1289–1294.
Lyon ME, Ball CL, Lyon AW, Walpole E, Church DL: A preliminary evaluation of the interaction between urine specific gravity and leukocyte esterase results using Bayer Multistix and the Clinitek 500. Clin Biochem 2003; 36: 579–581.
McElderry LA, Tarbit I, Cassells-Smith AJ: Six methods for urinary protein compared. Clin Chem 1982; 28:356.
McGregor DO, Lynn KL, Bailey RR, et al: Clinical audit of the use of renal biopsy in the management of isolated microscopic hematuria. Clin Nephrol 1998; 49:345–348.
Miyajima H, Orii KE, Shindo Y, et al: Mitochondrial trifunctional protein deficiency associated with recurrent myoglobinuria in adolescence. Neurology 1997; 49:833–837.
Mogensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. N Engl J Med 1984; 310:356.
Mount DL, Green MD, Zucker JR, et al: Field detection of sulfonamides in urine: The development of a new and sensitive test. Am J Trop Med Hyg 1996; 55:250–253.
O'Connor WJ, Murphy M, Darby C, et al: Porphyrin abnormalities in acquired immunodeficiency syndrome. Arch Dermatol 1996; 132:1443–1447.
Ooi SB, Kour NW, Mahadev A: Haematuria in the diagnosis of urinary calculi. Ann Acad Med Singapore 1998; 27:210–214.
Ottinger C, Huber AR: Quantitative urine particle analysis: integrative approach for the optimal combination of automation with UF-100 and microscopic review with KOVA cell chamber. Clin Chem 2003; 617–623.
Panholzer TJ, Beyer J, Lichtwald K: Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine. Clin Chem 1999; 45:262–268.
Penders J, Fiers T, Delanghe JR: Quantitative evaluation of urinalysis test strips. Clin Chem 2002; 48:2236–2241.
Rasoulpour M, Banco L, Laut JM, et al: Inability of community-based laboratories to identify pathological casts in urine samples. Arch Pediatr Adolesc Med 1996; 150:1201–1204.
Reilly AA, Bellisario R, Pass KA: Multivariate discrimination for phenylketonuria (PKU) and non-PKU hyperphenylalaninemia after analysis of newborns' dried blood-spot specimens for six amino acids by ion-exchange chromatography. Clin Chem 1998; 44:317–326.
Rendl J, Bier D, Groh T, et al: Rapid urinary iodide test. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:1007–1012.
Rhee E, Santiago L, Park E, et al: Urinary IL-6 is elevated in patients with urolithiasis. J Urol 1998; 160:2284–2288.
Robinson RR, Glover SN, Phillippi PJ, et al: Fixed and reproducible orthostatic proteinuria. Am J Pathol 1961; 39:291.
Rockall AG, Newman-Sanders AP, al-Kutoubi MA, et al: Haematuria. Postgrad Med J 1997; 73:129–136.
Artigo de revisão sobre hematúria, segundo uma perspectiva clínica. Propõe o uso de um algoritmo racional para work-up *laboratorial e clínico de pacientes com hematúria.*
Rose MR, Kissel JT, Bickley LS, et al: Sustained myoglobinuria: The presenting manifestation of dermatomyositis. Neurology 1996; 47:199–123.
Schwartz S, Shorov V, Watson CJ: Studies of urobilinogen. IV. Quantitative determination of urobilinogen by means of Evelyn photoelectric colorimeter. Am J Clin Pathol 1944; 14:598.
Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D: Metabolic Basis of Inherited Diseases, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 1989.
Shihabi ZK: Myoglobinuria detection by capillary electrophoresis. J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 669:53–58.
Siddiqui AA, Sultana T, Buchholz NP, et al: Proteins in renal stones and urine of stone formers. Urol Res 1998; 26:383–388.
Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, et al: Absence of Oxalobacter formigenes in cystic fibrosis patients: A risk factor for hyperoxaluria. Lancet 1998; 352:1026–1029.
Simo-Alfonso EF, Ramis-Ramos G, Garcia-Alvarez-Coque MC, et al: Determination of sulphonamides in human urine by azo dye precolumn derivatization and micellar liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 670:183–187.
Singh PP, Pendse AK, Ahmed A, et al: A study of recurrent stone formers with special reference to renal tubular acidosis. Urol Res 1995; 23:201–203.
Strohmaier WL, Hoelz KJ, Bichler KH: Spot urine samples for the metabolic evaluation of urolithiasis patients. Eur Urol 1997; 32:294–300.
Este estudo descreve o work-up *clínico e laboratorial de paciente com urolitíase. Pequenos volumes de urina são tão informativos quanto urina de 24 horas para fins de avaliação desses pacientes.*
Threatte GA: Laboratory evaluation of renal function in the elderly. In Michelis MF, Davis BB, Preuss HG (eds): Geriatric Nephrology, Vol I. New York, Field, Rich and Associates, Inc, 1986, pp 18–21.
Viberti GC, Jarrett RJ, Mahmud U, et al: Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 1982; 1:1430.
Ward JF, Kaplan GW, Mevorach R, et al: Refined microscopic urinalysis for red blood cell morphology in the evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in a pediatric population. J Urol 1998; 160:1492–1495.
Wong WK, Wieringa GE, Stec Z, et al: A comparison of three procedures for the detection of Bence-Jones proteinuria. Ann Clin Biochem 1997; 34:371–374.
Yoo YM, Tatsumi N, Kirihigashi K, et al: Inaccuracy and inefficiency of urinary sediment analysis. Osaka City Med J 1995; 41:41–48.
Neste estudo, os autores examinaram as características laboratoriais da microscopia manual de urina. As contagens de elementos celulares (mas não de cilindros) apresentaram boa reprodutibilidade, mesmo quando realizadas por técnicos inexperientes.
Young DS: Effects of drugs on clinical laboratory tests. Washington, DC, AACC Press, 1990.
Zaman Z, Borremans A, Varhaegen J, et al: Disappointing dipstick screening for urinary tract infection in hospital inpatients. J Clin Pathol 1998; 51:471–472.
Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira J, et al: Proteinuria is still useful for the screening and diagnosis of overt diabetic nephropathy. Diabetes Care 1998; 21:1076–1079.
Zuijderhoudt FM, Dorresteijn-de Bok J: Comparison of the Bio-Rad Porphyrin Column Test with a simple spectrophotometric test for total urine porphyrin concentration. Ann Clin Biochem 1998; 35:418–421.

CAPÍTULO 28

Líquidos cerebrospinal, sinovial e seroso

Joseph A. Knight MD, Carl R. Kjeldsberg MD

Líquido cerebrospinal	**499**
Coleta da amostra e pressão de abertura	499
Indicações e testes recomendados	500
Exame macroscópico	500
Exame microscópico	501
Análise bioquímica	504
Exame microbiológico	510
Líquido sinovial	**512**
Coleta da amostra	513
Testes recomendados	513
Exame macroscópico	514
Exame microscópico	516
Análise bioquímica	517
Estudos imunológicos	517
Exame microbiológico	
Líquido pleural	**517**
Coleta da amostra	517
Transudatos e exsudatos	517
Testes recomendados	518
Exame macroscópico	519
Exame microscópico	519
Análise bioquímica	520
Estudos imunológicos	521
Exame microbiológico	521
Líquido pericárdico	**522**
Coleta da amostra	522
Exame macroscópico	522
Exsudatos e transudatos	522
Exame microscópico	522
Análise bioquímica	522
Estudos imunológicos	523
Exame microbiológico	523
Líquido peritoneal	**523**
Transudatos e exsudatos	523
Coleta da amostra	524
Testes recomendados	524
Exame macroscópico	525
Exame microscópico	525
Análise bioquímica	525
Exame microbiológico	526
Referências selecionadas	**527**
Referências bibliográficas	**527**

PONTOS-CHAVE

- A causa etiológica do acúmulo de líquidos nas diversas cavidades corporais (i. e., articulações, tórax, abdome) é essencial para o tratamento do distúrbio.
- O exame laboratorial adequado desses líquidos, portanto, é essencial ao diagnóstico de inúmeras doenças (i. e., infecções por bactérias, vírus e fungos; distinção entre as várias artrítides; malignidades primárias [i. e., mesotelioma] e metastáticas; entre outras).
- A interpretação do teste depende da realização de uma coleta de amostra adequada, do tempo de resposta, da comunicação médico/laboratório e de valores de referência confiáveis.

Líquido cerebrospinal

Em adultos, aproximadamente 500 mL de líquido cerebrospinal (LCE) são produzidos diariamente (0,3–0,4 mL/min). O volume total de LCE em um indivíduo adulto varia de 90 a 150 mL, sendo que aproximadamente 25 mL desse total está contido nos ventrículos e o restante, no espaço subaracnoideo. Em recém-nascidos, esse volume varia de 10 a 60 mL. Assim, o volume de LCE total é reposto a cada 5 a 7 horas (Wood, 1980). Estima-se que 70% do LCE seja derivado de ultrafiltração e secreção através do plexo coroide. O revestimento ependimal ventricular e o espaço subaracnóideo cerebral contribuem para o restante. O LCE deixa o sistema ventricular através dos forames medial e lateral, fluindo pelas superfícies do cérebro e da medula espinal junto ao espaço subaracnóideo. A reabsorção do LCE se dá ao nível das vilosidades aracnoides, predominantemente ao longo do seio sagital superior.

O LCE exerce várias funções importantes: (a) proporciona suporte físico, já que as 1.500 g do cérebro passam a pesar somente 50 g quando suspensas no LCE; (b) tem efeito protetor contra alterações repentinas da pressão sanguínea arterial e venosa aguda (respiratória e postural) ou contra a pressão de impacto; (c) atua na excreção de resíduos, já que o cérebro não possui sistema linfático; (d) constitui a via pela qual os fatores de liberação hipotalâmicos são transportados até as células da eminência mediana; e (e) mantém a homeostasia iônica do SNC.

O conceito de barreira hematoencefálica (BHE) deriva de estudos realizados com coloração de exclusão (azul tripan). A BHE é constituída por dois componentes morfologicamente distintos: um endotélio capilar único, cuja coesão é mantida por junções impermeáveis conhecidas como tight junctions; e o plexo coroide, onde uma camada única de células ependimárias coroidais especializadas conectadas por junções impermeáveis reveste capilares fenestrados. Os componentes iônicos do LCE (p. ex., H^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, bicarbonato etc.) são fortemente regulados por sistemas de transporte específicos. Por outro lado, glicose, ureia e creatinina se difundem livremente, ainda que atinjam o equilíbrio somente após 2 horas ou mais. As proteínas a atravessam por difusão passiva, segundo uma taxa dependente do gradiente de concentração plasma/LCE e de forma inversamente proporcional ao peso molecular e volume hidrodinâmico (Fishman, 1992). Assim, a BHE mantém uma relativa homeostasia do ambiente no SNC durante perturbações agudas dos componentes plasmáticos.

Coleta da amostra e pressão de abertura

O LCE deve ser obtido por punção lombar, de cisterna ou lateral-cervical, ou por meio de desvios ou cânulas ventriculares. A execução de uma punção lombar já foi descrita em detalhes (Herndon, 1989; Ward, 1992). Pode haver comprometimento respiratório em bebês que tenham a cabeça flexionada (Ward, 1992).

Antes da remoção do líquido, é preciso fixar um manômetro para registrar a pressão de abertura. A pressão do LCE varia com as alterações posturais, pressão sanguínea, retorno venoso, manobras de Valsava e fatores que alteram o fluxo sanguíneo cerebral. A pressão de abertura normal em um indivíduo adulto é de 90 a 180 mm de água na posição de decúbito lateral com as pernas e o pescoço em posição neutra. Pode haver uma discreta elevação quando o paciente se senta e há uma variação de até 10 mm com a respiração. Entretanto,

III

essa pressão pode chegar a 250 mm de água em indivíduos obesos. Em bebês e crianças, a faixa normal é de 10 a 100 mm de água, atingindo os valores observados em adultos por volta dos 6 a 8 anos de idade (Fishman, 1992). Pressões de abertura acima de 250 mmH_2O são diagnósticas de hipertensão intracraniana, que pode ser decorrente de meningite, hemorragia intracraniana e tumores (Seehusen, 2003). Se a pressão de abertura for maior que 200 mmH_2O em um paciente em relaxamento, é desaconselhável retirar mais de 2 mL de LCE.

A hipertensão intracraniana idiopática é mais comumente observada nas mulheres obesas em idade fértil. Quando uma pressão de abertura elevada é detectada, o LCE deve ser removido lentamente sob um cuidadoso monitoramento da pressão. Não se deve remover mais LCE caso a pressão atinja 50% do valor da pressão de abertura (Conly, 1983).

A pressão pode estar aumentada em pacientes tensos ou submetidos a esforços excessivos, bem como naqueles com insuficiência cardíaca congestiva, meningite, síndrome da veia cava superior, trombose dos seios venosos, edema cerebral, lesões em massa, hipo-osmolalidade ou condições que inibem a absorção do LCE. A elevação da pressão de abertura pode ser a única anormalidade evidente em casos de meningite por criptococos e pseudotumor cerebral (Hayward, 1987). Pode haver diminuição da pressão do LCE em casos de bloqueio espinal subaracnóideo, desidratação, colapso circulatório e vazamento de LCE. Uma queda significativa da pressão após a remoção de 1 a 2 mL é sugestiva de herniação ou bloqueio espinhal acima do sítio de punção, e aponta a necessidade de interromper a retirada de líquido.

Normalmente, é possível remover até 20 mL de LCE. Todavia, além de estar ciente do volume de LCE necessário à realização dos testes para garantir a coleta de amostra suficiente, o médico deve fornecer ao laboratório a devida história clínica do paciente. O sítio de amostragem (i. e., lombar, cisterna etc.) deve ser registrado, uma vez que os parâmetros citológicos e bioquímicos variam nos diferentes sítios existentes. É preciso considerar também a necessidade de determinar simultaneamente os níveis séricos de glicose. Estes são melhor obtidos 2 a 4 horas antes da realização de uma punção lombar, visto que o equilíbrio soro/LCE é retardado.

A amostra de LCE usualmente é coletada em três tubos estéreis, de modo seriado: a amostra do tubo 1 é destinada ao exame bioquímico e aos estudos imunológicos; a do tubo 2 serve ao exame microbiológico; e a do tubo 3 é utilizada para realização das contagens celulares e diferenciais. Em casos de suspeita de malignidade, um tubo 3 adicional é obtido para realização de exame citológico. Contudo, sob certas condições, ocorrem variações que são críticas. Exemplificando, se a amostra contida no tubo 1 estiver hemorrágica em decorrência de uma punção traumática, não deverá ser utilizada nos casos em que a análise de proteínas constitui o aspecto mais importante do exame (i. e., suspeita de esclerose múltipla). De fato, a amostra do tubo 3 deve ser destinada aos exames que atendem aos principais propósitos da coleta de LCE. Talvez, somente seja possível estabelecer definitivamente que a amostra contida no tubo 1 jamais deve ser destinada ao exame microbiológico, pois pode estar contaminada com bactérias presentes na pele. Em caso de dúvidas, é essencial haver comunicação entre o laboratório e o médico antes de iniciar a análise de LCE.

Recomenda-se evitar o uso de tubos de ensaio de vidro, pois a adesão celular ao vidro afeta a contagem celular e a análise diferencial. As amostras devem ser enviadas ao laboratório e processadas sem demora, a fim de minimizar a degradação celular que tem início 1 hora após a coleta. A refrigeração é contraindicada para as amostras destinadas à cultura, porque impede a sobrevivência de organismos mais exigentes (p. ex., *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*).

Indicações e testes recomendados

As indicações de punção lombar podem ser divididas em quatro categorias de doenças principais: infecção meníngea, hemorragia subaracnóidea, malignidade primária ou metastática e doenças desmielinizantes (American College of Physicians, 1986). A identificação da meningite infecciosa, particularmente bacteriana, constitui a indicação mais importante para o exame de LCE (Tab. 28.1). Os testes laboratoriais recomendados se destinam a identificar tais distúrbios (Tab. 28.2). Em geral, o exame de LCE para detecção de outras doenças é menos útil, porém fornece evidências que sustentam o diagnóstico clínico ou ajudam a excluir outras doenças. Estudos de rotina restritos, acompanhados da solicitação restrospectiva de testes mais centralizados (conforme a necessidade) utilizando amostras estocadas têm sido defendidos como meio de aprimorar a eficiência do teste (Albright, 1988).

Tabela 28.1 Doenças detectadas por meio do exame laboratorial do LCE

Alta sensibilidade, alta especificidade
Meningites bacteriana, tuberculosa e fúngica
Alta sensibilidade, especificidade moderada
Meningite viral
Hemorragia subaracnóidea
Esclerose múltipla
Sífilis no SNC
Polineurite infecciosa
Abscesso paraespinal
Sensibilidade moderada, alta especificidade
Malignidade meníngea
Sensibilidade moderada, especificidade moderada
Hemorragia intracraniana
Encefalite viral
Hematoma subdural

A sensibilidade é a capacidade do teste de detectar a doença quando ela está presente. A especificidade é a capacidade do teste de excluir a doença quando ela está ausente.

De American College of Physicians, Health and Public Police Committee: The diagnostic spinal tap. Ann Intern Med 1986; 104-880, com permissão.

Tabela 28.2 Testes laboratoriais recomendados para o LCE

Rotina
Pressão de abertura no LCE
Contagem celular total (CBS e CVS)
Contagem celular diferencial (esfregaço corado)
Glicose (proporção LCE/plasma)
Proteína total
Sob determinadas condições
Culturas (bactérias, fungos, vírus, *Mycobacterium tuberculosis*)
Coloração de Gram, coloração acidorresistente
Antígenos de bactérias e fungos
Enzimas (LD, ADA, CK-BB)
Lactato
Reação em cadeia da polimerase (TB, vírus)
Citologia
Eletroforese (proteína, imunofixação)
Proteínas (C-reativa, 14-3-3, τ, β-amiloide, transferrina)
Teste de sífilis da VDRL
D-dímero derivado de fibrina
Ácido tuberculoesteárico

LCE = líquido cerebrospinal; TB = tuberculose; VDRL = *Venereal Disease Research Laboratories*; LD = lactato desidrogenase; ADA = adenosina deaminase; CK-BB = creatina quinase-BB.

Modificado de Kjeldsberg, CR.; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. ©American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

Exame macroscópico

O LCE normal é límpido como cristal, incolor e tem viscosidade similar à da água. O LCE anormal pode apresentar-se turvo, francamente purulento ou tingido com pigmentos. A turvação ou nebulosidade começa a se tornar aparente diante de contagens de CBSs acima de 200 células/μL ou de uma contagem de hemácias de 400 células/μL.

Todavia, líquidos grosseiramente sanguinolentos apresentam contagem de CVSs acima de 6.000 células/μL. A presença de microrganismos (bactéria, fungos, amebas), material de contraste radiográfico, aspirado de gordura epidural e níveis de proteína acima de 150 mg/dL (1,5 g/L) podem igualmente produzir graus variáveis de turvação. Observadores experientes conseguem detectar a olho nu contagens celulares inferiores a 50 células/μL pela simples observação do efeito de Tyndall (Simon, 1978). Nesse caso, a luz solar incidindo diretamente sobre o tubo em um ângulo de 90º em relação ao observador confere um aspecto "cintilante" ou "de neve" à amostra, conforme as partículas suspensas dispersam a luz.

Pode haver *formação de coágulo* em pacientes submetidos a punções traumáticas, com bloqueio espinhal total (síndrome de Froin), meningite supurativa ou tuberculosa. Está ausente em pacientes com hemorragia subaracnóidea. A amostra pode apresentar finas películas superficiais após ser submetida à refrigeração por 12 a 24 horas. Capturando células inflamatórias, os coágulos podem interferir na acurácia das contagens celulares.

Um *LCE viscoso* pode ser obtido de pacientes com adenocarcinomas produtores de mucina metastáticos, meningite criptocócica decorrente de polissacarídeo capsular ou núcleo pulposo líquido resultante de lesão no anel fibroso com agulha.

Um LCE de cor rosa-avermelhado costuma indicar a presença de sangue, sendo grosseiramente sanguinolento diante de contagens de hemácias acima de 6.000 células/μL. Pode se originar a partir de uma hemorragia subaracnóidea ou intracraniana, de um infarto do miocárdio e de uma punção espinhal traumática.

Xantocromia. A xantocromia comumente se refere ao aparecimento de uma cor que varia do rosa-claro ao amarelo no sobrenadante de uma amostra de LCE centrifugada, ainda que outras cores possam ser observadas (Tab. 28.3). Para detectá-la, o LCE deve ser centrifugado e o líquido do sobrenadante deve ser comparado à água destilada contida em um tubo de ensaio. O LCE xantocrômico apresenta coloração rosa, alaranjada ou amarela em razão da lise de CVSs e quebra da hemoglobina. A xantocromia rosa-clara a amarela produzida pela oxi-hemoglobina liberada costuma ser detectada por meio de uma punção lombar realizada 2 a 4 horas após o início da hemorragia subaracnóidea, embora possa demorar até 12 horas. O pico de intensidade ocorre em cerca de 24 a 36 horas e, então, vai desaparecendo gradativamente no decorrer dos próximos 4 a 8 dias. A xantocromia amarela é produzida pela bilirrubina e se desenvolve em cerca de 12 horas após o evento de um sangramento subaracnóideo, atingindo o pico em 2 a 4 dias. Contudo, esse tipo de xantocromia pode persistir por 2 a 4 semanas.

Uma xantocromia de LCE visível também pode ser devida aos seguintes fatores: (1) presença de oxi-hemoglobina resultante de lise artificial de CVSs provocada pela ação de detergentes contaminantes na agulha ou no tubo de coleta, ou por um atraso de mais de 1 hora sem refrigeração antes da realização do exame; (2) presença de bilirrubina (bilirraquia) em pacientes com icterícia; (3) níveis proteicos do LCE acima de 150 mg/dL, que também são detectados em casos de punção traumática (mais de 100.000 CVSs/μL) ou em certos estados patológicos, como bloqueio espinhal total, polineurite e meningite; (4) contaminação com desinfetante mertiolate; (5) carotenoides (cor alaranjada) em indivíduos com hipercarotenemia alimentar (i. e., hipervitaminose A); (6) melanina (cor castanha) proveniente de melanoma metastático meníngeo; e (7) terapia com rifampina (cor vermelho-alaranjada).

Embora as varreduras do espectro de absorbância forneçam registros objetivos da xantocromia, uma cuidadosa inspeção geral do LCE apresenta um grau de sensibilidade comparável (Britton, 1983). A espectrofotometria também pode ajudar a diferenciar entre substâncias derivadas da hemoglobina e outros pigmentos xantocrômicos com picos de absorção máxima distintos.

Diagnóstico diferencial do LCE sanguinolento. Cerca de 20% das punções lombares são traumáticas. Portanto, é vital distinguir uma punção traumática de um caso de hemorragia patológica. Embora a presença de CVSs crenadas não tenha utilidade, as observações a seguir podem auxiliar a distinção dessas duas formas de sangramento.

1. Em uma punção traumática, o líquido hemorrágico em geral se torna limpo entre a coleta dos tubos 1 e 3, porém se mantém relativamente uniforme quando se trata de uma hemorragia subaracnóidea.

Tabela 28.3 Xantocromia e doenças/distúrbios associados

Cor do sobrenadante de LCE	Doença/distúrbios associados
Rosa	Lise de CVSs/produtos da quebra da hemoglobina
Amarelo	Lise de CVSs/produtos da quebra da hemoglobina Hiperbilirrubinemia Proteínas no LCE > 150 mg/dL (1,5 g/L)
Alaranjado	Lise de CVSs/produtos da quebra da hemoglobina Hipervitaminose A (carotenoides)
Amarelo-esverdeado	Hiperbilirrubinemia (biliverdina)
Marrom	Melanoma metastático meníngeo

2. Xantocromia, evidências microscópicas de eritrofagocitose ou presença de macrófagos repletos de hemossiderina são indícios de sangramento subaracnóideo na ausência de uma punção traumática prévia. A lise das CVSs tem início em 1 a 2 horas após uma punção traumática. Sendo assim, é necessário realizar uma rápida avaliação para evitar a geração de resultados falso-positivos.
3. Existe um teste de imunoensaio de aglutinação do látex comercialmente disponível para detecção do D-dímero derivado de fibrina com ligações cruzadas. Esse teste é específico para a degradação de fibrina e produz resultado negativo em casos de punção traumática (Lang, 1990). Entretanto, pode haver resultados falso-positivos diante de casos de coagulação intravascular disseminada, fibrinólise ou trauma causado por punções repetidas.

Exame microscópico

Contagem celular total. As contagens celulares são realizadas no LCE não diluído, em uma câmara de contagem manual. A contagem automatizada de leucócitos e eritrócitos já foi descrita (Talstad, 1984), contudo, sua precisão é fraca diante das baixas contagens celulares normalmente encontradas no LCE. A precisão inerente das contagens manuais é igualmente limitada. Exemplificando, ao utilizar 18 quadrantes grandes (de 1 mm^2 cada) de uma câmara do tipo Fuchs-Rosenthal com profundidade de 0,2 mm, examina-se um volume total de 3,6 μL (18 × 0,2 μL/quadrante). Com uma concentração de 5 células/μL, conta-se ao todo 18 células. O coeficiente de variação (CV) – definido como sendo a divisão de 100 pela raiz quadrada do número de células contadas – é igual a 24%; ± 2 CV equivale a aproximadamente 48%. Um hemocitômetro de Neubauer, que possui nove quadrantes de 1 mm^2 com uma profundidade de 0,1 mm, apresenta um CV de 45% (+ 90% para 2 CV) para essa mesma concentração de células. Mais recentemente, a análise do LCE por citometria de fluxo automatizada (com citômetro de fluxo UF-100) apresentou um rendimento rápido e confiável de contagens de CBSs e CVSs (Van Acker, 2001).

A contagem de leucócitos normal para um indivíduo adulto corresponde a 0 a 5 células/μL. Essa contagem é maior em recém-nascidos, nos quais varia de 0 a 30 células/μL, sendo que durante a adolescência há uma queda do limite máximo considerado normal até os valores observados em adultos. No LCE não deve haver hemácias. Se inúmeras hemácias estiverem presentes (exceto nos casos de punção traumática), é provável que haja um processo patológico subjacente (p. ex., trauma, malignidade, infarto, hemorragia). Embora as contagens de CVSs possuam valor diagnóstico limitado, ao corrigirem a quantidade de leucócitos ou proteínas introduzida por uma punção traumática, podem fornecer uma aproximação útil da contagem de CBSs verdadeira ou da quantidade de proteínas total no evento de punção traumática. Para serem válidas, todas as quantificações (CBS, CVS, proteínas) devem ser realizadas utilizando a amostra do mesmo tubo de ensaio. Esse procedimento também considera que o sangue deriva exclusivamente de uma punção traumática. A contagem de CBSs corrigida é igual a:

$$CBS_{corr} = CBS_{obs} - CBS_{adic}$$

Em que:

$$CBS_{adic} = CBS_{sangue} \cdot CVS_{LCE}/CVS_{sangue}$$

E:

CBS_{obs} = contagem de leucócitos no LCE

CBS_{adic}= leucócitos adicionados ao LCE pela punção traumática

CBS_{sangue} = contagem de leucócitos no sangue periférico

CVS_{LCE} = contagem de eritrócitos no LCE

CVS_{sangue} = contagem de eritrócitos no sangue periférico.

É possível empregar uma fórmula análoga para corrigir a "quantidade total de proteína adicionada" (QTP):

$$QTP_{adic} = [QTP_{soro} \times (1 - HCT)] \times CVS_{LCE}/CVS_{sangue}$$

Diante de valores normais para contagem de CVSs no sangue periférico e níveis séricos de proteína, essas correções correspondem a cerca de 1 CBS para cada 700 CVSs e 8 mg de proteínas/dL para cada 10.000 CVSs/μL. Esse último fator de correção para CVSs é razoavelmente acurado, desde que a contagem de CBSs periféricas não seja extremamente alta nem baixa. Além disso, a acurácia dessas correções é limitada pela precisão da contagem de CVSs do LCE, a qual pode afetar significativamente seu valor.

Com relação à contagem de CBSs, uma proporção de células observadas/esperadas (adicionadas) maior que 10 está associada a uma sensibilidade de 88% e a uma especificidade de 90% para detecção de meningite bacteriana. Quando o valor previsto para a contagem de CBSs é menor do que a contagem observada, parece ser pouco provável que o indivíduo apresente meningite bacteriana (Mayefsky, 1987; Bonadio, 1990).

Contagem celular diferencial. As faixas referenciais sugeridas para a contagem diferencial são mostradas na Tabela 28.4. Um diferencial feito em câmara de contagem é considerado insatisfatório, porque o baixo número de células apresenta uma precisão fraca e por ser difícil identificar o tipo celular como algo além de granulócitos e "células mononucleares" em uma preparação a fresco. Esfregaços diretos de sedimento de LCE centrifugado também estão sujeitos a erros significativos de fragmentação e distorção celular.

A *citocentrifugação* é uma técnica rápida, requer treinamento mínimo e permite que os citospins secos ao ar sejam submetidos à coloração de Wright. De fato, trata-se do método recomendado para a realização das contagens celulares diferenciais de todos os líquidos corporais (Rabinovitch, 1994). A preservação e o rendimento celular são melhores do que aqueles proporcionados pela centrifugação simples. É possível concentrar 30 a 50 células a partir de 0,5 mL de LCE "normal". Diferentes graus de distorção por artefatos podem ser observados, contudo essas distorções são minimizadas quando a amostra utilizada é recente, albumina é acrescentada à amostra (2 gotas de uma solução contendo albumina bovina sérica a 22%) e a concentração celular é ajustada para aproximadamente 300 CBSs/L antes da centrifugação (Kjeldsberg, 1993).

Os *métodos de filtração e sedimentação* são muito inconvenientes para o uso geral. A filtração, todavia, permite concentrar grandes volumes de LCE para realização do exame citológico ou de culturas, ao mesmo tempo em que o filtrado obtido do líquido pode ser utilizado em estudos adicionais.

Em adultos, o LCE normal contém um pequeno número de *linfócitos* e *monócitos*, em uma proporção aproximada de 70:30 (Fig. 28.1). Uma proporção mais alta de monócitos é detectada no LCE de crianças, nas quais valores de até 80% são considerados normais (Pappu, 1982). É comum observar eritrócitos após sangramentos traumáticos mínimos, especialmente em bebês. Pequenas concentrações de neutrófilos (PMNs) também podem ser observadas em amostras de LCE "normal", mais provavelmente como resultado de pequenas hemorragias (Hayward, 1988) e métodos de concentração celular aprimorados. Não há consenso acerca do limite máximo da concentração de PMNs considerada normal com uma contagem normal de CBSs. Há relatos de porcentuais de neutrófilos superiores a 60% em recém-nascidos com risco elevado na ausência de meningite (Rodriguez, 1990). O número de PMNs pode estar reduzido em até 68% nas primeiras 2 horas subsequentes à realização de uma punção lombar, em razão da lise celular (Steele, 1986).

A punção traumática pode resultar na presença de células da medula óssea, células de cartilagem, células escamosas, células ganglionares e elementos de tecidos moles. Células ependimárias e do plexo coroide também podem ser observadas, ainda que mais raramente (Fig. 28.2). Além disso, agrupamentos de células primitivas semelhantes a blastos, mais provavelmente originários da matriz germinativa, às vezes são encontrados em bebês prematuros com hemorragia intraventricular (Fig. 28.3).

Uma concentração aumentada de *neutrófilos* no LCE é observada em inúmeras condições (Tab. 28.5). No estágio inicial da meningite bacteriana, a proporção de PMNs usualmente ultrapassa 60%. Entretanto, em cerca de 1/4 dos casos de meningite viral precoce, a proporção de PMNs também excede 60%. A neutrofilia induzida por vírus em geral se converte em pleocitose linfocítica dentro de 2 a 3 dias. Uma conta-

Tabela 28.4 Valores de referência para contagens diferenciais em amostras citocentrifugadas de LCE

Tipo de célula	Adultos (%)	Recém-nascidos (%)
Linfócitos	62 ± 34	20 ± 18
Monócitos	36 ± 20	72 ± 22
Neutrófilos	2 ± 5	3 ± 5
Histiócitos	Raras	5 ± 4
Células ependimárias	Raras	Raras
Eosinófilos	Raras	Raras

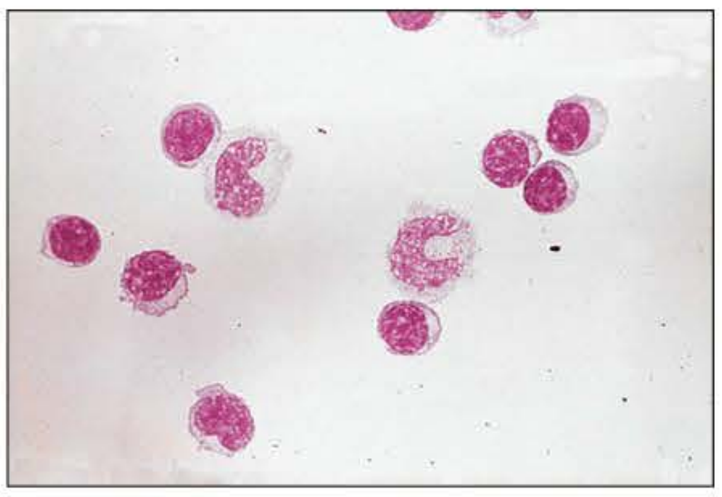


Figura 28.1 Citologia do LCE (proporção de distribuição de linfócitos/monócitos igual a 70:30).

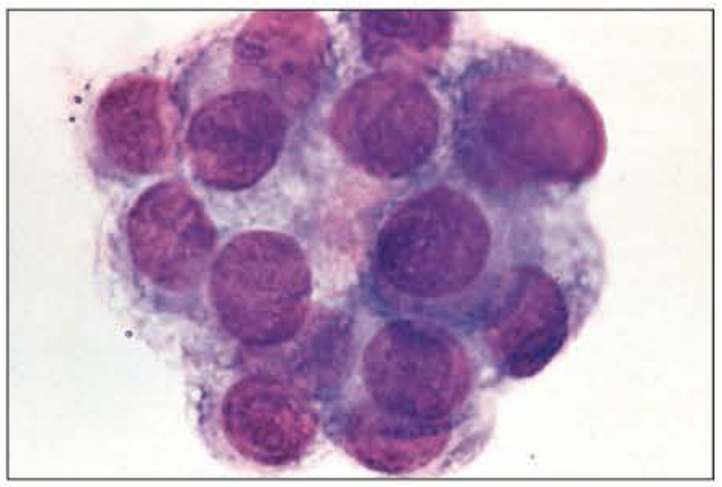


Figura 28.2 Células do plexo coroide no LCE.

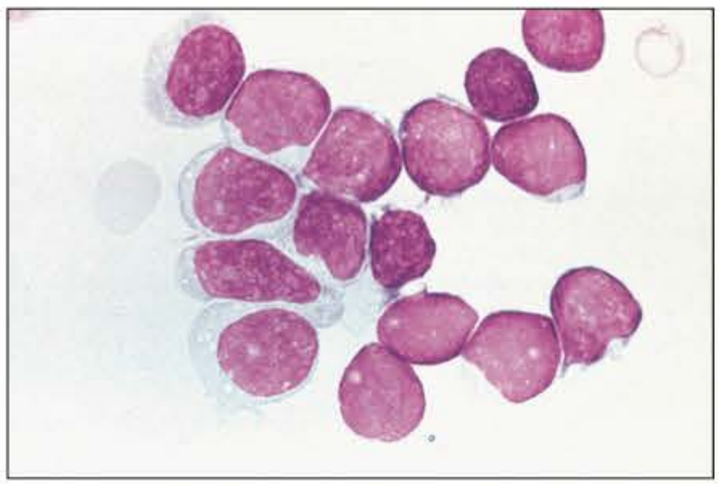


Figura 28.3 Agrupamento de células semelhantes a blastos no LCE de um recém-nascido. (De Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.)

gem total de PMNs acima de 1.180 células/μL (ou mais de 2.000 CBSs/μL) está associada a um valor preditivo de 99% para meningite bacteriana (Spanos, 1989). A meningite neutrofílica persistente (mais de 1 semana) pode ser não infecciosa ou causada por patógenos menos comuns, tais como *Nocardia*, *Actinomyces*, *Aspergillus* e zigomicetos (Peacock, 1984).

Uma concentração aumentada de linfócitos no LCE tem sido descrita em várias doenças/distúrbios (Tab. 28.6). Não raro, há linfocitose (> 50%) no início da meningite bacteriana aguda, quando a contagem de leucócitos do LCE está abaixo de 1.000 células/μL (Powers, 1985). É possível que estejam presentes variantes atípicas reativas linfoplasmacitoides e imunoblásticas. Linfócitos semelhantes a blastos podem ser encontrados misturados a linfócitos pequenos e grandes no LCE de recém-nascidos.

Plasmócitos, normalmente ausentes no LCE, podem aparecer em uma variedade de condições inflamatórias (Tab. 28.7), ao lado de linfócitos grandes e pequenos e associados a tumores cerebrais malignos (Fishman, 1992). Mais raramente, o mieloma múltiplo também pode envolver as meninges (Oda, 1991).

Embora os *eosinófilos* raramente estejam presentes no LCE normal, sua concentração pode estar aumentada em diversas condições envolvendo o SNC (Tab. 28.8). Exemplificando, a eosinofilia observada em uma resposta inflamatória comum frequentemente é suave (1–4%), contudo, pode ser marcante em crianças que apresentam mau funcionamento de desvios ventriculares (Fig. 28.4). Um dos critérios sugeridos para determinação da meningite eosinofílica é um porcentual de eosinófilos igual a 10% (Kuberski, 1981), sendo a invasão parasítica do SNC a causa mais comum ao nível mundial. O *Coccidioides immitis* constitui causa significativa de eosinofilia no LCE em regiões endêmicas dos Estados Unidos (Ragland, 1993).

O número aumentado de *monócitos* no LCE é desprovido de especificidade diagnóstica e usualmente integra uma "reação de células mistas",

Tabela 28.5 Causas da elevação do número de neutrófilos no LCE

Meningite
Meningite bacteriana
Meningoencefalite viral precoce
Meningite tuberculosa precoce
Meningite micótica precoce
Encefalomielite amébica
Outras infecções
Abscessos cerebrais
Empiema subdural
Radiculopatia por CMV relacionada à AIDS
Subsequente a febres
Subsequente à hemorragia no SNC
Subaracnóidea
Intracerebral
Subsequente a infarto do SNC
Reação a punções lombares repetidas
Injeção de material estranho no espaço subaracnoide (p. ex., metotrexato, meio de contraste)
Tumor metastático em contato com LCE

SNC = sistema nervoso central; LCE = líquido cerebrospinal; CMV = citomegalovírus.

Tabela 28.6 Causas de linfocitose no LCE

Meningite
Meningite viral
Meningite tuberculosa
Meningite fúngica
Meningoencefalite sifilítica
Meninge leptospirótica
Bacteriana, causada por organismos pouco comuns
Meningite bacteriana precoce, com contagens de leucócitos relativamente baixas
Infestações parasíticas (p. ex., cisticercose, triquinose, toxoplasmose)
Meningite asséptica, causada por foco séptico adjacente às meninges
Distúrbios degenerativos
Panencefalite esclerosante subaguda
Esclerose múltipla
Encefalopatia por drogas de abuso
Síndrome de Guillain-Barré
Encefalomielite disseminada aguda
Outros distúrbios inflamatórios
Síndrome de Handl (dor de cabeça com déficits neurológicos e linfocitose no LCE)
Sarcoidose
Polineurite
Periarterite no SNC

LCE = líquido cerebrospinal; SNC = sistema nervoso central.

Tabela 28.7 Causas de plasmocitose no LCE

Infecções virais agudas
Síndrome de Guillain-Barré
Esclerose múltipla
Infestações parasíticas no SNC
Sarcoidose
Panencefalite esclerosante subaguda
Meningoencefalite sifilítica
Meningite tuberculosa

LCE = líquido cerebrospinal; SNC = sistema nervoso central.

Tabela 28.8 Causas de pleiocitose eosinofílica no LCE

Associações comuns
Polineurite aguda
Reação do SNC a material estranho (fármacos, desvios)
Infecções fúngicas
Meningite eosinofílica idiopática
Síndrome hipereosinofílica idiopática
Infecções parasitárias
Associações pouco frequentes
Meningite bacteriana
Leucemia/linfoma
Distúrbios mieloproliferativos
Neurossarcoidose
Tumores cerebrais primários
Meningoencefalite tuberculosa
Meningite viral

LCE = líquido cerebrospinal; SNC = sistema nervoso central.

Modificado de Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. ©American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

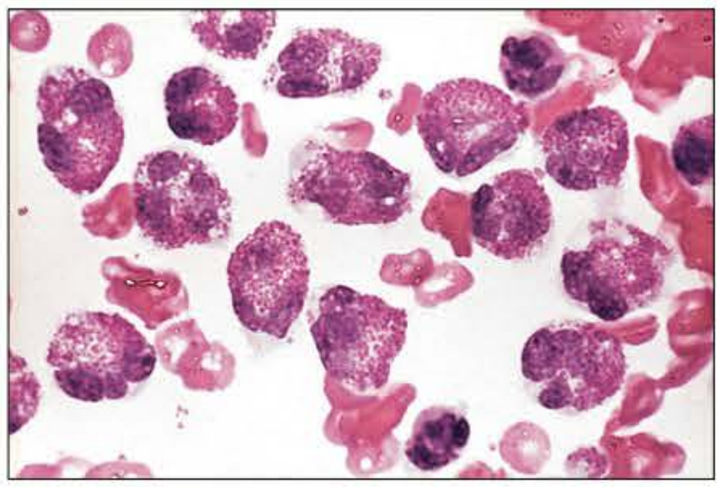


Figura 28.4 Eosinófilos no LCE de uma criança com mau funcionamento de desvio ventricular.

que inclui neutrófilos, linfócitos e plasmócitos. Esse padrão é observado na meningite tuberculosa e fúngica, na meningite bacteriana crônica (i. e., *Listeria monocytogenes* entre outros), meningite leptospirótica, abscessos cerebrais rompidos, meningite causada por *Toxoplasma* e encefalomeningite amébica. Um padrão celular misto e sem neutrófilos é característico de meningoencefalite viral e sifilítica. *Macrófagos* contendo eritrócitos fagocitados (*eritrófagos*) surgem por volta de 12 a 48 horas após o evento de uma hemorragia subaracnóidea ou de uma punção traumática. Macrófagos repletos de hemossiderina (*sideróf agos*) aparecem depois de aproximadamente 48 horas e podem persistir durante semanas (Fig. 28.5). Pode haver formação de cristais de hematoidina castanho-amarelados ou avermelhados após alguns dias.

O exame do LCE para detecção de células tumorais apresenta sensibilidade moderada e alta especificidade (97–98%) (Marton, 1986). A ausência de sensibilidade depende do tipo de tumor. O exame de LCE de pacientes com leucemia apresenta maior sensibilidade (cerca de 70%), seguido pelo carcinoma metastático (20–60%) e pelas malignidades primárias envolvendo o SNC (30%). A sensibilidade pode ser otimizada com o uso de métodos de filtração e volumes maiores de líquido, ou pela a realização de punções seriadas em pacientes com forte suspeita de apresentarem tumor.

O envolvimento leucêmico das meninges é mais frequente em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (Fig. 28.6) do que naqueles com leucemia mieloblástica aguda (Fig. 28.7). Ambos os casos são significativamente mais comuns do que o envolvimento do SNC em casos de leucemia crônica. É comum uma contagem de leucócitos acima de 5 células/μL com detecção inequívoca de linfoblastos em preparações citocentrifugadas ser aceita como evidência de envolvimento do LCE. A incidência de recidivas envolvendo o SNC em crianças com linfoblastos e contagens celulares abaixo de 6 células/μL parece ser baixa, não diferindo significativamente dos casos em que nenhum blasto é identificado (Odom, 1990; Gilchrist, 1994; Tubergen, 1994).

Linfomas não Hodgkin com envolvimento das leptomeninges costumam ser tumores de alto grau (linfoblástico, imunoblástico de células grandes e linfomas de Burkitt) (Fig. 28.8). Linfomas de baixo grau e o linfoma de Hodgkin são significativamente menos comuns (Bigner, 1992; Walts, 1992). As células T predominam tanto em condições normais como inflamatórias, enquanto a maioria dos linfomas, especialmente aqueles que acometem pacientes imunocomprometidos, afetam a linhagem de células B. O linfoma linfoblástico – o linfoma de células T mais comum – pode ser detectado pela coloração da deoxinucleotidil transferase terminal (TdT, *terminal deoxynucleotidyl transferase*).

O PCR e a citometria de fluxo de parâmetros múltiplos podem aumentar a sensibilidade da detecção dos linfomas (Rhodes, 1996; Finn, 1998). Entretanto, sua utilidade clínica para a prática diária ainda precisa ser comprovada por meio de estudos prospectivos de longa duração.

Amebas, fungos (especialmente Cryptococcus neoformans) e *Toxoplasma gondii* são organismos que podem estar presentes em amostras citocentrifugadas, porém, talvez seja difícil reconhê-los na ausência de colorações confirmatórias.

Análise bioquímica

Os valores de referência para LCE lombar em indivíduos adultos estão listados na Tabela 28.9.

Proteínas.

Proteína total. Mais de 80% dos conteúdo de proteínas do LCE deriva do plasma sanguíneo, em concentrações inferiores a 1% dos níveis plasmáticos (Tab. 28.10).

Pré-albumina (transtirretina), transferrina e pequenas quantidades de proteínas específicas de tecidos nervosos constituem as principais diferenças qualitativas normalmente existentes entre proteínas do LCE e do plasma. Embora alguns autores tenham argumentado contra a quantificação de rotina das proteínas totais (American College of Physicians, 1986), a alteração desse parâmetro é a anomalia mais comumente encontrada no LCE. Sendo assim, a detecção de um aumento da concentração proteica do LCE serve como indicador útil, ainda que inespecífico, da doença meníngea ou do SNC.

Valores de referência. Os valores referenciais de proteínas totais do LCE variam consideravelmente entre os diversos laboratórios, em razão das diferentes metodologias, instrumentação e tipo de padrão referencial adotado (College of American Pathologists CSF Chemistry Survey, Set M-B, 1991*; Gerbaut, 1986). Níveis proteicos da ordem de 15 a 45 mg/dL no LCE têm sido aceitos como faixa de referência "normal" há muito tempo (Silverman, 1994). Utilizando o clássico método de Lowry, foi descrita uma faixa de referência para indivíduos adultos da ordem de 24,1 a 48,5 mg/dL (Tibbling, 1977). Outros pesquisadores descreveram uma faixa de valores referencial de 14 a 49 mg/dL utilizando o método do ácido tricloroacético-Ponceau S (Breebaart, 1978),

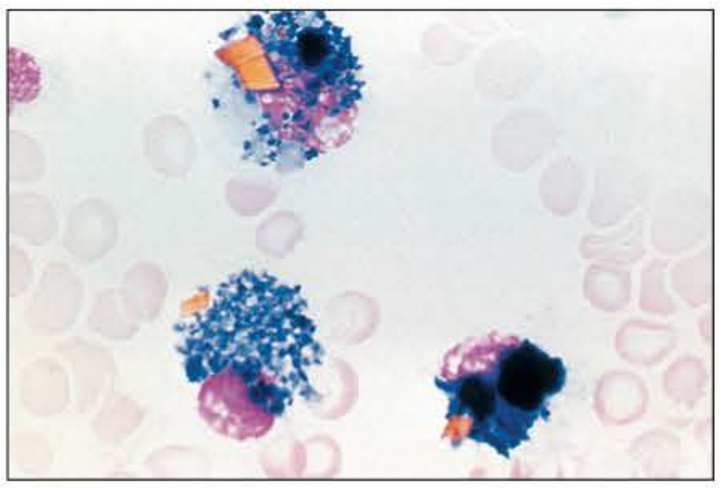


Figura 28.5 Macrófagos repletos de hemossiderina (sideróf agos) no LCE de um paciente com hemorragia subaracnóidea. Cristais de hemossiderina (amarelo-dourado) também estão presentes. (De Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.)

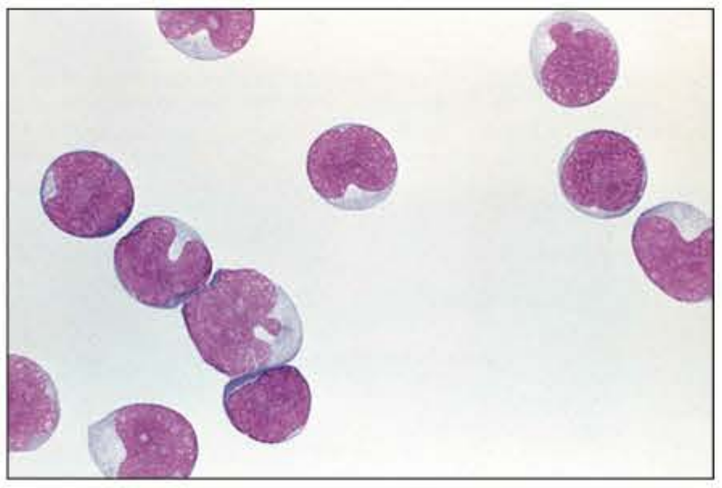


Figura 28.6 Leucemia linfoblástica aguda no LCE. Observe a uniformidade das células blásticas.

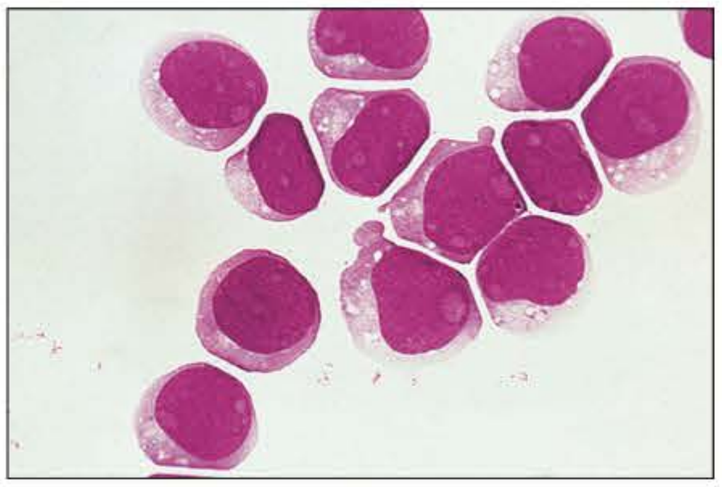


Figura 28.7 Leucemia mieloblástica aguda no LCE.

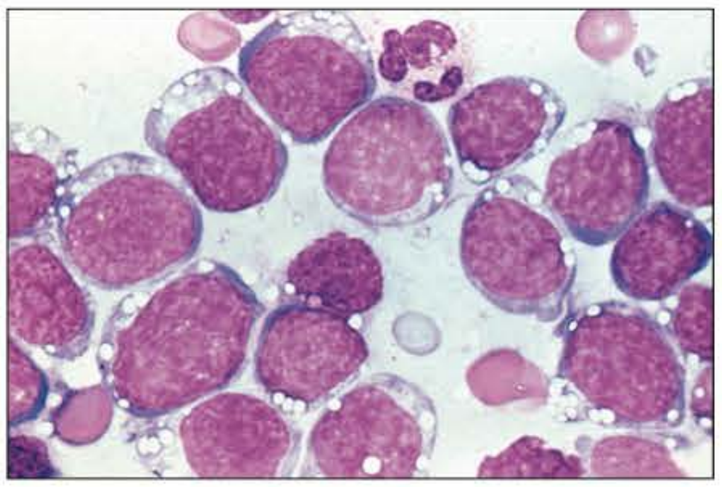


Figura 28.8 Linfoma de Burkitt no LCE. As células são caracterizadas pelo citoplasma azul contendo vacúolos e pelo padrão de cromatina discretamente agrupada. (De Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.)

*College of American Pathologists, 325 Waukegan Road, Northfield, IL.

Tabela 28.9 Valores de referência do LCE lombar para adultos

Analito	Unidades convencionais	Unidades do SI
Proteína	15–45 mg/dL	0,15–0,45 g/L
Pré-albumina	2–7%	
Albumina	56–76%	
α_1-globulina	2–7%	
α_2-globulina	4–12%	
β-globulina	8–18%	
γ-globulina	3–12%	
Eletrólitos		
Osmolalidade	280–300 mOsm/L	280–300 mmol/L
Sódio	135–150 mEq/L	135–150 mmol/L
Potássio	2,6–3,0 mEq/L	2,6–3,0 mmol/L
Cloreto	115–130 mEq/L	115–130 mmol/L
Dióxido de carbono	20–25 mEq/L	20–25 mmol/L
Cálcio	2,0–2,8 mEq/L	1,0–1,4 mmol/L
Magnésio	2,4–3,0 mEq/L	1,2–1,5 mmol/L
Lactato	10–22 mg/dL	1,1–2,4 mmol/L
pH		
Líquido lombar	7,28–7,32	
Líquido da cisterna	7,32–7,34	
P_{CO_2}		
Líquido lombar	44–50 mmHg	
Líquido da cisterna	40–46 mmHg	
P_{O_2}	40–44 mmHg	
Outros constituintes		
Amônia	10–35 µg/dL	6–20 µmol/L
Glutamina	5–20 mg/dL	0,3–1,4 mmol/L
Creatinina	0,6–1,2 mg/dL	45–92 µmol/L
Glicose	50–80 mg/dL	2,8–4,4 mmol/L
Ferro	1–2 µg/dL	0,2–0,4 µmol/L
Fósforo	1,2–2,0 mg/dL	0,4–0,7 mmol/L
Lipídeos totais	1–2 mg/dL	0,01–0,02 g/L
Ureia	6–16 mg/dL	2,0–5,7 mmol/L
Urato	0,5–3,0 mg/dL	30–180 µmol/L
Zinco	2–6 µg/dL	0,3–0,9 µmol/L

Tabela 28.10 Concentrações médias de proteína no plasma e no LCE

Proteína	LCE (mg/L)	Proporção plasma/LCE
Pré-albumina	17,3	14
Albumina	155,0	236
Transferrina	14,4	142
Ceruloplasmina	1,0	366
IgG	12,3	802
IgA	1,3	1346
α-2-microglobulina	2,0	1111
Fibrinogênio	0,6	4940
IgM	0,6	1167
β-lipoproteína	0,6	6213

LCE = líquido cerebrospinal.

Adaptado de Felgenhauer, K: Klin Wochenschr 1974; 52:1158, com permissão.

e uma faixa de 22,3 a 50,3 mg/dL pelo método do biureto (Ahonen, 1978). Os níveis de referência também foram comparados utilizando três métodos: (a) uma técnica modificada do método do biureto; (b) o método de Dupont Aca, em que a proteína foi precipitada e, então, submetida à reação com ácido tricloroacético (TCA); e (c) uma técnica em lâmina colorimétrica Kodak Ektachem (Lott, 1989). Todos os três métodos produziram resultados semelhantes, embora com níveis significativamente mais altos do que aqueles já descritos (i. e., 14–62 mg/dL; 16–61 mg/dL; e 12–60 mg/dL, respectivamente).

Embora haja relatos de discrepâncias entre indivíduos de ambos os sexos e entre aqueles com idade acima de 60 anos, essas diferenças provavelmente não são significativas. No entanto, os níveis de proteína no LCE de bebês são consideravelmente mais altos do que no LCE de crianças mais velhas e de adultos. Assim, foram descritos níveis médios de 90 mg/dL para bebês nascidos a termo e 115 mg/dL para bebês prematuros. Os níveis máximos foram de 150 e 170 mg/dL, respectivamente (Sarff, 1976). De modo semelhante, outros pesquisadores constataram recentemente que a concentração de proteínas do LCE cai de forma rápida desde o nascimento até os 6 meses de idade (níveis médios de 108 e 40 mg/dL), atinge um platô entre os 3 e 10 anos de idade (média de 32 mg/dL) e, então, sofre uma elevação discreta a partir dos 10 anos até os 16 anos de idade (média igual a 41 mg/dL) (Biou, 2000).

Níveis elevados de proteína no LCE podem ser decorrentes de um aumento da permeabilidade da BHE, diminuição da reabsorção ao nível das vilosidades aracnoides, obstrução mecânica do fluxo de LCE causada por um bloqueio espinhal acima do sítio de punção, ou aumento da síntese de imunoglobulina intratecal. As condições comumente associadas a valores aumentados de proteínas no LCE lombar (acima de 65 mg/dL) estão resumidas na Tabela 28.11.

Níveis normais de proteína no LCE lombar (< 20 mg/dL) geralmente são detectados em algumas crianças com idade entre 6 meses e 2 anos, bem como em pacientes com condições associadas a uma taxa aumentada de renovação do LCE. Tais condições incluem: (a) remoção de grandes volumes de LCE; (b) vazamentos de LCE induzidos por trauma ou punção lombar; (c) aumento da pressão intracraniana, provavelmente devido ao aumento da taxa de reabsorção de proteínas nas vilosidades aracnoides; e (d) hipertireoidismo (Fishman, 1992).

A eletroforese de proteínas utilizando amostra concentrada de LCE normal revela a existência de duas diferenças em relação ao soro: uma banda proeminente de transtirretina (pré-albumina) e duas bandas de transferrina. Os níveis de transtirretina são relativamente elevados, por causa da dupla síntese que ocorre no fígado e no plexo coreoide. A segunda banda de transferrina – referida como β_2-transferrina ou proteína τ – migra mais lentamente do que a proteína sérica correspondente, por causa da digestão pela neuroaminidase cerebral dos resíduos de ácido siálico.

Metodologia. Os métodos turbidimétricos, comumente baseados no uso do TCA ou do ácido sulfossalicílico (SSA) e do sulfato de sódio para precipitação de proteínas, são populares pela execução simples,

Tabela 28.11 Condições associadas ao aumento da concentração de proteínas total no LCE

- Punção espinal traumática
- Aumento da permeabilidade sangue-LCE
  - Aracnoidite (p. ex., subsequente à terapia com metotrexato)
  - Meningite (bacteriana, viral, fúngica, tuberculosa)
  - Hemorragia (subaracnóidea, intracerebral)
  - Distúrbios endócrinos/metabólicos
    - Síndrome do leite-álcali com hipercalcemia
    - Neuropatia diabética
    - Neuropatias e mielopatias hereditárias
    - Diminuição da função endócrina (tireoide, paratireoide)
    - Outros distúrbios (uremia, desidratação)
- Toxicidade de fármacos
  - Etanol, fenotiazinas, fenitoína
- Defeitos circulatórios no SNC
  - Obstrução mecânica (tumor, abscesso, hérnia de disco)
  - Efusão loculada de LCE
- Síntese aumentada de IgG
  - Neurossífilis, esclerose múltipla
  - Panencefalite esclerosante subaguda
- Aumento da síntese de IgG e da permeabilidade sangue-LCE
  - Síndrome de Guillain-Barré
  - Doenças vasculares do colágeno (p. ex., lúpus, periarterite)
  - Polirradiculopatia desmielinizante inflamatória crônica

LCE = líquido cerebrospinal.

rápida e sem necessidade de aparelhagem especial. Entretanto, são termossensíveis e requerem volumes de amostra bem maiores (cerca de 0,5 mL). Além disso, alguns métodos estão sujeitos a variações significativas associadas a alterações da proporção albumina/globulina (Schriever, 1965). Uma falsa elevação dos níveis proteicos pode ser observada com o uso dos métodos de TCA na presença de metotrexato (Kasper, 1988). O cloreto de benzetônio ou o cloreto de benzalcônio tem sido utilizado como agente precipitante em métodos automatizados e micrométodos (Luxton, 1989; Shephard, 1992).

Os métodos colorimétricos incluem o método de Lowry, métodos de fixação de corantes que utilizando azul brilhante de Comassie (CBB, Comassie brilliant blue) ou Ponceau S, além do método do biureto modificado. O método do CBB é rápido, altamente sensível e pode ser aplicado a amostras de pequeno volume. Os métodos imunológicos quantificam proteínas específicas, requerem somente 25 a 50 μL de LCE e sua execução é relativamente simples, desde que as condições experimentais e reagentes sejam padronizados. Os métodos automatizados também são empregados de forma habitual e costumam apresentar boa correlação com os métodos padrão (Lott, 1989).

Quantificações de albumina e IgG. É possível avaliar a permeabilidade da BHE por meio da determinação imunoquímica da proporção albumina de LCE/albumina sérica em g/dL. A proporção normal (1:230) (Tourtellotte, 1985) resulta no decimal incoveniente 0,004 que estimulou o uso do *índice de albumina de LCE/sérica*. Esse índice, por sua vez, é calculado de forma arbitrária do seguinte modo:

$$\text{Índice de albumina de LCE/sérica} = \frac{\text{albumina}_{LCE}\ (\text{mg/dL})}{\text{albumina}_{\text{sérica}}\ (\text{g/dL})} \quad (28.1)$$

Um índice com valor inferior a 9 é consistente com uma BHE intacta. Por outro lado, considera-se a existência de um discreto comprometimento diante de índices com valores de 9 a 14, comprometimento moderado diante de valores de 14 a 30 e comprometimento severo com índices maiores que 30 (Silverman, 1994). Esse índice é um pouco mais alto em bebês com até 6 meses de idade, como reflexo da imaturidade da BHE, e aumenta gradualmente após os 40 anos de idade. Uma punção traumática invalida seu cálculo.

O aumento da síntese de IgG intratecal é refletido por um aumento da proporção IgG de LCE/sérica:

$$\text{Proporção de IgG LCE/sérica} = \frac{\text{IgG}_{LCE}\ (\text{mg/dL})}{\text{IgG}_{\text{sérica}}\ (\text{g/dL})} \quad (28.2)$$

A proporção normal é igual a 1/390 ou 0,003 (Tourtellotte, 1985). Assim como o índice de albumina, o índice de IgG de LCE/sérica pode ser obtido com o valor de IgG de LCE em mg/dL. A faixa normal desse índice é de 3 a 8,7.

O *índice de IgG de LCE/sérica* pode aumentar em função da síntese de IgG intratecal ou do aumento de passagem de IgG plasmática a partir do rompimento da BHE. A imunoglobulina derivada da passagem de plasma pode ser corrigida dividindo-se o índice de IgG de LCE/sérica pelo índice de albumina de LCE/sérica, que fornece o índice de IgG de LCE.

Índice de IgG de LCE =

$$\frac{[\text{IgG}_{LCE}\ (\text{mg/dL}) \div \text{IgG}_{\text{sérica}}\ (\text{g/dL})]}{[\text{albumina}_{LCE}\ (\text{mg/dL}) \div \text{albumina}_{\text{sérica}}\ (\text{g/dL})]} \quad (28.3)$$

Ou:

Índice de IgG de LCE =

$$\frac{[\text{IgG}_{LCE}\ (\text{mg/dL}) \times \text{albumina}_{\text{sérica}}\ (\text{g/dL})]}{[\text{IgG}_{\text{sérica}}\ (\text{g/dL}) \times \text{albumina}_{LCE}\ (\text{mg/dL})]} \quad (28.4)$$

A faixa de referência normal para o índice de IgG é variável, como reflexo das variações que ocorrem na determinação dos quatro índices componentes. O limite máximo considerado razoável vale 0,8 (Souverijn, 1989). Entretanto, cada laboratório deve determinar sua própria proporção crítica.

A *taxa de síntese de IgG* é calculada por meio de uma fórmula empírica (Tourtellotte, 1985):

$$\text{Taxa de síntese de IgG (mg/dia)} = [(\text{IgG}_{LCE}) - (\text{IgG}_{\text{sérica}})/369 - (\text{albumina}_{LCE}) - (\text{albumina}_{\text{sérica}}/230) \cdot (\text{IgG}_{\text{sérica}}/\text{albumina}_{\text{sérica}}) \times 0{,}43] \times 5\ \text{dL/dia} \quad (28.5)$$

Todas as concentrações proteicas são expressas em mg/dL. O primeiro termo em parênteses representa a diferença existente entre a IgG_{LCE} medida e a IgG esperada a partir da difusão através da BHE. O número 369 é a proporção soro/LCE normal. O segundo termo em parênteses representa a diferença existente entre albumina_{LCE} medida e a albumina esperada, caso a BHE esteja intacta. O número 230 representa a proporção de albumina do soro/LCE normal. O excesso de albumina_{LCE} é multiplicado pela proporção IgG/albumina e pela proporção dos pesos moleculares de IgG em relação ao da albumina (0,43) para correção das alterações ocorridas na IgG_{LCE} em razão do aumento da permeabilidade da barreira. O número 5 converte o resultado expresso em concentração para uma quantidade diária, considerando uma produção média de LCE diária de 500 mL (i. e., 5 dL). A fórmula desconsidera quaisquer variações na produção de LCE ou no consumo de imunoglobulinas. Parte-se do princípio de que a proporção IgG/albumina se mantém constante diante de graus variáveis de comprometimento da BHE – um conceito que pode conduzir a erros variáveis (Lefvert, 1985). O intervalo de referência normal da taxa de síntese se estende de -9,9 a +3,3 mg/dia. Valores maiores que 8 mg/dia indicam uma taxa aumentada (Silverman, 1994).

Normalmente, o porcentual de IgG no LCE equivale a 3 – 5% do conteúdo total de proteínas do LCE. Contudo, na esclerose múltipla (EM), a concentração se aproxima da concentração plasmática (15 – 18%) (Hersey, 1980). O índice de IgG do LCE e a taxa de síntese de IgG apresentam uma sensibilidade de 90% no caso de pacientes com EM bem definida. Essa sensibilidade é menor para os pacientes em que há apenas uma possibilidade moderada de EM, pois a síntese de IgG intratecal aumenta em diversas outras doenças neurológicas inflamatórias.

O cálculo do índice de imunoglobulina e da taxa de síntese também é aplicável à IgM, IgA, cadeias leves de imunoglobulinas e anticorpos específicos para microrganismos infecciosos. Por exemplo, foi sugerido que a síntese aumentada de IgM e de cadeias leves κ livres atua como marcador da EM (Rudick, 1989; Lolli, 1991).

Técnicas eletroforéticas. Embora o diagnóstico final de EM seja clínico, houve avanços significativos no campo dos testes laboratoriais para esse distúrbio. O conteúdo total de proteínas do LCE está aumentado em menos de 50% dos pacientes com EM. De fato, se a concentração de proteínas do LCE for maior do que 100 mg/dL, é provável que o paciente não tenha EM. No entanto, conforme determinado na eletroforese do LCE, a fração correspondente às γ-globulinas frequentemente está aumentada na EM. Sendo assim, a proporção de proteínas totais do LCE/γ-globulinas excede 0,12 em cerca de 65% dos casos (Johnson, 1977). Utilizando a *eletroimunodifusão*, detecta-se uma proporção de IgG_{LCE}/albumina maior que 0,25 em cerca de 75% dos casos (Tourtellotte, 1971). Além disso, níveis acima da média do índice de IgG de LCE + 3 DP são encontrados em 80 a 85% dos casos de EM. Todavia, esse nível superior de referência varia significativamente entre os laboratórios, sendo relatados valores de *cutoff* de 0,58, 0,66 e 0,77 (Tibbling, 1977; Olsson, 1976; Markowitz, 1983, respectivamente). Por esse motivo, os laboratórios devem estabelecer seus próprios valores de referência.

A *eletroforese em gel de agarose de alta resolução* de amostras concentradas de LCE obtidos de pacientes com EM muitas vezes contém populações discretas de IgG denominadas bandas oligoclonais. Apesar de essas populações discretas de IgG normalmente estarem ausentes, é necessário haver duas ou mais bandas para dar suporte ao diagnóstico da EM. Uma única banda não é considerada um resultado positivo. Utilizando essa técnica, as bandas oligoclonais têm sido detectadas em 83-94% dos pacientes com EM definida, em 40 a 60% daqueles com EM provável, e em 20 a 30% dos possíveis casos de EM. Por outro lado, essas bandas também são encontradas com frequência em pacientes com panencefalite esclerosante subaguda, várias infecções virais envolvendo o SNC, neurossífilis, neuroborreliose, meningite criptocócica, síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa, carcinomatose meníngea, glioblastoma multiforme, linfoma de Burkitt, polineuropatia recorrente crônica, doença de Behçet, cisticercose e tripanossomíase, entre outras (Trotter, 1989; Chalmers, 1990; Fishman, 1992; Hall,

1992). Estudos subsequentes indicaram que, para detecção de EM, a eletroforese em gel de agarose apresenta um sensibilidade inferior àquelas anteriormente relatadas (ver adiante).

Cadeias leves oligoclonais (ambas, κ e λ) estão presentes em cerca de 90% dos pacientes com EM (Gallo, 1989; Sindie, 1991). Essas cadeias também foram identificadas no LCE de indivíduos negativos para bandas oligoclonais de IgG. Entretanto, como sua ocorrência é incomum na ausência de IgG e por se tratar de uma técnica custo-ineficiente, além da pronta disponibilidade da IRM, é improvável que seu uso se torne uma prática comum.

A *coloração com azul brilhante de Comassie* (CBB) ou corantes violeta padrão resolvem bandas oligoclonais utilizando apenas 5 μg de IgG (Silverman, 1994). Entretanto, a coloração com prata é 20 a 50 vezes mais sensível dos que o CBB e não requer a concentração da amostra de LCE. É importante salientar que, ao mesmo tempo, essas técnicas eletroforéticas também devem ser realizadas utilizando amostras de soro do paciente para excluir a possível existência de uma gamopatia policlonal (p. ex., doença hepática, lúpus sistêmico, artrite reumatoide, doença granulomatosa crônica), uma vez que distúrbios desse tipo podem ser acompanhados de difusão de imunoglobulinas para o LCE e consequente produção de resultados falso-positivos.

A *eletroforese por imunofixação* (IFE) é mais sensível do que a eletroforese em gel de agarose e dispensa a concentração do LCE (Cawley, 1976). Um estudo subsequente relatou que foi alcançada uma sensibilidade de 74% com a utilização dessa técnica, comparativamente aos 57% de sensibilidade proporcionados pela eletroforese em gel de agarose (Cavuoti, 1998). Mais recentemente, o emprego de uma técnica de imunofixação-peroxidase semiautomatizada proporcionou 83% de sensibilidade e 79% de especificidade para pacientes com EM clinicamente definida (Richard, 2002). No entanto, a IFE fornece menor número de bandas que a *focalização isoelétrica com imunoblot de Ig* (IgG-IEF). Além disso, as bandas detectadas por IFE tendem a ser mais difusas.

Em 1994, em um relato de consenso, conclui-se que a IgG-IEF é o método mais sensível para detecção das bandas oligoclonais (Andersson, 1994). Dando suporte a essa conclusão, um estudo recente demonstrou que a IgG-IEF detectou 100% dos casos de EM definida, mas apenas cerca de 50% dos casos resultaram positivos na eletroforese em gel de agarose (Lunding, 2000). Outros pesquisadores detectaram 91% dos casos de EM, sendo que apenas 68% desses casos foram positivos na eletroforese em agarose (Seres, 1998). De modo semelhante, uma técnica de IgG-IEF semiautomatizada identificou 90% dos casos de EM, em comparação aos 60% identificados por eletroforese em gel de agarose (Fortini, 2003). Não obstante, uma pesquisa realizada em 2002 constatou que 90% dos 235 laboratórios que realizavam análises de LCE para detecção de bandas oligoclonais usavam a eletroforese em gel de agarose. Menos de 10% desses laboratórios usava IEF (College of American Pathologists, 2002).

Em resumo, o diagnóstico da EM – assim como o de inúmeros distúrbios neurológicos – é definitivamente clínico e baseado na história neurológica e no exame físico. Todavia, resultados laboratoriais avançados, como a detecção dos índices de IgG aumentados e das bandas oligoclonais, além das técnicas de neuroimagem, têm se mostrado inestimáveis para o diagnóstico da EM.

Outras proteínas do LCE. Aproximadamente 300 proteínas diferentes foram identificadas no LCE por eletrofore bidimensional, tendo a focalização isoelétrica e o gel de poliacrilamida em presença de SDS como primeira e segunda dimensões, respectivamente (Harrington, 1986). O uso dessa técnica permitiu identificar quatro proteínas anormais em pacientes com doença de Creutzfeldt-Jacob (C-J). Duas dessas proteínas (cada uma com massa molecular aproximada de 40 kDa) também estavam presentes em alguns pacientes com encefalite causada por herpes simples, doença de Parkinson, síndrome de Guillain-Barré e esquizofrenia. Por outro lado, estavam ausentes em vários distúrbios neurológicos e em 100 amostras-controle de LCE normais. Essas proteínas e mais duas outras (massas moleculares de 26 e 29 kDa) foram encontradas em todos os casos de doença C-J e em 5 dos 10 casos de encefalite por herpes simples. Nenhuma delas foi detectada em outras doenças neurológicas nem nas amostras-controle.

O aumento da concentração de várias proteínas especificas do LCE tem sido associado a diversas doenças envolvendo o SNC (Tab. 28.12).

Tabela 28.12 Proteínas e doenças do SNC

Proteína	Principais doenças/distúrbios
α_2-macroglobulina	Hemorragia subdural, meningite bacteriana
Proteínas β-amiloide e τ	Doença de Alzheimer
β_2-microglobulina	Leucemia/linfoma, síndrome de Behçet
Proteína C reativa	Meningite bacteriana e viral
Fibronectina	Leucemia linfoblástica, AIDS, meningite
Meta-hemoglobina	Hemorragia subaracnóidea/subdural branda
Proteína básica da mielina	Esclerose múltipla, tumores, outros
Proteína 14-3-3	Doença de Creutzfeldt-Jacob
Transferrina	Vazamento de LCE (otorreia, rinorreia)

***Proteína básica da mielina* (*MBP*, myelin basic protein).** Sendo um componente da bainha de mielina dos nervos, a MBP é liberada durante o processo de desmielinização, como resultado de vários distúrbios neurológicos, especialmente na EM. Assim, essa proteína apresenta correlação positiva com a contagem de leucócitos do LCE, síntese de IgG intratecal e quociente de concentração da albumina no LCE/soro (Sellebjerg, 1998). Esses dados sustentam o uso da MBP presente no LCE como marcador de doenças substituto durante as exacerbações da EM aguda. Outros pesquisadores constataram que a análise de anticorpos dirigidos contra a MBP presentes em pacientes com síndromes clinicamente isoladas constitui um método rápido e preciso de prever a conversão inicial em EM clinicamente definida (Berger, 2003). Entretanto, níveis aumentados de LCE também foram detectados na síndrome de Guillain-Barré, lúpus eritematoso, panencefalite esclerosante subaguda, vários tumores cerebrais e após a irradiação do SNC e quimioterapia (Brooks, 1989; Mahoney, 1984). Também foi proposto que sua quantificação serviria de marcador prognóstico no caso de pacientes com lesões graves na cabeça (Noseworthy, 1985).

α_2-macroglobulina (A2M). Exceto pela pequena quantidade transportada através da BHE em vesículas pinocíticas, a A2M normalmente é excluída do LCE por seu tamanho grande. O número de vesículas pinocíticas está aumentado em certos casos de polineuropatia, acarretando o aumento da concentração de A2M no LCE. Uma elevação significativa reflete a ocorrência de hemorragia subdural ou rompimento da BHE, assim como ocorre na meningite bacteriana. A quantificação de A2M isolada ou sua correlação com a albumina e a IgG podem auxiliar na avaliação de distúrbios neurológicos, aumento da concentração de proteínas do LCE e rápida diferenciação entre as formas de meningite bacteriana e asséptica (Meucci, 1993; Kanoh, 1997).

β_2-microglobulina (B2M). Essa proteína integra a molécula de HLA classe I encontrada na superfície de todas as células nucleadas. Níveis no LCE acima de 1,8 mg/L estão associados ao linfoma e à leucemia leptomeníngea, porém não são altamente específicos (Weller, 1992) e apresentam um valor preditivo de 78% nos casos com citologia positiva (Jeffrey, 1990). Recentemente, também foi demonstrado que a B2M é um marcador da síndrome de neuro-Behçet (Kawai, 2000). Além disso, infecções virais (incluindo a infecção por HIV-1), outras condições inflamatórias e várias malignidades também foram associadas à elevação dos níveis dessa proteína. Entretanto, a quantificação da B2M ainda é considerada primariamente investigativa.

Proteína C reativa (CRP). Estudos iniciais indicaram que a CRP do LCE é útil na diferenciação entre meningite viral (asséptica) e meningite bacteriana (Corral, 1981; Abramson, 1985; Stearman, 1994). Há outros relatos de que a CRP do LCE constitui um teste de triagem mais útil para os casos de meningite viral *versus* bacteriana, especialmente em crianças (Sormunen, 1999). Uma metanálise dos estudos sobre CRP conduzidos a partir de 1980 sugeriu que níveis normais de CRP tanto no LCE como no soro estão associados a uma alta probabilidade de exclusão da meningite bacteriana (i. e., valor preditivo negativo de cerca de 97%) (Gerdes, 1998). Um estudo recente constatou que não só os níveis de CRP no LCE aumentam na meningite bacteriana como também estão significativamente mais altos em pacientes com meningite causada por bactérias Gram-positivas (Rajs, 2002).

Fibronectina. Essa grande glicoproteína (massa molecular aproximada de 420 kDa) normalmente é encontrada em quase todos os tecidos

e líquidos corporais. Tem como funções primárias a adesão celular e a fagocitose (Ruoslahti, 1981). A adesão celular permite aos leucócitos aderir e atravessar o endotélio vascular, e migrar para o sítio inflamatório.

Em crianças com leucemia linfoblástica aguda, níveis elevados de fibronectina no LCE estão associados a um mau prognóstico, provavelmente devido ao envolvimento leucêmico do SNC (Rautonen, 1989). Também há relatos de elevações significativas da fibronectina no LCE em pacientes com linfoma de Burkitt (Rajantie, 1989), alguns tumores sólidos metastáticos, astrocitomas e meningite bacteriana (Weller, 1990; Torre, 1991). Foram descritos níveis diminuídos de fibronectina em casos de meningite viral e complexo de demência da AIDS (Torre, 1991; 1993).

Proteína β-amiloide 42 e proteína τ. O diagnóstico da doença de Alzheimer (DA) baseia-se na presença de demência e de um padrão clínico específico (i. e., a partir da história médica, exame clínico) sugestivo de DA, acompanhado da exclusão de outras possíveis causas de demência. Em termos patológicos, a doença se caracteriza pela presença de emaranhados neurofibrilares e placas amiloides.

Estudos recentes indicaram que a quantificação de marcadores bioquímicos aumenta a acurácia diagnóstica, especialmente no início do curso da doença, quando os sintomas clínicos são brandos, vagos e se sobrepõem às alterações cognitivas que acompanham o envelhecimento e a demência isquêmica. Sendo assim, foi demonstrado que a acurácia do diagnóstico da DA é significativamente aumentada pela detecção de níveis aumentados de proteína τ microtúbulo-associada no LCE e de níveis diminuídos de proteína β-amiloide com terminação no aminoácido 42 (Andreasen, 2001; Riemenschneider, 2002; Sunderland, 2003). De fato, o valor preditivo para DA em estágio inicial é maior que 90% (Andreasen, 2001). Outros pesquisadores descobriram que a proporção calculada de proteína τ fosforilada/peptídeo β-amiloide é superior a qualquer uma das medidas isoladas (Maddalena, 2003). Os resultados encontrados foram: na distinção entre pacientes com DA e controles sadios (sensibilidade de 96% e especificidade de 97%); distinção entre pacientes com demência associada à DA e pacientes com demência não DA (sensibilidade de 80% e especificidade de 73%); e diferenciação entre DA e outros distúrbios neurológicos (sensibilidade de 80% e especificidade de 89%).

Proteína 14-3-3. As encefalopatias espongiformes transmissíveis constituem um grupo de doenças neurodegenerativas uniformemente fatais. Destas, a doença de Creutzfeldt-Jakob (C-J) é a principal doença espongiforme entre os seres humanos. Foram identificadas duas proteínas (designadas 130 e 131) presentes em baixas concentrações no LCE de pacientes com C-J. Essas proteínas possuem a mesma sequência de aminoácidos que a proteína 14-3-3 (Hsich, 1996). Além disso, nos pacientes com demência, um resultado positivo no imunoensaio para detecção de proteína 14-3-3 no LCE sustentou fortemente o diagnóstico da C-J. Em um estudo subsequente sobre os pacientes com C-J comprovada, a detecção da proteína 14-3-3 por imunoensaio apresentou uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 87% (Lemstra, 2000). Resultados falso-positivos foram observados principalmente em casos de pacientes que sofreram derrame e naqueles com meningoencefalite.

Utilizando uma técnica modificada de *Western blot*, outros pesquisadores relataram um valor preditivo positivo de 94,7% e um valor preditivo negativo de 92,4% para a C-J (Zerr, 1998). Resultados falso-positivos foram obtidos a partir de uma única análise de LCE de pacientes com encefalite por herpes simples, encefalite atípica, câncer de pulmão metastático e dano cerebral por hipóxia.

Transferrina e vazamento de LCE. O vazamento de LCE costuma se apresentar sob a forma de otorreia ou rinorreia subsequentes a um traumatismo na cabeça. Às vezes, esse vazamento se inicia meses ou anos após a produção da lesão. A meningite recorrente constitui séria complicação e faz com que seja muito importante identificar com acurácia o líquido perdido por vazamento. Nesse sentido, a quantificação de proteína e glicose são demasiadamente inespecíficas para terem algum valor. A transferrina – uma glicoproteína ligadora de ferro com massa molecular aproximada de 77 kDa – é sintetizada primariamente no fígado. Entretanto, são encontradas duas isoformas de transferrina no LCE. Sua principal isoforma (β_1-transferrina) está presente em todos os líquidos corporais. A isoforma secundária (β_2-transferrina) é encontrada somente no SNC, onde é produzida pela conversão catalítica da β_1-transferrina por ação de uma neuraminidase. É possível identificar prontamente ambas as isoformas por meio da IFE.

A eletroforese de proteínas com imunofixação da transferrina é um teste não invasivo, rápido e barato, com alta sensibilidade e especificidade, que requer apenas 0,1 mL de líquido (Ryall, 1992; Normansell, 1994). Diversos relatos demonstraram o valor dessa técnica para o diagnóstico da otorreia e rinorreia de LCE – condições nas quais ambas as isoformas são prontamente identificadas (Irjala, 1979; Rouah, 1987; Zaret, 1992). Outros pesquisadores estressaram a importância da identificação da β_2-transferrina tanto no vazamento de LCE como no vazamento perilinfático do ouvido interno, bem como as possíveis fontes de erro devidas à presença da variante alélica da transferrina (Skedros, 1993a,b; Sloman, 1993).

Metemoglobina e bilirrubina. Apesar de a maioria dos casos de hemorragia subaracnóidea e intracerebral ser prontamente identificada por TC, essa técnica muitas vezes não identifica pacientes com hemorragia subaracnóidea branda, pequenos hematomas subdurais ou cerebrais, infiltração de sangue proveniente de aneurisma ou neoplasma, e a partir de pequenos infartos cerebrais. Nesses casos, foi demonstrado que a análise espectrofotométrica do LCE é capaz de detectar a metemoglobina em amostras de LCE incolores (< 0,3 μmol/L) (Trbojevic-Cepe, 1992). Contudo, um aumento da concentração de bilirrubina no LCE atualmente é considerado um achado crítico para dar suporte ao diagnóstico de hemorragia subaracnoidea (UK National External Quality Assessment Scheme for Immunochemistry Working Group, 2003). Sendo assim, na árvore de decisão para interpretação e transmissão de resultados, recomenda-se um único ponto de cutoff (> 0,007) para absorbância líquida da bilirrubina.

Glicose. Derivada da glicose sanguínea, a glicose de jejum no LCE normalmente é encontrada em níveis de 50 a 80 mg/dL (2,8–4,4 mmol/L), correspondendo a cerca de 60% dos valores plasmáticos. Os resultados obtidos devem ser comparados aos níveis plasmáticos, idealmente após um jejum de 4 horas, para sua correta interpretação clínica. A proporção normal de glicose no LCE/plasma varia de 0,3 a 0,9 conforme as flutuações nos níveis sanguíneos, devido ao retardo do tempo de equilíbrio da glicose no LCE.

Valores no LCE abaixo de 40 mg/dL (2,2 mmol/L) ou proporções inferiores a 0,3 são considerados anormais. A hipoglicorraquia é um achado característico da meningite bacteriana, turberculosa e fúngica. No caso da meningite bacteriana, contudo, a sensibilidade pode ser de até 55% (Hayward, 1987), de modo que níveis normais não excluem tais condições. Em alguns casos de meningoencefalite viral também são detectados baixos níveis de glicose, porém, geralmente não tão baixos quanto o observado na meningite bacteriana. Baixos níveis de glicose no LCE também podem ser produzidos com o envolvimento das meninges por tumor maligno, sarcoidose, cisticercose, triquinose, ameba (Naegleria), meningite sifilítica aguda, administração intratecal de albumina sérica radioiodada, hemorragia subaracnóidea, hipoglicemia sintomática e meningite reumatoide (Fishman, 1992).

A diminuição dos níveis de glicose no LCE pode ser provocada pela ocorrência de glicólise anaeróbia no tecido cerebral e em leucócitos, bem como pelo comprometimento do transporte no LCE. As bactérias em geral estão presentes em número insuficiente para atuarem como fator contribuinte importante. A normalização dos níveis de glicose no LCE ocorre antes daquela dos níveis de proteína e das contagens celulares durante a recuperação da meningite, constituindo um parâmetro útil à avaliação da resposta do paciente ao tratamento.

A detecção de *níveis aumentados de glicose no LCE* é desprovida de significado clínico e reflete o aumento dos níveis de glicose no sangue 2 horas após a realização de uma punção lombar. Uma punção traumática também pode provocar um aumento espúrio da glicose no LCE.

Lactato. Os níveis de lactato no LCE e no sangue são bastante independentes um do outro. O intervalo de referência para crianças mais velhas e adultos corresponde a 9 a 26 mg/dL (1–2,9 mmol/L) (Knight, 1981). Recém-nascidos apresentam níveis mais altos, os quais variam entre 10 a 60 mg/dL (1,1–6,7 mmol/L) nos primeiros 2 dias de vida, e 10 a 40 mg/dL (1,1–4,4 mmol/L) em 3 a 10 dias após o nascimento (McGuinness, 1983). Níveis de lactato elevados no LCE refletem a ocorrência de um metabolismo anaeróbio no SNC, decorrente de hipóxia tecidual.

A quantificação de lactato tem sido empregada como teste adjuvante para diferenciação entre meningite viral, meningite causada por bactérias, micoplasma e fungos, e meningite tuberculosa, no qual os parâmetros de rotina conduzem a resultados equivocados. Pacientes com meningite viral costumam apresentar níveis de lactato abaixo de 25 mg/dL (2,8 mmol/L), quase sempre inferiores a 35 mg/dL (3,9 mmol/L), enquanto aqueles com meningite bacteriana apresentam níveis de lactato tipicamente acima de 35 mg/dL (Bailey, 1990; Cameron, 1993). Adotando como valor de cutoff uma concentração de 30 a 36 mg/dL para os casos de meningite bacteriana, é possível obter uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 90%. Nos casos de meningite viral, meningite bacteriana parcialmente tratada e meningite tuberculosa, com frequência são detectados níveis de lactato intermediários que se sobrepõem uns aos outros, limitando o uso da quantificação de lactato para o diagnóstico diferencial.

Níveis de lactato que continuam elevados no LCE ventricular estão associados a um prognóstico ruim em casos de pacientes com lesão grave na cabeça (DeSalles, 1986).

Isoprostanas F2. Os níveis de isoprostanas F2 aumentam nas áreas cerebrais afetadas por doenças em pacientes com DA (Pratico, 1998). Em comparação aos controles da faixa etária correspondente, os níveis de isoprostanas F2 no LCE também estão aumentados em pacientes com DA provável (Montine, 1999). Por isso, aliada à quantificação das proteínas τ e β-amiloide no LCE, a quantificação de isoprostanas F2 no LCE parece aumentar a acurácia do diagnóstico laboratorial da DA (Montine, 2001).

Enzimas. Uma grande variedade de enzimas derivadas do tecido cerebral, sangue ou elementos celulares foi descrita no LCE. Embora os ensaios para detecção de enzimas no LCE sejam pouco utilizados para o diagnóstico das doenças que afetam o SNC, esses ensaios se mostram úteis diante de certas doenças/distúrbios.

Adenosina deaminase (ADA). A ADA catalisa a desaminação hidrolítica irreversível da adenosina para formação da inosina. Como a ADA é particularmente abundante em linfócitos T – que aumentam em número na tuberculose –, sua quantificação tem sido recomendada para o diagnóstico da tuberculose pleural, peritoneal e meníngea. Além disso, nos casos de infecções tuberculosas são detectados níveis mais altos dessa enzima do que nas infecções causadas por vírus e bactérias, e nas doenças malignas (Blake, 1982; Mann, 1982). Recentemente, constatou-se que níveis de ADA acima de 15 U/L constituem forte indicação de meningite tuberculosa, pois os casos de meningite não tuberculosa estão consistentemente associados a níveis de ADA abaixo desse valor (Choi, 2002). No entanto, a ADA tem utilidade limitada nos casos de distúrbio neurológico associado ao HIV (Corral, 2004).

Creatina quinase (CK). O tecido cerebral é rico em CK, já que participa na manutenção do suprimento adequado de adenosina trifosfato. Há relatos de aumento da atividade de CK em inúmeros distúrbios envolvendo o SNC, tais como hidrocefalia, infarto cerebral, vários tumores cerebrais primários e hemorragia subaracnóidea, entre outros (Savory, 1979). Em pacientes que sofreram traumatismo craniano, os níveis de CK no LCE correlacionam-se diretamente com o grau de severidade da concussão (Florez, 1976).

Normalmente, não há CK-MM nem CK-MB no LCE e, quando são identificadas, sua presença se deve à contaminação com sangue (CK-MM) e ao estabelecimento de um equilíbrio entre CK-BB e CK-MM para produção de CK-MB. Considerando que a isozima CK-BB corresponde a cerca de 90% da atividade de CK no cérebro, enquanto a CK mitocondrial (CKmt) representa os 10% de atividade restantes, conclui-se que a quantificação da isozima de CK é mais específica para detecção de distúrbios do SNC do que a quantificação de CK total (Chandler, 1984).

A concentração de CK-BB no LCE aumenta 6 horas após o evento de insulto isquêmico ou anóxico. A isquemia cerebral global após um episódio de parada respiratória ou cardíaca resulta na produção de uma lesão cerebral difusa, em que os níveis de CK-BB atingem o pico em aproximadamente 48 horas (Chandler, 1986). Nessas circunstâncias, uma atividade de CK-BB inferior a 5 U/L (limite máximo normal) no LCE indica a existência de um dano neurológico mínimo; uma atividade de 5 a 20 U/L indica que o SNC apresenta lesão de grau suave a moderado; e níveis de atividade de 21 a 50 U/L comumente estão associados à morte. Essencialmente, todos os pacientes com níveis acima de 50 U/L morrem.

O aumento dos níveis de CK-BB também estão associados ao resultado de uma hemorragia subaracnóidea (Coplin, 1999). Nesse caso, foi demonstrado que níveis de CK-BB acima de 40 U/L elevaram a 100% as chances de haver um resultado inicial ou tardio desfavorável. A taxa de morte foi de 13% diante de níveis de CK-BB inferiores a 40 U/L no LCE.

Lactato desidrogenase (LD). O tecido cerebral apresenta alta atividade de LD, com predominância de frações de isozimas LD_1 e LD_2 de mobilidade eletroforética rápida. Uma atividade de LD total de 40 U/L é considerada um limite máximo normal razoável para indivíduos adultos. Para recém-nascidos, esse limite vale 70 U/L (Donald, 1986; Engelke, 1986). A LD é útil para diferenciar uma punção traumática de uma hemorragia intracraniana, visto que uma punção traumática recente em que os eritrócitos permanecem intactos não produz aumento significativo dos níveis de LD (Engelke, 1986). A sensibilidade e especificidade são de aproximadamente 70 a 85%, dependendo do valor de cutoff. Assim como ocorre com o lactato, a atividade de LD também é significativamente maior na meningite bacteriana do que na meningite asséptica (Donald, 1986; Engelke, 1986). Adotando um *cutoff* de 40 U/L, obtem-se uma sensibilidade de cerca de 86% e uma especificidade em torno de 93%.

Os níveis de LD total no LCE estão igualmente aumentados em pacientes com leucemia envolvendo o SNC, linfoma, carcinoma metastático, meningite bacteriana e hemorragia subaracnóidea (Kjeldsberg, 1993). Foi demonstrado que as isozimas de LD presentes no LCE acrescentam considerável especificidade à avaliação de diversos tumores cerebrais metastáticos (Fleisher, 1981). Assim, a proporção de LD_5 em relação à LD total está aumentada (i. e., acima de 10 – 15%) em pacientes com metástases leptomeníngeas de carcinoma da mama, pulmões e melanoma maligno. A análise de isozimas também revela um padrão distinto em crianças pequenas com espasmos do lactente (Nussinovitch, 2003a) e convulsões febris (Nussinovitch, 2003b). Comparados aos controles, ambos distúrbios se caracterizam pela diminuição dos níveis de LD_1, aumento de LD_2 e LD_3, e ausência de alteração dos níveis de LD_4 e LD_5.

A tomografia computadorizada (TC) tem valor limitado na estimação do potencial de recuperação e do resultado neurológico durante os estágios iniciais da lesão cerebral isquêmica. Todavia, quando comparados aos controles (média de LD de 11,2 U/L), pacientes com derrame em estágio inicial apresentaram níveis médios de 40,9 U/L. Aqueles com ataque isquêmico transiente (TIA, *transient ischemic attack*) apresentaram níveis médios de 11,8 U/L (Lampl, 1990). Além disso, o aumento dos níveis de LD 72 horas após a ressuscitação nos pacientes com lesão cerebral isquêmica indica um prognóstico ruim (Karkela, 1992).

Lisozima. A lisozima (maramidase) catalisa a despolimerização de mucopolissacarídeos. Por ser particularmente abundante nos lisossomos de neutrófilos e macrófagos, apresenta atividade muito baixa no LCE normal. Contudo, a atividade da lisozima no LCE encontra-se bastante aumentada em pacientes com meningite tanto bacteriana como tuberculosa. Desse modo, uma análise discriminativa revelou que 97% dos pacientes com meningite bacteriana apresentavam níveis aumentados de lisozima (Ribeiro, 1992). Outros pesquisadores demonstraram que pacientes com meningite tuberculosa apresentavam níveis significativamente mais altos de lisozima no LCE do que aqueles com meningite bacteriana, meningite bacteriana parcialmente tratada e indivíduos do grupo controle (Mishra, 2003). Para os casos de meningite tuberculosa, o teste apresentou sensibilidade e especificidade de 93,7 e 84,1%, respectivamente. Os níveis da enzima também estão aumentados na atrofia cerebral, em diversos tumores do SNC, EM, hemorragia intracraniana e epilepsia (Kjeldsberg, 1993).

Amônia, aminas e aminoácidos. Os níveis de amônia no LCE variam de 30 a 50% em relação aos valores observados no sangue. Níveis elevados em geral são proporcionais ao grau de encefalopatia hepática preexistente, contudo, é difícil determiná-los. Além disso, como a encefalopatia hepática via de regra apresenta correlação com os níveis sanguíneos de amônia, a quantificação dos níveis de amônia no LCE tem pouco ou nenhum valor clínico. Por outro lado, sintetizada a partir da amônia e do ácido glutâmico, a glutamina cerebral atua

como meio de eliminação da amônia do SNC. Sendo assim, os níveis de glutamina no LCE refletem a concentração de amônia presente no cérebro. Os intervalos de referência para a glutamina dependem do método utilizado, sendo que o limite referencial superior vale 20 mg/dL. Valores acima de 35 mg/dL geralmente estão associados à encefalopatia hepática (Fishman, 1992). Níveis elevados de glutamina no LCE também foram detectados em pacientes com encefalopatia secundária à hipercapnia e sepse (Mizock, 1989).

Uma das principais teorias sobre a etiologia da esquizofrenia envolve a dopamina. O alicerce dessa teoria reside no fato de os fármacos neurolépticos bloqueadores dos receptores de dopamina serem eficazes no tratamento desse distúrbio. Dessa forma, há relatos afirmando que níveis elevados de ácido homovanílico (HVA) – um metabólito das aminas biogênicas – no LCE estão associados ao grau de severidade da psicose esquizofrênica (Maas, 1997). Entretanto, observou-se que a concentração de HVA variou em função da psicose, em vez de ser estar relacionada ao diagnóstico da esquizofrenia em si. Outros relatos descreveram uma diminuição dos níveis de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) – um metabólito da serotonina – no LCE de pacientes esquizofrênicos com comportamento suicida (Cooper, 1992). Esse relato fornece suporte adicional à existência de uma possível relação entre comportamento suicida e metabolismo da serotonina no SNC.

Apesar de a concentração de aminoácidos livres no LCE ser relativamente alta em bebês com menos de 30 dias de vida, essa concentração aumenta ainda mais em indivíduos com convulsões febris e meningite bacteriana. O GABA (ácido γ-aminobutírico), que é um dos principais transmissores cerebrais inibitórios, é encontrado em níveis significativamente reduzidos nos neurônios dos gânglios basais, e em níveis quase indetectáveis no LCE de pacientes com DA e doença de Huntington (Achar, 1976; Dubowitz, 1992). Além disso, o GABA foi detectado no LCE de todos os pacientes que sofriam de ataques de enxaqueca, mas estava ausente naqueles que apresentavam dor de cabeça causada por tensão ou nos indivíduos do grupo controle, que não tinham dores de cabeça (Welch, 1975). De modo recíproco, bebês com hiperecplexia – um distúrbio de herança autossômica dominante caracterizado tanto por ataques convulsivos como pela conhecida "síndrome do bebê rígido" – apresentaram níveis de GABA significativamente diminuídos no LCE (Dubowitz, 1992; Berthier, 1994).

Eletrólitos e equilíbrio acidobásico. Não há indicações clinicamente úteis para a quantificação da concentração de sódio, potássio, cloreto, cálcio ou magnésio no LCE. A determinação do pH, P_{CO2} e bicarbonato, do mesmo modo, não é prática em termos de assistência ao paciente (Fishman, 1992).

Marcadores tumorais. Inúmeros estudos mostraram que os níveis de diversos marcadores tumorais estão aumentados no LCE de pacientes com tumores tanto primários como metastáticos. Contudo, o valor da maioria desses testes na prática clínica de rotina ainda precisa ser estabelecido.

Antígeno carcinoembrionário (CEA). O CEA é uma proteína oncofetal produzida por uma variedade de carcinomas. Um estudo inicial constatou que os níveis de CEA estavam aumentados em 44% dos pacientes com tumores cerebrais metastáticos (Suzuki, 1980). Outros pesquisadores relataram que a determinação dos níveis de CEA no LCE apresentou uma sensibilidade de apenas 31%, embora a especificidade obtida tenha sido de aproximadamente 90% na detecção de carcinomas metastáticos de leptomeninges (Klee, 1986; Twijnstra, 1986). Recentemente, foram detectados níveis de CEA no LCE de pacientes com tumores cerebrais benignos, malignos primários e metastáticos iguais a 0,31 ng/mL, 0,92 ng/mL e 6,3 ng/mL, respectivamente (Batabyal, 2003).

Outras proteínas oncofetais são a *gonadotrofina coriônica humana* (HCG), produzida por coriocarcinomas e tumores de células germinativas malignos com componente trofoblástico, e a *α-fetoproteína*, que é uma glicoproteína produzida por elementos do saco vitelino de tumores de células germinativas. Os resultados de um estudo recente levaram à conclusão de que tanto a β-HCG como a α-fetoproteína podem ser úteis ao diagnóstico e monitoramento da resposta à terapia de pacientes com tumores de células germinativas do SNC (Seregni, 2002).

A elevação dos níveis de ferritina no LCE constitui indicação sensível da existência de malignidade no SNC, porém apresenta especificidade muito baixa, uma vez que seus níveis também estão aumentados em pacientes com doenças neurológicas inflamatórias (Zandman-Goddard, 1986).

Exame microbiológico

Um exame completo e imediato do LCE é essencial ao diagnóstico de infecções afetando o SNC, uma vez que a transmissão inadequada ou incorreta de uma informação pode resultar em mortalidade ou morbidade significativa. Apesar das alterações na pressão de abertura, as contagens celulares total e diferencial, a determinação da concentração de proteínas total e dos níveis de glicose podem sugerir uma etiologia infecciosa (Tab. 28.13). A coloração por Gram e a realização de culturas são críticas para o estabelecimento do diagnóstico definitivo.

Meningite bacteriana. Os agentes mais comuns de meningite bacteriana são os estreptococos do grupo B (recém-nascidos), *Neisseria meningitidis* (bebês com 3 meses de idade ou mais) (Fig. 28.9), *Streptococcus pneumoniae* (bebês com 3 meses de idade ou mais), *Escherichia coli* e outros bacilos Gram-negativos (recém-nascidos e bebês com até 1 mês de idade), *Haemophilus influenzae* (bebês com 3 meses e indivíduos com até 18 anos de idade) e *Listeria monocytogenes* (recém-nascidos, idosos, alcoólatras e indivíduos imunossuprimidos) (Graves, 1989; Wenger, 1990). O uso disseminado da vacina com *H. influenzae* de tipo B reduziu dramaticamente a incidência desse organismo, que é o agente bacteriano causador de meningite mais comum entre crianças pequenas. Desvios de LCE, traumatismo craniano e neurocirurgias expõem os pacientes ao risco de infecções no SNC causadas por espécies de *Staphylococcus*, bacilos Gram-negativos e espécies de *Propionibacterium*.

A coloração de Gram continua sendo o método com maior acurácia e mais rápido de diagnosticar infecções no SNC. Todas as amostras devem ser concentradas por centrifugação antes de serem coradas por

Tabela 28.13 Achados típicos da meningite no LCE lombar

Teste	Bacteriana	Viral	Fúngica	Tuberculosa
Pressão de abertura	Alta	Geralmente normal	Variável	Variável
Contagem de leucócitos	≥ 1.000/μL	< 100/μL	Variável	Variável
Diferencial de células	Principalmente neutrófilos*	Principalmente linfócitos†	Principalmente linfócitos	Principalmente linfócitos
Proteína	Aumento suave a marcante	Aumento normal a suave	Aumentada	Aumentada
Glicose	Usualmente ≤ 40 mg/dL	Normal	Diminuída	Diminuída: pode ser < 45 mg/dL
Proporção LCE/glicosérica	Diminuição normal a marcante	Geralmente normal	Baixa	Baixa
Ácido lático	Aumento suave a marcante	Aumento normal a marcante	Aumento suave a moderado	Aumento suave a moderado

* Linfocitose presente em cerca de 10% dos casos.

† Os neutrófilos podem predominar no início da doença.

Dados de Arevalo, 1989; Body, 1987; Fishman, 1992; Tang, 1988; Wubbel, 1998; Zunt, 1999.

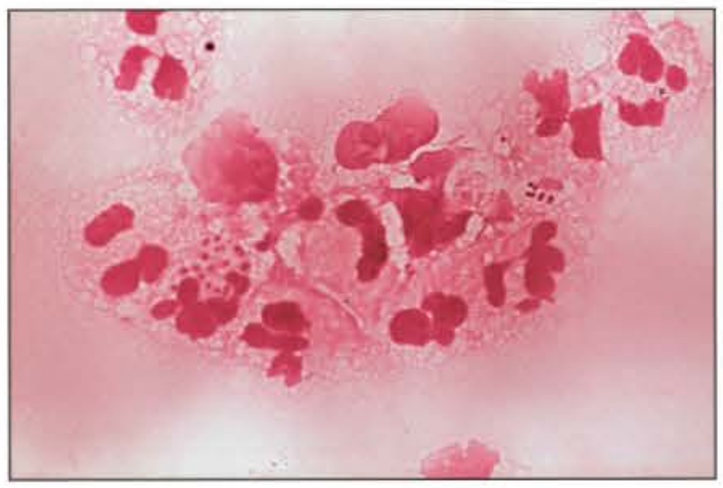


Figura 28.9 Coloração de Gram do LCE mostrando diplococos Gram-negativos característicos de *N. meningitidis*.

Gram e cultivadas. Dependendo do microrganismo infeccioso e de sua concentração no LCE, a sensibilidade desse método pode apresentar uma variação de 60 a 90%, com o maior grau de sensibilidade correspondendo às maiores concentrações de bactéria (cerca de 10^5 unidades formadoras de colônia/mL). Por exemplo, a sensibilidade da coloração de Gram para detecção de *Listeria monocytogenes* e bacilos Gram-negativos é menor ou igual a 50% (Greenlee, 1990). No caso de pacientes com grande número de leucócitos polimorfonucleares e que não apresentam nenhum organismo evidenciado pela coloração de Gram, a coloração mais sensível de alaranjado de acridina pode ser útil. As culturas apresentam uma sensibilidade de 80 a 90%, porém essa sensibilidade é 30% menor nos casos parcialmente tratados (Greenlee, 1990).

Embora os métodos baseados nas culturas-padrão sejam o principal ponto de apoio do diagnóstico, o teste Binax NOW – que utiliza antígeno de *Streptococcus pneumoniae* e consiste em um ensaio em membrana imunocromatográfica para detecção da presença do antígeno de parede celular (polissacarídeo C) comum a todos os sorotipos de pneumococos – tem se mostrado uma ferramenta valiosa para o rápido diagnóstico da meningite pneumocócica a partir do LCE. Os testes de aglutinação de látex para antígeno bacteriano (BAT), que utilizam amostras de LCE para detecção de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e estreptococos do grupo B β-hemolítico, eram historicamente empregados como auxiliares da coloração de Gram e das culturas. No entanto, sua sensibilidade é quase a mesma da coloração de Gram e um resultado negativo não exclui a possibilidade de um diagnóstico de meningite bacteriana. Talvez, a melhor aplicação dos testes antigênicos de aglutinação do látex sejam os casos de meningite adquirida na comunidade, parcialmente tratados, com resultado negativo para presença de microrganismos na coloração de Gram (Perkins, 1995; Wilson, 1997). As tiras reativas utilizadas para amostras de urina também têm sido empregadas na caracterização da meningite bacteriana (Moosa, 1995). Apesar de não serem adotadas por laboratórios com uma boa equipe de funcionários, as tiras reativas podem ser úteis em pequenos estabelecimentos que não dispõem de microscópios nem culturas.

O *teste do lisado de Limulus* é bastante sensível para detecção de endotoxinas, que são produzidas pela maioria das bactérias Gram-negativas. É particularmente útil como teste rápido em casos de recém-nascidos, para os quais o diagnóstico e tratamento precoces são cruciais. Todavia, como a endotoxina é ubíqua e há disseminação da contaminação, é preciso adotar as devidas precauções. Apesar da grande sensibilidade, esse teste jamais se tornou popular entre os laboratórios clínicos. Em vez disso, é empregado primariamente para assegurar a esterilidade das soluções utilizadas na nutrição parenteral.

Estudos recentes indicaram que o uso da PCR e do sequenciamento do RNA ribossomal 16S em amostras de LCE é bastante útil no diagnóstico da meningite bacteriana (Schuurman, 2004). Em comparação com a cultura de bactérias, o ensaio mostrou sensibilidade de 86%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo de 80% e valor preditivo negativo de 98%. Os testes de amplificação do ácido nucleico também podem ser úteis em casos de pacientes que já estão recebendo terapia antimicrobiana, ou na detecção de patógenos mais exigentes, como *N. meningitidis* (Seward, 2000; Porritt, 2000; Baethgen, 2003).

Meningite por espiroquetas. A incidência da neurossífilis tem aumentado nos últimos anos, principalmente entre pacientes infectados pelo HIV. Há um relato em que 44% dos pacientes com neurossífilis estavam com AIDS (Flood, 1998). Infelizmente, faltou estudar os demais pacientes infectados com HIV que não desenvolveram AIDS.

O diagnóstico de uma infecção no SNC em pacientes com sífilis consiste primariamente na análise de parâmetros do LCE e na realização de testes sorológicos. Anormalidades envolvendo a concentração de proteínas e as contagens celulares do LCE são achados comuns na meningite sifilítica, ainda que sejam inespecíficos. É difícil realizar testes sorológicos com amostras de LCE para diagnosticar casos de neurossífilis. O teste não treponêmico padrão realizado com amostras de LCE é o VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory* – Laboratório de Pesquisas sobre Doenças Venéreas). Diante da presença de alguns eritrócitos contaminando o LCE, a especificidade do VDRL é alta, porém a sensibilidade é de apenas 50 a 60% (Davis, 1989). Os testes treponêmicos, como o de absorção de anticorpo treponêmico (FTA-ABS), são sensíveis e específicos para a sífilis. Contudo, seu uso na análise de amostras de LCE para detecção de neurossífilis é controverso. O FTA-ABS de LCE é altamente sensível, porém pode gerar resultados falso-positivos. Além disso, na ausência de anormalidades envolvendo o LCE ou de suspeita clínica, esse teste não deve ser utilizado como teste de triagem. Por isso, foram propostas as seguintes generalizações (Davis, 1989): (1) um soro não reativo no teste de FTA-ABS exclui a neurossífilis; (2) um soro reativo e um LCE não reativo no teste de FTA-ABS essencialmente excluem a neurossífilis; (3) um LCE reativo no teste VDRL indica probabilidade de neurossífilis; e (4) um LCE reativo no teste de FTA-ABS pode indicar neurossífilis ativa, assintomática ou tratada, ou uma reação falso-positiva.

Meningite viral. Os enterovírus (vírus ECHO, coxsackievírus, poliovírus) são responsáveis por até 80% dos casos de meningite, com um pico sazonal no final verão. De fato, os vírus ECHO 9 (E9) e 30 (E30) são os principais responsáveis pelo recente aumento do número de casos de meningite asséptica (Morbidity and Mortality Weekly Report, 2003). A maioria dos pacientes apresenta LCE pleiocítico e, embora os neutrófilos possam ser observados já no início da infecção, os indivíduos afetados logo desenvolvem uma predominância de linfócitos.

Antes do teste de diagnóstico molecular, a meningite era diagnosticada por exclusão, uma vez que a sensibilidade das culturas pode ser extremamente baixa. Assim, em um estudo antigo, o diagnóstico etiológico específico dado por culturas virais variou entre 72% causados por enterovírus e 5% causados pelo vírus herpes simples (HSV) (Marton, 1986).

A PCR com transcriptase transversa (RT-PCR) é significativamente mais sensível do que as culturas celulares (Dumler, 1999; Hausfater, 2004). Ainda que de forma discutível, essa técnica evoluiu e se tranformou no padrão-ouro do diagnóstico de meningite viral secundária ao enterovírus, HSV, citomegalovírus e vírus varicela zóster. É importante notar que, para os pacientes com meningite associada ao arbovírus, a análise do soro e do LCE obtidos em fase aguda e convalescente continua sendo o alicerce do diagnóstico. Os resultados produzidos por um ensaio de RT-PCR disponível no mercado (teste de RT-PCR Penter), comparativamente àqueles obtidos por cultura celular e em um ensaio de RT-PCR domiciliar, foram os seguintes: 52% foram positivos por cultura celular; 76% foram positivos pelo ensaio de RT-PCR domiciliar; e 80% foram positivos pelos teste de RT-PCR comercial (Jacques, 2003). Além disso, o RT-PCR é tão sensível quanto o RT-PCR referencial e ambos são significativamente mais sensíveis para o rápido diagnóstico de infecções causadas por entero- e rinovírus (Kares, 2004). O uso de RT-PCR também pode resultar em uma significativa economia, em termos de custo, proporcionada pela redução do tempo de internação hospitalar e pela eliminação de intervenções diagnósticas e terapêuticas desnecessárias (Ramers, 2000).

A amplificação do DNA do HSV-2 por PCR pode ser útil ao diagnóstico precoce da encefalite causada por esse vírus, sendo que mostrou uma excelente correlação com dados obtidos por biópsia cerebral (Lakeman, 1995). É possível que surjam resultados falso-negativos bem no início das infecções e nos casos de punção sanguinolenta. Como os resultados de PCR podem se tornar negativos em 1 a 14 dias após o aparecimento dos sintomas, a realização de testes sorológicos com amostras de soro e LCE para pesquisa de anticorpos contra HSV pode ser útil se aliada ao PCR.

Vírus da imunodeficiência humana (HIV). Uma grande variedade de anomalias pode ser encontrada em pacientes HIV-positivos com ou sem doença neurológica, tais como pleiocitose linfocítica, elevação

dos índices de IgG e bandas oligoclonais (Chalmers, 1990; Hall, 1992). A identificação de infecções oportunísticas constitui a indicação mais importante para um exame de LCE. Pode haver infecções fúngicas severas mesmo diante de poucos ou nenhum parâmetro anormal no LCE.

Meningite fúngica. O criptococos é o patógeno fúngico isolado com mais frequência a partir do LCE. As colorações com tinta nanquim ou nigrosina para halos capsulares de criptococos apresentam uma sensibilidade aproximada de 25%, a qual aumenta para 53% com a realização de punções lombares múltiplas (Marton, 1986). A detecção do antígeno criptocócico em amostras de soro ou LCE por aglutinação do látex apresenta uma sensibilidade que varia de 60 a 95%. Pode haver produção de resultados falso-negativos decorrentes do efeito prozona ou de uma baixa concentração de antígeno polissacarídico. Doença precoce, infecção intraparenquimal, infecção com variantes não capsuladas de *Cryptococcus neoformans* e formação de imunocomplexos (corrigida pelo tratamento com pronase) são condições que também podem levar à produção de resultados falso-negativos. Por outro lado, o soro ou o LCE contendo fator reumatoide ou obtidos de pacientes infectados por *Trichosporon beigelii* pode render resultados falso-positivos. Havendo forte suspeita clínica da presença de fungos dimórficos ou filamentosos, a obtenção de grandes volumes de LCE (cerca de 15–20 mL) é ótima para a realização de culturas visando à melhorada recuperação dos organismos fúngicos.

Meningite tuberculosa. Um LCE anormal com elevação da concentração de proteínas e predominância linfocítica é considerado a marca registrada da meningite tuberculosa. As colorações acidorresistentes de amostras de LCE para diagnóstico da meningite tuberculosa apresentam sensibilidade altamente variável, podendo ser de 10 a 12% (Greenlee, 1990) a mais de 50% (Thwaites, 2004). Grandes volumes de LCE, muitas vezes obtidos por meio de múltiplas punções lombares, são recomendados para melhorar a sensibilidade tanto da coloração acidorresistente como das culturas (Marton, 1986).

A amplificação de ácidos nucleicos por PCR para detecção de sequências de DNA específicas para *Mycobacterium tuberculosis* é bastante promissora em termos de diagnóstico rápido e acurado da meningite tuberculosa (Lin, 1995; Desai, 2002). Entretanto, um resultado de PCR negativo não exclui o diagnóstico desse tipo de meningite. Na verdade, se restar uma forte suspeita clínica, uma terapia empírica deve ser iniciada.

O DOT-ELISA foi padronizado para detectar antígenos tuberculínicos e anticorpos dirigidos contra M. tuberculosis presentes no LCE. Utilizando essa técnica, obteve-se reações positivas em 86% dos casos com suspeita de meningite tuberculosa (Kashyap, 2003). Apenas 5% dos pacientes com outros distúrbios, principalmente meningite piogênica, apresentaram reação positiva.

Outros testes também se mostraram úteis na detecção de certos casos de meningite tuberculosa. Um exemplo é a reação em cadeia da ligase de amplificação, que foi relatada como sendo o método mais rápido para o diagnóstico precoce da meningite tuberculosa (Rajo, 2002). Nesse caso, a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo foram, respectivamente: 55, 100, 100 e 92,9%. Além disso, os níveis de ADA são significativamente maiores na meningite tuberculosa do que nos demais tipos de meningite e distúrbios do SNC (Pettersson, 1991). De fato, níveis acima de 15 U/L constituem forte indicação de meningite tuberculosa (Choi, 2002).

Meningoencefalite amébica primária (PAM). Esta rara doença é causada pela ameba de vida livre *Naegleria fowleri* ou por espécies de *Acanthamoeba*. A *Naegleria* tende mais provavelmente a induzir uma resposta inflamatória aguda com pleiocitose neutrofílica, níveis de glicose diminuídos, elevação da concentração de proteínas e presença de eritrócitos. A coloração de Gram sempre dá resultado negativo. A *Acanthamoeba* mais frequentemente produz meningite do tipo granulomatosa. Os trofozoítas móveis de *Naegleria* podem ser visualizados pela observação direta de montagens a fresco ao microscópio de luz ou de contraste de fase, e o diagnóstico pode ser estabelecido rapidamente. Organismos intactos ou em degeneração podem ser identificados em citospins corados pelo método de Wright ou com Giemsa, entretanto, devem ser distinguidos dos macrófagos (dos Santos, 1970; Benson, 1985). O corante alaranjado de acridina auxilia a diferenciar as amebas (vermelho-tijolo) dos leucócitos (verde brilhante).

Líquido sinovial

O termo *sinóvia* se refere ao tecido de revestimento sinovial das bainhas tendíneas, bursas e articulações do tipo diartrose, com exceção da superfície articular. É composta por uma ou três camadas de células que constituem uma superfície descontínua depositada sobre os tecidos gorduroso, fibroso ou perióstico articular.

O *líquido sinovial* (sinóvia, LS) é um ultrafiltrado imperfeito de plasma sanguíneo combinado ao ácido hialurônico produzido pelas células sinoviais. Pequenos íons e moléculas (p. ex., Na^+, K^+, glicose, ureia etc.) atravessam prontamente o espaço articular e, portanto, são encontrados em concentrações semelhantes às do plasma. As moléculas grandes, por sua vez, estão ausentes ou são encontrados apenas traços. A reabsorção das moléculas sinoviais se dá através dos linfáticos e independe do tamanho. O LS atua como lubrificante e adesivo, e fornece nutrientes para a cartilagem articular avascular.

É essencial examinar o LS para diferenciar a artrite infecciosa da não infecciosa. Os resultados obtidos a partir do exame geral e microscópico do LS são tradicionalmente divididos em "tipos de reação", conforme representado na Tabela 28.14. Tais agrupamentos são em grande parte descritivos e apresentam considerável sobreposição entre si. Com exceção da coloração de Gram, das culturas e do exame de cristais, os parâmetros relacionados ao LS podem ser inespecíficos e devem estar integrados ao contexto clínico.

As *efusões não inflamatórias* (grupo I) tipicamente apresentam contagens de leucócitos inferiores a 3.000 células/μL, sendo os neutrófilos minoritários. As condições que usualmente apresentam uma pequena resposta inflamatória são osteoartrite, artrite traumática, osteoartropatia neuropática, sinovite vilonodular pigmentada e febre reumática em fase inicial. A artrite reumatoide em fase inicial, infecções bacterianas em estágio inicial e artrite viral também podem se manifestar como efusões não inflamatórias.

Tabela 28.14 Achados no LS de acordo com a categoria da doença

		Categoria			
Achado	Normal	Grupo I: não inflamatória	Grupo II: inflamatória	Grupo III: infecciosa	Grupo IV: hemorrágica
Limpidez	Transparente	Transparente	Transparente/opaca	Opaca	Opaca
Cor	Incolor a amarelo-claro	Xantocrômica	Xantocrômica a esbranquiçada/sanguinolenta	Branca	Castanho-avermelhada ou xantocrômica
CBSs/mL	0–150	< 3.000	3.000–75.000	50.000–200.000	50–10.000
PMNs %	< 25	< 30	> 50	> 90	< 50
CVSs	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Presentes	Presentes
Glicose (diferença sangue/LS em mg/dL)	0–10 (0–0,56 mmol/L)	0–10 (0–0,56 mmol/L)	0–40 (0–2,2 mmol/L)	20–100 (1,11–5,5 mmol/L)	0–20 (0–1,11 mmol/L)

CBSs = células brancas sanguíneas; PMNs = polimorfonucleares; CVSs = células vermelhas sanguíneas; LS = líquido sinovial.

Modificado de Kjeldsberg CR, Knight JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. Copyright © American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

As *efusões inflamatórias* (grupo II) estão associadas a contagens de leucócitos que variam de 3.000 a 75.000 células e os neutrófilos constituem mais de 50% da população leucocitária. Exemplos desse grupo reativo são artrite reumatoide, SLE, síndrome de Reiter, febre reumática, artrite aguda induzida por cristais, artrite associada à doença inflamatória intestinal, artrite psoriática e sinovite por gotículas de gordura.

As *efusões purulentas (infecciosas)* (grupo III) tipicamente apresentam contagens de leucócitos acima de 50.000 células, das quais 90% ou mais são neutrófilos. Esse grupo é constituído pelas infecções articulares bacterianas, fúngicas e tuberculosas.

As *efusões hemorrágicas* (grupo IV) podem ser observadas em associação com a artrite truamática, sinovite vilonodular pigmentada, hemangioma sinovial, osteoartropatia neuropática, próteses articulares e distúrbios hematológicos (hemofilia, trombocitopenia, terapia anticoagulante, anemia ou traço falciforme, síndrome mieloproliferativa).

Coleta da amostra

A aspiração do líquido articular (artrocentese) deve se restringir aos pacientes com efusão não diagnosticada ou que apresentam alteração clínica significativa relacionada a uma efusão já conhecida (Pal, 1999). Deve ser executada por um profissional experiente, utilizando uma técnica estéril apropriada. É preciso ter cautela para evitar aspirar uma articulação estéril de um paciente com bacteremina, ou para não aspirar o líquido a partir do sítio de infecção de um tecido cutâneo ou periarticular para dentro de uma articulação estéril. Articulações maiores, como a do joelho, normalmente contêm até 4 mL de sinóvia, portanto, é comum retirar amostras de volume pequeno, a menos que haja uma efusão.

O LS deve ser coletado utilizando agulhas estéreis descartáveis e seringas de plástico, a fim de evitar a contaminação com partículas birrefringentes. Na artrocentese de rotina, a seringa deve ser heparinizada com 25 U de heparina sódica/mL de LS. Recomenda-se evitar o uso de anticoagulantes como oxalato, lítio-heparina e EDTA em pó, pois esses compostos formam artefatos cristalinos que podem gerar confusão durante o exame microscópico. Antes de iniciar a aspiração, movimente ou manuseie a articulação de modo a garantir a homogeneização de seu conteúdo.

A amostra deve ser preferencialmente dividida em três partes: 3 a 10 mL em seringa ou tubo heparinizado estéril para realização de estudos microbiológicos; 2 a 5 mL em tubo contendo anticoagulante (heparina sódica ou EDTA líquido) para o exame microscópico; e cerca de 5 mL em tubo comum (sem anticoagulante) para realização de análises bioquímicas (o LS normal não coagula, pois não contém fibrinogênio). Concentrações de heparina acima de 125 U/mL exercem efeito inibitório sobre algumas bactérias patogênicas (Rosett, 1980). Por esse motivo, as amostras destinadas à cultura devem ter um volume mínimo de 1 a 2 mL, caso sejam colhidas em tubos de coleta heparinizados com tampa verde (Becton Dickinson, Rutherford, NJ), que contêm 143 U de heparina/tubo, ou se forem obtidas com seringas novamente tampadas após terem a agulha e o excesso de ar removidos.

Nas "punções a seco", é possível que ainda permaneça líquido na agulha em quantidade suficiente para a realização dos testes mais importantes. Tais amostras devem ser enviadas com a agulha ainda acoplada à seringa, com a ponta espetada em uma rolha estéril. A existência de uma boa comunicação com o laboratório é essencial para que essas amostras sejam corretamente processadas.

Testes recomendados

O exame laboratorial do LS é fundamental para o diagnóstico diferencial da doença articular, especialmente nos casos de artrite induzida por cristais e infecciosa. Diante da suspeita de qualquer um desses casos, é imperativo realizar uma artrocentese e um exame sistemático do LS, sendo que o exame corretamente realizado em geral é diagnóstico. Em outras doenças articulares, talvez não seja possível estabelecer um diagnóstico específico. Mesmo assim, o exame do LS continua sendo importante, ainda que seja apenas para excluir uma possível artrite infecciosa, pois essa exclusão constitui um diagnóstico crítico ao se considerar que a articulação pode ser irreversivelmente danificada em poucos dias, caso não receba tratamento adequado. Essa afirmação é especialmente válida para os casos de infecção por *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, os testes de rotina devem ser orientados para o diagnóstico desses dois distúrbios (Tab. 28.15). Embora os demais testes sejam desprovidos de valor prático para uso na rotina, podem fornecer informação diagnóstica importante em determinadas circunstâncias.

É essencial que esses testes sejam devidamente executados, pois podem fornecer informações diagnósticas altamente específicas. Entretanto, um dos principais problemas inerentes ao exame laboratorial do LS é que, diferentemente do LCE e do líquido amniótico, a maioria dos laboratórios ainda não chegou a um consenso sobre os componentes de uma análise de "rotina" (Hasselbacher, 1987). Além disso, a falta de consistência da qualidade do desempenho se deve, parcialmente, ao fato de os laboratórios em média examinarem apenas 1 a 2 amostras de LS a cada mês (Hasselbacher, 1987; Rabinovitch, 1994).

Exame macroscópico

O *volume total* deve ser registrado na cabeceira, em especial se a amostra tiver que ser repartida para o envio a diferentes setores do laboratório.

A *cor* deve ser avaliada na amostra contida em um tubo de ensaio de vidro transparente contra um fundo branco. O LS normal é incolor, porém muitas vezes apresenta coloração amarela-clara resultante da diapedese de algumas CVSs, que está associada à ocorrência de traumas, ainda que suaves. Distúrbios não inflamatórios ou inflamatórios usualmente conferem uma tonalidade que varia da cor-de-palha ao amarelo (xantocromia). Líquidos sépticos podem ser amarelos, marrons ou verdes, dependendo dos cromógenos produzidos pelo organismo agressor e da resposta do paciente (hospedeiro), incluindo a presença de leucócitos e hemácias.

Uma *punção traumática* provoca uma distribuição de sangue irregular durante a artrocentese ou a formação de estrias dentro da seringa. Embora seja difícil distinguir uma xantocromia amarelo-clara de um líquido normal, a presença de uma cor castanho-avermelhada após a centrifugação é uma boa evidência de hemartrose patológica.

A *limpidez* está relacionada ao número e tipo de partículas presentes na sinóvia. Como o LS normal é transparente, é possível ler com facilidade um jornal através do tubo contendo a amostra. Apesar de os detalhes se tornarem obscuros em líquidos translúcidos, ainda é possível distinguir áreas escuras e claras. Em um líquido opaco, contudo, o fundo se torna completamente obscuro.

Os leucócitos, comumente, são os mais responsáveis pelas alterações que afetam a limpidez. Todavia, a presença de um número muito grande de cristais pode resultar em um líquido opaco, leitoso opalescente, na ausência de leucócitos. Uma amostra cintilante, com aspecto oleoso, sugere a presença de cristais de colesterol em abundância que, a grosso modo, podem parecer pus.

Tabela 28.15 Testes recomendados para o LS

Testes de rotina
Exame geral (cor, limpidez)
Contagens de leucócitos total e diferencial
Coloração de Gram e cultura de bactérias (aeróbias e anaeróbias)
Exame de cristais ao microscópio polarizador e compensador
Testes úteis em circunstâncias especiais
Culturas e colorações fúngicas e acidorresistentes
PCR para DNA bacteriano e de micobactéria
Diferencial de glicose soro-líquido sinovial
Lactato e outros ácidos orgânicos
Complemento
Enzimas
Ácido úrico

PCR = reação em cadeia da polimerase; DNA = ácido desoxirribonucleico.

Modificado de Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3.ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

Uma turvação aumentada se deve, com menos frequência, às concentrações de fibrina, "corpúsculos riciformes" flutuando livremente (fragmentos de células sinoviais proliferantes em degeneração ou sinóvia microinfartada), partículas de metal ou plástico em pacientes com próteses articulares, ou fragmentos de cartilagem em casos de osteoartrite. Distúrbios metabólicos (i. e., ocronose) podem acarretar um aspecto de "pimenta moída" produzido por fragmentos de cartilagem pigmentada.

Exame microscópico

Contagem de células total. As contagens de leucócitos totais devem ser realizadas imediatamente, a fim de evitar a perda celular por degeneração, que tem início em 1 hora após a execução da artrocentese. Os tubos devem ser invertidos antes da coleta da amostra para garantir uma mistura uniforme. As contagens celulares costumam ser realizadas em hemocitômetro padrão. Contadores de células automatizados também podem ser utilizados, porém seus orifícios estão sujeitos ao entupimento e esses aparelhos podem fornecer resultados de contagens celulares espuriamente altos diante da presença de partículas diversas que não sejam leucócitos (p. ex., cristais e glóbulos de gordura), em especial quando se usa contadores com canais múltiplos. Em uma lâmina de preparação a fresco, a contagem de 0 a 2 leucócitos/hpf (média estimada em mais de 10 campos) indica a detecção de menos de 1.300 leucócitos por contagem celular (Clayburne, 1992).

Contagens de leucócitos maiores que 10.000 células/μL – e frequentemente acima de 50.000 células/μL – são características de artrite induzida por cristais (p. ex., gota, pseudogota), artrite inflamatória crônica (p. ex., artrite reumatoide, LES, espondilite anquilosante entre outras) e artrite séptica (Kjeldsberg, 1993). Na osteoartrite, osteocondrite dissecante, traumatismo e sinovioma, as contagens de leucócitos costumam ser menores que 10.000 células/μL.

Contagens de leucócitos acima de 50.000 células/μL requerem diluição, que pode ser feita com solução salina e não com ácido acético, a fim de evitar a formação de coágulos de mucina e de aglomerados de células. Um LS altamente viscoso deve ser incubado em presença de hialuronidase antes da realização da contagem, em especial quando são utilizados contadores automatizados.

Os eritrócitos devem ser contados na prática de rotina, a menos que se trate de um caso óbvio de punção traumática. Se houver um grande número de hemácias interferindo na contagem de leucócitos, essas hemácias devem ser lisadas por meio da diluição da amostra com salina 0,3 N ou saponina a 1% em salina.

O limite de referência para a concentração de leucócitos no LS é de 150 a 200 células/μL (Kjeldsberg, 1993). Contagens celulares elevadas são utilizadas para ajudar a distribuir os achados em diferentes categorias de doenças, contudo são inespecíficos para qualquer doença em particular por apresentarem uma extensa sobreposição.

Contagem de leucócitos diferencial. Preparações de citospin são preferíveis aos esfregaços produzidos a partir de amostras de LS centrifugadas, pois a morfologia celular é significativamente melhor preservada. A produção de esfregaços mais finos a partir de amostras viscosas pode requerer tratamento com hialuronidase.

Os *neutrófilos* normalmente correspondem a cerca de 20% dos leucócitos presentes no LS. A população de neutrófilos em geral representa mais de 50% do total de leucócitos em pacientes com gota, pseudogota e artrite reumatoide (AR). Na maioria das vezes, a concentração de neutrófilos ultrapassa 75% em pacientes com artrite bacteriana aguda. Adotando um valor de cutoff igual a 75%, a detecção de um processo inflamatório apresenta uma sensibilidade aproximada de 75% e uma especificidade de 92% (Shmerling, 1990). Essas células com frequência exibem alterações degenerativas e podem conter bactérias, cristais, gotículas lipídicas, vacúolos ou inclusões granulares de cor azul-escura a negra (ragócitos, células AR), semelhantes às granulações tóxicas ocasionalmente observadas em esfregaços de sangue periférico. A presença dos ragócitos em pacientes com AR pode indicar um resultado mais precário (Davis, 1988).

As *células LE (lúpus eritematoso)*, não raro presentes em pacientes com artrite lúpica, são mais frequentemente neutrófilos que fagocitaram o núcleo de células degeneradas (Fig. 28.10). Entretanto, as células LE não são patognomônicas para o LES, uma vez que também foram identificadas no LS de pacientes com AR (Hunder, 1970).

Os *linfócitos*, que normalmente representam 15% das células presentes no LS, são proeminentes no início da AR, bem como em outros distúrbios do colágeno e nas infecções crônicas. Formas reativas, incluindo imunoblastos, também estão presentes de maneira ocasional.

Os *monócitos* e *macrófagos* são as células mais comumente encontradas no LS normal, correspondendo a cerca de 65% da contagem de células. A monocitose pode ser autolimitada na artrite viral ou na doença do soro, como também pode ser mais crônica no SLE ou nos distúrbios envolvendo o tecido conjuntivo indiferenciado. As células de Reiter, originalmente tidas como específicas da síndrome de Reiter, são macrófagos contendo neutrófilos em degeneração (Fig. 28.11).

A *eosinofilia*, definida como sendo superior a 2% da contagem de leucócitos, tem sido descrita na AR, febre reumática, carcinoma metastático, doença de Lyme, infecções parasíticas, urticária crônica, angioedema, subsequentemente à realização de artrografias (reação alérgica ao corante) e irradiação (Podell, 1980; Kay, 1988).

As *células sinoviais* não têm significado patológico. São células semelhantes às células mesoteliais, podendo ser difícil distingui-las de monócitos e macrófagos.

Os *corpúsculos lipídicos* estão associados a traumatismos, necrose asséptica e AR. Essas gotículas muitas vezes formam cruzes de Malta sob a luz polarizada, podem estar associadas à resposta dos leucócitos e também podem causar elevações espúrias das contagens automatizadas de CBSs (Wise, 1987).

Exame de cristais. Os cristais presentes no LS conduzem à inflamação aguda com aumento das contagens de CBSs e infiltração predominantemente neutrofílica. A identificação dos cristais, principalmente quando localizados no interior de neutrófilos e macrófagos, é patognomônico para a artrite induzida por cristais (Judkins, 1997).

A *gota* se refere a um processo de deposição de cristais no tecido articular. O uso comum desse termo tipicamente implica a gota de urato, sendo que a resposta inflamatória à deposição de cristais é referida como artrite gotosa. Os tipos mais comuns de cristais endógenos responsáveis pela artrite gotosa são constituídos de *urato monossódico mono-hidratado* (gota de urato), *pirofosfato de cálcio di-hidratado* (gota de pirofosfato, condrocalcinose ou "pseudogota"), apatita e outros *fos-*

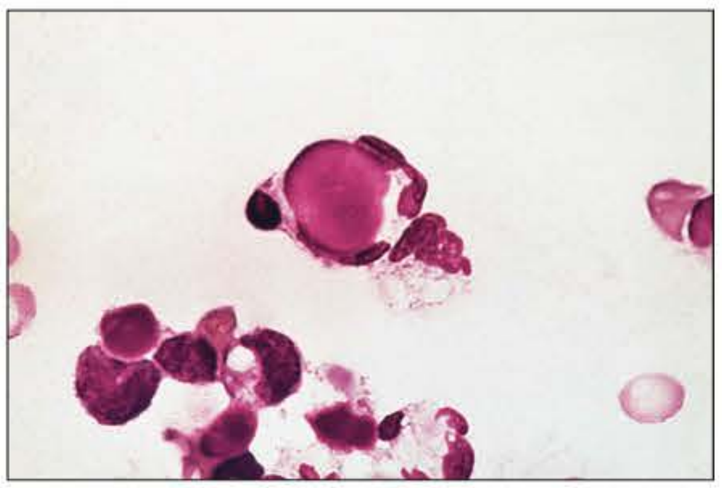


Figura 28.10 Célula LE no líquido sinovial de um paciente com lúpus eritematoso sistêmico.

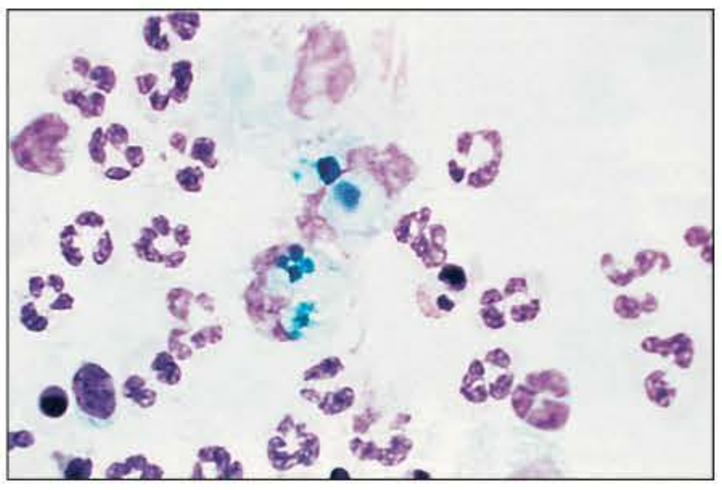


Figura 28.11 Células de Reiter no líquido sinovial de um paciente com síndrome de Reiter.

fatos de cálcio básicos (FCB; gota de apatita), *oxalato de cálcio* (gota de oxalato) e *lipídeos* (gota de lipídeos).

Com exceção do FCB, todos os cristais mencionados podem ser detectados por microscopia de luz polarizada. Para tanto, deve ser utilizado um microscópio polarizador de alta qualidade equipado com placa compesadora vermelha de primeira ordem. O filtro *polarizador* é posicionado diretamente acima da fonte de luz. O *analisador* (outro filtro polarizador) é colocado entre a lâmina contendo amostra e as oculares do microscópio, a uma orientação de 90º em relação ao polarizador, a fim de produzir um fundo escuro. O *compensador* deve ser posicionado entre o polarizador e o analisador, usualmente orientado a 45º (meio caminho) em relação aos planos dos dois filtros polarizadores.

O exame inicial deve ser realizado em uma preparação a fresco, utilizando luz polarizada. A microscopia de contraste de fase intensifica a detecção dos cristais. A lâmina e lamínula devem ser limpas e secas com cuidado imediatamente antes de serem utilizadas, para evitar a deposição de partículas de poeira birrefringente que atuam como artefatos. As bordas da lamínula são vedadas com esmalte de unha, que retarda – mas não evita – a evaporação. As bordas da lamínula são utilizadas para encontrar o plano de foco adequado. Entretanto, os cristais presentes nessas áreas devem ser ignorados pois é mais provável que sejam artefatos. A maioria dos cristais passa por uma varredura com a objetiva de aumento de 10×, e é avaliada pelo menos com uma objetiva de aumento de 40×, concentrando-se principalmente nas áreas celulares. O exame completo, no entanto, requer o uso da objetiva de aumento de 100× (objetiva de imersão), uma vez que os líquidos aparentemente negativos à varredura podem conter uma grande população de pequenos cristais (Gatter, 1991). O alinhamento da orientação dos cristais ao compensador através da rotação do estágio do microscópio ou do compensador facilita no reconhecimento e identificação. Anota-se informações referentes à morfologia dos cristais, seu ângulo de extinção, resistência e sinais de qualquer tipo de birrefringência (i. e, a capacidade de refratar a luz e partir a luz incidente em dois raios – um rápido e outro lento). Mesmo assim, para detecção de cristais, a microscopia polarizada apresenta uma sensibilidade e especificidade de apenas 78 e 79%, respectivamente, para urato monossódico (UMS) (Hasselbacher, 1987), e de 12 e 67% para fosfato de cálcio di-hidratado (McGill, 1991). Por outro lado, a repetição do exame após 24 horas de refrigeração da amostra a 4 ºC pode resultar em aumento significativo do número de líquidos positivos para cristais (Yuan, 2003).

O método de coloração Diff Quick pode ser uma alternativa segura à microscopia polarizada. Em termos gerais, essa técnica apresentou especificidade de 87,5%, sensibilidade de 94,4% e acurácia de 91,9%. Seus valores preditivos globais para positivo e negativo foram 92,7% e 90,3%, respectivamente (Selvi, 2001). Além disso, métodos mais sofisticados e confiáveis, tais como a cristalografia de raios X e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, foram descritos para identificação e caracterização de cristais em amostras biológicas (Rosenthal, 2001).

Os *cristais de UMS* apresentam-se como hastes em forma de agulha medindo 5 a 20 μm de comprimento, embora também possam medir apenas 1 a 2 μm ou, raramente, assumir a forma de esferólitos arredondados. São fortemente birrefringentes (Fig. 28.12): exibem cor amarela, quando estão orientados em paralelo ao compensador, ou azul, quando orientados perpendicularmente (elongação ou birrefringência negativa) (Fig. 28.13). Uma lâmina-controle de cristais de UMS deve ser sempre utilizada para fins de comparação. Alternativamente, a betametasona – um esteroide que aparece como haste de birrefringência fortemente negativa – também pode ser utilizada na preparação de uma lâmina de referência para microscopia polarizada (Judkins, 1997).

Os cristais de UMS são encontrados em 90% dos casos de gota de urato aguda, e em cerca de 75% dos pacientes entre as crises. Os cristais de UMS intracelulares são característicos da gota de urato aguda, podendo ser ocasionalmente observados como resultado da inflamação na artrite séptica (McCarty, 1988).

Os cristais de pirofosfato de cálcio di-hidratado (PFCD) são encontrados em um grupos de condições coletivamente conhecidas como doença da deposição de cristais de PFCD. Esses cristais apresentam forma romboide, de hastes ou retângulos medindo 1 a 20 μm de comprimento. Os cristais de PFCD possuem birrefringência fraca e elongação positiva (são azuis quando estão alinhados ao eixo do compensador; Fig. 28.14). Muitos são pequenos demais para polarizar luz e, por isso, são difíceis de detectar sem auxílio da microscopia de contraste de fase. A extinção é incompleta e se dá entre 20 e 30º em relação ao ângulo do polarizador e do analisador (extinção oblíqua ou inclinada).

Os cristais de *PFCD* estão associados à artrite degenerativa e, nos casos de artrítide, associam-se a hipomagnesemia, hemocromatose, hiperparatireoidismo e hipotireoidismo (Jones, 1992).

Os cristais de *hidroxiapatita de cálcio* e outros cristais de FCB tipicamente são pequenos demais e desprovidos de birrefringência (isotrópicos) para serem observados por microscopia de luz, a menos que estejam agrupados em microagregados esféricos de 1 a 50 μm. O corante vermelho de alizarina S pode ser utilizado para corar esses e outros tipos de cristais contendo cálcio (Lazcano, 1993). No momento, a identificação dos cristais de FCB é considerada irrelevante para o diagnóstico, prognóstico ou como guia para o tratamento.

Os *cristais de oxalato de cálcio di-hidratado* são "envelopes" octaédricos bipiramidais que medem 5 a 30 μm, apresentam birrefringência variável e elongação positiva. São encontrados na artropatia associada à diálise renal crônica e oxalose primária – um raro erro inato do metabolismo. A forma mono-hidratada é birrefringente, mas sua forma é indefinida.

Os *cristais lipídicos* são esferas medindo 1 a 20 μm que apresentam

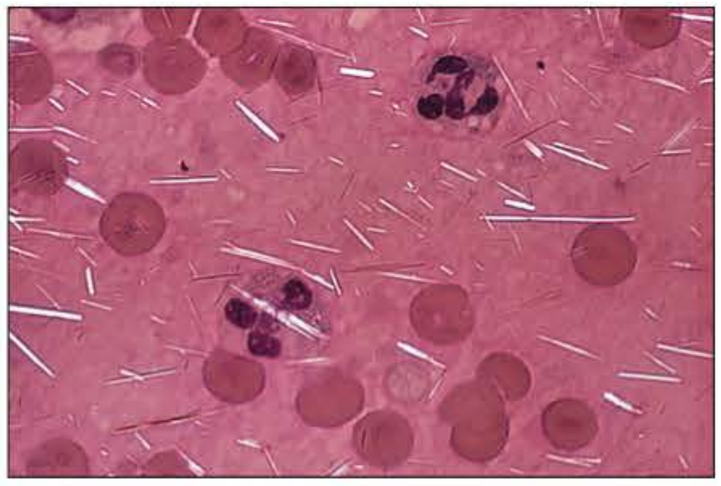


Figura 28.12 Cristais de urato monossódico sob luz polarizada, de um paciente com gota de urato.

Figura 28.13 Cristais de urato monossódico no líquido sinovial. Luz polarizada compensada. (De Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.)

Figura 28.14 Cristais de pirofosfato de cálcio di-hidratado no liquido sinovial de um paciente com pseudogota. Luz polarizada compensada. (De Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.)

aspecto de cruz de Malta e birrefringência positiva sob luz polarizada compensada. Esses cristais foram implicados como causa de artrite aguda (McCarty, 1988).

Os *corticosteroides cristalinos* oriundos de injeções intra-articulares podem exibir aspecto semelhante ao dos cristais de UMS ou PFCD, bem como persisitir por até 1 mês após a administração da injeção. Na maioria das vezes, apresentam bordas rombudas e denteadas sem estrutura de cristal definida, pois são preparados a partir da trituração de formas cristalinas maiores. A hexacetonida de triancinolona é negativamente birrefringente, porém a maioria dos demais apresenta birrefringência positiva.

Os *cristais de colesterol* tipicamente aparecem como placas birrefringentes irregulares por vezes com cantos chanfrados (Fig. 28.15). Nas efusões crônicas (p. ex., artrite tuberculosa, AR, SLE), podem estar presentes cristais com forma de agulha ou romboides, similares aos cristais de UMS ou PFCD (Ettlinger, 1979). Cristais de colesterol bem pequenos (1–5 mícrons), irregulares e com forma de haste ou agulha foram identificados em efusões de osteoartrite por análise de difração de raios X e por estudos ultraestruturais (Fam, 1981). Os cristais de colesterol são solúveis em etanol e éter, e não são fagocitados pelos leucócitos. Além disso, quando se trata de cristais de colesterol, a análise quantitativa deve mostrar que os níveis encontrados no LS excedem os níveis plasmáticos.

Talco de luvas introduzidos durante cirurgias de articulações são vistos como partículas redondas e fortemente birrefringentes, medindo 5 a 30 μm de diâmetro e aparência de cruz de Malta sob polarização.

Uma variedade de cristais e particulados de outros tipos pode estar presente no LS. Entre estes estão os cristais de imunoglobulina monoclonal ou crioglobulinas, cristais de Charcot-Leyden, fragmentos amiloides, fragmentos de cartilagem, fibrilas colágenas e filamentos de fibrina, cristais de hematoidina oriundos de hemorragias anteriores, cristais de certos anticoagulantes, esmalte de unha, fragmentos de prótese e partículas de poeira (Gatter, 1991).

Análise bioquímica

As análises bioquímicas geralmente fornecem apenas informação de apoio aos testes de rotina. Uma alta viscosidade pode ser remediada pela diluição com solução salina normal, sonicação ou tratamento com hialuronidase. Os intervalos de referência para os analitos bioquímicos mais importantes são mostrados na Tabela 28.16.

Teste do coágulo de mucina. A adição de ácido acético ao LS precipita o hialuronato em um coágulo de mucina. Este, por sua vez, pode ser classificado como bom, regular ou insatisfatório. Um teste de coágulo de mucina cujo resultado seja classificado regular ou insatisfatório reflete a diluição e despolimerização do ácido hialurônico – um achado inespecífico para várias artrítide inflamatórias. Apesar do interesse histórico, a utilidade clínica desse teste é mínima (Baker, 1991).

Glicose. A interpretação correta dos valores de glicose do LS requer a comparação com os níveis séricos, que, de forma ideal, é precedida por um jejum de 8 horas para promover o equilíbrio da glicose através da membrana sinovial. O diferencial soro-sinóvia resulta em um valor abaixo de 10 mg/dL tanto em condições normais como em várias condições não inflamatórias. Na artrite séptica, essa diferença varia entre 20 e 60 mg/dL, porém observa-se uma significativa sobreposição com outras condições inflamatórias que limita sua utilidade clínica. Com um valor de *cutoff* de 75 mg/dL, o uso de baixos níveis de glicose para detecção de doença articular inflamatória apresenta sensibilidade de apenas 20% e uma especificidade de 84% (Shmerling, 1990).

A glicólise in vitro por ação de grandes números de leucócitos pode acarretar uma falsa redução dos valores de glicose do LS, a menos que o teste seja realizado dentro de 1 hora após a coleta. Por outro lado, tubos contendo fluoreto de sódio – um inibidor da glicólise – previne a perda de glicose.

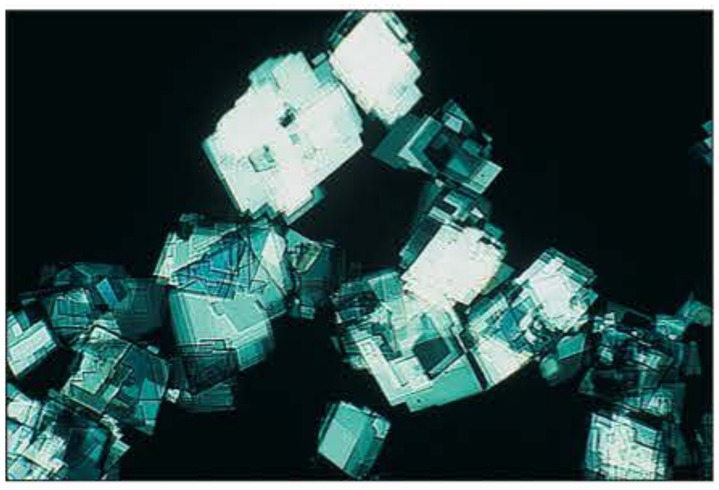


Figura 28.15 Cristais de colesterol no líquido sinovial. Luz polarizada.

Tabela 28.16 Intervalos de referência para constituintes do LS

Constituinte	Líquido sinovial	Plasma
Proteínas totais	1–3 g/dL	6–8 g/dL
Albumina	55–70%	50–65%
α_1-globulina	6–8%	3–5%
α_2-globulina	5–7%	7–13%
β-globulina	8–10%	8–14%
γ-globulina	10–14%	12–22%
Ácido hialurônico	0,3–0,4 g/dL	
Glicose	70–110mg/dL	70–110 mg/dL
Ácido úrico	2–8 mg/dL	2–8 mg/dL
Lactato	9–29 mg/dL	9–29 mg/dL

Modificado de Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

Proteína. A concentração média de proteínas normal é igual a 1,38 g/dL, em seres vivos voluntários (Weinburger, 1989). Em cadáveres, essa concentração é de 1,88 g/dL. A diferença existente entre esses valores provavelmente representa as variações metodológicas. Um intervalo de referência confiável seria de 1 a 3 g/dL. Diante de uma inflamação cada vez mais intensa, proteínas maiores (p. ex., fibrinogênio) entram no espaço sinovial. É possível detectar formação espontânea de coágulo em amostras coletadas em tubos desprovidos de anticoagulante (teste do coágulo de fibrina). A quantificação das proteínas do LS é bastante inespecífica, apresentando uma sensibilidade aproximada de 52% e especificidade de 56% para distúrbios inflamatórios. O conteúdo total de proteína em geral não tem utilidade no diagnóstico, tratamento nem resultado apresentado pelo paciente (Shmerling, 1990).

Enzimas. Inúmeras enzimas foram estudas no LS, incluindo LD, aspartato aminotransferase, ADA, fosfatases ácida e alcalina, e lisozima, entre outras (Kjeldsberg, 1993). A LD está aumentada na gota de AR, nos casos de falha de artroplastia e na artrite infecciosa. Esse aumento mais provavelmente reflete a infiltração de neutrófilos. Níveis elevados de *fosfatase ácida* podem ter valor prognóstico negativo na AR, ainda que sejam inespecíficos (Luukkainen, 1989). Embora a análise das enzimas do LS atualmente seja considerada irrelevante, a quantificação de várias hidrolases pode ter valor preditivo positivo significativo no prognóstico da articulação, principalmente na AR.

Ácidos orgânicos. Quando comparados à artrite monoarticular asséptica, os níveis de *ácido lático* do LS usualmente estão aumentados nos pacientes com artrite séptica (Kjeldsberg, 1993). Níveis significativamente maiores que 30 mg/dL (3,7 mmol/L) costumam estar associados à artrite séptica causada por cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos. Assim, a quantificação dos níveis de lactato no LS pode fornecer evidências provisórias rápidas de infecção em amostras negativas para coloração de Gram. Essa é uma ocorrência comum especialmente diante de bacilos Gram-negativos. Todavia, níveis normais ou intermediários não confirmam nem excluem uma infecção. Além disso, a artrite gonocócica é conhecida por estar associada a níveis normais de lactato no LS (Curtis, 1983).

Com auxílio da cromatografia gasosa-líquida, a detecção de outros ácidos orgânicos que normalmente estão ausentes no LS (p. ex., ácido n-valérico, ácido n-hexanoico e ácido succínico) pode ser muito útil na diferenciação entre artrite séptica e asséptica (Brook, 1980; Borenstein, 1982).

Ácido úrico. Os níveis de ácido úrico no líquido sinovial em geral (ainda que nem sempre) são paralelos aos níveis séricos observados na gota e

nas artropatias não inflamatórias. Uma exceção são os demais distúrbios articulares inflamatórios além da gota, em que os níveis de urato no LS podem ser significativamente menores do que no soro correspondente (Beutler, 1996). Apresenta valor clínico pouco significativo na análise do LS, exceto em alguns casos em que há suspeita de gota sem identificação de nenhum cristal (Reeves, 1965). Nesses casos, o aumento dos níveis de ácido úrico no LS sustentam o diagnóstico de gota.

Lipídeos. Diferentemente do plasma, o LS normal contém concentrações extremamente baixas de lípideos. As anomalias envolvendo lipídeos do LS são: (1) efusões pseudoquilosas ricas em colesterol e tipicamente associadas à AR crônica; (2) gotículas lipídicas, usualmente resultantes de traumatismo; e (3) efusões quilosas extremamente raras e associadas à AR, SLE, filariose, pancreatite e trauma (Wise, 1987). Tais doenças usualmente podem ser diferenciadas em termos clínicos e por meio do exame macro- e microscópico. A quantificação de lipídeos atualmente não possui valor clínico na análise do líquido articular, exceto nos casos em que cristais de colesterol assemelham-se aos de UMS ou PFCD. Em tais circunstâncias, níveis de colesterol maiores que os níveis plasmáticos sustentam a presença de cristais de colesterol.

Estudos imunológicos

O *fator reumatoide* (FR) é encontrado na sinóvia de cerca de 60% dos pacientes com AR, usualmente em títulos iguais ou um pouco menores do que os títulos séricos. Os *anticorpos antinucleares* (ANA) são encontrados no LS de cerca de 70% dos pacientes com SLE e em 20% dos pacientes com AR. Nenhum deles é específico o bastante para uso prático. Os níveis de *complemento* do LS, que normalmente correspondem a acerca de 10% dos níveis observados no soro, atingem valores equivalentes a 40 – 70% da atividade sérica durante a inflamação, de modo proporcional ao aumento da exsudação proteica. O consumo de complemento no SLE e na AR, em particular, resulta em níveis inferiores a 30% do conteúdo sérico de complemento. Também há diminuição dos níveis de complemento em certos casos de artrite bacteriana e induzida por cristais, de modo que sua quantificação é impraticável para o diagnóstico de rotina.

Exame microbiológico

O transporte imediato de líquido articular e uma boa transmissão da suspeita clínica ao laboratório são fatores extremamente importantes para a rápida identificação de um agente infeccioso.

A artrite séptica pode ser aguda ou crônica. A coloração de Gram e as culturas devem ser realizadas como parte da avaliação de rotina do LS. A sensibilidade da coloração de Gram varia de aproximadamente 75% para as infecções por estafilococos, e 50% para a maioria dos organismos Gram-negativos, até menos de 25% para as infecções gonocócicas (GC) (Goldenberg, 1985).

A sensibilidade das culturas varia de 75 a 95% para os casos de infecção articular não GC em pacientes não submetidos ao tratamento com antibióticos. Para os pacientes com gonorreia, a sensibilidade das culturas é de apenas 10 a 50% (Shmerling, 1994).

Apesar de não integrar a prática de rotina, o uso da PCR com iniciadores (primers) universais para detecção de DNA bacteriano pode ser útil, principalmente quando se trata de patógenos mais exigentes que não podem ser cultivados (p. ex., *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia* sp., *Mycoplasma* sp.) (Nocton, 1994; Li, 1996). Os vírus com frequência estão associados à artrite infecciosa e, dependendo do vírus putativo, torna-se necessário realizar sorologia, cultura viral e detecção do DNA viral por amplificação de ácido nucleico.

Dependendo da história clínica, a artrite infecciosa pode estar associada a exposições particulares e a seus patógenos correspondentes. A artrite se desenvolve em cerca de 60% dos pacientes com doença de Lyme como resultado da exposição a carrapatos infectados com *Borrelia burgdorferi* (Golightly, 1993). O teste de PCR para detecção do DNA de *B. burgdorferi* no LS é positivo em 96% dos casos não tratados (Nocton, 1994; Exner, 2003).

Em pacientes com história de viagem ou que trabalham ao ar livre, recomenda-se avaliar o líquido/tecido sinovial quanto à presença de patógenos fúngicos por coloração KOH/branco de calcoflúor e realizar cultura em meio seletivo para fungos. Exemplificando, um paciente com história de viagem recente para o Arizona pode apresentar artrite monoarticular secundária ao *Coccidioides immitis*. Pacientes com artrite crônica que apresentam fatores de risco para infecção por *Mycobacterium tuberculosis* ou para infecções não tuberculosas devem ser submetidos a uma biópsia sinovial.

As colorações de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun para organismos acidorresistentes apresentam uma sensibilidade de cerca de 20%. As culturas para *M. tuberculosis* resultam positivas em aproximadamente 80% dos casos comprovados. Considerando que os métodos de cultura convencionais para *M. tuberculosis* com frequência são muito demorados, a aplicação da PCR para detecção desse organismo constitui uma técnica nova e promissora para um diagnóstico mais rápido. A biópsia sinovial é recomendada para os casos com suspeita de artrite tuberculosa, com a finalidade de obter um diagnóstico mais rapidamente (Verettas, 2003; Titov, 2004).

Líquido pleural

A cavidade pleural é um espaço em potencial revestido pelo mesotélio da pleura visceral e parietal. A cavidade pleural normalmente contém uma pequena quantidade de líquido que facilita a movimentação das duas membranas uma contra a outra. Esse líquido é um filtrado de plasma derivado dos capilares da pleura parietal. É produzido continuamente a uma taxa dependente da pressão hidrostática capilar, pressão oncótica plasmática e permeabilidade capilar. O líquido pleural é reabsorvido pelos vasos linfáticos e vênulas da pleura visceral.

O acúmulo de líquido é denominado efusão e resulta de um desequilíbrio entre sua produção e reabsorção. Esse acúmulo de líquido nas cavidades pleural, pericárdica e peritoneal é conhecido como *efusão serosa*.

Coleta da amostra

A toracentese é indicada em qualquer tipo de efusão pleural não diagnosticada ou para fins terapêuticos em casos de pacientes que apresentam efusões massivas sintomáticas. Entretanto, os líquidos serosos com frequência não são coletados, manipulados nem testados de uma forma totalmente satisfatória. De fato, essa coleta/manipulação inadequada e, por vezes, a realização de subtestes ou de testes inapropriados são mais comuns do que com outros líquidos corporais. O laboratório muitas vezes recebe uma grande seringa ou garrafa a vácuo que, por sua vez, deve ser conduzida aos diversos setores laboratoriais. Além disso, a amostra pode conter um grande coágulo de sangue ou fibrina em razão do uso inadequado de anticoagulantes ou à própria mistura.

Com exceção de um tubo contendo EDTA para realização das contagens celulares total e diferencial, a amostra deve ser coletada em tubos heparinizados para evitar a coagulação. Alíquotas de culturas de bactérias aeróbias e anaeróbias são melhor inoculadas em meio de cultura de sangue junto à cabeceira. Em caso de suspeita de malignidade, infecção fúngica ou infecção por micobactéria, deve ser utilizado todo o líquido remanescente (100 mL ou mais) para maximizar o rendimento das colorações e cultura. Como as efusões serosas são mais indulgentes do que o LCE em termos de manutenção da integridade celular, as amostras frescas destinadas à citologia podem ser estocadas por até 48 horas na geladeira e, ainda sim, gerar resultados satisfatórios. Para medir o pH, o líquido deve ser colhido sob condições anaeróbicas em seringa heparinizada e enviado ao laboratório no gelo. Amostras grosseiramente purulentas não requerem determinação do pH e podem entupir o analisador.

Transudatos e exsudatos

Há muito se reconhece que a classificação inicial do líquido pleural em *transudato* ou *exsudato* simplifica enormemente o processo pelo qual um diagnóstico final correto é alcançado. Além disso, essa classificação determina a necessidade de realizar ou não novos testes.

Os transudatos em geral são bilaterais, em razão das condições sistêmicas que conduzem ao aumento da pressão hidrostática capilar ou à diminuição da pressão oncótica plasmática (Tab. 28.17). As efusões malignas, com menor frequência, podem ser transudativas em decorrência da presença concomitante de uma condição clínica que gere confusão, como a insuficiência cardíaca congestiva (Ashchi, 1998). Os exsudatos são mais frequentemente unilaterais, associados a distúrbios localizados que aumentam a permeabilidade vascular ou interfe-

rem na reabsorção linfática (Tab. 28.17).

Testes recomendados

A avaliação de líquidos corporais serosos (pleural, pericárdico, peritoneal) é direcionada primeiramente no sentido de diferenciar as efusões transudativas das exsudativas. Em geral, os transudatos dispensam outras formas de *work up*. Todavia, o líquido deve permanecer retido por 7 a 10 dias se houver necessidade de realizar novos testes. Para separar ambos, foram propostos diversos parâmetros bioquímicos, embora nenhum deles tenha 100% de acurácia (Tab. 28.18).

O ensino tradicional enfatiza que os exsudatos e transudatos podem ser distinguidos com base em suas concentrações de proteínas totais. Assim, concentrações acima e abaixo de 3 g/dL definem, respectivamente, exsudatos e transudatos. No entanto, o uso apenas da concentração de proteínas resulta na classificação errada de ambos em cerca de 30% dos casos (Melsom, 1979). Atualmente, é bem aceito o fato de a combinação de testes aumentar a sensibilidade (qualquer parâmetro positivo indica um exsudato), melhorar a acurácia e constituir a base de um critério de Light bem estabelecido (Light, 1972). Do mesmo modo, um exsudato cumpre um ou mais dos seguintes critérios: (1) proporção de proteínas no líquido pleural/soro maior que 0,5; (2) proporção de LD no líquido pleural/soro maior que 0,6; e (3) níveis de LD no líquido pleural maiores que o equivalente a 2/3 do limite máximo normal dos níveis séricos. A sensibilidade e especificidade aproximadas são, respectivamente, 98 e 80%.

Vários relatos subsequentes sustentam os critérios de Light como sendo o método mais confiável para diferenciar transudatos de exsudatos (Peterman, 1984; Burgess, 1995; Gazquez, 1998; Assi, 1998).

Foram propostas diversas determinações alternativas para diferenciar exsudatos e transudatos. O teste de colesterol total, o gradiente de albumina ou uma combinação da LD com o colesterol total podem discriminar efusões associadas a resultados equivocados baseados nos critérios de Light. Exemplificando, o gradiente de albumina é recomendado para confirmar um transudato clínico erroneamente classificado como exsudato com base nos critérios de Light (Light, 1997). Ou seja, níveis séricos de albumina acima de 1,2 g/dL e mais altos do que os níveis presentes no líquido pleural indicam se tratar de um transudato (Burgess, 1995). Em muitos desses casos, o paciente passa por uma diurese. Outras combinações de testes têm mostrado desempenho equivalente e não superior ao dos critérios de Light.

Alguns testes, como a combinação das determinações de LD e colesterol no líquido pleural, podem ser mais convenientes e apresentar uma melhor relação custo-benefício por dispensarem a necessidade de realizar exames de sangue simultâneos (Costa, 1995). A quantificação de bilirrubina não é um forte discriminador das efusões (Heffner, 1997).

Uma análise mais aprofundada do exsudato é destinada a excluir a presença de malignidade e infecção. A citologia e as colorações de bactérias apropriadas constituem os testes de maior utilidade para esse fim. Além disso, como os níveis de DNA presentes no líquido pleural estão significativamente aumentados nos exsudatos, a análise quantitativa pode ser um novo método efetivo de avaliação das causas etiológicas das efusões serosas (Chan, 2003). Os testes recomendados para avaliação dessas efusões estão resumidos na Tabela 28.19. O tipo de teste solicitado e a interpretação dos resultados dos testes devem estar sempre correlacionados aos achados clínicos e ao diagnóstico diferencial. As contagens de leucócitos totais, diferencial e de hemácias têm utilidade limitada na avaliação das efusões serosas.

Exame macroscópio

Os transudatos são tipicamente límpidos, de cor variável entre o

Tabela 28.17 Classificação das efusões pleurais

Transudatos: pressão hidrostática aumentada ou pressão oncótica plasmática diminuída
Insuficiência cardíaca congestiva
Cirrose hepática
Hipoproteinemia (p. ex., síndrome nefrótica)
Exsudatos: permeabilidade capilar aumentada ou reabsorção linfática diminuída
Infecções
Pneumonia bacteriana
Tuberculose, outras doenças granulomatosas (i. e., sarcoidose, histoplasmose etc.)
Pneumonia viral ou por micoplasma
Neoplasmas
Carcinoma broncogênico
Carcinoma metastático
Linfoma
Mesotelioma (aumento do conteúdo de hialuronato do líquido de efusão)
Infarto pulmonar (pode estar associado à efusão hemorrágica)
Doença inflamatória não infecciosa envolvendo a pleura
Doença reumatoide (baixos níveis de glicose no líquido pleural, na maioria dos casos)
Lúpus eritematoso sistêmico (células LE ocasionalmente presentes)
Líquido proveniente de fontes extrapleurais
Pancreatite (atividade de amilase elevada no líquido de efusão)
Esôfago rompido (atividade de amilase elevada e pH baixo)
Urinotórax (creatinina elevada e pH baixo)

Tabela 28.18 Critérios laboratoriais para exsudato de líquido pleural

Proporção de proteínas do líquido pleural/soro	≥ 0,50
Proporção de LD do líquido pleural/soro	≥ 0,60
LD do líquido pleural	≥ 2/3 do limite máximo dos níveis séricos de LD normais
Colesterol do líquido pleural	> 45 mg/dL
Proporção de colesterol do líquido pleural/soro	≥ 0,30
Gradiente de albumina soro-líquido pleural	≤ 1,2 g/dL
Proporção de bilirrubina do líquido pleural/soro	≥ 0,60

LD = lactato desidrogenase.

Tabela 28.19 Efusão pleural: testes recomendados

Testes de rotina
Exame geral
Proporção de proteínas do líquido pleural/soro
Proporção de LD do líquido pleural/soro
Exame de esfregaço corado por Romanowski (células malignas, células LE)
Testes úteis para a maioria dos pacientes
Colorações e culturas para microrganismos
Citologia
Testes úteis em casos especiais
Colesterol do líquido pleural
Proporção de colesterol do líquido pleural/soro
Gradiente de albumina
pH
Lactato
Enzimas (ADA, amilase, LD)
Interferon-γ
Proteína C-reativa
Análise de lipídeos
Marcadores tumorais
Estudos imunológicos
Ácido tuberculoesteárico
Biópsia pleural

ADA = adenosina deaminase; LD = lactato desidrogenase.

Modificado de Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. ©American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

amarelo-claro e o palha, inodoros e não coaguláveis. Cerca de 15% dos transudatos são tingidos pelo sangue. Uma efusão pleural sanguinolenta (hematócrito > 1%) sugere a ocorrência de traumatismo, malignidade ou infarto pulmonar (Jay, 1986). Uma punção traumática é sugerida pela distribuição irregular de sangue, clareamento do líquido com a continuidade da aspiração ou formação de pequenos coágulos de sangue. Um hematócrito de líquido pleural superior a 50% do valor do hematócrito sanguíneo constitui boa evidência de um hemotórax (Light, 1995).

Os exsudatos podem ser grosseiramente parecidos com os transudatos, contudo a maioria apresenta graus variáveis de opacidade ou turvação e por vezes coagula se não for heparinizada. Um odor fecal pode ser detectado em casos de infecção por organismos anaeróbios. Amostras turvas, leitosas e/ou sanguinolentas devem ser centrifugadas e ter o sobrenadante examinado. Se esse sobrenadante for límpido, é mais provável que a turvação seja devida à presença de elementos celulares ou debris. Se a turvação persistir após a centrifugação, é provável que se trate de uma efusão quilosa ou pseudoquilosa.

Efusões quilosas verdadeiras são produzidas por vazamentos a partir do ducto torácico, causados pela obstrução decorrente de um linfoma, carcinoma ou ruptura traumática. A presença de uma camada superficial cremosa de quilomícrons constitui a forma mais comum de efusão pleural em recém-nascidos.

As efusões pseudoquilosas ou quiliformes podem ter aspecto leitoso, esverdeado ou "pintado de ouro". Elas se acumulam gradualmente com a quebra dos lipídeos celulares em efusões de longa duração, como ocorre na pleurite reumatoide, tuberculose ou mixedema. A Tabela 28.20 resume as características que diferenciam as efusões quilosas verdadeiras das efusões pseudoquilosas.

Exame microscópico

Contagens celulares. As contagens de leucócitos não são confiáveis quanto à separação entre transudatos (< 1.000 células/μL) e exsudatos (> 1.000 células/μL). Embora contagens de hemácias acima de 100.000 células/μL sejam altamente sugestivas de malignidade, traumatismo ou infarto pulmonar, apresentam pouco valor prático.

Citologia e contagem de leucócitos diferencial. O exame deve ser realizado em um esfregaço corado, de preferência preparado por citocentrofugação e coloração de Romanowsky seca ao ar. De fato, o exame realizado por um laboratório de hematologia pode ser altamente efetivo quanto à detecção de células malignas, em especial de malignidades hematológicas (Kendall, 1997). A filtração ou os métodos de concentração automatizados com coloração de Papanicolau também podem ser utilizados, principalmente diante da preocupação com perda de células.

A análise citológica estabelece o diagnóstico de carcinoma metastático em pelo menos 70% dos casos em que tanto os esfregaços como os blocos de células são examinados (Light, 2002). Entretanto, a sensibilidade é bem menor nos casos de mesotelioma (10%), carcinoma de células escamosas (20%), linfoma (25–50%) ou sarcoma (25%). O preparo de blocos de células é desnecessário, exceto quando se trata de efusões para as quais a presença de malignidade constitui importante consideração (Jonasson, 1990).

As *células mesoteliais* são comuns no líquido pleural obtido a partir de processos inflamatórios (Fig. 28.16). Contudo, são conspicuamente escassas em amostras provenientes de pacientes com pleurisia tuberculosa, enfisema e pleurite reumatoide, bem como de pacientes que tiveram pleurodese. A ocorrência de deposição de fibrina e fibrose em tais condições previne a exfoliação das células mesoteliais. Células de carcinoma bem diferenciadas podem ser facilmente reconhecidas (Fig. 28.17), caso contrário podem estar altamente indiferenciadas (Fig. 28.18). A confirmação do resultado pode necessitar da elaboração de um painel de colorações imunocitoquímicas.

Os *neutrófilos* predominam no líquido pleural obtido de pacientes com inflamação pleural (Tab. 28.21). Mais de 10% dos transudatos também apresentam predominância de neutrófilos, contudo esse achado é desprovido de significado clínico.

Os *linfócitos* predominam nos distúrbios listados na Tabela 28.21. A maioria são células pequenas, porém é possível encontrar variantes de tamanho médio, grande e reativas (transformadas). Os nucléolos e a clivagem nuclear são mais proeminentes nas efusões do que no sangue periférico. Também podem ser encontrados plasmócitos. A ocorrência de linfocitose associada aos transudatos não possui sig-

Tabela 28.20 Aspectos característicos de efusões quilosas e pseudoquilosas

Aspecto	Quilosa	Pseudoquilosa
Início	Repentino	Gradual
Aparência	Leitosa-esbranquiçada, ou amarela a sanguinolenta	Leitosa ou esverdeada, brilho metálico
Exame microscópico	Linfocitose	Reação celular mista, cristais de colesterol
Triglicerídeos*†	≥ 110 mg/dL (≥ 1,24 mmol/L)	< 50 mg/dL (< 0,56 mol/L)
Eletroforese de lipoproteínas	Presença de quilomícrons	Ausência de quilomícrons

* Os valores entre parênteses estão em unidades do SI.

† Níveis de triglicerídeos entre 50 e 110 mg/dL são duvidosos e requerem avaliação por eletroforese para confirmação do quilotórax.

Modificado de Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed.© American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

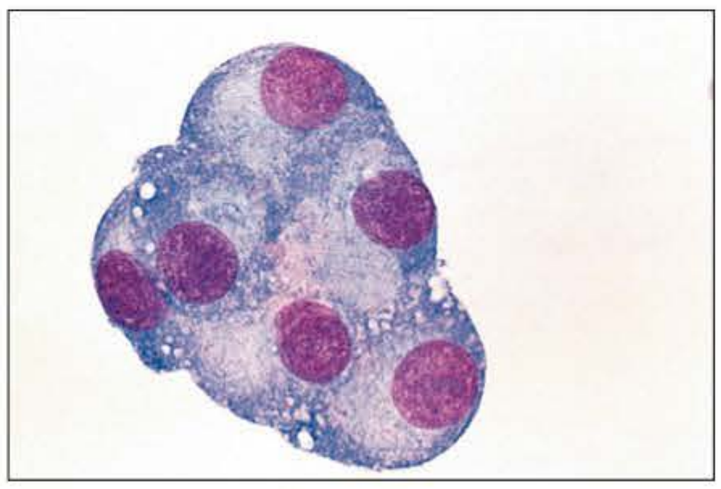


Figura 28.16 Células mesoteliais no líquido pleural.

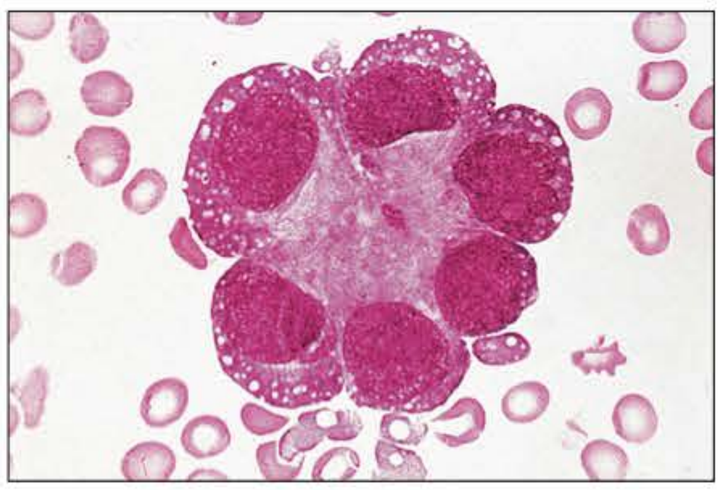


Figura 28.17 Células bem diferenciadas de carcinoma de mama no líquido pleural.

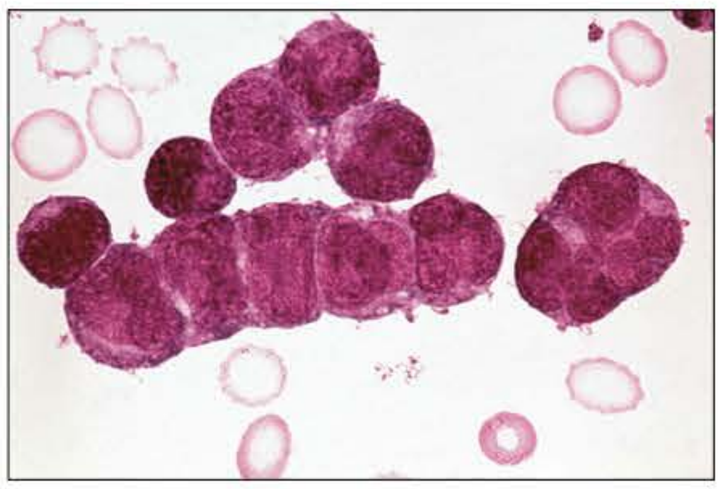


Figura 28.18 Células indiferenciadas de carcinoma pulmonar, mostrando a típica modelagem nuclear.

Tabela 28.21 Diferencial de células das efusões pleurais

Neutrofilia (> 50%)
Pneumonia bacteriana (efusão parapneumônica)
Infarto pulmonar
Pancreatite
Abscessos subfrênicos
Tuberculose precoce
Transudatos (acima de 10%)
Linfocitose (> 50%)
Tuberculose (as células mesoteliais são raras)
Infecção viral
Malignidade
Quilotórax verdadeiro
Pleurite reumatoide
Lúpus eritematoso sistêmico
Efusões urêmicas
Transudatos (cerca de 30%)
Eosinofilia (> 10%)
Pneumotórax (ar no espaço pleural)
Trauma
Infarto pulmonar
Insuficiência cardíaca congestiva
Infecção (especialmente parasíticas, fúngicas)
Síndromes de hipersensibilidade
Reação a fármacos
Doenças reumatológicas
Doença de Hodgkin
Idiopática

nificado clínico.

Pode ser difícil distinguir os linfomas não Hodgkin ou a leucemia linfocítica crônica (LLC) dos casos de efusões serosas ricas em linfócitos benignas (Fig. 28.19).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo ou imunocitoquímica, aliada à análise da morfologia celular, costuma ajudar a estabelecer o diagnóstico correto. As proporções relativas de células T, B e cadeias leves são, por si mesmas, indefinidas para serem utilizadas na separação das formas benignas e malignas de exsudatos (Ibrahim, 1989).

Uma efusão eosinofílica é aquela que contém ao menos 10% de eosinófilos. Suas causas mais comuns estão relacionadas à presença de ar ou sangue na cavidade pleural (Tab. 28.21). A maioria são exsudatos, entretanto sua etiologia permanece desconhecida em cerca de 35% dos pacientes (Adelman, 1984). Embora não tenha muita utilidade no diagnóstico da causa de uma efusão, a eosinofilia parece estar independentemente associada a sobrevidas mais longas (Rubins, 1996). Um pequeno número de *mastócitos* ou *basófilos* com frequência acompanha os eosinófilos. Também podem ser vistos *cristais de Charcot-Leyden* derivados de eosinófilos.

Análise bioquímica

Proteína. A quantificação do conteúdo total de proteínas ou albumina do líquido pleural tem pouco valor clínico, exceto quando combinada a outros parâmetros para diferenciar os exsudatos dos transudatos. A eletroforese de proteínas mostra um padrão semelhante ao do soro, a não ser pela maior proporção de albumina. Sua importância para o diagnóstico diferencial é pequena (Light, 1995).

Glicose. Os níveis de glicose do líquido pleural normal, transudatos e da maioria dos exsudatos são semelhantes aos observados no soro. Níveis de glicose reduzidos no líquido pleural (abaixo de 60 mg/dL ou 3,33 mmol/L) ou uma proporção de conteúdo de glicose no líquido pleural/soro inferior a 0,5 são mais consistentes e dramáticas na pleurite reumatoide e nos exsudatos parapneumônicos grosseiramente purulentos (Sahn, 1982). Baixos níveis de glicose no líquido pleural

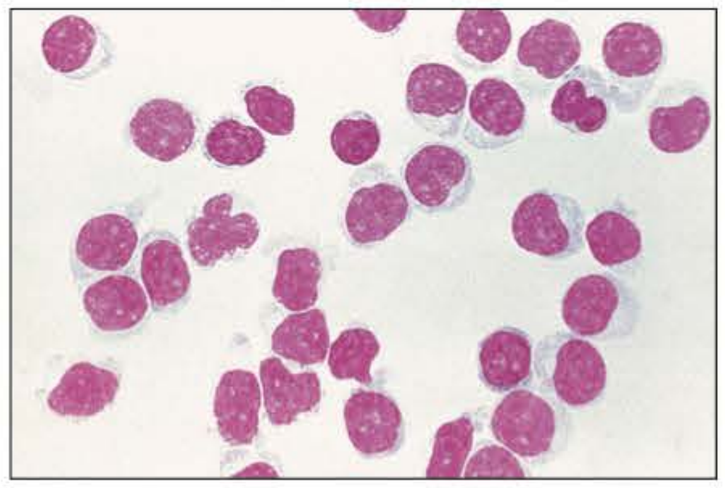


Figura 28.19 Efusão pleural em paciente com linfoma não Hodgkin, do tipo pequeno linfocítico. (De Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. ©American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.)

também são observados nos casos de malignidade, tuberculose, infecções bacterianas não purulentas, pleurite lúpica e ruptura esofágica.

Lactato. Os níveis de lactato no líquido pleural podem ter utilidade como adjuntos no diagnóstico rápido da pleurite infecciosa. Esses níveis são significativamente mais altos nas infecções pleurais bacterianas e tuberculosas, comparado ao que se observa em outras efusões pleurais. Elevações moderadas em geral são observadas nas efusões malignas (Brook, 1980). Valores acima de 90 mg/dL (10 mmol/L) apresentam um valor preditivo positivo de 94% para pleurite infecciosa, e um valor preditivo negativo de 100% (Gastrin, 1988).

Enzimas. A elevação dos níveis de *amilase* a valores acima dos níveis séricos (em geral, de 1,5–2 vezes ou mais) indica a ocorrência de pancreatite, ruptura esofágica ou efusão maligna (Light, 1973). A concentração aumentada de amilase decorrente de ruptura esofágica ou malignidade constitui a isoforma salivar, que a diferencia da amilase pancreática (Kramer, 1989).

Os níveis de LD no líquido pleural aumentam de forma proporcional ao grau de inflamação. Além de seu uso na separação entre exsudatos e transudatos, o declínio dos níveis de LD no decorrer de uma efusão indica que o processo inflamatório está sendo resolvido. Ao contrário, quando esses níveis aumentam, significa que a condição está piorando e requer work up ou tratamento agressivo. A análise das isozimas da LD pode ser útil no diagnóstico de exsudatos problemáticos, contudo, não costuma ser recomendada (Lossos, 1997).

A ADA, particularmente abundante nos linfócitos T, sofre um aumento significativo na pleurite tuberculosa. Na tuberculose, níveis de 50 U/L estão associados a uma sensibilidade de 91%, especificidade de 81%, valor preditivo positivo de 84%, valor preditivo negativo de 89% e eficiência de 86% (Burgess, 1996). Diante de uma proporção linfócito/neutrófilo ≥ 0,75, esses porcentuais são de 88, 95, 95, 88 e 92%, respectivamente. Níveis de ADA ≥ 40 U/L são detectados em cerca de 99,6% dos pacientes com pleurite tuberculosa confirmada (Lee, 2001). Entretanto, em pacientes cujos líquidos pleurais são ricos em linfócitos em razão de causas não tuberculosas, níveis de ADA inferiores a 40 U/L são encontrados em 97,1% dos casos.

Interferon-γ (INF-γ). Os níveis de INF-γ aumentam significativamente no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa. Níveis 3,7 UI/L apresentam sensibilidade de 99% e especificidade de 98% (Villena, 1996a). A sensibilidade do teste não é diferente entre pacientes positivos e negativos para HIV. Apenas cerca de 20% dos pacientes com efusões derivadas de malignidades hematológicas apresentam níveis de INF-γ ligeiramente maiores que 3,7 UI/L (Villena, 2003a).

pH. A determinação do pH do líquido pleural apresenta maior precisão diagnóstica na avaliação do prognóstico de efusões parapneumônicas (relacionadas à pneumonia) (Heffner, 1995). Um exsudato parapneumônico com pH > 7,3 em geral se resolve apenas com a terapia médica. Um pH < 7,2 indica a presença de ume efusão parapneumônica complicada (loculada ou associada ao empiema), necessitando de drenagem cirúrgica.

Pacientes com exsudatos limítrofes complicados (pH 7,2–7,3) podem ser assistidos de perto pelas determinações repetitivas. Níveis pleurais de glicose abaixo de 60 mg/dL (3,33 mmol/L) concomitantes, por outro lado, sugerem fortemente a ocorrência de empiema imi-

nente. Pleurite reumatoide e efusões malignas com resposta precária à pleurodese também são condições em que o pH está abaixo de 7,2 e os níveis de glicose são baixos (Rodriguez-Panadero, 1989). Um pH < 6 caracteriza *ruptura esofágica*, embora nos casos severos de empiema o pH também possa ser menor ou igual a 6 (Good, 1980).

O *urinotórax* – uma coleção de urina provavelmente produzida por drenagem linfática de acúmulos perirrenais na cavidade pleural – também está associado a um líquido pleural com pH < 7,3. Essas efusões são transudativas em razão do baixo conteúdo proteico, apresentam odor de urina e seus níveis de creatinina são maiores do que aqueles do soro colhido simultaneamente (Miller, 1988).

Lipídeos. Algumas efusões serosas parecem ser quilosas (i. e., têm aspecto leitoso), ainda que não sejam (pseudoquilosas). Outras, ao contrário, podem não parecer quilosas e o são. Embora os líquidos pseudoquilosos possam ser parcialmente produzidos pelo número aumentado de leucócitos e debris necróticos, na verdade se devem primariamente à presença de uma concentração aumentada de complexos lecitina-globulina. Uma efusão quilosa verdadeira apresenta quilomícrons na origem em análises eletroforéticas de lipoproteínas. As quantificações de lipídeos também são úteis na identificação das efusões quilosas (Staats, 1980). Sendo assim, níveis de triglicerídeos acima de 110 mg/dL no líquido pleural indicam a presença de um efusão quilosa. Valores da ordem de 60 a 110 mg/dL (0,68–1,24 mmol/L) são mais incertos e requerem a realização de uma eletroforese de lipoproteínas para confirmação de um quilotórax. Efusões não quilosas e pseudoquilosas em geral apresentam níveis de triglicerídeos abaixo de 50 mg/dL (0,56 mmol/L) e ausência de quilomícrons à eletroforese (Tab. 28.20).

As quantificações de *colesterol* podem ser úteis para separar transudatos de exsudatos, em especial se houver dúvidas referentes aos critérios de Light. Valores de colesterol ≥ 54 mg/dL e uma proporção de colesterol no líquido pleural/soro ≥ 0,32 apresentam, cada um, sensibilidade e especificidade bastante semelhantes àquelas dos critérios de Light (Suay, 1995). Níveis elevados e presença de cristais de colesterol podem ser detectados em pacientes com efusões pleurais há vários anos.

Proteína C reativa (CRP). A CRP presente no líquido pleural muitas vezes tem utilidade clínica como teste de triagem de doenças que afetam órgãos, índice de atividade de doenças e medida da resposta à terapia (Castano, 1992). Foi relatado que níveis de CRP > 30 mg/L no líquido pleural apresentam uma sensibilidade de 93,7%, especificidade de 76,5% e valor preditivo positivo de 98,4% nas infecções parapneumônicas (Turay, 2000). A média dos valores de CRP vale aproximadamente 90 mg/L nas infecções parapneumônicas, comparada às médias de 26 e 23 mg/L observadas nas efusões tuberculosa e maligna, respectivamente.

Ácido tuberculoesteárico (TSA, ácido 10-metiloctadecanoico). O TSA foi isolado pela primeira vez a partir do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Esse ácido graxo é um componente estrutural das micobactérias e normalmente está ausente nos tecidos humanos. Com auxílio da cromatografia gasosa/espectroscopia de massa, o TSA foi quantificado em amostras de escarro, lavados brônquicos e líquido pleural provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar (Muranishi, 1990). Nesse caso, o TSA presente no líquido pleural foi identificado em 24 (75%) dos 32 pacientes com tuberculose ativa. As amostras de lavado brônquico resultaram positivas para TSA em 15 dos 22 casos estudados. Em pacientes com outros distúrbios pulmonares, níveis detectáveis foram encontrados somente em 4 de um total de 46 amostras de líquido pleural, e em 3 dentre 69 amostras de lavado brônquico. Um estudo de menores proporções realizado posteriormente relatou os seguintes percentuais referentes ao TSA do líquido pleural: 54% de sensibilidade, 80% de especificidade, valor preditivo positivo de 75%, valor preditivo negativo de 61% e eficácia de 66% (Yorgancioglu, 1996).

Marcadores tumorais. Apesar de não serem recomendados para testes de rotina, vários marcadores tumorais com frequência têm utilidade auxiliar nos casos enigmáticos de exsudatos não inflamatórios de citologia negativa. Diversos marcadores tumorais, em especial CEA, CA 15-3, CA 549, CA 72-4 e CYFRA 21-1, entre outros, têm sido estudados no líquido pleural. O CEA provavelmente é o marcador isolado mais útil para os casos de adenocarcinoma, porém relatos mostram que seus valores de cutoff variam consideravelmente. A sensibilidade do CEA para efusões malignas varia dependendo da origem do tumor, e corresponde cerca de 50% no geral. Embora as efusões parapneumônicas complicadas possam resultar na elevação dos níveis de CEA (Garcia-Pachon, 1997), costumam não ser problemáticas em termos de distinção clínica.

O uso de combinações de marcadores tumorais aumenta a acurácia diagnóstica. Sendo assim, uma combinação de CEA, CA 15-3 e CA 72-4 apresenta acurácia de 90%, sensibilidade de 78%, especificidade de 95%, valor preditivo positivo de 88% e valor preditivo negativo de 91% (Villena, 1996b). De modo semelhante, a combinação CA 15-3 e CEA apresenta acurácia de 87% (Romero, 1996). Uma combinação de CA 549, CEA e CA 15-3 possui sensibilidade de 65%, especificidade de 99% e acurácia de 85% (Villena, 2003b). O uso do fragmento 19 da citoqueratina (CYFRA 21-1) também pode ser útil quando combinado aos demais marcadores tumorais.

Outros marcadores tumorais também podem ser úteis ao diagnóstico de efusões inexplicáveis. Um aumento marcante dos níveis de antígeno específico da próstata (PSA) no líquido pleural, por exemplo, conduziu ao diagnóstico correto de um paciente com câncer de próstata metastático que apresentava anemia severa, edema periférico e efusões pleural e pericárdica negativas ao exame citológico (Chin, 1999).

Estudos imunológicos

Aproximadamente 5% dos pacientes com AR e 50% daqueles com SLE desenvolvem efusões pleurais em algum momento, no decorrer da doença.

É comum detectar FR em efusões pleurais associadas à AR soropositiva. Embora títulos ≥ 1:320 no líquido pleural de indivíduo com AR conhecida constituam evidência razoável de pleurite reumatoide (Halla, 1980), títulos de FR elevados de até 1:1.280 foram detectados em 41% dos pacientes com pneumonia bacteriana, 20% dos pacientes com efusões malignas e 14% dos pacientes com tuberculose. Esse fato torna irrelevante o teste de detecção de FR de rotina (Levine, 1968).

Os títulos de ANA podem ser úteis no diagnóstico das efusões produzidas por pleurite lúpica, apresentando uma sensibilidade aproximada de 85% com um título de *cutoff* de 1:160 (Good, 1983). Por outro lado, a especificidade desse teste não é alta porque a elevação dos títulos de ANA também é detectada em outras condições. Por isso, os títulos de ANA no líquido pleural são desprovidos de utilidade clínica.

Níveis reduzidos de *complemento* (CH50 < 10 U/mL ou níveis de C4 abaixo de 10×10^{-5} U/g de proteína) estão presentes na maioria dos pacientes com pleurite reumatoide ou lúpica (Hunder, 1972; Halla, 1980). Todavia, as quantificações de complemento não são altamente específicas e têm pouco valor para o diagnóstico de rotina, ainda que possam ser úteis ao diagnóstico de efusões, de outro modo, enigmáticas.

Exame microbiológico

As bactérias mais comumente associadas a efusões parapneumônicas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos β-hemolíticos do grupo A, estreptococos-γ e alguns bacilos Gram-negativos. Bactérias anaeróbias são isoladas em uma proporção significativa de casos, de modo que é necessário realizar ambas as culturas – aeróbica e anaeróbica. A coloração de Gram apresenta sensibilidade de aproximadamente 50% (Ferrer, 1999).

Para pacientes com suspeita de *M. tuberculosis*, a coloração direta das efusões tuberculosas para detecção de bactérias acidorresistentes apresenta uma sensibilidade de 20 a 30%. São encontradas culturas positivas em 50 a 70% dos casos (Baer, 2001). A biópsia pleural rende o maior porcentual de sensibilidade em culturas (50–75%) e pode fornecer um rápido diagnóstico provável de tuberculose por meio da demonstração histopatológica de granulomas ou bactérias acidorresistentes. A combinação de culturas e colorações acidorresistentes à biópsia pleural aumenta a sensibilidade para aproximadamente 95% (Jay, 1986).

A análise da ADA pode fornecer rápidas evidências bioquímicas de efusões tuberculosas, independentemente do status de HIV (Burgess, 1996; Riantawan, 1999; Lee, 2001). Enquanto a isozima ADA-2 é produzida por linfócitos ativados durante a tuberculose, nos casos sem tuberculose são observadas apenas elevações discretas de sua concentração nas efusões pleurais ricas em linfócitos. Todavia, a prevalência relativamente baixa da pleurisia tuberculosa na América do Norte antecipa uma taxa menor de valores preditivos positivos, em compa-

ração aos excelentes resultados registrados nas literaturas asiática e europeia, onde a tuberculose é mais comum. Além disso, o método colorimétrico de Giusti, pelo qual é derivada a maior parte dos dados referentes à ADA, infelizmente não está amplamente disponível nos Estados Unidos (Roth, 1999).

A concentração de INF-γ do líquido pleural também aumenta significativamente na pleurisia tuberculosa e sua determinação pode ser útil em certos casos, já que independe do status do HIV e sofre apenas um aumento modesto nas malignidades hematológicas (Villena, 2003).

Líquido pericárdico

Normalmente, o espaço pericárdico contém 10 a 50 mL de líquido produzido em um processo transudativo, semelhante ao líquido pleural. As efusões pericárdicas são mais frequentemente causadas por infecções virais, dentre as quais a infecção por enterovírus é a mais comum. Também podem se desenvolver como resultado de infecções bacterianas, tuberculosas ou fúngicas, doenças autoimunes, insuficiência renal, infarto do miocárdio, lesão mediastínica, efeitos produzidos por vários fármacos, ou podem ser idiopáticas (Tab. 28.22). Pacientes infectados pelo HIV comumente apresentam efusões pericárdicas assintomáticas, que podem ser tornar maiores com o avanço da doença (Silva-Cardosa, 1999). Muitos dos testes laboratoriais recomendados que foram descritos para o líquido pleural também são pertinentes às efusões pericárdicas (Tab. 28.19).

Coleta da amostra

Efusões pericárdicas de etiologia conhecida, ou efusões amplas com sinais de tamponamento cardíaco, em geral são enviadas ao laboratório para serem examinadas. As amostras de líquido podem ser obtidas por pericardiotomia seguida de uma toracotomia restrita, ou por pericardiocentese (aspiração com agulha estéril).

O líquido pericárdico normal tem cor amarela-clara e é límpido. Efusões amplas (> 350 mL) são mais frequentemente causadas por malignidades ou uremia, ou são idiopáticas. No tamponamento cardíaco associado ao HIV, 45% das efusões são idiopáticas, enquanto as efusões tuberculosas e bacterianas correspondem, cada qual, a aproximadamente 20% dos casos (Chen, 1999). Infecções ou malignidades tipicamente produzem efusões turvas. Já as efusões decorrentes de uremia costumam ser límpidas e exibir cor de palha. Estes, além de tantos outros distúrbios, podem acarretar efusões hemorrágicas.

Um líquido similar ao sangue e que tenha sido obtido por pericardiocentese pode representar tanto uma efusão hemorrágica como a aspiração descuidada de sangue a partir do coração. O sangue obtido a partir da câmara cardíaca apresenta hematócrito comparável ao do sangue periférico, sendo que a análise de seus gases gera resultados semelhantes àqueles obtidos com amostras de sangue venoso ou arterial. Em contraste, o hematócrito de uma efusão hemorrágica costuma ser mais baixo do que o hematócrito do sangue periférico. O pH e a PO_2 são mais baixos, enquanto a PCO_2 é mais alta do que no sangue venoso ou arterial (Mann, 1978). O sangue oriundo de punção cardíaca coagula, porém o mesmo não ocorre, comumente, com uma efusão hemorrágica.

Um aspecto leitoso sugere a presença de efusão quilosa ou pseudoquilosa. A identificação e diferenciação dessas efusões são discutidas na seção sobre líquido pleural.

Exame macroscópico

Embora seja bastante comum, a *síndrome pós-pericardiotomia* é uma complicação inespecífica da cirurgia cardíaca (ou de outros danos cardíacos) que se desenvolve em alguns dias ou semanas após a lesão inicial. É marcada pelo desenvolvimento de febre, dor torácica pleurítica e outros sintomas pleurais, pericárdicos e, menos frequentemente, inflamação pulmonar. As efusões pleurais exsudativas se desenvolvem em mais de 80% dos casos. Muitas vezes, seu aspecto varia entre serossanguinolento e hemorrágico, o pH é tipicamente maior que 7,4 e os níveis de glicose permanecem normais (Stelzner, 1983). Não há testes diagnósticos específicos para essa síndrome e, assim, seu diagnóstico se dá por exclusão clínica. Embora sua etiologia seja incerta, o curso no decorrer do tempo, a presença de anticorpos antimiocárdio e a resposta à terapia anti-inflamatória sugerem que se trata de um processo imunomediado. Níveis aumentados de anticorpos antimiocárdio em relação ao observado no soro, redução dos níveis de complemento e formação de imunocomplexos foram constatados no líquido pleural de um único paciente que apresentava a síndrome (Kim, 1996).

Tabela 28.22 Etiologia das efusões pericárdicas

Idiopática (mais frequentemente viral)	Falência renal
Infecção	Hemorragia
Bactérias	Trauma
Tuberculose	Terapia anticoagulante
Fungos	Vazamento de aneurisma aórtico
Vírus	Distúrbios autoimunes
Associada a AIDS (geralmente viral)	Hipotireoidismo
Neoplasma	Artrite reumatoide
Carcinoma metastático	Lúpus eritematoso sistêmico
Linfoma	Doença intestinal inflamatória
Fármacos	Granulomatose de Wegener
Hidralazina	Infarto agudo do miocárdio
Procainamida	Radioterapia
Fenitoína	

AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida.

Exsudatos e transudatos

Até pouco tempo, os critérios adotados para diferenciar exsudatos de transudatos não haviam sido cuidadosamente estudados nas efusões pericárdicas. De acordo com os critérios de Light, um exsudato pleural apresenta uma ou mais das seguintes características: proporção de proteínas no líquido pleural/soro > 0,5; proporção de LD no líquido pleural/soro > 0,6; e níveis de LD no líquido pleural > 200 U/L. A aplicação dos critérios de Light ao líquido pericárdico tem se mostrado a ferramenta diagnóstica mais confiável para identificação de exsudatos e transudatos pericárdicos (Burgess, 2002a).

O teste de rotina para efusões pericárdicas provavelmente deve se limitar a contagem de células, determinação dos níveis de glicose, proteínas totais, LD, cultura de bactérias e citologia (Meyers, 1997). Outros testes mais específicos são apropriados para os casos de doenças com alto grau de suspeita clínica.

Exame microscópico

O hematócrito e a contagem de hemácias documentam a presença de uma efusão hemorrágica, porém seu valor é limitado em termos de diagnóstico diferencial. As contagens de leucócitos totais acima de 10.000 células/μL sugerem pericardite bacteriana, tuberculosa ou maligna. Entretanto, nessas condições também podem ser encontradas baixas contagens, limitando o valor dessa medida (Agner, 1979). Embora os diferenciais de leucócitos formais acrescentem pouca informação diagnóstica, recomenda-se sempre examinar um esfregaço corado.

A identificação citológica de células malignas não costuma ser difícil. Carcinomas metastáticos de pulmão e mama são observados com maior frequência em efusões pericárdicas malignas. A citologia, nesse caso, apresenta sensibilidade de 95% e especificidade de 100% (Meyers, 1997).

Análise bioquímica

Os parâmetros bioquímicos do diagnóstico das efusões pericárdicas ainda não foram estudados na mesma extensão que em outros líquidos corporais. Apesar de as efusões pericárdicas serem bem semelhantes a líquidos pleurais, a aplicação rotineira desses testes necessita de mais estudos para ter sua importância diagnóstica totalmente apreciada.

Proteína. Um valor maior que 3 g/dL apresenta sensibilidade de 97% para efusões exsudativas, porém sua especificidade de apenas 22% limita significativamente sua utilidade. Portanto, a quantificação de proteínas totais não possui poder discriminante no diagnóstico pericárdico (Meyers, 1997).

Glicose. Níveis pericárdicos de glicose abaixo de 60 mg/dL apresentam

uma acurácia de apenas 36% na identificação dos exsudatos pericárdicos (Meyers, 1997). Valores inferiores a 40 mg/dL (< 2,22 mmol/L) são comuns nas efusões bacterianas, tuberculosas, reumáticas ou malignas.

pH. O pH do líquido pericárdico pode estar acentuadamente reduzido (< 7,1) em casos de pericardite reumática ou purulenta. Malignidades, uremia, tuberculose e distúrbios idiopáticos podem apresentar baixas moderadas na faixa de faixa de 7,2 a 7,3 (Kindig, 1983).

Lipídeos. Separar efusões quilosas verdadeiras de efusões pseudoquilosas pode se tornar mais fácil com a determinação dos conteúdos de triglicerídeos e colesterol, bem como eletroforese de lipoproteínas para quilomícrons (Tab. 28.20). Ver em "Lipídeos", na seção "Líquido pleural", maiores detalhes relacionados ao diagnóstico das efusões quilosas.

Enzimas. Níveis de LD maiores que 200 U/L no líquido pericárdico foram sugeridos para valor de cutoff das análises de exsudatos pericárdicos (Burgess, 2002a). Além disso, a quantificação de LD e de CK no líquido pericárdico em 48 horas após a morte do paciente pode ser útil para estabelecer um caso de lesão de miocárdio aguda, diante de uma suspeita que não pode ser confirmada pelos métodos histológicos convencionais (Luna, 1982; Stewart, 1984). Os níveis de CK-MB e mioglobulina no líquido pericárdico, bem como de troponina I no líquido pericárdico obtido após a morte do paciente estão significativamente aumentados na lesão miocárdica (Perez-Carceles, 2004).

A atividade de ADA constitui um teste auxiliar útil para detecção de pericardite tuberculosa em casos suspeitos com resultaram negativos na coloração acidorresistente. A mediana da concentração de ADA é significativamente maior na pericardite tuberculosa do que em outras efusões patológicas (Burgess, 2002b). Adotando um *cutoff* de 30 U/L, foi alcançada uma sensibilidade de 94%, especificidade de 68% e valor preditivo positivo de 80%. Com um cutoff de 40 U/L, a sensibilidade e especificidade obtidas foram, respectivamente, 93 e 97% (Koh, 1994).

Interferon-γ (INF-γ). Níveis aumentados de INF-γ foram descritos em efusões serosas tuberculosas, incluindo a pericardite tuberculosa (Burgess, 2002b). Nesse caso, a concentração de INF-γ ultrapassou 1.000 pg/L, sendo esse valor significativamente maior do que nas efusões oriundas de outras condições patológicas. Um valor de *cutoff* de 200 pg/L resultou em 100% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da pericardite tuberculosa.

Reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é uma técnica sensível que pode ser ainda mais específica do que a detecção de adenosina deaminase no diagnóstico da pericardite tuberculosa (Lee, 2002). No entanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de pericardite tuberculosa, uma vez que alguns líquidos pericárdicos obtidos de pacientes com amplas efusões tuberculosas podem não conter *M. tuberculosis*.

Estudos imunológicos

Um teste negativo para ANA torna altamente improvável um diagnóstico de serosite lúpica. Por outro lado, títulos de ANA elevados em efusões pericárdicas são pouco específicos, ainda que sejam da ordem de 1:5.120 (Leventhal, 1990; Wang, 2000). Se não houver explicação para a detecção de altos títulos de ANA, é preciso suspeitar que se trata de um caso de malignidade.

Exame microbiológico

Nos casos de pericardite bacteriana, a coloração de Gram e as culturas apresentam sensibilidade semelhante à obtida com outros líquidos corporais serosos (i. e., cerca de 50 e 80%, respectivamente). As bactérias aeróbias de maior importância são *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, estreptococos β-hemolítico do grupo A e bacilos Gram-negativos. Apesar de a pericardite infecciosa causada por bactérias anaeróbias não ser incomum, muitas vezes essas bactérias não são reconhecidas, por causa dos métodos inconsistentes de isolamento e identificação utilizados (Brook, 2002). Os principais organismos anaeróbios são o grupo *Bacterioides fragilis*, estreptococos anaeróbios e espécies de *Clostridium*, *Fusobacterium* e *Bifidobacterium*.

É difícil diagnosticar um agente etiológico específico na pericardite viral, porque os vírus (p. ex., coxsackievírus, vírus influenza e caxumba) raramente são isolados a partir do líquido pericárdico. A obtenção de amostras de soro de fase aguda e convalescente para avaliação da resposta humoral aos patógenos virais suspeitos pode ajudar a sustentar o diagnóstico (Bellinger, 1987). É provável que a infecção viral contribua para as efusões pericárdicas associadas ao HIV mais idiopáticas.

As colorações acidorresistentes e culturas para detecção de pericardite tuberculosa apresentam sensibilidade em torno de 50% (Agner, 1979). A PCR é uma técnica sensível que pode ser ainda mais específica que a detecção de adenosina deaminase no diagnóstico da pericardite tuberculosa (Lee, 2002). No entanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de pericardite tuberculosa.

Líquido peritoneal

Uma *ascite* é o acúmulo patológico de excesso de líquido na cavidade peritoneal. Normalmente, o espaço delimitado pelo revestimento mesotelial contém até 50 mL de líquido. Assim como os líquidos pleural e pericárdico, o líquido peritoneal é produzido por ultrafiltração plasmática dependente da permeabilidade vascular e das forças hidrostática e oncótica de Starling.

Transudatos e exsudatos

A Tabela 28.23 lista as causas mais comuns das efusões peritoneais. Os critérios laboratoriais para classificação do líquido ascítico como transudato ou exsudato ainda não estão tão bem definidos como para os líquidos pleural e pericárdico. Exemplificando, amostras infectadas ou relacionadas a malignidades não raro são descritas como contendo concentração de proteínas na mesma faixa dos transudatos (i. e., < 3 g/dL), sendo que muitos pacientes com ascite cirrótica ou decorrente de insuficiência cardíaca apresentam concentração proteica semelhante à encontrada nos exsudatos (> 3 g/dL) (Runyon, 1992).

O *gradiente de albumina no soro-ascite*, definido como a concentração de albumina sérica subtraída da concentração de albumina do líquido ascítico, é amplamente considerado o método mais confiável de diferenciação de exsudatos e transudatos peritoneais (Runyon, 1992). A ascite causada por hipertensão porta apresenta um gradiente mínimo de 1,1 g/dL (> 11 g/L; transudato), enquanto a ascite produzida por outras causas apresenta gradiente inferior a 1,1 g/dL (exsudato) (Runyon, 1992). De fato, obteve-se uma acurácia diagnóstica de 98% para o gradiente de albumina no soro-ascite, comparada à acurácia de 52 a 80% obtida para quatro marcadores distintos: proteína total no líquido ascítico; proporção de proteína total na ascite/soro; concentração de LD no líquido ascí-

Tabela 28.23 Etiologia das efusões peritoneais

Transudatos: pressão hidrostática aumentada ou pressão oncótica plasmática diminuída
Insuficiência cardíaca congestiva
Cirrose hepática
Hipoproteinemia (p. ex., síndrome nefrótica)
Exsudatos: permeabilidade capilar aumentada ou reabsorção linfática diminuída
Infecções
Peritonite bacteriana primária
Peritonite bacteriana secundária (p. ex., apendicite, ruptura intestinal)
Tuberculose
Neoplasmas
Hepatoma
Linfoma
Mesotelioma
Carcinoma metastático
Carcinoma ovariano
Câncer de próstata
Trauma
Pancreatite
Peritonite biliar (p. ex., ruptura da vesícula biliar)
Efusões quilosas
Dano ou obstrução do ducto torácico (p. ex., trauma, linfoma, carcinoma, tuberculose e outros granulomas [p. ex., sarcoidose, histoplasmose etc.], infestação parasítica).

tico; e proporção de LD na ascite/soro (Akriviadis, 1996).

Uma proporção de bilirrubina no líquido ascítico/soro ≥ 0,6 também apresenta significativa associação com os exsudatos (Elis, 1998). Na verdade, a proporção de bilirrubina, o gradiente de albumina soro-ascite e os critérios de Light apresentaram acurácias de 81,5, 84 e 80,2%, respectivamente. Outros estudos sugeriram que o líquido ascítico deve ser considerado exsudato se apresentar uma concentração de LDH > 130 U/L e uma proporção de proteínas totais ascite/soro > 0,4 (Paramothayan, 2002).

Embora seja provável que o gradiente de albumina soro-ascite é o melhor método de diferenciação de exsudatos e transudatos ascíticos, há outros métodos favoravelmente comparáveis. Não obstante, inexistem marcadores bioquímicos ideais que permitam discriminar completamente exsudatos e transudatos ascíticos.

Coleta da amostra

Paracentese. A paracentese diagnóstica é realizada na maioria dos pacientes com ascite recente, ou diante da mudança do quadro clínico de um paciente com ascite, como um rápido acúmulo de líquido ou o desenvolvimento de febre. Para uma avaliação completa, o volume mínimo necessário é 30 mL. Se for possível, devem ser obtidos 100 mL de líquido para o exame citológico. As amostras destinadas à contagem celular devem ser transferidas para um tubo de venipuntura tratado com anticoagulante EDTA. As amostras para cultura devem incluir inoculação de garrafas de cultura de sangue na cabeceira com líquido ascítico (10 mL por garrafa de cultura).

Lavado peritoneal diagnóstico (LPD). Esse procedimento deixou de ser recomendado como técnica de rotina para avaliação de traumas abdominais. Preocupações relativas à sensibilidade excessiva e inespecificidade, e também o avanço dos procedimentos diagnósticos não invasivos, como a TC e a ultrassonografia, limitaram seu uso comum na (1) triagem rápida para detecção de hemorragias abdominais significativas, e (2) avaliação de lesões em víscera oca.

O procedimento consiste em introduzir um cateter, através de uma pequena incisão, no interior da cavidade abdominal. Se for possível aspirar mais de 15 mL de sangue total, procede-se à realização do LPD com a infusão de 1 mL de salina ou de solução de Ringer (20 mg/kg para crianças) e drenagem de líquido por ação da gravidade. É necessário obter ao menos 600 mL de amostra, a fim de evitar contagens falsamente baixas (Sullivan, 1997). O cateter às vezes é deixado em posição para uma nova obtenção de LPD dentro de 2 a 3 horas, caso os resultados iniciais tenham sido negativos ou indeterminados.

Os critérios comumente adotados para interpretação do LPD após traumatismos são mostrados na Tabela 28.24. O valor preditivo positivo da técnica é de apenas 23% para uma contagem isolada (sem nenhum outro critério anormal) de leucócitos de 500 células/μL (Soyka, 1990).

Os critérios convencionais do LPD talvez não sejam confiáveis para a detecção de lesões em vísceras ocas quando há sangue proveniente de uma lesão concomitante em órgão sólido que dispense o reparo cirúrgico, resultando em laparotomias exploratórias desnecessárias. Visando à introdução de ajustes a essa fonte de sangramento, foram sugeridas as seguintes modificações dos critérios de LPD: (a) uma contagem de CBSs maior ou igual à contagem de CVSs dividida por 150, na qual a concentração de CVSs é 10×10^4 células/mm^3 (Otomo, 1998); ou (b) uma proporção de contagem celular > 1 (Fang, 1998). A proporção de contagem celular é definida como a proporção entre as contagens de CBSs/CVSs do lavado dividida pela proporção CBSs/CVSs do sangue periférico. Para esses novos critérios, foi relatada uma especificidade de 97% em casos de lesão em víscera oca, especialmente se o LPD for realizado em pelo menos 3 horas após a produção da lesão.

Outras aplicações do LPD incluem a avaliação de pacientes com suspeita de peritonite ou pancreatite aguda. Por exemplo, uma contagem de leucócitos em amostra de lavado igual a 200 células/mm^3 foi associada a uma probabilidade de 99% de peritonite aguda (Larson, 1992).

Diálise peritoneal. O dialisado proveniente de pacientes renais submetidos à diálise peritoneal crônica ambulatorial deve ser enviado ao laboratório para avaliação quanto à possibilidade de infecção.

Lavagens peritoneais. O procedimento de obtenção desse material é realizado no intraoperatório para documentar a disseminação intra-abdominal precoce de carcinomas ginecológicos e gástricos. Em geral, as amostras são enviadas apenas para o exame citológico.

Testes recomendados

A Tabela 28.25 lista os testes mais importantes para avaliação do líquido ascítico. A importância relativa desses testes é variável, dependendo do tipo de amostra e dos achados clínicos. Exemplificando, as contagens de CVS e CBS são mais importantes do que a citologia ou o gradiente de albumina soro-ascite na avaliação dos efeitos abdominais do trauma. O exame geral fornece informação imediata durante a triagem clínica e laboratorial.

Tabela 28.24 Critérios para avaliação do lavado peritoneal

Resultado positivo
Aspiração de > 15 mL de sangue total durante a introdução do cateter
Lavado totalmente sanguinolento
CVS > 100.000/μL após trauma cego
CVS > 50.000/μL após trauma com perfuração
CBS > 500/μL
Amilase > 110 U/dL
Resultado indeterminado
Pequena quantidade de sangue total durante a introdução do cateter
CVS 50.000–100.000/μL após trauma cego
CVS 1.000–50.000/μL após trauma com perfuração
CBS > 100–500/μL
Resultado negativo
CVS < 50.000/μL após trauma cego
CVS < 1.000/μL após trauma com perfuração
CBS < 100/μL

CVS = células vermelhas sanguíneas; CBS = células brancas sanguíneas.

Modificado de Feied, CF: Diagnostic peritoneal lavage. Postgrad Med 1989; 85:40, com permissão.

Tabela 28.25 Testes recomendados para efusões peritoneais

Testes úteis para a maioria dos pacientes
Exame geral
Citologia
Colorações e culturas para microrganismos
Gradiente de concentração de albumina soro-ascite
Testes úteis em casos especiais
Contagens de leucócitos total e celular diferencial
Contagem de CVS (lavado)
Bilirrubina
Creatinina/nitrogênio ureico
Enzimas (ADA, ALP, amilase, LD, telomerase)
Lactato
Colesterol (ascites malignas)
Fibronectina
Marcadores tumorais (CEA, PSA, CA 19-9, CA 15-3, CA-125)
Imunocitologia/citometria de fluxo
Ácido tuberculoesteárico

CVS = células vermelhas sanguíneas; CEA = antígeno carcinoembrionário; PSA = antígeno específico da próstata; ALP = fosfatase alcalina; ADA = adenosina deaminase; LD = lactato desidrogenase.

Modificado de Kjeldsberg, CR; Knight, JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids, 3. ed. ©American Society for Clinical Pathology, Chicago, 1993, com permissão.

Exame macroscópico

Enquanto os transudatos em geral são amarelo-claros e límpidos, os exsudatos são nebulosos ou turvos por causa da presença de leucócitos, células tumorais ou concentração proteica aumentada. A presença de partículas de alimento, materiais estranhos ou coloração amarela-esverdeada produzida pela bile em amostras de LPD sugere a ocorrência de perfuração do trato gastrintestinal ou biliar. A pancreatite aguda e a colecistite também produzem uma descoloração esverdeada.

Um líquido tingido de sangue ou totalmente sanguinolento deve ser distinguido de uma punção traumática, em que o sangue usualmente é eliminado com a continuidade da paracentese. Uma quantidade tão pequena quanto 15 mL de sangue já é suficiente para produzir uma cor vermelha-escura brilhante, que impossibilita a leitura de um jornal através do tubo contendo o lavado. Na maioria dos casos, essa capacidade de ler o jornal através do tubo resulta em LPD negativo. Amostras opacas/escurecidas requerem contagens celulares, pois a legibilidade da leitura de jornal é perdida a concentrações bem menores que a de 100.000 CVSs/μL estabelecida como critério para LPD positivo (Bellows, 1998). Ascites sanguinolentas também são encontradas em malignidades e na tuberculose.

Um líquido leitoso que não se torna límpido mesmo após a centrifugação sugere uma efusão quilosa ou pseudoquilosa. Efusões peritoneais verdadeiramente quilosas são bem menos comuns do que os líquidos pleurais quilosos. São causadas pela interrupção ou bloqueio do fluxo linfático em decorrência de traumatismo, linfoma, carcinoma, tuberculose ou outras doenças granulomatosas (p. ex., sarcoidose), cirrose hepática, adesões ou infestações parasíticas. A diferenciação das efusões verdadeiramente quilosas e pseudoquilosas é discutida na seção "Líquido pleural", em "Exame geral".

Exame microscópico

A contagem de leucócitos total é útil na distinção da ascite decorrente de cirrose simples daquela causada por peritonite bacteriana espontânea (SBP, spontaneous bacterial peritonitis), que se deve à migração de bactérias do intestino para o líquido ascítico. Cerca de 90% dos pacientes com SBP apresentarão contagem de leucócitos > 500 células/μL, sendo que mais de 50% desse total são neutrófilos (Fig. 28.20) (Runyon, 1984; Stewart, 1986).

A contagem total de neutrófilos presentes no líquido ascítico é o método preferido para diagnóstico da SBP. Foram recomendados valores de cutoff de 250 e 500 neutrófilos/μL que apresentam acurácia diagnóstica aproximada de 90 e 94%, respectivamente (Stassen, 1986; Albillos, 1990).

Contagens celulares, concentração de proteínas total e valores de gradiente de albumina variam em função das alterações que o líquido apresenta, associadas à formação e resolução da ascite. Exemplificando, a diurese pode fazer com que a contagem de CBSs aumente de 300 células/μL para 1.000 células/μL ou mais. Quando determinada por LPD, uma contagem de leucócitos ≥ 200 células/μL está associada a uma probabilidade de 99% de peritonite aguda (Alverdy, 1988; Larson, 1992).

A *eosinofilia* (> 10%) está mais comumente associada a um processo inflamatório crônico, que, por sua vez, está associado à diálise peritoneal crônica. A eosinofilia também foi demonstrada em casos de insuficiência cardíaca congestiva, vasculite, linfoma e rompimento de cisto hidático.

A citologia apresenta uma sensibilidade global de 40 a 65% para ascites malignas. Entretanto, a carcinomatose peritoneal contribui apenas para cerca de $^2/_3$ das efusões malignas. A citologia apresenta um sensibilidade maior que 95%, quando restrita a tais casos (Runyon, 1988). As colorações imunocitoquímicas são úteis para caracterização de células atípicas em casos duvidosos.

Análise bioquímica

Proteína. O gradiente de albumina soro-ascite excede o conteúdo de proteínas total na diferenciação da cirrose entre as demais causas de efusão peritoneal (Runyon, 1992). A SBP está comumente associada a uma baixa concentração proteica total (< 3 g/dL) e a um alto gradiente de albumina soro-ascite (> 1,1 g/dL), tornando as determinações do conteúdo de proteínas total irrelevantes para esse distúrbio. As alterações

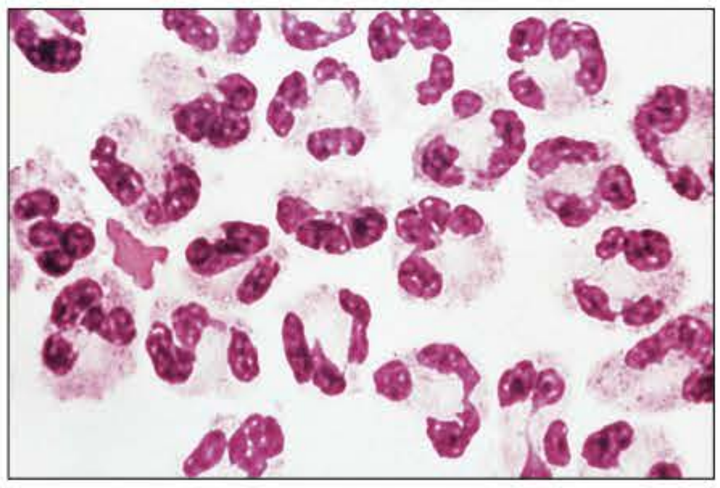


Figura 28.20 Neutrófilos em paciente com peritonite bacteriana.

que ocorrem no líquido extracelular associadas à formação e reabsorção da ascite também produzem variações no conteúdo proteico.

Glicose. Relatos anteriores apontaram que níveis de glicose ≤ 50 mg/dL no líquido peritoneal eram encontrados em 30 a 60% dos casos de peritonite tuberculosa e em cerca de 50% dos pacientes com carcinomatose abdominal (Polak, 1973; Brown, 1976). Entretanto, um estudo recente encontrou níveis de glicose ainda mais baixos na maioria dos casos de ascite tuberculosa (Bansal, 1998). Não obstante, a quantificação da glicose tem pouca importância, uma vez que apresenta sensibilidade e especificidade baixas demais para ter algum valor prático.

Enzimas. A atividade da *amilase* no líquido peritoneal normal assemelha-se aos níveis plasmáticos. A elevação dessa atividade a valores maiores que o triplo da atividade observada no plasma constitui boa evidência da presença de ascite relacionada ao pâncreas, incluindo pancreatite aguda e pseudocisto pancreático (Runyon, 1987a). A análise da amilase não é recomendada para avaliações de rotina de ascite, dada a baixa prevalência da ascite pancreática. A determinação retrospectiva da amilase em amostras armazenadas é indicada para os casos em que os estudos iniciais não foram diagnósticos. Entretanto, os níveis de amilase no lavado peritoneal podem ser importantes em casos de pacientes que sofreram trauma abdominal cego ou com penetração (McAnena, 1991). Nesse caso, níveis de amilase ≥ 20 U/L apresentam sensibilidade de 87%, especificidade de 75% e valor preditivo positivo de 46% para lesões intra-abdominais significativas. Em tais casos, deve ser considerada a realização de laparotomia. Perfuração gastroduodenal, trombose de veia mesentérica, estrangulamento intestinal ou necrose também podem produzir elevação dos níveis de amilase. Apesar de várias malignidades não pancreáticas raramente produzirem aumento dos níveis dessa enzima, a avaliação das isozimas costuma identificar a presença de sua isoforma salivar nesses casos (Kosches, 1989).

Níveis de ALP > 10 U/L no LPD constituem um achado bastante útil na predição de lesões de vísceras ocas em pacientes que, de outra forma, não devem ser submetidos a uma laparotomia (especificidade de 99,8% e sensibilidade de 94,7%) (Jaffin, 1993). A quantificação de ALP no líquido ascítico também pode ser útil na diferenciação das formas primária e secundária da peritonite bacteriana decorrente de perfuração intestinal. A peritonite secundária está associada a níveis médios de ALP significativamente mais altos do que os observados na SBP. Sendo assim, níveis de ALP > 240 U/L forma encontrados em 92% dos pacientes com peritonite secundária *versus* 12% dos casos de SBP (Wu, 2001). A sensibilidade e especificidade para diferenciar essas doenças foram, respectivamente, 92 e 88%.

A atividade de LD com frequência fica maior nas efusões malignas (Gerbes, 1991). Para uma proporção de LD no líquido ascítico/soro > 0,6 foi descrita uma sensibilidade de 80% (Boyer, 1978). A medida combinada da LD e do colesterol presentes no líquido ascítico discriminou totalmente as acites decorrentes de carcinomatose peritoneal daquelas derivadas de cirrose e hepatocarcinomas (Castaldo, 1994; Halperin, 1999). Embora tanto nos níveis de LD como no soro como no líquido peritoneal sejam significativamente maiores em pacientes com câncer ovariano do que naqueles com tumores ovarianos benignos ou outros tipos de malignidades ginecológicas, os níveis de LD do líquido peritoneal apresentam maior sensibilidade (87%) e acurácia diagnóstica (90%) que a medida dos níveis séricos de LD (60 e 70%, respectivamente) (Schneider, 1997). A LD também tem sido utilizada

no diagnóstico precoce da SBP, apresentando uma acurácia diagnóstica aproximada de 74% com *cutoff* da proporção líquido ascítico/soro de 0,4 (Lee, 1987).

A *telomerase*, quando presente, atua como marcador discriminador específico de ascites malignas (Tangkijvanich, 1999). Assim, a atividade de telomerase foi detectada em 81% das efusões peritoneais malignas, com 76% de sensibilidade e 95,7% de especificidade.

Em áreas endêmicas, a ADA é comumente empregada para identificar pacientes com peritonite tuberculosa (Burgess, 2001). Utilizando as curvas de ROC e um valor de cutoff de 30 U/L, obteve-se 94% de sensibilidade e 92% de especificidade. Com um *cutoff* de 33 U/L, obteve-se 100% de sensibilidade, 96,6% de especificidade, valor preditivo positivo de 95% e valor preditivo negativo de 98% (Dwivedi, 1990).

Fibronectina. Adotando-se um *cutoff* de 85 μg/mL (85 mg/L), a detecção da fibronectina foi um método mais confiável para diferenciar ascites malignas e estéreis (acurácia diagnóstica de 79%), comparada à determinação da concentração total de proteínas, LD, GGT, pH, amilase, triglicerídeos, contagem de leucócitos e exame citológico (Colli, 1986). Em um estudo subsequente, o uso de um *cutoff* de 94,6 μg/mL resultou em 100% de sensibilidade, 95% de especifidade, 93,8% de acurácia positiva, 100% de acurácia negativa e 97,1% de acurácia diagnóstica global para o diagnóstico de ascites malignas (Sood, 1997).

Lactato. O lactato presente no líquido ascítico tem sido aliado à determinação do pH para diferenciar as ascites derivadas de SBP das ascites livres de complicação. Utilizando um *cutoff* de 40 mg/dL (4,44 mmol/L), obtem-se aproximadamente 90% de sensibilidade e especificidade, com um valor preditivo positivo de 62% (Stassen, 1986). Embora não seja tão acurada quanto a contagem de leucócitos, a alta especificidade da medida do lactato para ascites hepáticas sugere que essa técnica tem certo valor no diagnóstico da SBP em casos duvidosos. Ascites malignas e tuberculosas também estão associadas a níveis elevados de lactato.

Pacientes com perfuração de víscera oca, intestino gangrenoso, peritonite ou abscesso intra-abdominal apresentam uma diferença [níveis de lactato do líquido peritoneal menos níveis de lactato no soro] de pelo menos 13,5 mg/dL (1,5 mmol/L). Esse valor permite separar totalmente tais pacientes daqueles que apresentam outras condições produtoras de distúrbios abdominais agudos (DeLaurier, 1994). Estudos adicionais se fazem necessários para determinar a utilidade da quantificação dos níveis de lactato na tomada de decisão para cirurgias.

Creatinina e ureia. A medida da creatinina e do nitrogênio da ureia é útil para diferenciar o líquido peritoneal da urina. Uma alta concentração de nitrogênio ureico e creatinina no líquido peritoneal, associada à elevação dos níveis séricos de ureia e níveis séricos normais de creatinina (devidos à ausência de difusão da ureia), sugere ruptura da bexiga urinária.

Bilirrubina. Foi demonstrado que a média (± DP) da concentração de bilirrubina em vários tipos de ascite é igual a 0,7 (± 0,8) mg/dL, com uma proporção bilirrubina ascítica/sérica de 0,38 (± 0,44) (Runyon, 1987b). Uma concentração de bilirrubina > 6 mg/dL no líquido ascítico e uma proporção bilirrubina ascítica/sérica > 1 sugerem colecistoperitônio decorrente de ruptura da vesícula biliar. Foi defendido que uma proporção de ≥ 0,6 serviria de marcador adicional para processos exsudativos, embora sua acurácia não fosse tão alta quanto a do gradiente de albumina soro-ascite (Elis, 1998).

pH. O pH do líquido ascítico pode ajudar a estabelecer o diagnóstico da SBP em pacientes que apresentam ascite cirrótica, especialmente quando aliado à contagem de leucócitos (Attali, 1986; Stassen, 1986). Um pH < 7,32 ou uma diferença de pH sérico-ascítico > 0,1 foi associado a 90% de sensibilidade e especificidade para SBP, com o diferencial de pH sendo discretamente mais acurado. Contudo, na ausência de neutrófilos, o pH do líquido peritoneal parece não ter utilidade na detecção da SBP (Runyon, 1991). Pacientes cujo pH do líquido ascítico é < 7,15 apresentam mau prognóstico (Attali, 1986). O pH do líquido ascítico também é baixo nos pacientes que apresentam ascites malignas e pancreáticas, bem como na peritonite tuberculosa.

Colesterol. Os níveis de colesterol no líquido ascítico constituem um índice moderadamente útil à separação das ascites malignas (> 45–48 mg/dL) das ascites cirróticas (Mortensen, 1988; Castaldo, 1994). O uso de um *cutoff* de 45 a 48 mg/dL (1,2 mmol/L) permite obter médias de sensibilidade e especificidade acima de 90%. Portanto, na diferenciação das ascites malignas e não malignas, um valor de *cutoff* de 48 mg/dL fornece 96,5% de sensibilidade, 96,6% de especificidade, valor preditivo positivo de 93,3%, valor preditivo negativo de 98,3% e acurácia diagnóstica global de 96,6% (Garg, 1993).

IL-8. A IL-8 é uma citocina produzida por diversas células em resposta a certos estímulos, como o lipopolissacarídeo bacteriano. Os níveis de IL-8 são significativamente maiores na ascite da SBP do que na ascite estéril (Matinez-Bru, 1999). O uso de um *cutoff* de 100 ng/L fornece sensibilidade e especificidade de 100% em casos de pacientes cirróticos.

TSA. Conforme já mencionado na seção "Líquido pleural", o TSA foi detectado no líquido pleural em 75% dos pacientes com tuberculose pulmonar por meio de cromatografia gasosa/espectroscopia de massa (Muranishi, 1990). Utilizando cromatografia gasosa/espectroscopia de massa com ionização química quantitativa, a medida do TSA também constitui uma técnica valiosa para identificação da peritonite tuberculosa, bem como da meningite tuberculosa (líquido espinhal) e da pneumonia (líquido pleural) (Brooks, 1998).

Marcadores tumorais. Em razão dos relatos de baixa sensibilidade e especificidade, a quantificação de marcadores tumorais em geral é considerada pouco importante. Por outro lado, esses marcadores muitas vezes são úteis em casos seletos, como no acompanhamento da resposta do paciente à terapia e na detecção precoce de tumor recorrente. Também podem ser muito úteis nos casos de citologia negativa com forte suspeita de ascite maligna. De fato, a precária sensibilidade dos exames citológicos é decepcionante, apresentando resultados positivos apenas em 40% (35 de 89 pacientes) dos casos de malignidade. A análise de marcadores tumorais, por sua vez, resulta positiva em 80% desses casos (Cascinu, 1997). Além disso, excluindo-se o câncer pulmonar de pequenas células e o câncer renal para os quais faltam marcadores tumores, a análise de marcadores (i. e., CEA, CA 19-9, CA 15-3, PSA) em amostras de líquido ascítico oriundas de outros carcinomas resultou positiva em 97% dos casos. Observou-se que esses marcadores tumorais, e também a α-fetoproteína, são muito específicos (mais de 90%) para malignidades associadas a líquidos serosos, embora apresentem baixa sensibilidade (19–38%) (Sari, 2001). A quantificação de PSA pode igualmente atuar como marcador importante no diagnóstico de efusões malignas derivadas do câncer de próstata (Appalaneni, 2004).

A quantificação de CEA apresenta sensibilidade de 40–50% e especificidade aproximada de 90%, mediante um *cutoff* de 3 ng/mL (Mezger, 1988). O uso de um *cutoff* de 5 mg/mL resulta em uma especificidade em torno de 97% (Gulyas, 2001). Níveis elevados de CEA em lavados peritoneais sugerem um mau prognóstico em casos de carcinoma gástrico (Irinoda, 1998).

Em diversas condições não malignas, os níveis de CA-125 apresentam certo grau de elevação no líquido ascítico. De fato, a doença cardiovascular e a doença hepática crônica podem ser os diagnósticos mais frequentes em casos de pacientes com níveis aumentados desse marcador (Miralles, 2003). Essa possibilidade sustenta a opinião geral de que o CA-125 carece da devida especificidade como marcador de malignidade. Entretanto, a detecção de níveis extremamente altos é mais provavelmente causada pela presença de carcinomas epiteliais ovarianos, das tubas uterinas ou do endométrio.

Quando se trata do carcinoma ovariano, o grau de sensibilidade depende do estágio do tumor (faixa de 40–95%) e do subtipo histológico (adenocarcinomas mucinosos estão associados a valores mais baixos) (Molina, 1998).

A análise da *ploidia do DNA* por citometria de fluxo ou análise de imagens pode fornecer informações diagnósticas complementares em casos de citologia duvidosa, quando as células malignas possuem cariótipo aneuploide. A análise de imagens parece ser mais prática do que a citometria de fluxo diante da escassez de células (Rijken, 1991).

Exame microbiológico

A peritonite primária ocorre em indivíduos de qualquer idade. Em crianças, está associada à síndrome nefrótica e, em adultos, à doença hepática cirrótica. A SBP ocorre em pacientes com ascite e na ausência de causas secundárias conhecidas, tais como perfuração intestinal ou abscesso intra-abdominal. Na SBP, as bactérias mais frequentemente pertencem à flora bacteriana intestinal normal e mais de 92% dos

casos são monomicrobianos. Bacilos Gram-negativos aeróbicos (p. ex., *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*) são responsáveis por ao menos 2/3 de todos os casos (Gilbert, 1995), seguidos por *S. pneumoniae*, *Enterococcus* sp. e, mais raramente, organismos anaeróbios. A coloração de Gram apresenta sensibilidade de 25% para SBP (Lee, 1987), enquanto as culturas resultam positivas apenas em 50% dos casos (Castellote, 1990). A inoculação de garrafas de cultura de sangue na cabeceira e a concentração de grandes volumes de líquido podem melhorar a sensibilidade, contudo, até 35% dos pacientes infectados ainda apresenta resultados negativos em culturas de líquido ascítico (Marshall, 1988).

A contagem total de neutrófilos em amostras de líquido ascítico é o método preferido para o diagnóstico da SBP (ver na seção "Exame microscópico"). Todavia, conforme já mencionado, nos casos difíceis há vários analitos que podem ser úteis para diferenciar a SBP de uma peritonite bacteriana secundária ou tuberculosa. Recentemente, o uso da PCR foi bem-sucedido na detecção de DNA bacteriano em culturas negativas de líquido ascítico (Such, 2002).

A sensibilidade das colorações acidorresistentes para detecção de *M. tuberculosis* não ultrapassa 20 a 30%, enquanto as culturas apresentam sensibilidade de apenas 50 a 70% (Reimer, 1985). A aplicação da PCR para detecção do DNA de *M. tuberculosis* tem sido objeto de estudos, porém um resultado negativo não exclui o diagnóstico (Schwake, 2003). Para casos de paciente com forte suspeita clínica de peritonite tuberculosa, pode ser indicado o exame laparoscópico com biópsia.

Referências selecionadas

Fishman RA: Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1992.

Hasselbacher P: Variation in synovial fluid analysis by hospital laboratories. Arthritis Rheumatism 1987; 30:637.

Kjeldsberg CR, Knight JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous, and Synovial Fluids, 3rd ed. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, IL, 1993.

Light RW: Pleural effusions. N Engl J Med 2002; 346:1971.

Runyon BA, Montano AA, Evangelos A, et al: The serum–ascites albumin gradient is superior to the exudate–transudate concept in the differential diagnosis of ascites. Ann Intern Med 1992; 117:215.

Referências bibliográficas

Abramson JS, Hampton KD, Babu S, et al: The use of C-reactive protein from cerebrospinal fluid for differentiating meningitis from other central nervous system diseases. J Infect Dis 1985; 151:854.

Achar VS, Welch KM, Chabi, et al: Cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid in neurologic disease. Neurology 1976; 26:777.

Adelman M, Albelda S, Gottlieb J, et al: Diagnostic utility of pleural fluid eosinophilia. Am J Med 1984; 77:915.

Agner RC, Gallis HA: Pericarditis. Differential diagnosis considerations. Arch Intern Med 1979; 139:407.

Ahonen A, Myllyla W, Hokkanen E: Measurement of reference values for certain proteins in cerebrospinal fluid. Acta Neurol Scand 1978; 57:358.

Akriviadis EA, Kapnias D, Hadjigavriel M, et al: Serum/ascites albumin gradient: its value as a rational approach to the differential diagnosis of ascites. Scand J Gastroenterol 1996; 31:814.

Albillos A, Cuervas-Mons V, Millan L, et al: Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. Gastroenterology 1990; 98:134.

Albright RE, Christenson RH, Habig RL, et al: Cerebrospinal fluid (CSF) TRAP: A method to improve CSF laboratory efficiency. Am J Clin Pathol 1988; 90:707.

Alverdy JC, Saunders J, Chamberlin WH, et al: Diagnostic peritoneal lavage in intra-abdominal sepsis. Am Surg 1988; 54:456.

American College of Physicians: The diagnostic spinal tap. Ann Intern Med 1986; 104:880.

Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, et al: Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57:897.

Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, et al: Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. Arch Neurol 2001; 58:373.

Appalaneni V, Yellinedi S, Baumann MA: Diagnosis of malignant ascites in prostate cancer by measurement of prostate specific antigen. Am J Med Sci 2004; 327:262.

Arevalo CE, Barnes PF, Duda M, Leedom JM: Cerebrospinal fluid cell counts and chemistries in bacterial meningitis. South Med J 1989; 82:1122.

Ashchi M, Golish J, Eng P, et al: Transudative malignant pleural effusions: Prevalence and mechanisms. South Med J 1998; 91:23.

Assi Z, Caruso JL, Herndon J, Patz EF Jr: Cytologically proved malignant pleural effusions: Distribution of transudates and exudates. Chest 1998; 113:1302.

Attali P, Turner K, Pelleteir G, et al: pH of ascitic fluid: Diagnostic and prognostic value in cirrhotic and non-cirrhotic patients. Gastroenterology 1986; 90:1255.

Baer KE, Smith GP: Serous body cavity fluid examination. Lab Med 2001; 32:85.

Baethgen LF, Moraes C, Weidlich L, et al: Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: Standardization and adaptation for use in a public health laboratory. J Med Microbiol 2003; 52:793.

Bailey EM, Domenico P, Cunha BA: Bacterial or viral meningitis? Measuring lactate in CSF can help you know quickly. Postgrad Med 1990; 88:217.

Baker DG: Chemistry, serology and immunology. In Gatter RA, Schumacher HR (eds): A Practical Handbook of Joint Fluid Analysis, 2nd ed. Philadelphia, Lea & Febiger 1991, p 70.

Bansal S, Kaur K, Bansal AK: Diagnosing ascitic etiology on a biochemical basis. Hepatogastroenterology 1998; 45:1673.

Batabyal SK, Ghosh B, Sengupta S, et al: Cerebrospinal fluid and serum carcinoembryonic antigen in brain tumors. Neoplasma 2003; 50:377.

Bellinger RL, Vacek JL: A review of pericarditis. 2. Specific pericardial disorders. Postgrad Med 1987; 82:105.

Bellows CF, Salomone JP, Nakamura SK, et al: What's black and white and red (read) all over? The bedside interpretation of diagnostic peritoneal lavage fluid. Am Surg 1998; 64:112.

Benson RL, Ansbacher L, Hutchison RE, et al: Cerebrospinal fluid centrifuge analysis in primary amebic meningoencephalitis due to Naegleria fowleri. Arch Pathol Lab Med 1985; 109:668.

Berger T, Rubner P, Schautzer F, et al: Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. N Engl J Med 2003; 349:139.

Berthier M, Bonneau D, Desbordes JM, et al: Possible involvement of a gamma-hydroxybutyric acid receptor in startle disease. Acta Paediatr 1994; 83:678.

Beutler AM, Keenan GE, Soloway S, et al: Soluble urate in sera and synovial fluids from patients with different joint disorders. Clin Exp Rheumatol 1996; 14:249.

Bigner SH: Cerebrospinal fluid (CSF) cytology: Current status and diagnostic applications. J Neuropathol Exp Neurol 1992; 51:235.

Biou D, Benoist J-F, Huong CN-TX, et al: Cerebrospinal fluid protein concentrations in children: Age-related values in patients without disorders of the central nervous system. Clin Chem 2000; 46:399.

Blake J, Berman P: The use of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculosis. S Afr Med J 1982; 62:19.

Body BA, Oneson RH, Herold DA: Use of cerebrospinal fluid lactic acid concentration in the diagnosis of fungal meningitis. Ann Clin Lab Sci 1987; 17:429.

Bonadio WA, Smith DS, Goddard S, et al: Distinguishing cerebrospinal fluid abnormalities in children with bacterial meningitis and traumatic lumbar puncture. J Infect Dis 1990; 162:251.

Borenstein DG, Gibbs CA, Jacobs RP: Gas-liquid chromatographic analysis of synovial fluid. Arthritis Rheum 1982; 25:947.

Boyer TD, Kahn AM, Telfer BR: Diagnostic value of ascitic fluid lactic dehydrogenase, protein, and WBC levels. Arch Intern Med 1978; 138:1103.

Breebaart K, Becker H, Jongebloed FA: Investigation of reference values of components of cerebrospinal fluid. J Clin Chem Clin Biochem 1978; 16:561.

Britton C, Hultman E, Murray V, et al: The diagnostic accuracy of CSF analyses in stroke. Acta Med Scand 1983; 214:3.

Brook I: Pericarditis due to anaerobic bacteria. Cardiology 2002; 97:55.

Brook I, Reza MJ, Bricknell SK, et al: Abnormalities in synovial fluid of patients with septic arthritis detected by gas-liquid chromatography. Ann Rheum Dis 1980; 39:168.

Brooks BR: Nonimmunoglobulin proteins in human cerebrospinal fluid. In Herndon RM, Brumback RA (eds): Cerebrospinal Fluid. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1989, p 167.

Brooks JB, Syriopoulou V, Butler WR, et al: Development of a quantitative chemical ionization gas chromatography–mass spectrometry method to detect tuberculostearic acid in body fluids. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 712:1.

Brown KD, An ND: Tuberculous peritonitis. Am J Gastroenterol 1976; 66:277.

Burgess LJ, Maritz FJ, Taljaard JJ: Comparative analysis of the biochemical parameters used to distinguish between pleural transudates and exudates. Chest 1995; 107:1604.

Burgess LJ, Maritz FJ, LeRoux I, Taljaard JJ. Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio. Increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis. Chest 1996; 109:414.

Burgess LJ, Swanepoel CG, Taljaard JJ: The use of adenosine deaminase as a diagnostic tool for peritoneal tuberculosis. Tuberculosis 2001; 8:243.

Burgess LJ, Reuter H, Taljaard JJ, Doubell AF: Role of biochemical tests in the diagnosis of large pericardial effusions. Chest 2002a; 121,495.

Burgess LJ, Reuter H, Carstens ME, et al: The use of adenosine deaminase and interferon-gamma as diagnostic tools for tuberculous pericarditis. Chest 2002b; 122:900.

Cameron PD, Boyce JM, Ansari BM: Cerebrospinal fluid lactate in meningitis and meningococcaemia. J Infect 1993; 26:245.

Cascinu S, Del Ferro E, Barbanti I, et al: Tumor markers in the diagnosis of malignant serous effusions. Am J Clin Oncol 1997; 20:247.

Castaldo G, Oriani G, Cimino L, et al: Total discrimination of peritoneal malignant ascites from cirrhosis and heptocarcinoma-associated ascites by assays of ascitic cholesterol and lactate dehydrogenase. Clin Chem 1994; 40:478.

Castano VJL, Amores AC: Use of pleural fluid C-reactive protein in laboratory diagnosis of pleural effusions. Eur J Med 1992; 1:201.

Castellote J, Xiol X, Verdaguer R, et al: Comparison of two ascitic fluid culture methods in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. Am J Gastroenterol 1990; 85:1605.

Cavuoti D, Baskin L, Jialal I: Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by immunofixation electro-

phoresis. Am J Clin Pathol 1998; 109:585.

Cawley LP, Minard BJ, Tourtellotte WW, et al: Immunofixation electrophoresis techniques applied to identification of proteins in serum and cerebrospinal fluid. Clin Chem 1976; 22:1262.

Chalmers AC, Aprill BS, Shephard H: Cerebrospinal fluid and human immuno-deficiency virus: Findings in healthy, asymptomatic, seropositive men. Arch Intern Med 1990; 150:1538.

Chan MHM, Chow KM, Chan ATC, et al. Quantitative analysis of pleural fluid cell-free DNA as a tool for the classification of pleural effusions. Clin Chem 2003; 49:740.

Chandler WL, Clayson KJ, Longstreth WT Jr, et al: Creatine kinase isoenzymes in human cerebrospinal fluid and brain. Clin Chem 1984; 30:1801.

Chandler WL, Clayson KJ, Longstreth WT Jr, et al: Mitochondrial and BB isoenzymes of creatine kinase in cerebrospinal fluid from patients with hypoxic-ischemic brain damage. Am J Clin Pathol 1986; 86:533.

Chen Y, Brennessel D, Walters J, et al: Human immunodeficiency virus-associated pericardial effusions: Report of 40 cases and review of the literature. Am Heart J 1999; 137:516.

Chin NW, Sinay LJ, Taylor J, et al: Metastatic prostate cancer presenting as pleural and pericardial effusions. Fed Pract 1999; 16:19.

Choi SH, Kim YS, Bae IG, et al. The possible role of cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity in the diagnosis of tuberculous meningitis in adults. Clin Neurol Neurosurg 2002; 104:10.

Clayburne G, Baker DG, Schumacher HR: Estimated synovial fluid leukocyte numbers on wet drop preparations as a potential substitute for actual leukocyte counts. J Rheumatol 1992; 19:60.

College of American Pathologists: Cerebrospinal Fluid Survey M-B: Participant Summary Report. Northfield, IL: College of American Pathologists, 2002.

Colli A, Buccino G, Cocciolo M, et al: Diagnostic accuracy of fibronectin in the differential diagnosis of ascites. Cancer 1986; 58:2489.

Conly JM, Ronald AR: Cerebrospinal fluid as a diagnostic body fluid. Am J Med 1983; 75:102.

Cooper SJ, Kelly CB, King DJ: 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid and prediction of suicidal behaviour in schizophrenia. Lancet 1992; 340:940.

Coplin WM, Longstreth WT Jr, Lam AM, et al: Cerebrospinal fluid creatine kinase-BB isoenzyme activity and outcome after subarachnoid hemorrhage. Arch Neurol 1999; 56:1348.

Corral CJ, Pepple JM, Moxon ER, Hughes WT: C-reactive protein in spinal fluid of children with meningitis. J Pediatr 1981; 99:365.

Corral I, Quereda C, Navas E, et al: Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of HIV-infected patients: Limited value for diagnosis of tuberculous meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:471.

Costa M, Quiroga T, Cruz E. Measurement of pleural fluid cholesterol and lactate dehydrogenase. A simple and accurate set of indicators for separating exudates from transudates. Chest 1995; 108:1260.

Curtis GDW, Newman RJ, Slack MPE: Synovial fluid lactate and the diagnosis of septic arthritis. J Infect 1983; 6:239.

Davis LE, Schmitt JW: Clinical significance of cerebrospinal fluid tests for neurosyphilis. Ann Neurol 1989; 25:50.

Davis MJ, Denton J, Freemont AJ, Holt PJ: Comparison of serial synovial fluid cytology in rheumatoid arthritis: Delineation of subgroups with prognostic implications. Ann Rheum Dis 1988; 47:559.

DeLaurier GA, Ivey RK, Johnson RH: Peritoneal fluid lactate and diagnostic dilemmas in acute abdominal disease. Am J Surg 1994; 167:302.

Desai MM, Pal RB: Polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Indian J Med Sci 2002; 56:546.

DeSalles AAF, Kontos HA, Becker DP, et al: Prognostic significance of ventricular CSF lactic acidosis in severe head injury. J Neurosurg 1986; 65:615.

Donald PR, Malan C: Cerebrospinal fluid lactate and lactate dehydrogenase activity in the rapid diagnosis of bacterial meningitis. S Afr Med J 1986; 69:39.

dos Santos JGN: Fetal primary amebic meningoencephalitis: A retrospective study in Richmond, Virginia. Am J Clin Pathol 1970; 54:737.

Dubowitz LM, Bouza H, Hird MF, Jaeken J: Low cerebrospinal fluid concentration of free gamma-aminobutyric acid in startle disease. Lancet 1992; 340:80.

Dumler JS, Valsamakis A: Molecular diagnosis for existing and emerging infections. Complementary tools for a new era of clinical microbiology. Am J Clin Pathol 1999; 112:533.

Dwivedi M, Misra SP, Misra V, Kamar R: Value of adenosine deaminase estimation in the diagnosis of tuberculous ascites. Am J Gastroenterol 1990; 85:1123.

Elis A, Meisel S, Tishler T, et al: Ascitic fluid serum bilirubin concentration ratio for the classification of transudates or exudates. Am J Gastroenterol 1998; 93:401.

Engelke S, Bridgers S, Saldanha RL, et al: Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase in neonatal intracranial hemorrhage. Am J Med Sci 1986; 291:391.

Ettlinger RE, Hunder GC: Synovial effusions containing cholesterol crystals. Mayo Clin Proc 1979; 54:366.

Exner MM, Lewinski MA: Isolation and detection of Borrelia burgdorferi DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 2003;46:235.

Fam AG, Pritzker KP, Cheng PT, Little AH: Cholesterol crystals in osteoarthritic joint effusions. J Rheumatol 1981; 8:273.

Fang J-F, Chen R-J, Lin B-C: Cell count ratio: New criterion of diagnostic peritoneal lavage for detection of hollow organ perforation. J Trauma 1998; 45:540.

Ferrer A, Osset J, Alegre J, et al: Prospective clinical and microbiological study of pleural effusions. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18:237.

Finn WG, Peterson LC, James C, et al: Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. Am J Clin Pathol 1998; 110:341.

Fishman RA: Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1992.

Fleisher M, Wasserstrom WRT, Schold SC, et al: Lactic dehydrogenase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with systemic cancer. Cancer 1981; 47:2654.

Flood J, Weinstock HS, Guroy M, et al: Neurosyphilis during the AIDS epidemic, San Francisco, 1985–1992. J Infect Dis 1998; 177:931.

Florez G, Cabeza A, Gonzalez JM, et al: Changes in serum and cerebrospinal fluid enzyme activity after head injury. Acta Neurochir 1976; 35:3.

Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmann JA: Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Am J Clin Pathol 2003; 120:672.

Gallo P, Tavolato B, Bergenbrant S, Siden A: Immunoglobulin light chain patterns in the cerebrospinal fluid: A study with special reference to the occurrence of free light chains in cerebrospinal fluid with and without oligoclonal immunoglobulin G. J Neurol Sci 1989; 94:241.

Garcia-Pachon E, Padilla-Navas I, Dosda ME, et al: Elevated level of carcinoembryonic antigen in nonmalignant pleural effusions. Chest 1997; 111:643.

Garg R, Sood A, Arora S, et al: Ascitic fluid cholesterol in differential diagnosis of ascites. J Assoc Physicians India 1993; 41:644.

Gastrin B, Lovestad A: Diagnostic significance of pleural fluid lactate concentration in pleural and pulmonary disease. Scand J Infect Dis 1988; 20:85:.

Gatter RA, Schumacher HR: A Practical Handbook of Joint Fluid Analysis, 2nd ed. Philadelphia, Lee & Febiger, 1991.

Gazquez I, Porcel JM, Vives M, et al. Comparative analysis of Light's criteria and other biochemical parameters for distinguishing transudates from exudates. Resp Med 1998; 92:762.

Gerbaut L, Macart M: Is standardization more important than methodology for assay of total protein in cerebrospinal fluid? Clin Chem 1986; 32:353.

Gerbes AL, Jungst D, Xie Y, et al: Ascitic fluid analysis for the differentiation of malignancy-related and nonmalignant ascites. Cancer 1991; 68:1808.

Gerdes LU, Jorgensen PE, Nexo E, Wang P: C-reactive protein and bacterial meningitis: a meta-analysis. Scand J Clin Lab Invest 1998; 58:383.

Gilbert JA, Kamath PS: Spontaneous bacterial peritonitis: An update. Mayo Clin Proc 1995; 70:365.

Gilchrist GS, Tubergen DG, Sather HN, et al: Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia. A Childrens Cancer Group report. J Clin Oncol 1994; 12:2594.

Goldenberg DL, Reed JL: Bacterial arthritis. N Engl J Med 764; 1985; 312:.

Golightly MG: Laboratory considerations in the diagnosis and management of lyme borreliosis. Am J Clin Pathol 1993; 99:168.

Good JT, Taryle DA, Maulitz RM, et al: The diagnostic value of pleural fluid pH. Chest 1980; 78:55.

Good JT, King TE, Antony VB, et al: Lupus pleuritis. Chest 1983; 84:714.

Graves M: Cerebrospinal fluid infections. In Herndon RM, Brumback RA (eds): The Cerebrospinal Fluid. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1989, p 143.

Greenlee JE: Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid examination. Infect Dis Clin North Am 1990; 4:583.

Gulyas M, Kaposi AD, Elek G, et al: Value of carcinoembryonic antigen (CEA) and cholesterol assays of ascitic fluid in cases of inconclusive cytology. J Clin Pathol 2001; 54:831.

Hall CD, Snyder CR, Robertson KR, et al: Cerebrospinal fluid analysis in human immunodeficiency virus infection. Ann Clin Lab Sci 1992; 22:139.

Halla JT, Schrohenloher RE, Volankis JE: Immune complexes and other laboratory features of pleural effusions. Ann Intern Med 1980; 92:748.

Halperin R, Hadas E, Bukovsky I, Schneider D: Peritoneal fluid analysis in the differentiation of ovarian cancer and benign ovarian tumor. Eur J Gynecol Oncol 1999; 20:40.

Harrington MG, Merrill CR, Asher DM, et al: Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt–Jacob disease. N Engl J Med 1986; 315:279.

Hasselbacher P: Variation in synovial fluid analysis by hospital laboratories. Arthritis Rheum 1987; 30:637.

Hausfater P, Fillet AM, Rozenberg F, et al: Prevalence of viral infection markers by polymerase chain reaction amplification and interferon-alpha measurements among patients undergoing lumbar puncture in an emergency department. J Med Virol 2004; 73:137.

Hayward RA, Oye RK: Are polymorphonuclear leukocytes an abnormal finding in cerebrospinal fluid? Results from 225 normal cerebrospinal fluid specimens. Arch Intern Med 1988; 148:1623.

Hayward RA, Shapiro MF, Oye RK: Laboratory testing on cerebrospinal fluid: A reappraisal. Lancet 1987; 1:8523.

Heffner JE, Brown LK, Barbieri C, DeLeo JM.: Pleural fluid chemical analysis in parapneumonic effusions. A meta-analysis. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151:1700.

Heffner JE, Brown LK, Barbieri CA: Diagnostic value of tests that discriminate between exudative and transudative pleural effusions. Primary Study Investigators. Chest 1997; 111:970.

Herndon RM, Brumback RA (eds): The Cerebrospinal Fluid. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1989.

Hersey LA, Trotter JL: The use and abuse of the cerebrospinal fluid IgG profile in the adult: A practical evaluation. Ann Neurol 1980; 8:126.

Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, et al: The 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med 1996; 335:924.

Hunder GG, Pierre RV: In vivo LE cell formation in synovial fluid. Arthritis Rheum 1970; 13:448.

Hunder GG, McDuffie FC, Hepper NGG: Pleural fluid complement activity in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Ann Intern Med 1972; 76:357.

Ibrahim RE, Teich D, Smith ER, et al: Flow cytometric surface light chain analysis of lymphocyte-rich effusions. Cancer 1989; 63:2024.

Irinoda T, Terashima M, Takagane A, et al: Carcinoembryonic antigen level in peritoneal washing is prognostic factor in patients with gastric cancer. Oncol Rep 1998; 5:661.

Irjala K, Suorpaa J, Laurent B: Identification of CSF leakage by immunofixation. Arch Otolaryngol 1979; 105:447.

Jacques J, Carquin J, Brodard V, et al: New reverse transcription-PCR assay for rapid and sensitive detection of enterovirus genomes in cerebrospinal fluid specimens of

patients with aseptic meningitis. J Clin Microbiol 2003; 41:5726.
Jaffin JH, Ochsner MG, Cole FJ, et al: Alkaline phosphatase levels in diagnostic peritoneal lavage as a predictor of hollow visceral injury. J Trauma 1993; 34:829.
Jay SJ: Pleural effusions. II: Definitive evaluation of the exudate. Postgrad Med 1986; 80:181.
Jeffrey GM, Frampton CM, Legge HM, et al: Cerebrospinal fluid β_2-microglobulin levels in meningeal involvement by malignancy. Pathology 1990; 22:20.
Johnson KP, Nelson BJ: Multiple sclerosis: diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid. Ann Neurol 1977; 2:425.
Jonasson JG, Ducatman BS, Wang HH: The cell block for body cavity fluids: Do the results justify the cost? Mod Pathol 1990; 3:667.
Jones AC, Chuck AJ, Arie EA, et al: Diseases associated with calcium pyrophosphate deposition disease. Semin Arthritis Rheum 1992; 22:188.
Judkins SW, Cornbleet PJ: Synovial fluid crystal analysis. Lab Med 1997; 28:774.
Kanoh Y, Ohtani H: Levels of interleukin-6, CRP and alpha 2 macroglobulin in cerebrospinal fluid (CSF) and serum as indicators of blood–CSF barrier damage. Biochem Mol Biol Int 1997; 43:269.
Kares S, Lonnrot M, Vuorinen P, et al: Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using LightCycler. J Clin Virol 2004; 29:99.
Karkela J, Pasanen M, Kaukinen S, et al: Evaluation of hypoxic brain injury with spinal fluid enzymes, lactate, and pyruvate. Crit Care Med 1992; 20:378.
Kashyap RS, Kainthla RP, Biswas SK, et al: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis using simple DOT ELISA method. Med Sci Monit 2003; 9:123.
Kasper LM, Moorehead WR, Oel TO, et al: An alternative method assaying cerebrospinal fluid protein in the presence of methotrexate. Clin Chem 1988; 34:2091.
Kawai M, Hirohata S: Cerebrospinal fluid beta(2)-microglobulin in neuro-Behçet's syndrome. J Neurol Sci 2000; 179:132.
Kay J, Eichenfield AH, Athreya BH, et al: Synovial fluid eosinophilia in Lyme disease. Arthritis Rheum 1988; 31:1384.
Kendall B, Dunn C, Solanki P. A comparison of the effectiveness of malignancy detection in body fluid examination by the cytopathology and hematology laboratories. Arch Pathol Lab Med 1997; 121:976.
Kim S, Sahn SA: Postcardiac injury syndrome. An immunologic pleural fluid analysis. Chest 1996; 109:570.
Kindig JR, Goodman MR: Clinical utility of pericardial fluid pH determination. Am J Med 1983; 75:1077.
Kjeldsberg CR, Knight JA: Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids. 3rd ed. Chicago, American Society of Clinical Pathologists Press, 1993.
Klee GG, Tallman RD, Goellner JR, et al: Elevation of carcinoembryonic antigen in cerebrospinal fluid among patients with meningeal carcinomatosis. Mayo Clin Proc 1986; 61:9.
Knight JA, Dudek SM, Haymond RE: Early (chemical) diagnosis of bacterial meningitis – cerebrospinal fluid glucose, lactate, and lactate dehydrogenase compared. Clin Chem 1981; 27:1431.
Koh KK, Kim EJ, Cho CH, et al: Adenosine deaminase and carcinoembryonic antigen in pericardial effusion diagnosis, especially in suspected tuberculous pericarditis. Circulation 1994; 89:2728.
Kosches DS, Sosnowik D, Lendvai S, et al: Unusual anodic migrating isoamylase differentiates selected malignant from nonmalignant ascites. J Clin Gastroenterol 1989; 11:43.
Kramer MR, Saldana MJ, Cepero RJ, et al: High amylase levels in neoplasm-related pleural effusion. Ann Intern Med 1989; 110:567.
Kuberski T: Eosinophils in cerebrospinal fluid: Criteria for eosinophilic meningitis. Hawaii Med J 1981; 40:97.
Lakeman FD, Whitley RJ: Diagnosis of herpes simplex encephalitis: Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. J Infect Dis 1995; 171:857.
Lampl Y, Paniri Y, Eshel Y, et al: Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase levels in early stroke and transient ischemic attacks. Stroke 1990; 21:854.
Lang DT, Berberian LB, Lee S, et al: Rapid differentiation of subarachnoid hemorrhage from traumatic lumbar puncture using the D-dimer assay. Am J Clin Pathol 1990; 91:403.
Larson FA, Haller CC, Delcore R, Thomas JH. Diagnostic peritoneal lavage in acute peritonitis. Am J Surgery 1992; 164:449..
Lazcano O, Li CY, Pierre RV, et al: Clinical utility of the Alizarin Red S stain on permanent preparations to detect calcium-containing compounds in synovial fluid. Am J Clin Pathol 1993; 99:90.
Lee HH, Carlson RW, Bull DM: Early diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. Values of ascitic fluid variables. Infection 1987; 15:232.
Lee J-H, Lee CW, Lee S-G, et al: Comparison of polymerase chain reaction with adenosine deaminase activity in pericardial fluid for the diagnosis of tuberculous pericarditis. Am J Med 2002; 113:519.
Lee YCG, Rogers JT, Rodriguez RM, et al: Adenosine deaminase levels in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. Chest 2001; 120:356.
Lefvert AK, Link H: IgG production within the central nervous system: A critical review of proposed formulae. Ann Neurol 1985; 17:13.
Lemstra AW, van Meegen MT, Vreyling JP, et al: 14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt–Jakob disease: A prospective study in 112 patients. Neurol 2000; 55:514.
Leventhal LJ, DeMarco DM, Zurier RB: Antinuclear antibody in pericardial fluid from a patient with primary cardiac lymphoma. Arch Intern Med 1990; 150:1113.
Levine H, Szanto M, Grieble HG, et al: Rheumatoid factor in nonrheumatoid pleural effusions. Ann Intern Med 1968; 69:487.
Li F, Bulbul R, Schumacher HRJ, et al: Molecular detection of bacterial DNA in venereal-associated arthritis. Arthritis Rheum 1996; 39:950.
Light RW: Pleural Diseases, 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1995.
Light RW: Diagnostic principles in pleural disease. Eur Respir J 1997; 10:476.
Light RW: Pleural effusion. N Engl J Med 2002; 346:1971.
Light RW, Ball WC Jr: Glucose and amylase in pleural effusions. JAMA 1973; 225:257.
Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, et al: Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med 1972; 77:507.
Lin JJ, Harn HJ, Hsu YD, et al: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. J Neurol 1995; 242:147.
Lolli F, Siracusa G, Amato MP, et al: Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains and IgM in initial multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1991; 83:239.
Lossos IS, Breuer R, Intrator O, et al: Differential diagnosis of pleural effusion by lactate dehydrogenase isoenzyme analysis. Chest 1997; 111:648.
Lott JA, Warren P: Estimation of reference intervals for total protein in cerebrospinal fluid. Clin Chem 1989; 35:1766.
Luna A, Villanueva E, Castellano M, Jimenez G: The determination of CK, LDH and its isoenzymes in pericardial fluid and its application to the post-mortem diagnosis of myocardial infarction. Forensic Sci Int 1982; 19:85.
Lunding J, Midgard R, Vedeler CA: Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: A comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. Acta Neurol Scand 2000; 102:322.
Luukkainen R, Kaarela K, Huhtala H, et al: Prognostic significance of synovial fluid analysis in rheumatoid arthritis. Ann Med 1989; 21:269.
Luxton RW, Patel P, Keir G, et al: A micro-method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microliter plate wells. Clin Chem 1989; 35:1731.
Maas JW, Bowden CL, Miller AL, et al: Schizophrenia, pyschosis, and cerebrospinal fluid homovanillic acid concentrations. Schizophr Bull 1997; 23:147.
McAnena OJ, Marx JA, Moore EE: Peritoneal lavage enzyme determinations following blunt and penetrating abdominal trauma. J Trauma 1991; 31:1161.
McCarty DJ: Crystal identification in human synovial fluids. Rheum Disease Clin North Am 1988; 14:253.
McGill NW, York H. Reproducibility of synovial fluid examination for crystals. Aust NZ J Med 1991; 34:710.
McGuinness GA, Weisz SC, Bell WE: CSF lactate levels in neonates. Am J Dis Child 1983; 137:48.
Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, et al: Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to β-amyloid peptide42. Arch Neurol 2003; 60:1202.
Mahoney DH Jr., Fernbach DJ, Glaze DG, et al: Elevated myelin basic protein levels in cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1984; 2:58.
Mann AD, Millen JE, Glauser FL: Bloody pericardial fluid. The value of blood gas measurements. JAMA 1978; 239:2151.
Mann AD, Macfarlane CM, Verburg CJ, et al: The bromide partition test and CSF adenosine deaminase activity in the diagnosis of tuberculous meningitis in children. S Afr Med J 1982; 62:432.
Markowitz H, Kokmen E: Neurologic diseases and the cerebrospinal fluid immunoglobulin profile. Mayo Clin Proc 1983; 58:273.
Marshall JB: Finding the cause of ascites. The importance of accurate fluid analysis. Postgrad Med 1988; 83:189.
Martinez-Bru C, Gomez C, Cortes M, et al: Ascitic fluid interleukin-8 to distinguish spontaneous bacterial peritonitis and sterile ascites in cirrhotic patients. Clin Chem 1999; 45:2027.
Marton KI, Gean AD: The spinal tap: A new look at an old test. Ann Intern Med 1986; 104:840.
Mayefsky JH, Roughmann KJ: Determination of leukocytosis in traumatic spinal tap specimens. Am J Med 1987; 82:1175.
Melsom RD: Diagnostic reliability of pleural fluid protein estimation. J Royal Soc Med 1979; 72:823.
Mezger J, Permanetter W, Gerbes AL, et al: Tumour associated antigens in diagnosis of serous effusions. J Clin Pathol 1988; 41:633.
Meucci G, Rossi G, Bertini R, et al: Laser nephelometric evaluation of albumin, IgG and alpha2-macroglobulin: Applications to the study of alterations of the blood–brain barrier. J Neurol Sci 1993; 118:73.
Meyers DG, Meyers RE, Prendergast TW: The usefulness of diagnostic tests on pericardial fluid. Chest 1997; 111:1213.
Miller KS, Wooten S, Sahn SA: Urinothorax: A cause of low pH transudative pleural effusions. Am J Med 1988; 85:448.
Miralles C, Orea M, Espana P, et al: Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. Ann Surg Oncol 2003; 10:150.
Mishra OP, Batra P, Ali Z, et al: Cerebrospinal fluid lysozyme level for the diagnosis of tuberculous meningitis in children. J Trop Pediatr 2003; 49:13.
Mizock BA, Rackow EC, Burke GS: Elevated cerebrospinal fluid glutamine in septic encephalopathy. J Clin Gastroenterol 1989; 11:362.
Molina R, Filella X, Jo J, et al: CA 125 in biological fluids. Int J Biol Markers 1998; 13:224.
Morbidity and Mortality Weekly Report: Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity – United States, 2003. JAMA 2003; 290:1444.
Mortensen PB, Kristensen SD, Bloch A, et al: Diagnostic value of ascitic fluid cholesterol levels in the prediction of malignancy. Scand J Gastroenterol 1988; 23:1085.
Montine TJ, Beal MF, Cudkowicz ME, et al: Increased cerebrospinal fluid F2-isoprostane concentration in probable Alzheimer's disease. Neurology 1999; 52:562.
Montine TJ, Kaye JA, Montine KS, et al: Cerebrospinal fluid Abeta42, tau, and F2-isoprostane concentrations in patients with Alzheimer disease, other dementias, and in age-matched controls. Arch Pathol Lab Med 2001; 125:510.
Moosa AA, Quortum HA, Ibrahim MD: Rapid diagnosis of bacterial meningitis with reagent strips. Lancet 1995; 345:1290.
Muranishi H, Nakashima M, Isobe R, et al: Measurement of tuberculostearic acid in sputa, pleural effusions, and bronchial washings. A clinical evaluation for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 1990; 13:235.
Nocton JJ, Dressler F, Rutledge RJ, et al: Detection of

Borrelia burgdorferi DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with lyme arthritis. N Engl J Med 1994; 330:229.

Normansell DE, Stacy EK, Booker CF, et al: Detection of beta-2-transferrin in otorrhea and rhinorrhea in a routine clinical laboratory setting. Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1:68.

Noseworthy TW, Anderson BJ, Noseworthy AF, et al: Cerebrospinal fluid myelin basic protein as a prognostic marker in patients with head injury. Crit Care Med 1985; 13:743.

Nussinovitch M, Harel D, Eidlitz-Markus T, et al: Lactic dehydrogenase isoenzyme in cerebrospinal fluid of children with infantile spasms. Eur Neurol 2003a; 49:231.

Nussinovitch M, Avitzur Y, Finkelstein Y, et al: Lactic dehydrogenase isoenzyme in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. Acta Paediatr 2003b; 92:186.

Oda K, Egawa H, Okuhara T, et al: Meningeal involvement in Bence Jones multiple myeloma. Cancer 1991; 67:1900.

Odom LF, Wilson H, Cullen J, et al: Significance of blasts in low-cell count cerebrospinal fluid specimens from children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer 1990; 66:1748.

Olsson JE, Pettersson BL: A comparison between agar gel electrophoresis and CSF serum quotients of IgG and albumin in neurological disease. Acta Neurol Scand 1976; 53:308.

Otomo Y, Henmi H, Mashiko K, et al: New diagnostic peritoneal lavage criteria for diagnosis of intestinal injury. J Trauma 1998; 44:991.

Pal B, Nash J, Oppenheim B, et al: Is routine synovial fluid analysis necessary? Lessons and recommendations from an audit. Rheumatol Int 1999; 18:181.

Pappu ID, Purolit DM, Levkoff AH: CSF cytology in the neonate. Am J Dis Child 1982; 136:297.

Paramothayan NS, Barron J: New criteria for the differentiation between transudates and exudates. J Clin Pathol 2002; 55:69.

Peacock JEJ, McGinnis MR, Cohen MS: Persistent neutrophilic meningitis: Report of four cases and review of the literature. Medicine 1984; 63:379.

Perez-Carceles MD, Noguera J, Jimenez JL, et al: Diagnostic efficacy of biochemical markers in diagnosis postmortem of ischaemic heart disease. Forensic Sci Int 2004; 142:1.

Perkins MD, Mirrett S, Reller LB: Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J Clin Microbiol 1995; 33:1486.

Peterman TA, Speicher CE: Evaluating pleural effusions: A two-stage laboratory approach. JAMA 1984; 252:1051.

Pettersson T, Klockars M, Weber TH, et al: Diagnostic value of cerebrospinal fluid adenosine deaminase determination. Scand J Infect Dis 1991; 23:97.

Podell TE, Ault M, Sullam P, et al: Synovial fluid eosinophilia. Arthritis Rheum 1980; 23:1060.

Polak M, Torres Da Costa AC: Diagnostic value of the estimation of glucose in ascitic fluid. Digestion 1973; 8:347.

Porritt RJ, Mercer JL, Munro R: Detection and serogroup determination of Neisseria meningitidis in CSF by polymerase chain reaction (PCR). Pathology 2000; 32:42.

Powers W: Cerebrospinal fluid lymphocytosis in acute bacterial meningitis. Am J Med 1985; 79:216.

Pratico D, Lee VM, Trojanowski JQ, et al: Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: Evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. FASEB J 1998; 12:1777.

Rabinovitch A, Cornbleet PJ: Body fluid microscopy in US laboratories. Data from two College of American Pathologists surveys, with practice recommendations. Arch Pathol Lab Med 1994; 118:13.

Ragland SA, Arsura E, Ismail Y, et al: Eosinophilic pleocytosis in coccidioidal meningitis: Frequency and significance. Am J Med 1993; 95:254.

Rajantie J, Koskiniemi M, Siimes MA, et al: CSF fibronectin concentration in Burkitt's lymphoma: An early marker for CNS involvement. Eur J Haematol 1989; 42:313.

Rajo MC, Perez Del Molina ML, Lado Lado FL, et al: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by ligase chain reaction amplification. Scand J Infect Dis 2002; 34:14.

Rajs G, Finzi-Yeheskel Z, Rajs A, Mayer M: C-reactive protein concentrations in cerebral spinal fluid in gram-positive and gram-negative bacterial meningitis. Clin Chem 2002; 48:591.

Ramers C, Billman G, Hartin M, et al: Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. JAMA 2000; 283:2680.

Rautonen J, Koskiniemi M, Siimes MA, et al: Elevated cerebrospinal fluid fibronectin concentration indicates poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Int J Cancer 1989; 43:32.

Reeves B: Significance of joint fluid uric acid levels in gout. Ann Rheum Dis 1965; 24:569.

Reimer LG: Approach to the analysis of body fluids for the detection of infection. Clin Lab Med 1985; 5:209.

Rhodes CH, Glantz MJ, Glantz L, et al: A comparison of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid and conventional cytology in the diagnosis of lymphomatous meningitis. Cancer 1996; 77:543.

Riantawan P, Chaowalit P, Wongsangiem M, et al: Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase in tuberculous pleuritis with reference to HIV coinfection and a Baysian analysis. Chest 1999; 116:97.

Ribeiro MA, Kimura RT, Irulegui I, et al: Cerebrospinal fluid levels of lysozyme, IgM and C-reactive protein in the identification of bacterial meningitis. J Trop Med Hyg 1992; 95:87.

Richard S, Miossec V, Moreau J-F, et al: Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. Clin Chem 2002; 48:167.

Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, et al: Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. Arch Neurol 2002; 59:1729.

Rijken A, Dekker A, Taylor S, et al: Diagnostic value of DNA analysis in effusions by flow cytometry and image analysis. A prospective study on 102 patients as compared with cytologic examination. Am J Clin Pathol 1991; 95:6.

Rodriguez AF, Kaplan SL, Mason EO Jr: Cerebrospinal fluid values in the very low birth weight infant. J Pediatr 1990; 116:971.

Rodriquez-Panadero F, Mejias JL: Low glucose and pH levels in malignant pleural effusions. Am Rev Respir Dis 1989; 139:663.

Romero S, Fernandez C, Arriero JM, et al: CEA, CA 15-3 and CYFRA 21-1 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. Eur Respir J 1996; 9:17.

Rosenthal AK, Mandel N: Identification of crystals in synovial fluids and joint tissues. Curr Rheumatol Rep 2001; 3:11.

Rosett W, Hodges GR: Antimicrobial activity of heparin. J Clin Microbiol 1980; 11:30.

Roth BJ: Searching for tuberculosis in the pleural space. Chest 1999; 116:3.

Rouah E, Rogers BB, Buffone GJ: Transferrin analysis by immunofixation as an aid in the diagnosis of cerebrospinal fluid otorrhea. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:756.

Rubins JB, Rubins HB: Etiology and prognostic significance of eosinophilic effusions. A prospective study. Chest 1996; 110:1271.

Rudick RA, French CA, Breton D, et al: Relative diagnostic value of cerebrospinal fluid kappa chains in MS, comparison with other immunoglobulin tests. Neurology 1989; 39:964.

Runyon BA: Amylase levels in ascitic fluid. J Clin Gastroenterol 1987a; 9:172.

Runyon BA: Ascitic fluid bilirubin concentration as a key to choleperitoneum. J Clin Gastroenterol 1987b; 9:543.

Runyon BA, Antillon MR: Ascitic fluid pH and lactate: Insensitive and nonspecific tests in detecting ascitic fluid infection. Hepatology 1991; 13:929.

Runyon BA, Hoefs JC: Ascitic fluid analysis in the differentiation of spontaneous bacterial peritonitis from gastrointestinal tract perforation into ascitic fluid. Hepatology 1984; 4:447.

Runyon BA, Hoefs JC, Morgan TR: Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites. Hepatology 1988; 8:1104.

Runyon BA, Montano AA, Evangelos A, et al: The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate–transudate concept in the differential diagnosis of ascites. Ann Intern Med 1992; 117:215.

Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG: Fibronectin: current concepts of its structure and function. Coll Res 1981; 1:95.

Ryall RG, Peacock MK, Simpson DA: Usefulness of beta 2-transferrin assay in the detection of cerebrospinal fluid leaks following head injury. J Neurosurg 1992; 77:737.

Sahn SA: The differential diagnosis of pleural effusions. West J Med 1982; 137:99.

Sarff LD, Platt LH, McCracken GH Jr: Cerebrospinal fluid evaluation in neonates: Comparison of high risk infants with and without meningitis. J Pediatrics 1976; 88:473.

Sari R, Yildirim B, Sevinc A, et al: The importance of serum and ascites fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA 19-9, and CA 15-3 levels in differential diagnosis of ascites etiology. Hepatogastroenterology 2001; 48:1616.

Savory J, Brody JP: Measurement and diagnostic value of cerebrospinal fluid enzymes. Ann Clin Lab Sci 1979; 9:68.

Schneider D, Halperin R, Langer R, et al: Peritoneal fluid lactate dehydrogenase in ovarian cancer. Gynecol Oncol 1997; 66:399.

Schriever H, Gambino SR: Protein turbidity produced by trichloroacetic acid and sulfosalicylic acid at varying temperatures and varying ratios of albumin and globulin. Am J Clin Pathol 1965; 44:667.

Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AMD, van Zwet AA: Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J Clin Microbiol 2004; 42:734.

Schwake L, von Herbay A, Junghanss T, et al: Peritoneal tuberculosis with negative polymerase chain reaction results: Report of two cases. Scand J Gastroenterol 2003; 38:221.

Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA: Cerebrospinal fluid analysis. Am Family Phys 2003; 68:1103.

Sellebjerg F, Christiansen M, Nielsen PM, Frederiksen JL: Cerebrospinal fluid measures of disease activity in patients with multiple sclerosis. Mult Scler 1998; 4:475.

Selvi E, Manganelli S, Catenaccio M, et al: Diff Quik staining method for detection and identification of monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals in synovial fluids. Ann Rheum Dis 2001; 60:194.

Seregni E, Massimino M, Nerini Molteni S, et al: Serum and cerebrospinal fluid human chorionic gonadotropin (hCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in intracranial germ cell tumors. Int J Biol Markers 2002; 17:112.

Seres E, Bencsik K, Rajda C, et al: Diagnostic studies of cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis [In Hungarian]. Orv Hetil 1998; 139:1905.

Seward RJ, Towner KJ: Evaluation of a PCR-immunoassay technique for detection of Neisseria meningitidis in cerebrospinal fluid and peripheral blood. J Med Microbiol 2000; 49:451.

Shephard MD, Whiting MJ: Nephelometric determination of total protein in cerebrospinal fluid and urine using benzalkonium chloride as precipitation reagent. Ann Clin Biochem 1992; 29:411.

Shmerling RH: Synovial fluid analysis. A critical reappraisal. Rheum Dis Clin North Am 1994; 20:503.

Shmerling RH, Delbanco TL, Tosteson ANA, et al. Synovial fluid tests. What should be ordered? JAMA 1990; 264:1009.

Silva-Cardosa J, Moura B, Martins L, et al: Pericardial involvement in human immunodeficiency virus infection. Chest 1999; 115:418.

Silverman LM, Christenson RH: Amino acids and proteins. In Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1994, p 625.

Simon RP, Abele JS: Spinal-fluid pleocytosis estimated by the Tyndall effect. Ann Intern Med 1978; 89:75.

Sindie CJ, Laterte EC: Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid. J Neuroimmunol 1991; 33:63.

Skedros DG, Cass SP, Hirsh BE, Kelly RH: Beta-2-transferrin assay in clinical management of cerebral spinal fluid and perilymphatic fluid leaks. J Otolaryngol 1993a; 22:341.

Skedros DG, Cass SP, Hirsh BE, Kelly RH: Sources of error in the use of beta-2 transferrin analysis for diagnosing perilymphatic and cerebral spinal fluid leaks. Otolaryngol Head Neck Surg 1993b; 109:861.

Sloman AJ, Kelly RH: Transferrin allelic variants may cause false positives in the detection of cerebrospinal fluid fistulae. Clin Chem 1993; 39:1444.
Sood A, Moudgil A, Sood N, et al: Role of fibronectin in diagnosis of malignant ascites. J Assoc Physicians India 1997; 45:283.
Sormunen P, Kallio MJ, Kilpi T, Peltola H: C-reactive protein is useful in distinguishing Gram stain-negative bacterial meningitis from viral meningitis in children. J Pediatr 1999; 134:725.
Souverijn JHM, Smit WG, Peet R, et al: Intrathecal Ig synthesis: Its detection by isoelectric focusing and IgG index. J Neurol Sci 1989; 93:211.
Soyka JM, Martin M, Sloan EP, et al: Diagnostic peritoneal lavage: Is an isolated WBC count > 500/mm^3 predictive of intra-abdominal injury requiring celiotomy in blunt trauma patients? J Trauma 1990; 30:874.
Spanos A, Harrell FEJ, Durack DT: Differential diagnosis of acute meningitis: An analysis of the predictive value of initial observations. JAMA 1989; 262:2700.
Staats BA, Ellefson RD, Budahn LL, et al: The lipoprotein profile of chylous and non-chylous pleural effusions. Mayo Clin Proc 1980; 55:700.
Stassen WN, McCullough AJ, Bacon BR, et al: Immediate diagnostic criteria for bacterial infection of ascitic fluid. Gastroenterology 1986; 90:1247.
Stearman M, Southgate HJ: The use of cytokine and C-reactive protein measurements in cerebrospinal fluid during acute infective meningitis. Ann Clin Biochem 1994; 31:255.
Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, et al: Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1986; 23:965.
Stelzner TJ, King TEJ, Antony VB, et al: The pleuropulmonary manifestations of the postcardiac injury syndrome. Chest 1983; 84:383.
Stewart RV, Zumwalt RE, Hirsch CS, Kaplan L: Postmortem diagnosis of myocardial disease by enzyme analysis of pericardial fluid. Am J Clin Pathol 1984; 82:411.
Stewart RJ, Gupta RK, Purdie GI, et al: Fine catheter aspiration cytology of peritoneal cavity improves decision-making about difficult cases of acute abdominal pain. Lancet 1986; 2:1414.
Suay VG, Moragon EM, Viedma EC, et al: Pleural cholesterol in differentiating transudates and exudates. Respiration 1995; 62:57.
Such J, Frances R, Munoz C, et al: Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative nonneutrocytic ascites. Hepatology 2002; 36:135.
Sullivan KR, Nelson MJ, Tandberg D: Incremental analysis of diagnostic peritoneal lavage fluid in adult abdominal trauma. Am J Emerg Med 1997; 15:277.
Sunderland T, Linker G, Mirza N, et al: Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. JAMA 2003; 289:2094.
Suzuki Y, Tanaka R: Carcinoembryonic antigen in patients with intracranial tumors. J Neurosurg 1980; 53:355.
Talstad I: Electronic counting of spinal fluid cells. Am J Clin Pathol 1984; 81:506.
Tang LM: Serial lactate determinations in tuberculous meningitis. Scand J Infect Dis 1988; 20:81.
Tangkijvanich P, Tresukolos D, Sanpatamukul P, et al: Telomerase assay for differentiating between malignancy-related and nonmalignant ascites. Clin Cancer Res 1999; 5:2470.
Thwaites GE, Chau TT, Farrar JJ: Improving the bacteriological diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 2004; 42:378.
Tibbling G, Link H, Ohman S: Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders, I: Establishment of reference values. Scand J Clin Lab Invest 1977; 37:385.
Titov AG, Vyshnevskaya EB, Mazurenko SI, et al: Use of polymerase chain reaction to diagnose tuberculous arthritis from joint tissues and synovial fluid. Arch Pathol Lab Med 2004; 128:205.
Torre D, Zeroli C, Issi M, et al: Cerebrospinal fluid concentration of fibronectin in meningitis. J Clin Pathol 1991; 44:783.
Torre D, Zeroli C, Ferrario G, et al: Cerebrospinal fluid concentration of fibronectin in HIV-1 infection and central nervous system disorders. J Clin Pathol 1993; 46:1039.
Tourtellotte WW, Tavolato B, Parker JA, et al. Cerebrospinal fluid electroimmunodiffusion. Arch Neurol 1971; 25:345.
Tourtellotte WW, Staugaitis SM, Walsh MJ, et al: The basis of intra-blood–brain barrier IgG synthesis. Ann Neurol 1985; 17:21.
Trbojevic-Cepe M, Vogrinc Z, Brinar V. Diagnostic significance of methemoglobin determination in colorless cerebrospinal fluid. Clin Chem 1992; 38:1401.
Trotter JL, Rust RS: Human cerebrospinal fluid immunology. In Herndon RM, Brumback RA (eds): The Cerebrospinal Fluid. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1989, p 179.
Tubergen DG, Cullen JW, Boyett JM, et al: Blasts in CSF with a normal cell count do not justify alteration of therapy for acute lymphoblastic leukemia in remission: A Childrens Cancer Group study. J Clin Oncol 1994; 12:273.
Turay UY, Yildirim Z, Turkoz Y, et al: Use of pleural fluid C-reactive protein in diagnosis of pleural effusions. Respir Med 2000; 94:432.
Twijnstra A, Nooyen WJ, van Zanten AP, et al: Cerebrospinal fluid carcinoembryonic antigen in patients with metastatic and nonmetastatic neurological diseases. Arch Neurol 1986; 43:269.
UK National External Quality Assessment Scheme for Immunochemistry Working Group. National guidelines for the analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid hemorrhage. Ann Clin Biochem 2003; 40:481.
Van Acker JT, Delanghe JR, Langlois MR, et al: Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid. Clin Chem 2001; 47:556.
Verettas D, Kazakos C, Tilkeridis C, et al: Polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis in synovial fluid, tissue samples, bone marrow aspirate and peripheral blood. Acta Orthop Belg 2003; 69:396.
Villena V, Lopez-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, et al: Interferon-gamma in 388 immunocompromised and immunocompetent patients for diagnosing pleural tuberculosis. Eur Respir J 1996a; 9:2635.
Villena V, Lopez-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, et al: Diagnostic value of CA 72-4, carcinoembryonic antigen, CA 15-3, and CA 19-9 assay of pleural fluid. A study of 207 patients. Cancer 1996b; 78:736.
Villena V, Lopez-Encuentra A, Pozo F, et al: Interferon gamma levels in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. Am J Med 2003a; 115:365.
Villena V, Lopez-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, et al: Diagnostic value of CA 549 in pleural fluid. Comparison with CEA, CA 15-3 and CA 72-4. Lung Cancer 2003b; 40:289.
Walts AE: Cerebrospinal fluid cytology: Selected issues. Diagn Cytopathol 1992; 8:394.
Wang DY, Yang PC, Yu WL, et al: Serial antinuclear antibodies titre in pleural and pericardial fluid. Eur Respir J 2000; 15:1106.
Ward E, Gushurst CA: Uses and techniques of pediatric lumbar puncture. Am J Dis Child 1992; 146:1160.
Weinburger A, Simkin PA: Plasma proteins in synovial fluids of normal human joints. Semin Arthritis Rheum 1989; 19:66.
Welch KM, Chabi E, Bartosh K, et al: Cerebrospinal fluid gamma aminobutyric acid level in migraine. Br Med J 1975; 30:516.
Weller M, Sommer N, Stevens A, et al: Increased intrathecal synthesis of fibronectin in bacterial and carcinomatous meningitis. Acta Neurol Scand 1990; 82:138.
Weller M, Stevens A, Sommer N, et al: Humoral CSF parameters in the differential diagnosis of hematologic CNS neoplasia. Acta Neurol Scand 1992; 86:129.
Wenger JD, Hightower AW, Broome CV, et al: Bacterial meningitis in the United States: Report of a multistate surveillance study, 1986. J Infect Dis 1990; 162:1316.
Wilson ML. Clinically relevant, cost-effective clinical microbiology: Strategies to decrease unnecessary testing. Am J Pathol 1997; 107:154.
Wise CM, White RE, Agudelo CA: Synovial fluid lipid abnormalities in various disease states: Review and classification. Semin Arthritis Rheum 1987; 16:222.
Wood JH: Neurobiology of CSF. New York, Plenum Press, 1980.
Wu SS, Lin OS, Chen YY, et al: Ascitic fluid carcinoembryonic antigen and alkaline phosphatase levels for the differentiation of primary from secondary bacterial peritonitis with intestinal perforation. J Hepatol 2001; 34:215.
Wubbel L, McCracken GH Jr: Management of bacterial meningitis: 1998. Pediatr Rev 1998; 19:78.
Yorgancioglu A, Akin M, Dereli S, et al: The diagnostic value of tuberculostearic acid in tuberculous pleural effusions. Monaldi Arch Chest Dis 1996; 51:108.
Yuan S, Bien C, Wener MH, et al: Repeat examination of synovial fluid for crystals: Is it useful? Clin Chem 2003; 49: 1562.
Zandman-Goddard G, Matzner Y, Konijn AM, et al: Cerebrospinal fluid ferritin in malignant CNS involvement. Cancer 1986; 58:1146.
Zaret DL, Morrison N, Gullbranson R, Keren DF: Immunofixation to quantify beta-2-transferrin in cerebrospinal fluid from skull injury. Clin Chem 1992; 38:1909.
Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, et al: Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease. Ann Neurol 1998; 43:32.
Zunt JR, Marra CM: Cerebrospinal fluid testing for the diagnosis of central nervous system infection. Neurol Clin 1999; 17:675.

PARTE IV

Hematologia

Editado por

Robert E. Hutchison MD, Richard A. McPherson MD

CAPÍTULO 29

Exame básico de sangue e medula óssea

Neerja Vajpayee MD, Susan S. Graham MS, Sylva Bem MD

Princípios e procedimentos da hematologia 535
- Hemoglobina 535
- Hematócrito (volume de células concentrado) 538
- Índices eritrocitários 539
- Contagens manuais de células sanguíneas 539
- Variação fisiológica 543
- Taxa de sedimentação eritrocitária 545
- Tecnologia instrumental 546

Exame do esfregaço de sangue 548
- Exame de preparações a fresco 548
- Confecção e coloração dos esfregaços de sangue 548
- Eritrócitos 550
- Leucócitos ao exame do esfregaço de sangue periférico 554
- Plaquetas ao exame do esfregaço de sangue periférico 559

Exame da medula óssea 560
- Preparo do aspirado e do corte de biópsia 560
- Coloração de preparações de medula 560
- Exame de medula 561
- Indicações para o estudo da medula 564

Referências bibliográficas 564

PONTOS-CHAVE

- A avaliação de eritrócitos, leucócitos e plaquetas por meio de contagens realizadas manualmente e com o auxílio de contadores de partículas automatizados é fundamental ao diagnóstico e monitoramento das doenças hematológicas.
- Com exceção de alguns casos, os métodos manuais foram substituídos pelo uso de analisadores hematológicos automáticos. A seleção dos analisadores é variada e volumosa o bastante para atender às necessidades de qualquer laboratório de hematologia.
- A automação da hematologia combinada ao emprego de algoritmos sofisticados para interpretação de dados resultou em grande melhoria da utilização de analisadores automáticos na prestação de assistência aos pacientes. A aparelhagem moderna evoluiu muito além das antigas ferramentas de triagem.
- O exame de esfregaços de sangue periférico/biópsias de medula óssea constitui a base do diagnóstico hematológico. O exame de medula óssea fornece uma avaliação semiquantitativa e qualitativa do estado da hematopoiese, auxiliando o diagnóstico de várias doenças benignas e malignas, hereditárias e adquiridas.

A hematologia engloba o estudo das células sanguíneas e a coagulação. Abrange as análises de concentração, estrutura e função das células presentes no sangue, de seus precursores na medula óssea e dos constituintes bioquímicos do plasma ou soro que estão intimamente ligados à estrutura e função das células sanguíneas, bem como da função das plaquetas e proteínas envolvidas na coagulação do sangue. O avanço das técnicas de biologia molecular e o aumento de sua utilização na hematologia conduziram à detecção de várias mutações genéticas subjacentes a alterações estruturais e funcionais de células e proteínas responsáveis por doenças hematológicas.

Princípios e procedimentos da hematologia

Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) – principal componente das CVSs – é uma proteína conjugada que atua como veículo de transporte de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2). Quando totalmente saturada, cada grama de Hb contém 1,34 mL de oxigênio. A massa de hemácias de um adulto contém cerca de 600 g de Hb, capaz de transportar 800 mL de oxigênio. Uma molécula de Hb consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas ("globinas") e quatro grupos protéticos heme, cada com um átomo de ferro de ferroso. Cada grupo heme está precisamente localizado em uma bolsa ou dobra de uma das cadeias polipeptídicas. Localizado próximo à superfície da molécula, o heme se combina de forma reversível a uma molécula de oxigênio ou dióxido de carbono. A principal função da Hb é transportar oxigênio a partir dos pulmões – onde a tensão de oxigênio é alta – para os tecidos – onde a tensão de oxigênio é baixa. Com uma tensão de oxigênio de 100 mmHg nos capilares pulmonares, 95 a 98% da Hb está combinada ao oxigênio. Nos tecidos, onde a tensão de oxigênio chega a 20 mmHg, o oxigênio rapidamente se dissocia da Hb. Nessa situação, menos de 30% do oxigênio permanece combinado à Hb.

A Hb reduzida é aquela na qual o ferro não está associado ao oxigênio. Quando cada grupo heme está associado a uma molécula de oxigênio, a Hb é referida como oxi-hemoglobina (HbO_2). Tanto na Hb quanto na HbO_2, o ferro permanece no estado ferroso. Quando o ferro é oxidado ao estado férrico, há formação de metemoglobina (hemiglobina, Hi) e a molécula perde a capacidade de transportar oxigênio e dióxido de carbono.

Anemia é a diminuição da concentração de hemoglobina e da contagem de eritrócitos (ou hematócrito) a valores abaixo do normal. Trata-se de uma condição muito comum e complicação frequente de outras doenças. O diagnóstico clínico da anemia ou da elevação da Hb com base na estimação da cor da pele e das membranas mucosas visíveis é muito pouco confiável. A estimativa correta da Hb é importante e constitui um dos testes de rotina que é realizado praticamente em todos os pacientes.

Derivados da hemoglobina

Hemiglobina (metemoglobina [Hi])

A metemoglobina é um derivado da hemoglobina em que o ferro ferroso é oxidado ao estado férrico, resultando na incapacidade da molécula de combinar-se reversivelmente ao oxigênio. As cadeias polipeptídicas se mantêm inalteradas. Um indivíduo normal possui até 1,5% de Hi. A metemoglobinemia faz com que o sangue adquira cor castanho-chocolate, causando cianose e "anemia" funcional quando presente em concentração alta o suficiente. A cianose se torna óbvia diante de concentrações em torno de 1,5 g de Hi/dL (i. e., 10% de Hb). Graus comparáveis de cianose são produzidos por 5 g de Hb/dL de sangue, 1,5 g de Hi/dL de sangue e 0,5 g de SHb/dL de sangue. O grau de cianose, contudo, não está necessariamente correlacionado à concentração de Hi. Uma pequena quantidade de Hi é formada de modo contínuo, porém é reduzida por sistemas enzimáticos nos eritrócitos. O sistema enzimático mais importante é o sistema da metemoglobina redutase dependente de NADH (NADH-citocromo b_5 redutase). Outros sistemas, que podem atuar sobretudo como sistemas de reserva, são o do ácido ascórbico, glutationa reduzida e NADPH-metemoglobina redutase. Este último requer um cofator natural ou corante auto-oxidável, como o azul de metileno, para se tornar ativo.

A metemoglobinemia – um aumento da quantidade de Hi nos eritrócitos – resulta tanto da produção aumentada de Hi quanto da atividade diminuída da NADH-citocromo b_5 redutase, podendo ser hereditária ou adquirida (Jaffé, 1989). A forma hereditária é classificada em duas categorias. Na primeira delas, a metemoglobinemia se deve à diminuição da capacidade eritrocitária de reduzir a Hi, que é constantemente formada em Hb de novo. Isso se deve, com frequência, à *deficiência da NADH-citocromo b_5 redutase* – uma condição herdada de forma autossômica recessiva. Indivíduos homozigotos apresentam níveis de metemoglobina da ordem de 10 a 50% e são cianóticos. Apenas em algumas ocasiões a policitemia está presente como mecanismo de compensação. Concentrações de hemiglobina de 10 a 25% podem não acarretar a manifestação de sintomas aparentes. Níveis em torno de 35 a 50% resultam em sintomas discretos, como dispneia por esforço e dor de cabeça, enquanto é provável que níveis superiores a 70% sejam letais. A terapia com ácido ascórbico ou cloreto de metiltionínio (azul de metileno) para essa forma de metemoglobinemia hereditária reduz os níveis de Hi, e ao tratamento com azul de metileno atua, aparentemente, promovendo a ativação do sistema de metemoglobina redutase dependente de NADH. Indivíduos heterozigotos apresentam níveis intermediários de atividade de NADH-citocromo b_5 redutase e níveis sanguíneos de Hi normais. Podem se tornar cianóticos, em decorrência da metemoglobinemia, após a exposição a agentes químicos ou fármacos oxidantes em concentrações que não afetam indivíduos normais.

Na segunda categoria principal de metemoglobinemia hereditária, os sistemas redutores eritrocitários permanecem intactos, porém a própria estrutura da molécula da Hb é anormal. Uma alteração geneticamente determinada da composição de aminoácidos tanto das cadeias α quanto das cadeias β-globulina pode dar origem a uma molécula de Hb mais propensa à oxidação e menos propensa à redução da metemoglobina novamente em Hb. A principal consequência é a cianose assintomática, resultante da metemoglobinemia. São designadas como várias formas de *hemoglobina M (HbM)*. Em seis das sete variantes da HbM, há substituição da tirosina por histidina na bolsa do heme da cadeia de globina proximal ou distal. Nagai & Mawatari (1995), utilizando espectroscopia, demonstraram que uma proporção considerável de subunidades mutantes de HbM Sakatoon e HbM Boston permanecem na forma totalmente reduzida nas condições da circulação. São herdadas como traços autossômicos dominantes (Lukens, 2004). A terapia com cloreto de metiltionínio (azul de metileno) é ineficaz para indivíduos com essa condição, portanto o tratamento é desnecessário.

A maioria dos casos de metemoglobinemia é classificada como secundária ou adquirida, sobretudo em decorrência da exposição a fármacos e compostos químicos que provocam aumento da formação de Hb. Entre os agentes químicos ou fármacos que oxidam diretamente a HbO_2 a Hi estão os nitritos, nitratos, cloratos e quinonas. É provável que outras substâncias – aminoaromáticas e nitrocompostos – atuem de modo indireto, por meio de um metabólito, já que não promovem a formação de Hi *in vitro*. Estas incluem acetanilida, fenacetina, sulfonamidas e corantes de anilina. O sulfato ferroso pode acarretar metemoglobinemia mediante a ingestão de doses muito altas. Os níveis de fármacos ou compostos químicos que não causam metemoglobinemia significativa em indivíduos normais atuam do mesmo modo naqueles que apresentam redução discreta da atividade de NADH-citocromo b_5 redutase, os quais não são cianóticos em circunstâncias normais. Tais indivíduos são recém-nascidos ou indivíduos heterozigotos para deficiência de NADH-citocromo b_5 redutase (Bunn, 1986). A hemiglobina é reduzida outra vez à Hb por ação dos sistemas enzimáticos eritrocitários. Também pode ser reduzida (lentamente) pela administração de agentes redutores, como ácido ascórbico ou compostos sulfidril (glutationa, cisteína). Estes, assim como o cloreto de metiltionínio (azul de metileno), têm valor nos casos de deficiência de NADH-citocromo b_5 redutase. Em casos de metemoglobinemia adquirida ou tóxica, o cloreto de metiltionínio é muito importante. A ação rápida dessa substância não se baseia em sua própria capacidade redutora, mas na aceleração da via da NADPH-metemoglobina redutase (em geral lenta) que promove. A hemiglobina pode se combinar de maneira reversível a vários compostos químicos (p. ex., cianetos, sulfetos, peróxidos, fluoretos e azidas). Em decorrência da forte afinidade da Hi pelo cianeto, a terapia para o envenenamento por cianeto consiste na administração de nitritos para formação de Hi que, então, se combina ao cianeto. Assim, o cianeto livre (que é extremamente venenoso às enzimas respiratórias celulares) torna-se menos tóxico ao ser convertido em HiCN.

A hemiglobina é quantificada por espectrofotometria. Quando os níveis de Hi estão elevados, fármacos ou substâncias tóxicas devem ser excluídas como causa em primeiro lugar. A metemoglobinemia congênita decorrente da deficiência de NADH-citocromo b_5 redutase é determinada pelo ensaio para a enzima. A presença de uma Hb anormal (HbM) também pode ser responsável pela metemoglobinemia detectada ao nascimento ou nos primeiros meses de vida.

Sulfemoglobina

A sulfemoglobina é uma mistura de formas oxidadas e parcialmente desnaturadas da Hb, as quais se formam durante a hemólise oxidativa (Jandl, 1986). Durante a oxidação da Hb, o enxofre (de uma fonte que pode ser variável) é incorporado aos anéis do heme da Hb, resultando na formação de um hemocromo verde. Com frequência, uma nova oxidação resulta em desnaturação e precipitação da Hb sob a forma de corpúsculos de Heinz (Fig. 29.1). A sulfemoglobina é incapaz de transportar oxigênio, contudo pode se combinar ao monóxido de carbono (CO) e formar carboxisulfemoglobina. Diferentemente da metemoglobina, a sulfemoglobina não pode ser reduzida de volta a Hb, permanecendo nas células até que estas se rompam. Na sufemoglobinemia, o sangue tem cor de mauva-lavanda. Foi relatada presença de sulfemoglobina em pacientes sob tratamento com sulfonamidas ou fármacos à base de aminas aromáticas (fenacetina, acetanilida), bem como em pacientes com constipação severa, em casos de bacteremia por *Clostridium perfringens* e em uma condição conhecida como cianose enterógena. A concentração de sulfemoglobina in vivo em geral é inferior a 1%, e em tais condições raramente ultrapassa 10% da hemoglobina total. Resulta em cianose e costuma ser assintomática. Ainda é desconhecida a razão pela qual certos pacientes desenvolvem metemoglobinemia, alguns têm sufemoglobinemia e outros apresentam formação de corpúsculos de Heinz e cianose. A sulfemoglobina é quantificada por espectrofotometria.

Carboxiemoglobina (HbCO)

O CO endógeno, produzido durante a degradação do heme em bilirrubina, normalmente contribui para cerca de 0,5% do conteúdo de carboxiemoglobina presente no sangue, além de estar aumentado nos casos de anemia hemolítica. A Hb tem a capacidade de combinar-se ao monóxido de carbono com uma afinidade 210 vezes maior que sua afinidade com o oxigênio. O monóxido de carbono se liga à Hb mesmo quando está presente em concentrações muito baixas no ar (p. ex., 0,02–0,04%). Nessas condições, a HbCO acumula-se até que os sintomas típicos de envenenamento se manifestem. A HbCO não se liga nem transporta oxigênio. Além disso, concentrações aumentadas de HbCO provocam um deslocamento crescente da curva de dissociação Hb-oxigênio para a esquerda e, assim, intensificam a anóxia. Se um paciente envenenado com monóxido de carbono recebe oxigênio puro, há grande intensificação da conversão da HbCO em HbO_2. A HbCO é sensível à luz e apresenta uma cor vermelho-cereja brilhante peculiar.

O envenenamento agudo por monóxido de carbono é bem conhecido e, sabidamente, produz hipóxia tecidual como resultado da dimi-

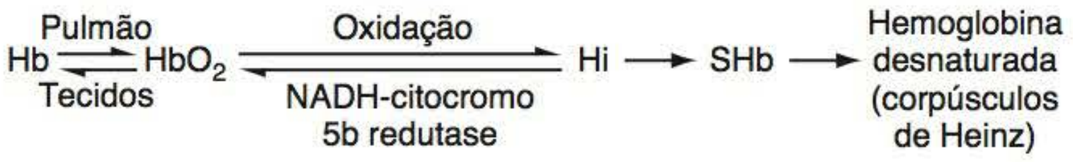


Figura 29.1 Conceito simplificado da oxidação da hemoglobina (Hb) a metemoglobina (Hi), conforme proposto por Jandl (1996). A ligação reversível e liberação do oxigênio ocorre nos pulmões e tecidos. A oxidação dos íons ferrosos e formação de hemoglobina na hemácia são reversíveis até certo ponto. O prosseguimento da oxidação leva a alterações conformacionais irreversíveis e à sulfemoglobina. Se a oxidação avançar ainda mais, haverá desnaturação da hemoglobina e precipitação no eritrócito, sob a forma de corpúsculos de Heinz.

nuição do transporte de oxigênio. O envenenamento crônico, resultante da exposição prolongada a pequenas quantidades de monóxido de carbono, é menos conhecido, porém sua importância tem aumentado. As principais fontes desse gás são os motores a gasolina, a iluminação a gás, os aquecedores a gás, os fornos defeituosos e a fumaça do fumo. A exposição ao monóxido de carbono é, assim, um dos perigos mais significativos na civilização moderna. O gás já foi encontrado até mesmo no ar das ruas movimentadas das grandes cidades, em concentração suficiente para produzir sintomas em guardas de trânsito, por exemplo, que ficam expostos ao gás por períodos prolongados. A exposição crônica à fumaça do fumo pode conduzir à elevação crônica dos níveis de HbCO e ao deslocamento associado da curva de dissociação do oxigênio para a esquerda. Fumantes tendem a apresentar níveis mais altos de hematócritos que indivíduos não fumantes, e também podem ter policitemia. Indivíduos sadios que se expõem a várias concentrações do gás durante 1 hora não manifestam sintomas definidos (dor de cabeça, tontura, fraqueza muscular e náuseas), a menos que a concentração de gás no sangue atinja 20 a 30% de saturação. Todavia, parece que, no envenenamento crônico, em especial de crianças, podem ocorrer sintomas sérios diante de concentrações menores. A HbCO pode ser quantificada por espectrofotometria diferencial ou por cromatografia gasosa.

Determinação da concentração de hemoglobina

O método da cianometemoglobina (ciano-hemiglobina; HiCN) proporciona a vantagem da conveniência e de uma solução padrão estável e prontamente disponível.

Método da ciano-hemiglobina (HiCN)

Princípio. O sangue é diluído em solução de ferrocianeto de potássio e cianeto de potássio. O ferrocianeto de potássio oxida a Hb a Hi, enquanto o cianeto de potássio fornece íons cianeto (CN^-) para formar HiCN. Esta, por sua vez, apresenta ampla absorção máxima em comprimento de onda 540 nm (Fig. 29.2, Tab. 29.1). A absorbância da amostra é mensurada em um espectrofotômetro a 540 nm e comparada à de uma solução padrão de HiCN.

Reagente. O diluente é o reagente de Drabkin detergente-modificado:
0,20 g de ferrocianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$]
0,05 g de cianeto de potássio (KCN)
0,14 g de fosfato de potássio di-hidrogenado (anidro) (KH_2PO_4)
Detergente não iônico – p. ex.,
0,5 mL de Sterox S.E. (Harleco), *ou*
1,0 mL de Tritom X-100 (Rohm e Haas)
Água destilada que seja suficiente para 1.000 mL

A solução deve ser límpida e ter tonalidade amarela-clara, pH de 7 a 7,4 e apresentar leitura igual a zero quando quantificada em fotômetro a 540 nm contra um *blank* de água.

A substituição do fosfato de potássio di-hidrogenado (KH_2PO_4) desse reagente pelo bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) no reagente de Drabkin encurta o tempo necessário para a completa conversão da Hb em HiCN, de 10 para 3 minutos. O detergente intensifica a lise de eritrócitos e diminui a turvação decorrente da precipitação de proteínas.

É preciso ter cuidado com o KCN contido na solução de Drabkin, pois sais ou soluções que contêm cianeto são venenosos. O diluente em si contém apenas 50 mg de KCN/L, que é uma concentração inferior à dose letal para um indivíduo que pesa 70 kg. Entretanto, como há liberação de HCN por acidificação, a exposição do diluente a ácidos deve ser evitada. Recomenda-se descartar os reagentes e amostras em água corrente na pia. Para conservar bem o diluente, guarde-o em uma garrafa escura à temperatura ambiente, porém prepare um novo diluente com frequência.

Método. Cerca de 20 µL de sangue são adicionados a 5 mL de diluente (1:251), bem misturado e deixado em repouso à temperatura ambiente, durante ao menos 3 minutos (Dacie, 1991). A absorbância é medida a 540 nm em colorímetro fotoelétrico, com ou sem filtro apropriado, contra um blank que contenha apenas o reagente. Em seguida, é aberto um frasco de padrão HiCN, e sua absorbância é medida à temperatura ambiente, no mesmo instrumento e sob as mesmas condições. Após ter sido diluída, a amostra a ser testada deve ser analisada em algumas horas. O padrão deve ser mantido ao abrigo da luz quando não estiver em uso e descartado ao final do dia.

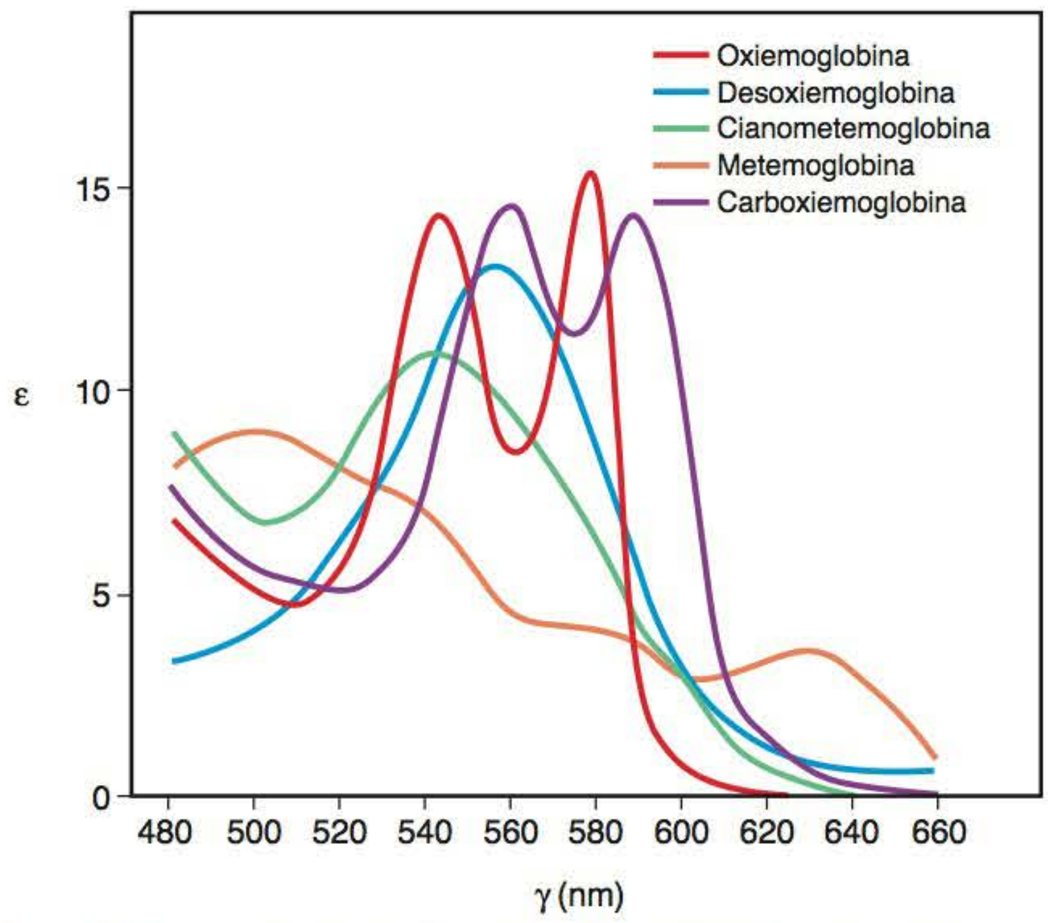


Figura 29.2 Espectro de absorção da oxiemoglobina (HbO_2), desoxiemoglobina (Hb), metemoglobina (hemiglobina [Hi]) e cianometemoglobina (ciano-hemiglobina [HiCN]). (Morris, MW; Skrodzki, Z; Nelson, DA. Zeta sedimentation ratio (ZSR), a replacement for the erythrocyte sedimentation rate (ESR). Am J Clin Pathol 1975; 64:254-6.© 1975 American Society for Clinical Pathology.)

Tabela 29.1 Nomenclatura e absorção máxima das hemoglobinas

		Pico de absorção 1		Pico de absorção 2		Pico de absorção 3	
Termo	**Símbolo**	λ	ε	λ	ε	λ	ε
Hemoglobina	Hb	431	(140)	555	(13,04)		
Oxiemoglobina	HbO_2	415	(131)	542	(14,37)	577	(15,37)
Carboxiemoglobina	HbCO	420	(192)	539	(14,36)	568.5	(14,31)
Hemiglobina (metemoglobina)	Hi	406	(162)	500	(9,04)	630	(3,70)
Ciano-hemiglobina (cianometemoglobina)	HiCN	421	(122,5)	540	(10,99)		

O comprimento de onda (λ) em nanômetros para cada máximo é acompanhado do coeficiente de extinção (ε) entre parênteses.

De van Assendelft OW, 1970.

$$\text{Hb (g/dL)} = [A^{540}\text{ amostra teste}/A^{540}\text{ padrão}] \times [\text{concentração padrão (mg/dL)}/100\text{ mg/g}] \times 251$$

Em geral, convém calibrar o fotômetro a ser utilizado na hemoglobinometria. Para tanto, é elaborada uma curva ou tabela-padrão que relacionará valores de absorbância a concentrações de Hb expressas em g/dL. A absorbância de uma padrão de HiCN recém-preparado é medida contra um blank de reagente. São obtidas leituras da absorbância do padrão de HiCN recente, bem como de suas diluições no reagente (1 para 2, 1 para 3 e 1 para 4), sempre contra o blank de reagente. Os valores de Hb em g/dL são calculados para cada solução, conforme descrito anteriormente. Quando as leituras da absorbância são graficamente representadas na abscissa, em papel milimetrado linear, os pontos devem descrever uma reta que passa através da origem. A vantagem do método da HiCN reside na possibilidade de quantificar a maioria das formas de Hb (Hb, HbO_2, Hi e $HbCO_2$, com exceção da SHb).

A amostra a ser testada pode ser comparada diretamente ao padrão de HiCN, e as leituras podem ser realizadas conforme a conveniência do analista, graças à estabilidade das amostras diluídas. Valores de absorbância com elevação não devida à Hb podem ser produzidos pela turvação da amostra que, por sua vez, decorre da presença de proteínas plasmáticas anormais, hiperlipidemia, grande concentração de leucócitos (contagens > 30×10^9/L) ou gotículas gordurosas. A presença de qualquer um desses componentes pode acarretar o aumento da dispersão da luz e da absorbância aparente.

Erros de hemoglobinometria

As fontes de erro podem estar associadas às amostras, ao método, ao equipamento ou ao analista.

Erros inerentes à amostra. Uma técnica de punção venosa inadequada pode acarretar hemoconcentração. Esta, por sua vez, resultará em valores muito altos de concentração de Hb e contagens celulares. A técnica inadequada da picada no dedo ou da amostragem capilar pode produzir erros em qualquer direção.

Erros inerentes ao método. O método da HiCN é o método de escolha. O uso do padrão de HiCN para calibrar o instrumento e para o próprio teste elimina a fonte de erros mais importante. A ampla banda de absorção da HiCN na região de 540 nm torna seu uso conveniente tanto em fotômetros do tipo filtro quanto em espectrofotômetros de banda estreita. Com exceção da SHb, todas as demais variedades de Hb são convertidas em HiCN.

Erros inerentes ao equipamento. A acurácia do equipamento não é uniforme. É desejável utilizar pipetas bem graduadas com acurácia garantida superior a 99%. A calibração das pipetas reduz a ocorrência de erros. O uso de cubetas não pareadas pode introduzir erros significativos e, por esse motivo, é preferível usar cubetas de fluxo contínuo. Os ajustes do comprimento de onda, filtros e leituras métricas precisam ser checados. O fotômetro deve ser calibrado no laboratório antes de seu uso inicial, e sua checagem deve ser repetida com frequência, a fim de reduzir para 2% (± CV) o erro inerente ao método.

Erros do analista. É possível reduzir os erros humanos com bons treinamentos, por meio da compreensão do significado clínico do teste e da necessidade de utilizar um método dependente, obediência a instruções orais e escritas e familiarização com o equipamento e as fontes de erro. Os erros se tornam mais frequentes com o cansaço e tendem a adquirir maiores proporções ao final do dia de trabalho. Um técnico paciente e crítico, tanto por natureza quanto em decorrência do treinamento recebido, e que se interessa pelo trabalho que faz é menos propenso a cometer erros.

Essa discussão aplica-se às técnicas manuais de hemoglobinometria. Os equipamentos automatizados são muito utilizados e eliminam a maior parte dos erros.

Identificação espectrofotométrica das hemoglobulinas

As várias Hb existentes possuem espectros de absorbância característicos, que podem ser facilmente determinados com o auxílio de um espectrofotômetro. As absorbâncias máximas que possuem utilidade são mostradas na Tabela 29.1. A absorbância máxima da Hi varia de forma considerável de acordo com o pH. As absorbâncias máxima constantes nas duas colunas à direita são úteis para distinguir as formas de Hb. Os valores de absorbância na faixa de 405 a 435 nm (a banda de Soret) são consideravelmente mais altos e podem ser empregados para quantificação de pequenas concentrações de Hb.

Hematócrito (volume de células concentrado)

O hematócrito de uma amostra de sangue é a proporção do volume de eritrócitos em relação ao volume de sangue total. É expresso tanto em porcentual (convencional) quanto em fração decimal (unidades do SI). As unidades L/L são utilizadas. A heparina desidratada e o EDTA são anticoagulantes satisfatórios. Antes de retirar uma alíquota de um tubo com sangue venoso para realização de determinações hematológicas, é importante homogeneizar bem a amostra. Se o tubo com sangue permaneceu em repouso, será necessário invertê-lo no mínimo 60 vezes ou deixá-lo no agitador mecânico por 2 minutos. Menos que isso resulta em perda inaceitável da precisão (Fairbanks, 1971). O número de inversões requeridas para homogeinização da amostra depende das dimensões do frasco. Tubos-padrão (10–14 × 75 mm), com 5 mL de sangue e bolhas de ar que correspondem a pelo menos 20% do volume do tubo, requerem no mínimo 8 inversões (NCCLS, 1993). O hematócrito venoso apresenta boa concordância com o hematócrito obtido a partir de uma punção cutânea. Ambos são maiores que o hematócrito corporal total. O hematócrito pode ser determinado de modo direto – por meio da centrifugação com macro ou micrométodos – ou indireto – como produto do volume corpuscular médio (VCoM) pela contagem de CVSs em aparelhos automatizados. No sangue mantido à temperatura ambiente, a tumefação dos eritrócitos, que ocorre entre 6 e 24 horas, eleva o hematócrito e o VCoM. As contagens celulares e índices permanecem estáveis por 24 horas a 4°C (Brittin, 1969).

O hematócrito do macrométodo de Wintrobe emprega a centrifugação do sangue em tubos de vidro espessos, de diâmetro interno uniforme e fundo achatado. Esse método deixou de ser utilizado.

Exame macroscópico

A determinação do hematócrito se dá por centrifugação. A inspeção da amostra após o processo de centrifugação pode fornecer informações valiosas. Devem ser observadas as alturas relativas da coluna de hemácias, creme leucocitário e coluna de plasma. O creme leucocitário é a camada vermelho-acinzentada situada entre as hemácias e o plasma, que inclui as plaquetas e os leucócitos.

Uma tonalidade alaranjada ou verde do plasma sugere concentração de bilirrubina aumentada, enquanto a cor rosa ou vermelha indica hemoglobinemia. O uso de uma técnica precária para coleta da amostra de sangue é a causa mais frequente de hemólise. Quando as amostras não são obtidas em 1 a 2 horas após uma refeição rica em gordura, o plasma turvo pode apontar a ocorrência de nefrose ou de certas hiperglobulinemias anormais, em especial crioglobulinemia.

Determinação do hematócrito pelo micrométodo

Equipamento

Utiliza-se um tubo capilar para hematócrito de cerca de 7 cm de comprimento e diâmetro interno uniforme de cerca de 1 mm. Para a coleta de sangue diretamente a partir de uma punção cutânea, são disponibilizados tubos capilares.

Procedimento

O tubo de micro-hematócrito é preenchido por atração capilar, seja a partir da punção do líquido que flui livremente de uma ferida, seja a partir de uma amostra de sangue venoso bem homogeneizada. No mínimo, até 5 cm do tubo capilar devem ser preenchidos. A extremidade vazia é vedada com massa de modelagem. O tubo preenchido é colocado nos sulcos radiais existentes no rotor da centrífuga de micro-hematócrito, com a parte vedada afastada do centro. O fundo do tubo deve ser posicionado contra a gaxeta de borracha, para que não se quebre. Uma centrifugação de 5 minutos a 10.000 – 12.000 g é satisfatória, a menos que o hematócrito ultrapasse 50%. Nesse caso, deve-se realizar a centrifugação por mais 5 minutos para garantir que a retenção de plasma seja mínima. Os tubos capilares não são graduados. A altura da coluna de sangue, incluindo o plasma, e a coluna de hemácias isolada devem ser medidas em cada caso, com o auxílio de uma régua milimétrica e lentes de aumento, ou com um dos vários dispositivos de medição comercializados. As instruções do fabricante devem ser seguidas.

Interpretação dos resultados

Os valores de referência típicos para indivíduos adultos do sexo masculino são de 0,41 a 0,51 L. Para as mulheres, esses valores são de 0,36 a 0,45 L. Um valor abaixo daquele considerado normal para o indivíduo, ou abaixo do intervalo de referência para o sexo e a idade, indica anemia. Um valor acima desses referenciais indica policitemia. O hematócrito reflete a concentração de CVSs, em vez da massa total de CVSs. Nos casos de hidremia da gravidez, o hematócrito é baixo, porém o número total de hemácias circulantes não apresenta redução. Em casos de choque, o hematócrito pode permanecer normal ou mesmo estar elevado, e ser acompanhado de hemoconcentração, ainda que a massa total de hemácias possa apresentar redução significativa decorrente da perda de sangue. O hematócrito não é uma estimativa de anemia confiável imediatamente após a perda de sangue, ou logo em seguida à realização de transfusões.

Fontes de erro

Centrifugação. A duração e a velocidade adequadas da centrifugação são fatores essenciais à obtenção de um hematócrito correto. As hemácias devem ser concentradas a fim de que uma centrifugação adicional não reduza ainda mais o volume de células concentradas. No decorrer da centrifugação, uma pequena proporção de leucócitos, plaquetas e plasma fica retida entre as hemácias. O erro que resulta dessa retenção é, via de regra, quase insignificante. A quantidade de plasma retida é maior em hematócritos mais altos que naqueles mais baixos. O plasma

retido corresponde a cerca de 1 a 3% da coluna de hemácias de uma amostra de sangue normal (em torno de 0,014 em um hematócrito de 0,47), um pouco mais em casos de anemia macrocítica, esferocitose e anemia hipocrômica (Dacie, 1991). Quantidades ainda maiores de plasma são retidas no hematócrito de pacientes com anemia falciforme, variando de acordo com a intensidade da doença e consequente rigidez das células. Ao se utilizar o micro-hematócrito como método de referência para calibração de instrumentos automatizados, recomenda-se fazer a correção referente ao plasma retido (ICSH, 1980).

Amostra. A postura, a atividade muscular e a estase promovida por torniquetes prolongados podem causar alterações da mesma ordem no hematócrito e na concentração celular, assim como ocorre com os constituintes solúveis não filtráveis. Uma característica única ao hematócrito é o erro decorrente do excesso de EDTA (sangue inadequado para uma quantidade fixa de EDTA): o hematócrito será falsamente baixo em decorrência da retração das células, porém a Hb e as contagens celulares não são afetadas. Não há uniformidade quanto ao tipo de sais de EDTA utilizado como anticoagulante (O'Broin, 1997). O sal de tripotássio (K_3-EDTA) provoca uma retração das hemácias de aproximadamente 2% e diminui o volume de células concentradas, em comparação ao efeito dos sais de dipotássio (K_2-EDTA) (Koepke, 1989). Do mesmo modo, como o K_3-EDTA é um líquido, a medida da Hb e das contagens de hemácias e leucócitos é reduzida em 1 a 2%. Embora o ICSH e o NCCLS recomendem o uso dos sais de K_2-EDTA (em pó), o K_3-EDTA é utilizado com mais frequência, talvez em razão da maior miscibilidade e menor ocorrência de coagulação da amostra (Geller, 1996).

Outros erros. Os erros técnicos consistem na falha em homogeneizar o sangue de forma adequada antes da amostragem, leitura incorreta do nível de células e plasma e inclusão do creme leucocitário como parte do volume de eritrócitos. Com uma boa técnica, a precisão do hematócrito (expresso em ± 2 CV [coeficiente de variação]) é ± 1%. Diante de valores de hematócrito baixos, o CV é maior em função do erro de leitura.

Índices eritrocitários

Wintrobe introduziu cálculos para determinação do tamanho, conteúdo e concentração de Hb das hemácias. Esses índices eritrocitários têm sido úteis para a caracterização morfológica das anemias. Podem ser calculados a partir da contagem de hemácias, determinação da concentração de Hb e hematócrito.

Volume celular médio (VCM)

O VCM corresponde ao volume médio de hemácias e é calculado a partir do hematócrito e da contagem de hemácias. O VCM = Hct × 1.000/CVS (em milhões por μL), expressa em femtolitros (fL) ou μm^3. Se o hematócrito for igual a 0,45 e a contagem de hemácias for igual a 5×10^{12} células/L, 1 L contém 5×10^{12} hemácias que ocupam um volume de 0,45 L.

$VCM = 0{,}45\ L/5 \times 10^{12} = 90 \times 10^{-15}\ L$

$1\ fL = 10^{-15}\ L = 1\ \mu m^3$

Hemoglobina celular média (HCM)

A HCM é o conteúdo (peso) de Hb da hemácia mediana, sendo calculada a partir da concentração de Hb e da contagem de hemácias.

HCM = Hb (em g/L)/CVS (em milhões/μL)

O valor é expresso em picogramas (pg). Se Hb = 15 g/dL e a contagem de hemácias for igual a 5×10^{12} células/L, então 1 L contém 150 g de Hb distribuídas em 5×10^{12} células.

$HCM = 150/(5 \times 10^{12}) = 30 \times 10^{-12}$ (pg)

$1\ pg = 10^{-12}\ g$

Concentração média de Hb celular (CMHC)

A CMHC é a concentração média de Hb presente em dado volume de hemácias concentradas. É calculada a partir da concentração de Hb e do hematócrito.

CMHC = Hb (em g/dL)/Hct, expresso em g/dL

Se a Hb = 15 g/dL e o hematócrito for igual a 0,45, então:

CMHC = 15 g/dL/0,45 = 33,3 g/dL

Discussão

Os índices são determinados com o auxílio de aparelhos de impedância elétrica, de modo um tanto diferente. O VCM é derivado a partir da altura média dos pulsos de voltagem formados durante a contagem de hemácias, e a Hb é quantificada pela leitura da densidade óptica da HiCN. Os outros três valores são calculados do seguinte modo:

Hct = VCM × CVS; HCM = Hb/CVS; CMHC = (Hb/Hct) × 100

Os valores de referência para os índices dependerá do modo como foram determinados – se a partir do hematócrito centrifugado ou de contagens celulares. Em indivíduos normais, os valores serão semelhantes desde que ambos sejam corrigidos quanto ao volume de plasma retido. Entretanto, como o volume de plasma retido é maior nos casos de anemia hipocrômica e anemia falciforme, o CMHC calculado por micro-hematócrito é significativamente menor que o CMHC derivado dos contadores de impedância elétrica.

O intervalo de referência de 95% para adultos normais são os seguintes: VCM = 80 a 96 fL; HCM = 27 a 33 pg; e CMHC = 33 a 36 g/dL (Ryan, 2001a). Em um indivíduo sadio, observa-se uma variação muito pequena, inferior a ± 1 unidade em qualquer um dos índices. Desvios em torno do valor de referência para um dado indivíduo ou valores fora dos intervalos de referência para indivíduos normais são úteis em particular na caracterização morfológica dos tipos de anemia.

Nas *anemias microcíticas*, os índices podem ser equivalentes a um VCM de 50 fL, uma HCM de 15 pg e uma CMHC de 22 g/dL. É raro qualquer um desses valores se tornarem ainda mais baixos.

Nas *anemias macrocíticas*, os índices podem ser iguais a um VCM de 150 fL, uma HCM de 50 pg e uma CMHC normal ou reduzida (Dacie, 1991). Tipicamente, a CMHC aumenta apenas na esferocitose, e é raro que esteja acima de 38 g/dL.

Contagens manuais de células sanguíneas

As contagens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas são expressas como concentrações – células por unidade de volume de sangue. A unidade de volume era expressa em milímetros cúbicos (mm^3), em decorrência das dimensões lineares da câmara (de contagem celular) do hemocitômetro.

$1\ mm^3 = 1{,}00003\ \mu L$

Embora não haja consistência na literatura quanto ao uso de unidades tradicionais/convencionais *versus* unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI), o International Committee for Standardization in Hematology recomenda o uso do litro (unidade do SI) como unidade de volume, conforme mostram os exemplos a seguir:

Eritrócitos:

$5 \times 10^6/mm^3 = 5 \times 10^6/\mu L$ (convencional) = 5×10^{12}/L (unidade do SI)

Leucócitos:

$7 \times 10^3/mm^3 = 7 \times 10^3/\mu L$ (convencional) = 7×10^9/L (unidade do SI)

Plaquetas:

$300 \times 10^3/mm^3 = 300 \times 10^3/\mu L$ (convencional) = 300×10^9/L (unidade do SI)

Com exceção de algumas contagens plaquetárias e de contagens baixas de leucócitos, o hemocitômetro já não é mais utilizado na rotina para contagem de células sanguíneas. Contudo, ainda é necessário não só para que o técnico utilize esse método de forma efetiva, mas também para que conheça suas limitações. Qualquer procedimento de contagem celular está dividido em três etapas: diluição do sangue; amostragem da suspensão diluída em determinado volume; e contagem das células nesse volume.

Contagens de eritrócitos

Manual

O uso combinado de um tubo microcapilar e um frasco de plástico com determinado volume de diluente pré-determinado – Unopette (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) – constitui um importante sistema de diluições manuais. Após o preenchimento do tubo capilar,

ele é empurrado para dentro de um recipiente e a amostra é lavada por meio da compressão do frasco plástico mole. Esse sistema é especialmente conveniente para microamostragens. As Unopettes são disponibilizadas já com diluentes para realização de contagens de CVSs, CBSs, plaquetas, eosinófilos e reticulócitos.

Métodos semiautomatizados

Existem instrumentos disponíveis para realização de diluições precisas e convenientes, que tanto aspiram a amostra quanto a lavam com diluente. O diluidor deve realizar diluições de 1:250 ou 1:500, com um CV < 1%.

Contagens manuais de reticulócitos

Princípio

Reticulócitos são células vermelhas anucleadas imaturas que contêm ácido ribonucleico (RNA) e continuam a sintetizar Hb mesmo após terem perdido o núcleo. Ao incubar o sangue brevemente em solução de azul de metileno novo ou de azul de cresil brilhante, o RNA precipita como complexo corante-ribonucleoproteína. Em termos microscópicos, o complexo aparece como uma rede (retículo ou fibras filamentosas) azul-escura, ou ao menos sob a forma de dois grânulos azul-escuros que permitem a identificação e enumeração dos reticulócitos (ICSH, 1998). Foi publicado um método proposto para a contagem de reticulócitos, baseado na determinação da proporção de reticulócitos/hemácias (ICSH, 1998), expandindo o método referencial de contagem de CVSs proposto pelo ICSH em 1994.

Reagente. Novo azul de metileno a 1% em diluente citrato-salina (1 parte em citrato de sódio a 30 g/L, mais 4 partes de cloreto de sódio a 9 g/L).

Controles. Embora os controles sejam comercializados, Ebrahim (1996) descreveu um método que demora cerca de 2 horas e produz um controle de nível múltiplo. Esse controle permanece estável por vários meses. A diálise hipotônica das CVSs em presença de RNA, seguida de um curto período de diálise hipertônica para vedar os poros da membrana das CVSs novamente, resulta na detecção de cerca de 20% das CVSs como "reticulócitos sintéticos", com variadas concentrações de RNA encapsulado.

Procedimento

Em um tubo de ensaio, são misturadas 3 gotas de reagente e 3 gotas de sangue. A mistura é, então, incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e homogeneizada de novo. São preparados dois esfregaços em cunha em lâminas de vidro, os quais são secos ao ar.

Observados pelo microscópio, com lentes de imersão, os reticulócitos exibem cor azul-clara e contêm material reticular ou granular azul-escuro. As hemácias se coram de azul-claro ou azul-esverdeado. A porcentagem de reticulócitos é determinada considerando-se no mínimo 1.000 hemácias. A inserção de um disco de Miller na ocular permite estimar rapidamente grandes números de hemácias, por meio da imposição de dois quadrantes (a área de um dos quadrantes equivale a nove vezes a área do outro) no campo visual (Brecher, 1950). Os reticulócitos são contados no quadrante maior, enquanto as hemácias são contadas no quadrante menor, em sucessivos campos microscópicos, até que tenham sido contadas pelo menos 300 hemácias. Esse procedimento fornece uma estimativa do número de reticulócitos existente em, no mínimo, 2.700 hemácias. Para tanto, considera-se:

$$\text{Reticulócitos (\%)} = [(\text{nº de reticulócitos nos quadrantes maiores})/(\text{nº de hemácias nos quadrantes menores} \times 9)] \times 100$$

A contagem de reticulócitos absoluta é determinada multiplicando-se o porcentual de reticulócitos pelo valor da contagem de hemácias.

Valores de referência

Adultos normais apresentam contagens de reticulócitos de 0,5 a 1,5% ou 24 a 84 $\times 10^9$ células/L. Em recém-nascidos, o porcentual de reticulócitos é de 2,5 a 6,5%. Ao final da segunda semana de vida, esse valor diminui para níveis encontrados no indivíduo adulto.

Interpretação

Como os reticulócitos são hemácias imaturas que perdem o RNA mais ou menos 1 dia após deixarem a medula óssea e alcançarem a circulação sanguínea, sua contagem fornece uma estimativa da taxa de produção de hemácias. A contagem de reticulócitos absoluta ou o índice de produção de reticulócitos são parâmetros mais úteis que os valores porcentuais (ver Cap. 30).

Fontes de variação

Em razão do pequeno número real de reticulócitos contados, a contagem manual de reticulócitos está associada a um erro de amostragem relativamente significativo. Os intervalos de confiança de 95% podem ser expressos da seguinte forma:

$$R \pm 2\sqrt{[R(100 - R)/N]}$$

Em que, R é a contagem de reticulócitos em porcentual, e N é o número de eritrócitos examinados. Isso significa que, no exame de apenas 1.000 eritrócitos, os limites de confiança de 95 para 1% da contagem são iguais a 0,4 a 1,6%; para a contagem de 5%, esses valores são de 3,6 a 6,4%; e para 10% da contagem, os limites valem 8,1 a 11,9%.

Contagens de leucócitos

Coleta da amostra. O EDTA deve ser utilizado, pois a heparina não apresenta o efeito anticoagulante desejado.

Método do hemocitômetro (método manual)

Apesar de esse método ser utilizado apenas às vezes para contagem de leucócitos, o técnico deve ser capaz de executá-lo:

1. como forma de checar a validade dos métodos eletrônicos de contagem, para fins de calibração;
2. como forma de checar a validade dos métodos eletrônicos de contagem, em casos de pacientes com trombocitopenia ou leucopenia profunda;
3. para amostras de sangue com interferência na contagem de plaquetas (CVSs demasiadamente microcíticas);
4. como forma de *back-up*.

Também é comumente utilizado como método de contagem das células presentes no LCE.

Câmara de contagens. O hemocitômetro consiste em uma lâmina de vidro espessa, em que há plataformas de área conhecida e profundidade precisamente controlada cobertas com uma lamínula de vidro. A câmara de contagem e lamínula de vidro devem ser lavadas em água morna logo após o uso. Em seguida, o excesso de água deve ser eliminado com um lenço de papel limpo que não solte fiapos, e ambas devem ser deixadas secando ao ar. As superfícies não devem ser tocadas com gaze nem tecido, uma vez que esses materiais podem arranhar as áreas demarcadas.

Líquido diluente. O líquido de diluição lisa os eritrócitos para que estes não obscureçam os leucócitos. O líquido deve ser refrigerado e filtrado com frequência para remoção de leveduras e mofo.

Procedimento

1. Uma amostra de sangue bem homogeneizada é diluída na proporção 1:20 em líquido de diluição e, em seguida, submetida à rotação por 5 minutos. A câmara é carregada com um volume de líquido que seja suficiente para preencher o espaço sob a lamínula de vidro.
2. Esperam-se vários minutos até que as células assentem e, então, a câmara é analisada com objetiva de baixa resolução para verificar a distribuição celular uniforme.
3. A contagem é realizada. O diafragma do condensador do microscópio é parcialmente fechado para destacar os leucócitos nitidamente durante a observação com lentes de menor aumento (10 ×). Os leucócitos são contados em cada um dos quatro quadrantes grandes (1 mm^2) nos cantos da câmara (A, B, C e D, na Fig. 29.3). No total, são contados oito quadrantes grandes de canto em ambos os lados da câmara.
4. Cada quadrante grande engloba um volume de 1/10 mm^3, enquanto a diluição é de 1:20. A fórmula geral empregada é:

$$\text{Contagem de leucócitos (células/mm}^3) = (\text{cc/lsc}) \times \text{d} \times 10$$

em que, cc (*cels counted*) é o número de total de células contadas, d (*dilution*) corresponde ao fator de diluição, 10 é o valor do fator de transformação sobre um quadrante grande (1/10 mm^3), e lsc (*large squares counted*) é o número de quadrantes grandes contados. Nos casos de leucopenia, em que a contagem celular total é menor que 2.500, o sangue é diluído na proporção de 1:10.

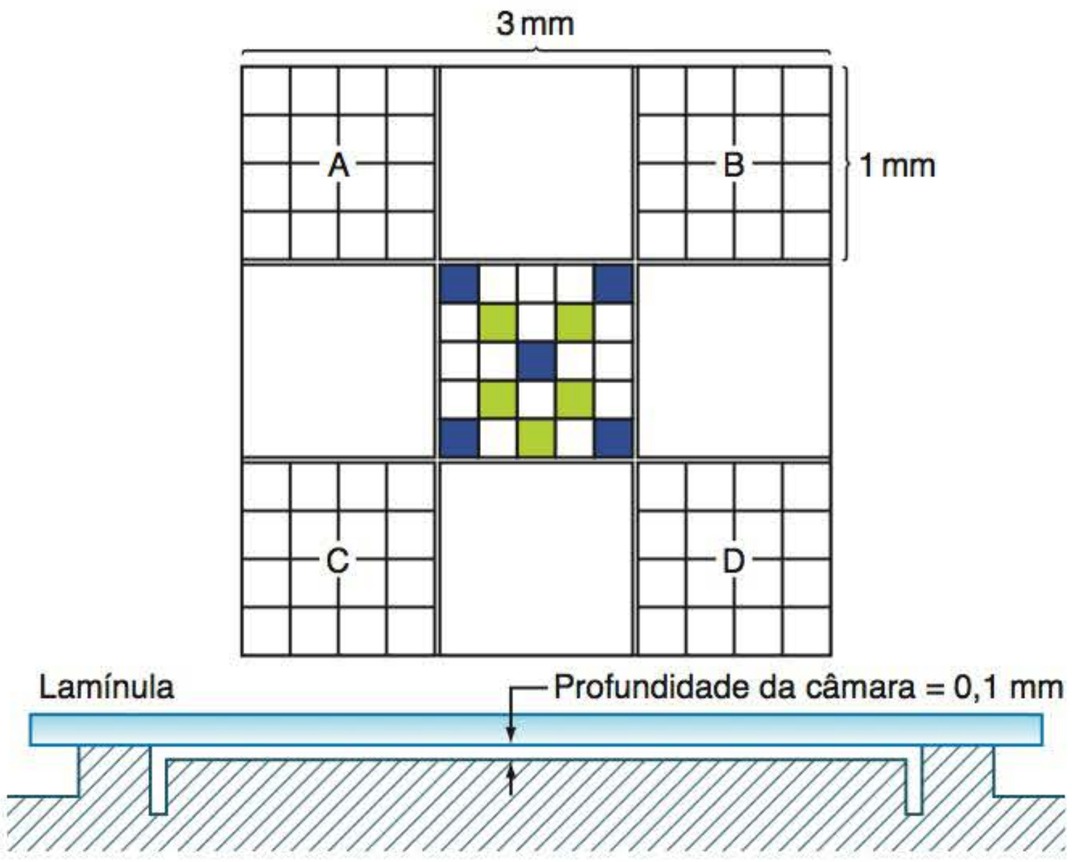


Figura 29.3 A figura de cima é um diagrama de um retículo de Neubauer aprimorado. Esse retículo é gravado na superfície de cada lado do hemocitômetro. Os quadrantes do canto grandes, A, B, C e D, são utilizados para contagens de leucócitos. Os cinco quadrantes azuis localizados no centro são utilizados para contagens de hemácias ou de plaquetas, e os 10 quadrantes verdes mais os azuis são utilizados para contagens de plaquetas. Na verdade, cada um dos 25 quadrantes no quadrante central (de 1 mm^2) possui 16 quadrantes menores no interior para facilitar a contagem. A figura de baixo é uma vista lateral da câmara com a lamínula na devida posição.

Nos casos de leucocitose, essa diluição pode ser de 1:100 ou até mesmo de 1:200.

Fontes de erro. Os erros podem ser decorrentes da natureza da amostra, da técnica adotada pelo analista e do uso de equipamento inacurado. Os erros inerentes à distribuição de células no volume de contagem são denominados erros de "campo", e podem ser minimizados apenas pela contagem de mais células.

As contagens de leucócitos realizadas em hemocitômetro apresentam um CV de aproximadamente 6,5% para contagens normais ou aumentadas, e de cerca de 15% para amostras de sangue leucopênico. Por outro lado, o uso de contadores eletrônicos resulta em CVs da ordem de 1 a 3%.

Erros devidos à natureza da amostra. A coagulação parcial do sangue venoso provoca alterações na distribuição e/ou redução do número de células. A falha em misturar totalmente o sangue de imediato antes da diluição introduz um erro que depende do grau de sedimentação.

Erros do analista. Erros decorrentes de um técnica falha podem ocorrer durante a diluição, quando a câmara é preenchida e também durante a contagem de células.

Erros devidos ao equipamento. Esse tipo de erro pode ser minimizado com o uso de pipetas e hemocitômetros certificados pelo US Bureau of Standards.

Erros inerentes ou de "campo". Até mesmo uma amostra perfeitamente homogeneizada pode apresentar variação no número de células suspendidas distribuídas em um dado volume (i. e., assentadas sobre um dado quadrante). Esse "erro de campo" é considerado o erro mínimo. Outro erro é o "erro da câmara", que inclui variações associadas a preenchimentos isolados de uma câmara, bem como a tamanhos de câmara diferentes. Há ainda o "erro de pipetagem", que engloba as variações associadas ao preenchimento de uma dada pipeta e aos diferentes tamanhos de pipeta existentes. Em uma contagem de leucócitos, se 200 células forem contadas utilizando 2 câmaras e 1 pipeta, tem-se um CV = 9,1% que corresponde a limites de confiança de 95% iguais a ± 18,2% (o dobro do CV). Quando 4 câmaras e 2 pipetas são utilizadas para contar um número de células duas vezes maior, os limites de confiança de 95% caem para ± 12,8%. Esse porcentual de erro relativamente alto tem consequências práticas irrelevantes, em decorrência da variação fisiológica da contagem de leucócitos.

Células vermelhas nucleadas. As células vermelhas sanguíneas nucleadas (CVSNs) são contadas e não podem ser distinguidas dos leucócitos com o aumento utilizado. Se estiverem presentes em número tão alto quanto o observado no esfregaço corado, deve ser realizada uma correção de acordo com a seguinte fórmula:

Contagem de leucócitos verdadeira = (contagem total × 100)/(100 + nº de CVSNs)

Em que o nº de CVSNs = nº de CVSNs contadas durante a enumeração de 100 leucócitos na contagem diferencial.

Exemplo. Um esfregaço de sangue mostra 25 CVSNs por 100 leucócitos. A contagem total de CVSNs é igual a 10.000.

Contagem de leucócitos verdadeira = (10.000 × 100)/(125) = 8.000/µl (8×10^9/L)

Valor de referência. Na contagem de leucócitos total, nenhuma distinção é feita entre os seis tipos celulares existentes (neutrófilos e bastonetes, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos). O intervalo de referência para adultos é de 4,5–11 × 10^9/L.

Contagens de plaquetas

As plaquetas são discos finos, com diâmetro de 2 a 4 µm e volume igual a 5 a 7 fL (em sangue com citrato). Atuam na homeostasia, na manutenção da integridade vascular e no processo de coagulação sanguínea.

Em amostras de sangue-EDTA, o volume médio de plaquetas (VMP) aumenta com o tempo em até 1 hora in vitro, se mantém relativamente estável entre 1 e 3 horas e, então, aumenta ainda mais com o passar do tempo. A mudança da forma discoide para a esférica contribui para esse aumento do volume aparente em EDTA, comparado ao que se observa em presença de citrato (Rowan, 1982). Para que os resultados sejam reproduzíveis, as medidas do volume das plaquetas obtidas com instrumentos multicanais devem ser realizadas entre 1 e 3 horas após a coleta de sangue. A distribuição da frequência dos volumes de plaquetas em um dado indivíduo é logarítmica normal. Entretanto, existe uma relação inversa e não linear entre o VMP e a contagem de plaquetas em indivíduos normais (Fig. 29.4). Sendo assim, os valores de referência para o VMP parecem variar com a contagem de plaquetas (Bessman, 1981). O VMP em geral aumenta nos indivíduos com hipertireoidismo (Ford, 1988) e doença mieloproliferativa (Small, 1981). É mais difícil contar plaquetas, pois estas são pequenas (é necessário distingui-las dos debris) e tendem a aderir ao vidro, a quaisquer corpos estranhos e, em particular, umas às outras. Com frequência, é possível identificar uma redução significativa do número de plaquetas durante a inspeção cuidadosa de esfregaços corados. Quando se trata de amos-

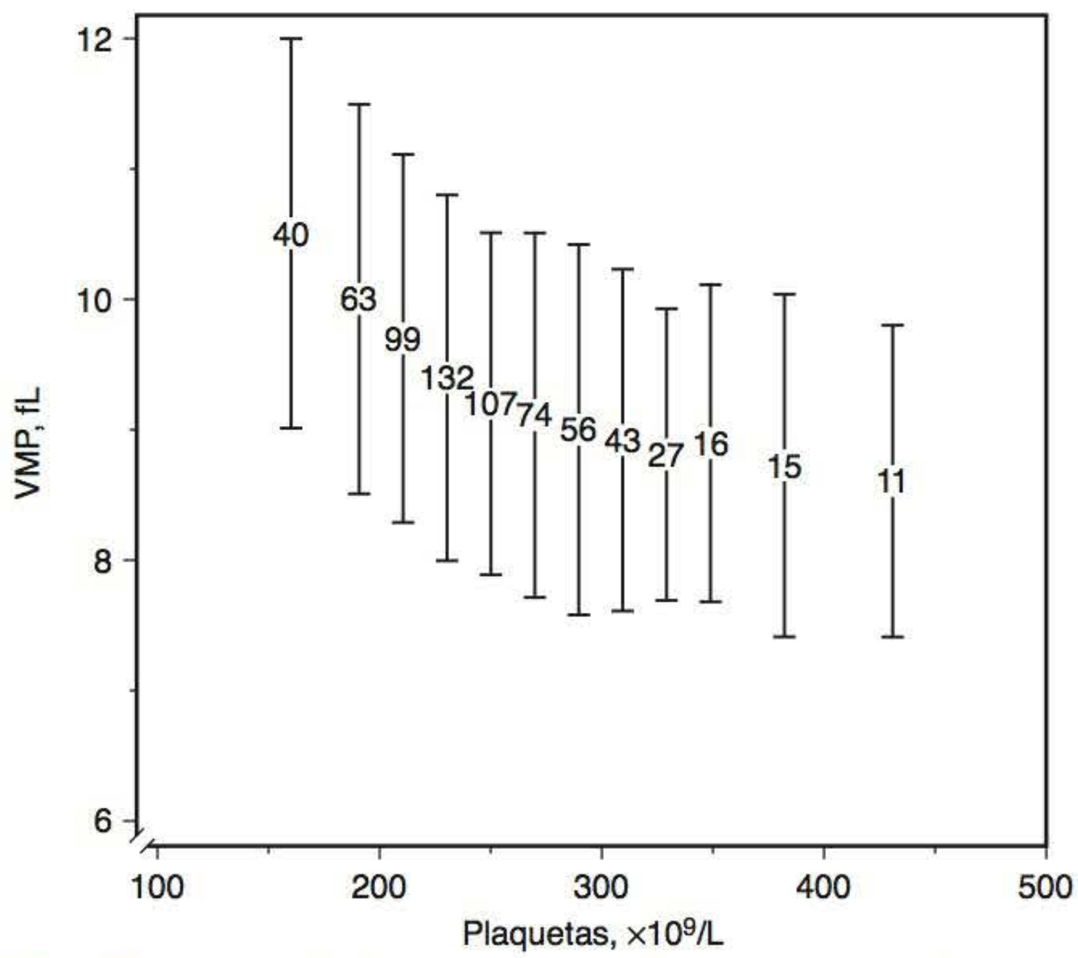


Figura 29.4 Volume médio de plaquetas relacionado à contagem plaquetária de 683 indivíduos normais. Cada grupo é mostrado como média (número) ± 2 DP (barras) de indivíduos agrupados em contagens plaquetárias de 128–179, 180–199, 200–219, 220–239, 240–259, 260–279, 280–299, 300–319, 320–339, 340–359, 360–403, 404–462 (× 10^9/L). O número na posição da média corresponde ao número de indivíduos do grupo (Bessman, 1981).

tras de sangue capilar, os esfregaços devem ser preparados de maneira uniforme e com bastante rapidez, assim que o sangue é obtido, a fim de evitar agregação e para minimizar a diminuição decorrente da adesão das plaquetas às bordas de vasos lesados. É possível realizar estimativas melhores por meio do exame de esfregaços corados de amostras de sangue venoso tratadas com anticoagulante EDTA (EDTA-sangue). Nesse material, as plaquetas são distribuídas de modo uniforme e, em geral, não ocorre agregação. O método visual de escolha utiliza o microscópio de contraste de fase. Esse é considerado o método de referência. Laboratórios que realizam mais de 5 contagens de plaquetas/dia podem justificar o uso de contadores de plaquetas eletrônicos. Nesse caso, tanto a contagem de pulsos de voltagem quanto os sistemas de contagem eletro-ópticos são satisfatórios.

Método do hemocitômetro – microscópio de contraste de fase

Amostra. O sangue venoso é coletado mediante o uso de EDTA como anticoagulante. O sangue obtido por punção cutânea a partir de feridas produz resultados mais variáveis, porém é satisfatório se estiver fluindo livremente e apenas as primeiras gotas forem utilizadas.

Solução diluente. Prepara-se uma mistura de oxalato de sódio a 1% em água destilada. A garrafa que contém a solução-estoque deve ser guardada na geladeira. A quantidade necessária ao uso do dia deve ser filtrada antes da utilização, e aquilo que sobrar é descartado ao final do expediente.

Procedimento

1. O sangue bem homogeneizado é diluído na proporção de 1:100 com líquido de diluição, e o frasco que contém a suspensão é homogeneizado em agitador mecânico, por 10 a 15 minutos.
2. O hemocitômetro é preenchido da forma usual, com o auxílio de um tubo capilar isolado para cada lado.
3. A câmara permanece coberta com uma placa de Petri por 15 minutos, para que as plaquetas se assentem em um plano óptico. Um chumaço de algodão ou papel de filtro úmido são posicionados sob a placa para prevenir evaporação.
4. As plaquetas exibem forma arredondada ou oval e, com frequência, possuem um ou mais processos dendríticos. A estrutura interna granular e o reflexo púrpura permitem distinguir as plaquetas dos debris, que costumam ser refráteis. Os fantasmas das hemácias lisadas pelo oxalato de amônio podem ser vistos ao fundo.
5. As plaquetas são contadas em 10 quadrados pequenos (os quadrados negros observados na Fig. 29.3) – 5 de cada lado da câmara. Se o número total de plaquetas contadas for menor que 100, mais quadrados pequenos são contados até que no mínimo 100 plaquetas tenham sido registradas. Podem ser contados 10 quadrados de cada lado (quadrados negros + quadrados sombreados, Fig. 29.3) ou todos os 25 quadrados do grande quadrante central, caso haja necessidade. Se o número total de plaquetas em todos os 50 quadrados pequenos ainda for menor que 50, a contagem deve ser repetida utilizando uma amostra de sangue diluída na proporção de 1:20 ou 1:10.

Cálculo. Cada um dos 25 quadrados pequenos define um volume de 1/250 μL (1/25 mm^2 de área × 1/10 mm de profundidade): contagem de plaquetas (por μL) = (nº de células contadas/nº de quadrados contados) × diluição × 250.

Ajustando-se o número de quadrados de modo que sejam contadas pelo menos 100 plaquetas, o erro de campo (erro estatístico em razão do número persistentemente limitado de plaquetas contadas na câmara) pode ser mantido na mesma faixa das contagens plaquetárias tanto baixas quanto altas. Foi demonstrado que o CV decorrente da combinação dos erros de campo, pipetagem e câmara é da ordem de 11%, quando ao menos 100 plaquetas são contadas, e de 15%, quando apenas 40 plaquetas são contadas.

A contagem plaquetária tende a ser a menos reprodutível entre as contagens de células sanguíneas, e o técnico precisa estar atento para garantir sua acurácia. Isso inclui a pronta confirmação de resultados suspeitos ou anormais com amostras recentemente colhidas. Quando a contagem plaquetária estiver em questão, como a sinalização por um aparelho, por exemplo, o esfregaço de sangue (preparado com sangue-EDTA) deve ser checado para corroborar a contagem e detectar anormalidades em plaquetas ou outros elementos sanguíneos que possam gerar valores falsos. Além disso, em razão do baixo número de plaquetas contadas pelo método manual e do alto grau de imprecisão associado à trombocitopenia severa (CV > 15%), a menor contagem a ser relatada pela quantificação manual deve ser da ordem de 7×10^9 plaquetas/L (Hanseler, 1996).

Fontes de erro. O sangue em EDTA é considerado satisfatório por até 5 horas após a coleta, quando mantido a 20ºC, ou por até 24 horas, se mantido a 4ºC, desde que nenhuma dificuldade tenha sido encontrada durante a coleta. A presença de agregados de plaquetas na câmara implica má distribuição e anula a confiabilidade da contagem. Nessa situação, torna-se necessário coletar uma nova amostra de sangue. É provável que as causas da aglutinação plaquetária se devam ao início da agregação das plaquetas e da coagulação antes de o sangue entrar em contato com o anticoagulante; venipuntura imperfeita; atraso do contato entre o anticoagulante e o sangue; ou, na técnica de punção cutânea, demora em realizar a amostragem. O sangue capilar gera valores médios similares, contudo os erros equivalem a cerca do dobro daqueles produzidos por amostras de sangue venoso, provavelmente porque o nível de plaquetas varia nas sucessivas gotas de sangue obtidas por punção cutânea de feridas.

Contagens falsamente altas. Fragmentos de citoplasma de leucócitos, que por vezes são numerosos nas leucemias, podem provocar elevações falsas na contagem. Nesses casos, o método do hemocitômetro com contraste de fase deve ser empregado com uma correção baseada na proporção de fragmentos em relação à concentração de plaquetas, determinada a partir do esfregaço sanguíneo.

Contagens falsamente baixas. Valores falsamente baixos podem ser obtidos quando as plaquetas aderem aos neutrófilos (satelitismo plaquetário) ou quando há aglutinação de plaquetas por ação das aglutininas (Lombarts, 1988), agregação espontânea ou coagulação incipiente decorrente de uma coleta de sangue mau feita. Os dois primeiros fenômenos parecem depender do EDTA (Dacie, 1991). A incidência relatada de casos de aglutinação plaquetária induzida por EDTA *in vitro* e pseudotrombocitopenia varia de 0,1 (Bartels, 1997) a 2% (Lippi, 1990). As alterações ocorridas nos histogramas de plaquetas ou nas medidas de *cutoff* quantitativo deles derivadas devem ser utilizadas na triagem dos casos de pseudotrombocitopenia (Bartels, 1997).

Variação na contagem plaquetária automatizada

Acompanhando cada equipamento, existem diretrizes-padrão que determinam a realização de contagens manuais de plaquetas abaixo e acima das faixas de referência estabelecidas. Exemplificando, uma contagem de plaquetas automatizada, realizada em aparelho Technicon HP81, cujos valores sejam inferiores a 30×10^9/L, deve ser substituída pelo procedimento manual (Hanseler, 1996).

Comparando o ADVIA 120 ao Coulter STKS, Stanworth et al. (1999) mostraram que, em certos casos de trombocitopenia decorrente do consumo periférico, o ADVIA forneceu valores mais altos de contagem plaquetária, enquanto o esfregaço sanguíneo detectou a presença de algumas plaquetas grandes. É provável que estudos adicionais utilizando anticorpos monoclonais específicos para plaquetas, como o CD61, determinem a contagem mais correta. Cantero et al. (1996) demonstraram que a existência de plasma visivelmente turvo nas amostras de sangue resultou, em média, em um aumento de 47% das contagens plaquetárias realizadas com o Technicon H P83.

Os valores de referência para as contagens de plaquetas são de 150 a 450×10^9/L. Os valores de referência para VMP são de cerca de 6,5 a 12 fL em indivíduos adultos.

Plaquetas reticuladas

Plaquetas reticuladas são aquelas recém-liberadas na circulação, que possuem RNA residual. As contagens de plaquetas reticuladas são estimativas da trombopoiese (Rapi, 1998), análogas ao uso da contagem de reticulócitos para estimação da eritropoese. Matic et al. (1998) descreveram um método de análise por citometria de fluxo otimizado, que requer incubação do sangue total com alaranjado de tiazol, cuja fluorescência é 3.000 vezes mais intensa após a ligação ao RNA. Para distinguir as plaquetas das demais células ou de debris, a mistura de incubação deve conter anticorpos marcados com fitoeritrina e dirigidos contra a molécula GPIb na superfície das plaquetas. A eritropoetina humana recombinante parece melhorar a função plaquetária em

casos de uremia, não só por corrigir a anemia, mas porque também aumenta a concentração de plaquetas jovens, as quais são detectadas como plaquetas reticuladas (Tassies, 1998). Os níveis medianos significativamente mais baixos de plaquetas reticuladas em doadores frequentes de plaquetaferese, comparados aos níveis observados em novos doadores, sugerem que doações repetidas de plaquetas podem levar a uma relativa exaustão da trombopoiese (Stohlawetz, 1998). Dependendo das condições de quantificação, pode haver uma enorme variação (3–20%) dos valores normais de plaquetas reticuladas publicados (Matic, 1998).

Valores de plaquetas reticuladas aumentados foram descritos na púrpura trombocitopênica idiopática (Koike, 1998; Saxton, 1998) e no hipertireoidismo (Stiegler, 1998). Em recém-nascidos cuja gestação teve duração inferior a 30 semanas, foi demonstrado que a contagem de plaquetas reticuladas era equivalente ao dobro dos valores encontrados em bebês de gestação completa (Peterec, 1996). Na recuperação da medula óssea após a quimioterapia para leucemia mieloide aguda (LMA) observou-se um aumento dos níveis de plaquetas reticuladas depois do 20º dia (Stohlawetz, 1999). Valores reduzidos de plaquetas reticuladas foram relatados em associação à aplasia e cirrose hepática (Koike, 1998; Saxton, 1998).

Contagem eletrônica

Em razão do custo relativamente baixo, tempo reduzido (de trabalho e para obtenção de resultados) e maior acurácia dos analisadores automáticos, o uso de instrumentos semiautomáticos na prática clínica se tornou raro nos dias atuais. Desempenho veloz, eliminação do cansaço visual do técnico e melhora da precisão constituem as vantagens decisivas proporcionadas pelos contadores de células eletrônicos, em relação aos métodos manuais/hemocitômetro para realização de contagens de células sanguíneas. Os instrumentos de contagem eletrônicos são discutidos em mais detalhes adiante, na seção "Tecnologia instrumental".

Variação fisiológica

Variação fisiológica nos eritrócitos

Os valores de hemácias sofrem alterações maiores durante as primeiras semanas de vida (Fig. 29.5). Ao nascimento, 100 a 125 mL de sangue placentário podem ser transferidos ao recém-nascido, caso o cordão seja preso somente após o término de sua pulsação. Em um estudo sobre recém-nascidos cujos cordões demoraram a ser pinçados, a média das contagens de hemácias capilares foi de $0,4 \times 10^{12}$/L mais alta após um atraso de 1 hora, e $0,8 \times 10^{12}$/L maior 24 horas após o nascimento, em comparação aos valores encontrados para recém-nascidos que tiveram o cordão preso sem demora. O sangue capilar (obtido por punção cutânea) fornece valores de CVS e Hb mais altos que o sangue venoso (cordão). As diferenças podem chegar a cerca de $0,5 \times 10^{12}$ CVSs/L e 3 g de Hb/dL. A lentificação da circulação capilar e consequente perda de líquidos podem ser os fatores responsáveis. O exame de sangue venoso fornece resultados mais consistentes que o exame de sangue capilar.

Em um bebê nascido a termo, a concentração média de hemácias nucleadas é em torno de $0,5 \times 10^{9}$/L. A contagem de normoblastos declina para aproximadamente 200/μL em 24 horas, 25/μL em 48 horas, e menos de 5/μL em 72 horas. Aos 7 dias, é raro encontrar normoblastos circulantes (Barone, 1999).

Ao nascimento, a *contagem de reticulócitos* normal varia de 3 a 7% durante as primeiras 48 horas, apresentando um leve aumento. Após o segundo dia, os valores caem mais rapidamente para 1 a 3% em torno do 7º dia de vida. A concentração média de Hb no sangue capilar ainda no primeiro dia de vida é igual a 19 g/dL, com 95% dos valores normais caindo para 14,6 a 23,4 g/dL. No sangue do cordão, a média é de 16,8 g/dL, com 95% dos valores normais entre 13,5 e 20 g/dL. Os níveis de Hb do sangue venoso com frequência aumentam ao final de 24 horas, em comparação aos níveis encontrados no sangue do cordão. Ao final da primeira semana, esses níveis se tornam quase iguais aos do sangue do cordão e passam a cair antes da segunda semana. Durante as primeiras 2 semanas de vida, o limite mínimo considerado normal é 14,5 g/dL para o sangue capilar e 13 g/dL para o sangue venoso. No primeiro dia de vida, o hematócrito do sangue capilar atinge um valor médio de 0,61, com 95% dos valores normais entre 0,46 e 0,76. No sangue do cordão, a média é 0,53. As alterações que ocorrem durante as primeiras semanas de vida seguem a concentração de Hb. A Hb e o Hct atingem seus valores mais altos ao nascimento, contudo acabam caindo abruptamente ainda nos primeiros dias e semanas de vida, atingindo valores mínimos aos 2 meses de idade. Nesse momento, o limite inferior dos valores de referência de 95% e a concentração média de Hb correspondem a 9,4 e 11,2 g/dL, enquanto os valores para o Hct são, respectivamente, 0,28 e 0,35. Após 4 meses de idade, o limite mínimo para a Hb é de 11,2 g/dL e, para o Hct, 0,32. Esses valores sofrem um aumento gradual até mais ou menos os 5 anos de idade e, subsequentemente, de forma mais abrupta nos meninos que nas meninas (Shannon, 1996). O VCM normal ao nascimento varia de 110 a 118 fL, comparado ao intervalo de referência para indivíduos adultos de 80 a 96 fL. Como os níveis de CVS não caem tanto quanto os de Hb e hematócrito, o VCM diminui

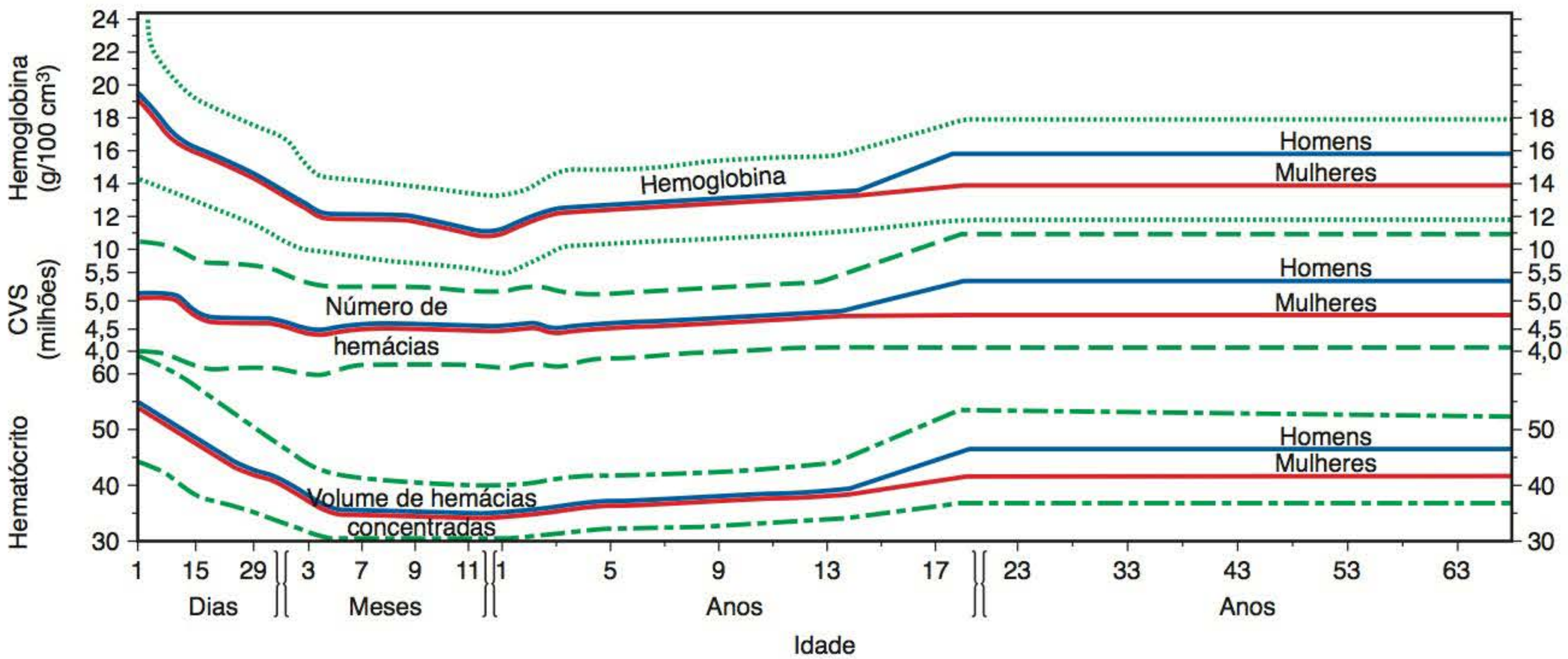


Figura 29.5 Valores para hemoglobina, hematócrito (volume de hemácias concentradas) e contagens de hemácias desde o nascimento até a idade avançada. Os valores das médias são representados pela linha contínuas. O intervalo de referência para a hemoglobina é indicado pelas linhas pontilhadas; para as contagens de hemácias está representado pelas linhas interrompidas; e, para o hematócrito, pelas linhas pontilhadas e interrompidas. As escalas da ordenada são semelhantes às das alterações relativas ocorridas no conteúdo de hemoglobina, na contagem de hemácias e no hematócrito, que são aparentes à inspeção. A escala da idade, contudo, é progressivamente alterada (Wintrobe, 1974).

de forma abrupta e, em seguida, passa a cair de forma mais gradativa durante os primeiros meses de vida. Os valores mais baixos são alcançados em cerca de 1 ano. Em estudos que excluíram a deficiência de ferro e a talassemia, o limite de referência mínimo (valores referenciais de 95%) para o VCM aumentou gradualmente entre 1 e 15 anos de idade – de 70 a 76 fL nos meninos e de 70 a 78 fL nas meninas (Shannon, 1996). Os intervalos de referência para valores de hemácias em indivíduos adultos e sexualmente maduros são mostrados na Tabela 29.2. Os índices são semelhantes em homens e mulheres, contudo os níveis de Hb são 1 a 2 g/dL mais altos nos homens, com incrementos comensuráveis no Hct e na concentração de CVSs (Fig. 29.5). Acredita-se que tais diferenças se devam, sobretudo, aos efeitos dos andrógenos na estimulação da produção de eritropoetina e seu efeito sobre a medula. Em homens idosos, os níveis de Hb tendem a cair, enquanto nas mulheres idosas os níveis de Hb tendem a sofrer uma queda menor (em alguns estudos) ou mesmo apresentam um leve aumento (em outros estudos). Em indivíduos de idade avançada, portanto, a diferença existente entre os sexos é menor que 1 g Hb/dL (Dacie, 1991). A postura e a atividade muscular modificam a concentração dos elementos formados. A Hb, Hct e CVSs sofrem aumento de vários porcentuais quando um indivíduo em posição recumbente se levanta e fica em pé, enquanto a atividade muscular extenuante também produz aumentos, provavelmente em razão da perda de água do plasma. Também há uma variação diurna que não está relacionada à prática de exercícios nem à variação analítica. Os níveis de Hb atigem seu valor máximo pela manhã, caem ao longo do dia e atingem valores mínimos durante a noite, com uma diferença de 8 a 9% (Dacie, 1991).

Indivíduos que vivem em locais de altitude mais alta apresentam níveis mais elevados de Hb, Hct e CVS do que apresentariam se morassem ao nível do mar. Essa diferença é de aproximadamente 1 g Hb/dL a 2 km de altitude e de 2 g Hb/dL a 3 km. O aumento da eritropoese é secundário à estimulação anóxica da produção de eritropoetina. Indivíduos fumantes também tendem a apresentar uma discreta eritrocitose.

Tabela 29.2 Valores típicos de contagem de células sanguíneas em uma população de adultos jovens normais

	Homens	Mulheres
Contagem de leucócitos (× 10^9/L de sangue)	7,8 (4,4–11,3)	
Contagem de hemácias (× 10^{12}/L de sangue)	5,21 (4,52–5,90)	4,60 (4,10–5,10)
Hemoglobina (g/dL de sangue)	15,7 (14,0–17,5)	13,8 (12,3–15,3)
Hematócrito (porcentual)	46 (41,5–50,4)	40,2 (35,9–44,6)
Volume celular médio (fL/hemácia)	88,0 (80,0–96,1)	
Hemoglobina celular média (pg/hemácia)	30,4 (27,5–33,2)	
Concentração de hemoglobina celular média (g/dL de CVSs)	34,4 (33,4–35,5)	
Amplitude da distribuição de hemácias (CV, porcentual)	13,1 (11,6–14,6)	
Contagem de plaquetas (× 10^9/L de sangue)	311 (172–450)	

São fornecidos a média e o intervalo de referência (faixa normal). Como as curvas de distribuição podem ser não gaussianas, o intervalo de referência é o intervalo de confiança de 95% central e não paramétrico. Os resultados se baseiam em 426 homens adultos normais e 212 mulheres adultas normais. Os estudos foram conduzidos em analisador Coulter, modelo S-Plus IV (Morris, 1975).

Variação fisiológica nos leucócitos

A contagem total de CBSs ao nascimento e durante as primeiras 24 horas varia dentro de amplos limites. Os neutrófilos são as células predominantes, e sua concentração varia de 6×10^9 a 28×10^9 células/L. Cerca de 15% desse total corresponde à forma de bastonete (Altman, 1974), e um número pequeno de mielócitos está presente. O número de neutrófilos cai para cerca de 5×10^9 células/L durante a primeira semana e assim permanece subsequentemente. A concentração de linfócitos ao nascimento é em torno de $5{,}5 \times 10^9$ células/L e sofre pouca alteração no decorrer da primeira semana. Os linfócitos se tornam o tipo celular predominante, em média, após a primeira semana de vida, e essa situação se mantém até cerca de 7 anos de idade. A partir de então, os neutrófilos passam a predominar de novo. O limite máximo do intervalo de referência de 95% para os linfócitos aos 6 meses é de $13{,}5 \times 10^9$ células/L, em 1 ano passa a $10{,}5 \times 10^9$ células/L, em 2 anos é de $9{,}5 \times 10^9$ células/L, aos 6 anos é de 7×10^9 células/L, e aos 12 anos de idade é igual a 6×10^9 células/L. Para os neutrófilos, os valores correspondentes às mesmas idades são, respectivamente: 8,5, 8,5, 8,5, 8,0 × 10^9 8,0 × 10^9 células/L. Os valores para neutrófilos são um pouco mais altos que os valores para indivíduos adultos (ver Tab. 29.3).

Constatou-se que a contagem de neutrófilos sofre variação diurna, apresentando níveis mais altos durante a tarde e níveis mais baixos pela manhã, no indivíduo em repouso. O exercício produz leucocitose, e esta inclui aumento da concentração de neutrófilos, decorrente do deslocamento das células a partir da população marginal para o grupo de granulócitos circulantes. A drenagem aumentada de linfócitos para o sangue também parece contribuir para o aumento total observado. Os valores de referência médio e mínimo para concentração de neutrófilos na população negra são menores que na população branca. Essa diferença deve ser considerada nas avaliações de neutropenia. Fumantes apresentam contagem média de leucócitos mais alta que indivíduos não fumantes. O maior aumento (cerca de 30%) é

Tabela 29.3 Valores normais de contagem de leucócitos, contagem diferencial e concentração de hemoglobina em várias idades

	Leucócitos*								
Idade	**Total de leucócitos**	**Total de neutrófilos**	**Neutrófilos bastonetes**	**Neutrófilos segmentados**	**Eosinófilos**	**Basófilos**	**Linfócitos**	**Monócitos**	**Hemoglobina (g/dL de sangue)**
12 meses	11,4 (6,0–17,5)	3,5 (1,5–8,5) *31*	0,35 *3,1*	3,2 (1,0–8,5) *28*	0,30 (0,05–0,70) *2,6*	0,05 (0–0,20) *0,4*	7,0 (4,0–10,5) *61*	0,55 (0,05–1,1) *4,8*	12,6 (11,1–14,1)
4 anos	9,1 (5,5–15,5)	3,8 (1,5–8,5) *42*	0,27 (0–1,0) *3,0*	3,5 (1,5–7,5) *39*	0,25 (0,02–0,65) *2,8*	0,05 (0–0,2) *0,6*	4,5 (2,0–8,0) *50*	0,45 (0–0,8) *5,0*	12,7 (11,2–14,3)
6 anos	8,5 (5,0–14,5)	4,3 (1,5–8,0) *51*	0,25 (0–1,0) *3,0*	4,0 (1,5–7,0) *48*	0,23 (0–0,65) *2,7*	0,05 (0–0,2) *0,6*	3,5 (1,50–7,0) *42*	0,40 (0–0,8) *4,7*	13,0 (11,4–14,5)
10 anos	8,1 (4,5–13,5)	4,4 (1,8–8,0) *54*	0,24 (0–1,0) *3,0*	4,2 (1,8–7,0) *51*	0,20 (0–0,60) *2,4*	0,04 (0–0,2) *0,5*	3,1 (1,5–6,5) *38*	0,35 (0–0,8) *4,3*	13,4 (11,8–15,0)
21 anos	7,4 (4,5–11,0)	4,4 (1,8–7,7) *59*	0,22 (0–0,7) *3,0*	4,2 (1,8–7,0) *56*	0,20 (0–0,45) *2,7*	0,04 (0–0,2) *0,5*	2,5 (1,0–4,8) *34*	0,30 (0–0,8) *4,0*	15,5 (13,5–17,5) 13,8 (12,0–15,6)

* Valores expressos em valores de média (referência de 95%). Para os tipos celulares das contagens de leucócitos e diferencial, as unidades são células × 10^9/μL; os valores em itálico são porcentuais médios.

Fonte: For leukocyte and differential count (Altman, 1961); For hemoglobin concentrations (Dalman, 1987).

apresentado por indivíduos que fumam muito e inalam fumaça, afetando os neutrófilos, linfócitos e monócitos.

Alterações discretas parecem ocorrer durante o ciclo menstrual. O número de neutrófilos e monócitos diminui, enquanto o de eosinófilos tende a aumentar durante a menstruação. Foi relatado que a concentração de basófilos sofre uma queda durante a ovulação. A disponibilidade de analisadores de leucócitos automáticos e precisos proporciona o potencial de investigar as fontes fisiológicas de variação que permanecem obscuras em decorrência do erro estatístico associado às contagens diferenciais microscópicas tradicionais (Statland, 1978).

Variação fisiológica nas plaquetas

Em média, a contagem de plaquetas é um pouco menor ao nascimento que em crianças e adultos, podendo variar de 84 a 478 · 10^9/L (Barone, 1999). Após a primeira semana de vida, os intervalos de referência se transformam naqueles de um indivíduo adulto. Em mulheres, a contagem de plaquetas pode cair durante o período menstrual. Mulheres possuem contagem de plaquetas (e de CBSs e neutrófilos) maior que a dos homens. Comparados aos caucasianos, os africanos (e, em menor grau, afro-caribenhos) apresentam contagens menores de plaquetas, CBS e neutrófilos (Bain, 1996). As médias descritas (faixas de referência de 95%) para contagens plaquetárias foram 218 (143–332) para homens caucasianos e 183 (115–290) para homens africanos, *versus* 246 (169–358) para mulheres caucasianas e 207 (125–342) para mulheres africanas. Estudando indivíduos australianos que viviam a oeste de Sydney e tinham 49 anos de idade ou mais, Tsang et al. (1998) relataram valores médios de contagens plaquetárias iguais a 247 (128–365) para homens e 275 (147–403) para mulheres.

Taxa de sedimentação eritrocitária

A taxa de sedimentação eritrocitária (ESR) é um marcador de inflamação subjacente útil, ainda que inespecífico. Nos últimos anos, a proteína C reativa de alta sensibilidade e outros marcadores inflamatórios têm sido utilizados para detectar ou monitorar doenças, em particular a doença cardiovascular e a síndrome metabólica (Rifai, 2005; Pearson, 2003). Quando sangue venoso bem homogeneizado é colocado em um tubo de ensaio posicionado na vertical, os eritrócitos tendem a ir para o fundo. O intervalo de tempo decorrido para que o topo da coluna de eritrócitos desça é denominado ESR. Vários fatores estão envolvidos.

Fatores plasmáticos

Uma ESR acelerada é favorecida por níveis elevados de fibrinogênio e, em menor extensão, de globulinas α_2, β, e γ. Essas moléculas proteicas assimétricas exercem maior efeito que outras proteínas na redução da carga negativa dos eritrócitos (potencial ζ), que tende a mantê-los afastados. O potencial ζ reduzido promove formação do empilhamento (*rouleaux*) que, por sua vez, sedimenta mais rápido que as células isoladas. A remoção do fibrinogênio por desfribinação reduz a ESR. Não há nenhuma correlação absoluta entre a ESR e qualquer uma das frações de proteínas plasmáticas. A albumina e a lecitina retardam a sedimentação, enquanto o colesterol acelera a ESR.

Fatores eritrocitários

A anemia aumenta a ESR, pois a alteração da proporção plasmática de eritrócitos favorece a formação do empilhamento, independentemente das alterações que envolvem a concentração plasmática de proteínas. Seja qual for o método quantitativo, a ESR é mais sensível às proteínas plasmáticas alteradas na faixa de hematócrito correspondente a 0,3 a 0,4 (Bull, 1975). A taxa de sedimentação é diretamente proporcional ao peso do agregado celular e inversamente proporcional à área de superfície. Os micrócitos sedimentam de forma mais lenta que os macrócitos, cujas proporções de área superficial/volume são menores. O empilhamento também está associado a uma reduzida proporção de área superficial/volume e acelera a ESR. Hemácias com formato anormal ou irregular, como células falciformes ou esferócitos, impedem a formação do empilhamento e retardam a ESR.

Estágios da ESR

Podem ser observados três estágios: (1) o estágio correspondente aos 10 minutos iniciais, em que há pouca sedimentação à medida que o empilhamento se forma; (2) um estágio seguinte de cerca de 40 minutos, quando há deposição a uma taxa constante; e (3) a fase correspondente aos 10 minutos finais, em que a sedimentação se lentifica à medida que as células se concentram no fundo do tubo.

Métodos

Método de Westergren

Dada sua simplicidade, o método de Westergren é muito utilizado. O ICSH (1993) o recomendou como método de referência que utiliza sangue total não diluído. O ICSH determina que o hematócrito do paciente não deve exceder 35%, pois a reprodutibilidade da sedimentação pode ser mais precária em tubos estreitos. A fórmula usada para conversões da ESR entre sangue diluído e não diluído é: ESR de sangue diluído = (ESR de sangue não diluído × 0,86) – 12

Equipamento. O tubo de Westergren consiste em uma pipeta reta com comprimento de 30 cm e diâmetro interno de 2,55 mm, que é calibrada em 0 a 200 mm. Sua capacidade é de aproximadamente 1 mL. Também é utilizada a estante de Westergren e, se necessário, niveladores para manter o tubo em posição vertical.

Reagente. Uma solução 0,105 M (faixa de 0,1 a 0,136) de citrato de sódio é empregada como solução diluente-anticoagulante (31 g de $Na_3C_6H_5 \bullet H_2O$ adicionados a 1 L de água destilada em uma garrafa de vidro estéril). Essa solução é filtrada é mantida sob refrigeração, sem adição de conservantes.

Procedimento

1. Dois mL de sangue total são adicionados a 0,5 mL de citrato de sódio e misturados por inversão.
2. Uma pipeta de Westergren é preenchida até a marca 0 e posicionada exatamente na vertical, na estante, à temperatura ambiente e sem vibração nem exposição direta à luz solar.
3. Decorridos exatamente 60 minutos, registra-se a distância em mm desde a marca 0 até o topo da coluna de hemácias, sendo esse valor a ESR. Caso a demarcação entre o plasma e a coluna de hemácias seja obscura, o nível é determinado pelo local em que a densidade total aparece primeiro.

Método de Westergren modificado

Uma modificação do método de Westergren produz os mesmos resultados, porém utiliza sangue tratado com anticoagulante EDTA, em vez de citrato de sódio. Esse método é mais conveniente, pois permite que a ESR seja realizada a partir do mesmo tubo de sangue utilizado para realização de outros estudos hematológicos. Cerca de 2 mL de sangue-EDTA bem homogeneizado são diluídos com 0,5 mL de citrato de sódio a 3,8% ou 0,5 mL de cloreto de sódio a 0,85%. O sangue não diluído e tratado com anticoagulante EDTA fornece uma fraca precisão (ICSH, 1977). A ESR aumenta de forma gradual com a idade. Os limites superiores normais originais de Westergren (10 mm/h para homens e 20 mm/h para mulheres) parecem ser muito baixos. De acordo com os estudos de Böttiger & Svedberg (1967) e de Zauber & Zauber (1987), os limites superiores dos valores de referência para o método de Westergren deveriam ser os seguintes:

	Homens	Mulheres
Abaixo dos 50 anos	15 mm/h	20 mm/h
Acima dos 50 anos	20 mm/h	30 mm/h
Acima dos 85 anos	30 mm/h	42 mm/h

Smith & Samadian (1994) afirmam que a elevação da ESR com o avanço da idade provavelmente reflete uma maior prevalência de enfermidade entre idosos e, assim, para fins práticos, pode ser recomendável usar a faixa normal padrão para pacientes idosos.

Fontes de erro

Se a concentração de anticoagulante for maior que a recomendada, é possível que a ESR seja elevada. Tanto o citrato de sódio quanto o EDTA não afetam a taxa de sedimentação quando utilizados em concentrações apropriadas. Por outro lado, a heparina altera o potencial ˙ de membrana e não pode ser utilizada como anticoagulante. A heparina também aumenta a ESR quando empregada como medicação *in vivo* (Penchas, 1978). A ESR é afetada pela permanência de bolhas no tubo durante seu preenchimento. A hemólise pode modificar a sedimentação. O grau de limpidez do tubo é um fator importante. A ESR pode ser acelerada se o

tubo for inclinado. As hemácias se agregam no lado mais baixo, enquanto o plasma sobe pelo lado superior. Em consequência, a influência retardadora do plasma em ascensão se torna menos efetiva. Um ângulo de até mesmo 3º em relação à vertical é capaz de acelerar a ESR em até 30%. Pipetas plásticas de ESR estão associadas a valores discretamente maiores (1 a 2 mm/h) que as de vidro (Schneiderka, 1997).

A temperatura deve estar na faixa de 20 a 25ºC. Em certos casos, temperaturas inferiores ou superiores alteram a ESR. Se o sangue for mantido sob refrigeração, deverá atingir a temperatura ambiente e ser homogeneizado por inversão ao menos 8 vezes, antes do início do teste. A realização do teste deve ser programada para ter início 2 horas após a coleta da amostra de sangue (ou após 12 horas, caso seja utilizado anticoagulante EDTA e a amostra tenha sido mantida a 4ºC). Se esse procedimento não for adotado, algumas amostras com ESR elevada apresentarão valores de ESR falsamente baixos (Morris, 1975). Na amostra deixada em repouso, os eritrócitos tendem a se tornar esféricos e a formar o empilhamento de forma mais lenta.

Diferentemente do método de Wintrobe, o método de Westergren não dispõe de recursos que corrijam a anemia com eficácia.

Aparelho VES-MATIC 20

O aparelho VES-MATIC 20 é um analisador de bancada projetado para medir a ESR em 20 amostras de sangue (Plebani, 1998; Caswell, 1991). É totalmente automatizado. O sangue é coletado em cubetas especiais e homogeneizado com cuidado pelo aparelho. Em seguida, as amostras são deixadas em repouso para sedimentação durante um determinado período. A inclinação dos tubos em 18º em relação ao eixo vertical acarreta a aceleração da sedimentação, produzindo em 25 e 45 minutos resultados comparáveis àqueles que se obtém por Westergren na primeira e na segunda hora, respectivamente. Os sensores óptico-elétricos leem automaticamente o nível de sedimentação eritrocitária. Os dados são elaborados e, então, impressos ou exibidos para visualização em tela.

Método de micro-ESR

Trata-se de um método mais útil a pacientes pediátricos. Barrett & Hill (1980) descreveram um método de micro-ESR que utiliza 0,2 mL de sangue para preencher um tubo de ensaio descartável de 230 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno. Os valores referentes ao sangue capilar apresentaram boa correlação com os valores obtidos por micro-ESR de sangue venoso e ESR de Westergren. Kumar & Singhi (1994) fizeram referência a uma micro-ESR (mESR) que utilizava sangue total para preencher por completo um tubo capilar de micro-hematócrito de 75 mm heparinizado.

Aplicação

A ESR é um dos testes laboratoriais mais antigos ainda em uso. Apesar de ter perdido um pouco de sua utilidade, à medida que métodos mais específicos de avaliação de doenças (como o de detecção de CRP) foram sendo desenvolvidos (Zlonis, 1993), novas aplicações clínicas têm sido descritas (Saadeh, 1998). Recentemente, foi relatado que a ESR apresenta significado clínico em casos de anemia falciforme (valor baixo na ausência de crise dolorosa, aumentando de forma moderada em 1 semana na crise), osteomielite (elevada, auxilia no monitoramento da terapia), derrame (ESR ≥ 28 mm/h associada a um prognóstico pior), câncer de próstata (ESR ≥ 37 mm/h associada a maior incidência de progressão da doença e morte), e doença arterial coronariana (DAC) (ESR > 22 mm/h em homens brancos associada ao risco aumentado de DAC) (Saadeh, 1998). Na gravidez, a ESR sofre um aumento moderado que tem início na 10ª a 12ª semana e volta ao normal em 1 mês durante o pós-parto. A ESR tende a estar acentuadamente elevada em distúrbios que envolvem proteínas sanguíneas monoclonais, tais como mieloma múltiplo ou macroglobulinemia, hiperglobulinemias policlonais severas decorrentes de doença inflamatória e hiperfibrinogenemias.

Elevações moderadas são comuns em casos de doença inflamatória ativa, como AR, infecções crônicas, doença do colágeno e doença neoplásica. A ESR tem pouco valor diagnóstico nesses distúrbios, mas é útil para o monitoramento da atividade da doença. É uma medida mais simples que a quantificação de proteínas séricas, que tende a substitui-la. Como o resultado do teste é frequentemente normal para pacientes com neoplasias, doença do tecido conjuntivo e infecções, uma ESR normal não pode ser utilizada para excluir essas possibilidades diagnósticas. Em pacientes com câncer, todavia, em geral há metástases diante de valores de ESR acima de 100 mm/h (Sox, 1986). A ESR tem pouca utilidade para a triagem de pacientes assintomáticos que apresentam doença; a história e o exame físico em geral revelam a causa de uma ESR elevada (Sox, 1986). Por outro lado, a ESR é útil e indicada para o estabelecimento do diagnóstico e monitoramento da polimialgia reumática e da arterite temporal, quando a taxa costuma exceder 90 mm/h (Zlonis, 1993). Os médicos que atendem emergências continuam utilizando a ESR para avaliar casos de arterite temporal, artrite séptica, doença inflamatória pélvica e apendicite (Olshaker, 1997). Freeman (1997) insiste na necessidade da rápida estimação da ESR em casos de indicação clínica de arterite de células gigantes, uma vez que o atraso de apenas algumas horas em iniciar a terapia com esteroides resulta em perda visual irreversível. Harrow et al. 1999) concluíram que uma ESR ≤ 5 mm em 30 minutos identifica de forma correta a maioria dos pacientes com ESR normal, sem classificar ESR elevadas erroneamente.

Na doença de Hodgkin, pode haver um prognóstico bastante útil nas determinações sanguíneas na ausência de sintomas (febre, perda de peso, sudorese noturna) sistêmicos ("B"). Em outro estudo (Vaughan Hudson, 1987), um terço dos pacientes assintomáticos apresentaram tanto ESR < 10 mm/h quanto uma excelente taxa de sobrevida, seja qual for a idade, estágio ou histopatologia. Os pacientes assintomáticos com ESR ≥ 60 mm/h apresentaram taxa de sobrevida tão precária quanto aqueles que tinham sintomas sistêmicos.

Segundo Iversen et al. (1996), 76% dos pacientes com carcinoma de células renais apresentavam uma elevada ESR, que havia aumentado significativamente por até 6 anos antes de o diagnóstico ser estabelecido. Esses pesquisadores defendem uma representação gráfica sistemática e a determinação dos níveis basais da ESR ao longo do tempo, a qual mostra aumento marcante da ESR 1 ano antes do diagnóstico. Essa tendência de elevação da ESR deve conduzir a novas investigações, como o exame de ultrassonografia renal, que, por sua vez, pode orientar a realização de uma nefrectomia curativa antes do aparecimento de metástases.

Tecnologia instrumental

Os instrumentos com canais múltiplos, que são utilizados em laboratórios modernos para realização das contagens celulares, baseiam-se nos princípios de impedância elétrica, dispersão da luz, condutividade por radiofrequência e/ou citoquímica (Ward, 2000). Os princípios dessas técnicas são discutidos na próxima seção.

Impedância elétrica

As células que passam por uma abertura onde há fluxo de corrente provocam alterações na resistência elétrica, as quais são contadas como pulsos de voltagem. Esse princípio, ilustrado na Figura 29.6, é empregado nos equipamentos comercializados pela Coulter (LH 700, GEN•S, HmX, A•T etc.; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA), Sysmex (XE-2100, XT 2000i, HST-N etc.; Sysmex America Inc., Mundelein, IL), Abbott (Cell-Dyn 3500, 3700, 4000 etc.; Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA), ABX (Micros 60, Pentra 60, Pentra 120, Pentra 120 Retic etc.; ABX Diagnostics, Inc., Irvine, CA), entre outras empresas. Uma suspensão de sangue (SS) diluída com acurácia é produzida com uma solução isotônica condutora que preserva o formato celular. O instrumento possui um cilindro de vidro (ClV) que pode ser preenchido com líquido condutor e tem um eletrodo (E_2) e uma abertura (A) (diâmetro de 100 μm) na parede. Exatamente do lado externo do ClV, há outro eletrodo (E_1). O cilindro conecta-se a um tubo de vidro em forma de U, que é parcialmente preenchido com mercúrio (M) e possui dois contatos elétricos (CE_1 e CE_2). O ClV é imerso na suspensão de células (SC) a serem contadas, preenchido com solução condutora e fechado por uma válvula (V). Então, uma corrente passa a correr pela abertura entre E_1 e E_2. À medida que o M sobe pelo tubo, a SC vai sendo puxada através da A, para dentro do cilindro. Cada célula que passa pela A desloca igual volume de líquido condutor, aumentando a resistência elétrica e criando um pulso de voltagem, uma vez que sua resistência é bem maior que a da solução condutora. Os pulsos, cujas alturas são proporcionais ao volume das células, são contados. Trata-se do princípio Coulter.

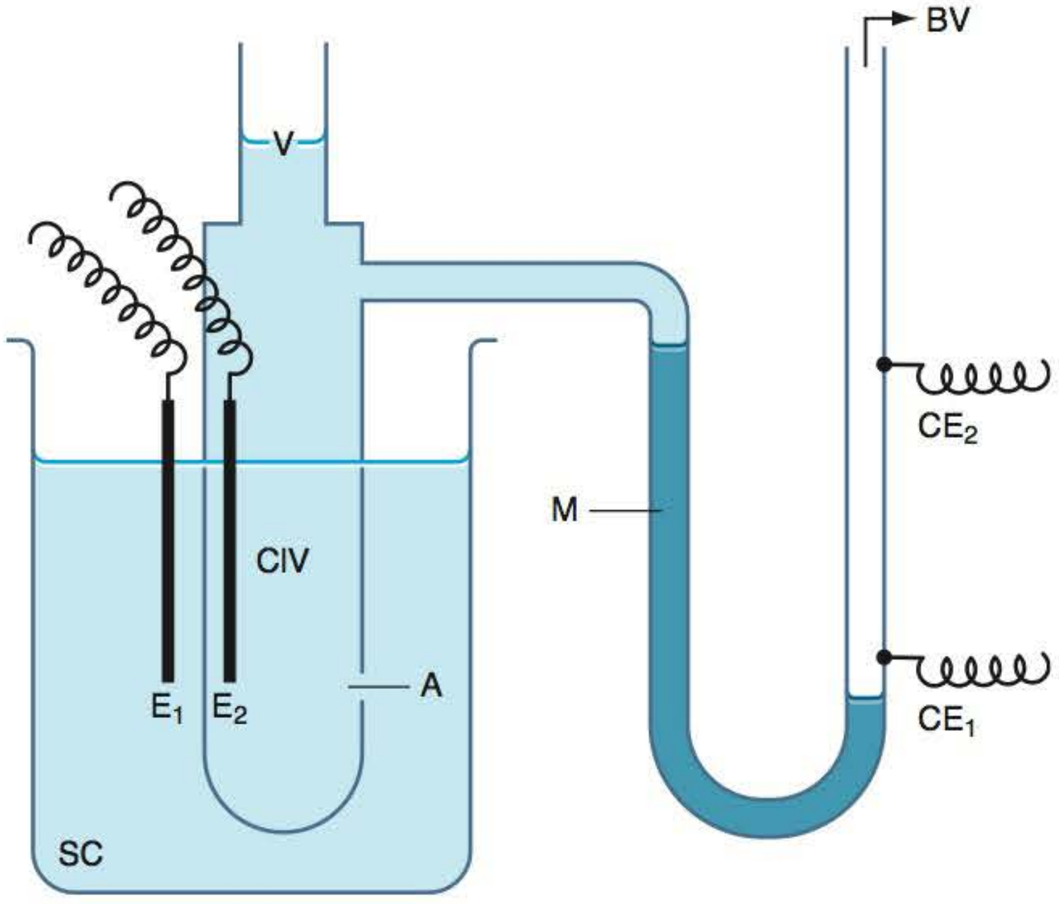


Figura 29.6 Diagrama esquemático de um contador de partículas em que as alterações na resistência elétrica são contadas como pulsos de voltagem. SC = suspensão de células; CIV = cilindro de vidro; A = abertura; E_1 e E_2 = eletrodos de platina; V = válvula; M = coluna de mercúrio; CE_1 e CE_2 = contatos elétricos; BV = bomba a vácuo. (Diagrama adaptado de Ackerman, 1972.)

No sistema mais simples, o mecanismo de contagem é iniciado quando o M entra em contato com CE_1, e cessa quando M atinge CE_2. Durante esse intervalo, as células são contadas em um volume de suspensão exatamente igual ao volume da tubulação de vidro entre os fios de contato CE_1 e CE_2. Caso duas ou mais células entrem na A ao mesmo tempo, serão contadas como um único pulso. Isso produz um erro de coincidência que já é corrigido automaticamente pelos analisadores. Em certos contadores, o ajuste de um limiar ou de um pulso discriminante permite a exclusão de pulsos abaixo de uma determinada altura ajustável. Em outros, um segundo limiar também exclui a contagem de pulsos acima de uma determinada altura. Dessa forma, é possível contar apenas as células dentro da "janela" estabelecida pelos dois limiares. Por meio da mudança sistemática de cada limiar com alguns incrementos, é possível determinar a frequência de distribuição de volumes celulares relativos. Tais distribuições de tamanho celular podem ser automaticamente representadas em gráfico e são valiosas para o estudo de hemácias, leucócitos ou plaquetas, quando estão presentes duas ou mais populações celulares variáveis. Essa é a base da determinação dos histogramas de células sanguíneas, que atualmente são produzidos de forma rotineira pelos analisadores hematológicos multicanais.

Condutividade por radiofrequência

A condutividade é determinada com o auxílio de uma sonda eletromagnética de alta frequência, que fornece informações sobre os constituintes celulares internos (composição química, características nucleares e constituintes granulares). Para tanto, a sonda permeabiliza a camada lipídica da membrana celular. A condutividade é especialmente útil na diferenciação entre células de tamanhos semelhantes, como os pequenos linfócitos e os basófilos (Burns, 1992; Bentley, 1993). Esse princípio é empregado por instrumentos comercializados pela Coulter (LH 700, GEN∑•S, HmX, A•T, etc.; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) e pela Sysmex (XE-2100, XT 2000i, HST-N etc.; Sysmex America, Inc., Mundelein, IL).

Dispersão da luz

Nos analisadores eletro-ópticos (Fig. 29.7), um detector fotossensível mede o grau de dispersão da luz. Todos os principais analisadores multicanais atualmente empregam a metodologia óptica, ao menos em alguma extensão. O tamanho do pulso detectado é proporcional ao tamanho da partícula (CBS, CVS ou plaqueta). Enquanto a precisão dos instrumentos que empregam metodologia óptica equivale à precisão dos sistemas à base de impedância elétrica, alguns sistemas utilizam ambos os métodos para fornecer uma combinação interna. O ângulo de dispersão incidente de uma luz monocromática gerada por laser determina as características de superfície, morfologia e granulação da célula. A medida da dispersão da luz em múltiplos ângulos permite uma melhor diferenciação dos tipos celulares. Exemplificando, no Abbott Cell Dyn, são tomadas quatro medidas simultâneas da dispersão da luz para cada CBS. Um ângulo incidente de 0º primeiramente é afetado e, então, determina o tamanho da célula. Uma dispersão de luz de 10º indica a estrutura ou complexidade de uma célula, sendo em especial útil na resolução de basófilos e separação de todas as populações celulares. Uma dispersão luminosa de 90º separa populações de células granulares e é denominada *lobularidade*. A dispersão de luz de 90º despolarizada resolve os eosinófilos, graças a sua *granulosidade* intensa e cristalina. Células anormais podem apresentar localizações distintivas no gráfico de dispersão de tamanho *versus* complexidade, ajudando a determinar sinais suspeitos de CBSs (Cornbleet, 1992), como os de blastos, variantes de linfócitos, bastonetes e granulócitos imaturos. Corantes de DNA fluorescentes são utilizados pelos sistemas hematológicos automatizados da Abbott, para enumerar CVSs nucleadas e identificar populações de linfócitos atípicos, além de CBSs inviáveis. A tecnologia adaptativa de portas (gating) proporciona uma melhor separação de grupos de tipos celulares que se sobrepõem. Sinais suspeitos são gerados diante da impossibilidade de delineamento de uma distinção clara, como muitas vezes ocorre em presença de populações de CBSs anormais ou de substâncias interferentes.

Citoquímica

Trata-se de uma metodologia exclusiva das séries hematológicas automatizadas da Bayer (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY). Consiste no uso de uma reação citoquímica para determinar a atividade de peroxidase das CBSs. O índice médio de peroxidase (IMPX) – uma medida da intensidade da coloração de neutrófilos – é determinada para cada espécie. A relativa positividade observada para neutrófilos, eosinófilos e monócitos é aliada aos dados derivados da dispersão da luz para determinar o diferencial de CBSs (Simson, 1986). A ABX Diagnostics utiliza um reagente citoquímico que fixa as CBSs em seu estado nativo e, subsequentemente, cora suas membranas intracelulares e plasmáticas com clorazol negro E (Clinical Case Studies: Interpretation Guide for ABX 5-Part Diff Hematology Analysers, ABX Horiba Diagnostics).

Descrição/sinalização dos dados

Cada sistema instrumental combina os dados gerados por essas metodologias de acordo com suas próprias configurações, a fim de

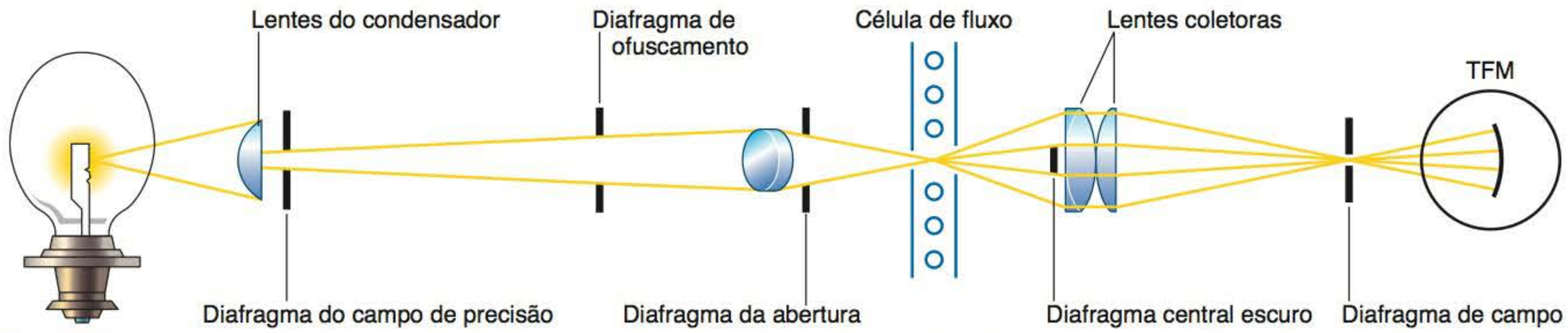


Figura 29.7 Diagrama esquemático de um contador de célula eletro-óptica. A luz é direcionada para a célula de fluxo. Somente a luz dispersada por uma célula atinge o tubo fotomultiplicador (TFM), que faz a conversão em um pulso elétrico. (De Mansberg, HP: Adv Automated Anal 1970; 1:213, com permissão. Reproduzido como cortesia da Technicon Instrument Corporation, Tarrytown, NY.)

fornecer um diferencial de CBSs de 5 a 6 partes, incluindo a morfologia das CVSs e os parâmetros plaquetários (Fig. 29.8). Os princípios quantitativos específicos a sistemas selecionados são detalhados na Tabela 29.4. Os dados gerados pelo instrumento que são rejeitados com base em critérios nele definidos ou pelo usuário são sinalizados para alertar o técnico de que a descrição da amostra requer mais investigação. É necessário ter extremo cuidado ao definir tais critérios, pois a adição de cada um deles reduz a vantagem proporcionada pelo processo automatizado. As melhores configurações são desenvolvidas visando à população de pacientes. Além disso, o acompanhamento deve ser adaptado de modo que minimize a necessidade de mais tempo para derivação do resultado correto.

Fontes de erro

A Tabela 29.5 lista as várias causas de erros de resultado obtidas a partir de contadores de células automatizados.

Contagem de reticulócitos automatizada

Muitos dos mesmos princípios aplicados na determinação do diferencial de CBSs podem ser empregados para determinar contagens de reticulócitos, resultando em melhoria da precisão na prática de rotina (Metzger, 1987). Dependendo do modelo específico de analisador, esse processo pode ser semi ou totalmente automatizado, e todos os métodos consistem na adição de um descolorante ou corante para detecção do conteúdo de RNA das CVSs. Esses corantes são o novo azul de metileno (NMB), oxazina, auramina O, polimetina e alaranjado de tiazol. Os métodos de detecção incluem impedância, dispersão da luz, absorção e intensidade de fluorescência. As frações de reticulócitos são separadas com base no conteúdo de RNA, e as células mais imaturas contêm a quantidade mais alta de retículo. A fração de reticulócitos imaturos (FRI) descreve quantitativamente os reticulócitos mais jovens, que se coram com mais intensidade. Esse parâmetro permite detectar, ainda no início, uma resposta eritropoiética aumentada, que constitui informação importante para a determinação da resposta da medula óssea em casos de recuperação da quimioterapia ou transplante, ou em resposta à terapia com eritropoetina. Também pode ser empregado combinado à contagem absoluta de reticulócitos para classificação de anemias (Davis, 1994, 1996; d'Onofrio, 1996).

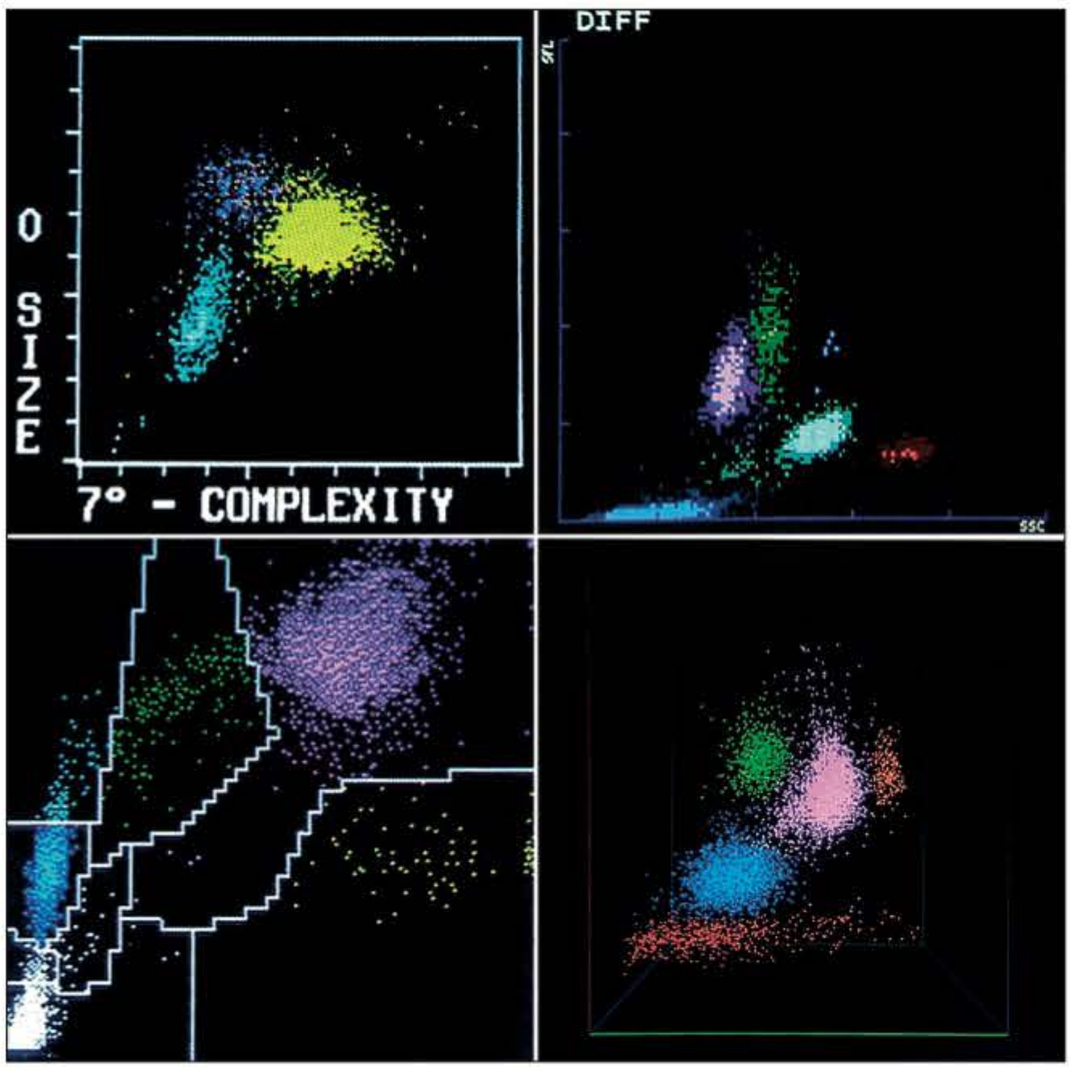


Figura 29.8 Gráficos de dispersão/citogramas de CBS. *Esquerda, acima:* gráfico de dispersão de CBS (dispersão da luz *vs*. volume) do Abbott CELL-DYN 4000. *Direita, acima*: gráfico de dispersão de CBS (dispersão da luz lateral *vs*. fluorescência lateral) do Sysmex XT 2000i. *Esquerda, abaixo*: citograma de peroxidase de CBS do Bayer Advia 120. *Direita, abaixo*: gráfico de dispersão de CBS (dispersão da luz *vs*. volume) do Coulter LH 750.

Tabela 29.4 Princípios utilizados em vários aparelhos multicanais no laboratório clínico

	Método			
Aparelho	**Impedância**	**Condutividade**	**Dispersão da luz**	**Citoquímica**
Abbott	×	×	×	
ABX	×		×	×
Bayer			×	×
Coulter	×	×	×	
Sysmex	×	×	×	

Exame do esfregaço de sangue

O exame microscópico de um esfregaço de sangue em lâmina ou lamínula de vidro fornece informações úteis sobre todos os elementos formados do sangue. O processo de preparo de um esfregaço de sangue delgado provoca trauma mecânico às células. Do mesmo modo, as células são achatadas sobre o vidro durante a secagem, e a fixação e coloração envolvem exposição ao metanol e à água. Alguns artefatos acabam inevitavelmente sendo introduzidos, porém é possível minimizar essa ocorrência com uma boa técnica.

Exame de preparações a fresco

Às vezes, é vantajoso examinar esfregaços de sangue a fresco ao microscópio, a fim de evitar artefatos trazidos pela fixação ou coloração. Esse objetivo é prontamente alcançado vedando, entre a lâmina e a lamínula de vidro, uma pequena gota de sangue diluída em solução isotônica de cloreto de sódio. O glutaraldeído tamponado preservará as células para posterior repetição do exame. Vaselina ou xipamida (Aquaphor) podem ser utilizadas para vedar as bordas da lamínula à lâmina. Preparações a fresco são empregadas para detectar afoiçamento (produção de eritrócitos falciformes); elas permitem a pronta detecção de esferócitos. As preparações a fresco podem ser examinadas para confirmar que as anormalidades eritrocitárias encontradas em esfregaços fixados não são meros artefatos produzidos durante a secagem ou coloração.

Confecção e coloração dos esfregaços de sangue

O exame do esfregaço de sangue constitui parte importante da avaliação hematológica. A confiabilidade da informação obtida é fortemente dependente de esfregaços bem confeccionados e bem corados, que são examinados de forma sistemática. Os esfregaços de sangue devem ser preparados o quanto antes, quando possível. A seguir, são descritos três métodos de preparo de esfregaços: o método de duas lâminas ou da cunha, o método da lamínula de vidro e o método rotatório.

Método da cunha

Uma gota de sangue (2–3 mm de diâmetro) é colocada sobre a superfície plana de uma lâmina limpa e sem poeira, a cerca de 1 cm da extremidade. Com o auxílio do polegar e do indicador da mão direita, segura-se pela extremidade uma segunda lâmina (de espalhamento) apoiada contra a superfície da outra lâmina a um ângulo de 30 a 45°. Em seguida, ela deve ser puxada para trás, para que entre em contato com a gota de sangue. Após o sangue se espalhar, forma-se o ângulo entre as duas lâminas. A "lâmina de espalhamento" é puxada para a frente a uma velocidade moderada, até que todo o sangue tenha se espalhado formando um esfregaço razoavelmente fino. A lâmina de espalhamento deve ser limpa, seca e um pouco mais estreita que a primeira lâmina, de modo que as bordas possam ser examinadas com facilidade ao microscópio.

As lâminas devem ser agitadas ao ar para que sequem com rapidez. Também podem ser secas com o auxílio de um ventilador elétrico. A espessura do esfregaço pode ser ajustada pela alteração do ângulo formado pela lâmina de espalhamento ou de acordo com a velocidade do espalhamento da amostra, ou ainda pela utilização de uma gota de sangue maior ou menor. A uma determinada velocidade, se o ângu-

Tabela 29.5 Potenciais causas de erros de resultado gerados por contadores de células automáticos

Parâmetro	Causas de elevações espúrias	Causas de reduções espúrias
CBS	Crioglobulina, criofibrinogênio Heparina Proteínas monoclonais Hemácias nucleadas Agregado de plaquetas Hemácias não lisadas	Coagulação Células esfumaçadas Uremia adicional Imunossupressores
CVS	Crioglobulina, criofibrinogênio Plaquetas gigantes Alta concentração de CBS (> 50.000/μL)	Autoaglutinação Coagulação Hemólise (*in vitro*) Hemácias microcíticas
Hemoglobina	Carboxiemoglobina (> 10%) Crioglobulina, criofibrinogênio Hemólise (*in vitro*) Heparina Alta concentração de CBS (> 50.000/μL) Hiperbilirrubinemia Lipemia Proteínas monoclonais	Coagulação Sulfemoglobina (?)
Hematócrito (automatizado)	Crioglobulina, criofibrinogênio Plaquetas gigantes Alta concentração de CBS (> 50.000/μL) Hiperglicemia (> 600 mg/dL)	Autoaglutinação Coagulação Hemólise (*in vitro*) Hemácias microcíticas
Hematócrito (micro-hematócrito)	Hiponatremia Retenção de plasma	Excesso de EDTA Hemólise (*in vitro*) Hipernatremia
VCM	Autoaglutinação Alta concentração de CBS (> 50.000/μL) Hiperglicemia Deformabilidade reduzida das hemácias	Crioglobulina Criofibrinogênio Plaquetas gigantes Hemólise (*in vitro*) Hemácias microcíticas Hemácias tumefeitas
HCM	Alta concentração de CBS (> 50.000/μL) Hb espuriosamente alta Concentração de CVS espuriosamente baixa	Hb espuriosamente baixa Concentração de CVS espuriosamente alta
CMHC	Autoaglutinação Coagulação Hemólise (*in vitro*) Hemólise (*in vivo*) Hb espuriosamente alta Hct espuriosamente baixo	Alta concentração de CBS (> 50.000/μL) Hb espuriosamente baixa Hct espuriosamente alto
Plaquetas	Crioglobulina, criofibrinogênio Hemólise (*in vitro* e *in vivo*) Hemácias microcíticas Inclusões de hemácias Fragmentos de leucócitos	Coagulação Plaquetas gigantes Heparina Agregado de plaquetas Satelitose plaquetária

De Cornbleet J, 1983.

lo formado pela lâmina de espalhamento for aumentado, o esfregaço produzido será mais espesso. Com um determinado ângulo, se a velocidade com que a lâmina de espalhamento é puxada aumentar, o esfregaço também será mais espesso. O esfregaço não deve cobrir por inteiro a superfície da lâmina, e um bom esfregaço apresenta uma porção espessa e uma porção delgada unidas por uma transição gradual entre ambas. O esfregaço deve ter aspecto liso, uniforme e livre de cristas, ondulações ou buracos. A extremidade da lâmina de espalhamento deve ser absolutamente lisa, pois se for irregular fará com que o esfregaço apresente caudas desiguais com acúmulo de leucócitos. Os esfregaços de espessura ideal apresentam certa sobreposição de hemácias em boa parte de sua extensão, contudo essas células estão bem distribuídas e separadas acompanhando uma cauda fina. Quanto mais rápido o esfregaço seca ao ar, melhor é o espalhamento de células individuais sobre a lâmina. Uma secagem lenta (p. ex., sob condições de tempo úmido) resulta em artefatos de contração das células. A lâmina pode ser identificada na extremidade fosca com o auxílio de um lápis, ou diretamente sobre a extremidade espessa do esfregaço.

Método da lamínula de vidro

Para esse método, recomenda-se usar lamínulas de vidro nº 1 ou $1^1/_2$, de 22 mm e quadradas.

Sem encostar na pele, toca-se a superfície de uma pequena gota de sangue com uma lamínula de vidro. Em seguida, com a parte que contém sangue virada para baixo, a lamínula é disposta de modo transversal sobre outra lamínula, de modo que forme uma estrela de oito pontas com os cantos de ambas. Se a gota de sangue não for muito grande e se as lamínulas estiverem perfeitamente limpas, o sangue se espalhará de modo rápido e uniforme formando uma fina camada entre as duas superfícies. Assim que o sangue parar de se espalhar, as lamínulas devem ser puxadas com rapidez e firmeza, de modo que as superfícies sejam separadas e permaneçam paralelas entre si. O sangue usualmente se espalha em uma das lamínulas com uniformidade bem maior que na outra. As lamínulas devem ser posicionadas com o lado que contém o esfregaço voltado para cima, sobre um pedaço de papel limpo, para que sequem ao ar. Como alternativa, as lamínulas podem ser inseridas em caixas apropriadas para guarda-lâminas, com o lado que não contém amostra de uma voltado para o mesmo lado (sem amostra) da outra. Esfregaços de sangue venoso podem ser preparados de modo semelhante, com deposição de uma gota de sangue sobre uma lamínula e processamento conforme descrito.

Método de centrifugação

Esfregaços de sangue que combinam as vantagens do manuseio simples, proporcionado pela lâmina em cunha, e da distribuição celular uniforme, garantida nas preparações em lamínula, podem ser obtidos com o uso de centrífugas especiais, denominadas citocentrífugas (Rogers, 1973). A lâmina preparada por centrifugação fornece um esfregaço de sangue uniforme, em que todas as células são separadas (monocamada) e distribuídas ao acaso. As CBSs podem ser facilmente identificadas em qualquer ponto do esfregaço. Em um esfregaço em cunha, há uma distribuição desproporcional de monócitos na extremidade da borda esfarrapada, de neutrófilos bem internamente em relação a essa borda, e dos dois tipos celulares em ambas as extremidades laterais do esfregaço (Rogers, 1973). Esse aspecto é irrelevante em termos de prática, contudo resulta na obtenção de contagens de monócitos discretamente mais baixas nos esfregaços em cunha.

Colorações para sangue

Os corantes de anilina, que são utilizados em trabalhos com sangue, são agrupados em duas classes: corantes básicos, como o azul de metileno; e corantes ácidos, como a eosina. Núcleos e outras estruturas encontradas no sangue são coradas por corantes básicos e, por conseguinte, denominadas basofílicas. Estruturas que fixam apenas corantes ácidos são chamadas acidofílicas ou eosinofílicas. Outras estruturas que são coradas por uma combinação desses dois tipos de corantes são referidas como neutrofílicas.

Os corantes policromos de azul de metileno e eosina são produtos muito utilizados de uma modificação do método demorado de Romanowsky original. Coram diferencialmente a maioria das estruturas normais e anormais existentes no sangue. Os componentes básicos das tiazinas consistem em azul de metileno (tetrametiltionina) e proporções variáveis de seus análogos, produzidos por desmetilação oxidativa – azur B (trimetiltionina), azur A (dimetiltionina assimétrica), dimetiltionina simétrica e azur C (monometiltionina) (Lillie, 1977). O componente acídico – eosina – é derivado de um esqueleto de xanteno. A maioria dos corantes de Romanowsky são dissolvidos em álcool metílico e combinam fixação à coloração. Entre os métodos mais bem conhecidos, estão as colorações de Giemsa e de Wright.

Coloração de Wright

Trata-se de uma solução metil alcoólica de eosina e uma mistura complexa de tiazinas, incluindo azul de metileno (usualmente

50–75%), azur B (10–25%) e outros derivados (Lubrano, 1977). A coloração de Wright certificada pela Biological Stain Commission é disponibilizada comercialmente sob a forma de solução pronta para uso ou em pó. A solução tampão (pH 6,4) contém 6,63 g de fosfato de potássio (monobásico) anidro primário (KH_2PO_4); 2,56 g de fosfato de sódio (dibásico) anidro secundário (Na_2HPO_4); e água destilada suficiente para 1 L de solução. Um tampão mais alcalino (pH 6,7) pode ser preparado com 5,13 g de sal de potássio e 4,12 {ts} g de sal de sódio.

Procedimento

1. Para evitar que o fundo de plasma do esfregaço seja corado de azul, os esfregaços devem ser corados poucas horas após a preparação ou, se tiverem de permanecer sem coloração, fixados.
2. A fixação e a coloração podem ser obtidas por meio da imersão das lâminas em recipientes cheios de reagente. Como alternativa, as lâminas ou lamínulas podem ser dispostas na horizontal e cobertas por completo com os reagentes. Nesse último método, cobrir os esfregaços com uma quantidade copiosa de corante evita a evaporação que, de outro modo, causaria precipitação.
3. A fixação é feita com metanol absoluto, por 1 a 2 minutos.
4. Em seguida, o esfregaço é exposto à solução corante não diluída por 2 minutos. Então, sem remover o corante da lâmina colocada em posição horizontal, adiciona-se com cuidado uma quantidade equivalente de solução tampão e mistura-se tudo soprando suavemente.
5. O corante é removido da lâmina em jato de água. A lavagem por mais de 30 minutos reduz a coloração azul. A parte de trás da lâmina é limpa com o auxílio de uma gaze.
6. A lâmina é colocada em posição inclinada para secar ao ar.
7. As lamínulas são montadas com o lado que contém o esfregaço voltado para baixo, sobre uma lâmina, com bálsamo do Canadá ou outro meio de montagem.

Esfregaços bem corados pelo método de Wright exibem cor rosa ao serem observados a olho nu. Sob baixa resolução, as células devem estar distribuídas de modo uniforme. As hemácias são cor-de-rosa, em vez de amarelo-limão ou vermelho. A quantidade de precipitado presente deve ser mínima. A tonalidade do esfregaço deve ser uniforme. As células sanguíneas devem estar livres de artefatos, como vacúolos. O núcleo dos leucócitos apresenta cor púrpura, com cromatina e paracromatina nitidamente diferenciadas. Os grânulos citoplasmáticos neutrofílicos têm cor marrom-clara. Os grânulos eosinofílicos são vermelho-alaranjados, e cada um deles é distintamente discernido. Os basófilos possuem gránulos roxo-escuros. As plaquetas possuem grânulos de cor lilás-escura. Bactérias (quando presentes) são azuis. O citoplasma dos linfócitos em geral é azul-claro, enquanto o dos monócitos é azul-acinzentado pálido. Parasitas maláricos possuem citoplasma azul-celeste e cromatina púrpura-avermelhada. As cores tendem a esmaecer se a preparação for montada com bálsamo de baixa qualidade ou exposta à luz.

Problemas de coloração

Coloração excessivamente azul. Esfregaços espessos, tempo de coloração prolongado, lavagem inadequada ou um grau de alcalinidade muito alto do corante ou diluente são fatores que tendem a causar basofilia excessiva. Nesse tipo de esfregaço, os eritrócitos aparecem azuis ou verdes, a cor da cromatina nuclear varia do azul-escuro ao negro, e os grânulos dos neutrófilos são escuros e supercorados, parecendo grandes e proeminentes. Os grânulos dos eosinófilos são azuis ou acinzentados. A redução do tempo de coloração ou o uso de menos corante e mais diluente podem corrigir o problema. Se essas etapas forem inefetivas, é provável que o tampão esteja alcalino demais e seja necessário preparar outro com pH menor.

Coloração excessivamente rosa. Coloração insuficiente, lavagem por tempo prolongado, lamínulas montadas antes de estarem totalmente secas ou acidez muito alta de um corante ou tampão são fatores que podem causar acidofilia excessiva. Em esfregaços com esse problema, os eritrócitos apresentam cor vermelha ou alaranjada brilhante, a cromatina nuclear é azul-clara e os grânulos dos eosinófilos têm cor vermelha brilhante cintilante. Uma das causas da acidez aumentada é a exposição do corante ou tampão a vapores ácidos. O problema pode ser um baixo pH do tampão ou o álcool metílico, que tende a desenvolver ácido fórmico como resultado da oxidação em repouso.

Outros problemas de coloração. A coloração inadequada de hemácias, núcleos ou grânulos eosinofílicos pode ser devida à subcoloração ou à lavagem excessiva. Prolongar o tempo de coloração ou reduzir o de lavagem pode solucionar esse problema.

O aparecimento de precipitados no esfregaço pode ser decorrente do uso de lâminas que não foram limpas, secagem do esfregaço durante período de coloração, lavagem inadequada da lâmina ao final do período de coloração (em especial a falha em manter a lâmina na horizontal durante a lavagem inicial), filtração inadequada do corante ou deposição de poeira sobre a lâmina ou esfregaço.

Outras colorações

Além da coloração de Wright, as colorações do tipo Romanowsky incluem inúmeras outras: Giemsa, de Leishman, de Jenner, May-Grünwald, de MacNeal e várias combinações. Algumas têm sido particularmente recomendadas para fins específicos, como a coloração de Giemsa, por sua excelência na coloração de parasitas maláricos e protozoários.

Método de referência

Estudos demonstraram a habilidade da combinação de apenas dois corantes – azur B e eosina Y – de produzir toda a gama de cores fornecida por uma coloração de Romanowsky ideal de células do sangue e da medula óssea. Trata-se do método de referência para coloração de Romanowsky (ICSH, 1984a).

Dispositivos de coloração automatizados

Dispositivos de coloração automatizados estão sendo utilizados em vários laboratórios, no preparo de lâminas para rotina de hematologia e microbiologia. O dispositivo que realiza a coloração é um instrumento compacto controlado por microprocessador, para flexibilização das aplicações de coloração. Várias lâminas podem ser coradas de modo uniforme em questão de minutos. Normalmente, qualquer aparelho de coloração automatizado conta com opções de escolha entre vários programas definidos pelo usuário. Problemas de coloração são encontrados mesmo quando se utilizam tais dispositivos, e devem ser considerados individualmente.

Eritrócitos

Os eritrócitos presentes no sangue de um indivíduo sadio, quando não estão juntos e aglomerados, apresentam a forma de discos circulares e homogêneos, de tamanho quase uniforme, com diâmetro de 6 a 8 μm (Fig. 29.9). Entretanto, mesmo no sangue normal, as células individuais podem atingir 5,5 μm e largura de 9,5 μm. O centro de cada uma delas é mais pálido que a periferia. Na doença, os eritrócitos variam quanto ao conteúdo de Hb, tamanho, formato, propriedades de coloração e estrutura.

Cor

Conteúdo de Hb

A profundidade da coloração fornece uma orientação aproximada acerca da quantidade de Hb existente nas hemácias, e os termos normocrômico, hipocrômico e hipercrômico são empregados para descrever esse aspecto das hemácias. Normocrômico refere-se à intensidade normal de coloração (Fig. 29.9). Quando a quantidade de Hb está diminuída, a área central pálida se torna maior e ainda mais pálida. Esse fenômeno é conhecido como hipocromia. A HCM e a CMHC usualmente estão diminuídas (Fig. 29.10). Na anemia megaloblástica, como as hemácias são maiores e, em consequência, mais espessas, muitas se coram intensamente e apresentam área central menos pálida (Fig. 29.11). Essas células são hipercrômicas, uma vez que possuem HCM elevada e CMHC normal. Na esferocitose hereditária (Fig. 29.12), as células também são hipercrômicas e, embora a HCM esteja normal, a CMHC costuma estar aumentada em decorrência da redução da proporção superfície/volume. A presença de células hipercrômicas e normocrômicas no mesmo esfregaço é denominada anisocromia ou, às vezes, anemia dimórfica (Fig. 29.13). É característica das anemias sideroblásticas, mas também é encontrada em indivíduos com anemia por deficiência de ferro, algumas semanas após receberem terapia com ferro, ou em pacientes com anemia hipocrômica, após receberem transfusão de células normais.

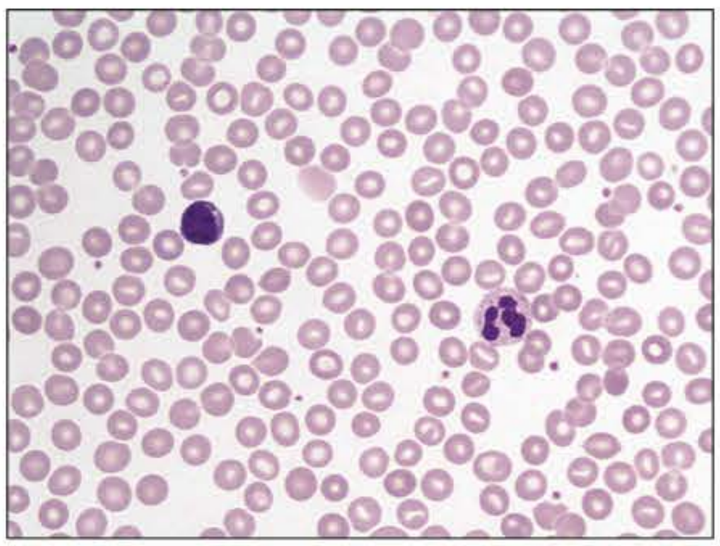


Figura 29.9 Esfregaço de sangue normal periférico. Os eritrócitos aparecem como discos circulares e homogêneos, tamanho quase uniforme, diâmetro de 6 – 8 µm e área central pálida que não ultrapassa 1/3 da célula. Em média, as hemácias têm aproximadamente o mesmo tamanho que o núcleo de um pequeno linfócito (∞ 500).

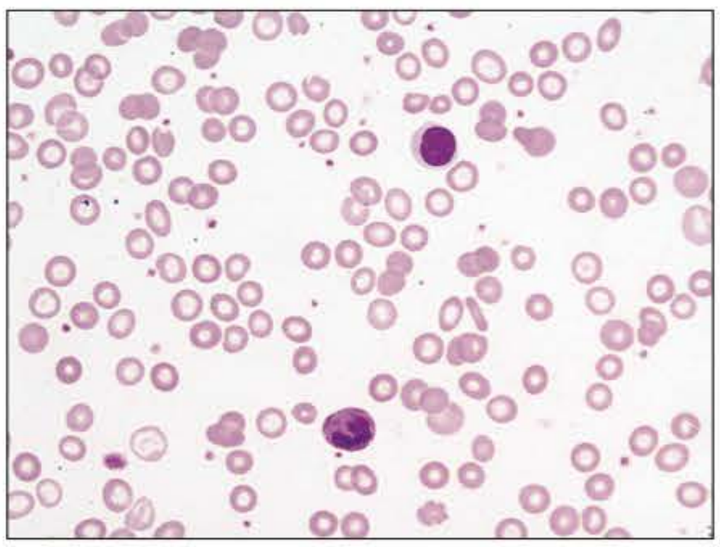


Figura 29.10 Hemácias hipocrômicas microcíticas na anemia ferropriva. As hemácias são hipocrômicas – a quantidade de hemoglobina por célula está diminuída e a área central pálida se tornou maior (> 1/3 da célula) (∞ 500).

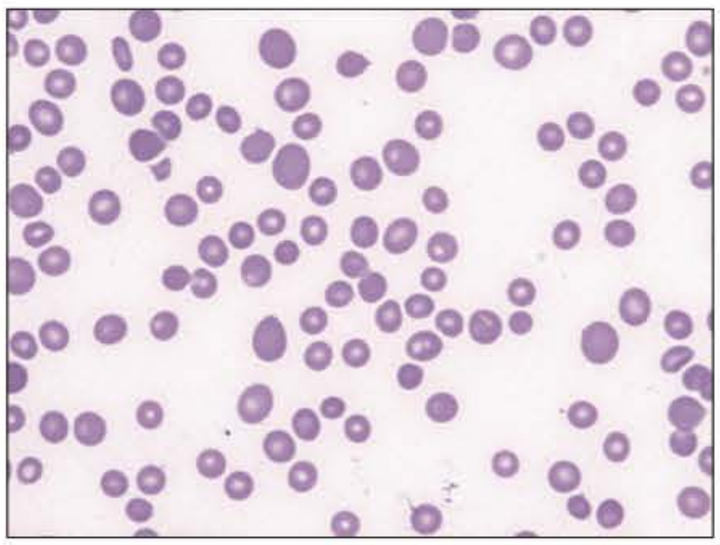


Figura 29.11 Macrócitos. As hemácias são maiores e mais espessas, se coram intensamente e não apresentam área central pálida (∞ 500).

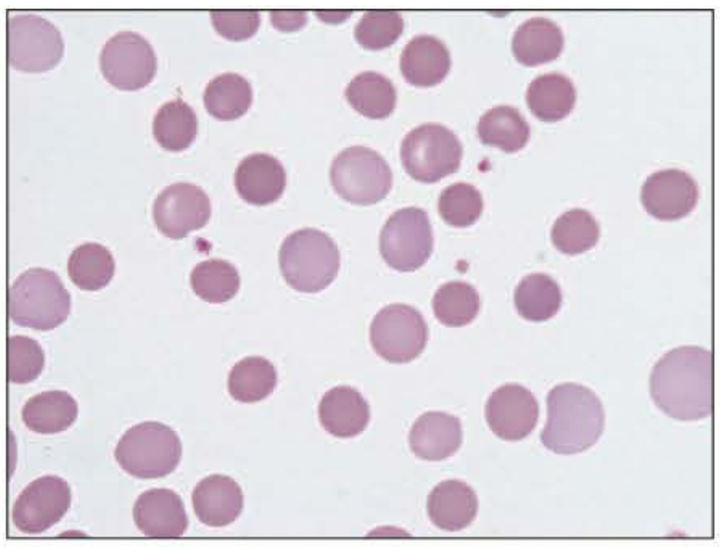


Figura 29.12 Esferocitose hereditária. Os esferócitos apresentam formato arredondado quase perfeito e são menores que as hemácias normais. A área central pálida está ausente (hipercrômicos) (∞ 1.000).

Policromatofilia

A coloração azul-acinzentada que as hemácias apresentam (policromatofilia ou policromasia) é uma combinação da afinidade da Hb por corantes ácidos e da afinidade do RNA por corantes básicos. A presença de RNA residual na hemácia indica que se trata de uma hemácia jovem, presente no sangue há 1 a 2 dias. Essas células são maiores que as hemácias maduras e podem não apresentar a palidez central (Fig. 29.14). Células jovens com RNA residual aparecem como hemácias policromatofílicas em esfregaços secos ao ar e corados pelo método de Wright. No entanto, aparecem como reticulócitos em esfregaços corados por coloração supravital, com corante azul de cresil brilhante. Portanto, o aumento da policromasia implica reticulocitose, a qual é mais acentuada na hemólise e na perda de sangue aguda.

Tamanho

As hemácias podem ser anormalmente pequenas (micrócitos) (Fig. 29.10), anormalmente grandes (macrócitos) (Fig. 29.11) ou mostrar variação anormal de tamanho (anisocitose) (Fig. 29.13). A anisocitose é um aspecto encontrado na maioria das anemias e, quando é intensa, tanto micrócitos quanto macrócitos em geral estão presentes. Na análise das causas de anemia, os termos microcítico e macrocítico possuem mais significado quando considerados em termos de volume celular, em vez de diâmetro celular. O VCM é medido diretamente em um analisador multicanais. É possível notar o diâmetro pela observação direta do esfregaço e inferir o volume (bem como o conteúdo de Hb) a partir dele. Sendo assim, as hemácias observadas na Figura 29.10 são microcíticas. Por serem hipocrômicas, são mais delgadas que o normal, e seu diâmetro não está reduzido de forma proporcional ao volume. Do mesmo modo, o VCM no sangue do paciente com esferocitose (Fig. 29.12) encontra-se na faixa normal. Ainda que muitas células tenham diâmetro pequeno, não apresentam volume reduzido por serem mais espessas que o normal.

Formato

A variação do formato é denominada poiquilocitose. Qualquer célula com formato anormal é um poiquilócito. Células com formato oval, de pera, em gota, em sela, com forma de capacete ou irregular podem

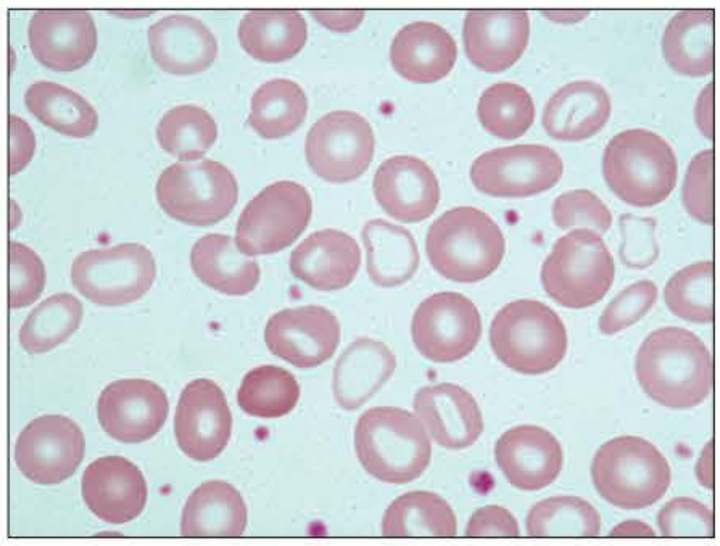


Figura 29.13 Anemia dimórfica. Anisocitose e anisocromia caracterizadas pela presença de células hipocrômicas microcíticas, células normocíticas e poucos macrócitos (∞ 1.000).

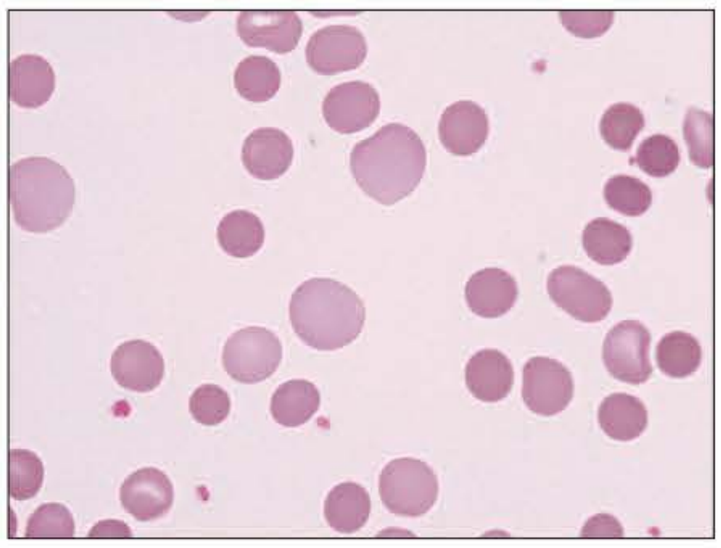


Figura 29.14 Policromatofilia. Hemácias policromatofílicas são hemácias jovens, maiores do que as hemácias maduras, não possuem a área central pálida e apresentam leve basofilia à coloração de Wright. São denominadas reticulócitos, quando coradas com corante supravital azul brilhante de cresil (∞ 1.000).

ser observadas em um único caso de anemia, como ocorre na anemia megaloblástica (Fig. 29.15).

Os eliptócitos são mais abundantes na eliptocitose hereditária (Fig. 29.16), em que a maioria das células é elíptica. Trata-se de uma condição dominante que apenas ocasionalmente associa-se à anemia hemolítica. Os eliptócitos estão presentes no sangue de indivíduos normais, porém em número equivalente a menos de 10% das células. São mais comuns, contudo, em casos de anemia ferropriva (Fig. 29.10), mielofibrose com metaplasia mieloide, anemias megaloblásticas e anemia falciforme.

Esferócitos são praticamente eritrócitos esféricos, em oposição aos discos bicôncavos normais. Possuem diâmetro menor que normal. A área central pálida está ausente ou é menor e frequentemente excêntrica (uma vez que essa célula é mais espessa e pode permanecer inclinada em repouso, em vez de perfeitamente alinhada sobre a lâmina). São encontrados na esferocitose hereditária (EH) (Fig. 29.12), em alguns casos de anemia hemolítica autoimune (AHA) e em certas condições em que há lesão celular física ou química, como a lesão decorrente da exposição ao calor (Fig. 29.17). Em cada uma dessas três situações, pequenos fragmentos de membrana (diante do excesso de Hb) são removidos das hemácias maduras e, assim, as células passam a apresentar uma menor proporção superfície/volume. Na EH e na AHA, esse fenômeno se dá no sistema reticular endotelial. Em outras circunstâncias (p. ex., no paciente com queimaduras pelo corpo), essa redução pode ocorrer intravascularmente.

Células-alvo são eritrócitos com espessura maior que a normal (leptócitos). Ao serem coradas, apresentam uma borda periférica de Hb com uma área central escura que contém Hb. São encontradas na icterícia obstrutiva (Fig. 29.18), em que a membrana da superfície celular parece sofrer um acréscimo; no estado pós-esplenectomia, em que não ocorre redução normal da membrana de superfície à medida que a célula envelhece; em qualquer anemia hipocrômica, em especial nas talassemias; e na doença da Hb C.

Esquistócitos (fragmentos de células) indicam a ocorrência de hemólise, seja na anemia megaloblástica, em casos graves de queimadura (Fig. 29.17) ou na anemia hemolítica microangiopática (Fig. 29.19). Esse último processo está associado tanto à doença de pequenos vasos sanguíneos quanto à fibrina nesses mesmos vasos, e resulta em fragmentação intravascular. Particularmente características são as células em forma de capacete e de formato triangular. As células espiculadas são hemácias contraídas de forma irregular, que apresentam espículas proeminentes e são observadas no mesmo processo. Entretanto, esse termo é empregado de modo distinto por diferentes hematologistas e, portanto, gera confusão.

Os acantócitos são hemácias irregularmente espiculadas, em que as extremidades das espículas são bulbosas e arredondadas (Fig. 29.20). São vistas na abetalipoproteinemia, tanto hereditária quanto adquirida, e em certos casos de doença hepática. As células crenadas ou equinócitos (Fig. 29.21) são células contraídas de forma irregular, que ocorrem, em geral, como artefatos durante o preparo dos esfregaços, ou que podem ser resultantes de hiperosmolaridade ou da transformação discócito-equinócito. In vivo, este último caso está associado à diminuição dos níveis de ATP nas hemácias, em decorrência de causas diversas. Artefatos semelhantes a células crenadas, constituídos de pequenos fragmentos ou bolhas que geram endentações nas hemácias

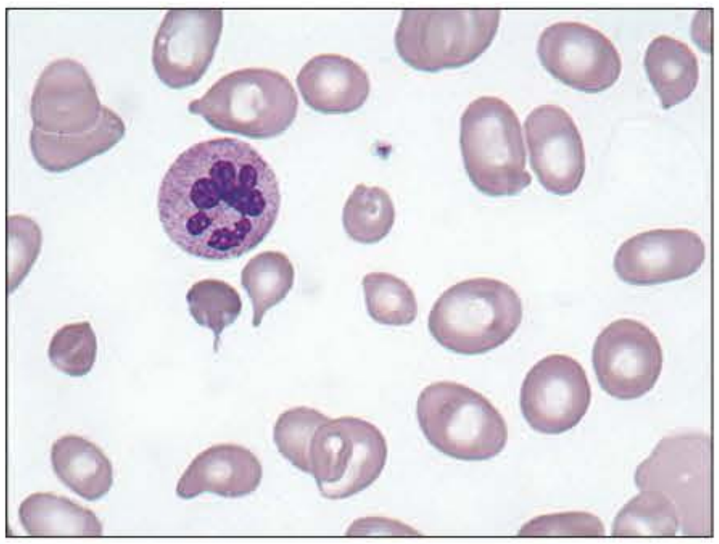


Figura 29.15 Poiquilocitose. Variação no formato das hemácias. Células com forma anormal, incluindo células ovais, em forma de pera, entre outras irregularidades (∞ 1.000).

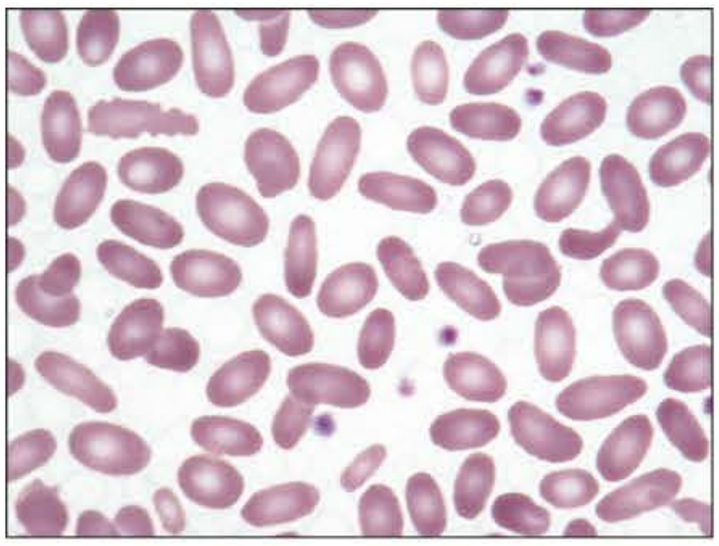


Figura 29.16 Elipsocitose hereditária. A maioria das células é eliptócita. Também são encontradas no sangue de indivíduos normais, porém usualmente representam menos de 10% do total de células. São igualmente comuns na anemia ferropriva, mielofibrose, anemia megaloblástica e anemia falciforme (∞ 1.000).

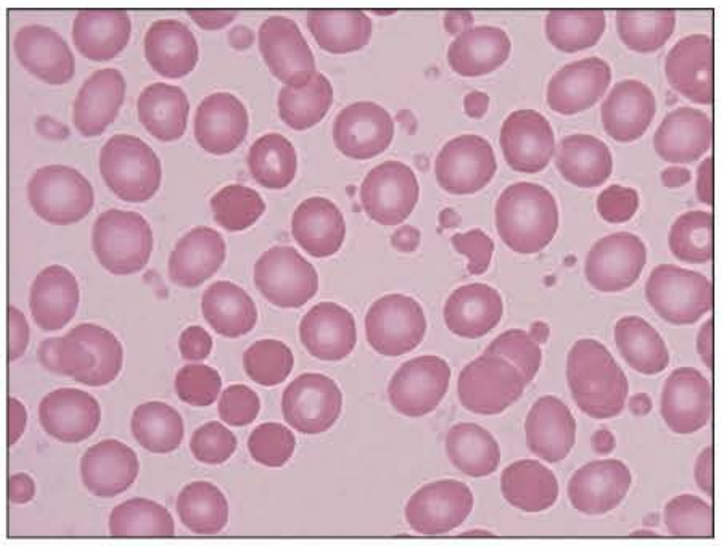


Figura 29.17 Lesão térmica. Pequenos fragmentos de membrana (diante do excesso de hemoglobina) são removidos da superfície das hemácias, levando à formação de esferócitos (∞ 1.000).

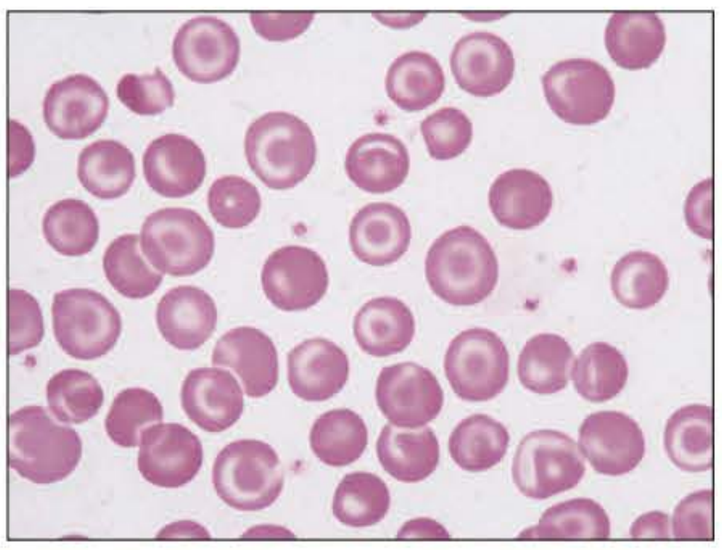


Figura 29.18 Células-alvo. Hemácias com membrana delgada, borda periférica de hemoglobina e área central escurecida com hemoglobina. São vistas com frequência na doença da hemoglobina C, anemias hipocrômicas e doença hepática (∞ 1.000).

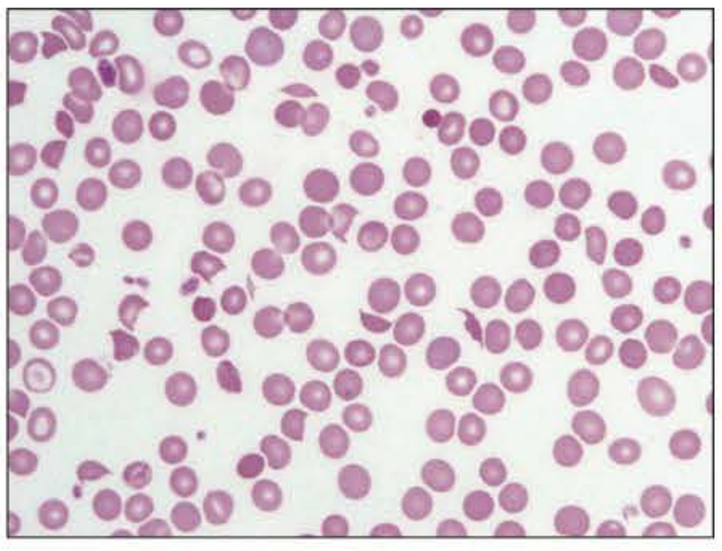


Figura 29.19 Esquistócitos. A presença de fragmentos celulares indica hemólise. Os esquistócitos podem ser vistos em várias condições, incluindo anemia hemolítica microangiopática, anemia megaloblástica, queimaduras e coagulação intravascular disseminada (∞ 500).

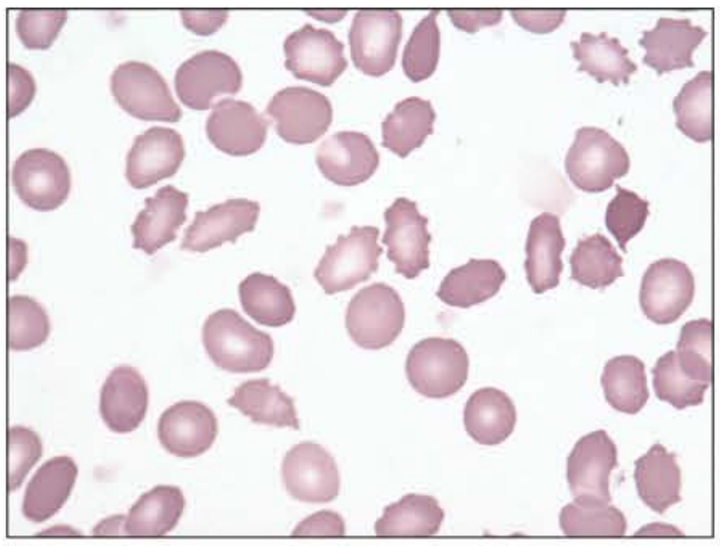


Figura 29.20 Acantócitos. Células irregularmente espiculadas, com extremidades bulbosas e arredondadas, frequentemente observadas na abetalipoproteinemia, ou certos casos de doença hepática (× 1.000).

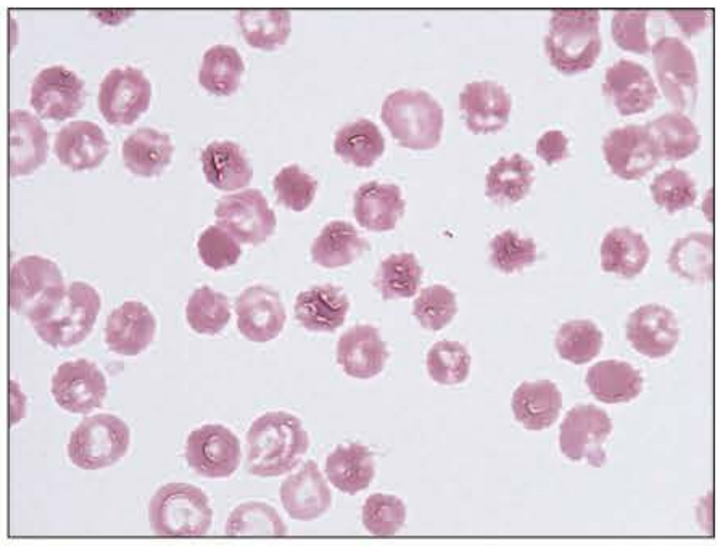


Figura 29.22 Artefato. Pequenos fragmentos ou bolhas nas hemácias. Podem ser produzidos pela presença de uma pequena quantidade de corante de Wright contaminante ou pela secagem insuficiente da lâmina (× 500).

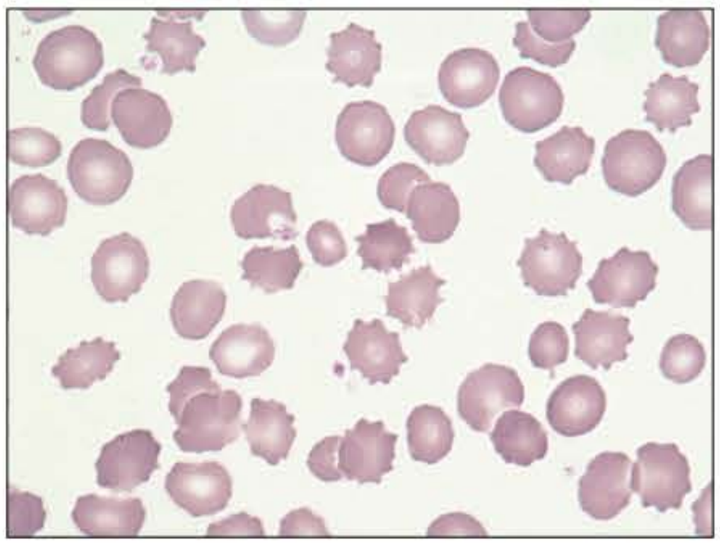


Figura 29.21 Equinócitos. Células que apresentam contração regular e extremidades pontudas. Podem ocorrer como artefatos durante o preparo do esfregaço ou como consequência da hiperosmolaridade ou ainda da diminuição do ATP em decorrência de causas diversas (× 1.000).

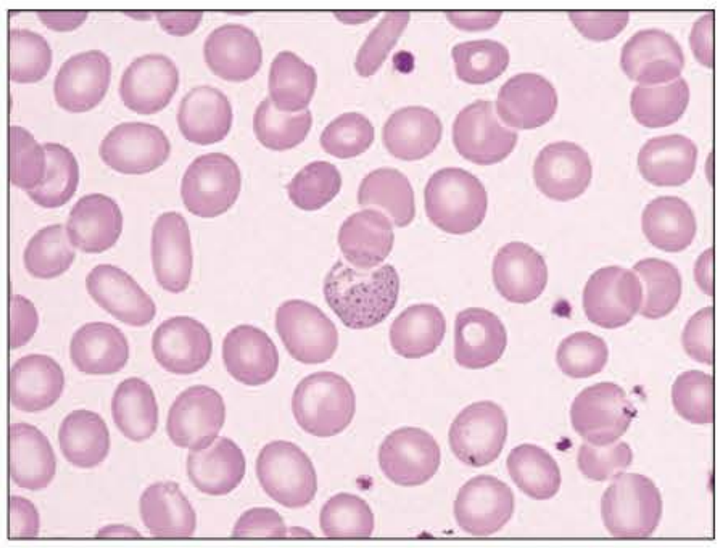


Figura 29.23 Pontilhado basofílico. Presença de grânulos basofílicos irregulares, sejam finos ou grossos. São comumente observados quando há aumento da produção de hemácias. O pontilhado grosseiro em geral é observado no envenenamento por chumbo ou outras anemias, em razão do comprometimento da síntese de hemoglobina, como ocorre na anemia megaloblástica (× 1.000).

(Fig. 29.22), podem ser decorrentes da contaminação do corante de Wright (ou metanol absoluto, se este for utilizado a princípio como fixador) com um pequeno volume de água.

Estrutura

Pontilhado basofílico (basofilia puntiforme)

Caracteriza-se pela presença, nos eritrócitos, de grânulos basofílicos irregulares que variam de finos a grossos (Fig. 29.23). Esses grânulos são corados de azul-escuro pela coloração de Wright. O eritrócito que os contém pode apresentar coloração normal em relação a outros aspectos ou pode apresentar policromatofilia. Um pontilhado fino é observado com mais frequência quando há policromatofilia aumentada e, portanto, com o aumento da produção de hemácias. O pontilhado grosso pode ser visto em casos de envenenamento por chumbo ou em outras doenças em que há comprometimento da síntese de Hb, na anemia megaloblástica e também em outras formas de anemia severa. Sua formação é atribuída a uma instabilidade anormal do RNA nas células jovens. Hemácias com grânulos que contêm ferro inorgânico (revelados pelas colorações para ferro) são denominadas siderócitos. Tais grânulos às vezes são corados pela coloração de Wright e, quando isso ocorre, são chamados corpúsculos de Pappenheimer. Em contraste com o pontilhado basofílico, os corpúsculos de Pappenheimer ocorrem em pequeno número em uma dada hemácia e, em raros casos, são encontrados no sangue periférico, exceto após a esplenectomia.

Corpúsculos de Howell-Jolly

Essas partículas arredondadas e lisas são remanescentes da cromatina nuclear. Corpúsculos de Howell-Jolly isolados podem ser observados em indivíduos com anemia megaloblástica (Fig. 29.24), anemia hemolítica e após a realização de esplenectomia. A presença de múltiplos corpúsculos em uma única célula com frequência indica anemia megaloblástica ou alguma outra forma anormal de eritropoese.

Anéis de Cabot

Trata-se de estruturas em forma de anel, de número oito ou de alça. Às vezes são formadas por duas ou várias linhas concêntricas e, em raros casos, são encontradas em indivíduos com anemia perniciosa, envenenamento por chumbo e outros distúrbios da eritropoese. Coram-se de vermelho ou púrpura-avermelhado pela coloração de Wright, e não possuem nenhuma estrutura interna. É provável que os anéis sejam microtúbulos remanescentes de um fuso mitótico (Bessis, 1977). Sua detecção é interpretada como evidência de eritropoese anômala.

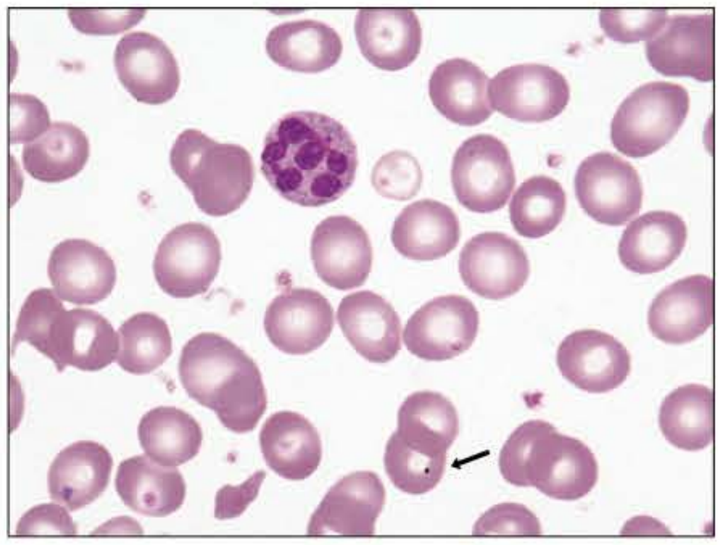


Figura 29.24 Corpúsculos de Howell-Jolly. Resquícios de cromatina nuclear lisos e arredondados. São vistos em estados de pós-esplenectomia, anemias hemolíticas e megaloblásticas (um neutrófilo hipersegmentado também pode ser observado) (× 1.000).

Pontilhado malárico

Grânulos finos podem aparecer em eritrócitos que abrigam *Plasmodium vivax*. Pelo método de Wright, os diminutos "grânulos de Schüffner" se coram de púrpura-avermelhado. Esses grânulos às vezes são tão numerosos que quase escondem os parasitas. As hemácias que os contêm são, via de regra, maiores que o normal.

Formação de empilhamento (*rouleaux*)

Trata-se do alinhamento das hemácias, umas atrás das outras, de modo semelhante a pilhas de moedas. Em esfregaços secos ao ar, o empilhamento é visto como na Figura 29.25. Níveis plasmáticos elevados de fibrinogênio ou globulinas provocam a formação do empilhamento, bem como o aumento da ESR. A formação do empilhamento é especialmente marcante na paraproteinemia (gamopatia monoclonal). O fenômeno da aglutinação (ou agregação) das hemácias é mais seguramente diferenciada do empilhamento pela observação de preparações a fresco, e os esfregaços secos ao ar tendem a mostrar mais agregados irregulares e arredondados que empilhamentos lineares. As aglutininas frias são responsáveis por esse aspecto (Fig. 29.26).

Hemácias nucleadas

Em comparação aos eritrócitos dos invertebrados inferiores e às células da maioria dos mamíferos, os eritrócitos de mamíferos não possuem núcleo. As hemácias nucleadas (normoblastos; Figs. 29.27 e 29.48) são precursoras de hemácias anucleadas maduras encontradas no sangue. No ser humano, em geral, os normoblastos estão presentes apenas na medula óssea. Os estágios de sua produção (ver Cap. 30), do mais inicial até o último, são pró-normoblasto, normoblasto basofílico, normoblasto policromatofílico e normoblasto ortocromático. Em geral, as hemácias nucleadas que poderiam aparecer no sangue em casos de doença são os normoblastos policromáticos. Em alguns deles, contudo, o citoplasma é tão basofílico que torna-se difícil reconhecer a célula como eritroide, exceto pelo carácter do núcleo – cromatina intensamente corada e separação aguda entre cromatina e paracromatina. Essas células eritroides com frequência são confundidas com linfócitos – um erro que, em geral, pode ser evitado pela cuidadosa observação do núcleo. O megaloblasto (Fig. 29.28) é uma célula eritroide nucleada distinta, e não um mero normoblasto de tamanho aumentado. Caracteriza-se pelo tamanho grande e padrão "aberto" anormal da cromatina nuclear. As células dessa série não são encontradas na medula normal, porém estão caracteristicamente presentes na medula e, às vezes, no sangue de pacientes com anemia perniciosa ou outras formas de anemia megaloblástica.

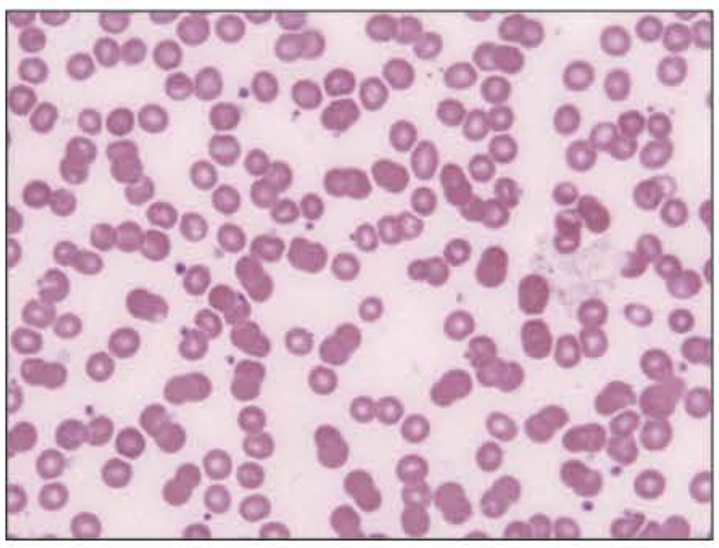


Figura 29.25 Formação de empilhamento (*rouleana*). Alinhamento de hemácias, umas atrás das outras, de modo semelhante a uma pilha de moedas. Usualmente, é causado pela elevação do fibrinogênio plasmático ou das globulinas (× 500).

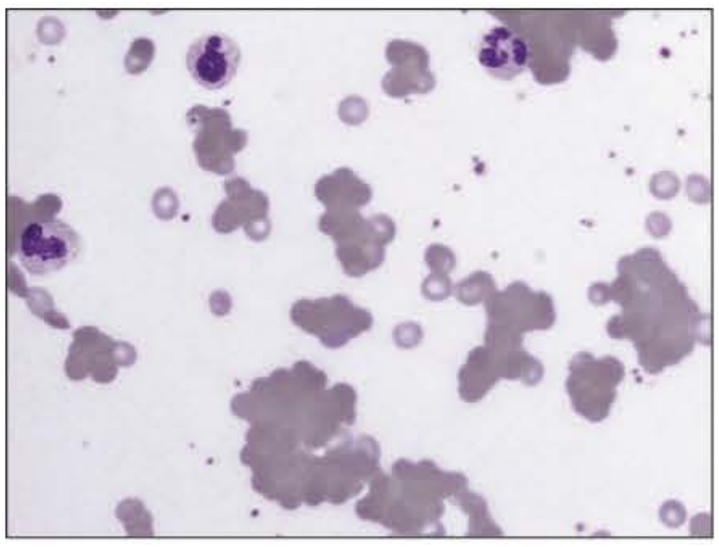


Figura 29.26 Aglutinação. Agregação de hemácias, que é mais irregular que na formação do empilhamento linear. É causada pelas aglutininas frias (× 500).

Significado das hemácias nucleadas

Os normoblastos normalmente estão presentes apenas no sangue do feto e de bebês recém-nascidos. No indivíduo adulto sadio, essas células ficam confinadas à medula óssea e aparecem no sangue circulante apenas em casos de doença, quando sua presença costuma denotar uma extrema demanda à medula, hematopoiese extramedular ou reposição de medula. Grandes números de hemácias nucleadas circulantes são vistos, em particular, na doença hemolítica do recém-nascido (eritroblastose fetal) e na talassemia maior.

Reação leucoeritroblastótica

A presença de normoblastos e células imaturas da série neutrofílica no sangue é conhecida como reação leucoeritroblastótica (Fig. 29.29). Com frequência, indica a existência de distúrbios que ocupam espaço na medula óssea, tais como mielofibrose com metaplasia mieloide, carcinoma metastático, leucemias, mieloma múltiplo, doença de Gaucher, entre outros. Não obstante, em um estudo realizado por Weick et al. (1974), mais de um terço dos pacientes com reação leucoeritroblastótica não apresentavam doença maligna ou potencialmente maligna (Tab. 29.6). Em pacientes com malignidade metastática, uma reação leucoeritroblastótica constitui boa evidência de envolvimento tumoral da medula.

Leucócitos ao exame do esfregaço de sangue periférico

Antes de avaliar os leucócitos em esfregaços corados pelo método de Romanowsky, primeiramente é necessário assegurar-se de que o esfregaço tenha sido bem feito, a distribuição celular esteja uniforme e a coloração das células esteja satisfatória. É possível começar pela varredura da área de contagem da lâmina e, nos esfregaços em cunha, das margens laterais e da cauda, onde monócitos, neutrófilos e células grandes anormais (quando presentes) tendem a estar representados de modo desproporcional. Nas preparações de lamínulas, é menos provável que haja essa distribuição desigual. Células suspeitas

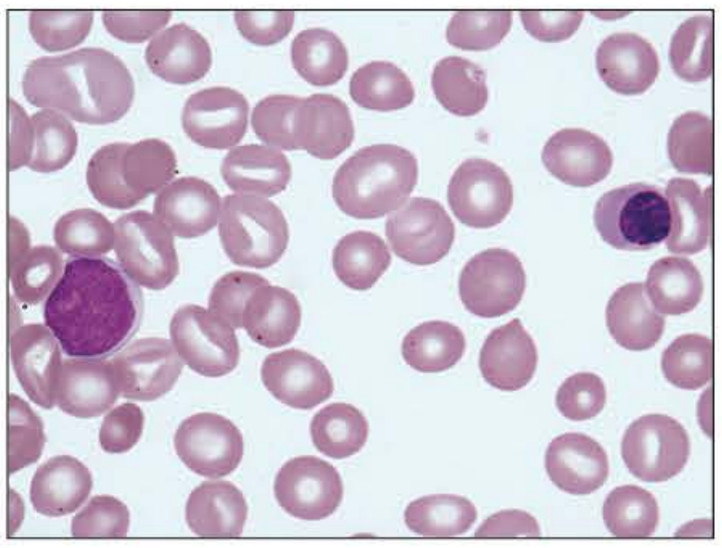


Figura 29.27 Hemácias nucleadas/normoblastos. Precursores de hemácias maduras, os normoblastos costumam se encontrados apenas na medula óssea. Sua presença no sangue usualmente está associada ao aumento da produção de hemácias ou a distúrbios de infiltração da medula óssea (× 1.000).

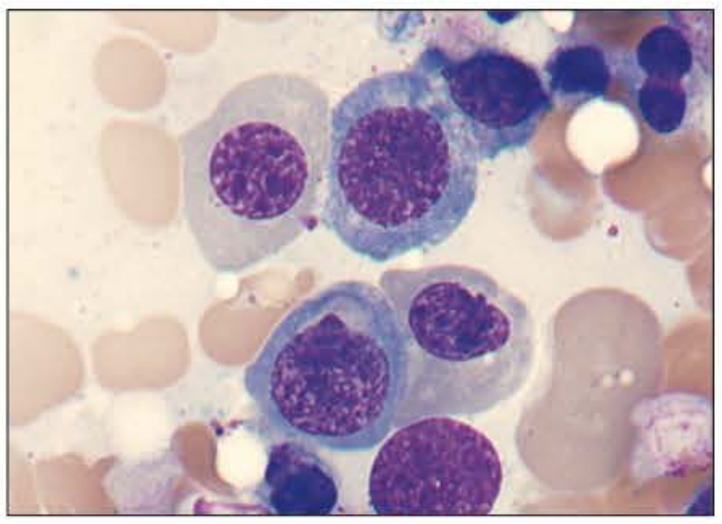


Figura 29.28 Megaloblasto. Grande hemácia nucleada, que apresenta cromatina nuclear "aberta" anormal. São encontrados com frequência na medula óssea de indivíduos com síndromes mielodisplásicas ou outras anemias megaloblásticas. Ocasionalmente, também podem ser vistos no sangue periférico (× 1.000).

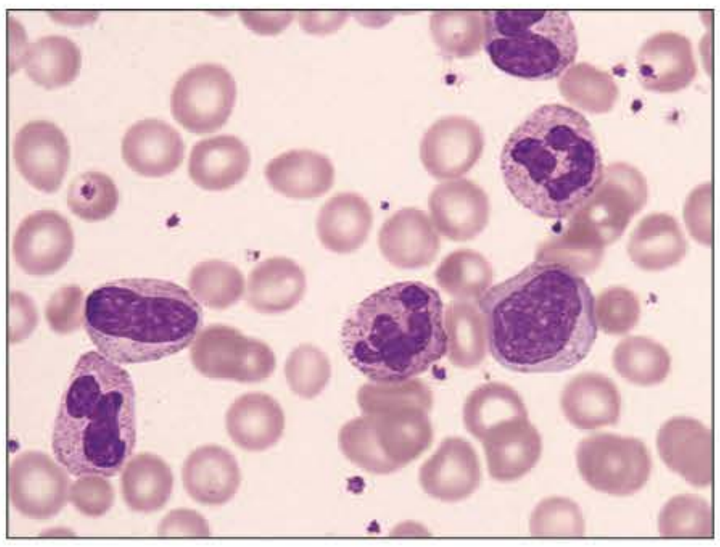


Figura 29.29 Reação leucemoide. Série neutrofílica deslocada para a esquerda, com neutrófilos, bastonetes e mielócitos. Os neutrófilos também apresentam grânulos tóxicos e grosseiros (× 1.000).

Tabela 29.6 Condições associadas à leucoeritroblastose

0,63	0,26	Tumores sólidos e linfomas
	0,24	Distúrbios mieloproliferativos, incluindo leucemia mieloide crônica (LMC)
	0,13	Leucemias agudas
0,37	0,03	Condições hematológicas benignas
	0,08	Hemólise
	0,26	Diversas, incluindo perda de sangue

As proporções se baseiam em uma série de 215 casos descobertos em um estudo de 50.277 exames de esfregaços de sangue realizado em um período de 6 meses, uma proporção de 0,004.

Dados de Weick JK, Hagedorn AB, Linman JW: Leukoerythroblastosis: Diagnostic and prognostic significance. Mayo Clin Proc 1974; 49:110.

são detectadas com aumento de 100 × e confirmadas por alta resolução. Como as hemácias nucleadas, macrófagos, granulócitos imaturos, células linfoides imaturas, megacariócitos e células anormais normalmente não são encontradas no sangue, sua detecção deve ser registrada.

Quando a varredura é feita sob baixa resolução, recomenda-se estimar a contagem de leucócitos a partir do esfregaço. Ainda que seja apenas uma aproximação imperfeita, às vezes é possível detectar erros na contagem total. Em seguida, procede-se à determinação do porcentual de distribuição dos diferentes tipos de leucócitos, que é a conhecida contagem diferencial de leucócitos. Em pacientes com leucopenia, pode ser necessário concentrar os leucócitos por meio da centrifugação do sangue tratado com anticoagulante EDTA e preparar esfregaços com material retirado da camada de cima do concentrado de células. Esse creme leucocitário contém sobretudo leucócitos e plaquetas. Na técnica de contagem de "ameias" (crenellation), o campo visual é movido de um lado a outro por toda a extensão da lâmina, na "área de contagem", logo atrás da cauda esfarrapada onde as hemácias estão separadas umas das outras e livres de artefatos. Conforme vão sendo encontrados, cada leucócito é classificado até que 100, 200, 500 ou 1.000 leucócitos tenham sido contados. Quanto maior o número de células contadas, maior a precisão. No entanto, por razões de ordem prática, usualmente é realizada a contagem de 100 células. A contagem pode ser registrada com o auxílio de contador mecânico ou eletrônico. Leucócitos que não podem ser classificados devem ser reunidos em um mesmo grupo não identificado. Em determinadas condições, pode haver muitos desses leucócitos não identificados. Durante o procedimento da contagem diferencial de leucócitos, a morfologia de eritrócitos e plaquetas é examinada e o número de plaquetas é estimado. A concentração absoluta de cada variedade de leucócito equivale a seu porcentual multiplicado pela contagem total de leucócitos. Um aumento da concentração absoluta é um aumento absoluto, enquanto um aumento do porcentual é apenas um aumento relativo. Os intervalos de referência são mais úteis se dados em concentrações absolutas, em vez de porcentuais (Tab. 29.3).

Leucócitos normalmente presentes no sangue

Neutrófilo (leucócito polimorfonuclear neutrofílico; granulócito segmentado neutrofílico)

Neutrófilos apresentam, em média, diâmetro de 12 μm. São menores que os monócitos e eosinófilos e discretamente maiores que os basófilos. Seu núcleo cora-se intensamente, é irregular e, por vezes, assume formas comparáveis às letras E, Z e S. Aquilo que aparenta ser núcleos separados em geral são segmentos de material nuclear conectados por delicados filamentos.

Um filamento possui comprimento, mas não apresenta largura quando o foco é deslocado para cima e para baixo. Um neutrófilo segmentado (Figs. 29.30 e 29.49) possui ao menos dois de seus lobos separados por um filamento. Um neutrófilo bastonete (Figs. 29.30 e 29.49) pode apresentar tanto uma fita de material nuclear, mais espessa que o filamento que conecta os lobos, quanto um núcleo em forma de U com espessura uniforme. Em ambos os tipos de neutrófilos, o núcleo possui blocos grosseiros de cromatina e espaços de paracromatina definidos de forma bastante aguda. Em decorrência da sobreposição do material nuclear, caso não seja possível descobrir se há ou não um filamento presente, a célula deve ser incluída na categoria de neutrófilos segmentados (Mathy, 1974). Em neutrófilos normais, o número de lobos varia de 2 a 5, sendo em média em número de 3. O citoplasma em si é incolor e apresenta pequenos grânulos (0,2 – 0,3 μm) que se coram de rosa pela coloração de Wright. Cerca de 2/3 desses grânulos são específicos, enquanto 1/3 deles são grânulos azurófilos. Quando observados ao microscópio de luz, ambos os tipos de grânulos muitas vezes são indistinguíveis na célula madura (Fig. 29.31). Os neutrófilos segmentados correspondem em média a 56% dos leucócitos, com intervalos de referência de 1,8 a 7 × 10^9/L em indivíduos adultos brancos, porém com um limite mais baixo de 1,1 × 10^9/L em indivíduos adultos negros. Os neutrófilos bastonetes representam em média 3% dos leucócitos, com um valor de referência máximo de cerca de 0,7 × 10^9/L na população branca, que é discretamente menor na população negra (considerando a definição anterior e fazendo a contagem diferencial de 100 células) (Tab. 29.3).

Na situação normal, cerca de 10 a 30% dos neutrófilos segmentados possuem 2 lobos, 40 a 50% têm 3 lobos, 10 a 20% têm 4 lobos e até 5% apresentam 5 lobos. Ocorre um "deslocamento para a esquerda" quando há aumento do número de bastonetes e diminuição da concentração de neutrófilos maduros no sangue, bem como número médio de lobos reduzido nas células segmentadas (Figs. 29.29 e 29.31).

A produção e a fisiologia dos neutrófilos são discutidas em capítulos subsequentes. Neutrofilia, ou leucocitose neutrofílica, consiste no aumento da contagem absoluta, enquanto a neutropenia se refere a sua diminuição.

Eosinófilo (granulócito eosinofílico)

O diâmetro médio dos eosinófilos é 13 μm. A estrutura dessas células assemelha-se à dos neutrófilos polimorfonucleares, com a notável diferença de que, em vez de grânulos neutrofílicos, seu citoplasma contém grânulos maiores, arredondados ou ovais, que apresentam forte afinidade por corantes ácidos (Fig. 29.32). São facil-

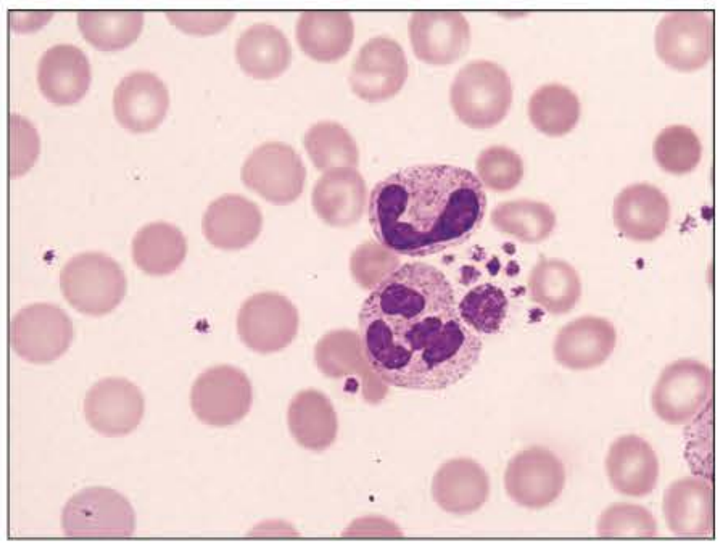


Figura 29.30 Um neutrófilo e uma forma em bastonete. O neutrófilo e o bastonete exibem separação dos lobos nucleares (no neutrófilo maduro) vs. núcleo em ferradura no bastonete. Uma plaqueta gigante também pode ser observada (× 1.000).

mente reconhecidos pelo tamanho e cor dos grânulos, que se coram de vermelho brilhante pela eosina. O citoplasma é incolor. O núcleo cora-se com um pouco menos de intensidade que o núcleo dos neutrófilos e, em geral, apresenta 2 segmentos conectados (lobos). É raro encontrar mais de 3 lobos em seu núcleo. Os eosinófilos, em média, correspondem a 3% da população de leucócitos de um indivíduo adulto, com um valor de referência máximo igual a $0{,}6 \times 10^9$/L, quando calculado a partir da contagem diferencial. Se os indivíduos alérgicos forem excluídos, esse limite provavelmente será de $0{,}35 \times 10^9$/L ou 350/μL. O valor de referência mínimo provavelmente é de 40/μL. Uma diminuição do número de eosinófilos (eosinopenia) pode ser detectada apenas por meio da contagem de grandes números de células, como nas contagens diretas em hemocitômetro (Dacie, 1991), ou com o auxílio de um contador diferencial automatizado de citometria de fluxo.

Basófilos (granulócitos basofílicos)

Em geral, os basófilos se parecem com os neutrófilos, exceto pelo núcleo menos segmentado (em geral apenas endentado ou parcialmente lobulado) e pelos grânulos maiores com forte afinidade por corantes básicos (Figs. 29.32 e 29.33). Uma vez que são solúveis em água, a maioria dos grânulos pode ser perdida em alguns basófilos, deixando em seu lugar vacúolos ou aberturas no citoplasma. Os grânulos têm cor de mauva. Em um esfregaço bem corado, essas estruturas têm cor púrpura-escura, enquanto o núcleo é um pouco mais pálido e, muitas vezes, fica praticamente escondido pelos grânulos, sendo difícil distinguir seu formato. Grânulos de basófilos com coloração desigual podem ter forma anelar e ser parecidos com *Histoplasma capsulatum* ou protozoários.

Os basófilos são os leucócitos menos numerosos no sangue normal, representando em média 0,5% do total. Os valores de referência de 95% para adultos são de 0 a $0{,}2 \times 10^9$/L, quando derivados da contagem diferencial.

Monócitos

O monócito é a maior célula presente no sangue normal (Fig. 29.34). Em geral, possui um diâmetro equivalente a 2 a 3 vezes o diâmetro de um eritrócito (14–20 μm), embora monócitos menores às vezes sejam encontrados. Possui um único núcleo que é lobulado em parte, profundamente endentado ou com forma de ferradura. Às vezes, o núcleo de um monócito pode parecer arredondado ou oval. O citoplasma é abundante. A cromatina nuclear com frequência é vista como fitas finas e paralelas, separadas por uma paracromatina agudamente definida. O núcleo cora-se de forma menos densa que o núcleo dos demais leucócitos. O citoplasma é azul-acinzentado, com aspecto de vidro fosco, e muitas vezes contém grânulos finos de cor vermelha a púrpura que são menos distintos e menores que os grânulos dos neutrófilos. Em alguns casos, grânulos azuis podem ser observados. Quando o monócito se transforma em macrófago, sofre aumento de tamanho (20–40 μm). Seu núcleo pode se tornar oval e a cromatina, mais reticular ou dispersada, de modo que os nucléolos passam a ser visualizados. Uma zona perinuclear clara (Golgi) pode ser evidenciada. Os finos grânulos vermelhos ou azurófilos variam em número ou podem desaparecer. O citoplasma mais abundante tende a ser irregular nas margens da célula e conter vacúolos. Essas estruturas são vacúolos fagocíticos, que podem conter hemácias ingeridas, debris, pigmentos ou bactérias. A evidência de fagocitose em monócitos ou a presença de macrófagos detectadas em esfregaço de sangue de preparação direta constituem um achado patológico e, muitas vezes, indicam a ocorrência de uma infecção ativa.

Os monócitos correspondem, em média, a 4% dos leucócitos, e o intervalo de referência para adultos é de aproximadamente 0 a $0{,}8 \times 10^9$/L, dependendo do método empregado na contagem diferencial (Tab. 29.3).

Linfócitos

Os linfócitos são células mononucleares desprovidas de grânulos citoplasmáticos específicos. Linfócitos pequenos são quase do mesmo tamanho que os eritrócitos, ou discretamente maiores (6–10 μm) (Fig. 29.9). O linfócito típico possui um núcleo único e agudamente definido, que contém blocos pesados de cromatina. Sua cromatina é corada de azul-escuro pela coloração de Wright, enquanto a

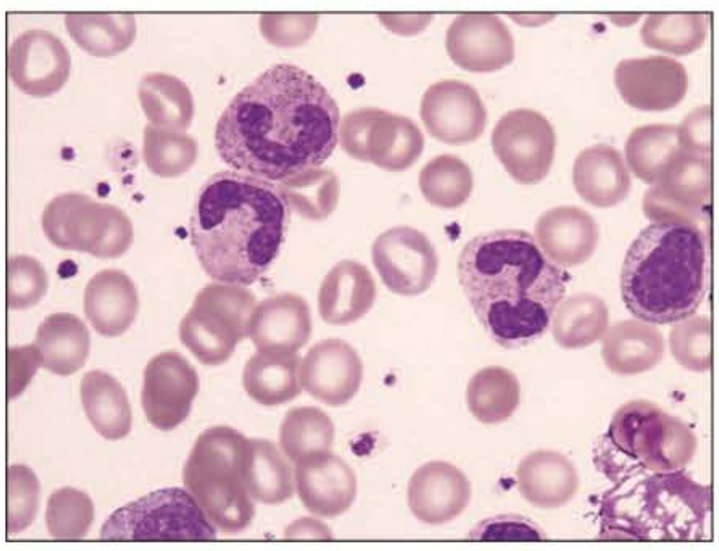


Figura 29.31 Grânulos neutrofílicos. Grânulos citoplasmáticos em mielócitos e neutrófilos maduros (× 1.000).

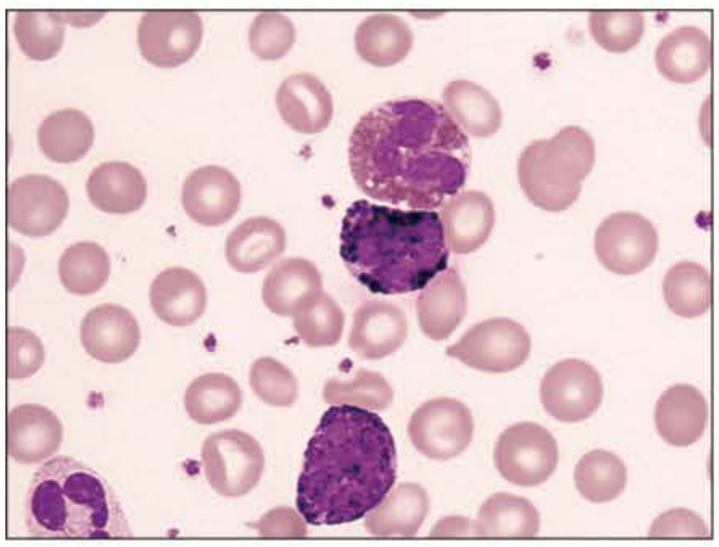


Figura 29.32 Basófilo (abaixo) e eosinófilo (acima). Grânulos eosinofílicos são mais grossos e maiores e muitas vezes não se sobrepõem ao núcleo, diferente do que se observa no basófilo, cujos grânulos grandes e intensamente basofílicos com frequência obscurecem os detalhes nucleares (× 1.000).

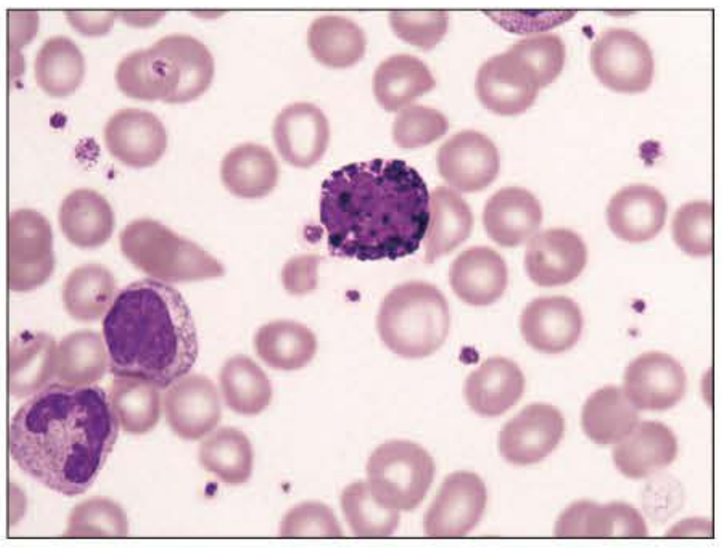


Figura 29.33 Basófilo (centro), mielócito neutrofílico e bastonete (esquerda). No basófilo, os grânulos são muito maiores e mais grossos que os finos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e de seus precursores (× 1.000).

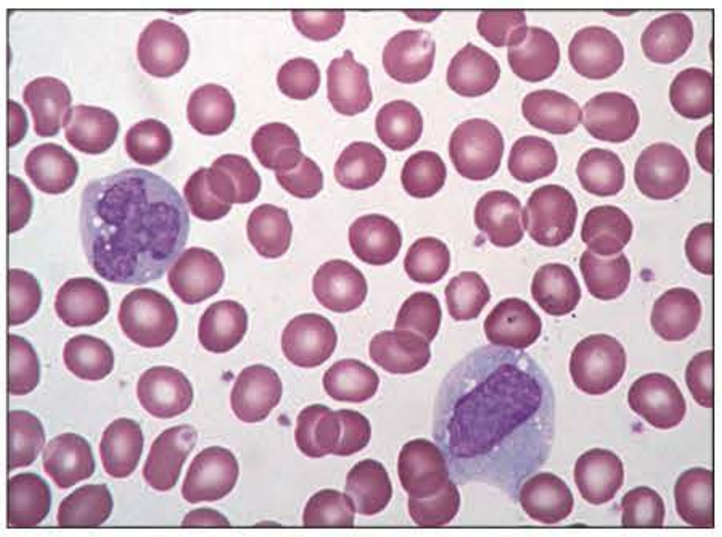


Figura 29.34 Monócito. Entre as células sanguíneas normais, o monócito é a maior e a que apresenta o padrão de cromatina nuclear mais delicado. Há uma quantidade moderada de citoplasma cinza-claro, com granulação fina e vacuolização (× 500).

paracromatina destaca-se como estrias de cor mais clara. Na periferia do núcleo, a cromatina é condensada. Caracteristicamente, observa-se uma transição gradual ou "esfumaçamento" entre a cromatina e a paracromatina. O núcleo em geral é redondo, mas às vezes apresenta uma endentação em um dos lados. O citoplasma é corado de azul-claro, exceto na zona perinuclear clara. Linfócitos maiores (Figs. 29.35 e 29.36), com diâmetro de 12 a 15 μm, um núcleo que se cora menos densamente e citoplasma abundante, são encontrados com frequência, em especial no sangue de crianças, podendo ser difícil distingui-los dos monócitos. As margens citoplasmáticas disformes e endentadas dos linfócitos se devem à pressão exercida pelas células vizinhas. No citoplasma de cerca de 1/3 dos linfócitos grandes, existem alguns grânulos púrpura-avermelhados arredondados. Esses grânulos são maiores que os grânulos dos leucócitos neutrofílicos. Há um contínuo espectro de tamanhos, desde os pequenos até os grandes linfócitos, e pode haver, de fato, uma transição de pequeno a grande para as formas blásticas, assim como o inverso. A classificação em pequenos linfócitos e grandes linfócitos, separadamente, não possui significado. A presença de uma proporção significativa de linfócitos atípicos e formas blásticas (linfócitos reticulares linfoblásticos não leucêmicos) merece atenção. Sua constatação indica que houve transformação de células linfoides como resposta à estimulação antigênica. Os plasmócitos possuem um citoplasma azul abundante, muitas vezes com vacúolos ou estrias claras, um núcleo redondo excêntrico e uma zona (Golgi) clara definida adjacente ao núcleo (Fig. 29.37). O núcleo do plasmócito contém cromatina intensamente agregada, muito bem definida a partir da paracromatina, e, por vezes, em arranjo de padrão radial ou semelhante à roda. Os plasmócitos, em geral, estão ausentes no sangue.

Os linfócitos representam, em média, 34% de todos os leucócitos, apresentando uma variação de $1{,}5 \times 10^9$/L a 4×10^9/L em adultos. Os linfócitos e seus derivados – os plasmócitos – fazem parte da defesa imune do corpo.

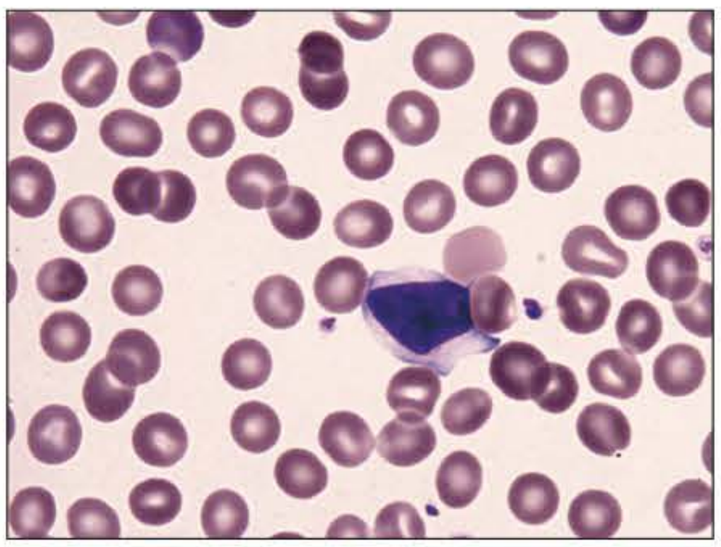


Figura 29.35 Linfócito. Este é um linfócito benigno reativo, com citoplasma cinza moderadamente abundante que envolve as hemácias vizinhas e com separação distinta de cromatina/paracromatina (× 1.000).

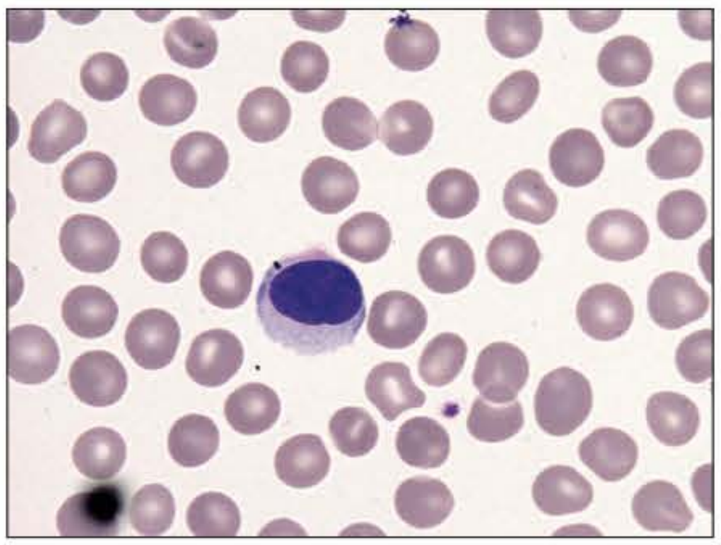


Figura 29.36 Grande linfócito reativo, com citoplasma azul-acinzentado moderadamente abundante (× 1.000).

Artefatos

Células rompidas

Leucócitos danificados ou rompidos (Figs. 29.38 e 29.39) constituem uma pequena parcela das células nucleadas no sangue normal. Os núcleos desnudos das células rompidas (Figs. 29.40 e 29.41) variam de relativamente bem preservados e sem citoplasma a um borrão de material nuclear, às vezes com estrias dispostas em uma rede grosseira – as conhecidas células em cesta. É provável que representem células frágeis, usualmente linfócitos rompidos durante o preparo do esfregaço. Essas células podem ser numerosas diante de uma linfocitose atípica, leucemia linfocítica crônica e leucemia aguda.

Alterações degenerativas

À medida que o sangue envelhece dentro do tubo de ensaio, os leucócitos começam a sofrer alterações morfológicas (Sacker, 1975). O grau de modificação varia entre as células e de um indivíduo para outro. Em 30 minutos, os núcleos dos neutrófilos começam a inchar e pode haver alguma perda estrutural de cromatina. Vacúolos citoplasmáticos aparecem especialmente em monócitos e neutrófilos. Os monócitos sofrem lobulação nuclear. Fendas profundas conferem ao núcleo uma aparência de folha de trevo (segmentação radial dos núcleos; células

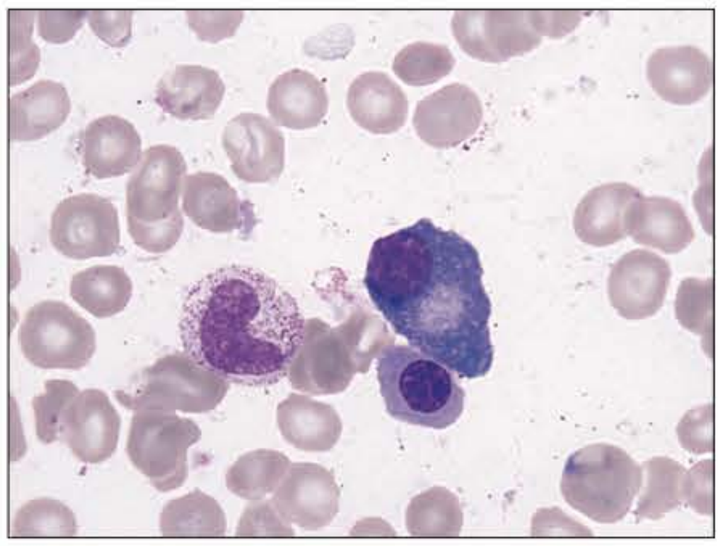


Figura 29.37 Plasmócito. Núcleo redondo e excêntrico, com agregação de cromatina nuclear e quantidade moderada de citoplasma basofílico com cavidade (hof) proeminente que abriga o núcleo (× 1.000).

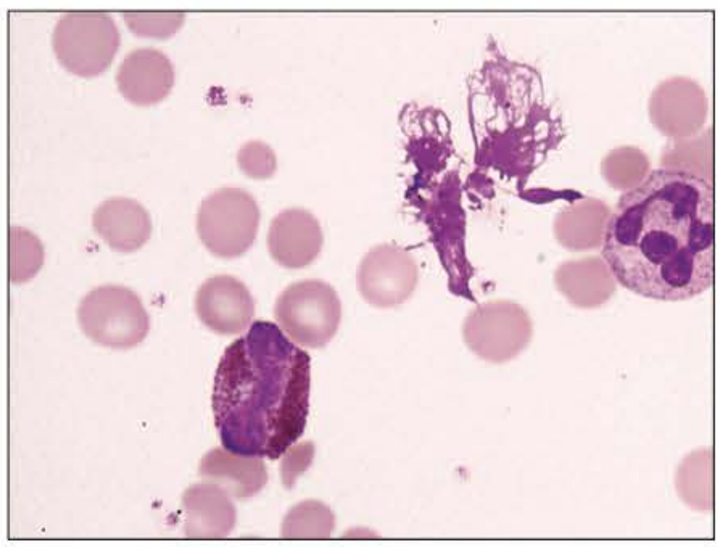


Figura 29.38 Célula rompida. Uma célula rompida da série mieloide, com perda da integridade da membrana e desintegração do conteúdo citoplasmático (× 1.000).

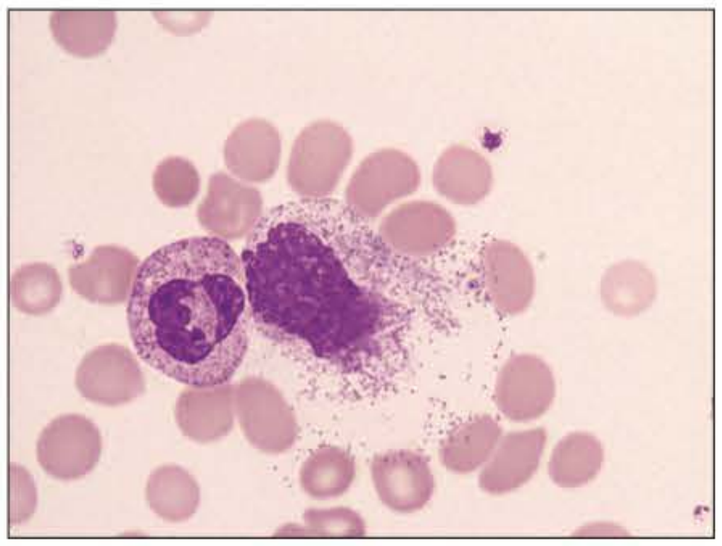


Figura 29.39 Célula rompida. Leucócito que sofreu ruptura/desintegração (× 1.000).

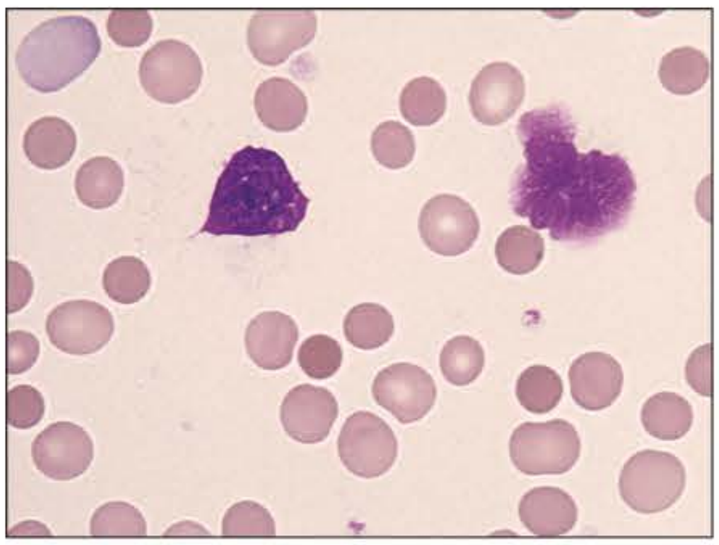


Figura 29.40 Célula esfumaçada. Remanescentes nucleares de um leucócito danificado/rompido (× 1.000).

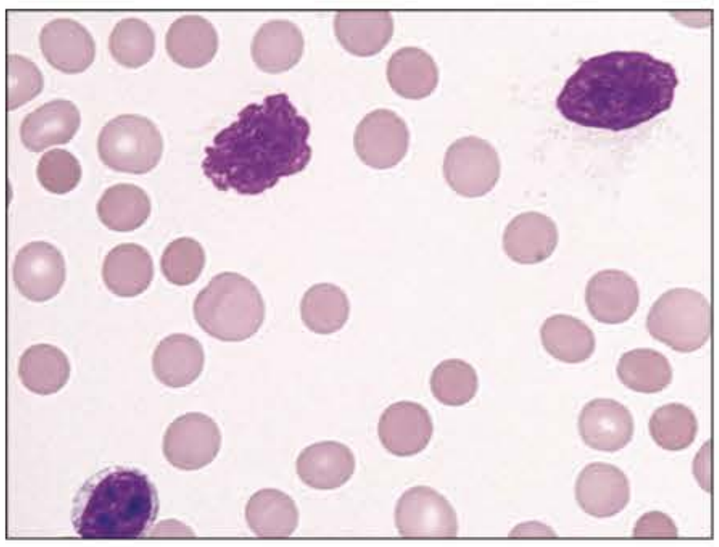


Figura 29.41 Células em cesta (× 1.000).

de Rieder). Por fim, a perda do citoplasma e um núcleo "esfumaçado" pode ser tudo o que resta da célula (Fig. 29.40). As alterações degenerativas ocorrem mais rapidamente no sangue oxalatado que no sangue-EDTA. Surgem mais rápido diante de concentrações aumentadas de EDTA, como ocorre no preenchimento incompleto de tubos de coleta de sangue a vácuo.

Células contraídas

A secagem é lenta na parte mais espessa da borda dos esfregaços. As alterações óbvias que ocorrem no esfregaço são o empilhamento dos eritrócitos e a retração dos leucócitos. Como os leucócitos estão contraídos e intensamente corados, torna-se difícil distinguir as células mononucleares. Com frequência, é impossível fazer uma identificação celular ótima nessas áreas.

Células endoteliais

Células endoteliais oriundas do revestimento dos vasos sanguíneos podem aparecer na primeira gota de sangue de uma amostra obtida por picada no dedo ou, em raros casos, no sangue venoso. Apresentam um padrão de cromatina reticular imaturo e podem ser confundidas com histiócitos ou células tumorais.

Segmentação radial dos núcleos

O uso de sangue oxalatado resulta no aparecimento de segmentação nuclear anormal nos leucócitos presentes no esfregaço. Essa segmentação difere da segmentação observada nos granulócitos, em que os lobos parecem irradiar a partir de um único ponto, conferindo uma imagem de folha de trevo ou roda de carroça. No sangue oxalatado, podem ocorrer alterações extensas em 1 a 2 horas. Outros anticoagulantes, entre os quais o EDTA, promovem modificações de menor grau.

Vacuolização

Vacúolos podem se desenvolver no núcleo e no citoplasma dos leucócitos, sobretudo em monócitos e neutrófilos, a partir do sangue anticoagulado com EDTA. Os vacúolos podem estar associados ao inchaço do núcleo e à perda de grânulos citoplasmáticos.

"Pseudofagocitose"

Às vezes, um pequeno linfócito ou, na maioria das vezes, um eritrócito pode repousar sobre um granulócito ou monócito e, assim, dar a impressão de ter sido ingerido. É possível suspeitar da verdadeira posição dessas células, pois estas são bem focalizadas em um plano acima ao da célula maior.

Fontes de erro na contagem diferencial de leucócitos

Até mesmo em esfregaços de sangue preparados com perfeição, a contagem diferencial está sujeita aos mesmos erros de distribuição aleatória. Para interpretação das diferenças dia-dia ou lâmina-lâmina de um mesmo paciente, é útil saber o quanto da variação observada é atribuível apenas ao acaso. A Tabela 29.7 fornece os limites de confiança de 95% para diferentes porcentuais de células nas contagens diferenciais realizadas, classificando um total de 100 a 10.000 leucócitos. Na comparação dos porcentuais de duas contagens isoladas, se um valor estiver fora dos limites de confiança do outro, é provável que haja uma diferença significativa (i. e., não devida ao acaso). Assim, com base em uma contagem diferencial de 100 células, se o porcentual de monócitos for igual a 5% em um dia e a

Tabela 29.7 Limites de confiança de 95% para vários porcentuais de células sanguíneas de um dado tipo, conforme determinado por contagem diferencial*

a	*n* = 100	*n* = 200	*n* = 500	*n* = 1.000	*n* = 10.000
0	0,0–3,6	0,0–1,8	0,0–0,7	0,0–0,4	0,0–0,1
1	0,0–5,4	0,1–3,6	0,3–2,3	0,5–1,8	0,8–1,3
2	0,0–7,0	0,6–5,0	1,0–3,6	1,2–3,1	1,7–2,3
3	0,6–8,5	1,1–6,4	1,7–4,9	2,0–4,3	2,6–3,4
4	1,1–9,9	1,7–7,7	2,5–6,1	2,9–5,4	3,6–4,5
5	1,6–11,3	2,4–9,0	3,3–7,3	3,7–6,5	4,5–5,5
6	2,2–12,6	3,1–10,2	4,1–8,5	4,6–7,7	5,5–6,5
7	2,9–13,9	3,9–11,5	4,9–9,6	5,5–8,8	6,5–7,6
8	3,5–15,2	4,6–12,7	5,8–10,7	6,4–9,9	7,4–8,6
9	4,2–16,4	5,4–13,9	6,6–11,9	7,3–10,9	8,4–9,6
10	4,9–17,6	6,2–15,0	7,5–13,0	8,2–12,0	9,4–10,7
15	8,6–23,5	10,4–20,7	12,0–18,4	12,8–17,4	14,3–15,8
20	12,7–29,2	14,7–26,2	16,6–23,8	17,6–22,6	19,2–20,8
25	16,9–34,7	19,2–31,6	21,3–29,0	22,3–27,8	24,1–25,9
30	21,2–40,0	23,7–36,9	26,0–34,2	27,2–32,9	29,1–31,0
35	25,7–45,2	28,4–42,0	30,8–39,4	32,0–38,0	34,0–36,0
40	30,3–50,3	33,2–47,1	35,7–44,4	36,9–43,1	39,0–41,0
45	35,0–55,3	38,0–52,2	40,6–49,5	41,9–48,1	44,0–46,0
50	39,8–60,2	42,9–57,1	45,5–54,5	46,9–53,1	49,0–51,0
55	44,7–65,0	47,8–62,0	50,5–59,4	51,9–58,1	54,0–56,0
60	49,7–69,7	52,9–66,8	55,6–64,3	56,9–63,1	59,0–61,0
65	54,8–74,3	58,0–71,6	60,6–69,2	62,0–68,0	64,0–66,0
70	60,0–78,8	63,1–76,3	65,8–74,0	67,1–72,8	69,0–70,9
75	65,3–83,1	68,4–80,8	71,0–78,7	72,2–77,7	74,1–75,9
80	70,8–87,3	73,8–85,3	76,2–83,4	77,4–82,4	79,2–80,8
85	76,5–91,4	79,3–89,6	81,6–88,0	82,6–87,2	84,2–85,7
90	82,4–95,1	85,0–93,8	87,0–92,5	88,0–91,8	89,3–90,6
91	83,6–95,8	86,1–94,6	88,1–93,4	89,1–92,7	90,4–91,6
92	84,8–96,5	87,3–95,4	89,3–94,2	90,1–93,6	91,4–92,6
93	86,1–97,1	88,5–96,1	90,4–95,1	91,2–94,5	92,4–93,5
94	87,4–97,8	89,8–96,9	91,5–95,9	92,3–95,4	93,5–94,5
95	88,7–98,4	91,0–97,6	92,7–96,7	93,5–96,3	94,5–95,5
96	90,1–98,9	92,3–98,3	93,9–97,5	94,6–97,1	95,5–96,4
97	91,5–99,4	93,6–98,9	95,1–98,3	95,7–98,0	96,6–97,4
98	93,0–99,9	95,0–99,4	96,4–99,0	96,9–98,8	97,7–98,3
99	94,6–99,9	96,4–99,9	97,7–99,7	98,2–99,5	98,7–99,2
100	96,4–100,0	98,2–100,0	99,3–100,0	99,6–100,0	99,9–100,0

* *n* é o número de células contadas; a é o porcentual de células de um determinado tipo. Os limites para *n* = 100, 200, 500 e 1.000 são exatos, enquanto aqueles para *n* = 10.000 foram determinados com as aproximações de Freeman e Tukey, conforme descrito nas tabelas de Geigy.

Cortesia de Prof CL Rümke (1985).

10% no dia seguinte, é provável que a diferença seja devida apenas a um erro de amostragem. Embora a diferença possa ser real, não se pode ter certeza por causa do pequeno número de células contadas. Por outro lado, se a contagem diferencial totalizar 500 células contadas, a diferença existente entre 5 e 10% é significativa. Nesse caso, é possível assumir com um grau razoável de certeza (com uma probabilidade de 5% de estar errado) que a diferença encontrada é real, e não se deve apenas ao acaso. Obviamente, trata-se apenas de uma estimativa mínima do erro envolvido nas contagens diferenciais, visto que não inclui erros mecânicos (devidos à variação na coleta das amostras de sangue, homogeneização inadequada, irregularidades na distribuição dependendo do tipo e da qualidade dos esfregaços e coloração precária) nem erros de identificação celular, os quais dependem do julgamento e da experiência do observador. Portanto, é necessário empregar uma técnica meticulosa e acurada, bem como uma classificação consistente das células. O médico que interpreta os resultados deve estar ciente das possíveis fontes de erro, principalmente de erros devidos ao acaso relacionados à distribuição das células. A Tabela 29.3 mostra a distribuição de vários tipos de leucócitos no sangue de indivíduos normais. São fornecidas as concentrações absolutas, que possuem importância consideravelmente maior que os porcentuais isolados.

Contagem diferencial de leucócitos automatizada

Como a contagem diferencial de leucócitos é inespecífica, imprecisa, propensa a erros, usualmente trabalhosa, de execução onerosa e de significado clínico limitado como teste de triagem, alguns pesquisadores sugeriram que seria prudente descontinuar seu uso como teste de triagem para pacientes adultos internos (Connelly, 1982). A automação da contagem diferencial elimina algumas de suas depreciações. Na situação ideal, os requerimentos de um sistema automatizado de contagem diferencial de leucócitos devem incluir:

1. a distribuição das células analisadas deve ser idêntica àquela encontrada no sangue;
2. todos os leucócitos com frequência encontrados em doenças sanguíneas devem ser acuradamente identificados, ou detectados e "sinalizados" de algum modo;
3. a velocidade do processamento deve permitir que um grande número de células seja contado, a fim de minimizar o erro estatístico;
4. o equipamento deve ser custo-efetivo (Bentley, 1977).

Os contadores de impedância e sistemas de citometria de fluxo, bem como suas respectivas contagens diferenciais, já foram discutidos antes na seção "Tecnologia Instrumental".

Os sistemas automatizados contam com a vantagem de serem capazes de analisar com rapidez maiores números de células e de reduzir significativamente o erro estatístico da contagem.

Sua desvantagem reside na falta de uma total concordância entre as categorias de células e aquelas mais familiares que são observadas nos esfregaços corados por Romanowsky. É difícil interpretar uma categoria "sem classificação". Diante da obtenção de resultados anormais, um esfregaço deve ser preparado e examinado. Em decorrência da preocupação referente às bandeiras de equipamentos, cada laboratório deve criar sua política para exames de esfregaço de sangue e contagem visual, quando houver indicação. Camden (1993) fornece questões orientadoras que devem ser aplicadas na escolha de um novo analisador hematológico para seu laboratório. O ICSH (1984b) também publicou um protocolo para avaliação de contadores de células sanguíneas automatizados.

Processamento de imagens digitalizadas

Um esfregaço de sangue confeccionado e corado com uniformidade é colocado na platina de microscópio motorizado. Um computador controla a varredura da lâmina e a interrompe quando há leucócito(s) no campo. Os detalhes ópticos (p. ex., densidade, forma, cor e tamanho nuclear e citoplasmático) são registrados por uma câmara de vídeo, analisados por computador e convertidos em formato digital. Essas características são comparadas a um banco de memória que possui as mesmas características para diferentes tipos de células. Se o padrão encontrado se ajustar ao de uma célula normal, é classificado como tal. Do contrário, é classificado como outros ou desconhecido. As coordenadas das células desconhecidas são armazenadas pelo equipamento e realocadas ao final da contagem, de modo que o analista possa classificá-las (Lapen, 1982; Parthenis, 1992; Mukherjee, 2004).

Plaquetas ao exame do esfregaço de sangue periférico

Em esfregaços feitos com sangue-EDTA e corados por corantes de Romanowsky, as plaquetas exibem forma arredondada ou oval e diâmetro de 2 a 4 μm, e estão separadas umas das outras (Fig. 29.42). A contagem de plaquetas pode ser estimada a partir desses esfregaços. Em média, se a contagem de plaquetas for normal, aproximadamente 1 plaqueta é encontrada a cada 10 a 30 hemácias. Ao aumento de 1.000 ×, isso equivale a cerca de 7 a 20 plaquetas por campo sob objetiva de imersão, nas áreas que apresentam hemácias com morfologia ótima (Fig. 29.43). As plaquetas contêm grânulos finos de cor púrpura, que usualmente preenchem seu citoplasma. Às vezes, os grânulos se concentram no centro (o "granulômero") e são circundados por um citoplasma pálido (o "hialômero"). É provável que essas plaquetas estejam ativadas; e sua aparência resulta da contração da banda microtubular. São poucas as plaquetas que apresentam concentração de grânulos diminuída (plaquetas hipogranulares). No sangue-EDTA de indivíduos normais, tanto a fração de plaquetas cujo diâmetro excede 3 μm quanto a fração de plaquetas hipogranulares são inferiores a 5%, desde que o esfregaço tenha sido preparado em 10 ou 60 minutos após a coleta do sangue. Caso os esfregaços sejam preparados de imediato ou 3 horas após a coleta de sangue, a fração de plaquetas grandes e a fração de plaquetas hipogranulares ou ativadas encontram-se aumentadas (Zeigler, 1978). Esses artefatos tornam necessário padronizar o momento em que o esfregaço deve ser preparado, para avaliação do tamanho das plaquetas nesse material. Em pacientes com trombocitopenia imune, há aumento do número de plaquetas grandes/gigantes (Fig. 29.30). A concentração dessas plaquetas também está aumentada em pacientes com a rara síndrome de Bernard-Soulier e naqueles com mieloftise ou síndromes mieloproliferativas. Nesse último caso, as plaquetas frequentemente são hipogranulares ou possuem granulômero e hialômero distintos. Em esfregaços de sangue feitos com amostra

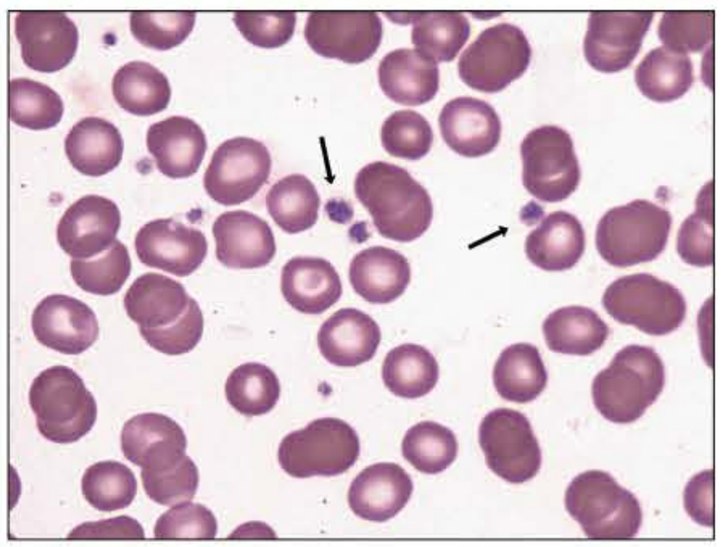


Figura 29.42 Plaquetas. Plaquetas apresentam forma que varia de arredondada a oval, diâmetro de 2 a 4 μm e estão separadas umas das outras (× 1.000).

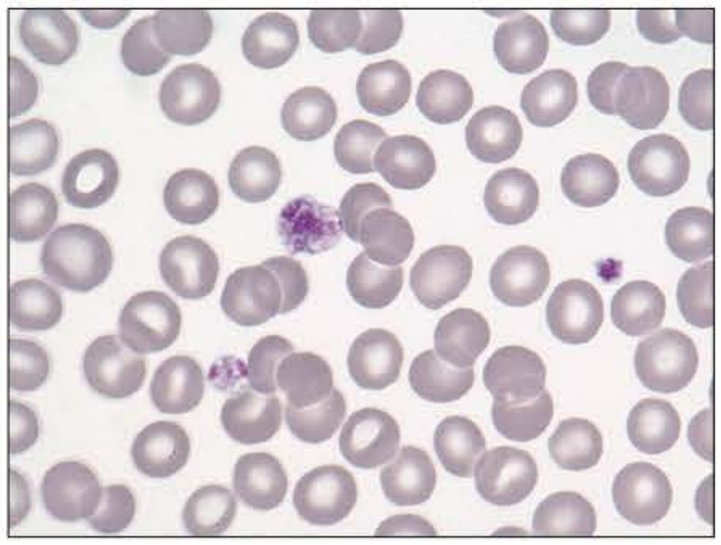


Figura 29.43 Plaqueta/plaqueta gigante. Plaquetas apresentam uma fina granularidade, e ocasionalmente uma forma maior (gigante) também pode ser observada (× 1.000).

obtida por punção de feridas existentes na pele, as plaquetas assumem formas irregulares com projeções agudas e tendem a se agregar.

Exame da medula óssea

A aspiração e a biópsia de medula podem ser realizadas como procedimentos de consultório em pacientes ambulatoriais, com risco mínimo. Comparam-se de modo favorável a uma punção venosa comum, sendo menos traumáticas que uma punção lombar. Contudo, assim como para outros procedimentos especiais, as indicações clínicas para o exame de medula devem estar claramente estabelecidas. Em cada caso, o médico deve ter em mente alguma previsão razoável do resultado a ser obtido e também do consequente benefício ao paciente. Sem exceção, primeiramente o sangue periférico deve ser examinado com cuidado. Uma circunstância relativamente incomum consiste em detectar uma doença hematológica na medula óssea sem que nenhuma evidência seja fornecida pelo sangue periférico.

Estima-se que o peso da medula de um indivíduo adulto seja de 1.300 a 1.500 g. A medula pode sofrer uma completa transformação em poucos dias e, às vezes, até mesmo em algumas horas. Via de regra, essa rápida transformação envolve todo o órgão, conforme evidenciado pelo fato de uma pequena amostra (obtida por biópsia ou aspiração) ser usualmente muito representativa de toda a medula. Tal conclusão está de acordo com resultados de estudos de amostras de biópsia obtidas simultaneamente de vários sítios. Conforme essas observações, os vários sítios escolhidos para retirada de medula para as análises são, na maioria das vezes, igualmente satisfatórios. Em consequência, a dificuldade de acesso, os riscos envolvidos, a facilidade de obtenção de uma amostra de biópsia satisfatória e o desconforto causado ao paciente constituem as principais razões que levam à escolha de um determinado sítio em um paciente em particular. Em um dado sítio, pode haver variação da distribuição celular, com áreas aparentemente hiper ou hipoplásticas. É isso que ocorre em especial na região logo abaixo do córtex. Em alguns casos, a falha em obter material em quantidade ou qualidade adequadas em um sítio pode ser seguida do sucesso em outra localização. Do mesmo modo, a necessidade de realizar repetidas aspirações ou biópsias pode indicar o uso de vários sítios diferentes. A crista ilíaca posterior é o sítio preferido. O amplo espaço medular permite que tanto a aspiração quanto a biópsia sejam facilmente realizadas de uma única vez. Existem revisões apropriadas acerca das técnicas empregadas para aspiração e biópsia de medula (Hyun, 1988).

Preparo do aspirado e do corte de biópsia

Esfregaços de medula. Um atraso é sempre indesejável, por mais breve que possa ser. Esfregaços podem ser preparados de modo similar ao preparo dos esfregaços para contagens sanguíneas comuns. Partículas acinzentadas de medula são visíveis a olho nu e constituem o melhor material para preparo de esfregaços de boa qualidade, além de servirem de pontos de referência para o exame microscópico de esfregaços corados.

Esfregaços diretos. Uma gota de medula é colocada sobre a superfície de uma lâmina a uma curta distância de uma das extremidades. Com o auxílio de um espalhador, é produzido um esfregaço de 3 a 5 cm de comprimento. A largura desse espalhador não deve ultrapassar 2 cm, e as partículas devem ser puxadas para trás sem serem esmagadas. Uma trilha de células é deixada atrás de cada partícula.

Imprints. As partículas de medula também podem ser utilizadas na preparação de *imprints*. Uma ou mais partículas visíveis são apanhadas com o auxílio de uma pipeta capilar, da extremidade quebrada de um aplicador de madeira ou de um palito de dentes, e transferidas imediatamente a uma lâmina, onde são aderidas por meio de um suave movimento deslizante. O esfregaço é rapidamente seco sob agitação ao ar e, em seguida, corado.

Preparações por esmagamento. Partículas de medula presentes em uma pequena gota de aspirado podem ser colocadas sobre uma lâmina, próximo a uma das extremidades. Outra lâmina é cuidadosamente colocada sobre a primeira. Uma leve pressão é exercida para esmagar as partículas, e as lâminas são separadas por afastamento, na direção paralela às suas superfícies. Todos os esfregaços devem ser secos rapidamente sob agitação ao ar, ou pela exposição ao ventilador. À medida que o material aspirado é espalhado, o aparecimento de gordura sob a forma de orifícios irregulares no esfregaço garante que a amostra obtida é realmente de medula, em vez de apenas sangue.

Estudos especiais. Uma amostra estéril tratada com anticoagulante e que contenha células viáveis não fixadas em suspensão celular única constitui o melhor substrato para quase todos os estudos especiais possivelmente requisitados de uma amostra de medula. Em específico, a citometria de fluxo é mais satisfatória quando utiliza amostras de aspirado tratadas com anticoagulante EDTA ou heparina, que permanecem estáveis no mínimo por 24 horas à temperatura ambiente. Para análises citogenéticas ou cultura de tecidos, a amostra de medula tratada com anticoagulante deve ser adicionada ao meio de cultura tecidual e analisada o quanto antes, visando a preservar a viabilidade ótima das células. Amostras destinadas a estudos citogenéticos em geral não são afetadas de modo adverso pela incubação de um dia a outro. O DNA é relativamente estável e pode ser extraído e analisado a partir de cortes de tecido parafinizado. Entretanto, os ensaios de RT-PCR, que envolvem amplificação de cDNA obtido a partir de mRNA, frequentemente são necessários ao diagnóstico molecular das translocações associadas à leucemia e ao linfoma. O mRNA apresenta meia-vida variável na célula intacta e é degradado rapidamente (em segundos ou minutos) no lisado celular, por ação de RNAses ubíquas. Para que a recuperação de mRNA a partir de suspensões celulares seja máxima, a maior parte das preparações de creme leucocitário ou de células mononucleares deve ser lisada em um tampão apropriado que contenha inibidores de RNAse. Essa lise deve ser realizada o quanto antes, logo após a amostragem. O EDTA é o anticoagulante preferido, porque a heparina pode provocar interferências em alguns ensaios moleculares (Ryan, 2001b).

Cortes histológicos. A biópsia por agulha e as partículas (fragmentos) de medula aglutinadas são fixadas em solução acética de Zenker (5% de ácido acético glacial; 95% de solução de Zeker) por 6 a 18 horas, ou em fixador B-5 por 1 a 2 horas (Hyun, 1988). Um tempo de incubação excessivo com qualquer fixador faz com que o tecido se torne quebradiço. Embora esses fixadores (em particular o B-5) proporcionem a melhor histologia, ambos contêm cloreto de mercúrio tóxico e estão sendo gradualmente substituídos por fixadores como zinco-formalina, entre outras preparações. O tecido é processado da forma rotineira para parafinização, cortado em seções de 4 μm e corado pelo método de rotina da hematoxilina e eosina (HE). As colorações de Giemsa e ácido periódico de Schiff (PAS) frequentemente são úteis. A fixação do tecido em material plástico possibilita o exame de seções mais espessas, bem como a melhor sobrevida da estrutura proteica, de modo que a histoquímica e a imunocitoquímica de enzimas se tornam práticas para identificação de linhagens celulares.

Os cortes proporcionam a melhor estimativa da celularidade e uma imagem da arquitetura da medula, porém são um tanto inferiores para o estudo dos detalhes citológicos. Outra desvantagem é que as partículas adequadas para os cortes histológicos nem sempre são obtidas, em especial diante de condições em que o diagnóstico depende de evidências fornecidas pela medula (p. ex., mielofibrose ou câncer metastático).

Coloração de preparações de medula

Coloração de Romanowsky. Esfregaços de medula devem ser corados com corante de Romanowsky (p. ex., Wright-Giemsa), de modo similar aos esfregaços sanguíneos. Amostras de medula com maior celularidade podem requerer um tempo de coloração maior. Além das colorações de Romanowsky e de HE, existem várias colorações especiais que também podem ser empregadas para esfregaços de sangue periférico, aspirados de medula óssea e esfregaços por imprint de contato, além de cortes de biópsia de medula óssea. Tais colorações incluem colorações citoquímicas (mieloperoxidase, Sudão negro B, naftol As-D cloroacetato esterase, esterases inespecíficas, fosfatases ácidas, fosfatase alcalina do leucócito, PAS, azul de toluidina e corante de ferro) e imunocitoquímicas, dependendo da doença e do exame morfológico preliminar do esfregaço e/ou corte (Perkins, 2004). O procedimento da coloração por ferro será discutido neste capítulo. A relevância de outras colorações é mencionada nos capítulos subsequentes, com as respectivas doenças.

Teste de Perl para ferro

Procedimento. Um esfregaço com partículas de medula é fixado por 10 minutos em vapor de formalina, imerso por 10 minutos em uma solução recém-preparada com 0,5% de ferrocianeto de potássio e 0,75% de ácido hidroclorídrico, lavado, seco e contracorado por coloração nuclear com vermelho rápido.

Interpretação. A reação com azul da Prússia ocorre em presença de hemossiderina ou ferritina. O ferro contido na Hb não se cora. Seu resultado pode ser relatado como negativo ou 1+ a 5+. Os estoques de ferro – no interior dos macrófagos – podem ser avaliados somente nas partículas de medula presentes no esfregaço. Em adultos, um resultado 2+ é normal, 3+ é discretamente elevado, 4+ é moderadamente elevado e 5+ é acentuadamente alto. Os estoques de ferro na medula localizam-se nos macrófagos. Com frequência, um pequeno número de grânulos azuis é observado. Em casos de deficiência de ferro, os grânulos corados de azul estão ausentes ou são muito raros. Os estoques de ferro aumentam na maioria dos demais tipos de anemia, infecções, hemocromatose, hemossiderose, cirrose hepática, uremia e câncer, bem como após repetidas transfusões. Os sideroblastos (Fig. 29.44) são normoblastos que contêm uma ou mais partículas de ferro passíveis de coloração. Na situação normal, 20 a 60% dos normoblastos tardios são sideroblastos; no restante, não são detectados grânulos azuis. O porcentual de sideroblastos diminui na anemia ferropriva (em que os estoques de ferro diminuem) e também nas anemias comuns associadas à infecção, artrite reumatoide e doença neoplásica (em que os estoques de ferro se mantêm normais ou aumentam). O número de sideroblastos aumenta diante do comprometimento da eritropoese decorrente de causas diversas. Esse aumento é proporcional ao grau de saturação da transferrina. A reação com azul da Prússia também pode ser realizada em lâminas previamente coradas com corante de Romanowsky para identificar sideroblastos ou para determinar se há ferro em outras células de interesse. Além disso, a coloração de ferro também é empregada na avaliação da presença de sideroblastos anormais e de sideroblastos anelares (Fig. 29.45), que são encontrados em diversas doenças hematológicas.

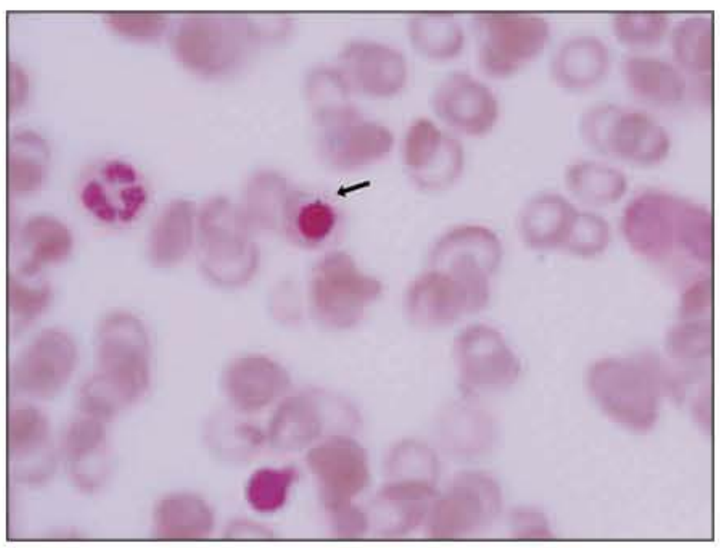


Figura 29.44 Sideroblasto normal. Um único grânulo que contém ferro é observado no citoplasma de um normoblasto em maturação. Sua identificação requer observação sob maior aumento e intensa iluminação, deslocando a objetiva para cima e para baixo (× 1.000).

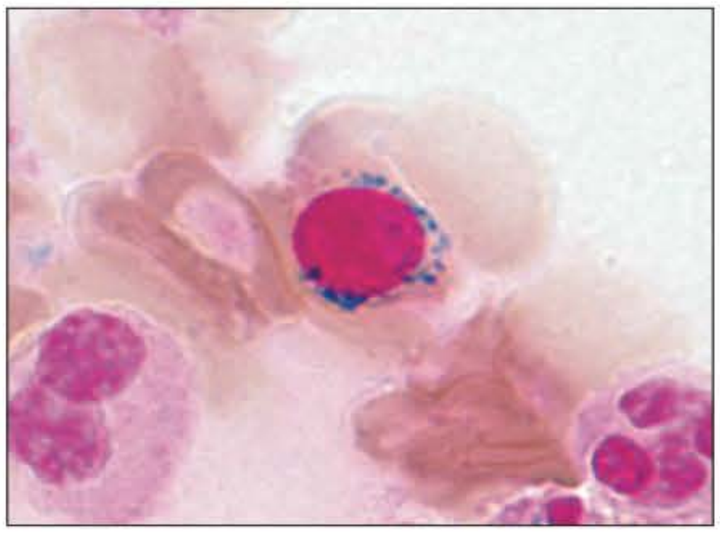


Figura 29.45 Sideroblasto em anel. Os grânulos sideróticos formam um anel perinuclear que engloba mais da metade do diâmetro nuclear (corante azul da Prússia, × 1.000).

Cortes. As colorações de rotina de HE são satisfatórias para a maioria dos propósitos. O uso de corantes de Romanowsky em materiais fixados pode ser bastante vantajoso. As colorações de ferro produzem resultados melhores quando são realizadas em esfregaços que contêm material particulado do tecido medular. São menos sensíveis para cortes de medula, porque uma parte do ferro é perdida durante o processamento e uma espessura tecidual menor é examinada nos cortes.

Exame de medula

É recomendável estabelecer um procedimento de rotina, visando a obter o máximo de informação a partir do exame de medula.

Sangue periférico

A contagem total de células sanguíneas, incluindo as contagens de plaquetas e de retioculócitos, deve ser realizada no dia do exame da medula, e os resultados devem ser incorporados ao relatório. O patologista ou hematologista que examina a medula também deve examinar cuidadosamente o esfregaço de sangue, conforme já descrito, e incorporar suas observações ao relatório sobre a medula.

Celularidade da medula

A celularidade da medula é expressa como a proporção entre volume de células hematopoiéticas em relação ao volume total do espaço medular (células + gordura + outros elementos do estroma). A celularidade varia de acordo com a idade do paciente e o sítio considerado. Exemplificando, aos 50 anos de idade, a celularidade média nas vértebras é 75%, no esterno é 60%, na crista ilíaca é 50% e nas costelas é 30%. A celularidade normal do osso ilíaco em diferentes idades foi bem definida por Hartsock et al. (1965), conforme resumido na Figura 29.46. Se o porcentual está elevado para a idade do paciente, a medula é considerada hipercelular ou hiperplástica. Se esse porcentual estiver diminuído, a medula é denominada hipocelular ou hipoplástica. A celularidade da medula é mais bem julgada a partir dos cortes histológicos de biópsia ou das partículas aspiradas (Fig. 29.47), mas também deve ser estimada a partir das partículas presentes nos esfregaços de medula. Para tanto, é feita a comparação das áreas ocupadas por espaços preenchidos com gordura e por células nucleadas nas partículas, bem como da densidade das células nucleadas encontradas na "cauda" ou *fallout* das partículas. A comparação de esfregaços e cortes de cada amostra de medula permite ao observador fazer uma estimativa razoavelmente boa a partir dos esfregaços – uma habilidade útil em situações de indisponibilidade de cortes.

Distribuição das células

A distribuição dos vários tipos de células pode ser determinada de duas formas. Na primeira delas, várias lâminas são examinadas em pequeno aumento e, em seguida, em grande aumento. Então, com base em experiências anteriores, o analista estima o número e a dis-

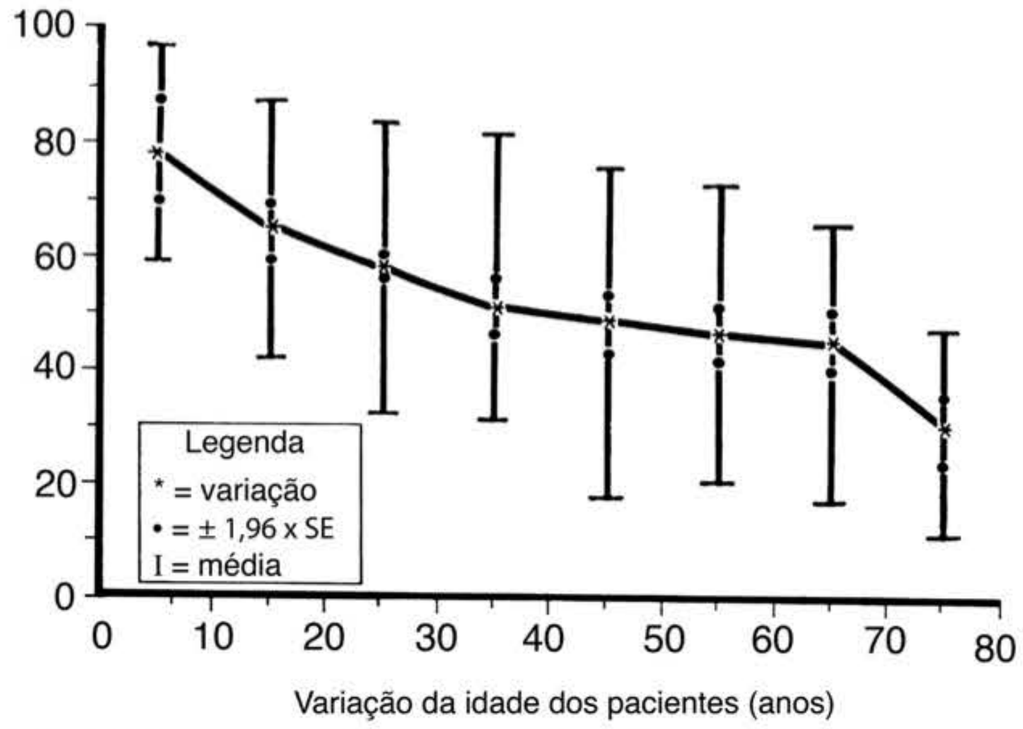


Figura 29.46 Celularidade da medula em indivíduos hematologicamente normais. O porcentual de celularidade foi representado na ordenada versus a idade (agrupada por décadas), na abscissa. (De Hartsock RJ, Smith EB, Petty CS. Am J Clin Pathol 1965; 43: 326, com permissão.)

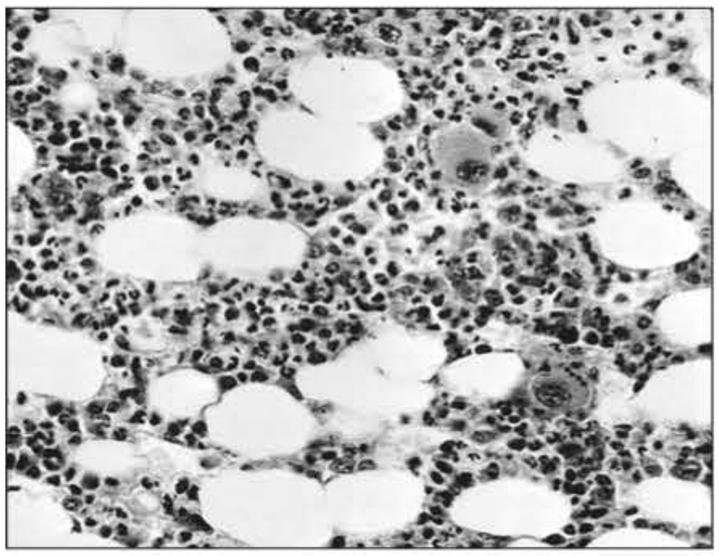


Figura 29.47 Biópsia de medula (× 1.470). A celularidade, nesse exemplo, é de 60 – 70% – um valor considerado normal para indivíduos adultos. Há três megacariócitos presentes, e do mesmo modo esse achado é normal para um tamanho de campo como o da ilustração. A maturação dos granulócitos parece ser normal, com todos os estágios presentes. Um número muito pequeno de normoblastos pode ser observado. (Os normoblastos apresentam núcleos intensamente corados e tendem a se agrupar.) A proporção mieloide/eritroide (M/E) é maior que 4:1, indicando hipoplasia eritroide. Nenhuma outra anomalia é observada.

tribuição das células. A segunda forma consiste em fazer a contagem diferencial de 300 a 1.000 células e calcular o porcentual de cada tipo de célula. O método preferido é a combinação dessas duas técnicas. A segunda técnica – a contagem diferencial cuidadosa – é parte essencial de treinamento para esse trabalho, sem a qual pode ser difícil obter acurácia na primeira técnica. A contagem diferencial também proporciona um registro objetivo a partir do qual é possível determinar futuras alterações.

O analista, em primeiro lugar, varre os esfregaços de medula sob baixa resolução (aumentos de 100 × ou 200 ×), à procura de irregularidades na distribuição celular, para determinar o número de megacariócitos e detectar a presença de células anormais. Em seguida, seleciona áreas dos esfregaços onde as células da medula não estejam diluídas com células sanguíneas e estejam separadas e dispersas o bastante para possibilitar uma identificação ótima. Essas áreas usualmente estão logo atrás das partículas de medula nos esfregaços diretos, ou próximas às partículas em esfregaços produzidos por esmagamento. A contagem diferencial é realizada sob aumentos de 400 ou 1.000 ×. A Tabela 29.8 fornece exemplos de intervalos de referência para contagens diferenciais da medula correspondentes a diferentes idades selecionadas.

As alterações na distribuição celular da medula são mais dramáticas durante o primeiro mês de vida, quando a predominância de células granulocíticas ao nascimento se transforma em predominância de linfócitos. Essas predominância de linfócitos caracteriza a medula óssea ao longo da infância. Uma pequena proporção de células linfoides "imaturas" ou transicionais (cromatina nuclear delgada, alta proporção núcleo/citoplasma, tamanho celular pequeno a intermediário) normalmente está presente. Talvez, essas células incluam células-tronco e células progenitoras, e é provável que englobem células denominadas "hematogônias". Podem aumentar em número na anemia ferropriva, púrpura trombocitopênica e outros distúrbios, principalmente durante a infância. A concentração de normoblastos diminui após o nascimento, atinge níveis máximos em 2 meses e, em 4 meses, sofre outra queda e atinge níveis estáveis relativamente baixos que permanecem durante a maior parte da infância. A proporção de células mieloides/eritroides (M/E) consiste na proporção do número total de granulócitos em relação ao número total de normoblastos. Em recém-nascidos e bebês, essa proporção é um pouco maior que a observada ao final da infância ou durante a vida adulta (Tab. 29.8). Em indivíduos adultos, observa-se uma faixa ampla que varia de cerca de 1,2:1 a 4:1. Tanto a contagem diferencial quanto a proporção M/E são valores relativos e devem ser interpretados em relação à celularidade ou considerando outra evidência de que um dos sistemas seja normal. Uma proporção M/E aumentada (p. ex., 6:1) pode ser encontrada em casos de infecção, leucemia mielógena crônica ou hipoplasia eritroide. Uma proporção M/E diminuída (i. e., < 1,2:1) pode significar uma depressão da leucocitopoiese ou uma hiperplasia normoblástica, dependendo da celularidade da medula. O número de megacariócitos é estimado de forma mais realística a partir de cortes que em esfregaços de medula. Nas áreas de varredura dos esfregaços que apresentam boa celularidade sob baixa resolução (100 ×), devem ser encontrados em média 1 a 3 megacariócitos em cada campo, quando se trata de medula normal.

Tabela 29.8 Contagens diferenciais de células da medula óssea, expressas em porcentual do total de células nucleadas

	Rosse (1977)			Mauer (1969)	Jandl (1987)
Tipos de células	**Nascimento (média, DP)**	**1 mês (média, DP)**	**18 meses (média, DP)**	**Infância (média, intervalo)**	**Adulto (média, intervalo)**
Normoblastos, total	14,48 ± 7,24	8,04 ± 5,00	8,21 ± 3,71	23,1	21,5 (14,2–30,4)
Pró-normoblastos	0,02 ± 0,06	0,10 ± 0,14	0,08 ± 0,13	0,5 (0,0–1,5)	0,6 (0,2–1,4)
N, basofílicos	0,24 ± 0,25	0,34 ± 0,33	0,50 ± 0,34	1,7 (0,2–4,8)	2,0 (0,7–3,7)
N, policromatofílicos	13,06 ± 6,78	6,90 ± 4,45	6,97 ± 3,56	18,2 (4,8–34,0)	12,4 (12,2–24,2)
N, ortocromáticos	0,69 ± 0,73	0,54 ± 1,88	0,44 ± 0,49	2,7 (0,0–7,8)	6,5 (2,0–22,7)
Neutrófilos, total	60,37 ± 8,66	32,35 ± 7,68	36,06 ± 7,40	57,1	56,0 (45,1–66,5)
Mieloblastos	0,31 ± 0,31	0,62 ± 0,50	0,06 ± 0,08	1,2 (0,0–3,2)	1,0 (0,5–1,8)
Pró-mielócitos	0,79 ± 0,91	0,76 ± 0,65	0,64 ± 0,59	1,4 (0,0–4,0)	3,4 (2,6-4,6)
Mielócitos	3,95 ± 2,93	2,50 ± 1,48	2,49 ± 1,39	18,3 (8,5–29,7)	11,9 (8,1–16,9)
Metamielócitos	19,37 ± 4,84	11,30 ± 3,59	12,42 ± 4,15	23,3 (14,0–34,2)	18,0 (9,8–25,3)
Bastonetes	28,89 ± 7,56	14,10 ± 4,63	14,20 ± 5,23		11,0 (8,5–20,8)
Segmentados	7,37 ± 4,64	3,64 ± 2,97	6,31 ± 3,91	12,9 (4,5–29,0)	10,7 (8,0–16,0)
Eosinófilos	2,70 ± 1,27	2,61 ± 1,40	2,70 ± 2,16	3,6 (1,0–9,0)	3,2 (1,2–6,2)
Basófilos	0,12 ± 0,20	0,07 ± 0,16	0,10 ± 0,12	0,06 (0,0–0,8)	<0,1 (0,0–0,2)
Linfócitos, total	15,6	49,0	45,5	16,0 (4,8–35,8)	15,8 (10,8–22,7)
De transição	1,18 ± 1,13	1,95 ± 0,94	1,99 ± 1,00		
Pequenos	14,42 ± 5,54	47,05 ± 9,24	43,55 ± 8,56		
Plasmócitos	0,00 ± 0,02	0,02 ± 0,06	0,06 ± 0,08	0,4 (0,2–0,6)	1,8 (0,2–2,2)
Monócitos	0,88 ± 0,85	1,01 ± 0,89	2,12 ± 1,59		1,8 (0,2–2,8)
Megacariócitos	0,06 ± 0,15	0,05 ± 0,09	0,07 ± 0,12		< 1,0 (0,0–0,2)
Células reticulares					0,3 (0,0–0,5)
Proporção M/E	4,2	4,0	4,4	2,9 (1,2–5,2)	2,5 (1,2–5,0)

Dados de Rosse, 1977; Mauer, 1969; e Jandl, 1987.

Maturação

Durante o exame das células na contagem diferencial, o analista pode avaliar se a maturação é normal (Figs. 29.48 e 29.49) – ou seja, se o desenvolvimento nuclear e citoplasmático é equilibrado. O comprometimento da maturação citoplasmática em normoblastos, por exemplo, ocorre quando a síntese de Hb é comprometida. Há comprometimento da maturação nuclear nas anemias megaloblásticas. Uma maturação bizarra ou displástica ocorre como resultado de certos fármacos, em alguns tipos de leucemia e nas síndromes dismielopoieticas.

Presença de tipos celulares raros ou de células anormais

Durante a varredura da medula, busca-se detectar a presença de tipos celulares raros ou inesperados.

Mastócitos teciduais (Fig. 29.50) em geral são bastante infrequentes. São encontrados em número aumentado nas anemias aplásticas ou refratárias e nos distúrbios linfoproliferativos.

Osteoblastos (Fig. 29.51) são as células que sintetizam a matriz colágena dos ossos. Osteoclastos são as células que reabsorvem o osso, e acredita-se que sejam resultantes da fusão de histiócitos. Ambos os tipos celulares normalmente estão presentes em pequeno número nos aspirados provenientes de bebês e crianças. É incomum encontrá-los na medula de indivíduos adultos, exceto quando há destruição ou reparo ósseo, como ocorre no hiperparatireoidismo, na doença de Paget, em tumores metastáticos ou em biópsias recentes de um mesmo sítio.

Osteoblastos são células grandes, com um único núcleo excêntrico que possui cromatina reticular e um nucléolo proeminente. O citoplasma é moderadamente basofílico. Uma ampla zona pálida de Golgi encontra-se separada do núcleo, em vez de confinada a ele como nos plasmócitos. Muitas vezes, os osteoblastos estão presentes em grupos e podem ser confundidos com plasmócitos imaturos ou células de mieloma. Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, cujo diâmetro chega a medir 100 μm, e que podem ser confundidas com megacariócitos. Possuem múltiplos núcleos que estão separados (e não agrupados, como nos megacariócitos). Sua cromatina é reticular e usualmente há um nucléolo presente. O citoplasma pode ser basofílico, contudo geralmente contém grânulos de cor rosa-púrpura que se parecem com os grânulos dos megacariócitos. Fragmentos grosseiros de material cor púrpura com frequência estão presentes. Grupos de células neoplásicas metastáticas (Fig. 29.52) podem ser encontrados em um ou mais esfregaços de medula de pacientes com tumor metastático no osso amostrado; podem ser observados em cortes de biópsia e, ao mesmo tempo, estar ausentes no esfregaço; podem estar presentes em ambos; ou, menos comumente, podem ser vistos em um ou mais esfregaços e não ser detectados na biópsia. Algumas células neoplásicas metastáticas assemelham-se aos mieloblastos ou a outros blastos primitivos. A pista que leva à identificação dessas células é a formação de grupos ou agregados celulares, nos quais quase sempre são encontrados. O mesmo não corre com as células blásticas hematopoiéticas.

Avaliação da amostra de biópsia

Os cortes histológicos proporcionam melhores estimativas da celularidade da medula e do número de megacariócitos do que se pode obter por meio dos esfregaços (Fig. 29.47). Em preparações histológicas de boa qualidade, é possível determinar com bastante segurança as anormalidades de distribuição e maturação celular. Além da detecção mais confiável da presença de linfomas ou tumor metastático, o

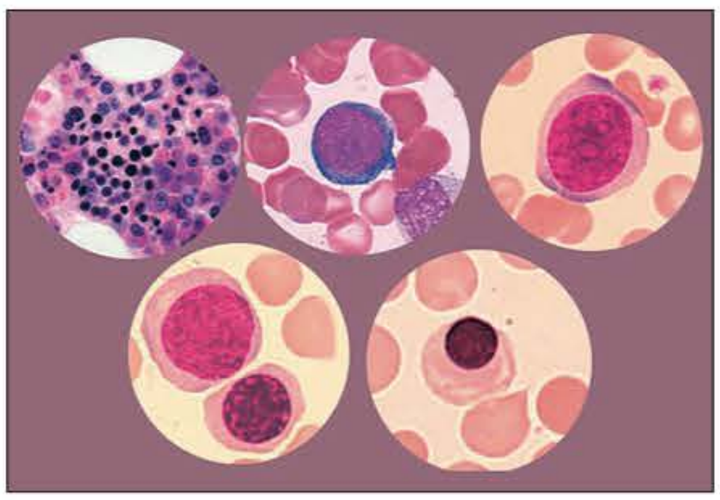


Figura 29.48 Maturação eritroide normal. Vários estágios de maturação eritroide normoblástica (∞ 1.000).

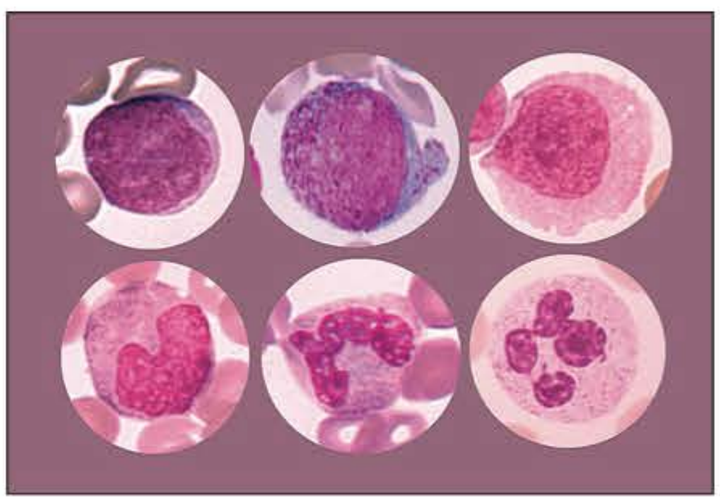


Figura 29.49 Maturação mieloide (neutrofílica) normal. Vários estágios da maturação mieloide normal, desde blastos até o neutrófilo maduro.

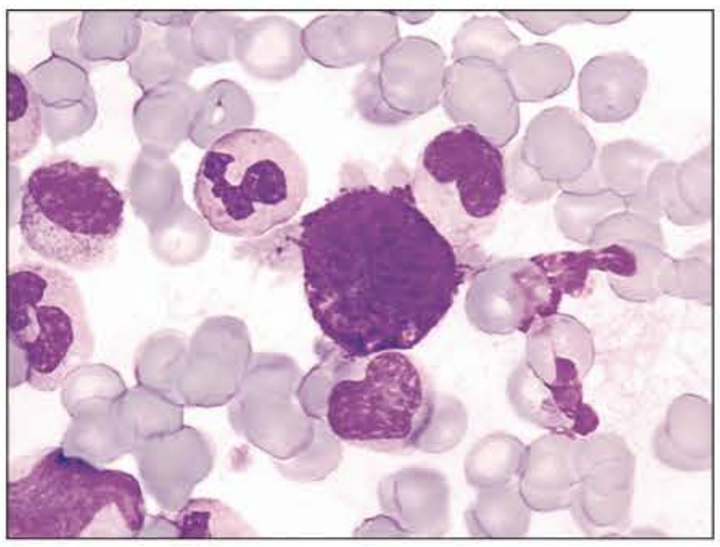


Figura 29.50 Mastócito tecidual. Os mastócitos contêm inúmeros grânulos citoplasmáticos densos, de cor púrpura-escura, que podem cobrir totalmente o núcleo redondo (∞ 1.000).

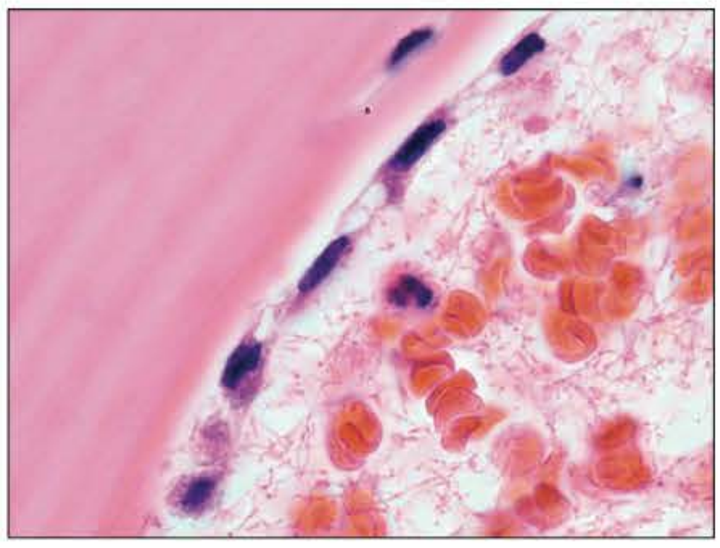


Figura 29.51 Osteoblasto. Encontrados com frequência em pacientes pediátricos, os osteoblastos revestem as trabéculas ósseas. Nos esfregaços, aparecem como células que contêm núcleo excêntrico, semelhantes aos plasmócitos, porém com citoplasma localizado mais centralmente, em vez de na área do Golgi (∞ 1.000).

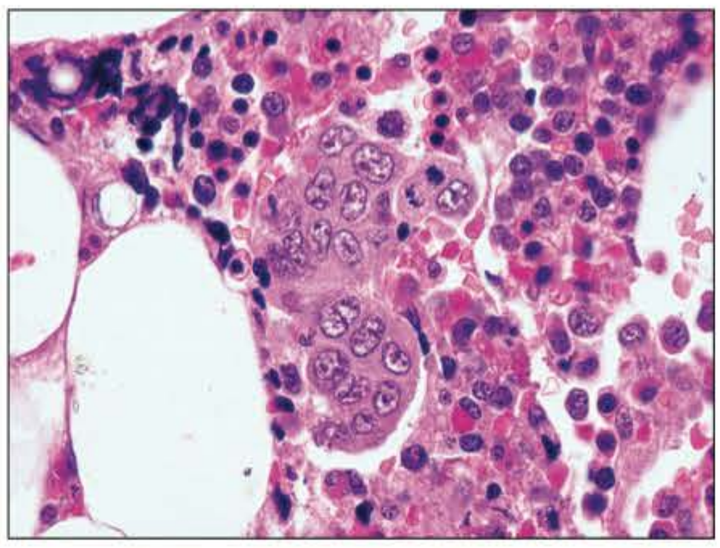


Figura 29.52 Tumor metastático. Biópsia de medula óssea com ilhas de adenocarcinoma gástrico metastático (∞ 1.000).

padrão histológico muitas vezes pode ser diagnóstico do tipo de neoplasia. Outras lesões focais que não são observadas nos esfregaços são os granulomas, os abscessos e as lesões vasculares. Em certas condições, como na mielofibrose e na leucemia de células pilosas, não é possível aspirar a medula óssea, e torna-se necessário extrair uma biópsia para estabelecer o diagnóstico. As trabéculas devem ser sempre examinadas para detectar anormalidades ósseas. A osteosclerose com espessamento das trabéculas ósseas pode acompanhar a mielofibrose ou ser congênita. Na osteoporose, as trabéculas ósseas são finas. A osteomalácia é caracterizada pela existência de uma sutura osteoide reconhecível. A osteíte fibrosa ocorre em casos de hiperparatireoidismo e se caracteriza por uma reabsorção óssea osteoclástica irregular, fibrose endóstea e algum grau de atividade osteoblástica em áreas de regeneração óssea. Trabéculas irregularmente ampliadas com um padrão "em mosaico" constituem achados típicos da doença óssea de Paget.

Interpretação

O resumo do relatório sobre a medula inclui uma estimativa da celularidade, do número de megacariócitos e da proporção M/E, observações referentes a quaisquer anormalidades citológicas ou de maturação e uma estimativa dos estoques de ferro e da proporção de sideroblastos, além de observações sobre quaisquer achados anormais encontrados. Também é incluído um resumo das anomalias que envolvem as contagens e morfologia das células sanguíneas. É elaborada uma interpretação dos achados observados, a qual obviamente engloba o diagnóstico, quando possível. Ao fazer essa interpretação, é preciso integrar as observações referentes à medula e ao sangue aos achados clínicos e outros dados laboratoriais. Alterações que envolvem as células do sangue e da medula são discutidas fazendo-se referência a doenças e distúrbios considerados em capítulos subsequentes deste livro.

Indicações para o estudo da medula

Nas anemias microcíticas, a avaliação dos estoques de ferro e dos sideroblatos permite classificar as anemias (i. e., anemia ferropriva, anemia da doença crônica, anemia sideroblástica).

Nas anemias macrocíticas, o exame da medula confirmará se o processo é ou não megaloblástico. Há certos casos em que as alterações ocorridas no sangue são mínimas, ainda que a medula seja megaloblástica. Nas anemias normocíticas (ou anemias macrocíticas) sem aumento do índice de produção de reticulócitos, a medula é avaliada quanto à existência de anormalidades quantitativas ou qualitativas na eritropoese (p. ex., aplasia pura de hemácias ou mielodisplasia).

Na neutropenia, trombocitopenia ou pancitopenia, o estudo da medula é útil para a avaliação da presença e do grau de normalidade das células precursoras em cada uma das séries. Com isso, é possível avaliar as probabilidades de diminuição da produção, comprometimento da maturação ou aumento da destruição como mecanismos do distúrbio. Nas citopenias, o exame de medula às vezes revela a presença de leucemia ou outra neoplasia hematológica.

Nas anomalias que envolvem as imunoglobulinas, o diagnóstico de mieloma de plasmócitos ou macroglobulinemia pode ser confirmado pela presença de infiltrações de plasmócitos ou linfócitos anormais. O exame de medula é essencial para o diagnóstico e classificação da leucemia aguda. Com frequência, é realizado para auxiliar o diagnóstico e estadiamento de outros neoplasmas, incluindo linfomas e tumores metastáticos, e também para avaliar a resposta do paciente à terapia de distúrbios hematológicos. É essencial obter biópsia diante da impossibilidade de aspirar a medula ("punção seca"). A biópsia de medula também deve ser obtida quando houver alterações sanguíneas sugestivas de mielofibrose com metaplasia mieloide, ou se houver suspeita de doença granulomatosa ou tumor metastático.

Referências bibliográficas

Ackerman P: Electronic Instrumentation in the Clinical Laboratory. Boston, Little, Brown and Co., 1972, p 140.

Altman PL, Dittmer DS (eds): Blood and Other Body Fluids. Washington, DC, Federation of American Societies for Experimental Biology, 1961.

Altman PL, Dittmer DS: Biology Data Book, Vol III, 2nd ed. Bethesda, MD, Federation of American Societies for Experimental Biology 1974, p 1856.

Bain BJ: Ethnic and sex differences in the total and differential white count and platelet count. J Clin Pathol 1996; 49:664–666.

Barone, MA: Lab values. *In* McMillan JA, Deangelis CD, Feigin RD, et al: (eds):Oski's Pediatrics, Principles and Practice, 3rd ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 1999, p 2224.

Barrett BA, Hill PI: A micromethod for the erythrocyte sedimentation rate suitable for use on venous or capillary blood. J Clin Pathol 1980; 33:1118.

Bartels PC, Schoorl M, Lombarts AJ: Screening for EDTA-dependent deviations in platelet counts and abnormalities in platelet distribution histograms in pseudothrombocytopenia. Scand J Clin Lab Invest 1997; 57:629–636.

Bentley SA, Lewis SM: Automated differential leukocyte counting: The present state of the art. Br J Haematol 1977; 35:481–485.

Bentley SA, Johnson A, Bishop CA: A parallel evaluation of four automated hematology analyzers. Am J Clin Pathol 1993; 100:626–632.

Bessis M: Blood Smears Reinterpreted, translated by G Brecher. New York, Springer-Verlag 1977, p 60.

Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR Jr: Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artifact of other particles. Am J Clin Pathol 1981; 76:289–293.

Böttiger LE, Svedberg CA: Normal erythrocyte sedimentation rate and age. Br Med J 1967; 2:85–87.

Brecher G, Schneiderman M: A time-saving device for the counting of reticulocytes. Am J Clin Pathol 1950; 20:1079–1093.

Brittin GM, Brecher G, Johnson CA, et al: Stability of blood in commonly used anticoagulants. Use of refrigerated blood for quality control of the Coulter Counter Model S. Am J Clin Pathol 1969; 52:690–694.

Bull BS: Is a standard ESR possible? Lab Med 1975; 6:31.

Bunn HF, Forget BG: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, WB Saunders Company, 1986, p 623.

Bunn HF, Forget BG, Ranney HM: Human Hemoglobins. Philadelphia, WB Saunders Company, 1977, p 2.

Burns ER, Lampasso J, Kowatch N, et al: Performance characteristics of state-of-the-art hematology analyzers. Clin Lab Sci 1992; 5:181–185.

Camden TL: How to select the ideal hematology analyzer. Med Lab Obs 1993; 25:29–33.

Cantero M, Conejo JR, Jimenez A: Interference from lipemia in cell count by hematology analyzers. Clin Chem 1996; 42:987–988.

Caswell M, Stuart J: Assessment of Diesse Ves-matic automated system for measuring erythrocyte sedimentation rate. J Clin Pathol 1991; 44:946–949.

Connelly DP, McClain MP, Crowson TW, et al: The use of the differential leukocyte count for inpatient case finding. Hum Pathol 1982; 13:294–300.

Cornbleet J: Spurious results from automated hematology cell analyzers. Lab Med 1983; 14:509.

Referência extremamente útil para análise de resultados espúrios fornecidos por contadores de células automáticos. Discute as razões para o aparecimento dos resultados espúrios, com cada parâmetro apresentado em um formato agradavelmente tabulado.

Cornbleet PJ, Myrick D, Judkins S, et al: Evaluation of the Cell-Dyn 3000 differential. Am J Clin Pathol 1992; 98:603–614.

Dacie JV, Lewis SM: Practical Haematology, 7th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991, p 33.

Dalman PR: Developmental changes in red blood cell production and function. *In* Rudolph AM, Hoffman JIE (eds): Pediatrics, 18th ed. Norwalk, CT, Appleton & Lange, 1987, pp 1011–1012.

Davis BH: Immature reticulocyte fraction (IRF): by any name, a useful clinical parameter of erythropoietic activity. Lab Hematol 1996; 2:2–8.

Davis BH, Biegelow NC: Automated reticulocyte analysis. Clinical practice and associated new parameters. Hematol Oncol Clin North Am 1994; 8: 617–630.

d'Onofrio G, Tichelli A, Foures C, et al: Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: The role of reticulocyte measurements. Clin Lab Haematol 1996 18:45–53.

Ebrahim A, Ryan WL: Encapsulation of ribonucleic acid in human red cells for use as a reticulocyte quality control material for flow cytometric analysis. Cytometry 1996; 25:156–163.

Fairbanks VF, Fahey JL, Beutler E: Clinical Disorders of Iron Metabolism, 2nd ed. New York, Grune & Stratton, 1971, p 178.

Ford HC, Toomath RJ, Carter JM, et al: Mean platelet volume is increased in hyperthyroidism. Am J Hematol 1988; 27:190–193.

Freeman AG: Is the erythrocyte sedimentation rate outdated? J R Soc Med 1997; 90:179–180.

Geller A: Vacutainer systems. Franklin Lakes, NJ, Becton Dickinson, 1996.

Hanseler E, Fehr J, Keller H: Estimation of the lower limits of manual and automated platelet counting. Am J Clin Pathol 1996; 105:782–787.

Harrow C, Singer AJ, Thode HC: Facilitating the use of the erythrocyte sedimentation rate in the emergency department. Acad Emerg Med 1999; 6:658–660.

Hartsock RJ, Smith EB, Petty CS: Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. Am J Clin Pathol 1965; 43:326–331.

Hyun BH, Gulati GL, Ashton JK: Bone marrow examination: Techniques and interpretation. Hematol Oncol Clin North Am 1988; 2:513–523.

International Committee for Standardization in Haematology (ICSH): Recommendation for measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood. Am J Clin Pathol 1977; 68:505.

International Committee for Standardization in Haematology (ICSH): Expert Panel on Blood Cell Sizing: Recommendation for reference method for determination of packed cell volume of blood. J Clin Pathol 1980; 33:1–7.

International Committee for Standardization in

Haematology (ICSH): ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). Br J Haematol 1984a; 57:707–710.

International Committee for Standardization in Haematology (ICSH): Protocol for evaluation of automated blood cell counters. Clin Lab Haematol 1984b; 6:69–84.

Este protocolo avalia os contadores de células sanguíneas automáticos, considerando o desempenho, as vantagens e as limitações de cada instrumento.

International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology): ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. J Clin Pathol 1993; 46:198–203.

International Committee for Standardization in Haematology: Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. Clin Lab Haematol 1994; 20: 77–79.

International Council for Standardization in Hematology, Expert Panel on Cytometry: Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. Clin Lab Haematol 1998; 20:77–79.

Iversen OH, Roger M, Solberg HE, et al: Rising erythrocyte sedimentation rate during several years before diagnosis can be a predictive factor in 70% of renal cell carcinoma patients. The benefit of knowing subject-based reference values. J Int Med 1996; 240:133–141.

Jaffé ER, Hultquist DE: Cytochrome b_5 reductase deficiency and enzymopenic hereditary methemoglobinemia. *In* Scriver CR, Beaudet AL, et al: (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 1989.

Jandl JH: Blood: Textbook of Hematology, 1st ed. Boston, Little, Brown & Co, 1987.

Jandl JH: Blood: Textbook of Hematology, 2nd ed. Boston, Little, Brown & Co, 1996, p 505.

Koepke JA, van Assendelft OW, Bull BS: Standardisation of EDTA anticoagulation for blood counting procedures. Lab Medica 1989; 5:15–17.

Koike Y, Yoneyama A, Shirai J: Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. Thromb Haemost 1998; 79:1106–1110.

Kumar V, Singhi S: Predictors of serious bacterial infection in infants up to 8 weeks of age. Ind Peds 1994; 32:171–180.

Lapen D: A standardized differential stain for hematology. Cytometry 1982; 2:309–315.

Lillie RD (ed): HJ Conn's Biological Stains, 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1977, p 416.

Lippi U, Schinella M, Nicoli M: EDTA-induced platelet aggregation can be avoided by a new anticoagulant also suitable for complete blood count. Haematology 1990; 75:38–41.

Lombarts AJ, deKieviet W: Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. Am J Clin Pathol 1988; 89:634–639.

Lubrano GJ, Dean WW, Heinsohn HG, et al: The analysis of some commercial dyes and Romanowsky stains by high-performance liquid chromatography. Stain Technol 1977 52:13–23.

Lukens JN: Hemoglobins associated with cyanosis: Methemoglobinemia and low affinity hemoglobins. *In* Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, p 1487.

Mathy KA, Koepke JA: The clinical usefulness of segmented vs. stab neutrophil criteria for differential leukocyte counts. Am J Clin Pathol 1974; 61:947–958.

Matic GB, Chapman ES, Zaiss M: Whole blood analysis of reticulated platelets: Improvements of detection and assay stability. Cytometry 1998; 34:229–234.

Mauer AM: Pediatric Hematology, New York, McGraw-Hill, 1969.

Metzger DK, Charache S: Flow cytometric reticulocyte counting with thioflavin T in a clinical hematology laboratory. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:540–544.

Morris MW, Skrodzki Z, Nelson DA: Zeta sedimentation ratio (ZSR), a replacement for the erythrocyte sedimentation rate (ESR). Am J Clin Pathol 1975 164:254–256.

Mukherjee DP, Ray N, Acton ST: Level set analysis for leukocyte detection and tracking. IEEE Trans Image Process 2004; 13:562–572.

Nagai M, Mawatari K: Studies of the oxidation states of hemoglobin M Boston and hemoglobin M Saskatoon in blood by EPR spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun 1995; 210:483–490.

NCCLS: Methods for the Erythrocyte Sedimentation Rate Test, 3rd ed. Candidate standard for approval. NCCLS document H2-A3. Villanova, PA, NCCLS, 1993.

O'Broin S, Kelleher B, O'Connor G: Uniformity of anticoagulation for full blood counting. Clin Lab Haematol 1997; 19:159–160.

Olshaker JS, Jerrard DA: The erythrocyte sedimentation rate. Clinical laboratory in emergency medicine. J Emerg Med 1997; 15:869–874.

Parthenis K, Metaxaki-Kossionides C: Blood analysis using black and white digital images. J Biomed Eng 1992; 14:287–292.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al: Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for health care professionals from The Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 2003; 107:499–511.

Penchas S: Heparin and the ESR. Arch Intern Med 1978; 138:1865–1866.

Perkins SL: Examination of the blood and bone marrow. *In* Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Philadelphia, Lippincott. Williams & Wilkins, 2004, pp 3–21.

Revisão abrangente sobre o exame de sangue e de medula, incluindo discussão detalhada de vários estudos auxiliares que podem ser conduzidos para estabelecer o diagnóstico de doenças hematológicas.

Peterec SM, Brennan SA, Rinder HM: Reticulated platelet values in normal and thrombocytopenic neonates. J Pediatr 1996; 129:269–274.

Plebani M, DeToni S, Sanzari MC, et al: The TEST 1 automated system. A new method for measuring erythrocyte sedimentation rate. Am J Clin Pathol 1998; 110:334–340.

Rapi S, Ermini A, Bartolini L: Reticulocytes and reticulated platelets: Simultaneous measurement in whole blood by flow cytometry. Clin Chem Lab 1998; Med 36:211–214.

Rifai N: High-sensitivity C-reactive protein: A useful marker for cardiovascular disease risk predication and the metabolic syndrome. Clin Chem 2005; 51:504–505.

Rogers CH: Blood sample preparation for automated differential systems. Am J Med Technol 1973; 39:435–442.

Rosse C, Kraemer MJ, Dillon TL, et al: Bone marrow cell populations of normal infants; the predominance of lymphocytes. J Lab Clin Med, 1977: 89(6):1225–1240.

Rowan RM, Fraser C: Platelet size distribution analysis. *In* van Assendelft OW, England JM (eds): Advances in Hematological Methods: The Blood Count. Boca Raton, FL, CRC Press 1982, p 125.

Rümke CL: The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts: A warning. Blood Cells 1985; 11:137–140.

Ryan DH: Examination of the blood: *In* Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw Hill, 2001a, pp 9–14.

Ryan DH: Examination of the marrow: *In* Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw Hill, 2001b, pp 17–24.

Revisão extensa sobre o exame de medula óssea, incluindo discussão sobre a técnica de aspiração da medula.

Saadeh C: The erythrocyte sedimentation rate: Old and new clinical applications. South Med J 1998; 91:220–225.

Sacker LS: Specimen collection. *In* Lewis SM, Coster JF (eds): Quality Control in Haematology. New York, Academic Press, 1975, p 211.

Saxton BR, Blanchette VW, Butchart S: Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. J Pediatr Hematol Oncol 1998; 20:44–48.

Schneiderka P, Dohnal L, Shachova J: Erythrocyte sedimentation rate in glass and plastic pipettes. Sb Lek 1997; 98:301–315.

Shannon K, Pearson HA: Blood and blood forming tissues. *In* Rudolph CD, Rudolph AM, Hostetter MK, et al: (eds): Rudolph's Pediatrics, 21st ed. New York, McGraw Hill Companies, 2002, p 1521.

Simson E (ed): Proceedings of the Technicon H-1 Hematology Symposium. Tarrytown, NY, Technicon Instruments Inc, 1986.

Small BM, Bettigole RE: Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of platelet volume distribution. Am J Clin Pathol 1981; 76:685–691.

Smith EM, Samadian S: Use of the erythrocyte sedimentation rate in the elderly. Br J Hosp Med 1994; 51:394–397.

Sox HC Jr, Liang MH: The erythrocyte sedimentation rate. Guidelines for rational use. Ann Intern Med 1986; 104:515–523.

Stanworth SJ, Denton K, Monteath J: Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA 120. Clin Lab Haematol 1999; 21:113–117.

Statland BE, Winkel P, Harris SC, et al: Evaluation of biologic sources of variation of leukocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analyzers. Am J Clin Pathol 1978; 69:48.

Stiegler G, Stohlawetz P, Brugger S: Elevated numbers of reticulated platelets in hyperthyroidism: Direct evidence for an increase of thrombopoiesis. Br J Haematol 1998; 101:656–658.

Stohlawetz P, Stiegler G, Jilma B: Measurement of the levels of reticulated platelets after plateletpheresis to monitor activity of thrombopoiesis. Transfusion 1998; 38:454–458.

Stohlawetz P, Stiegler P, Knobl P: The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions. Ann Hematol 1999; 78:271–273.

Tassies D, Reverter JC, Cases A: Effect of recombinant human erythropoietin treatment on circulating reticulated platelets in uremic patients: Associations with early improvement in platelet function. Am J Hematol 1998; 59:105–109.

Tsang CW, Lazarus R, Smith W: Hematological indices in an older population sample: Derivation of healthy reference values. Clin Chem 1998; 44:96–101.

Vaughan Hudson B, Maclennan KA, Bennett MH, et al: Systemic disturbance in Hodgkin's disease and its relation to histopathology and prognosis. Clin Radiol 1987; 38:257.

van Assendelft OW: Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives. Assen, The Netherlands, Royal Van Gorcum Ltd, 1970.

Ward P: The CBC at the turn of the millennium: an overview. Clin Chem 2000; 46:1215–1220.

Este artigo de revisão resume efetivamente as atuais metodologias utilizadas pelos analisadores hematológicos automáticos. Oferece ainda comentários sobre as vantagens e limitações de parâmetros de CCS e de diferencial selecionados.

Weick JK, Hagedorn AB, Linman JW: Leukoerythroblastosis: Diagnostic and prognostic significance. Mayo Clin Proc 1974; 49:110–113.

Wintrobe MM: Clinical Hematology, 7th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974.

Zauber NP, Zauber AG: Hematologic data of healthy very old people. JAMA 1987; 257:2181–2184.

Zeigler Z, Murphy S, Gardner FH: Microscopic platelet size and morphology in various hematologic disorders. Blood, 1978; 51:479–486.

Zlonis M: The mystique of the erythrocyte sedimentation rate. A reappraisal of one of the oldest laboratory tests still in use. Clin Lab Med 1993; 13:787–800.

CAPÍTULO 30

Hematopoese

Sharad Mathur MD, Katherine Schexneider MD, Robert E. Hutchison MD

Células-tronco 566
Células-tronco e progenitoras hematopoéticas 567
Fatores de crescimento hematopoéticos 568
Moléculas de adesão na hematopoese 569
Tecidos hematopoéticos 569
Hematopoese embrionária e fetal 569
Hematopoese pós-natal 569
Produção de eritrócitos 569
Maturação normoblástica 569
Maturação megaloblástica 571
Regulação da produção de eritrócitos 571
Síntese de hemoglobina 571
Estrutura e função da hemoglobina 572
Destruição de eritrócitos 573
Degradação da hemoglobina 573
Eritrocinética 574
Quantificações da produção total de eritrócitos ou de hemoglobina 574
Quantificações da destruição total de eritrócitos ou de hemoglobina 574
Quantificações da produção efetiva de eritrócitos 574
Quantificações da sobrevida efetiva dos eritrócitos no sangue 575
Resumo 575
As porfirias 575
Fisiologia 575
Técnicas analíticas 575
Porfiria intermitente aguda (PIA) 576
Coproporfiria hereditária (CPH) 576
Porfiria variegada (PV) 577
Porfiria eritropoética congênita (PEC) 577
Porfiria cutânea tardia (PCT) 577
Neutrófilos 577
Morfologia dos precursores de neutrófilos 577
Distribuição e cinética 578
Função 579
Eosinófilos 579
Morfologia dos precursores de eosinófilos 579
Distribuição e cinética 580
Função 580
Basófilos e mastócitos 580
Morfologia 580
Distribuição e cinética 580
Função 580
Monócitos e macrófagos 581
Morfologia 581
Distribuição e cinética 582
Função 582
Megacariócitos 582
Morfologia 582
Megacariócitos no sangue 582
Distribuição e cinética 583
Função 583
Linfócitos 583
Tecido linfoide primário 583
Tecido linfoide secundário 586
Função e fisiologia do linfócito 586
Referências bibliográficas 587

PONTOS-CHAVE

- O tecido hematopoético surge na medula óssea a partir de células-tronco que se diferenciam em granulócitos, monócitos, linfócitos, mecagariócitos e células eritroides.
- A diferenciação e maturação das células hematopoéticas são influenciadas por fatores solúveis, incluindo fatores de crescimento e citocinas, pela interação com o estroma da medula óssea, e são parcialmente mediadas pela interação de moléculas de adesão.
- A função principal dos eritrócitos consiste em transportar o oxigênio dos pulmões até os tecidos. Essa tarefa depende de propriedades particulares e da produção adequada de hemoglobina (Hb), além de ser regulada pela tensão de oxigênio nos rins, onde a eritropoietina é produzida.
- Anormalidades herdadas ou adquiridas que envolvem a biossíntese do heme – conhecidas como "porfirias" em razão do acúmulo de porfirinas e metabólitos – afetam principalmente o sistema nervoso.
- Neutrófilos e monócitos derivam de uma célula progenitora comum, sob influência de fatores de crescimento, e constituem as principais células fagocíticas. Estas e outras células granulocíticas (eosinófilos, basófilos e mastócitos) respondem a fatores solúveis, eliminam microrganismos e modulam a imunidade.
- Os megacariócitos, estimulados pela trombopoetina, dão origem às plaquetas e, assim, promovem a hemostasia primária.
- Os linfócitos surgem no timo e no tecido linfoide periférico, bem como na medula óssea. Integram populações complexas de células B, T, *natural killer* (NK) e subtipos relacionados, individuais e geneticamente distintas. Essas células interagem com outras, secretam fatores solúveis (principalmente citocinas e imunoglobulinas) e executam ambas as respostas de imunidade humoral e celular.

Células-tronco

Nos seres humanos, durante a vida pós-natal, eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas normalmente são produzidos apenas na medula óssea. Os linfócitos são produzidos em órgãos linfoides secundários, na medula óssea e na glândula tímica.

A maioria das células da medula é morfologicamente reconhecida como precursores de granulócitos ou eritrócitos, com menor número de precursores de plaquetas (megacariócitos), linfócitos, monócitos, macrófagos, células estromais (células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos), eosinófilos, plasmócitos, basófilos, mastócitos e blastos. Estes últimos são as células-tronco hematopoéticas (CTH), que apresentam capacidade de autorregeneração e diferenciação, e as células progenitoras, que se diferenciam de acordo com uma via específica.

Células-tronco e progenitoras hematopoéticas

Células-tronco hematopoéticas pluripotentes dão origem tanto a progenitores mieloides comuns quanto a progenitores linfoides comuns (Akashi, 2000; Kondo, 1997). Os progenitores mieloides comuns originam progenitores restritos às linhagens de granulócitos/macrófagos e de megacariócitos/eritrócitos. Subsequentemente, essas células dão origem a progenitores comprometidos com a produção de granulócitos, macrófagos, plaquetas e eritrócitos. Os progenitores linfoides comuns, por sua vez, dão origem a linfócitos B, T e células NK. Enquanto as CTH podem originar todos os tipos de células do sangue, níveis sucessivos de células progenitoras apresentam capacidade de diferenciação mais limitada. Por outro lado, a capacidade de autorregeneração vai sendo progressivamente perdida, de modo que as células diferenciadas terminais são incapazes de se dividir.

As CTHs humanas expressam CD34, mas não há expressão de HLA-DR, um antígeno do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Quesenberry, 2001). O CD34 é uma glicoproteína codificada por genes localizados no cromossomo 1q, sendo expressa tanto nas CTHs quanto nas células progenitoras mais iniciais. Essas células também expressam altos níveis de proteína multirresistente a fármacos 1 (MDR1, *multidrug-resistant 1*) e não exibem marcadores de comprometimento de linhagem, tais como CD38, CD33, thy-1 e CD71. São as precursoras mais iniciais conhecidas, representando menos de 1% das células da medula óssea, e apresentam morfologia de blastos. Um pequeno número de CTHs está presente no sangue periférico, e essa população de células aumenta com a administração de fatores de crescimento e/ou certos agentes terapêuticos. Esse aumento possibilita o uso tanto do sangue periférico quanto da medula óssea para obtenção das células-tronco que são utilizadas no transplante de medula óssea (Siena, 1989). O comprometimento da linhagem pode ser identificado pela detecção da expressão adicional do antígeno CD38 acompanhado de outros antígenos de diferenciação, como CD71 (eritroide), CD33 (mieloide), CD10 (linfoide B) e CD7/CD5 (linfoide T) (Tab. 30.1) (Terstappen, 1991). A seleção e a diferenciação com estreitamento progressivo de linhagens são influenciadas por efeitos locais, no microambiente da medula óssea, bem como por fatores humorais, e é provável que envolva interações com a molécula do MHC de classe II.

Tabela 30.1 Marcadores específicos de linhagens

Eritroide – CD71
Mieloide – CD33
Linfoide B – CD10
Linfoide T – CD7/CD5

Com base em estudos realizados em culturas *in vitro* e ensaios de colônias, foram identificados múltiplos níveis de progenitores com capacidade de diferenciação progressivamente limitada (Coulombel, 2004). O progenitor mieloide mais inicial são as células da unidade formadora de colônias de granulócitos-eritrócitos-macrófagos-megacariócitos (CFU-GEMM), as quais expressam CD34 e CD33. Sob influência de diferentes fatores de crescimento e citocinas, as células CFU-GEMM se desenvolvem em células de unidade formadora de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) e em células de unidade formadora de colônias de megacariócitos-eritrócitos (CFU-MegE). As células CFU-GM, por sua vez, se diferenciam em células de unidade formadora de colônias de granulócitos (CFU-G) – precursores de neutrófilos – e células de unidade formadora de colônias de macrófagos (CFU-M) – precursores de monócitos, macrófagos e células dendríticas (Fig. 30.1). As células CFU-MegE originam as células da unidade formadora de explosão eritroide (BFU-E) (e, subsequentemente, as células da unidade formadora de colônia de eritrócitos – CFU-E) e as células de unidade formadora de colônia de megacariócitos (CFU-Meg). Progenitores comprometidos com o desenvolvimento de eosinófilos, basófilos e mastócitos também foram descritos (células da unidade formadora de colônia de eosinófilos [CFU-Eo]; células da unidade formadora de colônia de basófilos [CFU-Baso]; células da unidade formadora de colônia de mastócitos [CFU-Mast]). A CTH também origina osteoclastos, que integram o sistema monocítico e fagocítico. Além disso, há evidências de que as CTHs podem se transdiferenciar em células não hematopoéticas (Zubair, 2002).

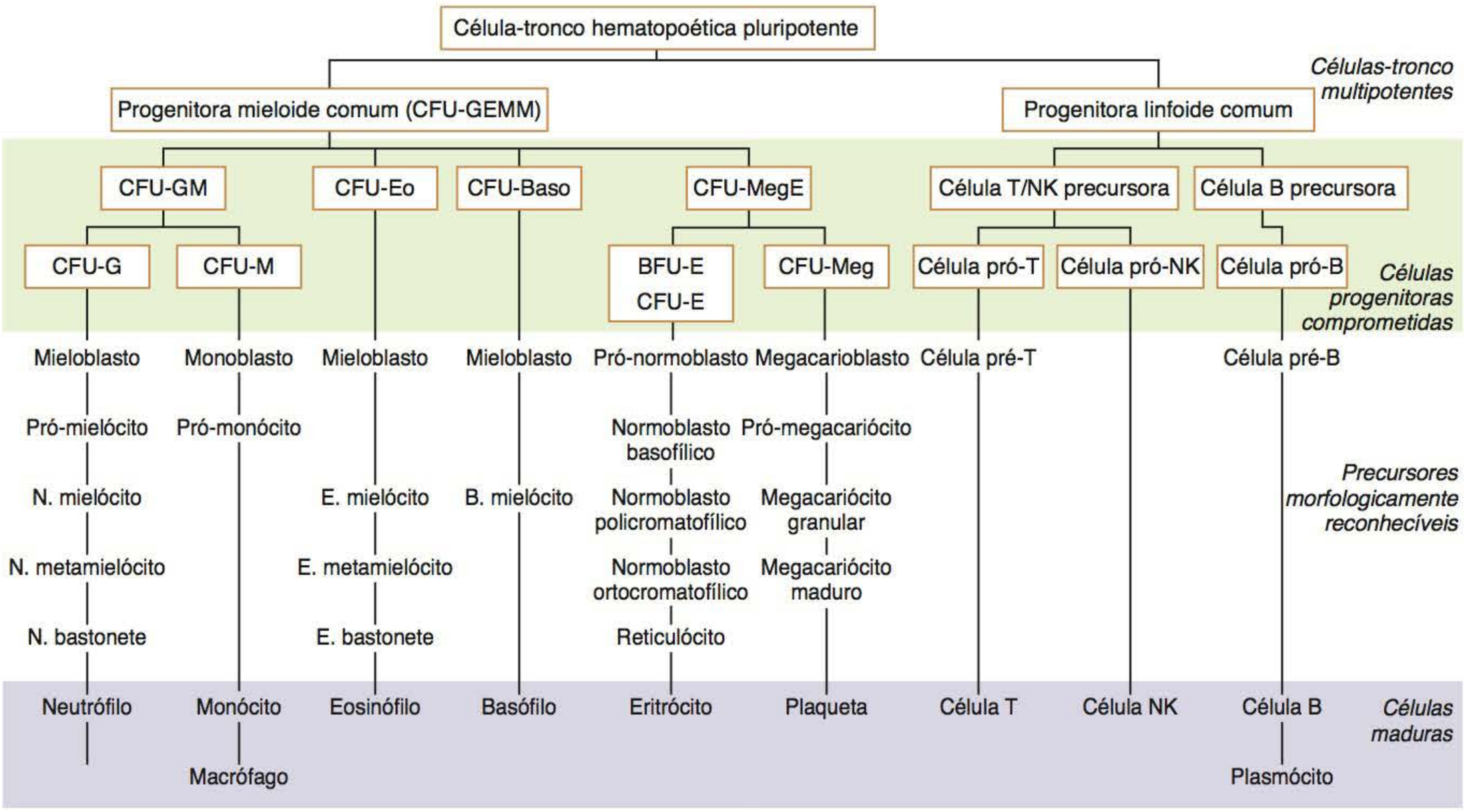


Figura 30.1 Esquema hipotético da hematopoese. CFU-GEMM = unidade formadora de colônias de granulócito/eritrócito/macrófago/megacariócito; CFU-GM = unidade formadora de colônias de granulócito/macrófago; CFU-G = unidade formadora de colônias de granulócito; CFU-M = unidade formadora de colônias de macrófago; CFU-Eo = unidade formadora de colônias de eosinófilo; CFU-Baso = unidade formadora de colônias de basófilo; CFU-MegE = unidade formadora de colônias de megacariócito/eritroide; BFU-E = unidade formadora de explosão de eritrócitos; CFU-E = unidade formadora de colônias de eritrócito; CFU-Meg = unidade formadora de colônias de megacariócito; N. = neutrófilo; E. = eosinófilo; B. = basófilo.

Fatores de crescimento hematopoéticos

Os fatores bioquímicos solúveis ou ligados à membrana celular que contribuem para o controle da hematopoese são os fatores de crescimento hematopoéticos e as interleucinas. Trata-se de glicoproteínas acídicas que, embora funcionalmente diversificadas, são bem conservadas em termos estruturais (Kaushansky, 1993). Regulam a proliferação e diferenciação das células precursoras hematopoéticas, e facilitam a função das células sanguíneas maduras. Os fatores de crescimento hematopoéticos podem atuar localmente, próximo ao sítio de sua produção, ou podem circular com o sangue. Exercem seus efeitos a baixas concentrações, são produzidos por muitos tipos celulares diferentes e usualmente afetam mais de uma linhagem (Quesenberry, 2001). Muitas vezes, atuam em sinergia com outros fatores de crescimento e podem agir tanto em células neoplásicas quanto em células normais. Os fatores de crescimento também tendem a intensificar a integridade da membrana e prevenir a apoptose.

Genes associados a fatores de crescimento hematopoéticos foram identificados, clonados e sequenciados. Seus respectivos produtos foram gerados a partir de métodos que utilizam DNA recombinante. As estruturas moleculares com frequência são previstas por meio de modelos criados em computador, a partir de dados da sequência, bem como analisadas diretamente por cristalografia e espectroscopia de ressonância magnética. Moléculas puras são utilizadas de modo experimental e várias já são empregadas com fins terapêuticos, como fármacos. O rápido aumento do conhecimento acerca dos fatores de crescimento hematopoéticos e do grau de complexidade de suas ações desafia o simples acúmulo de informação. Os principais fatores envolvidos na hematopoese são brevemente abordados aqui.

O *fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos* (*GM-CSF*) é um fator de crescimento panmieloide, que estimula progenitores de eritrócitos, granulócitos, monócitos, megacariócitos e eosinófilos, resultando primariamente no aumento do número de neutrófilos, monócitos e eosinófilos, bem como na ativação da função fagocítica. É uma glicoproteína de 14 a 35 kDa codificada por genes localizados no braço longo do cromossomo 5. O GM-CSF é utilizado na clínica para combater a neutropenia em pacientes submetidos à quimioterapia ou transplante de medula óssea (Mertelsmann, 1993). Nessas condições, pode haver hiperplasia mieloide na medula óssea.

O *fator estimulador de colônias de granulócitos* (*G-CSF*) estimula a produção e a ativação funcional de granulócitos. É uma proteína de 18 kDa, cujos genes codificadores localizam-se no braço longo do cromossomo 17 (Bagby, 1991). O G-CSF é utilizado com frequência no tratamento da neutropenia e pode induzir menos toxicidade do que o GM-CSF (Root, 1999). É também o fator de crescimento mais utilizado para mobilizar células-tronco CD34+ no sangue periférico (Hübel, 2003).

O *fator estimulador de colônias de monócitos/macrófagos* (*M-CSF*) (também conhecido como fator estimulador de colônias-1 [CFS-1]) estimula a produção e ativação de monócitos-macrófagos. Consiste em dois tipos de glicoproteínas (uma de 40–50 kDa e outra de 70–90 kDa) codificadas por genes localizados no braço longo do cromossomo 5 (Bagby, 1991). O CSF-1 induz a produção de interleucina-1 (IL-1) por macrófagos. O receptor do CSF-1 é o produto do gene FMS e atua como tirosina quinase, mediando a ativação celular.

A *eritropoetina* (*EPO*) estimula a proliferação, o crescimento e a diferenciação de precursores eritroides, resultando em um aumento das contagens de eritrócitos e em um possível efeito mínimo sobre os megacariócitos. A EPO exerce efeito dominante sobre as células da CFU-E, pró-normoblastos e normoblastos basofílicos. A máxima estimulação da BFU-E requer outros fatores de crescimento, como IL-3 e GM-CSF. A EPO, uma proteína de 18 kDa (ou 34–39 kDa, quando glicosilada) codificada por genes presentes no braço longo do cromossomo 7, é produzida primariamente nos rins durante a vida adulta e induzida por hipóxia (Bagby, 1991). A EPO recombinante é empregada clinicamente no tratamento da anemia, em particular quando associada à insuficiência renal, quimioterapia ou infiltração da medula óssea por células cancerígenas (Mertelsmann, 1993).

A *trombopoetina* (*TPO*) é um polipeptídeo de 35 kDa, que atua como ligante do produto do proto-oncogene *c-mpl* (Kaushansky, 1994), e é o principal regulador da produção de plaquetas. É produzido no fígado, rins, estroma da medula e outros tecidos. Estimula tanto a produção quanto a diferenciação das células precursoras megacariocíticas (Kaushansky, 2003). É essencial à completa maturação dos megacariócitos e intensifica a produção de plaquetas. É utilizado para acelerar a recuperação das plaquetas sanguíneas após terapias citorredutoras.

A *IL-3* é um fator estimulador de colônias que realiza ações análogas às do GM-CSF, porém ocorre em níveis mais iniciais. A proteína de 14 a 28 kDa é codificada na região próxima ao gene do GM-CSF, no braço longo do cromossomo 5, em estreita relação com os genes codificadores de GM-CSF, IL-4 e IL-5. A IL-3 é produzida pelas células T, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Promove ativação indiretamente, por meio da estimulação de outras citocinas (Bagby, 1991).

A *IL-5* ativa as células T citotóxicas, induz a secreção de imunoglobulinas e estimula os eosinófilos. É um produto de 50 a 60 kDa de genes localizados no braço longo do cromossomo 5, sendo produzido por células T ativadas (Jandl, 1996).

A *IL-6* é um fator ativador de ação abrangente, que parece exercer seus efeitos de modo indireto ao agir em sinergia com outros fatores. A IL-6 facilita a diferenciação da célula B, promove secreção de imunoglobulinas e atua como fator de crescimento para plasmócitos malignos (Teoh, 1997). Atua com a IL-3 para aumentar a replicação de precursores mieloides, sinergiza com a IL-2 e a IL-4 e estimula a produção de plaquetas. É um produto de 26 kDa de genes situados no braço curto do cromossomo 7 (Jandl, 1996), sendo secretado por células T, macrófagos e fibroblastos.

A *IL-9* é um fator de crescimento celular e fator de ativação de mastócitos que também produz efeitos estimulatórios sobre a proliferação eritroide e mileoide. É uma glicoproteína de 30 a 40 kDa, codificada por genes localizados no cromossomo 5 (Quesniaux, 1992).

A *IL-11* promove formação de células B secretoras de imunoglobulinas antígeno-específicas, e também atua em sinergia com a IL-3 para estimular a produção de megacariócitos e proliferação de células-tronco pluripotentes. A IL-11 também sinergiza com a IL-4 para promover proliferação de células-tronco. É uma glicoproteína de 23 kDa, codificada por genes presentes no braço longo do cromossomo 19 (Quesniaux, 1992).

O *ligante de kit* (*KL*) é o ligante do receptor *c-kit* (tirosina quinase) e tem sido referido como "fator estimulador de células-tronco" ou "fator de aço". Sinergiza a maior parte dos demais fatores de crescimento, incluindo GM-CSF e IL-3, na estimulação de progenitores mieloides, eritroides e linfoides (Quesniaux, 1992). O receptor KL é codificado por genes do cromossomo 4, enquanto os genes codificadores de KL (ou fator de aço) foram mapeados no cromossomo 12 (Broudy, 1997). KL estimula o crescimento, viabilidade e adesão de células progenitoras primitivas, precursores eritroides (BFU-E, CFU-E), precursores mieloides (CFU-GM), precursores megacariocíticos (CFU-Meg) e mastócitos. Também estimula o crescimento de células B, T, NK e dendríticas (Lyman, 1998).

O *ligante de Flt-3* (*FL*) estimula as células progenitoras primitivas, atuando muitas vezes em sinergia com KL. De modo similar ao receptor de KL, o receptor de FL também é uma tirosina quinase. Atua em sinergia com outros fatores de crescimento na estimulação de células T, B, NK e dendríticas. Em contraste com o KL, o FL não estimula mastócitos (Lyman, 1998).

Outros reguladores das CTHs são TNF-α e TGF-β. As CTHs expressam receptores das famílias NOTCH e Wnt, e é provável que essas vias sejam igualmente importantes para a autorregeneração e a diferenciação (Ohishi, 2003; Sauvageau, 2004).

As CTHs e os progenitores mieloides mais iniciais (CFU-GEMM) requerem KL, FL, IL-3 e IL-6 para duplicação e diferenciação em progenitores comprometidos. A continuação do desenvolvimento dos progenitores mieloides (CFU-G e CFU-M) requer G-CSF e M-CSF, além de GM-CSF e IL-3. O G-CSF é o principal responsável pela diferenciação dos neutrófilos, assim como o M-CSF pela diferenciação de monócitos/macrófagos, a IL-5 pela diferenciação dos eosinófilos, a IL-3 e KL pela diferenciação dos basófilos, e o KL pela diferenciação dos mastócitos. O desenvolvimento do progenitor eritroide mais inicial (BFU-E) independe de EPO, contudo a subsequente diferenciação em CFU-E requer EPO e também outros fatores de crescimento, como GM-CSF, IL-3 e KL. A EPO é a única responsável pela continuidade da maturação da linhagem de células eritroides. O desenvolvimento dos megacariócitos depende de TPO e, concomitantemente, de IL-3, IL-6, IL-11 e KL.

Existem ensaios laboratoriais disponíveis para detecção da maioria dos fatores de crescimento hematopoéticos e citocinas. Tais ensaios são úteis no seguimento diagnóstico de várias doenças. Os estados patológicos decorrentes de deficiências seletivas de fatores de crescimento, como a anemia da insuficiência renal causada pelos baixos níveis de EPO, podem ser tratados pela administração da proteína recombinante.

Moléculas de adesão na hematopoese

As moléculas de adesão são necessárias à modulação de diversas interações entre células hematopoéticas e fatores de crescimento, células estromais, endotélio e matriz extracelular. Essas moléculas de superfície influenciam a indução, diferenciação e função das células hematopoéticas. Também são responsáveis pela retenção e liberação de células hematopoéticas na medula óssea (Verfaillie, 1998). Existem várias famílias de moléculas de adesão importantes. Estas incluem as moléculas de adesão da família de supergenes das imunoglobulinas, as integrinas e as selectinas (Long, 1992).

Outro grupo de moléculas de adesão é o das moléculas análogas à mucina, que representa uma família de glicoproteínas expressas nos tecidos do sistema hematopoético. Essas sialomucinas foram encontradas em células progenitoras, incluindo as células com antígenos CD34, CD43, CD45RA, glicoproteína ligante de P selectina 1 (PSGL-1, P *selectin glycoprotein ligand-1*) e CD164 (Verfaillie, 1998). Estudos funcionais demonstraram que as moléculas de CD164 exercem papel importante na adesão das células progenitoras hematopoéticas às células estromais da medula óssea e podem atuar como potentes moléculas sinalizadoras, com capacidade de suprimir a proliferação das células hematopoéticas (Zannettino, 1998).

Muitos componentes da matriz extracelular interagem com receptores existentes nas células hematopoéticas. Entre estes estão fibronectina, trombospondina, ácido hialurônico, hemonectina, laminina e sulfato de heparina. Os receptores para algumas dessas moléculas já são conhecidos. O CD44, receptor do ácido hialurônico, integra um grupo antigenicamente relacionado de proteínas de superfície induzíveis, que são expressas de forma variável em todos os leucócitos. É necessário à granulopoiese inicial, bem como ao tráfico de linfócitos maduros.

Outra classe de compostos – as quimiocinas – são importantes na regulação do tráfico e residência de células sanguíneas. A quimiocina CXCL12 (SDF-1a) é expressa pelas células estromais da medula óssea e do endotélio microvascular. As CTHs expressam CXCR4, o receptor de CXCL12. A interação entre CXCL12 e CXCR4 está implicada no enxerto de CTHs. É provável que a mobilização de CTH induzida por GM-CSF se deva à redução da atividade de CXCL12 e CXCR4 (Campbell, 2003).

Tecidos hematopoéticos

Hematopoese embrionária e fetal

No início do primeiro mês da vida pré-natal, as primeiras células sanguíneas surgem externamente ao embrião, no mesênquima do saco vitelino, como *ilhas de sangue*. Essas células são predominantemente *eritroblastos primitivos*, que são grandes e megaloblásticos, formados no meio intravascular, com núcleo. Na sexta semana, a hematopoese se inicia no fígado e este, por sua vez, se torna o maior órgão hematopoético nas fases inicial e intermediária da vida fetal. *Eritroblastos definitivos*, que se transformam em hemácias anucleadas, são formados extravascularmente no fígado, enquanto granulopoiese e megacariócitos estão presentes em menor grau. Durante a fase intermediária da vida fetal, o baço e (em menor extensão) os linfonodos exercem papel minoritário na hematopoese, ao mesmo tempo em que o fígado continua dominando o processo. Na segunda metade da vida fetal, a medula óssea vai se tornando progressivamente mais importante como sítio de produção de células sanguíneas e, à medida que esse processo ocorre, o papel do fígado diminui.

Hematopoese pós-natal

Logo após o nascimento, a hematopoese no fígado cessa e a medula passa a ser o único sítio de produção de eritrócitos, granulócitos e plaquetas. As células-tronco hematopoéticas e as células progenitoras comprometidas se mantêm na medula. Os linfócitos (da célula do tipo B) continuam a ser produzidos na medula, bem como nos órgãos linfoides secundários, enquanto os linfócitos T são produzidos no timo e também nos órgãos linfoides secundários (ver a seção "Linfócitos").

Ao nascimento, todo o espaço da medula está ocupado por uma medula (vermelha) hematopoética ativa. Conforme o corpo continua a crescer e o espaço medular se amplia durante a fase de lactação, apenas uma parte de todo esse espaço se torna necessária à hematopoese. O espaço restante é ocupado por células adiposas. Posteriormente, durante a infância, somente os ossos achatados (crânio, vértebras, caixa torácica e pelve) e as partes proximais dos ossos longos dos membros superiores e inferiores constituem sítios de formação de células sanguíneas. O espaço medular remanescente corresponde à medula gordurosa ou amarela, que pode ser substituída por células hematopoéticas mediante a estimulação contínua e intensa.

Na medula, a circulação é fechada – ou seja, as arteríolas derivadas das artérias longitudinais centrais (i. e., nos ossos longos) se conectam diretamente aos amplos seios venosos que se anastomosam e eventualmente despejam todo o seu conteúdo dentro das veias longitudinais centrais. O endotélio plano dos seios é parcialmente revestido com células reticulares adventícias, as quais são um tipo de fibroblasto que elabora fibras de reticulina argentofílicas. Essas fibras e células reticulares formam a malha de sustentação do estroma medular, onde residem as células hematopoéticas. As células reticulares são minimamente fagocíticas. Essas células podem inchar e absorver água, se tornar células adiposas e, possivelmente, induzir as CTHs a se transformarem em células progenitoras comprometidas. Depois de sofrerem proliferação e maturação no estroma da medula, as células sanguíneas entram na corrente sangue através ou por entre as células endoteliais da parede sinusal. Para tanto, é preciso deslocar as células adventícias. As células mesenquimais estromais e as células endoteliais sinusoidais produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas envolvidas na hematopoese.

Produção de eritrócitos

O eritrócito atua como veículo de transporte da Hb, que é produzida pelas células precursoras de eritrócitos – os normoblastos. A função da Hb consiste em transportar oxigênio e dióxido de carbono. O eritrócito também é metabolicamente capaz de manter a Hb em estado funcional.

Maturação normoblástica

O precursor eritroide mais inicial reconhecível é o *pró-normoblasto* (Fig. 30.2). Com um diâmetro aproximado de 20 μm, este é o maior precursor eritroide. Seu núcleo apresenta um padrão de cromatina fina e uniforme, que é um pouco mais distinto e mais intensamente corado do que o núcleo de um mieloblasto. A membrana nuclear é proeminente. Um ou mais nucléolos proeminentes estão presentes. Seu citoplasma tem qualidade heterogênea e é mais moderado em termos de

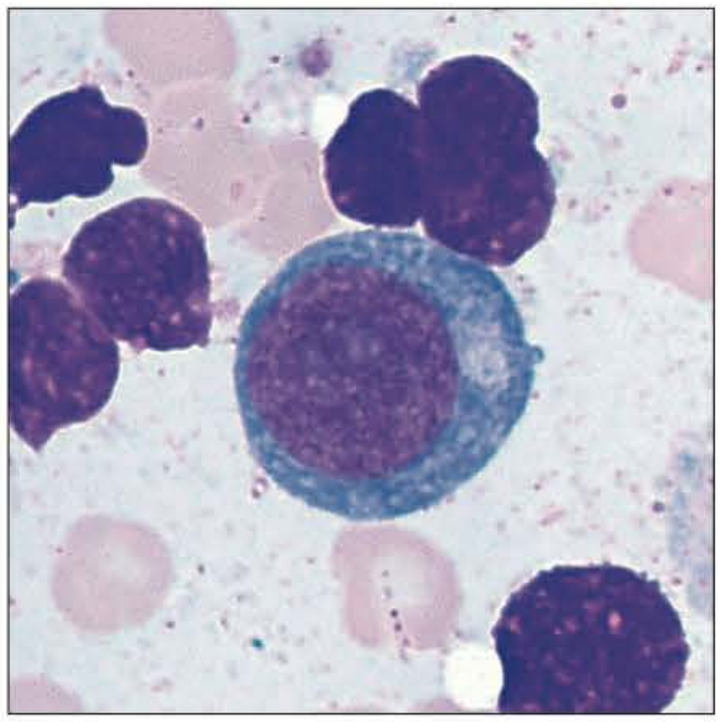


Figura 30.2 Pró-normoblasto com núcleo grande e redondo, cromatina fina e citoplasma basofílico (Wright-Giemsa, × 250).

quantidade e basofilia. Não há grânulos citoplasmáticos. O pró-normoblasto sofre mitose e dá origem a dois normoblastos basofílicos.

O *normoblasto basofílico* (Fig. 30.3) é um pouco menor e possui cromatina discretamente mais grosseira que se cora de forma intensa. A cromatina pode estar parcialmente agregada e seu padrão pode sugerir o de uma roda com aros largos. A paracromatina (a parte não cromatínica do núcleo) é distinta e se cora de rosa. Nucléolos estão presentes, ainda que muitas vezes não sejam visíveis. A proporção núcleo/citoplasma (N/C) é moderada. O citoplasma parece representar cerca de ¼ da área total da célula e é bastante basofílico, em razão da abundância de RNA. Quando observado ao microscópio eletrônico, grande parte desse RNA é evidenciada sob a forma de polirribossomos. As bordas celulares dos normoblastos iniciais com frequência estão irregulares, em decorrência da presença de pseudópodes.

Após a mitose do normoblasto basofílico, a evidência de uma contínua produção de Hb se torna visível no citoplasma das duas células-filhas, sob forma de policromia – ou seja, misturas da coloração vermelha da Hb com a cor azul do RNA em diversos tons de cinza. Essa célula é o *normoblasto policromatofílico* (Fig. 30.4), que é um pouco menor do que o normoblasto basofílico. Seu núcleo ocupa cerca da metade da área da célula, cora-se intensamente e possui cromatina com grau moderado de condensação, bastante distinta da paracromatina cor-de-rosa. O normoblasto policromatofílico sofre 1 a 2 divisões mitóticas.

Ao final da última mitose, o núcleo se torna pequeno e denso (picnótico), e a célula tinge o estágio de *normoblasto ortocromático* (Fig. 30.5). A partir de então, a mitose se torna impossível. Essa célula é menor do que um normoblasto policromatofílico e apresenta proporção N/C menor. Seu citoplasma é mais abundante em Hb e possui menor quantidade de polirribossomos, permanecendo levemente policromatofílico.

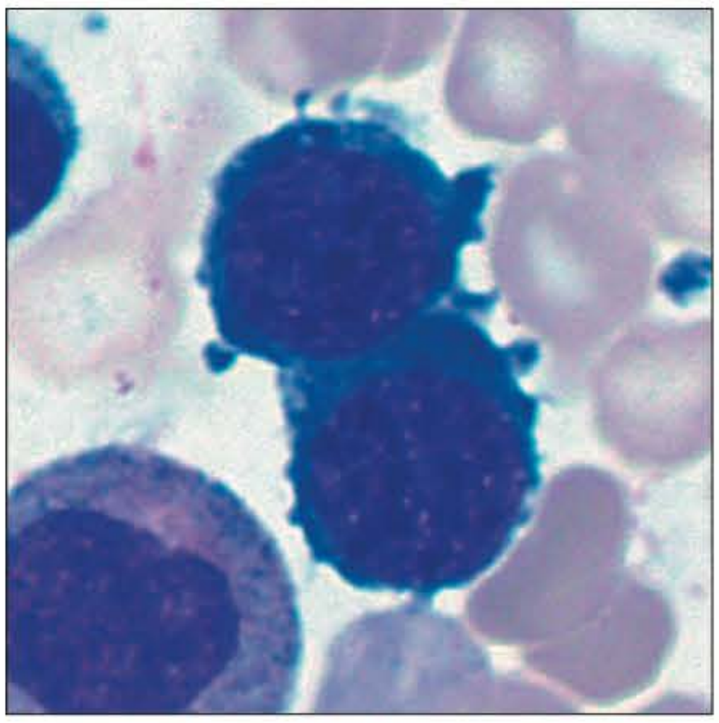


Figura 30.3 Normoblastos basofílicos apresentando condensação da cromatina e citoplasma intensamente basofílico (Wright-Giemsa, × 250).

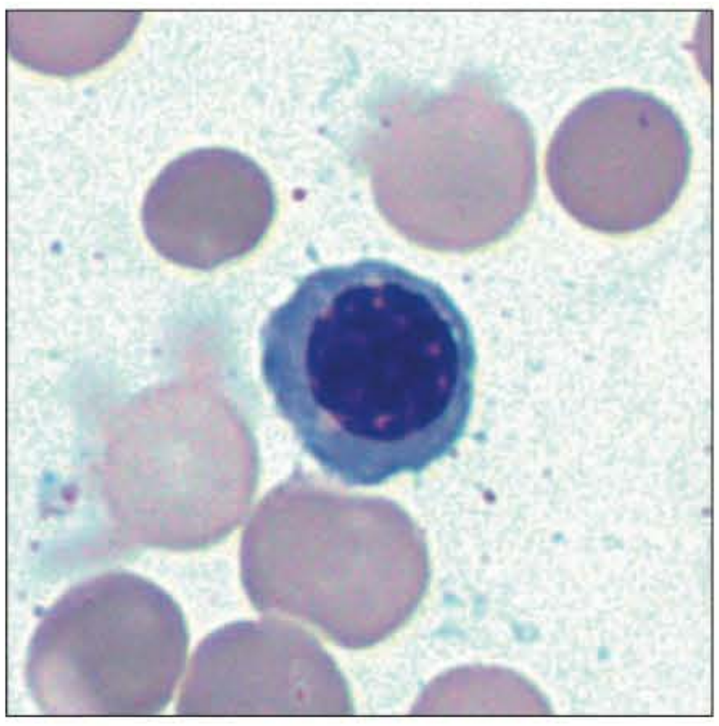


Figura 30.4 Normoblasto policromatofílico com citoplasma azul-claro em razão do acúmulo de hemoglobina (Wright-Giemsa, × 250).

Por fim, acompanhada por contrações e ondulações citoplasmáticas, ocorre a ejeção do núcleo e de uma pequena borda de citoplasma a partir do normoblasto ortocromático, dando origem ao *reticulócito* (Fig. 30.6). Em esfregaços secos ao ar e corados com corantes do tipo Romanowsky, o reticulócito aparece policromatofílico como resultado da retenção de RNA.

Na medula, as células eritroides em desenvolvimento usualmente entram em contato com macrófagos em estruturas denominadas "ilhas eritroblásticas" (Fig. 30.7). É comum dispersar essas ilhas eritroblásticas durante o espalhamento do aspirado de medula sobre a

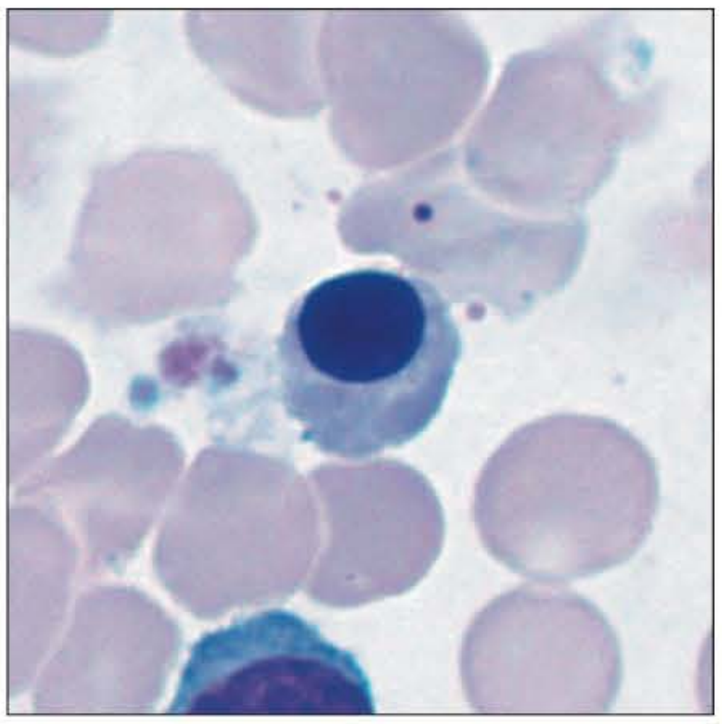


Figura 30.5 Normoblasto ortocromático com núcleo picnótico e citoplasma rosa-acinzentado (Wright-Giemsa, × 250).

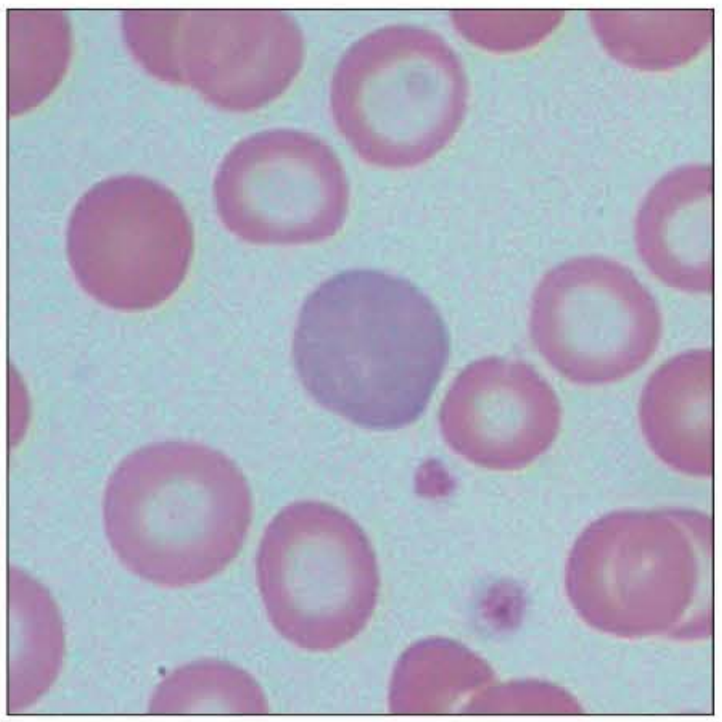


Figura 30.6 Reticulócito (eritrócito policromatofílico) apresentando citoplasma rosa-acinzentado em razão do RNA residual (Wright-Giemsa, × 250).

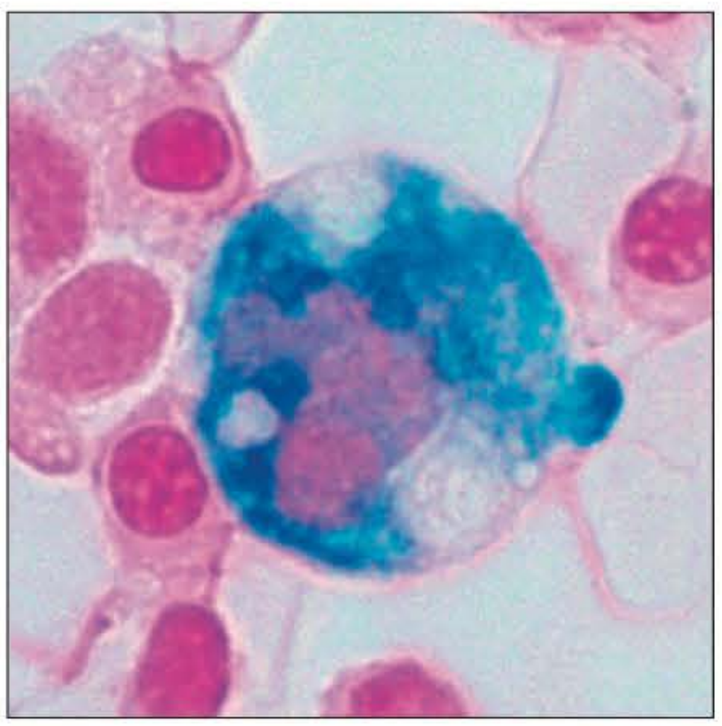


Figura 30.7 Siderófago com normoblastos associados (parte de uma ilha eritroblástica) na medula óssea (azul da Prússia, × 250).

lâmina, contudo, às vezes é possível observar fragmentos de citoplasma de macrófagos presos aos normoblastos separados, especialmente em esfregaços corados com azul da Prússia.

Durante a proliferação e maturação, o ferro é transferido da transferrina plasmática para dentro de células da série normoblástica. O pró-normoblasto e o normoblasto basofílico possuem o maior conteúdo de RNA, o qual começa a declinar nos normoblastos policromatofílicos, à medida que o conteúdo de Hb aumenta. A síntese de RNA diminui gradualmente a cada estágio, por meio dos normoblastos ortocromáticos. Quando o núcleo se torna ausente (no reticulócito), a síntese de RNA é interrompida – ainda que o RNA já produzido permaneça por mais alguns dias –, enquanto a síntese de proteínas e de heme continua ocorrendo até que o reticulócito perca seu conteúdo de RNA e mitocôndrias.

Durante esse processo de maturação, ocorrem 3 a 4 divisões mitóticas em um período de 3 dias, resultando na potencial produção de 16 reticulócitos a partir de cada pró-normoblasto. Os reticulócitos são maiores do que as hemácias maduras e permanecem no estroma da medula por 1 a 2 dias, antes de serem liberados no sangue.

Na medula, os reticulócitos são quase numericamente iguais aos eritrócitos nucleados e um pouco mais numerosos do que os reticulócitos no sangue circulante. Diante de uma hipóxia suficientemente severa, esse grupo de reticulócitos da medula pode ser liberado. Caso essa liberação ocorra, o numero de reticulócitos circulantes é praticamente duplicado.

Em geral, os reticulócitos permanecem como tal, sintetizando lentamente a Hb por 2 a 3 dias na medula e por 1 dia no sangue. Em seguida, ribossomos residuais, mitocôndrias e outras organelas são removidas, e os eritrócitos maduros circulam por cerca de 120 dias. Durante esse período, os eritrócitos sofrem um processo gradual de envelhecimento, a atividade de certas enzimas diminui e, por fim, os eritrócitos são destruídos nas células fagocíticas do sistema reticuloendotelial.

Maturação megaloblástica

A maturação anormal dos precursores eritroides, observada nos casos de deficiência de vitamina B_{12} ou de ácido fólico, é conhecida como maturação megaloblástica. Os eritrócitos anormais são chamados de *megaloblastos*. Em razão do comprometimento da capacidade de síntese de DNA das células, as fases intermitótica e mitótica são prolongadas. Como resultado, são produzidas células aumentadas, cuja maturação nuclear é retardada e ocorre bem depois da maturação citoplasmática (dissociação núcleo-citoplasma). O padrão de cromatina nuclear é mais delicado e mais "aberto", com uma paracromatina proeminente. Com frequência, observa-se a ocorrência de cariorrexe (ruptura do núcleo) e formação de corpúsculos de Howell-Jolly. O desenvolvimento megaloblástico ocorre paralelamente à maturação normoblástica. É possível identificar células em estágios de pró-megaloblasto, megaloblasto basofílico, megaloblasto policromatofílico e megaloblasto ortocromático.

Regulação da produção de eritrócitos

O número de eritrócitos no sangue pode ser regulado por meio da alteração da taxa de produção. A taxa de destruição de eritrócitos não varia de forma apreciável em indivíduos normais. Ocorre aumento da produção de eritrócitos diante do comprometimento do transporte de oxigênio para os tecidos, como na anemia, distúrbios cardíacos ou pulmonares, e diante da baixa tensão de oxigênio em altitudes elevadas. A produção de eritrócitos diminui quando um indivíduo é hipertransfundido ou exposto a uma tensão de oxigênio muito alta.

A afinidade do oxigênio pela Hb é modulada pela concentração de fosfatos, em particular 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), na hemácia. Esses fosfatos se combinam às cadeias β da Hb reduzida e sofrem redução da afinidade pelo oxigênio (Fig. 30.8). Em áreas de hipóxia tecidual, à medida que o oxigênio se move da Hb para os tecidos, há aumento da quantidade de Hb reduzida nas hemácias e ligação de mais 2,3-DPG. Como resultado, a afinidade da Hb pelo oxigênio diminui ainda mais, permitindo que uma quantidade maior de oxigênio seja distribuída aos tecidos. Se a hipóxia persistir, a depleção de 2,3-DPG leva ao aumento da glicólise, produção de mais 2,3-DPG e afinidade persistentemente menor da Hb pelo oxigênio.

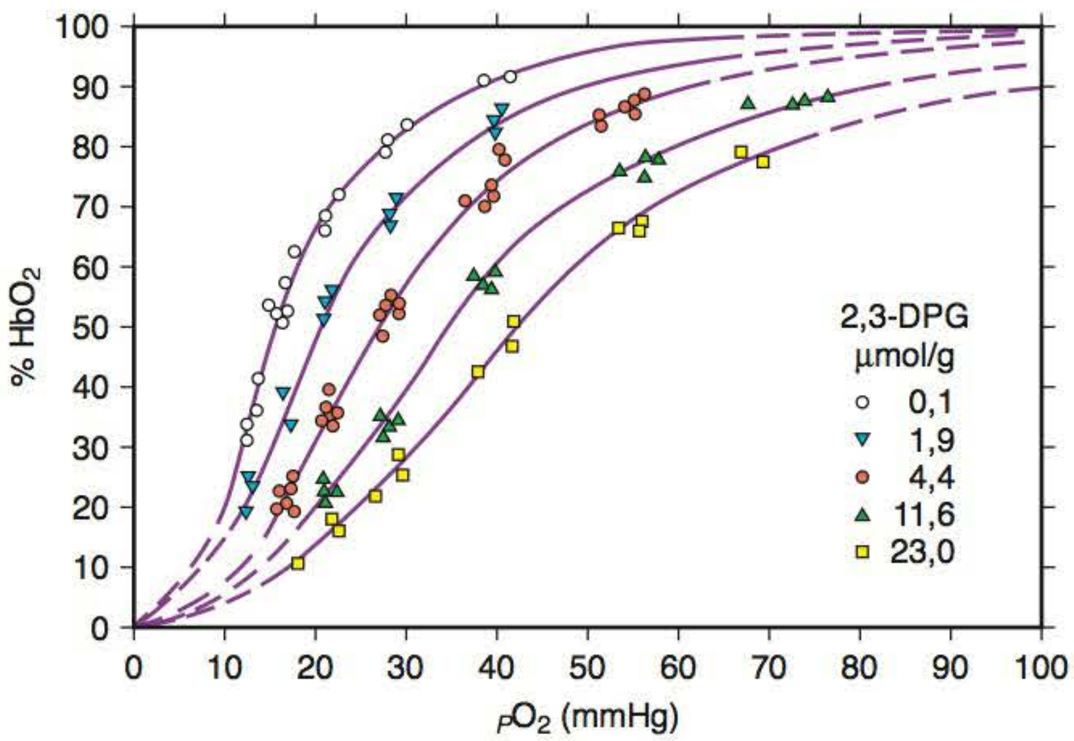


Figura 30.8 Curvas de dissociação do oxigênio da hemoglobina em diferentes concentrações de 2,3-difosfoglicerato (DPG). A curva é sigmoidal e se desloca para a direita diante de concentrações aumentadas de 2,3-DPG. Como resultado, há diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e aumento da distribuição de oxigênio aos tecidos. (Reimpresso de Oxygen Affinity of Hemoglobin and Red Cell Acid Base Status, Duhm J, p. 583, Copyright 1972, com permissão da Elsevier.)

A hipóxia tecidual induz a formação de EPO pela produção de um fator de transcrição, o fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1*). O HIF-1 é um heterodímero constituído pelas subunidades α e β. A subunidade α é regulada pela hipóxia. HIF-1α sofre degradação proteossômica sob condições normais de tensão de oxigênio, contudo se mantém estável diante da hipóxia. A EPO conduz à produção de mais hemácias na medula. Atua induzindo as células progenitoras comprometidas (CFU-E e BFU-E) da medula a proliferarem e se diferenciarem em pró-normoblastos, por meio do encurtamento do tempo de geração de normoblastos e da promoção da liberação precoce dos reticulócitos no sangue. O resultado é o aumento do número de normoblastos na medula com manutenção de uma proporção normal de tipos celulares – uma condição conhecida como hiperplasia normoblástica. A expressão celular aumentada de HIF-1α pode provocar uma mutação 598C→T no gene de Hippel-Lindau (a proteína de von Hippel-Lindau está envolvida na degradação de HIF-1α). Em consequência, há elevação dos níveis de EPO e estabelecimento de uma forma autossômica recessiva de policitemia hereditária chamada policitemia de Chuvash (Gordeuk, 2004).

A quantificação da EPO é feita *in vitro*, por meio de métodos imunológicos que utilizam amostras de soro ou plasma com EDTA. Esses métodos apresentam maior grau de sensibilidade (Lindstedt, 1998). Níveis elevados são detectados em pacientes com policitemia secundária e anemia aplásica. Níveis reduzidos, abaixo da faixa normal, são encontrados em indivíduos normais após a realização de transfusões e também nos casos de policitemia primária (policitemia vera). Entretanto, observa-se uma considerável sobreposição, e é possível detectar níveis de EPO normais tanto na policitemia primária quanto na secundária (Spivak, 2002). Anticorpos anti-EPO foram descritos em indivíduos com aplasia pura de hemácias e LES (Casadevall, 1996; Schett, 2001). Tais anticorpos podem interferir nos imunoensaios para EPO e também contribuir para a anemia.

Síntese de hemoglobina

Síntese do heme. O heme é sintetizado na maioria das células do corpo, exceto nos eritrócitos maduros, porém de forma mais intensa nos precursores eritroides. A succinilcoenzima A se condensa à glicina e forma um intermediário estável denominado ácido α-amino β-cetoadípico. Este é prontamente descarboxilado e se transforma em ácido σ-aminolevulínico (ALA) (Fig. 30.9). Essa condensação requer piridoxal fosfato (vitamina B_6) e ocorre na mitocôndria.

O ALA é excretado normalmente em pequenas quantidades pela urina, contudo essa excreção aumenta diante de certas anomalias que envolvem a síntese de heme (p. ex., envenenamento por chumbo). Duas moléculas de ALA se condensam para formar o monopirrol

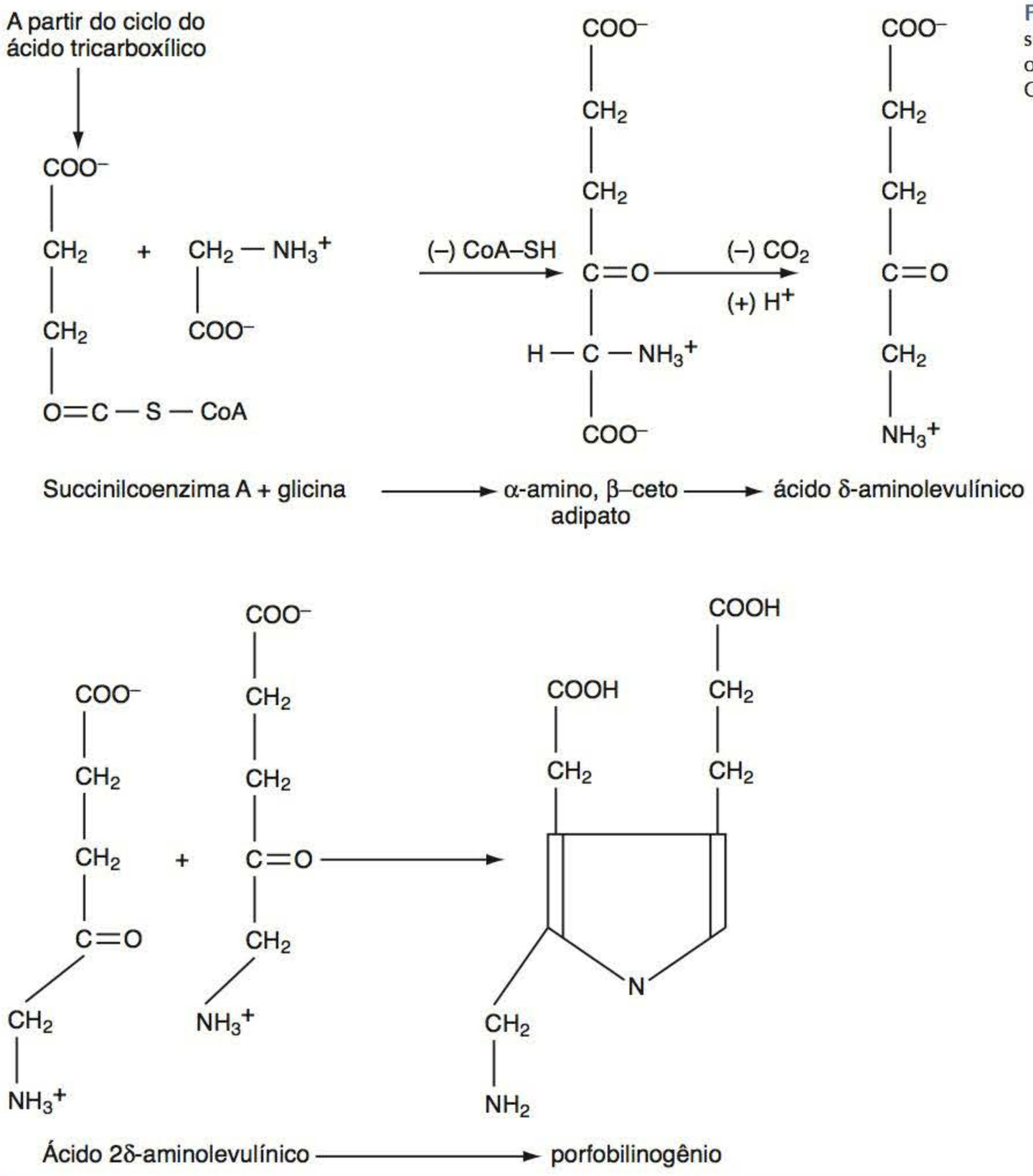


Figura 30.9 Formação de porfobilinogênio a partir de succinilcoenzima A e glicina. (De Leavell BS: Fundamentals of Clinical Hematology, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1976, com permissão.)

porfobilinogênio, em uma reação catalisada pela enzima ALA-desidratase. O porfobilinogênio também é excretado normalmente em pequenas quantidades pela urina. Quantidades bastante elevadas aparecem na urina de indivíduos com porfiria intermitente aguda, as quais são facilmente detectadas por meio de uma reação de cor com reagente aldeído de Ehrlich.

A formação de uroporfirinogênio III ou I (Fig. 30.10) requer a reação de 4 moléculas de porfobilinogênio. O isômero de tipo III é convertido em protoporfirina, via coproporfirinogênio III e protoporfirinogênio. Em certas doenças nas quais essa via é parcialmente bloqueada, há formação de isômeros de tipo I do uroporfirinogênio e coproporfirinogênio e aumento da quantidade de seus produtos de excreção oxidados (uroporfirina I e coproporfirina I).

A protoporfirina normalmente é encontrada em eritrócitos maduros. Em casos de envenenamento por chumbo e deficiência de ferro, os níveis de protoporfirina eritrocitária livre (FEP, *free erythrocyte protoporphyrin*) aumentam. O ferro é inserido na protoporfirina pela enzima mitocondrial ferroquelatase, e o grupo heme final é formado.

Outras anormalidades da síntese de heme (porfirias) são discutidas mais adiante neste capítulo.

Síntese de globina. A síntese de globina se dá no citoplasma do normoblasto e do reticulócito. As cadeias polipeptídicas são fabricadas nos ribossomos. Pequenas moléculas de RNA solúvel (sRNA) específicas determinam a colocação de cada aminoácido, de acordo com o código do mRNA. O crescimento progressivo da cadeia polipeptídica começa pela extremidade amino. Esse processo de síntese proteica ocorre em ribossomos que se encontram agrupados em polirribossomos. Estes, por sua vez, se mantêm juntos pelo mRNA. Considerando que o reticulócito pode sintetizar Hb por no mínimo 2 dias após perder o núcleo, o mRNA para Hb parece ser bastante estável. As cadeias polipeptídicas liberadas dos ribossomos apresentam-se espontaneamente dobradas em sua configuração tridimensional.

O controle da síntese de Hb é exercido primariamente pela ação do heme. O heme aumentado impede que haja mais síntese de heme, inibindo tanto a atividade quanto a síntese da ALA sintase. O heme também promove síntese de globina, principalmente no sítio de iniciação da cadeia, a interação dos ribossomos com o mRNA.

Estrutura e função da hemoglobina

Em cada molécula de Hb, há um grupo heme inserido em uma bolsa hidrofóbica de uma cadeia polipeptídica dobrada (Bunn, 1986). No indivíduo adulto normal, a HbA consiste em 4 grupos heme e 4 cadeias polipeptídicas (2 cadeias α e 2 cadeias β), compondo uma molécula de Hb grosseiramente globular (Fig. 30.11). Os átomos de ferro ferroso apresentam 6 ligações coordenadas – 4 com nitrogênios pirróis do heme, 1 com o nitrogênio imidazol da histidina da cadeia da globina (87-α ou 92-β) e 1 ligação reversível com o oxigênio. Conforme a pressão parcial de oxigênio aumenta, cada um dos 4 grupos heme se liga sequencialmente a uma molécula de oxigênio. Nesse processo, a configuração geral da molécula de Hb sofre uma modificação que favorece a ligação adicional de oxigênio.

A curva sigmoide de dissociação da Hb do oxigênio reflete essa crescente afinidade pelo oxigênio com o aumento da pressão parcial de oxigênio nos pulmões (Fig. 30.8). Nos tecidos, a conversão da Hb oxigenada em Hb, a diminuição do pH e o aumento da temperatura produzido pelos processos metabólicos, além da ligação de mais 2,3-DPG à Hb, resultam no deslocamento da curva de dissociação Hb-oxigênio para a direita, favorecendo a liberação de oxigênio a partir da Hb.

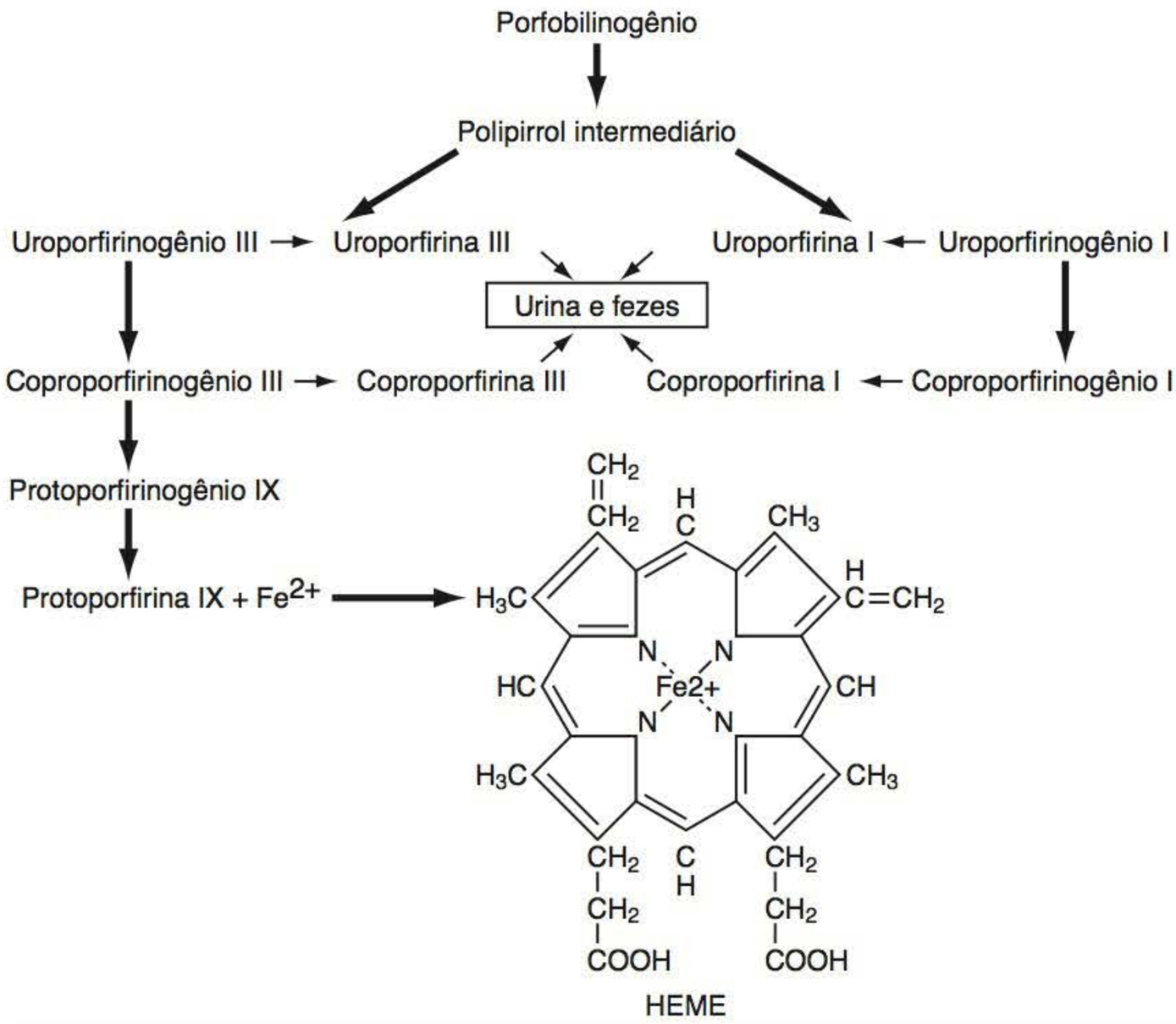


Figura 30.10 Formação de heme a partir de porfobilinogênio. (De Leavell BS: Fundamentals of Clinical Hematology, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1976, com permissão.)

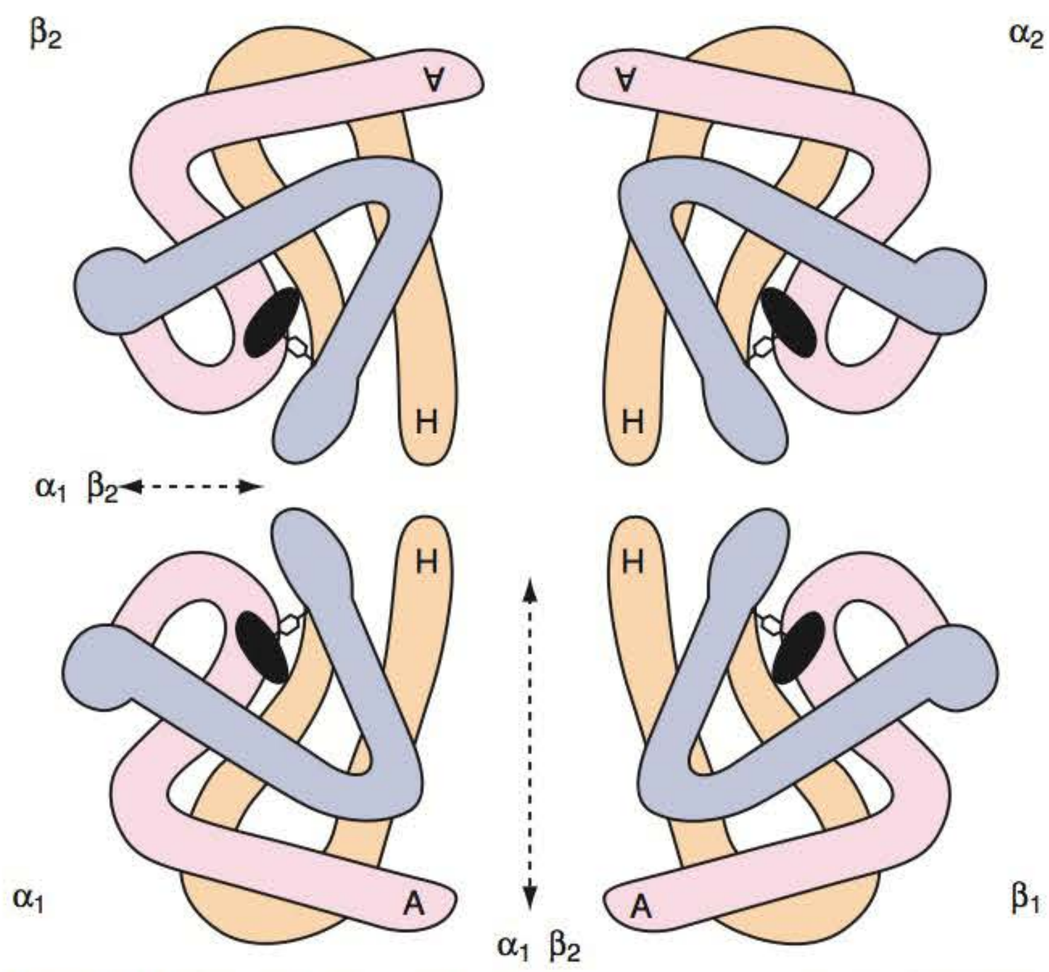


Figura 30.11 Molécula de hemoglobina (tetrâmero, peso molecular de 64.500 Da). O grupo heme de cada cadeia polipeptídica monomérica é representado com um disco preto, conectado ao grupo imidazola da histidina e localizado próximo à superfície da molécula, dentro de uma "bolsa" formada pela cadeia polipeptídica. As letras A e H designam segmentos de α-hélice de cada cadeia polipeptídica: A é o segmento aminoterminal, e H é o segmento carboxiterminal. Os quatro monômeros foram representados separados, contudo na verdade entram em contato ao longo de uma área relativamente ampla ($\alpha_1\beta_1$) – que é tida como uma área de contato relativamente fixa ou de estabilização – e uma área menor ($\alpha_1\beta_2$) – considerada a área de contato funcional – em que o movimento ocorre durante a oxigenação e desoxigenação, alterando a configuração molecular. (Redesenhado de White JM, Dacie JV: Prog Hematol 1971; 7:69, com permissão.)

O CO_2 é transportado nos eritrócitos e também no plasma. Uma pequena parte do CO_2 contido nas hemácias é dissolvido e se liga aos grupos amino da Hb, como carbamino-CO_2. Contudo, a maioria permanece na forma de bicarbonato. A enzima anidrase carbônica catalisa a transformação do dióxido de carbono em bicarbonato no interior das hemácias contidas no leito capilar dos tecidos, bem como a reação inversa (liberação de dióxido de carbono a partir de bicarbonato) nos eritrócitos localizados no leito capilar dos pulmões.

Destruição de eritrócitos

Os eritrócitos sofrem alterações metabólicas graduais no decorrer de seus 120 dias de vida, ao final dos quais a célula senescente menos viável é removida da circulação. A atividade de certas enzimas glicolíticas é reduzida à medida que a célula envelhece. Comparadas às células mais novas, as hemácias mais velhas possuem menor área de superfície e maior concentração média de Hb celular (CMHC). Além disso, hemácias envelhecidas perdem o ácido siálico de suas membranas e expõem uma asialoglicoforina. Esse antígeno da senescência é reconhecido e um autoanticorpo é sintetizado pelo hospedeiro. Após a ligação desse autoanticorpo, a célula senescente é removida da circulação pelo sistema reticuloendotelial, principalmente no nível do baço. Normalmente, cerca de 3 milhões de células/s são removidas do sangue sem nenhuma evidência histológica demonstrável de eritrofagocitose.

Em alguns estados patológicos, o sistema reticuloendotelial remove hemácias mais jovens sensibilizadas ou hemácias anormais a uma velocidade rápida. Subsequentemente, a eritrofagocitose muitas vezes se torna evidente. Na anemia hemolítica autoimune, o sistema reticular endotelial remove as hemácias após a ligação de autoanticorpos ou moléculas do complemento aos reticulócitos e hemácias novas. Em outros estados patológicos, as hemácias são removidas por apresentarem defeitos estruturais que interferem em sua passagem normal pela microcirculação do sistema reticuloendotelial.

Degradação da hemoglobina

Depois que a hemácia é removida da circulação, a Hb é quebrada em seus 3 componentes – ferro, protoporfirina e globina – no interior dos macrófagos do sistema reticuloendotelial. O ferro é armazenado e pode ser totalmente reutilizado. A globina pode ser degradada em aminoácidos que, por sua vez, retornam ao conjunto de aminoácidos do organismo. Em contraste, o anel de protoporfirina é quebrado, convertido em bilirrubina e eliminado do corpo.

No macrófago, o anel de protoporfirina é clivado na ponte α-meteno por ação de uma hemeoxidase, dando origem a 1 mol de monóxido de carbono (CO) e 1 mol de biliverdina. O CO aparece no sangue sob a forma de HbCO e, eventualmente, é exalado. No macrófago, a biliverdina é reduzida à bilirrubina, e esta é transportada até o

fígado pela albumina plasmática. A bilirrubina é removida do plasma pela célula hepática, conjugada principalmente à glucoronida e excretada na bile. No intestino, é reduzida por bactérias e se transforma em urobilinogênio, mesobilirrubinogênio e estercobilinogênio – compostos que são coletivamente denominados urobilinogênios.

As estimativas do CO e HbCO exalados ou do conteúdo de urobilinogênio fecal podem ser utilizadas como medidas da quebra de Hb. Quando a produção de hemácias diminui e os níveis de Hb circulante se tornam baixos, como ocorre na anemia aplásica, a excreção de urobilinogênio também diminui. Quando a destruição de eritrócitos aumenta, como na anemia hemolítica, a quantidade dos três componentes aumenta.

Em seres humanos normais, cerca de 80 a 90% do pigmento biliar excretado e medido como urobilinogênio fecal derivam da quebra de eritrócitos senescentes que viveram por 100 a 120 dias. Entretanto, cerca de 10 a 20% do total de pigmento é excretado logo nos primeiros dias. Esse pigmento biliar precocemente marcado é proveniente de um heme formado no fígado que não pertence à Hb, bem como da quebra de Hb recém-produzida na medula óssea. Com relação a essa última, uma grande parte representa a Hb oriunda de fragmentos citoplasmáticos de normoblastos ortocromáticos que são perdidos durante o processo de extrusão nuclear.

Em certas doenças hematológicas, notavelmente na talassemia, anemia megaloblástica e porfiria eritropoética, essa fração de pigmento biliar precocemente marcado pode estar bastante aumentada. A destruição da Hb no nível intramedular, que jamais é vista em eritrócitos circulantes, é conhecida como *eritropoese inefetiva*.

Eritrocinética

O equilíbrio entre a distribuição e a remoção de eritrócitos do sangue resulta na presença de uma massa de Hb relativamente constante na circulação. A anemia ocorre quando a remoção dos eritrócitos do sangue aumenta sem ser compensada por um aumento da produção, quando a distribuição de eritrócitos para o sangue diminui ou quando ambos os processos ocorrem ao mesmo tempo.

Quando o indivíduo apresenta anemia, a hipóxia tecidual provoca aumento dos níveis plasmáticos de EPO. A hiperplasia normoblástica resultante gera mais eritrócitos para serem entregues à circulação. Em um indivíduo normal, em casos de estimulação extrema, a medula é capaz de produzir o equivalente a 6 a 8 vezes o débito normal de eritrócitos. Ao avaliar a resposta de um dado paciente, essa capacidade deve ser comparada à produção real.

Para determinar o mecanismo e a causa de uma anemia, pode ser necessário realizar medidas que avaliem a *eritropoese efetiva* (produção e distribuição de eritrócitos à circulação), a *eritropoese inefetiva* e a destruição de eritrócitos.

Quantificações da produção total de eritrócitos ou de hemoglobina

É difícil quantificar a *massa total de células eritropoéticas* do corpo. Uma estimativa é feita pelo exame de uma amostra de medula óssea obtida de um sítio normalmente ativo, para determinação da celularidade e do porcentual total de células nucleadas que são eritropoéticas (ver seção "Exame de medula óssea" no Cap. 29). Quando a atividade da medula aumenta, células hematopoéticas adicionais usualmente substituem a gordura nos sítios de medula vermelha, antes que ocorra extensão para dentro da medula amarela do ossos longos. Em geral, é válido considerar a amostra representativa da medula como um todo.

A *renovação de ferro plasmático* é calculada a partir dos níveis séricos de ferro e da taxa de remoção do ferro radioativo injetado a partir do plasma. Cerca de 25 a 30% do ferro não são utilizados na eritropoese, sendo captados primariamente pelo fígado. Os 70 a 75% restantes são captados pelas células eritropoéticas e, portanto, constituem uma medida da eritropoese total, tanto efetiva quanto inefetiva.

Quantificações da destruição total de eritrócitos ou de hemoglobina

A determinação do conteúdo de *urobilinogênio fecal* é uma estimativa da excreção total de pigmentos biliares – os produtos da quebra do heme. Essa medida inclui os pigmentos derivados da Hb que se forma e é destruída na medula, sem nem mesmo alcançar os eritrócitos circulantes. As limitações constituem a conversão reduzida da bilirrubina em urobilinogênio (decorrente da administração oral de antibióticos de amplo espectro) e a impossibilidade de o pigmento chegar ao intestino (na icterícia obstrutiva).

Uma parte (até 50%) do urobilinogênio excretado é reabsorvida na circulação porta e excretada novamente na bile, sem conjugação, pelo fígado. Apenas uma pequena parte normalmente é excretada pela urina. O aumento da concentração de urobilinogênio urinário é observado em casos de doença hepática severa, bem como em condições associadas a um catabolismo aumentado do heme, que ultrapassa a capacidade metabólica do fígado. Assim, o dano hepatocelular, cirrose, congestão hepática decorrente de insuficiência cardíaca congestiva, doença hepática obstrutiva, colangite, anemia hemolítica e *eritropoese inefetiva* são condições associadas à elevação do urobilinogênio urinário.

Quantificações da produção efetiva de eritrócitos

Contagem de reticulócitos. Como o RNA dos reticulócitos desaparece em cerca de 1 dia após sua entrada na circulação sanguínea, a quantificação de reticulócitos irá fornecer a medida do número de células que está sendo distribuída pela medula ao sangue a cada dia – ou seja, uma medida da eritropoese efetiva. A contagem absoluta de reticulócitos é obtida multiplicando-se o porcentual de reticulócitos pela contagem de eritrócitos. Para fornecer uma expressão significativa da eritropoese, deve ser adotada a contagem absoluta normal de reticulócitos ou alguma estimativa dela, em vez de apenas o porcentual simples. A contagem de reticulócitos absoluta normal é de aproximadamente 50×10^9/L, ou 1% dos eritrócitos circulantes. Como o tempo normal de maturação dos reticulócitos no sangue é de 1 dia, a produção de reticulócitos é igual a 50×10^9/L/dia.

Uma segunda consideração diz respeito ao ajuste para o tempo de maturação aumentado dos reticulócitos no sangue, em decorrência da liberação acelerada a partir da medula como efeito da EPO. A necessidade desse ajuste se deve à presença de grandes células policromáticas ou de hemácias nucleadas no esfregaço de sangue, indicando um deslocamento de reticulócitos excessivamente imaturos da medula para o sangue. Para evitar superestimar a produção diária de eritrócitos, utiliza-se um fator de correção com base na estimativa do tempo de maturação dos reticulócitos no sangue. Observa-se uma variação inversa em relação ao hematócrito, conforme descrito a seguir (Hillman, 1996).

Hematócrito (%)	Tempo de maturação do reticulócito (dias)
45	1,0
35	1,5
25	2,0
15	2,5

Se um paciente apresentar Hct igual a 0,25, contagem de hemácias de $2{,}89 \times 10^{12}$/L e contagem de reticulócitos da ordem de 7%, sua contagem absoluta de reticulócitos será igual a 202×10^9/L. Considerando que a contagem de reticulócitos absoluta normal é, em média, 50×10^9/L, esse paciente terá:

$(202 \times 10^9/L)/(50 \times 10^9/L)$

Ou o equivalente a 4 vezes a concentração normal. Todavia, esse valor deve ser corrigido pelo tempo de maturação aumentado ($4 \times ½ = 2$). Portanto, uma concentração equivalente a 2 vezes o número normal de reticulócitos está entrando na circulação sanguínea diariamente, em comparação ao indivíduo normal – ou seja, a produção de hemácias é o dobro da produção normal.

Se apenas o hematócrito estiver disponível, é possível realizar a mesma correção, do seguinte modo:

Correção para anemia:
Contagem de reticulócitos do paciente (7%)/contagem de reticulócitos normal (1%) × Hct do paciente (0,25)/Hct normal (0,45) = 4
Correção do deslocamento:
Índice de reticulócitos corrigido (4) × 1/tempo de maturação (2) = 2

Essas correções são necessárias para avaliar o grau de produção de hemácias em resposta à anemia.

Em um indivíduo com suprimento de ferro normal, a produção de hemácias pode ser tornar 2 vezes maior do que a produção normal dentro de um período de 1 semana, caso o hematócrito caia para 0,35, ou pode ser equivalente a 3 vezes a produção normal se o hematócrito cair para 0,25. Uma produção máxima de hemácias, equivalente a 6 a 8 vezes a produção normal, somente pode ser alcançada por meio do suprimento de ferro parenteral (como na hemólise).

Se uma resposta apropriada da medula à anemia não for alcançada em 1 a 2 semanas, significa que a produção de hemácias apresenta algum comprometimento.

A *utilização do ferro pelo eritrócito* é uma medida da quantidade de uma dose de ferro injetada que aparece na Hb dos eritrócitos circulantes. É derivada a partir da renovação do ferro plasmático e do porcentual de ferro radioativo que foi injetado e apareceu nos eritrócitos circulantes após 2 semanas, considerando-se que não houve destruição de nenhuma célula recém-formada durante o período. É também uma medida da eritropoese efetiva.

Quantificações da sobrevida efetiva dos eritrócitos no sangue

A *sobrevida do eritrócito* pode ser determinada pela obtenção de uma amostra de sangue, marcação dos eritrócitos com cromo 51 (^{51}Cr), inativação do excesso de ^{51}Cr no plasma e reinoculação dos eritrócitos marcados no paciente. O ^{51}Cr se liga à cadeia β da molécula de Hb e, em sua maior parte, não é liberado até que ocorra a remoção da hemácia da circulação e a degradação da Hb. As medidas da radioatividade presente nas hemácias são feitas em 2 horas ou em 24 horas (o momento zero, ou nível de 100%), e a intervalos de 1 a 3 dias, até o desaparecimento de 50% da atividade do ^{51}Cr. Usualmente, os resultados são expressos como tempo de meia-vida do ^{51}Cr. A faixa normal é de 28 a 38 dias. (O motivo de não ser 60 dias é que o ^{51}Cr é eluído a partir da Hb a uma taxa aproximada de 1%/dia.) Se a produção de eritrócitos for igual à destruição (i. e., se houver um estado de equilíbrio estável), a sobrevida do eritrócito também será uma medida da produção efetiva de eritrócitos.

Resumo

A eritropoese total se refere à produção total de Hb ou hemácias. A eritropoese efetiva se refere à produção de Hb ou hemácias que atingem a circulação. A *eritropoese inefetiva*, por sua vez, diz respeito à produção de Hb ou hemácias que jamais atingem o sangue circulante. Esses conceitos de *eritrocinética* abordados no estudo da anemia são úteis principalmente nos casos de anemia de classificação difícil.

As porfirias

Fisiologia

A biossíntese do heme é uma via essencial que ocorre em todas as células metabolicamente ativas que contêm mitocôndria, sendo mais proeminente na medula óssea e no fígado. A medula eritroide constitui o principal tecido formador de heme do corpo, suprimindo 85% das necessidades diárias de heme. O heme complexado à globina é preservado nas hemácias circulantes por aproximadamente 120 dias, enquanto o heme produzido no fígado para os citocromos e enzimas está sujeito a uma renovação bem mais rápida, mesurável em algumas horas. A Figura 30.12 mostra uma breve sequência da via de biossíntese do heme, com os estados doentios associados a deficiências enzimáticas específicas ao longo dela.

As porfirinas são compostos constituídos por 4 anéis pirróis conectados por pontes de meteno, diferenciadas por substituintes encontrados em 8 posições periféricas. O arranjo de 4 átomos de nitrogênio no centro do anel de porfirina permite que as porfirinas quelem vários íons metálicos, como ferro ou, em estados patológicos, zinco. Os intermediários biossintéticos entre o porfobilinogênio (PBG) e a protoporfirina não são porfirinas, mas sim formas reduzidas – os porfirinógenos. Esses compostos são incolores, não fluorescentes e prontamente convertidos em porfirinas por agentes oxidantes fracos, como o ar na presença de luz.

Técnicas analíticas

Várias técnicas analíticas são empregadas para diagnosticar e classificar as porfirias, bem como monitorar pacientes que sabidamente apresentam ataques recorrentes. Essa discussão é iniciada enfatizando-se que as porfirias são distúrbios raros, usualmente herdados, e que a história familiar, a história médica completa e a história da doença atual do paciente, incluindo a investigação de fatores exacerbadores, são fatores adjuntos críticos para a avaliação laboratorial dos pacientes. No contexto apropriado, um novo paciente com ataque neurovisceral agudo pode ser submetido a uma triagem com avaliação dos níveis urinários de PBG. Estes, por sua vez, seguramente estão aumentados durante os ataques e com frequência equivalem a mais de

Figura 30.12 Via biossintética do heme e patogênese das porfirias.

10 vezes o limite de referência máximo nos casos de porfiria aguda – PIA, PV, CPH e a rara deficiência de ácido Δ-aminolevulínico desidratase (que não será mais discutida ao longo deste capítulo) (Deacon, 2001). Historicamente, o procedimento de triagem mais empregado para análise de PBG tem sido o teste de Watson-Schwartz. Contudo, foi demonstrado que o grau de sensibilidade desse teste é insuficiente para seu uso na triagem de rotina. A cromatografia é a metodologia atualmente em prática em muitos laboratórios.

Se os testes de triagem para PBG e/ou ALA forem positivos, então torna-se necessário classificar a porfiria aguda. O HPLC é capaz de separar as porfirinas individualmente. Essa separação, aliada à determinação do conteúdo total de porfirinas fecais, permite distinguir a PIA da CPH (Deacon, 2001). A PV pode ser diagnosticada pela quantificação dos metabólitos fecais e urinários, e também pela detecção de um pico de emissão de fluorescência de 624 a 627 nm, que é único entre as porfirias (Poh-Fitzpatrick, 1980). Além da análise de rotina dos metabólitos presentes na urina e nas fezes, também é possível considerar a varredura de fluorescência plasmática, que proporciona um grau de sensibilidade razoável no *work up* da PV (Hift, 2004). Os ensaios enzimáticos não têm sido amplamente utilizados no diagnóstico das porfirias, em razão das dificuldades técnicas e resultados ambíguos que apresenta. A única exceção consiste em seu uso no ensaio da PBG deaminase, no diagnóstico da PIA. A análise do DNA para mutações específicas é útil quando se trata de famílias, porém o vasto número de mutações limita seu uso como ferramenta de triagem. Uma exceção crítica é o caso da PV, em que a mutação R59W é prevalente (Sandberg, 2004).

As porfirias englobam um grupo de distúrbios herdados e adquiridos da biossíntese do heme, decorrentes de uma deficiência envolvendo uma enzima específica da via biossintética, que culmina em excesso de produção e aumento da excreção dos precursores formados nas etapas anteriores ao defeito enzimático. As porfirias são classificadas como aguda (PIA, PV, CPH) e não aguda ou cutânea (CPH e PCT). As manifestações clínicas de uma ataque agudo são caracterizadas pela disfunção do SNC, SNP e SNA. A patogênese da neuropatia em indivíduos afetados pode ser explicada pelo acúmulo de porfirinas e seus precursores (ALA e PBG são neurotóxicos), deficiência do heme nos tecidos neurais, depleção de substratos essenciais e acúmulo de produtos anormais derivados de outras vias. Os aspectos centrais das principais porfirias são resumidos na Tabela 30.2 e discutidos adiante.

Porfiria intermitente aguda (PIA)

A PIA é a porfiria aguda mais comum e, provavelmente, também a porfiria hereditária mais frequente (Chemmanur, 2004). É herdada de forma autossômica dominante de penetrância incompleta, dificultando os estudos familiares. A deficiência de PBG deaminase foi demonstrada em todos os tecidos examinados. Seu diagnóstico consiste na demonstração de níveis elevados de ALA e PBG na urina durante os ataques agudos (e a concentração de ALA é maior do que a de PBG), por meio do ensaio enzimático para PBG e, se a mutação for identificada em algum membro da família, por análise de DNA. O paciente agudo tipicamente apresenta dores causadas por cólicas abdominais, náusea e vômito, confusão, taquicardia e, em metade dos casos, neuropatia motora (Chemmanur, 2004). Conforme observado anteriormente, é nesse ponto que os níveis urinários de metabólitos podem auxiliar o diagnóstico. Com frequência, os pacientes apresentam níveis de metabólitos dentro ou perto da faixa de referência durante os períodos quiescentes. De forma característica, a urina dos pacientes com PIA adquire um coloração vermelho-escura quando exposta ao ar e à luz, uma vez que o PBG é espontaneamente oxidado a porfirina. Diferentemente das demais porfirinas já discutidas aqui, a PIA não apresenta manifestações cutâneas. A prevenção constitui a base do monitoramento, e devem ser evitados alguns fármacos (barbitúricos e sulfonamidas, entre muitos outros), alterações hormonais e jejum. Especificamente, uma dieta de baixo teor de carboidratos pode desencadear um ataque. Em uma época em que dietas desse tipo são populares entre o público em geral, os médicos podem sentir necessidade de alertar todos os pacientes com porfiria aguda acerca dos riscos oferecidos por tais dietas.

Coproporfiria hereditária (CPH)

Igualmente herdada de forma autossômica dominante com penetrância incompleta, a CPH é menos comum do que a PIA. É causada pela deficiência de coproporfirinogênio oxidase. Clinicamente, a

Tabela 30.2 Características das principais porfirias

Porfiria	Herança	Deficiência enzimática	Metabólitos em excesso	Características clínicas	Fatores exacerbantes
Porfiria aguda intermitente	Autossômica dominante	PBG deaminase	PBG (U) ALA (U) Escurecimento da urina em repouso	Dor abdominal; sintomas psiquiátricos	Hormônios esteroides
Porfiria eritropoiética congênita	Autossômica recessiva	Uroporfirinogênio I sintase e/ou UPG III cossintase	UP (U) CP (U) UP (E) Pigmento fluorescente, vermelho na urina	Fotossensibilidade; dentes, urina vermelha; hemólise	Luz solar
Coproporfiria hereditária	Autossômica dominante	Coproporfirinogênio oxidase	CP III (F, U) PBG (U) ALA (U) Pigmento fluorescente, vermelho na urina	Fotossensibilidade	Estresse
Porfiria variegada	Autossômica dominante	Protoporfirinogênio oxidase	PBG (U) ALA (U) UP (U, F) CP (U, F) Pigmento fluorescente, vermelho na urina	Fotossensibilidade	Estresse
Porfiria cutânea tardia	Autossômica dominante Adquirida	Uroporfirinogênio descarboxilase	UP I (U) UP III (U) Ácidos induzem fluorescência rosa	Fotossensibilidade	Álcool, lesão hepática, sobrecarga de ferro

PBG = porfobilinogênio; ALA = ácido aminolevulínico; UPG = uroporfirinogênio; UP = uroporfirina; CP = coproporfirina; U = urina; F = fezes; E = eritrócito.

CPH assemelha-se a uma forma mais branda da PIA com seus ataques neuroviscerais, porém cerca de 1/3 dos pacientes apresentam manifestações cutâneas (Chemmanur, 2004). O coproporfirinogênio fecal III é excretado durante e entre os ataques, enquanto a ALA e o PBG são encontrados na urina durante a crise aguda. A excreção de ALA usualmente excede a de PBG e esta, por sua vez, aliada aos achados cutâneos (quando presentes), ajuda a diferenciar a CPH da PIA. A prevenção, incluindo o uso de protetor solar, é central ao monitoramento.

Porfiria variegada (PV)

Assim como a PIA e a CPH, a PV é herdada como distúrbio autossômico dominante de baixa penetrância. Às vezes, é referida como porfiria sul-africana por conta de sua prevalência na população branca que vive nessa região. Os pacientes apresentam cerca de 50% de atividade de protoporfirinogênio oxidase. Dessa forma, tais pacientes excretam protoporfirinas e coproporfirinas pelas fezes, bem como ALA, PBG e coproporfirinas pela urina. A indução da ALA sintase hepática I por fatores precipitantes, como os barbitúricos, contraceptivos orais ou dieta de baixo teor de carboidratos, resulta especificamente em aumento dos níveis de ALA e PBG vistos durante os ataques agudos (Chemmanur, 2004). Manifestações cutâneas em forma de erosões ou bolhas após o trauma causado pela exposição da pele ao sol são observadas mais frequentemente em indivíduos mais novos do que a PCT. O diagnóstico se dá por meio da quantificação dos metabólitos, história familiar e análise de DNA. Evitar os fatores desencadeadores ainda é a principal abordagem para o tratamento do paciente.

Porfiria eritropoética congênita (PEC)

A PEC se distingue das demais porfirias já discutidas, seja pelo tipo de herança (é um distúrbio recessivo), seja pelo grau de severidade. Logo após o nascimento, o paciente apresenta pigmentação vermelha na urina, anemia hemolítica e fotossensibilidade cutânea severa. Há uma eritrodontia marcante que pode ser útil como evidência notável caso o diagnóstico ainda não tenha sido estabelecido. A enzima deficiente é a uroporfirinogênio III sintase, enquanto a atividade de ALA sintase está aumentada. A urina do paciente contém coproporfirina I e uroporfirina I. O prognóstico da PEC é significativamente pior do que o das demais porfirias, e há muitos casos de óbito de pacientes jovens.

Porfiria cutânea tardia (PCT)

A PCT é a mais comum das porfirias nos Estados Unidos, e usualmente é adquirida, em vez de herdada de forma dominante. A enzima deficiente é a uroporfirinogênio descarboxilase (UROD). Pesquisadores também postularam a presença de um inibidor de UROD, possivelmente secundário ao ferro e a metabólitos do uroporfirinogênio. Notavelmente, pacientes com hemocromatose apresentam maior risco de desenvolver PCT adquirida (Chemmanur, 2004). Os pacientes com essa doença exibem achados cutâneos isolados, decorrentes de traumas leves nas áreas da pele expostas ao sol, e não uma simples fotossensibilidade. Os achados laboratoriais diagnósticos incluem o aumento dos níveis de uroporfirinas, com aumentos menores do conteúdo de coproporfirinas na urina. É preciso evitar os fatores exacerbadores, como álcool, um indutor da ALA sintase hepática I, e estrógenos. Estratégias de monitoramento adicionais envolvem flebotomia, para redução da carga hepática de ferro; cloroquina, para complexação das porfirinas para excreção urinária; e uso de protetor solar (Chemmanur, 2004).

Neutrófilos

A célula progenitora comum de neutrófilos e monócitos (CFU-GM) sofre divisão e dá origem às células progenitoras de granulócitos (CFU-G) e de monócitos (CFU-M). As células CFU-G e CFU-M dão origem a mieloblastos e monoblastos, respectivamente, sob estimulação de fatores estimuladores de colônias de granulócitos e monócitos (ver Fig. 30.1).

Morfologia dos precursores de neutrófilos

O *mieloblasto* (Fig. 30.13) é uma célula cujo diâmetro mede cerca de 15 μm e que apresenta uma proporção N/C moderadamente alta. Possui um grande núcleo, cuja forma varia de oval a quadrangular, com um padrão de cromatina muito fino e uniforme, membrana nuclear delicada e 2 a 5 nucléolos. O citoplasma é azul-claro transparente e não apresenta grânulos. O aparecimento de grânulos azurofílicos (primários) com diâmetro aproximado de 0,5 μm anuncia a forma mais inicial de pró-mielócito (Fig. 30.14), e indica que a célula se tornará um neu-

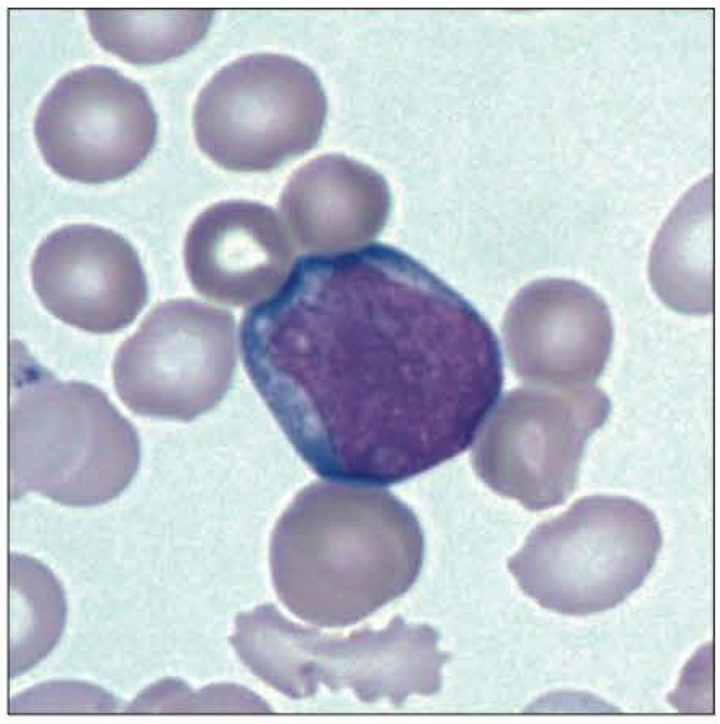


Figura 30.13 Mieloblasto com elevada proporção N/C, cromatina fina, nucléolos visíveis e citoplasma basofílico (Wright-Giemsa, × 250).

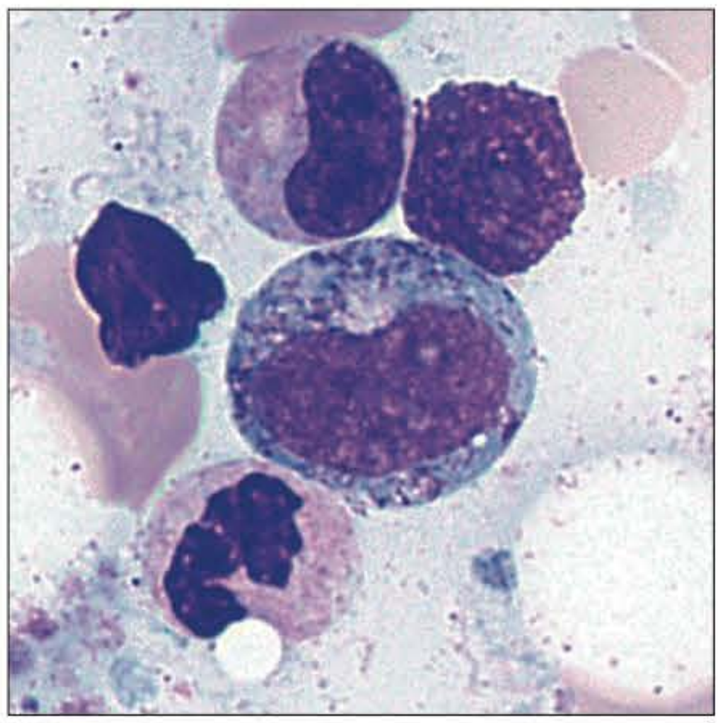


Figura 30.14 Pró-mielócito (centro) com grânulos azurofílicos no citoplasma. A cromatina ainda é fina. Um metamielócito e um neutrófilo segmentado também são observados (Wright-Giemsa, × 250).

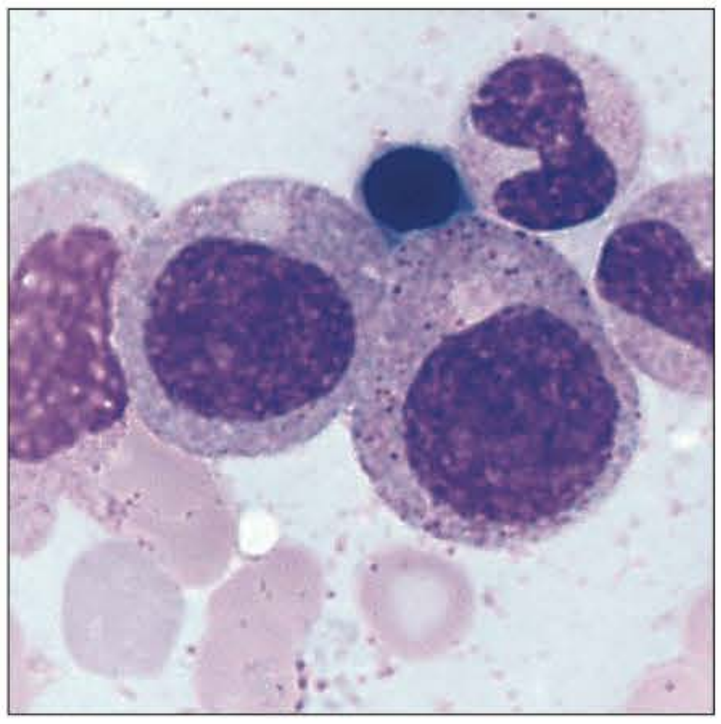


Figura 30.15 Mielócitos possuem grânulos secundários no citoplasma e apresentam cromatina nuclear condensada. Os grânulos primários persistentes vistos nos mielócitos iniciais (centro-direita) são perdidos conforme a célula amadurece. Um neutrófilo bastonete e um normoblasto ortocromático também podem ser observados (Wright–Giemsa, × 250).

trófilo. O estágio de *pró-mielócito* abrange todo o período de produção dos grânulos azurofílicos. O pró-mielócito é discretamente maior do que o mieloblasto. A cromatina nuclear começa a se condensar, e os nucléolos se tornam menos evidentes. O citoplasma é basofílico e preenchido cada vez mais com grânulos azurofílicos. O estágio de *neutrófilo mielócito* tem início com o aparecimento de grânulos específicos de neutrófilos (secundários), inicialmente apenas na região do complexo de Golgi. À medida que mais grânulos específicos se desenvolvem, vão se espalhando pelo citoplasma (Fig. 30.15). O número de grânulos azurofílicos (cuja produção terminou ao final da fase de pró-mielócito) vai diminuindo após sucessivas mitoses. O neutrófilo mielócito inicial, portanto, apresenta um padrão de cromatina nuclear fino e disperso, muitos grânulos azurofílicos e poucos grânulos específicos. Já o neutrófilo mielócito tardio apresenta padrão de cromatina um pouco mais condensado, citoplasma consideravelmente preenchido por grânulos específicos e poucos grânulos azurofílicos. O estágio de mielócito é o último estágio em que ainda há capacidade de divisão celular. O estágio seguinte, de *neutrófilo metamielócito*, é distinguido pela presença de um núcleo recortado com forma de rim, cuja cromatina é mais condensada (Fig. 30.16). A partir desse estágio, as alterações ocorridas no citoplasma são insignificantes. No *neutrófilo bastonete* (forma de bastão), o núcleo apresenta cromatina mais condensada e formato mais uniforme e alongado (Fig. 30.17). Nessa fase, o núcleo é parcialmente contraído até que haja formação de um filamento fino (em termos de comprimento, em vez de largura) entre os dois lobos, quando a célula passa a ser classificada como *neutrófilo segmentado* (Fig. 30.18).

Durante o desenvolvimento e maturação, os precursores neutrofílicos expressam vários marcadores de superfície celular que podem ser utilizados para reconhecimento imunofenotípico. Mieloblastos expressam o marcador de CTH (CD34), bem como HLA-DR e marcadores específicos da linhagem mieloide CD13, CD33, CD15 e CD117. Neutrófilos maturos expressam CD13, CD15, CD16 e CD11b, contudo perdem o HLA-DR e o CD33.

O neutrófilo humano maduro possui 2 vezes mais grânulos específicos do que grânulos azurofílicos (Tab. 30.3). Os grânulos azurofílicos (formados no estágio de pró-mielócito) contêm enzimas lisossômicas (p. ex., hidrolases ácidas, ACP, β-glicuronidase), mieloperoxidase, elastase, arilsulfatase e proteínas antibacterianas catiônicas, entre outras. Os grânulos específicos (formados no estágio de mielócito) contêm lisozima, lactoferrina, colagenase, ativador de plasminogênio, aminopeptidase e proteína ligadora de vitamina B_{12}, bem como outras proteínas e enzimas. Os grânulos terciários, cujo tamanho é semelhante ao dos grânulos específicos, contêm gelatinase. A ALP está localizada em um outro tipo de organela citoplasmática, cuja densidade é menor do que a dos grânulos específicos. Tais organelas surgem pela primeira vez durante o estágio de mielócito tardio.

Distribuição e cinética

Para cada neutrófilo presente nos vasos sanguíneos, existem cerca de 16 precursores na medula óssea. Desde o momento da diferenciação em mieloblasto até aproximadamente 5 divisões mitóticas (das quais 3 ocorrem no estágio de mielócito), leva quase 14 dias para que a progênie da célula atinja o sangue. Os últimos 6 a 7 dias são dedicados

Figura 30.16 Metamielócitos apresentando endentação nuclear e aumento da agregação cromatínica (Wright-Giemsa, × 250).

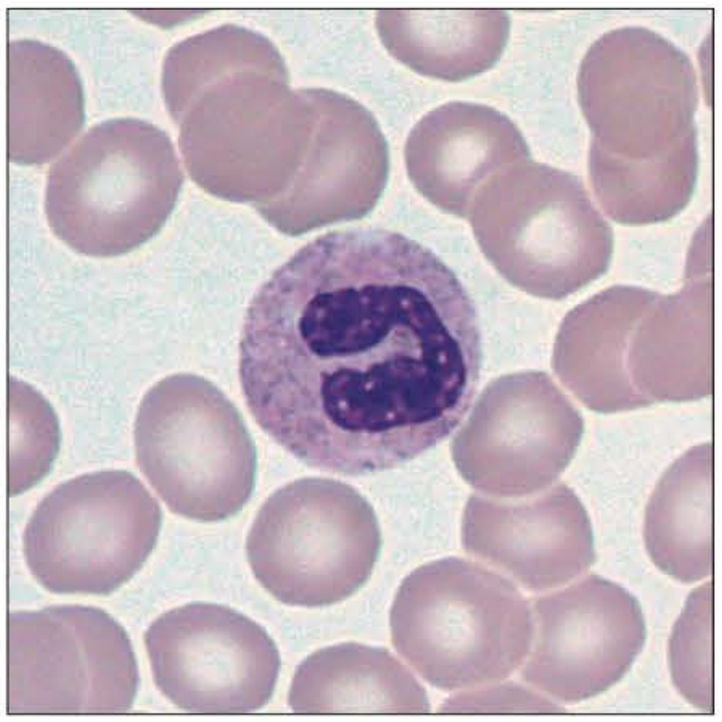


Figura 30.17 Neutrófilo bastonete com núcleos maduros apresentando cromatina agregada, porém sem segmentação (Wright-Giemsa, × 250).

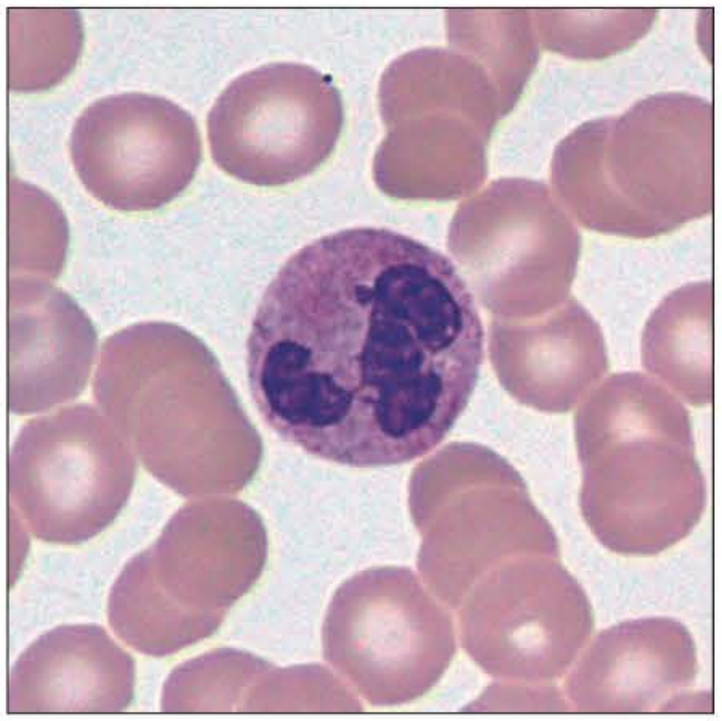


Figura 30.18 Neutrófilo segmentado com múltiplos lobos nucleares unidos por finos filamentos de cromatina (Wright-Giemsa, × 250).

Tabela 30.3 Constituintes e funções dos neutrófilos

Grânulos azurofílicos (formados no estágio de pró-mielócito)
Enzimas lisossômicas: hidrolases ácidas, ACP, β-glicuronidase
Mieloperoxidase
Elastase
Arilsulfatase
Proteínas catiônicas antibacterianas
Grânulos específicos (formados no estágio de mielócito)
Lisozima
Lactoferrina
Colagenase
Ativador de plasminogênio
Aminopeptidase
Grânulos terciários
Gelatinase
Organelas citoplasmáticas
ALP
Funções do neutrófilo
Fagocitose
Atividade bactericida

à maturação e permanência no grupo de armazenamento. Ao atingir o sangue, o neutrófilo prontamente se desloca entre um conjunto de granulócitos circulantes (CGP), que é amostrado para as contagens de leucócitos, e um conjunto de granulócitos marginais (CGM). Este, embora não seja amostrado, encontra-se tanto ao longo das margens das paredes vasculares quanto sequestrado em leitos capilares. Em menos de 1 dia após ter chegado ao sangue, o neutrófilo emigra aleatoriamente da circulação e entra nos tecidos. A partir daí, se não for utilizado em um exsudato inflamatório, o neutrófilo deixa o corpo dentro de alguns dias (via secreção brônquica, saliva, gastrintestinal e urinária) ou é destruído pelo sistema reticuloendotelial.

Função

Os neutrófilos são capazes de se mover em zigue-zague, porém movem-se em linha diante da presença de um fator quimiotático atraente (p. ex., uma bactéria recoberta com determinadas moléculas de complemento) a certa distância. Os neutrófilos expressam receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2, que são responsáveis por sua migração em resposta às quimiocinas. Também possuem receptores para a porção Fc da IgG, bem como para a molécula C3 do complemento, por meio dos quais se liga e fagocita partículas recobertas com ligante. A fagocitose se dá pela formação de um vacúolo fagocítico, que contém a partícula ingerida. Acompanhando esse processo, há um aumento da atividade metabólica e da produção de energia. Os grânulos específicos, seguidos de perto pelos grânulos azurofílicos, despejam seu conteúdo no interior dos vacúolos fagocíticos em um processo conhecido como degranulação. A atividade bactericida nos vacúolos é mediada por H_2O_2, ânion superóxido (O_2^-), mieloperoxidase e um íon haloide gerador de alogênio livre, ou por outro tipo de atividade enzimática. Outras substâncias também podem atuar como fatores quimiotáticos. O fragmento C5a é um fator quimiotático e também uma anafilatoxina que provoca contração da musculatura lisa. Substâncias liberadas por bactérias e produtos do metabolismo do ácido araquidônico também atuam como fatores quimiotáticos para neutrófilos. Sendo assim, os neutrófilos são células importantes na defesa contra doenças infecciosas. Quando suas enzimas são ativadas e liberadas para o meio extracelular, os neutrófilos podem causar necrose, lesão e inflamação nos tecidos.

Eosinófilos

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea. Estudos realizados em culturas *in vitro* demonstraram a existência de uma célula progenitora comprometida eosinofílica (CFU-Eo) na medula, a qual é distinta das células CFU-GM, CFU-G e CFU-M. Os linfócitos T produzem 3 fatores de crescimento (GM-CSF, IL-3, IL-5) que influenciam o desenvolvimento dos eosinófilos. A IL-5 promove maturação terminal e ativação funcional e previne a apoptose dessas células.

Morfologia dos precursores de eosinófilos

É provável que a célula precursora do eosinófilo mais precocemente reconhecível – o eosinófilo mielócito – seja um mieloblasto distintivo. Entretanto, é indistinguível da célula que dá origem aos neutrófilos e monócitos, ou aos basófilos (Figs. 30.1 e 30.13). No eosinófilo mielócito inicial, os grânulos são grandes e captam corantes basofílicos. Conforme a célula amadurece, os grânulos têm cor verde-oliva e, por fim, adquirem a característica cor vermelha-alaranjada (Figs. 30.19 e 30.20). A maturação nuclear é semelhante à que ocorre no neutrófilo. Os eosinófilos são discretamente maiores do que os neutrófilos e apresentam menos lobos nucleares. Eosinófilos maduros expressam CD16 e CD32.

Micrografias eletrônicas de eosinófilos mostram grânulos característicos que contêm um centro cristaloide denso em uma matriz menos densa. Os grânulos imaturos, que surgem na fase de mielócito, a princípio não possuem cristaloide e o desenvolvem no decorrer do processo de maturação. Existem dois tipos de grânulos maduros: o grânulo maior (com maior diâmetro de 0,5–1,5 μm) com um cristaloide denso, e um grânulo menor (com diâmetro de 0,1–0,5 μm) sem cristaloide. Os grânulos menores aparecem tardiamente durante a maturação, após o estágio de mielócito.

Os grânulos eosinófilo-específicos (Tab. 30.4) contêm proteína básica principal (MBP, *main basic protein*) no centro cristaloide. Essa proteína é tóxica para parasitas e células, neutraliza a heparina e induz a liberação de histamina pelos basófilos. Os constituintes dos grânulos encontrados na matriz incluem hidrolases ácidas, peroxidase, fosfolipase e catepsina. Os grânulos específicos também contêm proteína catiônica do eosinófi-

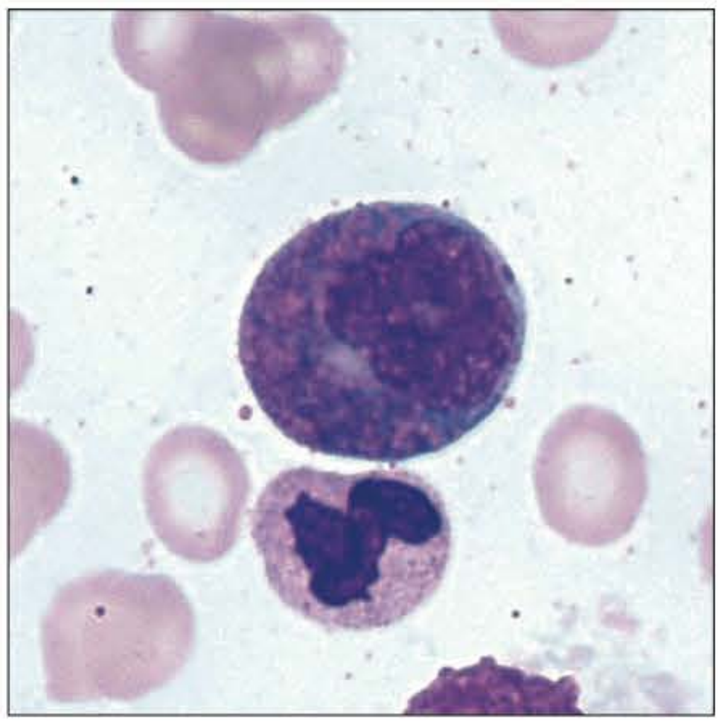


Figura 30.19 Eosinófilo mielócito com núcleo ovoide e grânulos eosinofílicos secundários no citoplasma. Também é possível observar um neutrófilo segmentado (Wright-Giemsa, × 250).

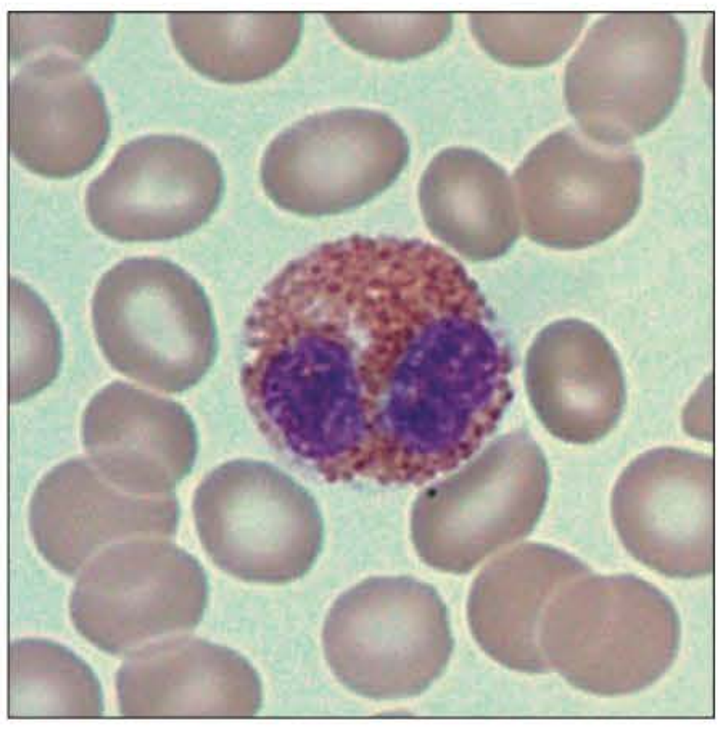


Figura 30.20 Eosinófilo maduro com núcleo bilobado e grandes grânulos eosinofílicos no citoplasma (Wright-Giemsa, × 250).

Tabela 30.4 Constituintes e funções dos eosinófilos

Grânulos eosinófilo-específicos
Grânulos maiores
Proteína básica principal
Hidrolases ácidas
Peroxidase
Fosfolipase
Catepsina
Proteína catiônica do eosinófilo
Neurotoxina derivada do eosinófilo
Proteína X do eosinófilo
Grânulos menores
Arilsulfatase
Peroxidase
ACP
Funções do eosinófilo
Atividade anti-helmíntica – proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, peroxidase
Fagocitose
Resposta alérgica
Inibição de reações inflamatórias

lo (ECP, *eosinophil cationic protein*), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN, *eosinophil-derived neurotoxina*) e proteína X do eosinófilo (EPX, *eosinophil protein X*). A ECP diminui o tempo de coagulação e altera a fibrinólise, além de inibir a proliferação de linfócitos e ser uma potente neurotoxina. EDN e EPX são neurotoxinas fortes (Gleich, 1986). Os grânulos menores contêm arilsulfatase. Ambos os tipos de grânulos contêm peroxidase e ACP. A peroxidase do eosinófilo é diferente daquela encontrada em neutrófilos e monócitos. Do mesmo modo, os eosinófilos não possuem ALP nem muramidase. Os eosinófilos secretam IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, TNF-α e GM-CSF. O TNF-α parece causar fibrose na doença de Hodgkin (Roberts, 1999).

Distribuição e cinética

A cinética dos eosinófilos é parecida com a dos neutrófilos. São armazenados na medula óssea durante vários dias, depois de passarem por diversos estágios de maturação. A meia-vida no sangue é de aproximadamente 18 horas, antes de entrarem nos tecidos onde sobrevivem por no mínimo 6 dias. Nos tecidos, entretanto, os eosinófilos são ao menos 100 vezes mais numerosos do que o total de eosinófilos presentes no sangue. Suas principais localizações são a pele, os pulmões e o trato GI (i. e., barreiras epiteliais ao meio externo).

Função

Os eosinófilos atuam como fagócitos e modulam as respostas inflamatórias (Tab. 30.4). Deixam o sangue quando os níveis de hormônios corticosteroides suprarrenais aumentam. Proliferam em resposta a estímulos imunológicos, e essa resposta proliferativa é mediada por linfócitos T, monócitos e mastócitos, ao menos diante de certos antígenos. Os eosinófilos destroem helmintos por meio da produção de oxidantes potentes e da liberação de proteínas catiônicas. Participam de algumas condições inflamatórias, particularmente reações alérgicas, asma e certas doenças miocárdicas (Gleich, 1986). Apesar de fagocitarem partículas estranhas e complexos antígeno-anticorpo, esta não é sua única atividade. Outra função importante dos eosinófilos consiste em inibir reações de hipersensibilidade e inflamatórias. Evidências apontam que os eosinófilos modulam as reações provocadas pela degranulação de mastócitos e basófilos teciduais. Os eosinófilos expressam receptor de quimiocina CCR3. Entre outros fatores quimiotáticos para eosinófilos, o fator quimiotático para eosinófilos da anafilaxia (ECF-A, *eosinophil chemotatic fator of anaphylaxis*) é encontrado em basófilos e mastócitos. Do mesmo modo, os eosinófilos contêm substâncias que inativam fatores liberados por essas células, tais como histamina, substância de reação lenta da anafilaxia (SRS-A, *slow-reacting substance of anaphylaxis*) e fator ativador de plaquetas (PAF, *platelet-activating fator*).

Diante de uma reação inflamatória eosinofílica intensa ou prolongada, muitas vezes há formação de cristais de Charcot-Leyden. Esses cristais hexagonais bipiramidais são compostos de lisofosfolipase localizada no citoplasma dos eosinófilos (Jandl, 1996).

Basófilos e mastócitos

Não há evidências de desenvolvimento de basófilos em colônias *in vitro* com neutrófilos e monócitos ou eosinófilos. Os basófilos parecem se desenvolver a partir de uma célula progenitora comprometida à parte, derivada de uma CTH.

Morfologia

Os basófilos se desenvolvem a partir de uma célula semelhante a um mioblasto. O primeiro estágio reconhecível é o de basófilo mielócito, em que aparecem os grânulos específicos dos basófilos. Esses grânulos (com diâmetro aproximado de 0,2–1 μm) são maiores do que os grânulos azurofílicos do pró-mielócito e com frequência apresentam forma irregular. Conforme a célula amadurece, os grânulos se tornam mais metacromáticos (vermelho-púrpura) em razão do aumento do conteúdo de mucopolissacarídeos ácidos (heparina). Durante a maturação, o conteúdo de RNA citoplasmático diminui e o núcleo é parcialmente segmentado. Por causa dessa segmentação nuclear incompleta, estágios análogos aos do neutrófilo não são prontamente identificados. Os basófilos maduros apresentam núcleo com cromatina condensada, ainda que "esfumaçada", citoplasma de fundo não

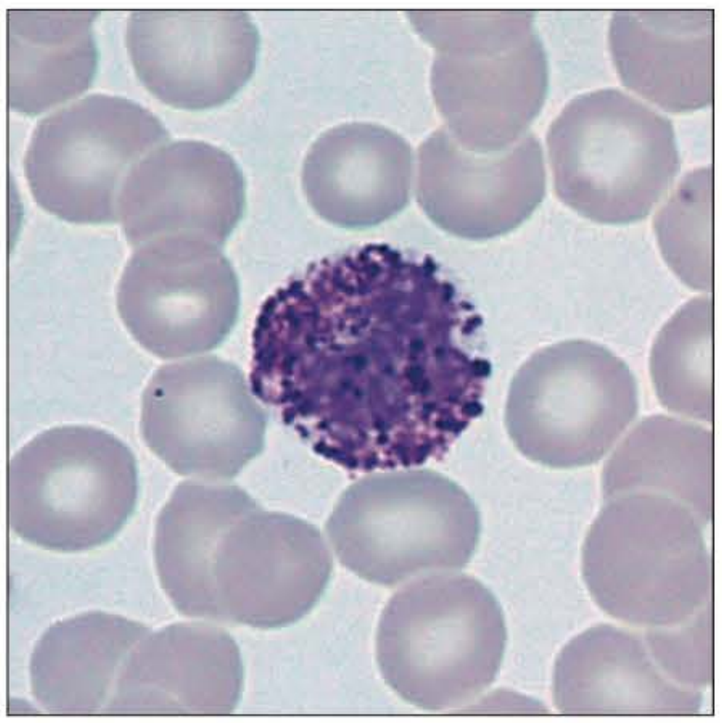


Figura 30.21 Basófilo maduro com grandes grânulos basofílicos vermelho-púrpura, que escondem parcialmente o núcleo (Wright-Giemsa, × 250).

basofílico (RNA residual) (Fig. 30.21) e expressão de CD32.

Em contraste, *mastócitos teciduais* são células integrantes do tecido conjuntivo, de origem mesenquimal, que contêm grânulos citoplasmáticos metacromáticos. Estão amplamente distribuídas pelo corpo, incluindo medula óssea, timo e baço, embora normalmente estejam ausentes no sangue. Em esfregaços corados por Romanowsky (Fig. 30.22), usualmente aparecem maiores do que os basófilos e apresentam baixa proporção N/C, bem como um núcleo reticular redondo ou oval que em geral é obscurecido pela presença de um grande número de grânulos vermelho-púrpura. Seus grânulos são menores, mais redondos e regulares, e menos solúveis do que os grânulos dos basófilos. Os grânulos

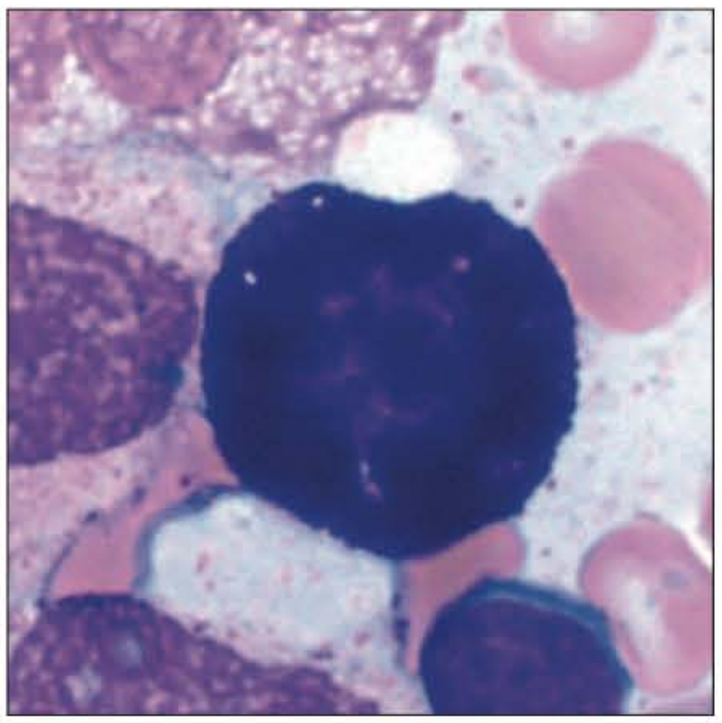


Figura 30.22 Mastócito de medula óssea mostrando inúmeros grânulos uniformes de cor púrpura no citoplasma, escondendo parcialmente o núcleo (Wright-Giemsa, × 250).

citoplasmáticos muitas vezes são fusiformes, em vez de arredondados.

Distribuição e cinética

Os basófilos apresentam uma expectativa de vida semelhante à dos eosinófilos. O tempo de maturação na medula é de aproximadamente 7 dias. Os basófilos circulam pelo sangue e normalmente estão ausentes dos tecidos, ao contrário dos mastócitos, que passam até 9 a 18 meses no tecido conectivo (Jandl, 1996). GM-CSF, IL-3 e IL-5 influenciam a produção de basófilos. Entretanto, a IL-3 é o principal fator de crescimento no desenvolvimento dos basófilos, enquanto o *c-kit* ligante aumenta o número e o estado de ativação dos mastócitos (Lyman, 1998).

Função

Com relação ao número de células circulantes, os basófilos respondem aos corticosteroides suprarrenais de modo semelhante aos eosinófilos. Os

Tabela 30.5 Constituintes e funções dos basófilos

Grânulos basófilo-específicos
Histamina
Heparina
Peroxidase
Fator quimiotático eosinofílico A
Outros constituintes celulares
Substância de reação lenta da anafilaxia
Fator ativador de plaquetas
Funções do basófilo
Reações de hipersensibilidade imediata
Algumas reações de hipersensibilidade tardia

grânulos basofílicos contêm histamina, heparina e peroxidase (Tab. 30.5). Os basófilos sintetizam e armazenam histamina e ECF-A. No momento da estimulação, também sintetizam e liberam SRS-A e provavelmente PAF, mas não os estocam. Os basófilos não possuem enzimas hidrolíticas, como ALP e ACP, ao menos em quantidade demonstrável por citoquímica. O glicogênio é abundante fora dos grânulos. Embora sejam ultraestruturalmente diferentes, os mastócitos apresentam características citoquímicas parecidas, exceto quanto à presença de enzimas proteolíticas e serotonina, ambas ausentes nos basófilos. Ambos os tipos celulares parecem atuar de modo semelhante nos tecidos.

Aparentemente, os basófilos (assim como os mastócitos) estão envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata, como na asma alérgica. A IgE se liga prontamente à membrana dos basófilos e mastócitos. Quando um antígeno específico reage com a IgE ligada à membrana dessas células, ocorre degranulação com consequente liberação de mediadores da hipersensibilidade imediata (p. ex., histamina, SRS-A, PAF, heparina e ECF-A). Este último leva ao acúmulo de eosinófilos, os quais contêm substâncias que tendem a neutralizar tais mediadores. Os basófilos também estão envolvidos em reações de hipersensibilidade tardia – "hipersensibilidade cutânea mediada por basófilos" –, como as alergias por contato, em que parecem exibir um tipo diferente de resposta de degranulação.

Monócitos e macrófagos

Monócitos e neutrófilos compartilham as mesmas células progenitoras comprometidas – CFU-GM (ver Fig. 30.1).

Morfologia

Na medula normal, é morfologicamente impossível distinguir o "monoblasto" do mieloblasto. A célula mais precocemente reconhecível dessa série é o pró-monócito, cujo diâmetro de 15 a 20 μm é um pouco maior do que o do mieloblasto. A proporção N/C é moderada, e o núcleo pode ser oval ou denteado, com um padrão de cromatina fina e uniforme ou discretamente estriada, com 2 a 5 nucléolos. O citoplasma é basofílico, tem aspecto de vidro fosco e apresenta quantidade variável de grânulos azurofílicos finos (Fig. 30.23). O *monócito*, que está presente tanto no sangue quanto na medula, é apenas um pouco menor. Apresenta uma proporção N/C moderada a baixa e um núcleo lobulado com padrão de cromatina delicada, levemente condensada, de estrias finas. Os nucléolos são indistinguíveis ou estão obscurecidos. O citoplasma é opaco, mais cinza do que azul, e contém grande quantidade de grânulos azurofílicos finos (Fig. 30.24).

Macrófagos são os componentes teciduais do sistema monocítico, originados a partir de monócitos sanguíneos emigrantes. São maiores do que os monócitos e medem 15 a 80 μm de diâmetro. Possuem membranas celulares irregulares, que muitas vezes apresentam brotamentos vesiculares e pseudópodos. A proporção N/C é alta nessas células, cujo núcleo é oblongo e/ou recortado. Embora os macrófagos estejam presentes em virtualmente todos os tecidos do corpo, são encontrados em maiores números no intestino, fígado, medula óssea e baço.

Nos pró-monócitos, monócitos e macrófagos, os grânulos (Tab. 30.6) contêm hidrolase ácida, arilsulfatase, esterase inespecífica e peroxidase. Esses grânulos podem ser de mais de um tipo. À medida que a célula amadurece, a atividade de peroxidase diminui e há aumento da atividade de ACP, arilsulfatase e esterase inespecífica. A atividade enzimática está presente em todo o retículo endoplasmático, na zona do complexo de Golgi, nas vesículas revestidas e nos vacúolos digestivos. Isso sugere que no macrófago as vesículas revestidas constituem uma forma secundária de lisossomos primários, que transportam as enzimas hidrolíticas desde o complexo de Golgi até os vacúolos digestivos.

Além dessas enzimas, os monócitos e macrófagos possuem inúmeros receptores e antígenos de superfície. Essas células possuem moléculas de antígenos dos complexos gênicos de classes I (HLA-A, B, C) e II (HLA-DR, DP, DQ). O antígeno (molécula) da célula T CD4 está presente não só nas células T auxiliares, mas também em

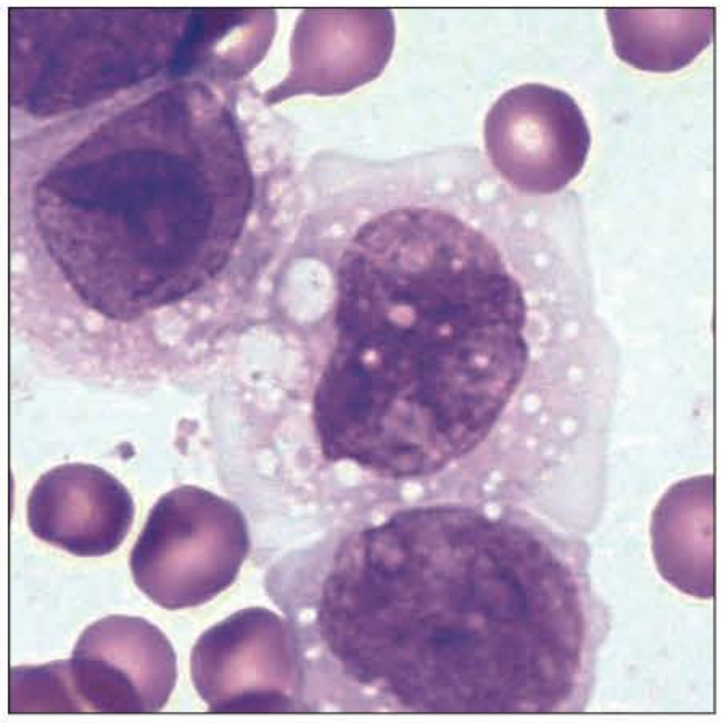


Figura 30.23 Pró-monócitos possuem cromatina fina, muitas vezes apresentando dobras visíveis e citoplasma basofílico que pode conter vacúolos (Wright-Giemsa, × 250).

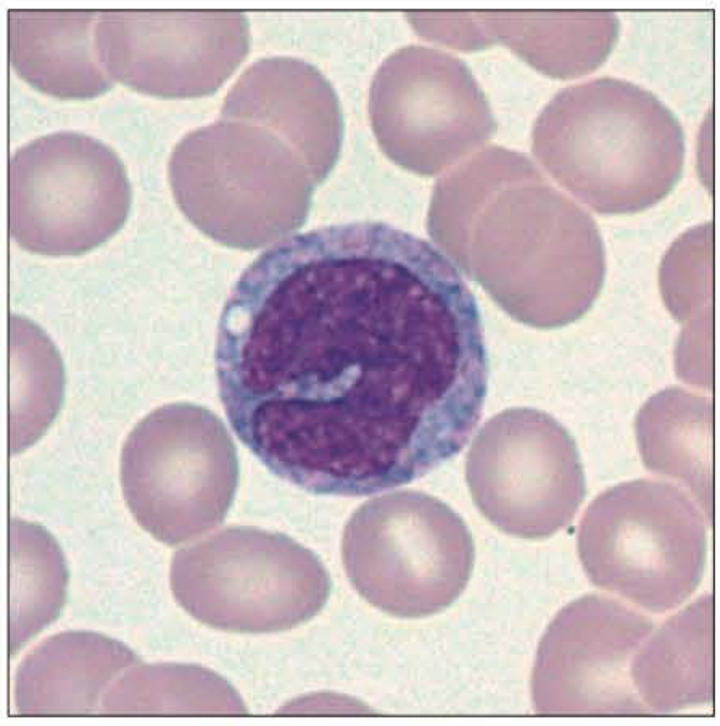


Figura 30.24 Monócito maduro com núcleo indentado, cromatina delicada, citoplasma basofílico e finos grânulos azurofílicos (Wright-Giemsa, × 250).

Tabela 30.6 Constituintes e funções dos monócitos/macrófagos

Grânulos e outros constituintes
Hidrolase ácida
Arilsulfatase
Esterase inespecífica
Peroxidase
ACP
Funções do monócito/macrófago
Fagocitose – bactéria, debris celulares, células senescentes
Processamento de antígeno
Imunidade mediada por células – citotoxicidade celular dependente de anticorpo
Síntese de moléculas bioativas

monócitos e macrófagos. Uma vez que a molécula de CD4 atua como receptor para o vírus da imunodeficiência humana de tipo 1 (HIV-1), esse vírus infecta monócitos e macrófagos além das células T auxiliares. Monócitos e macrófagos expressam antígenos CD11 (CD11a, b, c), que são marcadores definidores das glicoproteínas de adesão de superfície. Os antígenos CD14, CD64 e CD68 também estão presentes nessas células. Essas moléculas de superfície são frequentemente utilizadas para identificar a linhagem de células mononucleares na hematologia em casos de malignidade linfoide.

Distribuição e cinética

Depois de formados, os pró-monócitos respondem ao M-CSF e sofrem mais 2 a 3 divisões mitóticas em um período de aproximadamente 50 a 60 horas, antes de serem liberados no sangue. Sob condições de aumento da demanda, a duração do ciclo pode ser reduzida e células mais imaturas podem ser lançadas na circulação sanguínea. Os monócitos do sangue são distribuídos a um conjunto de monócitos circulantes e a outro conjunto de monócitos marginais, em uma proporção de 1:3,5. Tendo alcançado o sangue, os monócitos partem ao acaso, com uma meia-vida de 8,4 horas. Esse tempo de duração pode ser encurtado em casos de esplenomegalia ou infecção aguda, podendo ser prolongado diante de uma monocitose. Depois de deixarem a circulação sanguínea, os monócitos permanecem como macrófagos nos tecidos durante vários meses (talvez até por mais tempo).

Função

O monócito se forma na medula, é transportado pelo sangue e migra pelos tecidos, onde se transforma em histiócito ou macrófago e passa a maior parte de sua expectativa de vida. Os monócitos do sangue e os macrófagos teciduais constituem um sistema fagocítico mononuclear (sistema reticuloendotelial).

O sistema de fagócitos mononucleares exerce o importante papel de defender o corpo contra microrganismos, incluindo micobactérias, fungos, bactérias, protozoários e vírus (Tab. 30.6). As células são móveis e respondem a fatores quimiotáticos (componentes do complemento, bem como linfocinas e IFN-γ oriundo de linfócitos T ativados). São imobilizadas pelo fator de inibição da migração produzido por linfócitos ativados. Engajam-se na fagocitose, que é um processo intensificado quando a partícula-alvo é recoberta com IgG ou complemento, para os quais o macrófago possui receptores de membrana. Após a fagocitose, matam os microrganismos ingeridos.

Esses fagócitos mononucleares constituem parte integral tanto da imunidade humoral quanto da imunidade mediada por células. Eles manipulam ou processam antígenos, proporcionando o contato do antígeno (ou informação antigênica) com os linfócitos. Também respondem a várias linfocinas e monocinas, e atuam como células efetoras (p. ex., citotóxicas) na resposta imune mediada por células. Monócitos e macrófagos atuam na citotoxicidade celular dependente de anticorpos. Essas células conseguem eliminar uma variedade de células malignas (Weinberg, 2004), ao promoverem citostase e citólise. Uma parte da habilidade dos macrófagos de destruir células malignas pode ser atribuída à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e intermediários reativos do oxigênio.

Os macrófagos removem e processam células senescentes e debris por meio da fagocitose e digestão: exemplificando, os núcleos dos eritrócitos, leucócitos e megacariócitos são removidos pelos macrófagos na medula. Material particulado inalado é removido por macrófagos alveolares presentes nos pulmões.

É possível "ativar" os macrófagos com fatores tanto específicos (p. ex., anticorpos citofílicos) quanto inespecíficos (p. ex., em resposta ao material fagocitado). A ativação resulta em ampliação da célula e intensificação do metabolismo, fagocitose, atividade microbicida, citotoxicidade, secreção de proteínas citolíticas (incluindo TNF-α) e assim por diante.

Os macrófagos sintetizam e secretam um grande número de moléculas biologicamente ativas, tais como enzimas, componentes do complemento, proteínas ligadoras, fatores de coagulação, citocinas e fatores de crescimento, fatores quimiotáticos, fatores de angiogênese e lipídeos bioativos. Esse sistema, portanto, exerce múltiplas funções que incluem defesa do hospedeiro, controle da hematopoese e policiamento do ambiente por todo o corpo (Johnston, 1988).

Megacariócitos

As plaquetas se originam a partir dos megacariócitos poliploides, que são as maiores células hematopoéticas e representam menos de 1% do total de células nucleadas da medula óssea. Os megacariócitos originam-se de CTHs multipotentes e, então, de uma célula progenitora comprometida – a CFU-Meg (ver Fig. 30.1). A proliferação do megacariócito é em grande parte regulada pela trombopoetina. Fatores de crescimento adicionais (ligante *kit*, IL-3, IL-6 e IL-11) sustentam o desenvolvimento megacariocítico em presença de trombopoetina (Kaushansky, 1995). Os níveis séricos de trombopoetina em geral são inversamente proporcionais à contagem plaquetária. Entretanto, esses níveis aumentam na doença hepática e em estados inflamatórios, provavelmente em decorrência das repostas dos hepatócitos e das células estromais da medula (Kaushansky, 1995).

Morfologia

As células progenitoras comprometidas não são morfologicamente distinguíveis dos linfócitos. O desenvolvimento do megacariócito é caracterizado pela *endomitose*, ou seja, a divisão nuclear sem divisão citoplasmática concomitante, que resulta em ploidias variáveis de 2N a 64N. A maioria das ploidias é de 8N e 16N, com números menores de cada lado. Os lobos nucleares não apresentam correlação precisa com a ploidia. A cromatina nuclear se cora intensamente, sendo bastante dispersa no início e mais compacta e densa ao final. Os nucléolos permanecem pequenos em todos os estágios do desenvolvimento do megacariócito.

O estágio mais precocemente identificado – o *megacarioblasto* – apresenta lobos nucleares sobrepostos e pequena quantidade de citoplasma basofílico. No decorrer do processo de maturação, os lobos nucleares aumentam de tamanho e se espalham, e grânulos rosa-avermelhados passam a ser vistos primeiramente no centro da célula. No *megacariócito maduro*, o núcleo é mais compacto, a basofilia desaparece e os grânulos se juntam formando pequenos agregados (Fig. 30.25).

A formação de plaquetas individuais é um processo complexo. Os megacariócitos desenvolvem membranas de superfície invaginadas (membranas de demarcação), que fornecem uma reserva de membrana para formação de pró-plaquetas (Italiano, 2003). As pró-plaquetas são extensões de pseudópodos dos megacariócitos, que se destacam e afinam progressivamente. A ação microtubular é importante na formação das pró-plaquetas e também para trazer os grânulos e organelas constituintes para dentro das pró-plaquetas. As plaquetas se formam nas extremidades das pró-plaquetas e são liberadas pela ação microtubular (Hartwig, 2003).

Megacariócitos no sangue

Megacariócitos inteiros ou fragmentos podem ocasionalmente ser

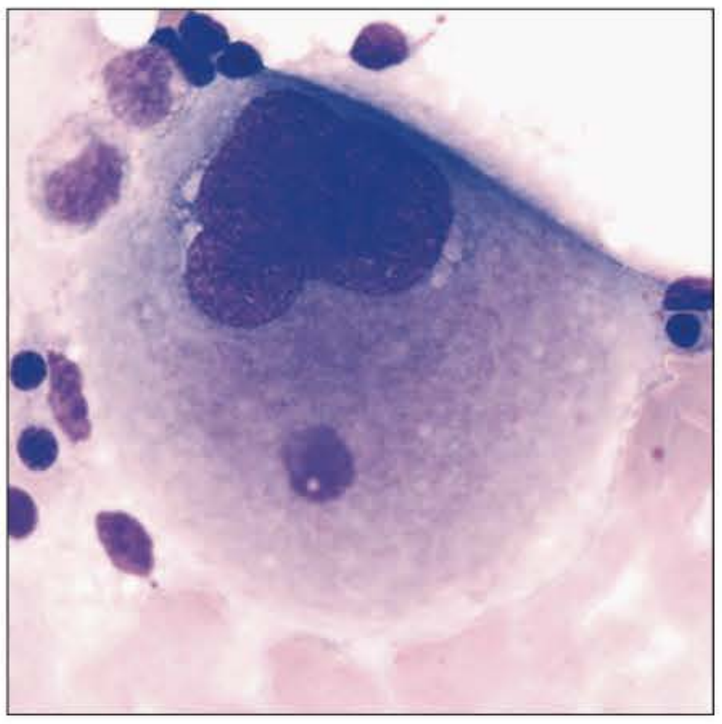


Figura 30.25 Megacariócito com um grande núcleo lobulado e citoplasma granular abundante (Wright-Giemsa, × 250).

encontrados em esfregaços de sangue normais. Estão presentes de forma consistente em esfregaços de creme leucocitário. Os fragmentos de megacariócitos em esfregaços de sangue podem ser tão pequenos quanto os linfócitos, sendo identificados pela cromatina intensamente corada (com uma separação cromatina-paracromatina mais definida do que a observada no núcleo de um linfócito) e por fragmentos de citoplasma de megacariócito que permanecem presos. São encontrados com mais frequência do que o normal em processos mieloftísicos, distúrbios mieloproliferativos ou após estresse ou lesão à medula.

Megacariócitos anões ou micromegacariócitos (Fig. 30.26) mostram evidências de megacariopoiese anormal: citoplasma agranular com zonas hialoplásmicas ou pseudópodos. Associações com grandes plaquetas atípicas apresentam características citoplasmáticas similares. Esses megacariócitos anões anormais raramente são encontrados em qualquer condição, exceto em distúrbios mieloproliferativos ou mielodisplásicos.

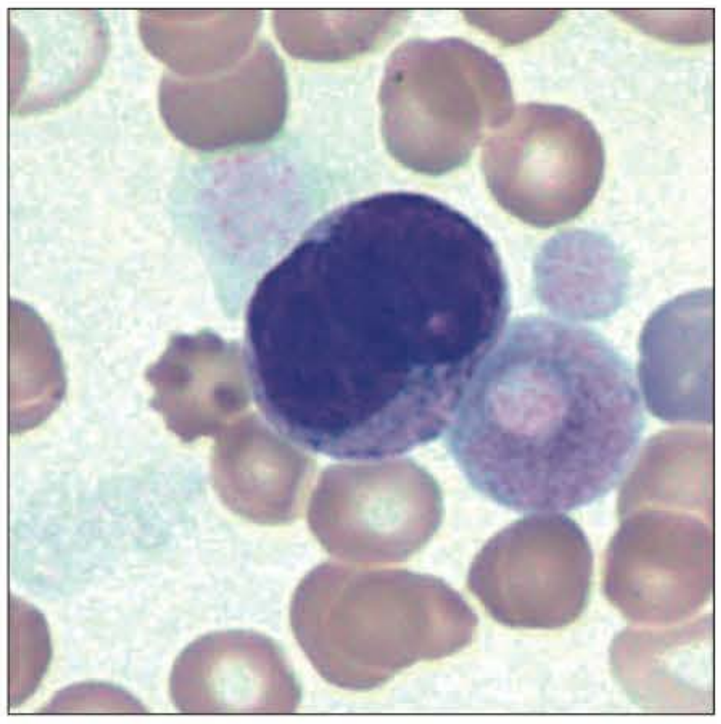


Figura 30.26 Megacariócito anão com núcleo bilobado e citoplasma granular escasso. Também há algumas plaquetas gigantes. Essas células estão mais frequentemente associadas a distúrbios mieloproliferativos e mielodisplásicos (Wright-Giemsa, × 250).

Distribuição e cinética

No ser humano, o tempo de maturação dos megacariócitos na medula é de aproximadamente 5 dias. As plaquetas são liberadas dentro dos seios medulares por várias horas (Hartwig, 2003) e os núcleos dos megacariócitos são fagocitados pelos macrófagos. As plaquetas recém-liberadas são maiores, metabolicamente mais ativas e mais efetivas em termos de hemostasia. Circulam em uma concentração média de 275 × 10^9/L, a qual se mantém estável. Cerca de ⅔ do total de plaquetas estão sempre na circulação, enquanto o restante permanece no baço. Em indivíduos sem baço, todas as plaquetas estão na circulação. Nas doenças caracterizadas pelo alargamento esplênico, 80 a 90% das plaquetas podem ser sequestradas pelo baço, com consequente diminuição da concentração de plaquetas circulantes (trombocitopenia).

As plaquetas sobrevivem por 8 a 11 dias no sangue circulante. Algumas são destinadas à manutenção da integridade vascular e à vedação de pequenas lesões vasculares (perda aleatória), enquanto outras são removidas pelo sistema fagocítico mononuclear ao se tornarem senescentes.

Função

As plaquetas normalmente exercem as seguintes funções: (1) mantêm a integridade dos vasos sanguíneos; e (2) formam rolhas hemostáticas para deter perdas de sangue a partir de vasos lesados e, durante esse processo, promovem coagulação de fatores plasmáticos.

Linfócitos

Tecido linfoide primário

Durante a vida fetal, precursores de linfócitos são originados na medula óssea e tornam-se comprometidos com uma linhagem independente de antígeno. A maturação e seleção das células T ocorrem primariamente no timo e, para as células B, na medula e órgãos linfoides periféricos (Denning, 1988; Bertoli, 1988). A população de células T é amplamente autorrenovável após a involução do timo. As células B têm apenas uma capacidade de autorrenovação limitada, dependendo do recrutamento das células-tronco da medula para reposição de células B e plasmócitos programados que não possuem capacidade de autorrenovação (Jandl, 1996). Embora a maturação das células NK ainda seja pouco compreendida, dados indicam a existência de uma célula precursora comum T/NK (Spits, 1995). Se por um lado a diferenciação da célula NK pode ocorrer no timo, é provável que a medula óssea seja o principal sítio de seu desenvolvimento.

Desenvolvimento da célula B: medula óssea (Tab. 30.7). Um órgão distinto, denominado bursa de Fabricius, é encontrado nas aves e serve como sítio primário de desenvolvimento das células B. No ser humano, o fígado é o equivalente da bursa durante a oitava ou nona semana de gestação. Posteriormente, a medula óssea passa a desempenhar esse papel, depois que as CTHs povoam o órgão. Durante a vida adulta, a geração de células B se dá na medula óssea.

A diferenciação das células B pode ser dividida de forma consistente em 2 estágios (Cooper, 1987). O estágio inicial da diferenciação da célula B envolve a geração de diversidade antígeno-independente, por meio do rearranjo dos genes codificadores das cadeias leve e pesada

Tabela 30.7 Marcadores de superfície celular críticos ao desenvolvimento do linfócito

Nome da célula	Marcadores CD
Célula B progenitora	CD19, TdT, CD79a, HLA-DR
Célula pré-B	CD19, TdT, CD10, CD20, μ citoplasmática
Célula B madura naive	CD19, CD20, Bcl-2, IgM de superfície
Centroblastos	CD19, CD20, CD10, Bcl-6
Células B maduras (sangue periférico)	CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD38
Plasmócitos	CD38, CD138, Ig citoplasmática

das imunoglobulinas. O segundo estágio é regulado pela deflagração do antígeno, interação com a célula T, macrófagos e vários fatores de crescimento (Fig. 30.27). Esse estágio ocorre predominantemente nos órgãos linfoides secundários.

Uma célula progenitora dá origem à primeira célula B reconhecível tanto no homem quanto nos mamíferos. No ser humano, essa célula progenitora é a célula (progenitora) pró-B. Essa célula é caracterizada pela expressão do receptor CD19 e TdT, e não possui nenhuma imunoglobulina citoplasmática ou ligada à superfície (Hagman, 1994). A diferenciação das células pró-B requer o rearranjo do gene das imunoglobulinas. A célula pré-B é caracterizada pela presença de cadeias pesadas μ intracitoplasmáticas, e também não possui nenhuma imunoglobulina ligada à superfície ($sIg^-c\mu^+$). Contém ainda antígenos HLA-DR, CD19, CD79a e outros marcadores de superfície. A diferenciação da célula pré-B é influenciada por proteínas humorais.

Ao se tornar uma célula pré-B, a célula-tronco linfoide sofre rearranjo nos segmentos gênicos DJ e VDJ para formar um gene V funcional para a cadeia pesada μ (Fig. 30.28). Um rearranjo produtivo do gene da cadeia pesada é, então, seguido de um rearranjo do segmento gênico VJ da cadeia leve. O rearranjo que ocorre primeiro envolve o gene da cadeia leve κ, localizado no cromossomo 2. Se os rearranjos κ em ambos os loci forem improdutivos, ocorre rearranjo do gene da cadeia leve λ, localizado no cromossomo 22. Os controles exercidos durante o desenvolvimento da célula pré-B permitem o surgimento de apenas um único gene produtivo VH e VL, limitando cada célula B a uma única estrutura de anticorpo (Bertoli, 1988). A combinação da cadeia pesada μ e das cadeias leves κ ou λ permite à célula pré-B originar uma molécula de imunoglobulina intacta e expressar IgM de superfície. A mudança (*switching*) de isótipo (de IgM/IgD para IgG1 etc.) e as constantes deleções do gene da cadeia pesada constante ocorrem nas células pré-B e nas células B mais diferenciadas. A transformação das células μ em células γ1 ou α2 se dá pela formação de uma alça de DNA em que todos os genes de cadeia pesada constan-

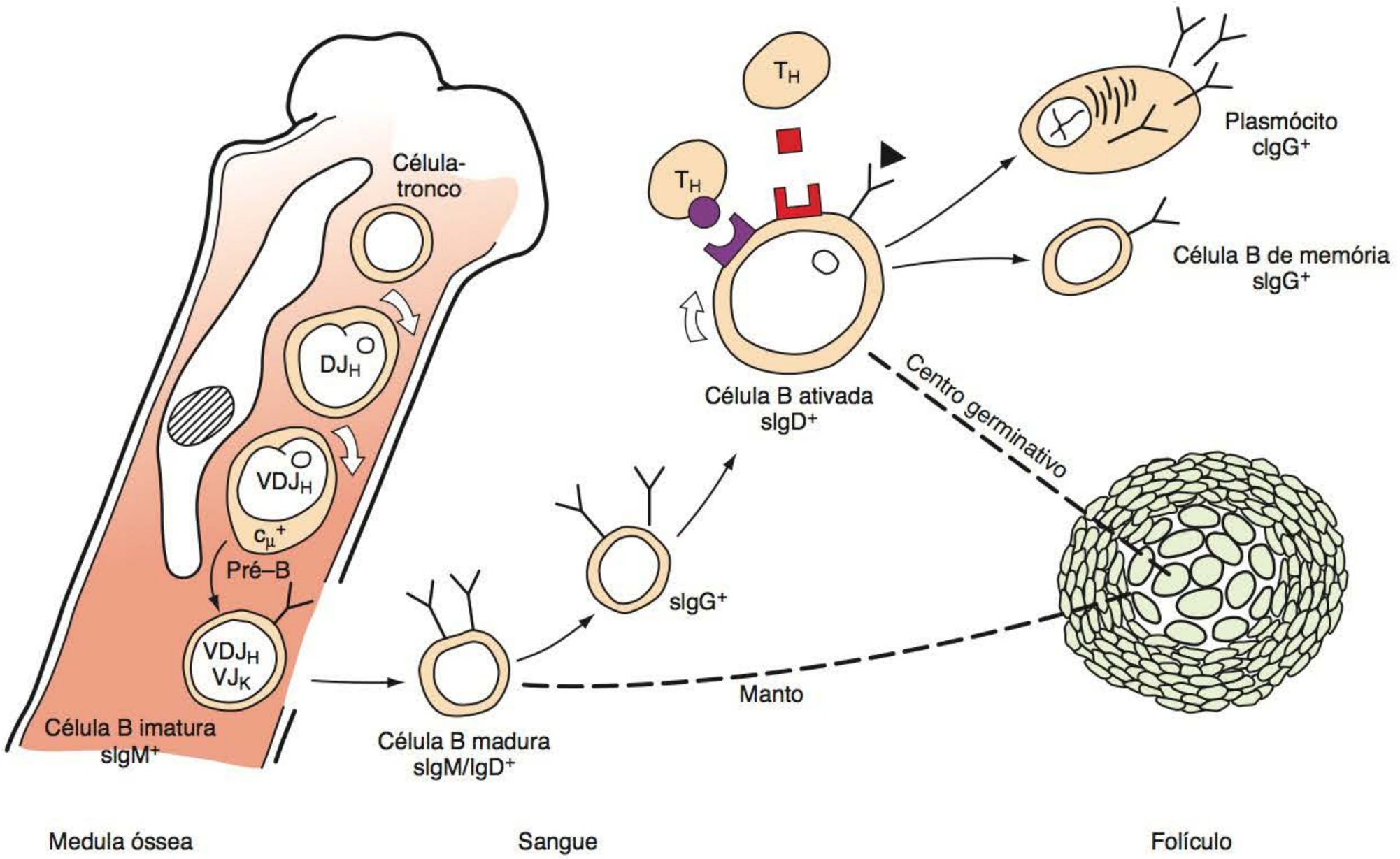


Figura 30.27 A diferenciação das células pré-B em células B é independente de antígeno, enquanto a proliferação e a diferenciação terminal das células B são conduzidas pelo antígeno. As células-tronco hematopoéticas e as células estromais ajudam a originar as células pré-B. Estas proliferam (setas abertas denotam ciclagem celular), rearranjam os segmentos genéticos DJ e VDJ, e, em seguida, expressam cadeias μ no citoplasma (cμ⁺). Uma célula pré-B pequena em repouso (não mostrada), cujo gene VJk sofreu rearranjo, monta uma molécula completa de IgM_k, se transforma em uma célula B imatura e deixa a medula óssea. A expressão de sIgD marca a entrada da célula na fase de célula madura em repouso (ou G_0), característica da maioria das células B presentes no sangue e na zona do manto. A mudança para um isótipo alternativo (IgG, nesse caso) pode ocorrer antes ou depois do encontro com o antígeno. O antígeno estimula a célula B a se tornar maior (na fase G_1 do ciclo celular) e a apresentar antígeno processado e DR ao complexo antígeno-específico TCR-T_3. As células T auxiliares (T_H) secretam fatores de crescimento que se ligam ao receptor recém-expresso, intensificando ainda mais a proliferação (fases S e M) nos centros germinativos. A célula B ativada pode ser induzida a se diferenciar em plasmócitos que, então, secretam seu abundante conteúdo citoplasmático de IgG. Alternativamente, a célula B pode se transformar em célula B de memória, que apresenta uma refinada especificidade equilibrada para fornecer uma resposta imune anamnésica em seu próximo encontro com o antígeno. (De Bertoli LF, Burrows PD: Normal B-lineage cells: Their differentiation and identification. Clin Lab Med 1988; 8:15, com permissão.)

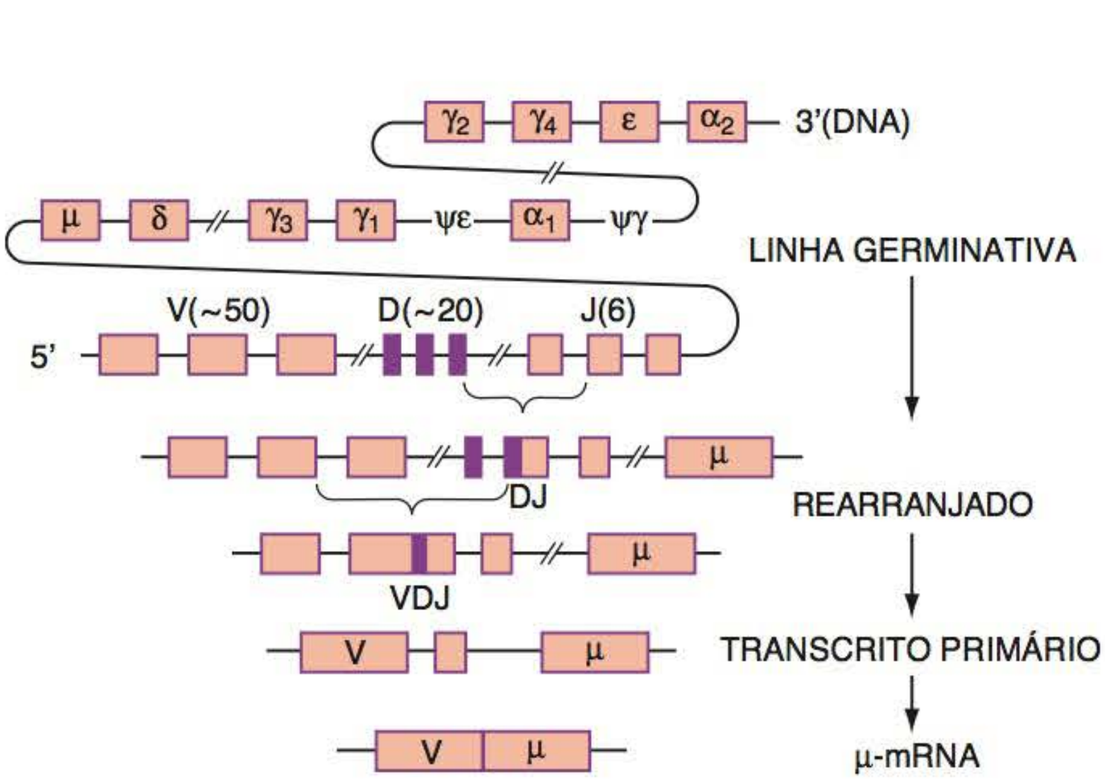


Figura 30.28 A geração de um gene de Ig funcional requer rearranjo do DNA. Nas células da linhagem germinativa e em células somáticas não linfoides, os segmentos genéticos V, D e J estão amplamente separados no DNA do cromossomo 14. Uma célula comprometida com a linhagem de células B primeiramente sofre rearranjo D para J, seguida da justaposição dos segmentos D e J, e deleção das sequências de DNA interferentes. Esse processo é seguido de um rearranjo V para DJ, com consequente geração de um éxon VDJ completo. O transcrito primário de RNA é processado e dá origem a um mRNA (VDJ) V contínuo. (De Bertoli LF, Burrows PD: Normal B-lineage cells: Their differentiation and identification. Clin Lab Med 1988; 8:15, com permissão.)

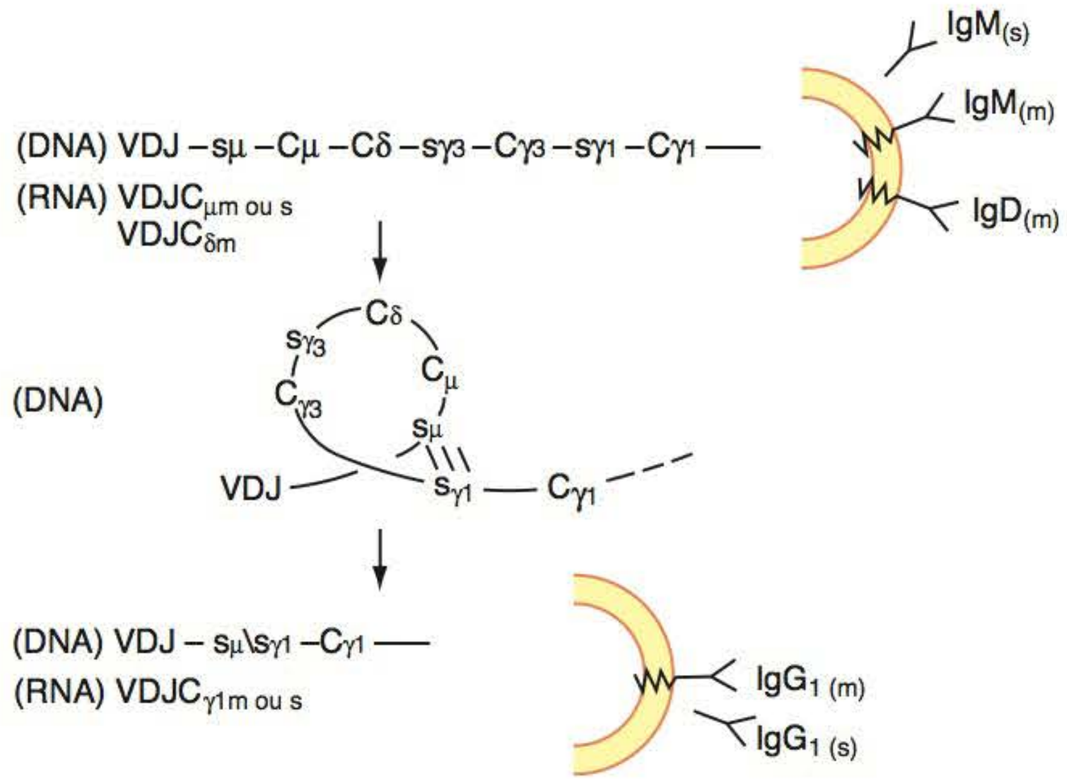


Figura 30.29 Estratégias alternativas para expressão de isótipos não IgM. A IgD pode ser coexpressa com a IgM por meio do processamento alternativo de um transcrito primário de RNA de VDJ-Cμ-Cδ para produzir μ de membrana (m), μ secretória (s) e RNAs δ_m. A produção de isótipos IgG, IgA ou IgE envolve rearranjo do DNA. Durante a mudança de IgM para IgG, por exemplo, a recombinação intracromossômica entre regiões de switch (s) homólogas resulta nas deleções de C_μ, C_δ e $C_{\gamma 3}$, de modo que $C_{\gamma 1}$ passa a ser o primeiro gene C 3′ do éxon VDJ. Portanto, a mesma região variável é expressa com uma região constante diferente. (De Bertoli LF, Burrows PD: Normal B-lineage cells: Their differentiation and identification. Clin Lab Med 1988; 8:15, com permissão.)

te interferentes são deletados (Fig. 30.29). A IgD pode ser coexpressa com a IgM por meio do processamento alternativo de RNA.

As células pré-B dão origem a células B maduras naive que caracteristicamente expressam imunoglobulina ligada à superfície. Essas células estão presentes nos folículos linfoides primários, nas zonas do manto folicular e na circulação. Além da IgD e da IgM, essas células muitas vezes expressam CD5 e são positivas para Bcl-2.

No segundo estágio de diferenciação, as células B naive interagem com o antígeno e sofrem transformação na presença de células T e macrófagos. Esse processo ocorre no centro germinativo. As células B se transformam em células blásticas (centroblastos) que expressam Bcl-6 e CD10. A rápida divisão e expansão dos clones de células B representa uma tentativa de identificar as células cujas imunoglobulinas melhor se ajustam ao antígeno estimulador. A especificidade antigênica é ainda mais refinada pelo processo de mutação somática que ocorre nos genes da região variável. Os centroblastos dão origem aos centrócitos que, por sua vez, são células clivadas dos centros foliculares. Essas células expressam a imunoglobulina modificada (após a mutação somática). As células com menor afinidade pelo antígeno são destruídas por apoptose (no centro germinativo, as células não expressam Bcl-2; portanto, são suscetíveis à apoptose). Os centrócitos sobreviventes se diferenciam em plasmócitos – que produzem imunoglobulinas circulantes – ou em células B de memória – que irão proporcionar uma rápida resposta humoral na próxima vez que encontrarem o mesmo antígeno. Células B de memória são encontradas na zona marginal do folículo.

O estado dos genes de imunoglobulinas, portanto, é um bom indicador do estágio de desenvolvimento das células B. A existência de rearranjo do gene da imunoglobulina identifica as células B primitivas. Mutações somáticas que resultam em sequências de região variável diferentes das sequências da linhagem germinativa identificam uma célula B que foi estimulada pelo antígeno. As células B do centro germinativo podem ser distinguidas das células B do centro pós-germinativo por meio da observação da diversidade intraclonal apresentada pelas primeiras, produzida por mutações somáticas em andamento.

No sangue periférico, cerca de 6 a 15% das células B expressam IgM ligada à superfície (90% destas coexpressam IgD), 1 a 3% expressam IgG, e 0,5 a 2% expressam IgA. As células B maduras expressam receptores para porções Fc de isótipos de Ig, fragmentos C3b e C3d do complemento, interferon e IL-4, além de CD19, CD20, CD21, CD22, CD24 e CD38.

Os plasmócitos se caracterizam pelo conteúdo abundante de imunoglobulinas citoplasmáticas, refletindo o comprometimento da imunoglobulina da célula B ativada. Nesse estágio, a expressão dos receptores de Fc e C3, antígeno HLA-DR e imunoglobulina ligada à superfície é muito baixa, porém as células expressam CD38 e CD138. Assim, os linfócitos que possuem sIg originam células comprometidas com a síntese de IgM, IgG e IgA.

Desenvolvimento da célula T: timo (Tab. 30.8). O microambiente do timo é necessário à diferenciação das células T. O timo humano é dividido em 2 regiões – córtex e medula. O córtex está subdividido em córtex subcapsular e córtex interno, e é povoado predominantemente por pequenos linfócitos e algumas células epiteliais dispersas. Um septo fibroso se estende a partir da cápsula até a região medular. Em sua maior parte, a medula é composta por células epiteliais com um pequeno componente de linfócitos. Na medula, existem pequenas ilhas de células epiteliais parcialmente hialinizadas denominadas corpúsculos de Hassall.

As células pró-T migram da medula óssea ou do fígado fetal em direção ao timo, onde são processadas em células T funcionalmente maduras, destinadas a seguirem para a circulação sanguínea e os tecidos linfoides secundários. As células T mais precoces encontradas no timo expressam CD2 e CD44 (Schattner, 2001). Subsequentemente, essas células expressam CD25 e CD3. Os genes codificadores do receptor da célula T (TCR) estão organizados de modo similar aos genes das imunoglobulinas. Possuem regiões V, D, J e C, e sofrem rearranjo durante a maturação inicial das células T. Além das glicoproteínas heterodiméricas (α/β ou γ/δ), o complexo do TCR/CD3 também é constituído de subunidades adicionais, CD3-ε, -ξ e -η (Blumberg, 1990). O TCR reconhece peptídeos estranhos apresentados em associação com moléculas do MHC próprio. Os TCRs das células CD4+ α/β reconhecem peptídeos não próprios expostos na fenda das moléculas de classe II do MHC, enquanto os TCRs das células T CD8+ α/β reconhecem polipeptídeos não próprios ligados a moléculas de classe I (MacLennan, 1999).

A maturação das células T é um processo complexo para o qual foram definidos ao menos 3 estágios, cada um com múltiplos subestágios (Paraskevas, 2004b). No primeiro estágio, as células pró-T migram tanto da medula óssea quanto do fígado fetal para o córtex do timo. No segundo estágio, as células pró-T migram primeiramente do córtex subcapsular para o córtex interno e, então, seguem para a medula tímica (Tab. 30.8). Durante essa fase, as células T com capacidade de reconhecer antígenos estranhos são retidas, enquanto as células T que reconhecem autoantígenos são eliminadas.

No início do desenvolvimento da célula T, os genes das cadeias γ e β sofrem rearranjo simultaneamente, com o comprometimento do TCR dependendo da expressão da cadeia α substituta e do desenvolvimento de um pré-TCR (Haks, 1998; Kang, 2001). As células T α/β do timo primeiramente coexpressam CD4 e CD8, com subsequente modulação negativa de uma ou outra. Na medula tímica, as células pré-T perdem a capacidade de produzir TdT conforme vão sendo convertidas em células T maduras (terceiro estágio). Em seguida, passam a circular no sangue e nos tecidos linfoides periféricos.

A maioria das células T (periféricas) pós-tímicas expressam TCR α/β, enquanto uma pequena minoria expressa cadeias γ/δ. As células NK expressam apenas cadeias ε com CD3 citoplasmático. Existem pelo menos 3 tipos de células T maduras. As células T auxiliares possuem cadeias α/β de TCR e expressam os marcadores celulares CD2, CD3, CD4, CD5 e CD7. As células T supressoras/citotóxicas possuem cadeias α/β de TCR e expressam marcadores celulares CD2, CD3, CD5, CD7 e CD8. As células T maduras com cadeias γ/δ de TCR exibem CD2, CD3 e CD7, não possuem CD4 nem CD8 e parecem atuar como uma outra população de células citotóxicas (Paraskevas, 2004b).

O desenvolvimento antígeno-dependente das células T é controlado pela interação com as células epiteliais tímicas e os fibroblastos tímicos, bem como pela influência de citocinas, fatores de crescimento e hormônios tímicos. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7 e KL são críticos ao crescimento e diferenciação dos linfócitos tímicos. Os hormônios tímicos produzidos pelas células epiteliais tímicas também induzem a função da célula T.

Na área da zona T do sistema linfoide periférico, a via dependente de antígeno da célula T se dá pela ligação dos TCRs a peptídeos antigênicos associados a moléculas apropriadas de MHC I e II em macrófagos ou células dendríticas interdigitantes (CDIs). Como resultado, há liberação de IL-1 pelos macrófagos ativados que, por sua vez, leva

Tabela 30.8 Resumo da maturação da célula T

Estágio celular	Eventos de maturação	Marcadores de superfície
Célula pró-T	Migração da medula para o córtex tímico	CD2, CD44
Células pré-T α/β	Migração do córtex tímico para a medula, eliminação de células T autorreativas, rearranjo do TCR α/β (para células T destinadas tanto ao subgrupo auxiliar quanto supressor)	TdT, CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8
Células pré-T γ/δ	Migração do córtex tímico para a medula, eliminação de células T autorreativas, rearranjo do TCR γ/δ (para células T destinadas ao subgrupo citotóxico)	TdT, CD1, CD2, CD3, CD7
Célula T madura	Perda da capacidade de produzir TdT, circulação no sangue periférico como células dos subgrupos auxiliar, supressor ou citotóxico	T auxiliar: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 T supressor: CD2, CD3, CD5, CD7, CD8 T citotóxico: CD2, CD3, CD7

à formação de receptores de IL-2 nas células T e subsequente síntese e liberação de IL-2 por essas células T ativadas. Nesse processo de ativação, muitas outras citocinas (incluindo IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN) são liberadas, e os receptores de citocinas apropriados são modulados positivamente. Tais eventos resultam na ativação e maturação das células T auxiliares, células T supressoras, células T citotóxicas e outras células imunorregulatórias. Esse processo de ativação não só aumenta o número de células T antígeno-específicas, como também altera o imunofenótipo e modifica a expressão de certas moléculas de adesão nas células T. Exemplificando, LFA-1 (um heterodímero formado a partir de CD11a e CD18) e VLA-4 (um heterodímero de CD29 e CD49d, CD44 e CD2) sofrem regulação positiva, enquanto a L-selectina (CD62L) é regulada negativamente (MacLennan, 1999). As alterações na expressão dos marcadores de adesão permitem que as células T circulem adequadamente pelo corpo.

Célula *natural killer* (NK): medula óssea. Dados imunofenotípicos e funcionais sugerem que as células NK e as células T possuem uma relação próxima em termos de desenvolvimento. A expressão de proteínas CD3 foi detectada em células NK fetais humanas. Assim, é provável que as células NK e T tenham uma célula precursora em comum. Apesar de as células NK se desenvolverem no timo, sua diferenciação dispensa o ambiente tímico. De fato, parece ser mais provável que a medula óssea seja o principal sítio de diferenciação das células NK (Spits, 1995). As células NK fetais possuem CD3γ, δ, ε e CD28, enquanto as células NK adultas expressam CD2, CD3ξ, CD7, CD8α, CD16 e CD56. KL, IL-7 e IL-2 são críticas no desenvolvimento das células NK (Spits, 1995). As células NK proliferam na presença de IL-2, e sua atividade pode ser aumentada pela exposição ao IFN-γ. Essas células parecem ter como alvo células infectadas por vírus que são incapazes de sinalizar para as células T citotóxicas (usualmente, em decorrência da baixa expressão de moléculas de classe I do MHC). Como dispõem da porção Fc de IgG, as células NK participam da lise celular dependente de anticorpo (MacLennan, 1999).

Tecido linfoide secundário

Na fase tardia da vida fetal e na vida pós-natal, os linfócitos são produzidos nos tecidos linfoides secundários: baço, linfonodos e intestino. Os linfócitos dos órgãos linfoides secundários constituem a progênie das células-tronco que foram influenciadas pelos órgãos linfoides primários. Os órgãos linfoides secundários, assim, são compostos de uma mistura de células B e T. A linfopoiese que ocorre nos órgãos linfoides secundários depende apenas de estimulação antigênica. As células B e T tendem a se localizar em regiões anatomicamente distintas dos tecidos linfoides, onde ocorre a proliferação.

Função e fisiologia do linfócito

As células T e sua progênie atuam na imunidade mediada por células (celular), que abrange a hipersensibilidade tardia, rejeição a transplantes, reações enxerto *versus* hospedeiro, defesa contra organismos intracelulares (como o bacilo tuberculínico e a bactéria *Brucella*) e contra neoplasias. As células B e sua progênie efetuam a imunidade humoral, ou produção de anticorpos, seja como linfócito, seja após a transformação em plasmócito.

A maioria dos linfócitos circulantes são células T, cuja expectativa de vida varia de meses a anos. As células B constituem a população minoritária (10–20% dos linfócitos), provavelmente têm menor expectativa de vida medida em dias (com exceção das células B de memória) e se distinguem pela presença considerável de imunoglobulinas em sua membrana de superfície.

Os linfócitos circulam no sangue e se fixam nos órgãos linfoides adequados. Durante o desenvolvimento fetal, os linfócitos migram do fígado do feto para a medula óssea ou o timo. Mais tarde, as células pró-T migram da medula óssea para o timo, enquanto as células B imaturas se fixam nos tecidos linfoides secundários. Após o processamento no timo, as células T virgens também se estabelecem em áreas específicas nos tecidos linfoides periféricos. A circulação dos linfócitos é regulada por múltiplas moléculas de adesão de superfície celular e por quimiocinas, incluindo integrinas, selectinas e selectina de leucócitos (L). A circulação e o *homing* (fixação nos tecidos) dos linfócitos são fenômenos bastante complexos, que envolvem múltiplas etapas, já revistos por vários pesquisadores (Springer, 1994; Paraskevas, 2004a). Todavia, nas vênulas pós-capilares do tecido linfoide, os linfócitos viajam pelo sangue, atravessam o endotélio e entram no tecido linfoide, onde podem permanecer ou percolar e retornar ao sangue através da linfa no ducto torácico. Linfócitos pequenos (Fig. 30.30) possuem pouco citoplasma e, nas micrografias eletrônicas, apresentam poucas organelas e relativamente pouco RNA. Após a estimulação antigênica, os linfócitos pequenos (células B ou T, dependendo da natureza do antígeno) intensificam a produção de RNA e sofrem transformação blástica. Em esfregaços corados por Romanowsky, esses blastos são vistos como células grandes (15–25 μm), com citoplasma intensamente azul-escuro e um grande núcleo reticular com cromatina uniforme e nucléolos proeminentes. Essa célula é denominada *linfócito reticular* (linfoblasto não leucêmico; "imunoblasto"). Quando os blastos derivam de células B, os novos linfócitos atuam na produção de anticorpos (células B, plasmócitos). Por outro lado, quando os blastos derivam de células T, sua progênie atua na resposta imune celular. Esta última é mediada por diversos fatores solúveis produzidos pela célula T ativada, entre os quais a IL-2, que induz a proliferação das células T; IL-3, que é um fator estimulador de colônias multipotente; IL-4, que promove proliferação de células B; IL-5, que intensifica a proliferação de eosinófilos e de células B; IL-6, que promove diferenciação de células B; linfotoxina, que exerce efeito tóxico direto sobre as células; e fator inibidor da migração, que promove a aderência de macrófagos e os mantém no local. Linfócitos atípicos (Fig. 30.31) são vistos em certas infecções virais, como na mononucleose infecciosa. Essas células pos-

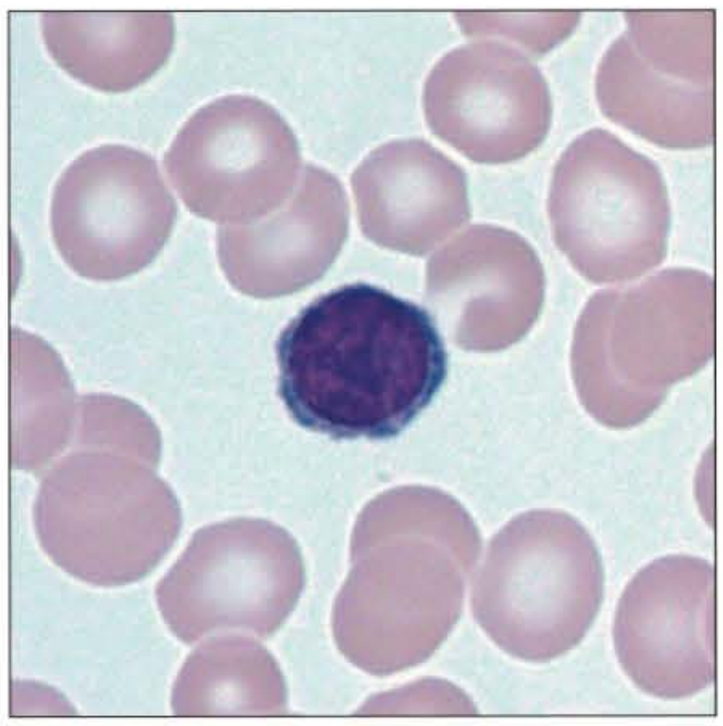


Figura 30.30 Pequeno linfócito com elevada proporção N/C, cromatina condensada e citoplasma basofílico escasso (Wright-Giemsa, × 250).

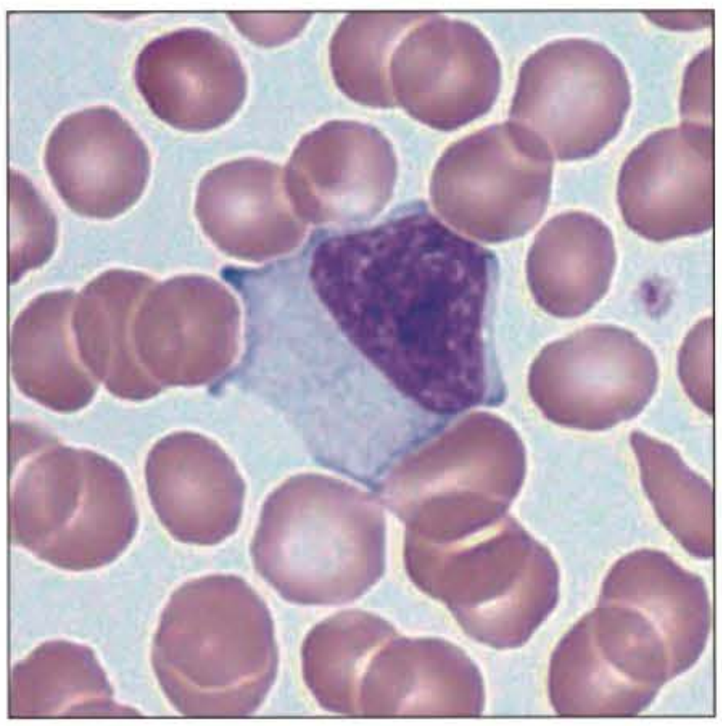


Figura 30.31 Linfócito atípico com núcleo grande, cromatina mais fina e abundante citoplasma basofílico projetando-se ao redor das hemácias adjacentes (Wright-Giemsa, × 250).

suem núcleos grandes com cromatina fina e citoplasma mais abundante, que muitas vezes emite projeções curvas ao redor de hemácias adjacentes. Linfócitos grandes granulares (Fig. 30.32) contêm grânulos azurofílicos no citoplasma. Com frequência, representam células T citotóxicas ou células NK.

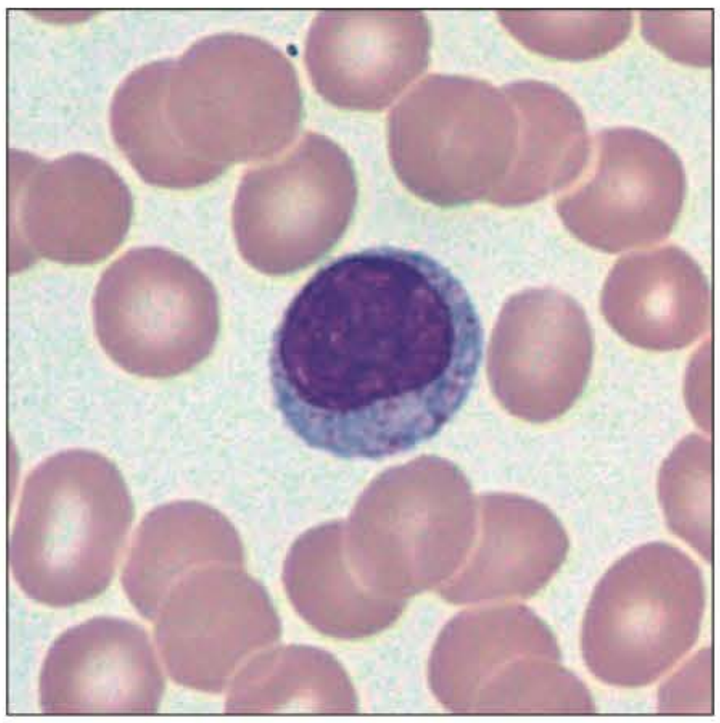


Figura 30.32 Grande linfócito granular com grânulos azurofílicos no citoplasma (Wright-Giemsa, × 250).

Plasmócitos apresentam um abundante citoplasma azul, muitas vezes contendo vacúolos ou estrias claras, um núcleo redondo excêntrico e uma zona (complexo de Golgi) clara e bem definida adjacente ao núcleo. O núcleo dos plasmócitos contém uma cromatina intensamente agregada, bem distinta da paracromatina e com frequência disposta em padrão radial ou em forma de roda (Fig. 30.33).

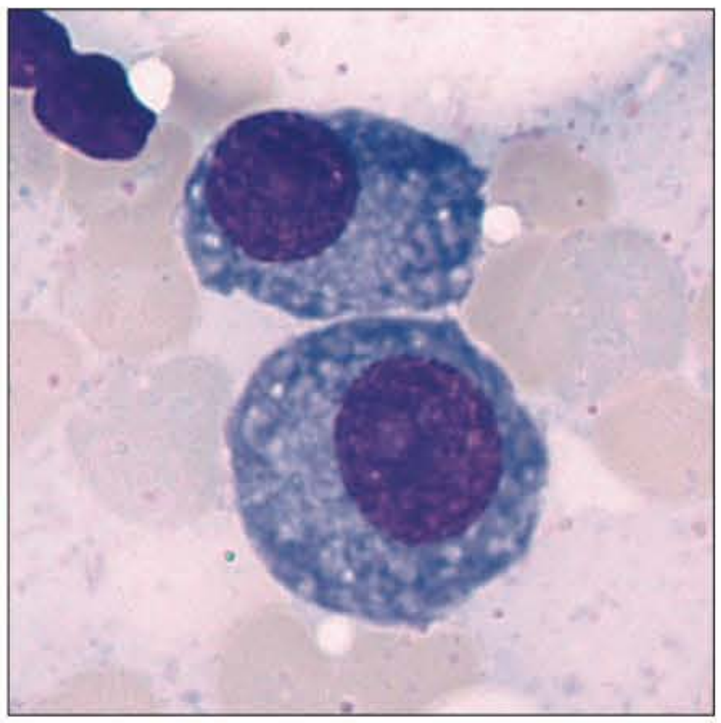


Figura 30.33 Plasmócitos com abundante citoplasma basofílico, núcleo excêntrico e uma clara zona do complexo de Golgi perinuclear (Wright-Giemsa, × 250).

Referências bibliográficas

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 2000; 404:193–197.

Bagby GC, Segal GM: Growth factors and control of hematopoiesis. *In* Hoffman R, Berry EJ, Shattil SJ, et al (eds): Hematology, Basic Principles and Practice. New York, Churchill Livingstone, 1991, p 97.

Bertoli LF, Burrows PD: Normal B-lineage cells: Their differentiation and identification. Clin Lab Med 1988; 8:15–30.

Blumberg RS, Ley S, Sancho J, et al: Structure of the T cell antigen receptor: Evidence for two CD3 epsilon subunits in the T cell receptor-CD3 complex. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:7220–7224.

Broudy VC: Stem cell factor and hematopoiesis. Blood 1997; 90:1345–1364.

Bunn HF, Forget BG: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, WB Saunders Company, 1986, p 13.

Campbell KJ, Kim CH, Butcher EC: Chemokines in the systemic organization of immunity. Immunol Rev 2003; 195:58–71.

Casadevall N, Dupuy E, Molho-Sabatier P, et al: Autoantibodies against erythropoietin in a patient with pure red-cell aplasia. N Engl J Med 1996; 334:630–633.

Chemmanur AT, Bonovsky HL: Hepatic porphyries: diagnosis and management. Clin Liver Dis 2004; 4:807–838.

Cooper MD: Current concepts. B lymphocytes: Normal development and function. N Engl J Med 1987; 317:1452–1456.

Coulombel L: Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. Oncogene 2004; 23:7210–7222.

Deacon AC, Elder GH: Best Practice No 165: front line tests for the investigation of suspected porphyria. J Clin Pathol 2001; 54:500–507.

Denning SM, Haynes BF: Differentiation of human T cells. Clin Lab Med 1988; 8:1–14.

Gleich GJ, Adolphson CR: The eosinophilic leukocyte: Structure and function. Adv Immunol 1986; 39:177–253.

Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, et al: Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. Blood 2004; 103:3924–3932.

Hagman J, Grosschedl R: Regulation of gene expression at early stages of B-cell differentiation. Curr Opin Immunol 1994; 6:222–230.

Haks MC, Krimpenfort P, Borst J, Kruisbeek AM: The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalphabeta and TCRgammadelta lineages. EMBO J 1998; 17:1871–1882.

Hartwig J, Italiano J: The birth of the platelet. J Thromb Haemost 2003; 1:1580–1586.

Hift RJ, Davidson BP, van der Hooft C, et al: Plasma fluorescence scanning and fecal porphyrin analysis for the diagnosis of variegate porphyria: precise determination of sensitivity and specificity with detection of protoporphyrinogen oxidase mutations as a reference standard. Clin Chem 2004; 50:915–923.

Hillman RS, Finch CA: Red Cell Manual, 7th ed. Philadelphia, FA Davis, 1996, p 58.

Trabalho clássico atualizado, ilustrando a morfologia das células sanguíneas vermelhas, com descrições de distúrbios de células vermelhas, bem como informações sobre fisiopatologia, diagnóstico e tratamento das anemias.

Hübel K, Engert A: Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary. Ann Hematol 2003; 82:207–213.

Italiano JE, Shivdasani A: Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. J Thomb Haemost 2003; 1:1174–1182.

Jandl JH: Blood cell formation. *In* Jandl JH (ed): Blood: Textbook of Hematology, 2nd ed. Boston, Little, Brown, 1996.

Johnston RB Jr: Current concepts: Immunology. Monocytes and macrophages. N Engl J Med 1988; 318:747–752.

Kang J, Volkmann A, Raulet DH: Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. J Exp Med 2001; 193:689–698.

Kaushansky K: Thrombopoietin: The primary regulator of platelet production. Blood 1995; 86:419–431.

Kaushansky K: Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. J Thromb Haemost 2003; 1:1587.

Revisão dos efeitos produzidos pelo regulador hormonal primário de produção de plaquetas e dos mecanismos subjacentes através dos quais essa substância atua.

Kaushansky K, Karplus PA: Hematopoietic growth factors: Understanding functional diversity in structural terms. Blood 1993; 82:3229–3240.

Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al: Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. Nature 1994; 369:568–571.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 1997; 91:661–672.

Lindstedt G, Lundberg PA: Are current methods of measurement of erythropoietin (EPO) in human plasma or serum adequate for the diagnosis of polycythaemia vera and the assessment of EPO deficiency? Scand J Clin Lab Invest 1998; 58:441–458.

Long MW: Blood cell cytoadhesion molecules. Exp Hematol 1992; 20:288–301.

Lyman SD, Jacobsen SEW: c-Kit ligand and Flt3 ligand: Stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinctive activities. Blood 1998; 91:1101–1134.

MacLennan ICM, Drayson MT: Normal lymphocytes and non-neoplastic lymphocyte disorders. *In* Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD (eds): Postgraduate Haematology, 4th ed. Oxford, Butterworth Heinemann, 1999, p 267.

Mertelsmann R: Hematopoietic cytokines: From biology and pathophysiology to clinical application. Leukemia 1993; (Suppl 2):S168–S177.

Ohishi K, Katayama N, Shiku H, et al: Notch signalling in hematopoiesis. Semin Cell Dev Biol 2003; 14:143–150.

Paraskevas F: The lymphatic system. *In* Foerster J, Lukens J, Rogers GM, et al (eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 2004a, p 409–438.

Paraskevas F: T lymphocytes and NK cells. *In* Foerster J, Lukens J, Rogers GM, et al (eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 2004b, p 475–526.

Poh-Fitzpatrick MB. A plasma porphyrin fluorescence marker for variegate porphyria. Arch Dermatol 1980; 116:543–547.

Quesenberry PJ, Colvin GA: Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. *In* Beutler E, Lichtman M, Coller B, et al (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, pp 153–176.

Quesniaux VFJ: Interleukins 9, 10, 11, and 12 and kit ligand: A brief overview. Res Immunol 1992; 143:385–400.

Roberts PJ, Linch DC, Webb DKH: Phagocytes. *In* Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD (eds): Postgraduate Haematology, 4th ed, Oxford, Butterworth Heinemann, 1999, p 235.

Root RK, Dale DC: Granulocyte colony-stimulating factor

and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. J Infect Dis 179 1999; (Suppl 2):S342–S352.

Sandberg S, Elder GH. Diagnosing acute porphyries. Clin Chem 2004; 50:803–805.

Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK: In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. Oncogene 2004; 23:7223–7232.

Schattner EJ, Casali P: The immune system: structure and function. *In* Knowles DM (ed): Neoplastic hematopathology, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 43–92.

Revisão abrangente e competente sobre o sistema imune humano.

Schett G, Firbas U, Füreder W, et al: Decreased serum erythropoietin and its relation to anti-erythropoietin antibodies in anaemia of systemic lupus erythematosus. Rheumatology 2001; 40:424–431.

Siena S, Bregni M, Brando B, et al: Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1989; 74:1905–1914.

Spits H, Lanier L, Phillips JH: Development of human T and natural killer cells. Blood 1995; 85:2654–2670.

Spivak JL: Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. Blood 2002; 100:4272–4290.

Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. Cell 1994; 76:301–314.

Teoh G, Anderson KC: Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 1997; 11:27–42.

Terstappen LW, Huang S, Safford M, et al: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38-progenitor cells. Blood 1991; 77:1218–1227.

Verfaillie CM: Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. Blood 1998; 92:2609–2612.

Weinberg JB: Mononuclear phagocytes. *In* Foerster J, Lukens J, Rogers GM, et al (eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 2004, p 349–386.

Zannettino ACW, Buhring HJ, Niutta S, et al: The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. Blood 1998; 92:2613–2628.

Zubair AC, Silberstein L, Ritz J: Adult hematopoietic stem cell plasticity. Transfusion 2002; 42:1096–1101.

CAPÍTULO 31

Distúrbios eritrocitários

M. Tarek Elghetany MD, Katalin Banki MD

Anemias 589
Comprometimento da produção – Anemia ferropriva 589
Comprometimento da produção – Anemia megaloblástica 592
Comprometimento da produção – Outras 598
Anemia por perda de sangue 603
Hemólise – Geral 603
Hemólise – Distúrbios da membrana 605
Distúrbios da hemoglobina 607
Talassemias 618
Hemólise – Distúrbios metabólicos 622
Hemólise – Adquirida; extrínseca 625
Diagnóstico laboratorial da anemia 630
Policitemia 632
Policitemia relativa 632
Policitemia absoluta 632
Determinação do volume eritrocitário e do volume plasmático 633
Referências bibliográficas 634

PONTOS-CHAVE

- A anemia pode ser resultante de um defeito de produção da medula óssea ou do encurtamento da sobrevida do eritrócito.
- A anemia hemolítica pode ser causada por fatores extrínsecos, usualmente adquiridos (p. ex., agentes químicos ou anticorpos), ou intrínsecos, usualmente herdados (p. ex., distúrbios da membrana do eritrócito, enzimas ou hemoglobinopatia).
- Distúrbios de células-tronco (p. ex., anemia aplásica herdada ou adquirida) e a hemoglobinúria paroxística noturna comumente afetam mais de uma linhagem celular.
- Doenças não relacionadas à medula óssea (p. ex., distúrbios renais, endócrinos e inflamatórios) influenciam significativamente a medula óssea.
- Para a avaliação inicial da anemia, deve-se realizar um hemograma completo, um esfregaço de sangue periférico e uma contagem de reticulócitos.

Anemias

A anemia é considerada presente quando a concentração de hemoglobina (Hb) ou o hematócrito (Ht) encontra-se abaixo do limite mínimo de 95% do intervalo de referência para a idade, sexo e locação geográfica (altitude) do indivíduo (Tab. 31.1). Isso significa que 2,5% dos indivíduos normais serão classificados como anêmicos. Por outro lado, um indivíduo cuja hemoglobina se encontra dentro dos intervalos de referência para sua idade e sexo, mas ainda significativamente abaixo de seus valores de referência, deve ser considerado anêmico.

A anemia pode ser absoluta, quando existe uma diminuição da massa de eritrócitos, ou relativa, quando ela está associada a um maior volume plasmático. As causas de anemia absoluta estão classificadas em duas categorias fisiopatológicas principais: comprometimento da produção de eritrócitos e aumento da destruição de eritrócitos ou perda excessiva da capacidade da medula óssea de repor essas perdas. Vários autores incluíram a anemia pós-hemorrágica nesta última categoria (Hillman, 1996; Erslev, 2001b). A presença de anemia pode ser um sinal de um distúrbio subjacente cuja causa deve ser identificada, haja vista que sua correção pode ser muito importante para o indivíduo. A anemia relativa pode ocorrer na gestação, macroglobulinemia e em astronautas no período pós-voo.

A anemia também pode ser classificada pela morfologia dos eritrócitos como macrocítica, normocítica ou microcítica, uma abordagem que é útil no diagnóstico diferencial (ver discussão a seguir). Tanto a classificação fisiopatológica quanto a morfológica devem ser conhecidas. Algumas anemias apresentam mais de um mecanismo patogênico e passam por mais de um estágio morfológico (p. ex., anemia por perda sanguínea).

Os sinais clínicos e sintomas são decorrentes da diminuição da liberação de oxigênio para os tecidos e, consequentemente, estão relacionados à diminuição da concentração de hemoglobina e do volume sanguíneo, e dependem da taxa dessas alterações. Fatores modificadores são os ajustes compensatórios do débito cardíaco, a frequência respiratória e a afinidade de oxigênio da hemoglobina. Quando a anemia se desenvolve lentamente em um paciente que não está gravemente doente, uma concentração de hemoglobina baixa (p. ex., 6 g/dL) pode ocorrer sem produzir qualquer desconforto ou sinais físicos enquanto o paciente permanecer em repouso.

Em geral, o paciente anêmico se queixa de fadiga fácil e dispneia ao esforço e, frequentemente, de sensação de desmaio, vertigem, palpitação e cefaleia. Os achados físicos mais comuns são a palidez, pulso fino e rápido, hipotensão arterial, febre discreta, algum edema dependente e sopros sistólicos. Além desses sinais e sintomas gerais, determinados achados clínicos são característicos do tipo específico de anemia.

Comprometimento da produção – Anemia ferropriva

Metabolismo do ferro (Fairbanks, 2001b)

O ferro é um componente essencial da hemoglobina, da mioglobina (nas células musculares) e de certas enzimas (na maioria das células do corpo). As principais "reservas" de ferro do corpo estão ilustradas na Figura 31.1. Dois terços ou mais do ferro total do corpo encontram-se nos normoblastos e eritrócitos. Cada milímetro de eritrócitos contém aproximadamente 1 mg de ferro. O estoque de ferro está presente nos macrófagos do sistema reticuloendotelial sob duas formas: ferritina e hemossiderina. A ferritina é um complexo hidrossolúvel de sal férrico e uma proteína, a apoferritina. A apoferritina possui um peso molecular de aproximadamente 450.000 Da e consiste em 24 subunidades com uma taxa variável de tipos H (pesada) e L (leve). A apoferritina forma uma concha em torno de um núcleo cristalino constituído predominantemente por oxihidróxido férrico (FeOOH). Os genes para as subunidades H e L foram localizados nos cromossomos 11 e 19, respectivamente. A hemossiderina é hidrossolúvel e consiste, principalmente, em agregados de cristais de núcleo de oxi-hidróxido férrico com uma carapaça proteica parcial ou completamente degradada. A degradação proteica usualmente ocorre nos lisossomos. A maior parte do ferro utilizado na síntese de hemoglobina é aquele recentemente liberado da Hb degradada nos macrófagos e transportado para os normoblastos pela transferrina plasmática (uma β-globulina com peso molecular de 80.000 Da, gene localizado no cromossomo 3). Cada molécula de apotransferrina liga dois átomos de ferro férrico. Subsequentemente, a transferrina liga-se a receptores da transferrina

Tabela 31.1 Valores de referência abaixo dos quais a anemia é considerada existente ao nível do mar

Idade (anos)	Hb (g/dL)
Ambos os sexos	
1–2	11
3–5	11,2
6–11	11,8
Mulheres	
12–15	11,9
16–69	12
≥ 70	11,8
Homens	
12–15	12,6
16–19	13,6
20–49	13,7
50–69	13,3
≥ 70	12,4

De Looker, 1997.

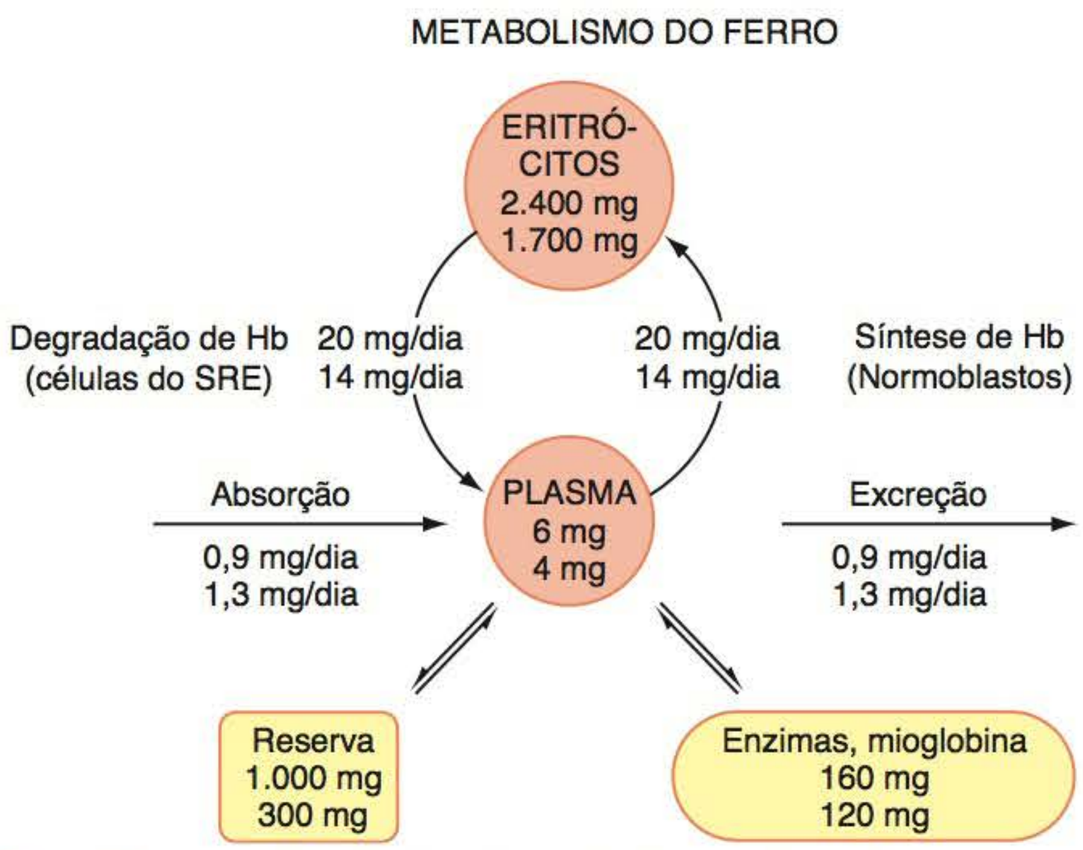


Figura 31.1 Esquema do metabolismo de ferro. O valor superior em cada posição é a média para um homem de 80 kg; o valor inferior é para uma mulher de 65 kg. (Dados de Hillman & Finch, 1974). O ferro plasmático, enormemente ligado à transferrina, é central neste esquema. Ele circula completamente várias vezes por dia fornecendo ferro para a síntese do heme. Cada dia, aproximadamente 1/120 dos eritrócitos circulantes totais é destruído e o mesmo número de novos eritrócitos é liberado para o sangue. Essa proporção do ferro total dos eritrócitos e normoblastos entra no plasma a partir do local de degradação da Hb, os macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE), e viaja (ligado à transferrina) para os normoblastos na medula óssea. Grande parte da reserva de ferro também está localizada nos macrófagos do SRE. O ferro absorvido entra no *pool* plasmático, ligado à transferrina. Grande parte do ferro excretado é oriundo da perda celular.

(CD71) na membrana celular de precursores eritroides, reticulócitos e da maioria das células do corpo. O complexo transferrina-receptor de transferrina é rapidamente internalizado, o ferro é liberado e a apotransferrina retorna para a circulação e liga mais ferro.

Muito pouco ferro é perdido do corpo e isso ocorre principalmente por meio da perda de células no trato gastrintestinal (GI) e, em uma menor extensão, da pele e na urina. O ferro excretado pelas mulheres é, em média, maior que o excretado pelos homens por causa da perda sanguínea devida à menstruação. Cerca de 1 mg é perdido diariamente, enquanto a perda de ferro durante a menstruação é de aproximadamente 2 mg/dia. O balanço de ferro é mantido pelo controle da absorção. Nos Estados Unidos, o consumo dietético é em média de 15 mg/dia com uma absorção de 7% nos homens e de 11 mg/dia com uma absorção de 13% nas mulheres. A absorção pode ser aumentada na deficiência de ferro, mas somente cerca de 20% do ferro ingerido em dietas que contêm carne e menos em dietas vegetarianas (Hillman, 1996). A absorção ocorre principalmente no intestino delgado, mais eficientemente no duodeno e na porção proximal do jejuno. O ferro do heme é absorvido mais eficientemente que o ferro inorgânico. A absorção de ferro é facilitada pelo ascorbato e o citrato e é inibida por fitatos e taninos. A produção ácida gástrica reduz o pH no duodeno e, consequentemente, aumenta a solubilidade e a captação do ferro férrico não heme. Embora o mecanismo de entrada do ferro nas células mucosas do trato gastrintestinal superior continue sendo muito desconhecido, parece existir mais de uma via, incluindo um mecanismo independente de absorção do heme. Estudos recentes sugerem a presença de um canal de transporte de ferro denominado transportador de metal divalente (DMT, *divalent metal transporter*), o qual é regulado por proteínas reguladoras do ferro. O DMT-1 regula o transporte de ferro da superfície intestinal para o interior da célula. Esse proceso é auxiliado pelo recentemente descoberto citocromo b duodenal, o qual reduz o ferro para a forma ferrosa. O transporte de ferro das células intestinais para o plasma envolve outro sistema de transporte, o qual inclui a ferroportina-1 e a hefaestina (Brissot, 2004). A ferroportina-1 está localizada na membrana basolateral de enterócitos apicais e atua como uma proteína transportadora que libera ferro para o plasma. A hefaestina, assim denominada por causa do deus grego Hefaísto, que forjou o ferro, possui uma atividade de ferroxidase que contribui para o transporte de ferro, transformando o ferro na forma férrica para permitir sua captação pela apotransferrina circulante. A ceruloplasmina também possui atividade ferroxidase e está envolvida na liberação de ferro das células. Foi demonstrado que outro peptídeo antimicrobiano com 25 aminoácidos recentemente identificado, a hepcidina, tem um papel importante na homeostasia do ferro, possivelmente por meio de um efeito hormonal. A hepcidina parece controlar a absorção GI de ferro e a liberação de ferro dos macrófagos. Foi demonstrado que a diminuição da expressão da hepcidina está associada ao aumento da absorção de ferro e à sua liberação dos macrófagos. A relação com o gene da hemocromatose (HFE) permanece obscura, embora estudos iniciais sugiram que a HFE controla a expressão da hepcidina (Brugnara, 2003; Brissot, 2004).

No plasma, a média do ferro total é de 110 µg/dL (19,7 µmol/L). A grande maioria dele está ligada à transferrina, a qual apresenta uma capacidade de ligar 330 µg de ferro por decilitro (ou 59,1 µmol/L) e, consequentemente, cerca de um terço é saturada. Uma quantidade muito pequena de ferro no plasma está na ferritina. A média de ferritina no plasma (ou soro) é de mais ou menos 100 µg/L nos homens e menor nas mulheres (aproximadamente 50 µg/L).

Anemia ferropriva

Quando a perda de ferro excede a ingestão durante um tempo suficientemente longo para depletar as reservas de ferro do organismo, a quantidade de ferro disponível é insuficiente para a produção normal de hemoglobina. Quando bem desenvolvida, a deficiência de ferro é caracterizada por uma anemia microcítica hipocrômica.

A deficiência de ferro ocorre somente quando há um aumento da necessidade de ferro (p. ex., durante o crescimento rápido na lactância e infância ou durante a gestação) ou quando uma perda excessiva de sangue reduz as reservas de ferro do organismo (p. ex., após hemorragias repetidas, menstruação excessiva ou gestações múltiplas).

A deficiência de ferro é provavelmente a causa mais comum de anemia no planeta, afetando pelo menos um terço da população mundial (Fairbanks, 20011a). Crianças com idades entre 6 e 24 meses são particularmente sensíveis. Ela é causada por uma insuficiência de ferro dietético para suprir as necessidades do crescimento rápido. Após os primeiros 4 a 6 meses de vida, as reservas de ferro presentes no nascimento se esgotam e o lactente depende do ferro dietético. Um lactente mantido com leite e carboidratos sem suplemento de alimentos que contêm ferro pode desenvolver uma anemia ferropriva, a "anemia do leite" da lactância. Em um recente estudo norte-americano, foi relatada a anemia ferropriva em 3% das crianças com 1 a 2 anos e em 2 a 5% das meninas adolescentes e mulheres em idade fértil (Looker, 1997). A absorção defeituosa de ferro e a consequente anemia ferropriva ocorrem após gastrectomia total ou mesmo após gastrectomia subtotal. O tratamento prolongado de úlceras pépticas e de refluxo ácido por bloqueadores H_2 e bloqueadores da bomba de ácido pode causar absorção defeituosa de ferro. Exceto no caso do espru, outras causas de má absorção de ferro são extremamente raras. Como a deficiência

de ferro aumenta a taxa de absorção de ferro e chumbo, a intoxicação plúmbica pode acompanhar a deficiência de ferro.

Se um homem adulto não ingerir ou não absorver absolutamente o ferrro (o que é extremamente improvável), suas reservas orgânicas de ferro de 1.000 mg durariam 3 a 4 anos antes de ele começar a apresentar deficiência. Por essa razão, quase todos os casos de anemia ferropriva em homens adultos são devidos à perda crônica de sangue.

A sequência de eventos no desenvolvimento da anemia ferropriva usualmente é a seguinte (Hillman, 1996): quando a perda sanguínea excede a absorção, ocorre um balanço negativo de ferro. O ferro é mobilizado das reservas, a reserva de ferro diminui, a ferritina plasmática diminui, a absorção de ferro aumenta e a capacidade de ligação de ferro do plasma (transferrina) também. Esse estágio é conhecido como depleção de ferro. Após o esgotamento das reservas de ferro, a concentração plasmática de ferro diminui, a saturação de transferrina cai abaixo de 15% e a porcentagem de sideroblastos diminui na medula óssea. Como resultado da falta de ferro para a síntese de heme, a protoporfirina eritrocitária aumenta. Esses segundo estágio é denominado eritropoiese por deficiência de ferro; a anemia pode ainda estar ausente. O terceiro estágio é a anemia ferropriva. Além das anormalidades acima, a anemia é detectável. Ela é inicialmente normocrômica e normocítica e, gradualmente, torna-se microcítica e, finalmente, microcítica e hipocrômica.

Características clínicas. Os achados clínicos podem ser devidos à causa subjacente da perda sanguínea em si, às manifestações gerais da anemia (ver discussão prévia) ou à deficiência de ferro. Aqueles que são provavelmente atribuíveis à falta de ferro tissular incluem a parestesia (p. ex., hipoestesia e formigamento); atrofia do epitélio lingual com sensação de queimação ou dor; fissuras ou úlceras nos cantos da boca (estomatite angular); gastrite crônica, a qual leva à diminuição das secreções gástricas, mas com poucos sintomas; "pica", que é o desejo de consumir substâncias incomuns como sujeira ou gelo; unhas côncavas ou em forma de colher (coiloníquia); e dificuldade de deglutição em razão de "membranas" de tecido ou estenoses parciais na junção entre o esôfago e a hipofaringe. Esses dois últimos achados são relativamente incomuns. A esplenomegalia pode ocorrer, mas ela é bem incomum.

Características laboratoriais

Sangue. Na anemia ferropriva inicial, a lâmina corada de sangue frequentemente revela eritrócitos normocrômicos e normocíticos (Hillman, 1996), Nos estágios finais, o quadro é de microcitose, anisocitose, poiquilocitose (incluindo células elípticas e alongadas) e graus variados de hipocromia. A membrana plasmática das células com deficiência de ferro é anormalmente rígida, e esta anormalidade contribui para o desenvolvimento da poiquilocitose, particularmente eliptócitos alongados hipocrômicos (células lápis). A anisocitose pode ser identificada por meio de contadores celulares automatizados como um aumento da distribuição da largura dos eritrócitos (RDW, red cell distribution width). Entretanto, esse achado não é específico para a anemia ferropriva (Fairbanks, 2010a). Usualmente, os reticulócitos estão diminuídos em número absoluto, exceto após a terapia com ferro. O volume corpuscular médio (VCM) está baixo e a Hb e o Ht estão relativamente mais baixos que a contagem eritrocitária. A fragilidade osmótica pode estar diminuída porque os eritrócitos são mais finos que o normal (ver Figs. 29.10 e 31.2).

A contagem leucocitária é normal ou discretamente reduzida. Pode ocorrer granulocitopenia e um pequeno número de neutrófilos hipersegmentados. Alterações megaloblásticas na deficiência de ferro grave podem estar relacionadas à diminuição da atividade da enzima ribonucleotídeo redutase, a qual contém um átomo de ferro não heme essencial (Beck, 1991). No entanto, a detecção de neutrófilos hipersegmentados deve aumentar a suspeita de uma deficiência leve de folato, a qual pode se tornar mais franca após a terapia com ferro (Dallman, 1993). As plaquetas podem estar aumentadas caso a falta de ferro seja devida à perda sanguínea ou à deficiência dietética, mas elas tendem a estar diminuídas na anemia grave.

Medula óssea. A hiperplasia normoblástica ocorre precocemente, mas nos estágios finais o efeito limitador da deficiência grave de ferro limita a eritropoiese ao nível basal. Os normoblastos são menores que o normal e apresentam uma quantidade deficiente de hemoglobina no citoplasma e uma forma irregular com margens desgastadas (Fig. 31.3). Bastonetes neutrofílicos gigantes ou metamielócitos, quando presentes, raramente são devidos à deficiência de ferro em si. Usualmente, eles indicam uma deficiência associada de cobalamina ou de folato (ver, a seguir, em "Anemia megaloblástica"). A coloração de ferro deve ser realizada rotineiramente (Figs. 31.4 e 31.5). A reserva de ferro está ausente, exceto se essa substância sob alguma forma tiver sido administrada recentemente. A proporção de normoblastos que são sideroblastos diminui (< 20%); essa proporção comumente é a mesma que o percentual de saturação de transferrina (TIBC, *total iron-biding capacity*) e é uma medida da liberação de ferro para os normoblastos.

Ferro sérico. O intervalo de referência é 50 a 160 μg/dL (9–29 μmol/L) nos adultos. O nível é mais baixo na deficiência de ferro, mas também em infecções e na anemia de doenças crônicas.

Capacidade de ligação ao ferro sérico. O intervalo de referência para os adultos é 250 a 400 μg/dL (45–72 μmol/L). Na anemia ferropriva, a TIBC sérica aumenta. Ela está normal ou diminuída na anemia de doenças crônicas. Quando uma infecção crônica coexiste com uma perda sanguínea crônica, a TIBC pode não estar aumentada, embora o paciente apresente deficiência de ferro.

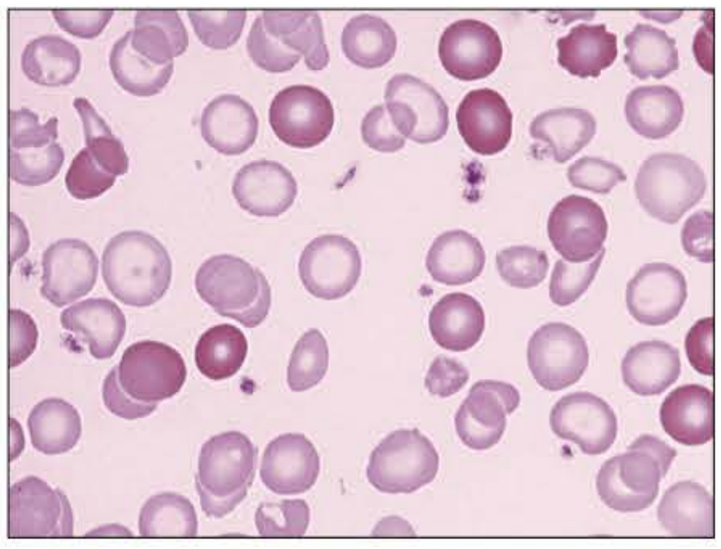


Figura 31.2 Anemia ferropriva, pós-transfusão. As células são pálidas com maior palidez central, em forte contraste com as células normocrômicas transfundidas.

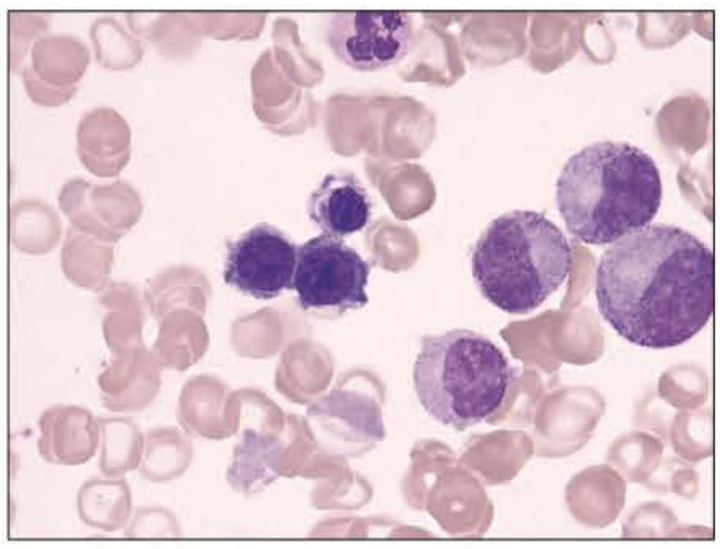


Figura 31.3 Lâmina de medula óssea, anemia ferropriva. Os três normoblastos apresentam margem irregular e espaços claros irregulares, refletindo a falta de síntese de hemoglobina (i. e., maturação citoplasmática defeituosa).

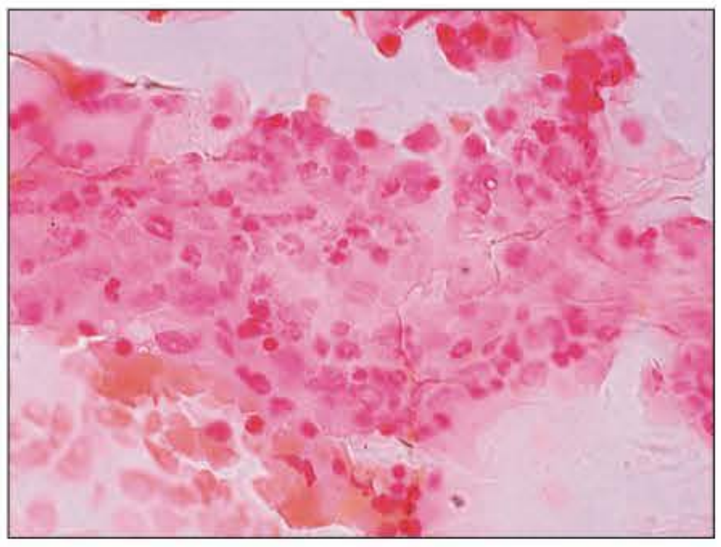


Figura 31.4 Lâmina de medula óssea, reação de azul da Prússia. Reserva de ferro depletada; não há coloração azul-esverdeada visível. Em uma escala de 0 a 5+, o ferro é normal de 1+ a 3+ para as mulheres e de 2+ a 3+ para os homens.

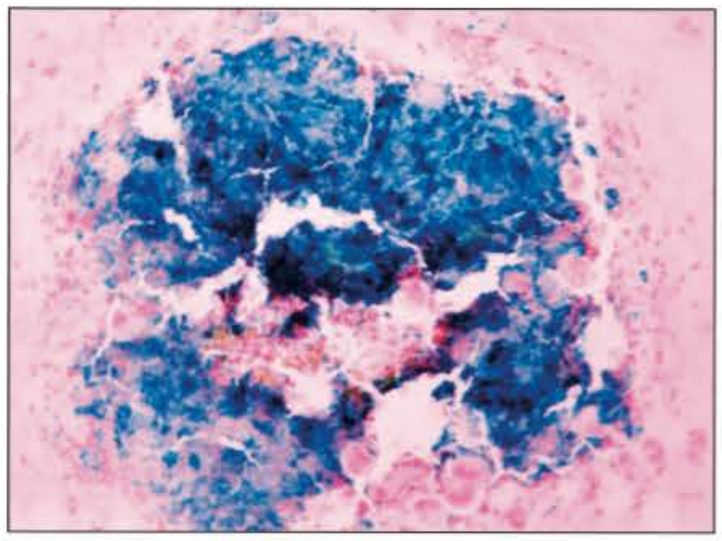


Figura 31.5 Lâmina de medula óssea, reação de azul da Prússia. Em uma escala de 0 a 5+, a quantidade de reserva de ferro é considerada 5+, a qual é acentuadamente aumentada.

Percentual de saturação da TIBC. A relação entre o ferro sérico e a TIBC é o percentual de saturação da TIBC. Normalmente, ele é de 20 a 55%. Valores inferiores a 15% indicam uma eritropoiese com deficiência de ferro.

Normalmente, ocorre uma variação diária acentuada do ferro sérico (de até 30%) com os valores mais altos pela manhã e os mais baixos no final do dia. Consequentemente, amostras de sangue coletadas pela manhã em jejum são preferidas para o diagnóstico de deficiência de ferro. A TIBC permanece relativamente constante no indivíduo normal. A gestação e o uso de contraceptivos orais aumentam a TIBC.

Comumente, o ferro sérico está mais elevado nos primeiros 90 dias de vida e, a seguir, ele diminui até um intervalo de referência um pouco mais baixo durante o segundo mês de vida, e o valor aumenta gradualmente com a idade até atingir a faixa adulta aproximadamente em torno dos 15 anos (Ritchie, 2002b; Soldin, 2004). Por outro lado, a TIBC aumenta gradualmente com a idade até atingir valores que são comparáveis aos dos adultos na idade de 15 anos (Soldin, 2004). Similarmente, o percentual de saturação nas crianças é menor que o dos adultos e atinge o valor adulto em torno dos 15 a 18 anos (Ritchie, 2002b).

Ferritina sérica. Nos adultos, os valores de referência são de 12 a 300 μg/L, com valores mais altos nos homens que nas mulheres. Parece que a ferritina sérica está em equilíbrio com a ferritina tissular e é um bom reflexo da reserva de ferro em indivíduos normais e na maioria dos distúrbios. A equivalência de 1 μg/L de ferritina sérica com 8 a 10 mg de reserva de ferro foi sugerida. Em pacientes com algumas doenças hepatocelulares, processos malignos e doenças inflamatórias, a ferritina sérica é uma estimativa desproporcionalmente alta de reserva de ferro porque ela é um reagente da fase aguda. Em tais distúrbios, a anemia ferropriva pode existir com uma concentração normal de ferritina sérica. Na presença de inflamação, indivíduos com um nível de ferritina sérica inferior a 50 a 60 μg/L provavelmente responderão à terapia com ferro (Fairbanks, 2001a). Um valor baixo (12 μg/L) indica uma baixa reserva de ferro. Não foram observados valores falsamente baixos imitando uma deficiência de ferro.

Na infância, entre 6 meses e 15 anos, o intervalo de referência para a ferritina sérica é um pouco menor do que na primeira infância ou na fase adulta (Soldin, 2004). Nos homens, os níveis séricos de ferritina aumentam gradualmente entre 18 e 30 anos, enquanto isso não acontece nas mulheres. No entanto, as mulheres na pós-menopausa têm um nível de ferritina muito maior do que aquelas na pré-menopausa, de modo comparável aos níveis observados nos homens (Van den Bosch, 2001). Os níveis séricos de ferritina não apresentam variação diurna.

Porfirinas eritrocitárias. Como o heme é formado pela inserção do ferro na protoporfirina IX, esta aumenta na eritropoiese com deficiência de ferro, seja por causa da deficiência de ferro ou da anemia de doenças crônicas. Ela também está aumentada na intoxicação por chumbo e em alguns casos de anemia sideroblástica, mas está normal na talassemia. Usualmente, o zinco liga-se à protoporfirina formando a zinco-protoporfirina (ZPP). Um micrométodo relativamente simples de mensuração da ZPP no sangue total demonstrou ser útil na diferenciação da microcitose devida a uma deficiência de ferro daquela devida à β-talassemia *minor* (Labbé, 2004). O intervalo de referência era de 10 a 99 μg/dL de eritrócitos antes do desenvolvimento da anemia e pode ser um dos primeiros indicadores de deficiência de ferro (Labbé, 2004).

Receptores séricos da transferrina. Receptores da transferrina (RTs) também existem em uma forma solúvel na circulação. Os RTs séricos (RTSs) são produzidos pela liberação de RTs da membrana durante a maturação eritrocitária. Os RTs variam com a taxa de eritropoiese. Pacientes com anemia aplásica apresentam níveis mais baixos que o normal de RTs, enquanto pacientes com anemia hemolítica autoimune apresentam valores mais altos. A anemia ferropriva está associada a um aumento do nível sérico de RTs, provavelmente por causa do aumento da síntese de RTs pela membrana e da expressão secundária à privação de ferro (Fairbanks, 2001a). Usualmente, os RTSs não aumentam na anemia das doenças crônicas, embora tenha sido observado que pacientes com artrite reumatoide apresentam aumento de RTSs na ausência de deficiência de ferro (Fairbanks, 2001a; Brugnara, 2003).

Relação transferrina sérica/ferritina sérica. A relação transferrina/ferritina foi sugerida como uma nova abordagem para se estimar as reservas totais de ferro do corpo. No entanto, a relação transferrina/ferritina continua a apresentar um valor limitado em indivíduos com inflamação ou hepatopatias (Brugnara, 2003).

Conteúdo de hemoglobina do reticulócito. Alguns analisadores hematológicos automatizados podem realizar um ensaio do conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos (CHr; em pg/célula). Estudos iniciais sugerem que esse parâmetro pode ser melhor aplicado em crianças. Entretanto, são necessários estudos adicionais para que ele possa se tornar um parâmetro de rotina para avaliação da condição do ferro (Fairbanks, 2001a; Brugnara, 2003).

Diagnóstico diferencial. A anemia devida à deficiência de ferro usualmente deve ser diferenciada de outras anemias microcíticas hipocrômicas. Elas incluem aos traços de talassemia, anemia de longa duração de doenças crônicas e anemias sideroblásticas (ver adiante análise dessas condições). A reserva de ferro da medula óssea e a ferritina sérica diminuem na deficiência de ferro e estão normais em todas as outras condições. No traço de talassemia, a ZPP está normal, o ferro sérico está normal e a condição está presente em membros da família. No traço da β-talassemia, a HbA_2 e, algumas vezes, a HbF estão aumentadas. De fato, a HbA_2 está frequentemente diminuída na deficiência de ferro. Na anemia das doenças crônicas (infecção crônica, artrite reumatoide ou neoplasia), apesar do ferro sérico estar baixo como na deficiência de ferro, a TIBC está baixa ou normal. Nas anemias sideroblásticas, as quais incluem a intoxicação crônica por chumbo, o ferro sérico e a porcentagem de saturação da TIBC estão aumentados, e sideroblastos "em anel" estão presentes na medula óssea.

Supervisão. O primeiro princípio da terapia é que a causa subjacente seja identificada e corrigida. Ferro ferroso é administrado pela via oral (aproximadamente 200 mg/dia) em três doses entre as refeições. Isso fornecerá 40 a 60 mg de ferro absorvido por dia, o qual, com o ferro produzido pelo turnover de eritrócitos senescentes, será suficiente para aumentar duas a três vezes a produção normal (Hillman, 1996). A contagem de reticulócitos atingirá um máximo em 5 a 10 dias e, a seguir, diminuirá gradualmente em direção à normal. A monitoração da hemoglobina é melhor. A Hb deve aumentar 0,1 a 0,2 g/dL/dia após o quinto dia e pelo menos 2 g/dL para cada uma das 3 semanas subsequentes. Após a hemoglobina ter retornado ao normal, a terapia com ferro deverá ser mantida por pelo menos 2 meses para repor a reserva de ferro.

Comprometimento da produção – Anemia megaloblástica

Macrocitose com medula óssea normoblástica

Anemias macrocíticas que não são megaloblásticas podem ser devidas à liberação precoce de eritrócitos da medula óssea, o chamado desvio de reticulócitos. Isso pode ocorrer em virtude de uma perda sanguínea aguda, infiltração da medula óssea e alto nível de eritropoetina associado a doenças com falência da medula óssea (p. ex., anemia aplásica, anemia refratária e anemia de Diamond-Blackfan). A macrocitose não megaloblástica também é observada no hipotireoidismo, em indivíduos que ingerem quantidades excessivas de álcool e em hepatopatias (Hillman, 1996).

Anemia megaloblástica

Sangue. Anemias macrocíticas associadas à megaloblastose diferem da anemia macrocítica não megaloblástica pela presença de macro-ovalócitos e neutrófilos hipersegmentados no sangue (Figs. 29.11, 31.6 e 29.15). A pancitopenia é a regra. A anemia é macrocítica com um VCM elevado e é caracterizada por macro-ovalócitos e, frequentemente, um grau extremo de anisocitose e poiquilocitose. Micrócitos e dacriócitos são comuns. Pode-se observar a presença de ponteado basofílico, corpúsculos de Howell-Jolly, eritrócitos nucleados com cariorrexe e mesmo megaloblastos. A leucopenia está presente. Granulócitos apresentam um maior número de lobos, presumivelmente devido à maturação nuclear anormal. Cinco lobos em mais de 5% dos neutrófilos significa hipersegmentação (Herbert, 1985), assim como neutrófilos com seis ou mais lobos. A trombocitopenia é comumente observada e, em raras ocasiões, é suficientemente grave para ser responsável por sangramento. Vale a pena notar que alterações morfológicas significativas podem ocorrer no sangue na ausência de anemia e também que sintomas neurológicos podem estar presentes na ausência de anemia.

Medula óssea. A anemia megaloblástica é caracterizada pelo aumento de todas as células do corpo que proliferam rapidamente, incluindo células da medula óssea. A principal anormalidade é a diminuição da capacidade de síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA). As células apresentam uma fase de repouso intermitótico prolongada e um bloqueio precoce da mitose. O número de figuras mitóticas aumenta. A síntese de ácido ribonucleico (RNA) é menos afetada que a de DNA. Por essa razão, a maturação e o crescimento citoplasmáticos continuam sendo responsáveis pelo aumento do tamanho das células. A cromatina delicada e a paracromatina proeminente resultam em um padrão de cromatina distintamente mais "aberto" que o observado nos precursores eritroides (Figs. 29.28 e 31.6). Os núcleos sofrem cariorrexe prontamente, e múltiplos corpúsculos de Howell-Jolly podem estar presentes. Geralmente, existem mais células análogas ao pró-normoblasto e ao normoblasto basófilo (i. e., o pró-megaloblasto e o megaloblasto basófilo) que o observado na eritropoiese normal. Isso algumas vezes tem sido denominado "parada da maturação" ou assincronia núcleocitoplasmática. Megaloblastos policromáticos gigantes são particularmente distintivos. As mesmas características gerais são observadas em outras linhagens celulares. Nas séries granulocíticas, as células são maiores, com maturação nuclear retardada e grande massa citoplasmática. Frequentemente, os grânulos específicos são distintamente maiores. O padrão da cromatina é menos condensado (mais "aberto") e, como resultado, o núcleo é mal corado. Configurações nucleares anormalmente contorcidas são comuns. Os megacariócitos também são grandes e apresentam lobos nucleares separados ou fragmentos nucleares.

A medula óssea é hiperplásica (Fig. 31.7). A gordura é substituída e a medula óssea estende-se nos ossos longos. O número de precursores eritroides (megaloblastos) aumenta e a relação mieloide/eritroide diminui. Quando o processo megaloblástico é incompletamente desenvolvido ou quando o paciente foi tratado inadequadamente, os achados podem ser apenas parciais. Pelo fato de persistirem por mais tempo, as alterações granulocíticas são particularmente úteis na avaliação da anemia megaloblástica recentemente tratada. Os achados da medula óssea são decorrentes dos efeitos da diminuição da síntese de ácido nucleico, causando megaloblastose e estresse hipóxico, dando origem ao aumento do número de células eritroides. Quando o paciente recebe transfusão de concentrado de eritrócitos, o número de precursores eritroides diminui, mas as anormalidades citológicas persistem.

Cinética eritrocitária. Nas anemias megaloblásticas, a massa de tecido eritroide aumenta, o turnover do ferro no plasma é rápido, e a taxa de urobilinogênio urinário e fecal aumenta. Essas mensurações indicam um aumento da eritropoiese total que pode atingir até três vezes o valor normal. A diminuição da taxa de aparecimento de ferro na Hb nos eritrócitos circulantes e a reticulocitopenia indicam uma eritropoiese ineficaz. Além do aumento da destruição de precursores eritroides efetivos na medula óssea, a sobrevida dos eritrócitos circulantes é curta, indicando hemólise. A bilirrubina indireta sérica aumenta, assim como o ferro sérico e a produção endógena de monóxido de carbono; a desidrogenase lática sérica geralmente está muito elevada. A muramidase sérica pode aumentar, indicando uma granulocitopoiese ineficaz.

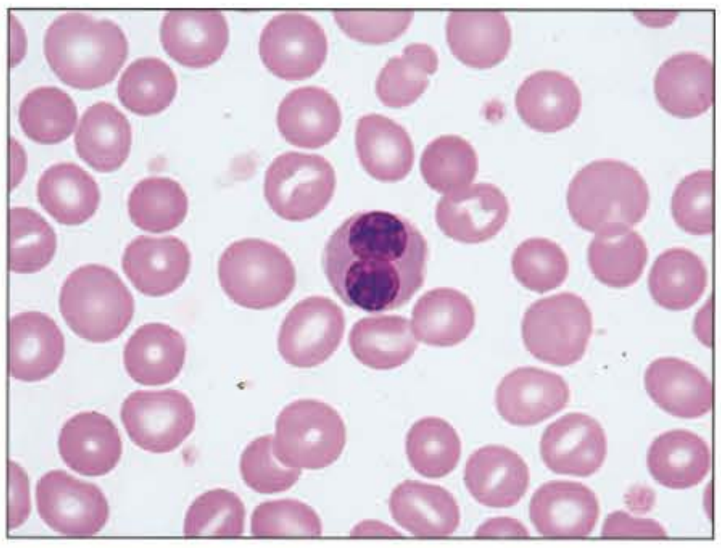


Figura 31.6 Lâmina de sangue, anemia megaloblástica. Macrocitose e um megaloblasto circulante com núcleo binucleado anormal e cromatina aberta.

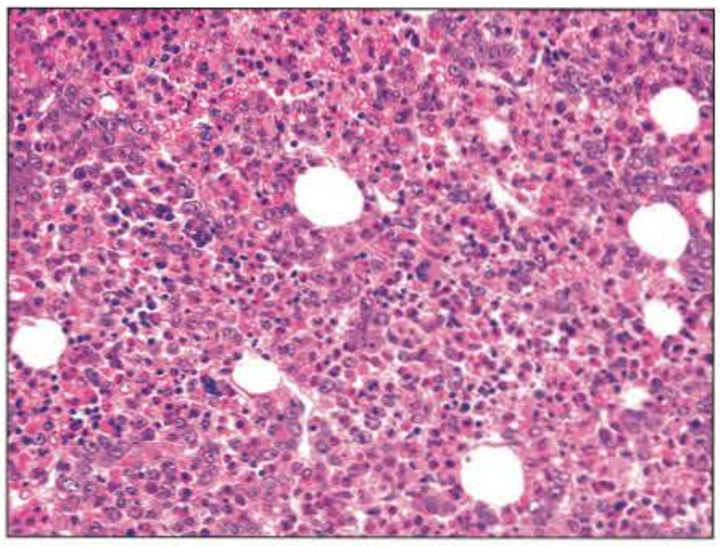


Figura 31.7 Medula óssea hipercelular na anemia megaloblástica. A celularidade é superior a 95%.

A anemia megaloblástica é quase sempre devida à deficiência de cobalamina ou de ácido fólico. Os achados descritos são similares para ambas as situações.

Metabolismo da cobalamina (vitamina B_{12})

A vitamina B_{12} (cianocobalamina) possui um peso molecular de 1.355 Da. As duas partes principais da molécula são (1) um "grupo planar" (o núcleo corrine), uma estrutura em anel que circunda um átomo de cobalto; e (2) um grupo "nucleotídeo", o qual consiste na base 5,6-dimetilbenzimidazol e uma ribose fosforilada esterificada com 1-amino, 2-propanol. Um grupo cianeto liga-se do modo coordenado com o cobalto trivalente. Resultam diferentes formas de vitamina B_{12} por causa da substituição do cianeto por grupos hidróxi, adenosil ou metil. Genericamente, elas são denominadas cobalaminas.

A cobalamina é a única vitamina exclusivamente sintetizada por microrganismos. Ela é encontrada em praticamente todos os tecidos animais. Ela é armazenada principalmente no fígado sob a forma de adenosilcobalamina. O fígado humano contém aproximadamente 1 μg/g de tecido. A cobalamina é inicialmente conectada a ligadores R (proteínas ligadoras da cobalamina com mobilidade eletroforética Rápida) presentes na saliva e nos alimentos, liberada pela digestão da tripsina e, a seguir, ligada por outros ligadores R no pH ácido do estômago. Ao entrar no duodeno, a cobalamina é liberada por enzimas pancreáticas para finalmente se ligar ao fator intrínseco (FI) gástrico, uma glicoproteína com peso molecular de 44 kDa produzida nas células parietais do estômago. O gene do FI está localizado no cromossomo 11. A seguir, esse complexo cobalamina-FI, muito resistente à digestão, adere a sítios receptores específicos nas células epiteliais do íleo. Nesses sítios, a cobalamina é absorvida. Um estudo recente indica que o receptor do complexo cobalamina-FI é uma combinação de duas proteínas: uma chamada cubilina (460 kDa) e outra denominada amnionless (45 a 50 kDa). Ambas as proteínas também estão presentes nos túbulos renais. A mutação de um dos dois genes pode produzir anemia megaloblástica com proteinúria, também conhecida como síndrome de Imerslund-Gräsbeck (Fyfe, 2004). A concentração do receptor no íleo aumenta progressivamente até atingir seu máximo próximo do íleo terminal. O complexo cobalamina-FI é levado para o

interior da célula, no qual a cobalamina é liberada e o FI é destruído. O receptor é reciclado para a superfície da célula (Babior, 2001a).

A cobalamina é transportada no plasma como metilcobalamina, ligada a um grupo de proteínas chamadas de transcobalamina II (TC II) e haptocorrinas (denominadas variadamente: TC I, TC III, ligador R, cobalofilina [ver abaixo]). Da cobalamina recém-absorvida, 90% ligam-se à TC II, a qual atua como a principal proteína transportadora, liberando rapidamente a vitamina ao fígado, às células hematopoéticas e às outras células que estão se dividindo. Parte da cobalamina liga-se às haptocorrinas, o que impede sua saída do plasma; essa cobalamina é um reservatório passivo no equilíbrio com reservas orgânicas do fígado, mas não é captada por outras células do corpo. Os valores de referência para a cobalamina plasmática dependem do método de ensaio, mas, comumente, eles são de 200 a 900 ng/L (150–670 pmol/L). Um terço dos sítios de ligação nas transcobalaminas normalmente está ocupado: 70 a 90% da cobalamina plasmática estão ligados às haptocorrinas, principalmente à TC I. Ela é muito lentamente eliminada do plasma. O restante está ligado à TC II, a qual permanece apenas cerca de 5% saturada. Grande parte da cobalamina recém-absorvida ligada à TC II é removida do plasma durante as horas iniciais, mas uma pequena fração permanece ligada por várias semanas.

A importância relativa das transcobalaminas é ilustrada pelos efeitos clínicos da deficiência congênita. A falta de TC II ocasiona anemia megaloblástica grave na lactância. No entanto, o nível sérico de cobalamina é normal. A falta de TC I não é acompanhada por anemia ou megaloblastose. No entanto, o nível sérico de cobalamina está diminuído (Babior, 2001b).

As TC I e III são proteínas do tipo R. A TC III é provavelmente uma isoproteína da TC I, a qual é insaturada de cobalamina e, consequentemente, menos carregada. Grande parte da TC III sérica é liberada dos granulócitos durante a coagulação sanguínea in vitro. Parece que a TC III não liga quantidades importantes de cobalamina plasmática em condições normais. As haptocorrinas (TC I e III) podem ser oriundas dos granulócitos, glândulas salivares e fígado, assim como de outros tecidos. A elevação de TC I e TC III é responsável pelo aumento das proteínas ligadoras de cobalamina totais em doenças mieloproliferativas. A TC II também é sintetizada por uma variedade de células, incluindo células renais, enterócitos e hepatócitos. A TC II atua como um reagente da fase aguda, e seu nível aumenta em condições inflamatórias e infecciosas (Carmel, 1999).

A necessidade diária de cobalamina está na faixa de 2 a 5 μg/dia. As reservas do corpo de 2 a 5 mg dura por vários anos se a ingestão for suspensa, como no caso de realização de uma gastrectomia total (Beck, 1991).

Deficiência de cobalamina

Embora a prevalência real da deficiência de cobalamina na população geral seja desconhecida, ela aumenta com a idade. Aproximadamente 15% dos adultos com mais de 65 anos apresentam achados laboratoriais de deficiência de vitamina B_{12}. O uso disseminado de inibidores da bomba de próton para controlar a secreção gástrica vem se tornando um fator contribuinte (Oh, 2003). A deficiência de cobalamina é produzida por qualquer dos vários mecanismos que nem sempre são excludentes entre si e envolvem a ingestão inadequada e a absorção reduzida.

Ingestão inadequada

Uma deficiência dietética é uma causa extremamente rara de anemia megaloblástica nos Estados Unidos e é observada apenas em indivíduos que se abstêm completamente de alimentos de origem animal, incluindo leite e ovos. Sabidamente, somente os vegetarianos estritos desenvolvem essa forma de deficiência de cobalamina.

Produção defeituosa de fator intrínseco

Essa é a causa mais comum de deficiência de cobalamina.

Anemia perniciosa

A anemia perniciosa é uma deficiência nutricional "condicionada" de cobalamina causada por uma falha da mucosa gástrica em secretar fator intrínseco. Essa anormalidade é geneticamente determinada, mas em geral se manifesta apenas tardiamente. Menos de 10% dos casos ocorrem antes dos 40 anos. Pesquisas modernas indicam que a anemia perniciosa é tão comum em indivíduos da raça negra quanto em indivíduos caucasianos (Carmel, 1999).

Características clínicas. O distúrbio é igualmente comum em homens e em mulheres. Os sintomas de anemia e a combinação de palidez cutânea e icterícia que confere uma aparência amarelada à pele são frequentemente presentes. A língua pode ficar dolorida, lisa e pálida (glossite atrófica) ou vermelha e edemaciada (glossite aguda). Sintomas gastrintestinais podem ser proeminentes e incluem dor abdominal episódica, constipação e diarreia. A degeneração difusa e irregular da substância branca do sistema nervoso central (SNC) envolve caracteristicamente as colunas posterior e lateral da medula espinal (degeneração combinada subaguda) e, algumas vezes, outros locais. A sensação simétrica de "picada" nas extremidades distais, hipoestesia e formigamento, perda de sensibilidade de posição (dificuldade de equilíbrio e de marcha) e perda da sensibilidade vibratória (talvez o sinal mais constante) são indicativos de neuropatia periférica e lesões da coluna posterior. O envolvimento da coluna lateral dá origem à fraqueza, espasticidade e aumento dos reflexos tendinosos profundos. Algumas vezes, o encéfalo pode ser afetado e o paciente apresenta irritabilidade, instabilidade emocional ou alteração da personalidade. Distúrbios neuropsiquiátricos podem estar associados à deficiência de cobalamina, mesmo sem manifestações hematológicas concomitantes (Lindenbaum, 1988). O mecanismo dos defeitos do SNC na deficiência de cobalamina pode estar relacionado ao metabolismo defeituoso do grupo metil (Babior, 2001b).

Achados gástricos. A gastrite atrófica em grau variado é observada na maioria dos adultos com anemia perniciosa e atrofia gástrica que envolve todas as camadas da parede restante. O FI e o ácido clorídrico (HCl) são secretados pelas células parietais gástricas no ser humano. Na anemia perniciosa do adulto, a secreção de FI está ausente e quase sempre existe aquilia e acloridria refratárias à histamina – uma diminuição do volume do suco gástrico e ausência de secreção de HCl.

Anormalidades imunológicas. Autoanticorpos foram observados na maioria dos adultos com anemia perniciosa (Babior, 2001b). Anticorpos anticélula parietal reagem com células parietais gástricas e estão presentes em mais de 90% dos pacientes. Esses anticorpos anticélula parietal também estão presentes em pacientes com gastrite crônica, como a associada à deficiência de ferro, e em alguns pacientes com tireoidite e mixedema. Eles também estão presentes em 4 a 5% de indivíduos saudáveis com a mesma idade. Quando esses anticorpos são injetados de maneira crônica em ratos, eles diminuem a secreção gástrica de HCl, FI e pepsina e produzem atrofia gástrica. O principal antígeno contra o qual esses anticorpos são produzidos é a enzima produtora de ácido H^+-K^+-ATPase, uma proteína com peso molecular de 92 kDa presente na membrana luminal das células parietais. Os anticorpos anticélula parietal provavelmente não estão diretamente ligados à patogênese da anemia perniciosa haja vista o antígeno alvo não ser facilmente acessado por esses anticorpos. No entanto, a anemia perniciosa provavelmente é causada pelas células T CD4+ que reconhecem a H^+-K^+-ATPase (Babior, 2001b).

Outro tipo de autoanticorpo é direcionado contra o fator intrínseco. Anticorpos antifator intrínseco estão presentes no soro, na saliva e no suco gástrico de aproximadamente 75% dos pacientes com anemia perniciosa. Existem dois tipos de anticorpos anti-FI: anticorpos "bloqueadores", os quais bloqueiam a ligação da cobalamina ao FI; e anticorpos "ligadores", os quais ligam o complexo cobalamina-FI e impedem que o complexo se ligue a receptores no íleo. Embora esses anticorpos possam causar algum comprometimento funcional in vivo, não está claro se eles são a causa ou um efeito da doença. Anticorpos anti-FI na ausência de anemia perniciosa ocorrem em uma pequena porcentagem de indivíduos com hipertireoidismo (doença de Graves) e, similarmente, em indivíduos com diabetes insulino-dependente.

Estudos com familiares de pacientes com anemia perniciosa demonstraram um aumento da incidência da doença em parentes e muitos destes apresentam acloridria e defeitos parciais de absorção da cobalamina. Parentes de pacientes com anemia perniciosa também apresentam maior incidência de anticorpos anticélula parietal gástrica e anticorpos antitireoide do que o normal.

É possível que a anemia perniciosa do adulto seja uma gastrite autoimune determinada geneticamente. Entretanto, a relação entre a lesão gástrica e os anticorpos permanece obscura.

Anemia perniciosa em crianças

Existem duas formas de anemia perniciosa na criança. A anemia perniciosa congênita usualmente se manifesta precocemente, no segundo ano de vida. A secreção de FI é ausente ou o FI secretado é funcionalmente defeituoso, mas a secreção ácida e a aparência da mucosa gástrica são normais. Anticorpos anticélula parietal e anti-FI estão ausentes. A anemia perniciosa juvenil ocorre em crianças maiores e é igual à do adulto, com atrofia gástrica, acloridria e anticorpo anti-FI e anticélula parietal, embora este último possa estar ausente em um subgrupo de pacientes (Rosenblatt, 1999).

Gastrectomia

A remoção cirúrgica do estômago (total ou, ocasionalmente, parcial) remove a fonte de fator intrínseco. Isso acarreta uma anemia megaloblástica após as reservas orgânicas de cobalamina serem exauridas, em 3 a 6 anos, quando a terapia com cobalamina não tiver sido instituída. Frequentemente, a anemia deve-se parcialmente à deficiência de ferro.

Defeitos na absorção de cobalamina

Síndromes de má absorção. A doença celíaca, o espru tropical, a ressecção do intestino delgado ou a doença inflamatória do intestino delgado podem estar associados a múltiplos defeitos de absorção, incluindo outras vitaminas. A deficiência de ácido fólico (absorvido principalmente na porção proximal do intestino delgado) é mais comumente observada que a deficiência de cobalamina (absorvida principalmente na porção distal do intestino delgado) em doenças que levam à má absorção. A razão disso provavelmente é o menor tempo necessário para a depleção das reservas orgânicas de ácido fólico.

A síndrome de Imerslund-Gräsbeck é um defeito autossômico recessivo herdado de absorção intestinal de cobalamina, em presença de fator intrínseco normal. Em muitos pacientes, a proteinúria tubular também é observada. Como foi mencionado anteriormente, a síndrome é causada por um defeito do receptor de cubilina/amnionless (Fyfe, 2004).

Falta de disponibilidade de cobalamina. Em certos países, a infestação pelo *Diphylobotrium latum* é comum o bastante para causar ocasionalmente a deficiência de cobalamina. O parasita compete com sucesso com o hospedeiro pela cobalamina ingerida. Mais comum na Finlândia, ele é raramente observado nos Estados Unidos.

Bactérias em uma alça cega do intestino também podem utilizar preferencialmente a cobalamina ingerida em detrimento do hospedeiro.

A deficiência de vitamina B_{12} ou de folato pode produzir indiretamente efeitos cardiovasculares. Ambas as deficiências estão associadas à hiper-homocistinemia, a qual é um fator independente da aterosclerose e da trombose vascular (Oh, 2003).

Diagnóstico da deficiência de cobalamina

O reconhecimento da anemia megaloblástica indica a probabilidade de deficiência de cobalamina ou de ácido fólico. Além disso, a evidência de envolvimento neurológico favorece a deficiência de cobalamina. Esse diagnóstico pode ser estabelecido por um dos quatro métodos a seguir.

Ensaio terapêutico. Com o paciente em uma dieta pobre em cobalamina e folato, uma dose fisiológica parenteral de cobalamina (10 μg/dia) é administrada. A resposta hematológica ideal indica deficiência e consiste em uma reticulocitose que começa no terceiro ou quarto dia e atinge o pico no sétimo dia. A eritropoiese torna-se normoblástica em 2 dias e a leucopoiese torna-se normal em 12 a 14 dias. Em uma semana, as contagens de leucócitos e plaquetas retornam ao normal e a concentração de hemoglobina começa a aumentar.

Ensaio da cobalamina sérica. Esse é o método usual de detecção da deficiência de cobalamina. Trata-se de um ensaio microbiológico da cobalamina sérica que utiliza um microrganismo (p. ex., *Euglena gracilis*) que requer cobalamina para o seu crescimento. Embora o método microbiológico seja preciso e confiável, ele exige pelo menos 48 horas de incubação e está sujeito ao efeito inibidor de antibióticos. Ensaios de diluição radioisotópica e de quimioluminescência são mais rápidos e amplamente utilizados e fornecem resultados comparáveis aos do ensaio com Euglena, contanto que a proteína ligadora seja específica para a cobalamina biologicamente ativa. Uma preparação padronizada de fator intrínseco é mais satisfatória. Entretanto, esses métodos podem produzir falsos resultados normais em aproximadamente 10% dos pacientes com deficiência de cobalamina (Zittoun, 1999).

Os valores de referência são de 200 a 900 ng/L. Na anemia megaloblástica devida à deficiência de cobalamina, o valor da cobalamina sérica é comumente inferior a 100 ng/L. Indivíduos com deficiência de folato e deficiência leve de cobalamina e gestantes apresentam valores limítrofes, entre 100 a 200 ng/L. Pacientes com infecção pelo HIV frequentemente apresentam um baixo nível sérico de cobalamina na ausência de manifestações clínicas (Ward, 2002). Falsos níveis séricos normais de cobalamina foram registrados em pacientes com deficiência de cobalamina associada ao crescimento exagerado de bactérias intestinais, o qual produz análogos da vitamina B_{12} bioquimicamente inertes (Ward, 2002). A mensuração da cobalamina ligada à TC II (holotranscobalamina II) pode fornecer informações adicionais, haja vista que seu nível cai abaixo da faixa normal muito antes do nível sérico da cobalamina total cair e representa provavelmente um estado de balanço negativo de cobalamina (Zittoun, 1999). Contudo, sua utilidade clínica é limitada (Ward, 2002).

Ensaios com ácido metilmalônico e homocisteína. Como uma coenzima cobalamina é essencial para a isomerização do metilmalonato em succinato, a excreção urinária de uma quantidade maior de metilmalonato é observada na deficiência de cobalamina. Desde que a excreção urinária do ácido metilmalônico devida ao raro erro inato do metabolismo não esteja presente, trata-se de um teste sensível para a deficiência de cobalamina, mas ele geralmente não é necessário para o diagnóstico. Além disso, os níveis plasmáticos de ácido metilmalônico e homocisteína também estão aumentados. Após várias semanas de terapia, sua concentração retorna ao normal. Os níveis plasmáticos desses metabólitos devem ser interpretados com cautela em pacientes com insuficiência renal crônica por causa da tendência desses metabólitos acumularem (Zittoun, 1999).

Teste de supressão da deoxiuridina. Esse teste mensura, *in vitro*, a capacidade das células da medula óssea utilizarem a deoxiuridina na síntese do DNA. Normalmente, em células da medula óssea, a principal fonte de timidina para o DNA é a síntese de deoxiuridina, a qual exige enzimas cobalamina e folato intactas. Consequentemente, menos de 10% da timidina marcada com trítio (^{3}H-Tdr) são incorporados no DNA. Na medula óssea megaloblástica causada por deficiência de cobalamina ou folato, a deoxiuridina não pode ser convertida em timidina e mais ^{3}H-Tdr é captado no DNA. Um teste de supressão de deoxiuridina anormal indica deficiência de cobalamina ou de folato. Esse teste é muito sensível e produz resultados anormais antes que a anemia ou a macrocitose seja observada (Zittoun, 1999). Um teste de supressão da microdeoxiuridina linfocitária (Herbert, 1985) requer apenas 1 mL de sangue, tornando essa modalidade diagnóstica disponível para lactentes e crianças.

Detecção da causa de deficiência de cobalamina

A história clínica é útil para sugerir se a deficiência de cobalamina ou de folato é a causa da anemia megaloblástica. Associações clínicas de anemia perniciosa incluem uma história familiar desta patologia em um terço dos pacientes, certas deficiências endócrinas (tireoidopatias, diabetes melito, hipotireoidismo, doença de Addison) e certos distúrbios imunes (púrpura trombocitopênica imune, anemia hemolítica autoimune e hipogamaglobulinemia adquirida). A deficiência de cobalamina é provável em vegetarianos estritos e em pacientes com parestesias, neuropatia ou submetidos previamente a uma gastrectomia.

Em pacientes com deficiência de cobalamina, é importante demonstrar a falta de FI. Para fazê-lo, a capacidade do paciente de absorver uma dose oral de cobalamina radioativa pode ser mensurada. O método usual é o teste de Schilling, o qual mensura a radioatividade em uma amostra de urina de 24 horas. Duas horas após a administração oral de 0,5 a 2,0 μg de cobalamina radioativa, uma grande dose de "eliminação" de cobalamina não marcada é administrada pela via parenteral. Indivíduos normais excretarão mais de 7% de uma dose de 1 μg de cobalamina ingerida na urina em 24 horas, enquanto pacientes com falta de FI excretarão menos. Quando a excreção for baixa, o teste deve ser repetido utilizando o mesmo procedimento com exceção de que o FI suíno é administrado pela via oral com a cobalamina marcada. Se a excreção de 24 horas for normal, o valor baixo da primeira parte é devido à deficiência de FI. Se a excreção permanece normal na segunda parte do procedimento, deve-se buscar uma explicação para a má absorção de cobalamina com base em uma doença

intestinal. A validade dos resultados depende de uma boa função renal e uma coleta acurada da urina. O teste de Schilling será anormal na anemia perniciosa mesmo após o paciente ser tratado com cobalamina e estar em remissão. Alguns pacientes podem absorver vitamina B_{12} em água (como administrada no teste de Schilling original), mas não conseguem absorver a vitamina B_{12} ligada à proteína em alimentos. Uma modificação do teste de Schilling vem sendo introduzida para incluir a vitamina B_{12} ligada à proteína utilizando gema de ovo ou soro de galinha (Zittoun, 1999).

Outro teste que estabelece o diagnóstico de anemia perniciosa é o ensaio direto de FI, que demonstra sua deficiência no suco gástrico. A combinação de anemia megaloblástica, diminuição do nível sérico de cobalamina e anticorpos séricos anti-FI é essencialmente diagnóstica, excluindo a necessidade do teste de Schilling (Lindenbaum, 1983).

Metabolismo do ácido fólico

O ácido fólico ou ácido pteroilmonoglutâmico contém três partes: pteridina, p-aminobenzoato e ácido L-glutâmico (Beck, 1991). Na natureza, o ácido fólico ocorre principalmente como poliglutamatos menos solúveis, com múltiplos resíduos de ácido glutâmico ligados entre si. O ácido fólico está presente em uma ampla variedade de alimentos como, por exemplo, ovos, leite, vegetais folhosos, leveduras, fígado e frutas, e também é formado por bactérias intestinais. Os folatos são extremamente termolábeis e o cozimento prolongado (> 15 minutos) em grandes quantidades de água na ausência de agentes redutores os destrói.

Enzimas conjugadas na bile e no intestino hidrolisam os poliglutamatos antes da absorção, a qual é rápida e ocorre no jejuno proximal, principalmente por meio de um mecanismo mediado por transportador. No plasma, um terço do folato está livre, enquanto dois terços estão ligados de maneira frouxa e inespecífica a proteínas séricas. Uma pequena quantidade de folato está especificamente ligada a proteínas ligadoras de folato. A importância fisiológica disso ainda permanece obscura (Babior, 2001a). O folato é rapidamente removido do plasma para as células e tecidos para ser utilizado. A principal forma do folato no soro, eritrócitos e fígado é o 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-FH_4). O fígado é o principal local de reserva. Existe folato intracelular principalmente sob a forma de poliglutamatos. Existe uma importante circulação enterohepática e a bile contém 2 a 10 vezes a concentração sérica normal de folato. A demanda diária mínima é de aproximadamente 50 μg de pteroilmonoglutamato ou 400 μg de folato total. O intervalo de referência típico de folato sérico é de 5 a 21 μg/L (11–48 nmol/L) e o de folato dos eritrócitos é de 150 a 600 μg/L (340–1.360 nmol/L) de eritrócitos.

A relação folato-cobalamina

A anemia por deficiência de cobalamina é parcialmente corrigida pelo folato, mesmo na ausência de suplementação de cobalamina. O contrário não é verdadeiro. Por essa razão, algumas das manifestações megaloblásticas da deficiência de cobalamina são na realidade causadas por anormalidades no metabolismo do folato (Babior, 2001b). A teoria mais aceita para essa interrelação é a teoria da armadilha do metilfolato. Essa teoria baseia-se na observação de que a forma metil do tetrahidrofolato (FH_4) escaparia das células, exceto quando ela é conjugada para formar poligutamatos. O metil FH_4 é um substrato ruim para a enzima conjugadora. A cobalamina é essencial para o processo de conversão do metil FH_4 em FH_4. O acúmulo de metil FH_4 é seguido por um escape das células (Babior, 2001a).

Deficiência de ácido fólico (Babior, 2001b)

Ingestão inadequada de folato

Evolução das anormalidades laboratoriais. Herbert delineou a sequência de eventos no início da anemia megaloblástica por deficiência de folato. Após uma dieta pobre em folato ser iniciada, as várias anormalidades foram estabelecidas da seguinte maneira: 3 semanas, baixo nível sérico de folato; 5 semanas, neutrófilos hipersegmentados na medula óssea; 7 semanas, neutrófilos hipersegmentados no sangue periférico, com a medula óssea apresentando um aumento e anormalidade das mitoses e megaloblastos intermediários basófilos; 10 semanas, a medula óssea apresenta metamielócitos grandes e megaloblastos intermediários policromatófilos; 13 semanas, alta excreção de ácido forminoglutâmico (FIGLU) na urina; 17 semanas, baixo nível de folato eritrocitário; 18 semanas, macro-ovalocitose de eritrócitos com muitos metamielócitos grandes na medula óssea; 19 semanas, medula óssea francamente megaloblástica; 20 semanas, anemia (Herbert, 1985).

Nesse momento, ainda não existem alterações no epitélio intestinal. Por isso, nos humanos que não ingerem ácido fólico dietético, a anemia aparecerá em 3 a 5 meses. As características do sangue periférico e da medula óssea da anemia megaloblástica devida à deficiência de ácido fólico são similares às da anemia por deficiência de cobalamina. Entretanto, a leucopenia e a trombocitopenia são menos constantes. A deficiência de ácido fólico usualmente é observada associada a algum fator complicador.

Deficiência nutricional de folato. A anemia megaloblástica devida à falta de folato está mais comumente associada à ingestão dietética insuficiente. A dieta usual não contém uma quantidade muito superior à da demanda mínima e as reservas do organismo no adulto são suficientes para suprir as necessidades por apenas cerca de 3 meses. A deficiência de folato dietético é especialmente comum nos trópicos e na Índia e, mesmo nessas localidades, ela está em geral associada ao aumento da demanda de folato na gestação, ao crescimento rápido na lactância, a infecções ou à anemia hemolítica. Nos Estados Unidos, idosos ou dietas inadequadas podem desenvolver anemia megaloblástica por deficiência de folato.

A deficiência de folato na lactância é incomum nos Estados Unidos. O leite humano e o leite fresco de vaca contêm folato suficiente, mas o leite fervido, o leite em pó e o leite de cabra não. Se o leite consumido pelo lactente não tiver folato, se a dieta for pobre em ácido ascórbico ou se o lactente apresentar um problema de infecção ou diarreia, a anemia megaloblástica pode ocorrer.

A anemia megaloblástica na gestação não é incomum em razão da demanda fetal de folato. O nível plasmático de folato da mãe diminui gradualmente durante a gestação e, ao nascimento, o nível plasmático do recém-nascido é em média cinco vezes o da mãe. A anemia megaloblástica é mais frequente nas multíparas, podendo ser precipitada por infecções e, geralmente, ela é devida mais à deficiência de folato que de cobalamina. As gestantes devem receber, além de ferro, uma suplementação de ácido fólico. Estudos recentes indicam que a suplementação de folato para gestantes reduz o risco de elas darem à luz bebês com defeitos do tubo neural.

Hepatopatia. A doença hepática associada ao alcoolismo pode levar à anemia megaloblástica por deficiência de folato por causa da dieta altamente inadequada do alcoolista e porque o fígado é o principal local de armazenamento e metabolismo do folato (Zittoun, 1999). Entretanto, com uma ingestão adequada de ácido fólico dietético, a anemia observada na doença hepática é macrocítica e normoblástica, não megaloblástica.

Absorção defeituosa de folato

A absorção defeituosa de ácido fólico ocorre em associação com síndromes de má absorção analisadas previamente e na síndrome da alça cega, na qual as bactérias utilizam o folato preferencialmente.

O espru não tropical, ou a doença celíaca do adulto, é uma causa importante de má absorção em adultos ou crianças que está relacionada ao glúten dietético (proteína do trigo). A anemia megaloblástica devida à deficiência de ácido fólico pode estar incluída entre os sinais de má absorção (Beck, 1991). A biópsia jejunal revela atrofia vilosa. A deficiência de folato, assim como a má absorção, responde à dieta sem glúten. A terapia com ácido fólico (parenteral) corrige a deficiência de folato, mas não a má absorção geral.

O espru tropical é um distúrbio de má absorção muito mal conhecido e comum no Caribe, na Índia e no Sudeste Asiático. Evidências de má absorção incluem a anemia megaloblástica devida à deficiência de folato. O tratamento com ácido fólico provê uma melhoria considerável da má absorção geral e também da anemia. O tratamento antimicrobiano é recomendado.

A anemia megaloblástica ou a diminuição do folato sérico ou eritrocitário sem anemia tem sido associada ao uso prolongado de fármacos anticonvulsivantes (fenitoína, fenobarbital e primidona). O problema parece ser a má-absorção do pteroilpoliglutamato induzida por medicamento. Contraceptivos orais causam má absorção de folato em uma pequena proporção de mulheres por causa da diminuição da desconjugação do pteroilpoliglutamato (Beck, 1991).

Aumento da demanda de folato

O aumento da necessidade durante a gestação e dos lactentes (nascimento múltiplo) foi mencionada. O aumento do turnover celular que ocorre em neoplasias e na hematopoese acentuadamente estimulada das anemias hemolíticas pode acarretar uma hematopoese megaloblástica. A base disso é o aumento da necessidade de um suprimento adicional de folato.

Utilização inadequada de folato

A utilização inadequada de ácido fólico é relativamente rara. Antagonistas do ácido fólico como o metotrexato bloqueiam o metabolismo do ácido fólico e, por essa razão, eles são utilizados na terapia de algumas neoplasias malignas. Além de inibir o crescimento do tumor, eles também induzem a hematopoese megaloblástica.

Além do problema nutricional do alcoolista anteriormente mencionado, o álcool pode exercer um efeito direto suprimindo a hematopoese ao bloquear o metabolismo do folato. Além disso, o álcool pode interferir na absorção e na circulação enterohepática do folato. A homocisteína plasmática usualmente está elevada nos alcoolistas (Zittoun, 1999).

Diagnóstico da deficiência de folato

Há suspeita de deficiência de ácido fólico ou de cobalamina quando o sangue e a medula óssea apresentam alterações características de anemia megaloblástica. Usualmente, os níveis séricos de folato e cobalamina são então determinados.

Folato sérico e eritrocitário. Um ensaio microbiológico para a atividade do ácido fólico que utiliza Lactobacillus casei é um método confiável para o diagnóstico definitivo (Beck, 1991). Métodos radioisotópicos e quimioluminescentes que utilizam diferentes ligadores de folato são amplamente aplicados por causa de sua rapidez e da maior conveniência. Embora a correlação com o ensaio microbiológico geralmente seja boa, as discrepâncias parecem ser frequentes e, com base em outros dados, tendem a ser favoráveis ao ensaio microbiológico. Falsos níveis normais de folato eritrocitários foram relatados em 16 a 40% dos pacientes identificados por ensaios microbiológicos (Zittoun, 1999). Ao contrário do folato sérico (o qual é inteiramente 5-metiltetra-hidrofolato), o folato eritrocitário é uma mistura heterogênea de diferentes formas com comprimentos variados de cadeia poliglutamato, o que representa um desafio para os ensaios não microbiológicos.

O nível sérico de folato diminui (< 3 μg/L) na anemia megaloblástica por deficiência de folato, mas ele geralmente é normal ou elevado na deficiência de cobalamina. Um baixo nível sérico de folato precede a diminuição do folato eritrocitário ou tissular. Na deficiência de cobalamina, o folato sérico está diminuído em 10% dos casos, aumentado em 20% e normal para o restante (Tietz, 1990).

O folato eritrocitário é um teste melhor das reservas orgânicas de folato e está diminuído na anemia megaloblástica devida à deficiência de folato. No entanto, na deficiência de cobalamina, o folato eritrocitário está baixo em quase dois terços dos casos. Por essa razão, ela deve ser descartada antes de se considerar um baixo nível de folato eritrocitário como uma prova de deficiência grave de folato. Consequentemente, essas mensurações são frequentemente úteis na diferenciação entre a deficiência de ácido fólico e a de cobalamina (Tab. 31.2).

Ácido formiminoglutâmico urinário. As coenzimas do ácido fólico são necessárias para a conversão de FIGLU em ácido glutâmico no catabolismo da histidina. Quando a histidina oral é administrada, o FIGLU aparece em maior quantidade na urina quando existe deficiência de folato. O teste é útil em pacientes com anemia megaloblástica devida a fármacos antifolato; esses pacientes apresentam nível sérico de folato normal, mas uma diminuição grande do nível tissular da coenzima (Beck, 1991).

Ensaio terapêutico. O ensaio terapêutico permanece sendo um modo excelente de se diferenciar a deficiência de ácido fólico da de vitamina B_{12}. Doses fisiológicas de ácido fólico (50–200 μg/dia, via parenteral) permitem uma resposta reticulocitária adequada em pacientes com deficiência de ácido fólico, mas não na deficiência de cobalamina. Por outro lado, as doses terapêuticas usuais de ácido fólico (5 a 15 mg/dia) ou doses mais elevadas de cobalamina (500–1.000 μg) podem induzir uma resposta parcial em um paciente com anemia megaloblástica devida a outra deficiência.

Tabela 31.2 Correlação entre os níveis de vitamina B_{12} e folato com a condição clínica: três exames laboratoriais necessários para diferenciar quatro situações clínicas específicas

Situação clínica	Nível sérico de vitamina B_{12} (pg/mL)	Nível sérico de folato (ng/mL)	Nível de folato eritrocitário (ng/mL)
Normal*	Normal (200–900)	Normal (5–16), indeterminado (3–5), ou baixo (< 3)	Normal (> 150)
Deficiência de vitamina B_{12}	Baixo (< 100)	Normal (5–16) ou alto (> 16)	Baixo (< 150)
Deficiência de ácido fólico	Normal	Baixo	Baixo
Deficiência de ambos	Baixo	Baixo	Baixo

* Normal inclui estados transitórios de balanço negativo de folato.

Teste de supressão da deoxiuridina. Ver discussão precedente.

Ensaio da homocisteína plasmática. Como na deficiência de cobalamina, a homocisteína plasmática total está aumentada em aproximadamente 75% dos pacientes com deficiência de folato. O nível de ácido metilmalônico permanece normal (Zittoun, 1999).

Anemia megaloblástica aguda

A anemia megaloblástica aguda pode se desenvolver ao longo de apenas alguns dias. A causa mais comum foi relacionada à anestesia com óxido nitroso (N_2O). O N_2O destrói rapidamente a metilcobalamina provocando uma anemia megaloblástica rapidamente progressiva. A deficiência aguda de folato pode ocorrer em alguns pacientes internados em unidade de terapia intensiva por causa de uma combinação de fatores (diminuição da ingestão, nutrição parenteral total, diálise, cirurgia, sépsis, medicamentos). O folato sérico pode estar normal (Babior, 2001b).

Terapia para a anemia megaloblástica

Embora possa ser necessário tratar pacientes com anemia grave com ambas as vitaminas, geralmente é possível determinar qual deficiência é a causa e tratar somente com a vitamina deficiente.

A resposta reticulocitária máxima ocorre em 7 dias. Em 4 a 6 horas após a terapia inicial (quando pela via parenteral), a medula óssea apresenta diminuição de megaloblastos iniciais e o surgimento de pró-normoblastos. Em 2 a 4 dias, a medula óssea é predominantemente normoblástica. Anormalidades granulocíticas retornam ao normal mais lentamente e neutrófilos hipersegmentados desaparecem do sangue somente após 12 a 14 dias.

A anemia perniciosa é tratada pela via parenteral com 1.000 mg de cianocobalamina ao dia durante 2 semanas e, a seguir, semanalmente até o hematócrito retornar ao normal e, finalmente, mensalmente durante o resto da vida (Babior, 2001b). Altas concentrações de cobalamina oral (1.000 mg/dia) forçam a absorção de alguma cobalamina através de um sistema alternativo. Alguns relatos recomendam o uso da terapia oral de cobalamina em vez de injeções (Oh, 2003).

Na deficiência de folato, a terapia oral geralmente é utilizada em uma dosagem de 1 a 2 mg/dia. A deficiência de cobalamina deve ser excluída e corrigida quando presente para se evitar a ocorrência de neuropatias da deficiência de cobalamina. Foi relatado que a suplementação de ácido fólico dietético durante a gestação reduz a incidência de defeitos do tubo neural na criança.

Outros defeitos da síntese de nucleoproteínas

Outros defeitos da síntese de nucleoproteínas podem causar anemias megaloblásticas que não respondem à cobalamina ou ao ácido fólico.

Defeitos congênitos. A acidúria orótica é uma condição autossômica recessiva muito rara na qual certas enzimas necessárias para a síntese de pirimidina estão ausentes. Os achados são a excessiva excreção urinária de ácido orótico, falha do crescimento e desenvolvimento nor-

mais e anemia megaloblástica, a qual é refratária à cobalamina e ao folato, mas que responde à uridina.

Também foram descritos defeitos inatos de enzimas envolvidas no metabolismo do folato, incluindo as deficiências de metiltetra-hidrofolato redutase e a glutamato formiminotransferase.

Inibidores sintéticos. Inibidores sintéticos da síntese de purinas (6-mercaptopurina, tioguanina, azatioprina) ou da síntese de pirimidina (5-fluorouracil) ou da síntese de desoxirribonucleotídeo (citosina arabinosídeo ou hidroxicarbamida [hidroxiureia]) são utilizados na quimioterapia de neoplasias e podem produzir megaloblastose concomitantemente.

Anemias refratárias. Anemias megaloblásticas que não respondem à cobalamina ou ao ácido fólico serão consideradas nas síndromes mielodisplásicas (ver Cap. 32). As alterações megaloblásticas comumente são atípicas e não incluem as alterações granulocíticas características, mas outras alterações displásicas estão presentes.

Comprometimento da produção – Outras

Anemia de doenças crônicas (Means, 2003)

O termo anemia de doença crônica indica uma síndrome anêmica tipicamente observada em pacientes com infecções, distúrbios inflamatórios ou neoplásicos crônicos, a qual é caracterizada por uma redução da resposta reticulocitária acompanhada por um nível sérico baixo de ferro apesar das reservas de ferro serem normais. A anemia da doença crônica ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes hospitalizados, como foi observado por estudos laboratoriais. Além disso, a anemia da doença crônica foi observada em pacientes vítimas de trauma agudo ou com quadros críticos.

Os eritrócitos geralmente são normocíticos e normocrômicos, embora em 20 a 50% dos pacientes seja microcítica e hipocrômica. A anisocitose e a poiquilocitose são discretas. A contagem de reticulócitos comumente não é elevada. Os leucócitos e as plaquetas não são distintamente alterados, exceto pela doença causal.

A medula celular é normocelular ou discretamente hipo ou hipercelular e a distribuição celular não é grandemente alterada. Os normoblastos podem apresentar citoplasma hipocrômico e irregular, e o surgimento da hemoglobina nas células pode ser retardado (como na anemia ferropriva). Os sideroblastos diminuem, mas a reserva de ferro é normal ou aumentada.

Caracteristicamente, a concentração sérica de ferro diminui, a TIBC diminui ou permanece normal (em contraste com a anemia ferropriva, na qual ela está aumentada) e a porcentagem de saturação diminui. A protoporfirina eritrocitária e a ferritina sérica estão elevadas.

O mecanismo patogênico mais importante da anemia da doença crônica é a presença de níveis elevados de citocinas, o que pode acarretar diminuição da sobrevida dos eritrócitos, alteração do metabolismo do ferro, inibição direta da hematopoese e diminuição da secreção de eritropoetina. O fator de necrose tumoral a (TNF-α, *tumor necrosis factor*-α) tem um papel importante na inflamação e na resposta imune. O nível de TNF-α aumenta em pacientes com câncer, artrite reumatoide, infecções e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A inibição in vitro da formação de colônia eritroide humana (BFU-E e CFU-E) pelo TNF-α foi relatada. Similarmente, uma ação inibidora da interleucina-1 (IL-1) e do interferon-γ (IFN-γ) sobre a eritropoiese foi sugerida. A ceramida, um produto da hidrólise enzimática da esfingomielina da membrana celular induzida por citocina, tem um papel como mensageiro dos efeitos inibidores do IFN-γ (Means, 2003).

O nível de eritropoetina (EPO), embora acima do normal, é desproporcional ao grau de anemia, indicando uma deficiência relativa de EPO na anemia da doença crônica. Efeitos inibidores das citocinas sobre os locais de síntese de EPO (p. ex., células renais e hepáticas) foram sugeridos. A deficiência relativa de EPO induz a neocitólise, isto é, hemólise seletiva dos eritrócitos mais jovens. Portanto, uma hemólise leve usualmente acompanha a anemia da doença crônica (Trial, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que a hepcidina aumenta na anemia da doença crônica pela indução da IL-6. Essa elevação pode representar um mecanismo fundamental para o aumento da reserva de ferro e sua liberação defeituosa das reservas na anemia da doença crônica (Brugnara, 2003).

Usualmente, a anemia não responde à terapia com ferro. Entrentanto, pacientes tratados com EPO demonstraram melhora do quadro.

Anemia da insuficiência renal

Uma anemia normocítica normocrômica é comumente observada em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC). A correlação entre a gravidade da anemia e o grau de elevação do nitrogênio da ureia sanguínea (BUN, *blood, urea nitrogen*) é positiva, mas não estritamente linear. Quando a depuração de creatinina cai abaixo de 20 mL/min, o hematócrito geralmente se encontra abaixo de 0,30 (Caro, 2001).

Vários fatores estão comumente envolvidos na anemia da insuficiência renal crônica. A diminuição da produção de EPO pelo rim lesado é provavelmente o fator importante na maioria dos casos em que a BUM é superior a 100 mg/dL. Tanto a eritropoiese ineficaz quanto a diminuição da capacidade da medula óssea de responder à EPO parecem estar presentes em certo grau.

Inibidores da eritropoiese foram demonstrados no plasma de pacientes com insuficiência renal crônica. A natureza desses fatores inibidores não é conhecida. No entanto, o paratormônio e a espermina foram implicados como inibidores da eritropoiese. Estudos recentes indicam a presença de um alto nível de citocinas inflamatórias (p. ex., IL-1, IL-4, IL-6 e TNF-a) em pacientes com IRC. Como discutido em Anemia de Doenças Crônicas, essas citocinas exercem um efeito supressor sobre a medula óssea e provavelmente contribuem para o desenvolvimento da anemia (Stenvinkel, 2003).

A hemólise é uma característica importante em muitos casos de insuficiência renal crônica. Parece existir um fator extracorpuscular no plasma urêmico que exerce um efeito deletério sobre o metabolismo dos eritrócitos e que acarreta a presença de células deformadas morfologicamente (equinócitos e eritrócitos espiculados). Numerosas células irregularmente contraídas e fragmentadas são observadas na síndrome hemolítico-urêmica e na hipertensão maligna em consequência da lesão traumática sofrida pelos eritrócitos ao atravessarem os pequenos vasos sanguíneos lesados. Alterações da adenosina trifosfatase (ATPase) e da transketolase da membrana eritrocitária podem tornar os eritrócitos mais sensíveis a fármacos ou a substâncias químicas oxidantes.

Além disso, o sangramento é um problema comum na doença renal crônica, provavelmente devido à trombocitopenia (em alguns pacientes) ou a defeitos funcionais das plaquetas, os quais estão presentes na maioria dos pacientes. A anemia ferropriva devida à perda sanguínea sempre deve ser suspeitada. A deficiência de ácido fólico pode ser um problema em pacientes submetidos à diálise, uma vez que o ácido fólico é prontamente movido para o banho de diálise.

Anemia na hepatopatia

A anemia pós-hemorrágica crônica; a anemia hipoplásica secundária à supressão da medula óssea induzida por vírus; a anemia megaloblástica devida à deficiência de folato decorrente da má nutrição na cirrose alcoólica; e as anemias hemolíticas adquiridas associadas a eritrócitos Coombs-positivo, esplenomegalia congestiva ou distúrbios lipídicos podem ocorrer na hepatopatia (Gallagher, 2001). A anemia ferropriva é a mais comum, ocorrendo em aproximadamente 50% dos pacientes, sendo seguida pelo hiperesplenismo em cerca de 25% dos pacientes (Ozatli, 2000). O interferon-α (INF-α) e a ribavarina (Rbv) são terapias comuns para a hepatite C. A Rbv induz a supressão da eritropoiese, possivelmente por meio da infrarregulação dos receptores de eritropoetina. Além disso, a Rbv pode causar uma anemia hemolítica dose-dependente. O INF-α pode produzir anemia por meio da supressão da proliferação de células progenitores hematopoéticas e da indução da apoptose de células progenitoras eritroides (Dieterich, 2003).

Além disso, existe uma anemia associada à hepatopatia que é caracterizada pela diminuição da sobrevida dos eritrócitos e uma produção relativamente inadequada de eritrócitos. Ela é exagerada por um aumento do volume celular que parece estar correlacionado ao grau de hipertensão porta. Os eritrócitos são normocíticos ou macrocíticos (macrócitos finos). Frequentemente, células-alvo estão presentes, especialmente na icterícia obstrutiva. Elas possuem um aumento da superfície da membrana com aumento do conteúdo de colesterol e lecitina. Os reticulócitos podem estar discretamente elevados e as plaquetas podem estar normais ou diminuídas. A medula óssea pode

apresentar uma leve hipercelularidade e a eritropoiese é macronormoblástica e não megaloblástica. Alterações nos leucócitos, como as presentes nas anemias megaloblásticas, não são observadas, e esse tipo de anemia não responde à cobalamina (vitamina B_{12}) ou ao ácido fólico. A anemia é de origem desconhecida.

Uma pequena proporção de pacientes com cirrose grave apresenta uma anemia hemolítica associada a "spur cells", as quais são eritrócitos com projeções espiculadas similares a acantócitos. Como nas células-alvo, as *spur cells* são secundárias a anormalidades lipídicas no plasma. Elas apresentam aumento da superfície da membrana com aumento do colesterol, porém com conteúdo normal de fosfolipídeos na membrana. O colesterol na membrana tende a se associar com o folheto externo da membrana tornando-a mais rígida. O baço tenta remodelar a membrana produzindo as projeções características (Gallagher, 2001).

Anemia na endocrinopatia

A anemia não complicada no hipotireoidismo é leve a moderada. Ela é normocítica e normocrômica sem reticulocitose e com sobrevida normal dos eritrócitos. Ela reflete uma diminuição da produção da medula óssea por causa de uma menor demanda de oxigênio tissular e subsequente redução da secreção de eritropoetina. Como o volume plasmático está diminuído no hipotireoidismo, o grau aparente de anemia pode não ser proporcional à diminuição da massa eritrocitária. Evidentemente, o hipotireoidismo pode ser complicado pela anemia ferropriva, particularmente em mulheres, por conta da menorragia. A macrocitose é frequentemente observada. Embora a incidência de anemia perniciosa em pacientes com hipotireoidismo possa estar aumentada, a maioria dos casos de macrocitose é devida à deficiência de folato (Erslev, 2001a).

Na deficiência de hormônio adrenocortical, ocorre uma anemia normocítica normocrômica. A etiologia não está clara, mas a anemia é corrigida com a reposição hormonal.

A secreção deficiente de testosterona nos homens acarreta uma diminuição da produção de eritrócitos de 1 a 2 g Hg/dL (até um valor comparável ao das mulheres). Isso parece ser devido ao efeito dos androgênios sobre a secreção de EPO e também por meio da ação da EPO sobre a medula óssea.

A deficiência hipofisária também causa anemia. Ela tende a acarretar uma maior diminuição da concentração de hemoglobina por causa do efeito de múltiplas glândulas endócrinas e, possivelmente, pela perda do efeito do hormônio do crescimento.

Um pequeno número de pacientes com hiperparatireoidismo apresenta uma anemia normocítica normocrômica. Estudos iniciais sugeriram que o paratormônio pode suprimir a eritropoiese normal. Estudos mais recentes não conseguiram apoiar essa teoria. A anemia do hiperparatireoidismo está possivelmente relacionada com a fibrose da medula óssea ou com a diminuição da secreção de eritropoetina secundária à calcificação renal (Erslev, 2001a).

Anemia associada à infiltração da medula óssea (anemia mielotísica)

Essa anemia está associada à substituição da medula óssea por (ou envolvimento com) carcinoma metastático, mieloma múltiplo, leucemia, linfoma, lipidoses ou doença de depósito e algumas outras condições.

Uma anemia normocítica normocrômica (ocasionalmente macrocítica) de gravidade variável está presente. Geralmente, os reticulócitos estão aumentados e o número de normoblastos está fora de proporção à gravidade da anemia. A contagem de leucócitos está normal ou reduzida (ocasionalmente elevada) e neutrófilos imaturos e até mesmo mieloblastos podem ser encontrados. As plaquetas estão normais ou reduzidas, e plaquetas atípicas e anormais podem ser observadas, às vezes.

A eliminação mecânica de tecido hematopoético por processos patológicos foi suposta, porém não foi comprovada, e provavelmente não é a causa usual. Frequentemente, a quantidade de tecido eritropoiético na medula óssea como é determinada por estudos morfológicos e cinéticos é normal ou aumentada. O mecanismo descrito anteriormente (em Anemia das doenças crônicas) pode, em geral, ter um papel, mas a razão da efusão de células imaturas no sangue não está clara.

Além das anemias mielotísicas, normoblastos e neutrófilos imaturos circulantes também podem ser observados em anemias hemolígicas, anemias graves devidas a outras causas, infecções graves e insuficiência cardíaca congestiva, mas geralmente os normoblastos não são tão numerosos.

A reação leucoeritroblástica associada às anemias mielotísicas nem sempre pode ser diferenciada do quadro sanguíneo de mielosclerose com metaplasia mieloide (MMM, *myelosclerosis with myeloid metaplasia*), a qual é um dos distúrbios mieloproliferativos. Na MMM, o aumento do baço e do fígado é quase sempre observado. Na lâmina de sangue, anormalidades eritrocitárias mais graves, leucocitose, mieloblastos e granulócitos imaturos de todos os tipos (não apenas neutrófilos), aumento de basófilos, plaquetas mais atípicas, mais fragmentos de megacariócitos e megacariócitos anões são achados mais característicos da MMM que a reação leucoeritroblástica de alguma outra causa. O exame da medula óssea por meio de uma biópsia com agulha ou de uma biópsia cirúrgica é necessário para diferenciar a MMM das anemias mielotísicas.

Anemia aplásica

O termo anemia aplásica usualmente refere-se à pancitopenia associada a uma grave redução da quantidade de tecido hematopoético que acarreta uma produção deficiente de eritrócitos. A medula óssea, embora hipocelular, pode apresentar áreas irregulares de normocelularidade ou mesmo hipercelularidade. O diagnóstico de anemia aplásica grave é feita em pacientes com pancitopenia quando pelo menos houver a presença de pelo menos dois dos três seguintes valores do sangue periférico – granulócitos inferiores a $0{,}5 \times 10^9$/L, plaquetas inferiores a 20×10^9/L ou reticulócitos inferiores a 40.000/ml ou 1% (corrigido pelo hematócrito) – e a medula óssea apresenta uma celularidade inferior a 30% (Camitta, 1982). O termo anemia aplásica muito grave é utilizado quando a contagem de granulócitos é inferior a $0{,}2 \times 10^9$/L (Young, 2002). Caso contrário, a anemia aplásica deve ser classificada como moderada. A incidência de anemia aplásica é de 2 a 5 por milhão por ano baseada em estudos retrospectivos, apesar de países industrializados poderem apresentar maior incidência (Shadduck, 2001).

Características clínicas. A evolução clínica pode ser aguda e fulminante com pancitopenia profunda e uma rápida progressão para a morte ou o distúrbio pode ter um início insidioso e uma evolução crônica. Os sinais e sintomas dependem do grau das deficiências: sangramento devido à trombocitopenia, infecção devida à neutropenia e sinais e sintomas de anemia. Como regra, a esplenomegalia e a linfadenopatia estão ausentes. O sangramento é a manifestação mais comum da anemia aplásica, ocorrendo em aproximadamente 40% dos pacientes (Young, 2000). Em geral, o sangramento se manifesta pela ocorrência de equimoses fáceis, sangramento gengival e epistaxes episódicas. Menos de 5% dos pacientes apresentam infecção.

Etiologia. As anemias aplásicas possuem várias etiologias. Desde 1980, em aproximadamente 70% dos casos, nenhum agente etiológico específico pôde ser correlacionado com a doença. Esses casos são considerados idiopáticos. Anemias aplásicas relacionadas a fármacos e substâncias químicas representam 11 a 20% dos casos e aquelas associadas à hepatite infecciosa representam 2 a 9% dos casos (Young, 2000).

Patogênese. A insuficiência hematopoética pode ocorrer em qualquer nível da diferenciação das células precursoras da medula óssea. Pode haver uma quantidade insuficiente de células-tronco testadas como células iniciadoras de cultura de longo prazo ou uma quantidade insuficiente de células-tronco dedicadas (células progenitoras). As células CD 34+ da medula óssea, as quais contêm a maioria das células-tronco e de células progenitoras dedicadas, estão acentuadamente diminuídas em pacientes com anemia aplásica. Embora em teoria a anemia aplásica possa ser decorrente do microambiente da medula óssea defeituosa, esses defeitos não parecem ser a causa para a maioria dos pacientes (Young, 2002).

Sugere-se que o mecanismo da anemia aplásica se classifique em duas categorias principais: lesão direta e destruição da medula óssea mediada imunologicamente. A lesão direta de células-tronco e progenitoras hematopoéticas pode ser causada por um agente conhecido (p. ex., fármacos citotóxicos, irradiação e vírus) ou por um agente desconhecido que de alguma maneira altera a capacidade da célula de proliferar ou de se diferenciar. A destruição mediada imunologicamente dos compartimentos de células-tronco e de células progenitoras resulta da ativação citotóxica do linfócito, produção de citocina

e eliminação celular específica. Estudos recentes favorecem o mecanismo mediado imunologicamente da anemia aplásica e sugerem que substâncias químicas e antígenos virais podem iniciar o processo imune destrutivo (Young, 2002). De fato, a anemia aplásica atualmente é vista como uma síndrome mediada imunologicamente.

Prognóstico. As complicações são devidas à infecção, sangramento e problemas de sobrecarga de ferro decorrente de transfusões repetidas. O prognóstico parece depender da gravidade da lesão medular. Entretanto, a contagem celular inicial e a resposta à terapia durante os primeiros meses de tratamento são importantes fatores prognósticos (Young, 2000). Em uma série de 101 pacientes tratados com métodos convencionais (Williams, 1978), 25% dos pacientes morreram em 4 meses a partir do início dos sintomas, 50% morreram em 12 meses e 71% morreram em 5 anos. Aqueles que morreram em 4 meses apresentavam contagens de reticulócitos, neutrófilos e plaquetas significativamente mais baixas; uma porcentagem menor de células mieloides na medula óssea; e um intervalo menor entre o início dos sintomas e a visita ao médico (Lynch, 1975). Outros fatores correlacionados a um mau prognóstico incluíram o sexo masculino, mas não a idade do paciente ou a etiologia da aplasia (Williams, 1978). Contudo, a idade do paciente usualmente influencia a decisão da terapia à qual o paciente deverá ser submetido. Em alguns sobreviventes, a recuperação parcial é comum. Com a introdução de protocolos terapêuticos modernos com terapia imunossupressora e transplante de medula óssea, foram relatadas taxas de sobrevida de longo prazo de mais de 70%. Os sobreviventes apresentam um risco muito maior de desenvolver síndrome mielodisplásica, hemoglobinúria paroxística noturna e leucemia aguda (Young, 2002).

Supervisão. O tratamento inclui o transplante de medula óssea em pacientes com doença grave com menos de 50 anos de idade se houver um doador com HLA compatível. Crianças e adultos jovens apresentam uma probabilidade de sobrevida muito maior em comparação com adultos mais velhos (Young, 2002). A imunossupressão que utiliza globulina antilinfócito, ciclosporina e corticosteroides pode induzir a remissão hematológica em alguns pacientes. Parece que os androgênios são menos úteis na estimulação de qualquer medula óssea residual. O tratamento de suporte deve ser utilizado com cautela. Certamente, antibióticos adequados devem ser utilizados para o combate de infecções. Contudo, o risco de sensibilização deve ser considerado com a administração de hemoderivados. Plaquetas de doador único ou plaquetas de doadores HLA compatíveis são preferidas (Alter, 1998).

Anemia aplásica idiopática

Em pacientes com pancitopenia e medula óssea hipoplásica, deve ser realizada uma investigação de evidências de exposição importante à radiação, fármacos e substâncias químicas com propensão comprovada ou possível de lesar a medula óssea, de modo que a exposição adicional seja eliminada. No entanto, em aproximadamente 70% dos casos de anemia aplásica, nenhuma relação causal suspeita com agentes tóxicos pode ser detectada e são esses casos que são denominados idiopáticos.

Os sinais e sintomas não diferem, mas o início é comumente mais insidioso que o das anemias aplásicas tóxicas ou por hipersensibilidade.

Sangue. Os eritrócitos geralmente são normais ou aumentados de tamanho com graus variados de anisocitose e poiquilocitose, particularmente macrócitos ovais. A macrocitose pode ser uma característica proeminente, sobretudo em resposta a níveis elevados de eritropoetina. A distribuição da largura dos eritrócitos (RDW) pode estar aumentada, mesmo sem transfusão (Elghetany, 1997). Mais frequentemente, a policromasia, o pontilhamento e normoblastos não estão presentes. A leucopenia com diminuição acentuada de granulócitos e uma linfocitose relativa são observadas. Na leucopenia grave, geralmente também há uma linfocitopenia absoluta. Os grânulos neutrofílicos podem ser maiores do que o normal e podem corar de vermelho escuro (ao contrário dos grânulos "tóxicos" observados em infecções) e a fosfatase alcalina do neutrófilo pode estar elevada. Entretanto, o desvio neutrofílico à esquerda não é observado na ausência de infecção (Elghetany, 1997). A trombocitopenia faz parte do quadro. O ferro sérico usualmente está elevado. Os níveis séricos de cobalamina e folato usualmente são normais. Embora um paciente ocasional apresente hipogamaglobulinemia, a maioria apresenta níveis séricos normais de imunoglobulinas.

Medula óssea. Na maioria dos casos, o aspirado consiste de eritrócitos, linfócitos, algumas células plasmáticas, mastócitos e partículas de gordura. Cortes da medula óssea apresentam tecido adiposo com fibrose discreta e ilhotas de linfócitos e células plasmáticas (Fig. 31.8). Embora áreas focais normocelulares ou hipercelulares (manchas quentes) predominantemente eritroides algumas vezes possam estar presentes, a celularidade global está diminuída. A reserva de ferro está aumentada.

Cinética eritrocitária. O aumento da concentração sérica de ferro é um sinal precoce valioso de hipoplasia eritroide e reflete a diminuição do turnover plasmático de ferro. Além disso, a utilização de ferro pelos eritrócitos diminui. Por essa razão, tanto a eritropoiese efetiva quanto a total estão diminuídas na anemia aplásica.

Anemia aplásica associada a substâncias químicas ou a agentes físicos

Anemias aplásicas tóxicas. Um número de agentes físicos e químicos produz lesão da medula óssea em todos os humanos e animais expostos a uma dose suficiente. Os exemplos são a radiação ionizante; compostos mostarda; benzeno; e agentes antineoplásicos como o bussulfano, uretano e antimetabólitos. O benzeno é um problema menor que foi no passado devido à redução da exposição.

Radiação ionizante. Os efeitos dependem da radiossensibilidade das células e da capacidade de regeneração das células, assim como da taxa de sobrevida das células no sangue. As células eritroides são mais sensíveis, os granulócitos apresentam uma sensibilidade intermediária e os megacariócitos são os menos sensíveis dos três. As células estromais são relativamente insensíveis.

Após a exposição aguda à radiação, a contagem de reticulócitos cai, mas os eritrócitos diminuem lentamente por causa de sua sobrevida longa. Nas primeiras horas, ocorre uma leucocitose neutrofílica devida a um desvio de células periféricas e provavelmente de reservas da medula óssea. Uma queda de linfócitos ocorre após o primeiro dia e é responsável pela leucopenia inicial, haja vista os linfócitos serem sensíveis à irradiação e mortos diretamente. Após mais ou menos 5 dias, a granulocitose começa a diminuir. As plaquetas diminuem mais tarde. Frequentemente, as plaquetas são as últimas a retornar ao normal na fase de recuperação. A exposição crônica à irradiação de baixa dose, incluindo a radiação localizada para a espondilite anquilosante, está associada ao maior risco retardado de anemia aplásica (Shadduck, 2001).

Anemias aplásicas hipersensíveis. Um grande número de fármacos produz lesão da medula óssea em alguns indivíduos após uma única exposição ou após exposições repetidas. Os efeitos não estão relacionados à dose como acontece na aplasia tóxica. Os agentes incluem fármacos antimicrobianos (arsfernamina, cloranfenicol, sulfonamidas, clortetraciclina, estreptomicina), anticonvulsivantes (mefenitoína, trimetadiona), analgésicos (fenilbutazona), fármacos antitireoidianos (carbimazol), anti-histamínicos (tripelenamina), antagonistas do receptor de histamina H_2 (cimetidina), inseticidas (DDT) e outras substâncias químicas, algumas conhecidas (compostos de ouro, quinacrina, clorpromazina, tinturas para cabelo, bismuto, mercúrio) e outras desconhecidas.

O cloranfenicol é um fármaco importante nessa categoria. Esse antibiótico foi considerado a causa mais comum de anemia aplásica no pico de seu uso, o qual foi iniciado em 1949. Reações da medula óssea ao cloranfenicol são de dois tipos, os quais possivelmente não possuem relação entre si (Alter, 1998).

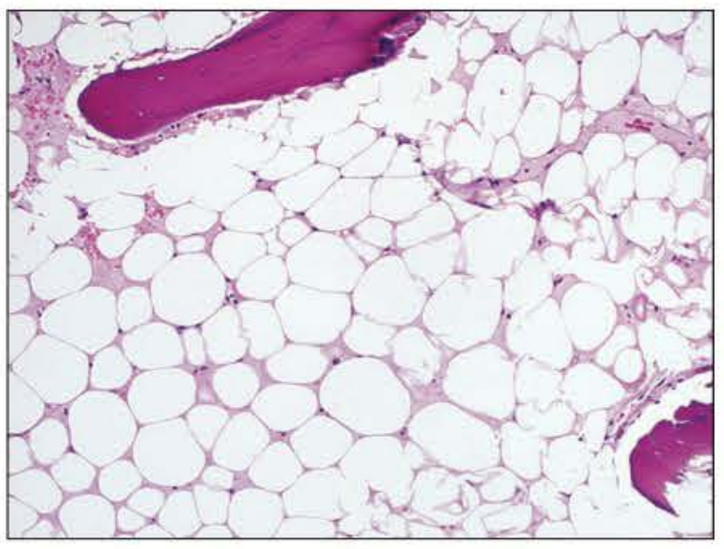


Figura 31.8 Corte de medula óssea hipocelular, anemia aplásica. A celularidade é inferior a 5%.

Em cerca de 50% dos pacientes que utilizam cloranfenicol, observa-se aumento do ferro sérico, reticulocitopenia com anemia, neutropenia e trombocitopenia. A medula óssea pode apresentar diminuição de células eritroides e vacuolização de precursores eritroides e granulocíticos primitivos. Essas alterações estão relacionadas à dose, dependem do tempo e são reversíveis.

Em uma pequena proporção de indivíduos que utilizam cloranfenicol, ocorre uma anemia aplásica irreversível que pode ser fatal. A pancitopenia ocorre 3 semanas a 5 meses após a última dose. Não foi estabelecida uma relação entre a lesão eritropoética reversível e o desenvolvimento da anemia aplásica. Pode ser que a susceptibilidade individual seja responsável por esta última. Por essa razão, é essencial que o uso desse fármaco seja feito de modo restrito porque a monitoração de sua administração por meio das contagens celulares não é uma medida preventiva efetiva.

Anemia aplásica associada a outra doença

Infecção. Infecções virais são frequentemente associadas a uma supressão limitada da medula óssea. Tipicamente, ocorre neutropenia e, menos comumente, trombocitopenia. A aplasia da medula óssea tem sido descrita como uma sequela rara da hepatite viral, ocorrendo alguns meses após o início quando a hepatite está em fase de resolução. Estima-se que ela ocorra em menos de 0,07% dos casos de hepatite em crianças e em 2% de pacientes com hepatite não A não B. A maioria dos casos é soronegativa para as hepatites A, B, C e G, com apenas raros casos dos tipos A ou B. Esses pacientes usualmente são do sexo masculino e com idade inferior a 20 anos. O prognóstico geralmente é grave e o transplante de medula óssea é considerado precocemente na evolução da doença (Young, 2002). O parvovírus foi associado à crise aplásica eritroide transitória em pacientes com distúrbios hemolíticos crônicos (Young, 2002). O vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o Epstein-Barr vírus também podem causar depressão hematopoética. O mecanismo da insuficiência medular induzida por vírus pode estar relacionado à citotoxicidade direta ou, mais provavelmente, a mecanismos mediados imulogicamente secundários ao mimetismo molecular, à disseminação de antígeno e sinais de perigo causados pela infecção (Young, 2002).

Hemoglobinúria paroxística noturna. Esse processo hemolítico raro (ver discussão a seguir) pode ser seguido por anemia aplásica. Usualmente, na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), coexiste um grau variável de hipofunção medular. Curiosamente, em alguns pacientes que apresentam anemia aplásica, o defeito eritrocitário da HPN pode estar presente ou pode aparecer durante a evolução da doença. Segundo Lewis (1967), aproximadamente 15% dos pacientes com anemia aplásica apresentam defeito eritrocitário da HPN demonstrável, com ou sem hemólise clínica. Entretanto, com a introdução recente de técnicas mais sensíveis (p. ex., citometria de fluxo), até 40% dos pacientes com anemia aplásica podem apresentar evidências particularmente no início de um marcador de superfície de HPN, particularmente no início da evolução da doença. A expansão clonal de células HPN pode ter um pano de fundo imunológico como é evidenciado pela forte associação do HLA-DR2 e a HPN (Young, 2002).

Gravidez. A gestação em uma paciente com anemia aplásica adquirida pode tornar a pancitopenia mais grave. Entretanto, a anemia aplásica ocasionalmente ocorre durante a gestação e sofre remissão após o parto. Em tais casos, ocorre recorrência da aplasia durante uma segunda gestação. Os lactentes podem apresentar anemia, trombocitopenia ou leucopenia (Fleming, 1968). As taxas de sobrevida da anemia aplásica na gestação são relativamente altas para a mãe (83%) e para o bebê (75%). A hemorragia é a causa mais comum de morte nesses pacientes (Young, 2000).

Timoma. Embora os timomas comumente estejam associados a aplasias puras de eritrócitos, outros elementos da medula óssea também podem ser deprimidos. A pancitopenia frequentemente com medula óssea hipoplásica ocorre em raros casos com timoma. A anemia aplásica pode ocorrer como uma complicação tardia após o tratamento do timoma (Ritchie, 2002a).

Doenças imunológicas. A anemia aplásica ocorre em aproximadamente 10% dos casos de fasciite eosinofílica. O prognóstico da anemia aplásica nessa situação é ruim. A anemia aplásica pode estar associada ao lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e à artrite reumatoide (AR), embora o papel da terapia medicamentosa na patogênese da anemia aplásica tenha sido considerado (Young, 2000). A anemia aplásica também pode complicar a esclerose múltipla, síndromes de imunodeficiência congênitas e tireoidopatias imunes.

Anemia aplásica herdada

O termo anemia aplásica herdada indica indivíduos com uma predisposição congênita ou genética à insuficiência medular crônica, a qual pode estar associada a outras anomalias congênitas. Entre 30 a 35% dos casos de anemia aplásica infantil são herdados. Em um estudo de 134 crianças com anemia aplásica, 40 pacientes tiveram o diagnóstico de anemia aplásica herdada, 26 apresentavam anemia de Fanconi, 10 apresentavam anemia aplásica familiar sem sinais clássicos de anemia de Fanconi e quatro apresentavam trombocitopenia amegacariocítica que posteriormente evoluiu para a aplasia completa (Alter, 1998).

Anemia de Fanconi. Trata-se de um distúrbio autossômico recessivo com uma frequência de portador de 1/300 nos Estados Unidos e na Europa (Alter, 2002). Frequentemente, mais de um membro de uma família é afetado. A pancitopenia torna-se evidente após a lactância e geralmente torna-se importante em torno dos oito anos de vida. A anemia comumente é normocrômica e pode ser macrocítica. Podem ser observados níveis elevados de hemoglobina fetal (HbF) e de antígeno i. A medula óssea geralmente é hipocelular. Anomalias desenvolvimentais estão presentes e podem incluir a hiperpigmentação, baixa estatura, hipogonadismo, malformações das extremidades (p. ex., aplasia do rádio e anormalidades dos polegares), microcefalia e malformação de outros órgãos (p. ex., coração e rins). Defeitos cromossômicos que consistem em quebras aleatórias e rearranjos caracteristicamente estão presentes nos linfócitos sanguíneos e também nas células da medula óssea. A quebra cromossômica torna-se mais evidente quando células cultivadas são desafiadas com agentes alquilantes e que provocam *cross-linking* do DNA (p. ex., mitomicina C e diepoxibutano). Um avanço na investigação da anemia de Fanconi ocorreu a partir da observação de que células híbridas da anemia de Fanconi e células normais resultavam na correção da fragilidade cromossômica anormal, um processo conhecido como complementação. Mais de 10 grupos de complementação foram identificados até o momento. O grupo de complementação A (FANCA) é o mais comum, ocorrendo em aproximadamente 70% dos pacientes com anemia de Fanconi. Várias proteínas da anemia de Fanconi formam um complexo nuclear que está envolvido na estabilidade nuclear (Alter, 2002). A sobrevida média prevista na anemia de Fanconi é de 19 anos. Pacientes com anemia de Fanconi apresentam um maior risco de desenvolver leucemia e tumores não hematológicos, particularmente no fígado, com uma incidência global de neoplasia de 15% (Alter, 1998).

Outras anemias aplásicas herdadas. Algumas poucas crianças apresentam manifestações hemorrágicas secundárias à trombocitopenia amegacariocítica. Na medida em que a doença evolui, elas apresentam pancitopenia e hipoplasia medular. Os estudos de quebra cromossômica geralmente são normais. O modo de herança é autossômico recessivo. O defeito molecular está relacionado à mutação do gene do receptor de trombopoietina, c-mpl, mapeado em lp35 (Alter, 2002).

A pancitopenia e a hipoplasia medular podem ocorrer em um subgrupo de pacientes com outros distúrbios familiares. Alguns pacientes com disqueratose congênita (hiperpigmentação reticulada da pele, unhas distróficas e leucoplasia mucosa) e síndrome de Shwachman-Diamond (insuficiência pancreática exócrina e neutropenia) desenvolvem anemia aplásica durante a evolução de sua doença (Alter, 2002).

Aplasia eritrocitária pura

Retardo transitório da eritropoese (crise aplásica transitória)

Isso pode ocorrer durante a evolução de uma anemia hemolítica (frequentemente precedida por uma infecção) e a combinação de aplasia e hemólise se torna uma situação potencialmente letal. A produção eritrocitária ocasionalmente pode cessar durante ou após infecções menores em crianças ou adultos normais. Nesse período, a medula óssea apresenta apenas alguns poucos precursores eritroides mais imaturos. Episódios de aplasia em anemias hemolíticas crônicas parecem ser devidos à infecção pelo parvovírus B19. Esse vírus inibe a eritropoiese infectando células progenitoras eritroides maduras (CFU-E). A principal característica morfológica da doença é a presença de pró-normoblastos gigantes dis-

persos no aspirado de medula óssea com redução acentuada dos precursores eritroides mais maduros. A inclusão nuclear pode ser difícil de ser identificada na coloração de Wright. As crises aplásicas resultantes da infecção por parvovírus são transitórias, com recuperação eritroide da medula óssea em 1 a 2 semanas após o início (Erslev, 2001c).

Eritroblastopenia transitória da infância

A eritroblastopenia transitória da infância (ETI) ocorre em crianças previamente saudáveis, usualmente com menos de 8 anos de idade, com a maioria dos casos ocorrendo entre 1 e 3 anos de idade. Ela é caracterizada por uma anemia normocítica moderada a grave, reticulocitopenia grave, neutropenia transitória (20%) e aumento da contagem de plaquetas (60% dos pacientes). A macrocitose é comumente observada durante a recuperação em razão do efeito dos reticulócitos. Uma história de infecção viral nos 3 meses precedentes é frequentemente presente. A medula óssea geralmente é normocelular e apresenta ausência virtual de precursores eritroides, exceto por algumas poucas formas iniciais. O paciente recupera-se em 1 ou 2 meses sem terapia. A patogênese parece envolver a inibição humoral da eritropoiese ou diminuição de células-tronco em muitos dos pacientes que foram estudados, mas não foi provado que o parvovírus seja a causa da ETI (Alter, 2002).

Aplasia eritrocitária congênita (anemia de Diamond-Blackfan; anemia hipoplásica congênita)

Trata-se de uma rara aplasia eritrocitária congênita que usualmente se torna evidente durante o primeiro ano de vida, mas que pode ocorrer mais tarde (p. ex., aos 6 anos). A anemia grave é normocrômica e discretamente microcítica; as plaquetas estão normais ou aumentadas; e a medula óssea geralmente apresenta redução de todas as células eritroides em desenvolvimento, mas apresenta linhagens granulocítica e megacariocítica normais. Em um pequeno número de casos, precursores eritroides residuais são detectados. Esses precursores são principalmente pró-normoblastos. A hemoglobina F está elevada (5–25%) até um grau não esperado para a idade do paciente e o antígeno i frequentemente está presente. A adenosina deaminase (ADA) eritrocitária comumente está aumentada. Esses achados contrastam com a ETI. Na fase anêmica desta, os eritrócitos são normocíticos, a Hb F está normal, o antígeno i está ausente e as enzimas eritrocitárias estão em um nível mais baixo (característica de uma população celular mais velha) (Alter, 1998).

O defeito parece estar nas células progenitoras eritroides dedicadas. Os CFU-Es e BFU-Es estão diminuídos na medula óssea, e os BFU-Es, os quais circulam normalmente, estão ausentes ou diminuídos no sangue. Além disso, essas células progenitoras apresentam uma aceleração da morte celular programada (apoptose) e não respondem em sistemas de cultura in vitro a células T normais e a níveis usuais de EPO, sugerindo um defeito qualitativo. Uma mutação no gene RPS19 foi detectada em 25% dos pacientes. Esse gene codifica a subunidade proteica ribossômica de localização nucleolar (Alter, 2002).

Aproximadamente 75% dos pacientes respondem pelo menos parcialmente aos corticosteroides, e a sobrevida global de longo prazo é de cerca de 65%, embora muitos pacientes necessitem de uso prolongado de esteroide (Alter, 1998).

Aplasia eritrocitária pura adquirida

Em adultos de meia-idade, a falha seletiva de produção eritrocitária ocorre raramente. A reticulocitopenia e a medula óssea que apresentam apenas os precursores eritroides mais primitivos são características. A produção de leucócitos e de plaquetas é normal. Aproximadamente 50% dos casos relatados foram associados a um timoma, usualmente do tipo de célula fusiforme não invasivo. No entanto, apenas 5 a 10% dos pacientes com timoma apresentam a anemia. A remissão da anemia ocorre em aproximadamente um quarto dos casos após a remoção cirúrgica do timoma. A aplasia eritrocitária crônica adquirida também foi associada a outras condições como uso de fármacos, distúrbios vasculares colagenosos, distúrbios linfoproliferativos de linfócitos granulares ou outros distúrbios com alterações imunológicas. A maioria dessas anemias parece fazer parte de um espectro de citopenias autoimunes nas quais as células-alvo são células-tronco eritroides ou normoblastos. Em alguns pacientes, anticorpos que reagem com essas células foram identificados. Corticosteroides e fármacos imunossupressores têm sido utilizados como terapia, mas menos de 50% dos pacientes obtêm uma remissão satisfatória (Erslev, 2001c).

Anemia sideroblástica

A anemia sideroblástica é caracterizada por eritrócitos hipocrômicos e frequentemente microcíticos no sangue usualmente misturados com células normocrômicas, de modo que a sua aparência é dimórfica (Fig. 29.13). A concentração sérica de ferro está aumentada, a TIBC está diminuída e a porcentagem de saturação da proteína ligadora de ferro está enormemente elevada. A medula óssea apresenta um aumento acentuado da reserva de ferro (Fig. 31.5), hiperplasia eritroide com evidências de hemoglobinização defeituosa e aumento do número de sideroblastos. Além disso, há um aumento do número de grânulos sideróticos por célula e os grânulos circundam o núcleo (com a maioria dos autores exigindo pelo menos um terço da circunferência) formando "sideroblastos em anel" (Koc, 1998) (Fig. 32.17). Neste último, a carga de ferro das mitocôndrias é observada através da microscopia eletrônica. Esses achados estão associados à sintese defeituosa do heme, a qual pode ser devida a qualquer um dos vários defeitos enzimáticos possíveis. Ocasionalmente, alterações tipo megaloblasto são observadas nas células eritroides, mas alterações típicas da deficiência de cobalamina ou de folato não são observadas nos granulócitos, exceto se a deficiência de folato coexistir.

Anemias sideroblásticas hereditárias

As anemias sideroblásticas hereditárias incluem vários modos de herança (i. e., ligada ao X, autossômica dominante e autossômica recessiva). As formas ligadas ao X geralmente exibem níveis baixos da enzima ácido d-aminolevulínico sintase (ALAS). Isso ocorre em homens e pode não se manifestar até a adolescência. Embora raros, existem alguns poucos estudos familiares bem documentados. Em contraste com a anemia sideroblástica adquirida, a anormalidade sideroblástica em anel usualmente é observada em formas tardias de eritroblastos que não se encontram em fase de divisão (Bottomley, 1982). O gene da isozima ALAS-2 (ALAS eritroide) foi localizado no cromossomo X e parece ocorrer uma mutação pontual desse gene (Xp11.21) na maior parte da anemia sideroblástica ligada ao X (Koc, 1998). Mutações do gene ALS-2 podem acarretar uma baixa afinidade enzimática pelo fosfato de piridoxal, instabilidade estrutural, sítio catalítico anormal ou aumento da susceptibilidade a proteases mitocondriais. O grau de anemia aumenta com a suplementação de piridoxina quando a mutação rompe a associação catalítica entre a enzima e o fosfato de piridoxal (Alcindor, 2002). Anemias sideroblásticas hereditárias podem ser devidas a um defeito mitocondrial, i. e., citopatia mitocondrial. A maioria desses distúrbios é produzida por deleções no genoma mitocondrial, as quais podem ser de até 30% do genoma mitocondrial inteiro (Alcindor, 2002). Essas doenças raras geralmente estão associadas a manifestações sistêmicas como a síndrome de Pearson (insuficiência pancreática, vacuolização de células da medula óssea, sideroblastos em anel e um grau variável de insuficiência medular).

Anemias sideroblásticas adquiridas

Anemia sideroblástica idiopática adquirida. Quando outras causas de anemia sideroplástica não podem ser identificadas, utiliza-se o termo "primária" ou "idiopática". A anemia sideroplástica idiopática adquirida (ASIA) é mais comum, inicia em uma fase mais tardia da vida adulta e é observada em ambos os sexos. A ASIA é geralmente considerada um subgrupo das síndromes mielodisplásicas (anemia refratária com sideroblastos em anel [RARS, refractory anemia with ring sideroblasts]) (Jaffe, 2001); ver também Cap. 32). A anemia dimórfica apresenta tanto eritrócitos hipocrômicos microcíticos quanto macrocíticos e, comumente, o VCM é elevado (Fig. 29.15). Pelo menos 15% dos eritroblastos (formas iniciais e tardias) na medula óssea são sideroblastos em anel. Outras manifestações de displasia da linha celular eritroide podem ser observadas. As características displásicas podem também ser observadas nas linhagens mieloide e megacariocítica. Existem evidências crescentes de que a ASIA pode ser causada por mutações do DNA mitocondrial (Gattermann, 1997).

Anemia sideroblástica secundária (induzida por fármacos ou toxina)

Essa forma de anemia sideroblástica é secundária a algum agente que interfere na síntese do heme; seu reconhecimento é importante porque ocorre uma melhora hematológica quando o agente é removido.

Os fármacos antituberculose isoniazida, cicloserina e pirazinamida provocam anormalidades sideroblásticas em alguns pacientes submetidos à terapia prolongada.

A intoxicação por chumbo é um membro importante desse grupo porque a exposição ambiental ao chumbo geralmente não é reconhecida e necessita ser detectada. O chumbo interfere na síntese do heme bloqueando as enzimas ALA sintase, ALA desidratase e heme sintase. Esses bloqueios são apenas parciais e de grau variado. A ALA e a coproporfirina estão aumentadas na urina. O cloranfenicol também causa formação de sideroblasto em anel, provavelmente pela inibição da síntese proteica mitocondrial. A deficiência de cobre ou a sobrecarga de zinco podem produzir anemia sideroblástica, células da medula óssea vacuolizadas e neutropenia. A ingestão de grandes quantidades de zinco interfere na absorção do cobre e produz manifestações de deficiência de cobre. Quelantes do cobre em altas doses (p. ex., penicilamina) podem produzir anemia sideroblástica.

A anemia induzida pelo etanol talvez seja a mais comum das anemias sideroblásticas reversíveis. Os achados concomitantes são a deficiência de folato, hipomagnesemia e hipocalemia. Após a suspensão da ingestão de álcool, os sideroblastos anormais usualmente desaparecem em poucos dias.

A deficiência primária de piridoxina, frequentemente associada à má nutrição, é às vezes associada à anemia sideroblástica. Entretanto, outras manifestações como neuropatia periférica e dermatite, dominam o quadro clínico. A anemia sideroblástica como única manifestação da deficiência de piridoxina não foi descrita em humanos, mas isso ocorre em animais (Alcindor, 2002).

Anemia refratária

Existe um grupo mal definido de anemias crônicas que comumente ocorrem em indivíduos com mais de 50 anos de idade. Elas se manifestam por anemia normocítica ou macrocítica, reticulocitopenia, frequentemente pancitopenia e hipercelularidade medular com hiperplasia eritroide em grau variável de diseritropoiese. Geralmente, o paciente foi tratado com cobalamina, ácido fólico e ferro sem apresentar resposta. O processo é usualmente contínuo e, em uma pequena proporção de casos, desenvolve alterações displásicas em células da medula óssea e aumento de células blásticas e evolui para uma leucemia aguda. Por essa razão, anemias refratárias são consideradas como parte das síndromes mielodisplásicas (ver Cap. 32).

Anemias diseritropoéticas congênitas

Anemias diseritropoéticas congênitas representam uma família de anemias refratárias herdadas caracterizadas por uma eritropoiese ineficaz e multinuclearidade eritroide medular.

Até o momento, pelo menos três tipos foram identificados com base nos achados da medula óssea e sorológicos (Heimpel, 2004). A anemia diseritropoética congênita I apresenta alterações megaloblásticas com alguma binuclearidade em aproximadamente 5% dos eritroblastos da medula óssea, pontes de cromatina internucleares e uma anemia macrocítica. Alguns casos apresentam uma anormalidade no gene CDAN1 localizado no braço longo do cromossomo 15 (Heimpel, 2004). A anemia diseritropoética congênita II é mais comum que as outras e apresenta binuclearidade e multinuclearidade em 10 a 40% dos precursores eritroides com mitoses pluripolares e cariorrexe. A anemia é normocítica e difere das outras por apresentar um teste do soro acidificado positivo (em alguns, mas nem todos os soros normais) e um teste de hemólise com sacarose negativo. É conhecida como multinuclearidade eritroblástica hereditária com teste do soro acidificado positivo (HEMPAS, *hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified serum*). Os eritrócitos apresentam um antígeno não presente em células normais ou na hemobloginúria paroxística noturna e aproximadamente um terço dos soros normais contêm o anticorpo imunoglobulina M (IgM) correspondente. Além disso, eritrócitos na anemia diseritrocitária congênita II reagem fortemente com anti-i e anti-I. A microscopia eletrônica mostra um excesso de retículo endoplasmático paralelo à membrana celular, o que confere a aparência de uma membrana dupla nas formas tardia de eritroblastos e alguns eritrócitos. Acredita-se que a anemia diseritrocitária congênita II esteja relacionada com a glicosilação anormal da membrana. A anemia diseritrocitária congênita III apresenta precursores eritroides gigantes, com multinuclearidade mais pronunciada (gigantoblastos) em 10 a 40% dos precursores eritroides, e uma anemia macrocítica. Em contraste com os tipos I e II, que são autossômicos recessivos, o tipo III é autossômico dominante. Um gene putativo para o tipo III foi recentemente localizado no cromossomo 15 próximo do gene CDAN1 (Heimpel, 2004). Outras variantes também foram descritas em um pequeno número de famílias.

Anemia por perda de sangue

Anemia pós-hemorrágica aguda

O sangue pode ser perdido da circulação externa ou internamente para um espaço tissular ou uma cavidade corpórea. Quando o sangue é perdido ao longo de um curto período de tempo em quantidade suficiente para causar anemia, ocorre a anemia pós-hemorrágica aguda. Indivíduos saudáveis normais são capazes de compensar a perda sanguínea rápida de até 20% do volume sanguíneo circulante com poucos sintomas (Hillman, 1996). Após um único episódio de sangramento excessivo, as principais manifestações são devidas à depleção do volume sanguíneo (hipovolemia). Após mais ou menos um dia, o volume retorna ao nível prévio pelo movimento de líquido para o interior da circulação e a anemia se torna evidente.

A primeira alteração hematológica é uma queda transitória da contagem de plaquetas, a qual pode subir e atingir níveis elevados em uma hora. A alteração seguinte é uma leucocitose neutrofílica moderada com desvio para a esquerda; em 2 a 5 horas, pode ocorrer uma contagem de leucócitos máxima de 10 a 35 × 10^9/L. A Hb e o hematócrito não caem imediatamente, mas apenas lentamente na medida em que os líquidos tissulares se movem para o interior da circulação para compensar a perda de volume sanguíneo. As quedas da Hb e do hematócrito podem não revelar a completa extensão da perda de eritrócitos até 2 a 3 dias após a hemorragia.

A anemia que ocorre inicialmente é normocrômica e normocítica, com um VCM e uma concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) normais e apenas uma anisopoiquilocitose mínima. O aumento da secreção de eritropoetina estimula a proliferação eritroide na medula óssea e os reticulócitos começam a atingir a circulação em 3 a 5 dias, atingindo um máximo em aproximadamente 10 dias. Durante esse período, pode ocorrer macrocitose (aumento do VCM) transitório, aumento da policromasia e presença de normoblastos no sangue. São necessários 2 a 4 dias após a perda sanguínea para que a contagem de leucócitos retorne ao normal e aproximadamente 2 semanas para que as alterações morfológicas desapareçam. O retorno dos valores eritrocitários é mais lento.

Anemia pós-hemorrágica crônica

Se a perda sanguínea for pequena ao longo de um longo período de tempo, tanto as características clínicas quanto as hematológicas que caracterizam a anemia pós-hemorrágica aguda não estarão presentes. A regeneração dos eritrócitos ocorre em uma velocidade mais lenta.

A contagem de reticulócitos pode estar normal ou discretamente aumentada. Usualmente, não ocorre anemia importante até que haja depleção da reserva de ferro, quando a anemia é, então, ferropriva. No início, a anemia é normocrômica e normocítica; gradualmente as células vermelhas recém-formadas se tornam microcíticas e então hipocrômicas. A contagem de leucócitos está normal ou discretamente diminuída devido à neutropenia. Geralmente, as plaquetas estão aumentadas e, apenas mais tarde, na deficiência de ferro grave, elas podem diminuir.

A causa da perda sanguínea deve ser identificada, pois é a ela que o tratamento deve ser direcionado.

Hemólise – Geral

Anemias devidas primariamente ao aumento da destruição dos eritrócitos são denominadas anemias hemolíticas. Por essa razão, um encurtamento da sobrevida eritrocitária comprova a presença de hemólise. Na prática, essa mensuração geralmente é desnecessária.

Anemias hemolíticas podem ser devidas a um defeito do eritrócito em si, sendo consideradas anemias hemolíticas intrínsecas. Em geral são hereditárias e são comumente agrupadas como defeitos de membrana, metabólico ou da hemoglobina. Alternativamente, a hemólise pode ser devida a um fator exterior ao eritrócito e que atua sobre ele.

São as anemias hemolíticas extrínsecas. Elas quase sempre são adquiridas. Os termos hemólise intravascular e hemólise extravascular referem-se aos locais da destruição dos eritrócitos, isto é, dentro ou fora do sangue circulante, respectivamente.

Estudos de sobrevida dos eritrócitos. Uma diminuição da sobrevida dos eritrócitos define a hemólise. Quando o processo hemolítico é moderado ou grave, os estudos a seguir serão suficientes para demonstrar a presença de hemólise. Quando o processo hemolítico é leve ou obscuro, estudos da sobrevida dos eritrócitos podem ser necessários.

O cromo radioativo (^{51}Cr) é conveniente e amplamente utilizado. O cromato marcado é adicionado a uma amostra de sangue in vitro e liga-se a cadeias β da hemoglobina. Os eritrócitos marcados com cromo são injetados pela via intravenosa e seu desaparecimento é mensurado pela contagem sanguínea. O sangue é coletado a cada 1 a 2 dias durante 10 a 14 dias. A atividade residual é um indicador do período de vida intravascular dos eritrócitos marcados. Como o ^{51}Cr emite raios γ, a cintilografia pode detectar locais de destruição eritrocitária.

O período de vida dos eritrócitos é usualmente expresso como o período durante o qual a meia-vida da radioatividade permanece no sangue ($T_{\frac{1}{2}}$ ^{51}Cr; ver Fig. 31.9). Normalmente, o cromo desaparece dos eritrócitos em uma taxa de 1% ao dia. Portanto, a meia-vida dos eritrócitos marcados com ^{51}Cr em indivíduos normais é de 25 a 32 dias em vez de 60 dias. A perda sanguínea, a alteração do hematócrito e transfusões sanguíneas recentes complicam significativamente a interpretação dos dados sobre a sobrevida. Por essa razão, uma condição estável é necessária para a obtenção de resultados utilizáveis.

Nas anemias hemolíticas autoimunes, a inclinação da sobrevida dos eritrócitos produz uma linha reta quando projetada em um papel semilogarítmico (Fig. 31.9). Em outras anemias hemolíticas, podem existir duas populações celulares. Nessas situações, a curva de sobrevida pode ser composta por uma inclinação acentuada inicial seguida por um componente plano (Fig. 31.10). Esse tipo de curva foi observado em anemias hemolíticas hereditárias por deficiência enzimática, na anemia falciforme e na hemoglobinúria paroxística noturna (Dacie, 1991).

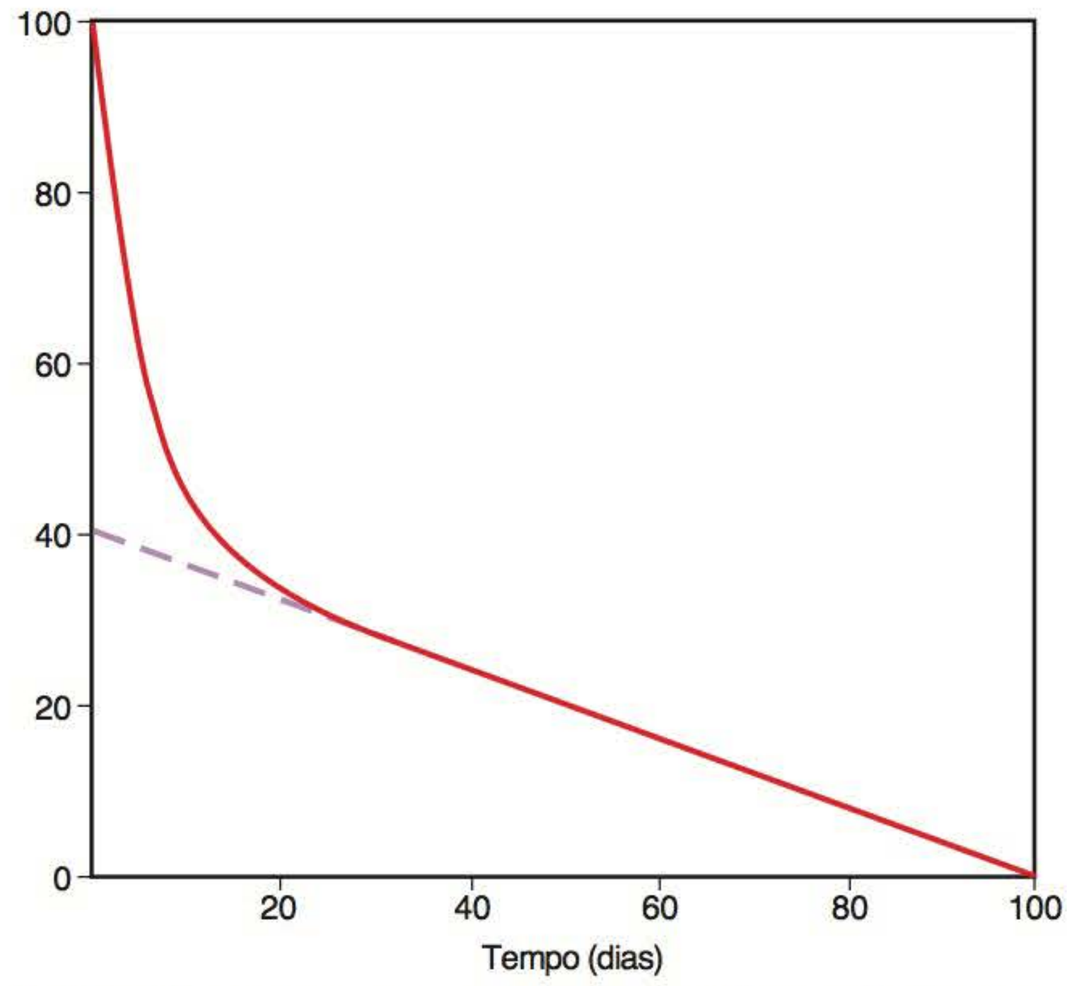


Figura 31.10 Resultados da curva de sobrevida dos eritrócitos marcados com ^{51}Cr em um paciente com anemia hemolítica que contém duas populações celulares. A porcentagem da sobrevida está na ordenada. Extrapolando a curva mais plana ao tempo 0, pode ser estimado que 40% das células apresentam um tempo médio de vida de 100 dias. Sessenta por cento das células apresentam um tempo médio de vida de 5 dias. (De Bentley SA, 1977.)

Destruição de hemoglobina

Os achados laboratoriais diferem dependendo do local da destruição celular, da quantidade de sangue destruído e da velocidade da destruição. Quando a destruição é intravascular e a quantidade de sangue destruído é grande, a hemoglobina livre e o metalbumina estarão presentes no plasma (hemoglobinemia e metalbuminemia). A urina pode conter hemoglobina livre e também hemossiderina.

A hemoglobina livre dissocia-se prontamente em dímeros αβ ($\alpha_2\beta_2 \rightarrow 2\alpha\beta$). Eles estão ligados à haptoglobina, uma α_2-globulina, e o complexo hemoglobina-haptoglobina é rapidamente removido da circulação e catabolizado pelas células parenquimatosas hepáticas. Esse processo impede que a hemoglobina apareça na urina. Entretanto, quando o nível plasmático de hemoglobina ultrapassa 50 a 200 mg/dL (8–31 μmol/L), que é a capacidade da haptoglobina de se ligar à hemoglobina, os dímeros αβ livres da hemoglobina passam imediatamente através dos glomérulos renais. Parte da hemoglobina é então absorvida pelas células dos túbulos contornados proximais, nos quais o ferro da hemoglobina é convertido em hemossiderina. Quando essas células tubulares descamam na urina, ocorre hemossiderinúria. Quando a quantidade de hemoglobina na luz tubular ultrapassa a capacidade de reabsorção tubular, ela atinge a urina (hemoglobinúria). No processo ela pode ser oxidada em metemoglobina (hemiglobina). A hemoglobina plasmática não ligada à haptoglobina ou removida pelos rins é oxidada em hemiglobina. Os grupos heme oxidados (hemina) ligam-se à hemopexina, uma β-globulina, e o complexo é rapidamente eliminado pelas células parenquimatosas hepáticas. Quando a hemopexina é depletada, grupos hemina ligam-se à albumina, formando a metalbumina. Quando a hemopexina torna-se novamente disponível, ela remove os grupos hemina da albumina para a depuração hepática (Hillman, 1996).

A lactato desidrogenase (LDH) é liberada dos eritrócitos e está aumentada no soro na hemólise, especialmente na hemólise intra-

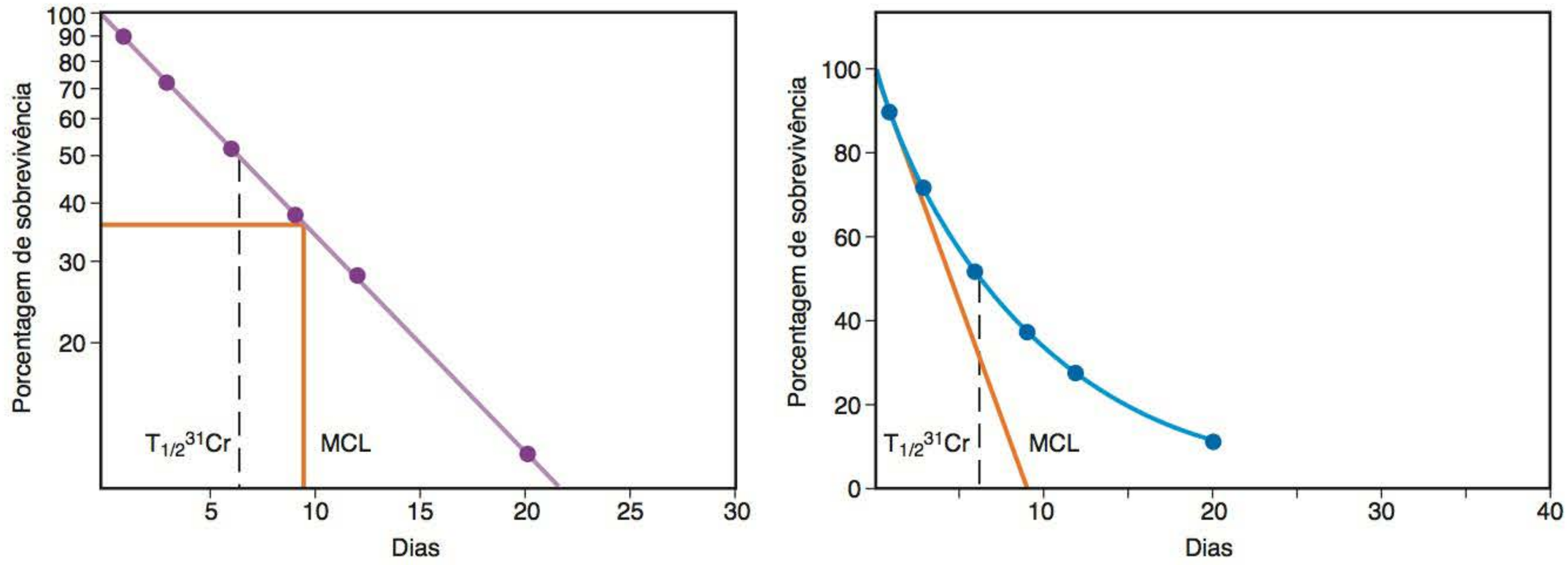


Figura 31.9 Resultados da curva de sobrevida dos eritrócitos marcados com ^{51}Cr em pacientes com anemia hemolítica autoimune (esquerda, semi-log; direita, plots lineares). O tempo médio de vida das células foi de 9 a 10 dias e é registrado em um período quando 37% das células ainda estão circulando. O tempo de sobrevida de 50% ($T_{\frac{1}{2}}Cr$) foi de 6 a 7 dias. (De Dacie, 1991; p. 386 com permissão.)

vascular. Ela é eliminada mais lentamente do que a hemoglobina. Seu valor de referência superior é de 207 UI/L e, na anemia hemolítica, a LDH pode estar bem elevada, atingindo até 800 UI/L. Na anemia megaloblástica associada a uma acentuada eritropoiese ineficaz, a LDH está enormemente aumentada, atingindo vários milhares de unidades. A LDH sérica também está aumentada em outras formas de lesão celular. Nas anemias hemolíticas, ocorre reversão do padrão da isozima da LDH, com a LDH_1 ultrapassando a LDH_2.

O nível plasmático normal de hemoglobina é de 0,5 a 5 mg/dL (0,08–0,78 μmol/L). Uma elevação para 10 mg/dL confere ao plasma uma coloração amarelada ou alaranjada. Com um maior aumento, a cor torna-se rosa. Níveis de até 25 a 30 mg/dL são comuns na anemia hemolítica. Níveis mais elevados usualmente indicam hemólise intravascular e são observados em reações transfusionais hemolíticas e nas hemoglobinúrias paroxísticas noturnas e pela exposição ao frio.

Quando a hemólise for primariamente extravascular, não ocorre hemoglobinemia, hemoglobinúria ou hemossiderinúria. A hemólise é detectada por meio da mensuração de um aumento de um dos produtos do catabolismo do heme (ver Cap. 30).

1. Um aumento de monóxido de carbono (CO) expirado (uma técnica de pesquisa) ou do nível sanguíneo de carboxihemoglobina.
2. Um aumento sérico da bilirrubina indireta. Como ela é ligada à albumina, não aparece na urina.
3. Um aumento do urobilinogênio na urina ou, mais consistentemente, do urobilinogênio fecal.

O urobilinogênio normal em uma amostra de 24 horas é de 0,5 a 4 mg (0,8–6,75 μmol) na urina e 40 a 280 mg (0,068–0,470 mmol) nas fezes. Após uma hemólise excessiva, ele pode aumentar para 5 a 200 mg na urina e para 300 a 400 mg nas fezes. O exame de fezes é mais confiável que o de urina porque ele pode revelar um aumento quando a urina não mostra nenhum. Ele pode revelar um aumento mesmo quando a concentração sérica de bilirrubina não estiver elevada porque o fígado normal pode remover grandes quantidades de bilirrubina (reagindo indiretamente) e de urobilinogênio reabsorvido do sangue.

A anemia hemolítica é caracterizada também por um aumento da produção de eritrócitos. Por causa da disponibilidade da quantidade máxima de ferro para a formação de hemoglobina, a produção de eritrócitos atinge o grau máximo possível (aproximadamente oito vezes o normal) na anemia hemolítica crônica grave, se não houver intervenção de fatores complicadores (p. ex., deficiência de folato). Se a destruição de eritrócitos ultrapassar a capacidade de reposição da medula óssea na mesma velocidade, ocorrerá a anemia hemolítica. Na hemólise menos grave, a medula óssea pode ser capaz de produzir uma quantidade suficiente de eritrócitos de modo que a anemia não ocorra. Isso é denominado hemólise compensada.

A piora súbita do grau de anemia pode ocorrer nas anemias hemolíticas crônicas e pode ser decorrente de dois mecanismos básicos. Ocasionalmente, episódios de insuficiência medular (interrupção transitória da eritropoiese; ver discussão anterior) caracterizados por hipoplasia eritroide e reticulocitopenia podem perturbar o equilíbrio entre a produção e a destruição de eritrócitos. Na maioria das vezes, essas crises aplásicas são provavelmente devidas à infecção por parvovírus (Young, 1984). Por outro lado, um aumento da taxa de destruição de eritrócitos pode ocorrer associado à infecção ou a outras doenças que aumentam o tamanho do baço. Isto não está associado à aplasia eritroide e é denominado crise hemolítica.

Lâmina de sangue. A anemia é normocítica ou macrocítica. A macrocitose é devida à presença de eritrócitos imaturos, os quais são maiores que os normócitos. A policromasia é geralmente proeminente. Ela pode ser excessivamente basofílica e pode haver a presença de normoblastos, ambos indicando um "desvio" de reticulócitos da medula óssea para o sangue. Outras anormalidades eritrocitárias podem fornecer um indício sobre a natureza do processo hemolítico. Esferócitos sugerem esferocitose hereditária (EH) ou hemólise autoimune (Fig. 29.12); esquizócitos indicam anemia hemolítica traumática (Fig. 29.19); células falciformes, células-alvo ou cristais sugerem uma hemoglobinopatia. Quando a anemia hemolítica é aguda, ocorre um aumento dos números e formas mais jovens de leucócitos e plaquetas são frequentemente liberadas da medula óssea com os eritrócitos. O resultado é uma leucocitose com um "desvio para a esquerda" e trombocitose com plaquetas normais e gigantes.

Medula óssea. A hiperplasia normoblástica está presente e pode ser de grau impressionante. A reserva de ferro usualmente está aumentada e a quantidade de sideroblastos está normal ou aumentada, refletindo a abundância de ferro disponível para a síntese de hemoglobina.

Hemólise – Distúrbios da membrana

Esferocitose hereditária

A EH afeta 1 em cada 5.000 indivíduos da população, ocorrendo predominantemente entre aqueles com ascendentes oriundos do norte da Europa. Ela é caracterizada por eritrócitos esféricos que são intrinsecamente defeituosos, esplenomegalia e ocorrência familiar (mais frequentemente, autossômica dominante). Em aproximadamente 15 a 30% dos casos, no entanto, nenhum familiar é afetado. O processo hemolítico apresenta uma gravidade variável e é corrigido pela esplenectomia, embora a esferocitose permaneça.

Os achados laboratoriais são os de um processo hemolítico extravascular: evidências de aumento do catabolismo do pigmento, hiperplasia eritroide e reticulocitose. O teste direto de antiglobulina é negativo. Caracteristicamente, os eritrócitos apresentam um aumento da fragilidade osmótica. Na lâmina de sangue, os esferócitos apresentam um diâmetro menor e coram mais intensamente do que as células normais. A palidez central está diminuída ou ausente. Quando presente, a palidez pode ser excêntrica (Fig. 29.12). O VCM é normal e a CHCM frequentemente está aumentada, refletindo uma diminuição da superfície celular.

Teste de fragilidade osmótica. Os eritrócitos são suspensos em uma série de tubos que contêm soluções hipotônicas de NaCl que variam de 0,9 a 0,0% incubados em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugados. A porcentagem de hemólise nas soluções sobrenadantes é mensurada e mostrada em um gráfico para cada concentração de NaCl. As células que são mais esféricas, com uma menor relação superfície/volume, apresentam uma capacidade limitada de expansão em soluções hipotônicas e são destruídas em uma maior concentração de NaCl que aos eritrócitos bicôncavos normais. Diz-se que eles possuem maior fragilidade osmótica. Por outro lado, células que são hipocrômicas e mais achatadas possuem uma maior capacidade de expandir em soluções hipotônicas e são destruídas em menor concentração do que as células normais. Diz-se que elas apresentam menor fragilidade osmótica (Fig. 31.11).

A fragilidade osmótica do sangue recém-coletado normalmente está aumentada na EH, mas pode ser normal em pacientes levemente afetados. No sangue incubado a 37°C por 24 horas antes da realização do teste, a fragilidade osmótica quase sempre está aumentada (Fig. 31.12).

Essa fragilidade do sangue recém-coletado usualmente está aumentada na esferocitose hereditária, mas pode estar normal em pacientes levemente afetados. Um rastro de células muito frágeis condicionadas pelo baço é usualmente observado. O rastro geralmente desaparece após esplenectomia. Células com aumento da relação superfície/volume são resistentes à osmose. Essas células são observadas na deficiência de ferro, talassemia, hepatopatia e reticulocitose.

Teste de auto-hemólise. O sangue estéril desfibrinado é incubado a 37°C por 48 horas (Dacie, 1991). Durante esse tempo, os eritrócitos sofrem uma série de alterações complexas, perdem membrana e se tornam mais esféricos. No sangue normal, sem adição de glicose, a quantidade de auto-hemólise na 48ª hora é de 0,2 a 2,0%. No sangue normal, incubado com adição de glicose, a quantidade de auto-hemólise é menor: 0 a 0,9%.

Na esferocitose hereditária, a auto-hemolise está praticamente sempre aumentada. Com glicose, a lise diminui em certo grau. Raramente, pacientes com fortes evidências clínicas e laboratoriais de esferocitose hereditária apresentam fragilidade osmótica incubada normal. Nesses pacientes, o teste de auto-hemólise anormal é útil na confirmação do diagnóstico de esferocitose hereditária (Fukagawa, 1979).

Os eritrócitos são anormalmente permeáveis ao sódio e não existe defeito no metabolismo energético, o qual está, de fato, aumentado. O aumento da atividade metabólica foi explicado como uma tentativa de compensar o defeito da membrana que permite a saída de cátions,

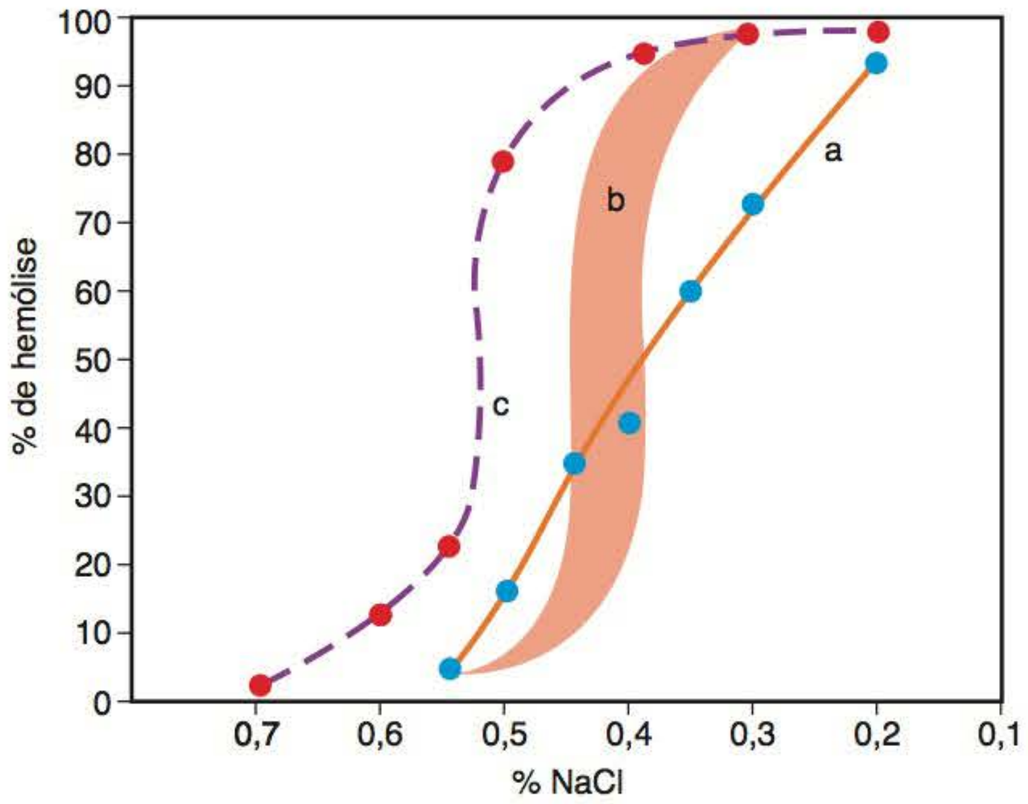


Figura 31.11 Fragilidade osmótica eritrocitária. *a*, talassemia, que mostra uma pequena fração de células com fragilidade aumentada (inferior à esquerda) e uma maior fração de células com diminuição da fragilidade (superior à direita). *b*, curvas normais encontram-se na área sombreada. *c*, esferocitose hereditária que mostra aumento da fragilidade osmótica.

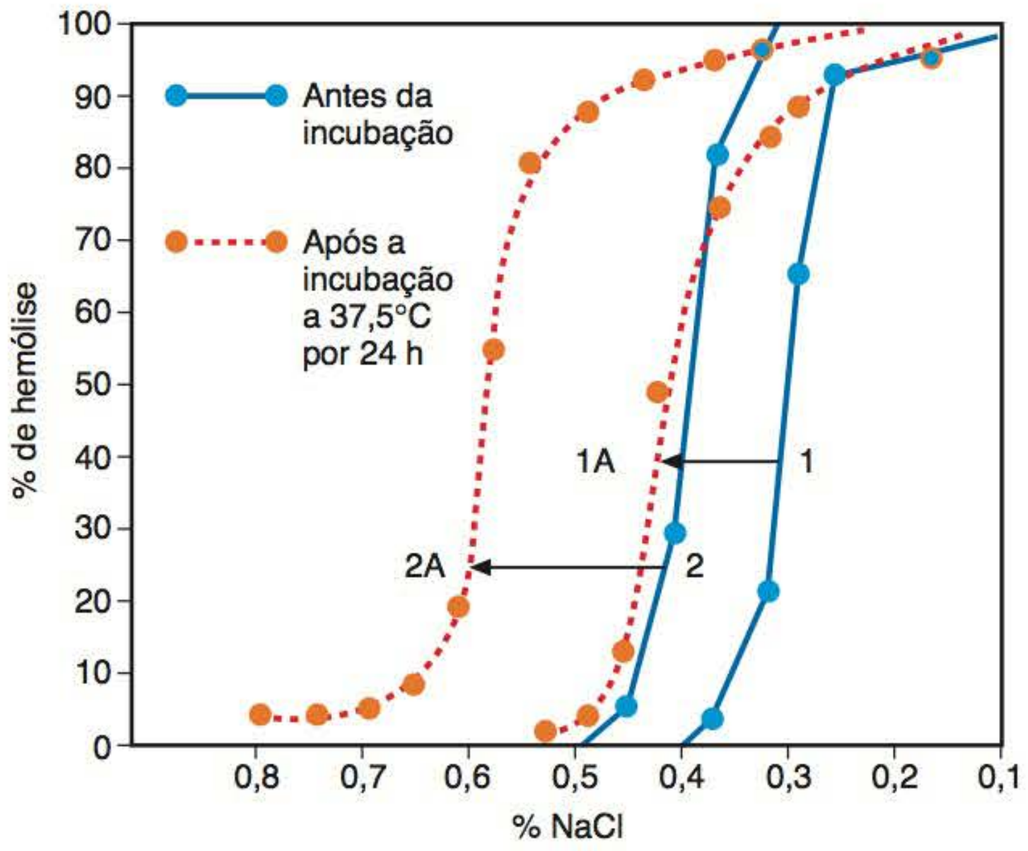


Figura 31.12 O efeito da incubação sobre a fragilidade osmótica eritrocitária. A alteração da curva da fragilidade osmótica de "antes da incubação" para "após a incubação" é ilustrada para o sangue normal (1 → 1A) e do sangue de um paciente com esferocitose hereditária (2 → 2A). O sangue na esferocitose hereditária apresenta caracteristicamente um aumento maior da fragilidade com a incubação do que o sangue normal ou mesmo o sangue de paciente com esferocitose adquirida (p. ex., anemia hemolítica autoimune).

com alterações degenerativas e a perda de membrana celular acelerada pelo estresse metabólico e físico da passagem pelo baço.

Os defeitos genéticos na esferocitose hereditária são heterogêneos, mas eles afetam proteínas esqueléticas da membrana eritrocitária. A esferocitose hereditária pode ser dividida nas seguintes categorias patogênicas: (1) deficiência parcial isolada de espectrina; (2) deficiência parcial combinada de espectrina e anquirina; (3) deficiência parcial de proteína banda 3; (4) deficiência de proteína 4.2; e (5) outros defeitos menos comuns. A maioria dessas anormalidades está relacionada à síntese de proteína anormal, principalmente por meio de mutações pontuais ou *frameshift* (Gallagher, 2000). A perda de área superficial na esferocitose hereditária provavelmente está relacionada à separação e perda da camada lipídica dupla da membrana do esqueleto. Estudos recentes sugerem que a densidade normal da espectrina é necessária para a coesão normal entre a camada lipídica dupla e o esqueleto da membrana (Mohandas, 1993).

Eliptocitose hereditária

Essa condição autossômica dominante provavelmente inclui mais de uma variante genética. Na população norte-americana, a prevalência é aproximadamente de 3 a 5 indivíduos por 10.000. Ela é mais comum em indivíduos de ascendência africana e mediterrânea. Todos os casos de eliptocitose hereditária estão associados ao enfraquecimento do esqueleto da membrana e a associação defeituosa de proteínas que mantêm o esqueleto unido (Gallagher, 2000). Com base na morfologia dos eritrócitos, a eliptocitose hereditária pode ser dividida em três categorias: (1) eliptocitose hereditária comum (incluindo a piropoiquilocitose hereditária), com eliptócitos que podem apresentar forma de bastão; (2) eliptocitose hereditária esferocítica; e (3) ovalocitose do Sudeste Asiático. A anormalidade mais comumente definida parece ser um defeito na espectrina que acarreta um comprometimento da associação de dímeros da espectrina em tetrâmeros de espectrina e oligômeros de espectrina. Outras anormalidades incluem um defeito na proteína 4.1 e deficiência de glicoforina C. A piropoiquilocitose hereditária está associada a duas anormalidades: uma mutação da espectrina que perturba a autoassociação do heterodímero de espectrina e uma deficiência parcial de espectrina que acarreta diminuição da relação espectrina/banda 3.

Eliptocitose hereditária comum. A maioria dos indivíduos com a forma comum de eliptocitose hereditária (~90% dos casos) não apresenta anemia. Uma minoria desse grupo (talvez 10–20%) apresenta hemólise leve. Eliptócitos não hipocrômicos são abundantes na lâmina de sangue, representando mais de 25% (ver Fig. 29.16), enquanto em indivíduos normais menos de 5% dos eritrócitos são elípticos, embora um relato mais antigo descreva uma porcentagem normal de 15% (Gallagher, 2000). A deformidade aumenta em preparações a fresco seladas.

Em um subgrupo da eliptocitose hereditária comum, especialmente em famílias negras, recém-nascidos afetados apresentam transitoriamente poiquilocitose moderada, fragmentação eritrocitária e germinação, com anemia hemolítica. Durante o primeiro ano de vida, a hemólise diminui e a eliptocitose hereditária típica emerge. A piora da hemólise no período neonatal foi atribuída à presença de hemoglobina fetal, a qual se liga mal ao 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Níveis mais elevados deste exercem um efeito desestabilizador sobre a interação espectrina-proteína 4,1-actina (Gallagher, 2000).

Piropoiquilocitose hereditária. A piropoiquilocitose hereditária é uma anemia hemolítica congênita grave caracterizada por microcitose, micropoiquilocitose acentuada e fragmentação e herança autossômica recessiva. Ela representa um subtipo da eliptocitose hereditária comum e ocorre principalmente em indivíduos negros. Em contraste com os eritrócitos normais, os quais apresentam germinação e fragmentação quando aquecidos a 49°C, os eritrócitos da piropoiquilocitose hereditária fragmentam a 45-46°C.

Eliptocitose hereditária esferocítica. Este subgrupo representa 10% dos casos. O indivíduo apresenta uma anemia hemolítica leve a moderada e esplenomegalia com eliptócitos e esferócitos, com testes de fragilidade osmótica e de auto-hemólise anormais. Poiquilócitos e fragmentos usualmente estão ausentes. A base molecular desse subtipo é desconhecida.

Ovalocitose do sudeste asiático. Este subgrupo ocorre com alta frequência (20–30%) em determinadas populações do Extremo Oriente, particularmente na Malásia. A hemólise geralmente está ausente ou é leve. Os eritrócitos são menos alongados e alguns apresentam o aspecto de ovalócitos estomatocíticos. Muitas células contêm uma ou duas pontes transversas ou uma fenda longitudinal. Essa condição está associada a um aumento da resistência à malária. O defeito subjacente está relacionado a uma mutação na banda 3 (Mohandas, 1993; Gallagher, 2000).

Estomatocitose hereditária (hidrocitose hereditária)

Trata-se de um raro distúrbio autossômico transmissível. Indivíduos heterozigotos não possuen anemia e apresentam de 1 a 25% de estomatócitos na lâmina de sangue. Em indivíduos supostamente homozigotos, aproximadamente um terço dos eritrócitos são estomatócitos e existe uma anemia hemolítica leve a moderada. A anormalidade da membrana acarreta um aumento da permeabilidade da membrana ao Na^+ e K^+ (e, consequentemente, à água), resultando em eritrócitos macrocíticos hidratados. O VCM pode ser de até 150 fL. A fragilidade osmótica e a auto-hemólise estão aumentadas. Embora o exato defeito da membrana não seja conhe-

cido, vários relatos indicam a ausência de uma proteína denominada estomatina localizada na região da banda 7 (Gallagher, 2000).

Hemoglobinúria paroxística noturna

A HPN é um distúrbio adquirido das células-tronco clonais caracterizado pela produção de eritrócitos, granulócitos e plaquetas anormais (Beutler, 1999; Johnson, 2002). O defeito dos eritrócitos os torna mais susceptíveis à lise intravascular mediada pelo complemento. Foram descritos três tipos de eritrócitos de acordo com sua sensibilidade in vitro: tipo I, com sensibilidade normal; tipo II, com sensibilidade média (três a cinco vezes a normal); tipo III, com sensibilidade extrema (15 a 25 vezes a normal). Várias proteínas de defesa do complemento diminuem ou estão ausentes na HPN. Essas proteínas incluem: fator acelerador de decaimento (DAF [decay accelerator factor], CD55); inibidor da membrana da lise reacional (MIRL [membrane inhibitor of reactive lysis], CD59) e proteína ligadora de C8 (fator de restrição homólogo). O DAF é uma glicoproteína que antagoniza os complexos convertase do complemento. O MIRL é uma proteína que controla o complexo de ataque da membrana C5b-9. Outras proteínas que estão deficientes na HPN incluem CD58 (antígeno 3 da função leucocitária), CD14 (receptor da proteína ligadora de endotoxina), CD24 e CD16a (receptor Fcγ). Enzimas associadas à membrana (p. ex., acetilcolinesterase e fosfatase alcalina leucocitária) também podem estar deficientes. Um estudo recente indica que proteínas e enzimas deficientes estão ligadas à membrana celular por uma âncora glicolipídica comum denominada glicosilfosfatidil inositol (GPI). A deficiência de GPI acarreta deficiência secundária das proteínas ligadas. Por essa razão, a HPN pode ser redefinida como uma falta parcial ou completa de proteínas ligadas ao GPI em uma população de células do sistema hematopoético (Johnson, 2002).

A HPN é uma doença rara com uma incidência anual estimada de 4 por milhão (Johnson, 2002). A doença é caracterizada pela hemólise intravascular crônica com ou sem hemoglobinúria evidente. Entretanto, a hemossiderinúria está quase que constantemente presente. A hemoglobinúria noturna típica ou relacionada ao sono está presente em menos de 25% dos pacientes. Episódios de hemólise podem ser iniciados por infecção, cirurgia, transfusão de sangue total, injeção de contraste ou mesmo exercício intenso.

O sangue usualmente apresenta uma anemia normocítica com uma reticulocitose que é frequentemente inferior à esperada para o grau de anemia. Contudo, a anemia microcítica hipocrômica não é incomum e ela se deve à perda de ferro na urina. A neutropenia ocorre em três quintos e a trombocitopenia em dois terços dos pacientes em algum momento da evolução da doença, de modo que a pancitopenia é comum. O teste direto de antiglobulina geralmente é negativo.

A medula óssea pode ser hipercelular com hiperplasia eritroide ou hipocelular. Em alguns pacientes, a insuficiência medular pode ocorrer durante a evolução da HPN. Em outros, a anemia aplásica é o diagnóstico inicial, com sinais de HPN manifestando-se simultaneamente ou mais tarde. Como foi mencionado, cerca de 40% dos pacientes com anemia aplásica apresentam evidências de clones de HPN no diagnóstico (Young, 2002).

Complicações trombocíticas são comuns, ocorrendo em aproximadamente 20% dos pacientes e representam uma causa importante de mortalidade. A trombose comumente ocorre em veias hepáticas, cerebrais e abdominais. A ausência de CD59 nas plaquetas causa a externalização da fosfatidilserina, um sítio para complexos da protrombinase e, consequentemente, aumenta a propensão para a trombose. A doença pode sofrer remissão parcial e exacerbação. Em mais de 50% dos pacientes, tanto a proporção de células anormais quanto a gravidade clínica diminuem com o tempo. Em aproximadamente 3 a 5% dos pacientes com HPN, a doença evolui para a leucemia aguda.

Teste de hemólise com sacarose. Este teste deve ser realizado sempre que o diagnóstico de HPN for considerado e também em anemias hipoplásicas e em qualquer anemia hemolítica de origem obscura (Hartmann, 1970). O princípio do teste é que a sacarose fornece um meio de força iônica baixa que promove a ligação do complemento aos eritrócitos. Na HPN, uma proporção dos eritrócitos é anormalmente sensível à lise mediada pelo complemento. Resultados suspeitos podem ser vistos em algumas outras doenças hematológicas, especialmente na anemia megaloblástica e na anemia hemolítica autoimune. Resultados falso-negativos ocorrem quando o soro não apresenta atividade do complemento. Um teste de investigação mais simples, o teste de água com açúcar, aplica o mesmo princípio de misturar o sangue com açúcar e observar a ocorrência de hemólise.

Teste do soro acidificado (teste de Ham). O diagnóstico definitivo da HPN geralmente depende da positividade de um teste do soro acidificado (Ham, 1939; Dacie, 1991). No soro acidificado, o complemento é ativado pela via alternativa, ligando-se aos eritrócitos, e lisa as células anormais da HPN que usualmente são susceptíveis ao complemento. Os eritrócitos lavados do paciente são misturados com soro normal ABO-compatível (fresco ou armazenado adequadamente) e ácido. Após uma incubação de 1 hora a 37°C, as células da HPN são lisadas, como é indicado na Tabela 31.3. O próprio soro do paciente pode ou não causar a lise, dependendo do complemento residual, e os outros tubos são utilizados como controles.

Na HPN, geralmente 10 a 50% das células são lisadas. Quando a lise também ocorre no soro inativado pelo calor, o teste não é positivo, haja vista que esferócitos ou células sensibilizadas por anticorpos podem ser responsáveis. Um teste positivo do soro acidificado ocorre na anemia diseritropoética congênita, tipo II (CDA-II) ou HEM-PAS (ver discussão anterior). No entanto, nessa situação, a lise não ocorre no soro do paciente e apenas em aproximadamente 30% dos soros normais. Além disso, o teste de investigação de água com açúcar é negativo na CDA-II.

A citometria de fluxo que usa coloração imunofluorescente de eritrócitos com um anticorpo monoclonal contra proteínas deficientes (p. ex., CD55, CD58 e CD59) vem se tornando gradualmente o método padrão de diagnóstico da HPN. Os granulócitos são alvos diagnósticos excelentes para a citometria de fluxo.

O gene responsável pelo fenótipo da HPN foi identificado no cromossomo X e designado fosfatidil inositol glicano A ou PIG-A. Mais de 120 mutações somáticas do gene PIG-A foram descritas.

Distúrbios da hemoglobina

Existem dois grupos principais de distúrbios herdados da hemoglobina: (1) variantes estruturais, com defeitos da estrutura, e (2) talassemias, com defeitos da síntese de uma cadeia da globina. Existe uma sobreposição entre esses grupos: 44 variantes estruturais também apresentam o fenótipo talassêmico com diminuição da síntese e, consequentemente, do nível da cadeia da globina anormal. A persistência hereditária de hemoglobina fetal está relacionada com as talassemias, embora o fenótipo não seja claramente talassêmico. A maioria das talassemias envolve cadeias de α ou β-globina. São conhecidas talassemia δ, γ e εγδβ, mas elas são clinicamente menos importantes.

Hemoglobinas normais

O grupo heme é idêntico em todas as hemoglobinas. A parte proteica da molécula é um tetrâmero, constituído por dois dímeros; cada dímero contém uma globina tipo α e uma tipo β. A partir da combinação de duas globinas tipo α e quatro globinas tipo β, três hemoglobinas distintas são observadas após o nascimento em indivíduos normais e existem mais três hemoglobinas embrionárias que estão presentes apenas nos três primeiros meses de gestação (Fig. 31.13).

Tabela 31.3 Teste do soro acidificado

	1	2	3	4	5	6	7
Soro normal fresco		0,5	0,5			0,5	0,5
Soro do paciente			0,5				
Soro normal inativado pelo calor				0,5			0,5
HCl 0,2 N		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05
50% dos eritrócitos do paciente	0,05	0,05	0,05	0,05			
50% dos eritrócitos normais					0,05	0,05	0,05
Padrão de lise no teste positivo	Traço	+++	+	–	–	–	–

Modificado de Dacie, 1991, p. 261.

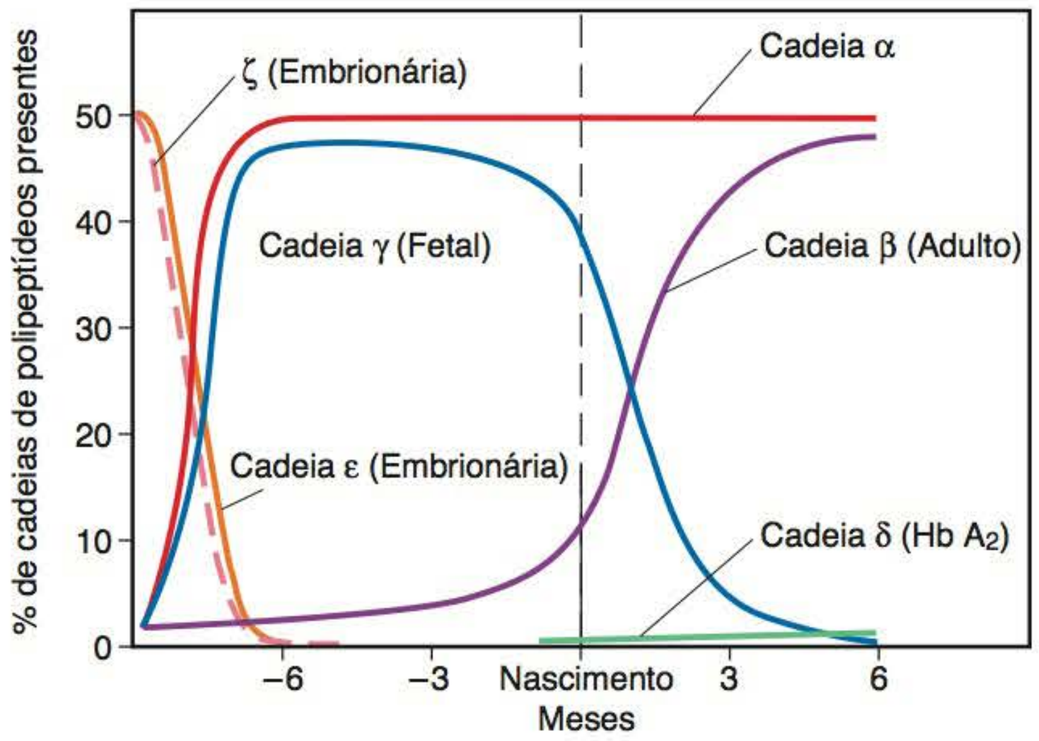


Figura 31.13 Proporções relativas de cadeias polipeptídicas de hemoglobina presentes durante a vida fetal e neonatal. (De Bunn, 1977)

HbA ($\alpha_2\beta_2$). A hemoglobina A é a principal hemoglobina do adulto normal, representando aproximadamente 97% do total. Ela consiste em duas cadeias α idênticas, cada uma com 141 aminoácidos, e duas cadeias β idênticas com 146 aminoácidos cada. Cada cadeia está ligada a um grupo heme. A molécula é elipsoidal, com quatro grupos heme na sua superfície, onde eles atuam combinando de forma reversível com o oxigênio.

HbF ($\alpha_2\gamma_2$). A hemoglobina F é a principal hemoglobina do feto e do recém-nascido. A maior afinidade pelo oxigênio do sangue fetal em comparação com o sangue do adulto deve-se à sua menor afinidade pelo 2,3-difosfoglicerato (DPG). As duas cadeias α são idênticas às da HbA, enquanto as duas cadeias γ, com 146 resíduos aminoácidos, diferem das cadeias β. Em indivíduos normais, a HbF possui dois tipos de cadeias γ, as quais diferem em um aminoácido, apresentando alanina ($^{A}\gamma$) ou glicina ($^{G}\gamma$) na posição 136. A relação entre cadeias $^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$ vai de 3:1 ao nascimento para 2:3 em torno dos 12 meses de vida (Weatherall, 2001). Existe um polimorfismo comum do gene $^{A}\gamma$, no qual a treonina substitui a isoleucina na posição 75. Essa variante da HbF é denominada HbF Sardenha e não apresenta anormalidades funcionais.

Durante a vida fetal, a HbF predomina, uma vez que a produção de cadeia γ é alta. A produção de cadeia β começa antes da vigésima semana de vida pré-natal, de modo que a Hb A representa 10% do total entre 20 a 35 semanas e 15 a 40% no momento do nascimento. Após o nascimento, quantidades menores de HbF são produzidas. Em torno do sexto mês, a HbF usualmente é inferior a 8% e, em torno do décimo segundo mês, ela é inferior a 5% em aproximadamente 90% das crianças. Entre 12 a 24 meses de idade, a HbF usualmente é inferior a 3%, mas varia de 3 a 10% em cerca de 20% das crianças. Após os 2 anos, a HbF normalmente é inferior a 2% nas crianças. Somente traços de HbF (< 1,0%) são observados nos adultos. Esse desvio da γ-globina para a β-globina é muito retardado em pacientes com doença falciforme, os quais podem não atingir o nível estável de HbF até a adolescência (Huisman, 1980). Um retardo similar no declínio da HbF também é observado no traço talassêmico (Schroter, 1981). Durante a vida fetal, todos os eritrócitos produzem e contêm HbF, enquanto nos adultos isso ocorre em somente 3 a 5% (Weatherall, 2001). As células que contêm HbF (Células F) podem aumentar em quantidade quando ocorre a reativação da síntese de HbF na gestação normal e em alguns distúrbios da eritropoiese, particularmente nas síndromes de insuficiência medular crônica. Aproximadamente 10% da hemoglobina total apresentam uma variante da HbF com carga negativa, designada HbF_1, decorrente da acetilação pós-translacional das extremidades com terminal amino das cadeias γ.

O aumento de HbF é observado em poucas hemoglobinopatias, nas talassemias β e δβ, e na persistência hereditária de hemoglobina fetal. Em determinados distúrbios hematopoéticos adquiridos, o nível de HbF também pode estar elevado. Eles incluem a anemia megaloblástica, mielofibrose, anemia aplásica, hemoglobinúria paroxística noturna, anemias refratárias, leucemias e tumores sólidos (até 5–10%). No segundo trimestre de gestação pode ocorrer um discreto aumento e, na mola hidatiforme, um aumento mais significativo (até 6%). Os níveis mais elevados de HbF são observados na leucemia mieloide crônica juvenil, anemia de Fanconi e eritroleucemia (30–50%).

HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$). A hemoglobina A_2 representa 1,5 a 3,5% da hemoglobina total do adulto. As suas duas cadeias α são as mesmas da HbA; as suas duas camadas δ diferem das cadeias β em apenas 10 de seus 146 aminoácidos. A transcrição menos eficiente do gene da δ-globina comparada com a do gene β é o resultado das diferenças na área promotora (Delvoye, 1993; Tang, 1997) e o segundo íntron (Kosche, 1985). A síntese de cadeia δ começa tardiamente durante a vida fetal. O nível de HbA_2 aumenta gradualmente durante o primeiro ano de vida, atingindo o nível do adulto durante esse período.

O aumento de HbA_2 é observado quase que exclusivamente nas β-talassemias. Ela raramente atinge 6% e nunca mais do que 12%. A HbA_2 encontra-se ocasionalmente aumentada no hipertireoidismo e na anemia megaloblástica, e o seu aumento foi relatado no traço falciforme (Whitten, 1981) e na doença falciforme, mas é um aumento modesto e o nível permanece inferior a 4,5%. Ela pode estar diminuída na anemia ferropriva e na α-talassemia. Quando um indivíduo com traço de β-talassemia apresenta deficiência grave de ferro concomitante, o aumento de HbA_2 pode ser inibido e parecer questionável. Nesses casos, a retestagem deve ser realizada após a correção da deficiência de ferro. Por causa do retardo desenvolvimental, a HbA_2 pode não ser útil no diagnóstico do traço de β-talassemia em crianças de baixa idade.

Hemoglobinas embrionárias. A cadeia ξ é o análogo embrionário da cadeia α e pode combinar-se com cadeias épsilon (ε) para formar a Hb Gower-1 (x_2e_2) ou com cadeias γ para formar a Hb Portland ($\xi_2\gamma_2$). A cadeia ε é a contraparte embrionária das cadeias γ, β e δ e combina-se com cadeias α para formar a Hb Gower-2 ($\alpha_2\varepsilon_2$). A Hb Gower-1, a Hb Portland e a Hb Gower-2 são as hemoglobinas embrionárias e são encontradas em embriões e fetos humanos normais com uma idade gestacional inferior a 3 meses.

Agrupamentos genéticos da globina. A síntese de globina é controlada por dois aglomerados separados de genes. O gene ξ e dois genes α (globinas semelhantes a α) em conjunto com pseudogenes que não funcionam encontram-se no cromossomo 16. Genes das cadeias ε, δ, β e duas cadeias γ (globinas semelhantes a β) e dois pseudogenes estão localizados no cromossomo 11 (Fig. 31.14). Observe que existem dois genes α funcionando em um cromossomo haploide (equilibrado por apenas um gene β). Os diferentes genes de globina evoluem de um ancestral comum por duplicação genética. Há um considerável poli-

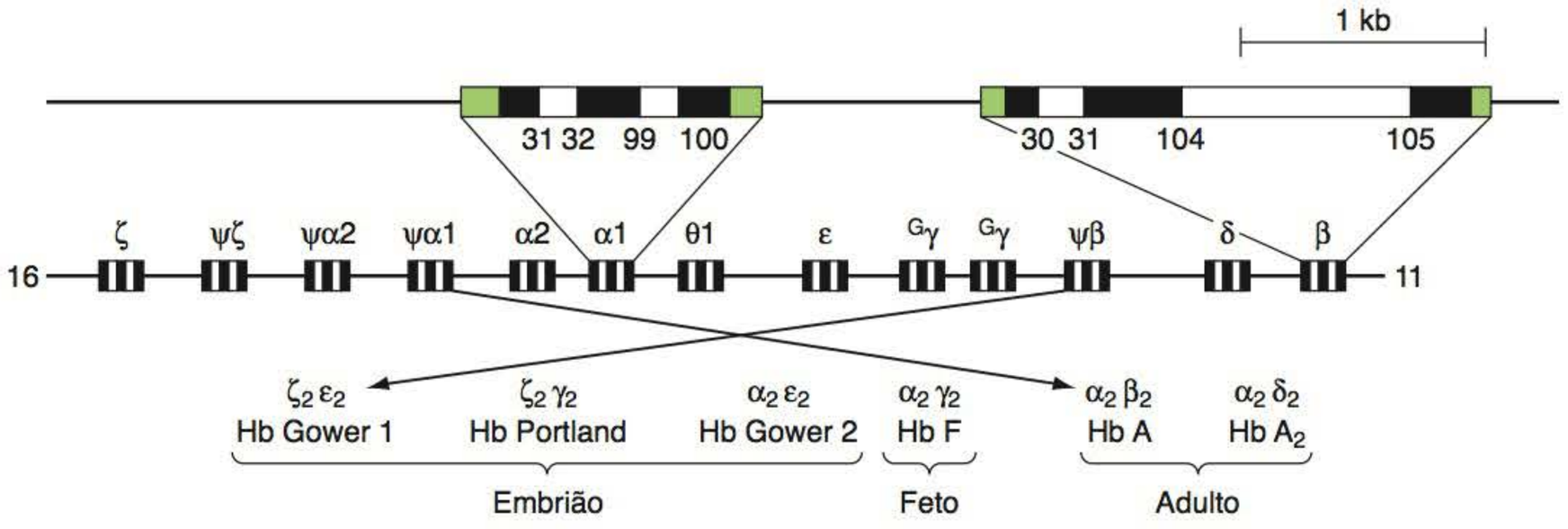


Figura 31.14 Aglomerados genéticos das globinas α e β no cromossomo 16 e 11, respectivamente. Nos genes estendidos das globinas α e β, os íntrons estão sombreados em preto, as regiões não codificadoras 5′ e 3′ estão em verde e os éxons não estão sombreados. (De Weatherall DJ, Clegg JB: The Thalassaemia Syndromes, 4th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 2001. Com permissão.)

morfismo das sequências reguladoras nesses aglomerados, responsável por variações normais e amplas diferenças fenotípicas nas hemoglobinopatias e síndromes talassêmicas.

Hemoglobinas glicosiladas. O termo glicosilação indica a ligação de um açúcar a uma proteína. Aproximadamente 5% da HbA sofrem glicosilação pós-translacional resultando na ligação de açúcares a resíduos serina, asparagina e hidroxilisina. As hemoglobinas glicosiladas foram designadas HbA_{1a} (< 1%), HbA_{1b} (< 2%) e HbA_{1c} (3%). A glicosilação da hemoglobina aumenta linearmente ao longo do período de vida de 120 dias dos eritrócitos. A HbA_{1c} contém uma molécula de glicose ligada não enzimaticamente por uma ligação cetoamina ao grupo amino do terminal amino de cada cadeia β. A HbA_{1c} está elevada 2 a 3 vezes em pacientes com diabetes melito. A mensuração da HbA_{1c} tem sido utilizada como um indicador do controle metabólico do diabetes durante os 2 a 3 meses precedentes (Bunn, 1994). A HbA_{1c} pode estar falsamente diminuída em condições associadas ao rápido turnover dos eritrócitos (p. ex., anemia hemolítica).

Investigação laboratorial de hemoglobinopatias e talassemias

As recomendações atuais incluem o hemograma completo realizado por um contador celular moderno com valores acurados de VCM, contagem eritrocitária, HbCM e CHbCM, pesquisa de HbH, dosagem de ferritina, cromatografia líquida de alta performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) para HbA_2 e dosagem de HbF e detecção de variantes da Hb, seguida por eletroforese alcalina e ácida quando uma variante for detectada e estudos adicionais (Sicledex) quando necessário (Clarke, 2000).

HPLC de troca catiônica. Numerosos sistemas automatizados foram desenvolvidos nos últimos 20 anos, e a HPLC é atualmente o método de escolha para a investigação inicial de variantes da hemoglobina e para separar e determinar as porcentagens das hemoglobinas A, A_2 e F (Wilson, 1983). Um sistema de HPLC de troca catiônica, Bio-Rad Variant do Bio-Rad Laboratories, é o kit comercial líder do mercado. Considera-se que a resolução desse sistema é similar à da focagem isoelétrica e existem disponíveis bases de dados de tempos de retenção (Figs. 31.15 e 31.16) (Riou, 1997; Globin Gene Server). Variantes detectadas pela HPLC são confirmadas por uma técnica alternativa (p. ex., eletroforese).

Eletroforese de hemoglobina e focagem isoelétrica. Moléculas de hemoglobina em uma solução alcalina apresentam uma carga negativa e movem-se em direção ao ânodo em um sistema eletroforético. Um método prático para a eletroforese de hemoglobina de rotina é o de acetato de celulose em pH alcalino (Birere, 1965). Ele é rápido e reprodutível e separa as hemoglobinas S, F, C, A e A_2. (Figs. 31.17 e 31.18). A quantificação das bandas principais é facilmente obtida. Aquelas com uma mobilidade eletroforética maior do que a da HbA em um pH de 8,6 são conhecidas como "hemoglobinas rápidas"; elas

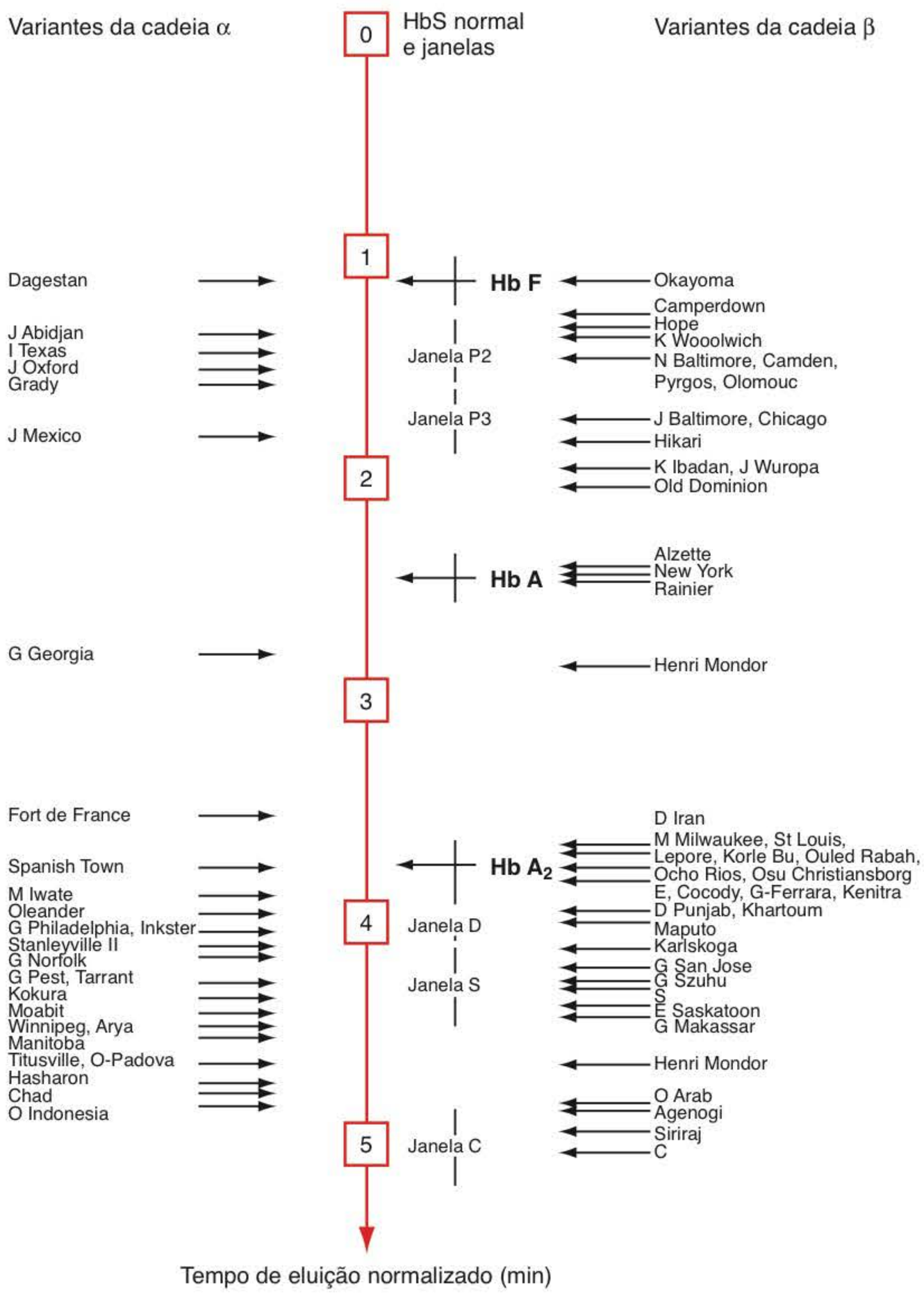


Figura 31.15 Tempos de eluição de 74 hemoglobinas. Eles foram normalizados a um valor de referência de 3,8 minutos para a HbA_2. Separação por HPLC de troca catiônica pelo sistema Bio-Rad Variant, utilizando o programa β Thalassemia Short. (De Riou, 1997).

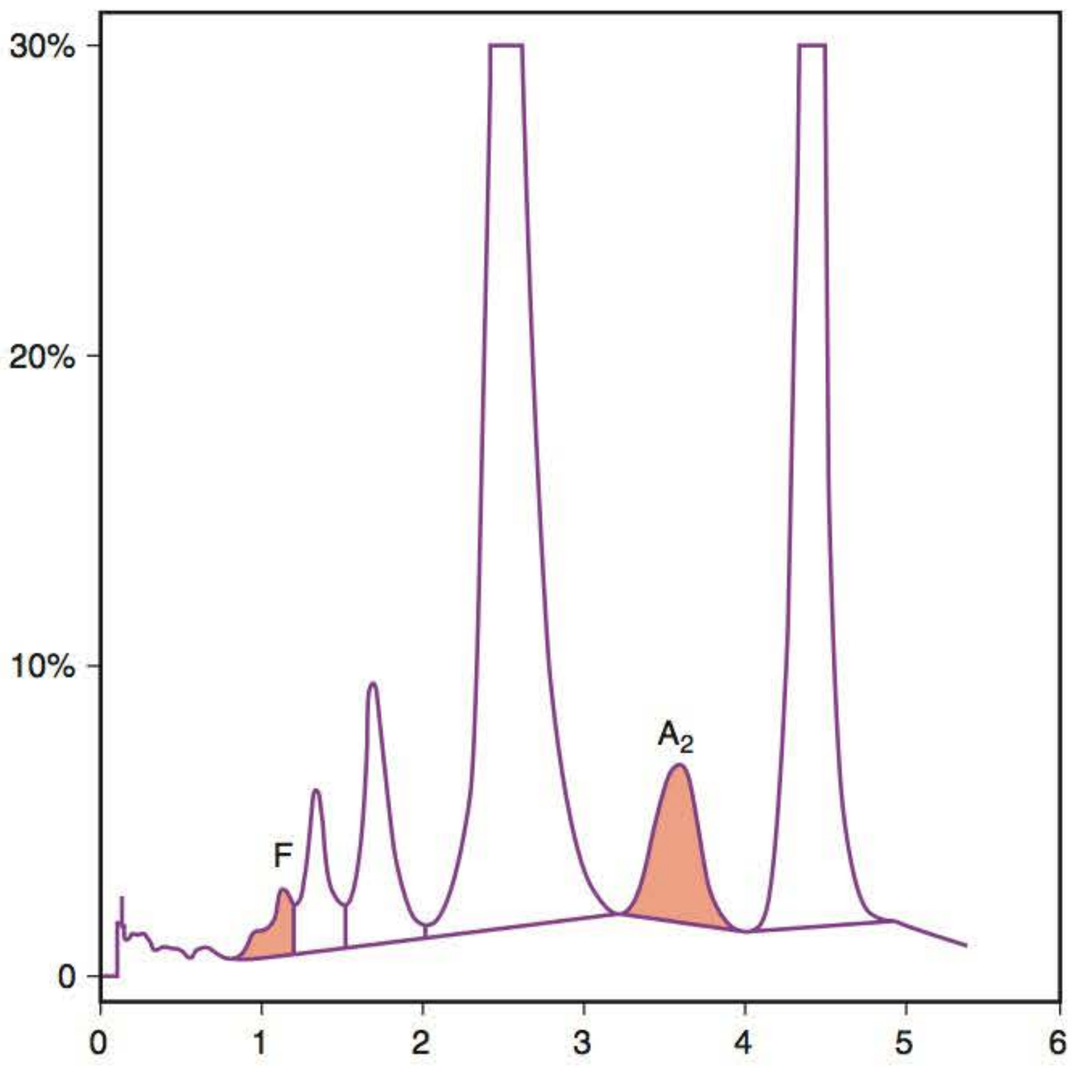


Figura 31.16 Separação por HPLC de troca catiônica. Paciente com traço falciforme; as hemoglobinas F, A e A_2 e hemoglobina anormal na janela S foram detectadas. A hemoglobina A_2 não pode ser quantificada por causa da presença de HbS. (Bio-Rad Variant Classic Hb Testing System.)

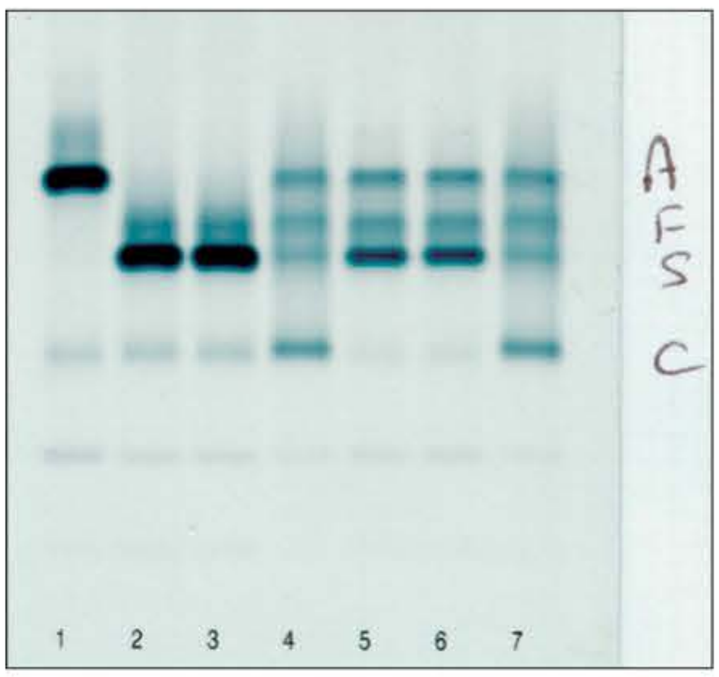


Figura 31.17 Separação eletroforética de hemoglobinas em pH alcalino. 1: adulto normal; 2 e 3: anemia falciforme em paciente com 17 anos; 5 e 6: paciente com anemia falciforme recentemente transfundido; 4 e 7: hemoglobinas padrão A, F, S, C. (Sistema Hydragel 7 hemoglobin/Hydrasys de Sebia, França.)

incluem, em ordem de mobilidade crescente, as hemoglobinas K, J, de Bart, N, I e H. As hemoglobinas A_2, C, E e O Árabe na extremidade lenta não são diferenciadas umas das outras, assim como as hemoglobinas S, D, G e Lepore. A eletroforese em ágar citrato em um pH ácido (Milner, 1975) provê uma separação imediata de hemoglobinas que migram juntas no acetato de celulose: S de D e G, e C de E e O (Fig. 31.19). A focagem isoelétrica separa as hemoglobinas baseada no seu ponto isoelétrico ao longo de um gradiente de pH com uma alta resolução (Fig. 31.20). A focagem isoelétrica capilar é um sistema automatizado em rápido desenvolvimento com um desempenho similar ao da HPLC (Mario, 1997).

Teste de desnaturação alcalina de HbF. A hemoglobina fetal resiste à desnaturação alcalina; a hemoglobina do adulto não (Singer, 1951). Um hemolisado é alcalinizado e, a seguir, neutralizado, e a hemoglobina do adulto desnaturada é precipitada pelo sulfato de amônio. Um filtrado conterá então apenas hemoglobina resistente ao álcali, a qual é mensurada e expressa como uma porcentagem do total. A modificação de Betke (1959) é confiável para a HbF inferior a 15%, mas subestima níveis mais altos de HbF. O intervalo de referência é de 0,2 a 1,0 para adultos. Esse método tem sido amplamente substituído pela estimação da HbF pela HPLC.

Teste de lâmina de eluição ácida de células F. A modificação do método original de Kleihauer e Betke por Shepard (1962) é útil para a análise da distribuição da HbF entre os eritrócitos. Outras hemoglobinas que não a HbF são removidas dos eritrócitos em uma lâmina de sangue secada a ar com um tampão ácido cítrico-fosfato (pH 3,3). Somente a HbF permanece nos eritrócitos fixados e a distribuição pode ser determinada após a coloração. Nos adultos normais, quase todos os eritrócitos aparecem como fantasmas; 1 a 5% dos eritrócitos contêm hemoglobina residual (HbF).

Na maioria dos tipos de persistência hereditária de hemoglobina fetal, a HbF é distribuída homogeneamente entre os eritrócitos (distribuição pancelular). Em todas as outras condições (p. ex., talassemia ou hemoglobinopatia) e no tipo menos comum de persistência hereditária de hemoglobina fetal suíça, a distribuição da HbF é heterogênea entre os eritrócitos (distribuição heterocelular). A citometria de fluxo também é utilizada para detectar células F.

Quantificação da HbA_2. A quantificação de hemoglobina A_2 é desafiadora por duas razões: (1) seu nível é baixo com uma faixa estreita e apenas um modesto aumento na doença, exigindo um alto grau de precisão, e (2) variantes da hemoglobina com carga ou tempo de retenção similar interferem na sua estimação. Vários métodos laboratoriais com acurácia e precisão variadas estão sendo utilizados. A HPLC com troca de cátion (Head, 2004), a cromatografia de microcoluna (Steinberg, 1991) e a eletroforese em acetato de celulose com eluição são consideradas suficientemente precisas. A densitometria de bandas eletroforéticas na eletroforese em acetato de celulose não é confiável (Schmidt, 1975). Cada vez mais, a HPLC com troca de cátion é o método de escolha, a qual também fornece uma mensuração acurada da HbF com a separação de variantes da hemoglobina. No entanto, em presença de HbS, seu nível torna-se falsamente elevado porque compostos da HbS apresentam tempos de retenção similares (Suh, 1996). Em presença da HbS, a cromatografia de microcoluna fornece uma mensuração adequada da HbA_2 (Head, 2004).

A estimativa da HbA_2 é utilizada principalmente no diagnóstico de traço de β-talassemia no qual ela está elevada até 7%. Valores de HbA_2 de indivíduos normais não se sobrepõem aos daqueles com traço de β-talassemia quando obtidos por meio da microcromatografia ou da HPLC. Contudo, ocorre alguma sobreposição com o método de eletroforese em acetato de celulose (Huisman, 1986). Os intervalos de referência da HbA_2 são de 1,5 a 3,5 da hemoglobina total.

Teste de afoiçamento – Teste de lâmina com metabissulfito. A adição de metabissulfito de sódio, uma substância redutora, ao sangue aumenta a deoxigenação da Hb e afoiçamento da HbS (Fig. 31.21). O teste não distingue a doença falciforme do traço falciforme ou de outras síndromes da HbS porque todos os eritrócitos sofrem afoiçamento. Entretanto, a afoiçamento ocorre mais rapidamente e em maior quantidade de HbS nas células. Testes positivos podem ocorrer com outras hemoglobinas que sofrem afoiçamento raras (HbsS Travis, C Harlem), HbI e alta concentração de Hb de Bart. A HbI, uma variante da cadeia α possui propriedades funcionais normais. Testes falso-negativos podem ocorrer se a concentração de HbS for inferior à 10% (em crianças muito jovens) ou se a deoxigenação for inadequada (p. ex., deterioração do reagente).

Teste de solubilidade falciforme. Neste teste não quantitativo, os eritrócitos são lisados com saponina e a hemoglobina é reduzida pela ditionita (hidrossulfito de sódio). A HbS reduzida é insolúvel em tampão inorgânico concentrado (tampão fosfato 2,3 M), e os polímeros da deoxi-HbS obstruem raios luminosos para produzir opacidade. O teste é útil na investigação da presença de HbS ou de outras hemoglobinas que sofrem afoiçamento em grandes quantidades de pessoas. Reações falso-positivas (soluções turvas) ocorrem também em presença de muitos corpúsculos de Heinz, como em distúrbios de hemoglobina instável após esplenectomia e em distúrbios de proteínas sanguíneas devidos à precipitação de proteínas plasmáticas. Reações falso-negativas (soluções transparentes) ocorrem quando a quantidade de HbS é muito pequena, como na anemia grave, ou quando o reagente tiver deteriorado.

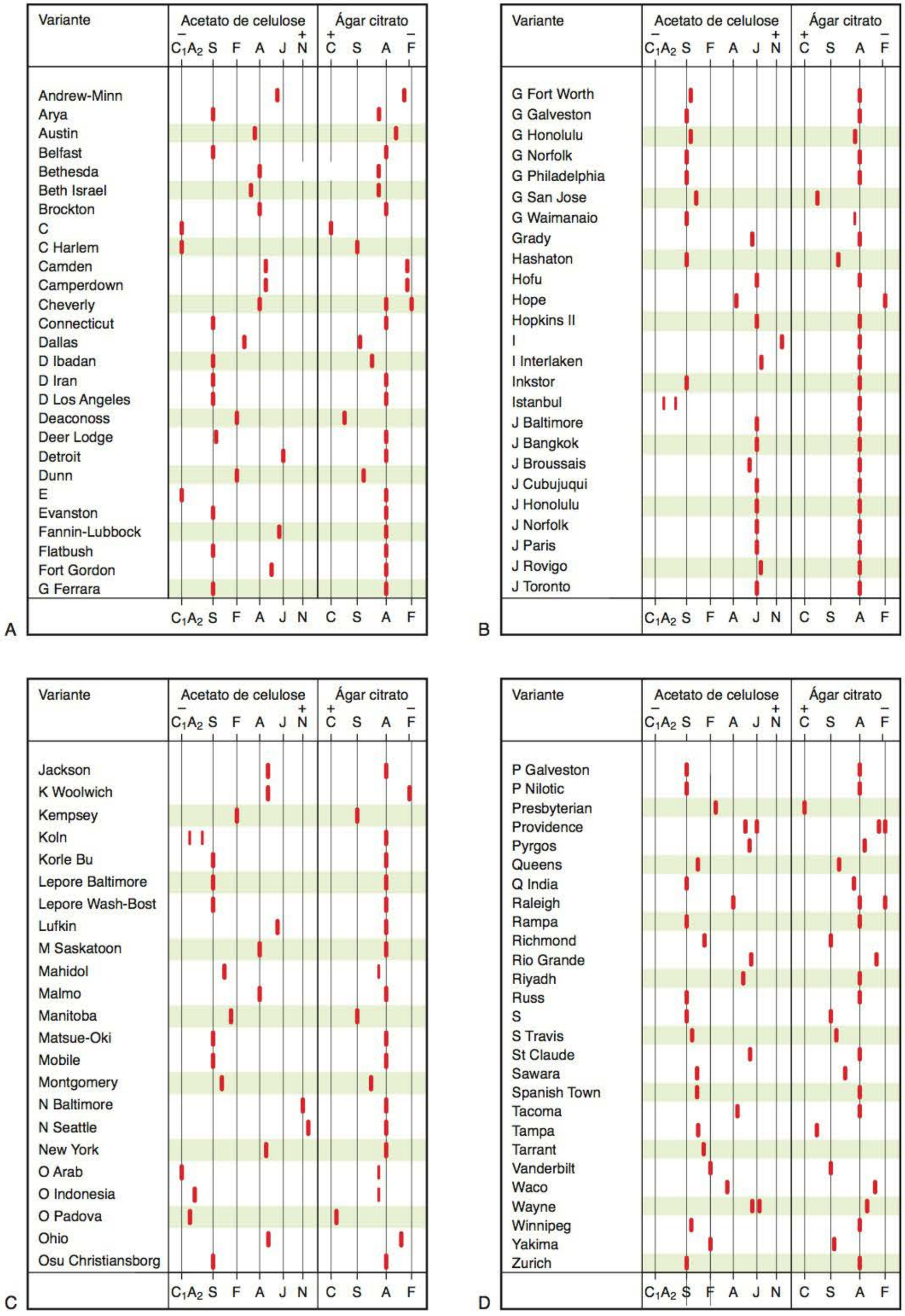


Figura 31.18 Mobilidade eletroforética de 102 variantes de hemoglobina em pH alcalino (acetato de celulose) e ácido (ágar citrato). (Cortesia de Winston Moo-Penn e Danny Jue.)

Análise de DNA (Old, 2001). A gap-PCR é utilizada para a detecção de deleções comuns na α-talassemia ou, menos frequentemente, em outras síndromes talassêmicas. Na gap-PCR, iniciadores ligam-se à região que flanqueia a deleção. O produto da PCR é apenas obtido dos alelos afetados, uma vez que os iniciadores ficam bem afastados no gene normal. Iniciadores adicionais que amplificam o alelo normal são utilizados para se avaliar a heterozigosidade/homozigosidade. O método Southern blot ainda é utilizado e pode avaliar todos os alelos e confirmar os resultados da PCR. Técnicas baseadas na PCR foram desenvolvidas para investigar mutações pontuais comuns na β-talassemia e variantes da hemoglobina. No *reverse dot-blot* ou hibridização reversa, oligonucleotídeos mutantes são fixados a uma membrana de náilon (ViennaLab) ou microplaca (Bio-Rad) e hibridizados com o DNA amplificado do paciente. No sistema de amplificação de mutação refratária (ARMS, *amplification refractory mutation system*), a amplificação ocorre apenas quando o iniciador combina perfeitamente com a sequência do DNA genômico. Iniciadores do ARMS estão disponíveis para a detecção de todas as mutações comuns da β-talassemia (Old, 1996). O sequenciamento baseado na PCR é utilizado para a confirmação de mutações únicas de nucleotídeos e pequenas deleções.

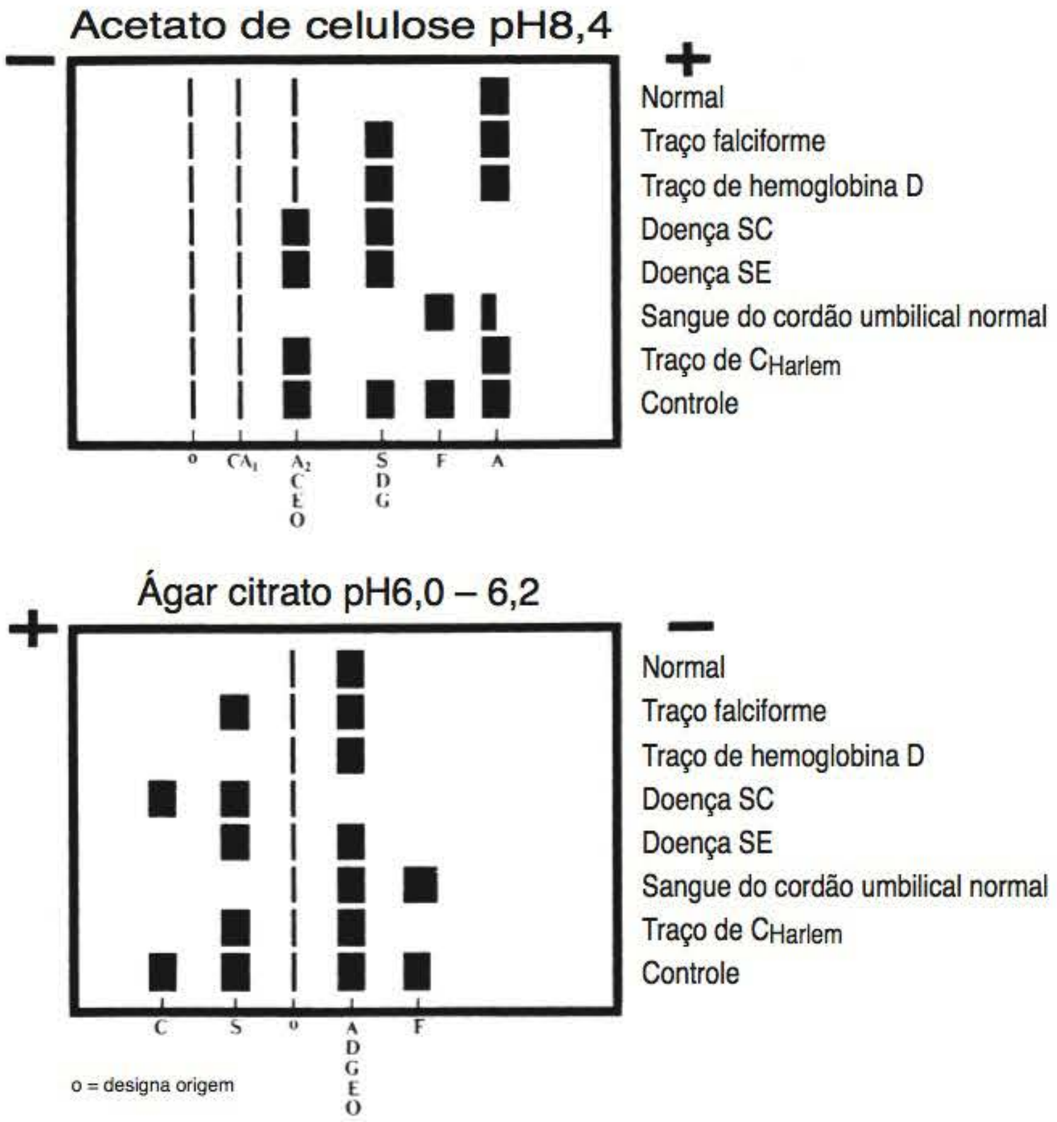


Figura 31.19 Eletroforese de hemoglobina. Comparação de várias amostras de hemoglobina em acetato de celulose (pH 8,4) e ágar citrato (pH 6), que mostra mobilidades relativas. O controle é uma amostra composta. As quantidades relativas de hemoglobina não são necessariamente proporcionais ao tamanho da banda. (Adaptado de Schmidt RM, Brosious, EF: Basic Laboratory Methods of Hemoglobinopathy Detection, 6th ed., Atlanta, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Centers for Disease Control, [HEW Publ. No. (CDC) 77-8266] 1976).

Variantes estruturais da hemoglobina

A partir de 2005, 893 variantes da hemoglobina foram identificadas (Huisman, 1998; Globin Gene Server). Noventa por cento delas são devidas a substituições únicas de aminoácido, enquanto nos 10% restantes a cadeia polipeptídica é anormalmente longa ou curta como consequência de erros de terminação, mutações frameshift, inserções, deleções ou cadeias fundidas ou híbridas.

A maioria afeta as cadeias da globina α ou β. O envolvimento da cadeia γ e da cadeia δ ocorre, mas por causa da pequena quantidade de hemoglobina envolvida, as suas variantes são menos frequentemente detectadas e raramente têm alguma importância clínica. Um grande número de variantes da hemoglobina que não causam doença foi descoberto em investigações.

Novas hemoglobinas são nomeadas com letras do alfabeto e, em seguida, nomes geográficos – usualmente para distinguir diferentes hemoglobinas com mobilidades eletroforéticas similares. Por exemplo, existem diversas variantes das hemoglobinas D, G e J. Algumas vezes uma variante é conhecida por múltiplos nomes, baseados em descobertas independentes. HbM indica uma variante que forma a metemoglobina. Substituições de aminoácido em algumas das variantes conhecidas da hemoglobina são listadas e classificadas por suas características funcionais na Tabela 31.4.

As hemoglobinas S, C, E e D são de longe as variantes mais importantes (Tab. 31.5). Com as talassemias, elas atingem frequências polimórficas em regiões onde a malária falciparum foi ou é endêmica, sendo responsáveis pela proteção contra o parasita por meio de mecanismos ainda não totalmente compreendidos.

Síndromes da hemoglobina anormal

Em variantes estruturais homozigotas da cadeia β, ambos os alelos para cadeias β anormais estão presentes, de modo que nenhuma das cadeias β normais (portanto, nenhuma HbA) são produzidas. Como os genes α, γ e δ são normais, a HbF e HbA_2 formadas são estrutu-

Tabela 31.4 Classificação funcional das variantes de hemoglobina

I. Homozigoto: polimorfismos da hemoglobina: variantes mais comuns

Hb S	$\alpha_2\beta_2^{6\,Val}$	Anemia hemolítica grave; afoiçamento
Hb C	$\alpha_2\beta_2^{6\,Lys}$	Anemia hemolítica grave
Hb D Punjab	$\alpha_2\beta_2^{121\,Gln}$	Ausência de anemia
Hb E	$\alpha_2\beta_2^{26\,Lys}$	Anemia microcítica leve

II. Heterozigoto: variantes da hemoglobina que causam aberrações funcionais ou anemia hemolítica na condição heterozigota.

A. Hemoglobinas associadas à metemoglobinemia e à cianose
- Hb M Boston $\alpha_2^{58Tyr}\beta_2$
- Hb M Iwate $\alpha_2^{87Tyr}\beta_2$
- Hb M Saskatoon $\alpha_2\beta_2^{63Tyr}$
- Hb M Milwaukee $\alpha_2\beta_2^{67Glu}$
- Hb M Hyde Park $\alpha_2\beta_2^{92Tyr}$
- Hb FM Osaka $\alpha_2\gamma_2^{63Tyr}$
- Hb FM Fort Ripley $\alpha_2\gamma_2^{92Tyr}$

B. Hemoglobinas associadas à afinidade pelo oxigênio alterada
1. Aumento da afinidade e policitemia
   - Hb Chesapeake $\alpha_2^{92Leu}\beta_2$
   - Hb J Capetown $\alpha_2^{92Gln}\beta_2$
   - Hb Malmo $\alpha_2\beta_2^{97Gln}$
   - Hb Yakima $\alpha_2\beta_2^{99His}$
   - Hb Kempsey $\alpha_2\beta_2^{99Asn}$
   - Hb Y psi (Ypsilanti) $\alpha_2\beta_2^{99Tyr}$
   - Hb Hiroshima $\alpha_2\beta_2^{146Asp}$
   - Hb Rainier $\alpha_2\beta_2^{145Cys}$
   - Hb Bethesda $\alpha_2\beta_2^{145His}$
2. Diminuição da afinidade – pode apresentar anemia leve ou cianose
   - Hb Kansas $\alpha_2\beta_2^{102Thr}$
   - Hb Titusville $\alpha_2^{94Asn}\beta_2$
   - Hb Providence $\alpha_2\beta_2^{82Asn}$
   - Hb Agenogi $\alpha_2\beta_2^{90Lys}$
   - Hb Beth Israel $\alpha_2\beta_2^{102Ser}$
   - Hb Yoshizuka $\alpha_2\beta_2^{108Asp}$

C. Hemoglobinas instáveis
1. A hemoglobina pode precipitar como corpúsculos de Heinz após esplenectomia: "anemia de corpúsculos de Heinz congênita"
   a. Hemólise grave: sem melhora após esplenectomia
      - Hb Bibba $\alpha_2^{136Pro}\beta_2$
      - Hb Hammersmith $\alpha_2\beta_2^{42Ser}$
      - Hb Bristol $\alpha_2\beta_2^{67Asp}$
      - Hb Olmsted $\alpha_2\beta_2^{141Arg}$
   b. Hemólise grave: melhora após esplenectomia
      - Hb Torino $\alpha_2^{43Val}\beta_2$
      - Hb Ann Arbor $\alpha_2^{80Arg}\beta_2$
      - Hb Genova $\alpha_2\beta_2^{28Pro}$
      - Hb Shepherd's Bush $\alpha_2\beta_2^{74Asp}$
      - Hb Koln $\alpha_2\beta_2^{98Met}$
      - Hb Wein $\alpha_2\beta_2^{130Asp}$
   c. Hemólise leve: exacerbações intermitentes
      - Hb L-Ferrara $\alpha_2^{47Gly}\beta_2$
      - Hb Hasharon $\alpha_2^{47His}\beta_2$
      - Hb Leiden $\alpha_2\beta_2^{6ou7}$ (Glu anulado)
      - Hb Freiburg $\alpha_2\beta_2$ (Val anulado)
      - Hb Seattle $\alpha_2\beta_2^{42Leu}$
      - Hb Zurich $\alpha_2\beta_2^{63Arg}$
      - Hb Gun Hill $\alpha_2\beta_2^{91\text{-}97}$ (5 a. a. anulado)
   d. Ausência de doença
      - Hb Etobicoke $\alpha_2^{84Arg}\beta_2$
      - Hb Dakar $\alpha_2^{112Gln}\beta_2$
      - Hb Sogn $\alpha_2\beta_2^{14Arg}$
      - Hb Tacoma $\alpha_2\beta_2^{30Ser}$
2. Tetrâmeros de cadeias normais: aparecem na talassemia
   - Hb Bart's γ_4
   - Hb H β_4
   - Hb α_4

Modificado parcialmente de Winslow, 1983, pp. 2281-2317.

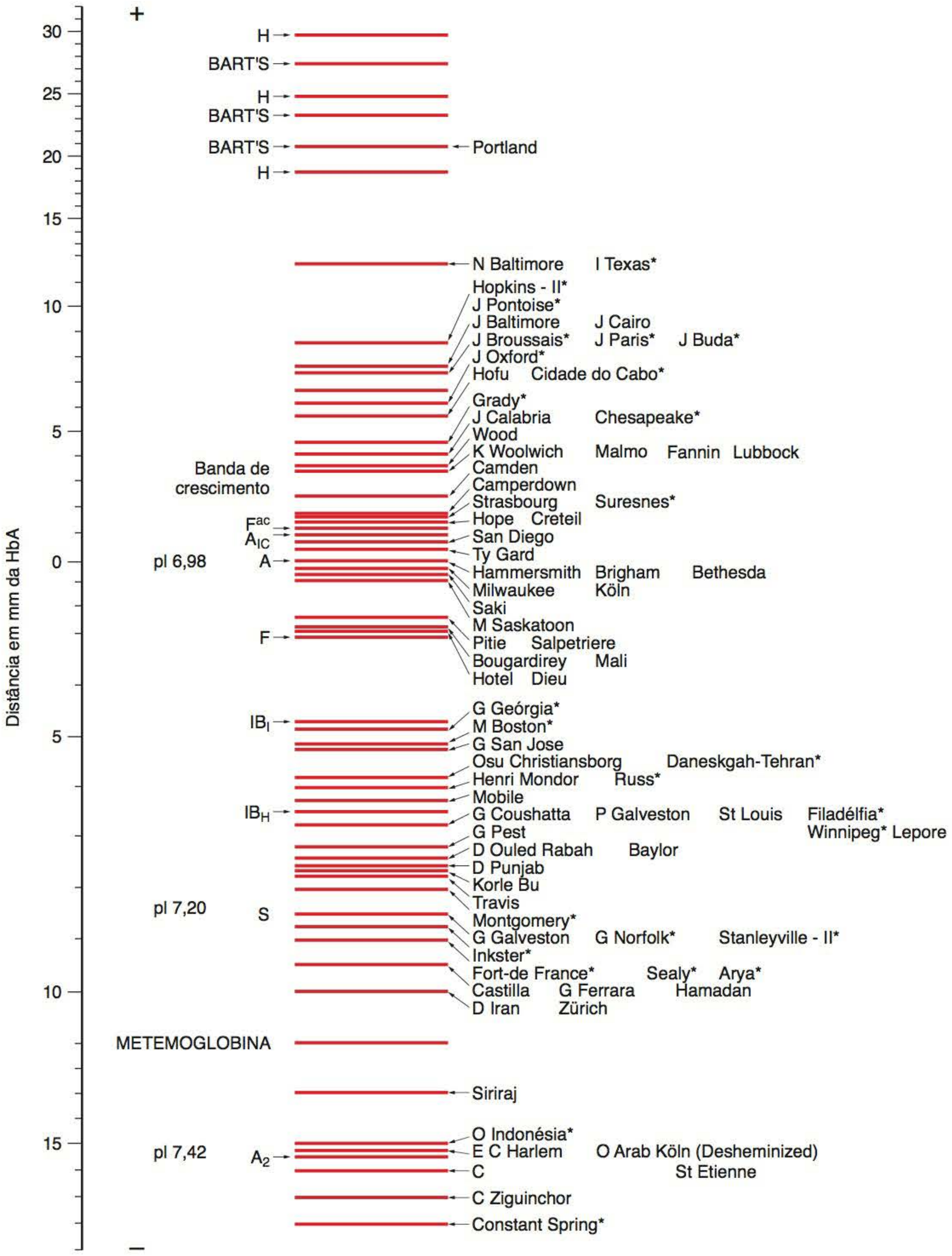


Figura 31.20 Comparação de 57 variantes de hemoglobina por focagem isoelétrica. O asterisco indica variantes da cadeia α. (Reproduzido de J Chromatogr Biomed Appl, Vol. 227, Bassett P, Braconnier F, Rosa J. An update on electrophoretic and chromatographic methods in the diagnosis of hemoglobinopaties, pp. 267-304, Copyright 1982, com permissão de Elsevier.)

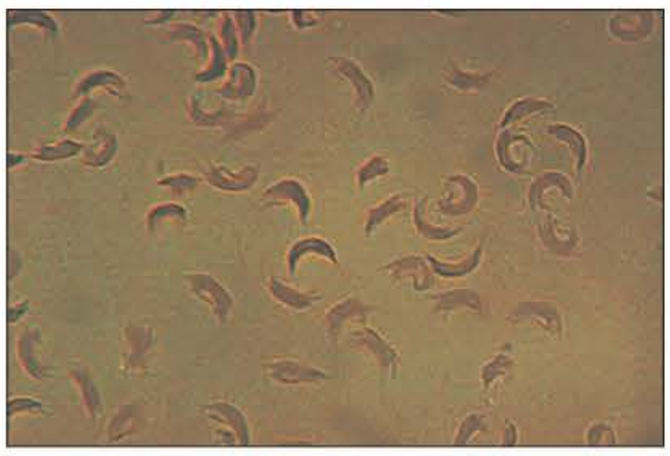


Figura 31.21 Preparação para célula falciforme, em metabissulfato de sódio; anemia falciforme. Mesmo no traço falciforme, todas as células acabam se tornando falciformes.

ralmente normais, embora possam estar presentes em quantidade aumentada.

Em variantes estruturais heterozigotas da cadeia β, a hemoglobina anormal está presente além das hemoglobinas A, F e A_2. Seu nível depende de sua taxa de síntese e estabilidade, mas também de sua disponibilidade para formar dímeros com cadeias α. Esse último processo é impulsionado por forças eletrostáticas entre a globina α carregada positivamente e a globina β negativa. Como a maioria das variantes da globina α adquire carga positiva, a sua união com a cadeia β positiva é usualmente menor que a da HbA. Em presença concomitante da α-talassemia, quando cadeias β competem pelo número insuficiente de globinas α, esses efeitos são exagerados e o nível da variante estrutural diminui ainda mais. Forças similares influenciam os níveis de HbA_2. A globina δ, subunidade da HbA_2, possui uma carga positiva

Tabela 31.5 Prevalência de distúrbios comuns da hemoglobina entre afro-americanos

	(%)
Traços	
α-talassemia silenciosa (αα/–α)	24
Hb AS	8,6
Traço da α-talassemia (–α/–α)	5,7
Hb AC	2,4
Traço da β-talassemia	1,5
HPFH	0,1
Hbs D e G	0,026
Todos os outros	0,3
Anemia falciforme	
Hb SS	0,16
Hb S/C	0,13
Hb S/talassemia	0,06
Hb S/HPHF	0,004
Outros distúrbios	
Hb CC	0,02
Hb C/β-talassemia	0,02
β-talassemia homozigota	0,005

Dados de Schneider, 1976; Pierce, 1977 e Motulsky, 1973.

importante, não favorável para a formação de dímero. Variantes da cadeia β carregadas positivamente também têm pouca afinidade pelas cadeias α, deixando um excesso de cadeias α para se unir à globina δ e acarretando um aumento discreto de HbA_2. Isso foi descrito no traço das hemoglobinas S e C, mas o aumento é tão mínimo que a sua existência sempre foi questionada.

Heterozigotos duplos para variantes estruturais da cadeia β e da β-talassemia são bem conhecidos. Aqui, a quantidade de hemoglobina anormal excede a hemoglobina normal, em contraste com as hemoglobinas estruturais β heterozigotas, nas quais o contrário é verdadeiro. São exemplos a HbS-talassemia e a HbE-talassemia.

Em variantes estruturais da cadeia α heterozigotas, a anormalidade na cadeia α afetará todos os três tipos de hemoglobina. Por essa razão, são observados seis hemoglobinas diferentes, três formas normais e três anormais. São exemplos a HbD Baltimore, Hb Ann Harbor e HbM Boston.

Heterozigotos duplos para anormalidades de duas cadeias β produzem duas cadeias β anormais diferentes. Em consequência disso, observa-se a presença de duas hemoglobinas anormais e de nenhuma hemoglobina A. Um exemplo disso é a doença da HbSC. Heterozigotos duplos para anormalidades das cadeias β e δ e anormalidades das cadeias α e β são raros, mas forneceram informações importantes. Os últimos apresentam quatro tipos importantes de hemoglobina na eletroforese.

Anemia falciforme

Traço falciforme (HbAS)

O estado heterozigoto para a HbS é a hemoglobinopatia mais comum nos Estados Unidos. Ele está presente em aproximadamente 8% dos afro-americanos (Schneider, 1976) e em cerca de 45% da população de certas áreas da África Ocidental. O gene é observado em toda a África Subsaariana e, em uma frequência muito mais baixa, no Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. O traço HbS é uma condição completamente benigna sem sintomas clínicos ou anormalidades hematológicas. O risco adicional associado ao traço falciforme é mínimo e somente em circunstâncias muito raras. Tensões de oxigênio extremamente baixas podem desencadear o afoiçamento, e alguns poucos indivíduos apresentaram infarto esplênico ao voarem em altitudes muito elevadas em aviões não pressurizados. Em mulheres, foi descrita uma incidência discretamente maior de hematúria e comprometimento da capacidade de concentrar urina e bacteriúria. O traço falciforme confere proteção às crianças contra os efeitos letais da malária falciparum, o qual é responsável pela maior concentração de HbS no centro da África.

A lâmina de sangue corada parece normal, exceto talvez pela presença de algumas poucas células-alvo. As contagens de células sanguíneas são normais. A preparação de célula falciforme é positiva e quase todos os eritrócitos acabam sofrendo afoiçamento. O teste de solubilidade é positivo.

A separação de hemoglobina revela 60% de HbA, 40% de HbS, HbF normal, HbA_2 normal ou discretamente elevada (até 4,5%).

A proporção de HbS diminui em presença da α-talassemia. A quantidade de HbS é inferior a 35% quando um gene α é deletado e inferior a 29% quando dois genes são perdidos (Head, 2004). No último caso, as células são hipocrômicas e microcíticas. Como 27% dos afro-americanos são portadores do gene da α^+-talassemia, não é surpresa que esse dilema diagnóstico seja muito comum. A HbS também pode estar diminuída na deficiência de ferro e folato.

Anemia falciforme (HbSS)

A doença da HbS homozigota é uma anemia hemolítica crônica grave que se manifesta primeiramente no início da infância e é frequentemente fatal antes dos 30 anos de vida. Com o tratamento médico moderno, muitos pacientes vivem mais tempo, mas a idade média de óbito nos Estados Unidos ainda é de aproximadamente 40 anos. A hemoglobina S é encontrada principalmente na população negra; 1 em cada 600 indivíduos da raça negra apresenta anemia falciforme nos Estados Unidos (Steinberg, 1999).

Na hemoglobina S, (β_6 glu → val) o ácido glutâmico na sexta posição na cadeia β é substituído pela valina. A hemoglobina S é livremente solúvel quando totalmente oxigenada. Quando o oxigênio é removido, a HbS se polimeriza e forma tactoides (cristais fluidos) que são rígidos e deformam a célula, conferindo-lhe a forma característica que justifica o nome dado à patologia. Uma forte interação entre a cadeia lateral da β_6 valina e a bolsa hidrofóbica de β_{85} fenilalanina e 88 leucina de outra molécula de HbS é provavelmente a base da formação do polímero. Na doença HbS homozigota, a afoiçamento ocorre em tensões de oxigênio fisiológicas e a rigidez da célula é responsável tanto pela hemólise quanto pela maioria das complicações. Essas células irreversivelmente falciformes podem ser decorrentes da reorganização da membrana durante episódios repetidos de afoiçamento e desafoiçamento além da desidratação celular que reduz acentuadamente a deformabilidade celular (Mohandas, 1993). As células falciformes contêm níveis altos de cálcio, o que estimula a perda de potássio e água (efeito Gardos) e desidratação celular exagerada (Weatherall, 1999). O componente hemolítico é principalmente extracelular e causado pela aglomeração da banda 3 da membrana celular, com o consequente aumento da ligação de IgG e reconhecimento de macrófagos. Integrinas ($\alpha_4\beta_1$) na superfície da célula falciforme ligam-se à fibronectina e moléculas de adesão nas células endoteliais. Isso é potencializado por citocinas inflamatórias, pelo fator de von Willebrand e ativação de plaquetas. Em conjunto, essas interações causam oclusão vascular.

Complicações. No início da infância ocorre edema bilateral doloroso do dorso das mãos ou dos pés em consequência do afoiçamento e da estase capilar. Isso é conhecido como síndrome da mão-pé ou dactilite falciforme. Essa manifestação dura aproximadamente 2 semanas, é acompanhada por periostite observada em estudos radiográficos, e não ocorre após os 4 anos de vida.

O baço é o centro de três complicações. Uma crise de sequestro esplênico refere-se ao acúmulo abrupto de sangue e aumento rápido do baço, resultando em choque hipovolêmico. Isso pode ocorrer no início da infância, período em que a esplenomegalia está presente e é frequentemente precedida por infecção. A asplenia funcional (Pearson, 1969) consiste em respostas inadequadas de anticorpos em algumas condições e diminuição da capacidade do sistema reticuloendotelial de eliminar bactérias e material particulado do sangue, provavelmente por causa do bloqueio reticuloendotelial. Isso pode explicar parcialmente o maior risco de infecção em crianças com a doença. Infecções por salmonela ou pneumococo são incomumente prevalentes em crianças com anemia falciforme. Episódios de oclusão vascular acarretam infarto progressivo, fibrose e contração do baço, a chamada autoesplenectomia. Embora a esplenomegalia esteja presente na infância, um pequeno remanescente fibrótico é a regra no adulto.

A partir da primeira infância, os pacientes não conseguem produzir uma urina concentrada, aparentemente por causa da lesão anóxica da medula renal. A hematúria como consequência da necrose papi-

lar é comum. A insuficiência renal ocorre em 5 a 20% dos adultos (Steinberg, 1999).

Crises de oclusão vascular são episódios debilitantes de dor abdominal, óssea ou articular, acompanhados por febre, provavelmente em razão da oclusão de pequenos vasos sanguíneos por massas de células falciformes. A síndrome torácica aguda representa episódios de dor torácica aguda geralmente associada a um novo infiltrado na radiografia torácica. Aproximadamente 40% dos pacientes apresentam pelo menos um episódio de síndrome torácica aguda. Embora uma etiologia infecciosa tenha sido suspeitada em estudos iniciais, considera-se atualmente que a embolia gordurosa tem um papel importante nessa síndrome. As várias complicações como consequência das crises de oclusão vascular recorrentes envolvem muitos órgãos do corpo (Steinberg, 1999).

Ocasionalmente, crises aplásicas podem ocorrer em qualquer paciente com anemia hemolítica crônica. Uma insuficiência temporária da produção de eritrócitos que não seria percebida em um indivíduo com um tempo de vida normal dos eritrócitos causa uma queda grave na concentração de hemoglobina na anemia hemolítica. Isso pode ser decorrente de infecção (particularmente pelo parvovírus B), exposição a fármacos tóxicos ou deficiência de ácido fólico. Algumas vezes, nenhuma causa é encontrada. Crises hemolíticas devidas a um maior aumento da hemólise são raras.

Diagnóstico. A anemia é normocítica e normocrômica; a policromasia está aumentada e há presença de eritrócitos nucleados. Células falciformes são quase sempre observadas no esfregaço corado (Fig. 31.22). Células-alvo são numerosas e corpúsculos de Howell-Jolly e Pappenheimer são regularmente observados em crianças maiores e adultos como resultado da aplasia. O micro-hematócrito como uma estimativa do grau de anemia não é confiável por causa do aprisionamento excessivo de plasma. A neutrofilia e a trombocitose são usuais. A medula óssea apresenta hiperplasia normoblástica.

Nenhuma HbA é encontrada se o paciente não tiver recebido uma transfusão recentemente. Mais de 80% da hemoglobina são de HbS, 1 a 20% de HbF e 2,0 a 4,5% de HbA_2 (Wrightstone, 1974). A hemoglobina fetal é distribuída de modo não uniforme entre os eritrócitos. A HbS e várias hemoglobinas D e G apresentam a mesma mobilidade eletroforética em pH alcalino, mas dentre elas somente a HbS produz um teste de afoiçamento positivo.

Doença da Hb SC. A frequência da doença da HbSC é quase a mesma que a da doença da HbSS em afro-americanos. Ela causa uma anemia hemolítica leve. As crises são menos frequentes e menos dolorosas que na anemia falciforme. O início ocorre geralmente na infância, mas ela pode passar despercebida até um período mais tardio da vida. A expectativa de vida é reduzida apenas modestamente. O físico do paciente é normal ou robusto em contraste com as características astênicas da anemia falciforme. A esplenomegalia pode ser o único achado no exame físico. Observa-se a ocorrência de fadiga, dispneia ao esforço, infecções das vias aéreas superiores frequentes, crises de icterícia leve e artralgias. A dor constante no quadril ou na região lombar pode estar presente com necrose asséptica da cabeça do fêmur. Existem relatos de hematúria devida ao infarto medular renal e infartos esplênicos. Na gestação, as crises são mais frequentes e ocorre um aumento da tendência trombótica, a qual pode causar tromboembolia maciça e morte súbita após o nascimento. Existe uma maior incidência de retinopatia na doença da HbSC que na doença da HbSS.

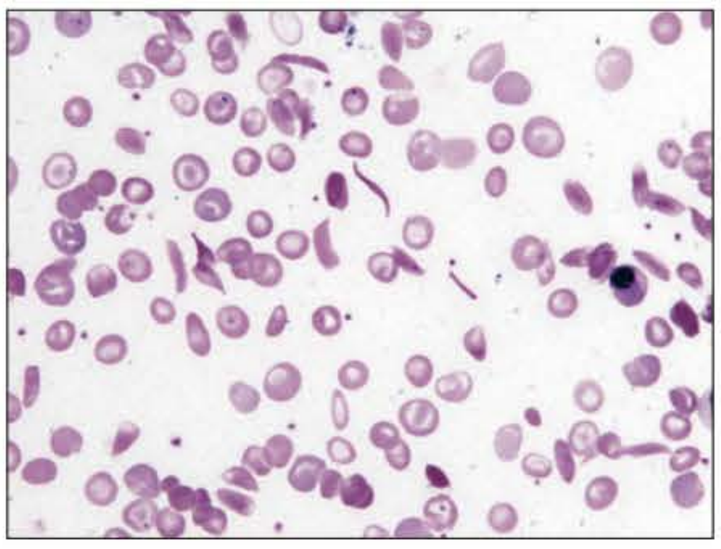


Figura 31.22 Lâmina de sangue, anemia falciforme. Os eritrócitos estão bem distantes uns dos outros, sugerindo uma anemia grave. Numerosas células falciformes e células-alvo estão presentes. Próximo do eritrócito nucleado, observa-se a presença de células elípticas. Estas células apresentam um centro denso, em vez da palidez central usual, sugerindo que elas sejam células falciformes incipientes. (× 500)

A anemia varia de moderada a muito leve e é normocítica e normocrômica. A anisocitose e a poiquilocitose são leves a intensas e as células-alvo são numerosas (até 85% dos eritrócitos). Células falciformes roliças ou anguladas estão frequentemente presentes na lâmina. O teste de afoiçamento é positivo. A porcentagem de HbS é de 50% e de HbC é levemente menor. A de HbF usualmente é inferior a 2%. As proporções de hemoglobinas são as mesmas em pacientes com α-talassemia coexistente (Steinberg, 1983).

HbS/β-talassemia. Trata-se do terceiro distúrbio falciforme mais comum após as doenças da HbSS e da HbSC em afro-americanos e o mais comum em indivíduos do Mediterrâneo. Comumente, ela apresenta uma evolução mais leve em indivíduos negros (usualmente, S/β^+-talassemia), mas causa um distúrbio falciforme grave com manifestações similares às da anemia falciforme em indivíduos de ascendência italiana, turca ou grega.

Na HbS/β^0-talassemia, a HbA está ausente; a porcentagem de HbS é de 75 a 90%, a de HbF é de 5 a 20% e a de HbA_2 é de 4 a 6%. Esse distúrbio assemelha-se clínica e hematologicamente à doença falciforme, exceto no que concerne o baço, o qual permanece aumentado de volume após a infância e na vida adulta. A principal diferença é que na HbS/β^0-talassemia, o VCM e a HbCM estão diminuídos e a HbA_2 pode estar significativamente aumentada. O estudo familiar é frequentemente necessário para uma distinção clara (Lehmann, 1977; Wrightstone, 1974). No esfregaço de sangue, observa-se a presença de microcitose pronunciada, hipocromia variável e muitas células-alvo. Como consequência da redução da hemoglobina celular, polímeros de HbS são formados mais lentamente e menos células falciformes estão presentes no esfregaço.

Na HbS/β^+-talassemia, a porcentagem de HbA é de 15 a 30%, a de HbS é superior a 50%, a de HbF é de 1 a 20% e a de HbA_2 é de 4 a 6%. Embora esses indivíduos possam clinicamente se assemelhar àqueles com traço falciforme (HbAS), na S/β^+-talassemia a quantidade de HbS é sempre superior a de HbA, enquanto na HbAS, a HbA sempre excede a HbS.

HbSS/ α-talassemia. Dos pacientes com anemia falciforme, 30 a 40% são heterozigotos e 2 a 3% são homozigotos para a α^+-talassemia (Higgs, 1982). O VCM (83 fL em heterozigotos e 72 fL em homozigotos) e a HbCM estão diminuídos. O nível de hemoglobina é mais alto e a contagem de reticulócitos é significativamente mais baixa em comparação com a observada na anemia falciforme. No esfregaço, as células falciformes são incomumente similares às da HbS/β^0-talassemia. Embora a anemia seja menos grave, a doença vascular oclusiva não é e alguns estudos mostram inclusive um aumento da morbidade e da mortalidade. Como foi descrito anteriormente, cadeias δ competem com sucesso com cadeias β^s carregadas positivamente por uma quantidade limitada de cadeias α e o nível de HbA_2 aumenta. Hematologicamente, isso não pode ser separado da HbS/β^0-talassemia (Tab. 31.6). Sempre que a microcitose e o aumento da HbA_2 estiverem presentes na anemia falciforme, estudos familiares ou moleculares devem ser realizados para diferenciar essas entidades.

Doença da Hb SD (HbS/D-Los Angeles). A doença SD simula a anemia falciforme, mas é menos grave. Por isso, ela também pode se

Tabela 31.6 Diagnóstico diferencial das síndromes falciformes/talassêmicas

Genótipo	Expressão clínica	Hb	MCV	Hb F	Hb A_2	Hb A
SS	Grave	7–8	85–95	2–20	2–4	
S/β^0-tal	Moderada a grave	8–10	65–75	5–20	4–6	
SS/α-tal	Moderada a grave	8–10	70–85	2–20	3–5	
S/HPHF	Assintomática a leve	13–14	75–85	20–30	1–3	
S/β^+-tal	Leve a moderada	11–12	70–80	1–13	3–6	10–30

Modificado de Bunn, 1986, e Steinberg, 2001.

assemelhar à doença SC. Ela é ocasionalmente observada na população afro-americana. Na eletroforese de rotina (alcalina), o padrão é indiferenciável do da anemia falciforme porque a HbS e a HbD não podem ser separadas. A eletroforese em ágar gel no pH de 6,2 separa a HbS e a HbD.

HbS/O Arab. Compostos heterozigotos de HbS e HbO Arab (β 121 glu → lis) apresentam um distúrbio falciforme grave. A HbO Arab é encontrada em indivíduos negros e árabes. A HbE e algumas outras variantes β menos frequentes também causam anemia falciforme com a HbS. A coexistência de uma variante da cadeia α e do traço falciforme não causam distúrbio falciforme.

Outras variantes comuns da cadeia β

Traço HbC. (β 6 glu→lis). A hemoglobina C é prevalente em africanos do oeste e em aproximadamente 2 a 3% dos indivíduos negros. O estado heterozigoto (HbAC) é assintomático, sem anemia, com VCM e tempo de vida dos eritrócitos normais. A CHbCM pode estar levemente elevada. Células-alvo estão presentes na lâmina de sangue. A HbC representa aproximadamente 40% da hemoglobina total. Quando existe microcitose, ela é usualmente causada pela α-talassemia coexistente e a HbC está reduzida para 38, 32 e 24% em pacientes com três, dois e um gene α, respectivamente (Huissman, 1977).

Doença da HbC. A doença da HbC homozigota é uma anemia hemolítica leve com esplenomegalia que é geralmente assintomática, mas ocasionalmente causa icterícia e desconforto abdominal. A expectativa de vida é normal. Nos Estados Unidos, 0,02% dos indivíduos negros apresentam doença da HbC (Schneider, 1976). A reticulose é baixa para o grau de anemia. A anemia é em grande parte uma consequência da baixa afinidade pelo oxigênio da HbC (Bunn, 1986) e não deve ser tratada. O VCM está normal ou diminuído e a CHbCM está normal ou aumentada. Várias células-alvo com uma mistura de microesferócitos e policromasia mínima são observadas no sangue. A fragilidade osmótica é bifásica, tanto com aumento quanto com diminuição da fragilidade, mas atualmente não é utilizada no diagnóstico. Cristais hexagonais ou em forma de bastonetes podem ser observados em eritrócitos no esfregaço corado, especialmente após esplenectomia ou após uma secagem lenta do esfregaço (Fig. 31.23). Quando oposta à HbS, cristais de HbC tendem a fundir em uma P_{O2} baixa e não causam doença vascular oclusiva. Os eritrócitos são desidratados (provocando aumento da CHbCM), por causa da perda de cátions e água em consequência da interação da hemoglobina anormal com a membrana eritrocitária. Como resultado, as células são mais rígidas e menos deformáveis do que o normal, aumentando a sua probabilidade de serem aprisionadas e destruídas no baço. A HbF está elevada (2–4%) e a HbA_2, quando mensurada pela HPLC, pode estar discretamente elevada. O restante da hemoglobina é de HbC.

HbC/β^+-talassemia. Ela ocorre principalmente em indivíduos negros, nos quais ela tende a provocar poucos problemas, exceto a anemia na gestação. Os índices eritrocitários são típicos do traço da β-talassemia, mas o indivíduo apresenta anisocitose e 20 a 50% de células-alvo. Geralmente, a porcentagem de HbC é de 65 a 80%, a de HbA é de 16 a 30% e a de HbF é de 2 a 5%.

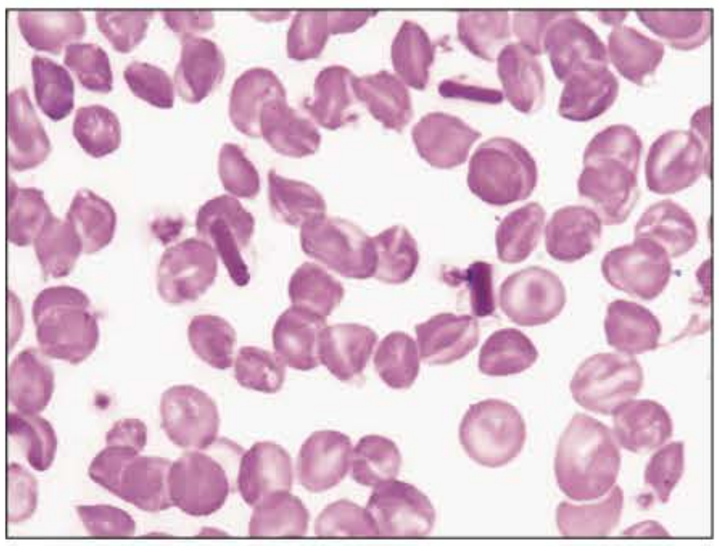


Figura 31.23 Doença da hemoglobina C, após esplenectomia. Antes da esplenectomia, a única anormalidade morfológica era a presença de células-alvo. Após a esplenectomia, foi detectada a presença de corpúsculos de Howell-Jolly e cristais de hemoglobina, como os observados no centro. Observe que quase toda a hemoglobina nessa célula particular está na barra escura e a membrana ainda é visível. Alguns cristais são distintamente hexagonais. (× 1.000)

HbC/β^0-talassemia. Indivíduos da região mediterrânea usualmente apresentam uma anemia hemolítica moderadamente grave com o genótipo β^0 ou grave com o genótipo β^+. Essa combinação é extremamente rara na população africana. A HbC/β^0-talassemia pode ser difícil de ser diferenciada da doença HbC porque a HbA está ausente em ambas e ocorre uma sobreposição dos níveis das hemoglobinas A_2 e F. A HbA_2 aumenta cerca de duas vezes o valor normal e a HbF aumenta para 3 a 10%.

HbD Los Angeles (Punjab) (β 121 glu→gln). Ela constitui a variante D mais comum em afro-americanos (< 0,02%). Na região indiana do Punjab, a heterogosidade atinge 3% (Bunn, 1986). Homozigotos apresentam índices eritrocitários normais, sem evidências de hemólise e 95% de HbD com HbF e HbA_2 normais (Bunn, 1986). Duplos heterozigotos para HbD Punjab/β^0-talassemia apresentam uma anemia hemolítica leve com índices eritrocitários talassêmicos e aumento de hemoglobinas F e A_2.

A importância da HbD Punjab é que a heterogosidade composta com a HbS produz um distúrbio falciforme moderadamente grave (ver doença HbSD acima). Outras hemoglobinas D (D Iran, D Ibadan) e G menos frequentes não causam afoiçamento, uma diferença importante para o aconselhamento genético. As hemobloginas D e G migram com a HbS na eletroforese alcalina, mas são separadas da HbS em pH ácido, migrando com a HbA. É mais difícil separar uma da outra. A análise cuidadosa da focagem isoelétrica e da HPLC é útil na maioria dos casos.

HbG Philadelphia (α 68asn→lis). Trata-se da variante mais comum da cadeia α em indivíduos negros (Schneider, 1976). Quase invariavelmente, o gene α relacionado está deletado ($-\alpha^G$). Heterozigotos simples ($-\alpha^G/-\alpha\alpha$) apresentam 30% de HbG e índices eritrocitários normais, mas heterozigotos duplos também com deleção do gene α no outro cromossomo ($-\alpha^G/-\alpha$) apresentam 45% de HbG e um fenótipo de traço talassêmico. Como em outras variantes da cadeia α, uma hemoglobina menor, uma combinação de α^G e δ está presente próximo à HbA_2 e ajuda a diferenciar a HbG Philadelphia da variante da cadeia β das hemoglobinas G e D.

HbE (β 26 glu→lis). Trata-se provavelmente da variante mais prevalente da hemoglobina e é a terceira mais comum nos Estados Unidos, atrás da S e da C. Ela é observada principalmente no Sudeste Asiático, especialmente em indivíduos da Tailândia e de Burma, mas também é observada em indivíduos negros e brancos. A HbE está associada ao fenótipo da β-talassemia assim como a uma cadeia de globina estruturalmente anormal. A mutação que causa a substituição de aminoácido também ativa um sítio de clivagem obscuro que compete com o sítio doador normal de clivagem do DNA e o RNA normalmente processado diminui. No laboratório, a instabilidade da HbE pode ser demonstrada. Ela precipita anormalmente no teste de desnaturação térmica e com isopropanol, mas isso não tem uma importância in vivo. A sobrevida dos eritrócitos é normal (Fairbanks, 1980).

Traço HbE (HbAE). A HbAE é assintomática, com microcitose limítrofe (VCM = 84±5) e ausência de anemia. A HbA representa 65 a 70% da hemoglobina total. A HbE representa 30% e a HbF é normal. A coexistência de um gene da α-talassemia não altera qualquer um dos parâmetros acima somente pode ser comprovada por meio da análise de DNA. Quando existem dois ou três genes da α-talassemia presente, a proporção de HbE diminui para 21 e 14%, respectivamente. A proporção de HbE também é significativamente menor na deficiência de ferro.

Doença da Hb E. Ela também é assintomática, assemelhando-se a um traço talassêmico, com microcitose (VCM médio = 70 fL), eritrocitose, CHbCM normal e anemia discreta. Portanto, a HbE comporta-se como uma talassemia extremamente leve. A contagem de reticulócitos é normal, mas existem 20 a 80% de células-alvo na lâmina de sangue. A HbE representa mais de 90% da hemoglobina total, com a HbF variando de 1 a 10% e nenhuma HbA.

HbE/β-talassemia. Em contraste acentuado com a doença da hemoglobina E, esta é uma condição grave. Trata-se de uma das síndromes talassêmicas mais importantes, sendo mais comum no Sudeste Asiático. Existe uma acentuada variabilidade clínica; raramente, existem poucos sintomas, mas o quadro usual é o de uma talassemia *inter-*

media ou de uma talassemia *major*. A maioria dos alelos da talassemia são da variedade β^0 ou β^+ grave. A eritropoiese ineficaz, uma consequência do excesso de globinas α, os índices eritrocitários, a morfologia eritrocitária e as manifestações clínicas são muito similares às da β-talassemia homozigota. As hemoglobinas E, F e A estão presentes. A HbF apresenta uma extrema variação, de 5 a 85%; a HbF média é de 42% e a de HbE é de 58% (Steinberg, 2001).

Distúrbios da função e da estabilidade da hemoglobina

Um número de substituições de aminoácidos ocorre na bolsa do heme, na qual elas aumentam a estabilidade da metemoglobina ou alteram a afinidade do heme pelo oxigênio. Esta última modificação usualmente altera também a estabilidade da molécula. Outras substituições afetam os sítios de contato αβ e também podem alterar a estabilidade e a afinidade pelo oxigênio da molécula (Bunn, 1994).

Essas hemoglobinopatias funcionalmente significativas são heterozigotas. Geralmente, a concentração da hemoglobina anormal é inferior a 50%. Comumente, as hemoglobinas com cadeias α anormais formam uma proporção menor do total (10–25%) do que aquelas com cadeias β anormais (35–50%).

Hemoglobinas associadas à alta afinidade pelo oxigênio e policitemia

Atualmente, conhece-se oitenta e seis hemoglobinas anormais com alta afinidade pelo oxigênio que estão associadas à eritrocitose familiar (*Globina Gene Server*). Algumas estão listadas na Tabela 31.4. A curva de dissociação do oxigênio é desviada para a esquerda. A P_{50}, pressão parcial de oxigênio na qual a hemoglobina está 50% saturada, está diminuída. Em condições fisiológicas, a P_{50} do sangue total é de 26 mmHg. Nesse distúrbio, ela varia de 5 a 23 mmHg. Como a hemoglobina possui uma alta afinidade pelo oxigênio, os tecidos ficam relativamente hipóxicos em qualquer P_{O2}, acarretando aumento da produção de eritropoetina e policitemia. Esses distúrbios são autossômicos dominantes; apenas heterozigotos foram descritos. A concentração de hemoglobina variou de 15 a 23,8 g/dL. A mensuração da afinidade pelo oxigênio é necessária para se estabelecer o diagnóstico (Bunn, 1986). Como a substituição de aminoácido ocorre no interior da molécula, a hemoglobina anormal é frequentemente indistinguível da HbA na eletroforese ou na HPLC.

Hemoglobina Chesapeake. Uma cadeia α anormalmente associada à policitemia leve assintomática em uma família caucasiana foi descrita em 1966 (Clegg). As características eram similares às da policitemia familiar benigna. A hemoglobina anormal representava 30% do total, apresentava uma maior afinidade pelo oxigênio resultando em um hematócrito significativamente elevado.

Hemoglobinas associadas à baixa afinidade pelo oxigênio

Existem muito menos variantes com diminuição da afinidade pelo oxigênio (ver Tab. 31.4; Bunn, 1986). A curva de dissociação hemoglobina-oxigênio é desviada para a direita (aumento da P_{50}). Esses indivíduos apresentam "anemia" leve, uma vez que eles podem descarregar mais oxigênio para os tecidos e simplesmente não necessitam dessa quantidade de hemoglobina. Uma pequena quantidade de variantes com diminuição acentuada da afinidade está associada à cianose. Nelas, a captação de oxigênio está diminuída nos pulmões e o nível de deoxihemoglobina é superior a 5 g/dL, provocando cianose. Esses pacientes apresentam pele e mucosas com uma cor cinza-azulada. Eles não apresentam anemia. Grande parte das hemoglobinas instáveis também apresenta diminuição da afinidade pelo oxigênio. Entretanto, o estado hemolítico domina o quadro clínico.

Hemoglobina Kansas. Essa hemoglobina com baixa afinidade, descrita em um menino caucasiano, apresenta uma propriedade oposta à da Hb Chesapeake. As características clínicas eram cianose desde a lactância, tensão de oxigênio arterial normal e redução da saturação de oxigênio. A eletroforese após a conversão para metemoglobina permitiu a separação da HbA (Reissman, 1961).

Metemoglobinas: pseudocianose

Nove hemoglobinas anormais estão associadas à metemoglobinemia clínica e à cianose que não responde ao cloreto de metiltioninío (azul de metileno) (Globin Gene Server; Bunn, 1994). A cor é similar à da cianose, uma cor acastanhada, causada pela metemoglobina. A característica comum é que todas apresentam uma substituição de aminoácido próximo ou no grupo heme, de modo que a metemoglobina é incomumente estável e a redução para o heme ferroso e, consequentemente, a ligação reversível do oxigênio são impedidas. A metemoglobina representa menos de 30% da hemoglobina total em humanos normais.

A cianose ao nascimento é observada na doença da HbM com anormalidades da cadeia α ou na HbM fetal (HbFM Osaka). Nesta última, a cianose desaparecerá após as cadeias γ serem substituídas por cadeias β em torno dos 6 meses de idade. A cianose somente aparece próximo dos 6 meses de vida em variantes HbM com anormalidades da cadeia β pela mesma razão (Bunn, 1994). Evidentemente, a cianose não está associada a anormalidades enzimáticas no eritrócito, fármacos tóxicos ou cardiopatias cianóticas, condições que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial. Usualmente, os pacientes não apresentam outros sintomas.

Todos os distúrbios da HbM descobertos até o momento foram observados em heterozigotos, provavelmente porque a homozigosidade é letal. Alguns tipos de HbM não são separados da HbA na eletroforese alcalina. Quando o hemolisado é convertido primeiramente em metemoglobina, a HbM migrará diferentemente da metemoglobina normal no pH de 7,1. A absorção do espectro da HbM eluída, a qual pode ser característica, pode ser comparada com a da metemoglobina normal (Bunn, 1994).

Hemoglobinas instáveis (Bunn, 1998)

Foram descritas mais de 100 variantes da hemoglobina nas quais a hemoglobina precipita no eritrócito como corpúsculos de Heinz. Algumas são listadas na Tabela 31.4. Aproximadamente 75% das anormalidades são da cadeia β. Raras hemoglobinas (p. ex., HbF Poole) estão relacionadas a variantes instáveis da cadeia γ. A substituição de aminoácido ou a deleção torna a molécula de Hb instável. A Hb precipitada liga-se à membrana celular e diminui a sobrevida; as células tornam-se rígidas. Os corpúsculos de Heinz são removidos pelo baço e as células ainda mais lesadas apresentam uma sobrevida menor. A afinidade pelo oxigênio é geralmente anormal e pode estar aumentada ou diminuída. Algumas dessas hemoglobinas instáveis produzem "anemias hemolíticas congênitas com corpúsculos de Heinz".

Todos os pacientes observados eram heterozigotos. As características clínicas são consideravelmente variáveis, da anemia hemolítica grave no primeiro ano de vida (p. ex., Hb Hammersmith, Hb Bristol) a uma anemia hemolítica crônica muito leve (p. ex., Hb Zurich). Algumas poucas hemoglobinas instáveis foram descobertas incidentalmente em indivíduos clinicamente normais (p. ex., Hb Tacoma, Hb Sogn).

A icterícia e a esplenomegalia são comuns, como em outras anemias hemolíticas. Mais característica em alguns casos é a excreção de urina fortemente pigmentada (somente durante crises hemolíticas em variantes leves). O pigmento urinário parece ser o dipirol, provavelmente um produto metabólico de moléculas de heme após a separação da globina (Dacie, 1991). A cianose está presente em alguns pacientes e é devida à metemoglobinúria e a sulfoemoglobinemia ou à baixa afinidade pelo oxigênio.

A anemia é normocítica e normocrômica a hipocrômica. A hipocromia é devida à remoção de hemoglobina precipitada dos eritrócitos velhos pelos macrófagos do baço e outros órgãos reticuloendoteliais. O ponteado basófilo proeminente, provavelmente relacionado ao aglomerado de ribossomos, é uma característica comum. Ocasionalmente, "eritrócitos mordidos" (*bite cells*) podem ser observados. Pacientes com concentração relativamente alta de hemoglobina no estado estável usualmente apresentam variantes da hemoglobina com uma alta afinidade pelo oxigênio e uma inesperada alta contagem de reticulócitos (p. ex., Hb Köln, Hb Gun Hill). Por outro lado, pacientes com concentração de hemoglobina baixa podem ser relativamente assintomáticos se sua hemoglobina apresentar baixa afinidade pelo oxigênio. Sua contagem de reticulócitos é inesperadamente baixa para a concentração de hemoglobina (p. ex., Hb Hammersmith). Corpúsculos de Heinz são raramente observados nos eritrócitos circulantes antes da esplenectomia, embora algumas vezes eles possam ser gerados na incubação de eritrócitos com azul de cresil brilhante ou azul de metileno novo. Após a esplenectomia, os corpúsculos de Heinz são prontamente demonstráveis em uma grande proporção de células. A lâmina

de sangue mostra células contraídas irregularmente e ponteado basófilo, o qual pode ser pronunciado.

Em pacientes esplenectomizados, os corpúsculos de Heinz podem interferir na determinação de hemoglobina e na contagem eletrônica de plaquetas e leucócitos. Antes de mensurar a absorbância do hemolisado, ele deve ser centrifugado para se remover os corpúsculos de Heinz. A contagem de plaquetas e leucócitos deve ser realizada por meio de meios visuais. A eletroforese de hemoglobina é normal em aproximadamente um quarto dos pacientes. A HbA_2 pode estar elevada em variantes da cadeia β por causa da perda da hemoglobina normal das células e esse fenótipo pode se assemelhar à talassemia *intermedia*. A HbF pode estar aumentada (até 10–15%). As determinações laboratoriais fundamentais são os testes de instabilidade térmica e de precipitação com isopropanol.

Teste de instabilidade térmica. Hemoglobinas mais instáveis precipitam mais rapidamente que as hemoglobinas normais quando incubadas a 50°C (Dacie, 1991). Tanto as hemoglobinas normais quanto as instáveis precipitam mais rapidamente no tampão Tris (Tris-buffer) que nos tampões fosfato. Em um hemolisado em Tris-buffer, ocorrerá a formação de um precipitado facilmente visível em uma hora quando uma hemoglobina instável estiver presente; a amostra controle permanece transparente ou ligeiramente turva. A precipitação discreta é duvidosa; o teste deve ser repetido e o teste de precipitação com isopropanol também deve ser realizado. Em distúrbios de hemoglobina instável, foi observado que os precipitados representam 10 a 40% da Hb total.

Teste de precipitação com isopropanol. Um solvente relativamente não polar enfraquece as ligações internas da hemoglobina e diminui a sua estabilidade (Carrell, 1972). Uma hemoglobina instável precipita em 20 minutos no isopropanol (solvente não polar), enquanto um hemolisado normal permanece transparente por 30 a 40 minutos. Resultados falso-positivos ocorrem com níveis altos de HbF.

Talassemias

Nas talassemias, cadeias de globina, geralmente de estrutura normal, são produzidas em uma taxa menor. A β-talassemia refere-se à diminuição da produção de cadeias β. A α-talassemia e as talassemias δβ, δ e γδβ referem-se à redução da síntese das cadeias polipeptídicas respectivas. Como resultado, ocorre um déficit global de tetrâmeros da hemoglobina nos eritrócitos e o VCM e a CHbM diminuem. No entanto, não é a falta da cadeia de globina afetada, mas o acúmulo da não afetada que causa a hemólise (na α-talassemia) e a hematopoese ineficaz (principalmente na β-talassemia) nas formas graves da doença.

As talassemias ocorrem predominantemente em indivíduos de descendência mediterrânea, africana e asiática uma vez que, similarmente a variantes da hemoglobina ou à deficiência de G6PD, os genes da talassemia estão sob a pressão seletiva da malária. Na Grécia e no sul da Itália, a prevalência da β-talassemia é de aproximadamente 10% e a da α-talassemia, de 5%. Vinte e cinco a trinta por cento dos indivíduos negros e 20% dos tailandeses são portadores do gene da α-talassemia. Como variantes estruturais e talassemias ocorrem na mesma população, uma ampla variedade da doença emerge de suas interações.

Várias classificações são utilizadas. A classificação clínica define a talassemia *major*, uma forma grave e dependente de transfusão; a talassemia *intermedia*, com sintomas menos graves; e a talassemia *minor* (estado de portador ou traço), sem sintomas clínicos, mas com anormalidades hematológicas. A classificação genética é baseada no(s) gene(s) afetado(s) pela mutação, estado heterozigoto/homozigoto, taxa de síntese de globina ausente/reduzida etc. Finalmente, mutações específicas causam síndromes bem definidas e podem ser utilizadas para classificação.

Defeitos moleculares

Na β-talassemia, existe uma considerável heterogeneidade de defeitos moleculares. Cento e noventa e sete mutações diferentes foram identificadas como causa de β-talassemia. A maioria está associada a substituições simples de base que produzem defeitos na atividade estimuladora, processamento/clivagem ou translação do RNA, acarretando diminuição ou instabilidade do mRNA. Grandes deleções são incomuns. Em raras variantes estruturais, a produção de cadeias β altamente instáveis resulta no fenótipo da β-talassemia (Bunn, 1998). Apesar dessa diversidade, 20 mutações comuns são responsáveis por 80% dos alelos da β-talassemia na população mundial (Weatherall, 1999). Na β^0-talassemia, a síntese de cadeia β está ausente no cromossomo afetado. O mRNA está ausente ou pode estar presente, porém não é funcional. Na β^+-talassemia, cadeias de globina-β estão presentes, mas em quantidade reduzida porque os defeitos moleculares acarretam uma menor produção de mRNA ou a produção de mRNA instável.

Na $\delta\beta^0$-talassemia, grandes deleções envolvem o complexo genético δβ ou $^A\gamma\delta\beta$. Como consequência, nenhuma síntese de HbA ou HbA_2 é suportada pelo cromossomo afetado, mas a γ é supra-regulada geneticamente e a produção de HbF aumenta. Hemoglobinas Lepore possuem fusões de globinas-δβ que são resultantes do *crossover* desigual entre genes da globina-δ e da globina-δ durante a meiose.

As α-talassemias geralmente são devidas à deleção genética de comprimento variado. Existem dois genes da globina α em cada cromossomo 16, circundados por duas unidades de duplicação altamente homólogas, cada uma delas contém três segmentos homólogos (Z, X e Y). O *crossover* desigual entre os segmentos Z produz um cromossomo com um gene α ($-\alpha^{3,7}$) e um com três (ααα). Um crossover não recíproco similar entre segmentos X causa outra deleção comum ($-\alpha^{4,2}$) (Fig. 31.24). A probabilidade dessa recombinação é alta e os cromossomos com falta de gene α ou com genes α extras são observados em todas as civilizações. No entanto, somente os alelos talassêmicos tornaram-se frequentes em certas populações, sob pressão da malária. Esses defeitos, que afetam apenas um dos genes, são denominados α^+-talassemia. O genótipo heterozigoto pode ser escrito como -α/αα. Defeitos sem deleção são menos comuns ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$). O determinante da α^0-talassemia é resultante da deleção de ambos os genes da globina-α no cromossomo (Fig. 31.25), o qual consequentemente orienta a síntese de cadeias não α (–/αα).

A Hb Constant Spring é devida a uma códon terminal anormal em um gene da globina-α que resulta em uma cadeia α alongada com 31 aminoácidos extras. Por causa da acentuada redução da estabilidade do mRNA, o fenótipo clínico da α-talassemia é observado (Orkin, 1998).

β-talassemias

Os achados clínicos e da hemoglobina nas β-talassemias estão resumidos nas Tabelas 31.7 e 31.8. Os distúrbios são muito heterogêneos, tanto fenotipicamente quanto ao nível dos defeitos moleculares. Os termos talassemia *major*, talassemia *intermedia* e talassemia *minor* referem-se à gravidade clínica e não são designações genéticas.

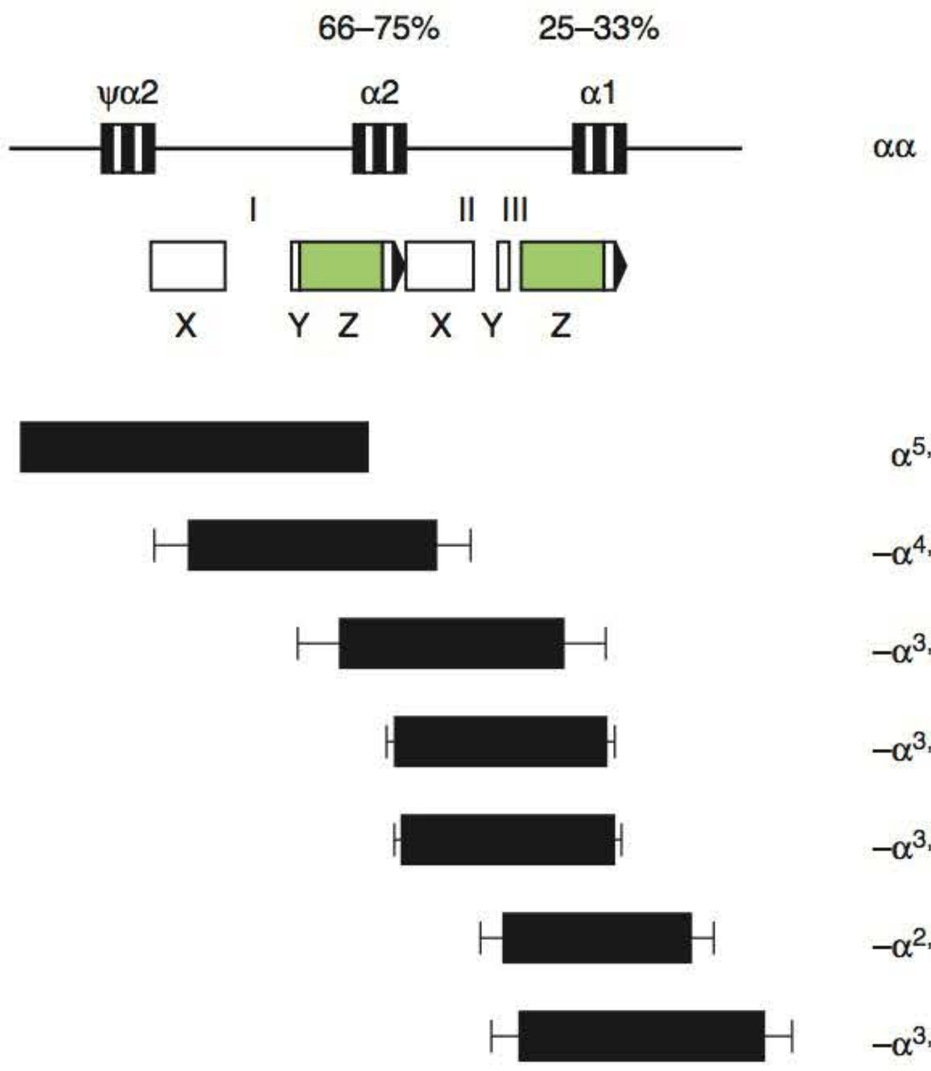


Figura 31.24 Deleções que causam a α^+-talassemia. Os segmentos homólogos (X, Y e Z) são interrompidos por segmentos não homólogos (I, II e III). As barras pretas mostram a extensão de cada deleção, e as barras finas mostram as áreas de ponto de quebra. Em cada caso, somente um gene α foi deletado.

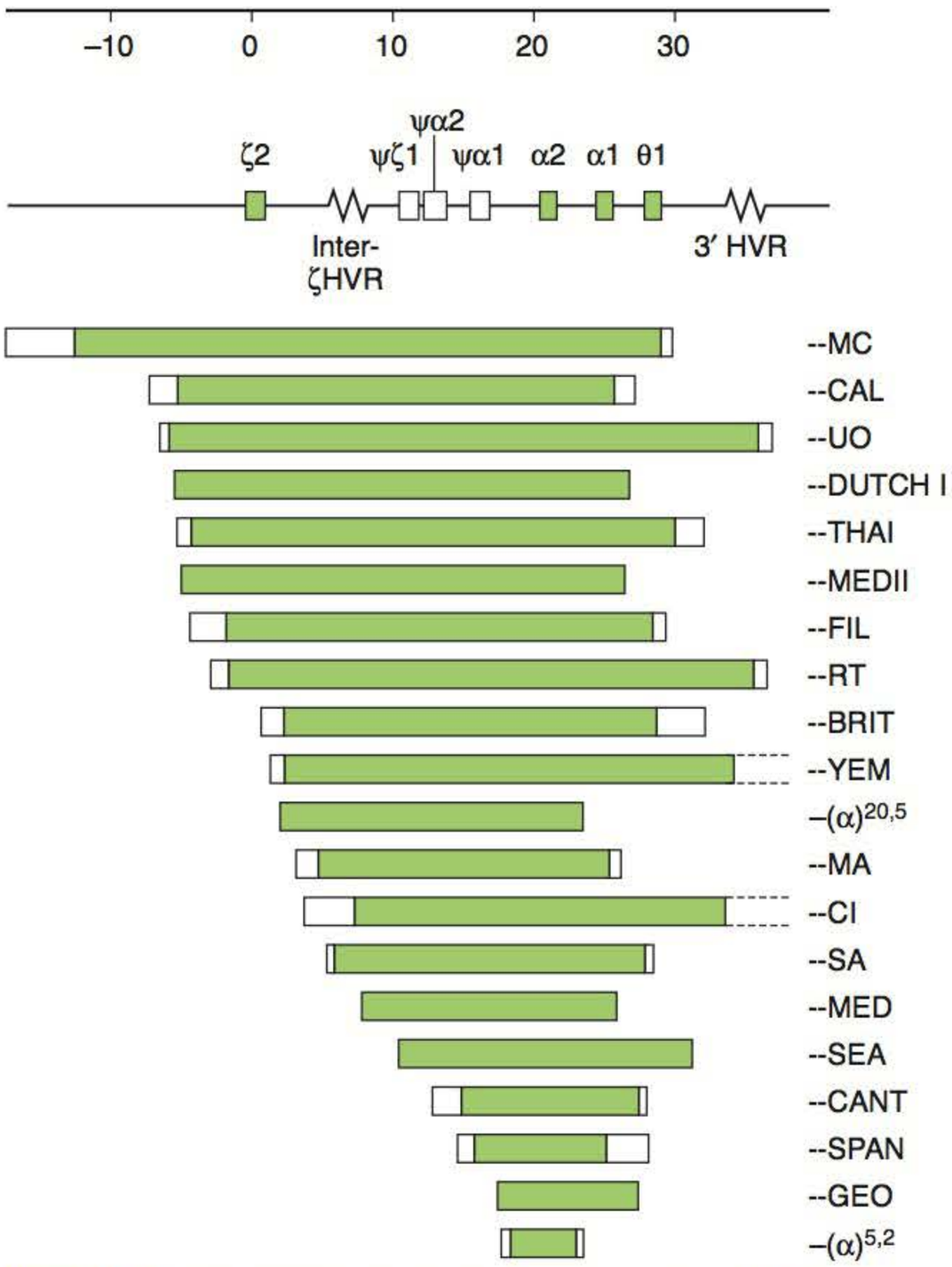


Figura 31.25 Grandes deleções do complexo do gene α causam α^0-talassemia. Nenhuma síntese da cadeia α é dirigida a partir do cromossomo. Deleções MED (mediterrâneo) e SEA (sudeste asiático) são as mais frequentes.

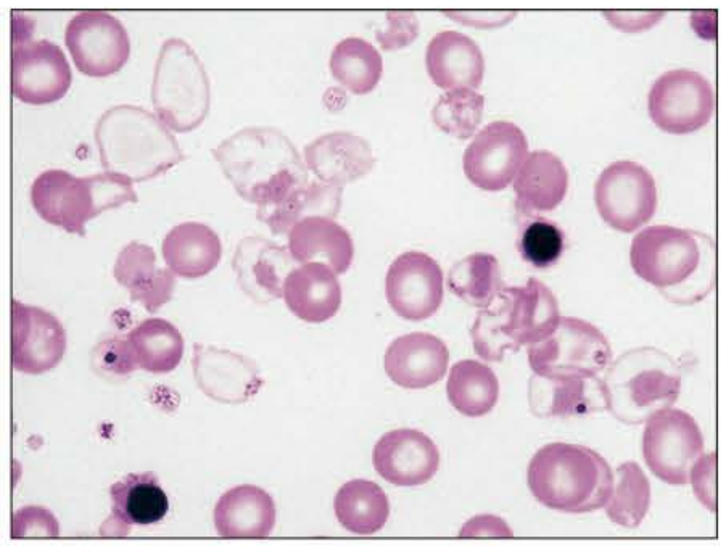


Figura 31.26 β-talassemia homozigota. Algumas poucas células contêm muito pouca hemoglobina, que frequentemente está precipitada na membrana. Células-alvo bizarras, corpúsculos de Howell-Jolly e eritrócitos nucleados com pouca hemoglobina são observados.

β-talassemia homozigota (talassemia *major*; anemia de Cooley). Na ausência (β^0) ou diminuição acentuada (β^+) da produção de cadeia β, ocorre um excesso de cadeias α. Agregados de cadeias α são instáveis e precipitam no normoblasto ou no eritrócito e lesam as células. O excesso de cadeias α e seus produtos de degradação (heme, hemina e ferro) que servem como focos para a geração de espécies reativas de oxigênio acarretam oxidação parcial da banda 4.1 e redução da relação espectrina/banda 3 nos precursores dos eritrócitos. Precipitados e células são removidos, causando eritropoiese ineficaz e uma anemia hemolítica grave. Além disso, a aglomeração de banda 3 na membrana pode ser seguida pela opsonização com IgG e complemento autólogos e remoção pelos macrófagos (Weatherall, 1999).

Os achados clínicos incluem a icterícia e a esplenomegalia, a qual se torna evidente cedo na infância. Ossos frontais, malares e mandíbulas proeminentes conferem uma aparência mongoloide. Essas alterações e os achados radiográficos de córtex afilado dos ossos longos e chatos e o espessamento do crânio com osteoporose (aparência de "cabelo na extremidade") refletem a extrema hiperplasia da medula óssea. O crescimento é interrompido e a puberdade é retardada. A maioria dos pacientes necessita de transfusões regulares e apresentam problemas em função da carga de ferro. A sobrecarga de ferro comumente ocorre e a principal causa de morte é a insuficiência cardíaca devida à siderose miocárdica no final da terceira década de vida.

Ao contrário da maioria das doenças hemolíticas, a anemia é microcítica e hipocrômica. Extrema poiquilocitose com formas bizarras, células-alvo, ovalocitose, anéis de Cabot, corpúsculos de Howell-Jolly, fragmentos nucleares, siderócitos, anisocromia, anisocitose e frequentemente normoblastose extrema estão presentes (Fig. 31.26). A poiquilocitose é mais acentuada em pacientes com baço intacto. A normoblastose é mais grave após a esplenectomia. Os normoblastos apresentam citoplasma hipocrômico e, especialmente após esplenectomia, agregados de hemoglobina que coram densamente, os quais provavelmente representam cadeias α precipitadas. A incubação do sangue com violeta de genciana cora esses precipitados em eritrócitos e normoblastos. A contagem de reticulócitos é menos elevada que o esperado para o grau de anemia por causa da destruição de precursores eritroides na medula óssea. A resistência osmótica dos eritrócitos, o ferro sérico e a dosagem de bilirrubina indireta estão aumentados.

Na medula óssea, uma hiperplasia normoblástica acentuada está presente. Muitos normoblastos tardios apresentam corpos de inclusão como no sangue. A destruição intramedular de hemoglobina (eritropoiese ineficaz) está acentuadamente aumentada na talassemia *major*. Células do tipo Gaucher estão presentes. A reserva de ferro e os sideroblastos estão aumentados.

Na β^0-talassemia, a HbA está ausente, a HbF está elevada (até 98%) e a HbA_2 representa aproximadamente 2%. Nas β^+-talassemias (Mediterrâneas), a HbF representa 60 a 95% com presença de HbA. Embora a HbA_2 possa ou não estar aumentada, a relação A_2/A está sempre aumentada. Em indivíduos negros com β^+-talassemia, as características clínicas são menos severas (talassemia *intermedia*) e a transfusão geralmente é desnecessária. A HbF representa 20 a 40%, a HbA_2 representa 2 a 5% e o restante é de HbA (Tab. 31.8).

β-talassemia heterozigota (traço de β-talassemia; talassemia *minor*; traço de Cooley). Ela é causada pelo gene da β^0-talassemia com ausência da síntese de cadeia de globina-β ou pelo gene da β^+-talassemia com redução da síntese de cadeia de globina-β. Usualmente, o paciente não apresenta sintomas ou sinais físicos anormais. A única manifestação clínica pode ser uma anemia refratária na gestação (Weatherall, 2001).

A maioria das β-talassemias heterozigotas apresenta uma anemia leve, mas, ocasionalmente, o Ht e a Hb podem estar normais. Aqueles de ascendência africana apresentam nível mais elevado de Hb que os da região mediterrânea, reletindo o seu genótipo mais leve. Caracteristicamente, os eritrócitos estão elevados (5–7 milhões/μL), a CHbM está baixa (geralmente, menos de 22 pg) e o VCM está baixo (55–70 fL). A CHbCM algumas vezes está baixa, mas frequentemente ela está normal. A contagem de reticulócitos é o dobro do valor normal. Em lâminas coradas, as células apresentam um grau moderado de microcitose, hipocromia, anisocitose e poiquilocitose; células-alvo

Tabela 31.7 β-talassemias e seus defeitos bioquímicos e moleculares associados

	Defeito típico do DNA	Cadeia β	Cadeia δ	Cadeia γ	Distribuição de HbF	α: desequilíbrio não globulina-α
β^+-talassemia	Mutação	↓	+	+	Heterocelular	+++
β^0-talassemia	Mutação	0	+	+	Heterocelular	++++
δβ-talassemia	Deleção	0	0	+++	Heterocelular	++
HPHF	Deleção	0 ou ↓	0	++++	Pancelular	+

Modificado de Forget, 1982.

Tabela 31.8 Principais categorias das síndromes da β-talassemia

Síndrome	Genótipo	Características clínicas	Padrão de hemoglobina
Estados homozigotos:			
β^+-talassemia	β^+/β^+	Talassemia *major* ou *intermedia*	↓↓ Hb A, ↑↑ Hb F, Hb A_2 variável
β^0-talassemia	β^0/β^0	Talassemia *major*	Hb F > 95%, Hb A_2 em repouso
$\delta\beta^0$-talassemia	$\delta\beta^0/\delta\beta^0$	Talassemia *intermedia*	Hb F 100%
Hb Lepore	Lepore/ Lepore	Talassemia *major*	Hb F 85%, Hb Lepore 15%
Estados heterozigotos:			
β^+-talassemia	β^+/β	Talassemia *minor*	Hb A, ↑ Hb A_2, ±↑ Hb F
β^0-talassemia	β^0/β	Talassemia *minor*	Hb A, ↑ Hb A_2, ±↑ Hb F
$\delta\beta^0$-talassemia	$\delta\beta^0/\delta\beta$	Talassemia *minor*	Hb A, Hb F 5–20%, ±↓ Hb A_2
Hb Lepore	Lepore/β	Talassemia *minor*	Hb A, ↑ Hb F, ↓ Hb A_2, Hb Lepore 10%

Modificado de Orkin, 1976.

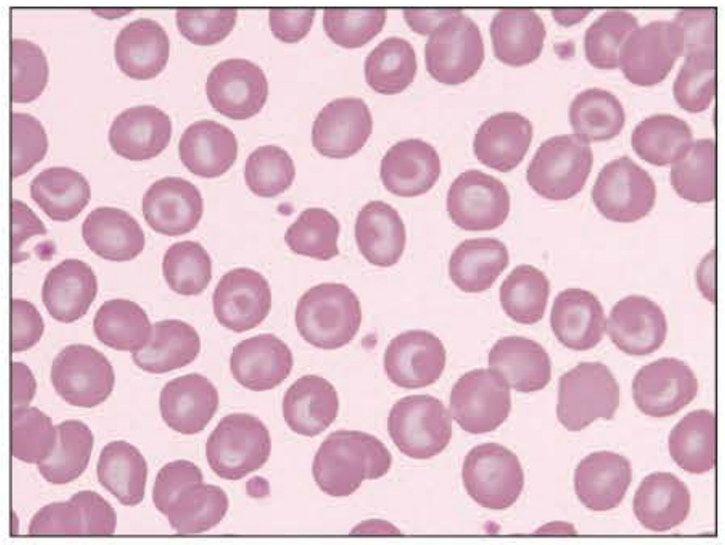


Figura 31.27 Traço da β-talassemia. Eritrócitos microcíticos hipocrômicos com alvo frequente. Anemia leve.

e ponteado basofílico são frequentes, mas nem sempre estão presentes (Fig. 31.27). A fragilidade osmótica está diminuída. Na medula óssea, existe uma hiperplasia normoblástica leve com bordas citoplasmáticas irregulares, um sinal de hemoglobinização defeituosa.

A HbA_2 está elevada, na faixa de 3,5 a 7,0%; a HbF está discretamente elevada (1–3%) em aproximadamente 50% dos casos. Nos poucos casos em que a HbF ultrapassa 4% é provável que um gene para a persistência hereditária de hemoglobina fetal também esteja presente (Mazza, 1976). As formas delecionais relativamente raras tendem a apresentar níveis mais elevados de HbF (até 9%) e, em algumas poucas famílias, nas quais a deleção inclui a região promotora, foi observado que a HbF está incomumente alta (até 14%) (Weatherall, 2001). Em lactentes, ocorre um declínio mais lento que o normal do nível de HbF e o nível estável do adulto somente é atingido na adolescência. Isso é uma consideração particularmente importante na heterogosidade dupla para β-talassemia e HbS, quando o nível de HbS é utilizado para a previsão prognóstica.

Em alguns poucos casos, tanto a HbA_2 quanto a HbF estão normais. Eles são difíceis de ser diferenciados do traço da α-talassemia e somente estudos moleculares podem ser definitivos. Estudos indicam que a maioria dos casos resulta da herança concomitante de α e β-talassemia (Weatherall, 1994), seja *in trans* ou *in cis* para o gene da β-talassemia. Em outros pacientes com padrão normal de hemoglobina, existem apenas alterações hematológicas mínimas (o gene da β-talassemia "silencioso") e somente uma síndrome da β-talassemia mais grave em um membro da família sugere a presença de um gene da β-talassemia muito leve.

Estudos do ferro são um pouco diferentes do normal (Weatherall, 2001), embora a deficiência de ferro frequentemente complique o traço talassêmico na infância e durante a gestação. Na deficiência grave de ferro, o nível de HbA_2 pode cair para a faixa normal e, consequentemente, obscurecer o diagnóstico do traço da β-talassemia, mas isso é incomum. Mais frequentemente, embora o nível de HbA_2 caia, ele permanece elevado, acima da faixa normal (Weatherall, 2001). No entanto, se a deficiência de ferro estiver presente, a repetição da mensuração da HbA_2 é recomendada após o total reabastecimento de ferro.

O diagnóstico diferencial entre a deficiência de ferro e o traço da β ou α-talassemia pode ser difícil. O aumento de eritrócitos em presença de uma diminuição do VCM é a característica principal do traço talassêmico. Uma relação VCM/contagem de eritrócitos < 13 sugere talassemia; uma relação > 13 é mais compatível com deficiência de ferro, mas esta ou outras fórmulas não são suficientemente conclusivas para o diagnóstico.

$(\delta\beta)^0$-talassemia. Anteriormente denominada talassemia F, um nome útil, uma vez que você deve pensar nela quando existirem índices talassêmicos e nível significativamente elevado de HbF. Não há produção de cadeias β e δ, mas isso é quase, embora não totalmente, compensado por um aumento de produção de cadeias γ. O estado heterozigoto é similar a um traço de β-talassemia leve, exceto pelo fato da HbA_2 não estar aumentada ou estar discretamente diminuída (o nível médio é de 2,4%) e a HbF estar significativamente aumentada (5,4–20,0%). No estado homozigoto, a hemoglobina consiste em apenas HbF.

Clinicamente, a $(\delta\beta)^0$-talassemia comporta-se como uma forma leve da β-talassemia. No estado heterozigoto, a hemoglobina está normal ou discretamente reduzida, a CHbM encontra-se entre 21 a 26 pg e o VCM é de 65 a 79 fL. Não existem sintomas clínicos. Os homozigotos apresentam uma forma leve de talassemia *intermedia* com um nível de hemoglobina de 10 a 13 g/dL, índices eritrocitários levemente talassêmicos e somente uma hepatoesplenomegalia discreta. É mais comum na população mediterrânea. O fenótipo leve é o resultado do aumento da produção de cadeias γ, o que compensa em certo grau a falta de cadeias β.

O defeito molecular é uma deleção longa que envolve os genes β e δ e, frequentemente, também o gene $^A\gamma$. Existem 21 deleções diferentes descritas (*Globin Gene Server*), mas os achados hematológicos são essencialmente os mesmos. Quando o gene $^A\gamma$ também é deletado, a nomenclatura acurada é $(^A\gamma\delta\beta)^0$-talassemia; os homozigotos apresentam um fenótipo um pouco mais grave.

$(\delta\beta)^+$-talassemia: hemoglobinas Lepore. Nas hemoglobinas Lepore, uma cadeia de fusão anormal δβ é produzida como resultado do crossover cromossômico e fusão de material genético dos genes δβ. O cromossomo afetado não induz a síntese de cadeias δ e β. Como a produção de HbF é apenas levemente aumentada e a cadeia composta δβ é sintetizada em uma taxa muito lenta, resulta um fenótipo talassêmico. As anormalidades hematológicas são similares às observadas na β^0-talassemia. A Hb Lepore migra um pouco mais rápido que a HbS na eletroforese alcalina e, comumente, representa aproximadamente 10% da hemoglobina total nos heterozigotos, enquanto a HbA_2 representa em média 2% e a HbF representa 2 a 3% (Efremov, 1978). Em homozigotos, a Hb Lepore representa 10 a 15% e o restante é de HbF. Diferentes hemoglobinas Lepore foram descritas de acordo com o ponto de fusão, mas elas se comportam de modo muito similar. Trata-se de um gene da talassemia muito mais grave que a forma $(\delta\beta)^0$ e causa uma talassemia *major* dependente de transfusão no estado homozigoto.

Persistência hereditária da hemoglobina fetal

Um grupo de condições com persistência da produção de hemoglobina fetal além da lactância, mas sem anormalidades hematológicas significativas, é conhecido como persistência hereditária da hemoglobina fetal. Ela é observada em aproximadamente 0,1% dos afro-americanos. A persistência hereditária da hemoglobina fetal está intimamente relacionada com as talassemias β e δβ, com as quais ela forma um espectro contínuo. Em uma extremidade do espectro, existe uma produção mínima de cadeia γ e nenhuma compensação da deficiência de cadeias β na β-talassemia, enquanto na outra extremidade, a produção de HbF aumenta e quase compensa totalmente o déficit na persistência hereditária da hemoglobina fetal (Weatherall, 2001).

Como resultado, pelo menos em heterozigotos, não existe uma evidência clara de talassemia (exceto talvez uma microcitose limítrofe em alguns poucos casos) e isso serve como um critério diagnóstico. Na prática clínica, um paciente com HbF significativamente elevada e HbA_2 reduzida é suspeito de apresentar persistência hereditária da

hemoglobina fetal se os índices eritrocitários estiverem normais. No entanto, ele é diagnosticado como portador de $\delta\beta^0$-talassemia se os índices forem talassêmicos. De qualquer modo, existe um leve desequilíbrio entre cadeias α e cadeias não α e a persistência hereditária da hemoglobina fetal é considerada uma forma leve de $\delta\beta^0$-talassemia.

Persistência hereditária da hemoglobina fetal delecional. Nas seis formas delecionais, o complexo genético δβ é deletado. As formas negra e Ghanaian são as mais comuns, mas as formas indiana, italiana e do Sudeste Asiático também foram bem documentadas. Homozigotos apresentam eritrócitos discretamente microcíticos e hipocrômicos, mas não apresentam anemia. A HbF representa 100% da hemoglobina total; não existe HbA ou HBA_2. O hematócrito pode estar alto, consequência da alta afinidade pelo oxigênio da HbF. No heterozigoto, não são observadas anormalidades hematológicas. A HbF representa 15 a 30% da hemoglobina total, a HbA_2 representa 1,0 a 2,1%. A HbF é homogeneamente distribuída entre os eritrócitos (pancelular). Isso contrasta com as talassemias β e δβ, nas quais a distribuição é heterocelular.

Hb Kenya. Trata-se de uma hemoglobina análoga às hemoglobinas Lepore, a qual está associada a um fenótipo da persistência hereditária da hemoglobina fetal. Ela contém o gene de fusão $^{A}\gamma\beta$. No heterozigoto, a Hb Kenya representa aproximadamente 10% da hemoglobina total, a HbF representa 7% e a HbA_2 está reduzida.

Persistência hereditária da hemoglobina fetal não delecional. Existe mutação na região promotora de um dos genes γ, resultando no aumento da síntese de HbF. A produção dos genes δ e β in cis é reduzida. O nível da HbF varia de 3 a 31% nas diferentes formas. A HbA_2 está invariavelmente reduzida e os índices eritrocitários estão próximos do normal. Existem duas particularidades que devem estar em mente. Primeiro, a síntese de cadeia β não está ausente do cromossomo afetado. Além disso, os heterozigotos compostos dessa forma de persistência hereditária da hemoglobina fetal e HbC ou HbS no outro cromossomo apresentam HbA (aproximadamente 30%). A composição da hemoglobina é similar à observada na HbS/β^+-talassemia, exceto pelo fato da HbA_2 estar reduzida. Segundo, não é raro observá-la com um gene da α-talassemia, o qual é altamente prevalente em afro-americanos.

A persistência hereditária da hemoglobina fetal heterocelular ou suíça apresenta menos HbF, variando de 2 a 10%. A base genética varia e frequentemente é mal compreendida, mas a distribuição heterogênea de HbF separa esse grupo. Quando herdada com uma variante β ou talassemia, o resultado é um nível incomumente alto de HbF (Weatherall, 2001).

α-talassemias

A α-talassemia é provavelmente o distúrbio mais comum de gene único em humanos. Sua distribuição é grandemente limitada às regiões tropical e subtropical da Ásia e da África e ao Mediterrâneio (Higgs, 1989), onde ela atinge frequências extremamente altas.

Existem dois genes da globina-α em cada cromossomo 16. As α-talassemias são classificadas de acordo com a produção total desses genes ligados à globina-α. Na α^0-talassemia, ambos os genes são inativos (–/), enquanto na α^+-talassemia somente um gene é defeituoso, em decorrência da deleção (–α/) ou, menos frequentemente, da mutação ($\alpha^T\alpha$/). As formas delecionais usualmente resultam em menor produção de globina do gene ligado à α e fenótipos mais graves. Raramente, o cromossomo apresenta uma deleção e uma mutação separada (α^T–/). Previamente, α^0 e α^+ eram denominados α-talassemia 1 e 2. Isso era muito confuso, uma vez que o defeito mais leve em um gene afetado era denominado α-talassemia 2 e o genótipo mais grave com dois genes defeituosos era denominado α-talassemia 1. Alternativamente, esses termos também foram utilizados para descrever fenótipos clínicos.

Ao contrário das cadeias a extremamente instáveis na β-talassemia, o excesso de cadeias β e γ pode formar tetrâmeros estáveis, hemoglobina H (β_4) e hemoglobina de Bart (γ_4). Elas precipitam nos eritrócitos velhos e, por meio da interação com a membrana celular, causam hemólise. Trata-se principalmente de uma anemia hemolítica, enquanto na β-talassemia o que predomina é a eritropoiese ineficaz.

Síndromes da α-talassemia

Quatro síndromes da α-talassemia resultam da combinação desses genótipos (Bunn, 1986), as quais correspondem grosseiramente à perda de 4, 3, 2 ou 1 gene(s) do complemento normal (αα/αα) (ver Tab. 31.9). Na discussão a seguir, as formas sem deleção nem sempre são descritas separadamente, por questão de simplicidade.

Hidropsia fetal da hemoglobina de Bart (—/—). A completa ausência de cadeias α é incompatível com a vida. Os fetos são natimortos com edema intenso, anemia e hepatoesplenomegalia acentuadas. O sangue revela anisocitose, poiquilocitose, microcitose e eritroblastose acentuadas. A incompatibilidade ABO ou Rh está ausente. Por causa da ausência de cadeias α, não existe HbA ou HbF. Estão presentes grandes quantidades de Hb de Bart (γ_4), uma quantidade variável de Hb Portland e traços de HbH (β_4). Todas elas migram mais rápido que a HbA na eletroforese alcalina. A Hb de Bart é funcionalmente inútil para a transferência de oxigênio, causando hipóxia intrauterina extrema.

Doença da hemoglobina H (–α/—). Três dos quatro genes α estão ausentes. Existe uma anemia hemolítica crônica com o quadro clínico de talassemia *intermedia* em uma minoria de casos, embora a gravidade varie e a maioria dos pacientes evolua bem. A doença da HbH é muito comum no Sudeste Asiático, mas também é observada no Mediterrâneo e no Oriente Médio. No entanto, ela é muito rara em indivíduos negros, uma vez que a α^0-talassemia é incomum nesse grupo. A esplenomegalia e, às vezes, a hepatomegalia estão presentes. O valor da hemoglobina é em média 3 g/dL inferior a de controles com a mesma idade e do mesmo sexo. A transfusão raramente é necessária. A anemia pode se tornar mais grave durante a gestação, mas a hemoglobina raramente cai abaixo de 7 g/dL. O VCM (60–70 fL) e a HbCM (17–21 pg) estão diminuídos (Higgs, 1989) e a contagem de eritrócitos está aumentada (6–6,2 milhões/μL). A lâmina de sangue revela hipocromia, ponteado basófilo e anisopoiquilocitose com células-alvo (Fig. 31.28). A faixa dos reticulócitos é de 4 a 5%.

A eletroforese de hemoglobina revela uma banda de migração rápida da HbH (β_4), representando aproximadamente 99% (1–40%) da hemoglobina e da Hb de Bart que migra de modo levemente mais lento em metade dos casos. A HbH pode ser precipitada in vitro e a manipulação descuidada ou o armazenamento prolongado pode fazer com que ela seja perdida do hemolisado. Em hemolisados velhos, uma série de bandas migra como HbH. A Hb de Bart é resistente ao álcali e pode ser mensurada com a HbF (a qual não aumenta na doença da HbH). A porcentagem de Hb de Bart é de 2 a 40% ao nascimento e, a seguir, cai gradualmente (média de 4,8%), mas o seu nível nos adultos é muito variável. Como em outras síndromes da α-talassemia, existe mais Hb de Bart ao nascimento que HbH na vida adulta. A HbA_2 está diminuída.

Preparação da hemoglobina H. A coloração vital do sangue com um corante oxidante (p. ex., azul de cresil brilhante) induz a formação de corpos de inclusão (a HbH precipita) em muitos eritrócitos. Durante a incubação de duas partes de sangue em uma de azul de cresil brilhan-

Tabela 31.9 Síndromes da α-talassemia

Síndrome	Genes defeituosos	Genótipo	Características clínicas	Recém-nascido	Após o primeiro ano
Hidropsia fetal	4	–/–	Morte fetal ou neonatal com anemia grave	Hb de Bart > 80% HbH, Hb Portland	
Doença da HbH	3	–/–α ($-/\alpha\alpha^{CS}$)	Anemia hemolítica crônica	Hb de Bart 20–40% (HbCS)	HbH 5–30% (HbCS 2–3%)
Talassemia *minor*	2	–/αα –α/–α $\alpha^T\alpha$/–α	Assintomática, anemia leve, índices talassêmicos	Hb de Bart 5–10%	Nenhum
Portador silencioso	1	–α/αα ($\alpha\alpha/\alpha\alpha^{CS}$)	Nenhuma anormalidade clínica ou hematológica	Hb de Bart ± 1–2% (HbCS)	Nenhum (HbCS 1%)

Modificado de Wintrobe, 1981.

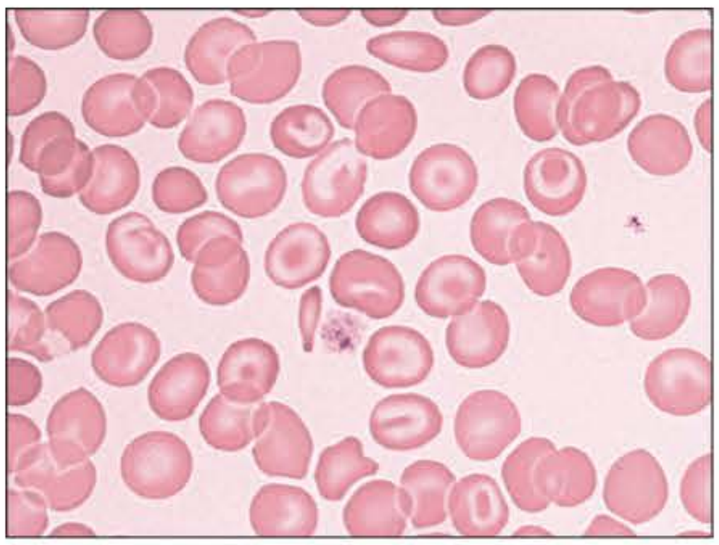


Figura 31.28 Doença da hemoglobina H. Anemia leve e células-alvo.

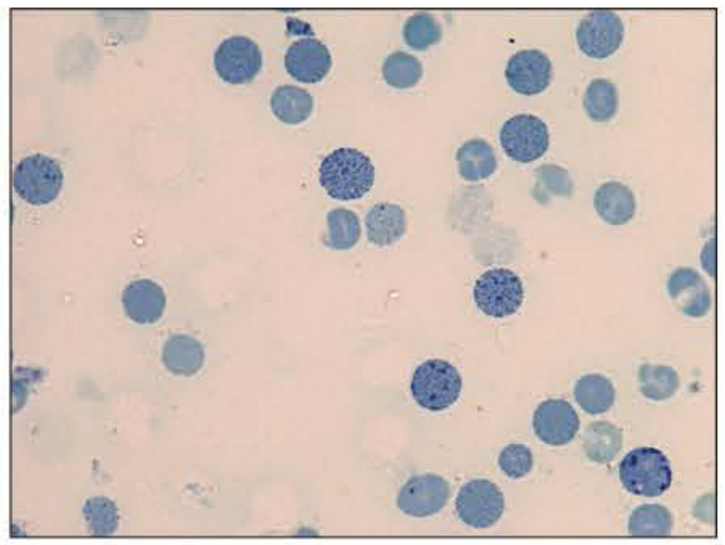


Figura 31.29 Preparação de hemoglobina H. Lâmina preparada após incubação de sangue com azul de cresil brilhante. Vários eritrócitos contêm múltiplas pequenas inclusões de cor azul-claro.

te a 1%, a HbH (β_4) instável precipita gradualmente como múltiplas pequenas inclusões azul pálido distribuídas uniformemente na membrana do eritrócito (Fig. 31.29) (Jones, 1981). As inclusões de HbH devem ser diferenciadas de (1) grânulos e redes reticulares nos reticulócitos, os quais possuem uma coloração azul mais escura; e (2) corpúsculos de Heinz pré-formados, os quais são maiores, também sendo azul escuros, e frequentemente fixados à membrana. Após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente, as inclusões de HbH estão presentes em pelo menos metade dos eritrócitos na doença da HbH e em um eritrócito muito raro no traço da α-talassemia. Corpúsculos de Heinz maiores isolados, podem ser encontrados após esplenectomia na doença de HbH.

Traço da α-talassemia (α^0-talassemia heterozigota (–/αα) ou α^+-talassemia homozigota (–α/–α)). A ausência de dois genes α resulta em características clínicas similares à da β-talassemia *minor* com anemia muito leve e índices talassêmicos com o VCM variando de 65 a 75 fL (Higgs, 1989). A relação entre a síntese de cadeia α e de cadeia β diminui (~0,6). O diagnóstico é mais bem estabelecido pela presença de 5 a 10% de Hb de Bart no sangue do cordão umbilical. Normalmente, somente quantidades vestigiais (< 0,5%) são encontradas. Nos adultos, a Hb de Bart é indetectável e os estudos da hemoglobina são perfeitamente normais, exceto pelo fato da HbA_2 poder estar reduzida. Inclusões de HbH são encontradas na α^0-talassemia, mas raramente em heterozigose ou homozigose de α^+-talassemia, e somente em uma porcentagem muito pequena de eritrócitos, quando a pesquisa for exaustiva (Wasi, 1974) e se amostra for enriquecida por HbH contendo eritrócitos (Jones, 1981). Caso contrário, nenhuma evidência de desequilíbrio na produção de hemoglobina será detectada por técnicas convencionais, e o diagnóstico excluirá a deficiência de ferro, a anemia de doenças crônicas e a β-talassemia. Em contraste com a β-talassemia, a HbF está normal e a HbF está normal ou diminuída. Essa condição é absolutamente benigna e a maioria dos pacientes é diagnosticada em investigações de rotina. Os achados hematológicos são idênticos nos dois genótipos distintos observados em diferentes populações (–/αα), comuns no Sudeste Asiático e no Mediterrâneo e extremamente raros na população negra; e (–α/–α), mais comum em indivíduos com ascendência africana.

Portador silencioso de α-talassemia (α^+-talassemia < heterozigota, αα/–α). Nessa condição, um dos quatro genes da globina-α está ausente. Os achados hematológicos são normais, exceto pelo fato do VCM poder estar discretamente reduzido, com um valor médio de 81 fL (faixa de 75–85 fL), e a HbCM pode estar minimamente reduzida. Contudo, muitas vezes os índices eritrocitários estão perfeitamente normais. Durante o período neonatal, a α^+-talassemia heterozigota pode ser diagnosticada por um nível elevado de Hb de Bart (1–2%) no sangue do cordão umbilical. A Hb de Bart desaparece em torno dos 6 meses e o diagnóstico somente pode ser estabelecido por meio de estudos moleculares ou da síntese da cadeia de globina. Como apenas 40% dos recém-nascidos com o genótipo da α^+-talassemia apresentam Hb de Bart detectável no sangue do cordão umbilical (Higgs, 1982), o insucesso em detectar a Hb de Bart no recém-nascido não descarta o portador silencioso da α-talassemia e a investigação do recém-nascido não deve ser utilizada para descartar essa patologia.

A partir de grandes estudos que comparam achados hematológicos de diferentes genótipos, torna-se aparente que existe um *continuum* entre o indivíduo normal, o portador silencioso e o traço da α-talassemia. Como não existe uma clara separação entre defeitos de um ou dois genes, alguns autores os agrupam como fenótipos mais leves da α-talassemia. Nenhum dos genes da α-talassemia ou nenhuma de suas combinações pode ser identificado com certeza sem estudos moleculares.

Hemoglobina Constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha$/). A Hb Constant Spring é devida a um códon terminal anormal em um gene α que resulta em uma cadeia α alongada com 31 aminoácidos extras. É de longe a mais comum das variantes de cadeia α alongada. Por causa da redução acentuada da estabilidade do mRNA, o fenótipo clínico da α-talassemia é observado (Orkin, 1998). Similarmente a outros genes da α^+-talassemia não delecional, ela causa um fenótipo mais grave. O estado homozigoto manifesta-se como uma anemia hemolítica leve assintomática, com um nível de hemoglobina de 9 a 11 g/dL. Os índices eritrocitários são incomuns para a talassemia: o VCM está normal (88 fL) e a contagem eritrocitária está baixa (3,9 milhões/μL). A hemoglobina é composta por 5 a 8% de Hb CS, HbA_2 normal, quantidades vestigiais de Hb de Bart e o restante sendo de HbA (Weatherall, 1994). Os heterozigotos apresentam um fenótipo de portador silencioso sem anormalidades hematológicas e com aproximadamente 1% de HbCS. A Hb anormal migra mais lentamente que a HbA_2 em pH alcalino e pode facilmente passar desapercebida. A HbCS é comum no Sudeste Asiático onde é observada em aproximadamente 50% dos casos de doença da hemoglobina H ($\alpha^{CS}\alpha$/–).

Triagem e diagnóstico pré-natal de distúrbios da hemoglobina

Em populações em que existe uma incidência significativa de formas graves de talassemia ou de anemia falciforme, as mulheres devem ser investigadas no início da gestação em busca de traço talassêmico ou de anemia falciforme (Weatherall, 1985, 1994; Alter, 1998). Quando ambos os genitores são portadores, a prevenção da doença grave é possível por meio do aconselhamento genético e da oferta do diagnóstico pré-natal com a opção do aborto terapêutico. Em regiões onde a frequência é alta, a investigação de crianças em idade escolar ou o aconselhamento pré-nupcial foi implementado. Os testes iniciais incluem o VCM (< 80 fL), a HbCM (< 27 pg) e a HPLC para se estimar a HbA_2 (> 3,5%) e para detectar variantes comuns da hemoglobina (valores de cutoff estão entre parênteses). No diagnóstico pré-natal, a análise do DNA fetal do vilo coriônico substituiu a análise do sangue fetal no início da década de 1990.

Hemólise – Distúrbios metabólicos

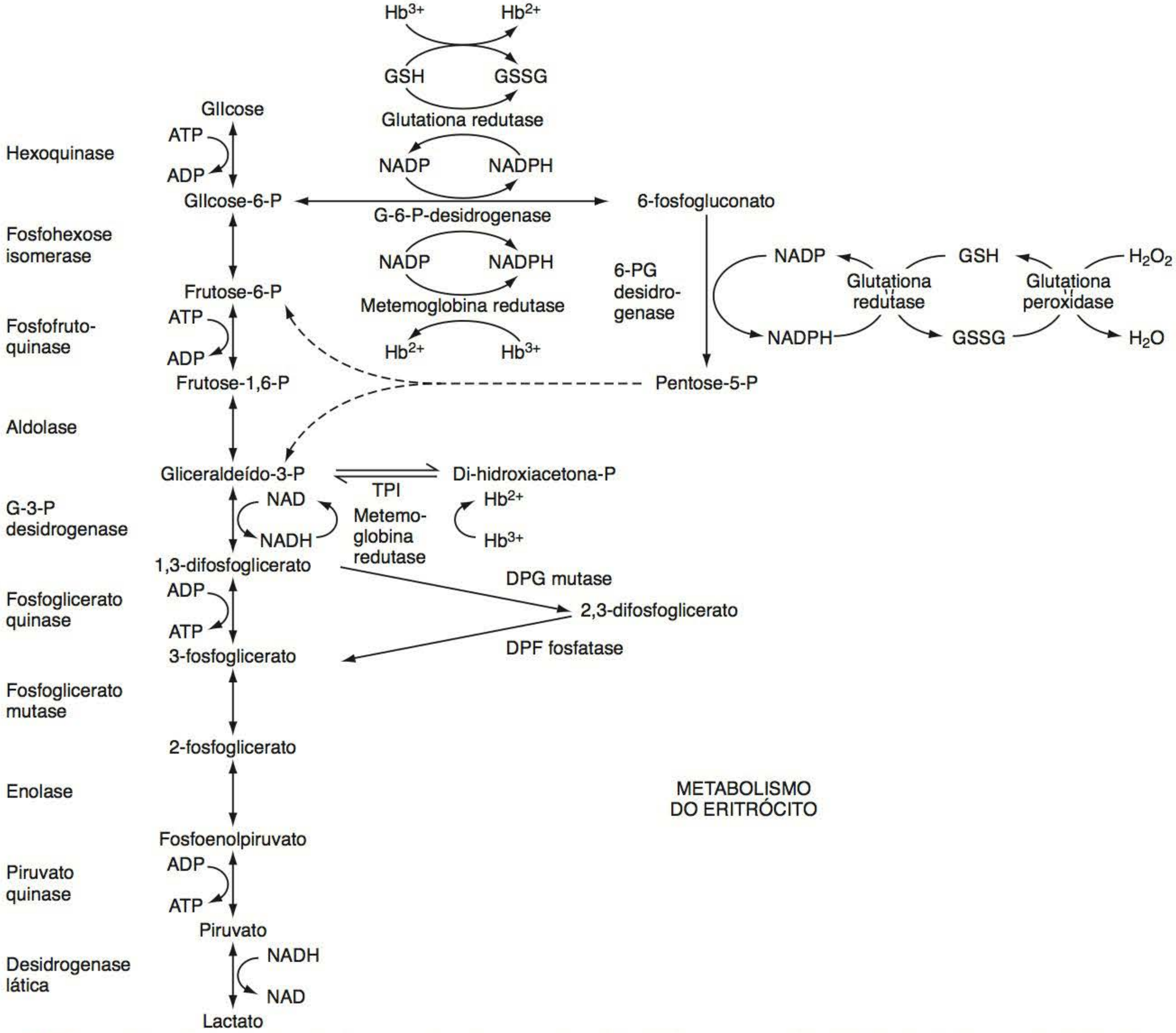
A atividade enzimática deficiente no eritrócito pode causar anormalidades que levam à destruição prematura e à anemia hemolítica. Esses distúrbios são usualmente herdados. Entretanto, a interferência ou o estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitário algumas vezes pode resultar em hemólise em indivíduos que possuem eritrócitos normais.

Metabolismo eritrocitário. Os eritrócitos maduros não possuem mitocôndrias e, consequentemente, não apresentam fosforilação oxidativa nem atividade do ciclo de Krebs. A produção energética é principalmente glicolítica, 90% da qual ocorrem através da via de Embden-

-Meyerhof, uma vez que a glicose é transformada em ácido lático com a produção de 2 mol de ATP (Fig. 31.30). O ATP é necessário para as reações que requerem energia na célula: para o transporte ativo de cátions através da membrana, para a manutenção da deformabilidade da membrana e para a preservação da forma bicôncava da célula. A captação de glicose pelos eritrócitos é independente da insulina. Aproximadamente 90% da glicose são consumidos na via glicolítica, enquanto 10% são utilizados na via da pentose-fosfato (desvio da hexose monofosfato [HMP]). Uma etapa da via glicolítica repõe o NADH, o qual tem um papel importante na proteção da hemoglobina contra o estresse oxidativo. A maior parte da hemoglobina (metemoglobina) produzida na célula normal (aproximadamente 3% do total por dia) é reduzida pela metemoglobina redutase ligada ao NAD. O *shunt* da HMP gera NADPH nas primeiras duas etapas, através das enzimas G6PD e 6-fosfogluconato. A produção de NADPH está ligada à redução da glutationa e, através desse mecanismo, à preservação de enzimas vitais e à proteção da hemoglobina contra a oxidação. Pequenas quantidades de hemoglobina (metemoglobina) são reduzidas pela glutationa. A atividade do *shunt* da HMP aumenta quando a célula é exposta a um fármaco oxidante, provavelmente como resultado do aumento da produção de NADP. Quando há falta de uma enzima dessa via, o glutationa não pode ser produzido e a hemoglobina será oxidada pelo estresse oxidativo. A oxidação de eritrócitos é mediada por derivados do oxigênio de alta energia denominados coletivamente oxigênio ativado (Prchal, 2000). Cadeias de globina oxidadas desnaturam e precipitam como corpúsculos de Heinz, os quais aderem à membrana, causando rigidez e uma tendência à lise. Deficiências moderadas de enzimas dessa via (p. ex., de G6PD) podem não estar associadas à anemia em condições normais. Contudo, um episódio hemolítico agudo ocorre quando as células são submetidas ao estresse oxidativo (p. ex., fármacos, infecção).

Deficiências da via de Embden-Meyerhof causam diminuição da geração de ATP e uma anemia hemolítica crônica. O mecanismo da destruição eritrocitária aqui é menos claro. Corpúsculos de Heinz não são formados. A ausência de deformabilidade celular e o comprometimento da bomba de cátions são importantes no processo hemolítico. Entretanto, a deficiência de ATP é difícil de ser demonstrada em muitos pacientes e outros distúrbios associados à deficiência mais grave de ATP não estão relacionados a uma hemólise significativa (Prchal, 2000).

O *shunt* de Rapoport-Luebering é responsável pela conversão de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) em 2,3-DPG em vez de diretamente em 3-fosfoglicerato (3-PG) (Fig. 31.30). Se esse *shunt* estiver operante, a geração de 2 mol de ATP (por mol de glicose) não ocorre. O resulta-



METABOLISMO DO ERITRÓCITO

Figura 31.30 O metabolismo do eritrócito é analisado no texto. Normalmente, a maioria da hemiglobina (metemoglobina, Hb^{3+}) é reduzida à hemoglobina (Hb^{2+}) pela metemoglobina redutase ligada ao nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD, MetHb redutase). A metemoglobina redutase ligada ao NADP requer azul de metileno para a ativação e é mais efetiva na metemoglobinemia induzida por fármaco do que no mecanismo celular normal. (GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada). (Reproduzido com permissão de McGraw-Hill Companies.)

do é a ausência de produção de energia na glicólise. Entretanto, o 2,3--DPG combina-se com a cadeia β da hemoglobina e diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Consequentemente, em uma determinada pressão parcial de oxigênio, a maior quantidade de 2,3-DPG permite que mais oxigênio deixe a hemoglobina e vá para os tecidos. A curva de dissociação do oxigênio é desviada para a direita. A maior atividade desse shunt é aparentemente estimulada pela hipóxia.

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Cerca de 10% dos homens afro-americanos que utilizaram o antimalárico primaquina durante a guerra da Coreia apresentaram uma anemia hemolítica aguda autolimitada (Beutler, 1994; Prchal, 2000). A relação entre fármacos antimaláricos e a hemólise foi observada no início da década de 1920 (Beutler, 1999). Somente os eritrócitos mais velhos eram destruídos e foi finalmente determinado que a deficiência nos eritrócitos susceptíveis era de G6PD. Os reticulócitos apresentam uma atividade enzimática cinco vezes maior que a população de eritrócitos mais velhos (Prchal, 2000). Desde então, foi verificado que a deficiência de G6PD é disseminada através do mundo. Entre os indivíduos brancos, a maior incidência é observada em judeus curdos. A deficiência é comum em indivíduos do Oriente Médio, países mediterrâneos e Ásia.

Como a G6PD é determinada por um gene localizado no cromossomo X, a expressão completa da deficiência é observada no homem hemizigoto. A expressão parcial pode ser observada na mulher heterozigota que apresenta duas populações de eritrócitos, uma normal e uma deficiente. A deficiência de G6PD limita a regeneração de NADPH, o que torna a célula vulnerável à desnaturação oxidativa da hemoglobina. Como, normalmente, a G6PD é mais elevada nas células jovens e diminui à medida que a célula envelhece, em indivíduos com deficiência de G6PD as células mais velhas são preferencialmente destruídas.

A suscetibilidade hemolítica em indivíduos afetados pode aumentar enormemente durante doença intercorrente ou exposição a vários fármacos que possuem propriedades oxidantes (Tab. 31.10).

A heterogeneidade genética é grande e mais de 300 variantes foram definidas. Essa hetereogeneidade genética é expressa sob a forma de variações na estabilidade e nas propriedades eletroforéticas e catalíticas das enzimas, no grau de deficiência, nos tipos de células do corpo afetadas, nos tipos de fármacos que produzem hemólise e na suscetibilidade à hemólise crônica ou à icterícia neonatal. A isozima da G6PD mais comum ("normal") em todos os grupos populacionais é designada B. Em indivíduos negros, uma variante mais rápida do ponto de vista eletroforético, isozima A, é prevalente e possui quase a mesma atividade. Vinte por cento dos homens negros apresentam essa variante. Onze por cento dos homens negros apresentam o tipo A de G6PD, o que representa apenas 5 a 15% da atividade enzimática normal. São eles que são suscetíveis à hemólise após a ingestão de fármacos oxidantes ou durante uma infecção. A variante mais comum em indivíduos brancos é a G6PD-Mediterrânea, observada em populações mediterrâneas. O nível da atividade enzimática em homens afetados é baixo, frequentemente inferior a 1%. Esses indivíduos geralmente não apresentam anemia, mas podem apresentar uma anemia hemolítica um pouco mais severa e não autolimitada com infecções e com uma variedade mais ampla de fármacos que a variante negra. Em um subgrupo de indivíduos com deficiência de G6PD, pode ocorrer hemólise grave em horas após o consumo de feijão fava ("favismo"). Embora a vasta maioria dos indivíduos com deficiência de G6PD não apresente anemia, uma pequena proporção de pessoas com G6PD-Mediterrânea (e pessoas com variantes mais raras) apresentam uma anemia hemolítica não esferocítica.

Os achados laboratoriais durante a hemólise ativa são aqueles da anemia hemolítica em geral. Na lâmina de sangue, observamos poiquilócitos, alguns esferócitos e células irregularmente contraídas que coram densamente e apresentam contração da Hb de uma parte da membrana celular. Provavelmente, são células das quais corpúsculos de Heinz foram removidos pelo baço. Após a coloração supravital com violeta de genciana, corpúsculos de Heinz podem estar presentes precocemente em um episódio hemolítico agudo. A deficiência de G6PD pode ser detectada por um dos testes de investigação: o teste de redução do corante, o teste do ascorbato-cianeto ou um teste da mancha fluorescente. A confirmação é feita com um ensaio quantitativo.

Corpúsculos de Heinz. Quando a hemoglobina sofre desnaturação, ela forma precipitados que são conhecidos como corpúsculos de Heinz (Dacie, 1991). Esses precipitados não podem ser detectados em lâminas de sangue coradas com a técnica de Romanowsky e secas ao ar, mas após coloração vital com azul de genciana ou cristal violeta. Os corpúsculos de Heinz coram com uma cor púrpura escura. O seu diâmetro varia de 1 a 4 μm e, frequentemente, eles se fixam à membrana eritrocitária. Eles também se coram, mas menos intensamente, como inclusões azul claro em colorações para reticulócitos (p. ex., azul de metileno novo) (Fig. 31.31).

A presença de corpúsculos de Heinz em sangue recém-coletado indica (1) que um fármaco ou substância química oxidante (p. ex., fenil-hidrazina, clorato, naftaleno, dapsona) foi ingerida em quantidade suficiente para superar os mecanismos protetores normais do eritrócito e desnaturar a hemoglobina; (2) que um fármaco como a primaquina foi ingerido por um indivíduo com deficiência de G6PD (ou outro defeito que resulta em uma deficiência de glutationa reduzido), de modo que a hemoglobina perde a proteção contra a desnaturação oxidativa; ou (3) que o indivíduo possui uma hemoglobina instável ou talassemia.

Teste do ascorbato-cianeto. Quando o sangue é incubado com uma solução de cianeto de sódio e ascorbato de sódio, o peróxido de hidrogênio é gerado a partir da oxidação acoplada de ascorbato e de hemoglobina (Jacob, 1966). O cianeto inibe a catalase, o peróxido de hidrogênio fica disponível para oxidar a hemoglobina e a cor marrom da metemoglobina é discernível. Isso ocorre mais rapidamente em células com deficiência de G6PD que em células normais.

O teste do ascorbato-cianeto não é específico, haja vista que a deficiência de piruvato quinase, a hemoglobinúria paroxística noturna e hemoglobinas instáveis produzem um resultado positivo. É o teste de investigação mais sensível pelo fato de ele utilizar células intactas e detectar a deficiência em homens negros durante episódios hemolíticos e em heterozigotos (Fairbanks, 1969).

Teste da mancha fluorescente. Sangue total é adicionado a uma mistura de glicose-6-fosfato (G6P), NADP, saponina e tampão e uma mancha dessa mistura é colocada sobre papel filtro e sua fluorescência é observada com luz ultravioleta. Quando a G6PD está presente, o

Tabela 31.10 Fármacos e substâncias químicas que comprovadamente causam anemia hemolítica clinicamente significativa na deficiência de G6PD

Acetanilida	Primaquina
Cloreto de metiltionínio (azul de metileno)	Sulfacetamida
Ácido nalidíxico (Negram)	Sulfanilamida
Naftaleno	Sulfametoxazol (Gantanol)
Niridazol (Ambilhar)	Sulfapiridina
Nitrofurantoína (Furadantin)	Tiazolsulfona
Pamaquina	Azul de toluidina
Pentaquina	Trinitrotolueno (TNT)
Fenilhidrazina	

De Beutler, 1978.

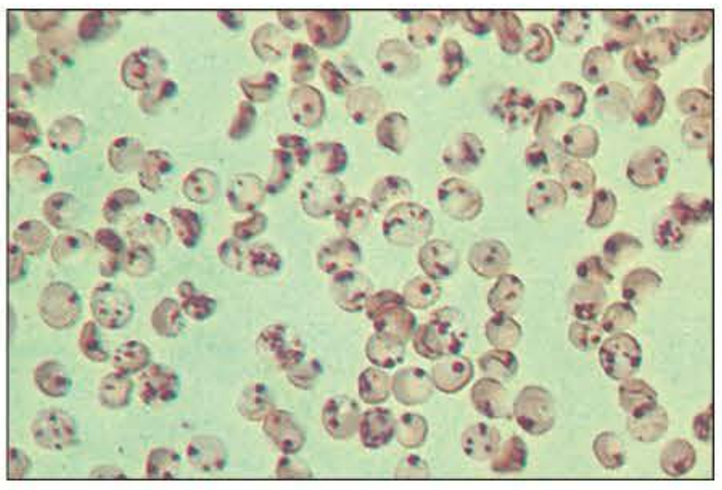


Figura 31.31 Corpúsculos de Heinz. Eritrócitos normais incubados com um fármaco oxidante e corados durante suspensão com violeta de genciana. A seguir, foi preparada uma lâmina secada ao ar livre e corada com corante de Wright. Corpúsculos de Heinz corados de púrpura são precipitados de hemoglobina desnaturada que tendem a se fixar na membrana celular.

NADP é convertido em NADPH. Como a fosfogluconato desidrogenase está presente na maioria dos hemolisados, mais NADP é convertido em NADPH (Fig. 31.30). O NADPH é fluorescente, mas o NADP não. A amostra controle normal apresenta uma fluorescência brilhante e a ausência de fluorescência indica deficiência de G6PD. Reoxidando qualquer pequena quantidade de NADPH formado, o glutationa oxidado aumenta a capacidade do teste de detectar a deficiência leve de G6PD. Esse é o teste de investigação recomendado para a deficiência de G6PD (Beutler, 1979b).

Ensaio quantitativo de G6PD. Para a G6PD, a maioria dos ensaios baseia-se na taxa de redução do NADP em NADPH, mensurada através da espectrometria a 340 nm, quando o hemolisado é incubado com G6P (Beutler, 1984). Em heterozigotos ou na hemólise aguda em indivíduos negros com deficiência de G6PD, o diagnóstico pode ser obscurecido mesmo com o ensaio por causa do nível aumentado de G6PD nos reticulócitos e eritrócitos mais jovens. No entanto, usualmente o teste de investigação do ascorbato-cianeto será positivo nessas situações.

Deficiência de piruvato quinase. É a deficiência enzimática eritrocitária mais comum que envolve a via glicolítica de Embden-Meyerhof. A deficiência de piruvato quinase (PK, *pyruvate kinase*) causa uma anemia hemolítica crônica leve a moderadamente grave com esplenomegalia (Prchal, 2000). A anemia pode ser detectada na lactância ou somente na vida adulta em casos mais leves. Os pacientes toleram muito bem a anemia por causa dos altos níveis de 2,3-DPG, o qual é resultante do bloqueio da glicólise. A lâmina de sangue singular pode não apresentar anormalidades eritrocitárias notáveis até após a esplenectomia, quando equinócitos, células irregularmente contraídas e eritrócitos crenados podem ser proeminentes. A contagem de reticulócitos está elevada e aumenta ainda mais após a esplenectomia.

Isoenzimas da piruvato quinase são produzidas por dois genes separados: um no cromossomo 15, o qual codifica as isoformas M (músculo); e outro no cromossomo 1, o qual codifica as isoformas L (*liver* = fígado) e R (*red cells* = eritrócitos). A complexidade das isoformas da PK é ainda mais complicada pelo fato de a enzima funcional ser um tetrâmero. A herança é autossômica recessiva, mas isso é provavelmente verdadeiro somente em famílias consanguíneas. Os mutantes da PK são numerosos e não são detectados em heterozigotos fenotipicamente normais que possuem 50% da atividade normal da PK. Em consequência, a maioria dos indivíduos com anemias hemolíticas por deficiência de PK é provavelmente de heterozigotos duplos para dois genes mutantes (Valentine, 1979). A deficiência adquirida de PK ocorre ocasionalmente em distúrbios mielodisplásicos e leucemias (Valentine, 1979; Miwa, 1981).

O teste de auto-hemólise fornece resultados variáveis. Alguns pacientes apresentam apenas um aumento leve da auto-hemólise que é parcialmente prevenido pela glicose (tipo I) e outros apresentam um aumento maior que não é prevenido pela glicose (tipo II). Corpúsculos de Heinz não são observados. O diagnóstico é estabelecido por meio de um teste de investigação ou ensaio enzimático específico.

A esplenectomia é indicada em casos que requerem transfusão. Após a esplenectomia, a concentração de hemoglobina geralmente aumenta 1 a 2 g/dL e os reticulócitos aumentam acentuadamente, embora a hemólise persista (Miwa, 1981).

Teste da mancha fluorescente. A piruvato quinase catalisa a fosforilação do ADP em ATP pelo fosfoenolpiruvato (PEP) com a formação de piruvato (Beutler, 1984). A seguir, o piruvato reduz qualquer NADH presente em NAD com a formação de lactato (Fig. 31.30). A perda de fluorescência do NADH sob luz ultravioleta é observada como evidência da presença de PK.

Leucócitos devem ser removidos da amostra porque eles em geral contêm uma quantidade aproximadamente 300 vezes maior de PK do que os eritrócitos e, na deficiência de PK, são os eritrócitos que são deficientes e não os leucócitos.

Ensaio quantitativo da PK. O mesmo princípio do teste investigativo é empregado, mas a taxa de diminuição da absorbância a 340 nm é mensurada. Um teste de investigação negativo ou um ensaio de PK normal (que utiliza concentração alta de substrato padrão [PEP]) não descarta a anemia hemolítica por deficiência de PK. Como enzimas PK mutantes podem ter atividade normal em concentrações altas de PEP e diminuição da atividade em concentrações baixas de PEP, é necessário realizar o ensaio em ambas as direções (Beutler, 1984).

Outras deficiências de enzimas glicolíticas. Outras deficiências enzimáticas da via de Embden-Meyerhof são mais raras (Beutler, 1994; Prchal, 2000). Quando graves, elas produzem anemias hemolíticas, com duas exceções: (1) a deficiência de lactato desidrogenase não apresenta manifestações clínicas; e (2) deficiências de atividade da 2,3-DPG mutase e da 2,3-DPG fosfatase ocorrem conjuntamente e acarretam eritrocitose como resultado da falta de 2,3-DPG, desviando a curva de dissociação do oxigênio da Hb para a esquerda.

Outras deficiências enzimáticas no desvio da hexose monofosfato são bem raras. Elas incluem as duas enzimas envolvidas na síntese do glutationa: γ-glutamil cisteína sintase e glutationa sintetase. Como na deficiência de G6PD, a hemólise aumenta com a exposição a fármacos oxidantes ou a infecções.

No entanto, não existem boas evidências em relação à produção de anemia hemolítica crônica pela deficiência de 6-fosfogluconato, de glutationa redutase ou de glutationa peroxidase (GP_x) (Beutler, 1994). A glutationa redutase contém o dinucleotídeo flavina-adenina e é com frequência parcialmente deficiente por causa da deficiência dietética de riboflavina. A GP_x é 50% normal em aproximadamente 30% da população judia como resultado da homozigosidade para um gene para a baixa atividade da GP_x. A atividade da GP_x depende da ingestão de selênio na dieta. Em nenhum caso, existe uma associação com um distúrbio hematológico.

Deficiência de pirimidina-5'-nucleotidase. Quando o RNA é degradado no reticulócito, nucleotídeos pirimidina devem ser desfosforilados pela pirimidina-5'-nucleotidase para cruzar a membrana eritrocitária (Paglia, 1981). A deficiência autossômica recessiva de pirimidina-5'-nucleotidase causa um acúmulo de pirimidinas e, na lâmina de sangue, a degradação inadequada do RNA produz um ponteado basófilo pronunciado nos eritrócitos. Essa é provavelmente uma das deficiências enzimáticas mais comuns responsáveis pela anemia hemolítica hereditária (Beutler, 1979a).

O distúrbio é caracterizado pela hemólise crônica leve a moderada, reticulocitose (~10%), ponteado basófilo acentuado e esplenomegalia sem aumento notável após esplenectomia. Um teste de investigação compara a absorção ultravioleta de extratos desproteinizados de eritrócitos a 260 nm com a absorção a 280 nm. Na deficiência de pirimidina-5'-nucleotidase, o maior pico de absorção é desviado do normal (260 nm) para 280 nm, o qual é o máximo para as pirimidinas uridina difosfato e citidina difosfato. A confirmação requer um ensaio que mostre a diminuição da atividade da nucleotidase (Beutler, 1984).

A deficiência adquirida de pirimidina-5'-nucleotidase ocorre na intoxicação por chumbo e é provavelmente responsável pelo ponteado basófilo nessa condição.

Hemólise – Adquirida; extrínseca

Agentes químicos

Agentes hemolíticos para células normais. A ação de agentes químicos depende da dose e de outros fatores, muitos dos quais são apenas vagamente conhecidos. Eles variam de simples substâncias (p. ex., água) a algumas substâncias altamente complexas. Quando utilizada como líquido de irrigação, a água destilada pode ser responsável pela anemia hemolítica aguda em consequência da entrada nos canais venosos durante a ressecção transuretral.

Além da anemia, algumas substâncias químicas produzem metemoglobina, a qual pode se manifestar como cianose (tolueno, trinitrotolueno, nitrobenzeno, acenilida e fenacetina). Algumas podem levar à anemia aplásica (tolueno e trinitrotolueno). A promina, um derivado da sulfona, faz com que o sangue adquira uma cor marrom chocolate por causa da formação de sulfo-hemoglobina.

A intoxicação por chumbo pode produzir anemia progressiva com ponteado basófilo, reticulocitose, normoblastemia, anéis de Cabot, corpúsculos de Howell-Jolly e leucocitose. O chumbo não apenas causa dano aos eritrócitos e hemólise, mas também produz defeitos na via de síntese do heme. Em casos de exposição crônica ao chumbo, o ponteado basófilo, mais na medula óssea que no sangue periférico, e a coproporfirinúria são os achados característicos. Essas alterações produzem eritrócitos defeituosos, os quais são removidos pelo baço.

Agentes hemolíticos para células anormais. Certos fármacos e substâncias químicas que possuem atividade oxidante podem pro-

duzir anemia hemolítica em indivíduos com deficiência de G6PD ou outros defeitos que resultam na deficiência de glutationa. Além disso, hemoglobinas instáveis (p. ex., Hb Zürich) apresentam uma propensão à anemia hemolítica induzida por fármaco. Lactentes prematuros, embora possuam níveis elevados de G6PD, apresentam instabilidade e níveis baixos de glutationa e podem desenvolver anemia hemolítica quando recebem altas doses de análogos sintéticos hidrossolúveis da vitamina K.

Deve-se lembrar que, se a exposição a essas substâncias oxidantes for suficientemente grande, a anemia hemolítica aguda pode ser produzida em indivíduos normais.

Durante o episódio hemolítico agudo, corpúsculos de Heinz podem ser frequentemente demonstrados pela coloração direta do sangue com violeta de genciana. Eritrócitos com corpúsculos de Heinz são removidos da circulação pelo baço ou extraídos dos eritrócitos pela ação esplênica. Consequentemente, corpúsculos de Heinz podem não ser observados no sangue se o baço os estiver removendo efetivamente ou após o processo hemolítico agudo diminuir de intensidade.

Testes para a deficiência de G6PD, a causa subjacente mais comum de anemia hemolítica induzida por fármacos, foram descritos anteriormente neste capítulo.

Agentes físicos

Calor. Queimaduras extensas produzem anemia hemolítica, provavelmente por causa da lesão direta dos eritrócitos. Pacientes com queimaduras graves podem apresentar hemoglobinúria macroscópica. A lâmina de sangue pode revelar anormalidades morfológicas acentuadas nos eritrócitos, incluindo fragmentação da membrana e microesferocitose. As anormalidades mais graves comumente são observadas imediatamente após queimaduras extensas, antes que haja tempo de ocorrer uma resposta reticulocitária. As células muito lesadas são rapidamente removidas da circulação.

Hemólise traumática. A anemia hemolítica caracterizada por anormalidades morfológicas acentuadas dos eritrócitos, as quais incluem fragmentos (esquizócitos) e células irregularmente contraídas (células triangulares, células em capacete), foi atribuída ao traumatismo físico de eritrócitos. A base do processo hemolítico é provavelmente a lesão dos eritrócitos em seu contato com redes frouxas de fibrina (coagulação intravascular) ou com lesões vasculares patológicas. A fragmentação das células ocorre com ou sem lise intravascular. Nesse grupo de distúrbios, adequadamente denominados "síndrome da fragmentação eritrocitária", são reconhecidas duas categorias gerais.

Anemia hemolítica macroangiopática (valvopatias e próteses cardíacas). A hemólise intravascular crônica associada ao baixo nível sérico de haptoglobina, hemossiderinúria, reticulocitose e anormalidades eritrocitárias (p. ex., esquizócitos e células irregularmente contraídas) ocorre após cirurgia de substituição valvar por uma prótese ou após reparação cirúrgica de um defeito septal com um enxerto plástico (Erslev, 2001d). Isso foi atribuído à lesão mecânica dos eritrócitos no ambiente turbulento de uma valva insuficiente ou de uma superfície rugosa não coberta por células endoteliais. A reparação valvar ou a cobertura do enxerto por células endoteliais reduz o processo hemolítico. Outros estudos demonstraram que alguns pacientes com valvopatia cardíaca apresentam um processo hemolítico que pode ser alterado pela cirurgia.

O trauma mecânico externo foi relatado na hemoglobinúria da marcha, uma condição observada em soldados após uma longa marcha ou em praticantes de *jogging* ou em outros atletas após exercícios longos, particularmente sobre superfícies duras. A hemólise intravascular crônica pode levar à deficiência de ferro em decorrência da perda de hemoglobina na urina.

Microangiopatia trombótica (anemia hemolítica microangiopática). Microangiopatias trombóticas são distúrbios oclusivos microvasculares caracterizados por agregação sistêmica ou intrarrenal de plaquetas, trombocitopenia e lesão mecânica dos eritrócitos. Eritrócitos fragmentados (p. ex., esquizócitos e células irregularmente contraídas) são provavelmente produzidos quando o sangue flui através de áreas turbulentas da microcirculação que estão parcialmente ocluídas por agregados plaquetários (Moake, 2002). A microangiopatia trombótica pode ser idiopática ou desencadeada por fármacos (p.ex, mitomicina), transplante, processo maligno, gestação, colagenose ou HIV (Ahmed, 2002).

A classificação da microangiopatia trombótica foi controversa durante muitos anos. Na prática clínica de rotina, o termo púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) é em geral utilizado para casos de adultos com sintomas predominantemente neurológicos, enquanto o termo síndrome hemolítico-urêmica (SHU) tem sido utilizado para descrever casos pediátricos com microangiopatia trombótica e envolvimento renal predominante (Moake, 2002). Entretanto, a distinção nem sempre é possível e a sobreposição da sintomatologia pode ser observada. Autores sugerem a inclusão de ambas as entidades sob a denominação PTT/SHU, supondo um mecanismo patogênico similar com diferente tropismo por órgãos. Outros agrupam casos esporádicos de SHU com PTT sob o nome de microangiopatia trombótica idiopática e separam a maioria dos casos de SHU sob o nome de microangiopatia trombótica associada à toxina (Ahmed, 2002). Estudos recentes indicam uma diferença nos mecanismos patogênicos entre a SHU e a PTT que será discutida a seguir.

Síndrome hemolítica urêmica (SHU). O SHU ocorre mais comumente em lactentes com menos de 2 anos de idade e é comumente precedida por uma infecção associada à diarreia. É provável que alguns desses casos sejam devidos a um dos vários tipos de Escherichia coli que produzem uma verotoxina (assim denominada por sua toxicidade contra células do rim [vero] do macaco verde africano). A infecção por *Shigella dysenteriae* e, ocasionalmente, outros microrganismos também podem causar SHU em crianças e adultos. A toxina Shiga é codificada pela *S. dysenteriae*. As toxinas Shiga 1 e 2 podem estar presentes em vários sorotipos de *E. coli*, o mais comum sendo a *E. coli* 0157:H7. Toxinas Shiga causam diarreia sanguinolenta e, a seguir, entram na circulação e viajam no plasma na superfície das plaquetas ou dos monócitos (Moake, 2002). Estudos recentes sugerem que essas toxinas se ligam ao endotélio capilar glomerular e a outras células epiteliais renais. As toxinas Shiga, com citocinas secretadas localmente, provocam a liberação de multímeros incomumente grandes do fator de von Willebrand, os quais promovem a agregação na vasculatura renal (Moake, 2002). A anemia hemolítica com esquizócitos (por causa da interação dos eritrócitos com lesões trombóticas microvasculares), a trombocitopenia variável e a uremia são as principais características. A morte ocorria antigamente em aproximadamente 50% dos casos. A patologia renal incluía a glomerulonefrite aguda e lesões vasculares trombóticas e necróticas associadas à necrose cortical renal bilateral irregular. Com a terapia suportiva, incluindo transfusões e diálise, alguns investigadores relataram uma mortalidade reduzida para 5 a 15%. De qualquer modo, comprometimentos renais menores a maiores foram relatados em aproximadamente 50% dos pacientes. Uma variante familiar da SHU foi relatada em associação com a deficiência familiar de fator H, o qual é um componente do complemento. Esses pacientes apresentam uma taxa de mortalidade muito mais elevada (Moake, 2002).

Púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). A PTT pode ocorrer em qualquer ideia, mas possui uma incidência máxima na terceira década. Ela ocorre mais frequentemente em mulheres que em homens. A incidência anual é de 3,7 casos por 100.000 (Ahmed, 2002). A tríade de manifestações clínicas presente na maioria dos pacientes inclui a anemia hemolítica, trombocitopenia e sintomas neurológicos. Além disso, febre e doenças renais estão comumente presentes. Patologicamente, lesões oclusivas microvasculares com trombos hialinos e proliferação endotelial são disseminadas pelo corpo. Até 1997, a etiologia era desconhecida. Diferentes teorias incluíam a lesão endotelial por estresse oxidante, anticorpos antiendoteliais, anticorpos anti-CD36 (glicoproteína IV localizada na microvasculatura), fatores antiagregantes plaquetários e liberação de grandes múltimeros do fator de von Willebrand (vWF) no plasma. Em 1996, uma protease que causa a clivagem de subunidades do vWF foi identificada no plasma normal. Em 1997 e nos anos seguintes, vários relatos indicaram deficiência da protease clivadora do vWF em pacientes com PTT em razão do nível enzimático baixo (em casos familiares) ou da presença de um inibidor enzimático IgG (em casos não familiares). Essas observações foram confirmadas por estudos adicionais, os quais revelaram níveis normais da protease clivadora do vWF na SHU (Moake, 2004). A enzima foi ainda mais caracterizada sob o número 13 em uma família de 19 enzimas distintas do tipo ADAMTS identificadas até o momento (uma desintegrina e metaloprotease com oito domínios tipo trombospon-

dina-1). Por essa razão, a metaloprotease que provoca a clivagem do vWF é atualmente designada ADAMTS13 (Moake, 2004). Na ausência da protease clivadora do vWF, multímeros ultragrandes do vWF secretados pelas células endoteliais não são processados normalmente. Esses multímeros altamente adesivos podem induzir a agregação de plaquetas na microcirculação sob estresse de cisalhamento resultando na manifestação clínica da PTT. A doença é aguda e, até a década de 1980, era fatal em mais de 50% dos casos. Com a terapia de troca plasmática através da plasmaferese e de transfusões de plasma (além de inibidores plaquetários), a taxa de remissão aumentou e a sobrevida de longo prazo atualmente é próxima de 90% (Moake, 2004).

Pré-eclâmpsia/eclâmpsia. A pré-eclâmpsia e a eclâmpsia são distúrbios microangiopáticos que ocorrem na gestação e que compartilham algumas características da SHU ou da PTT. Aproximadamente 4 a 39% das pacientes com pré-eclâmpsia grave desenvolvem a síndrome HELLP: hemólise, elevação de enzimas hepáticas e contagem plaquetária baixa. Usualmente, a síndrome manifesta-se durante o terceiro trimestre de gestação, embora algumas pacientes possam apresentá-la durante o período pós-parto. A maioria das pacientes recupera-se em poucos dias após o parto. Um pequeno subgrupo de pacientes apresenta uma doença multissistêmica persistente grave que exige a troca plasmática (McMinn, 2001).

Agentes infecciosos

A destruição de eritrócitos pelo plasmódio é responsável pela anemia na malária. Essa hipótese é sustentada pela observação de que a fragilidade osmótica e mecânica dos eritrócitos parasitados aumenta. A inibição da atividade da medula óssea pode ser um fator adicional. A hemoglobinúria fulminante (febre de Blackwater) é uma complicação da malária causada pelo *P. falciparum*.

A febre de Oroya é uma doença frequentemente fatal que ocorre no Peru e é caracterizada por uma anemia hemolítica e leucocitose. O agente responsável é a *Bartonella bacilliformis*.

A babesiose, uma infecção por protozoário transmitida por carrapatos de roedores e gado, está associada à hemólise. Parasitas podem ser observados nos eritrócitos em lâminas de sangue coradas pela técnica de Romanowsky.

A anemia hemolítica com aglutininas frias pode complicar a pneumonia por micoplasma e a mononucleose infecciosa. Isso se deve ao efeito do anticorpo sobre os eritrócitos.

A anemia hemolítica de gravidade variada é frequente em algumas infecções bacterianas. Um exemplo notável é a septicemia por *Clostridrium perfringens* após aborto séptico ou cirurgia das vias biliares, a qual pode ser acompanhada por uma crise hemolítica dramática e potencialmente fatal.

Anemias hemolíticas imunes

Anemias hemolíticas imunes são distúrbios nos quais a sobrevida dos eritrócitos é reduzida por causa da deposição de imunoglobulina e/ou complemento sobre a membrana eritrocitária. As anemias hemolíticas imunes podem ser agrupadas de acordo com a presença de autoanticorpos, aloanticorpos ou anticorpos relacionados a fármacos (Tab. 31.11).

Anemia hemolítica autoimune. As anemias hemolíticas autoimunes (AIHA, *autoimmune hemolytic anemia*) são devidas a uma alteração da resposta imune que resulta na produção de anticorpo contra os próprios eritrócitos do hospedeiro, com subsequente hemólise. A incidência de AIHA é estimada em 10 a 30 casos por 1 milhão de habitantes (Gehrs, 2002). As AIHAs podem ser classificadas de acordo com as características clínicas ou sorológicas (Tab. 31.12). Algumas delas são mediadas por anticorpos com uma afinidade máxima de ligação a 37°C e outras são mediadas por anticorpos com sua afinidade máxima de ligação a 4°C. Além disso, as AIHAs podem ser vistas de acordo com a sua associação com outros distúrbios. Em um estudo de 1.834 pacientes, aproximadamente 40% dos casos de AIHA foram associados a uma doença subjacente, enquanto o restante foi considerado idiopático (Sokol, 1992). Distúrbios linfoproliferativos são responsáveis por aproximadamente metade dos casos de AIHAs por anticorpo reativo ao frio ou ao calor (Gehrs, 2002).

Etiologia e fisiopatologia. A causa da produção de autoanticorpos em pacientes com AIHA é desconhecida. No entanto, vários mecanismos foram sugeridos. Anticorpos autoimunes, particularmente os reativos ao frio, são algumas vezes produzidos após uma infecção. Isso é tipicamente observado com a produção de anti-I em pacientes com infecções causadas pelo *Mycoplasma pneumoniae* e anti-i em pacientes com mononucleose infecciosa. As aglutininas frias de especificidade anti-I e anti-i são notavelmente similares no que diz respeito aos sítios de ligação do antígeno. Esses anticorpos reagem com anticorpos que também identificam o produto do segmento genético VH4-34 nas células B. Foi apresentada a hipótese de que infecções podem causar a produção de anticorpos de uma população de células B utilizando esse segmento genético. Esses anticorpos também apresentam atividade de aglutininas frias contra os antígenos I/i (Rosse, 2004).

Tabela 31.11 Classificação de anemias hemolíticas imunes

Anemias hemolíticas autoimunes
Associadas a anticorpos quentes
Associadas a anticorpos frios
Associadas à combinação de anticorpos quentes e frios
Anemias hemolíticas aloimunes
Anemia hemolítica associada à transfusão
Doença hemolítica do recém-nascido
Incompatibilidade Rh
Incompatibilidade ABO
Anemia hemolítica induzida por fármacos
Adsorção de fármaco
Indução à produção de autoanticorpos
Formação de neoantígeno

Tabela 31.12 Anemia hemolítica autoimune (AIHA)*

Condição	AIHA por anticorpo reativo ao calor	AIHA por anticorpo reativo ao frio		AIHA mista
		CHAD	PCH	
Idiopática	282 (23)	194 (16)	5 (< 1)	47 (4)
Distúrbios induzidos por fármaco	184 (15)	0	0	2 (< 1)
Neoplasia	165 (14)	81 (7)	0 (0)	26 (2)
Linfoma não Hodgkin	27	25	0	8
Leucemia linfocítica crônica	65	4	0	8
Linfoma de Hodgkin	11	7	0	5
Carcinomas	37	30	0	4
Miscelânea	25	15	0	1
Infecções	9 (< 1)	76 (6)	14 (1)	2 (< 1)
Pneumonia por micoplasma	0	21	0	0
Pneumonia viral	2	19	0	0
Mononucleose infecciosa	0	11	1	0
Miscelânea	7	25	13	2
Doenças do colágeno	30 (2)	15 (1)	0 (0)	20 (2)
Lúpus eritematoso sistêmico	7	4	0	16
Artrite reumatoide	21	6	0	4
Outras	2	5	0	0
Miscelânea	45 (4)	20 (2)	0	6 (< 1)
Total	715 (58)	386 (32)	19 (2)	103 (8)

* Os números entre parênteses são porcentagens.

CHAD = doença por hemaglutinina fria; PCH = hemoglobinúria paroxística fria.

Modificado de Sokol, 1985.

A quantidade de anticorpo, sua avidez por autoantígeno eritrocitário e sua capacidade de fixar complemento variam significativamente. A opsonização de eritrócitos pode destruí-los na circulação (hemólise intravascular) ou acelerar sua remoção da circulação pelos macrófagos tissulares (hemólise extravascular). Os principais locais desses macrófagos são o baço e, em uma menor extensão, o fígado (Gehrs, 2002).

O desenvolvimento da AIHA em pacientes com distúrbios linfoproliferativos ou com distúrbios autoimunes pode estar relacionado a alguma anormalidade nas células B, células T, macrófagos ou à interação entre essas células. Talvez a perda da função supressora das células T possa causar uma produção descontrolada de anticorpos antieritrocitários pelas células B. Essa hipótese é fortalecida pela observação de que a metildopa, um fármaco que sabidamente provoca o desenvolvimento de anticorpos antieritrocitários, inibe a ativação de linfócitos T supressores (Gehrs, 2002).

Na AIHA associada a anticorpos quentes, existe um revestimento de IgG dos eritrócitos com ou sem fixação de complemento. A eliminação de eritrócitos ocorre sobretudo no baço. Na ausência de fixação de complemento, parece que a porção Fc da IgG ligada ao eritrócito interage com o receptor de Fc presente na membrana dos macrófagos esplênicos localizados ao longo dos cordões de Billroth. Consequentemente, os eritrócitos sensibilizados são retidos, fagocitados ou fragmentados pelos macrófagos durante a sua passagem pelo baço.

Na AIHA associada à produção de autoanticorpo frio, os eritrócitos geralmente são revestidos por IgM. Nessas circunstâncias, a fixação de complemento ocorre frequentemente. Na hemoglobinúria paroxística fria, o anticorpo agressor é uma IgG que fixa complemento. Quando toda a sequência do complemento é ativada, pode ocorrer hemólise intravascular. Esse fenômeno pode ocorrer em casos de doença por hemaglutinina fria assim como na hemoglobinúria paroxística fria. Quando a ativação do complemento não leva o processo até o final, interrompendo no estágio intermediário, a lise intravascular de eritrócitos pode não ocorrer. Entretanto, a hemólise extravascular pode continuar. Nessa situação, células sensibilizadas com C3b na membrana ligam-se no fígado pela interação de C3b e seus receptores nas células de Kupffer. Eritrócitos podem ser fagocitados inteiramente ou partes das células podem ser removidas, resultando na fragmentação e formação de esferócitos.

Aproximadamente 7% dos pacientes com AIHA satisfazem os critérios diagnósticos tanto para autoanticorpos quentes quanto frios (Sokol, 1992). Nesses casos, a IgG e C3d sensibilizam os eritrócitos. O soro contém auto-hemaglutininas frias IgM (reagentes ao máximo a 4°C, mas com uma amplitude térmica alta, até 37°C) e autoanticorpos quentes IgG.

Anemia hemolítica autoimune associada ao anticorpo quente. A AIHA do tipo anticorpo quente é um pouco menos frequente em mulheres que em homens e ocorre mais em indivíduos com 40 anos ou mais. Os sinais e sintomas clínicos são os do distúrbio subjacente. No entanto, em indivíduos com anemia hemolítica autoimune idiopática, o paciente pode observar a presença de uma infecção leve das vias respiratórias superiores um pouco antes do início da hemólise. Na medida em que a doença evolui, o paciente pode apresentar fraqueza, tontura e febre. A icterícia pode ser uma das queixas iniciais. A gestação aumenta em cinco vezes o risco de desenvolvimento de autoanticorpos em comparação com a população controle (Gehrs, 2002).

Os achados laboratoriais incluem a presença de uma anemia moderada a grave. A contagem de neutrófilos pode estar aumentada. Em uma pequena proporção de casos, a trombocitopenia pode estar presente. A lâmina de sangue periférico frequentemente revela esferocitose, fragmentação eritrocitária, policromasia e alguns poucos normoblastos. A porcentagem de reticulócitos é alta em aproximadamente 50% dos pacientes e está comumente associada ao aumento do VCM. A ausência de reticulócitos não deve descartar o diagnóstico de anemia hemolítica autoimune. A medula óssea apresenta hiperplasia eritroide normoblástica, algumas vezes com leves alterações megaloblásticas.

Usualmente, ocorre uma diminuição da haptoglobina sérica e um aumento da bilirrubina indireta e de LDH. Os testes de fragilidade osmótica e a auto-hemólise podem ser normais ou anormais.

Os testes direto e indireto de antiglobulina indicam a presença de anticorpos antieritrocitários. A especificidade dos autoanticorpos geralmente é direcionada contra antígenos do sistema Rh, proteína banda 3 e banda 4.1 da membrana e glicoforina A. Entretanto, a atividade contra antígenos U, LW, Kell, jk^a e Fy^a também pode ocorrer. Mais provavelmente, o anticorpo quente é uma IgG com subclasse IgG1 e, menos frequentemente, IgG3. Quando há presença apenas de IgG2 ou IgG4 nos eritrócitos, não ocorre reação hemolítica associada (Packman, 2001a). Ocasionalmente, o anticorpo pode ser uma IgA e, raramente, uma IgM. O complemento pode ser detectado na membrana eritrocitária em um pouco mais de 50% dos casos.

Em alguns casos, eritrócitos sensibilizados contêm menos imunoglobulina do que pode ser detectado utilizando antiglobulinas preparadas comercialmente, as quais em geral são sensíveis a 250 a 500 moléculas de IgG por eritrócito (Gilliland, 1976). Nessas circunstâncias, o autoanticorpo pode algumas vezes ser detectado com um teste de consumo de antiglobulina.

A evolução clínica da AIHA associada a anticorpo quente é caracterizada por períodos de remissão e de recaída. Na AIHA secundária, a evolução e o prognóstico estão relacionados à natureza da doença subjacente. Na AIHA idiopática, as complicações do distúrbio hemolítico podem ser graves e levar ao óbito.

AIHA associada ao anticorpo frio. A AIHA associada ao anticorpo frio pode ser mediada por uma imunoglobulina IgM e, menos frequentemente, por uma IgG. O autoanticorpo IgM está associado a uma síndrome conhecida como doença por aglutinina fria, enquanto o autoanticorpo IgG é visto na hemoglobinúria paroxística fria.

Doença por aglutinina fria. Geralmente, a doença por aglutinina fria ocorre em indivíduos com mais de 50 anos e mais em mulheres que em homens. Em alguns casos, a doença por aglutinina fria está associada a um distúrbio linfoproliferativo ou a uma infecção (especialmente por *Mycoplasma pneumoniae* ou mononucleose infecciosa). Casos não associados a uma doença subjacente são considerados idiopáticos. Quase todos os soros de indivíduos saudáveis contêm baixo título de aglutininas frias, consideradas benignas ou inofensivas e elas são policlonais. As aglutininas frias pós-infecciosas geralmente são policlonais. Em contraste, aglutininas frias monoclonais geralmente são patogênicas e podem dar origem ao linfoma de célula B (Gehrs, 2002). A doença por aglutinina fria representa aproximadamente 20% das AIHAs.

Os sinais e sintomas variam enormemente. Alguns indivíduos podem se queixar de acrocianose ou fenômeno de Raynaud. Outros apresentam episódios de hemólise após a exposição ao frio.

Os achados laboratoriais usualmente indicam uma anemia. Esferócitos e eritrócitos policromatófilos estão presentes em graus variáveis na lâmina de sangue. Pode haver uma acentuada aglutinação eritrocitária, a qual deve ser diferenciada da formação de rouleaux (ver Figs. 29.25 e 29.26). Uma leucocitose leve pode estar presente. A aglutinação eritrocitária pode interferir na contagem hematológica automatizada, particularmente a CHbCM, a qual tende a ser alta.

O anticorpo frio é geralmente uma imunoglobulina IgM com especificidade anti-I ou, com menor frequência, anti-i. Raramente, existem outras especificidades. Na forma crônica idiopática da doença por aglutinina fria, o anticorpo tende a ser uma IgM monoclonal, k com especificidade anti-I (Gehrs, 2002). A autoanticorpo também é capaz de fixar o complemento. Quando o título de anticorpo frio é muito alto, a variação térmica da atividade do anticorpo pode se estender até 37°C. O teste direto de antiglobulina é positivo somente se os reagentes apresentarem atividade anticomplemento. Por essa razão, geralmente observamos uma reação positiva antiglobulina com reagentes de amplo espectro e não γ, mas nenhuma aglutinação apenas com o reagente-γ. Com a exposição ao frio e a ligação de anticorpos aos eritrócitos, o complemento pode ser ativado até o estágio do C3b, o qual adere aos eritrócitos após entrar na circulação sistêmica. Na circulação hepática, macrófagos possuem receptores específicos de C3b. Contudo, as células geralmente escapam da destruição hepática.

Hemoglobinúria paroxística fria. A hemoglobinúria paroxística fria é um distúrbio muito raro que pode ocorrer em um indivíduo em qualquer idade. As mulheres são tão afetadas quanto os homens. Os pacientes apresentam sintomas de hemólise aguda após a exposição ao frio. Podem apresentar calafrios, febre, dor nas costas e membros inferiores e hemoglobinúria. A forma aguda pode suceder uma doença viral aguda ou imunização, mas a forma crônica está associada à sífilis congênita.

Os achados laboratoriais consistem na anemia, contagem elevada de reticulócitos, aumento da concentração de bilirrubina indireta e presença de hemoglobina na urina.

O soro contém uma hemolisina fria com atividade bifásica. Esse anticorpo, descrito originalmente por Donath e Landsteiner (1904), é uma IgG que fixa os primeiros componentes do complemento (C1 a C4) no frio (4°C). Na medida em que a temperatura sobe para 25 a 37°C, o anticorpo dissocia-se, mas o restante das proteínas do complemento são ativadas e ocorre a lise eritrocitária. O teste direto de antiglobulina é positivo com anti-C3, mas ele é geralmente negativo com anti-IgG, exceto se realizado em uma temperatura mais baixa. A especificidade do anticorpo é dirigida contra o antígeno P. Em geral, o prognóstico é bom.

AIHA associada a anticorpos quentes e frios. A AIHA associada tanto a anticorpos quentes quanto frios é mediada por anticorpos quentes IgG e complemento, assim como por hemaglutininas frias IgM. As mulheres provavelmente são mais afetadas que os homens. Parece haver uma associação entre a combinação de AIHA associada a anticorpos quentes e frios e o SLE (lúpus eritematoso sistêmico), haja vista 15 a 42% das pacientes apresentarem SLE (Sokol, 1985; Shulman, 1985). Em um estudo (Shulman, 1985), 6 de 12 pacientes (50%) apresentavam AIHA idiopática e quatro deles (33%) apresentavam trombocitopenia concomitante (síndrome de Evans). Todos os 12 pacientes apresentavam hemólise grave que respondeu prontamente à terapia com corticosteroide.

Doença hemolítica aloimune do recém-nascido. A doença hemolítica aloimune do recém-nascido usualmente ocorre após a passagem transplacentária de anticorpos maternos antieritrócitos fetais. A doença hemolítica aloimune do recém-nascido costuma decorrer da incompatibilidade dos antígenos Rh e ABO entre a mãe e o feto. Em raros casos, alguns outros antígenos eritrocitários podem ser responsáveis por esse distúrbio.

Na doença hemolítica aloimune do recém-nascido devida à incompatibilidade Rh, a sensibilização prévia é necessária para iniciar o processo patológico. A sensibilização geralmente ocorre durante a gestação quando eritrócitos fetais Rh(D) cruzam a placenta e entram na circulação materna com células Rh-negativo. A maioria das mulheres apresentam menos de 1 mL de sangue fetal em sua circulação após o parto. Entretanto, a hemorragia materno-fetal intraparto de mais de 30 mL ocorre em aproximadamente 1% das gestações (Ramasethu, 2001). A sensibilização materna também pode ocorrer por uma transfusão prévia incompatível. Em qualquer uma dessas circunstâncias, anticorpos maternos IgG são produzidos contra as células fetais. Se ocorrer uma nova gestação em uma mulher sensibilizada, os eritrócitos fetais novamente atingem a circulação materna e reestimulam a resposta imune, resultando na transferência de anticorpo anti-Rh(D) através da placenta e redução da sobrevida dos eritrócitos fetais.

No sistema ABO, anticorpos anti-A ou anti-B da classe IgG podem surgir espontaneamente na mãe. Sua presença não exige a existência de uma transfusão ou gestação prévia. Como resultado, o primeiro filho pode apresentar doença hemolítica aloimune do recém-nascido quando existir incompatibilidade ABO. Embora essa incompatibilidade ocorra em 15% das gestações de mulheres com grupo O, estima-se que a doença hemolítica causada pela incompatibilidade ABO ocorra em apenas 3% de todos os nascimentos (Ramasethu, 2001).

As características clínicas da doença hemolítica aloimune do recém-nascido decorrentes da incompatibilidade Rh varia enormemente. Alguns recém-nascidos apresentam apenas uma icterícia leve. Outros apresentam inicialmente palidez acentuada e, a seguir, apresentam icterícia. Eles podem apresentar hepatoesplenomegalia proeminente. A doença pode ser complicada por uma diátese hemorrágica, desequilíbrios acidobásicos acentuados e *kernicterus*. Em casos muito graves, o paciente pode apresentar hidropsia fetal.

O exame precoce do sangue usualmente revela um aumento de eritrócitos nucleados, os quais podem incluir formas imaturas (p. ex., pró-normoblastos). Embora esse achado seja o responsável pelo nome da doença, eritroblastose fetal, a eritroblastose nem sempre está presente, especialmente se o exame não for realizado imediatamente após o nascimento.

Comumente, se observa nesse distúrbio até $2{,}0 \times 10^9$/L eritrócitos nucleados em recém-nascidos a termo e até $5{,}0 \times 10^9$/L em recém-nascidos prematuros. Normalmente, a média de eritrócitos nucleados é de $0{,}5 \times 10^9$/L em recém-nascidos a termo e de 1,0 a $1{,}5 \times 10^9$/L em recém-nascidos prematuros. O sangue da veia umbilical para exame precoce é mais confiável que o periférico (capilar) porque a contagem eritrocitária e a hemoglobina podem estar significativamente alteradas entre o nascimento e a ligadura do cordão.

Geralmente, existe uma anemia macrocítica com grau variado de gravidade e um aumento de reticulócitos. Ocasionalmente, a anemia pode se desenvolver abruptamente no segundo ou terceiro dia. A contagem de leucócitos geralmente está elevada, com leucócitos imaturos. Existe uma hiperplasia normoblástica pronunciada da medula óssea.

Em recém-nascidos afetados severamente, pode ocorrer trombocitopenia, diminuição de pró-coagulantes do complexo da protrombina ou coagulação intravascular difusa.

Um teste direto de antiglobulina de eritrócitos fetais indica a presença de um anticorpo IgG. Quando o soro materno e um eluato de eritrócitos fetais são incubados separadamente com um painel de células O, pode-se demonstrar geralmente a presença de anticorpo com especificidade anti-Rh(D). Na gestante Rh-negativo sabidamente sensibilizada ao Rh(D), a titulação de anticorpo anti-Rh(D) é realizada periodicamente durante a gestação para servir como guia para a realização de amniocentese.

A doença hemolítica aloimune do recém-nascido associada à incompatibilidade ABO é menos grave que a observada na associada à incompatibilidade Rh. Ocasionalmente, o diagnóstico é sugerido pela presença de hiperbilirrubinemia inexplicada em recém-nascidos do grupo A ou B de mães do grupo O.

Os achados laboratoriais usualmente revelam uma anemia leve e uma reticulose modesta. Em contraste com a doença isoimune por incompatibilidade Rh, a esferocitose na doença isoimune por incompatibilidade ABO pode ser proeminente. As células fetais em geral são fracamente positivas aos reagentes antiglobulina. O soro do recém-nascido e eluatos das células devem conter anticorpo anti-A ou anti-B. Além disso, o soro materno deve conter altos títulos de anticorpos anti-A ou anti-B da subclasse IgG.

Anemia hemolítica imune induzida por fármacos. A anemia hemolítica imune pode ocorrer após a administração de fármacos. Na década de 1970, a maioria dos casos foi associada à metildopa ou à terapia intravenosa com alta dose de penicilina. Recentemente, esse quadro mudou e o agente causal mais comum é a cefalosporina (Garratty, 2004). Três mecanismos parecem mediar a hemólise imune (Packman, 2001b).

Formação de complexos ternários (formação de neoantígenos). Sabe-se que muitos fármacos se ligam fracamente à membrana eritrocitária, mesmo quando administrados em pequenas doses (Tab. 31.13). Anticorpos reconhecem os componentes combinados do fármaco e da membrana eritrocitária como antígeno e se ligam a eles formando um complexo ternário. O anticorpo induzido por fármacos é usualmente uma IgM e tende a fixar o complemento, acarretando lise celular. Além disso, eritrócitos podem ser sequestrados no fígado e no baço por causa de seu revestimento com C3b.

Os pacientes apresentam uma hemólise intravascular aguda, hemoglobinemia e hemoglobinúria. A reação direta de antiglobulina é positiva se os reagentes possuírem atividade anticomplemento. A reação usualmente é negativa com o reagente-γ porque ele contém pouca especificidade anti-IgM ou anticomplemento.

O diagnóstico pode ser determinado pela incubação do soro do paciente com o fármaco agressor na presença de eritrócitos-alvo, observando-se a ocorrência de aglutinação, lise ou sensibilização dos eritrócitos.

Adsorção do fármaco à membrana eritrocitária. As penicilinas e as cefalosporinas, particularmente em altas doses, ligam-se firmemente a proteínas, incluindo a membrana eritrocitária. Esses fármacos induzem uma resposta imune (produção de anticorpos) a elas, mas a especificidade do anticorpo não é direcionada contra a membrana eritrocitária. Ocorre a produção de anticorpos IgM e IgG, mas somente os anticorpos IgG estão associados à hemólise imune. O complemento não é envolvido. Os eritrócitos, revestidos de anticorpo IgG, são supostamente removidos via receptores Fc nos macrófagos no baço.

O teste direto da antiglobulina é fortemente positivo. Anticorpos eluídos dos eritrócitos do paciente reagirão apenas com eritrócitos previamente tratados com penicilinas ou cefalosporinas.

Indução de autoanticorpo por fármacos. Em aproximadamente 15% de pacientes que utilizam metildopa (anti-hipertensivo), uma reação direta de antiglobulina está presente. O anticorpo é da classe IgG e, em alguns estudos, parece possuir especifidade Rh (Packman, 2001b).

Tabela 31.13 Exemplos de fármacos que causam anemia hemolítica imune e seu mecanismo de ação

Mecanismo de adsorção de fármacos	
Penicilinas	Cefalosporinas
Tetraciclinas	Tolbutamida
Mecanismo de complexo ternário	
Estibofeno	Quinidina
Quinina	Cefalosporinas
Rifampicina	Dietilestilbestrol
Clorpropamida	Anfotericina B
Mecanismo de autoanticorpo	
α-metildopa	L-Dopa
Procainamida	Cefalosporinas
Ácido mefenâmico	Fludarabina

Modificado de Packman, 2001b, p. 657.

O mecanismo real da produção de autoanticorpos não é conhecido. Entretanto, foi hipotetizado que a metildopa causa ativação de células T e aumento da secreção de γ-interferon, o qual supra-regula moléculas de complexos de histocompatibilidade maiores classes I e II nas células que apresentam antígeno e induzem a produção de anticorpos pelas células B (Baier, 1994).

O desenvolvimento da reação positiva antiglobulina ocorre após um período de 3 a 6 meses e é dose-dependente. Trinta e seis por cento dos pacientes apresentam uma reação direta de antiglobulina com o consumo de 2 g ou mais de metildopa por dia e 11% apresentam uma reação positiva com o consumo de apenas 1 g ao dia. Uma anemia hemolítica imune ocorre em menos de 1% dos pacientes e não é dose-dependente. A metildopa também diminui a atividade fagocítica mononuclear, o que pode explicar a raridade da anemia hemolítica apesar da presença usual de autoanticorpos (Sokol, 1992). Outros fármacos que foram descritos como causadores de anemia hemolítica autoimune de maneira similar à metildopa são: levodopa, procainamida, fludarabina e ácido mefenâmico.

Adsorção não imunológica de imunoglobulinas à membrana eritrocitária. Fármacos como as cefalosporinas e a cisplatina parecem alterar a membrana eritrocitária, causando a adsorção inespecífica de proteínas plasmáticas à sua superfície. Como resultado, imunoglobulinas IgG e IgM podem se ligar frouxamente à membrana eritrocitária. Esse fenômeno pode então causar uma reação direta antiglobulina positiva. Contudo, a ocorrência de anemia hemolítica não foi provada (Packman, 2001b; Garratty, 2004).

Diagnóstico laboratorial da anemia

O diagnóstico e o estudo da anemia exigem o uso e a interpretação adequados das dosagens laboratoriais. O pré-requisito para o uso eficiente do laboratório é uma anamnese e um exame físico cuidadosos. Ambos direcionam os exames laboratoriais iniciais e fornecem uma orientação importante na determinação da natureza da anemia.

Para determinar se o paciente está anêmico é preciso confirmar se os valores da hemoglobina, do hematócrito ou da contagem eritrocitária se encontram (1) abaixo dos intervalos de referência para a idade e o sexo ou (2) abaixo dos valores prévios do paciente, embora estejam dentro dos intervalos de referência. A tarefa seguinte é definir a causa subjacente ou o mecanismo da anemia.

Usualmente, o hemograma completo (contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, Hb, Ht, VCM, HbCM, CHbCM) e o exame da lâmina de sangue com coloração de Wright fazem parte do exame de rotina do sangue. É possível que todos esses valores estejam normais na presença de uma anemia macrocítica leve, na qual a contagem de eritrócitos não cai abaixo da faixa normal e os macrócitos presentes (e detectáveis na lâmina de sangue) não elevam o VCM acima da faixa normal.

Após a anemia ser descoberta, o exame básico de sangue deve incluir: (1) hemoglobina, hematócrito, contagem de eritrócitos e índices eritrocitários; (2) exame da lâmina de sangue; (3) contagem de leucócitos; (4) contagem de plaquetas; e (5) contagem de reticulócitos.

Com os instrumentos multicanais atuais, todos os valores dos eritrócitos e os índices apresentam uma precisão comparável. Entretanto, os índices são valores médios e não detectam diferentes populações de células que se equilibram entre si. Por exemplo, deficiências combinadas de ferro e folato podem dar origem a populações de células macrocíticas e microcíticas hipocrômicas, as quais podem produzir índices normais. O exame cuidadoso da lâmina de sangue é essencial e as curvas de distribuição do volume celular são muito úteis para a definição do tipo de anormalidade (ver Cap. 29).

O tamanho dos eritrócitos, determinado pelo VCM e exame da lâmina de sangue, determinará o tipo morfológico da anemia. Além disso, certos achados na lâmina de sangue sugerirão mecanismos que estão envolvidos.

O aumento do número de macrócitos policromáticos, com ou sem normoblastos, sugere aumento da eritropoiese e, no paciente não tratado, isso geralmente é devido à hemorragia ou hemólise. Nessa situação, a história (de perda sanguínea) ou o exame físico (icterícia ou esplenomegalia) irá ajudar.

Achados sugestivos de hemólise são a poiquilocitose (eritrócitos com formas anormais), células falciformes, formas contraídas irregularmente (incluindo fragmentos eritrocitários ou esquizócitos) e esferócitos. Algumas vezes é difícil detectar esferócitos na esferocitose hereditária por causa da anisocitose mínima. Os dois achados morfológicos nos eritrócitos que são úteis nessa situação são a presença de um diâmetro celular médio (DCM) entre 6,0 e 6,5 μm (normal = 7,0–7,4 μm) e eritrócitos com palidez excêntrica.

Células-alvo também podem ser observadas em hemoglobinopatias, especialmente na presença de HbC, HbD e HbE e nas talassemias. Elas podem estar presentes em qualquer anemia hipocrômica, embora usualmente em menor número. Células-alvo sem microcitose também são observadas em hepatopatias e na ausência de baço ou de função esplênica.

O *ponteado basófilo* fino (devido à precipitação de RNA) pode ser observado em eritrócitos policromáticos associado a um aumento significativo da geração de eritrócitos, como na resposta à hemorragia ou à hemólise. O ponteado basófilo grosseiro sugere uma anormalidade na síntese de hemoglobina. Ele é observado nas anemias megaloblásticas, talassemias, anemias refratárias, algumas deficiências eritrocitárias e intoxicação por chumbo. Em particular, a hipocromasia ou a microcitose com ponteado depõe contra o diagnóstico de anemia ferropriva e é mais sugestiva de talassemia ou intoxicação por chumbo.

A combinação de macrócitos ovais (especialmente macrócitos em forma de ovo) e neutrófilos hipersegmentados indicam a muito provável existência de anemia megaloblástica.

Finalmente, o exame da lâmina de sangue permite a avaliação de anormalidades qualitativas nos leucócitos e plaquetas assim como uma estimativa de suas quantidades. As doenças sanguíneas que podem ser suspeitadas inicialmente ou detectadas dessa maneira são muitas e incluem a leucemia linfocítica crônica, anemia hemolítica compensada, início da anemia megaloblástica e anomalias eritrocitárias (p. ex., eliptocitose hereditária) ou leucocitárias (p. ex., mielodisplasia e anomalia nuclear de Pelger-Hüet).

Após os estudos básicos anteriormente mencionados, a escolha de procedimentos adicionais depende do tipo morfológico da anemia determinado pelos índices e pela lâmina de sangue.

Anemia macrocítica (VCM aumentado)

As anemias macrocíticas são normocrômicas, como é determinado pelo aspecto na lâmina e pela CHbCM. O primeiro passo é confirmar se a anemia é megaloblástica. Os indícios da lâmina já foram mencionados. Uma aspiração de medula óssea deve ser realizada para confirmar a presença de megaloblastose.

Medula óssea megaloblástica. Quando a medula óssea é megaloblástica, com alterações características tanto em precursores eritrocitários quanto leucocitários, a anemia é muito provavelmente devida à deficiência de folato ou cobalamina.

Ver seções anteriores sobre o diagnóstico da deficiência de cobalamina e de folato. Após o *tipo* de anemia ser definido, a causa deve ser determinada.

Medula óssea não megaloblástica. Quando a medula é não megaloblástica, condições que podem estar associadas à macrocitose devem

ser investigadas. Elas incluem hepatopatias; anemias hemolíticas; hipotireoidismo; consumo excessivo de álcool; anemias hipoplásicas; e anemias refratórias com medula óssea hiperplásica, as quais incluem as síndromes mielodisplásicas. Anemias associadas a esses distúrbios, embora possam ser macrocíticas, são mais comumente normocíticas e, consequentemente, também são consideradas com as anemias normocíticas.

Anemias microcíticas e hipocrômicas (VCM e HbCM diminuídos)

Se as contagens forem realizadas em um aparelho multicanal, a CHbCM pode estar na faixa normal, com grau leve a moderado de hipocromia. Consequentemente, o VCM assume o papel principal na detecção de anemias microcíticas hipocrômicas.

Essas anemias refletem um defeito quantitativo na síntese de hemoglobina:

1. *Anemias ferroprivas* devidas ao aumento da demanda ou à perda sanguínea não equilibrada pela ingestão.
2. *Anemia de doenças crônicas* associada à infecção, neoplasia ou colagenose. Essa anemia pode ser normocítica e normocrômica, mas na doença de longa duração ela é frequentemente microcítica e hipocrômica.
3. *Talassemia*. Trata-se de um comprometimento determinado geneticamente da taxa de síntese de globina.
4. *Anemia sideroblástica*. Grupo de anemias refratárias com hiperplasia eritroide da medula óssea no qual um defeito na síntese de hemoglobina cria uma população de células microcíticas hipocrômicas. A lâmina de sangue é dimórfica e pode haver prevalência de macrócitos, tornando o VCM normal ou alto.

Como a anemia ferropriva é a mais comum, a primeira etapa é determinar se está faltando ferro no organismo.

Quando a perda sanguínea não pode ser documentada, deve-se realizar a mensuração da ferritina sérica, ferro sérico e da capacidade de ligação do ferro ou a dosagem de ferro na medula óssea. Usualmente, esses exames diferenciam as duas anemias mais comuns dessa categoria, a anemia ferropriva e a anemia crônica simples associada a outra doença, frequentemente uma infecção crônica ou uma neoplasia. Em ambas, a concentração sérica de ferro está baixa, mas na anemia ferropriva, a capacidade total de ligação do ferro está elevada, enquanto na anemia de doenças crônicas ela está normal ou diminuída. A reserva de ferro na medula óssea está depletada na deficiência de ferro, mas está normal ou elevada na anemia de doenças crônicas. A anemia ferropriva em um homem adulto quase sempre significa perda sanguínea crônica. A fonte deve ser identificada e corrigida, quando necessário.

Anemias hipocrômicas (ou eritrocitoses) com ponteado basófilo e ferro sérico normal ou aumentado são mais provavelmente talassemias e os exames seguintes que deverão ser realizados são a eletroforese de hemoglobina e a determinação de HbA_2 e HbF. Estudos familiares são frequentemente necessários.

As anemias sideroblásticas incluem as anemias sideroblásticas refratárias idiopáticas, as quais fazem parte das síndromes mielodisplásicas (ver Cap. 32), assim como as anemias que ocorrem após terapia com certos fármacos (p. ex., isoniazida) ou na intoxicação crônica por chumbo. Um ponteado basófilo grosseiro é comum nesse grupo de anemias.

A Tabela 31.14 apresenta um sumário de algumas distinções laboratoriais nas anemias microcíticas.

Anemias normocíticas e normocrômicas (VCM normal)

Esse grande grupo de anemias apresenta muitas causas. Uma abordagem útil é a avaliação da eritrocinética em um determinado paciente (ver Cap. 30). Frequentemente, o índice de produção de reticulócitos (IPR) e o exame da medula óssea são suficientes. O IPR é a medida mais simples da eritropoiese efetiva.

Resposta ideal da medula óssea: índice de produção de reticulócitos superior a dois. Quando a produção de reticulócitos ultrapassa duas vezes o normal, como é determinado pela contagem absoluta de reticulócitos ou pelo IPR, pode-se supor que a medula óssea atingiu uma resposta ideal. A causa da anemia é uma perda sanguínea aguda ou hemólise. Quando a perda sanguínea não puder ser comprovada, devem ser buscadas evidências de que existe hemólise.

A hiperplasia eritroide da medula óssea, a dosagem das bilirrubinas séricas e do urobilinogênio fecal e urinário indicarão se existe aumento da atividade eritropoética e da destruição. A determinação da sobrevida dos eritrócitos pode ser necessária para comprovar a hemólise em alguns casos. O nível sérico baixo de haptoglobina e nível elevado de desidrogenase lática indicam para a hemólise, mas níveis normais não a excluem. Nenhuma dessas mensurações especifica se a hemólise é intravascular ou extravascular, mas o nível plasmático elevado de hemoglobina, a hemoglobinúria e a hemossiderinúria indicam hemólise intravascular.

Após ser definido que está ocorrendo uma hemólise excessiva, o tipo de mecanismo hemolítico deve ser identificado.

Teste direto de antiglobulina (de Coombs). Quando a reação direta de antiglobulina for positiva com reagentes de amplo espectro, testes para determinar a presença de IgG, IgM ou complemento nos eritrócitos devem ser realizados. Quando existe imunoglobulina presente nos eritrócitos, testes para a especifidade do anticorpo, aglutininas frias, anticorpo de Donath-Landsteiner e eletroforese de proteínas séricas podem ajudar a definir o processo.

Quando a reação direta de antiglobulina for negativa, os exames realizados a seguir dependem dos achados clínicos e dos resultados das mensurações já realizadas.

No caso de suspeita de esferocitose hereditária, a fragilidade osmótica antes e após incubação de 24 horas a 37°C e estudos familiares serão necessários.

Quando houver suspeita de uma anemia hemolítica congênita não esferocítica, a pesquisa de deficiência de G6PD e de piruvato quinase, eletroforese de hemoglobina e teste de afoiçamento serão úteis. Se esses exames forem negativos, o teste de instabilidade térmica, o teste de solubilidade do isopropanol e o teste de auto-hemólise devem ser considerados.

Quando a talassemia parece provável, a determinação de HbA_2 e HbF e, talvez, a pesquisa de inclusões de HbH são adequadas. Usualmente, as talassemias são anemias hipocrômicas microcíticas. A β-talassemia *major*, a β-talassemia *intermedia* e a doença de hemoglobina H são distúrbios hemolíticos e podem apresentar um IPR aumentado.

No caso de suspeita de hemólise induzida por fármacos, um teste de corpúsculos de Heinz, o teste de investigação de G6PD e, quando possível, testes de autoanticorpos dependentes de fármacos são indicados.

Quando a natureza da anemia hemolítica for obscura, um teste de citometria de fluxo para a hemoglobinúria paroxística notura deve ser realizado.

Tabela 31.14 Características laboratoriais das anemias microcíticas hipocrômicas

				Medula óssea					
	Ferro sérico	**TIBC sérico**	**% de saturação**	**% de sideroblastos**	**Reserva de ferro**	**Ferritina sérica**	**ZPP**	**HbA_2**	**HbF**
Deficiência de ferro	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	N–↓	N
Traço de β-talassemia	N (↑)	N	N	N	N–↑	N–↑	N	↑	N–↑
Anemia de doenças crônicas	↓	N–↓	↓	↓	N–↑	N–↑	↑	N	N
Anemias sideroblástica	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑ (↓)	N	N–↑

TIBC = capacidade total de ligação de ferro; ZPP = protoporfirina zinco; ↓ = diminuído; N = normal; ↑ = aumentado.

Resposta inadequada da medula óssea: índice de produção de reticulócitos inferior a dois. O mecanismo da anemia pode ser a eritropoiese ineficaz. Condições com o grau mais elevado de eritropoiese ineficaz aparecem em outras categorias (p. ex., anemia megaloblástica e talassemia), mas algumas anemias refratárias idiopáticas apresentam uma medula óssea hiperplásica e diminuição da liberação das células para o sangue. Em algumas dessas anormalidades em precursores eritroides sugestivas de alteração megaloblástica podem estar presentes, mas alterações granulocíticas e megacariocíticas usualmente observadas na anemia megaloblástica estão ausentes.

Uma baixa contagem de reticulócitos pode indicar diminuição da produção causada pela estimulação inadequada da medula óssea. A nefropatia renal pode causar diminuição da produção de eritropoetina. Certas endocrinopatias (p. ex., hipo-hipofisarismo ou hipotireoidismo) podem resultar em uma regulação da produção de hemoglobina em um nível mais baixo em consequência da diminuição da necessidade tissular de oxigênio.

Um grande grupo de anemias normocrômicas associadas a várias doenças crônicas formam um grupo heterogêneo caracterizado pela insuficiência medular em suprir as necessidades de uma sobrevida discretamente menor dos eritrócitos. Algumas dessas são anemias de distúrbios crônicos associados à infecção, neoplasia ou artrite reumatoide e apresentam o defeito no metabolismo do ferro observado previamente em anemias microcíticas hipocrômicas.

A incapacidade da medula óssea em responder à eritropoetina pode ser decorrente da lesão medular por fármacos ou substâncias químicas tóxicas, a causas desconhecidas ou à infiltração da medula por células neoplásicas ou tecido fibroso.

Nas condições com contagem de reticulócitos baixa em que a medula óssea não produz eritrócitos de modo eficaz, é usualmente útil examinar a medula óssea. Outros estudos para determinar a patologia subjacente podem então ser realizados de acordo com o quadro medular, a avaliação da eritrocinética e os achados clínicos.

Policitemia

A policitemia (eritrocitose) é classicamente definida como um hematócrito elevado, acima da faixa normal. Na clínica, a policitemia ocorre quando a hemoglobina e a contagem de eritrócitos estão aumentadas, refletindo uma elevação do volume eritrocitário total (Maran, 2004).

A policitemia absoluta refere-se a um aumento da massa eritrocitária total no corpo. Na policitemia relativa, a massa eritrocitária total não está aumentada. A policitemia pode ser classificada como na Tabela 31.15. Algumas classificações são baseadas na resposta da eritropoetina (Cazzola, 2004) enquanto outras baseiam-se no mecanismo subjacente, isto é, primário ou secundário e congênito ou adquirido (Gordeuk, 2005).

Policitemia relativa

A policitemia relativa refere-se a um aumento do hematócrito ou da contagem de eritrócitos como resultado da diminuição do volume plasmático. A massa eritrocitária total não aumenta. Isso ocorre na desidratação aguda (p. ex., diarreia grave ou queimaduras) e em pacientes submetidos à terapia com diuréticos.

Na policitemia espúria (policitemia aparente, síndrome de Gaisböck), a massa eritrocitária está frequentemente normal alta e o volume plasmático está normal baixo. Esses pacientes foram considerados como um extremo do estado fisiológico normal. Quase todos são do sexo masculino, apresentam uma alta incidência de tabagismo e tendem a ser obesos e hipertensos. A apneia do sono e o uso de diuréticos podem ser fatores contribuintes. O nível sérico de eritropoetina é normal (Cazzola, 2004).

Policitemia absoluta

Produção de eritropoetina apropriadamente aumentada devida à hipóxia

Insaturação arterial de oxigênio. A falta de oxigênio atingindo o sangue por qualquer razão resulta na insaturação arterial, diminuição da liberação de oxigênio para os tecidos, aumento da produção de eritropoetina, hiperplasia eritroide na medula óssea e consequente eritrocitose. A massa eritrocitária está aumentada. Como uma resposta à hipóxia, a 2,3-DPG e a P_{50} eritrocitárias estão aumentadas. Em contraste com a policitemia vera, geralmente não há leucocitose ou trombocitose e a fosfatase alcalina do neutrófilo está normal. A insaturação arterial de oxigênio pode ser a causa de policitemia em indivíduos que vivem em altitudes elevadas; em pacientes com doença pulmonar crônica e bloqueio da difusão de oxigênio no sangue; em cardiopatias cianóticas na qual existe um shunt direita-esquerda; e na carboxiemoglobinemia relacionada principalmente ao tabagismo. Em caso de intoxicação por monóxido de carbono, a hipóxia é causada por dois mecanismos: redução direta da saturação de oxigênio e interferência na liberação de oxigênio da hemoglobina (Landaw, 1990).

Hemoglobinopatia com alta afinidade pelo oxigênio. Outra causa de hipóxia é a presença de uma hemoglobina estruturalmente anormal que possui uma alta afinidade pelo oxigênio (Prchal, 2003) (ver anteriormente em "Distúrbios da Função e Estabilidade da Hemoglobina"). Como em outras hemoglobinopatias funcionais, o distúrbio ocorre no heterozigoto. Mais de 100 mutações de hemoglobina associadas ao aumento da afinidade pelo oxigênio foram identificadas (Prchal, 2003). A hemoglobina anormal libera menos oxigênio para os tecidos que a hemoglobina normal na mesma P_{O2}; a curva de dissociação do oxigênio é desviada para a esquerda e a P_{50} está diminuída. A 2,3-DPG eritrocitária não aumenta. Como na insaturação arterial de oxigênio, há um aumento da produção de eritropoetina e eritrocitose. Deve ser enfatizado que a eletroforese de hemoglobina de rotina geralmente não detecta essas variantes da hemoglobina porque a substituição de aminoácidos ocorre em um dos sítios de contato αβ da bolsa heme. Por essa razão, uma P_{50} é evidência presuntiva de uma hemoglobinopatia. Algumas hemoglobinas de alta afinidade associadas à policitemia são instáveis. Nesses casos, o teste de instabilidade térmica é positivo.

Outras causas de alteração da afinidade pelo oxigênio incluem a enzima 2,3-DPG eritrocitária e a hemoglobina M (Gordeuk, 2005).

Produção inapropriada de eritropoetina

Neoplasias. Neoplasias, benignas ou malignas, foram associadas à policitemia. Neoplasias renais representam a maioria. Em quase todos os casos, a eritrocitose desapareceu após a ressecção do tumor. O mecanismo não está claro. Foi demonstrado que algumas dessas neoplasias contêm e supostamente produzem eritropoetina (p. ex., hemangioma cerebelar, carcinoma de células renais, tumor de Wilms, alguns hepatomas).

Distúrbios renais. Em outras neoplasias ou crescimentos (p. ex., cistos renais, hidronefrose, carcinoma de ovário, alguns hepatomas),

Tabela 31.15 Classificação fisiopatológica da policitemia

Policitemia relativa
1. Diminuição do volume plasmático: desidratação, choque
2. Policitemia espúria (policitemia do estresse; síndrome de Gaisböck)
Policitemia absoluta
1. Policitemia secundária com produção de eritropoetina apropriadamente aumentada
a. Diminuição da carga de oxigênio: hipóxia, altitude elevada; doença pulmonar; cardiopatia cianótica; carboxiemoglobinemia; metemoglobinemia; HbM
b. Diminuição da descarga de oxigênio: hemoglobinopatia de alta afinidade pelo oxigênio, deficiência de bifosfoglicerato
2. Policitemia secundária com produção de eritropoetina inapropriadamente aumentada
a. Neoplasias: tumor de Wilms, carcinoma renal; hemangioma cerebelar; hepatoma
b. Hipóxia tissular localizada: rim policístico; estenose da artéria renal
c. Pós-transplante renal
d. Hepatite aguda
3. Policitemia genética
a. Policitemia congênita familiar primária (mutação do receptor de eritropoetina)
b. Policitemia de Chuvash (mutação do gene *VHL*)
4. Distúrbios primários da medula óssea
a. Policitemia vera

Modificado de Cazzola, 2004.

parece que a massa tumoral induz o aumento da produção renal de eritropoetina como consequência do aumento da pressão ou da hipóxia local no rim. A estenose da artéria renal também está associada à policitemia. A eritrocitose pós-transplante ocorre em 10 a 20% de receptores de transplante renal. O efeito terapêutico dos inibidores da enzima conversora da angiotensina nessa condição sugere um papel da angiotensina II na regulação da eritropoiese (Prchal, 2003).

Policitemia familiar. A policitemia familiar mais comum é devida à presença de uma hemoglobina com alta afinidade pelo oxigênio, a qual é herdada como um traço autossômico dominante. A policitemia congênita pode ser devida a um defeito no mecanismo de detecção da hipóxia, o qual depende do fator de transcrição induzido por hipóxia 1 (HIF-1) e a proteína de von Hippel-Lindau (pVHL). A hipóxia causa aumento do nível de HIF-1, o qual provê a regulação da transcrição do gene da eritropoetina (EPO). A subunidade α é o componente ativo do HIF-1 e é degradada pela pVHL. A síndrome de von Hippel-Lindau é um distúrbio autossômico dominante associado a mutações do gene VHL. Essas mutações resultam em aumento dos níveis de HIF-1α e de eritropoetina (Prchal, 2003; Gordeuk, 2005). A policitemia Chuvash é uma policitemia congênita autossômica recessiva que é endêmica na população Chuvash da Rússia. Foi relatado que ela está associada a uma alta taxa de mortalidade por causa das complicações trombóticas e hemorrágicas.

A policitemia congênita pode ser secundária a um defeito do receptor de eritropoetina, mas com um mecanismo detector de hipóxia normal. A policitemia primária familiar e congênita é um distúrbio autossômico dominante presente ao nascimento. Ela está associada a um nível sérico baixo de eritropoetina e sensibilidade in vitro dos progenitores eritroides à eritropoetina. Embora mutações no gene do receptor de eritropoetina (EPOR) com receptor truncado resultante tenham sido descritas na policitemia primária familiar e congênita, o mecanismo exato da policitemia não está claro (Prchal, 2003; Gordeuk, 2005). Como foi mencionado anteriormente, a diminuição acentuada de 2,3-DPG eritrocitária associada à deficiência da atividade da 2,3-DPG mutase resulta na policitemia e parece ser herdada como uma condição autossômica recessiva.

Policitemia vera

A policitemia vera é uma pan-mielose, isto é, uma condição na qual ocorre uma proliferação excessiva de megacariócitos e granulócitos, assim como de eritrócitos. Ela manifesta-se pela eritrocitose, leucocitose e trombocitose em graus variados. Sua etiologia é desconhecida. A policitemia vera é discutida com os distúrbios mieloproliferativos.

Determinação do volume eritrocitário e do volume plasmático

O diagnóstico de policitemia absoluta depende de mensurações confiáveis dos volumes eritrocitário e plasmático. Elas são obtidas através do uso de marcadores radioisotópicos e do princípio da diluição. Os marcadores mais comumente utilizados são o ^{51}Cr sob a forma de cromato de sódio ligado aos eritrócitos para a mensuração do volume eritrocitário, o ^{125}I ou o ^{131}I ligado à albumina e pode ser utilizado para mensurar o volume plasmático.

Para descrição detalhada da mensuração dos volumes eritrocitário e plasmático, ver relatório do International Committee for Standardization in Haematology (1980).

Volume eritrocitário. Em resumo, o sangue é coletado do paciente e os eritrócitos são marcados com ^{51}Cr. Os eritrócitos cromados são lavados com soro fisiológico. Uma alíquota dos eritrócitos marcados com ^{51}Cr diluída em soro fisiológico é injetada no paciente pela via intravenosa. Após um período de equilíbrio, usualmente 10 a 20 minutos, uma amostra de sangue é coletada do membro superior oposto. Em casos em que o tempo de equilíbrio pode ser prolongado (como na esplenomegalia, insuficiência cardíaca ou choque), outra amostra deve ser coletada 60 minutos após a injeção.

A radioatividade de cada amostra é registrada por um contador de cintilação. O volume eritrocitário (VE) é calculado pela fórmula:

$$EV\ (mL) = I\ (cpm)/C\ (cpm/mL)$$

em que I = radioatividade total injetada (contagem/min)
C = radioatividade nos eritrócitos após a mistura estar completa (contagem/min/mL de eritrócitos)

Volume plasmático. Aproximadamente 20 mL de sangue são coletados de um paciente. Após centrifugação, o plasma é removido e a albumina radiomarcada com iodo é adicionada. Após a mistura, o plasma marcado é injetado no paciente pela via intravenosa. 10, 20 e 30 minutos após a injeção, 5 mL são removidos e a radioatividade é contada em um contador de cintilação tipo poço. A radioatividade no tempo zero (P_o) é determinada pela colocação dos três pontos em um papel gráfico semilogarítmico e extrapolando o tempo zero. Um padrão é preparado por meio da diluição de uma alíquota da albumina radiomarcada com iodo com soro fisiológico que contém uma pequena quantidade de detergente.

O volume plasmático (VP) é calculado pela fórmula:

$$VP\ (mL) = S\ (cpm/mL) \times D \times V\ (mL)/P_0\ (cpm/mL)$$

em que S = taxa de contagem do padrão (contagem/min/mL)
D = diluição da solução padrão diluída
V = volume injetado da solução de albumina radiomarcada
P_0 = taxa de contagem da amostra de plasma corrigida no tempo zero

Interpretação. O volume eritrocitário para os homens é de 20 a 36 mL/kg e para as mulheres é de 19 a 31 mL/kg. O volume plasmático para os homens é de 25 a 43 mL/kg e para as mulheres é de 28 a 45 mL/kg. Em recém-nascidos e prematuros, os volumes eritrocitários e plasmático em milímetros por quilograma são mais altos que nos adultos.

Pacientes com policitemia apresentam volumes eritrocitários superiores a 36 mL/kg para os homens e 32 mL/kg para as mulheres. Alterações dos volumes eritrocitário e plasmático em várias condições são apresentadas na Tabela 31.16.

Tabela 31.16 Efeito clínico da relação variável entre o volume eritrocitário e o volume plasmático

Volume eritrocitário	Volume plasmático	Causa	Efeito
Normal	Alto	Gestação Cirrose Nefrite Insuficiência cardíaca congestiva	Pseudoanemia
Normal	Baixo	Estresse Insuficiência circulatória periférica Desidratação Edema Repouso ao leito prolongado	Pseudopolicitemia
Baixo	Normal	Anemia	Reflexo acurado do grau de anemia
Baixo	Alto	Anemia	Anemia menos grave que o indicado na contagem celular
Baixo	Baixo	Hemorragia Anemia grave (quando hematócrito < 0,2)	Anemia mais grave que o indicado na contagem celular
Alto	Normal a baixo	Policitemia	Reflexo acurado da policitemia ou policitemia menos grave do que aparenta
Alto	Alto	Policitemia (quando hematócrito > 0,5)	Policitemia mais grave do que aparenta
Normal ou alto	Alto	Esplenomegalia acentuada	Pseudoanemia

De Dacie, 1975.

Referências bibliográficas

Ahmed S, Siddiqui RK, Siddiqui AK, et al: HIV associated thrombotic microangiopathy. Postgrad Med J 2002; 78:520–525.

Alcindor T, Bridges KR: Sideroblastic anaemias. Br J Haematol 2002; 116:733–743.

Alter BP: Prenatal diagnosis: General introduction, methodology, and review. Hemoglobin 1988; 12:763–772.

Alter BP: Bone marrow failure syndromes in children. Pediatr Clin North Am 2002; 49:973–988.

Alter BP, Young NS: The bone marrow failure syndromes. In Nathan DG, Orkin SH (eds): Nathan, Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1998, p 237.

Babior BM: Metabolic aspects of folic acid and cobalamine. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001a, p 305.

Babior BM: The megaloblastic anemia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001b, p 425.

Baier JE, Poehlau D: Is alpha-methyldopa-type autoimmune hemolytic anemia mediated by interferon-gamma? Ann Hematol 1994; 69:249–251.

Basset P, Braconnier F, Rosa J: An update on electrophoretic and chromatographic methods in the diagnosis of hemoglobinopathies. J Chromatogr Biomed Appl 1982; 227:267–304.

Beck WS (ed): Hematology, 5th ed. Cambridge, MA, The MIT Press, 1991.

Bentley SA Red cell survival studies reinterpreted. Clin Haematol 1977; 6:601–623.

Betke K, Marti HR, Schlicht I: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. Nature 1959; 184:1877–1878.

Beutler E: Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism, New York, Plenum Medical Book Company, 1978.

Beutler E: Red cell enzyme defects as nondiseases and as diseases. Blood 1979a; 54:1–7.

Beutler E: Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, 3rd ed. Orlando, FL, Grune & Stratton, 1984.

Beutler E: The molecular biology of enzymes and erythrocyte metabolisms. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H (eds): The Molecular Basis of Blood Diseases, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994, p 331.

Beutler E, Luzzatto L: Hemolytic anemia. Semin Hematol 1999; 36:38–47.

Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, et al: International committee for standardization in haematology: Recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. Br J Haematol 1979b; 43:465–467.

Bottomley SS: Sideroblastic anaemia. Clin Haematol 1982; 11:389–409.

Briere RO, Golias T, Batsakis JG: Rapid qualitative and quantitative hemoglobin fractionation. Cellulose acetate electrophoresis. Am J Clin Pathol 1965; 44:695–701.

Brissot P, Troadec MB, Loreal O: The clinical relevance of new insights in iron transport and metabolism. Curr Hematol Rep 2004; 3:107–115.

Atualização abrangente sobre o transporte de ferro, incluindo o papel proposto para a hepcidina.

Brugnara C: Iron deficiency and erythropoiesis: New diagnostic approaches. Clin Chem 2003; 49:1573–1578.

Bunn HF: Sickle hemoglobin and other hemoglobin mutants. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H (eds): The Molecular Basis of Blood Diseases, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994, p 207.

Bunn HF: Human Hemoglobins; Normal and abnormal. In Nathan DG, Orkin SH (ed): Nathan, Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1998, p 729.

Bunn HF, Forget BG: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, WB Saunders Company, 1986.

Esse livro clássico fornece descrição das principais hemoglobinopatias e inclui, de maneira concisa, indícios essenciais ao diagnóstico diferencial.

Bunn HF, Forget BG, Ranney HM: Human Hemoglobins. Philadelphia, WB Saunders Company, 1977

Camitta BM, Storb R, Thomas ED: Aplastic anemia (second of two parts): Pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. N Engl J Med 1982; 306:712–718.

Carmel R: Ethnic and racial factors in cobalamin metabolism and its disorders. Semin Hematol 1999; 36:88–100.

Caro J, Erslev AJ: Anemia of chronic renal failure. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p 399.

Carrell RW, Kay R: A simple method for the detection of unstable haemoglobins. Br J Haematol 1972; 23:615–619.

Cazzola M: Serum erythropoietin concentration as a diagnostic tool for polycythemia vera. Haematologica 2004; 89:1159–1160.

Clarke GM, Higgins TN: Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. Clin Chem 2000; 46:1284–1290.

Clegg JB, Naughton MA, Weatherball DJ: Abnormal human haemoglobins. separation and characterization of the alpha and beta chains by chromatography, and the determination of two new variants, HB Chesapeak and HB J (Bangkok). J Mol Biol 1966; 19:91–108.

Dacie JV, Lewis SM: Practical Haematology, 5th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1975.

Dacie JV, Lewis SM: Practical Haematology, 7th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991.

Dallman PR, Yip R, Oski FA: Iron deficiency and related nutritional anemias. In Nathan DG, Oski FA (eds): Hematology of Infancy and Childhood, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1993, p 413.

Delvoye NL, Destroismaisons NM, Wall LA: Activation of the beta-globin promoter by the locus control region correlates with binding of a novel factor to the CAAT box in murine erythroleukemia cells but not in K562 cells. Mol Cell Biol 1993; 13:6969–6983.

Dieterich DT, Spivak JL: Hematologic disorders associated with hepatitis C virus infection and their management. Clin Infect Dis 2003; 37:533–541.

Donath J, Landsteiner K: Uber paroxysmale Haemoglobinurie. Munch Med Wschr 1904; 51:1590.

Efremov GD, Mladenovski B, Petkov G, et al: Lepore hemoglobinopathy in Yugoslavia. New Istanbul Contrib Clin Sci 1978; 12:211–232.

Elghetany MT, Hudnall SD, Gardner FH: Peripheral blood picture in primary hypocellular refractory anemia and idiopathic acquired aplastic anemia: An additional tool for differential diagnosis. Haematologica 1997; 82:21–24.

Erslev AJ: Anemia of endocrine disorders. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001a, p 407.

Erslev AJ: Clinical manifestations and classification of erythrocyte disorders. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001b, p 369.

Erslev AJ: Pure red cell aplasia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001c, p 391.

Erslev AJ: Traumatic cardiac hemolytic anemia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001d, p 619.

Fairbanks V, Beutler E: Iron deficiency. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001a, p 447.

Fairbanks V, Beutler E: Iron metabolism. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001b, p 295.

Fairbanks VF, Fernandez MN: The identification of metabolic errors associated with hemolytic anemia. JAMA 1969; 208:316–320.

Fairbanks VF, Oliveros R, Brandabur JH, et al.: Homozygous hemoglobin E mimics beta-thalassemia *minor* without anemia or hemolysis: hematologic, functional, and biosynthetic studies of first North American cases. Am J Hematol 1980; 8:109–121.

Fleming AF: Hypoplastic anaemia in pregnancy. J Obstet Gynaecol Br Commonw 1968; 75:138–141.

Forget BG: Molecular studies of genetic disorders affecting the expression of the human β-globin gene: A model system for the analysis of inborn errors of metabolism. Recent Prog Horm Res 1982; 38:257–277.

Fukagawa N, Friedman S, Gill FM, et al: Hereditary spherocytosis with normal osmotic fragility after incubation. Is the autohemolysis test really obsolete? JAMA 1979; 242:63–64.

Fyfe JC, Madsen M, Hojrup P, et al: The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. Blood 2004; 103:1573–1579.

O primeiro artigo a investigar os mecanismos envolvidos na síndrome de Imerslund-Gräsbeck.

Gallagher PG: Acanthocytosis, stomatocytosis, and related disorders. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p 519.

Gallagher PG, Jarolim P: Red cell membrane disorders. In Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al: (eds): Hematology Basic Principles and Practice, 3rd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, p 576.

Garratty G: Review: Drug-induced immune hemolytic anemia – the last decade. Immunohematol 2004; 20:138–146.

Revisão detalhada sobre a prevalência e o mecanismo da anemia hemolítica induzida por cefalosporina.

Gattermann N, Retzlaff S, Wang YL, et al: Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. Blood 1997; 90:4961–4972.

Gehrs BC, Friedberg RC: Autoimmune hemolytic anemia. Am J Hematol 2002; 69:258.

Gilliland BC: Coombs-negative immune hemolytic anemia. Semin Hematol 1976; 13:267–275.

Globin Gene Server: Online. Available: http://globin.cse.psu.edu/

Banco de dados atualizado e interativo de variantes de Hb e talassemias.

Gordeuk VR, Stockton DW, Prchal JT: Congenital polycythemias/erythrocytoses. Haematologica 2005; 90:109–116.

Ham TH: Studies on the destruction of red blood cells. I. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An investigation of the mechanism of hemolysis, with observations on five cases. Arch Intern Med 1939; 64:1271.

Hartmann RC, Jenkins DE Jr, Arnold AB: Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 1970; 35:462–475.

Head CE, Conroy M, Jarvis M, et al.: Some observations on the measurement of haemoglobin A2 and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of alpha thalassaemia. J Clin Pathol 2004; 57:276–280.

Heimpel H: Congenital dyserythropoietic anemias: Epidemiology, clinical significance, and progress in understanding their pathogenesis. Ann Hematol 2004; 83(10):613–621.

Herbert V: Megaloblastic anemias. Lab Invest 1985; 52:3–19.

Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, et al: The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med 1982; 306:1441–1446.

Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, et al: A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood 1989; 73:1081–1104.

Hillman RS, Finch CA: Red Cell Manual, 4th ed. Philadelphia, FA Davis, 1974.

Hillman RS, Finch CA: Red Cell Manual, 7th ed. Philadelphia, FA Davis, 1996.

Huisman TH: Trimodality in the percentages of beta chain variants in heterozygotes: The effect of the number of active HB alpha structural loci. Hemoglobin 1977; 1:349–382.

Huisman TH: The human fetal hemoglobins. Tex Rep Biol Med 1980; 40:29–42.

Huisman THJ: The Hemoglobinopathies. Methods in Hematology, Vol 15. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1986.

Huisman, A: Syllabus of Human Hemoglobin Variants, 2nd ed. Augusta, GA, The Sickle Cell Anemia Foundation, 1998.

International Committee for Standardization in Haematology: Recommended methods for measurement of red-cell and plasma volume. J Nucl Med 1980; 21:793.

Jacob HS, Jandl JH: A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide. N Engl J Med 1966; 274:1162–1167.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, p 63.

Johnson RJ, Hillmen P: Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy? Mol Pathol 2002; 55:145–152.

Jones JA, Broszeit HK, LeCrone CN, et al: An improved method for detection of red cell hemoglobin H inclusions. Am J Med Technol 1981; 47:94–96.

Koc S, Harris JW: Sideroblastic anemias: Variations on imprecision in diagnostic criteria, proposal for an extended classification of sideroblastic anemias. Am J Hematol 1998; 57:1–6.

Kosche KA, Dobkin C, Bank A: DNA sequences regulating human beta globin gene expression. Nucleic Acids Res 1985; 13:7781–7793.

Labbé RF, Dewanji A: Iron assessment tests: Transferrin receptor vis-a-vis zinc protoporphyrin. Clin Biochem 2004; 37:165–174.

Landaw SA: Polycythemia vera and other polycythemic states. Clin Lab Med 1990; 10:857–871.

Lehmann H, Huntsman RG, Casey R, et al: Erythrocyte disorders, anemias related to abnormal globin. In Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles RW (eds): Hematology, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1977, p 494.

Lewis SM, Dacie JV: The aplastic anaemia–paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. Br J Haematol 1967; 13:236–251.

Lindenbaum J: Status of laboratory testing in the diagnosis of megaloblastic anemia. Blood 1983; 61:624–627.

Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, et al: Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. N Engl J Med 1988; 318:1720–1728.

Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al: Prevalence of iron deficiency in the United States. JAMA 1997; 277:973–976.

Lynch RE, Williams DM, Reading JC, et al: The prognosis in aplastic anemia. Blood 1975; 45:517–528.

McMinn JR, George JN: Evaluation of women with clinically suspected thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome during pregnancy. J Clin Apheresis 2001; 16:202–209.

Maran J, Prchal J: Polycythemia and oxygen sensing. Pathol Biol (Paris) 2004; 52:280–284.

Mario N, Baudin B, Aussel C, et al: Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. Clin Chem 1997; 43:2137–2142.

Mazza U, Saglio G, Cappio FC, et al: Clinical and haematological data in 254 cases of beta-thalassaemia trait in Italy. Br J Haematol 1976; 33:91–99.

Means RT Jr: Recent developments in the anemia of chronic disease. Curr Hematol Rep 2003; 2:116–121.

Milner PF, Gooden HM: Rapid citrate-agar electrophoresis in routine screening for hemoglobinopathies using a simple hemolysate. Am J Clin Pathol 1975; 64:58–64.

Miwa S: Pyruvate kinase deficiency and other enzymopathies of the Embden–Meyerhof pathway. Clin Haematol 1981; 10:57–80.

Moake JL: Thrombotic microangiopathies. N Engl J Med 2002; 347:589–600.

Excelente revisão dos mecanismos fisiopatológicos, manifestação clínica e supervisão da microangiopatia trombótica. As figuras acompanhantes são excepcionalmente bem projetadas e simples.

Moake JL: Idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology 2004; 408 (The annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 2004).

Mohandas N, Chasis JA: Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: Regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. Semin Hematol 1993; 30:171–192.

Motulsky AG: Frequency of sickling disorders in US Blacks. N Engl J Med 1973; 288:31–33.

Oh R, Brown DL: Vitamin B12 deficiency. Am Fam Physician 2003; 67:979–986.

Old J: Haemoglobinopathies. Prenat Diagn 1996; 16:1181–1186.

Old JM: DNA-based diagnosis of hemoglobin disorders. In Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR and Nagel RL (eds): Disorders of Hemoglobin, Cambridge, Cambridge University Press, 2001, p 941.

Orkin SH, Nathan DG: The thalassemias. N Engl J Med 1976; 295:710–714.

Orkin SH, Nathan DG: The thalassemias. In Nathan DG, Orkin SH (eds): Nathan, Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1998, p 811.

Ozatli D, Koksal AS, Haznedaroglu IC, et al: Erythrocytes: Anemias in chronic liver diseases. Hematol 2000; 5:69–76.

Packman CH: Acquired hemolytic anemia due to warm reacting antibodies. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001a, p 639.

Packman CH: Drug related immune hemolytic anemia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001b, p 657.

Paglia DE, Valentine WN: Haemolytic anaemia associated with disorders of the purine and pyrimidine salvage pathways. Clin Haematol 1981; 10:81–98.

Pearson HA, Spencer RP, Cornelius EA: Functional asplenia in sickle-cell anemia. N Engl J Med 1969; 281:923–926.

Pierce HI, Sumiko KK, Sofroniadou K, et al: Frequencies of thalassemia in American Blacks. Blood 1977; 49:981–986.

Prchal JT: Classification and molecular biology of polycythemias (erythrocytoses) and thrombocytosis. Hematol Oncol Clin North Am 2003; 17(5):1151–1158.

Prchal JT, Gregg XT: Red cell enzymopathies. In Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al: (eds): Hematology Basic Principles and Practice, 3rd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, p 561.

Ramasethu J, Luban NLC: Alloimmune hemolytic anemia of the newborn. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p 665.

Reissman KR, Ruth WE, Nomura TA: A human hemoglobin with lowered oxygen affinity and impaired heme–heme interactions. J Clin Invest 1961; 40:1826.

Riou J, Godart C, Hurtrel D, et al: Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. Clin Chem 1997; 43:34–39.

Ritchie DS, Underhill C, Grigg AP: Aplastic anemia as a late complication of thymoma in remission. Eur J Haematol 2002a; 68:389–391.

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, et al: Reference distributions for serum iron and transferrin saturation: A practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal 2002b; 16:237–245.

Rosenblatt DS, Whitehead VM: Cobalamin and folate deficiency: Acquired and hereditary disorders in children. Semin Hematol 1999; 36:19–34.

Rosse WF: Cold-induced immune hemolytic anemia. Hematology 2004; 58 (The annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 2004).

Schmidt RM, Brosious EF: Basic Laboratory Methods of Hemoglobinopathy Detection, 6th ed. Atlanta, US Department of Health, Education and Welfare, Centers for Disease Control, [HEW Publ. No. (CDC) 77–8266], 1976.

Schmidt RM, Rucknagel DL, Necheles TF: Comparison of methodologies for thalassemia screening by HB A_2 quantitation. J Lab Clin Med 1975; 86:873–882.

Schneider RG, Hightower B, Hosty TS, et al: Abnormal hemoglobins in a quarter million people. Blood 1976; 48:629–637.

Schroter W, Nafz C: Diagnostic significance of hemoglobin F and A_2 levels in homo- and heterozygous beta-thalassemia during infancy. Helv Paediatr Acta 1981; 36:519–525.

Shadduck RK: Aplastic anemia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al: (eds): Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p 375.

Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp 1962; 110:293–310.

Shulman IA, Branch DR, Nelson JM, et al: Autoimmune hemolytic anemia with both cold and warm autoantibodies. JAMA 1985; 253:1746–1748.

Singer K, Chernoff AI, Singer L: Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood 1951; 6:413–428.

Sokol RJ, Hewitt S: Autoimmune hemolysis: A critical review. Crit Rev Oncol Hematol 1985; 4:125–154.

Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R: The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. J Clin Pathol 1992; 45:1047–1052.

Soldin OP, Bierbower LH, Choi JJ, et al: Serum iron, ferritin, transferrin, total iron binding capacity, hs-CRP, LDL cholesterol and magnesium in children; new reference intervals using the Dade dimension clinical chemistry system. Clin Chim Acta 2004; 342:211–217.

Steinberg MH: Management of sickle cell disease. N Engl J Med 1999; 340:1021–1030.

Steinberg MH, Adams JG 3rd: Hemoglobin A_2: Origin, evolution, and aftermath. Blood 1991; 78:2165–2177.

Steinberg MH, Coleman MB, Adams JG, et al: The effects of alpha-thalassaemia in HbSC disease. Br J Haematol 1983; 55:487–492.

Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel, RL: Disorders of Hemoglobins 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2001.

Livro de referência abrangente sobre distúrbios de hemoglobina. Contém explicações detalhadas sobre as variantes da hemoglobina.

Stenvinkel P: Anaemia and inflammation: What are the implications for the nephrologist? Nephrol Dial Transplant 2003; 18:17–22.

Suh DD, Krauss JS, Bures K: Influence of hemoglobin S adducts on hemoglobin A_2 quantification by HPLC. Clin Chem 1996; 42:1113–1114.

Tang DC, Ebb D, Hardison RC, et al: Restoration of the CCAAT box or insertion of the CACCC motif activates [corrected] delta-globin gene expression. Blood 1997; 90:421–427.

Tietz NW (ed): Clinical Guide to Laboratory Tests, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1990.

Trial J, Rice L, Alfrey CP: Erythropoietin withdrawal alters interactions between young red blood cells, splenic endothelial cells, and macrophages: An in vitro model of neocytolysis. J Investig Med 2001; 49:335–345.

Valentine WN: The Stratton lecture. Hemolytic anemia and inborn errors of metabolism. Blood 1979; 54:549–559.

Van den Bosch G, Van den Bossche J, Wagner C, et al: Determination of iron metabolism-related reference values in a healthy adult population. Clin Chem 2001; 47:1465–1467.

Ward PC: Modern approaches to the investigation of vitamin B12 deficiency. Clin Lab Med 2002; 22:435–445.

Wasi P, Na-Nakorn S, Pootrakul S-N: The alpha-thalassemias. Clin Haematol 1974; 3:383.

Weatherall DJ: Prenatal diagnosis of inherited blood diseases. Clin Haematol 1985; 14:747–774.

Weatherall DJ: The thalassemias. In Stamatoyannapoulos G, Niehuis AW, Majerus PW, Varmus H (eds): The Molecular Basis of Blood Disease, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994, p 157.

Weatherall DJ, Clegg JB: Genetic disorders of hemoglobin. Semin Hematol 1999; 36:24–37.

Weatherall DJ, Clegg JB: The Thalassaemia Syndromes, 4th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 2001.

Estudo completo sobre as talassemias e sua interação com as hemoglobinas variantes.

Whitten WJ, Rucknagel DL: The proportion of Hb A2 is higher in sickle cell trait than in normal homozygotes. Hemoglobin 1981; 5:371–378.

Williams DM, Lynch RE, Cartwright GE: Prognostic factors in aplastic anaemia. Clin Haematol 1978; 7:467–474.

Wilson JB, Headlee ME, Huisman TH: A new high-performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantitation of various hemoglobin variants in adults and newborn babies. J Lab Clin Med 1983; 102:174–186.

Winslow RM, Anderson WF: The hemoglobinopathies. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, et al: (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed. New York, McGraw-Hill, 1983, pp 2281–2317.

Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, et al: Clinical Hematology, 8th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1981.

Wrightstone RN, Huisman TH: On the levels of hemoglobins F and A_2 in sickle-cell anemia and some related disorders. Am J Clin Pathol 1974; 61:375–381.

Young N, Mortimer P: Viruses and bone marrow failure. Blood 1984; 63:729–737.

Young NS: Acquired aplastic anemia. Ann Intern Med 2002; 136:534–546.

Esse artigo destaca as considerações mais recentes feitas ao mecanismo imunológico da anemia aplásica, acompanhadas de uma breve discussão de sua relação com a síndrome mielodisplásica e a hemoglobinúria paroxística noturna.

Young NS, Maciejewski JP: Aplastic anemia. In Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al: (eds): Hematology Basic Principles and Practice, 3rd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, p 297.

Zittoun J, Zittoun R: Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. Semin Hematol 1999; 36:35–46.

CAPÍTULO 32

Distúrbios leucocitários

Robert E. Hutchison MD, Naif Z. Abraham Jr MD PhD

Leucócitos	637
Distúrbios não neoplásicos	639
Distúrbios granulocíticos e monocíticos	639
Distúrbios linfocíticos e plasmacíticos	647
Reações leucemoides	652
Distúrbios neoplásicos que envolvem primariamente leucócitos	653
Visão geral das neoplasias hematopoéticas	653
Distúrbios mieloproliferativos crônicos	653
Doenças mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas	657
Leucemias mieloides agudas	661
Neoplasias de precursores de células B e T (linfoblásticas)	667
Neoplasias de célula B madura	669
Neoplasias de célula T e células *natural killer*	680
Linfoma de Hodgkin	686
Distúrbios linfoproliferativos associados à imunodeficiência	688
Neoplasias de células histiocíticas e dendríticas	688
Doença de mastócitos	690
Referências bibliográficas	691

PONTOS-CHAVE

- Os leucócitos são regulados por mecanismos homeostáticos complexos que direcionam a sua resposta contra a infecção e a inflamação.
- A leucocitose frequentemente reflete uma anormalidade subjacente, enquanto a leucopenia, em especial a neutropenia, coloca um paciente em risco de infecção.
- As neoplasias hematopoéticas foram categorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com a célula de origem, anormalidades citogenéticas e moleculares e características imunofenotípicas e clínicas.
- As leucemias agudas são neoplasias de evolução rápida originadas de células mieloides ou linfoides. A compreensão da biologia está associada à melhoria da terapia.
- Os distúrbios mieloproliferativos crônicos e as SMD são distúrbios heterogêneos de células mieloides diferenciadas. Em geral, eles são indolentes no início, porém acabam evoluindo.
- Os linfomas não Hodgkin são com mais frequência originados de células B maduras. Eles são patológica e clinicamente heterogêneos. Os linfomas de célula T são menos comuns, heterogêneos e em geral de tratamento difícil.
- O linfoma de Hodgkin é atualmente considerado uma neoplasia de células B defeituosas. Muito de sua patologia é devida a um meio inflamatório associado.

Leucócitos

Os leucócitos (células brancas do sangue) são encontrados na medula óssea, no sangue periférico e nos tecidos. Eles estão entre os elementos essenciais do sistema hematopoético-linforreticular-imune, que atua para proteger o corpo humano de células estranhas (infecção) e células próprias alteradas (câncer). O sistema completo apresenta uma complexidade extraordinária e uma integração admirável durante a vida (saudável). Várias alterações que estão começando a ser compreendidas no nível molecular podem levar a doenças neoplásicas e não neoplásicas. O desenvolvimento normal do leucócito foi revisto no Capítulo 30. No entanto, para compreender algumas dessas doenças, serão resumidos brevemente os principais aspectos dos leucócitos fagocitários, da via vascular utilizada em seu movimento e migração, dos leucócitos imunes e da apoptose ou "morte celular programada".

Primeiramente serão abordados o sistema hematopoético e os leucócitos fagocitários (neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos). Nos adultos, essas células são formadas na medula óssea, liberadas no sangue periférico e, em seguida, movem-se para os tecidos de acordo com a necessidade. Um controle molecular e uma sinalização complexos são necessários em cada ponto dessa jornada, da diferenciação, maturação e envolvimento até a morte celular por apoptose ou necrose. As células hematopoéticas desenvolvem-se no microambiente complexo da medula óssea, ou estroma, contendo adipócitos e miofibroblastos, assim como plasmócitos, linfócitos e macrófagos. Existe um equilíbrio molecular constante que envolve moléculas de adesão celular (CAM, cell adhesion molecules), proteases e citocinas – pequenas proteínas ligadoras de receptores geradas por várias células que servem como sinais autócrinos ou parácrinos (Tab. 32.1). O efeito dessas interações determina o resultado celular final.

Na medula óssea, a maturação dos granulócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas é resultante da ação recíproca de estimulações positivas e negativas de citocinas pelo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (*GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*), interleucinas (IL-3, IL-4 e IL-5) sobre células-tronco e células progenitoras mieloides (Martinez-Moczygemba, 2003). A mobilização de neutrófilos (p. ex., em uma infecção) produzirá neutrofilia periférica com formas imaturas (desvio para a esquerda), assim como um aumento da produção de neutrófilos. As citocinas ativam receptores de superfície de células precursoras (p. ex., receptores de G-CSF) e aumentam a proliferação de acordo com a necessidade. Outras quimiocinas (p. ex., IL-8) também podem causar aumento da produção. Tanto a IL-8 quanto a gelatinase de neutrófilos B podem estar envolvidas na liberação de leucócitos dos seios da medula óssea (van Eeden, 2000; Starckx, 2002).

Após serem liberados no sangue periférico, interações moleculares com células endoteliais dirigem os leucócitos ao seu destino final. Selectinas são CAMs (glicoproteínas transmembrana) encontradas nos leucócitos (i. e., L-selectina) e no endotélio ativado (i. e., selectinas E e P). Elas estão envolvidas na adesão leucocitária ao endotélio e possivelmente atuam como moléculas sinalizadoras (Patel, 2002).

Quando leucócitos viajam no interior dos vasos, eles interagem com ligantes ou receptores da integrina endotelial. Essas integrinas são utilizadas na ligação de leucócitos e permitem que eles atravessem o endotélio (Alon, 2002). É importante compreender que a vasculatura de tecidos normais (assim como "anormais") não é uniforme ao nível molecular. Ela é altamente especializada para a região específica ou órgão do corpo, de modo que células endoteliais contenham moléculas específicas para o tecido ou órgão em suas superfícies luminares (Ruoslahti, 2000). Isso representa um mecanismo por meio do qual pode ocorrer o tráfego de leucócitos até um destino.

Quando os leucócitos chegam ao local desejado (p. ex., infecção), eles interagem com células endoteliais no nível molecular, de maneira que podem migrar através das células endoteliais (transocitose) ou

Tabela 32.1 Características de biomoléculas de sinalização celular fundamentais

Biomolécula	Alvo	Função
G-CSF	Precursores mieloides da medula óssea	Aumenta a proliferação e o desenvolvimento dos neutrófilos
L-selectinas	Receptores de integrina da célula endotelial	Liga leucócitos a células endoteliais para facilitar a adesão e a diapedese
Quimiocinas	Leucócitos via receptores de quimiocina	Migração direta e ativação de leucócitos via propriedades quimioatrativas da citocina
Fas/CD95 -ligante (proteína de membrana)	*Fas*/CD95 (receptor de membrana)	Apoptose via complexo indutor da morte
Caspases	Substratos proteicos	Apoptose via cascatas enzimáticas
Família de proteína antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-xL)	Membrana externa mitocondrial, membrana nuclear, retículo endoplasmático	Diminuição da sensibilidade celular à apoptose
Família de proteína pró-apoptótica Bcl-2 (Bax, Bok, Bak)	Membrana externa mitocondrial, membrana nuclear, retículo endoplasmático	Aumento da sensibilidade celular à apoptose

entre as junções intercelulares. A molécula de adesão juncional (JAM, junctional adhesion molecule), da família de proteínas de adesão, é expressa nas células endoteliais, epiteliais e sanguíneas e parece ter um papel importante na migração de células sanguíneas ou diapedese através da barreira endotelial (Luscinkas, 2002).

A migração leucocitária adicional e o posicionamento ocorrem por meio de citocinas ou quimiocinas quimiotáticas, as quais atraem leucócitos rapidamente e fornecem múltiplos níveis de controle da migração (Moser, 2004). As quimiocinas são variadas e produzidas nas células sanguíneas e tissulares (Rot, 2004). Os receptores de quimiocinas leucocitárias medeiam a migração direcional por meio de um gradiente de concentração, permitindo a migração sequencial de leucócitos para múltiplos quimioatratores. Isso é baseado nos receptores de múltiplos quimioatratores e padrões superpostos de receptores em subgrupos de leucócitos, permitindo a "navegação em múltiplas etapas" (Foxman, 1997). As quimiocinas são classificadas em subfamílias funcionais como "inflamatórias", "linfoides/homeostáticas" ou "duais". O primeiro tipo atrai principalmente neutrófilos (infecção, inflamação, tumor). As quimiocinas linfoides/homeostáticas mantêm a hemostasia e estão envolvidas nas respostas e no controle imune e na hematopoese na medula óssea. As quimiocinas de função dual parecem estar envolvidas em ambos os tipos de função (Sallusto, 2000; Moser, 2004). Além do tráfego e recrutamento leucocitário, as funções biológicas incluem o desenvolvimento de órgãos linfoides, cicatrização de feridas, angiogênese e metástase (patológico) (Rossi, 2000; Romagnani, 2004).

Os leucócitos imunes incluem os linfócitos, plasmócitos e células dendríticas. Os linfócitos podem ser divididos em células T, células B, células natural killer (NK) e células killer (K) e geralmente são diferenciados pelas moléculas da superfície celular que recebem uma denominação de "CD", ou *cluster* (agrupamento) de diferenciação. Os plasmócitos são células que secretam anticorpos que se desenvolvem a partir de células B. As células dendríticas são células fagocitárias que estão presentes em alguns órgãos do corpo e estimulam uma resposta imune processando e apresentando um antígeno (Banchereau, 2000; Lipscomb, 2002). As células NK e K também podem ser descritas com os linfócitos grandes granulares (LGL, large granular lymphocytes) com base na observação de sua morfologia pela coloração de Romanowsky. Células NK reconhecem antígenos naturalmente ou não imunologicamente. A ativação não é necessária para essa atividade. No entanto, as células K utilizam o anticorpo ligado à célula-alvo para ligação e citotoxicidade (citólise mediada por células dependente de anticorpo).

A apoptose (morte celular programada) é um colapso ativo e controlado de uma célula decorrente de um programa celular interno, em contraste com a necrose, a qual é inflamatória e passiva, e causa morte celular por fatores externos à célula. A apoptose produz características reconhecíveis, incluindo diminuição do tamanho da célula, condensação e fragmentação nuclear e fagocitose das células remanescentes. Ela está envolvida na regulação de níveis em estado estacionário de células que sofrem proliferação.

Duas vias bem definidas, um programa "intrínseco" e um "extrínseco" de morte, foram identificadas (Schultz, 2003; Martin, 2004). A via intrínseca envolve a participação mitocondrial no processo e parece ser iniciada por várias formas de estresse e de dano celular. A MME torna-se permeável, permitindo a liberação de citocromo c. Isso, por sua vez, promove a ativação de pró-caspase-9 no interior do complexo do apoptossomo (um olígômero do fator ativador de protease apoptótico-1 ou APAF-1 [*apoptotic protease-activating factor-1*], normalmente presente como um monômero no citoplasma da célula), levando à apoptose. A liberação de outras proteínas apoptóticas mitocondriais, por exemplo, a endonuclease G e o fator de indução da apoptose, também pode contribuir para a morte celular (Saelens, 2004).

A modulação da permeabilidade da MME ocorre por meio da família da proteína Bcl-2. A Bcl-2 é uma oncoproteína de 25 kDa normalmente localizada no segmento cromossômico 18q21. Além das mitocôndrias, parece que ela se encontra na membrana nuclear e no retículo endoplasmático (ver Schinzel, 2004). A Bcl-2 e a proteína relacionada Bcl-xL são antiapoptóticas e inibem a permeabilidade mitocondrial e, como consequência, a liberação de citocromo c e a ativação de APAF-1. Bax, Bok e Bak são exemplos de proteínas pró-apoptóticas da família da Bcl-2, denominadas proteínas BH123. As proteínas BH123 apresentam 3 de 4 áreas de homologia estrutural proteica com a Bcl-2 (denominadas BH1, BH2 e BH3) (Petros, 2004). Essas proteínas, quando ativadas, estimulam a liberação de proteína pela permeabilização da MME. A ativação de proteínas BH123 é mediada por um segundo tipo de proteínas pró-apoptóticas da família da Bcl-2, denominadas proteínas BH3-only. Estas constituem uma família de proteínas que apresentam homologia estrutural proteica com a Bcl-2 apenas no domínio BH3. As proteínas BH3-only incluem Bad, Bid, Bim e outras.

As caspases (cisteína-proteinases com especificidade para resíduos de aspartato) têm um papel central nesse processo e estão inicialmente presentes na célula como precursores inativos. Quando elas são ativadas pela liberação do citocromo c, é desencadeada uma cascata de clivagem enzimática de substratos celulares adicionais que resulta na ativação ou inativação desses substratos. Isso leva a uma desagregação ordenada da célula por meio da destruição de numerosos alvos celulares e morte celular apoptótica (Green, 2003; Martin, 2004; Orrenius, 2004). Deve ser observado que tanto a via caspase-dependente quanto a via caspase-independente de morte celular são ativadas por proteínas mitocondriais (Saelens, 2004). O retículo endoplasmático (RE), organela citoplasmática responsável pela síntese proteica e pela correção e formação do envelope proteico, também pode ser um local de início da cascata de caspases e de iniciação da apoptose subsequente ao estresse do RE (Szegezdi, 2003; Rao, 2004). Uma família de inibidores de proteínas da apoptose (IAP, inhibitor of apoptose proteins) pode bloquear a apoptose inibindo as vias de ativação das caspases.

Os Death receptors (DRs) são um subgrupo da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF, tumoral necrosis factor) e transmitem sinais apoptóticos pela via extrínseca. O Fas/CD95 e o receptor-1 do TNF (TNFR1) são dois conhecidos DRs, ligados por agonistas extracelulares ou ligantes do TNF da superfamília do TNF (p. ex., TNF-α e Fas/CD95 ligante) para iniciar a cascata. Esses ligantes podem ser solúveis ou estarem ligados à membrana. O DR transmite um sinal através da membrana celular, via porção citoplasmática do receptor denominada death domain (domínio de morte). Trata-se de um domínio de interação proteica que, quando ativado, inicia uma série de interações com proteínas adaptadoras adicionais, como a do death domain associado ao Fas (FADD, Fas-associated death domain), que acaba produzindo um complexo sinalizador de indução da morte (DISC, death-inducing signaling complex) celular por meio da incorporação de moléculas de caspases específicas. Isso dispara uma cascata de ativação de outras moléculas de caspases (além de outras proteases

como granzimas, catepsinas e calpaínas) e leva à morte celular apoptótica (Green, 2003; Ivanovska, 2004; Jiang, 2004).

O Fas também pode ativar o fator nuclear (NF)-κB, um fator de transcrição onipresente normalmente encontrado em um estado inativo no citoplasma celular. Esse fator parece estar envolvido na regulação do gene da apoptose, assim como na regulação de um número de processos imunes e inflamatórios (Aggarwal, 2004; McDonald, 2004). O NF-κB também pode atuar como um promotor tumoral no câncer associado à inflamação (Pikarsky, 2004).

Como pode ser imaginado, a apoptose é essencial para a homeostasia do corpo e parece ter um papel em numerosas condições patológicas (câncer, doença degenerativa, infecção persistente, doença autoimune). No desenvolvimento de células B e T, ela elimina receptores dessas células não funcionais, autorreativos ou autodestrutivos, assim como regula a ativação dessas células em relação à duração e à magnitude de uma resposta inflamatória (Marsden, 2003; Ivanovska, 2004). A apoptose também tem papel crítico no desenvolvimento dos granulócitos, aumentando seu período de vida (relativamente curto) no local de infecção ou diminuindo a resposta inflamatória após a eliminação do agente causal. A apoptose também previne a liberação de enzimas e outros mediadores inflamatórios por granulócitos senescentes no tecido saudável circunvizinho, prevenindo a destruição tissular.

Distúrbios não neoplásicos

Atualmente, o exame laboratorial de leucócitos ocorre como parte do hemograma automatizado para quase todos os pacientes. A concentração de todos os leucócitos, conhecida como contagem de células brancas sanguíneas (CBS) total, assim como as concentrações relativas e absolutas dos granulócitos neutrofílicos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, são determinadas e comparadas com valores normais para a idade e o sexo do paciente. Em geral, as concentrações absolutas (i. e., o produto da CBS e o percentual da série celular específica, como linfócitos ou neutrófilos) têm mais utilidade na determinação de anormalidades. Resultados anormais da contagem automatizada são "sinalizados" e, em seguida, revistos por um técnico de laboratório experiente.

Essas anormalidades incluem a leucocitose, que consiste no aumento da CBS total acima do limite superior da faixa normal para a idade e o sexo; e a leucopenia, que é uma queda da CBS total a níveis abaixo do limite inferior da faixa normal para a idade e o sexo. O estudo quantitativo adicional dos leucócitos inclui as concentrações relativas e absolutas das várias formas de leucócitos (contagem diferencial). Um aumento da concentração absoluta de células em cada série recebe as denominações de neutrofilia (leucocitose neutrofílica), linfocitose, monocitose, eosinofilia (leucocitose eosinofílica) e basofilia (leucocitose basofílica). Uma diminuição da concentração absoluta é denominada neutropenia, linfopenia ou linfocitopenia, monocitopenia, eosinopenia e basopenia. Anormalidades podem ocorrer tanto em condições neoplásicas (p. ex., leucemia ou infiltração da medula óssea por tumor metastático) como em condições não neoplásicas (p. ex., infecção, efeito de fármacos ou deficiência nutricional). O aumento de qualquer tipo celular pode ser clinicamente importante, mas apenas a diminuição de neutrófilos costuma ser significativa. De modo geral, uma monocitopenia, eosinopenia ou basopenia isolada identificada em uma CBS não é considerada uma anormalidade importante. O estudo qualitativo de leucócitos inclui anormalidades estruturais no citoplasma e no núcleo, assim como outras funcionais.

Um objetivo do exame de leucócitos é auxiliar no estabelecimento de um diagnóstico. Em alguns casos, ele pode isoladamente fornecer um diagnóstico específico, por exemplo, na leucemia. Esse exame costuma ser mais útil do ponto de vista diagnóstico quando analisado com outros dados clínicos e laboratoriais, por exemplo, na apendicite aguda, na MI ou em outro tipo de infecção. Outro objetivo é auxiliar no estabelecimento de um prognóstico. Por exemplo, a leucopenia na apendicite aguda ou na pneumonia é considerada desfavorável do ponto de vista prognóstico.

Por fim, o estudo de leucócitos é útil no acompanhamento da evolução de uma doença (p. ex., reconhecimento dos efeitos tóxicos da radioterapia e da quimioterapia). A recuperação pode ser monitorada pelo exame de leucócitos.

Neutrofilia

A leucocitose neutrofílica ou neutrofilia refere-se a uma concentração absoluta de neutrófilos no sangue acima da faixa normal para a idade. A faixa de referência normal (estabelecida por cada laboratório) é de cerca de 1,8–7,0 $\times 10^3/\mu L$ para adultos, com uma faixa discretamente maior (1,0–8,5 $\times 10^3/\mu L$) em crianças jovens. As causas principais de neutrofilia estão listadas na Tabela 32.2.

Mecanismos. Os principais fatores que influenciam a contagem de neutrófilos são (1) a taxa de influxo de células da medula óssea (mitose/proliferação, maturação/armazenamento e liberação); (2) a proporção de neutrófilos no *pool* de granulócitos marginais (MGP, *marginal granulocyte pool*) (células que aderem às paredes vasculares) e no *pool* de granulócitos circulantes (CGP, *circulating granulocyte pool*) (células não aderentes) do sangue – MGP e CGP possuem tamanhos aproximadamente iguais e estão equilíbrio no estado de higidez; e (3) a taxa de efluxo de neutrófilos do sangue (migração de e através dos vasos para os tecidos, de modo aleatório ou nos locais de inflamação, infecção etc.).

A leucocitose fisiológica é produzida por fatores ou situações que não têm relação com uma patologia tissular subjacente. O exercício intenso, a hipóxia, o estresse ou a injeção de adrenalina acarretam uma diminuição do MGP e um aumento correspondente do CGP, resultando em uma "pseudoneutrofilia" (i. e., sem alteração do *pool* total de granulócitos no sangue ou TBGP, *total blood granulocyte pool*). A simples redistribuição de células entre o CGP e o MGP, também conhecida como desmarginalização, é a liberação e o desligamento de leucócitos de receptores moleculares nas paredes luminares dos vasos. Isso pode ser, em parte, decorrente da ativação induzida pela adrenalina de receptores β nas células endoteliais, liberação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), o que acaba alterando ou modulando as propriedades e as características das moléculas de adesão da superfície celular e aumentando a liberação de neutrófilos (assim como de outros leucócitos) na circulação (Gabriel, 1998; Heine, 2001; Shephard, 2003).

O estresse de maior gravidade ou a injeção de endotoxina, corticosteroide ou etiocolanolona também causam um aumento do influxo de células do *pool* de maturação/reserva da medula óssea para o sangue. A interleucina-6, um regulador importante da resposta de fase aguda, parece exercer papel importante na desmarginalização de células circulantes (onda inicial de neutrófilos circulantes) e na liberação de neutrófilos da medula óssea (segunda onda de granulócitos neutrofílicos circulantes) (Suwa, 2000). Como resultado, o *pool* mitótico parece aumentar para recarregar o *pool* de maturação/reserva de onde as células maduras saem para o TBGP, sendo que tanto o MGP quanto o CGP aumentam. Talvez ocorra uma "maior" neutrofilia nessa situação, por causa da saída adicional de células do *pool* de maturação/reserva (além da desmarginalização) e da possível presença de células imaturas (p. ex., bastonetes e metamielócitos) (Suwa, 2000).

Como mencionado anteriormente, a neutrofilia pode ser produzida por corticosteroides, que aumentam a liberação de neutrófilos da medula óssea, diminuem a saída de neutrófilos do sangue e aumentam a desmarginalização.

A leucocitose patológica é um aumento da CBS que ocorre como consequência de uma doença, e em geral é uma resposta à lesão tissular. Essa leucocitose é mais frequentemente uma neutrofilia.

Tabela 32.2 Principais causas de neutrofilia

Inflamatórias agudas — doenças do colágeno vasculares, vasculite
Infecciosas agudas — bacteriana, algumas virais, fúngica, parasitária
Fármacos, toxinas, metabólicas — corticosteroides, fatores do crescimento, uremia, cetoacidose
Necrose tissular — queimaduras, trauma, infarto do miocárdio, hemólise eritrocitária
Fisiológicas — estresse, exercício, tabagismo na gestação
Neoplásicas — carcinomas, sarcomas, distúrbios mieloproliferativos

Além da perda aleatória de neutrófilos da circulação em várias secreções corporais, os neutrófilos deixam o corpo por meio do movimento ameboide quando atraídos para um foco de inflamação em tecidos, supostamente respondendo a uma variedade de moléculas quimiotáticas e gradientes. Os neutrófilos deixam o sangue a partir do MGP, passam entre as células endoteliais capilares e atingem os tecidos.

Na infecção aguda, o aumento da marginalização de neutrófilos e o escoamento de sangue para os tecidos levam à neutropenia, onde não há um fluxo de neutrófilos do compartimento de reserva da medula óssea para o sangue. Como o último supercompensa, o resultado é uma neutrofilia. Geralmente, os compartimentos de produção e de reserva aumentam na medula óssea e são capazes de sustentar o aumento de CGP (neutrofilia) e MGP diante do aumento do fluxo de neutrófilos do sangue para o sítio inflamatório. Nesses casos, a medula óssea apresentará hiperplasia granulocítica (aumento da relação mieloide/eritroide [M/E] e aumento da celularidade) com a maturação intacta. Um aumento de granulócitos imaturos no sangue periférico costuma estar presente e é com frequência designado como um "desvio para a esquerda".

Quando a demanda de neutrófilos é extremamente grande, como numa infecção grave, pode ocorrer depleção da reserva da medula óssea e diminuição do CGP (neutropenia) e do MGP, porque o suprimento de células é insuficiente em relação à demanda. Nesses casos, a medula óssea apresentará um aumento do número de precursores iniciais dos neutrófilos, pelo estágio mielocítico, mas diminuição do número de metamielócitos, bastonetes e neutrófilos.

Determinantes. Certos fatores do hospedeiro modificam o grau de resposta neutrofílica. As crianças respondem de forma mais intensa que os adultos. O grau de neutrofilia pode ser comprometido pelos mesmos fatores que comprometem a produção de eritrócitos (deficiência de ferro, folato ou cobalamina) ou por insuficiência medular devida a outras causas. Fatores não perfeitamente definidos que permitem ao corpo localizar uma infecção podem ter um papel: quanto mais localizado for o processo, mais pronunciada será a neutrofilia.

Outros fatores que modificam a resposta neutrofílica são devidos mais aos microrganismos que ao hospedeiro. Bactérias pirogênicas, em especial, induzem à neutrofilia. Dentro dos limites, quanto mais virulento for o agente, mais elevada será a contagem de neutrófilos. Entretanto, quando a infecção for avassaladora, pode ocorrer uma neutropenia e um maior desvio para a esquerda.

O tratamento de infecções com antibióticos pode modificar a resposta leucocitária à infecção. A terapia com esteroide, embora cause neutrofilia, tende a diminuir a resposta do hospedeiro à infecção, provavelmente por causa da diminuição do movimento dos neutrófilos nos tecidos e do aumento da estabilidade lisossomal.

A neutrofilia às vezes é observada em pacientes com tumores sólidos, sobretudo em carcinomas de células grandes do pulmão. A neutrofilia é secundária a vários fatores, incluindo a resposta à necrose tissular e à infecção subjacente, assim como à produção de fatores de crescimento mieloide (Peterson, 1993). A neutrofilia também pode ser observada em tumores gastrintestinais e hepáticos, no linfoma de Hodgkin, no carcinoma de células renais e na doença metastática da medula óssea (Hernandez, 2002; Blay, 1997). Um estudo recente (Ruka, 2001), que analisou alterações hematológicas em pacientes com sarcomas confirmados histologicamente, descobriu que o número de alterações sanguíneas, incluindo a neutrofilia, a monocitose, a trombocitose e a linfocitopenia, estava fortemente correlacionado a níveis elevados de várias citocinas circulantes e aos níveis de receptor solúvel de citocina detectados no sangue periférico. Acredita-se que a produção de citocinas pelas células tumorais seja responsável por essas alterações hematológicas.

Neutropenia

A neutropenia é uma redução da contagem absoluta de neutrófilos, abaixo de ~ 1,5–2 $\times 10^9$/L para indivíduos da raça branca e abaixo de ~ 1,2–1,3 $\times 10^9$/L para indivíduos da raça negra. Lembre-se de que a contagem absoluta de neutrófilos é o produto da CBS e o percentual de neutrófilos e bastonetes que foram enumerados na CBS diferencial. O termo "agranulocitose" é utilizado para a neutropenia grave, normalmente < 0,5 $\times 10^9$/L. Ele também pode ser associado à depleção de eosinófilos e basófilos. O termo "neutropenia crônica grave" refere-se a pacientes com uma contagem absoluta de neutrófilos < 0,5 $\times 10^9$/L durante meses ou anos, em geral com doenças que primariamente causam neutropenia na ausência de outras citopenias (Dale, 2002a). Quando a contagem de neutrófilos for inferior a 1 $\times 10^9$/L, o risco de infecção aumenta consideravelmente além do normal, e quando for inferior a 0,5 $\times 10^9$/L, o risco de infecção é ainda maior.

Os mecanismos por meio do qual a neutropenia ocorre incluem (1) a diminuição do fluxo de neutrófilos da medula óssea para o sangue como resultado da falta de produção ou da produção ineficaz (i. e., um defeito de produção ou de maturação); (2) um aumento da remoção de neutrófilos do sangue (defeito de sobrevivência); (3) uma alteração da distribuição entre o CGP e o MGP; ou (4) combinações desses mecanismos. As neutropenias não são tão bem classificadas quanto as anemias. Deve ser observado que fármacos induzem à neutropenia por meio de vários mecanismos e são uma consideração muito importante em qualquer diagnóstico diferencial de leucopenia. Causas e condições associadas à neutropenia são apresentadas na Tabela 32.3.

A lista apresentada na Tabela 32.3 não é completa. Algumas dessas condições serão analisadas com mais detalhes.

Os fármacos (Bhatt, 2004; Andres, 2004) são uma causa importante de neutropenia, podendo atuar de diferentes maneiras e afetar populações de células progenitoras ou maduras. Constituem a causa mais comum de neutropenia aguda ("agranulocitose") e geralmente levam à observação de ausência de células granulocíticas na medula óssea. Contudo, alguns pacientes podem apresentar uma pronunciada hiperplasia de células progenitoras que, às vezes, é denominada "parada da maturação" ou "hiperplasia promielocítica".

Os fármacos podem iniciar ações imunomediadas de destruição via formação de imunocomplexo (quinidina) ou lise celular mediada pelo complemento (propiltiouracil). Alguns fármacos, incluindo a penicilina, aminopirina e ouro, atuam como haptenos. A inibição da granulopoese ou a toxicidade mieloide ocorrem com o uso de agentes quimioterápicos, clorpromazina e outros. Esses efeitos tendem a ser dose-dependentes e reversíveis. Efeitos colaterais importantes e limitadores da quimioterapia oncológica são a neutropenia grave com o risco de infecção associado, bem como a trombocitopenia grave com risco de sangramento. A anemia é mais prontamente controlada com transfusão.

A radiação lesa, altera e destrói células progenitoras e células-tronco da medula óssea, assim como elementos do estroma medular. O tipo da radiação, a dose e a duração da exposição são fatores que determinam a extensão da lesão medular (p. ex., aplasia ou hipoplasia). A radiação afeta e altera ou lesa certo número de alvos moleculares, incluindo a estrutura do DNA, a translação e a transcrição genética, entre outras vias de sinalização (intra- e intercelulares). Os linfócitos são mais sensíveis e morrem diretamente mediante exposição. A contagem de linfócitos apresenta correlação e tem sido utilizada para avaliar a dose e a gravidade da exposição (Dainiak, 2002). Além disso, outros precursores hematopoéticos que sofrem mitose são muito sensíveis à lesão e à morte.

Defeitos intrínsecos ou distúrbios constitucionais associados à neutropenia normalmente presentes ao nascimento ou no início da infância são raros. Aqueles devidos à hipoplasia mieloide ou a um defeito de proliferação incluem anemia de Fanconi, a síndrome de Kostmann,

Tabela 32.3 Principais causas de neutropenia (breve lista parcial)

Fármacos — quimioterapia oncológica, cloranfenicol, sulfas/outros antibióticos, fenotiazinas, benzodiazepínico, antitireoideanos, anticonvulsivantes, quinina, quinidina, indometacina, procainamida, tiazidas

Radiação

Toxinas — álcool, compostos de benzeno

Defeitos intrínsecos — doença de Fanconi, doença de Kostmann, neutropenia cíclica, síndrome de Chédiak-Higashi

Mediação imune — distúrbios do colágeno vascular, artrite reumatoide, AIDS

Hematológicas — anemia megaloblástica, mielodisplasia, insuficiência medular, substituição medular

Infecciosas — qualquer infecção esmagadora

Outras — privação alimentar, hiperesplenismo

a síndrome de Schwachman-Diamond e a neutropenia cíclica. Aqueles devidos a um defeito de maturação incluem a mielocatexia e a síndrome de Chédiak-Higashi.

A anemia de Fanconi é uma síndrome de insuficiência medular herdada que ocorre com frequência na infância e em raros casos na vida adulta. Essa condição é heterogênea em suas manifestações clínicas, mas foi definida classicamente pela anemia aplástica e malformações físicas congênitas. A forma aplástica da anemia de Fanconi parece ser indiferenciável da aplasia adquirida. Pacientes com anemia de Fanconi também podem apresentar processos malignos hematopoéticos e de órgãos maciços. O diagnóstico é estabelecido pela análise citogenética em busca de quebra cromossômica após exposição ao diepoxibutano ou à mitomicina C.

Como se pode imaginar pela variação das manifestações e características clínicas dessa síndrome, a patologia molecular subjacente é complexa. Atualmente, existem pelo menos 11 subtipos genéticos de anemia de Fanconi e 7 genes da anemia de Fanconi foram clonados. Um deles, o FANCD1 – que na verdade é o BRCA2 e, assim como o BRCA1, é um gene de reparação do DNA – parece ser um gene determinante de suscetibilidade aos cânceres de mama e ovariano identificados em certas famílias com predisposição herdada a esses tipos de doenças. Esses genes provavelmente atuam como supressores tumorais e parecem estar envolvidos na(s) via(s) molecular(es) responsável(is) pela alteração da reparação do DNA na anemia de Fanconi (Tischkowitz, 2004; Levitus, 2004). O mecanismo da patogênese, no entanto, permanece obscuro.

A síndrome de Kostmann, originalmente denominada "agranulocitose genética infantil" é uma neutropenia congênita rara grave (em geral, a contagem absoluta de neutrófilos é < 200/μL) que se manifesta no início da infância. Embora essa síndrome inicialmente tenha sido identificada como apresentando um padrão autossômico recessivo de herança, também ocorrem casos esporádicos e autossômicos dominantes. É comum observar na medula óssea a presença de granulócitos imaturos (parada promielocítica/mielocítica), mas poucas formas maduras são observadas. A sobrevida do neutrófilo é normal. Embora o defeito genético subjacente nas células mieloides precursoras não esteja elucidado por completo, mutações no gene (ELA2), que codifica a elastase do neutrófilo, parecem estar presentes na maioria dos pacientes. Essas mutações podem ser responsáveis pelo início intempestivo da apoptose nos mielócitos, acarretando sua destruição prematura e interrompendo o ciclo normal de maturação. Além disso, pode haver outras alterações moleculares/genéticas produzindo mutações do DNA e instabilidade do genoma, as quais contribuem para o início e progressão dessa doença (Christensen, 2004; Zeidler, 2002).

Pacientes com neutropenia cíclica apresentam episódios recorrentes de infecção sintomática (fadiga, úlceras bucais, linfadenopatia cervical, febre) em razão dos episódios cíclicos de neutropenia grave. Esta é devida à periodicidade ou ao ciclo de produção de neutrófilos. A doença costuma se manifestar na infância, mas pode estar presente na vida adulta. Tipicamente, ocorrem oscilações dos níveis de neutrófilos e monócitos (níveis normais a muito baixos) durante um período de cerca de 21 dias. Mutações no ELA2, gene codificador da elastase do neutrófilo, foram identificadas em muitos pacientes (Dale, 2002b). Parece que elas são responsáveis pela morte apoptótica seletiva dos progenitores neutrofílicos – um mecanismo similar ao observado na síndrome de Kostmann, como discutido anteriormente.

A neutropenia crônica familiar ou neutropenia benigna familiar refere-se a uma contagem de neutrófilos abaixo do "normal", observada em certas etnias. Trata-se de um achado incidental e clinicamente estável, sem predisposição à infecção e considerado uma variação genética.

É importante observar que as duas causas mais frequentes de neutropenia congênita são a neutropenia da hipertensão induzida pela gestação (HIG – mais comum) e as infecções bacterianas avassaladoras. Os sinais típicos de infecção, incluindo um desvio granulocítico para a esquerda, granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle, acompanham as infecções bacterianas, sendo que essas alterações não são observadas na HIG. Em geral, a condição não persiste além da primeira semana de vida e outras causas devem ser investigadas para bebês com neutropenia persistente (Christensen, 2004).

Pacientes com doenças por imunodeficiência congênita ou primária podem apresentar algum grau de neutropenia. Indivíduos do sexo masculino com agamaglobulinemia ligada ao X (XLA, X-linked agammaglobulinemia) frequentemente apresentam neutropenia, sendo que a XLA deve ser considerada no diagnóstico diferencial de neutropenia crônica em bebês. Uma tirosina quinase não receptor anormal, envolvida na transdução de sinal e na diferenciação de células hematopoéticas, parece estar envolvida. Isso é devido à ocorrência de várias mutações no gene Btk (tirosina quinase do linfócito B ou de Bruton), localizado no braço longo do cromossomo X (q22). Outras síndromes congênitas que possuem uma associação proeminente com a neutropenia são a deficiência seletiva de IgA, imunodeficiência comum variável e síndrome de hiper-IgM (Cham, 2002).

Certas doenças autoimunes também podem estar associadas à neutropenia crônica. Tanto a artrite reumatoide quanto o lúpus eritematoso sistêmico apresentam essa associação (Starkebaum, 2002). A combinação de neutropenia crônica e artrite reumatoide é denominada síndrome de Felty. Pacientes com essa síndrome desenvolverão sintomas decorrentes da artrite reumatoide (p. ex., nódulos subcutâneos, contraturas, eritema, calor local, sensibilidade, envolvimento de grandes e pequenas articulações e dor musculoesquelética) e da neutropenia (sintomas de infecções bacterianas e fúngicas recorrentes). Muitos desses casos estão associados a uma leucemia de linfócitos grandes granulares.

O lúpus eritematoso sistêmico manifesta-se com envolvimento multissistêmico, tornando os sintomas altamente variáveis. Os sistemas comumente afetados são a pele, rins, medula óssea e sistema nervoso central (SNC), além do envolvimento simétrico das articulações. Outra vez, a fisiopatologia é complexa. As alterações na proliferação e sobrevida dos neutrófilos na neutropenia são devidas, pelo menos em parte, à destruição imunomediada, e ocorrem tanto no lúpus eritematoso sistêmico quanto na síndrome de Fanconi. O aumento da apoptose de neutrófilos também ocorre no lúpus eritematoso sistêmico (Starkebaum, 2002).

A mielofibrose primária autoimune (Bass, 2001; Pullarkat, 2003; Rizzi, 204) é, de certa maneira, uma entidade clínico-patológica rara que foi recentemente descrita em pacientes que não apresentam lúpus eritematoso sistêmico ou qualquer outra doença autoimune bem definida. Embora essa entidade ainda esteja sendo definida, os pacientes apresentam citopenias crônicas no sangue periférico, fibrose da medula óssea com celularidade medular variável e agregados linfoides medulares na ausência de outros distúrbios que tipicamente causam mielofibrose. Eles incluem a neoplasia hematológica primária de medula óssea, infecções, câncer metastático ou osteopatias (p. ex., doença de Paget ou hiperparatireoidismo). O prognóstico desses pacientes parece ser muito bom quando a terapia à base de corticosteroide é adotada.

A neutropenia isolada ou agranulocitose é bastante incomum em adultos. Quando um processo mielotísico (p. ex., carcinoma metastático, tuberculose disseminada ou doença de Gaucher) se infiltra na medula óssea, o dano não se limita à granulocitopoese, afeta também os normoblastos e os megacariócitos. Entretanto, por causa do curto período de vida dos granulócitos, a neutropenia é o efeito mais precocemente reconhecível no sangue. O dano ao tecido eritropoético pode levar semanas para se manifestar por causa do período de vida usualmente longo dos eritrócitos. As plaquetas apresentam um período de vida bem curto. Por outro lado, os megacariócitos são mais resistentes à lesão.

A neutropenia devida ao aumento da granulocitopoese ineficaz ocorre nas anemias megaloblásticas e mediante o uso de fármacos com efeito antifolato. Nessas condições, em geral ocorre uma associação de anemia e trombocitopenia. A medula óssea costuma ser hiperplásica. Na anemia megaloblástica devida à deficiência nutricional, supressão da síntese de DNA fármaco-induzida ou erro inato do metabolismo, a maturação nuclear/citoplasmática assíncrona (alteração megaloblástica ou megaloblastose) é identificada nas células medulares progenitoras. A granulocitopoese ineficaz também pode ocorrer na mielodisplasia, abordada na seção sobre distúrbios neoplásicos.

Na inanição, a celularidade tende a diminuir e uma alteração morfológica medular – denominada atrofia serosa gordurosa ou transformação gelatinosa da medula óssea – está presente. Essa alteração revela uma perda de células hematopoéticas no estroma medular, que são substituídas por adipócitos pequenos ou encolhidos expandidos por um material intercelular homogêneo eosinofílico. A hipocelularidade da medula óssea é tipicamente observada na doença avançada.

A neutropenia com hipoplasia medular pode estar associada a uma diminuição da lisozima plasmática ou sérica (muramidase).

A neutropenia transitória pode ocorrer de forma precoce em certas infecções, seguida de leucocitose quando a produção medular se iguala à demanda. Como observado anteriormente, na infecção bacteriana generalizada grave, a neutropenia com desvio para a esquerda pode ser devida à incapacidade de a produção medular compensar a utilização periférica. Algumas infecções bacterianas, sobretudo a brucelose e as infecções por Salmonella, apresentam uma propensão à neutropenia. Elas também podem ter algum efeito depressor sobre a medula óssea. Pacientes com infecções virais (p. ex., sarampo e rubéola) apresentam neutropenia durante vários dias após o aparecimento do exantema. Isso provavelmente é devido em parte ao aumento da utilização. Outras infecções virais agudas (p. ex., hepatite, MI e influenza) também podem causar neutropenia aguda. A linfocitose está presente e persiste após o desaparecimento da neutropenia.

A neutropenia do hiperesplenismo foi atribuída à remoção seletiva de neutrófilos pelo baço. Ela está associada à hiperplasia neutrofílica da medula óssea e é corrigida pela esplenectomia. A esplenomegalia devida a muitas causas pode acarretar diminuição do tempo de vida dos neutrófilos e neutropenia. As causas incluem a esplenomegalia congestiva, síndrome de Felty, doença de Gaucher e linfoma. Em alguns casos de síndrome de Felty (neutropenia e esplenomegalia na artrite reumatoide), pode haver um anticorpo específico antineutrófilo. Ramirez et al. (2004) recentemente demonstraram um aumento da apoptose em pacientes com cirrose e ascite, que pareceu ser dependente dos elevados níveis de atividade de caspase-3 observados. Esses pacientes apresentaram propensão ao desenvolvimento de neutropenia e infecção. No passado, isso era grandemente atribuído ao hiperesplenismo com aumento da depuração esplênica de neutrófilos. Contudo, estes achados recentes sugerem que outros mecanismos, pelo menos em parte, também podem contribuir.

A pseudoneutropenia pode ser causada por aumento da marginalização de neutrófilos em alguns indivíduos, sem uma diminuição da contagem total de granulócitos. Em vez de apresentar uma distribuição igual entre o MGP e o CGP, um aumento da proporção de neutrófilos parece estar presente no MGP. Pequenas doses de endotoxina causam um desvio de neutrófilos para o MGP do CGP, causando uma neutropenia aparente, antes de causarem uma leucocitose. Em animais, agentes anestésicos (p. ex., éter) causam o mesmo tipo de pseudoneutropenia.

Alterações morfológicas em neutrófilos

Além de alterações quantitativas, também ocorrem alterações morfológicas qualitativas nos neutrófilos. Algumas delas, como a presença de grânulos tóxicos ou vacúolos citoplasmáticos, são adquiridas e desaparecem quando o estímulo que as provocou é eliminado. Tais alterações foram bem ilustradas e revistas por Brunning (1970) e, mais recentemente, por Kroft (2002).

Deve ser observado que os distúrbios da função leucocitária podem existir sem qualquer anormalidade estrutural detectável pelos métodos usuais de análise morfológica.

Granulação tóxica (Tab. 32.4). Grânulos tóxicos são elementos citoplasmáticos de cor azul-escuro a roxo, presentes nos estágios de metamielócitos, bastonetes ou neutrófilos. São peroxidase-positivos e podem estar presentes em pequenas ou grandes quantidades. Neutrófilos tóxicos podem apresentar menor atividade de peroxidase do que os neutrófilos normais. A granulação tóxica é observada em infecções ou outras condições tóxicas, mas também pode ser encontrada em condições reativas não infecciosas (Fig. 32.1).

Em geral, grânulos neutrofílicos apresentam cor variável do marrom-claro ao rosa e são encontrados em neutrófilos metamielócitos, bastonetes e em formas maduras. Mesmo grânulos inespecíficos ou azurofílicos, que apresentam cor azul-escuro no estágio promielocítico, normalmente perdem a basofilia no estágio de neutrófilo maduro, onde representam aproximadamente 1/3 dos grânulos existentes em um ser humano. Grânulos tóxicos são elementos azurófilos que retêm a reação de coloração basofílica por falta de maturação ou que desenvolveram um aumento de basofilia no neutrófilo maduro. Além disso, eventuais divisões saltadas durante o desenvolvimento do neutrófilo podem acarretar uma maior proporção de grânulos do tipo azurófilo. O aumento da basofilia dos grânulos azurófilos, simulando grânulos tóxicos, pode ocorrer em células normais expostas a um tempo de coloração prolongado ou diante da diminuição do pH na reação de coloração.

Tabela 32.4 Alterações morfológicas em neutrófilos

Granulação tóxica – grânulos citoplasmáticos azurofílicos observados em infecções graves, outras condições tóxicas e condições reativas
Vacúolos citoplasmáticos – observados em infecções, indicando fagocitose
Corpúsculos de Döhle – remanescentes citoplasmáticos de ribossomos ovais de coloração azul-claro observados em infecções e outras condições
Anomalia de May-Hegglin – condição autossômica dominante rara com inclusões ribossômicas citoplasmáticas de coloração azul-claro *semelhantes* aos corpúsculos de Döhle
Anomalia de Reilly – granulação azurofílica proeminente não relacionada à infecção
Anomalia de Pelger-Huët – núcleos bilobados ou arredondados com forma de pincenê
Síndrome de Chédiak-Higashi – distúrbio autossômico recessivo com grânulos gigantes, possivelmente representando lisossomos gigantes fundidos e função leucocitária anormal

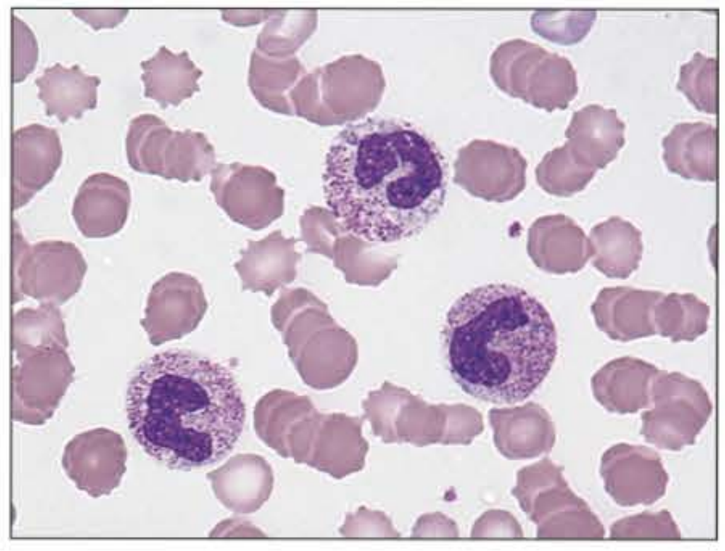


Figura 32.1 Neutrófilo com granulação tóxica, com dois bastonetes. Inclusões basofílicas (corpúsculos de Döhle) também estão presentes (× 1.000).

Vacúolos citoplasmáticos também sinalizam a ocorrência de alteração tóxica quando as lâminas são preparadas com sangue fresco sem anticoagulante para eliminar a possibilidade de artefatos de degeneração. A vacuolização tóxica parece apresentar uma especificidade > 90% para a infecção e, quando presente com granulação tóxica, corpúsculos de Döhle ou desvio para a esquerda, parece ser significativamente preditiva de infecção sistêmica (Kroft, 2002). Vacúolos ou depleção irregular de grânulos apontam a ocorrência de fagocitose (Fig. 32.2).

Corpúsculos de Döhle. São pequenas inclusões ovais no citoplasma periférico de neutrófilos polimorfonucleares, as quais se coram em azul-claro pela técnica de Wright (Fig. 32.1). São remanescentes de ribossomos livres ou do retículo endoplasmático rugoso persistente de um estágio de desenvolvimento anterior. A princípio, os corpúsculos de Döhle foram descritos como especialmente proeminentes na febre escarlate, mas podem ser observados em numerosas doenças infecciosas, queimaduras, anemia aplástica e após a administração de agentes tóxicos. Eles podem acompanhar granulações tóxicas nos neutrófilos. Ao microscópio, os corpúsculos de Döhle assemelham-se às inclusões observadas na anomalia de May-Hegglin. Outra alteração tóxica observável nos neutrófilos é o aparecimento ocasional de várias espículas pontiagudas ou arredondadas, que se estendem a partir do núcleo.

Anomalia de May-Hegglin. Trata-se de uma condição autossômica dominante rara que envolve o gene codificador da cadeia pesada da miosina não muscular 9 (MYH9), ligado ao cromossomo 22q12-13 (Kelley, 2000; Martignetti, 2000; Seri, 2000). As mutações parecem alterar a formação e a estabilidade da miosina e podem ser responsáveis pela fisiopatologia subjacente e alterações observadas na estrutura e na função de leucócitos e plaquetas. Parece que, ao nível molecular, várias mutações em MYH9 são, pelo menos parcialmente, responsáveis por um espectro fenotípico de doença. Esse espectro parece incluir a

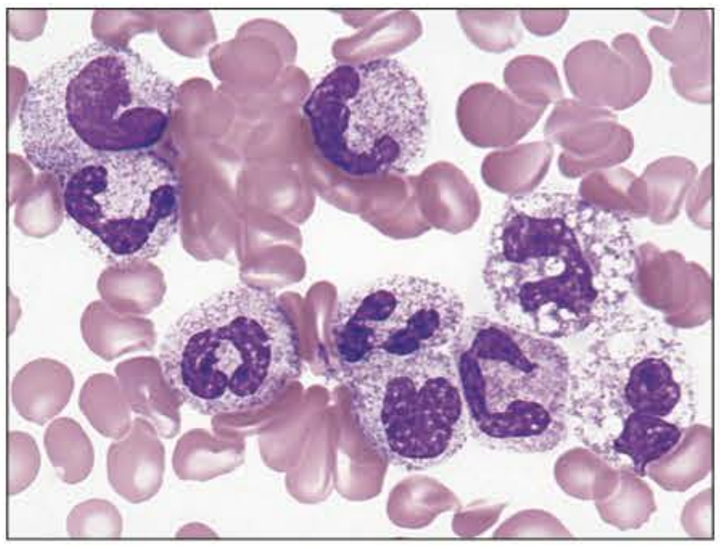


Figura 32.2 Neutrofilia tóxica leucemoide com desvio para a esquerda e vacuolização tóxica (×1.000).

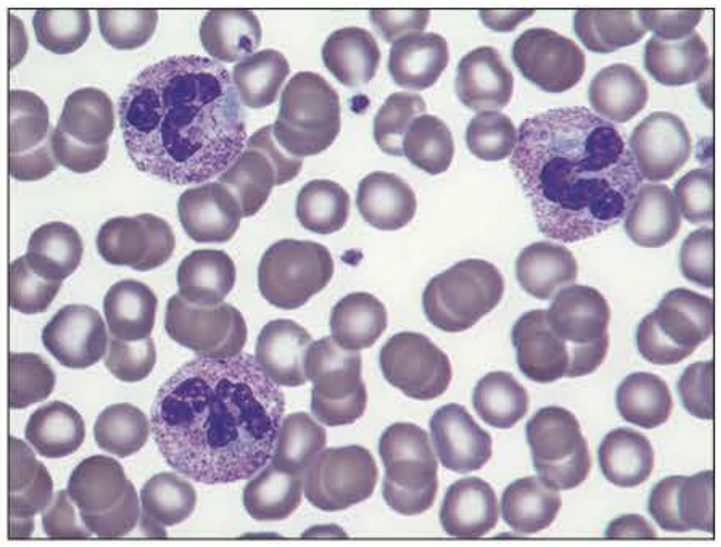


Figura 32.3 Anomalia de May-Hegglin, mostrando inclusões semelhantes aos corpúsculos de Döhle (×1.000).

anomalia de May-Hegglin e as síndromes de plaquetas de Sebastian, Fechtner e Epstein (Heath, 2001; Seri, 2003). Esse espectro pode ser fenotipicamente modificado pela expressão aberrante do gene *fibulina-1*, a qual pode ser responsável pela variabilidade clínica da doença (Toren, 2003). A *fibulina-1* é um gene codificador de uma glicoproteína secretada, presente na membrana basal de muitos órgãos.

Embora seja clinicamente variável, essa anomalia é caracterizada pela presença de inclusões azul-claras (parecidas com os corpúsculos de Döhle neutrofílicos), plaquetas gigantes e, em alguns indivíduos, trombocitopenia (Fig. 32.3). As inclusões são maiores e mais proeminentes que os córpúsculos de Döhle observados em infecções. Elas foram descritas em eosinófilos, basófilos e monócitos, assim como em neutrófilos (Brunning, 1970). A coloração azul das inclusões pode ser abolida pelo tratamento prévio das células com ribonuclease. À microscopia eletrônica, a aparência das inclusões difere daquela dos corpúsculos de Döhle (compostos de filamentos paralelos de retículo endoplasmático rugoso), sugerindo alterações estruturais no DNA e nos ribossomos (So, 2003). A função granulocítica é normal.

Anomalia de Alder-Reilly. Uma granulação densa, proeminente e maior que a normal em todos os leucócitos foi descrita por Alder, em 1939 (Fig. 32.4). Nos neutrófilos, essa granulação pode se assemelhar à granulação tóxica, mas não tem relação com a infecção nem é transitória. Em 1941, Reilly descreveu granulócitos similares em alguns (mas não em todos) pacientes com gargulismo, síndrome de Hurler ou, mais genericamente, mucopolissacaridoses genéticas (Reilly, 1941). Outras observações mostraram que a granulação densa em neutrófilos pode ocorrer como uma característica das mucopolissacaridoses genéticas ou independentemente em indivíduos saudáveis (Brunning, 1970).

A presença de uma inclusão metacromática nos linfócitos circundada por um espaço claro (Fig. 32.5) é mais frequente do que a anomalia de Alder-Reilly nas mucopolissacaridoses genéticas. Macrófagos na medula óssea com frequência apresentam granulação similar. Esse grupo de distúrbios é herdado e caracterizado por deficiências ou desarranjos de várias enzimas lisossômicas necessárias para a degradação de mucopolissacarídeos. O resultado é o depósito e armazenamento anormais de mucopolissacarídeos em múltiplos órgãos. Anormalidades esqueléticas são proeminentes.

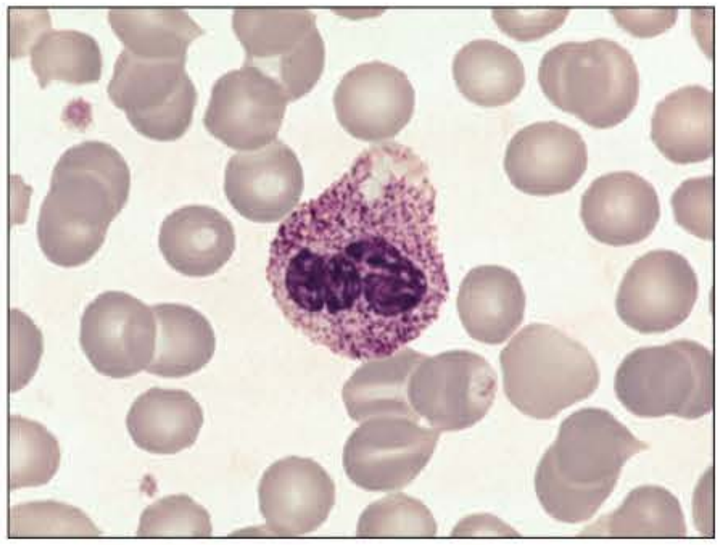


Figura 32.4 A anomalia de Alder-Reilly pode ser observada em indivíduos saudáveis ou nas mucopolissacaridoses, nas quais os grânulos são metacromáticos (×1.000).

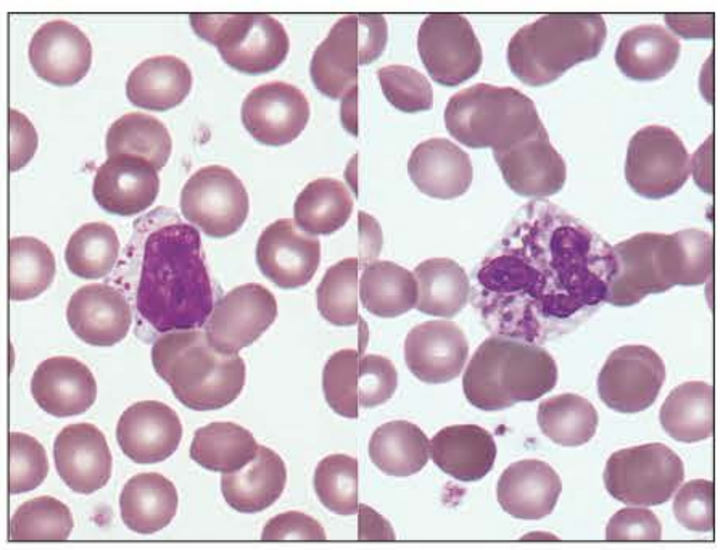


Figura 32.5 Mucopolissacaridoses genéticas frequentemente apresentam grânulos linfocíticos anormais com halos circundantes. Nessas células da mesma esfregaço de sangue, os neutrófilos apresentam alteração similar (×1.000).

Anomalia de Pelger-Huët. Essa condição autossômica dominante hereditária envolve a falha da segmentação normal dos núcleos granulocíticos. A maioria dos núcleos é bilobada e arredondada, com uma forma característica de "óculos" ou "pincenê" (Fig. 32.6). A cromatina é bem grosseira e as formas observadas não correspondem às normais de bastonetes jovens. Quando um grande número de neutrófilos-bastonetes aparece na contagem diferencial de um paciente sem infecção nem outra causa, a análise cuidadosa de esfregaços de sangue do paciente e de seus familiares em alguns casos permite estabelecer a presença da anomalia de Pelger-Hüet. As células são funcionalmente normais.

Um distúrbio adquirido similar de segmentação nuclear de granulócitos pode ser observado em casos de leucemia granulocítica, distúrbios mielodisplásicos e alguns distúrbios mieloproliferativos, algumas infecções e após a exposição a certos fármacos (Brunning, 1970). Isso é denominado pseudoanomalia de Pelger-Huët. Além dos bastonetes e neutrófilos com apenas dois segmentos, células maduras com núcleos redondos não segmentados e cromatina grosseira são comuns.

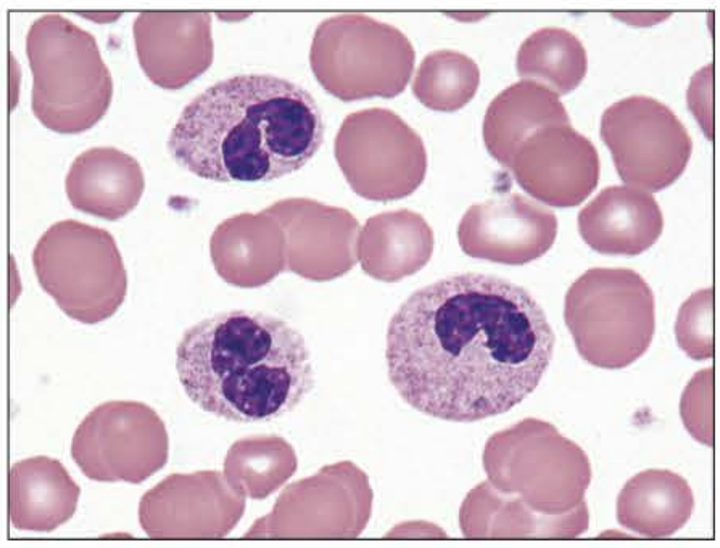


Figura 32.6 Anomalia de Pelger-Huët herdada (×1.000).

Em contraste com a anomalia de Pelger-Huët congênita, núcleos em forma de anel e outros núcleos anormais podem ser observados, e o citoplasma em geral é hipogranuloso.

Síndrome de Chédiak-Higashi. Esse raro distúrbio autossômico recessivo é caracterizado por albinismo óculo-cutâneo parcial, fotofobia,

imunodeficiência, grânulos anormalmente grandes nos leucócitos e outras células que contêm grânulos, defeitos neurológicos e infecções piogênicas frequentes (Introne, 1999). Ocorre uma fase acelerada similar ao linfoma com linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Infiltrados linfoides são disseminados, e a morte ocorre em um estágio inicial. Granulócitos, monócitos e linfócitos contêm grânulos gigantes (Fig. 32.7), os quais parecem ser lisossomos anormais. A patogênese desse distúrbio está ligada a uma anormalidade da maturação granular, causando um aumento de tamanho e aparente fusão de grânulos e vesículas (p. ex., lisossomos, melanossomos e grânulos densos de plaquetas) em todos os tipos celulares. Existem anormalidades funcionais nos leucócitos. Embora o mecanismo ainda não tenha sido totalmente elucidado, um modelo genético de camundongo *beige*, hoje em estudo, revelou uma mutação no gene que codifica CHS/*beige* para a proteína CHS1 ou Lyst. O gene *LYST* (*liposomal trafficking regulator,*regulador do tráfego lisossômico) aparece envolvido na regulação do tamanho da vesícula, no tráfego e no movimento intracelular, de modo que a migração e a liberação vesicular são anormais (Ward, 2002).

O termo "mielocatexia" é aplicado à neutropenia periférica com a presença de neutrófilos da medula óssea. A síndrome WHIM (*warts, hypogammaglobulinemia, infection and myelokathexis*, verrugas, hipogamaglobulinemia, infecção e mielocatexia) é uma doença autossômica dominante rara do tráfego de leucócitos que envolvem o cromossomo 2q21. Ela aparece devido a mutações no gene do receptor de quimiocina CXCR4 e à resposta leucocitária alterada a seu ligante funcional, a CXCL12. As alterações hematológicas incluem a neutropenia periférica grave com linfopenia também comum, mas com hiperplasia granulocítica da medula óssea (Gorlin, 2000; Hernandez, 2003; Gulino, 2003, 2004).

Distúrbios funcionais dos neutrófilos

Distúrbios herdados ou adquiridos, que afetam neutrófilos e outros leucócitos, podem acarretar função anormal e consequente suscetibilidade a infecções. Deficiências de fatores hormonais (anticorpos, componentes do complemento) podem resultar em uma quimiotaxia ou opsonização defeituosa. Como descrito anteriormente, alguns distúrbios herdados (p. ex., anomalias de May-Hegglin, Alder-Reilly e Pelger-Huët) apresentam aspectos morfológicos alterados, mas função granulocítica aparentemente normal. Outras condições herdadas (p. ex., síndrome de Chédiak-Higashi e deficiência granular específica [DGE]) apresentam alteração morfológica e funcional. Condições herdadas (p. ex., doença granulomatosa crônica, deficiência de mieloperoxidase [MPO] – DMP, e deficiência de adesão leucocitária) apresentam distúrbios funcionais com morfologia essencialmente normal observada em lâminas coradas pelos métodos de Wright e Giemsa.

A doença granulomatosa crônica (Lakshman, 2001; Vignais, 2002; Heyworth, 2003; Jurkowska, 2004) é uma imunodeficiência primária rara que afeta neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e monócitos e é decorrente da incapacidade dessas células fagocitárias de matar microrganismos intracelulares. Os pacientes apresentam infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (pele, fígado, boca, linfonodos). Estas levam a lesões granulomatosas crônicas (uma característica importante da doença) que podem, por sua vez, obstruir sistemas orgânicos vitais e acabar levando à morte. Os sintomas ocorrem de forma precoce, e tanto a forma autossômica recessiva (~ 66%) quanto a ligada ao X (~ 33%) são conhecidas.

A etiologia da doença está associada à ocorrência de defeitos genéticos afetando qualquer um dos componentes ligados à membrana ou dos componentes citoplasmáticos da NADPH oxidase. Esse complexo enzimático não é formado e, em consequência, permanece inativo nas células em repouso. Porém, com a estimulação celular, os componentes da membrana e do citoplasma juntam-se e formam o complexo ativo de NADPH oxidase-proteína que pode começar a funcionar. Após ser formada, essa enzima é responsável pela produção de ânion superóxido ($NADPH + 2O_2^- \; 2O_2^- + NADP^+ + H^+$), assim como de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, mediadores moleculares da morte celular microbiana. A produção dessas espécies altamente reativas de radicais livre de oxigênio costuma ser denominada "explosão respiratória", indicando o aumento do consumo de oxigênio que ocorre com a ativação da NADPH oxidase. Portanto, qualquer defeito nessa enzima, que impeça ou reduza de forma significativa a sua atividade permitirá que microrganismos intracelulares permaneçam viáveis e, em consequência, se disseminem (pela mobilidade celular e semeadura do tecido adjacente), produzindo infecção recorrente e doença granulomatosa. Estudos do perfil da expressão genética global (Kobayashi, 2004) sugerem que tanto o aumento da atividade pró-inflamatória quanto da apoptose defeituosa de neutrófilos podem estar envolvidos.

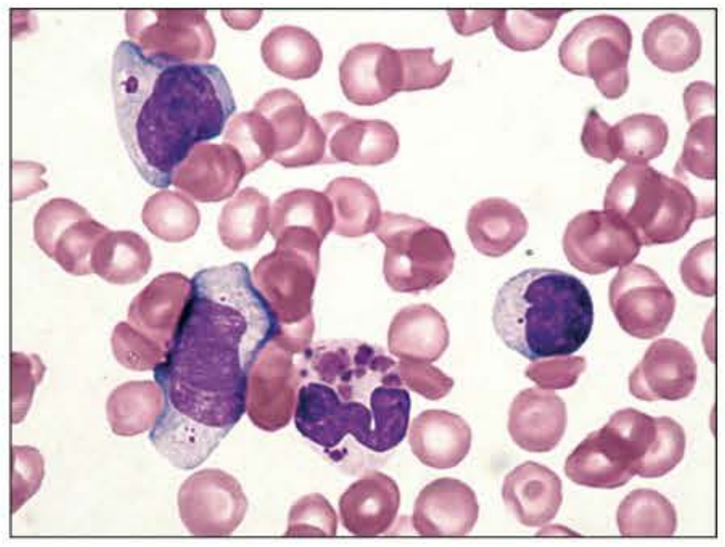


Figura 32.7 Neutrófilo e linfócitos com grânulos grandes na síndrome de Chédiak-Higashi (×1000).

A MPO está presente nos neutrófilos (em grânulos azurófilos/primários) e monócitos (nos lisossomos), mas está ausente nos pró-monócitos e macrófagos tissulares. A MPO catalisa a produção celular de hipoclorito (ClO^-) ou de ácido hipocloroso ($H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + ClO^-$). O HOCl é um forte oxidante normalmente envolvido na destruição de microrganismos intracelulares, assim como possivelmente de células tumorais (Hoy, 2002). Embora um único gene codifique a MPO, o produto da translação sofre algumas reações de modificação complexas, incluindo a inserção do heme, para produzir a molécula enzimática ativa final (Nauseef, 2004).

A deficiência de MPO primária é um distúrbio congênito que não é incomum e é facilmente identificado com contadores celulares automáticos que incorporam a mensuração da atividade da MPO na contagem diferencial. A deficiência de MPO secundária, a qual pode ser transitória e corrigida com tratamento da doença subjacente, pode ser secundária a condições como neoplasias mieloides, fármacos, doenças infecciosas graves, diabetes melito e gestação (Lanza, 1998). A DMP primária pode ser total ou parcial e, em geral, não apresenta um aumento da frequência de infecção na maioria dos indivíduos (Lanza, 1998; Lakshman, 2001; Suzuki, 2004), apesar de um aumento ter sido relatado em um estudo recente (Kutter, 2000).

Com respeito à estrutura, a peroxidase eosinofílica humana está intimamente relacionada com a MPO, mas é encontrada nos grânulos de eosinófilos e é codificada por um gene diferente. Acredita-se que a sua deficiência seja extremamente rara, não está relacionada com a deficiência de MPO, pode apresentar herança autossômica recessiva e parece que ela não causa sintomas clínicos (Nakagawa, 2001).

Pacientes com uma condição extremamente rara – a deficiência granular específica – apresentam infecções bacterianas múltiplas, núcleos bilobados atípicos nos neutrófilos e ausência de grânulos citoplasmáticos secundários/específicos nos neutrófilos quando lâminas de sangue são coradas com coloração de Wright. A deficiência específica de grânulos também afeta os eosinófilos. Além da deficiência de grânulos e comprometimento da atividade bactericida, os neutrófilos apresentam defeito na quimiotaxia, suprarregulação do receptor e desagregação. Uma mutação no gene do fator de transcrição mieloide específico (CCAAT/enhancer binding protein-ε ou C/EBPe) parece ter papel nessa doença (Rosenberg, 1993; Gombart, 2001; Khanna-Gupta, 2001).

Como a função adequada dos neutrófilos depende da adesão intercelular mediada pelas integrinas, não é surpreendente que existam doenças de deficiência de adesão leucocitária (DAL). As integrinas são essencialmente moléculas de superfície não adesivas presentes nos leucócitos circulantes. Estes, mediante estimulação adequada, se tornam adesivos ou desenvolvem um aumento das propriedades de ligação a seus ligantes específicos. Isso aparentemente se deve a uma alteração conformacional na estrutura molecular das integrinas e/ou à agregação de números maiores de moléculas na superfície celular. Por fim, tanto a adesão leucocitária quanto a migração se tornam defeituosas

e, como consequência clínica, observa-se a ocorrência de infecção recorrente e leucocitose.

Foram descritos três tipos de deficiência de adesão leucocitária (Bunting, 2002; Gabius, 2002; McDowall, 2003; Etzioni, 2004). Na DAL I, uma mutação da subunidade β_2 (do CD18) resulta na falta de expressão normal da integrina, provocando sua ausência ou uma disfunção na superfície celular. São observadas infecções graves recorrentes, neutrofilia na infecção grave e retardo da separação do cordão umbilical. A DAL II se deve à ocorrência de uma mutação que afeta o transporte de fucose e acarreta diminuição da expressão dos ligantes de selectina tanto em leucócitos (CD15a ou sialil Lewis X) como em outras células. Ocorre neutrofilia (com ou sem infecção) e anormalidades de desenvolvimento. Na DAL III, a expressão do CD18 e do CD15a nos leucócitos é normal. Por outro lado, parece haver um defeito na ativação da integrina (via quimiocinas endoteliais) em decorrência de uma mutação que afeta os receptores acoplados à proteína G (GPCRs, G-protein-coupled receptors). Se a ligação entre os GPCRs dos leucócitos e as quimiocinas endoteliais não ocorrer, a ativação da integrina e a adesão dos leucócitos são impossibilitadas. Ocorrem infecções graves recorrentes, neutrofilia com infecção e tendência ao desenvolvimento de hemorragias. Esta última é observada porque as integrinas plaquetárias GPIIbβ_3 não são ativadas. Algumas formas de DAL podem ser diagnosticadas por citometria de fluxo, que revela a ausência de expressão de CD18 ou CD15a nos neutrófilos (Roos, 2001).

Eosinofilia

A eosinofilia se dá quando os eosinófilos no sangue ultrapassam ~ $0{,}35 \times 10^9$/L na contagem de grandes quantidades de células, como aquelas realizadas em equipamentos automatizados ou via contagem direta em câmara; ou ~ $0{,}5 \times 10^9$/L, quando a contagem é calculada a partir do diferencial de 100 a 200 células e na contagem total de leucócitos. A eosinofilia está tipicamente associada a processos alérgicos (a causa mais comum em pacientes ambulatoriais na América do Norte) (Brigden, 1999) e infecções parasitárias. Ambos são tipos secundários ou reativos comuns de eosinofilia. Classicamente, a principal função dos eosinófilos parecia ser a liberação de conteúdo granular ou de espécies reativas do oxigênio geradas pela membrana celular para danificar o organismo-alvo ou a célula agressora (Shurin, 1988). Hoje em dia, acredita-se que a função eosinofílica seja mais complexa porque aparentemente apresenta funções adicionais, com possíveis papéis de sinalização imunorreguladora e pró-inflamatória. Por essa razão, o eosinófilo parece ser capaz de atuar como célula efetora e/ou reguladora.

Fatores similares influenciam a contagem de eosinófilos, como descrito anteriormente, em relação à de neutrófilos. Esses fatores são: (1) mitose/proliferação, maturação/armazenamento e liberação para/da medula óssea; (2) taxa de escoamento de eosinófilos do sangue (rolagem, espraiamento, adesão e migração); (3) tráfego de eosinófilos para locais específicos de acúmulo; e (4) sobrevida e taxa de destruição de eosinófilos nos tecidos. A produção de eosinófilos é estimulada pela IL-5, a migração é influenciada pela quimiocina eotaxina e os dois fatores interagem produzindo a eosinofilia (Palframan, 1998). As causas e as condições associadas à eosinofilia são apresentadas na Tabela 32.5.

A distinção das causas de eosinofilia secundária é um pouco arbitrária e existe uma grande sobreposição entre as condições. Talvez seja mais importante distinguir a eosinofilia reativa, que é devida a processos clonais (p. ex., LMC), da eosinofilia idiopática com evidência de envolvimento orgânico, embora também haja uma sobreposição entre essas condições.

As leucemias eosinofiílicas costumam apresentar aumento da proporção de mieloblastos e mielócitos eosinofílicos, e a presença de um cariótipo anormal ou de outras evidências de um distúrbio mieloproliferativo sugere uma eosinofilia originária de um clone leucêmico, enquanto a eosinofilia que ocorre na leucemia linfoide é provavelmente reativa (Bain, 1996). A eosinofilia em geral está presente na leucemia mieloide crônica (LMC), e alguns casos apresentam como característica principal uma eosinofilia acentuada (Gotlib, 2003). A leucemia eosinofílica crônica é distinta da LMC e apresenta anormalidades citogenéticas diferentes e variadas (Bain, 2004).

Algumas neoplasias hematológicas podem ser acompanhadas de eosinofilia, como se observa, por exemplo, na leucemia aguda, doença de mastócitos sistêmica, discrasias de plasmócitos, além de doenças mielodisplásicas e mieloproliferativas. A eosinofilia também pode ocorrer em uma neoplasia primária originada em outro órgão, como pulmão, tecido mole ou cólon. Raros casos relatados na literatura associam a reação leucemoide eosinofílica ao melanoma metastático (Oakley, 1998), histiocitoma fibroso maligno (HFM) (Melhem, 1993) e carcinoma pulmonar (Varindani, 1982). Parece que anormalidades na expressão e regulação de citocinas são responsáveis, pelo menos em parte, por essa reação. Um paciente com HFM apresentou reação leucemoide granulocítica (Melhem, 1993).

Tabela 32.5 Principais causas de eosinofilia

Alérgicas – urticária, febre do feno, asma
Inflamatórias – fasciíte eosinofílica, síndrome de Churg-Strauss
Parasitárias – triquinose, filaríase, esquistossomose
Infecções não parasitárias – fúngica sistêmica, febre escarlate, pneumonia por *Chlamydia* da infância
Respiratórias – síndromes eosinofílicas pulmonares (de Loeffler, eosinofilia pulmonar tropical), síndrome de Churg-Strauss
Neoplásicas – LMC, linfoma de Hodgkin, linfomas de células T
Síndromes hipereosinofílicas idiopáticas – afetando coração, fígado, baço, SNC e outros órgãos
Outras – certos fármacos, neoplasias hematológicas e viscerais, doenças inflamatórias gastrintestinais, sarcoidose, síndrome de Wiskott-Aldrich

A eosinofilia é, em geral, um componente proeminente no tecido afetado pelo linfoma de Hodgkin, e foi relatado que um envolvimento extenso indica um prognóstico ruim (von Wasielewski, 2003). A eosinofilia tissular e sanguínea também é observada em linfomas de célula T e, de modo similar, pode ser indicativa de um prognóstico negativo (Tancrede-Bohin, 2004). Algumas vezes, a eosinofilia é proeminente na leucemia linfoblástica aguda, sobretudo naquelas com t(5,14) (q31;q32) (Bain, 2001a).

Hipersensibilidade, reações alérgicas e condições atópicas (p. ex., asma brônquica e rinite sazonal) são caracterizadas pela eosionofilia. Essas reações imunes são mediadas pela imunoglobulina E (IgE), que acarreta degranulação de mastócitos e basófilos com liberação de um fator quimiotático para eosinófilos. Eosinófilos são encontrados no sangue, medula óssea, escarro (na asma brônquica) e em secreções nasais e conjuntivais (rinite sazonal). A eosinofilia sanguínea geralmente é apenas leve ou moderada ($0{,}4$–$1{,}0 \times 10^9$/L).

Na asma, a contagem absoluta de eosinófilos é útil no tratamento, porque o nível de eosinofilia apresenta correlação positiva com o desempenho pulmonar, indica a adequação da terapia ao esteroide e pode indicar a presença de infecções agravantes.

Os distúrbios cutâneos incluem alguns distúrbios heterogêneos, outros com etiologia conhecida e ainda outros de etiologia desconhecida ou idiopáticos, apresentando infiltrados cutâneos locais com eosinófilos (e, tipicamente, outros tipos de células inflamatórias). Alguns comumente estão associados à eosinofilia periférica, ao contrário de outros (Christophers, 2000). A dermatite atópica e o eczema são frequentemente acompanhados de eosinofilia sanguínea, sobretudo em crianças. No pênfigo, a eosinofilia é característica. A eosinofilia está frequente associda associada a reações urticariformes agudas, mas é incomum na urticária aguda. Seja qual for o caso, é importante reconhecer que o recrutamento de eosinófilos depende da interação adequada das quimiocinas (IL-5) e seus receptores, assim como da sua interação com subgrupos linfocitários específicos (linfócitos T auxiliares de tipo 2 [Th2]) nessas respostas e condições cutâneas.

No sangue periférico, uma eosinofilia de grau moderado a intenso está mais comumente associada à infecção por helmintos (incluindo nematódeos, trematódeos e cestódeos). Esta é a causa mais comum de eosinofilia no mundo (Brigden, 1999). A eosinofilia é mais acentuada na invasão dos tecidos (p. ex., triquinose) do que quando os parasitas habitam a luz de um órgão (p. ex., teníase). Alguns parasitas, como *Taenia solium* (cisticercose), produzem uma fraca resposta inflamatória enquanto estão vivos, mas desencadeiam uma resposta inflamatória durante a regeneração do organismo. Outros parasitas, como *Trichinella spiralis* (triquinose), causam eosinofilia periférica durante a in-

vasão larvária dos músculos e durante o encistamento. É importante observar que a ausência de eosinofilia não exclui uma infecção parasitária (Schulte, 2002).

Na triquinose, o nível de eosinófilos começa a aumentar no sangue dias após a infecção. O pico da eosinofilia ocorre durante a terceira ou quarta semana. Entretanto, a eosinofilia pode estar ausente em várias infestações por *Trichinella*.

A persistência de leucocitose e a eosinofilia por meses é observada na toxocaríase ou na larva migrans visceral. A migração das larvas de nematódeos, seja de cão (*Toxocara canis*) ou de gato (*Toxocara cati*), causa a infestação. Nessa condição, pode haver lesões pulmonares (síndrome de Löffler ou pneumonia eosinofílica simples). Uma reação de hipersensibilidade imune ao nematódeo Ascaris lumbricoides foi classicamente associada à síndrome de Löffler.

Uma outra infecção parasitária com eosinofilia é a erupção serpiginosa (larva migrans cutânea) causada por larvas de ancilostomídeo do cão (*Ancylostoma braziliense*) ou do gato (*Ancilostoma caninum*). A eosinofilia nessas infecções é dependente da célula T (Basten, 1970) e, como já mencionado, depende de múltiplas quimiocinas, moléculas e receptores quimiotáticos e interações intercelulares.

Graus variados de eosinofilia são observados em algumas doenças infecciosas. Na febre escarlate, a eosinofilia em geral está associada ao exantema cutâneo, cuja natureza é provavelmente alérgica. A coreia pode estar associada à eosinofilia, ao contrário das outras formas de febre reumática.

Pneumonias eosinofílicas com manifestações agudas tipicamente incluem eosinofilia pulmonar simples ou síndrome de Löffler, infecções parasitárias, pneumonias eosinofílicas induzidas por fármacos e pneumonia eosinofílica aguda idiopática. Também existem várias síndromes eosinofílicas pulmonares com manifestações mais crônicas. Outros esquemas de classificação dividem a pneumonia eosinofílica em pneumonia idiopática (de causa desconhecida) e secundária (infecção, fármacos, doença imunológica e/ou sistêmica).

A síndrome de Löffler (pneumonia eosinofílica simples) acomete indivíduos de todas as faixas etárias e é caracterizada pela formação de exsudatos pulmonares transitórios repetidos, acompanhados de febre e sintomas clínicos de bronquite, frequentemente produzindo escarro com eosinófilos. Essa condição se resolve em poucas semanas. Pode ser causada por uma variedade de exposições, incluindo certos fármacos, antígenos inaláveis ou infestação helmíntica (ver acima). Esta última ocorre durante períodos de disseminação ou migração, quando os parasitas passam do sangue para os alvéolos pulmonares. A síndrome de Löffler também pode ser idiopática.

Muitos fármacos estão associados à eosinofilia sanguínea ou pulmonar e a infiltrados pulmonares. Os sintomas podem ser leves ou mais graves, levando à insuficiência respiratória fulminante. Entretanto, o prognóstico é favorável na maioria dos casos e a resolução do quadro ocorre com a retirada do fármaco agressor. Assim, no caso desses pacientes, a obtenção de uma história farmacológica detalhada é essencial ao diagnóstico. Os fármacos implicados são: pilocarpina, fisostigmina, digitálicos, ácido p-aminosalicílico, sulfonamidas, clorpromazina, fenitoína, alguns fármacos antidiabetes, alguns agentes antineoplásicos e muitos outros. Um mecanismo comum de produção da eosinofilia ainda não foi identificado. É importante lembrar que pacientes com nefropatia e/ou hepatopatia apresentam maior incidência de reação medicamentosa, incluindo eosinofilia, em comparação aos pacientes que não apresentam tais condições.

A eosinoflia pulmonar tropical é uma síndrome caracterizada por tosse paroxística e broncoespasmo associados a uma eosinofilia acentuada. Ela é observada sobretudo na Índia, África, Sudeste Asiático e Pacífico Sul. No entanto, ela pode ser observada em qualquer grupo racial vivendo em uma área endêmica. A *Wuchereria bancrofti* (um parasita de seres humanos que se instala nos vasos linfáticos) é a causa mais comum e amplamente distribuída dessa doença. Os títulos de IgG e IgE antiantígenos de microfilária estão elevados. A doença provavelmente consiste numa reação hiperimune causada pelas microfilárias, que podem ser encontradas às vezes em amostras de biópsia de pulmão ou de linfonodos, mas usualmente não são observadas no sangue. A resposta ao fármaco antifilária, dietilcarbamazina, é curativa.

Níveis elevados persistentes de eosinofilia durante longos períodos de tempo, nenhuma evidência de causas conhecidas de eosinofilia e sinais e sintomas de lesão e dano orgânico são critérios para a inclusão de pacientes na síndrome hipereosinofílica idiopática (Fig. 32.8). Esta parece ser uma síndrome heterogênea composta por um número de diferentes distúrbios de gravidade variável. Embora a patogênese da síndrome hipereosinofílica idiopática não esteja totalmente clara, a desregulação da comunicação molecular intra ou intercelular parece estar envolvida, pelo menos em algumas de suas formas. Essa desregulação acarreta a presença de eosinófilos persistentemente ativados que liberam grânulos proteicos eosinofílicos e enzimas, mediadores lipídicos e citocinas, quimiocinas e fatores do crescimento. Isso não só produz dano e lesão tissular, mas também estabelece um "circuito autócrino" que ativa células continuamente e continua a produzir degranulação dos eosinófilos, provocando um maior dano celular e tissular. Algumas formas parecem ser mediadas por células T, envolvendo um subgrupo de linfócitos tipo Th2. Parece que existem pelo menos duas formas distintas ou variantes hematológicas: a mieloide e a linfoide. O quadro clínico, o comportamento a longo prazo e o risco de malignização dessas variantes são diferentes (Brito-Babapulle, 2003; Roufosse, 2003). Populações clonais de eosinófilos foram observados em alguns pacientes com síndrome hipereosinofiilica idiopática (Chang, 1999). Em outros pacientes com essa síndrome, foram identificadas populações clonais anormais de células T. Essas populações clonais podem ser precursores de neoplasias malignas (Simon, 1999).

O órgão afetado com mais frequência pela síndrome hipereosinofílica idiopática é o coração, com formação de trombos murais, miocardite, fibrose endocárdica e miocárdica, pericardite constritiva e endocardite fibroplástica (Brito-Babapulle, 2003). A hepatoesplenomegalia é comum. Outros sistemas podem ser envolvidos e incluem o SNC, retina, pulmões, pele, trato gastrintestinal (GI) e rins.

Existem relatos ocasionais de eosinofilia persistente em famílias na ausência de qualquer causa conhecida. Essa condição é conhecida como eosinofilia "familiar" ou "constitucional" e parece ser benigna (Naiman, 1964). A prevalência exata da eosinofilia "familiar" é desconhecida.

Basofilia

A basofilia é um aumento da contagem absoluta de basófilos acima de $0{,}2 \times 10^9$/L. As causas de basofilia estão listadas na Tabela 32.6. A basofilia reativa é um achado incomum. A basofilia é mais frequentemente observada em reações de hipersensibilidade e alérgicas, na LMC (Fig. 32.9), na metaplasia mieloide (mielopoese extramedular) e na policitemia vera (PV).

A basofilia relativa pode ser transitória após irradiação. A basofilia pode estar presente no hipotireoidismo, na anemia hemolítica crônica e após esplenectomia.

Monocitose

A monocitose é um aumento de monócitos acima do valor de referência superior, usualmente $1{,}0 \times 10^9$/L. As causas mais comuns são a recuperação da neutropenia e de infecções indolentes. As causas e associações da monocitose são apresentadas na Tabela 32.7.

A monocitose está presente durante o estágio de recuperação de infecções agudas e da agranulocitose, na qual ela é considerada um sinal favorável. A monocitose pode estar presente na endocardite bacteriana

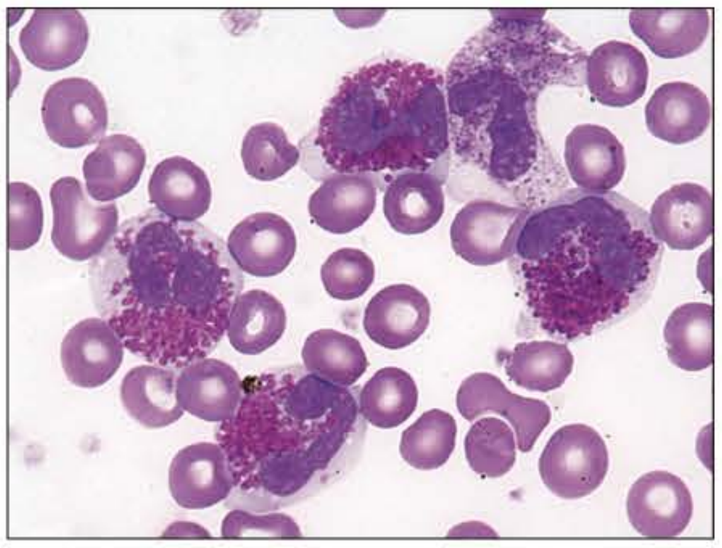


Figura 32.8 Eosinofilia acentuada de causa desconhecida, sugerindo síndrome hipereosinofílica, sangue periférico (×1.000).

Tabela 32.6 Principais causas de basofilia

Doença mieloproliferativa
Alérgicas – alimentos, fármacos, proteínas estranhas
Infecciosas – varíola, varicela
Anemia hemolítica crônica – especialmente pós-esplenectomia
Inflamatórias – doenças do colágeno vasculares, colite ulcerativa

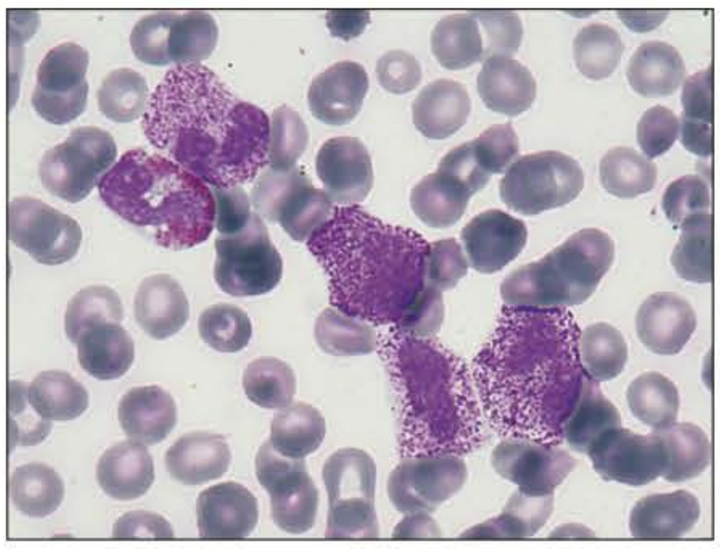


Figura 32.9 Basofilia acentuada e um eosinófilo em um paciente com positividade para cromossomo Philadelphia (×1.000). Cortesia de Robin Abaya, MD.

Tabela 32.7 Principais causas de monocitose

Infecciosas – tuberculose, endocardite bacteriana subaguda, sífilis, protozoários, riquétsias
Recuperação de pneumonia
Hematológicas – leucemias, distúrbios mieloproliferativos, linfomas, mieloma múltiplo
Inflamatórias – doenças do colágeno vasculares, colite ulcerativa crônica, espru, miosite, poliarterite, arterite temporal
Outras – tumores sólidos, púrpura trombocitopênica imune, sarcoidose

subaguda. Nessa condição, os monócitos podem apresentar fagocitose ou outras células sanguíneas, eritrócitos e leucócitos. Ela pode estar presente em infecções micóticas, por riquétsias, protozoárias e virais.

No entanto, doenças infecciosas são uma causa incomum de monocitose. Em um estudo de 160 casos sucessivos de monocitose absoluta (Maldonado, 1965), mais de metade deles (85) foram associados a uma doença hematológica, incluindo leucemias monocíticas e granulocíticas, linfoma (mais frequentemente, linfoma de Hodgkin), mieloma múltiplo e distúrbios mieloproliferativos.

Monocitopenia

A monocitopenia é uma diminuição de monócitos circulantes abaixo do valor de referência inferior de $0{,}2 \times 10^9$/L. Poucos estudos abordaram a monocitopenia, por causa (1) do grande número de células que devem ser contadas em uma contagem diferencial para a obtenção de contagens confiáveis; (2) da distorção de distribuição do esfregaço sanguíneo em cunha para monócitos, em comparação com o esfregaço de sangue feito em centrífuga; e (3) da indisponibilidade, até bem recentemente, de automação, fazendo com que grandes números de células sejam contados de forma rotineira.

Durante a terapia com prednisona, os monócitos caem durante as primeiras horas após a primeira dose, mas eles retornam a níveis acima do original em 12 horas. A monocitopenia também foi observada na leucemia de células pilosas. Ela é incomum como um achado isolado.

Distúrbios linfocíticos e plasmacíticos

Linfócitos nos indivíduos normais

Em indivíduos normais, os números absolutos de linfócitos e células T são mais altos nas crianças jovens. O percentual de linfócitos no sangue é normalmente de até 50% nos primeiros 5 anos. Durante a primeira década de vida, a contagem absoluta de linfócitos e o número absoluto de células T diminuem, mas permanecem mais altos que os observados nos adultos. Na adolescência, a contagem absoluta de linfócitos e o número de células T atingem os valores observados durante a vida adulta. O número absoluto de linfócitos B permanece estável durante todos os estágios da vida (Davey, 1977; Perkins, 2004). Na adolescência e na vida adulta, os linfócitos representam de 20 a 40% de todos os leucócitos ou 1,5–4,0 ×10 células/L.

Existe alguma discordância em relação ao número absoluto de linfócitos e o número de células T nos indivíduos idosos. Embora alguns estudos (Diaz-Jouanen, 1975) indiquem que há uma diminuição na contagem total de linfócitos e do número de células T, outros investigadores não observaram qualquer alteração significativa na contagem total de linfócitos e células T em indivíduos idosos (Davey, 1977; Weksler, 1974). A relação normal CD4/CD8 é de 1,0 a 3,4, mas foram observados valores de até 12 em condições reativas. No recém-nascido, os números totais de células T e células T CD8+ podem ser similares ou menores em comparação com os adultos, enquanto o número total de células T CD4 + pode ser similar ou menor (De Waele, 1988).

Linfocitose

A linfocitose é um aumento do número de linfócitos no sangue periférico. Os intervalos de referência são de ~ 1,5–4 $\times 10^9$/L no adulto e de ~ 1,5–8,8 $\times 10^9$/L na criança. A linfocitose relativa (aumento do percentual de linfócitos) está presente em várias condições e é especialmente proeminente em distúrbios com neutropenia. A linfocitose não é comum nas infecções bacterianas agudas, mas em geral está associada a infecções virais (EBV, hepatite) (Tab. 32.8).

Linfocitose infecciosa aguda

A linfocitose infecciosa aguda é uma condição contagiosa caracterizada por linfocitose e ocorre sobretudo em crianças. O período de incubação é de 12 a 21 dias. Estudos virais e de anticorpos indicaram uma relação entre a linfocitose infecciosa e o Coxsackie A, Coxsackie B, ecovírus e adenovírus tipo 12. Não foi observada associação com o Epstein-Barr vírus (EBV), citomegalovírus (CMV) ou herpesvírus (HPV). A doença apresenta manifestações sistêmicas variáveis, de sintomas leves e inespecíficos a outros mais acentuados, por exemplo, vômito, febre, desconforto abdominal, sinais sugestivos de envolvimento do SNC, erupções cutâneas, infecções das vias aéreas superiores e diarreia. A leucocitose (20–50 $\times 10^9$/L, ocasionalmente > 100 $\times 10^9$/L) precede as manifestações clínicas.

Na leucocitose infecciosa aguda, 60 a 95% dos leucócitos no sangue são pequenos linfócitos maduros e provavelmente originários de células T (Cassuto, 1977). Em contraste com a MI, linfócitos atípicos são incomuns. Com frequência existe eosinofilia. A linfocitose em geral dura de 3 a 5 semanas, algumas vezes um pouco mais. Outras alterações sanguíneas são incomuns. A medula óssea não apresenta alterações características. Um aumento do percentual de linfócitos foi observado, mas ele é provavelmente um artefato resultante da mistura de sangue periférico. A linfadenomegalia é rara e mínima quando presente. O aumento do fígado e do baço ocorre em raros casos. A biópsia de linfonodo pode revelar hiperplasia folicular reativa, mas sem alterações características. Em alguns casos, houve um aumento de leucócitos no LCE com aproximadamente 40% de linfócitos.

Também existe uma forma crônica da linfocitose infecciosa em crianças. A contagem de leucócitos é de 10–25 $\times 10^9$/L com 60 a 80% de linfócitos com aspecto normal. Eosinofilia, monocitose e plasmacitose discretas também estão presentes. Como regra, as crianças

Tabela 32.8 Principais causas de linfocitose

Infecciosas – muitas infecções virais, coqueluche, tuberculose, toxoplasmose, riquétsias
Inflamatórias crônicas – colite ulcerativa, doença de Crohn
Mediação imune – sensibilidade a fármacos, vasculite, rejeição de enxerto, doença de Graves, síndrome de Sjögren
Hematológicas – LLA, LLC, linfoma
Estresse – agudo, transitório

apresentam aumento das tonsilas, linfonodos e baço e uma história de infecções recorrentes das vias aéreas superiores. A medula óssea não apresenta anormalidades.

Coqueluche

A coqueluche, embora sua incidência tenha sido reduzida por causa da vacinação de rotina, ainda ocorre em crianças não imunizadas e é mais grave em lactentes. Também ocorre em adultos com imunidade reduzida desde a vacinação infantil. O agente etiológico é a Bordetella pertussis, um agente altamente infeccioso. Ele produz uma reação inflamatória de todo o trato respiratório. O período de incubação é de cerca de 6 a 20 dias, e os primeiros sintomas são os mesmos de um resfriado. Posteriormente, o paciente apresenta episódios paroxísticos de tosse produtiva com escarro espesso. Em geral, os episódios paroxísticos terminam com um som "seco", em decorrência da inspiração profunda. Com frequência, o paciente sente dor na região da traqueia e dos brônquios. Comumente, a doença dura 6 a 12 semanas.

Geralmente, os pacientes apresentam uma linfocitose importante com contagens superiores a 30×10^9/L. Os linfócitos são células T maduras pequenas com uma relação CD4/CD8 normal (Hudnall, 2000). A contagem de linfócitos é mais alta durante as 3 primeiras semanas da doença e, em seguida, diminui durante a quarta semana e as semanas subsequentes (Lagergren, 1963). A linfocitose se deve, pelo menos em parte, à liberação do fator promotor da linfocitose (LPF, lymphocytosis-promoting factor) ou da toxina pertussis do organismo. Esse(s) fator(es) pode(m) causar um aumento transitório da mobilização dos linfócitos dos órgãos linfóides, seguida pela inibição da recirculação de linfócitos do sangue para a circulação linfática. Portanto, a linfocitose é devida a uma redistribuição de linfócitos na circulação periférica sem aumento da linfopoese (Rai, 1971; Spangrude, 1985). No nível molecular, essa linfocitose absoluta parece ser devida, pelo menos em parte, à ausência de L-selectina em muitos linfócitos circulantes (Hudnall, 2000). Isso parece ser razoável uma vez que a L-selectina é um receptor de adesão endotelial e de *homing* nos linfonodos, e uma ausência dessa molécula de superfície essencialmente impediria que linfócitos circulantes encontrassem sua "casa" na maioria dos linfonodos. Eles permaneceriam na circulação por mais tempo e causariam um aumento do número (linfocitose) no sangue. O mecanismo exato da perda de L-selectina da superfície celular do linfócito não é conhecido até o momento.

Linfocitose crônica/linfocitose policlonal persistente de células B

A linfocitose reativa persistente é um evento incomum em adultos, e uma linfocitose significativa deve levantar a suspeita de doença neoplásica (p. ex., leucemia linfocítica crônica). A coexistência de neutropenia ou síndrome de Felty clássica sugere a leucemia de linfócitos granulosos grandes (LGL, large lymphocyte granular). Frequentemente, a biópsia de tecido e/ou a imunofenotipagem do sangue periférico indicará uma doença específica ou um diagnóstico. No entanto, a mononucleose ou linfocitose devida a outros vírus às vezes se manifesta em um período mais tardio da vida.

Uma condição rara, a linfocitose policlonal persistente, foi relatada em adultos, predominante em mulheres tabagistas, e em indivíduos esplenectomizados (Himmelmann, 2001). A linfocitose policlonal persistente de células B parece ser uma proliferação policlonal de células B benigna, apresentando linfócitos binucleados atípicos no sangue periférico. A IgM sérica policlonal em geral está elevada. A maioria (65–85% *vs.* 15–20% em indivíduos normais) das células B no sangue periférico parece ser células B de memória IgM+/IgD+/CD27+ (Loembe, 2002). Em alguns casos, foram observados rearranjos do gene bcl/2/Ig (LF com t(14;18) comumente associada) (Delage, 1997). Embora a sua causa seja desconhecida, a desregulação da apoptose mediada por Fas e as vias de sobrevivência do CD40 parecem estar envolvidas (Loembe, 2001; Roussel, 2003).

Doenças e condições associadas a retrovírus

O vírus T linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1), descoberto em 1980 por Poiesz e Gallo, é um retrovírus associado à leucemia/linfoma de células T (Poiez, 1980). Ele é endêmico em áreas do Japão, na bacia caribenha e no sudeste dos Estados Unidos. O HTLV-2, um segundo retrovírus humano, foi observado em um paciente com leucemia de células pilosas (Kalyanaraman, 1982). Um terceiro retrovírus humano, o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) foi reconhecido e confirmado como a causa da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS – analisada adiante) nos 2 anos seguintes. Posteriormente, em 1985, um segundo tipo distinto do vírus da imunodeficiência humana (HIV-2) foi identificado.

O HIV-1 infecta monócitos/macrófagos e células T (células essenciais para a função normal do sistema imune), utilizando receptores de quimiocina da superfície celular (CCR5 nas primeiras células e CXCR4 nas últimas). A infecção acaba provocando uma perda progressiva de linfócitos CD4+, altera a função imune normal e produz imunodeficiência e doença. A doença inclui não só muitos tipos diferentes de infecções, mas também um maior número de doenças neoplásicas, incluindo linfomas. Atualmente, parece que o HIV-1 tem um papel indireto (pela desregulação imune e não da indução direta) no desenvolvimento desses linfomas (Knowles, 2003). O HTLV-1 e o HTLV-2 também infectam e transformam células T: principalmente células CD4+ com HTLV-1 e células CD8+ com HTLV-2. O HTLV-1 imortaliza linfoblastos CD4+ em alguns pacientes, produzindo leucemia de células T do adulto. Embora o HTLV-2 tenha sido originalmente identificado em um paciente com leucemia de células pilosas, não existe hoje uma ligação entre a infecção pelo HTLV-2 e a doença humana.

Até o momento foram relatados vários casos de uma linfocitose transitória de células T em pacientes infectados pelo HTLV-1 (Kinoshita, 1985; Ehrlich, 1988). Na maioria dos pacientes, o distúrbio é caracterizado por poucos sintomas clínicos, incluindo febre, linfadenopatia limitada e erupção cutânea ocasional. A contagem de linfócitos no sangue periférico costuma ser inferior a 20×10^9/L. No entanto, de 10 a 40% desses linfócitos são formas imaturas. Na maioria desses casos, a linfocitose é monoclonal e, como consequência, leucêmica. Embora alguns pacientes com essa infecção evoluam para a leucemia de células T do adulto, a maioria (90 a 95%) dos pacientes com anticorpos anti-HTLV-1 é assintomática. Embora a maioria dos indivíduos apresentem apenas uma síndrome tipo viral, outros manifestam uma leucemia progressiva crônica, e outros desenvolvem paraparesia tropical espástica (Davey, 1991). A leucemia de células T do adulto tipicamente manifesta-se décadas após a infecção inicial e, por essa razão, costuma ser observada em pacientes mais velhos.

Mononucleose infecciosa (MI) e infecção pelo vírus de Epstein-Baar (EBV)

A MI é geralmente uma doença infecciosa autolimitada caracterizada por odinofagia, mal-estar prolongado, linfocitose atípica com presença de linfócitos grandes transformados (Fig. 32.10), linfadenopatia (mais frequentemente cervical posterior) e, com frequência, esplenomegalia. Em pacientes imunocomprometidos, o EBV está associado a uma hiperplasia benigna de células B, linfoma maligno e doença linfoproliferativa pós-transplante (Thompson, 2004; Hess, 2004).

Etiologia e fisiopatologia. A MI é um distúrbio secundário a uma infecção pelo EBV (herpesvírus humano 4). Quando a infecção primária ocorre em indivíduos saudáveis durante o início da infância, a doença frequentemente passa despercebida. Entretanto, quando envolve adolescentes ou adultos saudáveis, o distúrbio resultante é a síndrome da MI. Na maioria dos casos, o vírus entra no organismo através dos tecidos epiteliais e linfoides orofaríngeos. O vírus infecta ambos

Figura 32.10 Mononucleose infecciosa, mostrando uma célula linfoide grande ativada no sangue (×1.000).

os tecidos e liga-se aos receptores do complemento C3d (CD21) nas células linfoides B e entra nas células. O EBV estimula então a síntese de DNA nessas células B e induz a formação de vários novos antígenos, incluindo o antígeno do capsídeo viral (VCA, viral capsid antigen), antígeno de membrana (MA, membrane antigen), antígeno precoce (EA, *early antigen*) e subtipos difuso (EA-D, *both diffuse*) e restrito (EA-R, *restricted*), antígenos nucleares do Epstein-Baar (EBNA, Epstein-Baar *nuclear antigen*) e o antígeno de membrana detectado pelo linfócito (LYDMA, lymphocyte-detected membrane antigen) (Harrington, 1988). Portanto, a fase inicial dessa doença é caracterizada por uma infecção de células B que proliferam, desenvolvem neoantígenos, circulam, estimulam uma resposta imune e sintetizam imunoglobulinas (Sixbey, 1984). O VCA, o EA e o EBNA são as proteínas virais mais importantes para o diagnóstico sorológico em pacientes imunocompetentes (ver Hess, 2004). As características clínicas e laboratoriais são apresentadas na Tabela 32.9.

Tipicamente, a resposta imune humoral é caracterizada pela elevação dos títulos de IgG e IgM (anticorpos anticapsídeo viral) durante os períodos de incubação e prodrômico. O título de anticorpo anticapsídeo viral IgM começa a diminuir durante a segunda e terceira semanas de doença e, a seguir, diminui até níveis indetectáveis nos meses seguintes. O anticorpo anticapsídeo viral IgG diminui durante a convalescença, porém permanece detectável durante toda a vida. Cerca de 2 a 3 semanas após o início da doença, aparecem os anticorpos do vírus Epstein-Barr contra os antígenos precoces e, em seguida, diminuem ao longo dos 2 meses seguintes. O título de anticorpo do antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr aumenta durante a última parte da convalescença e aparentemente é detectável ao longo da vida.

A resposta imune celular na MI é caracterizada por uma proliferação e ativação de células T, usualmente durante a segunda semana de doença em resposta à infecção e à ativação de células B induzida pelo EBV. Como essas células T ativadas são majoritariamente da população de células citotóxicas/supressoras, ocorre uma supressão e uma destruição acentuadas de células B infectadas pelo EBV. De fato, a maioria dos linfócitos atípicos observados no sangue periférico de pacientes com MI durante a segunda semana de doença possui o antígeno CD8. Essas células T citotóxicas/supressoras matam células B infectadas e diminuem a produção de anticorpo policlonal induzida pelo EBV. Além das células T citotóxicas, a atividade das células NK tem um profundo efeito sobre a limitação da proliferação de células B infectadas pelo EBV em pacientes com MI (Purtilo, 1981). Também é provável que células B infectadas pelo EBV sejam destruídas, pelo menos parcialmente, pelo mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo, um processo que exige a presença de células citotóxicas e anticorpos. Esse processo de proliferação de células B seguido por efeitos inibidores e destrutivos da produção de anticorpos anti-EBV, assim como os efeitos citotóxicos de células T e NK, ocorre no sangue periférico, na medula óssea, nos tecidos linfoides e, talvez em um grau limitado, em todos os tecidos do corpo do paciente.

Em conclusão, a maioria dos indivíduos imunocompetentes apresenta evidência sorológica de infecção anterior por EBV (a infecção ocorre em mais de 90% dos adultos normais no mundo inteiro). O EBV tem a capacidade não só de infectar células (muitas das quais são destruídas por um sistema imune intacto), mas também de produzir uma infecção residual nas células B de memória em repouso e, em alguns casos, produzir transformação de linfócitos em linfoma maligno (Kuppers, 2003; Thorley-Lawson, 2004). Entretanto, a maioria dos indivíduos com infecção latente não apresenta manifestações da doença durante a vida.

As células B de memória em repouso podem atuar como um reservatório de EBV, uma vez que antígenos virais (facilmente reconhecidos por um sistema imune intacto) não são expressos na superfície do linfócito. Nesse modelo de infecção pelo EBV, mecanismos de persistência e transformação viral parecem ser dependentes da interação entre o estágio de maturação dos linfócitos infectados e a expressão genética de diferentes grupos (ou "programas") de proteínas virais nos linfócitos infectados (Kuppers, 2003; Thorley-Lawson, 2004). Além disso, diferentes tipos de tumores associados ao EBV (p. ex., linfoma de Burkitt [LB], carcinoma nasofaríngeo, doença linfoproliferativa de células B ou doença linfoproliferativa pós-transplante em indivíduos imunocomprometidos e linfoma de Hodgkin) também parecem apresentar diferentes grupos de expressão proteica viral (Wong, 2002).

Tabela 32.9 Resumo das características da MI em pacientes imunocompetentes

Fisiopatologia
Vírus de Epstein-Barr (HHV-4)
O vírus entra pelas células epiteliais e linfoides da orofaringe
O vírus liga-se ao CD21 em células B
Antígenos virais – antígeno do capsídeo viral (VCA), antígeno precoce, antígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA) – são produzidos e provocam produção de anticorpos
Resposta imune humoral
IgM contra VCA surge durante a incubação e o pródromo, cai ao longo de algumas semanas ou meses
IgG contra VCA surge durante a incubação, diminui durante a convalescença, permanecendo detectável por toda a vida
Anticorpos contra antígeno precoce surgem 2 a 3 semanas após o início da doença e caem a seguir
Anticorpos contra EBNA surgem durante a convalescença e permanecem detectáveis por toda a vida
Resposta imune celular
Células T ativadas durante a segunda semana da doença
Células T citotóxicas CD8+ matam células B infectadas
Células NK destroem células B infectadas
Algumas células B de memória em repouso permanecem latentemente infectadas
Características clínicas
Período de incubação de 2 a 5 semanas
Início vago dos sintomas
Febre, faringite, linfadenopatia
Adolescentes e adultos jovens costumam ser mais sintomáticos que crianças mais jovens
Características laboratoriais
Leucocitose com linfocitose absoluta e linfócitos atípicos
Monocitose transitória
Neutropenia relativa e absoluta precoce
Trombocitopenia leve em metade dos casos
Anemia hemolítica em 1 a 3% dos casos, frequentemente com especificidade anti-I
Aumento de transaminases em 85 a 100% dos casos, mas a icterícia clínica é rara
O *spot test* é simples, rápido e específico. Ele é baseado na aglutinação de eritrócitos de cavalo
O teste de anticorpo heterófilo é baseado na absorção diferenciada de AH MI-específico pelo estroma de eritrócitos do boi e rim de cobaia

Características clínicas. A MI foi observada em pacientes de 3 meses a 70 anos de idade, mas ela é mais comum em adolescentes e adultos jovens. Ocorre um período de incubação de 2 a 5 semanas antes da manifestação dos sintomas. O início é vago, indefinido e similar ao início de outras doenças infecciosas. Usualmente, os pacientes apresentam febre, odinofagia com faringite ulcerativa e linfadenopatia.

Complicações. Das raras anemias associadas à MI, a anemia hemolítica é a mais comum, ocorrendo em 1 a 3% dos casos. Hoje em dia, a causa parece estar relacionada ao anticorpo anti-I produzido frequentemente nessa doença.

A trombocitopenia leve ocorre em cerca da metade dos casos, mas a contagem de plaquetas poucas vezes é inferior a 100×10^9/L. A púrpura trombocitopênica com complicações hemorrágicas é extremamente rara. A ruptura esplênica também pode ocorrer. Em raros casos ocorrem neutropenia, pancitopenia e síndrome hemofagocitária, podendo ser fatal (Mroczek, 1987). Duas condições raras decorrentes da infecção pelo EBV em indivíduos saudáveis são a infecção crônica ativa pelo EBV e a síndrome hemofagocitária pelo EBV. Ambas as condições apresentam uma alta morbidade e mortalidade e parecem estar relacionadas à infecção ectópica pelo EBV em células T e células NK, em contraste com a infecção usual de células B que comumente ocorre na MI (Kasahara, 2002).

Entre 85 e 100% dos pacientes com mononucleosa infecciosa apresentam provas da função hepática anormais indicativas de hepatite. A

icterícia clínica é rara, mas foram relatados casos nos quais a icterícia e a faringite aguda eram as únicas manifestações clínicas de MI, com achados hematológicos e sorológicos positivos. Embora incomuns, complicações também podem envolver o sistema nervoso, coração, rins e pulmões.

Aproximadamente 1/3 dos pacientes com MI são portadores de estreptococos β-hemolítico na faringe. Por essa razão, é preciso prestar atenção aos critérios clínicos, hematológicos e sorológicos na diferenciação entre a MI e a faringite estreptocócica.

Características hematológicas. Os leucócitos estão aumentados, usualmente variando de 10 a 25 $\times 10^9$/L. Em raros casos, contagens elevadas, de até 80×10^9/L, foram relatadas. A leucocitose em geral é devida à linfocitose (60 a 90%) composta por uma variedade de linfócitos atípicos. Como regra, a contagem total de leucócitos retorna ao normal em 3 semanas. Os linfócitos atípicos apresentam alterações nucleares e um aumento da quantidade de citoplasma e basofilia.

Os linfócitos incluem linfócitos "monocitoides" que provavelmente correspondem a imunoblastos nos linfonodos (Fig. 32.10). Outros linfócitos atípicos, os quais são mais numerosos, incluem linfócitos plasmacitoides e linfócitos com núcleos pequenos e citoplasma abundante.

Com frequência, o número de monócitos aumenta de forma transitória. O termo "mononucleose" refere-se a um aumento de linfócitos e não de monócitos.

As alterações citológicas não são patognomômicas de MI. Células similares são encontradas em vários distúrbios, incluindo a mononucleose por CMV, a toxoplasmose, a hepatite infecciosa e, em um menor grau, a pneumonia viral, a varicela, a parotidite e exantemas virais da infância.

Na maioria dos casos, há uma diminuição relativa e absoluta de neutrófilos durante as primeiras semanas da doença. Durante esse período, pode haver um desvio para a esquerda, com um aumento de bastonetes e metamielócitos. Grânulos tóxicos e corpúsculos de Döhle podem ser observados. Os eosinófilos encontram-se dentro dos limites normais.

A medula óssea de pacientes com MI usualmente apresenta aumento da celularidade. Ocorre aumento do número de linfócitos, macrófagos, plasmócitos, megacariócitos e células eritroides. A série neutrofílica parece estar diminuída. Aproximadamente 50% dos casos parecem apresentar coleções de células mononucleares, formando granulomas frouxos.

Achados sorológicos em pacientes imunocompetentes

Anticorpo heterófilo. Paul (1932) descreveu pela primeira vez a presença de aglutininas de célula de carneiro no soro de pacientes com MI. Contudo, elas não são específicas para a MI e podem estar presentes em outros distúrbios.

Davidsohn (1937) demonstrou que os anticorpos heterófilos em pacientes com MI são absorvidos por eritrócitos de boi, em contraste com os anticorpos heterófilos presentes em outros distúrbios. Estes últimos são absorvidos pelo antígeno de Forssmann, como o encontrado no rim de cobaia. O teste de absorção diferencial (teste de Paul-Bunnell-Davidsohn) é altamente específico para a MI (Davidsohn, 1969).

O teste do spot (*monospot*) para MI (Lee, 1968) baseia-se no princípio de que eritrócitos de cavalo são mais sensíveis que os de carneiro para uso no teste de detecção da MI. Um teste positivo para MI apresenta aglutinação de eritrócitos de cavalo pelo soro absorvido com rim de cobaia, mas não pelo soro absorvido com estroma de eritrócitos de boi. O teste do spot demonstrou ser simples, rápido, altamente específico e sensível para anticorpos heterófilos da MI. Resultados falso-positivos ocorrem, mas são muito raros. O teste do spot ainda é utilizado, assim como outros imunoensaios e testes de detecção de anticorpos heterófilos baseados no látex que apresentam desempenho similar (Rogers, 1999). Resultados falso-negativos ocorrem particularmente com amostras provenientes de crianças pequenas que produzem anticorpos heterófilos (IgM) em quantidades limitadas. Na mononucleose com resultado negativo para anticorpos heterófilos, o diagnóstico pode ser confirmado pela pesquisa de anticorpo anti-EBV.

Como previamente mencionado, vários anticorpos são produzidos pelo hospedeiro em resposta a uma variedade de antígenos do EBV (ver Tab. 32.9). O anticorpo anti-VCA aparece nas primeiras 2 semanas de infecção. Esse anticorpo, que pode ser mensurado pelo método de imunofluorescência, é utilizado para determinar a exposição ao EBV. A pesquisa de anticorpos anti-EBV usualmente é limitada aos poucos casos de mononucleose heterófilo-negativa.

Além de anticorpos heterófilos e anti-EBV, pacientes com MI frequentemente produzem anticorpos contra uma ampla variedade de antígenos. Anticorpos contra eritrócitos, leucócitos e plaquetas humanos foram descritos. Pacientes com MI apresentam um aumento da frequência de aglutininas frias. Resultados positivos para fator reumatoide e fator antinuclear foram relatados.

Em pacientes imunocomprometidos, os testes sorológicos são de pouca utilidade e os métodos de detecção direta são considerados mais confiáveis. A determinação da carga viral do EBV pela reação de cadeia de polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) parece, no momento, ser um dos melhores testes para essa população de pacientes (Hess, 2004).

Diagnóstico diferencial. As características clínicas, hematológicas e sorológicas da MI permitem que um diagnóstico acurado seja estabelecido em mais de 90% dos casos. Quando o teste de anticorpo heterófilo for negativo, é preciso considerar várias possibilidades. O paciente poderia ainda apresentar MI com resultado positivo para anticorpo anti-EBV, porém, com resultado negativo na pesquisa de anticorpo heterófilo. Entretanto, a infecção por CMV é a causa mais comum de mononucleose heterófilo-negativa. Outras possibilidades incluem a toxoplasmose, hepatite infecciosa, herpevírus humano 6, vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 e ingestão de fármacos (ácido p-aminosalicílico, fenitoína [Dilantin] e diaminodifenilsulfona) (ver Tsaparas, 2000; e Taylor, 2003).

Evolução. A MI clássica é um distúrbio benigno, e ocorrem complicações em menos de 5% dos pacientes. Em geral, o distúrbio é solucionado em 3 a 4 semanas. Óbitos são extremamente raros, mas tendem a ocorrer em membros da mesma família (Purtilo, 1979). Estudos adicionais indicam que os indivíduos afetados costumam sofrer de uma doença linfoproliferativa ligada ao X. Esse grupo de indivíduos imunodeprimidos apresenta uma forma familiar rara e fatal de imunodeficiência combinada, aparentemente envolvendo tanto células B quanto células T. Todos os pacientes não tratados morrem com cerca de 40 anos de idade. A infecção pelo EBV pode causar qualquer uma das três complicações graves da doença linfoproliferativa ligada ao X: MI fulminante, doenças linfoproliferativas potencialmente fatais e linfoma de células B, e disgamaglobulinemia. Embora classicamente associada à infecção pelo EBV, a doença linfoproliferativa ligada ao X pode ocorrer em pacientes soronegativos para o EBV. Essa doença foi mapeada no cromossomo humano Xq24-25, o qual codifica um receptor da superfície celular presente nas células T e NK, mas não nas células B. Acredita-se que uma resposta citotóxica descontrolada das células T seja a responsável pela necrose hepática e pela insuficiência medular, podendo levar à morte (Thompson, 2004). Além da doença linfoproliferativa ligada ao X, distúrbios linfoproliferativos associados ao EBV podem ocorrer em indivíduos com imunodeficiências congênitas ou adquiridas.

Infecção pelo citomegalovírus

Alguns indivíduos infectados pelo CMV desenvolvem uma síndrome similar à MI. Esse distúrbio pode ocorrer após uma transfusão sanguínea maciça (mononucleose pós-transfusional) ou, de maneira espontânea, em indivíduos previamente saudáveis (citomegalovírus, mononucleose). O paciente apresenta febre, calafrios, mal-estar profundo e mialgia. Ele pode apresentar odinofagia (mas não faringite exsudativa) e linfadenopatia. Às vezes, observa-se esplenomegalia, mas não hepatomegalia. Em pacientes imunocomprometidos, estão envolvidos os sistemas SNC, TGI e sistema respiratório, embora a doença possa ser observada em praticamente qualquer sistema.

A leucocitose é característica com linfocitose absoluta. Usualmente, 20% ou mais dos leucócitos são linfócitos atípicos. Aspirados de medula óssea revelam um aumento do número de linfócitos normais e atípicos. Resultados alterados das provas da função hepática são os achados laboratoriais anormais mais frequentes (Wreghitt, 2003). Em um pequeno percentual de pacientes, pode haver um aumento do título de aglutininas frias, fator reumatoide e anticorpos antinucleares. Não ocorre elevação de anticorpo heterófilo, anticorpo anti-EBV ou anti-Toxoplasma gondii. O diagnóstico geralmente é estabelecido pelo isolamento do citomegalovírus na urina, saliva, sangue ou biópsia de tecido, ou pela sorologia.

Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii*, um protozoário parasita, pode produzir, tanto em jovens quanto em adultos, uma doença (toxoplasmose) similar à MI. O diagnóstico é crítico em fetos e recém-nascidos infectados congenitamente, mulheres infectadas durante a gestação, pacientes imunocomprometidos e pacientes com coriorretinite (Remington, 2004).

Somente uma pequena proporção (~ 10%) dos indivíduos imunocompetentes é sintomática. Esses pacientes costumam apresentar linfadenopatia, geralmente cervical. Alguns pacientes também podem apresentar febre, cefaleia, odinofagia, hepatoesplenomegalia, coriorretinite e um aumento do número de linfócitos atípicos no sangue periférico. Em pacientes imunocomprometidos, a doença comumente envolve o SNC e os olhos, mas também pode envolver os pulmões e o coração.

A histopatologia dos linfonodos em geral é característica, com histiócitos epitelioides esparsos que frequentemente obscurecem o centro germinativo/borda da zona do manto e com hiperplasia de células B monocitóides nos seios (Fig. 32.11). A morfologia está intimamente correlacionada com a elevação do título de anticorpo antitoxoplasma (Dorfman, 1973). Amostras de medula óssea não apresentam lesão específica.

O diagnóstico é estabelecido pela demonstração de uma elevação do título de anticorpos antitoxoplasma em pacientes imunocompetentes. Em pacientes imunocomprometidos, os exames sorológicos não são sensíveis, e a detecção direta do microrganismo no sangue, líquidos corporais ou tecido é necessária para o diagnóstico definitivo.

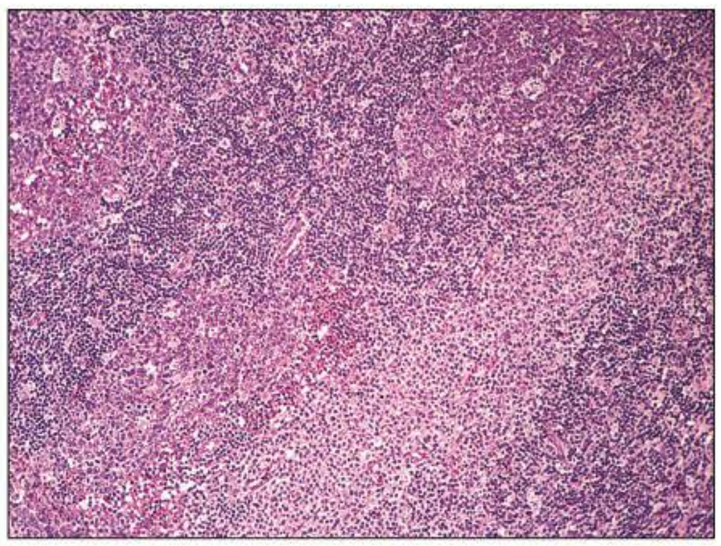


Figura 32.11 Linfadenite na toxoplasmose apresentando hiperplasia folicular com hiperplasia de células B monocitoides (inferior à direita – centro) e histiócitos isolados e agregados esparsos, frequentemente invadindo a borda do centro germinativo/zona do manto (×200).

Linfocitopenia

A linfocitopenia está presente quando a contagem absoluta de linfócitos for inferior a ~ $1{,}0 \times 10^9$/L em adultos e inferior a ~ $2{,}0 \times 10^9$/L em crianças. Em geral, aproximadamente 80% dos linfócitos do sangue periférico são células T CD3+, e a maioria dessas células (~ 65%) é de células T auxiliares CD4+. Um número de distúrbios por deficiência imunológica geneticamente determinada apresenta linfocitopenia com vários outros defeitos da imunidade humoral ou da imunidade mediada por células. A linfocitopenia nesses distúrbios é devida à diminuição da linfopoese. O aumento dos níveis dos hormônios adrenocorticais, a administração de quimioterápicos ou a irradiação causam linfocitopenia. A diminuição da drenagem dos linfáticos intestinais com perda de linfócitos nos intestinos devidos a várias causas foi implicada como um mecanismo de linfocitopenia. Em casos avançados de linfomas não Hodgkin e linfomas de Hodgkin, assim como em casos terminais de carcinomas, a linfocitopenia é observada com frequência. As causas e condições associadas à linfocitopenia incluem as apresentadas na Tabela 32.10.

Tabela 32.10 Principais causas de linfopenia

Destrutivas	radiação, quimioterapia, corticosteroides
Debilitantes	privação alimentar, anemia aplástica, câncer terminal, doença do colágeno vascular, insuficiência renal
Infecciosas	hepatite viral, *influenza*, febre tifoide, tuberculose
Associadas à AIDS	efeito citopático do HIV, desequilíbrio nutricional, efeito medicamentoso
Imunodeficiência congênita	síndrome de Wiskott-Aldrich
Circulação linfática anormal	linfangiectasia intestinal, obstrução, drenagem/ruptura do ducto torácico, insuficiência cardíaca congestiva

Síndrome da imunodeficiência adquirida

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é, em geral, um distúrbio infeccioso progressivamente fatal com anormalidades clínicas, hematológicas e sorológicas características.

Etiologia. A AIDS é um distúrbio secundário a uma infecção pelos vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2), os quais são RNA retrovírus (i. e., contêm RNA) que são citotrópicos para células T CD4+ e macrófagos. A entrada do vírus na célula não ocorre apenas pela interação com o receptor CD4. Além disso, a expressão de correceptores de quimiocinas é essencial para a entrada do vírus nas células e também determina o tropismo pela célula-alvo (Starr-Spires, 2002). Outros tipos celulares, por exemplo, monócitos, macrófagos e células microgliais do SNC, também expressam de modo concomitante esses receptores e podem suportar a replicação viral. O HIV é responsável tanto pela morte direta de células infectadas quanto pela morte indireta de células vizinhas, utilizando mecanismos de destruição celular dependentes e independentes da apoptose (Badley, 2003).

A infecção pelo HIV é disseminada pela contaminação por secreções, excreções, sangue e tecidos que contêm o vírus. Por causa do efeito citotrópico dos vírus da AIDS pelas células CD4+, ocorre uma diminuição acentuada do número de células T auxiliares e um desequilíbrio entre células T supressoras/citotóxicas no sangue e nos tecidos linfoides do corpo. Como resultado, ocorre uma profunda depressão imune celular caracterizada por infecções por vários microrganismos oportunistas. Inicialmente, as células B não são envolvidas, e os níveis de imunoglobulinas são normais ou aumentados. Entretanto, à medida que a doença progride, há um aumento da frequência de processos malignos nesses pacientes. Os cânceres associados à AIDS incluem o sarcoma de Kaposi, linfomas não Hodgkin e câncer de colo do útero (todos cânceres que definem a AIDS), assim como linfoma de Hodgkin e cânceres anogenitais (Mbulaiteye, 2003; Bellan, 2003). Embora a etiologia desses processos malignos seja indubitavelmente multifatorial, estudos recentes sugerem que o HIV pode possuir um potencial oncogênico (De Falco, 2003; Lazzi, 2002). Além disso, a função dos monócitos e das células NK é anormal.

Características hematológicas. A anormalidade hematológica mais comum em pacientes com AIDS é a anemia de doenças crônicas e a linfocitopenia (80 a 85% dos casos), em particular do subgrupo T auxiliar/indutor (CD4). A trombocitopenia ocorre em cerca de 30% dos casos, e a neutropenia, em 40%, frequentemente com um desvio para a esquerda. A trombocitopenia em geral é decorrente da mediação imune (Hoxie, 1995).

A esfregaço de sangue periférico costuma apresentar linfócitos atípicos que apresentam um aspecto plasmacitoide. Monócitos são frequentemente grandes com uma cromatina nuclear fina e vacúolos citoplasmáticos. Anemia devida à mediação imune, trombocitopenia e neutropenia também foram descritas na AIDS.

A medula óssea usualmente é normocelular ou hipercelular (Castella, 1985). Com frequência, ocorre aumento do número de células mieloides precursoras imaturas, macrófagos carregados de ferro e plasmócitos. São observados defeitos envolvendo células progenitoras da medula óssea, tais como células das unidades formadoras de colônias de granulócitos-monócitos (CFU-GM, colony-forming unit-granulocyte-monocyte); células-tronco pluripotentes das unidades formadoras de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (CFU-GEMM, colony-forming unit-granulocyte, erytrhrocyte, monocyte, megakaryocyte pluripotential temm cell); células das unidades formadoras de colônias de megacariócitos (CFU-MK, colony-forming unit-megakaryocyte); e células das unidades formadoras de explosão eritroide (BFU-E, burst-forming unit-erythrocyte). Diversos fármacos utilizados para tratar pacientes com AIDS e as complicações infecciosas dessa condição também são mielossupressores. É importante lembrar que a supressão da medula óssea é, em muitos pacientes, multifatorial, resultando de uma interação do efeito citopático direto do HIV, da desregulação do sistema imune e da apoptose, possivelmente complicando a infecção e/ou o desequilíbrio nutricional,

e do efeito do fármaco. Do ponto de vista clinico, a informação mais valiosa da biópsia de medula óssea é usualmente a identificação de infecção ou de processo maligno na medula.

Distúrbios funcionais dos linfócitos

Distúrbios funcionais dos linfócitos podem ser herdados ou adquiridos. A imunodeficiência pode ser devida a um distúrbio da maturação ou da função dos monócitos e de células que apresentam antígenos, células B, células T, células-tronco, células supressoras ou uma combinação delas. Elas podem causar defeitos de produção de anticorpos ou uma combinação de defeitos de produção de anticorpos e de defeitos funcionais das células T. Distúrbios adquiridos podem ser devidos à má nutrição, infecção ou processo maligno, assim como a qualquer agressão que pode perturbar de maneira significativa a regulação imune e a comunicação celular. Anormalidades funcionais adquiridas dos linfócitos são frequentemente observadas em processos malignos linfoides. Por exemplo, a diminuição da função das células B é observada na leucemia linfocítica crônica, na qual 2/3 dos pacientes apresentam hipogamaglobulinemia. No mieloma múltiplo, ocorre uma diminuição da síntese de imunoglobulinas normais em presença de altos níveis de paraproteína.

A diminuição da atividade das células T foi descrita em pacientes com linfoma de Hodgkin, sarcoidose e hanseníase. No linfoma de Hodgkin, a diminuição da atividade das células T pode ser o resultado dos efeitos supressores dos monócitos. Em doenças autoimunes, uma perda de células T supressoras foi observada.

Na desnutrição grave e em pacientes com processos malignos em fase terminal, ocorre uma diminuição da imunidade (humoral e mediada por célula).

O diagnóstico de distúrbios funcionais dos linfócitos requer o uso de testes cutâneos, contagem de células B e T e seus subgrupos, dosagem de imunoglobulinas e anticorpos séricos. Podem ser necessários vários ensaios in vitro com linfócitos para registrar a sua resposta a mitógenos e antígenos, incluindo os métodos citogenético e de hibridização fluorescente in situ (FISH, fluorescent in situ hybridization), citometria de fluxo e PCR, para o estabelecimento do diagnóstico definitivo. A obtenção de uma história e de um exame físico detalhados sempre deve preceder a realização de qualquer teste. É provavelmente melhor começar uma investigação com exames menos onerosos e facilmente obteníveis.

Plasmacitose

Normalmente, não existem plasmócitos no sangue circulante. O número de plasmócitos aumenta em várias infecções crônicas, condições alérgicas, presença de neoplasias e outras condições, nas quais a concentração sérica de γ-globulina está elevada. A presença de plasmócitos também foi detectada no sangue de pacientes com distúrbios virais, incluindo rubéola, sarampo, catapora e caxumba. A concentração dessas células está moderadamente aumentada em quadros de exantemas cutâneos, MI, sífilis, endocardite bacteriana subaguda, sarcoidose e doenças do colágeno. Em raros casos, indivíduos com sepse bacteriana podem apresentar uma plasmacitose periférica simulando uma leucemia de plasmócitos (Shtalrid, 2003). O aumento usualmente está ligado a um aumento de linfócitos, monócitos e eosinófilos. As causas e condições associadas à plasmacitose são apresentadas na Tabela 32.11.

Na medula óssea dos adultos, a média de plasmócitos é de 1 a 2%. Todo aumento superior a 4% é significativo. Nas crianças, são observados valores mais baixos. O aumento de até 20% do número de plasmócitos pode ser observado em várias condições além do mieloma múltiplo, incluindo carcinoma metastático, infecções granulomatosas crônicas, condições ligadas à hipersensibilidade e após a administração de fármacos citotóxicos. Frequentemente, o número de plasmócitos está aumentado na anemia aplástica, mas é provável que este seja apenas de um aumento relativo. Por outro lado, estas células estão diminuídas ou ausentes na agamaglobulinemia.

Tabela 32.11 Principais causas de plasmocitose

Virais – MI, sarampo, rubéola, HIV

Bacterianas – tuberculose, sífilis, estreptococos, estafilococos

Parasitárias – malária, triquinose

Inflamatórias – lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, doença intestinal inflamatória, hepatopatia alcoólica

Neoplásicas – leucemia de plasmócitos, LLC

Estimulação imune – doença do imunocomplexo (doença do soro), sensibilidade a fármacos, transfusão

Trauma

Reações leucemoides

Uma reação leucemoide é uma resposta leucocitária excessiva no sangue periférico. Inclui uma leucocitose de 50 $\times 10^9$/L ou mais com desvio para a esquerda, contagens mais baixas (inclusive abaixo do normal) com uma quantidade considerável de granulócitos imaturos e alterações quantitativas e qualitativas similares nos linfócitos ou monócitos. Dependendo da célula predominante, as reações leucemoides podem ser neutrofílicas, eosinofílicas, linfocíticas ou monocíticas. Não existe uma explicação clara para essas aparentes aberrações temporárias nos mecanismos de controle regulador, embora, em alguns casos, elas parecem ser devidas a uma elevação de citocinas ou do fator de estimulação de colônia de granulócitos por um tumor (Melhem, 1993; Nara, 2003; Nimieri, 2003). As reações apresentam graus variados, mesmo quando associadas ao mesmo agente desencadeador.

Reações leucemoides neutrofílicas

A neutrofilia excessiva pode ocorrer em muitas situações, tais como hemólise, hemorragia, processo maligno com envolvimento ósseo, linfoma de Hodgkin, mielofibrose, infecções (especialmente a tuberculose), queimaduras graves, eclâmpsia e determinadas intoxicações.

O exame do sangue usualmente é mais útil do que o exame de medula óssea. As reações leucemoides não apresentam as contagens diferenciais características observadas na LMC, incluindo o "pico" de mielócitos, eosinofilia e basofilia (Fig. 32.12).

Reações leucemoides eosinofílicas

Células imaturas (p. ex., mielócitos eosinofílicos) raramente aparecem no sangue na eosinofilia reacional, na qual a contagem de leucócitos pode ser superior a 50 $\times 10^9$/L (Fig. 32.8). Reações leucemoides eosinofílicas em geral ocorrem em crianças e comumente são causadas por infecções parasitárias. Como nas reações leucemoides granulocíticas, algumas reações leucemoides eosinofílicas foram associadas a tumores (Oakley, 1998; Melhem, 1993).

Eritroblastose e leucoeritroblastose

Em pacientes com ou sem anemia, normoblastos circulantes frequentemente são acompanhados por uma reação leucemoide neutrofílica. Trata-se de uma reação leucoeritroblástica. Uma anemia moderada com normoblastos no sangue periférico é bem comum no carcinoma metastático com envolvimento da medula óssea. A leucoeritroblastose também pode estar associada à infecção e/ou fibrose da medula óssea e pode ser observada em condições benignas como sangramento gastrintestinal e anemia hemolítica (Weick, 1974).

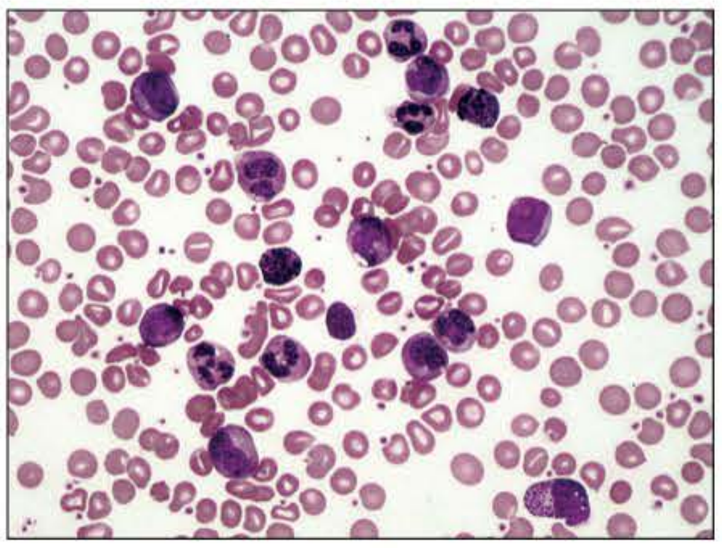


Figura 32.12 LMC com aumento de neutrófilos segmentados, mielócitos, basófilos e um blasto ocasional (×500).

Reações leucemoides linfocíticas

Contagens muitíssimo elevadas de linfócitos aparentemente normais podem ocorrer na linfocitose infecciosa e na coqueluche (ver acima). Diante de um aumento notável de linfócitos atípicos ou imaturos (o que pode ocorrer em condições como MI), a distinção da leucemia pode se tornar difícil.

O exame de medula óssea pode ser útil, uma vez que os linfócitos estão minimamente aumentados na maioria das reações leucemoides, em contraste com o observado na leucemia. Análises por citometria de fluxo do sangue periférico e/ou da medula óssea podem revelar uma população não clonal de linfócitos com uma combinação normal de marcadores de superfície celular na proliferação benigna.

Distúrbios neoplásicos que envolvem primariamente leucócitos

Visão geral das neoplasias hematopoéticas

As neoplasias hematopoéticas constituem uma variedade de distúrbios que têm em comum o fato de serem originários de células-tronco hematopoéticas da medula óssea ou de órgãos linfoides, e que são (ou acredita-se que sejam) processos clonais causados por erros genéticos. Considerando-se a diversidade e a complexidade da regulação das células hematopoéticas, não surpreende que as neoplasias envolvendo esses tecidos sejam igualmente bem variadas, diferindo quanto às células predominantes em uma neoplasia, grau de diferenciação, taxas de proliferação e de apoptose, características clínicas e resposta à terapia. O diagnóstico e a classificação dos tumores hematopoéticos mudaram em decorrência da maior compreensão dessas doenças. No século XIX, o termo "leucemia" referia-se à cor branca ou pálida do sangue, que apresentava concentração aumentada de leucócitos em comparação com o número de eritrócitos. Nenhuma dessas células podia ser observada microscopicamente sem coloração diferencial. Os termos "clorose" e "cloroma" referiam-se à cor esverdeada das células granulocíticas. O termo "linfoma" foi utilizado pela primeira vez por Virchow, referindo-se a tumores de glândulas linfáticas.

Com o desenvolvimento das colorações de Romanowsky (p. ex., Wright-Giemsa) e, posteriormente, de hematoxilina-eosina, assim como a melhoria dos microscópios, os tumores hematopoéticos puderam ser classificados pela morfologia, características clínicas e localização das proliferações anormais. Eles foram classificados como leucemia quando envolviam o sangue e a medula óssea e linfomas e sarcomas quando eles envolviam primariamente o tecido mole. O termo "aguda" refere-se a doenças com evolução clínica agressiva, e o termo "crônica" indica aquelas que evoluem de forma mais lenta. A subtipagem morfológica baseada nos tipos predominantes de células evoluiu nas décadas de 1950 e 1960, com o desenvolvimento de colorações citoquímicas para diferenciar subtipos de células mieloides e algumas células linfoides (p. ex., leucemia de células pilosas).

A partir da década de 1970, houve uma explosão de conhecimento e novas tecnologias, com a disponibilização de muitas ferramentas novas para auxiliar na compreensão desses tumores. Nesse contexto, foram incluídas a descoberta de células B, células T e outros compartimentos imunológicos; anticorpos monoclonais e antígenos de diferenciação de leucócitos; cariotipagem citogenética; rearranjos do gene das imunoglobulinas e células T; reação de cadeia de polimerase; arranjos de ácido nucleico e, mais recentemente, análises proteômicas. Muitos tumores hematopoéticos podem hoje ser caracterizados quanto à anormalidade genética e aos resultantes distúrbios da via intracelular. Isso oferece uma tremenda oportunidade para o desenvolvimento de terapias que visam às anormalidades específicas. Os exemplos incluem a LMC com uma t(9;22) (q34;11) BCR/ABL e a resultante tirosina quinase anormal, que constitui o alvo do fármaco Gleevec (mesilato de imatinib) (Druker, 2004); e a leucemia promielocítica aguda com t(15;17) (q22;q12) PML/RARα e um receptor anormal do ácido retinoico, que responde à tretinoína (ácido all-trans retinoico).

A classificação das leucemias e, em particular, dos linfomas tornou-se confusa nas décadas de 1970 e 1980 à medida que o progresso ocorria. O French-American-British Cooperative Group (FAB) desenvolveu critérios de consenso para leucemias e SMD (Bennet, 1976, 1982), enquanto a classificação dos linfomas variava internacionalmente. Na América do Norte, a classificação padrão de linfomas foi transformanda na National Cancer Institute [NCI] Working Formulation for Clinical Usage e Non Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project (1982), sendo que na Europa era utilizada a classificação atualizada de Kiel (Stanfeld, 1988). Estas classificações foram sintetizadas na Revised European-American Lymphoma Classification (Harris, 1995). Mais recentemente, hematopatologistas e oncologistas reconheceram que critérios diagnósticos uniformes eram essenciais para todas as neoplasias hematopoéticas. A classificação global atual de tumores hematopoéticos patrocinada pela OMS (Jaffe, 2001a) reconhece a predominância da biologia anormal de cada tumor e utiliza uma combinação de técnicas diagnósticas, variando para cada tumor, para estabelecer o diagnóstico. A morfologia, a imunofenotipagem, a citogenética e a genética molecular são utilizadas e, em alguns casos, são usados ensaios citoquímicos. Muitos dos tumores podem se apresentar como leucemias ou tumores de tecido mole (linfomas), e esses termos permanecem sendo úteis do ponto de vista descritivo. A classificação da OMS também utiliza uma abordagem do tipo 2/3 para as leucemias mieloides agudas, a qual reconhece que, em muitas partes do mundo, os exames moleculares e citogenéticos não estão disponíveis e, quando eles existem, a sua utilização nem sempre é produtiva. Para esses casos (LMA, não classificada de outra maneira), os critérios morfológicos baseiam-se na classificação FAB.

Distúrbios mieloproliferativos crônicos

Os distúrbios mieloproliferativos crônicos reconhecidos pela OMS são a LMC (LMC), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica/síndrome hipereosinofílica, PV, mielofibrose idiopática crônica (MIC) e TE (Vardiman, 2001a). São proliferações clonais de uma célula-tronco pluripotente que é capaz de se diferenciar em células das linhagens granulocítica, eritroide e megacariocítica (Adamson, 1976; Fialkow, 1977). Todas apresentam uma evolução crônica que pode terminar como uma leucemia aguda, mielofibrose ou coagulopatia, mas apenas uma, a LMC, apresenta uma anormalidade genética consistentemente recorrente (Nowell, 1960), As características essenciais dos principais distúrbios são apresentadas na Tabela 32.12.

Leucemia mieloide crônica (LMC)

Características clínicas. A LMC ocorre em adultos jovens e de meia-idade. A incidência específica para a idade, no entanto, aumenta acentuadamente após os 50 anos. O início é insidioso e o distúrbio pode ser descoberto de forma acidental em um exame de sangue de rotina. O paciente pode apresentar sintomas de anemia e perda de peso ou simplesmente se queixar de mal-estar. O baço aumenta de tamanho de modo progressivo, e o paciente começa a perder peso e apresenta febre e sudorese noturna associada a um aumento do metabolismo como consequência da rotatividade de granulócitos. O desconforto associado à esplenomegalia pode ser a causa da procura de ajuda médica. Infartos esplênicos podem produzir dor no quadrante superior esquerdo. Nos últimos estágios da doença, o paciente pode apresentar sangramento excessivo ou equimoses. A linfadenopatia, embora comumente presente, em raros casos é proeminente (Cortes, 2004).

Características laboratoriais.

Sangue. A contagem de leucócitos em geral é superior a 50×10^9/L e pode ultrapassar 300×10^9/L. A contagem diferencial é característica. Há um espectro completo de células granulocíticas, de alguns poucos mieloblastos a neutrófilos maduros, com o número de mielócitos e metamielócitos superiores ao dos outros tipos celulares (Savage, 1997). A distribuição bimodal ajuda a excluir outros distúrbios mieloproliferativos e a leucocitose reativa (Fig. 32.12). Os mieloblastos representam menos de 10% das células. O percentual relativa de mielócitos neutrófilos aumenta quando a contagem total de leucócitos aumenta. A basofilia está consistentemente presente, e a eosinofilia é quase sempre observada com a presença de mielócitos eosinófilos. A contagem absoluta de monócitos também está aumentada na maioria dos pacientes.

A anemia normocítica está presente na maioria dos pacientes no momento do diagnóstico, e poucos normoblastos geralmente podem ser observados. A trombocitose está presente em mais da metade dos pacientes, enquanto menos de 15% deles apresenta trombocitopenia.

Tabela 32.12 Características principais das doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas/mieloproliferativas maiores

Distúrbio	Demografia	Características laboratoriais, morfologia	Citogenética	Prognóstico
LMC	Meia-idade; ocasionalmente, qualquer idade	CBS > 50 ×10^3/μL, espectro de maturação de células granulocíticas, pico de mielócitos, basofilia, anemia, fosfatase alcalina do neutrófilo baixa	t(9:22)(q34;q11) *BCR-ABL*	Fase crônica ~ 5 anos. Efeito do Gleevec. Crise blástica eventual piora o prognóstico
PV	Meia-idade, H > M	Contagem eritrocitária > 6 ×10^6/μL, Hb > 18,5 g/dL nos homens e > 16,5 g/dL nas mulheres, aumento da contagem de plaquetas, neutrofilia moderada	t(9;22) pode ou não estar presente	10–20 anos
MIC	Tipicamente acima dos 50 anos	Anemia leucoeritroblástica, CBS moderadamente aumentada com desvio para a esquerda, plaquetas normais-diminuídas com morfologia atípica, medula óssea fibrótica com megacariócitos atípicos e precursores de eritrócitos e granulócitos	+8, +9, del(20q), del(13q), del(1p) e outros são observados em 80% dos pacientes; frequentemente prenunciam a conversão da LMA ou LMC. *Pode não* haver t(9;22)	Sobrevida média de 5 anos
TE	Quinta década (H = M), segundo pico por volta dos 30 anos (M > H)	Plaquetas > 1 ×10^3, morfologia anormal. MO com megacariócitos grandes e multilobulados aglomerados	del(13q22), +8, +9 observados em 5-10% dos casos. *Pode não* haver t(9;22)	Estável por muitos anos (maioria dos casos)
LMMC	Idade média de 65–75 anos, H > M	Monocitose > 1 ×10^3/μL por 3 meses, citopenias, displasias na linhagem mieloide na MO, < 20% de blastos + pró-monócitos na MO	+8, –7, anormalidades de 12p observados em 20–40% dos casos. *Pode não* haver t(9;22)	20–30 meses com progressão para a LMAem 15–30%
LMMCJ	Abaixo dos 3 anos, H > M	Monocitose > 1 ×10^3/μL, CBS > 10 ×10^3/μL, granulócitos desviados para a esquerda, aumento de HbF	Monossomia 7. *Pode não* haver t(9;22)	Ruim. Possível benefício do TMO

LMC = leucemia mieloide crônica; PV = policitemia vera; MIC = mielofibrose idiopática crônica; TE = trombocitopenia essencial; LMMC = leucemia mielomonocítica crônica; LMMCJ = leucemia mielomonocítica juvenil; MO = medula óssea; NAP = fosfatase alcalina de neutrófilos; TMO = transplante de medula óssea.

Medula óssea. A medula óssea apresenta uma hipercelularidade acentuada, principalmente como consequência da proliferação granulocítica, com todos os estágios representados. Em geral, há um aumento de precursores eosinófilos e basófilos. Os normoblastos tendem a estar relativamente diminuídos. Com frequência, a medula óssea não pode ser aspirada por causa da densidade celular ou (em especial no período tardio da doença) por causa do aumento de reticulina, a qual pode ser demonstrada na biópsia. Macrófagos carregados com pigmento azul (histiócitos azul-marinho) ou macrófagos indistinguíveis das células de Gaucher são observados em alguns pacientes.

É bom lembrar que mesmo uma medula óssea típica não é diagnóstica de LMC. Por outro lado, na maioria dos casos, o diagnóstico pode ser estabelecido pelo exame de esfregaço de sangue periférico.

Fosfatase alcalina de neutrófilos. A concentração de fosfatase alcalina neutrofílica (NAP, neutrophil alcaline phosphatase) está muito reduzida ou é indetectável em mais de 90% dos pacientes com LMC. Seus níveis encontram-se bastante aumentados na PV; elevados, normais ou baixos na mielofibrose idiopática; e estão normais ou aumentados nas reações leucemoides. Durante a remissão da LMC, com um quadro sanguíneo aparentemente normal, os níveis de NAP continuam baixos na maioria dos casos. Em aproximadamente 1/3 dos pacientes, esses níveis são normalizados. Os níveis de NAP aumentam nas fases acelerada e blástica da doença. Também pode pode haver um aumento em resposta a infecções, como ocorre em indivíduos normais.

Anormalidades citogenéticas. Em mais de 95% dos pacientes com LMC típica, células do sangue ou da medula óssea cultivadas apresentam anormalidade citogenética t(9;22) (q34;q11), envolvendo o gene ABL1 no braço longo do cromossomo 9 e o gene BCR no braço longo do cromossomo 22. Um cromossomo anormalmente pequeno formado por essa translocação é denominado cromossomo Philadelphia (Ph') (Nowell, 1960). A fusão do gene BCR-ABL1 resulta em um novo transcrito de RNA e, subsequentemente, num fator de crescimento proteico com atividade de tirosina quinase maior do que a da atividade da proteína 145 normal codificada pelo ABL1. Ocorrem outras translocações variantes envolvendo genes adicionais, bem como translocações crípticas que requerem detecção molecular. A maioria delas envolve um ponto de quebra em BCR na região do ponto de quebra maior (M-BCR) com a resultante proteína p210. Um ocasional ponto de quebra na região mu resulta em uma proteína p230 com maturação neutrofílica proeminente. Translocações em uma região de ponto de quebra menor (m-BCR) com a resultante proteína p190 usualmente estão associadas à leucemia linfoblástica aguda (LLA). Entretanto, translocações m-BCR raras estão associadas a um aumento da monocitose, sendo que pequenas quantidades de p190 podem ser detectadas na LMC padrão (Vardiman, 2001b).

Outros achados. As concentrações séricas de cobalamina e transcobalaminas em geral estão consideravelmente aumentadas, como consequência do aumento da transcobalamina I, e acredita-se que seja reflexo do tamanho do *pool* de granulócitos no sangue total. A muramidase (lisozima) sérica também está aumentada.

Evolução. No passado, o tratamento com bussulfano ou hidroxicarbamida (hidroxiureia) costumava controlar a doença na fase crônica, mas sem remissão hematológica da medula óssea nem eliminação do cromossomo Ph'. O uso de interferon-α recombinante ou a realização de transplante alogênico melhoraram os resultados (Silver, 1999). Um inibidor sintético de proteína quinase, STI-571 (mesilato de imatinib; Gleevec), tem como alvo específico a proteína BCR-ABL e atualmente constitui a terapia mais promissora. O tratamento produz remissão clínica frequente, embora ocorram recaídas e os benefícios a longo prazo ainda não sejam conhecidos (Angstreich, 2004).

Exceto nos casos de cura pelo transplante, a doença muda após um período variável, dependendo parcialmente da terapia, para uma fase mais agressiva ou acelerada (Cortes, 2003). Isso é caracterizado por uma ou mais características da mieloproliferação progressiva: aumento de 10 a 19% de blastos no sangue ou na medula óssea; basofilia no sangue periférico > 20%; trombocitopenia persistente não relacionada à terapia < 100 ×10^9/L; trombocitose > 1.000 ×10^9/L; aumento da leucocitose e esplenomegalia não responsiva à terapia; ou evolução clonal citogenética. A displasia granulocítica, o aumento de pequenos megacariócitos displásicos e a fibrose com reticulina também são sugestivos.

A fase blástica é essencialmente uma progressão para a leucemia aguda e é definida pela presença de mais de 20% de blastos no sangue ou na medula óssea, grandes agregados de blastos na medula óssea ou em locais extramedulares. A linhagem blástica é mieloide em 70%

dos casos e pode incluir qualquer tipo celular mieloide (neutrofílico, eosinofílico, basofílico, monocítico, eritroide ou megacariocítico). Contudo, corpúsculos de Auer são observados em raros casos. Em aproximadamente 1/3 dos casos, no entanto, a aparência é da LLA (Rosenthal, 1977). Em geral, são precursores da linhagem B, com expressão da desoxirribonucleotidil transferase terminal (TdT), CD34, CD19, CD10, porém negativos para a expressão de imunoglobulina de superfície. Casos ocasionais são de precursores da linhagem T com TdT, CD3, CD3 citoplasmático (cCD3) e CD7. Antígenos mieloides frequentemente expressam-se de forma concomitante e casos de linhagens duplas (mieloide/linfoide) são raros. A transformação blástica ocorre por causa de alterações genéticas secundárias envolvendo genes p53, retinoblastoma (Rb) e outros (Calabretta, 2004).

Leucemia neutrofílica crônica

A leucemia neutrofílica crônica é um distúrbio mieloproliferativo raro caracterizado por uma neutrofilia persistente e inexplicada com mais de 25×10^9/L granulócitos maduros por litro que se assemelha à neutrofilia reativa (Elliot, 2001; Imbert, 2001a). Tipicamente, ela afeta indivíduos adultos mais velhos que apresentam esplenomegalia e, algumas vezes, hepatomegalia, frequentemente com sangramento mucocutâneo, prurido ou gota. Pode haver um desvio para a esquerda com bastonetes e granulações tóxicas. Os achados da medula óssea são a hipercelularidade com hiperplasia granulocítica, que apresenta uma proporção mieloide:eritroide de até 20:1, e a predominância de neutrófilos maduros a mielócitos. A celularidade em termos de eritrócitos e megacariócitos pode estar aumentada, mas não existe displasia. O exame citogenético usualmente (90%) resulta normal, porém, alguns casos revelam anormalidades, incluindo +8, +9, del(20q) e del(11q). Casos com variante cromossômica Ph'-positiva e neutrofilia são considerados LMC.

Como não existe um marcador genético para essa doença, é provável que muitos casos sejam processos reativos devidos a uma neoplasia maligna oculta ou a outras causas de inflamação. O mieloma múltiplo é quem tem sido mais frequentemente implicado, mas outras neoplasias podem causar neutrofilia acentuada com ou sem envolvimento medular.

Leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica

A leucemia eosinofílica crônica é uma proliferação clonal de eosinófilos com aumento crônico no sangue e frequente lesão orgânica decorrente da infiltração tissular. O sangue contém mais de $1{,}5 \times 10^9$/L, sendo a maior parte de eosinófilos maduros, e uma quantidade geralmente aumentada de blastos no sangue e na medula óssea, porém, inferior a 20%. Quando os blastos não estão aumentados e não existe evidência de monoclonalidade, o termo síndrome hipereosinofílica é recomendado (Fig. 32.8). As causas da eosinofilia reativa devem ser descartadas.

Alguns casos de leucemia eosinofílica crônica apresentam anormalidades clonais citogenéticas; translocações +8, i(17q) ou 8p11 incluindo t(8;13)(p11;q12), t(8;9) (p11; q32-34) e t(6;8) (q27;p11). A translocação 8p11 também pode ocorrer na leucemia mieloide aguda (LMA) e na LLA de precursores das células B ou células T. O resultado clínico da leucemia eosinofílica crônica e da síndrome hipereosinofílica é usualmente indolente com uma sobrevida de 5 anos em cerca de 80% dos casos (Bain, 2001a).

Policitemia vera (PV)

A PV é uma proliferação clonal de células-tronco que afeta principalmente a série eritroide, caracterizada pela proliferação excessiva de elementos eritroides e geralmente de elementos granulocíticos e megacariocíticos na medula óssea (panmielose). Isso é refletido no sangue por um aumento absoluto da massa eritrocitária, leucocitose e trombocitose. A concentração sérica e urinária de eritropoietina diminui. A produção de eritrócitos é autônoma, com crescimento de "colônias eritroides endógenas" in vitro sem eritropoetina, mas não responde à eritropoetina quando o paciente se torna anêmico em decorrência de uma perda sanguínea (Pierre, 2001). A patologia pode estar relacionada à diminuição da expressão do receptor de TP c-Mpl (Kaushansky, 2003) e à superexpressão do RNA mensageiro da PV-1 (Pahl, 2004). Ocorre uma fase proliferativa inicial e eventualmente outra de consumo com anemia, fibrose medular, aumento da esplenomegalia e hematopoese extramedular.

Características clínicas. A doença é levemente mais frequente entre homens do que entre mulheres. Usualmente, começa na meia-idade. Os pacientes afetados apresentam cianose rubra e a esplenomegalia está presente em 2/3 dos casos. Fenômenos trombóticos ou hemorrágicos ocorrem em metade dos pacientes. A trombose é mais comum (Chomienne, 2004). Infarto do miocárdio, trombose cerebral, infartos esplênicos ou pulmonares e tromboflebites são os episódios trombóticos mais frequentes. O sangramento digestivo alto, frequentemente devido a uma úlcera péptica, é o problema hemorrágico mais comum. O prurido, em especial após o banho, é comum.

Características laboratoriais.

Sangue. Os eritrócitos ultrapassam $6\text{–}12 \times 10^{12}$/L, e a hemoglobina é > 18,5 g/dL (homens) ou > 16,5 g/dL (mulheres). O volume celular médio (VCM), a hemoglobina celular média (HCM) e a concentração de hemoglobina celular média (CHCM) estão normais ou baixos. Caso ocorra perda sanguínea crônica, os eritrócitos tornam-se hipocrômicos e microcíticos. Macrócitos, células policromáticas e normoblastos podem ser observados, mas não constituem uma característica proeminente da doença. A produção de eritrócitos aumenta. A destruição eritrocitária permance normal durante o período de eritrocitose. Mais tarde, com a evolução da doença e quando o paciente desenvolve esplenomegalia, a sobrevida dos eritrócitos diminui. O volume sanguíneo total aumenta principalmente por causa do aumento da massa eritrocitária, apesar de o volume plasmático também poder apresentar um menor grau de aumento. A viscosidade sanguínea é alta, podendo ser difícil preparar esfregaços de sangue satisfatórios. A velocidade de sedimentação eritrocitária (ESR, erythrocyte sedimentation rate) diminui.

A contagem de plaquetas aumenta em aproximadamente 2/3 dos pacientes, com frequência a níveis superiores a 1.000×10^9/L. Em 80% dos pacientes não tratados existem anormalidades funcionais das plaquetas (Gilbert, 1975), com diminuição da agregação em resposta ao ADP e à epinefrina. Defeitos funcionais podem estar relacionados à diminuição do c-Mpl nas plaquetas (Moliterno, 1998), embora ocorra um aumento nos megacariócitos (Bock, 2004). Não existe uma anormalidade consistente da hemostasia secundária.

Uma leucocitose neutrofílica moderada na faixa de $10\text{–}30 \times 10^9$/L é comum. Granulócitos imaturos são observados em cerca de 50% dos casos, e a contagem absoluta de basófilos costuma estar elevada. A fosfatase alcalina dos neutrófilos está acentuadamente elevada em 80% dos pacientes. Os níveis séricos de transcobalaminas e muramidade geralmente estão elevados.

A saturação arterial de oxigênio é normal. Muitos pacientes com PV apresentam hiperuricemia como consequência do aumento do metabolismo de ácidos nucleicos, e alguns pacientes apresentam gota secundária ou cálculos renais de ácido úrico.

Medula óssea. A medula óssea apresenta uma hipercelularidade moderada a acentuada, com hiperplasia normoblástica eritroide proeminente na panmielose. Ocorre um aumento do número de megacariócitos e agrupamento de megacariócitos pequenos e grandes com aumento de seios dilatados (Michiels, 1997). Além disso, é frequente a presença de aglomerados em torno dos sinusoides (Pierre, 2001) (Fig. 32.13). Os níveis de reticulina com frequência estão aumentados e as reservas de ferro estão diminuídas ou ausentes em 95% dos casos.

Diagnóstico. Os critérios da OMS (Pierre, 2001) para o diagnóstico de PV são:

1. aumento da massa eritrocitária > 25% acima da média normal, ou Hb > 18,5 g/dL (homens) ou 16,5 g/dL (mulheres).
2. nenhuma causa de eritrocitose secundária (incluindo a eritrocitose familiar) e ausência de aumento de eritropoietina (EPO) em decorrência de: hipóxia (P_{O2} arterial < 92%), alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, receptor de EPO truncado ou produção inadequada de EPO por um tumor.

Ambos os critérios devem ser atendidos, assim como qualquer um dos seguintes: esplenomegalia, anormalidade clonal genética diferente de BCR/ABL, ou formação endógena de colônia in vitro; ou dois dos seguintes parâmetros: trombocitose ($> 400 \times 10^9$/L), leucocitose ($> 12 \times 10^9$/L), biópsia de medula óssea mostrando panmielose com proeminente proliferação eritroide e megacariocítica ou baixo nível sérico de eritropoietina.

A PV é uma doença crônica. Usualmente, os pacientes vivem 10 a 20 anos sob controle. Flebotomia, clorambucil, fósforo radioativo (^{32}P) e hidroxicarbamida (hidroxiureia) têm sido utilizados para controlar a manifestação da doença.

Em aproximadamente 20 a 40% dos pacientes, a fase de consumo ou pós-policitêmica ocorre com anemia progressiva, aumento gradual do baço e elevação adicional da contagem de leucócitos, com mais granulócitos imaturos e mais eritrócitos nucleados circulantes. Muitos eritrócitos tornam-se ovais, sendo que células em forma "lágrima" (dacriócitos) tornam-se proeminentes. A aspiração da medula óssea é impossibilitada pela mielofibrose e a esplenomegalia aumenta por causa da hematopoese extramedular. As manifestações nesse estágio da doença são indiferenciáveis das manifestações observadas na mielofibrose com metaplasia mieloide. Uma outra complicação tardia da PV é a leucemia aguda ou a síndrome mielodisplásica (SMD) (Landaw, 1986). Ocorre um discreto aumento (2–3%) em pacientes tratados apenas com flebotomia. Um aumento maior (10%) é observado em pacientes tratados com agentes citotóxicos.

Mielofibrose idiopática crônica (MIC)

Esse distúrbio recebeu numerosas denominações, incluindo mielofibrose com metaplasia mieloide, metaplasia mieloide agnogênica, mielofibrose primária, mielosclerose com metaplasia mieloide, hepatoesplenomegalia megacariocítica mieloide, mielose não leucêmica, metaplasia granulocítica megacariocítica essencial (MGME) e muitas outras. Trata-se de uma condição bem identificada, mas pouco compreendida.

Essa condição consiste em uma panmielose clonal progressiva crônica caracterizada por uma hiperplasia megacariocítica e frequentemente granulocítica com graus variados de fibrose reativa da medula óssea e hematopoese extramedular (Thiele, 2001a). Tipicamente, ocorre uma anemia leucoeritroblástica com anormalidades eritrocitárias acentuadas, normoblastos circulantes, granulócitos imaturos e plaquetas atípicas. A MIC é uma doença incomum, cuja incidência corresponde a 2/3 da incidência da LMC. Costuma ocorrer em indivíduos com mais de 50 anos de idade e surgir de modo insidioso, com perda de peso, anemia e desconforto abdominal decorrentes da esplenomegalia. Com frequência, o fígado também está aumentado e o paciente pode apresentar icterícia leve. A radiografia revela osteosclerose irregular em até 50% dos pacientes, mas a osteoporose também pode ser observada.

Em 20 a 30% dos casos, um estágio pré-fibrótico é caracterizado por uma anemia normocítica leve com poiquilocitose incluindo dacriócitos, eritrócitos nucleados, trombocitose e leucocitose discreta com algumas formas imaturas. A medula celular encontra-se hipercelular e contém megacariócitos anormais, que se aglomeram em torno dos seios e das trabéculas. A histopatologia da medula óssea é dominada por megacariócitos atípicos imaturos, aumentados e com núcleos imaturos em forma de "nuvem" (Michiels, 1999), além de pequenos megacariócitos. A fibrose inicialmente pode ser mínima. A hematopoese intrasinusoidal é frequente (Fig. 32.14).

Os achados característicos da apresentação no estágio fibrótico incluem uma anemia normocítica normocrômica (frequentemente com algumas células hipocrômicas e pontilhado basofílico), anisocitose moderada e poiquilocitose acentuada, incluindo dacriócitos proeminentes e eliptócitos. Em geral, os normoblastos estão aumentados de forma desproporcional em relação ao grau de anemia com discreta reticulocitose. A anemia pode ter uma origem complicada, com componentes de insuficiência medular, eritropoese ineficaz e hemólise. A esplenomegalia decorrente da hematopoese extramedular é típica.

A contagem de leucócitos está moderadamente elevada. Neutrófilos imaturos e, em alguns casos, mieloblastos estão presentes. Com frequência, os basófilos estão aumentados. O número de plaquetas está normal ou diminuído (em raros casos aumentado), e elas costumam ser atípicas com "zonas" claras distintas. Micromegacariócitos do tamanho dos linfócitos com núcleo e citoplasma ou megacarioblastos pequenos podem ser comumente encontrados quando procurados. Em raras ocasiões, eles estão presentes em uma quantidade considerável.

A cultura de células sanguíneas in vitro revela um aumento de colônias (CFU-GM) similar ao que ocorre na LMC. O GM-CSF sérico está alto. Com frequência, o nível sérico de ácido úrico está aumentado, e o de cobalamina está normal ou elevado.

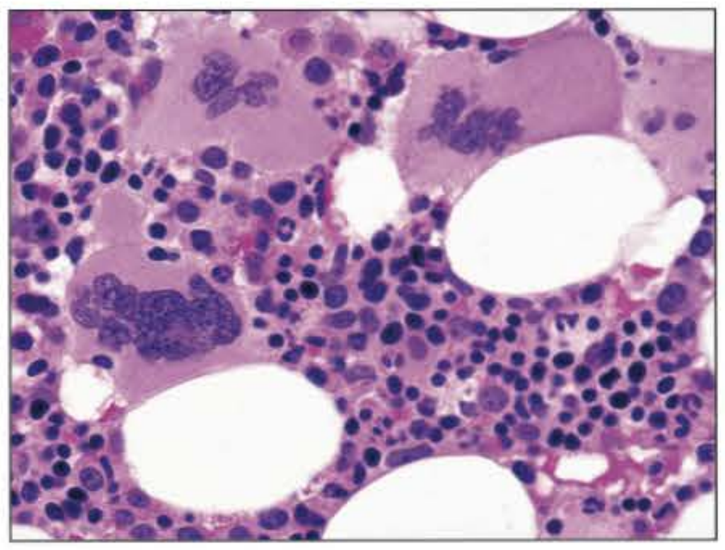


Figura 32.13 Biópsia de medula óssea na PV mostrando panmielose com hiperplasia normoblástica (×500).

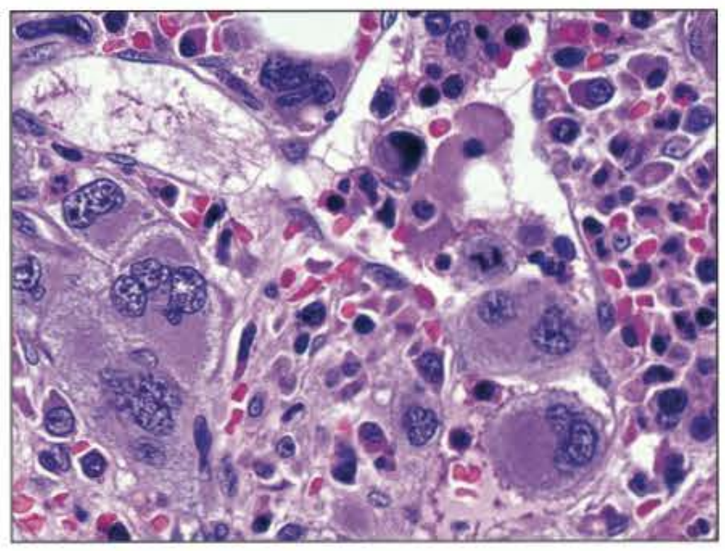


Figura 32.14 Biópsia de medula óssea na mielfibrose crônica idiopática, com aumento do espaço entre células sugerindo fibrose e hematopoese intersinusoidal (×500).

Em geral, é impossível aspirar a medula óssea, e a biópsia é necessária. A medula óssea é fibrótica, com ilhotas residuais de precursores eritroides e granulocíticos e megacariócitos atípicos. A fibrose é de tecido conjuntivo frouxo com colágeno escasso, mas com abundância de reticulina. Focos de formação osteoide e/ou óssea em placas endofíticas (Thiele, 2001b) podem ser observados, e trabéculas ósseas podem apresentar espessamento irregular (mielosclerose). A medula óssea pode apresentar um misto de hiperplasia e fibrose em uma amostra ou pode variar em locais diferentes do corpo. Megacariócitos formam agrupamentos nucleares anormais ou bainhas que podem ser observados nos seios com outros precursores da medula óssea. A hematopoese é observada no fígado e no baço.

Biologia. Embora os megacariócitos proliferantes sejam neoplásicos, a proliferação estromal é reativa por causa da liberação inadequada de fatores de crescimento derivados dos megacariócitos/plaquetas, incluindo o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*), fator transformador de crescimento-β (TGF-β, *transforming growth factor* β), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) e calmodulina (Reilly, 1998).

Estudos cromossômicos revelam ausência de BCR/ABL, mas é frequente a presença de alterações também observadas em outros distúrbios mieloproliferativos e mielodisplásicos: +8, +9, del(20q), del(13q) e del (1p). Cerca de 80% dos pacientes apresentam alterações cromossômicas inespecíficas cujo surgimento frequentemente reflete uma conversão para LMA ou LMC.

Evolução. A evolução natural é o aumento da fibrose com anemia progressiva e esplenomegalia. A hemólise com frequência se torna um elemento agravante da anemia, e infecções podem ser um problema grave. A hipertensão porta ocorre em 10 a 20% dos casos e pode resultar em sangramento de varizes esofágicas. A hipertensão pode ser devida à trombose da veia porta ou à obstrução intra-hepática decorrente da metaplasia mieloide com aumento do fluxo sanguíneo portal.

Preparações de andrógenos, corticosteroides e eritropoietina são úteis no controle da anemia (Tefferi, 2003). A sobrevida média tem sido de cerca de 5 anos, consideravelmente menor do que a sobrevida associada à PV. Entretanto, alguns pacientes vivem mais tempo e

nestes o evento terminal geralmente é uma leucemia aguda. Avanços terapêuticos recentes com remissão durável das citopenias foram relatados com o uso de talidomida e prednisona (Mesa, 2004).

Em certos casos, os pacientes apresentam citopenias e fibrose medular decorrentes de outras causas, algumas das quais podem responder de maneira favorável a terapias específicas. Dentre essas causas, estão os tumores metastáticos, tumores hematopoéticos primários (p. ex., leucemia de células pilosas ou discrasia de plasmócitos) (Meerkin, 1994), lesão causada por radiação e, em raros casos, mielofibrose autoimune (Hasselbalch, 1987; Pullarkat, 2003). Crianças desnutridas com deficiência de vitamina D (raquitismo) algumas vezes apresentam mielofibrose. Foi postulado um possível papel para os solventes na mielofibrose (Brandt, 1987), mas isso não está claro nem bem documentado. Também resta saber se os casos associados aos solventes são de mielofibrose neoplásica ou secundária. O solvente mais suspeito é o benzeno, que sabidamente induz LMA mediante níveis limítrofes de exposição. Parece muito improvável que a exposição ambiental geral esteja associada a processos malignos hematológicos (Duarte-Davidson, 2001). A fibrose medular peritrabecular ocorre no hiperparatireoidismo primário ou secundário da insuficiência renal crônica.

Trombocitemia essencial (TE)

A trombocitemia é um distúrbio clonal mieloproliferativo que afeta primariamente a linhagem megacariocítica e tem como principal manifestação uma trombocitose constante. Ocorre com mais frequência na quinta década de vida, com igual distribuição entre os sexos e um segundo pico de incidência nas mulheres em torno dos 30 anos (Imbert, 2001b).

Características clínicas. Frequentemente (50%) os pacientes apresentam trombocitose assintomática, mas até metade desses indivíduos apresentam hemorragia ou trombose. Esta última ocorre sob a forma arterial ou venosa ou como oclusão microvascular que ocasiona ataques isquêmicos transitórios ou isquemia digital. Hemorragias mucosas espontâneas e recorrentes características são mais comuns no trato gastrintestinal ou nas vias aéreas superiores. Em alguns casos, as hemorragias são precedidas ou acompanhadas por trombose. A esplenomegalia leve ocorre em 50% dos casos.

Características laboratoriais.

Sangue. A característica mais impressionante é o aumento acentuado de plaquetas (> 600 $\times 10^9$/L; com frequência, > 1.000 $\times 10^9$/L), em geral com formas gigantes e anormais, comumente acompanhado da presença de fragmentos de megacariócitos. Algumas vezes, o paciente apresenta leucocitose neutrofílica. A anemia microcítica hipocrômica devida à perda sanguínea crônica está presente em muitos casos. Defeitos funcionais das plaquetas na trombocitemia são frequentemente demonstráveis. O achado mais típico é a diminuição da agregação e megacariócitos aumentados de volume.

Medula óssea. Na medula óssea, os megacariócitos encontram-se aumentados em número e tamanho, apresentando citoplasma maduro e núcleos multilobulados, bem como uma tendência a se agruparem em uma medula óssea normal ou discretamente hipercelular (Michiels, 1999) (Fig. 32.15). Os núcleos dos megacariócitos não são descritos como atípicos, mas com frequência são distintos e se assemelham àqueles observados em outros distúrbios mieloproliferativos. A proliferação eritroide pode ocorrer secundariamente à perda sanguínea. As características observadas ao exame de biópsia podem ser indiferenciáveis daquelas associadas à PV, contudo em geral a predominância eritroide é menor. Pode haver hematopoese extramedular esplênica.

A cultura de medula óssea revela tipicamente a formação espontânea de colônias de megacariócitos e também de eritrócitos in vitro (Niittyvuopio, 2004). A marcação anormal (diminuída) da medula óssea para receptor de trombopoetina (TP), c-Mpl, pode ajudar na diferenciação entre TE e trombocitose reativa (Gale, 2003).

Diagnóstico. Os critérios da OMS para o diagnóstico de trombocitemia são os seguintes (Imbert, 2001b):

1. contagem de plaquetas constante > 600 $\times 10^9$/L;
2. biópsia de medula óssea revelando proliferação principalmente de megacariócitos com núcleos maduros aumentados de volume.

Os itens a seguir devem ser excluídos:

- hemoglobina inferior a 18,5 (homens) e 16,5 g/dL (mulheres) ou massa eritrocitária normal;

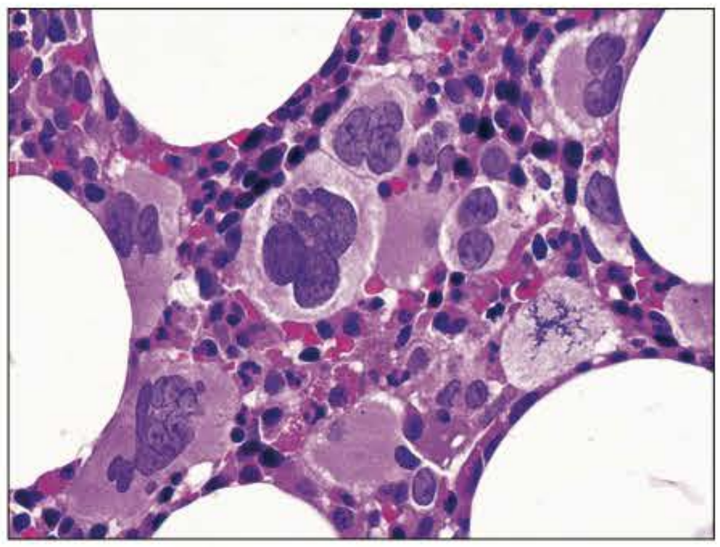


Figura 32.15 Biópsia de medula óssea na TE com aumento e agregação de megacariócitos (×500).

- ferro corável na medula óssea, ferritina normal ou VCM normal;
- ausência de evidência de LMC; ausência de cromossomo Philadelphia ou BCR/ABL;
- ausência de evidência de mielofibrose; ausência de fibrose por colágeno da medula óssea e fibrose por reticulina mínima ou ausente;
- nenhuma causa conhecida de trombocitose reativa, neoplasma, inflamação ou infecção nem história de esplenectomia.

Genética. Não existe uma anormalidade genética específica. Translocações BCR/ABL devem ser descartadas para excluir a LMC. A trombocitose com cromossomo Philadelphia positivo é provavelmente uma forma inicial de LMC e difere quanto aos apectos morfológicos pela ausência de megacariócitos grandes agrupados (Michiels, 2004). Casos ocasionais (5 a 10%) apresentam del(13q22), +8 ou +9 (Imbert, 2001b). Outras anormalidades, por exemplo, del(5q) ou anormalidades de 3q21q26, sugerem um distúrbio mieloproliferativo com trombocitose.

A maioria dos casos permanece estável por muitos anos, mas uma pequena proporção pode evoluir para outros distúrbios mieloproliferativos crônicos ou, em raros casos, desenvolver uma leucemia aguda. Historicamente, agentes alquilantes e radiofósforo foram utilizados para o tratamento da TE, mas esses tratamentos eram complicados por leucemias secundárias. A hidroxicarbamida (hidroxiureia) foi utilizada mais recentemente, mas ela também pode levar à leucemia. A anagrelida vem sendo utilizada e é considerada mais segura e confiável (Silverstein, 1999). O desenvolvimento de eritrocitose com aumento da massa eritrocitária levanta a possibilidade de PV, e existe algum cruzamento entre as duas entidades. A formação de colônia eritroide endógena pode permitir a identificação de casos precoces com risco de PV (Griesshammer, 2004). A fibrose ocorre em casos raros.

Doença mieloproliferativa crônica-não classificável (DMPC-NC)

Consiste em distúrbios com características de doença mieloproliferativa, todavia, que não satisfazem aos critérios de uma entidade específica ou apresentam características intermediárias (Thiele, 2001b). Os exemplos de DMPC-NC incluem MIC pré-fibrótica, PV pré e pós-policitêmica (sem diagnóstico prévio); e casos com características de distúrbio mieloproliferativo acompanhados de alguma displasia ou aumento de blastos. O BCR/ABL e outras anormalidades citogenéticas específicas estão ausentes. Ocorre sobreposição dessa categoria com a doença mielodisplásica/mieloproliferativa não classificável. Frequentemente, durante o acompanhamento, o paciente passa a apresentar achados característicos que permitem o diagnóstico definitivo (Bain, 2001b).

Doenças mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas

Em geral, as doenças mieloproliferativas são distúrbios nos quais a proliferação de células hematopoéticas ultrapassa a apoptose; ocorre um aumento de elementos celulares no sangue, e a morfologia da hematopoese é quase normal. As doenças ou SMD são distúrbios nos quais a apoptose predomina, a hematopoese é ineficaz e ocorrem cito-

penias (Greenberg, 1998; List, 2004). Os distúrbios mielodisplásicos/mieloproliferativos apresentam características de ambas, com aumentos variáveis de células, assim como citopenias e displasia morfológica (Vardiman, 2001c). Incluem a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), LMCa, LMMC juvenil (LMMCJ) e formas não classificáveis. A LMMC e a LMMC juvenil estão incluídas na Tabela 32.12.

As doenças mielodisplásicas ocorrem sobretudo em indivíduos com mais de 50 anos e geralmente manifestam-se como uma ARF aos hematínicos, como ou sem neutropenia e trombocitopenia. Em geral, não ocorre aumento de fígado, baço ou linfonodos. A medula óssea é hipercelular com maturação anormal de uma ou mais das três linhagens hematopoéticas. O número de blastos costuma estar aumentado. Esse grupo de distúrbios também foi denominado síndromes dismielopoéticas ou "pré-leucemias" por causa da alta proporção de casos que acabam evoluindo para uma leucemia aguda franca. O FAB (Bennett, 1976, 1982) descreveu e classificou esses distúrbios, e sua nomenclatura permanece sendo útil (com certas modificações) para a classificação da OMS (Brunning, 2001a). Um sistema de pontuação para previsão da sobrevida e do risco de transformação leucêmica aguda foi desenvolvido com base no percentual de blastos, citogenética e extensão das citopenias (Greenberg, 1997). Em geral, uma contagem de blastos superior a 5% eleva o risco. Quando essa contagem é superior a 10%, aumenta ainda mais o risco. Anormalidades cromossômicas complexas ou do cromossomo 7 representam alto risco; del(5q), del(2q) isolado, -Y e citogenética normal representam baixo risco; outros achados citogenéticos representam risco intermediário; e, enfim, a existência mais de uma citopenia aumenta o risco.

Tipos de maturação celular anormal

Diseritropoese. Assemelha-se à alteração megaloblástica e inclui fragmentação nuclear ou cariorrexe, multinuclearidade, brotamentos ou pontes nucleares, pontilhado basófilo e sideroblastos em anel (Bennett, 1986). Essas características também podem ser observadas em intoxicações por drogas, quimioterápicos, metais pesados, álcool e outras toxinas (Brunning, 2001a) (Figs. 32.16 e 32.17). O número de células eritroides pode estar aumentado ou diminuído. Anormalidades eritrocíticas na esfregaço de sangue incluem a presença de macrócitos ovais, anisocromia, pontilhado basófilo, dacriócitos e reticulocitopenia.

Disgranulopoese. Inclui a assincronia nuclear/citoplasmática, hipogranulação, hiposegmentação nuclear com aumento da condensação de cromatina, grânulos azurófilos grandes ocasionais, nucléolos inapropriadamente proeminentes ou outras anormalidades. Os precursores de neutrófilos e os monócitos com frequência se assemelham. Neutrófilos com cromatina madura, mas diminuição da granulação e núcleos bilobados ou unilobados, assemelham-se a células da anomalia de Pelger-Huët e são denominadas células "pseudo-Pelger-Huët" (Figs. 32.18 e 32.19).

Dismegacariocitopoese. Inclui megacariócitos grandes com núcleos não segmentados, micromegacariócitos e megacariócitos com dois ou mais núcleos pequenos não conectados (Fig. 32.20). O número de megacariócitos pode estar diminuído. Na esfregaço de sangue, a presença de plaquetas gigantes hipogranulosas é frequente, e micromegacariócitos são raramente observados.

Doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas (ver Tab. 32.12)

Leucemia mielomonocítica crônica. A LMMC é um distúrbio clonal de células-tronco no qual a característica predominante é a monocitose persistente ($> 1 \times 10^9$/L por mais de três meses) e para o qual outras causas foram descartadas (Vardiman, 2001d). Tipicamente, o indivíduo apresenta citopenias no sangue (anemia, trombocitopenia e/ou neutropenia), mas a neutrofilia com anormalidades morfológica também ocorre. O cromossomo Philadelphia ou BCR/ABL está ausente e pode haver displasia de uma ou mais linhagens mieloides, bem como menos de 20% de blastos somados a pró-monócitos na medula óssea (Fig. 32.21). A medula óssea também apresenta monocitose e, em geral, aumento do número de pró-monócitos. Estes podem ser diferenciados dos mielócitos anormais pela coloração com esterase inespecífica (α-naftil acetato ou α-naftil butirato esterase) ou pela marcação forte com antilisozima ou CD68. A eosinofilia ou a basofilia pode estar presente e, com frequência, existem monócitos com aspecto plasmacitoide. Quando a eosinofilia for superior a $1{,}5 \times 10^9$/L, a OMS recomenda a subcategoria de LMMC com eosinofilia.

Figura 32.16 Diseritropoese induzida por fármaco, com núcleos apresentando lóbulos irregulares nas células localizadas acima, à direita, em comparação aos normoblastos relativamente normais (×1.000).

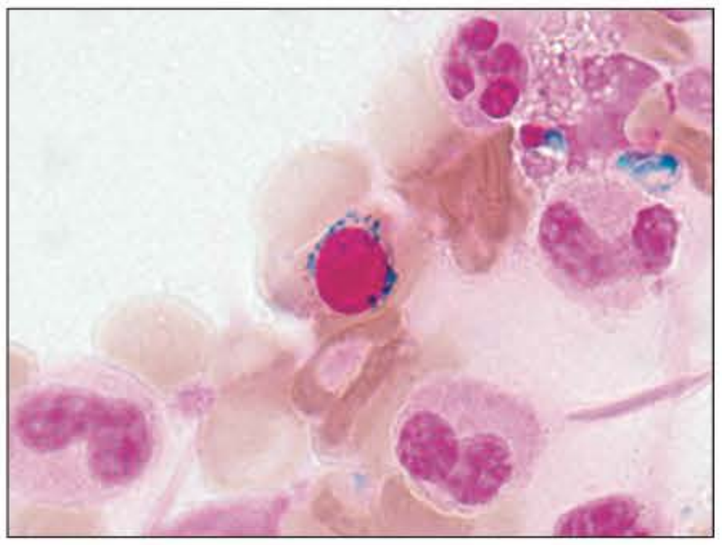


Figura 32.17 Um sideroblasto em anel presente no centro do campo (×1.000).

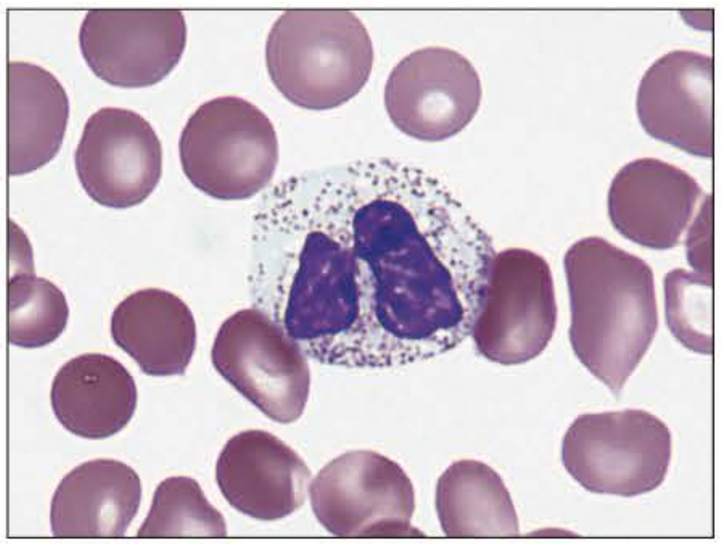


Figura 32.18 Pseudoneutrófilo de Pelger-Huët (×1.000).

Na LMMC e também nas leucemias mieloides agudas com diferenciação monocítica, os pró-monócitos são considerados equivalentes a blastos e são incluídos na determinação do percentual de blastos. Os pró-monócitos são precursores monocíticos que apresentam uma morfologia reconhecível de monócito, mas com cromatina imatura e núcleos finamente convolutos ou cerebriformes (Fig. 32.22). O percentual de blastos costuma ser < 5% no sangue e < 10% na medula óssea. Esses casos são referidos como LMMC-1. A subcategoria LMMC-2 refere-se aos casos com 5 a 19% de blastos no sangue e 10 a 19% de blastos na medula óssea ou àqueles em que há corpúsculos de Auer presentes. Isso indica uma doença agressiva com provável transformação iminente em leucemia aguda.

O imunofenótipo é CD13/CD33+; variável CD14/CD68/CD64/CD4+. Monócitos plasmacitoides podem ser observados e expressam CD14, CD43, CD56, CD68 e CD4, com variável CD2/CD5. Anormalidades citogenéticas em 20 a 40% dos casos incluem +8, –7/del e anormalidades de 12p.

A LMMC ocorre com mais frequência em idosos (média de 65 a 75 anos) e está associada à predominância no sexo masculino. Os sintomas em geral são aqueles relacionados às citopenias (fadiga, infecção ou sangramento) ou ao estado hipermetabólico (febre, perda de peso, sudorese noturna). A hepatoesplenomegalia pode estar presente parti-

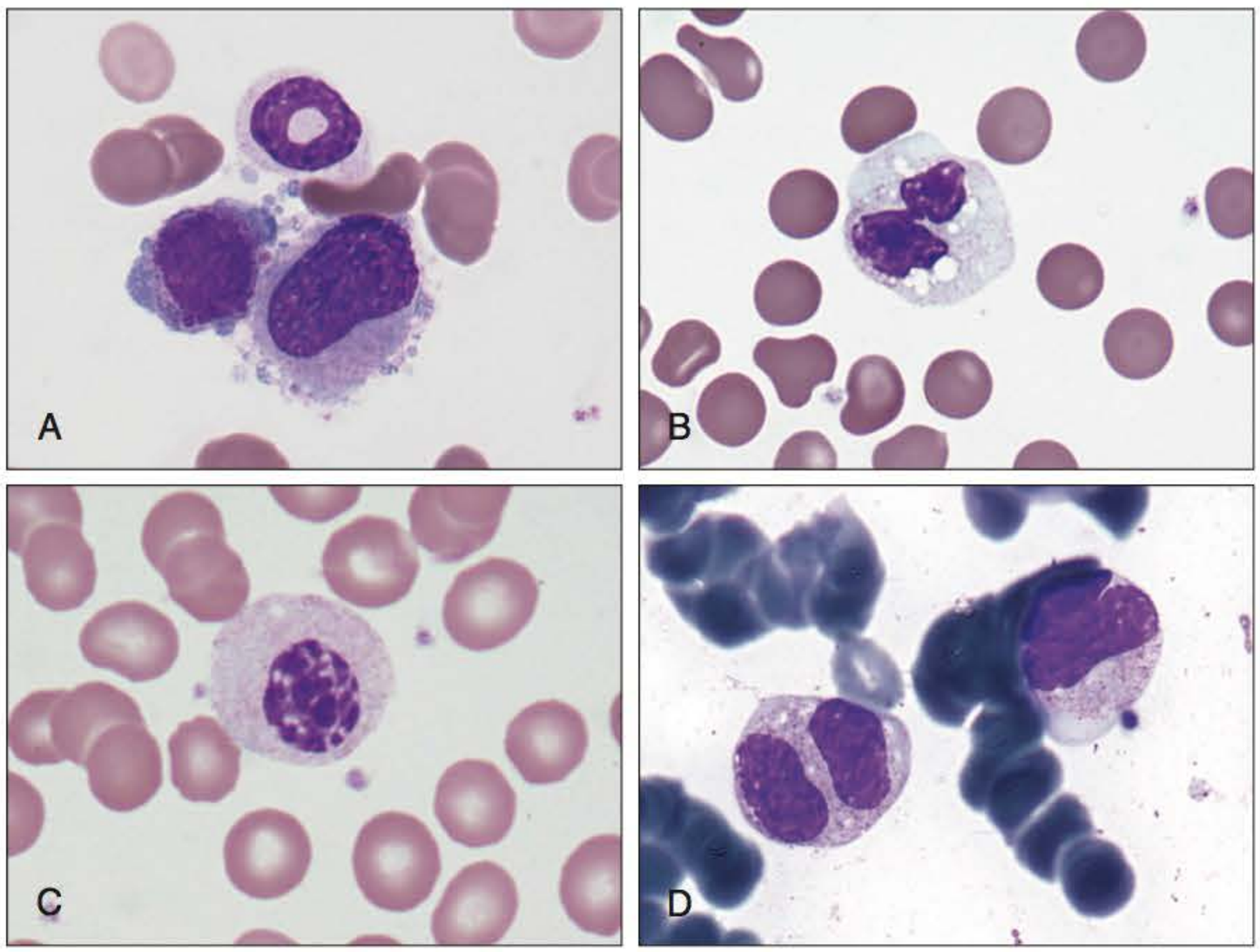


Figura 32.19 Outras formas de displasia de neutrófilos. *A*, neutrófilo em anel com células eritroides e megacariocíticas displásicas na medula óssea (×1.000). *B*, neutrófilo de Pelger-Huët parecido com um monócito (×1.000). *C*, células de Pelger-Huët mononuclear (×1.000). *D*, precursores de neutrófilo grandes com lobulação irregular e granulação (×1.000).

cularmente em pacientes com leucocitose acentuada. A linfadenopatia pode estar associada ao sarcoma granulocítico e à evolução para a leucemia aguda. A sobrevida média é de 20 a 30 meses com a progressão para LMA em 15 a 30% dos casos.

Leucemia mieloide crônica atípica (LMCa). Esta doença apresenta características mielodisplásicas e mieloproliferativas, um componente predominante de aumento de neutrófilos e precursores com características displásicas, além de displasia de outras linhagens celulares (Vardiman, 2001e). Os cromossomos Ph' ou BCR/ABL estão ausentes. Esses casos foram previamente considerados com a LMC ou a LMMC, porém eram negativos para o cromossomo Ph' ou para BCR/ABL e, embora a monocitose com frequência esteja presente, é menos proeminente do que a neutrofilia. A medula óssea é hipercelular com características variáveis de cada linhagem. Uma variante, "síndrome de aglutinação anormal de cromatina", apresenta uma condensação exagerada de cromatina e outras características displásicas.

A citogenética revela +8, +13, del(20q), i(17q) ou del(12p) em até 80% dos casos. A LMCa ocorre no final da vida e em geral com um mau prognóstico, com uma sobrevida média de 20 meses e 25 a 40% de transformação em leucemia aguda.

Os critérios para o diagnóstico de LMCa (Vardiman, 2001e) são:

- leucocitose decorrente do aumento de neutrófilos maduros e imaturos;
- disgranulopoese proeminente;
- ausência do cromossomo Ph' ou de BCR/ABL;
- precursores de neutrófilos (pró-mielócitos, mielócitos, metamielócitos) representam mais de 10% da CBS;
- monocitose absoluta mínima ou ausente; monócitos representam menos de 10% da CBS;
- medula óssea hipercelular com proliferação granulocítica e displasia granulocítica, com ou sem displasia das linhagens eritroide e/ou mecariocítica;
- menos de 20% de blastos no sangue ou na medula óssea.

Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ). Trata-se de um distúrbio clonal predominantemente das linhagens granulocítica e monocítica, com displasia nessas e em outras linhagens, ocorrendo em crianças e adolescentes jovens (Luna-Fineman, 1999; Vardiman, 2001e). Foi previamente designada como LMC cromossomo Ph'-negativa, LMMC ou síndrome da monossomia 7 (em alguns casos). A sua ocorrência é de 1,3 caso por milhão de crianças com menos de 14 anos e, na maioria dos casos, com menos de 3 anos de idade. Existe uma predominância mas-

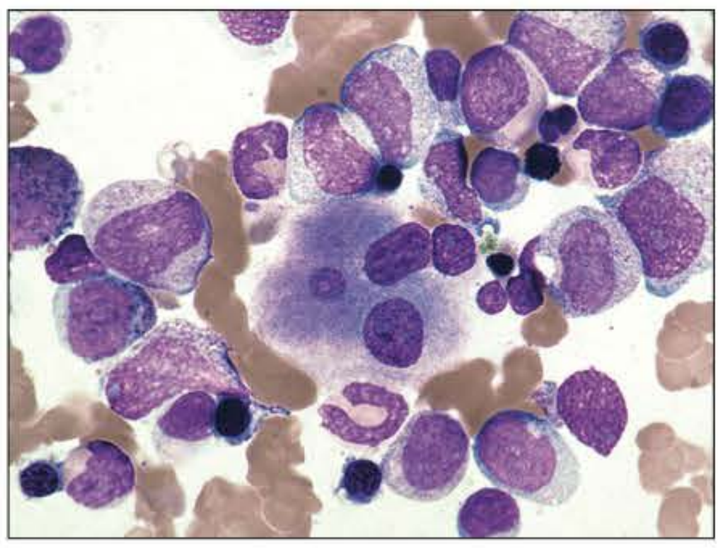


Figura 32.20 Megacariócito displásico apresentando lobos nucleares não conectados. Formas mononucleares também são frequentes na mielodisplasia (×500).

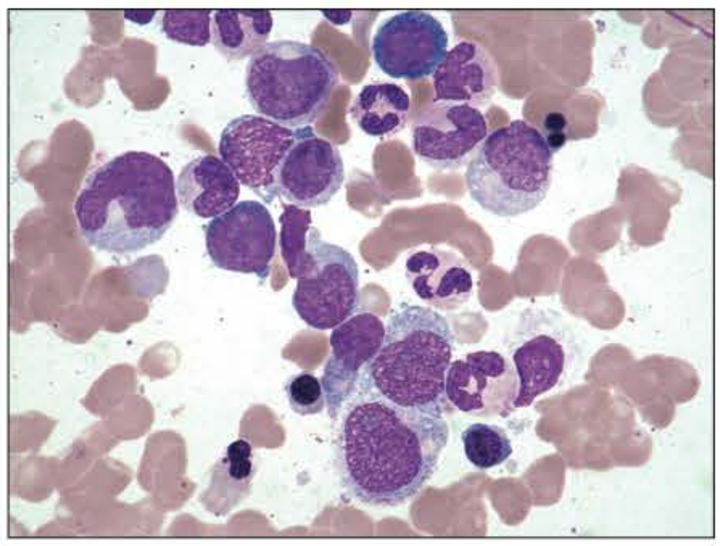


Figura 32.21 Este caso de LMMC apresenta uma displasia moderada de três linhagens e monocitose (×500).

culina de 2:1. O prognóstico é ruim e a morte geralmente é consequente à insuficiência orgânica decorrente de infiltrados leucêmicos, embora alguns pacientes se beneficiem com o transplante de medula óssea.

Os critérios para o diagnóstico de LMMJ (Vardiman, 2001f) são:

- monocitose no sangue periférico > 1 $\times 10^9$/L;
- ausência de cromossomo Ph' ou BCR/ABL;
- mais dois dos seguintes achados:

– hemoglobina F aumenta para a idade;

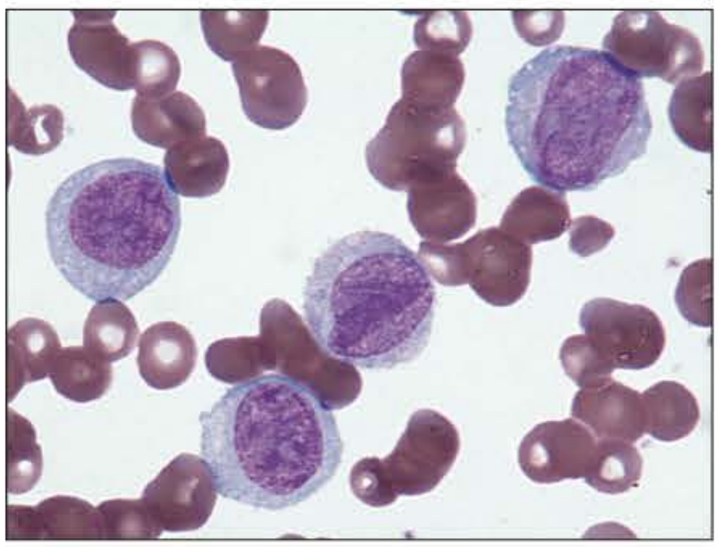


Figura 32.22 Promonócito (centro) apresentando cromatina imatura e pregas nucleares finamente convolutas em comparação com monoblastos.

- granulócitos imaturos no sangue;
- CBS > 10×10^9/L;
- anormalidade clonal cromossômica (incluindo monossomia 7);
- progenitores mieloides com hipersensibilidade ao GM-CSF *in vitro*.

Doença mielodisplásica/mieloproliferativa não classificável

Esta categoria da classificação da OMS é utilizada para aqueles casos com características de doença mielodisplásica, mas com a adição de características mieloproliferativas proeminentes, incluindo trombocitose superior a 600×10^9/L com hiperplasia megacariocítica ou CBS superior a 13×10^9/L com ou sem esplenomegalia, ausência de distúrbio mieloproliferativo crônico ou SMD e ausência de uma anormalidade cromossômica específica a uma outra doença (BCR/ABL, del(5q), t(3;3) (q21;q26) inv(3) (q21;q26) (Bain, 2001b). Um quadro provisório de ARF com sideroblastos em anel associada a uma trombocitose acentuada é incluído nessa categoria.

Síndromes mielodisplásicas (Brunning, 2001b, c, d, e, f, g) (Tab. 32.13)

Anemia refratária (ARF). Esse distúrbio clonal envolve principalmente a linhagem eritroide, com eritropoese ineficaz e sem aumento do número de blastos. Os achados são a anemia com reticulocitopenia e eritrócitos anormais. Granulócitos anormais são raros, e blastos representam menos de 1% no sangue. A medula óssea é normocelular a hipercelular com hiperplasia eritroide e/ou diseritropoese e menos de 5% de blastos. A sobrevida é relativamente boa (> 5 anos), e a evolução para a leucemia aguda é baixa (6%).

Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARFSA). Nesse distúrbio, além dos achados da ARF, existem sideroblastos em anel que representam 15% ou mais dos precursores eritroides presentes na medula óssea. São precursores eritroides nucleados, onde partículas de ferro coráveis (mitocôndrias incrustadas de ferro) formam um anel de 10 ou mais partículas intimamente associadas e que envolvem pelo menos 1/3 do núcleo (Fig. 32.17). A maturação citoplasmática defeituosa e eritrócitos anisocrômicos são anormalidades associadas. A sobrevida é similar à da ARF com uma incidência menor de progressão para a leucemia aguda (< 2%).

Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRFDM). Trata-se de um distúrbio clonal com bi ou pancitopenia e displasia de 10% ou mais dos precursores de duas ou mais linhagens. Os blastos não estão aumentados (< 1% no sangue e < 5% na medula óssea). Sideroblastos em anel podem estar presentes e quando sua concentração ultrapassa 15% dos precursores eritroides, o caso é classificado como citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens e sideroblastos em anel.

Em contraste com a ARF e a ARF com sideroblastos em anel, as quais apresentam anormalidades citogenéticas com pouca frequência (< 10%), a citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens e a citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens e sideroblastos em anel apresentam em até 50% dos casos. Elas incluem a trissomia 8, monossomia 7, del(7q), monossomia 5, del(5q), del(20q) e cariótipos complexos. A sobrevida é de aproximadamente 33 meses, e a conversão para a leucemia aguda é de 11%.

ARF com excesso de blastos (ARFEB, Tipos 1 e 2). Na ARFEB tipo 1, o sangue apresenta citopenia em 2 ou 3 das linhagens celulares e menos de 5% de blastos circulantes. A medula óssea é hipercelular, com hiperplasia eritroide ou granulocítica variável. Alterações da poese estão presente nas três linhagens celulares, e 5 a 9% das células medulares são blastos. Menos de 5% de blastos estão presentes no sangue, e não são observados corpúsculos de Auer. Aglomerados de 5 a 8 blastos e promielócitos no interstício medular são frequentemente observados e são designados como localização anormal de precursores imaturos.

Tabela 32.13 Características principais das síndromes mielodisplásicas maiores

Distúrbio	Demografia	Características laboratoriais, morfologia	Citogenética	Prognóstico
Anemia refratária (ARF)	Acima de 50 anos	SP com anemia, reticulocitopenia, blastos < 1%. MO com hiperplasia eritroide e/ou dispoese, < 5% de blastos	Raras anormalidades	Bom, > 5 anos; 6% evoluem para a LMA
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARFSA)	Acima de 50 anos	Similar à ARF, ≥ 15% de sideroblastos em anel na MO	Raras anormalidades	Bom, > 5 anos; 2% evoluem para a LMA
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRFDM)	Acima de 50 anos	SP com citopenias de ≥ 2 linhagens celulares, < 1% de blastos, < 1×10^9/L de monócitos. MO com displasia de ≥ 10% de precursores de ≥ 2 linhagens celulares, < 5% de blastos	+8, –7, del(7q), –5, outros em até 50%	33 meses, 11% para a LMA
Anemia refratária com excesso de blastos (ARFEB)	Acima de 50 anos	ARFEB-1: SP com citopenias de ≥ 2 linhagens celulares, < 5% de blastos, < 1×10^9/L de monócitos. MO com hipercelularidade, dispoese, 5-9% de blastos sem corpúsculos de Auer	+8, –5, del(5q), –7, del(7q), del(20q)	ARFEB-1: < 2 anos com 25% evoluindo para a LMA
		ARFEB-2: similar ao tipo 1, mas também com SP com > 5% de blastos ou MO com 10-19% de blastos ou corpúsculos de Auer		ARFEB-2: < 2 anos com 33% evoluindo para a LMA
Síndrome 5q	Mulheres de meia-idade ou mais velhas	SP com trombocitose, < 5% de blastos. MO com aumento de megacariócitos hipolobulados, <5 % de blastos	5q- é a única anormalidade	Bom

SP = sangue periférico; MO = medula óssea.

Eles devem ser descritos nos laudos patológicos, uma vez que eles podem indicar uma doença mais agressiva. A medula óssea hipocelular é observada em uma minoria de casos (10–15%). A sua interpretação pode ser difícil, uma vez que os pacientes costumam ser mais velhos, com diminuição da celularidade, o estresse medular na anemia hipoplásica frequentemente causa displasia. Um diagnóstico de SMD deve ser feito com cautela quando a medula óssea for hipoplásica.

A ARFEB tipo 2 apresenta achados similares ao tipo 1, mas com qualquer uma das seguintes alterações: (1) mais de 5% de blastos no sangue; (2) 10 a 19% de blastos na medula óssea; ou (3) presença de bastões da Auer. As anormalidades citogenéticas incluem +8, -5, del(5q), -7, del(7q) e del(20q). A sobrevida em geral é inferior a 2 anos para ambos os tipos com insuficiência medular progressiva e citopenias ou evolução para a leucemia aguda em 25% dos casos do tipo 1 e 33% do tipo 2.

Síndrome mielodisplásica (SMD) não classificada

A categoria da SMD não classificada é utilizada quando existem achados clínicos e hematológicos de mielodisplasia, mas sem características específicas que permitam a sua classificação em uma das outras categorias. Usualmente, os pacientes apresentam neutropenia ou trombocitopenia com hipercelularidade da medula óssea e displasia da linhagem granulocítica ou megacariocítica. Existe menos de 5% de blastos na medula óssea, e eles não estão aumentados no sangue.

Síndrome mielodisplásica associada à anormalidade Del(5q) isolada; síndrome 5q

Essa anormalidade clonal apresenta características similares às da ARF, mas com aumento de megacariócitos na medula óssea, usualmente incluindo formas hipolobuladas, e trombocitose periférica. O percentual de blastos é inferior a 5% na medula óssea e no sangue. Agregados linfoides costumam estar presentes. A única anormalidade citogenética é del(5q) entre as bandas 5q31 e 5q33. Em geral, essa síndrome afeta mulheres de meia-idade ou mais velhas e apresenta um prognóstico favorável.

Leucemias mieloides agudas

A leucemia mieloide aguda (LMA) é a forma mais comum de leucemia aguda durante os primeiros meses de vida, mas durante a infância e a adolescência ela representa aproximadamente 1/3 das enfermidades. Na meia-idade e na velhice, ela torna-se a leucemia aguda mais frequente, com uma idade média de 60 anos e uma ocorrência de 10/100.000 por ano na faixa etária acima de 60 anos. Vírus, radiação, quimioterapia citotóxica, benzeno e tabagismo foram ligados ao aumento da incidência, mas a maioria dos casos não está associada a esses fatores.

O início frequentemente assemelha-se ao de uma infecção aguda e inclui sinais de insuficiência granulocítica, com ulcerações de membranas mucosas (em especial na boca e faringe) e febre. O aumento de linfonodos. baço e fígado não é pronunciado. A prostração acentuada e o mal-estar podem estar presentes. Em casos não tratados, a evolução é rapidamente progressiva.

Hoje em dia, a classificação da LMA utiliza uma abordagem de múltiplas camadas que reconhece anormalidades citogenéticas adquiridas recorrentes associadas a tipos específicos, história de fatores predisponentes (antes da terapia citotóxica), associação com a SMD ou anormalidades relacionadas e uma estratificação morfológica para aqueles para os quais nenhuma dessas alterações pode ser observada. Essa abordagem requer, ou pelo menos encoraja, tentativas para definir a morfologia, citogenética e imunofenótico em cada caso. Com os avanços da citogenética molecular e da hibridização fluorescente in situ e a adoção disseminada dessas e de outras técnicas, é provável que a maioria dos casos acabe sendo categorizada pelas suas anormalidades genéticas. O conhecimento dessas alterações é particularmente importante porque as terapias podem visar às vias bioquímicas ou mesmo perturbações do ácido nucleico envolvidas (Gilliland, 2004).

O FAB publicou propostas, em 1976, para a classificação das leucemias agudas (Bennet, 1976) e, posteriormente, revisou os critérios para a classificação da leucemia linfocítica aguda (LLA) (Bennett, 1981) e LMA (Bennett, 1985a,b), baseado na morfologia de células e lâminas de sangue e medula coradas pela técnica de Romanowsky e certas reações citoquímicas suplementares ou nível sérico de lisozima (ver Tabs. 32.14 e 32.15). Esses critérios foram substituídas pela classificação atual da OMS (Brunning, 2001h), mas os princípios morfológicos básicos permanecem e os critérios do FAB são a base para a subtipagem da LMA não classificada por outros critérios.

O diagnóstico de LMA exige a presença de 20% de blastos na medula óssea ou no sangue. Os mieloblastos em geral apresentam núcleos centrais com cromatina fina não condensada e, com frequência, nucléolos proeminentes (usualmente 3 a 5). No entanto, apresentam citoplasma variável e podem apresentar alguns grânulos citoplasmáticos. Mieloblastos primitivos são identificados por anticorpos monoclonais contra antígenos associados às linhagens mieloides (MPO, CD13, CD33, CD117). Mieloblastos mais maduros também podem ser identificados por meio de reações citoquímicas empregando enzimas associadas aos granulócitos, em ensaios de MPO, Sudão black B (SBB) e ASD-cloroacetato esterase (CAE), embora esta técnica esteja sendo gradualmente substituída pelos estudos com citometria de fluxo. Os monoblastos são frequentemente grandes com citoplasma abundante, cromatina difusa e, com frequência, nucléolos proeminentes. Os monoblastos são caracterizados por uma forte reação com α-naftil acetato esterase (ANA), a qual é inibida em monócitos pelo fluoreto de sódio, assim como pela α-naftil butirato esterase (ANB), ou anticorpos que incluem antilisozima, CD68, CD64 e CD36. Para casos com diferenciação monocítica, os pró-monócitos são considerados equivalentes aos blastos (Fig. 32.22). Os pró-monócitos são monócitos imaturos reconhecíveis com alguma condensação de cromatina, mas com convoluções nucleares finas. Os promielócitos anormais também são considerados equivalentes dos blastos para o diagnóstico de leucemia promielocítica aguda. Os megacarioblastos são identificados por anticorpos contra antígenos associados a plaquetas ou pela microscopia eletrônica para plaqueta peroxidase.

A avaliação inicial de um caso de com quadro de LMA baseia-se na contagem de 500 células do aspirado de medula óssea. Em primeiro lugar, é necessário calcular o percentual de células precursoras eritroides. O diagnóstico de LMA-eritroleucemia é estabelecido quando mais de 50% das células da medula óssea são precursores eritroides e quando os mieloblastos representam mais de 20% das células não eritroides remanescente, isto é, células nucleadas que não incluem precursores eritroides, linfócitos ou plasmócitos. O diagnóstico de SMD é sugerido quando menos de 20% das células não eritroides são mieloblastos e existem alterações displásicas. Após o estabelecimento do diagnóstico de LMA, somente células não eritroides devem ser consideradas na contagem diferencial para a determinação do subtipo.

Um achado útil no diagnóstico da LMA é a presença de corpúsculos de Auer, inclusões citoplasmáticas eosinofílicas semelhantes a bastonetes, derivadas de grânulos primários MPO-positivos. Corpúsculos Phi, os quais parecem cordões de grânulos eosinofílicos, derivam de microperoxissomos catalase-positivos e são observados em uma maior quantidade na LMA e também na SMD (Cardullo, 1981). Entretanto, a estes corpúsculos não é atribuída a mesma importância dada aos corpúsculos de Auer. Com a coloração de Romanowsky, os corpúsculos de Auer são inclusões lineares ou fusiformes, vermelho-púrpura, presentes nos mieloblastos ou promielócitos (Fig. 32.23). Eles são observados de forma menos comum em neutrófilos mais maduros (na LMA com t(8;21)). Os corpúsculos de Auer derivam de grânulos azurofílicos e coram positivamente para SBB, MPO, CAE e fosfatase ácida. Eles podem ser encontrados em qualquer subtipo de

Tabela 32.14 Características clínicas e laboratoriais da LMA

Afeta todas as idades, mas aumenta com o decorrer do tempo (> 60 anos).
Pode se assemelhar a uma infecção aguda na primeira manifestação.
Exige a presença de 20% de blastos no sangue ou na medula óssea para o diagnóstico.
Os principais antígenos mieloides são MPO, CD13, CD33, CD117.
Anormalidades citogenéticas frequentes caracterizam certos subtipos.
A classificação é feita por morfologia, citogenética, citoquímica e citometria de fluxo.

Tabela 32.15 Características principais das leucemias mieloides agudas (LMA) mais importantes

Categoria	Morfologia celular	Marcadores de superfície celular	Citogenética	Prognóstico
LMA com t(8;21)	Blastos grandes com abundante citoplasma basofílico, corpúsculos de Auer, displasia, grânulos anormais, granulócitos em fase de maturação	CD 13, 33,117, CD19, CD34	t(8;21)(q22;q22) *AML1/ETO*	Mais favorável que o da LMA sem anormalidade genética recorrente
LMA com inv(16)	Blastos com diferenciação monocítica e neutrofílica, aumento de eosinófilos/eosinófilos imaturos	CD 13, 33, 14, 4, 64	inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22)	Superior ao de outras LMA
Leucemia promielocítica aguda	Promielócitos com grânulos azurófilos, corpúsculos de Auer	CD 13, 33 CD2±, DR–	t(15;17)(q22;q12) *PML/RARα* Todas as variantes envolvem 17q12	Bom se responsiva ao ATRA
LMA com 11q23	Variável. Diferenciação monocítica observada em t(9;11)	CD 13, 33, 34, ± 56, 57. CD 14, 4, 36 sem diferenciação monocítica	t(9;11)(p22;q23), outras	Menos favorável que o de outras LMA
LMA, relacionada à terapia	Displasia de múltiplas linhagens, RS, aumento de basófilos	CD 13, 33, 34, ± 56, 57	Anormalidade de 11q23 observada com AML associada ao inibidor da topoisomerase II	Sobrevida média < 3 anos
LMA, não classificada				
LMA, minimamente diferenciada	M0 em FAB. Mieloblastos, < 3% positivos para SBB, MPO ou ANA	CD 13, 33, 117 em ≥ 20% dos blastos	Inespecífica/indisponível	Ruim
LMA sem maturação	M1 em FAB. Mieloblastos ≥ 90% de não eritroides na medula óssea, ≥ 3% positivos para SBB ou MPO	CD 13, 33, 117	Inespecífica/indisponível	Ruim
LMA com maturação	M2 em FAB. O mesmo para a LMA com t(8;21).	CD 13, 33, 117	Inespecífica/indisponível	Variável. Menos favorável que o da LMA com t(8;21)
Leucemia mielomonocítica aguda	M4 em FAB. Células monocíticas 20-79%, granulocíticas 30-80% de não eritroides	CD 13, 33, 14, 4, 11b, 11c, 64, 36, 68	Inespecífica/indisponível	Variável. Menos favorável que o da LMA com inv(16)
Leucemia monoblástica/ monocítica	M5 em FAB, ≥ 80% das não eritroides são monoblastos (M5a) ou apresentam diferenciação monocítica (M5b)	CD 13, 33, 117, 14, 4, 11b, 11c, 64, 68, 36	t(8;16)(p1l; p13) observada em alguns casos de leucemia monocítica aguda Inespecífica/ indisponível	Ruim
Eritroleucemia	M6 em FAB, ≥ 50% de eritroblastos e ≥ 20% de mieloblastos em não eritroides A eritroleucemia pura sem blastos mieloides é rara	Glicoforina A, HbA em blastos eritroides; CD13, 33, 117 em mieloblastos	Inespecífica	Ruim
Leucemia megacarioblástica aguda	Megacarioblastos polimórficos, podem simular linfoblastos. O sangue periférico pode revelar fragmentos megacariocíticos	CD 41, 61, 36, frequentemente CD13, 33	Inespecífica em adultos. Lactentes podem apresentar t(1;22)(p13;q13)	Ruim, especialmente com t(1;22)

ATRA = ácido all-*trans* retinoico.

LMA, mas estão especialmente associados aos subtipos com diferenciação granulocítica.

As principais categorias de LMA na classificação da OMS são: (1) LMA com anormalidades citogenéticas recorrentes; (2) LMA com displasia de múltiplas linhagens; (3) LMA relacionada à terapia; (4) LMA, não categorizada (subclassificada pela morfologia e pelo imunofenótipo).

Leucemia aguda com anormalidades genéticas recorrentes

LMA com t(8;21) (q21;q22), LMA1/ETO (Brunning, 2001i). A morfologia usualmente corresponde à LMA com maturação neutrofílica, e ela representa de 5 a 12% das leucemias mieloides agudas com predominância em pacientes jovens. Os blastos representam 20% ou mais na medula óssea (ou sangue), e os precursores neutrofílicos em maturação constituem mais de 10% das células nucleadas da medula (não incluindo os eritrócitos nucleados, linfócitos e plasmócitos). São achados morfológicos característicos, mas variáveis: presença de blastos grandes com citoplasma basófilo abundante; precursores de neutrófilos em maturação com basofilia citoplásmica periférica; frequentes corpúsculos de Auer, geralmente longos, pontiagudos e cônicos,

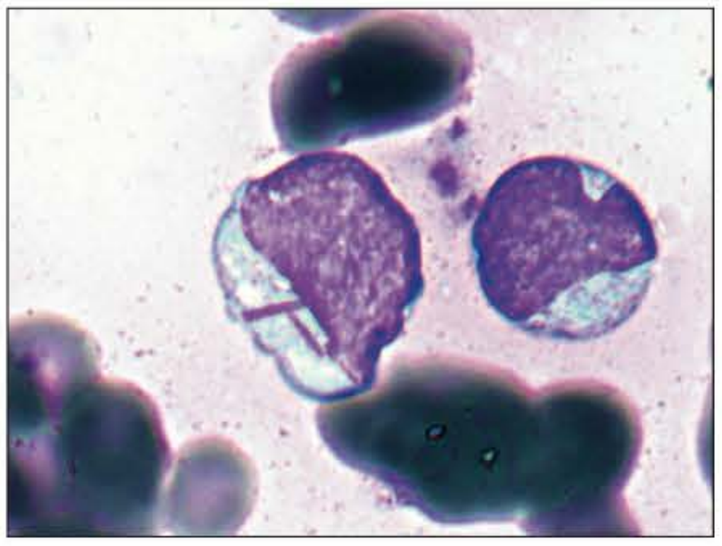


Figura 32.23 Corpúsculos de Auer variam de proeminentes, como nesta célula, a finos e delicados.

algumas vezes presentes em mielócitos e formas maduras, inclusive neutrófilos segmentados; granulação anormal, incluindo grânulos gigantes semelhantes aos de Chédiak-Higashi ou secundários ou granulação secundária homogênea de aspecto céreo; e displasia nuclear

com núcleos bilobados que podem estar bem separados (Fig. 32.24). A monocitose não é proeminente, e os monócitos representam menos de 20% das células na medula óssea. O imunofenótipo é distinto com frequente coexpressão variável de CD19 e CD34 juntamente com marcadores mieloides e, algumas vezes, CD56.

Casos ocasionais de LMA com t(8;21) apresentam diferenciação monocítica, apenas uma discreta diferenciação neutrofílica e menos de 20% de blastos ou manifestam-se com sarcoma granulocítico. O resultado da LMA com t(8;21) costuma ser mais favorável do que o da LMA sem anormalidades genéticas recorrentes ou com anormalidades associadas à SMD.

LMA com inv(16) (p13q22) ou t(16;16) (p13;q22), CBFβ/MYH11. Corresponde à leucemia mielomonocítica aguda com eosinófilos anormais (Bitter, 1984). A ocorrência e o resultado são similares ao da LMA com t(8;21). Esses casos apresentam mais de 20% de blastos na medula óssea e/ou no sangue com diferenciação tanto para a linhagem monocítica quanto para a linhagem neutrofílica (> 20% cada). Ocorre caracteristicamente um aumento de eosinófilos (Fig. 32.25), incluindo aqueles com grânulos basófilos grandes (como nos promielócitos eosinófilos), e, com frequência, uma fraca positividade citoplasmática para cloroacetato esterase. Esse tipo está associado à anormalidade cromossômica inv(16) (p13q22) ou sua variante t(16;16) (p13;q22) com fusão do gene CBFB, em 16q, e do gene MYH11, em 16p, bem como em mRNAs quiméricos resultantes variáveis (por causa dos pontos de quebra diferentes) e uma proteína de fusão BCGB-MYH11. O prognóstico é superior ao de outras leucemias mieloides agudas, e tanto a RT-PCR (reação de cadeia de polimerase para transcriptase reversa) quanto o método FISH (hibridização fluorescente in situ) são úteis para o diagnóstico, sobretudo quando existem poucos eosinófilos ou quando eles não são aparentes.

O imunofenótipo tipicamente revela marcadores granulocíticos (CD13, CD33, MPO) e monocíticos (CD14, CD4, CD64, CD11, CD11b e lisozima), algumas vezes com coexpressão de CD2.

Leucemia promielocítica aguda com t(15;17) (q22;q12), PML/RARA e variantes. Em vez de mieloblastos, a medula óssea apresenta predomínio de promielócitos na leucemia promielocítica hipergranular (M3) (McKenna, 1982) (Fig. 32.26). Grânulos azurofílicos são abundantes e intensamente corados. Corpúsculos de Auer são encontrados em quase todos os casos e, com frequência, são múltiplos (10 ou mais) em uma célula (Fig. 32.26). Complicações hemorrágicas são frequentes em decorrência da coagulação intravascular disseminada (CID) aparentemente iniciada pelo material pró-coagulante dos grânulos das células leucêmicas.

A característica anormalidade cromossômica t(15;17) (q22;q21) mostra a fusão do gene codificador do receptor α do ácido retinoide (RARA, *retinoid acid receptor* α), no cromossomo 17, ao gene PML, no cromossomo 15. O gene da fusão RARA-PML é transcrito como um mRNA quimérico. Em geral, a leucemia responde à terapia com o ácido retinoico *all-trans* (ATRA, *all-trans retinoic acid*), que geralmente é administrado em adição à quimioterapia, e o prognóstico é melhor do que o das outras LMAs. A anormalidade genética molecular pode ser detectada no laboratório pela citogenética, RT-PCR ou FISH. A remissão com frequência ocorre como um processo lento de "maturação" em vez de uma aplasia induzida pela terapia seguida pela remissão observada no tratamento de outras leucemias agudas.

Outras translocações incluem t(11;17) (q23;q21), t(5,17) (q32;q12) e t(11;17) (q13;q21). Algumas variantes, por exemplo, t(11;17) (q23;q21), não respondem ao ATRA.

Existem as variantes hipogranular e microgranular de M3 (M3V). Nelas, os grânulos citoplasmáticos são esparsos na microscopia de luz. Na microscopia eletrônica, eles estão presentes em grande número, mas são menores (Golomb, 1980; Bennet, 1980). A maioria das células leucêmicas apresenta núcleo bilobado ou reniforme, e a confusão com a leucemia monocítica atípica é frequente. As reações de coloração citoquímica são um pouco menos positivas do que na leucemia mielocítica hipergranular M3. Corpúsculos de Auer, únicos ou múltiplos, e promielócitos hipegranulares típicos são observados em quantidade variável e parece haver um espectro entre os tipos hipogranular e típico. A contagem de leucócitos pode estar elevada.

Na leucemia promielocítica aguda, a maioria das células leucêmicas se cora com as técnicas de MPO, SBB e CAE. Em cerca de 25% dos casos, mais de 20% das células leucêmicas se coram forte e difusamente com a técnica de ANA. Entretanto, essas células leucêmicas não apresentam qualquer característica imunofenotípica dos monócitos. Considerando-se os aspectos clínicos, esses casos comportam-se de modo similar ao de outros casos de leucemia promielocítica aguda.

LMA com anormalidades 11q23 (MLL). As anormalidades 11q23 estão presentes em um grupo mais diverso de leucemias que em outras anormalidades genéticas recorrentes. Anormalidades da banda cromossômica 11q23, as quais envolvem o gene MLL, não são específicas da LMA, e também são observadas na LLA, leucemias de linhagens mistas e, ocasionalmente, em linfomas. A translocação mais comum na LMA envolvendo essa região é t(9;11) (p22;q23). Outras translocações incluem t(6;11) (q27;q23), t(10;11) (p12;q23), t(11;17) (q23;q21) e t(11;19) (q23;p13) (Caligiuri, 1997). A maioria dos casos de t(9;11) apresenta diferenciação monocítica (monoblástica ou mielomonocítica) (Fig. 32.27). Em geral, o prognóstico da LMA com anormalidades de 11q23 é menos favorável que o das outras LMAs com quimioterapia padrão, mas existem evidências de que crianças com t(9;11) respondem de modo similar ao dos pacientes sem anormalidades de 11q23 (Martinez-Climent, 1999).

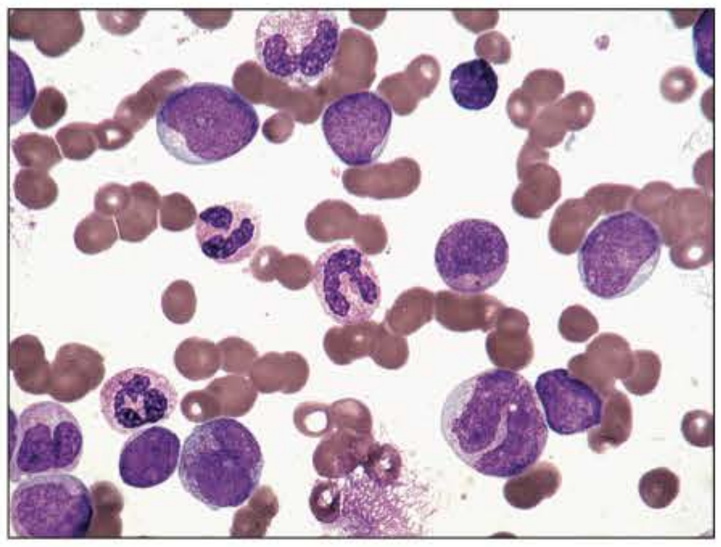


Figura 32.24 Este caso de LMA com t(8;21) apresenta maturação de granulócitos com granulação anormal e precursores bilobulados (×500).

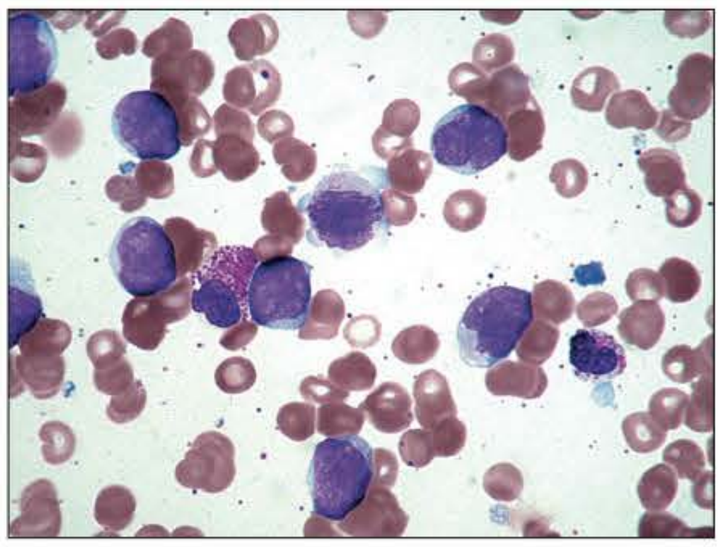


Figura 32.25 LMA com inv16 apresentando diferenciação mielomonocítica com eosinofilia (dois eosinófilos estão presentes nesta imagem).

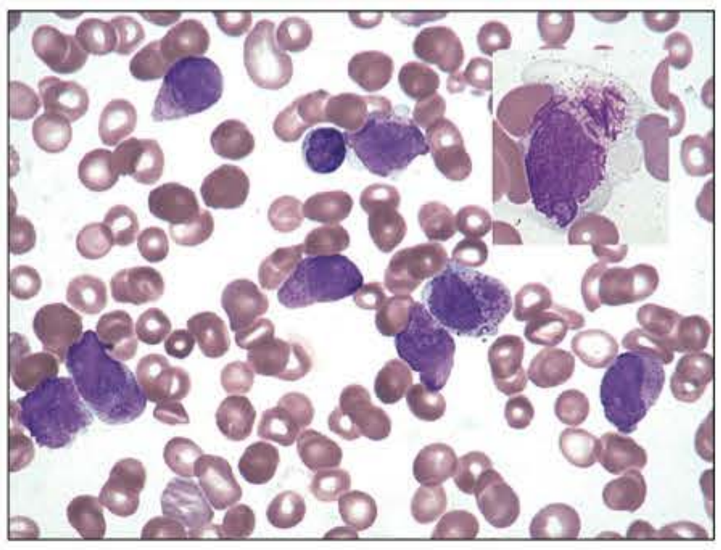


Figura 32.26 Leucemia promielocítica aguda com t(15;17) mostrando promielócitos predominantemente anormais (×500). Inserção: promielócitos anormais com feixes de corpúsculos de Auer são conhecidos como "células em feixe", dada a semelhança com feixes de lenha (×1000).

LMA com displasia de múltiplas linhagens (Brunning, 2001j)

Essas leucemias originam-se de uma SMD ou são primárias, mas compartilham características com a SMD. Tipicamente, elas ocorrem em indivíduos idosos e apresentam um mau prognóstico. São caracterizadas pela presença de 20% ou mais de blastos no sangue e/ou na medula óssea, assim como por uma displasia em mais de 50% das células de pelo menos duas linhagens. Casos de eritroleucemia (ver critérios a seguir) e displasia superior a 50% dos granulócitos ou megacariócitos também são classificados como LMA com displasia de múltiplas linhagens. As características displásicas são similares àquelas de vários tipos de SMD (Fig. 32.28).

Anormalidades citogenéticas, também observadas na SMD, incluem: 3q-, -5, -7, 7q-, +8, +9, 11q-, 12p-, -18, +19, 20q-, +21, t(1;7), 5(2;11), anormalidades de 3q26 (associadas à trombocitose) e cariótipos complexos. O imunofenótipo com frequência inclui blastos primitivos com fenótipo mieloide e expressão de CD34, CD56 e/ou CD7.

LMA e SMD, relacionadas à terapia (Brunning, 2001k)

Estes distúrbios estão relacionados à quimioterapia ou radioterapia citotóxica prévia. São divididos em dois tipos: relacionados a agentes alquilantes ou à radiação; e secundários ao uso de inibidores de topoisomerase.

LMA/SMD associada a agente alquilante. Estão relacionadas aos efeitos mutagênicos de agentes alquilantes (incluindo o clorambucil, ciclofosfamida, tiotepa e bussulfano) ou da radiação. Em geral, ocorrem 5 a 6 anos após a exposição e, mais frequentemente, a manifestação é de uma SMD. A característica mais comum é uma citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens, com ou sem sideroblastos em anel, seguida por uma ARF com excesso de blastos do tipo 1 ou 2. Sideroblastos em anel ocorrem em 2/3 dos casos (1/3 dos pacientes apresenta mais de 15% de sideroblastos em anel), e o aumento de basófilos é comum, embora os corpúsculos de Auer sejam inferequentes. As características citogenéticas são similares às da SMD e da LMA com displasia de múltiplas linhagens. A resposta à terapia e o resultado final são ruins.

LMA relacionada ao inibidor da topoisomerase II. A quimioterapia prévia com inibidores da topoisomerase II (incluindo as epipodofilotoxinas etoposídeo e teniposídeo e a doxorrubicina) também está associada à leucemia secundária (LLA ou LMA), mas, em geral, diferentes anormalidades citogenéticas estão envolvidas: anormalidades de 11q23 (MLL) incluindo t(9;11) t(11;19) e t(6;11), assim como t(3;21), t(8;21), inv(16) ou t(15;17). O período de latência após a terapia é também mais curto, em média inferior a 3 anos. A morfologia é, com mais frequência, monoblástica ou mielomonocítica. A resposta à terapia é possivelmente similar à LMA primária.

LMA não classificada (Brunning, 2001l)

Esses casos não preenchem os critérios para as categorias prévias ou os estudos citogenéticos foram malsucedidos ou não puderam ser realizados. A categorização é similar à dos critérios do Grupo Cooperativo FAB.

Leucemia mieloblástica aguda minimamente diferenciada. Nesta categoria, os mieloblastos apresentam positividade inferior a 3% com SBB, MPO ou ANA (Bennett, 1991). No entanto, com o uso de citometria de fluxo ou imuno-histoquímica com marcadores mieloides e linfoides, pelo menos 20% dos blastos apresentam antígenos associados à linhagem mieloide (CD13, CD33, CD117 e/ou MPO). Antígenos de células-tronco CD34, CD38, HLA-DR e TdT são frequentemente expressos, enquanto marcadores linfoides cCD3, cCD20 e cCD79 específicos da linhagem estão ausentes. Alguns marcadores primitivos em geral associados à linhagem linfoide, incluindo CD2, CD7 e CD19, não são linhagem-específicos e algumas vezes são expressos (Fig. 32.29).

Leucemia mieloblástica aguda sem maturação (M1). Nesta categoria, os mieloblastos representam pelo menos 90% das células não eritroides na medula óssea (Bennett, 1985a,b), e pelo menos 3% dos blastos se coram com MPO ou SBB. Algumas vezes, a coloração é positiva para CAE, mas é menos sensível. Antígenos CD13, CD33, CD117 e/ou MPO são usualmente detectáveis, assim como outros marcadores menos específicos. CD3, CD20 e CD79a estão em geral ausentes (Fig. 32.30).

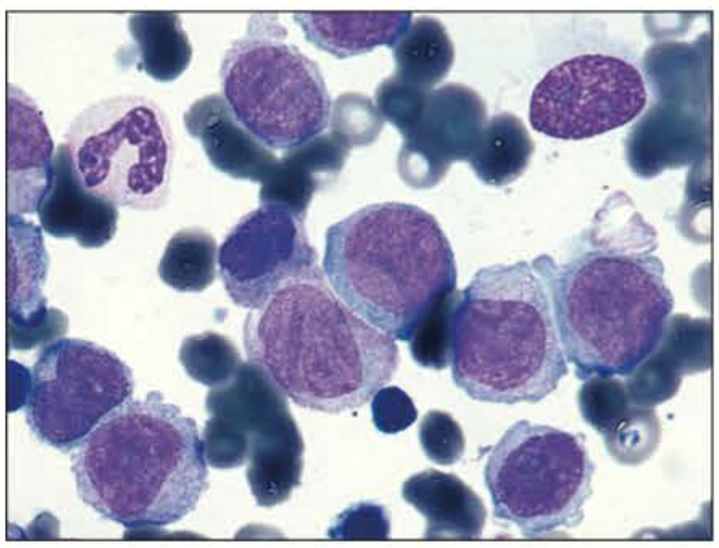


Figura 32.27 LMA com diferenciação monocítica e anormalidade de 11q23 (×1.000).

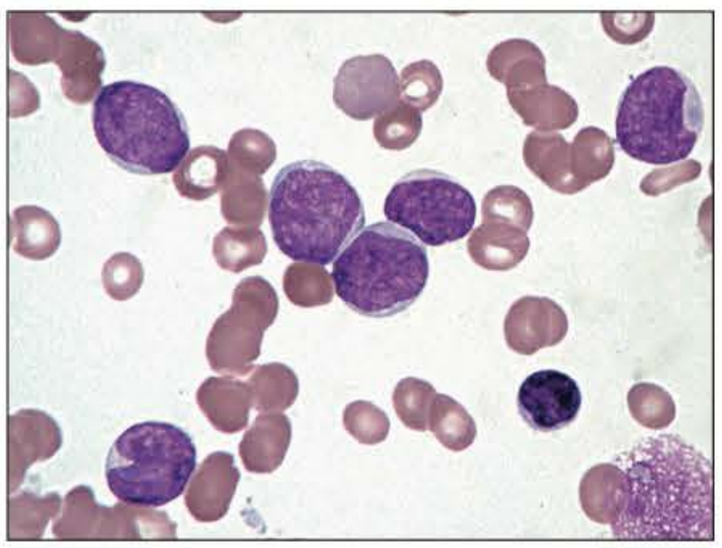


Figura 32.29 A LMA minimamente diferenciada se parece com a LLA e exige a imunofenotipagem para o diagnóstico (×500).

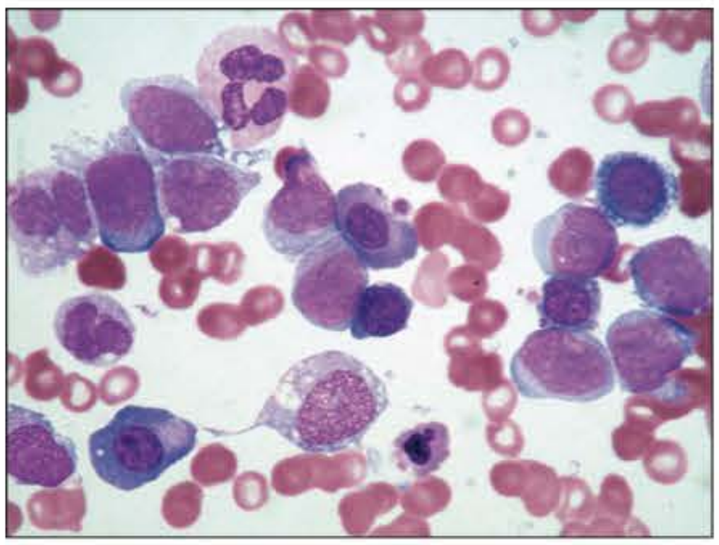


Figura 32.28 LMA com displasia de múltiplas linhagens apresentando disgranulopoese e diseritropoese (×1.000).

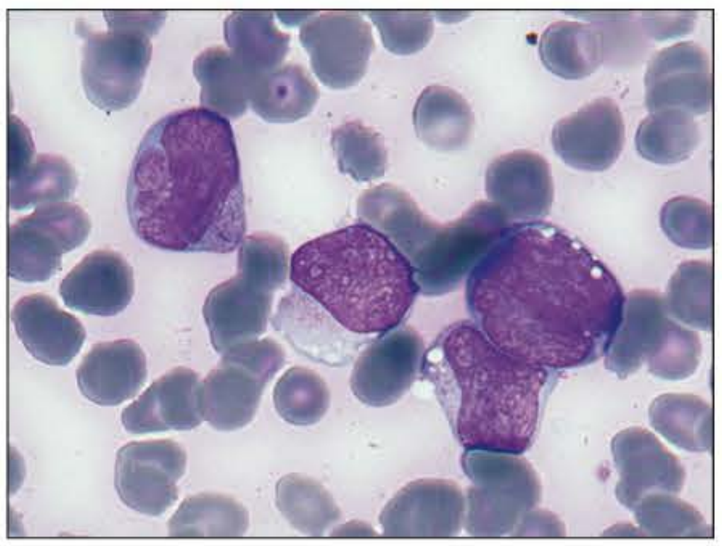


Figura 32.30 LMA sem maturação apresentando blastos com menos de 10% de neutrófilos em maturação. Corpúsculos de Auer estão presentes na célula localizada na parte superior esquerda.

Leucemia mieloblástica aguda com maturação. Os mieloblastos representam de 20 (segundo a OMS) a 80% do total de células da medula óssea; a quantidade de granulócitos, desde promielócitos a neutrófilos, é superior a 10% do total de células não eritroides; e os monócitos e suas células precursoras representam menos de 20% (Fig. 32.31). A maioria dos blastos se coram com MPO, SBB e CAE.

Casos com t(8;21)(q22;q22) são categorizados como LMA sem anormalidade citogenética t(8;21) recorrente.

Leucemia mielomonocítica aguda. Na leucemia mielomonocítia aguda, os mieloblastos representam mais de 20% do total de células da medula óssea. A soma de monoblastos, promonócitos e monócitos é superior a 20%, mas inferior a 80% das células não eritroides. As células da série granulocítica (mieloblastos, promielócitos, mielócitos e outras formas mais maduras) também representam 20 a 80% das células não eritroides (Fig. 32.32). Usualmente, ocorre monocitose ($> 5 \times 10^9$/L) no sangue periférico.

Na leucemia mielomonocítica ocorre uma coloração variável das células leucêmicas com MPO, SBB, CAE e ácido periódico de Schiff (PAS, *periodic acid-Schiff*). Na maioria dos casos, as células leucêmicas apresentam uma coloração difusa e intensa com ANA e ANB. Em alguns casos, essas esterases inespecíficas não podem ser demonstradas, e o diagnóstico pode ser feito com a coloração de Romanowsky e/ou com a imunofenotipagem.

Os marcadores imunológicos são variáveis, mas geralmente apresentam antígenos mieloides CD13 e/ou CD33, assim como uma expressão variável de marcadores monocíticos CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36, CD68 e lisozima. Alguns mieloblastos puros podem estar presentes, incluindo aqueles com expressão de CD34 e CD117 e uma segunda população de monócitos com maturação variável. Casos com anormalidades genéticas recorrentes são categorizados de modo separado.

Leucemia monoblástica aguda e monocítica aguda. Neste distúrbio, 80% ou mais das células não eritroides da medula óssea são monoblastos, pró-monócitos ou monócitos (Figs. 32.22 e 32.33). Dois subtipos foram reconhecidos. O subtipo monoblástico é caracterizado pela presença de blastos grandes que representam 80% ou mais das células monocíticas da medula óssea. O subtipo monocítico apresenta menos monoblastos (< 80% das células monocíticas da medula óssea) e mais pró-monócitos e monócitos (Bennett, 1985a). Em ambas, ANA e ANB coram as células leucêmicas difusa e intensamente (80% ou mais das células leucêmicas). Casos ocasionais não coram com esterases inespecíficas, e o diagnóstico é feito com a coloração de Romanowsky e/ou com técnicas de imunofenotipagem. Antilisozima e CD68 são particularmente úteis em lâminas. Tanto os marcadores mieloides quanto os monocíticos são expressos com frequência, como na leucemia mielomonocítica aguda. A translocação t(8;16) (p11;p13) tem sido associada à LMA-M5 (ou M4) com eritrofagocitose.

Eritroleucemia. O diagnóstico de eritroleucemia é feito quando mais de 50% das células nucleadas da medula óssea são eritroblastos e 20% ou mais das células não eritroides são mieloblastos. Na maioria dos casos, denominados eritroleucemia (eritroide/mieloide), ocorre uma mistura de proporções variáveis de precursores eritroides e mieloblastos (alguma vezes, elementos monocíticos e megacariocíticos anormais também estão presentes) (Fig. 32.34).

Em raríssimos casos praticamente não há envolvimento granulocítico no processo neoplásico e ocorre uma predominância de eritroblastos primitivos. Isso foi denominado *mielose eritrêmica*, e hoje é conhecido como leucemia eritroide pura. Anormalidades morfológicas dos eritroblastos são com frequência pronunciadas com características megaloblásticas atípicas, formas nucleares bizarras e formas gigantes multinucleadas. O citoplasma pode conter peseudópodos e/ou vacúolos, em particular nos pró-eritroblastos e eritroblastos basófilos.

Em alguns casos, as células eritroides podem apresentar uma forte positividade citoplásmica para o PAS (Fig. 32.35). Ela é granular em precursores eritroides iniciais e difusa nos estágios posteriores. Precursores eritroides são PAS-negativos em indivíduos normais e, na maioria das doenças, incluindo a anemia megaloblástica nutricional. No entanto, eles são algumas vezes positivos na anemia ferropriva, talassemia e ARF com sideroblastos em anel. Na eritroleucemia, os mieloblastos usualmente se coram com SBB, MPO e CAE. Um com-

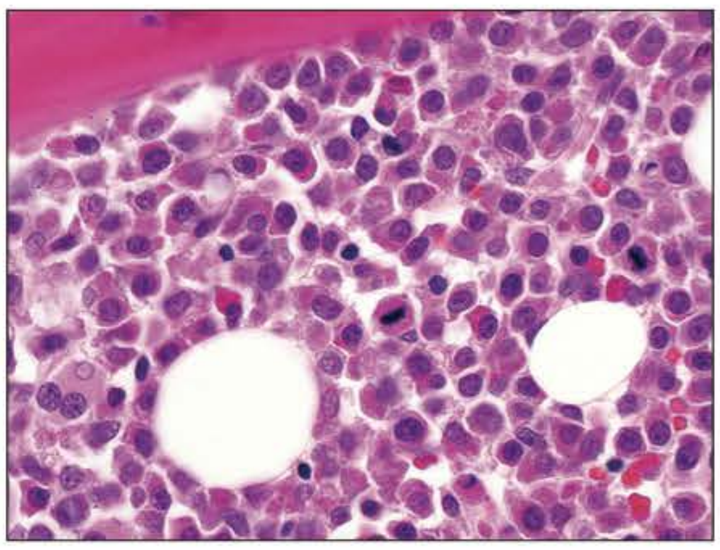


Figura 32.31 LMA com maturação apresentando células granulocíticas em maturação nesta biópsia (×200).

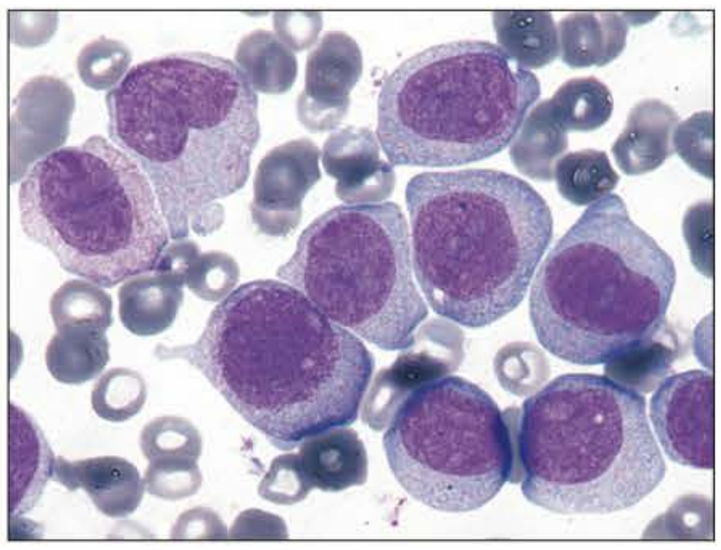


Figura 32.33 Leucemia monoblástica aguda apresentando predominantemente monoblastos (×1.000).

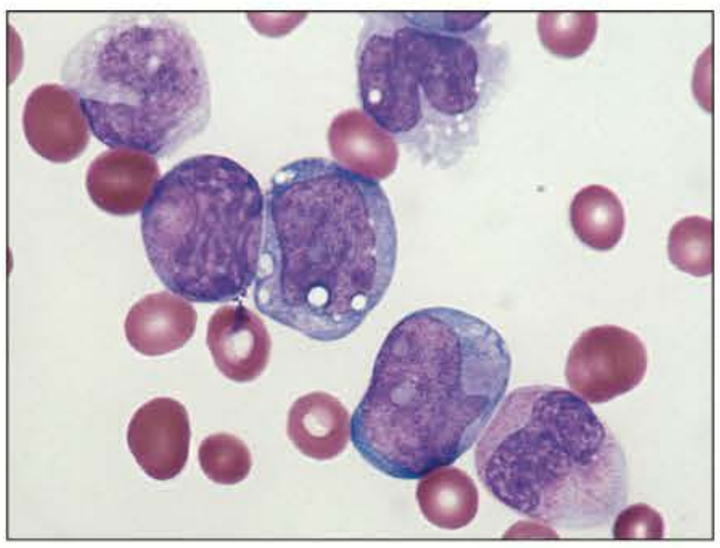


Figura 32.32 Leucemia mielomonocítica aguda apresentando blastos e diferenciação dual para granulócitos e monócitos (×1.000). Leucemia monocítica aguda apresentando monoblastos e monócitos em maturação. Promonócitos são contados como blastos e apresentam núcleos finamente convolutos (×1.000).

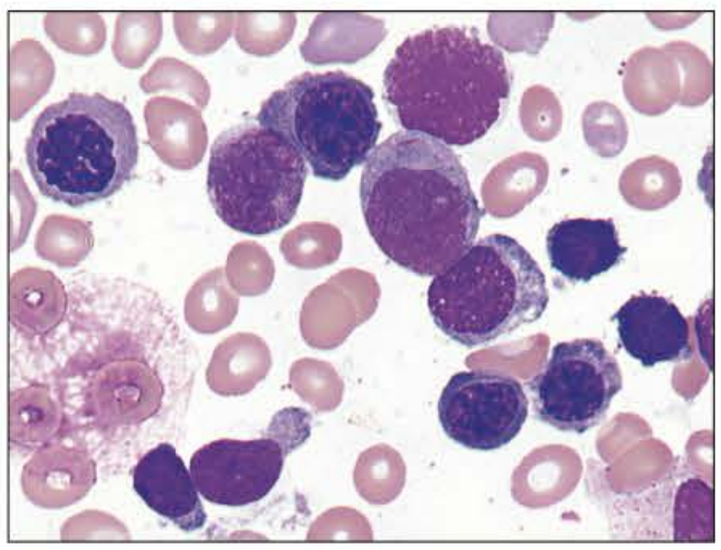


Figura 32.34 Eritroleucemia, eritroide/mieloide, apresentando predominância de precursores eritroides com mieloblastos, que representam 20% ou mais das células não eritroides. Um corpúsculo de Auer é observado no blasto localizado na parte central superior (×1.000).

ponente monocítico positivo para esterase inespecífica também pode estar presente. Precursores eritroides neoplásicos também são algumas vezes positivos para ANA e ANB (Hayhoe, 1984).

Leucemia megacarioblástica aguda. O diagnóstico de leucemia megacarioblástica aguda, como outras formas de LMA, requer a presença de ≥ 20% de blastos na medula óssea. Os megacarioblastos são muito polimórficos; alguns blastos simulam linfoblastos, enquanto outros são maiores e apresentam pseudópodos ou projeções citoplasmáticas filamentares. O citoplasma é em geral azul-claro e pode ou não possuir grânulos (Fig. 32.36). Os núcleos frequentemente apresentam de 1 a 3 nucléolos. Micromegacariócitos podem estar presentes, e não são contados como blastos.

Os blastos são indiferenciados do ponto de vista citoquímico. Eles não se coram com SBB, MPO, CAE ou ANB. No entanto, são positivos para ANA em um padrão citoplasmático focal (Fig. 32.37). A reação de PAS revela uma coloração granular difusa e periférica (com frequência em grandes blocos).

A linhagem megacariocítica é mais frequentemente (Bennett, 1985b) demonstrada pela imunofenotipagem utilizando anticorpos monoclonais contra glicoproteínas Ib (CD41) ou IIb/IIIa (CD61) de plaquetas (Erber, 1987). Os blastos em geral também são positivos para antígenos mieloides CD13 e CD33 e, caracteristicamente, para CD36. Deve-se ter cuidado para diferenciar essa doença da LMA com diferenciação mínima pela citometria de fluxo que, por sua vez, pode revelar positividade falsa para marcadores de plaquetas por causa da adesão de plaquetas aos blastos. Isso pode ser feito pelo exame imunoquímico de amostras citocentrifugadas. Células verdadeiramente positivas apresentam marcadores de membrana e/ou citoplasmática em vez de plaquetas aderentes.

No sangue periférico, em geral há pancitopenia com leucopenia e anemia acentuadas. Fragmentos megacariocíticos algumas vezes estão presentes no sangue. A medula óssea apresenta mielofibrose variável, algumas vezes pronunciada, frequentemente resultando em tentativas inúteis para se obter lâminas de aspirado de medula óssea.

A agregação de blastos pode simular um tumor metastático, por exemplo, neuroblastoma ou carcinoma de pequenas células. Lactentes com t(1;22) (p13;q13) com frequência apresentam infiltração medular que simula neuroblastoma.

Crianças jovens (1 a 4 anos de idade) com síndrome de Down (trissomia 21) apresentam um aumento da incidência de leucemia megacarioblástica que pode ser transitória e apresentar remissão espontânea em 1 a 3 meses. Podem ocorrer recaídas subsequentes transitórias ou persistentes. Além disso, os blastos tendem a apresentar características eritroides, indicando derivação de um precursor eritroide/megacariocítico multipotencial (Zipursky, 1992). Esses pacientes costumam responder bem à terapia, mas a sua tolerância à terapia intensiva é menor que a dos outros (Gamis, 2004).

Leucemia basofílica aguda. A leucemia basofílica aguda é uma forma rara de LMA na qual as células blásticas diferenciam-se ao longo da linhagem basófila. O sangue periférico usualmente apresenta anemia e trombocitopenia com leucocitose. A medula óssea é infiltrada por células blásticas que simulam linfoblastos ou mieloblastos. Em geral, os blastos são negativos para Sudan black B e MPO. Pode haver um aumento de basófilos maduros ou de blastos que se coram com azul de toluidina. O diagnóstico historicamente baseia-se na identificação de blastos com grânulos basofílicos por meio de métodos ultraestruturais (Brunning, 1994).

Panmielose aguda com mielofibrose. Trata-se de uma forma rara de leucemia aguda com proliferação panmieloide e fibrose medular. Tipicamente, existe uma pancitopenia. Os eritrócitos apresentam uma poiquilocitose mínima, mas é comum observar características displásicas em células mieloides, assim como plaquetas atípicas.

A amostra de aspirado de medula óssea com frequência revela ausência de células. Na biópsia, são observados aglomerados de blastos, precursores eritroides tardios e megacariócitos displásicos sobre um fundo variavelmente fibrótico (Fig. 32.38). Isso é diferenciado da leucemia megacarioblástica aguda pelo envolvimento das 3 linhagens mieloides em vez de apenas a linhagem megacariocítica.

Sarcoma granulocítico. Essa neoplasia também foi denominada sarcoma mieloblástico, tumor de células mieloides extramedular e cloroma. Ela representa um tumor localizado de mieloblastos ou monoblastos que se infiltram em locais extramedulares (Fig. 32.39). Foi relatado que esses tumores ocorrem na pele, linfonodos, tecidos nasofaríngeos e das vias respiratórias superiores, mamas, ovários, ossos, estruturas perineurais e epidurais, olhos e outras estruturas orbitárias

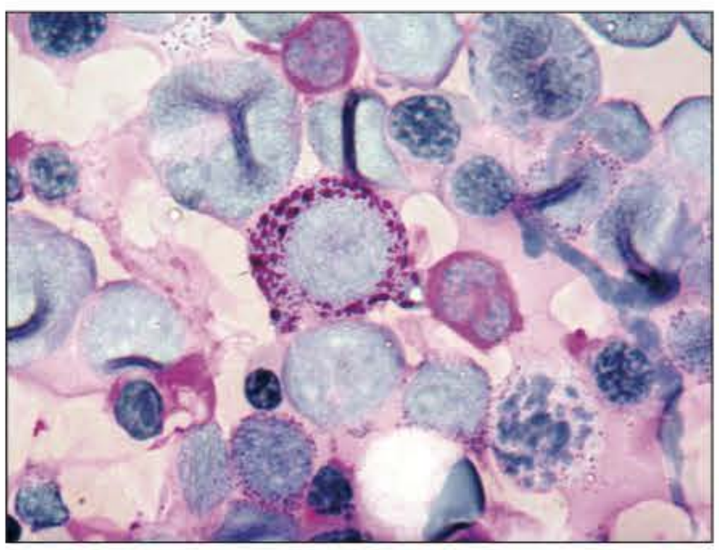


Figura 32.35 Grânulos grosseiros PAS-positivos são frequentemente observados em precursores eritroides na eritroleucemia (×1.000).

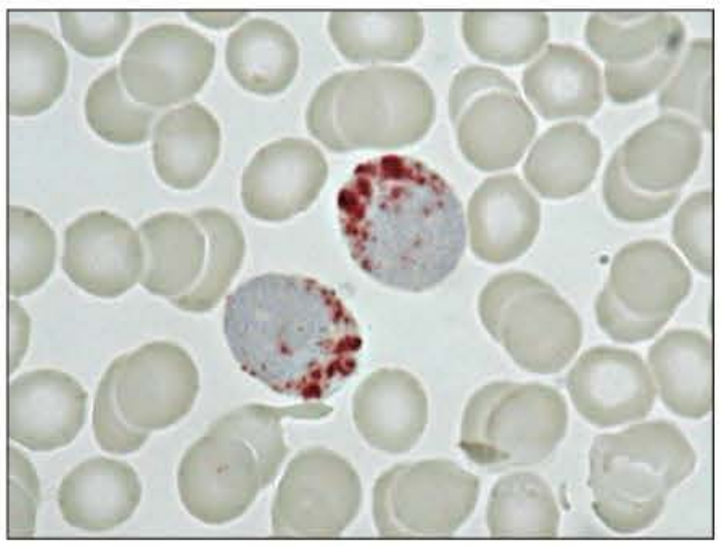


Figura 32.37 Grânulos ANA-positivos em megacariócitos.

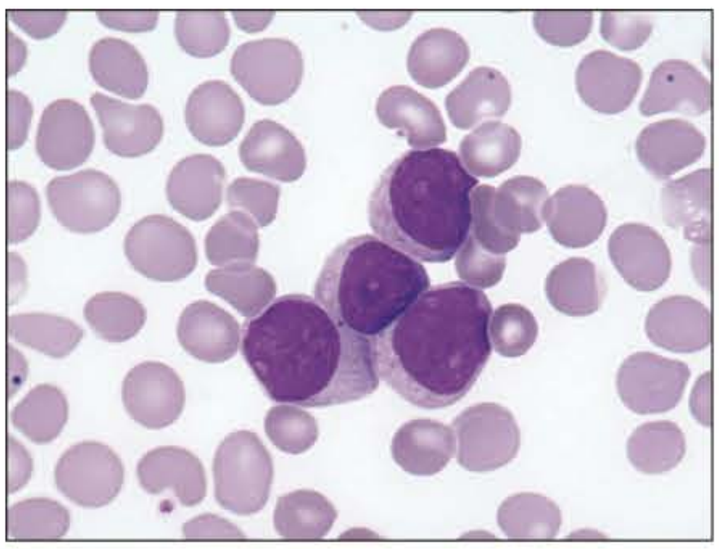


Figura 32.36 Algumas vezes, os blastos se agrupam na leucemia megacariocítica aguda (×1.000).

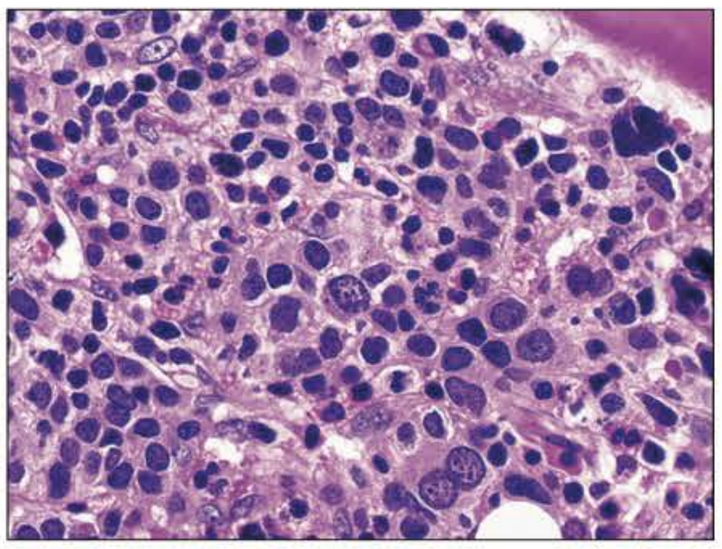


Figura 32.38 Panmielose aguda com mielofibrose apresentando envolvimento das três linhagens mieloides, com fibrose (×200).

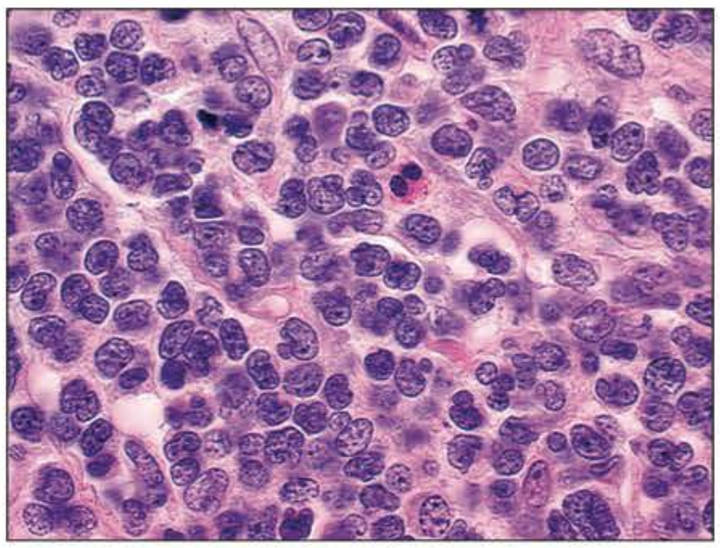


Figura 32.39 Sarcoma granulocítico, neste caso de pele, assemelhando-se a um linfoma, mas com células blásticas ou monocitoides grandes. Eosinófilos ou precursores estão frequentemente presentes (×500).

e vários tecidos moles (Neiman, 1981). Sarcomas granulocíticos foram relatados em 3 a 8% dos casos autopsiados de leucemia mielógena crônica e podem preceder a ocorrência de LMA em menos de 1% dos casos (Muss, 1973).

Sarcomas granulocíticos podem ocorrer em qualquer idade. Foram identificadas 3 situações clínicas : (1) nenhuma doença conhecida; (2) distúrbio mieloproliferativo conhecido; e (3) LMA (Neiman, 1981). O diagnóstico depende do reconhecimento da natureza das células primitivas que frequentemente podem ser confundidas com tumores sólidos, incluindo linfomas não Hodgkin, melanomas amelanóticos ou carcinoma indiferenciado (Hutchison, 1990). O diagnóstico é facilitado pela realização de *imprints* de cortes do tumor e coloração com corante de Romanowsky e pela imunofenotipagem. Anti-MPO e CD68 são particularmente úteis para a linhagem granulocítica ou monocítica em cortes de parafina.

Leucemias agudas de linhagem ambígua (Brunning, 2001m)

Alguns casos de leucemia aguda apresentam características que são indeterminadas entre a linhagem linfoide e a mieloide ou apresentam características de mais de uma linhagem. Trata-se de uma área controversa em razão da dificuldade de classificação. Muitas leucemias que parecem ser de uma determinada linhagem apresentam um ou mais marcadores imunológicos aberrantes ou apresentam infidelidade de linhagem. Um único desses marcadores em geral é insignificante. A LLA com marcadores mieloides responde de maneira similar às outras LLAs, e marcadores linfoides da LMA também são clinicamente importantes, sobretudo quando eles ajudam a definir um subtipo, por exemplo, a expressão de CD19 na LMA com t(8;21). O CD117 foi proposto como um bom indicador da linhagem mieloide (Bene, 1998). Para casos que são verdadeiramente ambíguos, um sistema de pontuação foi aceito pela classificação da OMS (Tab. 32.16) (Anon, 1998).

As leucemias agudas ambíguas encontram-se em várias categorias, como explicado a seguir.

Leucemia aguda indiferenciada. São leucemias agudas raras nas quais as células predominantes são formas blásticas que não podem ser classificadas com o uso de métodos morfológicos, citoquímicos, ultraestruturais, imunológicos ou de análise de DNA (Raghavachar, 1986; Sobol, 1988). CD34, CD38, HLA-DR são expressos com frequência, enquanto a expressão de CD7 e TdT é ocasional. Podem ocorrer anormalidades envolvendo os cromossomos 13, 12 ou a região 5q (Cuneo, 1996).

Leucemia aguda bilinear. Esses distúrbios raros apresentam células de mais de uma linhagem hematopoética distinta, incluindo a linhagem mieloide e linfoide ou de células B e T.

Leucemia bifenotípica. Esses casos apresentam uma população de células leucêmicas com expressão de múltiplas linhagens (linhagem mista). Esse termo é reservado para aqueles casos com marcadores específicos de múltiplas linhagens. Casos foram identificados em pacientes pediátricos e adultos (Sobol, 1987; Stass, 1986; Cheson, 1990).

Tanto a leucemia bilinear quanto a bifenotípica com frequência apresentam anormalidades citogenéticas. O cromossomo Philadelphia está associado a casos que apresentam um componente linfoblástico precursor B CD10+ e t(4;11) (q21;q23) ou outra anormalidade de 11q23 com linhagem de precursor B CD10 negativo e linhagem monocítica. É frequente a presença de arranjo da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH) e de genes de receptor da célula T (TCR), mas esses achados são inespecíficos e podem ser observados em outras LMAs (Adriaansen, 1991).

Tabela 32.16 Sistema de pontuação de marcadores de linhagem da leucemia aguda

Pontuação	Linfoide B	Linfoide T	Mieloide
2	CytCD79a Cyt IgM CytCD22	CD3(m/cyt) Anti-TCR	MPO
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD117 CD13 CD33 CD65
0.5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

Linhagem mieloide (AML-M0) = pontuação mieloide ≥ 4 e pontuação linfoide ≤ 3*
Linhagem linfoide (T ou B) = pontuação linfoide ≥ 4 e pontuação mieloide ≤*
Linhagem bifenotípica = pontuação linfoide T ou B e pontuação mieloide > 2 (mas < 4)†

* Thalhammer-Scherrer R, Mitterbauer G, Simonistsch I, et al: The immunophenotype of 325 adult acute leukemias. Am J Clin Pathol 2002; 117:380–389.

† EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukaemias): The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. Leukemia 1998; 12:2038.

Neoplasias de precursores de células B e T (linfoblásticas)

Historicamente, as leucemias linfoides e os linfomas foram classificados de modo separado. Leucemias são processos malignos que envolvem sobretudo a medula óssea e o sangue e foram mais extensamente categorizados pelo grupo FAB. Linfomas são aqueles que envolvem sobretudo órgãos linfoides ou outros tecidos moles e para os quais foram criados numerosos esquemas de classificação que evoluíram de modo rápido por causa dos avanços da imunologia, oncologia e genética. Desde a publicação da classificação Revised European-American Lymphoma (REAL) (Harris, 1994), as leucemias linfoides e os linfomas foram classificados pelas características biológicas da doença e não pela distribuição anatômica; em geral, provê um consenso internacional de classificação (Berard, 1997). A classificação da OMS é focada nos achados citogenéticos e moleculares sempre que possível (Brunning, 2001n,o).

Linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células B

Caracaterísticas clínicas. Esta categoria de processos malignos mais frequentemente manifesta-se como uma leucemia e é o protótipo da leucemia linfoblástica aguda (LLA). O outro tipo principal de LLA é o linfoblástico de precursores de células T, o qual é menos comum e tende a se manifestar como linfoma ou, de forma concomitante, como leucemia e linfoma. De modo geral, considera-se a LLA uma entidade clínica que é sutipada patologicamente e justifica uma análise geral.

A leucemia linfoblástica aguda é o processo maligno mais comum em crianças e adolescentes. Ocorrem de 3.000 a 4.000 casos novos por ano nos Estados Unidos, 2/3 dos quais são crianças. A evolução do tratamento com combinação de quimioterapia, tratamento do SNC e terapia intensificada para categorias de alto risco levou a taxa de cura para cerca de 80% em crianças. Em adultos, somente 30 a 40% dos casos são curados, em parte por causa da maior frequência de anormalidades genéticas adversas (Pui, 2004). A incidência de LLA no adulto aumenta na meia-idade e na velhice, de forma similar à LMA geneticamente de alto risco. Indivíduos com esse distúrbio costumam apresentar sintomas de fadiga, febre e sangramento. Linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e hepatomegalia são achados comuns.

Como as células leucêmicas se infiltram em muitos tecidos do corpo, outros sintomas podem ocorrer. A dor em membro inferior pode estar associada a infiltrados periosteais, e a cefaleia, náusea e vômito, à leucemia meníngea. Uma perda de consciência de início rápido pode indicar hemorragia subaracnoide.

Em alguns casos, a manifestação é cutânea, óssea e/ou em linfonodos, sem envolvimento da medula óssea (< 25% de blastos na medula óssea). Esses casos são designados como linfoma. Mais frequentemente, eles ocorrem em indivíduos jovens (< 18 anos) e apresentam características que se sobrepõem às da LLA de precursores de células B, com TdT, marcadores da linhagem B e frequente material adicional no cromossomo 21 (Maitra, 2001). A morfologia em cortes de tecidos apresenta infiltrações difusas de pequenas células (núcleos menores que os núcleos de histiócitos) com cromatina difusa, nucléolos não perceptíveis, citoplasma escasso, alta taxa mitótica e, com frequência, um padrão de "céu estrelado" de histiócitos misturados (indicando alta taxa de apoptose).

A anemia está presente na LLA de precursores de células B quando as manifestações clínicas estão completamente desenvolvidas. Em geral, ela é normocítica. Com frequência, eritrócitos nucleados estão presentes. A trombocitopenia de grau moderado a acentuado é a regra. A contagem de leucócitos às vezes é muito alta (> 100×10^9/L) e, com frequência, é discretamente elevada, mas o mais comum é ela estar normal ou diminuída. A célula predominante é o linfoblasto.

Medula óssea. No momento em que o paciente se torna sintomático, as células hematopoéticas e a gordura costumam ser substituídas por uma infiltração difusa de linfoblastos. O percentual de blastos costuma ser superior a 50%. A predominância de blastos pequenos com uma relação núcleo/citoplasma elevada e nucléolos não perceptíveis (tipo L1 na classificação FAB) é mais comum na LLA infantil (Fig. 32.40). A cromatina é difusa em algumas células, mas também pode apresentar condensação variável. Pode ser difícil distinguir os blastos dos linfócitos normais em crianças jovens. Blastos maiores com citoplasma mais abundante, nucléolos proeminentes e núcleos frequentemente irregulares (FAB L2) também ocorrem e tendem a predominar na LLA do adulto.

Os blastos são negativos para SBB, peroxidase e naftol ASD CAE. Grânulos azurofílicos podem estar presentes, contudo são negativos para SBB e peroxidase. Em outros casos, blastos da LLA podem apresentar alguma reatividade ao SBB, mas são peroxidase-negativos.

Em geral, os blastos expressam TdT, CD22 e CD79a citoplasmáticos, CD19 e HLA-DR. O CD10 (comum ao antígeno da LLA) é expresso em muitos. Observa-se uma expressão variável para CD34. A cadeia pesada mu da imunoglobulina citoplasmática (cyt-mu) indica um estado levemente mais maduro, porém a imunoglobulina de superfície é negativa. Antígenos associados mieloides CD13, CD33 ou CD15 podem ser expressos.

Citogenética. Achados citogenéticos são cada vez mais importantes no diagnóstico e prognóstico da LLA e foram revisados previamente (Brunning, 2001n; Mrozek, 2004). A translocação t(12;21) (p12;q22) ocorre em cerca de 25% das leucemias linfoblásticas de precursor B, correlaciona-se com a expressão de CD10 e HLA-DR de alta densidade com CD9 e CD20 negativos e está associada a um bom prognóstico. O gene TGEL, em 12p12, está fundido ao gene AML1, em 21q22, resultando em uma proteína de fusão. É difícil determinar a anormalidade pela cariotipagem, contudo, é possível detectá-la por análise de RT-PCR para o mRNA quimérico ou pelo método FISH.

O cromossomo Ph', t(9;22) com produção de uma fusão BCR-ABL, ocorre em aproximadamente 30% dos casos de LLA adulta (20% detectados na cariotipagem) e 6% dos casos de LLA infantil. A t(9;22) é a translocação mais frequente da LLA adulta e está associada a um mau prognóstico. Dois tipos são encontrados: um idêntico ao da LMCm envolvendo a região bcr do BCR com consequente proteína de fusão p210 kd, que ocorre em metade dos casos de LLA adulta positiva para o cromossomo Ph'; e um outro com ponto de quebra da montante do bcr, produzindo uma menor mensagem quimérica e proteína p190 kd. Esta última ocorre na maioria dos casos infantis positivos para o cromossomo Ph'. A LLA Ph'-positiva é mais frequentemente da linhagem de precursores da célula B, mas também pode estar presente com diferenciação bifenotípica mieloide.

Anormalidades do gene MLL na região cromossômica 11q23 são observadas em de 5 a 7% dos casos de LLA (Le Beau, 2000), assim como na LMA. A LLA com t(4;11) (q21;q23) está associada a um mau prognóstico, alta CBS e fenótipo de linhagem B imatura com ausência de CD10. É mais comum em lactentes, e muitos casos de LLA com essa anormalidade são bifenotípicos. A t(11;19) (q23;p13.3) é a próxima anormalidade mais frequente do MML na LLA, mas também ocorre na LMA-M5. De modo geral, anormalidades de 11q23 (MLL), com a possível exceção de t(9;11) na LMA, representam um mau prognóstico.

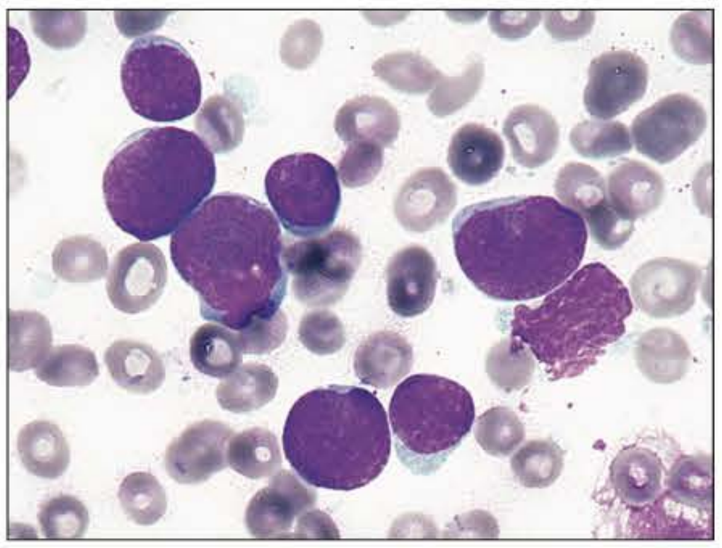


Figura 32.40 LLA de precursores de células B com blastos de tamanho pequeno a médio e ausência de nucléolos perceptíveis (×1000).

Uma outra translocação, t(11;19) (q23;p13), e variantes estão associadas à LLA de célula pré-B (com Ig mu citoplasmática). Envolve os genes E2A, em 19p13, que codifica fatores de transcrição, e PRX em 1q23. Isso também foi associado a uma menor resposta à terapia.

A hiperdiploidia foi há muito tempo reconhecida como um fator prognóstico favorável na LLA infantil. Pacientes com mais de 50 cromossomos apresentam um melhor prognóstico, e aqueles com mais de 56 possuem um prognóstico ainda melhor. Esses pacientes usualmente apresentam LLA de linhagem de precursor B.

Cerca de 80% das crianças com LLA de precursor B são curadas. Os fatores favoráveis são a idade entre 5 e 10 anos, hiperploidia (melhor, 54 a 62 com trissomia 4, 10 e/ou 17), t(12;21) e CBS baixa ou normal. Fatores de risco ruins são a idade inferior a 1 ano, t(9;22) e t(4;11).

Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor T

A leucemia linfoblástica de precursor T, representando 10 a 20% dos casos de LLA, ocorre predominantemente em meninos, os quais tendem a ser um pouco mais velhos que crianças com LLA linfoblástica de precursor B. Pacientes com LLA de linhagem T com frequência apresentam uma alta CBS e envolvimento mediastinal. A morfologia dos blastos é heterogênea, similar à LLA de célula B, e a imunofenotipagem é necessária para o diagnóstico. O imunofenótipo reflete células T tímicas que apresentam um padrão de maturação distinto (Reinherz, 1980), e os blastos apresentam maturidade variada. A maioria dos casos apresenta TdT, CD7 e CD3 citoplasmático com CD1a, CD2 e CD5 variáveis. Alguns casos, de fenótipo tímico precoce, não apresentam CD4 ou CD8, mas a maioria (fenótipo tímico médio-cortical, em particular na apresentação como linfoma) expressa CD4 e CD8 de maneira concomitante. No fenótipo tímico cortical tardio, CD4 ou CD8 podem estar presentes de modo isolado; nesses casos, TdT e/ou CD1a são particularmente úteis para o diagnóstico. Marcadores mieloides, por exemplo, CD13, CD33 e/ou CD117, podem estar presentes, e CD79a pode às vezes estar presente.

Com frequência, a apresentação como linfoma revela um fenótipo tímico mais maduro do que a apresentação leucêmica (Crist, 1988). São linfomas relativamente comuns de adolescentes e adultos jovens (1/3 dos linfomas não Hodgkin pediátricos), e também ocorrem mais tarde. Tipicamente, eles se manifestam no mediastino e/ou em linfonodos periféricos. Derrames pleurais são comuns. O comprometimento das vias aéreas e a síndrome da veia cava estão com frequência presentes, resultando na necessidade emergencial de terapia e na limitação de procedimentos diagnósticos.

Morfologia. A leucemia/linfoma linfoblástico de precursor T em geral apresenta envolvimento tissular difuso por blastos com núcleos menores do que os núcleos dos histiócitos ou das células endoteliais reativas (Fig. 32.41), embora alguns apresentem núcleos com tamanho similar aos do LB . Em geral, a cromatina é finamente dispersa

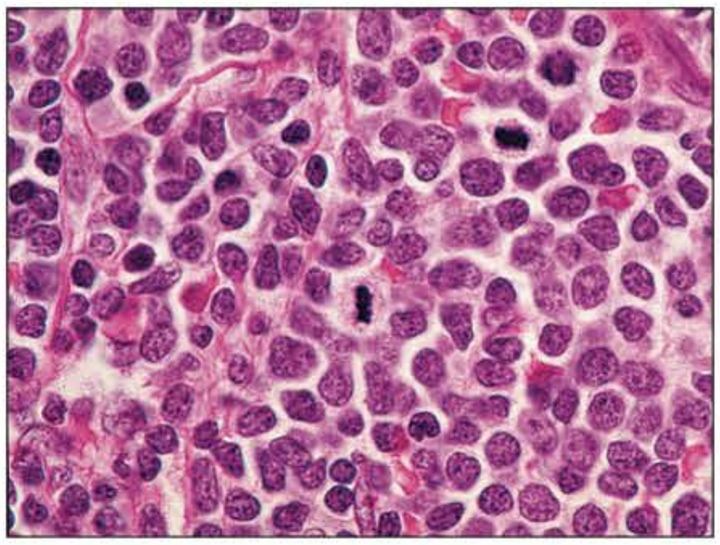


Figura 32.41 Linfoma linfoblástico de precursores de celulas T (×500).

a levemente agregada, mas em raros casos na intensidade que ocorre no LB. A taxa de mitose é alta, e com frequência existe um padrão de "céu estrelado" similar ao do LB. Algumas vezes, células neoplásicas apresentam envolvimento seletivo da zona T dos linfonodos e/ou um padrão de infiltração similar ao da leucemia nos tecidos moles.

O diagnóstico diferencial da leucemia/linfoma linfoblástico de precursor T em pacientes jovens é principalmente entre ele, o LB e, às vezes, o linfoma de células B grandes. A localização mediastinal favorece a leucemia/linfoma linfoblástico de precursor T em relação ao LB, mas não em relação ao linfoma de células B grandes. Em adultos, o diagnóstico diferencial também inclui variantes blastoides e blásticas do LCM. O sarcoma granulocítico também entra no diagnóstico diferencial em qualquer faixa etária. A expressão de TdT e de marcadores de célula T específicos sem marcadores B ou mieloides usualmente é diagnóstica.

Genética. Os genes do receptor de células T são rearranjados frequentemente, porém, os genes codificadores da cadeia pesada de Igs também podem sofrer rearranjo (Brunning, 2001o). Pacientes com LLA de células T apresentam translocações frequentes nos loci de α e β do receptor de células T (em 14q11.2), locus β (em 7q35), ou locus γ em 7p14-15), que geralmente contêm genes codificadores de fatores de transcrição. Os pares de genes incluem MYC (8q24.1), TAL1 (1p32), RBTN1 (11p15), RBTN2 (11p13), HOX11 (10q24) e LCK (1p34.3-35). Deleções no gene regulador TAL1 ocorrem em 25% dos casos, sendo que a del(9p) envolvendo CDKN2 também é frequente (Mrozek, 2004).

Neoplasias de célula B madura

Elas constituem o grupo mais numeroso e, possivelmente, mais diversificado de neoplasias hematopoéticas. As taxas globais variam de 1,2/100.000 indivíduos/ano na China a 15/100.000 nos Estados Unidos. Existe uma variação geográfica no linfoma/leucemia madura com células B grandes foliculares e difusas, com predominância em países ocidentais desenvolvidos, constituindo 50% dos linfomas não Hodgkin. O mieloma também é comum (Harris, 2001a). Doenças T/NK são mais frequentes na Ásia do que nos países ocidentais. As células afetadas em neoplasias de células B maduras são as do sistema imune humoral que, em si, é muito complexo e inclui inúmeros clones de linfócitos B com rearranjos do gene da imunoglobulina geneticamente distintos. Existem em muitos estados de maturação e tanto são influenciadas quanto afetam diversas vias reguladoras. As células normais e os tumores são influenciados pelo status imune, perturbações, vírus e outros microrganismos, além de estímulos antigênicos. Existe uma enorme variação na taxa de crescimento e na agressividade dos tumores nesse grande grupo, correspondendo à alta taxa proliferativa de algumas células e à quietude de outras. Também existe uma tendência variável correspondente à apoptose que influencia a resposta a terapias antineoplásicas. O comportamento clínico está relacionado ao escape clonal da regulação, ao equilíbrio entre a proliferação e a apoptose e à modulação pela terapia. As características das principais categorias são apresentadas na Tabela 32.17.

Leucemia linfocítica crônica (LLC)/linfoma linfocítico pequeno(LLP)

Trata-se da proliferação clonal de pequenos linfócitos B, que envolve a medula óssea, o sangue e os linfonodos. É comum e em geral indolente pelo menos no início. Sua cura é difícil ou impossível (Muller-Hermelink, 2001). Casos com envolvimento predominante da medula óssea e do sangue são tradicionalmente denominados LLC, enquanto os linfomas são denominados LLP, mas o conceito atual é de que se trata de uma única entidade. A maioria dos casos é leucêmica e constitui 90% das leucemias linfoides crônicas nos Estados Unidos e na Europa. É rara antes dos 40 anos de idade, sendo que a maioria dos casos ocorre em indivíduos com mais de 60 anos e é mais do que duas vezes mais frequente em homens do que em mulheres. O início é insidioso e a doença é comumente descoberta por acaso, durante a investigação de outro problema. A maioria dos pacientes tem idade > 50 anos.

Os tumores revelam infiltrados difusos de linfócitos pequenos maduros com cromatina aglomerada e citoplasma escasso a moderado (Fig. 32.42). Pró-linfócitos misturados e centros de proliferação (com maior número de pró-linfócitos e linfócitos com citoplasma aumentado) são característicos. A taxa mitótica é muito baixa.

A LLC/LLP apresenta um fenótipo característico de células B monoclonais (CD19/CD20/CD79a) com fraca expressão de Ig de superfície (dim) (cadeia leve única com IgM ou IgM e IgD), coexpressão do marcador de célula T usual (CD5) e expressão de CD23. Negatividade para CD22, CD10 e ciclina D1. Esse padrão é muito útil para diferenciar a LLC/LLP dos linfomas de célula de revestimento, folicular e de zona marginal. Negatividade para bcl-6 e expressão variável de bcl-2.

Os genes de cadeias pesada e leve (monotípica) de Ig sofrem rearranjo. A trissomia 12 está presente em 20% dos casos; del(13q14) em 50%; del(11q22-23) e/ou mutações nessa região em 20%; del(17p13) no locus p53 em 10% e del(6q21) em 5%. Anormalidades citogenéticas podem indicar um prognóstico pior. Essas anormalidades frequentemente não podem ser detectadas pelo cariótipo, uma vez que células da LLC não crescem bem em cultura, mas são detectados por sondas de FISH.

Em geral, a CBS encontra-se entre 30 e 200 $\times 10^9$/L. Na LLC típica, 90% ou mais das células são linfócitos pequenos que apresentam um aspecto similar e em geral parecem normais. A cromatina nuclear pode ser grosseiramente condensada e mais acentuadamente separada pela paracromatina que nos linfócitos normais ou, em alguns casos, a cromatina é menos condensada que o normal. Algumas vezes, nucléolos são evidentes em muitos dos linfócitos. A variação do tamanho é mínima. A quantidade de citoplasma é pequena a moderada. Menos de 10% dos linfócitos são pró-linfócitos ou linfócitos reticulares (linfócitos transformados).

Com frequência, não existe anemia nem trombocitopenia no momento do diagnóstico. A anemia devida à diminuição da produção ocorre à medida que a medula óssea é substituída por células leucêmicas. Além disso, o período de vida dos eritrócitos em alguns pacientes com LLC pode estar diminuído. Isso é especialmente verdadeiro quando existe uma esplenomegalia acentuada. A anemia hemolítica autoimune (AHA) ocorre em cerca de 10% dos pacientes. A trombocitopenia costuma ser discreta e, às vezes, se torna grave à medida que a doença evolui, de modo que ocorrem manifestações hemorrágicas. Em geral, a trombocitopenia é consequência da hipoproliferação, mas também pode ser secundária a um processo imune ou sequestração esplênica. O envolvimento irregular, nodular ou intersticial da medula óssea por linfócitos neoplásicos está associado a um resultado relativamente bom. Entretanto, um infiltrado difuso da medula óssea em geral está correlacionado a um mau prognóstico e/ou à doença avançada (Bartl, 1982a; Montserrat, 1987). Uma maior proporção de pró-linfócitos (entre 10 e 55%) foi referida como LLC/LPL e pode ter correlação com uma doença agressiva (Bennett, 1989; Melo, 1987). A expressão do marcador CD38 ou ZAP-70 e anormalidades de p53 foram investigadas para possível valor prognóstico, mas os resultados foram inconclusivos (Kim, 2004; Mainou-Fowler, 2004). A anemia, sintomas B e o Índice de Prognóstico Internacional (IPI, International Prognostic Index) podem fornecer melhor informação prognóstica (Nola, 2004). A sobrevida média para pacientes com LLC é de aproximadamente 7 anos, mas a terapêutica recente (p. ex., fludarabina) revela uma promessa de melhor sobrevida.

Leucemia pró-LInfocítica de células B

A leucemia pró-linfocífica foi originalmente descrita como uma variante da LLC (Galton, 1974). A relação homem:mulher é de 6,5:1, e a idade média é de 65 anos. A LPL é caracterizada por uma linfocitose muito acentuada (usualmente superior a 100 $\times 10^3$/μL), esplenomegalia maciça, hepatomegalia moderada e linfadenopatia inconspícua. As células

Tabela 32.17 Características principais das neoplasias de células B maduras mais importantes

Linfoma	Demografia, manifestação clínica e laboratorial	Morfologia	Marcadores da superfície celular: Positivo	Marcadores da superfície celular: Negativo	Citogenética
LLP /LLC	H > M, acima dos 60 anos. Início insidioso com fadiga, linfadenopatia. CBS > 30K, anemia, trombocitopenia, ocasionalmente AHA	Monomórfico, linfócitos pequenos com citoplasma ligeiramente moderado, cromatina condensada	CD5, 19, 20, 23, 79a, sIg dim	CD10, 22, Bcl-6	+12, del(13q14), del(11q22-23), rearranjo de Ig
LPL de células B	H >> M, idade média de 65 anos. Esplenomegalia maciça, linfadenopatia mínima, CBS >100K	Pró-linfócitos ≥ 55% com núcleo vesicular grande, cromatina condensada, citoplasma moderado	CD19, 20, sIg *bright*	Frequentemente CD5, 23 negativo	del(11q23), del(13q14), rearranjo de Ig
Leucemia de células pilosas	H > M, idade média de 50 anos. Início insidioso com esplenomegalia, monocitopenia	Células de tamanho médio com núcleos redondos-ovais, cromatina reticulada, bordos citoplasmáticos irregulares	CD 19, 20, 22, 79a, 103, 25, 11c	CD5, 10, 23	Rearranjo de Ig
Linfoma linfoplasmocítico	H ≈ M, idade média 63 anos. Envolvimento da MO, nodal e esplênico e paraproteína IgM frequente com hiperviscosidade (MW), causando diminuição da acuidade visual, risco de AVC, neuropatias	Linfócitos plasmocitoides e plasmócitos com inclusões PAS-positivas (corpúsculos de Dutcher)	CD19, 20, 22, 38, 79a, sIgM *bright* cIgM	CD5, 10, 23	t(9;14)(p13;q32)
Doença de cadeia pesada α	Adultos jovens vivendo em comunidades mediterrâneas mais pobres, com má absorção, diarreia	Infiltrado linfocitoplasmático da mucosa intestinal	NA	NA	NA
Linfoma MALT	M > H, idade média de 61 anos. Evolução indolente envolvendo o estômago, outros locais do trato GI. Associado à doença autoimune prévia (SS, tireoidite de Hashimoto) ou infecção pelo *H. pylori*.	Lesões linfoepiteliais com linfócitos pequenos, centrócitos, linfócitos monocitoides e centros germinativos reativos	CD19, 20, 22, 79a, sIg, bcl-2	CD5, 10, 23, bcl-6	+3, t(11;18)(q21;q21)
Linfoma folicular	M > H, idade média de 59 anos. Domínio da linfadenopatia periférica, com adenopatia central. Envolvimento da MO e esplênico frequente	Estruturas similares a folículos, com pequenos linfócitos clivados e quantidade variada de centroblastos maiores que permitem a gradação citológica	CD19, 20, 22, 23, 79a, 10, bcl-2, bcl-6	CD5, 43	t(14;18)(q32;q21)
Linfoma de células de revestimento	H > M, idade média de 70 anos. Linfadenopatia, esplenomegalia acentuada, envolvimento da MO. Evolução agressiva	Centros germinativos atróficos, zonas do manto proeminentes, células monomórficas com núcleos pequenos ou médios	CD19, 20, 22, 5, 43, bcl-2, ciclina D1	CD10, 23, bcl-6	t(11;14)(q13;q32)
Linfoma difuso de grandes células B	H > M, todas as idades, associado à infecção pelo HIV. Localizações nodais e extranodais, SNC. Evolução agressiva	Infiltrado difuso de células B variavelmente grandes, algumas vezes com morfologia centroblástica ou imunoblástica	CDCd19, 20, 22, 79a, sIg. Ocasionalmente CD30 (variante anaplásica)	CD5 (usualmente), 23	t(14;18) in 20–30%, anormalidade de 3q27 em até 30%, anormalidade complexa
Linfoma mediastinal de grandes células B	M > H, adultos jovens e de meia-idade. Compressão das vias aéreas, síndrome da veia cava superior	Lesões esclerosadas com células claras, multilobadas ou Reed-Sternberg	CD45, 19, 20	CD5, 10	Rearranjo de Ig
Linfoma de efusão primária	Raro, associado ao HHV-8 em homossexuais do sexo masculino jovens e imunodeprimidos. Derrame pleural	Células imunoblásticas ou anaplásicas	CD19, 20, 79a, frequentemente CD30, 38, 138	sIg, cIg	Rearranjo de Ig, ocasionalmente TCR
Linfoma de Burkitt	1. Endêmico: crianças africanas, massa mandibular, H > M 2. Esporádico: crianças e adultos jovens, universal, H > M, órgãos abdominais 3. Associado à imunodeficiência: pacientes infectados pelo HIV	Células uniformes com núcleos redondos ou ovais, múltiplos nucléolos, alta taxa mitótica	CD19, 2, 20, 79a, sIg, frequentemente CD10	TdT	t(8;14)(q24;q32)

MW = macroglobulinemia de Waldenström; PAS = ácido periódico de Schiff; SS = síndrome de Sjögren; RS = Reed-Sternberg.

linfoides malignas apresentam um grande nucléolo vesicular, cromatina nuclear condensada e quantidade moderada de citoplasma (Fig. 32.43). Mais de 55% das células sanguíneas leucêmicas são pró-linfócitos. O imunofenótipo varia desde a LLC/LLP, pela forte expressão de Ig de superfície (*bright*) (IgM monoclonal com ou sem IgD), ausência de CD5 em 2/3 dos casos, ausência comum de CD23 e presença de FMC-7. Anormalidades de p53 são frequentes e ocorrem deleções 11q23 e 13q14. A leucemia pró-linfocítica em geral é menos responsiva ao tratamento que a leucemia linfocítica crônica, e seu prognóstico é pior (Catovsky, 2001a).

Leucemia de células pilosas (LCP)

Bouroncle (1958) foi o primeiro a descrever esse distúrbio, o qual apresenta manifestações clínicas variáveis. A LCP ocorre mais frequentemente em homens que em mulheres. A idade média dos pacientes é de 50 anos. O seu início é insidioso e caracterizado pela proliferação de células anormais nos órgãos reticuloendoteliais e no sangue. A esplenomegalia é o achado físico predominante (Foucar, 2001).

A pancitopenia ou depressão de apenas duas linhagens celulares é o achado usual com quantidade variável de células pilosas. A monocitopenia é característica, e células pilosas geralmente são pouco frequentes no sangue, embora elas possam causar leucocitose. Na maioria dos casos, a aspiração da medula óssea é difícil. A biópsia de medula óssea revela uma medula com celularidade variável, com frequência apresentando áreas hipo e hipercelulares e fibrose de reticulina. Casos hipocelulares de LCP ocorrem e se assemelham à anemia aplástica.

Em relação à morfologia, as células apresentam um tamanho médio (10–20 μm de diâmetro), com núcleos redondos ou ovais, embora muitos sejam entalhados, em forma de halter ou de feijão. O padrão da cromatina em geral é uniformemente reticular, e os nucléolos são pequenos e imperceptíveis. Em algumas células, a cromatina é mais condensada e se parece com a cromatina de um linfócito. A quantidade de citoplasma é moderada, de cor azul-acinzentado claro e com numerosas projeções piliformes e bordas desgastadas, mais proeminentes em microfotografias eletrônicas (Fig. 32.44).

Em cortes de medula óssea, as células com núcleos centrais pequenos, citoplasma abundante e fibrose de reticulina produzem um aspecto característico de "ovo frito" que, no entanto, pode se assemelhar a ilhotas eritroides quando o envolvimento não é extenso (Fig. 32.45). A cromatina comumente é mais delicada, enquanto os núcleos são mais irregulares do que nos precursores eritroides. Em biópsias pequenas ou mal conservadas, a LCP pode ser confundida com o linfoma de células B grandes.

Amostras de esplenectomia em geral são diagnósticas com infiltrados na polpa vermelha de células similares aos presentes na medula óssea. Além disso, as células tendem a se alinhar aos seios esplênicos, obliterando o endotélio e produzindo "lagos" de eritrócitos com ausência de endotélio visível. Os linfonodos podem apresentar infiltrados paracorticais, e o fígado, infiltração sinusal.

Do ponto de vista citoquímico, essas células contêm uma fosfatase ácida resistente à inibição pelo tartarato (TRAP, tartrate resistant acid phosphatase). Isso contrasta com as isoenzimas da fosfatase ácida presentes em outras células hemáticas (Yam, 1971).

O imunofenótipo é da célula B madura (CD19, CD20, CD22, CD79a, DBA.44, imunoglobulina da superfície da membrana [SMIg]) com expressão de marcadores associados à célula pilosa (CD103, CD25, CD11c e FMC-7). A ciclina D1 é com frequência expressa. Células são negativas para CD5, CD10 e CD23. Anticorpos antianexina A1 (ANXA1) também podem se revelar úteis (Falini, 2004). Os genes codificadores das cadeias pesada e leve das imunoglobulinas estão rearranjados e apresentam mutação somática em regiões do gene *V*. Ainda não foram descritas anormalidades genéticas específicas.

A evolução clínica em geral é crônica, mas pode ser aguda ou subaguda. A sobrevida média é de 5 a 6 anos. Tradicionalmente, a esplenectomia representa um benefício importante para muitos pacientes. O tratamento com interferon-α foi responsável pelas primeiras remissões quimioterápicas, mas, hoje em dia, a 2'-deoxicoformicina e a 2-clordeoxiadenosina produzem remissões mais duráveis.

Variantes de células pilosas

A maioria dos casos de "variantes de células pilosas" é descrita como distúrbios linfoproliferativos que se assemelham à LCP, mas com uma CBS alta e presença de nucléolos proeminentes (Sainati, 1990). Apresentam morfologia e características clínicas intermediárias entre a LCP e a leucemia pró-linfocítica (Fig. 32.46). A resposta à quimioterapia é

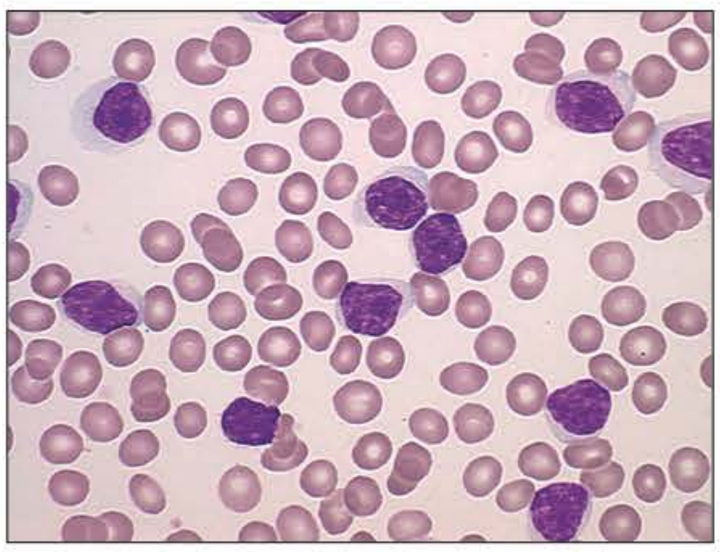


Figura 32.42 Leucemia linfocítica crônica de células B (×1.000).

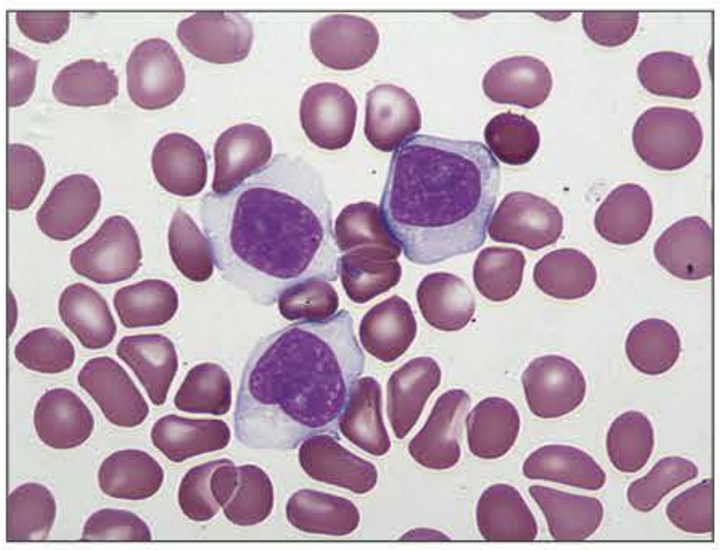


Figura 32.43 Leucemia prolinfocítica de células B tipicamente apresentando CBS elevada, linfócitos grandes com citoplasma moderadamente abundante e nucléolos proeminentes. Podem existir variações (×1.000).

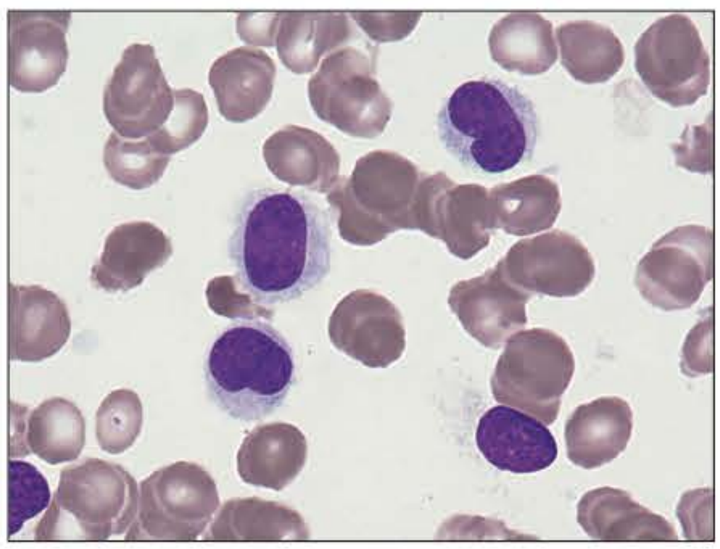


Figura 32.44 Leucemia de células pilosas apresentando células linfoides com citoplasma esponjoso e projeções citoplasmáticas e núcleos ovais ou indentados com cromatina reticulada (×1.000).

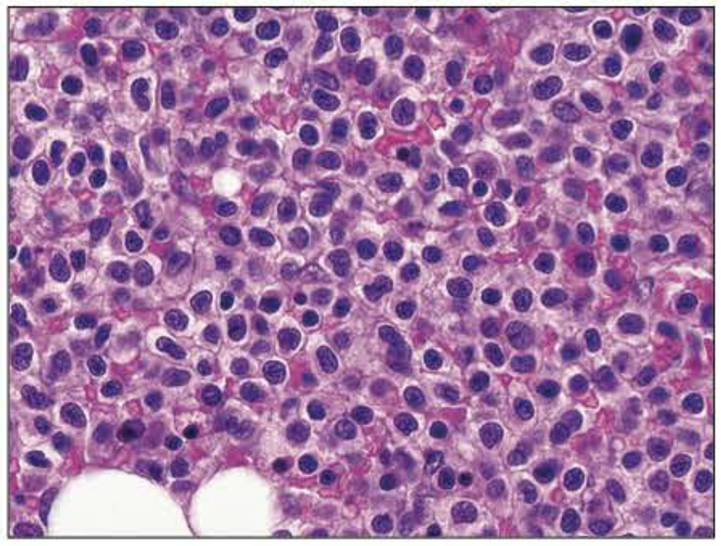


Figura 32.45 Leucemia de células pilosas na biópsia de medula óssea mostrando núcleos pequenos com citoplasma moderado e limites citoplasmáticos distintos (×500).

precária, contudo, a evolução é crônica e a remissão pode ser obtida com esplenectomia. TRAP e CD103 são variáveis, e em geral há negatividade para CD25. Uma forma muito rara de LCP foi descrita, sobretudo em pacientes japoneses, e é designada "variante japonesa" (Machii, 1993). Esse distúrbio apresenta nucléolos um pouco mais proeminentes do que a LCP típica, porém menos do que nas variantes pró-linfocitoides. Além disso, apresenta CD103 e TRAP variáveis, negatividade para CD25 e, em geral, ausência de Ig de superfície (Wu, 2000; Yamaguchi, 1996). Há rearranjos clonais de genes de Ig e precisar ser distinguido da linfocitose policlonal de células B, cuja morfologia é similar (Machii, 1997).

Linfoma linfoplasmocítico (LPL)/macroglobulinemia de Waldeström

"Linfoma linfoplasmocítico" é um termo derivado da classificação de Kiel (Stansfeld, 1988) para tumores que eram previamente conhecidos na América do Norte como linfoma linfocítico pequeno (ou leucemia linfocítica crônica) com diferenciação plasmocitoide. No entanto, esses tumores diferem quanto à presença de linfócitos plasmocitoides e plasmócitos, secreção de uma paraproteína monoclonal IgM e ausência de expressão de CD. Em geral, envolvem a medula óssea, os linfonodos e o baço (Fig. 32.47).

Linfonodos apresentam infiltrados difusos de linfócitos, linfócitos plasmacitoides e plasmócitos. Não existem centros de proliferação, e células B monocitoides não são vistas. O infiltrado pode ser paracortical com poupança dos seios. Inclusões PAS-positivas são comumente observadas no citoplasma, e inclusões centralizadas no complexo de Golgi com frequência invaginam no núcleo das células linfoides, formando "corpúsculos de Dutcher". Em geral, os mastócitos celulares estão aumentados.

É comum a medula óssea apresentar infiltrados intersticiais nodulares e/ou difusos de células similares. O envolvimento sanguíneo pode estar presente, mas com uma CBS menor do que na LLC.

O imunofenótipo revela os marcadores de célula B CD19, CD20, CD22, CD79a com expressão forte (*bright*) de IgM (em alguns casos IgG ou IgA) de superfície e citoplasmática, porém ausência de IgD, além de cadeia leve κ ou λ monoclonal. Difere da LLC quanto à ausência de CD5 e expressão forte de Ig (bright). A expressão de CD10 e CD23 também é negativa, a de CD38 é positiva e a de CD43 é variável.

Os genes codificadores das cadeias pesada e leve de Ig estão clonalmente rearranjados e ocorre mutação somática nas regiões variáveis, de maneira consistente com o estado de maturação da seleção pós-antígeno (centro pós-germinativo) e diferindo da LLC (Berger, 2001). O linfoma com translocação t(9;14) (p13;q32) envolvendo o gene PAX-5, em 9p13, que codifica a proteína ativadora específica da célula B (BSAP, B cell-specific activator protein), é mais frequentemente linfoplasmocitário (Offit, 1992; Iida, 1999).

Uma variante morfológica polimórfica com evolução mais agressiva foi descrita na classificação de Kiel (Lennert, 1975), mas não é reconhecida como subtipo pela OMS. Del6q21 foi relatada como a anormalidade mais frequente no LPL, em particular com morfologia polimórfica, e -8 e outras anormalidades são esporadicamente relatadas (Schop, 2003; Mansoor, 2001).

O termo macroglobulinemia de Waldeström refere-se à síndrome clínica da paraproteína IgM monoclonal (> 3 g/dL) com hiperviscosidade sintomática e/ou crioglobulinemia. Sua incidência máxima ocorre entre os 60 e 70 anos de idade. Os sintomas do aumento da viscosidade incluem distúrbios visuais, sintomas neurológicos, comprometimento da função renal e insuficiência cardíaca congestiva. Fenômenos hemorrágicos podem ocorrer como consequência de interferências de complexos com plaquetas e fatores da coagulação. A crioglobulinemia ocorre com uma frequência um pouco menor que no mieloma e em geral causa o fenômeno de Raynaud.

Algumas vezes, a anemia normocítica normocrômica está associada à trombocitopenia ou pancitopenia. Uma linfocitose relativa ou absoluta discreta costuma ser observada. Uma acentuada formação de rouleau é observado no esfregaço de sangue e a velocidade de hemossedimentação costuma ser extremamente rápida, embora possa ser baixa diante da presença de macrocrioglobulinas e quando o teste é realizado em uma temperatura mais baixa. A anemia às vezes é hemolítica com teste de Coombs positivo.

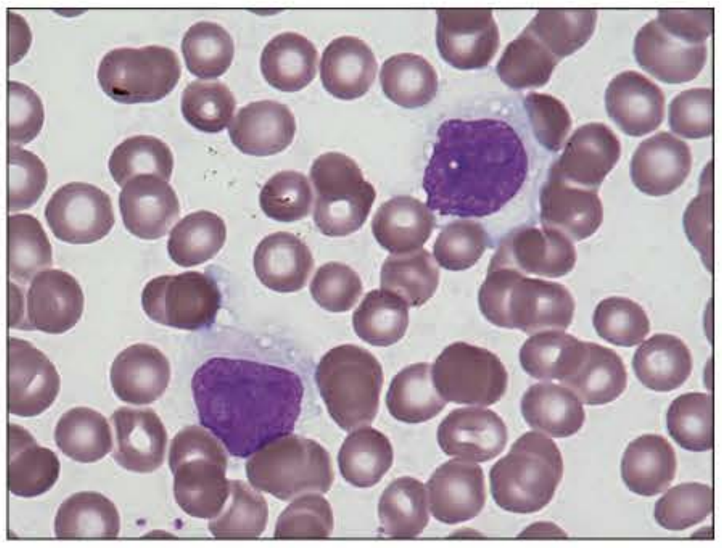


Figura 32.46 Variante da leucemia de células pilosas apresentando morfologia intermediária entre a leucemia de células pilosas e a leucemia prolinfocítica.

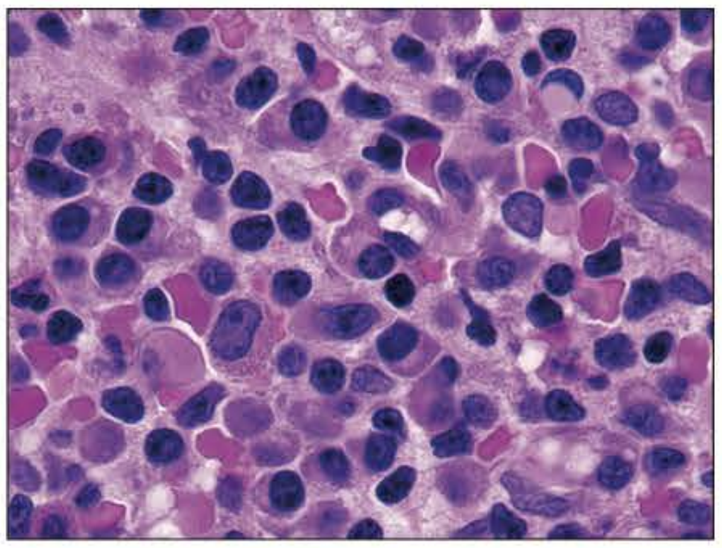


Figura 32.47 Linfoma linfoplasmocitário envolvendo a medula óssea com macroglobulinemia de Waldeström associada. Linfócitos, plasmócitos, linfócitos plasmocitoides e um raro corpúsculo de Dutcher (acima à direita) (×1000).

Em geral, a globulina sérica está muitíssimo elevada. A viscosidade sérica relativa pode ser mensurada simplesmente utilizando um viscômetro de Ostwald. O tempo médio para a descida do soro à temperatura ambiente é expresso como uma proporção, em relação ao tempo médio para a descida de água destilada. A faixa normal é de 1,4 a 1,8. Seus níveis estão consideravelmente aumentados na maioria dos pacientes com macroglobulinemia. Sintomas de hiperviscosidade aparecem na maioria dos pacientes quando a viscosidade relativa do soro encontra-se entre 6 e 8, embora o limiar varie entre pacientes. A paraproteína é identificada pela imunoeletroforese. A proteinúria de cadeia leve ocorre em cerca de 10% dos pacientes.

Muitos casos classificados previamente nessa categoria agora parecem representar casos de linfoma MALT (mucosal-associated lymphoid tissue) de baixo grau com expressão plasmocitoide. Não existe um marcador biológico definido para diferenciar ambos, porém, os linfomas MALT tipicamente envolvem órgãos epiteliais e a macroglobulinemia não é sua característica inicial. Muitos casos de crioglobulinemia devida a um linfoma linfoplasmocítico e a um linfoma MALT estão associados ao vírus da hepatite C (Sansonno, 1996).

Doença da cadeia pesada γ

Um pequeno número de pacientes produz e excreta fragmentos de cadeia pesada sem cadeias leves associadas. Algumas dessas proteínas apresentam mutações estruturais. A classificação dos distúrbios linfoproliferativos associados é um pouco ambígua. A OMS categoriza a doença da cadeia pesada (DCP) γ tanto como LPL quanto como mieloma (Berger, 2001) e a doença das cadeias pesadas mu e α como mieloma (Grogan, 2001).

A DCP γ é um distúrbio linfoproliferativo caracterizado pela secreção de uma cadeia γ truncada sem sítios de ligação de cadeia leve. Essa condição se manifesta com linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, febre e propensão à infecção. A anemia está presente de modo constante, frequentemente com leucopenia e trombocitopenia. A atipia linfocitária e plasmocitária está com frequência presente no sangue, e alguns poucos casos evoluíram para a leucemia de plasmócitos. A

medula óssea em geral é anormal, com aumento de plasmócitos, linfócitos e eosinófilos. Um "pico" amplo de proteína sérica foi observado na região βγ na maioria dos pacientes, acompanhado por hipogamaglobulinemia. O diagnóstico é estabelecido pela demonstração de que, na imunoeletroforese, a proteína reage com antissoro contra cadeias γ, e não contra cadeias leves. A proteína também é encontrada na urina em quantidades variáveis, embora por vezes seja necessário utilizar técnicas de concentração para demonstrá-la.

Doença da cadeia pesada α (DCP α)

A DCP α parece ser mais comum do que a DCP γ e envolve uma faixa etária mais jovem. O padrão clínico uniforme observado na maioria dos pacientes consiste na má absorção e diarreia que acompanham uma maciça infiltração linfoplasmocitária da mucosa intestinal ou um linfoma histiocítico intestinal. Em poucos pacientes, observa-se envolvimento do trato respiratório. A medula óssea e outros órgãos linfoides não são afetados. Em geral, a eletroforese de proteínas de rotina resulta negativa, contudo pequenas quantidades de cadeia α podem ser detectadas no soro e às vezes na urina por meio da imunoeletroforese. A proteína anormal não contém cadeias leves. É mais comum nas áreas do Mediterrâneo e está associada a má condição de vida em grupos socioeconômicos baixos. De modo similar ao linfoma MALT, muitos casos podem iniciar com uma proliferação desencadeada por um antígeno infeccioso. Também foi denominada linfoma abdominal mediterrâneo e doença imunoproliferativa do intestino delgado (IPSID, *immunoproliferative small intestinal disease*).

Doença da cadeia pesada μ (DCPμ)

Os poucos pacientes descritos com DCPmu apresentavam leucemia linfocítica crônica com plasmócitos vacuoladas na medula óssea. A eletroforese sérica de rotina revelou apenas hipogamaglobulinemia. A cadeia pesada mu foi detectada pela imunoeletroforese sérica; ela não foi detectada na urina. No entanto, na maioria dos pacientes, a urina continha cadeia leve κ em grandes quantidades (Franklin, 1975).

Mieloma múltiplo

O mieloma múltiplo é uma proliferação neoplásica de plasmócitos, ocorrendo primariamente na medula óssea. Embora as plasmócitos também prolferem nos linfonodos e no baço, em raros casos esses órgãos aumentam de volume (Grogan, 2001).

O mieloma múltiplo é raro entre indivíduos com menos de 40 anos de idade. A idade média no momento do diagnóstico é de 62 anos, com uma distribuição igual entre os sexos. A dor óssea é o sintoma mais comum. Fraturas patológicas são frequentes. Sintomas neurológicos podem ser proeminentes por causa da invasão do tumor pelo córtex ósseo para os nervos espinais ou para a medula óssea. A destruição óssea acarreta mobilização de cálcio, com aumento do cálcio no soro e calcificação metastática. O crescimento de células do mieloma na medula óssea produz múltiplos tumores, os quais aparecem na radiografia como lesões osteoporóticas em *punch*. Em alguns casos, o crescimento é difuso e manifesta-se como osteoporose difusa. A propensão à infecção é comum por causa da diminuição da produção de anticorpos. Pode haver uma associação entre distúrbios de plasmócitos infecção pelo herpevírus humano do tipo 8 (HHV-8).

Em geral, há uma anemia normocítica normocrômica e podem haver normoblastos no sangue. A CBS está discretamente diminuída, normal ou um pouco aumentada. Um desvio mieloide à esquerda ocasionalmente pode ser observado para mieloblastos. A contagem de plaquetas costuma estar normal, mas pode estar diminuída. A característica mais impressionante observada ao exame do esfregaço de sangue é o acentuado grau de formação de rouleau.

A medula óssea revela a presença de plasmócitos ou de células do mieloma, variando de menos de 1% a mais de 90%, dependendo do grau de envolvimento no local onde foi realizada a aspiração de medula óssea. O diagnóstico do mieloma e suas variantes baseia-se nos achados clínicos e da patologia, incluindo imunoglobulina monoclonal sérica e evidências radiológicas de lesões ósseas líticas (Durie, 2003; Grogan, 2001) (Tab. 32.18). Lesões ósseas líticas estão associadas a uma maior atividade osteoclástica, hipercalcemia e alterações neurológicas. Isso pode estar relacionado à atividade do ligante do ativador de receptor de NFκB (RANK, receptor activator for NFκB) (Sezer, 2003) e estimulou o interesse em seu receptor, osteoprotegerina (OPG).

Em termos citológicos, as células podem ser indistinguíveis dos plasmócitos normais, todavia em geral apresentam cromatina anormal (p. ex., menos agrupamento da cromatina nuclear), nucléolos grandes, ausência de zona clara perinuclear, citoplasma azul mais claro ou graus variados de anaplasia (Fig. 32.48).Variantes imaturas, plasmoblásticas e anaplásicas foram descritas.

A globulina sérica costuma estar aumentada, frequentemente de forma impressionante. Esse aumento é responsável pela tendência à formação de *rouleau* e aumento da VHS. A eletroforese de proteínas séricas em geral revela um M-*spot*, uma banda homogênea na região γ ou β. De forma menos comum, há hipogamaglobulinemia (quando somente cadeias leves são produzidas pelas plasmócitos neoplásicas). A imunoeletroforese indica que a proteína monoclonal é uma IgG em mais da metade dos casos; IgA em aproximadamente um 1/5 dos

Tabela 32.18 Critérios para o diagnóstico de mieloma de plasmócitos e gamopatia monoclonal de importância desconhecida (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*), mieloma indolente e latente

Principais critérios para mieloma de plasmócitos	Critérios minoritários para mieloma de plasmócitos
A. Plasmocitose medular (> 30%)	1. Plasmocitose medular (10–30%)
B. Plasmocitoma na biópsia	2. Componente M : presente mas menos do que C
C. Componente M Soro: IgG > 3,5 g/dL, IgA > 2 g/dL Urina: > 1 g/24 h de proteína de Bence-Jones (BJ)	3. Lesões ósseas líticas 4. Redução de imunoglobulinas normais (< 50% do normal): IgG < 600 mg/dL, IgA < 100 mg/dL, IgM < 50 mg/dL
Mieloma	
Um critério principal e um critério menor ou 3 critérios menores que devem incluir 1 e 2 em um paciente sintomático	
MGUS	
Componente M presente, mas em nível inferior ao observado no mieloma	
Plasmocitose medular < 10%	
Ausência de lesões ósseas líticas	
Nenhum sintoma relacionado ao mieloma	
Mieloma latente	
Igual ao MGUS, exceto:	
Componente M sérico no mesmo nível que o do mieloma	
Plasmocitose medular 10–30%	
Mielomas indolentes	
Igual ao mieloma, exceto:	
Componente M: IgG < 7g/dL, IgA < 5 g/dL	
Lesões ósseas raras (≤ 3 lesões líticas), sem fraturas por compressão	
Hemoglobina, cálcio e creatinina séricos normais	
Ausência de infecção	

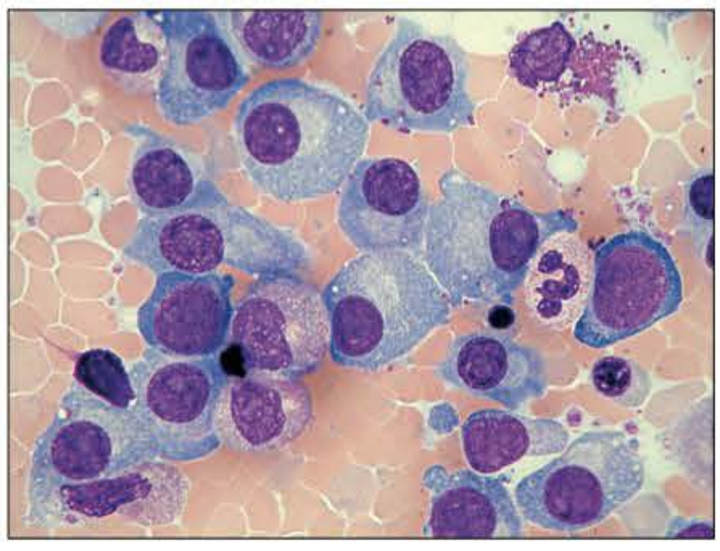


Figura 32.48 Mieloma na medula óssea apresentando plasmócitos grandes com nucléolos (×1.000).

pacientes; IgD em menos de 1% dos casos; e IgE em raríssimos casos. Cerca de 5% das proteínas do mieloma são crioglobulinas, isto é, proteínas que precipitam no soro resfriado e voltam a se dissolver com o aquecimento. Alguns tumores secretam cadeias leves monoclonais livres (proteína de Bence Jones), além da molécula de imunoglobulina inteira. Em aproximadamente 1/4 dos casos, apenas cadeias leves são produzidas. A hipogamaglobulinemia é observada no último grupo porque cadeias leves são filtradas por meio dos glomérulos renais, deixando nada ou muito pouco no soro. Além disso, a produção de imunoglobulina pelas plasmócitos não malignas é enormemente reduzida. Quando ocorre lesão renal, moléculas inteiras de albumina e de imunoglobulina também são encontradas na urina. A excreção de cadeias leves algumas vezes acarreta obstrução e perda de néfrons e o chamado "rim mielomatoso". A insuficiência renal é comum e é uma característica inicial do mieloma múltiplo em alguns casos. A amiloidose, presente em aproximadamente 10 a 15% dos casos de mieloma múltiplo, pode ser um fator na insuficiência renal.

A sobrevida média após o diagnóstico de mieloma múltiplo é de aproximadamente 3 anos. Quase 5% dos pacientes apresentam leucemia aguda (em geral, mieolomocítica). Isso pode ser precedido por uma anemia sideroblástica.

Gamopatia monoclonal de importância indeterminada

"Gamopatia monoclonal de importância indeterminada" é o termo utilizado quando uma imunoglobulina monoclonal sérica está presente, mas não há mieloma detectável. A maior parte (75%) é de IgG, com proporções menores de IgM (15%) e IgA (10%), enquanto 25% evoluíram para mieloma ao longo de um período de 20 anos de acompanhamento (Grogan, 2001). Há uma Ig monoclonal (componente M) de < 3,5 g/dL de IgG ou < 2 g/dL IgA, ou 1 g/dL de cadeia leve na urina (proteína de Bence Jones) (Tab. 32.18).

Mieloma latente e indolente

O mieloma latente apresenta 30% ou mais de plasmócitos na medula óssea, > 3,5 g/dL de IgG ou > 2 g/dL de IgA, ou > 1 g/dL de cadeia leve na urina (proteína de Bence Jones), porém sem lesões líticas e sem sintomas de mieloma, incluindo anemia, insuficiência renal ou hipercalcemia.

O mieloma indolente é similar, mas com até três lesões líticas, até 7 g/dL de IgG e 5 g/dL de IgA.

Leucemia de plasmócitos

Em geral, no mieloma múltiplo, poucas plasmócitos são encontradas no sangue periférico. O termo leucemia de plasmócitos é utilizado somente em raras circunstâncias do mieloma, nas quais grandes números de plasmócitos circulam (> 20% de leucócitos sanguíneos ou > 2×10^9/L) (Fig. 32.49). Pacientes com leucemia de plasmócitos têm uma tendência a apresentar infiltração tissular, doença em estágio avançado e sobrevida ruim (Woodruff, 1978).

O imunofenótipo das plasmócitos neoplásicas difere levemente das plasmócitos normais e pode ser utilizado para detecção por citometria de fluxo. CD19 e CD20 costumam estar ausentes ou indistintos (o CD19 está presente em plasmócitos normais), e o CD56 em geral é expresso no mieloma, mas não na leucemia de plasmócitos. CD38 e CD138 são expressos. A imunoglobulina citoplasmática monoclonal está presente e, às vezes, também a Ig de superfície. O CD45 é variável. Com o uso da citometria de fluxo, plasmócitos podem ser identificadas pelo *gating* em decorrência da coexpressão de CD38 e CD138, com análise subsequente de CD56. Plasmócitos muito positivos para CD56 são supostamente neoplásicas e, em geral, apresentam cadeia κ ou λ monoclonal citoplasmática. As técnicas de marcação imuno-histoquímica ou de hibridização do mRNA in situ de cortes da medula óssea para cadeias κ e λ em geral identificam plasmócitos monoclonais.

No passado, a realização de estudos citogenéticos foi difícil pela ausência de mitoses nessas plasmócitos terminais diferenciadas. Contudo, painéis de ensaios FISH com frequência revelam anormalidades (Cady, 2004). A monossomia ou a deleção parcial de 13q14 ocorre em 15 a 40%, e del(17) p(13) (gene *p53*) em 25%. Esta última, assim como del(7q) (múltipla resistência a fármacos), possivelmente são características adversas. Ganhos de cromossomos 3, 5, 7, 9, 11, 15 e 19 e perdas de cromossomos 8, 13, 14 e X são comuns. Pode haver t(11;14) (q13;q32) com consequente superexpressão de ciclina D1.

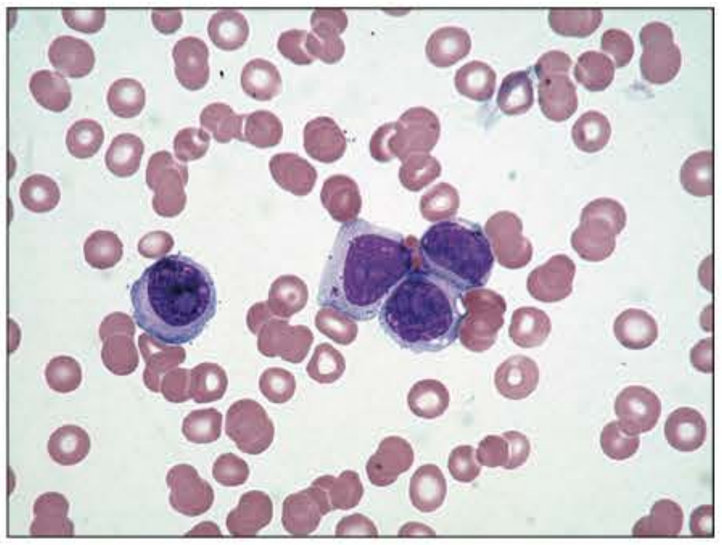


Figura 32.49 Leucemia de plasmócitos com células semelhantes a imunoblastos (×1.000).

Plasmacitomas solitários de localização óssea são tratados com radiação, mas apresentam uma alta incidência de progressão para o mieloma, com recorrência solitária ocasional. Plasmacitomas solitários extramedulares ocorrem no trato gastrintestinal, bexiga, SNC, mamas, tireoide, testículos, parótidas, linfonodos ou pele e também são irradiados. Eles recorrem em um quarto dos pacientes, mas evoluem para o mieloma em apenas 15%.

A amiloidose primária é uma manifestação incomum de neoplasias de plasmócitos de vários tipos e decorre da polimerização anormal de imunoglobulina no interior das bainhas β no tecido conjuntivo. Pode ser detectada pela coloração rosa homogênea de vasos sanguíneos espessados presentes na gordura abdominal, medula óssea, reto ou outros tecidos utilizando a coloração vermelho-Congo com sua característica birrefringência verde-maçã sob luz polarizada. Essa condição pode afetar o coração e acarretar insuficiência cardíaca congestiva subsequente, bem como o fígado (hepatomegalia), rins (síndrome nefrótica ou insuficiência renal), nervos (perda sensorial/motora) e outros órgãos.

A deposição de imunoglobulina não amiloide pode causar disfunção orgânica observada em distúrbios raros, conhecidos como doença de deposição de cadeia leve (LCDD, light chain deposition disease) ou doença de deposição de cadeia pesada (HCDD, heavy chain deposition disease) (Grogan, 2001).

Linfomas de células B da zona marginal

Linfomas da zona marginal são distúrbios de células B clonais previamente incluídos no termo linfoma linfocítico pequeno (Isaacson, 2001a, b, c, d). Eles diferem em termos clínicos e imunológicos do linfoma linfocítico pequeno e incluem vários tipos, os quais têm em comum a evolução clínica lenta e a presença de quantidades variáveis de linfócitos pequenos com citoplasma abundante, centrócitos (pequenas células com núcleos irregulares) e plasmócitos. Muitos surgem no MALT, junto ao trato gastrintestinal, glândulas salivares, pulmões e outros órgãos epiteliais. Outros surgem nas zonas marginais esplênicas e alguns podem ser primários em linfonodos.

Linfoma de células B de zona marginal extranodal de tecido linfoide associado à mucosa (MALT)

O linfoma de células B de zona marginal extranodal de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) é um linfoma indolente do tecido mucoso que inclui o estômago, outros órgãos do trato gastrintestinal, brônquios, glândulas salivares, tireoide, pele e outras áreas. O linfoma MALT do estômago é, em muitos casos, uma proliferação de células B clonais estimulada por antígeno relacionada à infecção pelo Helicobacter pylori, que também está associado a úlceras gástricas. Casos iniciais podem responder à terapia antibacteriana. Outros pacientes apresentam distúrbios autoimunes como a síndrome de Sjögren ou tireoidite de Hashimoto. A terminologia referente aos linfomas MALT diz respeito apenas àqueles com predominância de pequenas células, embora linfomas de grandes células e outros linfomas agressivos também possam ocorrer nos mesmos tecidos.

A mucosa gástrica ou outras mucosas são infiltradas por linfócitos pequenos que formam aglomerados no epitélio; são denominados lesões linfoepiteliais (Fig. 32.50). A submucosa contém infiltrados difu-

sos de linfócitos pequenos, centrócitos, linfócitos monocitoides e plasmócitos. Centros germinativos, aparentemente reativos ao processo inteiro, costumam estar presentes. Plasmócitos com frequência são abundantes na periferia das lesões e, em geral, são monoclonais.

O imunofenótipo é de célula B (CD19, CD20, CD22, Cd79a) com Ig de superfície. CD5, CD10, bcl-6 e, em geral, CD23 são negativos. Bcl-2 costuma ser positivo, assim como os marcadores CD21 e CD35 associados à célula dendrítica e zona marginal, e CD43 é variável (Isaacson, 2001b).

Genes de imunoglobulinas são rearranjados de forma clonal com mutações somáticas de regiões V. A trissomia 3 está presente em 60%, e t(11;18) (q21;q21), com envolvimento da apoptose inibindo o gene API2 com MLT em 18q21, em 25 a 50%. Também foram descritas t(1;14) (p22;q32) e t(14;18) (q32;q21), com ativação de vias antiapoptóticas mediadas por NFκB (Gascoyne, 2003).

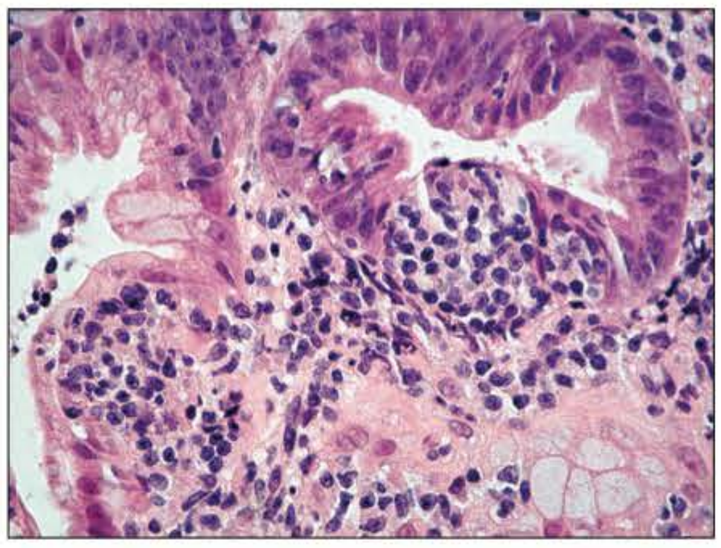


Figura 32.50 Linfoma MALT com aglomerados de linfócitos no epitélio gástrico (×500).

Linfoma de zona marginal esplênico (LZME)

Trata-se de um distúrbio com muitas características clínicas, laboratoriais e morfológicas similares àquelas da LCP e características similares às do LLP/LLC (Isaacson, 2001d). Esse linfoma denominado "linfoma esplênico com linfócitos vilosos circulantes". A doença é mais comum em homens do que em mulheres. Com frequência, os pacientes encontram-se na sétima década de vida e apresentam esplenomegalia. Em contraste com a LCP, a CBS está elevada. Alguns pacientes (~1/3) apresentam gamopatia monoclonal, usualmente IgM. As células neoplásicas são de tamanho médio com cromatina aglomerada, citoplasma moderadamente basófilo e vilos citoplasmáticos curtos, em geral com distribuição polar (Fig. 32.51). A medula óssea pode apresentar infiltrados irregulares ou envolvimento maciço. Células neoplásicas podem circular no sangue, mesmo na ausência de envolvimento da medula óssea.

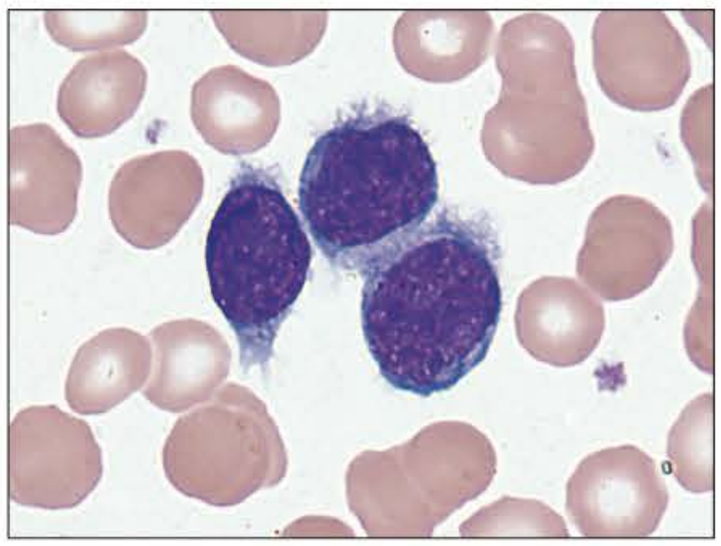


Figura 32.51 Linfócitos vilosos.

No baço, o infiltrado neoplásico expande da polpa branca para a polpa vermelha. O tumor origina-se nas zonas marginais esplênicas, as quais em processos reativos são vistas como uma área externa de linfócitos pálidos com citoplasma moderadamente abundante em torno da polpa branca e uma aparência tipo alvo. Em alguns casos, folículos reativos com centros germinativos estão presentes, e uma zona marginal expandida circunda a polpa branca e envolve a polpa vermelha. A hiperplasia da zona marginal pode simular esse distúrbio. Outros casos apresentam envolvimento predominantemente da polpa vermelha (Figs. 32.52 e 32.53). Lagos de eritrócitos estão ausentes. Linfonodos não são caracteristicamente envolvidos. A coloração de TRAP em geral resulta negativa, embora reações positivas tenham sido registradas.

Figura 32.52 Linfoma de zona marginal esplênico apresentando expansão leve da polpa branca e envolvimento irregular da polpa vermelha (×100).

O imunofenótipo é de célula B madura com IgM e IgD de superfície (similar ao LLP/LLC), com positividade para CD20 e CD79. Caracteristicamente, há negatividade para CD5, CD10, CD23, ciclina D1, CD103 e CD43.

Genes de imunoglobulinas estão clonalmente rearranjados com mutações somáticas. A translocação em 7q21-32 é observada em 40% dos casos, mas a trissomia 3 e t(11;18) observadas em linfomas MALT de zona marginal extranodal são incomuns (Dogan, 2003). Bcl-2 é variável, tipicamente expressa de acordo com alguns estudos (Pawade, 1995), mas não segundo outros (Menendez, 2004). A hepatite C pode ter um papel na patogênese em alguns casos (Iannitto, 2004; Kelaidi, 2004; Weng, 2003).

O LZME é indolente e foi demonstrado que responde mal à terapia. Novas abordagens utilizando quimioterapia combinada à terapia anti-CD20 parecem ser promissoras (Arcaini, 2004).

Linfoma de zona marginal nodal

Essa entidade recebeu a denominação de "linfoma de células B monocitoides" e pode se assemelhar ao envolvimento nodal observado no linfoma MALT ou no linfoma de zona marginal esplênico (Fig. 32.54). A raridade desse tumor (1,8% das neoplasias linfóides) e a presença de envolvimento extranodal não suspeito em até 1/3 dos casos (Isaacson, 2001c) levantam a possibilidade de ele não ser distinto de outras formas de linfoma de zona marginal.

O imunofenótipo é similar ao linfoma MALT ou linfoma de zona marginal esplênico com Ig de superfície (IgM/IgD, IgM, menos frequentemente IgA ou IgG), marcadores de célula B (CD19, CD20, CD22, CD79a), expressão de CD23, CD43 variável e ausência de CD5 ou CD10. Bcl-2 é expresso na maioria dos casos e a survivina é superexpressa em cerca de 50% dos pacientes, sugerindo ativação de vias antiapoptóticas. O linfoma de zona marginal nodal é heterogêneo nos níveis molecular e imuno-histoquímico (Camacho, 2003). Genes

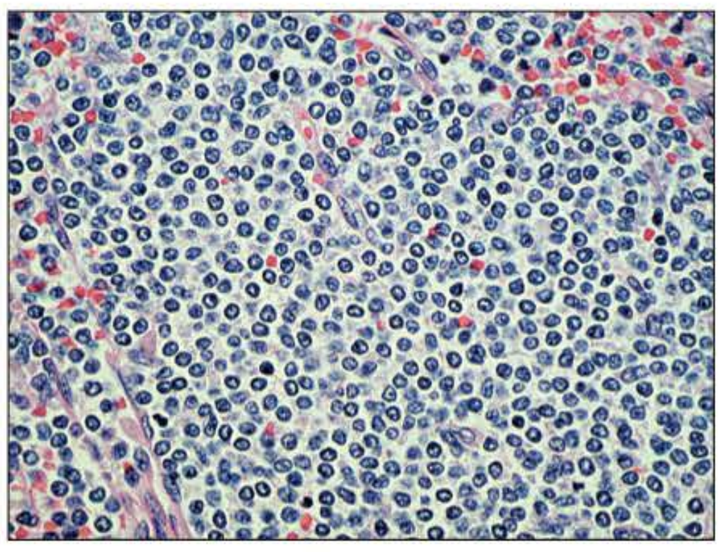


Figura 32.53 Visão de maior aumento do envolvimento da polpa vermelha esplênica por células monocitoides da zona marginal esplênica no linfoma de zona marginal esplênico (×200).

das cadeias pesada e leve (monotípica) de Ig são rearranjados. A trissomia 3 e t(1;18) são infrequentes.

Linfoma folicular

O linfoma folicular (LF) é um grupo de linfomas relacionados de células B derivadas do centro germinativo. A distinção morfológica entre os subgrupos é baseada no número de centroblastos nos folículos neoplásicos (Nathwani, 2001).

O padrão morfológico global (Fig. 32.55) consiste na recapitulação de folículos de linfonodos, todavia com diversidade limitada em termos de tipo celular e ausência de proliferação de outras estruturas dos linfonodos. Em geral, os tumores apresentam folículos aglomerados de uma uniformidade superior à usual, com ausência de revestimentos distintos, pouca intervenção do paracórtex e ausência de macrófagos com "corpúsculos coráveis" no centro germinativo normal e polarização. Mais frequentemente, células pequenas irregulares (pequenas células clivadas ou centrócitos) predominam com números variáveis de grandes células misturadas (células grandes clivadas ou não ou centroblastos). Também pode haver infiltrados difusos. O termo "folicular" indica um padrão folicular superior a 75%; "folicular e difuso" refere-se a casos com padrão folicular de 25 a 75%; e "difuso" refere-se a casos com padrão folicular inferior a 25% (ver Tab. 32.19).

A gradação citológica é baseada no número médio de centroblastos por campo de maior aumento nos folículos neoplásicos (Figs. 32.56 e 32.57). Um campo de maior aumento é definido como aquele com uma lente 40 × e uma ocular com um campo de visão de 18 mm. O uso de uma lente de 40 × e uma ocular de 20 mm de 10 × exige um ajustamento para baixo de um fator de 1,2, enquanto uma lente de 50 × com uma ocular de 22 mm de 10 ×, utilizada com frequência na hematologia, fornece um campo de visão quase equivalente, embora com maior resolução.

A diferenciação da zona marginal ou da célula B monocitoide ocorre em até 10% dos casos. Em geral, essa diferenciação ocorre em torno dos folículos e nas áreas interfoliculares, assemelhando-se a um linfoma composto. O LF apresenta um imunofenótipo de célula B madura com forte expressão de Ig de superfície monoclonal (bright) e expressão de CD19, CD20, CD22, CD23, CD79a e CD10. Geralmente, há expressão de bcl-2 (citoplasmático) e de bcl-6 (nuclear), que ajuda a diferenciar o LF da hiperplasia reativa (bcl-2-negativo/bcl-6-positivo) e de outros linfomas que não são derivados de células do centro germinativo (bcl-6-negativo). Tipicamente, CD5 e CD43 estão ausentes.

Tabela 32.19 Linfoma folicular: graduação e variantes

Graduação	Definição
Grau 1	0–5 centroblastos por campo de maior aumento*
Grau 2	6–15 centroblastos por campo de maior aumento*
Grau 3	> 15 centroblastos por campo de maior aumento*
3a	Presença de centrócitos
3b	Bainhas sólidas de centroblastos
Padrão	**Proporção folicular**
Folicular	> 75%
Folicular e difuso	25–75%†
Focalmente folicular	< 25%†
Linfoma folicular: variantes	
Linfoma centro folicular difuso	
Grau 1	0–5 centroblastos por campo de maior aumento*
Grau 2	6–15 centroblastos por campo de maior aumento*
Linfoma centro folicular cutâneo	

* Campo de maior aumento: 0,159mm² (objetiva 40x, campo de visão ocular de 18 mm; contar 10 campos de maior aumento e dividir por 10).

Se utilizar um campo de visão ocular de 10 mm, contar 8 campos de maior aumento e dividir por 10; ou contar 10 campos de maior aumento e dividir por 12 para obter o número de centroblastos/campo de maior aumento de 0,159mm².

Se utilizar um campo de visão ocular de 22 mm, contar 7 campos de maior aumento e dividir por 10; ou contar 10 campos de maior aumento e dividir por 15 para obter o número de centroblastos/campo de maior aumento de 0,159mm².

† Fornece uma % aproximada.

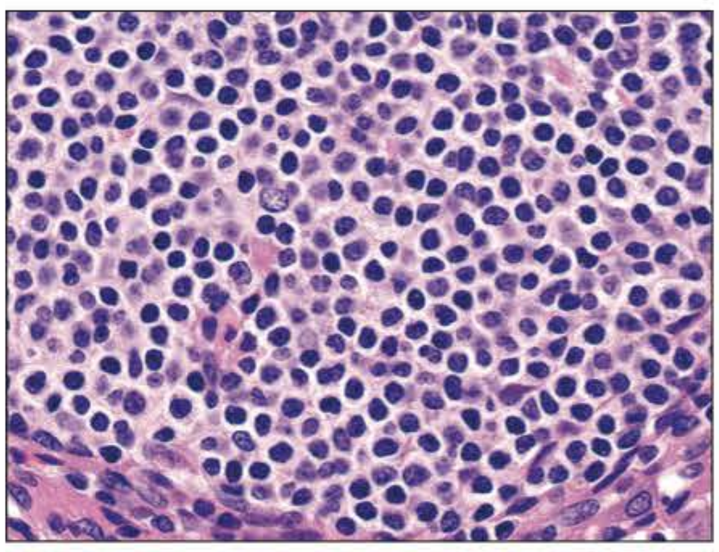


Figura 32.54 Linfoma nodal de zona marginal mostrando um nódulo de células B monocitoides (×200).

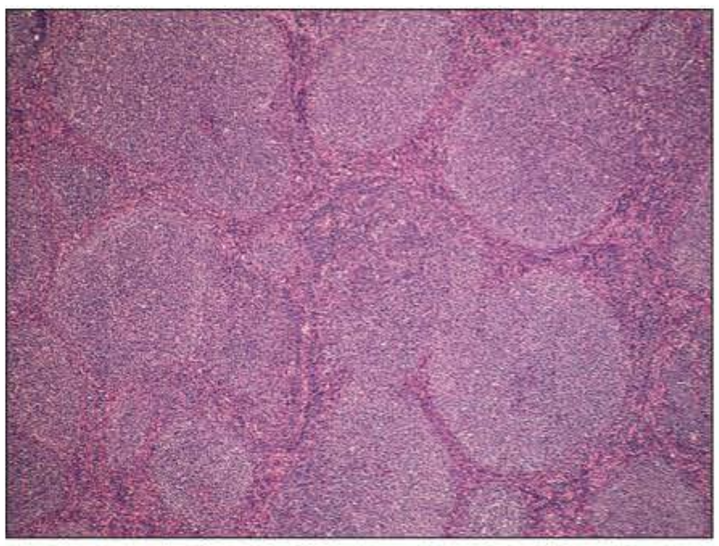


Figura 32.55 Visão de menor aumento do LF, repetindo estágios em centros germinativos do linfonodo (×200).

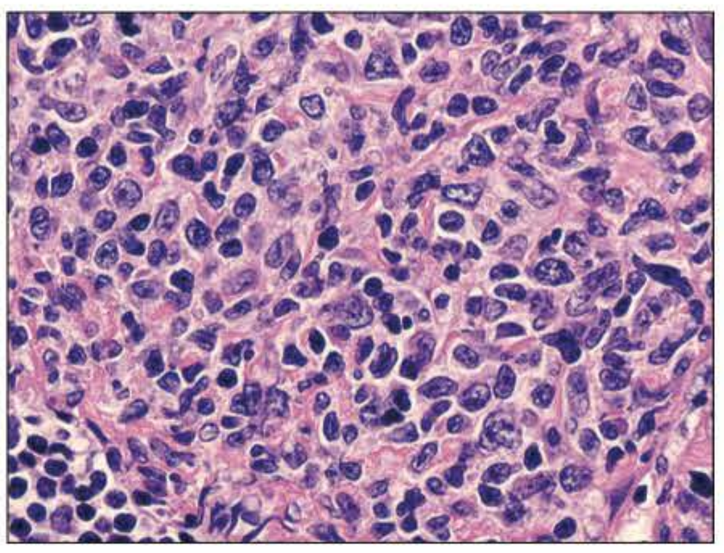


Figura 32.56 Linfoma folicular de grau 2, apresentando centrócitos com 5 a 15 centroblastos por campo de maior aumento. O linfoma de grau 1 apresenta menos de 5 centroblastos por campo de maior aumento.

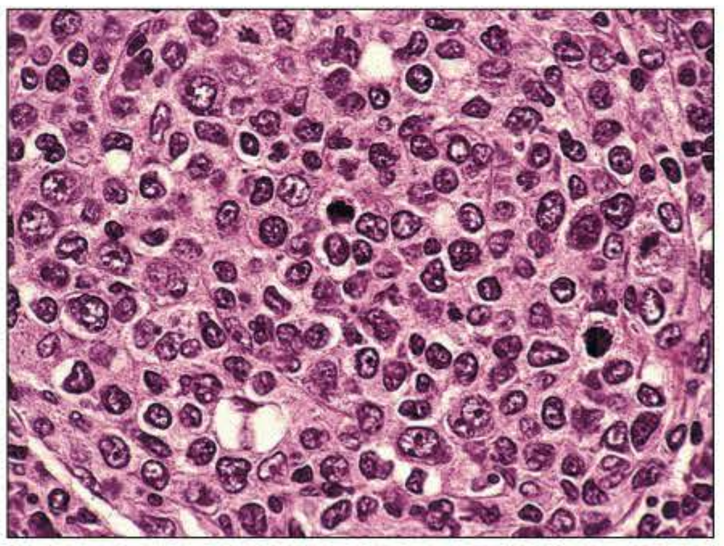


Figura 32.57 Linfoma folicular de grau 3a, apresentando centrócitos com mais de 15 centroblastos por campo de maior aumento (×500).

A IgH sofre rearranjo clonal junto a um gene da cadeia leve da Ig e há t(14;18) (q32;q21) com justaposição de IgH e BCL-2. A proteína bcl-2 é expressa de forma inadequada e a subsequente inibição da apoptose é considerada um mecanismo patogênico primário do LF. Ensaios padrões de PCR são relativamente insensíveis para IgH e t(14;18) porque apenas 75% dos pontos de quebra da IgH encontram-se na MBR ou na mcr direcionada aos iniciadores padrão. As técnicas de RT-PCR quantitativa e de FISH apresentam maior sensibilidade (Jiang, 2002; Jenner, 2002). Outras anormalidades podem ser observadas, incluindo uma variante do rearranjo de bcl-2, t(2;18) (p12;q21), anormalidades de 6q23-36 e deleções/anormalidades de 9p ou 17p13 envolvendo TP53 (ambas associadas à transformação de célula grande), rearranjos ou mutações de BCL-6 em 3q27 e anormalidades de X, 1, 2, 4, 5, 7, 12, 13 e 18 (Nathwani, 2001).

O prognóstico é variável. A doença de graus 1 e 2 geralmente apresenta uma evolução indolente e sem cura. A doença de grau 3 é mais agressiva, mas é provável que seja mais curável. Tentativas de identificar pacientes que necessitam de terapia agressiva levaram à criação de um índice internacional de prognóstico do LF (FLIPI, follicular lymphoma international prognostic index) (Solal-Celigny, 2004). O FLIPI se baseia na idade, estágio, níveis de hemoglobina, número de áreas nodais envolvidas e LDH, e parece ser válido pelo menos para o LF na primeira recaída (Montoto, 2004).

Linfoma (centro) folicular difuso

O linfoma (centro) folicular difuso é essencialmente uma transformação difusa do LF de grau 1 ou 2. O diagnóstico requer a fenotipagem para descartar o LCM ou de zona marginal, e inclui categorias prévias de linfoma de pequenas células clivadas difuso, linfoma centrocítica difuso, linfoma de grandes células e pequenas mistas difuso e centrocítico/centroblástico difuso. A nomenclatura atual é "LF, grau 1 (ou 2), predominantemente difuso".

O linfoma de grandes células B difuso (LGCBD) é considerado pelos autores da OMS como uma entidade diferente, mesmo quando se origina a partir do LF (Nathwani, 2001). Nesses casos, dois diagnósticos são recomendados: como "LF, grau 3/3 (75%), com LGCBD (25%)", quando o LGCBD ocupa 25% do tumor de onde foram tiradas amostras. O envolvimento leucêmico pelo LF também pode ocorrer e é conhecido como "leucemia de células de linfossarcoma". A citometria de fluxo é útil para diferenciar a LLC dos linfomas de células de revestimento leucêmicas ou de zona marginal.

Linfoma de células de revestimento (LCR)

Desde que a classificação REAL foi publicada, ficou reconhecido que o LCr é uma forma perigosa de linfoma que combina a refratariedade à terapia a uma evolução clínica agressiva e sobrevida precária (IL-SG, 1997). A refratariedade possivelmente é devida em parte à forte expressão de Bcl-2 também observada em células do manto normais, linfomas foliculares e algumas outras leucemias, linfomas e tumores sólidos (Korsmeyer, 1999). Bcl-2 inibe vias apoptóticas exploradas por muitas quimioterapias.

Com frequência, o tumor apresenta um padrão difuso ou, algumas vezes, de zona do manto (Swerdlow, 2001). No padrão de zona do manto, centros germinativos atróficos costumam ser observados no centro de nódulos, e eles também podem ser vistos como pequenos folículos nus ocasionais no interior de um infiltrado difuso. Os núcleos apresentam um tamanho pequeno a médio com cromatina aglomerada ou moderadamente dispersa e uma taxa mitótica moderadamente aumentada. De modo geral, as membranas nucleares são discretamente irregulares com núcleos pequenos redondos e clivados ocasionais também presentes. Histiócitos esparsos com citoplasma levemente eosinofílicos estão com frequência presentes. Uma variante blástica ou "blastoide" apresenta núcleos levemente maiores com cromatina tipo blasto e taxa mitótica mais elevada, simulando um linfoma linfoblástico (Fig. 32.58).

São células B (CD19, CD20, CD22) monoclonais (IgM e IgD de superfície monotípica) com coexpressão característica de CD5 (e CD43) e ausência de CD23. Bcl-2 e ciclina-D1 são expressos, enquanto bcl-6 e CD10 são negativos. Ocorrem raros casos sem expressão de CD5 (Liu, 2002).

Genes das cadeias pesada e leve (monotípica) de imunoglobulina são rearranjados. A maioria dos casos apresenta t(11;14) (q13;q32) envolvendo o gene da cadeia pesada de Ig e bcl-1 com superexpressão de PRAD-1, que codifica a ciclina-D1. Em laboratórios diagnósticos, muitos casos não revelam translocação demonstrável de bcl-1 por PCR, e a expressão de ciclina-D1 pode não ser detectada por razões técnicas. O ensaio FISH, que pode ser realizado com suspensões de células frescas, núcleos extraídos de parafina ou, em alguns casos, cortes finos de blocos de parafina, é em geral confirmatório. Cariótipo complexo costuma ser observado em casos avançados ou blastoides, e anormalidades secundárias de 8q24 estão associadas à morfologia blástica/blastoide e à apresentação leucêmica (Au, 2002; Hao, 2002; Viswanatha, 2000). Rearranjos de BCL-2 estão ausentes.

Linfoma de grandes células B difuso (LGCBD)

O LGCBD é uma categoria simplificada que inclui uma variedade de morfologias. Todas elas compartilham um padrão difuso, células grandes e fenótipo de célula B madura (Gatter, 2001a). O linfoma ocorre em locais nodais e extranodais e em todas as idades. É frequente em pacientes imunodeprimidos, normalmente em associação com o EBV, e é o linfoma mais comum do SNC. As várias morfologias assemelham-se a linfomas de células T, e a fenotipagem é necessária para o diagnóstico.

O LGCBD apresenta infiltração difusa de grandes células B (núcleos maiores que os dos histiócitos ou das células endoteliais) com morfologia variável. As células podem ser centroblastos e/ou centrócitos com citoplasma escasso e múltiplos nucléolos (variante morfológica centroblástica) (Fig. 32.59). Alguns casos apresentam imunoblastos plasmocitoides com núcleos grandes, um ou mais nucléolos proeminentes e citoplasma anfofílico que pode ser excêntrico (variante imunoblástica). O linfoma plasmablástico assemelha-se a essa variante, mas expressa os antígenos de plasmócito CD38 e CD138, ocorrendo primariamente na cavidade oral de pacientes com HIV, e está associado ao EBV. Ele possui um comportamento agressivo. Outros casos de linfoma difuso de grandes células B apresentam uma morfologia celular polimórfica com células grandes e pequenas e células gigantes similares às de Reed-Sternberg (variante anaplásica) (Fig. 32.60). Outros ainda às vezes apresentam células grandes com citoplasma claro.

Células neoplásicas apresentam Ig de superfície, algumas vezes Ig ci-

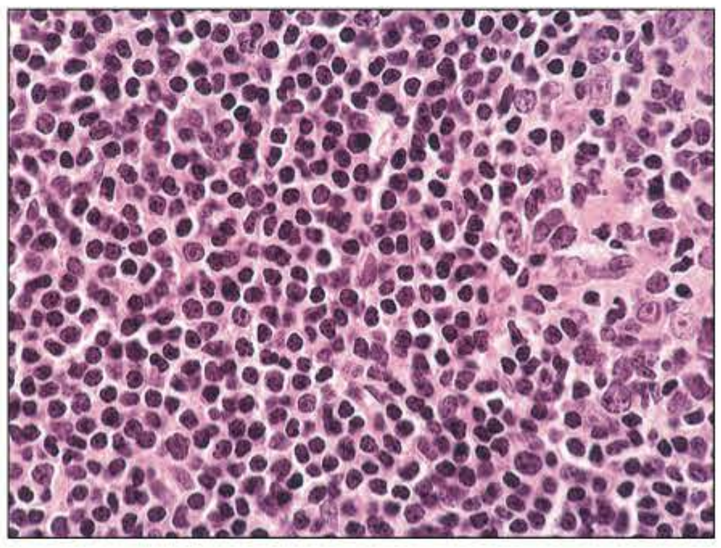


Figura 32.58 Linfoma de células de revestimento mostrando um manto expandido em torno de centros germinativos residuais.

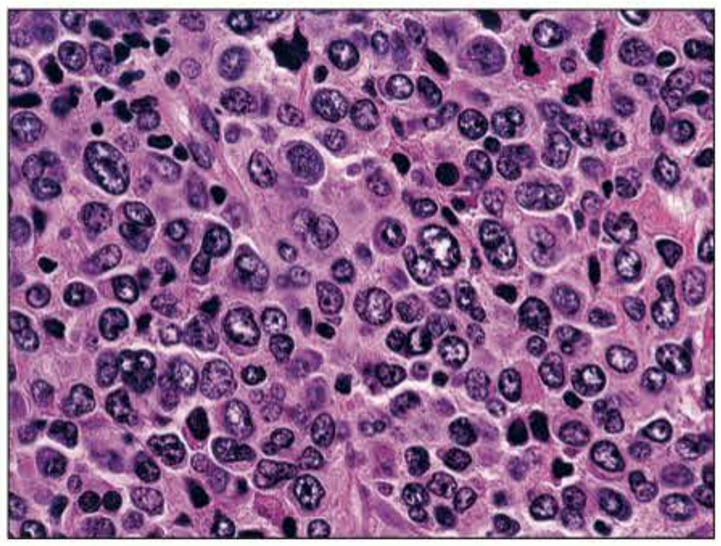


Figura 32.59 Linfoma difuso de grandes células B com centroblastos e centrócitos misturados (×500).

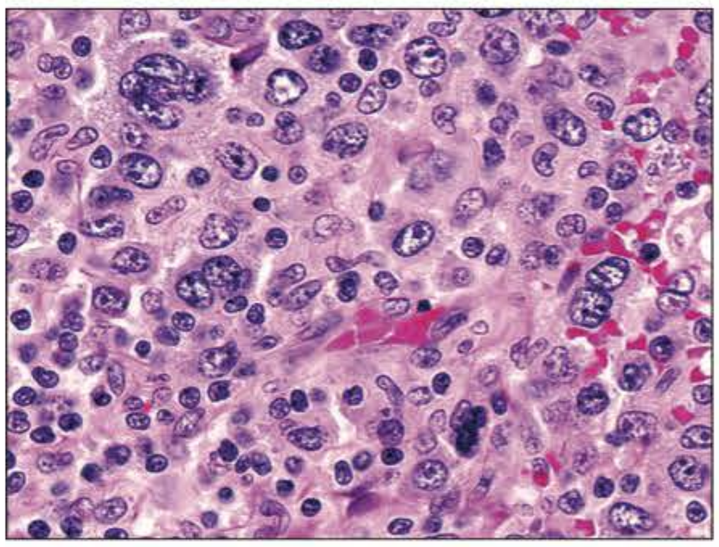


Figura 32.60 Linfoma difuso de grandes células B com polimorfismo e células semelhantes à de Reed-Sternberg (×1.000).

toplasmática e marcadores de células B (CD19, CD20, CD22, CD79a). Em alguns casos, o CD30 está presente em quantidades variáveis de células. A expressão de CD20 pela imuno-histoquímica costuma ser muito útil no diagnóstico em corte de parafina, uma vez que a citometria de fluxo pode ser dificultada por razões técnicas pelo grande tamanho da célula.

No LGCBD, genes das cadeias pesada e leve (monotípica) de Ig são rearranjados. Anormalidades de bcl-2 e/ou bcl-6 e expressão proteica são frequentes (Skinnider, 1999; Capello, 2000).

LGCBD com expressão completa da proteína ALK assemelham-se ao linfoma anaplásico de grandes células T (LAGCT) na morfologia e expressão de CD30 e ALK, mas sem t(2;5) e proteína de fusão NPM-ALK. Uma variante muito rara de linfoma anaplásico de grandes células, com envolvimento do gene da clatrina (CLTL-ALK), apresenta derivação de células B com expressão de CD79a, mas ausência de CD20.

Estudos sobre arranjo genético separaram o LGCBD em pelo menos quatro grupos principais de expressão: GCC-símile, ABC (activated B cell)-símile, de tipo 3 e linfoma de células B grandes mediastinal (Rosenwald, 2002, 2003; Savage, 2003). Dentre os três primeiros, o GCC-símile apresenta uma melhor resposta à terapia, se comparado ao ABC-símile ou ao linfoma de tipo 3. BCL-2 e BCL-6 estão no agregado de genes de tumores GCC-like e podem ser substitutos para essa categoria. Na categoria GCC, casos com t(14;18) apresentam uma menor proliferação, mas não diferem na resposta ao tratamento (Iqbal, 2004). A proteína bcl-2 está associada à resistência à apoptose e à quimioterapia, contudo essa resistência pode ser superada com anti-CD20 monoclonal humanizado (Mounier, 2003).

Linfoma de grandes células B mediastínicas (tímicas) (LGCBM)

O LGCBM (tímico) em geral ocorre no adulto jovem ou de meia-idade e é mais frequente em mulheres. A histologia é variável, mas a esclerose difusa ou compartimentalizada é frequente, e células claras, células multilobadas ou similares às de Reed-Sternberg podem estar presentes (Fig. 32.61). Os sintomas comumente estão relacionados com a localização, com compressão das vias respiratórias ou síndrome da veia cava superior, e é frequente a invasão e a recorrência locais após a terapia. CD45, CD19 e CD20 são expressos, mas não CD5 ou CD10 (Banks, 2001a). CD30 é expresso em alguns casos, mas não com fenótipo do linfoma de Hodgkin clássico. Genes de Ig são rearranjados de forma clonal. Hipermutações dos genes IgV e Bcl-6 são consistentes com a derivação celular GCC, mas ocorrem de modo similar ao observado nas células B tímicas normais (Csernus, 2004). A análise de arranjos de expressão genética revela que o LGCBM é similar ao linfoma de Hodgkin clássico (Savage, 2003). A maioria dos pacientes responde à quimioterapia CHOP padrão, contudo a sobrevida a longo prazo pode ser melhor quando são utilizadas abordagens mais agressivas (Andreopoulou, 2004; Zinzani, 2002).

Linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos (LGCBRCTH)

A variante linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos (LGCBRCTH) é muito difícil de ser diferenciada do linfoma de Hodgkin com predominância de linfócitos (LHPL), mas a distinção é importante porque esse tumor usualmente é agressivo e se manifesta no estágio avançado, enquanto o LHPL com frequência é localizado, indolente e exige menos terapia. O LGCBRCTH exibe um infiltrado difuso de grandes células B que podem parecer centroblastos ou imunoblastos, ou ainda células linfocíticas e histiocíticas do LHPL, incluindo células similares às de Reed-Sternberg (Fig. 32.62). As grandes células B constituem ≤ 10% do total, enquanto células T representam a maioria. O fenótipo é similar ao do LHPL, com positividade para CD20, CD79a e EMA. J-chain, Oct-2 e Bob-1 também são expressos. A Ig de superfície/citoplasmática, quando monoclonal, pode ser útil de alguma forma, contudo o LHPL atualmente também é considerado uma doença clonal de células B. As distinções principais são o infiltrado difuso, fundo de célula T, ausência de rosetas de CD3/CD57 em torno de células neoplásicas em um fundo nodular de células B, como é observado no LHPL, e exibição de estágio avançado.

Linfoma de grandes células B intravascular

O linfoma intravascular de grandes células B é um tumor raro e muitíssimo restrito à luz intravascular de pequenos vasos (Gatter, 2001b). É bastante agressivo, amplamente disseminado no momento do diagnóstico e com frequência permanece sem ser diagnosticado até a autópsia. Os achados costumam incluir hemorragia, trombose e/ou necrose de tecidos de todo o corpo, com o tumor imperceptivelmente presente nos pequenos vasos. Marcadores de células B são expressos (CD19, CD20, CD22, D79a), e CD5 em alguns. Rearranjos clonais do gene de Ig estão presentes com hipermutação somática consistente com a derivação pós-GCC (Kanda, 2001). Casos raros de células T são descritos (Merchant, 2003). A ausência de moléculas de adesão vascular CD29 (integrina β1) e CD54 (ICAM-1) foi relatada (Ponzoni, 2000).

Linfoma de efusão primária (linfoma localizado em cavidade corpórea)

Trata-se de um outro tumor raro que se manifesta com derrames serosos, mas sem tumor. A citologia costuma ser imunoblástica ou anaplásica. Está associado ao herpesvírus-8 humano (HHV-8) do sarcoma de Kaposi em pacientes imunodeficientes. As células tumorais

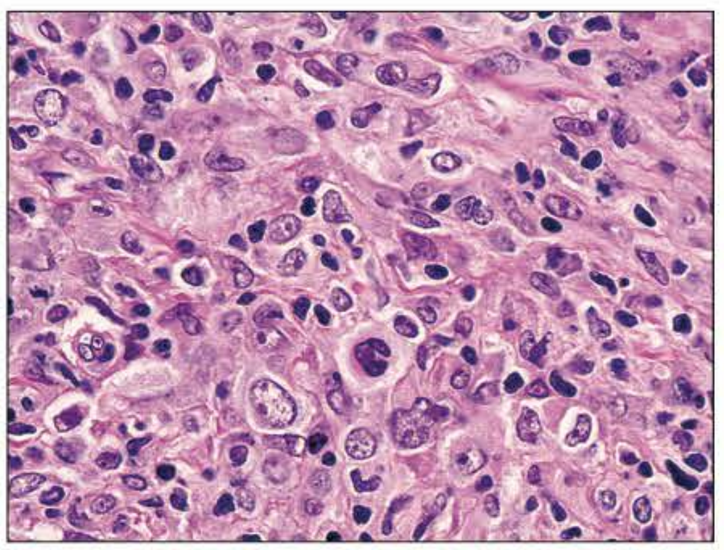


Figura 32.61 Linfoma mediastinal de grandes células B com esclerose (×500).

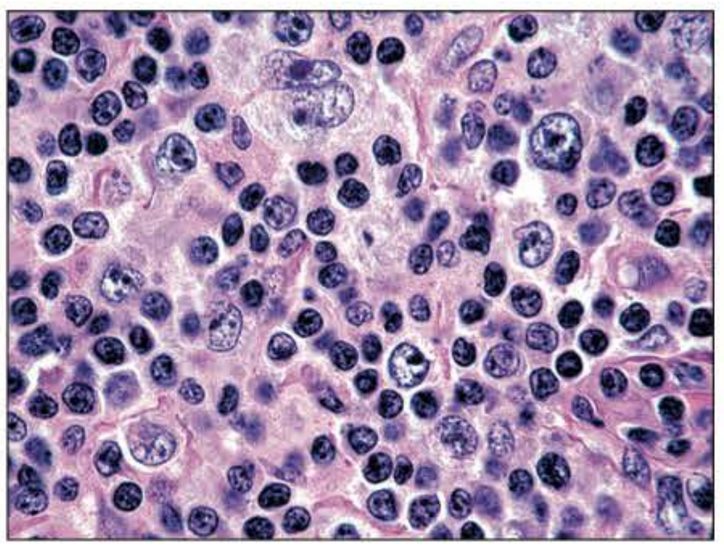


Figura 32.62 O linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos assemelha-se ao linfoma de Hodgkin com predominância de linfócitos, mas a maioria das células pequena é de células T (×500).

são células B e apresentam rearranjos de Ig, embora variedades de células T tenham sido relatadas. O EBV comumente pode ser detectado utilizando a hibridização in situ para o ribonucleotídeo codificado para o EBV (EBER, EBV-encoded ribonucleotide), mas a proteína-1 latente da membrana do EBV está ausente na imuno-histoquímica (Banks, 2001b). A patogênese pode estar relacionada à ativação viral da via alternativa NF?B (Matta, 2004).

Linfoma de Burkitt (LB)

O LB foi descrito pela primeira vez na mandíbula de crianças africanas por Dennis Burkitt, em 1958 (Burkitt, 1958). Foi definido inicialmente como uma entidade tumoral distinta pela OMS, em 1968 (Berard, 1985), e permanece assim na classificação atual da OMS (Diebold, 2001). Representa aproximadamente 1/3 dos casos de linfomas não Hodgkin e também ocorre em adultos. Existem vários tipos epidemiológicos de LB. O protótipo é o LB "endêmico", que ocorre predominantemente em crianças vivendo na África e em outras regiões equatoriais e está associado ao EBV. O LB "esporádico" ocorre no mundo inteiro, afetando crianças e adultos, e em geral não está associado ao EBV. Pacientes com HIV ou outra imunossupressão com frequência apresentam LB relacionado ao EBV que, no entanto, difere da forma endêmica ao nível molecular. O LB é um tumor muito proliferativo e cresce de modo bem rápido.

O tumor apresenta um infiltrado difuso com células relativamente uniformes de tamanho médio, com bordas penetrantes e núcleos redondos a ovais contendo 3 a 5 nucléolos moderadamente proeminentes em paracromatina relativamente clara (Fig. 32.63). O citoplasma é moderadamente basófilo e tende a se adaptar entre células adjacentes. Vacúolos citoplasmáticos que contêm lipídeos são observados em imprints (Fig. 32.64). São observadas altas taxas de mitose e apoptose e um padrão proeminente de macrófagos do tipo "céu estrelado". Na maioria dos casos, a histologia é característica, mas existe sobreposição com o linfoma difuso de células B grandes e, em alguns casos, com o linfoma linfoblástico.

A leucemia/LB apresenta células leucêmicas com cromatina moderadamente aglomerada e citoplasma vacuolado basófilo (Fig. 32.63) e com imunoglobulina de superfície restrita a uma cadeia leve. De modo geral, elas apresentam ausência de TdT, presença de antígenos de células B CD19, CD22, CD20, CD79a e, com frequência, CD10 e expressão de Ig de superfície monoclonal. Raros casos apresentam ausência de imunoglobulina de superfície de membrana (SMIg, *surface membrane immunoglobulin*) ou expressão de TdT, e eles exigem confirmação citogenética. A leucemia/LB apresenta uma taxa de proliferação muito alta e evolução rápida da doença. Embora ele seja rapidamente fatal quando não tratado, resultados recentes da terapia em pacientes pediátricos revelaram uma sobrevida de longo prazo superior a 90% (Patte, 2001). O resultado em adultos também melhorou, mas a sobrevida de longo prazo é inferior que a das crianças (50 a 70%) (Kasamon, 2004; Blum, 2004).

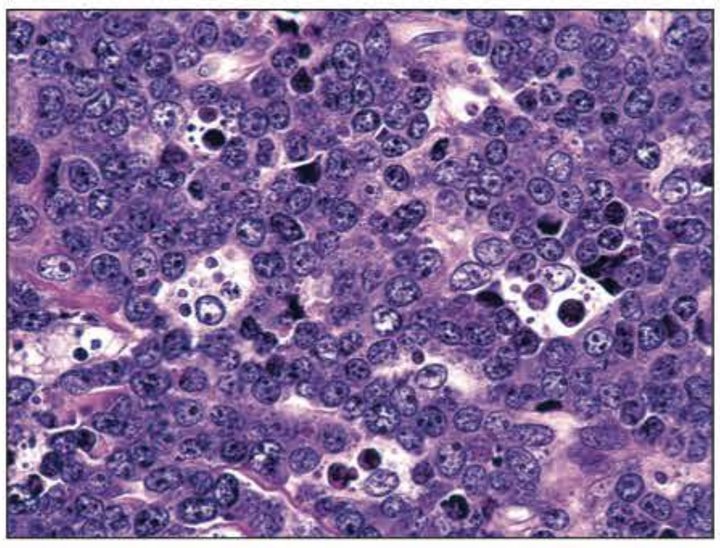


Figura 32.63 Linfoma de Burkitt (×500).

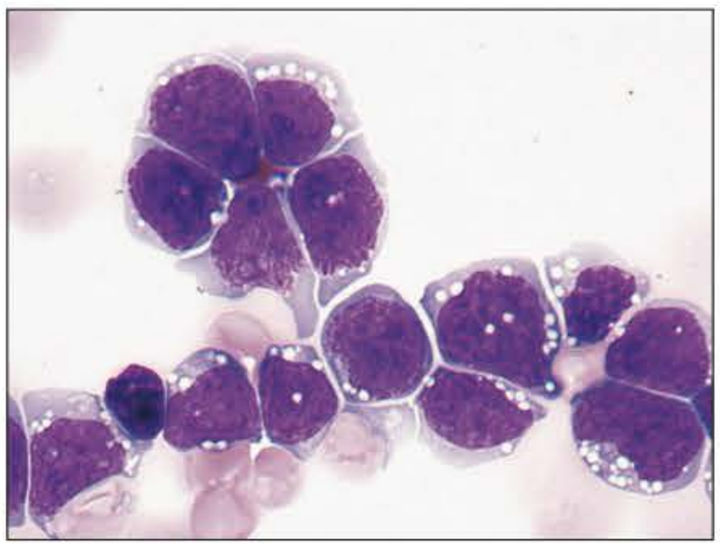


Figura 32.64 Citologia do LB (×1000).

A leucemia/LB apresenta anormalidades citogenéticas características que consistem na translocação de *c-myc* na região cromossômica 8q24 para um dos genes de imunoglobulina (cadeia pesada-14q32, λ-2q11 ou λ-22q11), para fornecer t(8;14), t(2;8) ou t(8;22). A maioria dos casos apresenta t(8;14) (q24;q32). C-myc promove a proliferação e a apoptose (Le Beau, 2000) e presumivelmente causa proliferação descontrolada de células B produtoras de imunoglobulina. No entanto, essas células são sensíveis à quimioterapia.

Linfoma de Burkitt atípico

Ocorrem casos de linfoma com características histológicas e clínicas intermediárias entre o LB e o de grandes células B. A histologia é similar ao LB, exceto pelo fato de geralmente haver mais pleomorfismo com presença de células grandes (até 25%), assim como células de tamanho médio e com maior irregularidade de núcleos e nucléolos mais proeminentes do que o LB típico (Fig. 32.65). O citoplasma costuma ser menos distinto que no LB.

Previamente denominado linfoma similar ao de Burkitt ou não Burkitt, foi observado que alguns casos apresentam anormalidades de bcl-2 e não apresentam anormalidades de c-myc (Yano, 1992). A classificação REAL colocou a maioria dos casos com essa histologia na categoria de linfoma de grandes células B difuso.

Em crianças, o quadro clínico do LB atípico é similar ao do LB (Hutchison, 1989), embora estudos citogenéticos não revelem translocações de c-myc (Lones, 2004). Em adultos, translocações envolvendo bcl-2 e c-myc foram identificadas em alguns pacientes e são características adversas (MacPherson, 1999).

O termo LB atípico é utilizado para aqueles tumores com histologia intermediária, taxa de proliferação de cerca de 100% pela imuno-histoquímica Ki-67 (Mib-1) e/ou demonstração de translocação envolvendo myc (Diebold, 2001).

Em uma criança com tumor de crescimento rápido e quadro similar ao do LB (como localização ileocecal ou em outro sítio abdominal, localização extranodal com derrames, localização endócrina ou gonadal etc.), o tratamento é como se a condição fosse o LB (Cairo, 2003). A fixação e outros artefatos técnicos dificultam a distinção morfológica, e a classificação revela uma maior variação entre observadores que outros linfomas pediátricos (Lones, 2000).

Em adultos, crianças com tumores de crescimento mais lento, tumores com taxas de proliferação de 90 a 95% ou aqueles com cariótipos complexos, a classificação se torna obscura. A tendência no tratamento de linfoma de grandes células B em indivíduos jovens é utilizar terapias destinadas ao LB (Patte, 2001). Os adultos costumam ser tratados como se apresentassem LGCBD. Uma terapia mais agres-

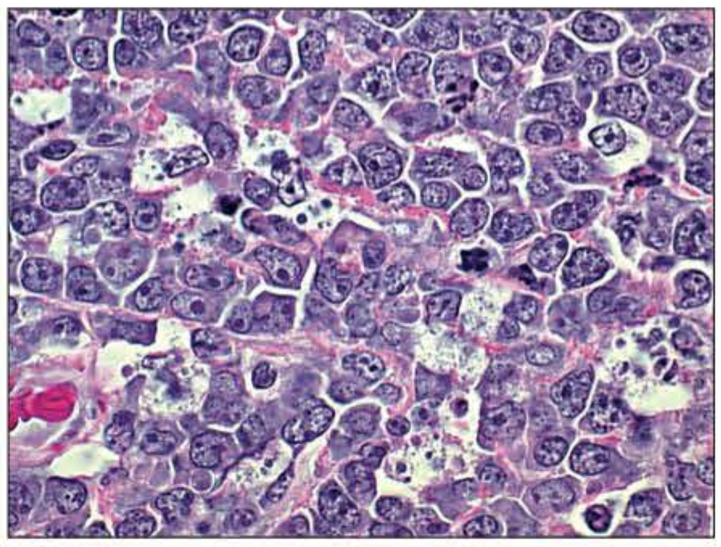


Figura 32.65 Linfoma de Burkitt atípico ou tipo Burkitt, com pleomorfismo moderado e aumento do número de nucléolos proeminentes (×500).

siva pode exercer algum papel, todavia isso em geral significa aumento da morbidade e por isso a terapia é controversa e normalmente não utilizada. Esquemas pediátricos agressivos foram testados com sucesso em adultos com LB (Nicola, 2004).

Granulomatose linfomatoide (GL)

A GL é um distúrbio linfoproliferativo angiocêntrico que envolve os pulmões e/ou outros locais, como encéfalo, rins, fígado, pele, vias aéreas superiores e trato gastrintestinal (Katzenstein, 1979). É considerada uma neoplasia de células B induzida pela infecção pelo EBV, que possui um proeminente componente reativo de células T por vezes em situação de imunossupressão (Wilson, 1996; Katzenstein, 1990). Apresenta características histológicas similares àquelas exibidas pelo linfoma de células NK/T do tipo nasal (Jaffe, 2001b).

As manifestações clínicas costumam incluir tosse, dispneia e dor torácica com sintomas constitucionais, incluindo febre, mal-estar, perda de peso, sintomas gastrointestinais, mialgias e sintomas neurológicos. Nódulos bilaterais localizados na região pulmonar média a inferior são mais observados, frequentemente com nódulos cerebrais, renais, cutâneos e subcutâneos.

A histologia revela um infiltrado angiocêntrico e angiodestrutivo de linfócitos polimórficos, plasmócitos, imunoblastos e histiócitos, com neutrófilos e eosinófilos imperceptíveis e sem granulomas bem formados. Com frequência é observada necrose fibrinoide de vasos (Fig. 32.66), assim como infarto tissular.

A imunofenotipagem revela número variável de CD79a, usualmente células B CD20+ com expressão de LMP-1 de EBV, expressão variável de CD30 e ausência de CD15. O EBER é em geral positivo em alguns estudos (Myers, 1995). A maioria das células de fundo são células T reativas com predominância de CD4. Lesões de grau mais elevado (com mais células B) apresentam rearranjo clonal dos genes de receptor de IgH. Genes de receptor de células T não são rearranjados de forma clonal.

A gradação está relacionada ao número de linfócitos clonais positivos para EBV. Lesões de grau I são polimóficas com apenas células grandes ocasionais. Lesões de grau II são mistas com células pleomórficas grandes em um fundo inflamatório misto. Lesões de grau III representam essencialmente um linfoma difuso de grandes células B.

O resultado é variável, com períodos de melhoria e piora do quadro, algumas vezes remissão espontânea e frequentemente progressão para uma insuficiência pulmonar em uma média de 2 anos. A terapia adequada está relacionada ao grau. Lesões de grau III são tratadas com quimioterapia sistêmica, enquanto as de grau I e II podem ser tratadas com α-interferon.

Neoplasias de célula T e células *natural killer*

Linfomas e leucemias de células T e células NK são um grupo diverso de neoplasias incomuns ou raras em comparação com os linfomas de células B. Embora representem apenas 12% de todos os linfomas, um número aproximadamente igual de categorias é reconhecido pela OMS. A maioria deles é tipificada pelo rearranjo clonal de genes que codificam CD3, o complexo receptor da célula T que é um receptor de antígeno da família do supergene de imunoglobulina, embora neoplasias verdadeiras de células NK não apresentem rearranjo clonal nos testes clínicos (Jaffe, 2001c). As características das principais neoplasias de células T/NK estão resumidas na Tabela 32.20.

A maioria das células T pós-tímicas (periféricas) expressa cadeias α-β do TCR, ao contrário de uma pequena minoria. Estas, por sua vez, expressam cadeias γ-δ. Células NK expressam apenas cadeias ε com CD3 citoplasmático. Estudos da clonalidade da célula T no laboratório com frequência são focados no rearranjo do receptor γ-δ que está presente em todas ou na maioria das células T. Isso porque, no desenvolvimento inicial da célula T, os genes das cadeias γ e β fazem o rearranjo de forma simultânea, e o comprometimento do TCR depende da expressão da cadeia α substituta e do desenvolvimento de um pré-TCR (Haks, 1998; Kang, 2001). O repertório das "famílias" importantes do gene γ é muito menor (4 a 6) do que o das famílias β, e o ensaio de PCR para TCR-γ é muito mais eficiente para uso rotineiro do que o ensaio de PCR para TCR-β, que requer aproximadamente 25 conjuntos diferentes de iniciadores (Shadrach, 2004). O teste de PCR para TCR-γ também é efetivo com DNA extraído com formalina e substituiu amplamente a análise de TCR-β por Southern blot. Ensaios de citometria de fluxo utilizando anticorpos para cada família de TCR-β também são úteis e rápidos, contudo exigem um grande número de anticorpos. A RT-PCR para transcrições da família V β pode ser utilizada (Langerak, 2001; Moorice, 2004).

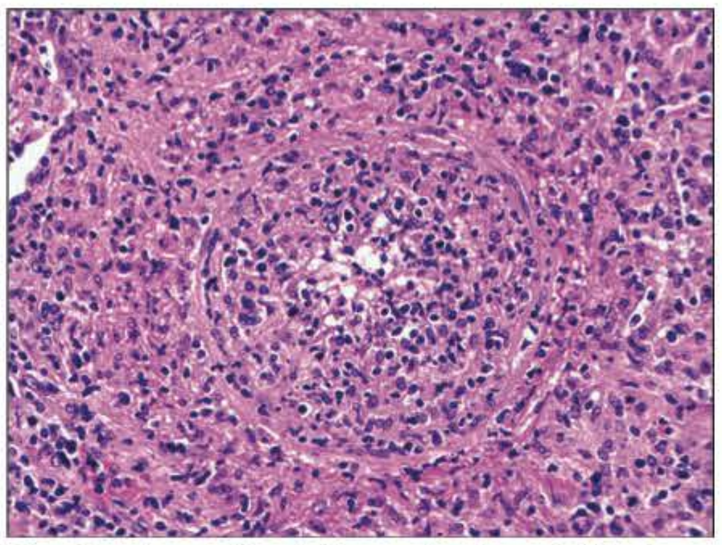


Figura 32.66 Granulomatose linfomatoide mostrando um infiltrado pulmonar angiodestrutivo polimórfico (×200). Cortesia da dra. Anna-Luise Katzenstein.

Células T α-β maduras expressam CD2, CD3, CD5, CD7 e CD4 ou CD8. Essas células são negativas para TdT e CD1. O tecido linfoide normal em repouso costuma apresentar uma relação CD4:CD8 igual a 2:1. A diferenciação em um ou outro no timo envolve a ativação ou o silenciamento de CD4 ou CD8 de células CD4+CD8+, porém esse processo é pouco compreendido (Yasutomo, 2000). Células CD4 primariamente maduras proliferam no ambiente pós-tímico (Foa, 1980). A relação CD4:CD8 cai na inflamação aguda e com frequência aumenta a altos níveis na recuperação e na inflamação crônica. Por isso, essas moléculas não são bons marcadores de clonalidade. Neoplasias de células T periféricas em geral perdem a expressão de um antígeno normal de célula T (p. ex., CD7) e apresentam predominância de CD4 ou CD8 (Knowles, 1989). Deve-se tomar cuidado para distinguir células T α-β anormais de células NK normais.

De modo geral, células T γ-δ são duplamente negativas para CD4 e CD8 e, com frequência, também são CD5 negativas, com expressão de CD2 e uma sequência de maturação de CD7. Como representam apenas 1 a 2% das células T normais, o aumento do número dessas células é um achado suspeito. Células NK são altamente variáveis do ponto de vista da expressão dos antígenos normais CD2 e CD7 das células T, costumam ser CD5 negativas e em geral expressam CD16 (um receptor Fc de baixa afinidade também é observado em monócitos e granulócitos) com CD56 e CD57 variável. CD3 é detectável no citoplasma com anticorpos policlonais, contudo também está presente na superfície em algumas neoplasias de células NK. Usualmente, estão presentes constituintes de grânulos citotóxicos (TIA-1, granzima-B e perforina) em células NK e células T citotóxicas.

Leucemia pró-linfocítica T

A leucemia pró-linfocítica T é um distúrbio incomum que atinge indivíduos com uma idade média de 69 anos. Trata-se de uma doença um pouco mais frequente em homens que em mulheres. Os pacientes apresentam uma linfocitose acentuada ($> 100 \times 10^9$/L), anemia e trombocitopenia. Na maioria dos casos, a célula neoplásica é um pró-linfócito com um nucléolo proeminente (*punched-out*) que apresenta cromatina perinucleolar distinta e citoplasma moderadamente abundante. Entretanto, em cerca de 20% dos pacientes, os linfócitos não apresentam características distintas e não possuem um nucléolo proeminente. A hepatoesplenomegalia, a linfadenopatia e o envolvimento cutâneo são comuns (Catovsky, 2001b).

O imunofenótipo é mais frequentemente de célula T periférica CD4+ (60%) com coexpressão de CD4/CD8 em 25% e de CD8+ em 15%. CD7 é forte, e CD3 de superfície é fraco.

Ocorre um rearranjo clonal de TCR-α-β (e γ-δ). Então, 80% apresentam inv(14) (q11;q32), e 10% apresentam t(14;14) (q11;q32) envolvendo o *locus* do TCR-α-β e oncogenes TCL1 e TCL1b. Anormalidades do cromossomo 8, t(8;8) (p11-12;q12) ou trissomia 8q são observadas em 70%, e outras anormalidades incluem t(X;14) (q28;q11) e deleções em 11q23.

A leucemia pró-linfocítica T é um processo maligno rapidamente progressivo com sobrevida em geral inferior a 4 anos. Progressos re-

Tabela 32.20 Key Características essenciais das principais neoplasias de células T e NK maduras

Linfoma	Demografia, manifestações clínicas e laboratoriais	Morfologia	Marcadores da superfície celular: Positivo	Marcadores da superfície celular: Negativo	Rearranjos Genéticos
LPL de células T	H > M, idade média de 69 anos. Linfocitose > 100 ×10³, anemia, trombocitopenia, HEM, lesões cutâneas	Pró-linfócito com nucléolos proeminentes, cromatina perinuclear, citoplasma abundante	CD7; CD4 (60%), CD4/8 (25%), CD8 (15%)		TCRα-β, inv(14)(q11;q32)
Leucemia LGG	Idade média de 63 anos. Neutropenia causando infecções, anemia, linfocitose leve, LGG > 2 ×10³	Célula de tamanho médio com cromatina condensada, citoplasma azul-claro abundante, grânulos azurófilos	CD3, 8, 57, TCRα-β Algumas variantes são CD4+ ou CD4/8+ ou CD4/8–	CD4	TCRγ, β
Leucemia de células NK agressiva	Adolescentes e adultos jovens asiáticos. Sintomas constitucionais, HEM, CBS variável	Variável, pode se assemelhar a LGG ou ter um aspecto blástico	cCD3ε, 2, 56	sCD3, 57	EBV epissomal clonal, del(6)(q21;q25)
Leucemia-linfoma de células T do adulto	Associado à infecção por HTLV-1, frequente no Japão, Caribe, África Central. Variante aguda com envolvimento cutâneo e de linfonodos, hipercalcemia	Células blásticas moderadamente grandes com núcleos convolutos (células em flor), sem granulações, citoplasma basofílico	CD 2, 3, 5, 25, frequentemente CD30	CD4, 7	Genes TCR
Linfoma extranodal de células NK/T, tipo nasal	H > M, América Latina e Ásia. Destruição nasofaríngea maciça. Associado à infecção pelo EBV	Células linfoides polimórficas, frequentemente angiocêntrico ou angioinvasivo, com ulceração mucosa	CD2, 56, cCD3ε	CD4, 8, 5, 16, 56	EBV epissomal clonal
Micose fungoide/SS	H > M, meia-idade ou indivíduos mais velhos. Dermatite evoluindo para lesões ulceradas. Envolvimento do SP na SS	Infiltrados dérmicos semelhantes a faixas, constituídos de linfócitos com núcleos cerebriformes, microabscessos	CD2, 3, 4	CD7, 8	Genes TCR
Cutâneo primário CD30+	H > M, adultos idosos. Limitado a lesões cutâneas	Células linfoides polimórficas, algumas anaplásicas	CD4, 30	Frequentemente CD2, 3, 5	Genes TCR ALK-negativo
Linfoma anaplásico de grandes células	H≈M, adolescentes e adultos jovens. Adenopatia periférica e abdominal, envolvimento extranodal e da MO, sintomas B frequentes	Células grandes polimórficas, núcleos tipo coroa, múltiplos nucléolos, citoplasma abundante	CD30 (citoplasmático e complexo de Golgi), CD2, 4	CD3, 5, 7, EBV	t(2;5)(p23;q35) Outras variantes envolvem 2p23

LPL = leucemia pró-linfocítica; HEM = hepatoesplenomegalia; LGG = linfócitos grandes granulares; EBV = vírus Epstein-Barr; SP = sangue periférico; MO = medula óssea.

centes foram feitos com novas terapias, incluindo CAMPTH-1H (Dearden, 2001; Cao, 2003).

Leucemia grandes granulares (LGG)

A idade média desses pacientes é de 63 anos. Sessenta a setenta por cento dos pacientes são sintomáticos com infecções recorrentes por causa da neutropenia. A anemia ou a artrite reumatoide também é comum (Lamy, 2003). A linfocitose costuma ser leve (até 20 ×10³/μL), e o número de linfócitos pode ser normal. Os grandes linfócitos granulares geralmente medem no mínimo 2 ×10³/μL (Chan, 2001a). A neutropenia crônica é frequente, pode ocorrer esplenomegalia e pode haver anemia e/ou trombocitopenia. Os grandes linfócitos granulares estão pelo menos relativamente aumentados e apresentam tamanho moderado com abundante citoplasma azul-claro e cromatina condensada. Grânulos citoplasmáticos azurófilos variam em número e tamanho (Fig. 32.67). A medula óssea apresenta um infiltrado intersticial moderado de linfócitos granulados. Elementos eritroides e mieloides podem ser normais ou hipoplásicos em casos ocasionais. O baço costuma apresentar infiltrados na polpa vermelha.

A variante comum é CD3/CD8/CD57/TCR-α-β+; CD4–. Variantes incomuns expressam CD4 (Lima, 2003), expressam dualmente CD4 e CD8, apresentam CD4/CD8 duplamente negativos e/ou apresentam expressão variável de CD57 e CD56. Casos reativos com CD3 e CD56 tendem a se comportar de forma agressiva (Gentile, 1994). Casos de leucemia de grandes linfócitos granulares após transplante renal foram observados (Gentile, 1998), assim como casos originados de doador após transplante de medula óssea (Au, 2003). É provável que a linfocitose de grandes linfócitos granulares após transplante de medula óssea esteja relacionada ao surgimento precoce de grandes linfócitos granulares (Niederwieser, 1987).

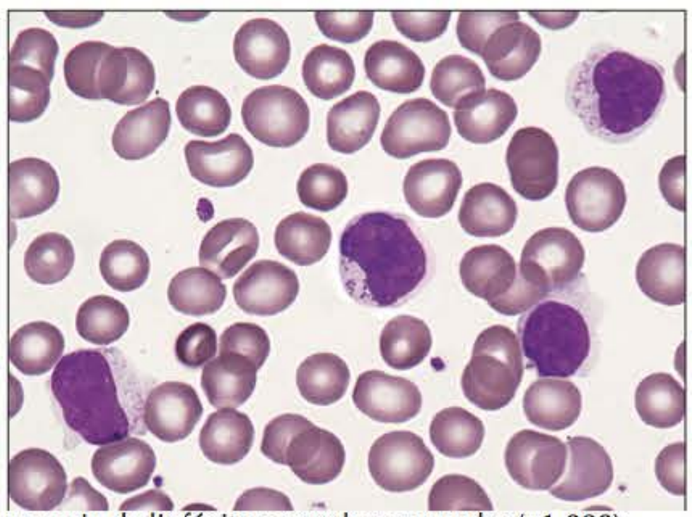


Figura 32.67 Leucemia de linfócitos granulosos grandes (×1.000).

O rearranjo do gene do TCR-γ usualmente é clonal por PCR, e o TCR-β em geral é rearranjado. Embora uma única banda clonal costume confirmar um diagnóstico suspeito, ensaios de PCR podem revelar um clone dominante emergindo de uma população oligoclonal de distúrbio autoimune. Isso, com uma evolução tipicamente indolente, dificulta muito o diagnóstico de casos com CBS baixa. Uma baixa dose de metotrexato, ciclosporina ou ciclofosfamida costumam produzir remissão duradoura (Lamy, 2003).

Leucemia de células NK agressiva

Trata-se de uma rara leucemia agressiva de células NK associada ao EBV. É comum em adolescentes e adultos jovens asiáticos. Em geral, ela se manifesta com sintomas constitucionais. A CBS é variável, a hepatoesplenomegalia é comum e, algumas vezes, ocorre linfadenopatia, coagulopatia, síndrome hematofagocítica e/ou falência de múltiplos órgãos (Chan, 2001b).

A morfologia das células leucêmicas é variável, algumas vezes assemelhando-se à morfologia dos LGG, com cromatina condensada e citoplasma basofílico e, algumas vezes, apresentando células blásticas ou transformadas.

O imunofenótipo é CD3 de superfície negativo, CD3 ε citoplasmático/CD2+/C56+ e expressão de moléculas citotóxicas (TIA-1. granzima-B e/ou perforina). CD16 é variável, e CD57, negativo.

Os genes do TCR não estão rearranjados. A clonalidade pode ser estabelecida pela detecção do EBV episssomal clonal (analisando repetições em tandem pelo método de Southern blot) ou pela observação de anormalidades citogenéticas clonais como del(6) (q21;q25).

A proliferação indolente de células NK também ocorre e é caracterizada pelo início na idade adulta, ausência de sintomas constitucionais, ausência de EBV e fenótipo CD57+ (juntamente com CD2, CD16 e CD56, com CD3 de superfície negativo) (Fig. 32.68).

Leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA)

A LLTA é uma leucemia/linfoma de células T altamente variável, porém com frequência agressiva do ponto de vista clínico, associada à infecção pelo retrovírus HTLV-1(Poiesz, 1980). É mais endêmica no sudoeste japonês, assim como na bacia caribenha, sudeste dos Estados Unidos e região centro-africana. A transmissão do HTLV-1 pode ocorrer verticalmente (da mãe para o filho) ou pelo contato sexual, uso de drogas intravenosas ou transfusão sanguínea. Apenas uma minoria de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (2,5%) desenvolve a LLTA e tipicamente após um período latente de muitos anos. A infecção aguda resulta em uma síndrome similar a um resfriado.

De modo geral, a variante aguda apresenta leucemia, envolvimento cutâneo, linfadenopatia generalizada, lesões ósseas líticas e hipercalcemia. O esfregaço de sangue revela anemia e trombocitopenia com a presença de células blásticas grandes com núcleos em forma de trevo e cromatina condensada ("células em flor") no sangue e na medula óssea. Os nucléolos são pequenos ou estão ausentes, o citoplasma não possui grânulos e é basófilo. Células tipo blastos misturadas estão presentes. O envolvimento da medula óssea costuma ser irregular e com aumento da atividade osteoclástica. As lesões cutâneas assemelham-se àquelas observadas na micose fungoide, incluindo a presença de microabscessos de Pautrier, mas frequentemente com mais células pleomórficas.

Na variante aguda ou na variante linfomatosa, os linfonodos apresentam uma morfologia altamente variável, em geral com características e diversidade similares às do linfoma anaplásico de grandes células (Kikuchi, 2001). A histologia pode se assemelhar à do LAGCT comum, variante de pequenas células, linfoma de Hodgkin ou linfoma típico de grandes células (Fig. 32.69).

A variante crônica com frequência se assemelha à micose fungoide, e a variante oligoblástica apresenta baixo nível de envolvimento leucêmico com < 5% de células neoplásicas circulantes. A integração clonal do HTLV-1 é um achado invariável e é essencialmente diagnóstica (Yamaguchi, 2002), mas deve ser observado que a infecção pelo HTLV-1 é crônica e esses pacientes podem apresentar outras doenças hematológicas da mesma forma que as outras pessoas.

O imunofenótipo da LLTA é CD2+/CD3+/CD5+/CD25+, usualmente CD4+ e CD7–. CD30 costuma ser positivo, porém há negatividade para ALK e marcadores citotóxicos. Os genes do TCR sofrem rearranjo clonal. Pacientes ocasionais com doença oligoblástica apresentam um distúrbio linfoproliferativo tipo Hodgkin de células B infectadas pelo EBV com expressão de CD30 e CD15, provavelmente relacionado à imunossupressão crônica. Pode ser observado que tanto o HTLV-1 quanto o EBV são indutores potentes de CD30.

Linfoma extranodal de células NK/T, tipo nasal

Esses linfomas foram denominados granuloma letal da linha média, reticulose polimórfica e linfoma angiocêntrico de células T. Eles são linfomas extranodais, em geral de derivação de células NK, os quais estão associados ao EBV e são mais comuns na Ásia e na América Latina. Tipicamente, envolvem a nasofaringe, palato, pele, trato gastrintestinal, testículos ou outros locais. A síndrome hematofagocítica algumas vezes está associada (Chan, 2001c).

A histologia revela infiltrados difusos de células linfoides de citologia variável, com frequência polimórfica, de linfócitos pequenos a grandes células, imunoblastos e/ou células anaplásicas. Comumente, são ulcerações mucosas e áreas que apresentam padrão angiocêntrico ou angioinvasivo (Fig. 32.70) com necrose fibrinoide de vasos e necrose tipo infarto associada.

O fenótipo em geral é CD2+/CD56+, com expressão de cCD3 ε e de moléculas citotóxicas. CD43, CD45Ro, HLA-DR, CD25, CD95 e FAS-ligante também são expressos, mas CD4, CD8, CD5, CD16 e CD57 são negativos.

genes do TCR-α-β e γ-δ e de IgH são oriundos da linhagem geminativa, no entanto o EBV episssomal clonal está presente. A expressão de EBER ISH é positiva. Del(6) (q21;q25) por vezes é descrita. O prognóstico é variável.

Linfoma de células T do tipo enteropático

Trata-se de um processo maligno clonal de células T de células T intraepiteliais. Está associado à doença celíaca, todavia os pacientes costumam apresentar má absorção e linfoma de forma simultânea (Isaacson, 2001a). Em geral, ocorre no jejuno ou íleo, entre outras localizações no trato gastrintestinal ou fora dele já relatadas.

A morfologia apresenta células neoplásicas pequenas, médias a grandes, frequentemente com citoplasma claro a eosinofílico e núcleos angulados excêntricos. Em alguns casos, a citologia é similar à

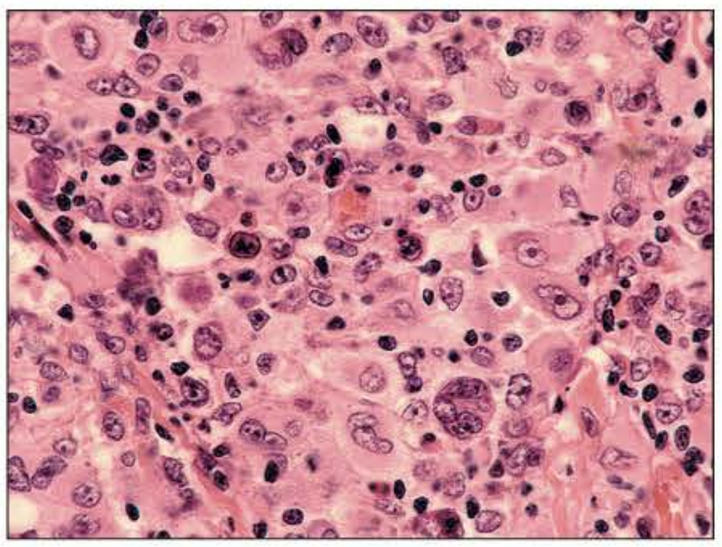


Figura 32.69 Leucemia/linfoma de células T do adulto com características anaplásicas (×500).

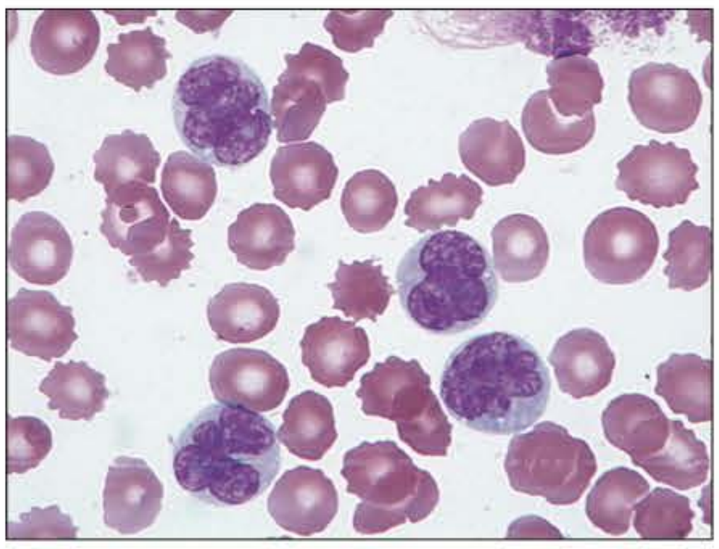


Figura 32.68 Leucemia de células NK em indivíduo adulto, com "células em flor", assemelhando-se à leucemia de células T do adulto.

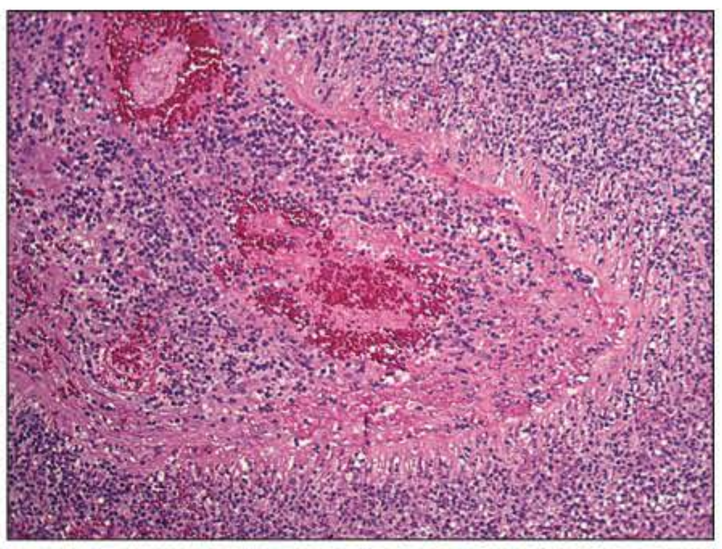


Figura 32.70 Linfoma de células T/NK nasal/nasal-símile apresentando invasão e destruição vascular (×200).

citologia do linfoma anaplásico de grandes células com multinucleação tipo coroa e núcleos em forma de ferradura (Fig. 32.71). Outros casos apresentam linfócitos pequenos com aparência suave. Histócitos e eosinófilos são em geral abundantes.

O fenótipo é CD3, CD7, CD103–, CD8 variável, CD4–, frequentemente com CD4–/CD8–. Variantes de pequenas células são CD8+/CD56+. Há expressão de moléculas citotóxicas. Os genes do TCR são rearranjados de maneira clonal, e pacientes com doença celíaca tipicamente apresentam HLA DQA1*0501 e DQB1*0201. Com frequência, trata-se de uma doença agressiva.

Linfoma de células T hepatoesplênico

Trata-se de uma neoplasia rara, usualmente de células T γ-δ, associada à infiltração sinusoidal do baço, fígado e medula óssea. É mais comum em indivíduos adolescentes ou adultos jovens do sexo masculino. Os pacientes apresentam maciça esplenomegalia, hepatomegalia, trombocitopenia pronunciada e, em certos casos, leucocitose e anemia (Jaffe, 2001d).

A histologia mostra envolvimento difuso da polpa vermelha esplênica por células linfoides de tamanho pequeno a médio com cromatina levemente dispersa e citoplasma moderado. O fígado apresenta células similares nos seios. O diagnóstico é mais bem estabelecido na medula óssea pela presença de uma infiltração característica dos seios, porém com arquitetura e hematopoese intactas (Fig. 32.72). A imunofenotipagem de cortes é muito útil por causa da morfologia imperceptível na coloração hematoxilina-eosina.

O imunofenótipo é de CD3 e TIA-1 positivos, com negatividade para CD4, CD8, CD5, granzima B e perforina (Belhadj, 2003). Anticorpos anti-TCR δ são positivos, enquanto os anticorpos anti-TCR α-β são negativos, embora ocorram alguns casos do tipo α-β.

A detecção do TCR γ por PCR resulta positiva, enquanto a do TCR β às vezes resulta positiva. A maioria dos casos é EBV-negativo, mas também ocorrem casos EBV-positivos (Taguchi, 2004). O isocromossomo 7q é usualmente descrito, com trissomia 8 ocasional. A doença é agressiva e apresenta respostas iniciais à terapia, porém é comum haver recaída e progressão da doença. Não existem dados de ensaios clínicos.

Linfoma de células T tipo paniculite subcutânea

Essa neoplasia de células T citotóxicas costuma ocorrer sob a forma de múltiplos nódulos na gordura subcutânea do tronco ou das extremidades e se assemelha à paniculite benigna. A epiderme e a derme suprajacentes não são envolvidas, mas os septos do tecido adiposo subcutâneo são infiltrados. O infiltrado linfoide é polimórfico e pode ser ilusoriamente suave, embora com frequência haja células grandes presentes (Fig. 32.73). Ocorre um envolvimento de células adiposas por linfócitos e, em geral, envolvimento vascular com áreas de necrose e infiltrados histiocíticos. Células da fase inflamatória aguda não estão tipicamente presentes, como na paniculite benigna, e células gigantes multinucleares em geral não são observadas.

O imunofenótipo costuma ser de célula T madura CD8+ com expressão de granzima B, perforina e TIA-1, com um genótipo do tipo de célula T α-β clonal (Go, 2004). 25% das células T são células T γ-δ com CD4–/CD8– e expressão de CD56 (Jaffe, 2001e).

A doença com frequência é agressiva. A síndrome hematofagocítica é observada em cerca de 37% dos casos. A sobrevida média é de cerca de 27 meses, contudo remissões a longo prazo podem ser obtidas com terapia à base de antraciclina (Go, 2004).

Linfoma blástico de células NK

Trata-se de um outro tumor raro derivado de células NK, mas com morfologia blástica presente na pele ou raramente na cavidade nasal de indivíduos de meia-idade ou mais velhos, podendo envolver linfonodos, medula óssea ou tecidos moles (Chan, 2001d).

A morfologia apresenta infiltrados dérmicos e/ou de tecidos moles difusos de blastos de tamanho médio. Rosetas podem ser observadas. O fenótipo é CD4+, CD56+ e CD43+; a expressão de CD3, CD2, CD7 e, usualmente, CD68 é negativa. Marcadores mieloides, MPO e CD33, são negativos, TdT e CD34 são variavelmente expressos, e os genes do TCR não estão rearranjados. Foi relatada positividade de CD99 (Shapiro, 2003). A doença assemelha-se ao linfoma linfoblástico ou ao sarcoma granulocítico e é agressiva.

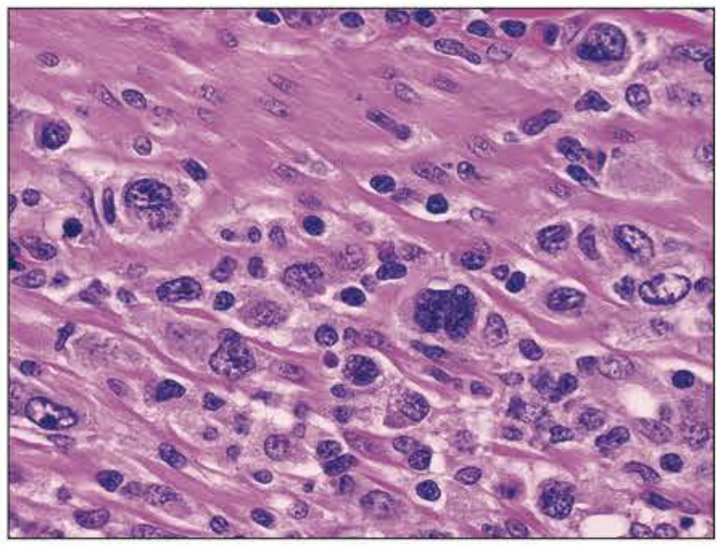


Figura 32.71 Linfoma de células T associado à enteropatia infiltrando a camada muscular do intestino delgado (×500).

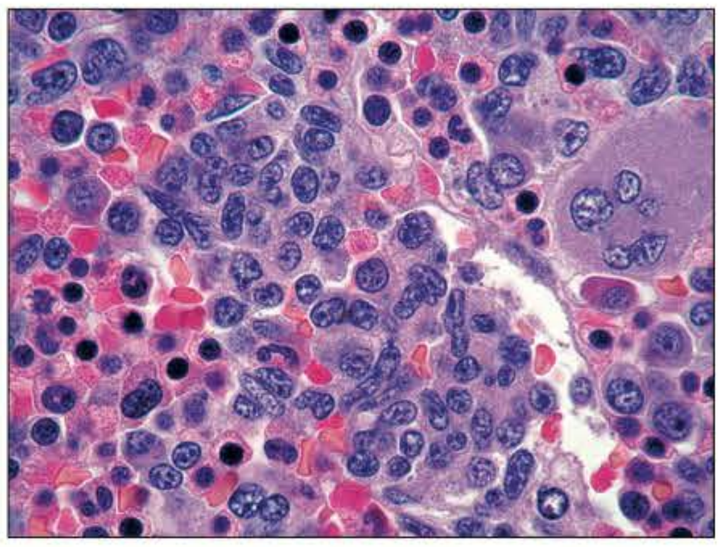


Figura 32.72 Linfoma de células T hepatoesplênico apresentando envolvimento intrassinusoidal da medula óssea (×500).

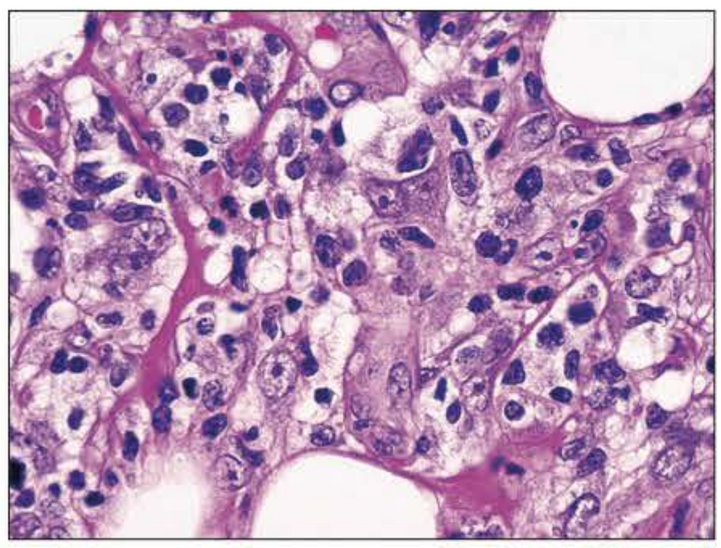


Figura 32.73 Linfoma de células T similar à paniculite subcutânea (×500).

Micose fungoide ou síndrome de Sézary

A micose fungoide ocorre duas vezes mais frequentemente em homens que em mulheres. Costuma afetar indivíduos de meia-idade ou mais velhos.

O distúrbio a princípio manifesta-se como uma dermatite eczematoide, psoriasiforme ou esfoliativa inespecífica. As lesões tendem a formar placas e, em seguida, tumores que ulceram com frequência. Alguns pacientes desenvolvem eritrodermia generalizada.

Biópsias de pele revelam infiltrados linfocíticos tipo faixa na derme (Fig. 32.69), frequentemente com histiócitos misturados e eosinófilos ocasionais (Ralfiaer, 2001b). Células T com núcleos irregulares (Fig. 32.74) apresentam infiltração celular da epiderme e com frequência formam aglomerados conhecidos como abscessos de Pautrier (Fig. 32.75). Eles em geral são acompanhados por paraqueratose e acantose, tipicamente com espongiose mínima ou sem espongiose e alongamento de cavilhas interpapilares. Os núcleos de pelo menos uma parte das células neoplásicas apresentam caracteristicamente uma aparência cerebriforme. A extensão do infiltrado subcutâneo nem sempre está correlacionada diretamente com a gravidade da doença. A comunicação com o dermatologista ou outro médico é importante, e mesmo alterações sutis em um paciente com suspeita clínica devem ser consideradas com seriedade.

O fenótipo costuma ser de célula T madura com expressão de CD4 e ausência de CD7, porém isso em geral é inconclusivo. Os genes do TCR sofrem rearranjo clonal e a análise por PCR de tecido de biópsia fixado em formalina deve ser tentada em casos com quadro suspeito.

Em estágios avançados da doença, células neoplásicas se infiltram nos linfonodos, fígado, baço e outros órgãos. O envolvimento nodal inicial (categoria I) apresenta alterações dermatopáticas com linfócitos cerebriformes atípicos esparsos. A categoria II apresenta obliteração nodal parcial, e a categoria III apresenta envolvimento difuso.

Raras células mononucleares atípicas com núcleos cerebriformes (células de Sézary) podem estar presentes no sangue periférico (Fig. 32.76). A linfocitose com essas células (especialmente em pacientes com eritremia) é denominada síndrome de Sézary.

O distúrbio pode apresentar uma evolução crônica prolongada. Entretanto, após a infiltração de linfonodos, a doença torna-se mais progressiva, e a morte, usualmente devida à infecção, ocorre em 2 anos.

A terapia é tópica nos casos iniciais. A doença mais avançada tem sido tratada com PUVA, retinoides, alfa-interferon e, mais recentemente, alemtuzumab (Campath) (Pichardo, 2004).

Distúrbio linfoproliferativo de células T CD30+ cutâneo primário

Esta categoria na classificação da OMS inclui o linfoma anaplásico de grandes células cutâneo primário (ALK–), a papulose linfomatoide e lesões limítrofes (Ralfkiaer, 2001a). Esses distúrbios compartilham as características de infiltrados dérmicos de células linfoides polimórficas, incluindo uma proporção variável de células anaplásicas ou similares às de Reed-Sternberg com expressão de CD30 e, tipicamente, evolução clínica com recaídas e remissões.

O linfoma anaplásico de grandes células cutâneo assemelha-se ao linfoma anaplásico de grandes células sistêmico (Fig. 32.77), exceto pelo fato de ele ser indolente e não apresentar expressão de ALK ou translocações genéticas detectáveis. A papulose linfomatoide foi considerada uma variante da pitiríase liquenoide e varioliforme aguda, com um infiltrado linfoide do tipo vaso invertido com quantidades variáveis de células grandes CD30+. Ele foi associado ao linfoma de Hodgkin em algumas situações.

Ambos os distúrbios apresentam o fenótipo de células T maduras CD4+ com perda variável de antígenos de célula T, expressão de moléculas citotóxicas e forte expressão de CD30. ALK é negativo. Os genes do TCR são sofrem rearranjo clonal. "Histiocitose regressiva atípica" é um termo antigo utilizado para ambos os distúrbios.

Linfoma angioimunoblástico de células T

Esse distúrbio foi denominado linfadenopatia angioimunoblástica com disproteinemia e resposta imune anormal. Trata-se de um linfoma clonal de células T que se manifesta com sintomas constitucionais e hipergamaglobulinemia policlonal. Embora a princípio tenha sido considerado um processo reativo com um espectro de progressão para o linfoma, atualmente é considerado neoplásico desde o início.

A histologia mostra hiperplasia paracortical de linfonodos com depleção de linfócitos, aumento de plasmócitos e quantidade alta de vênulas pós-capilares com hialinização PAS-positiva e folículos residuais "esgotados" (Fig. 32.78). Aglomerações de linfócitos com pequenos núcleos, mas com citoplasma claro moderadamente abundante, estão em geral presentes, e sua proeminência aumenta com a progressão do quadro. O imunofenótipo é de célula T madura com predominância de CD4, plasmócitos policlonais e células dendríticas proeminentes próximas de vasos detectadas por CD21/CD23.

Genes do TCR são em geral rearranjados, e genes de IgH também o são em uma minoria de casos que contêm EBV, presumivelmente como um evento secundário à imunossupressão. A trissomia 3, 5 ou um cromossomo X adicional foi descrito. A doença é agressiva, e complicações infecciosas são comuns (Jaffe, 2001f).

Linfoma de células T/NK periféricas inespecífico

Essas neoplasias são caracteristicamente diversas e podem consistir em bainhas de células grandes (Fig. 32.79), expansão paracortical de linfonodos por um misto de células pequenas e grandes, predominantemente células pequenas, e casos com um pleomorfismo notável que assemelha-se ao linfoma anaplásico de grandes células ou ao linfoma de Hodgkin. Padrões anormais de expressão de antígeno de célula T são úteis para o diagnóstico. Antígenos de célula T (CD3, CD2, CD5, CD7) costumam estar presentes em alguma combinação, mas um ou mais em geral não são expressos de forma aberrante. Casos CD4+ são mais frequentes que CD8+, mas casos CD4–/CD8– ou CD4+/CD8+

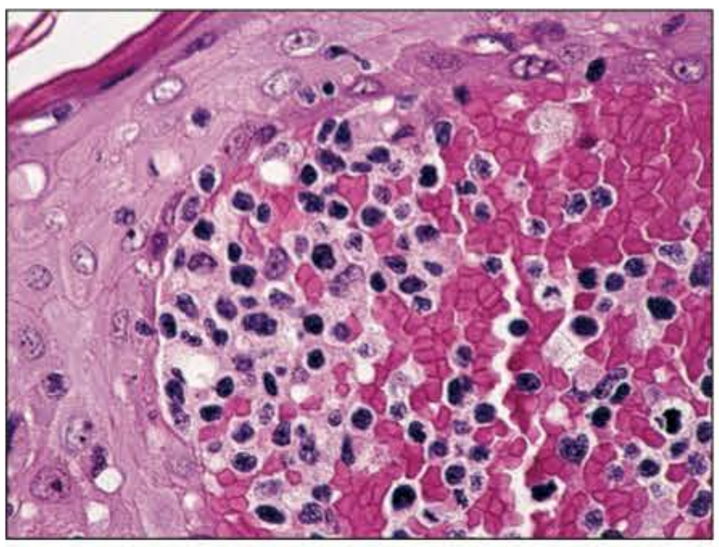


Figura 32.74 Linfoma de células T cutâneo mostrando um grande microabscesso de Pautrier (×20).

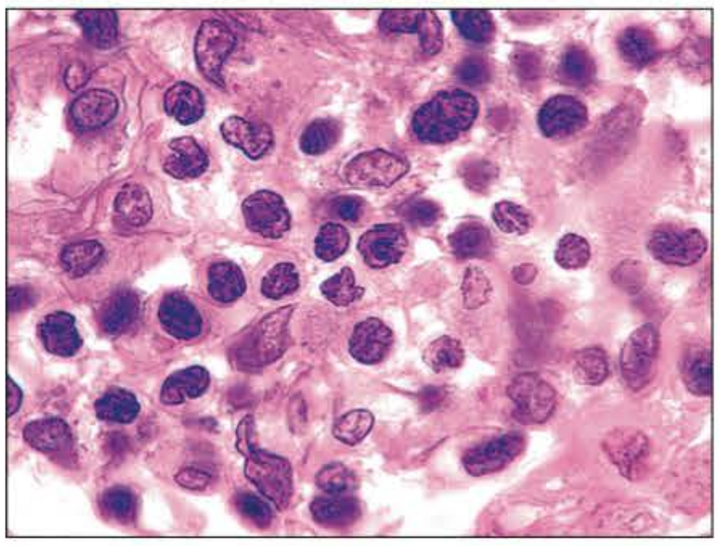


Figura 32.75 Linfócitos neoplásicos com núcleos convolutos na micose fungoide (×1000).

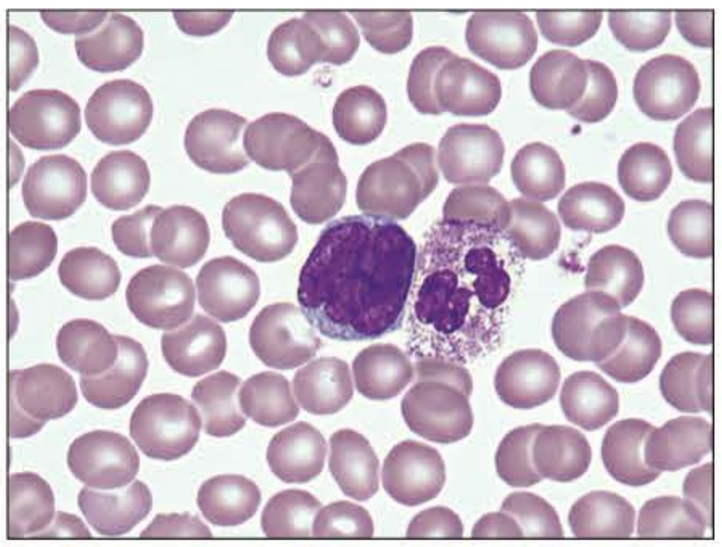


Figura 32.76 Célula de Sézary no sangue com um neutrófilo (×1000).

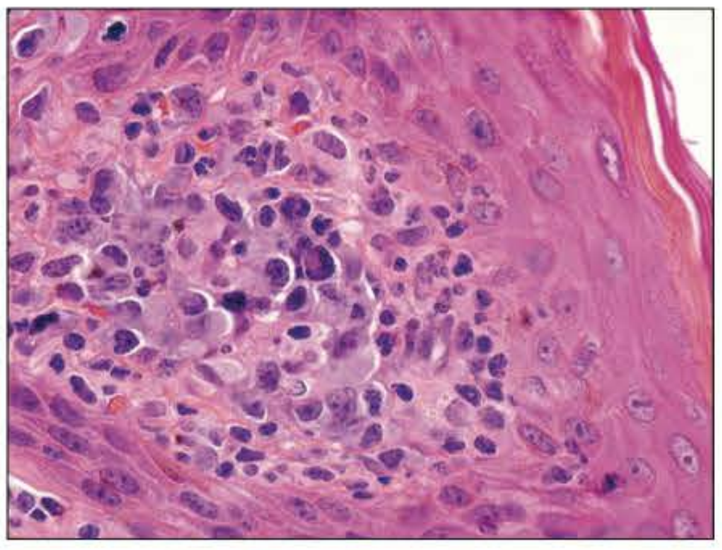


Figura 32.77 Linfoma anaplásico de grandes células cutâneo (×1000).

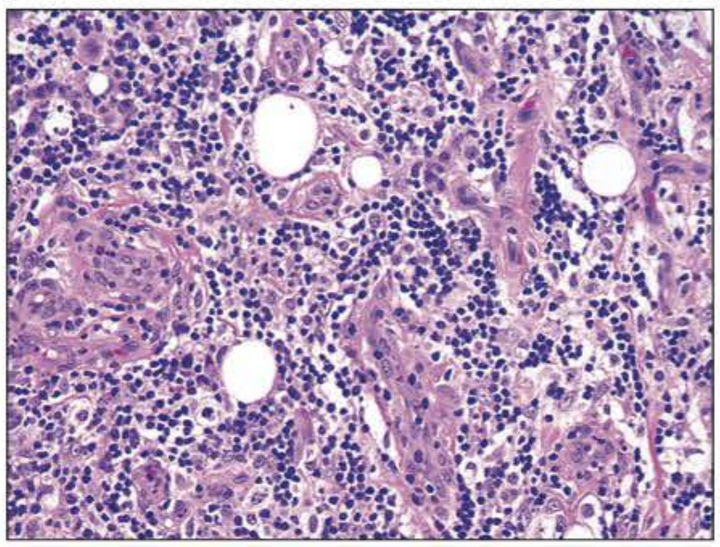


Figura 32.78 Linfoma angioimunoblástico apresentando arborização vascular e infiltrado linfoide infiltrando gordura. Em outras áreas deste caso, plasmócitos e imunoblastos estão presente. Células claras também costumam estar presentes (×200).

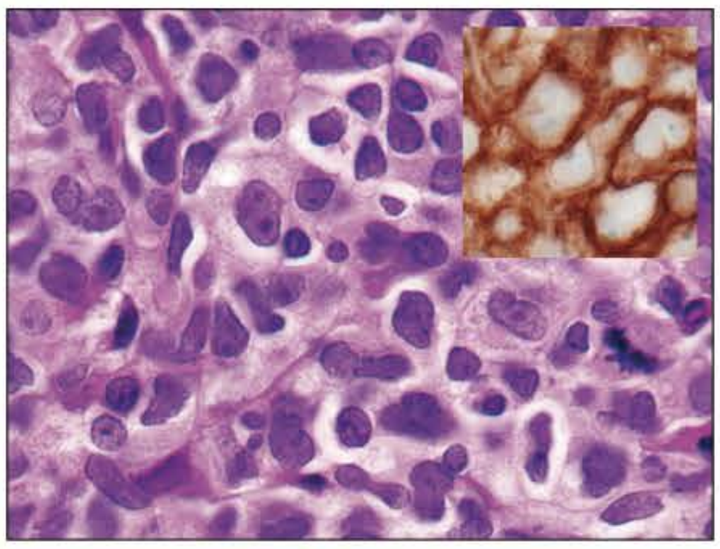


Figura 32.79 Linfoma de células T/NK periféricas inespecificado; a expressão de CD3 é vista na inserção (×1.000).

também ocorrem (Ralfkiaer, 2001c). Em cortes de parafina, CD3, CD45Ro e CD43 são úteis quando positivos, mas os dois últimos também estão presentes em tumores mieloides e em alguns linfomas de células B. CD68 em raros casos é expresso.

A variante da zona T do linfoma periférico de células T inespecífico apresenta expansão paracortical com GCC preservado. A morfologia citológica é variável com células de tamanho pequeno e médio, linfócitos, plasmócitos, hiperplasia endotelial e, algumas vezes, aglomerados de células claras e/ou células que se assemelham às do linfoma de Hodkin.

A variante linfoepitelioide, anteriormente denominada linfoma de Lennert, apresenta aglomerados de histiócitos epitelioides.

Esses tumores costumam ser agressivos e com frequência desmentem sua aparência algumas vezes suave ou reativa. Rearranjos clonais de genes do TCR são essenciais para um diagnóstico seguro.

Linfoma anaplásico de grandes células

O linfoma anaplásico de grandes células foi a princípio reconhecido relativamente há pouco tempo como um linfoma não Hodgkin reativo com anticopo Ki-1 associado ao Hodgkin (anti-CD30) (Stein, 1985). O linfoma anaplásico de grandes células primário é mais comum em adolescentes e adultos jovens e representa aproximadamente 10 a 15% dos linfomas pediátricos. Casos em indivíduos jovens provavelmente não foram diagnosticados antes da imunofenotipagem de rotina, e estudos retrospectivos revelam que cerca de 50% dos linfomas de grandes células pediátricos apresentavam fenótipo de célula T com morfologia "imunoblástica polimórfica" que atualmente está associada ao linfoma anaplásico de grandes células (Hutchison, 1991). Além disso, a morfologia é variável e não é em si diagnóstica, sendo que uma variedade de linfomas anaplásicos de grandes células "secundários" (incluindo a progressão de outros linfomas, tumores pós-transplante e linfomas associados à infecção por EBV e HTLV-1) também expressam CD30.

O linfoma anaplásico de grandes células primário parece estar associado a anormalidades cromossômicas envolvendo a região cromossômica 2p23 como t(2;5) (p23;q35), na qual o gene para uma tirosina quinase do linfoma de células anaplásicas funde-se ao da proteína de lançamento nucleolar nucleofosmina, com uma proteína de fusão NPM-ALK resultante, que é altamente expressa (Morris, 1994). Os termos "ALKoma" e "linfoma ALK" foram propostos (Benharroch, 1998). Anormalidades genéticas variantes envolvendo ALK também ocorrem, em geral com superexpressão de ALK (Falini, 1999). O linfoma anaplásico de grandes células secundário e o linfoma anaplásico de grandes células cutâneo primário são usualmente ALK-negativos. As implicações clínicas do linfoma anaplásico de grandes células primário ou secundário ainda não foram totalmente elucidadas.

De modo geral, o linfoma anaplásico de grandes células apresenta infiltrados difusos ou agregados de células grandes e, algumas vezes, pleomórficas com citoplasma abundante e núcleos indentados ou em ferradura e, em alguns casos, núcleos multilobulados tipo coroa (Fig. 32.80). O envolvimento de seios e paracortical superficial de linfonodos é comum, bainhas coesivas de células tumorais frequentemente simulam carcinoma, e alguns casos apresentam um padrão polimórfico tipo Hodgkin. Células de Reed-Sternberg verdadeiras são observadas. As variantes histológicas incluem os tipos de pequenas células e linfo-histiocíticos, que no entanto também expressam ALK e apresentam um fenótipo similar.

Essencialmente, todos expressam CD30. A maioria dos casos primários em indivíduos jovens expressa ALK, que costuma ser nuclear e citoplasmático, mas é apenas citoplasmático em algumas variantes genéticas. Pouco mais de 50% apresentam fenótipo de célula T periférica detectado por imuno-histoquímica, bem como expressão variável de CD3, CD43 e CD45Ro. Também ocorre expressão variável de CD45, CD25 e EMA. CD68 ou CD15 é expresso apenas às vezes. Casos de negatividade para marcador de superfície de célula T foram designados como "nulos", porém evidências recentes sugerem que embora rearranjos do TCR estejam presentes em até 90% dos casos, observa-se uma típica expressão defeituosa do TCR (Delsol, 2001; Bonzheim, 2004).

Ocorre expressão de CD56, que está relacionada ao prognóstico adverso (Suzuki, 2000). Grânulos citotóxicos marcados pelo TIA-1 também foram descritos (Felgar, 1999). O transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3, signal transducer and activator of transcription 3) com frequência é superexpresso, havendo ativação de vias antiapoptóticas e aumento da expressão de bcl-2, bcl-xl, survivina, entre outros, bem como diminuição da apoptose mediada pela caspase (Amin, 2004). A expressão da survivina em cerca de 50% dos casos possivelmente está associada ao resultado adverso (Schlette, 2004). A sinalização apoptótica anormal pode oferecer futuros alvos terapêuticos. O LAGCT difere do linfoma de Hodgkin pelo fato de a expressão de ALK anular a indução de NFκB pelo CD30, enquanto o CD30 ativa NFκB no linfoma de Hodgkin (Horie, 2004).

A maioria apresenta t(2;5) (p23;q35), mas também são observadas variantes, como t(1;2) (q25;p23) envolvendo o TPM3 que codifica uma tropomiosina; inv(2) (p23;q35) envolvendo o ATIC; e t(2;3) (p23;q35) envolvendo TFG (gene fundido TRAK). Todos apresentam ALK citoplasmático e não apresentam ALK nuclear. Outros genes parceiros incluem TPM4, CLTC, MSN, ALO17 e MYH9 (Lamant, 2003). Aqueles com CLTC-ALK foram identificados como linfoma de grandes células B (CD20–, CD79a+), cada um com rearranjo de IgH e também rearranjos de TCR em um. Eles apresentam coloração citoplasmática

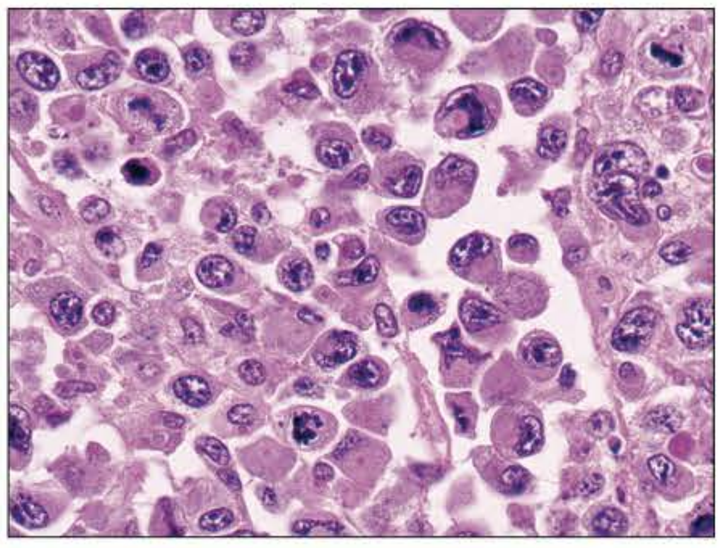


Figura 32.80 Linfoma anaplásico de grandes células em um adolescente (×500).

granular com ALK. A citogenética revelou t(2;17) (p23;q34) (De Paepe, 2003). Raros casos de linfoma anaplásico de grandes células B, com ou sem ALK, são classificados pela OMS como linfoma anaplásico de grandes células B (LAGCB).

Linfoma de Hodgkin

A nomenclatura do linfoma de Hodgkin, antigamente denominado doença de Hodgkin, foi pouco alterada em relação à apresentada na conferência de Rye (Lukes, 1966). A característica principal do linfoma de Hodkin é a célula de Hodgkin Reed-Sternberg (HRS *vs.* RS), que é uma célula grande bi, multi ou mononucleada (Hodgkin), com cada núcleo apresentando um nucléolo muito grande semelhante a uma inclusão (Fig. 32.81). Essas células neoplásicas aparecem em um fundo imunoproliferativo que contém quantidades variáveis de linfócitos, histiócitos, eosinófilos e plasmócitos. Células neoplásicas degeneradas "mumificadas" também costumam estar presentes. Subtipos clássicos com celularidade mista, esclerose nodular, depleção de linfócitos e abundância de linfócitos apresentam biologia similar, e todos são denominados linfoma de Hodgkin "clássico" (Stein, 2001a). O linfoma de Hodgkin nodular com predominância de linfócitos parece ser uma entidade diferente.

O fenótipo mais comum de células HRS no linfoma de Hodgkin clássico consiste na expressão de CD30, CD15 e fascina, na ausência de expressão de CD45 e de marcadores de célula T. Marcadores associados à célula B, CD20 e/ou CD79 são expressos em uma minoria de casos (< 30%) e usualmente de maneira focal e fraca. Casos ocasionais apresentam forte expressão de CD20. Os fatores de transcrição da célula B, Oct2 e Bob.1, estão ausentes, assim como a cadeia de imunoglobulina J. Anticorpos de imunoglobulina de cadeia leve podem apresentar marcação citoplasmática generalizada. Estudos padrões de rearranjos de genes de Ig e TCR são negativos no linfoma de Hodkin clássico, mas o sequenciamento de genes amplificados de IgH de célula única sugere que a maioria dos caos de linfoma de Hodgkin derivam de linfócitos B clonais (Stein, 1999). A infecção por EBV está associada a uma parte substancial de casos de linfoma de Hodgkin clássico (Herbst, 1992).

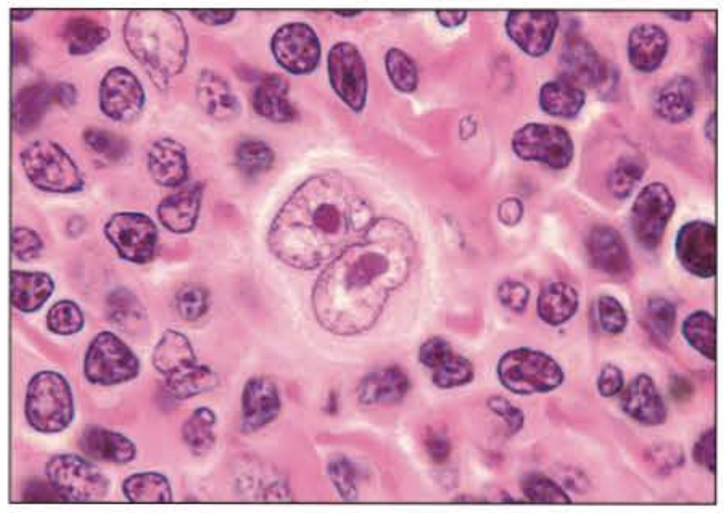


Figura 32.81 Célula de Reed-Sternberg em um caso de linfoma de Hodgkin de celularidade mista (×1.000).

O linfoma de Hodgkin pode ocorrer desde o início da infância até a velhice. A maior frequência é observada entre os 15 e 35 anos e após os 50 anos. A predominância é no sexo masculino, sobretudo na infância. A doença em mulheres com menos de 30 anos costuma ser do tipo esclerose nodular (Tab. 32.21).

Linfoma de Hodgkin nodular com predominância linfocítica (LHNPL)

A LHNPL é de obliteração da arquitetura do linfonodo por um infiltrado nodular de células B pequenas com uma rede dendrítica folicular associada e células grandes esparsas ou aglomeradas (denominadas células L&H, de acordo com a terminologia original de Lukes e Butler de linfoma de Hodkin linfocítico e histiocítico). A nodularidade pode ser vaga. A citologia das células L&H é bem variável de caso a caso, embora geralmente seja mais uniforme em um caso. A aparência mais frequentemente descrita relata a presença de núcleos grandes contendo cromatina vesicular, nucléolos moderadamente proeminentes e núcleos convolutos que se assemelham à pipoca ("células pipoca").

Tabela 32.21 Características principais dos linfomas de Hodgkin

Linfoma	Demografia, manifestações clínicas	Morfologia	Marcadores da superfície celular	Prognóstico
Nodular, com predominância linfocitária	H > M, 30–50 anos, com linfadenopatia periférica	Células L&H com núcleos grandes e convolutos, cromatina vesiculada, nucléolos proeminentes ("células pipoca") agregadas frouxamente em nódulos	CD45, 20, 22, 79a; bcl-6	Bom para os estágios I e II. Ruim para a doença em estágio avançado
Esclerose nodular	H = M, < 30 anos com massa intestinal, ocasionalmente envolvimento esplênico ou pulmonar. 40% apresentam sintomas B. A maioria dos pacientes apresentam manifestações no estágio II da doença	Faixas largas de colágeno, nódulos de tecido linfoide com "células lacunares" apresentando abundante citoplasma pálido. Células HRS clássicas são raras	CD15, 30	Regular-bom
Celularidade mista	H > M, idade média de 37 anos. Linfadenopatia periférica comum, ± envolvimento do baço e medula óssea. Sintomas B comuns. Pacientes frequentemente no estágio III ou IV	Células HRS clássicas com mono, bi ou múltiplas nucleações contendo nucléolos proeminentes encontrados em uma mistura de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos	CD15, 30	Regular-bom
Depleção de linfócitos	H > M, idade média de 37 anos. Pode manifestar-se como uma doença febril aguda com pacitopenia, MO, envolvimento medular e visceral, sintomas B. O estágio avançado é comum. Associado à infecção pelo HIV	Células HRS clássicas comuns com escassez de linfócitos. Células HRS pleomórficas simulam um sarcoma	CD15, 30	Regular-bom, estágio a estágio, em comparação com outros LHC. Pacientes infectados pelo HIV apresentam uma evolução mais agressiva
Clássico, rico em linfócitos	H > M, idosos. Linfadenopatia periférica, sintomas B raros. A maioria dos pacientes com doença no estágio I ou II	Células HRS clássicas esparsas entre numerosos linfócitos pequenos. Padrão de crescimento nodular	CD15, 30	Bom

L&H = linfócito e histiocítico; HRS = Hodgkin Reed-Sternberg; MO = medula óssea; LHC = linfoma de Hodgkin clássico.

A quantidade de citoplasma é moderada e a cor, clara. O citoplasma apresenta-se retraído ou levemente eosinofílico. Provavelmente com mais frequência, as células neoplásicas apresentam núcleos redondos a ovais, contendo nucléolos eosinofílicos ou basofílicos distintos, porém menos proeminentes do que nas células HRS (Fig. 32.82). Com a experiência, essas células se tornam bem distintas. Células HRS ocasionais podem ser observadas, mas nem sempre estão presentes e predominam em raros casos. No entanto, seu fenótipo difere do fenótipo das células HRS clássicas. As células L&H costumam estar frouxamente agregadas nos centros dos nódulos, mas encontram-se dispersas em outros locais.

O fenótipo das células L&H é da célula B madura, expressando CD45, CD20, CD22, CD79a, bcl-6, BOB.1, Oct-2, CD75 e, em geral, cadeia J. A expressão de CD30 está ausente ou é fraca, enquanto EMA é frequentemente expresso. Os nódulos são compostos sobretudo por células B, mas com uma mistura abundante de células CD3 e CD3+/CD57+ que tendem a formar rosetas em torno de células L&H. Estas nem sempre estão presentes, contudo sua presença é útil para estabelecer o diagnóstico. Os nódulos contêm uma rede dendrítica folicular que pode ser iluminada por anticorpos anti-CD21, CD35 ou CD23 (Pileri, 2002). A Ig citoplasmática está presente e não parece ser clonal, embora tenha sido demonstrado que as células B são monoclonais pela técnica de PCR de célula única (Stein, 2001b).

A IgH é rearranjada de forma clonal por ensaios sensíveis em condições de pesquisa, mas em geral isso não é detectado sob as condições de rotina dos laboratórios clínicos. As células L&H são derivadas do centro germinativo ou do centro pós-germinativo com mutações somáticas de genes de Ig que são contínuas em aproximadamente metade dos casos estudados (Braeuninger, 1997; Pileri, 2002).

A transformação progressiva dos centros germinativos dos linfonodos foi descrita com uma lesão precursora para o linfoma de Hodgkin nodular com predominância linfocítica, mas não existe uma relação provada. A maioria dos casos de transformação progressiva de centros germinativos não leva ao linfoma.

Esclerose nodular (EN)

Caracteriza-se pela presença de largas faixas de colágeno separando nódulos de tecido linfoide, bem como das "células lacunares", que são células grandes e atípicas contendo um abundante citoplasma claro (Figs. 32.83 e 32.84). A quantidade de células de Reed-Sternberg clássicas é variável. A fibrose pode ser imperceptível em lesões iniciais, porém o agrupamento de células neoplásicas usualmente está presente.

O linfoma de Hodkin do tipo esclerose nodular (LHEN) é graduado de acordo com o número de células neoplásicas. Quando bainhas de células neoplásicas estão presentes em ≥ 25% dos nódulos, o tumor é classificado como sendo de grau 2. Isso costuma estar associado à necrose e foi denominado variante sincicial. A variedade EN do linfoma de Hodgkin é comum, e com frequência se manifesta como uma massa mediastinal na mulher jovem.

Celularidade mista (CM)

A CM consiste num infiltrado polimórfico difuso de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e células de Reed-Sternberg, que por vezes são bem numerosas (Fig. 32.85). Necrose e fibrose desordenada podem estar presentes. Esse subtipo é menos comum em indivíduos jovens do que o subtipo de EN, sendo o subtipo mais frequentemente acompanhado de envolvimento da infecção pelo EBV.

Depleção de linfócitos (DL)

Este tipo é incomum, geralmente ocorre em idosos e pode estar associado à fibrose difusa. As células neoplásicas predominam, enquanto os linfócitos estão relativamente diminuídos em comparação a outras formas do linfoma de Hodgkin (Fig. 32.86). Algumas vezes, está associado a uma doença febril aguda acompanhada de pancitopenia e linfocitopenia. Pode haver escassez de linfadenopatia periférica, embora alguns pacientes apresentem aumento generalizado do tamanho dos linfonodos. O envolvimento da medula óssea é comum, mas a linfocitose e a trombocitose, frequentemente observadas em outros tipos de linfoma de Hodgkin, costumam estar ausentes (Neiman, 1973).

A anemia normocítica é observada em aproximadamente 50% dos casos de linfoma de Hodgkin. As contagens de leucócitos e plaquetas são variáveis, e pode haver eosinofilia. Os achados no sangue e medula óssea, assim como as características histológicas, parecem ser manifestações de respostas do hospedeiro à doença. Estudos imunológicos no linfoma de Hodgkin demonstraram que a imunidade mediada por célula é defeituosa quando a doença é extensa.

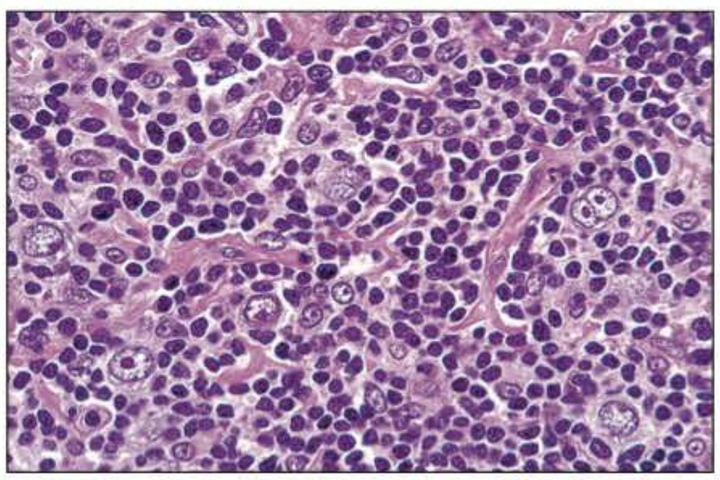


Figura 32.82 Linfoma de Hodgkin com predominância linfocitária com células L&H apresentando núcleos redondos e não do tipo pipoca (×500).

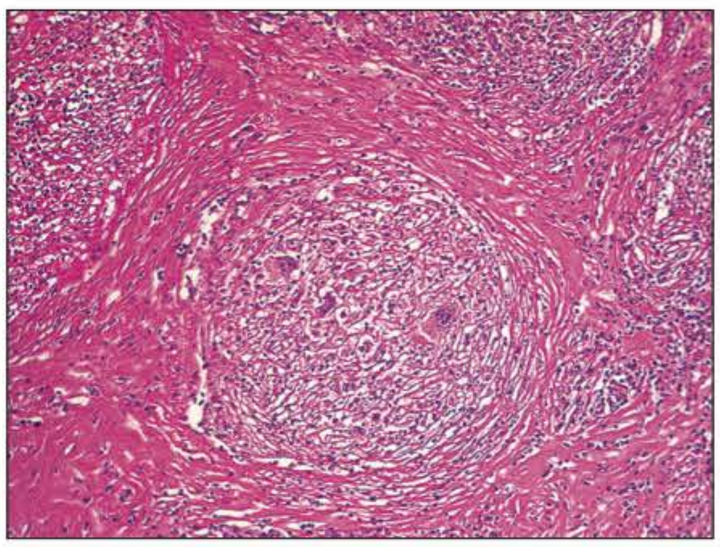


Figura 32.83 Fibrose densa em um caso de linfoma de Hodgkin do tipo esclerose nodular (×200).

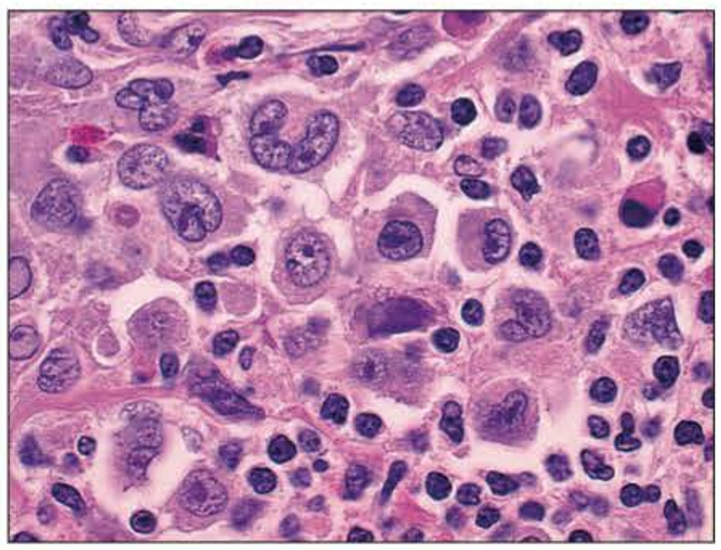


Figura 32.84 Aglomerado de células HRS em um nódulo de um linfoma de Hodgkin do tipo esclerose nodular (×500).

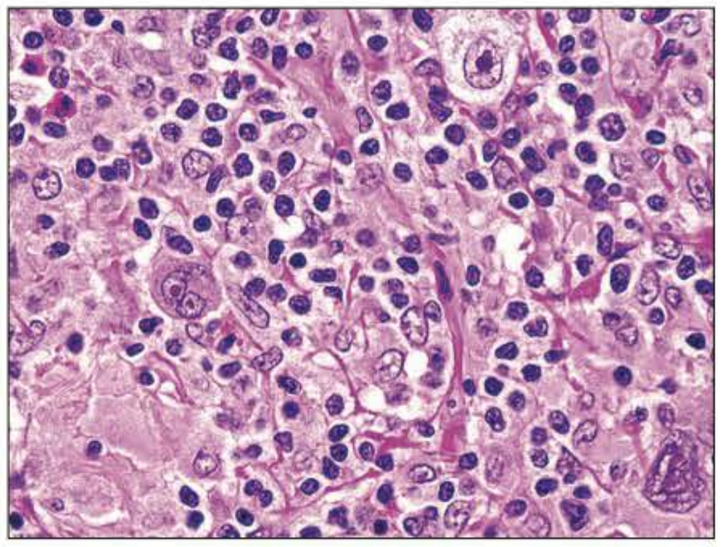


Figura 32.85 Células de Hodgkin Reed-Sternberg esparsas no linfoma de Hodgkin de celularidade mista (×500).

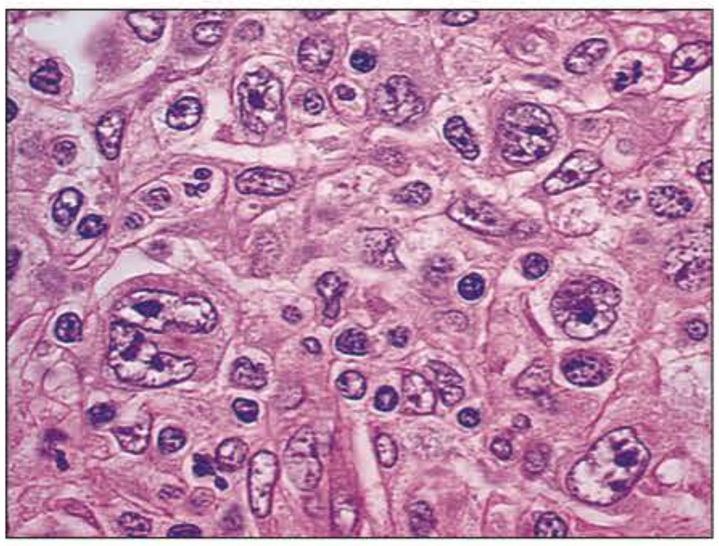


Figura 32.86 Linfoma de Hodgkin com depleção de linfócitos apresentando predominância de células neoplásicas com poucos linfócitos (×500).

O estadiamento clínico define a doença em estágio I como limitada aos linfonodos em uma região anatômica ou duas regiões contíguas em um lado do diafragma. A doença em estágio II envolve mais de duas regiões contíguas ou duas regiões não contíguas em um lado do diafragma. A doença em estágio III está presente em ambos os lados do diafragma, mas está confinada ao tecido linfoide. A doença em estágio IV envolve a medula óssea ou qualquer outro órgão, além do tecido linfoide. A incidência de envolvimento da medula óssea em casos não tratados de linfoma de Hodgkin é de aproximadamente 10% (Bartl, 1982b). Todos os estágios são também classificados como "A", quando sintomas sistêmicos estão ausentes e "B", quando eles estão presentes. Uma abordagem agressiva no tratamento do linfoma de Hodgkin resultou em uma melhoria da sobrevida com muitas curas, sobretudo em pacientes jovens.

Distúrbios linfoproliferativos associados à imunodeficiência

Linfomas e proliferações linfoides policlonais descontroladas ocorrem com maior frequência em pacientes com disfunção imune. Esses estados disfuncionais são classificados em três categorias principais: estados de imunodeficiência primária (congênita), infecção pelo HIV e imunodeficiência iatrogênica particularmente devida à imunossupressão pós-transplante, mas também devida à terapia imunossupressora prolongada por outras razões.

Esses distúrbios são em sua maioria distúrbios linfoproliferativos de células B associados à infecção ou reativação de de infecção pelo EBV ou por outros vírus, incluindo o linfoma de grandes células B e variantes, LB e hiperplasia polimórfica de células B. Os linfomas de Hodgkin e de células T periféricas ocorrem em raros casos.

Imunodeficiências primárias são distúrbios raros e incluem a síndrome de Wiskott-Aldrich (SWA), ataxia teleangiectasia (AT), síndrome de imunodeficiência variável comum (CVID, *common variable immunodeficiency syndrome*), imunodeficiência combinada severa (SCID, severe combined immunodeficiency), distúrbio imunoproliferativo ligado ao X (DILX), síndrome de quebra de Nijmegan (SQN), síndrome de hiper-IgM e síndrome linfoproliferativa autoimune (SLPA) (Borisch, 2001).

A SLPA envolve mutações herdadas do gene FAS, que bloqueiam a apoptose. Diferentes mutações de efeito variado estão envolvidas. O distúrbio pode ser mais comum do que se acreditava previamente e, em alguns casos, surgir na idade adulta (Oren, 2002). A síndrome da hiper-IgM resulta de mutações que afetam o CD40-ligante com inibição da interação de células T/B e maturação de células B. A AT e a SQN são anormalidades envolvendo a reparação do DNA. A SWA é uma síndrome caracterizada por trombocitopenia, erupções cutâneas e infecções recorrentes. Pode ser fatal, porém é curável pelo transplante alogênico de medula óssea.

A MI fatal por EBV é uma ocorrência comum no DILX e na SCID. Linfomas de grandes células B são os tumores mais comuns na maioria das imunodeficiências primárias, enquanto a GL está aumentada na SWA.

Linfomas associados à infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV inadequadamente tratada apresenta uma incidência bastante aumentada de linfomas de células B de alto grau associados à infecção por EBV (Knowles, 1998; Raphael, 2001). São primariamente LB, LB atípico e linfoma de grandes células B. O LB associado à infecção pelo HIV é similar ao LB endêmico associado à infecção por EBV e à translocação c-myc, mas com diferentes pontos de quebra (Haluska, 1989). O LB com diferenciação plasmocitoide está exclusivamente associado à infecção pelo HIV. Linfomas MALT ocorrem até mesmo em crianças infectadas pelo HIV. O linfoma de Hodgkin e o linfoma NK ocorrem em raros casos. Linfomas com efusão primária na infecção pelo HIV são decorrentes da infecção por KHSV/HHV-8 e estão associados ao sarcoma de Kaposi e à doença de Castleman multicêntrica. A incidência de linfomas associados à infecção pelo HIV diminuiu de forma substancial nos países desenvolvidos a partir da introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, *highly active antiretroviral therapy*).

Distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT)

Estes distúrbios também estão associados à infecção produzida pelo EBV, em decorrência da infecção crônica e/ou reativação da infecção (Collins, 2002). Os DLPT são compostos por um espectro único de distúrbios linfoproliferativos, que foram divididos em categorias morfológicas (Harris, 2001b). Em muitos casos, esses tumores regridem quando a terapia imunossupressora é reduzida, mas isso é imprevisível.

A hiperplasia plasmacítica (HP) é composta por numerosos plasmócitos e imunoblastos esparsos. O DLPT similar à MI apresenta expansão paracortical de linfonodos com aumento do número de imunoblastos. Ambas as condições consistem em lesões precoces ou de baixo grau que apresentam progressão lenta.

O DLPT polimórfico apresenta aumento do número de imunoblastos e plasmócitos em um fundo linfoide. O DLPT monomórfico é essencialmente um linfoma difuso, em geral de grandes células B. É provável que um DLPT similar ao linfoma de Hodgkin seja um linfoma de grandes células B com características similares àquelas do linfoma de Hodgkin, previamente denominado imunoblástico polimórfico na Working Formulation (Fig. 32.87). Linfomas de células T monomórficas também ocorrem em raros casos.

Um distúrbio similar ao DLPT também pode ocorrer em casos de imunossupressão crônica produzidos por outras causas. Dentre estas, a mais proeminente é o uso de metotrexato no tratamento da artrite reumatoide (Harris, 2001c).

Neoplasias de células histiocíticas e dendríticas

São distúrbios raros que afetam linfonodos, tecidos moles e, às vezes, medula óssea (Jaffe, 2001g).

O sarcoma histiocítico, também conhecido como neoplasia histiocítica, é um tumor maligno de células não circulantes da linhagem de macrófagos monócitos (Weiss, 2001a). O diagnóstico diferencial inclui a leucemia monocítica e o linfoma de grandes células B ou de células T periféricas. Ela assemelha-se ao linfoma de grandes células ou sarcoma histiocítico de linhagem monocítica (Fig. 32.88). Células tumorais apresentam características nucleares de malignidade. Elas são identificadas pela presença de CD68, lisozima, α-1-antitripsina e antiquimotripsina, e outras são identificadas por outros marcadores de macrófagos monócitos (i. e., CD64, CD14). Pode ser observada hematofagocitose.

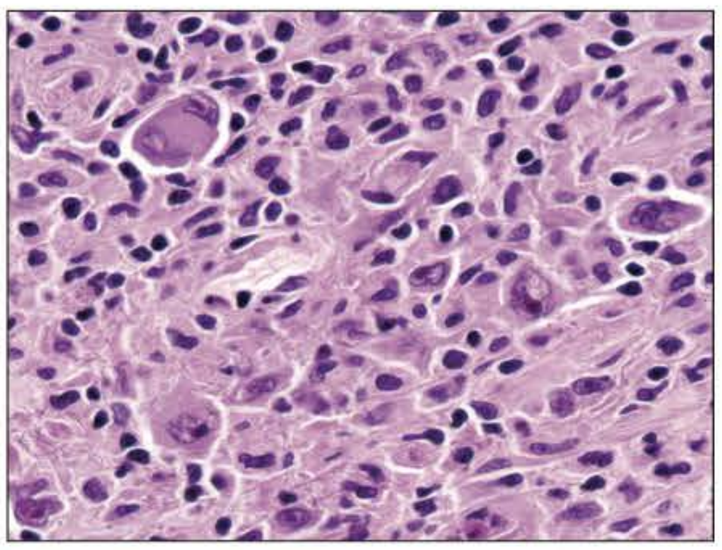


Figura 32.87 Linfoma de grandes células B (subtipo anaplásico) originado um distúrbio linfoproliferativo pós-transplante no trato gastrintestinal (×500).

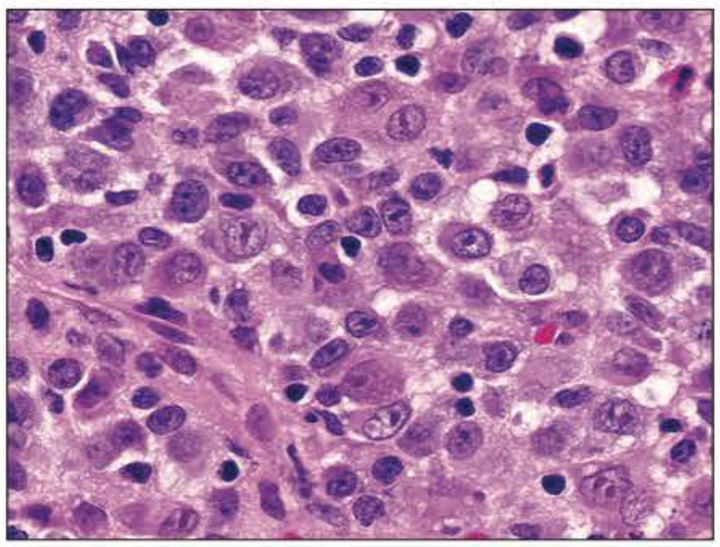


Figura 32.88 Sarcoma histiocítico em uma criança. Este caso apresentava expressão de marcadores monocíticos e enzimas, ausência de marcadores linfoides e ausência de rearranjos genéticos linfoides (×500).

Síndromes hematofagocíticas

São frequentemente confundidas com a neoplasia histiocítica. Manifestam-se com hepatoesplenomegalia, febre e outros sintomas constitucionais, citopenias e infiltrados de macrófagos nos órgãos envolvidos, incluindo a medula óssea, com hemofagocitose principalmente de eritrócitos (Fig. 32.89). A hematofagocitose pode ser difícil de ser identificada em casos usuais ocasionais. Com frequência, estão associadas a uma infecção viral recente, causada por EBV ou CMV, embora também ocorram síndromes hematofagocíticas familiares.

A causa do distúrbio em geral é obscura, mas sua evolução costuma ser agressiva. Aproximadamente 60% dos pacientes morrem dentro de 2 meses (Chen, 2004; Karras, 2004), porém alguns pacientes respondem à imunoterapia.

Histiocitose de Langerhans (HCL)

A HCL é uma proliferação neoplásica das células de Langerhans. Estas são células dendríticas normalmente encontradas sobretudo na pele (Weiss, 2001b). A condição se manifesta de várias maneiras, incluindo uma doença unifocal, usualmente no osso ou, às vezes, em linfonodos, pele ou pulmões de um indivíduo adolescente ou adulto jovem. Foi denominada granuloma eosinofílico. A doença multifocal unissistêmica em geral envolve os ossos de crianças e frequente disseminação para tecidos moles adjacentes. A condição também é conhecida como doença de Hand-Schuler-Christian. O envolvimento do crânio pode levar ao diabetes insipido, perda de dentes ou exoftalmia. Lesões pulmonares múltiplas podem ser observadas em adultos. A doença multifocal multissistêmica, doença de Letterer-Siwe, ocorre em lactentes. Trata-se de uma enfermidade agressiva que causa febre, erupções cutâneas, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, envolvimento ósseo e pancitopenia.

Histologicamente, a doença consiste em infiltrados de células de Langerhans. Estas assemelham-se a histiócitos benignos, porém apresentam um núcleo em forma de "grão de café" com um sulco central linear (Fig. 32.90). Uma quantidade variável de eosinófilos e linfócitos usualmente está presente. Os infiltrados formam nódulos no osso, envolvem a derme superior e podem envolver seios de linfonodos e a polpa vermelha esplênica. Células gigantes algumas vezes estão presentes, mas diferem dos histiócitos multinucleados (como no xantogranuloma juvenil) quanto à presença de núcleos característicos.

A imunofenotipagem mostra reatividade para CD1a e proteína S-100, e pode haver uma fraca reatividade para CD45 e CD68, contudo, a reatividade é negativa para anticorpos específicos contra células T e B, bem como para os marcadores dendríticos foliculares CD21 e CD35. A microscopia eletrônica ainda é útil em alguns casos, por causa dos grânulos de Birbeck característicos, que são estruturas pentalaminares em forma de "raquete" patognomônicas das células de Langerhans.

O resultado é em grande medida dependente do grau de envolvimento dos órgãos, com a doença localizada apresentando uma alta taxa de sobrevida sem eventos, mas com a doença extensiva mostrando

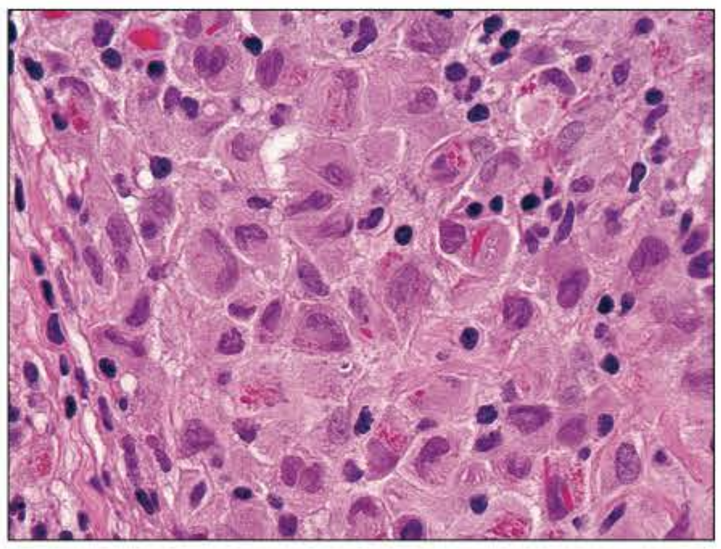


Figura 32.90 Histiocitose de células de Langerhans apresentando pregueamento e sulcos nucleares típicos (×500).

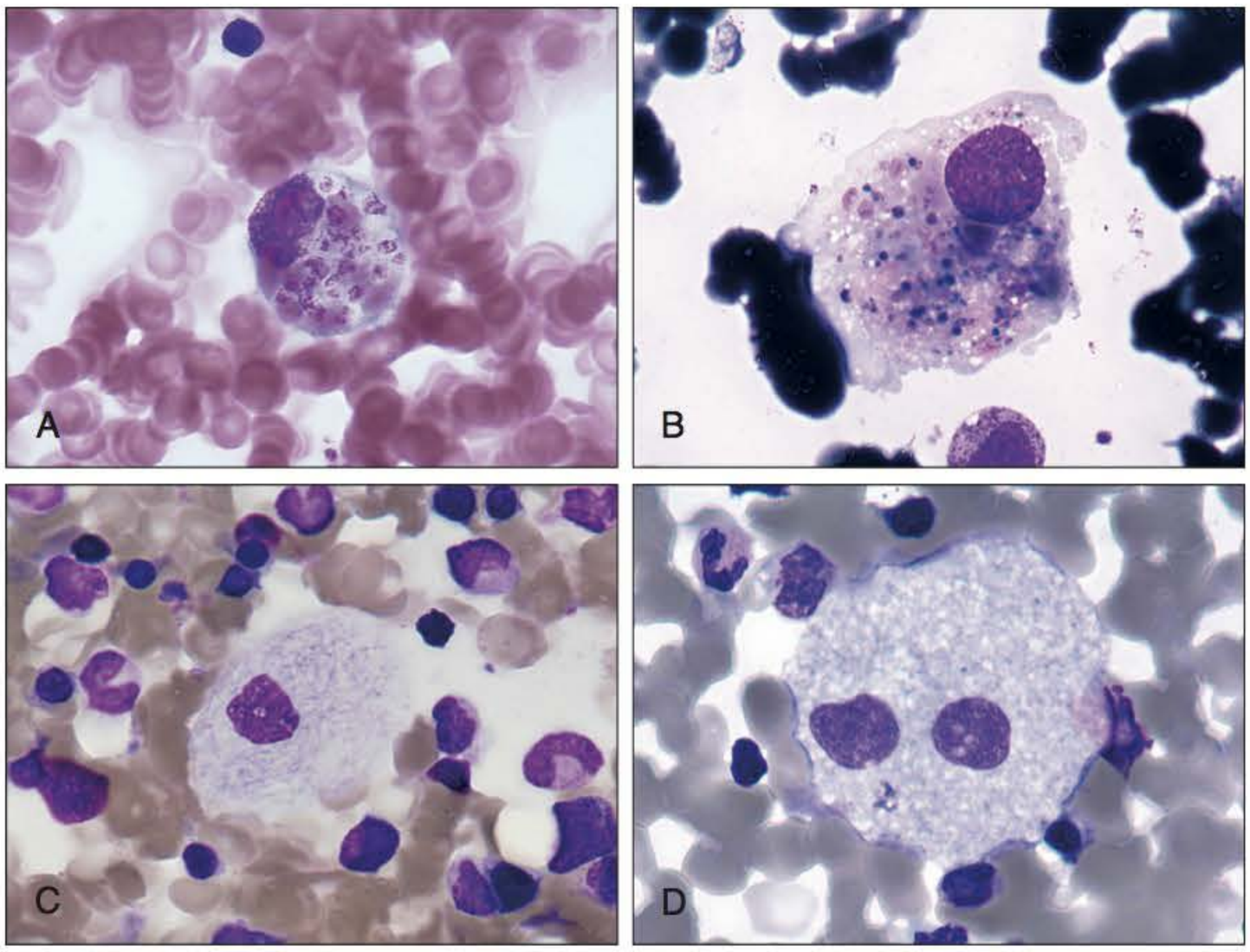


Figura 32.89 *A*, hiperplasia histiocítica ocorrendo na síndrome hematofagocítica associada à infecção; esse macrófago contém plaquetas e eritrócitos (× 1.000). Compare com B, histiócito com resíduos celulares em um paciente com HIV (×1.000); *C*, macrófago anormal na doença de Gaucher (×1.000); e D, um na doença de Niemann-Pick (×1.000).

apenas uma resposta variável à quimioterapia. A doença pulmonar em indivíduos adultos pode regredir espontaneamente mediante o abandono do tabagismo.

Uma forma citológica maligna de HCL foi avaliada como sarcoma de Langerhan (Weiss, 2001c). Este geralmente se manifesta como uma doença que acomete múltiplos órgãos, apresentando alta taxa mitótica e comportamento agressivo.

Sarcoma/tumor de células dendríticas interdigitantes (SCDI)

Trata-se de um tumor raro de células dendríticas interdigitantes paracorticais de linfonodos (Weiss, 2001d). Seu aspecto macro e microscópico corresponde ao de um sarcoma, apresentando cor marrom-claro e aparência lobulada firme, por vezes acompanhado de hemorragia ou necrose, além de fascículos microscópicos, espiras e/ou padrão estoriforme. Os linfócitos estão distribuídos de forma dispersa e células epitelioides roliças podem estar presentes. A atipia é variável.

A imunofenotipagem é essencial para o diagnóstico. As células tumorais são positivas para S-100, apresentam positividade fraca variável para CD45 e os marcadores de monócitos CD68 e lisozima. Negatividade para CD1a, CD21 e CD35, bem como para outros marcadores de células B e T mieloides, EMA e CD30. Os linfócitos de fundo são células T reativas. O prognóstico é variável.

Sarcoma/tumor de células dendríticas foliculares (SCDF)

Trata-se de outro tumor de células dendríticas raro, derivado de células dendríticas foliculares fenotipicamente diferentes das células do SCDI (Weiss, 2001e). Geralmente, há envolvimento dos linfonodos cervicais. O envolvimento dos linfonodos axilares, mediastinais, mesentéricos e retroperitoneais também foi descrito. Microscopicamente, apresentam fascículos, padrão estoriforme e/ou espiras completas (360°).

O imunofenótipo revela positividade para CD1, CD23 e CD35, com expressão variável de S-100 e CD68, negatividade para CD1a e expressão ocasional de CD45 e CD20. Não há expressão de outros marcadores de células B e T mieloides, citoqueratinas e HMB-45, bem como de CD117 (Hornick, 2002).

Esses tumores são indolentes e com frequência respondem bem à ressecção simples.

Sarcoma de células dendríticas não especificado

Sarcomas de células dendríticas que não são classificados nas categorias já descritas são denominados sarcomas de células dendríticas não especificados (Weiss, 2001f). Outra denominação é a de sarcomas de células dendríticas indeterminados. Esses sarcomas expressam CD1a e S-100 sem grânulos de Birbeck.

Doença de mastócitos

A doença de mastócitos (mastocitose) é uma proliferação neoplásica frequentemente enigmática de mastócitos que envolve a pele, medula óssea, linfonodos e/ou baço (Valent, 2001a, b). Os sintomas são complexos e originam-se da secreção de aminas vasoativas, incluindo histamina e serotonina, e também do efeito de massa. A urticária com pigmentação é comum no envolvimento cutâneo e é denominada urticária pigmentosa. A mastocitose sistêmica manifesta-se com sintomas constitucionais variáveis, distúrbio cutâneo incluindo a urticária, prurido e dermatografismo, sintomas de liberação sistêmica de histamina, dor óssea, artralgia e fraturas, esplenomegalia, hepatomegalia ou linfadenopatia.

A mastocitose é provavelmente devida a mutações do receptor do fator da célula-tronco, KIT, com expressão de CD117. Considerando-se os aspectos morfológicos, o aumento de mastócitos é observado nos órgãos envolvidos, com frequência associado à fibrose. Os mastócitos normalmente são células mononucleares com núcleos centrais, cromatina aglomerada e grânulos basofílicos densos. No entanto, costuma ser difícil identificá-los, uma vez que grânulos de mastócitos não são bem preservados no tecido fixado e as células podem parecer células claras, histiócitos, fibroblastos ou outras.

Os mastócitos podem ser identificados no tecido por meio da coloração de Gimsa ou com corante azul de toluidina. A triptase do mastócito constitui o marcador mais específico, porém as células também expressam CD117, assim como CD45, CD33, CD68, CD2 e CD25. Os mastócitos não possuem MPO e com frequência expressam a cloroacetato esterase.

Há ocasiões em que é difícil identificar o envolvimento da medula, na presença de agregados paratrabeculares e perivasculares contendo maior quantidade de linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos. Os padrões de envolvimento são altamente variáveis e o exame de biópsia é útil. O número de mastócitos costuma estar aumentado em neoplasias hematológicas, sendo que estas células são mais aparentes em torno de partículas de medula óssea observadas em esfregaços de aspirado. Além disso, a mastocitose sistêmica por vezes é acompanhada de uma leucemia aguda simultânea, sendo detectada somente após tratamento do processo agudo (Figs. 32.91 e 32.92). Também existe leucemia de mastócitos.

Foi descrito um espectro de distúrbios de mastocitose (Valent, 2001a, b). O resultado é altamente variável, com doença cutânea em geral indolente. Em crianças, a condição usualmente regride. A doença sistêmica sem envolvimento cutâneo é mais agressiva do que quando apresenta doença cutânea, sendo que a leucemia e o sarcoma de mastócitos são condições altamente agressivas.

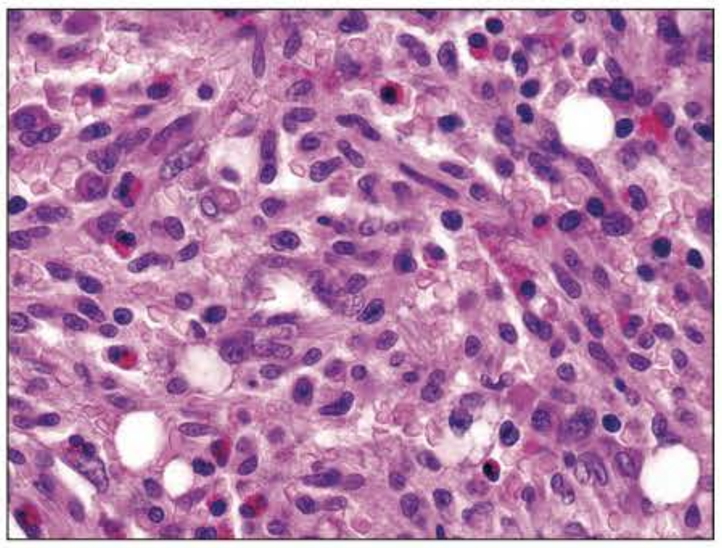


Figura 32.91 Mastocitose na medula óssea ocorrida após tratamento de LMA (×500).

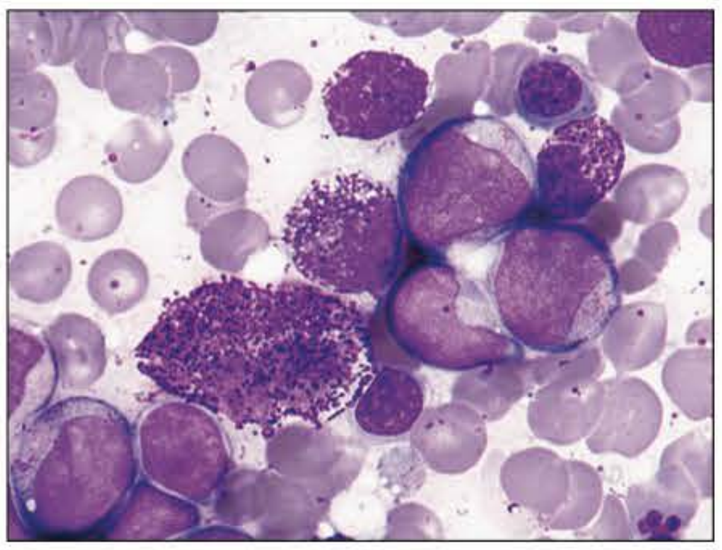


Figura 32.92 Leucemia aguda com doença de mastócitos inicial, antes da terapia (amostra prévia do caso apresentado na Fig. 32.91) (×1.000).

Referências bibliográficas

Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, et al: Polycythemia vera: Stem-cell and probable clonal origin of the disease. N Engl J Med 1976: 295:913–916.

Adriaansen HJ, Soeting PW, Wolvers-Tettero IL, et al: Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in acute non-lymphocytic leukemias. Analysis of 54 cases and a review of the literature. Leukemia 1991; 5:744–751.

Aggarwal BB: Nuclear factor-kappaB: The enemy within. Cancer Cell 2004; 6:203–208.

Alder A: Uber konstitutionell bedingte Granulationsveranderungen den Leukocyten. Arch Klin Med 1939; 138:372–378.

Alon R, Feigelson S: From rolling to arrest on blood vessels: Leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. Semin Immunol 2002; 14:93–104.

Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, et al: Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Oncogene 2004; 23:5426–5434.

Andreopoulou E, Pectasides D, Dimopoulos MA, et al: Primary mediastinal large B-cell lymphoma: Clinical study of a distinct clinical entity and treatment outcome in 20 patients: Review of the literature. Am J Clin Oncol 2004; 27:312–316.

Andres E, Noel E, Kurtz JE, et al: Life-threatening idiosyncratic drug-induced agranulocytosis in elderly patients. Drugs Aging 2004; 21:427–435.

Angstreich GR, Smith BD, Jones RJ: Treatment options for chronic myeloid leukemia: Imatinib versus interferon versus allogeneic transplant. Curr Opin Oncol 2004; 16:95–99.

Anon: The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. EGIL 1998; 12:2038.

Arcaini L, Orlandi E, Scotti M, et al: Combination of rituximab, cyclophosphamide, and vincristine induces complete hematologic remission of splenic marginal zone lymphoma. Clin Lymphoma 2004; 4:250–252.

Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, et al: Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: A review of 214 cases. Leuk Lymphoma 2002; 43:783–791.

Au WY, Lam CC, Lie AK, et al: T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation. Am J Clin Pathol 2003; 120:626–630.

Badley AD, Roumier T, Lum JJ, et al: Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. Trends Pharmacol Sci 2003; 24:298–305.

Bain BJ: Eosinophilic leukaemias and the idiopathic hypereosinophilic syndrome. Br J Haematol 1996; 95:2–9.

Bain BJ: Relationship between idiopathic hypereosinophilic syndrome, eosinophilic leukemia, and systemic mastocytosis. Am J Hematol 2004; 77:82–85.

Bain B, Pierre R, Imbert M, et al: Chronic eosinophilic leukaemia and the hypereosinophilic syndrome. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 29–31.

Bain B, Vardiman JW, Imbert M, et al: Myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 58–59.

Banchereau J, Briere F, Caux C, et al: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000; 18:767–811.

Banks PM, Warnke RA: Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 175–176.

Banks PM, Warnke RA: Primary effusion lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 179–180.

Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, et al: Assessment of marrow trephine in relation to staging in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 1982a; 51(1):1–15.

Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, et al: Assessment of bone marrow histology in Hodgkin's disease: Correlation with clinical factors. Br J Haematol 1982b; 51(3):345–360.

Bass RD, Pullarkat V, Feinstein DI, et al: Pathology of autoimmune myelofibrosis. A report of three cases and a review of the literature. Am J Clin Pathol 2001; 116:211–216.

Basten A, Beeson PB: Mechanism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. J Exp Med 1970; 131:1288–1305.

Belhadj K, Reyes F, Farcet JP, et al: Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: Report on a series of 21 patients. Blood 2003; 102:4261–4269.

Bellan C, De Falco G, Lazzi S, et al: Pathologic aspects of AIDS malignancies. Oncogene 2003; 22:6639–6645.

Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, et al: The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). Blood 1998; 92:596–599.

Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al: ALK-positive lymphoma: A single disease with a broad spectrum of morphology. Blood 1998; 91:2076–2084.

Bennett JM: Classification of the myelodysplastic syndromes. Clin Haematol 1986; 15:909–923.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French–American–British (FAB) Cooperative Group. Br J Haematol 1976; 33:451–458.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: A variant form of hypergranular promyelocytic leukaemia (M3). Br J Haematol 1980; 44:169–170.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: Concordance among observers and clinical correlations. Br J Haematol 1981; 47:553–561.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1982; 51:189–199.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French–American–British Cooperative Group. Ann Intern Med 1985a; 103:620–625.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French–American–British Cooperative Group. Ann Intern Med 1985b; 103:460–462.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French–American–British (FAB) Cooperative Group. J Clin Pathol 1989; 42:567–584.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). Br J Haematol 1991; 78:325–329.

Berard CW: Morphological definition of Burkitt's tumour: Historical review and present status. IARC Sci Publ 1985; 60:31–35.

Berard CW, Hutchison RE: The problem of classifying lymphomas: An orderly prescription for progress. Ann Oncol 1997; 8:3–9.

Berger F, Isaacson PG, Piris MA, et al: Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 132–134.

Bhatt V, Saleem A: Review: Drug-induced neutropenia – pathophysiology, clinical features, and management. Annals of Clin & Lab Sci 2004; 34:131–137.

Revisão recente sobre os mecanismos de ação. Aspectos clínicos, diagnóstico e supervisão de neutropenia induzida por fármacos, incluindo o uso de filgrastina e pegfilgrastina por pacientes submetidos à quimioterapia.

Bitter MA, Le Beau MM, Larson RA, et al: A morphologic and cytochemical study of acute myelomonocytic leukemia with abnormal marrow eosinophils associated with inv(16)(p13q22). Am J Clin Pathol 1984; 81:733–741.

Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, et al: Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. Int J Cancer 1997; 72:424–430.

Blum KA, Lozanski G, Byrd JC: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. Blood 2004; 104:3009–3020.

Bock O, Schlue J, Mengel M, et al: Thrombopoietin receptor (Mpl) expression by megakaryocytes in myeloproliferative disorders. J Pathol 2004; 203:609–615.

Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, et al: Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. Blood 2004; 104:3358–3360.

Borisch B, Raphael M, Swerdlow SH, et al: Lymphoproliferative diseases associated with primary immune disorders. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 257–259.

Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA: Leukemic reticuloendotheliosis. Blood 1958; 13:609–630.

Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, et al: Hodgkin and Reed–Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:9337–9342.

Brandt L: Leukaemia and lymphoma risks derived from solvents. Med Oncol Tumor Pharmacother 1987; 4:199–205.

Brigden ML: A practical workup for eosinophilia. You can investigate the most likely causes right in your office. Postgrad Med 1999; 105:193–210.

Brito-Babapulle F: The eosinophilias, including the idiopathic hypereosinophilic syndrome. Br J Haematol 2003; 121:203–223.

Brunning RD: Morphologic alterations in nucleated blood and marrow cells in genetic disorders. Hum Pathol 1970; 1:99.

Brunning RD, McKenna RW: Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Bone Marrow. Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Myelodysplastic syndromes: Introduction. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 63–67.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Refractory anaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haemaltopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, p.68.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Refractory anaemia with ringed sideroblasts. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, p 69.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Refractory cytopenia with multilineage dysplasia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001d, p 70.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Refractory anaemia with excess blasts. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001e, p 71.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Myelodysplastic syndrome, unclassifiable. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001f, p 72.

Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, et al: Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q) chromosome abnormality ('5q-syndrome'). *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001g, p 73.

Brunning RD, Matutes E, Harris NL, et al: Acute myeloid leukaemia: Introduction. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Hae-

matopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001h, pp 77–80.
Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al: Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001i, pp 81–87.
Brunning RD, Matutes E, Harris NL, et al: Acute myeloid leukaemia with multilineage dysplasia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001j, pp 88–89.
Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al: Acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes, therapy related. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001k, pp 89–91.
Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al: Acute myeloid leukaemia not otherwise categorised. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001l, pp 91–105.
Brunning RD, Matutes E, Borowitz M, et al: Acute leukaemias of ambiguous lineage. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001m, pp 106–107.
Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, et al: Precursor B lymphoblastic leukaemia/lymphoblastic lymphoma (precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia). *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001n, pp 111–114.
Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, et al: Precursor T lymphoblastic leukaemia/lymphoblastic lymphoma (precursor T-cell acute lymphoblastic leukaemia). *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001o, pp 115–117.
Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, et al: Leukocyte adhesion deficiency syndromes: Adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. Curr Opin Hematol 2002; 9:30–35.
Burkitt D: A sarcoma involving the jaws in African children. Br J Surg 1958; 46:218–223.
Cady FM, Muto DN, Ciabeterri G, et al: Utility of interphase FISH panels for routine clinical cytogenetic evaluation of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. J Assoc Genet Technol 2004; 30:77–81.
Cairo MS, Sposto R, Perkins SL, et al: Burkitt's and Burkitt-like lymphoma in children and adolescents: A review of the Children's Cancer Group experience. Br J Haematol 2003; 120:660–670.
Calabretta B, Perrotti D: The biology of CML blast crisis. Blood 2004; 103:4010–4022.
Caligiuri MA, Strout MP, Gilliland DG: Molecular biology of acute myeloid leukemia. Semin Oncol 1997; 24:32–44.
Camacho FI, Algara P, Mollejo M, et al: Nodal marginal zone lymphoma: A heterogeneous tumor: A comprehensive analysis of a series of 27 cases. Am J Surg Pathol 2003; 27:762–771.
Cao TM, Coutre SE: T-cell prolymphocytic leukemia: Update and focus on alemtuzumab (Campath-1H). Hematology 2003; 8:1–6.
Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et al: Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. Blood 2000; 95:651–659.
Cardullo L de S, Morilla R, Catovsky D: Significance of phi bodies in acute leukaemia. J Clin Pathol 1981; 34:153–157.
Cassuto JP, Schneider M, Bourg M, et al: Acute infectious lymphocytosis as a T-cell lymphoproliferative syndrome. Br Med J 1977; 2:1331–1332.
Castella A, Croxson TS, Mildvan D, et al: The bone marrow in AIDS. A histologic, hematologic, and microbiologic study. Am J Clin Pathol 1985; 84:425–432.
Catovsky D, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, et al: B-cell prolymphocytic leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 131–132.
Catovsky D, Ralfkiaer E, Muller-Hermelink HK: T-cell prolymphocytic leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 195–196.
Cham B, Bonilla MA, Winkelstein J: Neutropenia associated with primary immunodeficiency syndromes. Semin Hematol 2002; 39:107–112.
Chan JKC, Jaffe ES, Ralfkiaer E: Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 204–207.
Chan JKC, Jaffe ES, Ralfkiaer E: Blastic NK-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 214–215.
Chan JKC, Wong KF, Jaffe ES, et al: Aggressive NK-cell leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, pp 198–200.
Chan WC, Catovsky D, Foucar K, et al: T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001d, pp 197–198.
Chang HW, Leong KH, Koh DR, et al: Clonality of isolated eosinophils in the hypereosinophilic syndrome. Blood 1999; 93:1651–1657.
Chen CJ, Huang YC, Jaing TH, et al: Hemophagocytic syndrome: A review of 18 pediatric cases. J Microbiol Immunol Infect 2004; 37:157–163.
Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, et al: Report of the national cancer institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 1990; 8:813–819.
Chomienne C, Rain JD, Briere J, et al: Risk of leukemic transformation in PV and ET patients. Pathol Biol (Paris) 2004; 52:289–293.
Christensen RD, Calhoun DA: Congenital neutropenia. Clin Perinatol 2004; 31:29–38.
Christophers E: Eosinophilic diseases of the skin. Chem Immunol 2000; 76:230–243.
Collins CM, Medveczky PG: Genetic requirements for the episomal maintenance of oncogenic herpesvirus genomes. Adv Cancer Res 2002; 84:155–174.
Cortes J: Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2004; 18:569–584.
Cortes J, Kantarjian H: Advanced-phase chronic myeloid leukemia. Semin Hematol 2003; 40:79–86.
Crist WM, Shuster JJ, Falletta J, et al: Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation: A Pediatric Oncology Group study. Blood 1988; 72:1891–1897.
Csernus B, Timar B, Fulop Z, et al: Mutational analysis of IgVH and BCL-6 genes suggests thymic B-cells origin of mediastinal (thymic) B-cell lymphoma. Leuk Lymphoma 2004; 45:2105–2110.
Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, et al: Cytogenetic and clinicobiological features of acute leukemia with stem cell phenotype: Study of nine cases. Cancer Genet Cytogenet 1996; 92:31–36.
Dainiak N: Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. Exp Hematol 2002; 30:513–528.
O artigo revisa as formas comuns de radiação ionizante, incluindo medida e resposta à dose para elementos normais de medula, efeitos sobre as células ao nível celular e efeitos clínicos da exposição.
Dale DC: Introduction: Severe chronic neutropenia. Semin Hematol 2002a; 39:73–74.
Dale DC, Bolyard AA, Aprikyan A: Cyclic neutropenia. Semin Hematol 2002b; 39:89–94.
Davey FR, Huntington S: Age-related variation in lymphocyte subpopulations. Gerontology 1977; 23:381–389.
Davey FR, Hutchison RE: Pathology and immunology of adult T-cell leukemia/lymphoma. Curr Opin Oncol 1991; 3:13–20.
Davidsohn I: Serologic diagnosis of infectious mononucleosis. JAMA 1937; 108:289.
Davidsohn I, Lee CL: The clinical serology of infectious mononucleosis. *In* Carter RL, Penman HG (eds): Infectious Mononucleosis. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1969.
De Falco G, Bellan C, Lazzi S, et al: Interaction between HIV-1 Tat and pRb2/p130: A possible mechanism in the pathogenesis of AIDS-related neoplasms. Oncogene 2003; 22:6214–6219.
De Paepe P, Baens M, van Krieken H, et al: ALK activation by the CLTC-ALK fusion is a recurrent event in large B-cell lymphoma. Blood 2003; 102:2638–2641.
De Waele M, Foulon W, Renmans W, et al: Hematologic values and lymphocyte subsets in fetal blood. Am J Clin Pathol 1988; 89:742–746.
Dearden CE, Matutes E, Cazin B, et al: High remission rate in T-cell prolymphocytic leukemia with CAMPATH-1H. Blood 2001; 98:1721–1726.
Delage R, Roy J, Jacques L, et al: Multiple bcl-2/Ig gene rearrangements in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. Br J Haematol 1997; 97:589–595.
Delsol G, Ralfkiaer E, Stein H, et al: Anaplastic large cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 230–235.
Diaz-Jouanen E, Strickland RG, Williams RC: Studies of human lymphocytes in the newborn and the aged. Am J Med 1975; 58:620–628.
Diebold J, Jaffe ES, Raphael M, et al: Burkitt lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 181–184.
Dogan A, Isaacson PG: Splenic marginal zone lymphoma. Semin Diagn Pathol 2003; 20:121–127.
Dorfman RF, Remington JS: Value of lymph-node biopsy in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. N Engl J Med 1973; 289:878–881.
Druker BJ: Imatinib as a paradigm of targeted therapies. Adv Cancer Res 2004; 91:1–30.
Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, et al: Benzene in the environment: An assessment of the potential risks to the health of the population. Occup Environ Med 2001; 58:2–13.
Durie BG, Kyle RA, Belch A, et al: Myeloma management guidelines: A consensus report from the scientific advisors of the international myeloma foundation. Hematol J 2003; 4:379–398.
Ehrlich GD, Han T, Bettigole R, et al: Human T-lymphotropic virus type I-associated benign transient immature T-cell lymphocytosis. Am J Hematol 1988; 27:49–55.
Elliott MA, Dewald GW, Tefferi A, et al: Chronic neutrophilic leukemia (CNL): A clinical, pathologic and cytogenetic study. Leukemia 2001; 15:35–40.
Erber WN, Breton-Gorius J, Villeval JL, et al: Detection of cells of megakaryocyte lineage in haematological malignancies by immuno-alkaline phosphatase labelling cell smears with a panel of monoclonal antibodies. Br J Haematol 1987; 65:87–94.
Etzioni A, Alon R: Leukocyte adhesion deficiency III: A group of integrin activation defects in hematopoietic lineage cells. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004; 4:485–490.
Falini B, Pulford K, Pucciarini A, et al: Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. Blood 1999; 94:3509–3515.
Falini B, Tiacci E, Liso A, et al: Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). Lancet 2004; 363:1869–1870.
Felgar RE, Salhany KE, Macon WR, et al: The expression of TIA-1+ cytolytic-type granules and other cytolytic lymphocyte-associated markers in CD30+ anaplastic large cell lymphomas (ALCL): Correlation with morphology, immunophenotype, ultrastructure, and clinical features. Hum Pathol 1999; 30:228–236.
Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T: Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell com-

mon to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. Am J Med 1977; 63:125–130.
Foa R, Lauria F, Catovsky D: Evidence that T colony formation is a property of T mu (helper) lymphocytes. Clin Exp Immunol 1980; 42:152–155.
Foucar K, Catovsky D: Hairy cell leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 138–141.
Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC: Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. J Cell Biol 1997; 139:1349–1360.
Franklin EC: Mu-chain disease. Arch Intern Med 1975; 135:71–72.
Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, et al: The sugar code: Functional lectinomics. Biochim Biophys Acta 2002; 1572:165–177.
Gabriel HH, Kindermann W: Adhesion molecules during immune response to exercise. Can J Physiol Pharmacol 1998; 76:512–523.
Gale RE: Pathogenic markers in essential thrombocythemia. Curr Hematol Rep 2003; 2:242–247.
Galton DA, Goldman JM, Wiltshaw E, et al: Prolymphocytic leukaemia. Br J Haematol 1974; 27:7–23.
Gamis AS: Acute myeloid leukemia and Down syndrome evolution of modern therapy-state of the art review. Pediatr Blood Cancer, 2004.
Gascoyne RD: Molecular pathogenesis of mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Leuk Lymphoma 2003; 44:S13–20.
Gatter KC, Warnke RA: Diffuse large B-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 171–174.
Gatter KC, Warnke RA: Intravascular large B-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 177–178.
Gentile TC, Hadlock KG, Uner AH, et al: Large granular lymphocyte leukaemia occurring after renal transplantation. Br J Haematol 1998; 101:507–512.
Gentile TC, Uner AH, Hutchison RE, et al: CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia. Blood 1994; 84:2315–2321.
Gilbert HS, Ornstein L: Basophil counting with a new staining method using alcian blue. Blood 1975; 46:279–286.
Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2004; 80–97.
Este artigo descreve a genética molecular de leucemias adultas e relaciona as descobertas recentes de terapias atuais e futuras.
Go RS, Wester SM: Immunophenotypic and molecular features, clinical outcomes, treatments, and prognostic factors associated with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: A systematic analysis of 156 patients reported in the literature. Cancer 2004; 101:1404–1413.
Golomb HM, Rowley JD, Vardiman JW, et al: 'Microgranular' acute promyelocytic leukemia: A distinct clinical, ultrastructural, and cytogenetic entity. Blood 1980; 55:253–259.
Gombart AF, Shiohara M, Kwok SH, et al: Neutrophil-specific granule deficiency: Homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor CCAAT/enhancer binding protein-epsilon. Blood 2001; 97:2561–2567.
Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, et al: WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: Clinical, hematological, and molecular studies. Am J Med Genet 2000; 91:368–376.
Gotlib V, Darji J, Bloomfield K, et al: Eosinophilic variant of chronic myeloid leukemia with vascular complications. Leuk Lymphoma 2003; 44:1609–1613.
Green DR: Overview: Apoptotic signaling pathways in the immune system. Immunol Rev 2003; 193:5–9.
Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, et al: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 1997; 89:2079–2088.
Greenberg PL: Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: Implications for disease natural history and treatment. Leuk Res 1998; 22:1123–1136.
Griesshammer M, Klippel S, Strunck E, et al: PRV-1 mRNA expression discriminates two types of essential thrombocythemia. Ann Hematol 2004; 83:364–370.
Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, et al: Plasma cell neoplasms. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 142–156.
Gulino AV: WHIM syndrome: A genetic disorder of leukocyte trafficking. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2003 3:443–450.
Gulino AV, Moratto D, Sozzani S, et al: Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. Blood 2004; 104:444–452.
Haks MC, Krimpenfort P, Borst J, et al: The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalphabeta and TCRgammadelta lineages. EMBO J 1998; 17:1871–1882.
Haluska FG, Russo G, Kant J, et al: Molecular resemblance of an AIDS-associated lymphoma and endemic Burkitt lymphomas: Implications for their pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:8907–8911.
Hao S, Sanger W, Onciu M, et al: Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: A report of 5 cases with blastoid features. Mod Pathol 2002; 15:1266–1272.
Harrington DS, Weisenburger DD, Purtilo DT: Epstein–Barr virus-associated lymphoproliferative lesions. Clin Lab Med 1988; 8:97–118.
Harris NL: Mature B-cell neoplasms: Introduction. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 121–126.
Harris NL, Swerdlow SH: Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 270–271.
Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: A revised European–American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84:1361–1392.
Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: Lymphoma classification proposal: Clarification. Blood 1995; 85:857–860.
Harris NL, Swerdlow SH, Frizzera G, et al: Post-transplant lymphoproliferative disorders. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, pp 264–269.
Hasselbalch H, Jans H, Nielsen PL: A distinct subtype of idiopathic myelofibrosis with bone marrow features mimicking hairy cell leukemia: Evidence of an autoimmune pathogenesis. Am J Hematol 1987; 25:225–229.
Hayhoe FG: Cytochemistry of the acute leukaemias. Histochem J 1984; 16:1051–1059.
Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et al: Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May–Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. Am J Hum Genet 2001; 69:1033–1045.
Heine G, Gabriel H, Weindler J, et al: Painful regional anaesthesia induces an immunological stress reaction: The model of retrobulbar anaesthesia. Eur J Anaesthesiol 2001; 18:505–510.
Herbst H, Pallesen G, Weiss LM, et al: Hodgkin's disease and Epstein–Barr virus. Ann Oncol 1992; 3:27–30.
Hernandez AM: Peripheral blood manifestations of lymphoma and solid tumors. Clin Lab Med 2002; 22:215–253.
Esse artigo descreve a correlação existente entre os achados identificados em esfregaços de sangue periférico de pacientes com diversos tipos de leucemia linfoide e linfoma, incluindo morfologia de várias células de linfoma no sangue circulante durante a doença.
Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, et al: Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. Nat Genet 2003; 34:70–74.
Hess RD: Routine Epstein–Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. J Clin Microbiol 2004; 42:3381–387.
Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT: Chronic granulomatous disease. Curr Opin Immunol 2003; 15:578–584.
Himmelmann A, Gautschi O, Nawrath M, et al: Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD(+)CD27(+) memory B cells. Br J Haematol 2001; 114:400–405.
Horie R, Watanabe M, Ishida T, et al: The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF-kappaB activation in anaplastic large cell lymphoma. Cancer Cell 2004; 5:353–364.
Hornick JL, Fletcher CD: Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. Am J Clin Pathol 2002; 117:188–193.
Hoxie JA: Hematologic manifestations of AIDS. *In* Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ (eds): Hematology. Basic Principles and Practice. New York, Churchill Livingstone, 1995.
Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, et al: Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. Clin Chem Lab Med 2002; 40:2–8.
Hudnall SD, Molina CP: Marked increase in L-selectin-negative T cells in neonatal pertussis. The lymphocytosis explained? Am J Clin Pathol 2000; 114:35–40.
Hutchison RE, Fairclough DL, Holt H, et al: Clinical significance of histology and immunophenotype in childhood diffuse large cell lymphoma. Am J Clin Pathol 1991; 95:787–793.
Hutchison RE, Kurec AS, Davey FR: Granulocytic sarcoma. Clin Lab Med 1990; 10:889–901.
Hutchison RE, Murphy SB, Fairclough DL, et al: Diffuse small noncleaved cell lymphoma in children, Burkitt's versus non-Burkitt's types. Results from the Pediatric Oncology Group and St. Jude Children's Research Hospital. Cancer 1989; 64:23–28.
Iannitto E, Ambrosetti A, Ammatuna E, et al: Splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. Cancer 2004; 101:2050–2057.
Iida S, Rao PH, Ueda R, et al: Chromosomal rearrangement of the PAX-5 locus in lymphoplasmacytic lymphoma with t(9;14)(p13;q32). Leuk Lymphoma 1999; 34:25–33.
ILSG – The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997; 89:3909–3918.
Imbert M, Bain B, Pierre R, et al: Chronic neutrophilic leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 27–28.
Imbert M, Pierre R, Thiele J, et al: Essential thrombocythaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 39–41.
Introne W, Boissy RE, Gahl WA: Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak–Higashi syndrome. Mol Genet Metab 1999; 68:283–303.
Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al: BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. Am J Pathol 2004; 165:159–166.
Isaacson P, Wright D, Ralfkiaer E, et al: Enteropathy-type T-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp.208–209.
Isaacson PG, Muller-Hermelink HK, Piris MA, et al: Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, Press, IARC Press, 2001b, pp 157–160.
Isaacson PG, Nathwani BN, Piris MA, et al: Nodal marginal zone B-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of

Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, p 161.

Isaacson PG, Piris MA, Catovsky D, et al: Splenic marginal zone lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001d, pp 135–137.

Ivanovska I, Galonek HL, Hildeman DA, Hardwick JM: Regulation of cell death in the lymphoid system by Bcl-2 family proteins. Acta Haematol 2004; 11:42–55.

Jaffe ES: Histiocytic and dendritic cell neoplasms: Introduction. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 275–277.

Jaffe ES, Ralfkiaer E: Mature T-cell and NK-cell neoplasma: Introduction. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, pp 191–194.

Jaffe ES, Ralfkiaer E: Hepatosplenic T-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001d, pp 210–211.

Jaffe ES, Ralfkiaer E: Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001e, pp 212–213.

Jaffe ES, Ralfkiaer E: Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001f, pp 225–226.

Jaffe ES, Wilson WH: Lymphomatoid granulomatosis. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001g, pp 185–187.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 3rd ed. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2001a.

Fornece uma classificação abrangente e uniforme dos neoplasmas hematopoéticos. Foi encomendado pela OMS por meio das principais organizações de hemopatologia, sendo alimentado por informações oriundas de grupos colaboradores e centros de câncer, tendo como objetivo fornecer critérios diagnósticos padrão para uso ao nível mundial. Também fornece uma revisão abrangente sobre o estado do conhecimento acerca dos neoplasmas hematopoéticos no decorrer do século XX.

Jenner MJ, Summers KE, Norton AJ, et al: JH probe real-time quantitative polymerase chain reaction assay for bcl-2/IgH rearrangements. Br J Haematol 2002; 118:550–558.

Jiang F, Lin F, Price R, et al: Rapid detection of IgH/BCL2 rearrangement in follicular lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization with bacterial artificial chromosome probes. J Mol Diagn 2002; 4:144–149.

Jiang X, Wang X: Cytochrome C-mediated apoptosis. Annu Rev Biochem 2004; 73:87–106.

Jurkowska M, Bernatowska E, Bal J: Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2004; 52:113–120.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, et al: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218:571–573.

Kanda M, Suzumiya J, Ohshima K, et al: Analysis of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of intravascular large B-cell lymphoma. Virchows Arch 2001; 439:540–546.

Kang J, Volkmann A, Raulet DH: Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. J Exp Med 2001; 193:689–698.

Karras A, Thervet E, Legendre C, et al: Hemophagocytic syndrome in renal transplant recipients: Report of 17 cases and review of literature. Transplantation 2004; 77:238–243.

Kasahara Y, Yachie A: Cell type specific infection of Epstein–Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. Crit Rev Oncol Hematol 2002; 44:283–294.

Kasamon YL, Swinnen LJ: Treatment advances in adult Burkitt lymphoma and leukemia. Curr Opin Oncol 2004; 16:429–435.

Katzenstein AL, Peiper SC: Detection of Epstein–Barr virus genomes in lymphomatoid granulomatosis: Analysis of 29 cases by the polymerase chain reaction technique. Mod Pathol 1990; 3:435–441.

Katzenstein AL, Carrington CB, Liebow AA: Lymphomatoid granulomatosis: A clinicopathologic study of 152 cases. Cancer 1979; 43:360–373.

Kaushansky K: Etiology of the myeloproliferative disorders: The role of thrombopoietin. Semin Hematol 2003; 40:6–9.

Kelaidi C, Rollot F, Park S, et al: Response to antiviral treatment in hepatitis C virus-associated marginal zone lymphomas. Leukemia 2004; 18:1711–1716.

Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL, et al: Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May–Hegglin anomaly. Nat Genet 2000; 26:106–108.

Khanna-Gupta A, Zibello T, Sun H, et al: C/EBP epsilon mediates myeloid differentiation and is regulated by the CCAAT displacement protein (CDP/cut). Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:8000–8005.

Kikuchi M, Jaffe ES, Ralfkiaer E: Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 200–203.

Kim SZ, Chow KU, Kukoc-Zivojnov N, et al: Expression of ZAP-70 protein correlates with disease stage in chronic lymphocytic leukemia and is associated with, but not generally restricted to, non-mutated Ig VH status. Leuk Lymphoma 2004; 45:2037–2045.

Kinoshita K, Amagasaki T, Ikeda S, et al: Preleukemic state of adult T cell leukemia: Abnormal T lymphocytosis induced by human adult T cell leukemia-lymphoma virus. Blood 1985; 66:120–127.

Knowles DM: Immunophenotypic and antigen receptor gene rearrangement analysis in T cell neoplasia. Am J Pathol 1989; 134:761–785.

Knowles DM: Etiology and pathogenesis of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am 2003; 17:785–820.

Knowles DM, Chamulak GA, Subar M, et al: Lymphoid neoplasia associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The New York University Medical Center experience with 105 patients (1981–1986). Ann Intern Med 1988; 108:744–753.

Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, et al: Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. J Immunol 2004; 172:636–643.

Korsmeyer SJ: BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Res 1999; 59:1693s–1700s.

Kroft SH: Infectious diseases manifested in the peripheral blood. Clin Lab Med 2002; 22:253–277.

Revisão sobre ambas as alterações hematopoéticas inespecíficas ocorridas no sangue periférico durante a infecção, bem como os achados referentes a poucas doenças em que o esfregaço de sangue periférico exerce papel diagnóstico primário.

Kuppers R: B cells under influence: Transformation of B cells by Epstein–Barr virus. Nat Rev Immunol 2003; 3:801–812.

Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, et al: Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: Risk or benefit? Acta Haematol 2000; 104:10–15.

Lagergren J: The white blood cell count and the erythrocyte sedimentation rate in pertussis. Acta Paediatr 1963; 52:405–409.

Lakshman R, Finn A: Neutrophil disorders and their management. J Clin Pathol 2001; 54:7–19.

Lamant L, Gascoyne RD, Duplantier MM, et al: Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): A new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer 2003; 37:427–432.

Lamy T, Loughran TP, Jr: Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. Semin Hematol 2003; 40:185–195.

Landaw SA: Acute leukemia in polycythemia vera. Semin Hematol 1986; 23:156–165.

Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, et al: Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations. Blood 2001; 98:165–173.

Lanza F: Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. J Mol Med 1998; 76:676–681.

Lazzi S, Bellan C, De Falco G, et al: Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: Implications for disease pathogenesis. Hum Pathol 2002; 33:723–731.

Le Beau MM, Larson RA: Cytogenetics and neoplasia. *In* Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ (eds): Hematology. Basic Principles and Practice. New York, Churchill Livingstone, 2000, p 848.

Lee CL, Davidsohn I, Panczyszyn O: Horse agglutinins in infectious mononucleosis. II. The spot test. Am J Clin Pathol 1968; 49:12–18.

Lennert K, Stein H, Kaiserling E: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. Br J Cancer 1975; 31:29–43.

Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, et al: Heterogeneity in Fanconi anemia: Evidence for 2 new genetic subtypes. Blood 2004; 103:2498–2503.

Lima M, Almeida J, Dos Anjos Teixeira M, et al: TCRalphabeta+/CD4+ large granular lymphocytosis: A new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. Am J Pathol 2003; 163:763–771.

Lipscomb MF, Masten BJ: Dendritic cells: Immune regulators in health and disease. Physiol Rev 2002; 82:97–130.

List AF, Vardiman J, Issa JP, Dewitte TM: Myelodysplastic syndromes. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2004; 297–317.

Esta revisão sobre SMD cobre o espectro que vai do diagnóstico microscópio até a ciência laboratorial e a tradução de achados recentes em estratégias terapêuticas.

Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, et al: CD5-mantle cell lymphoma. Am J Clin Pathol 2002; 118:216–224.

Loembe MM, Lamoureux J, Deslauriers N, et al: Lack of CD40-dependent B-cell proliferation in B lymphocytes isolated from patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. Br J Haematol 2001; 113:699–705.

Loembe MM, Neron S, Delage R, et al: Analysis of expressed V(H) genes in persistent polyclonal B cell lymphocytosis reveals absence of selection in CD27+IgM+IgD+ memory B cells. Eur J Immunol 2002; 32:3678–3688.

Lones MA, Auperin A, Raphael M, et al: Mature B-cell lymphoma/leukemia in children and adolescents: Intergroup pathologist consensus with the revised European–American lymphoma classification. Ann Oncol 2000; 11:47–51.

Lones MA, Sanger WG, Le Beau MM, et al: Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: A report from Children's Cancer Group study CCG-E08. J Pediatr Hematol Oncol 2004; 26:169–178.

Lukes RJ, Carver LL, Hall TC: Hodgkin's disease, report of nomenclature committee. Cancer Res 1966; 26:1311.

Luna-Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, et al: Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: A study of 167 patients. Blood 1999; 93:459–466.

Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, et al: Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. Semin Immunol 2002; 14:105–113.

McDonald PP: Transcriptional regulation in neutrophils: Teaching old cells new tricks. Adv Immunol 2004; 82:1–48.

McDowall A, Inwald D, Leitinger B, et al: A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. J Clin Invest 2003; 111:51–60.

Machii T, Tokumine Y, Inoue R, et al: Predominance of a distinct subtype of hairy cell leukemia in Japan. Leukemia 1993; 7:181–186.

Machii T, Yamaguchi M, Inoue R, et al: Polyclonal B-cell lymphocytosis with features resembling hairy cell leukemia-Japanese variant. Blood 1997; 89:2008–2014.

McKenna RW, Parkin J, Bloomfield CD, et al: Acute

promyelocytic leukaemia: A study of 39 cases with identification of a hyperbasophilic microgranular variant. Br J Haematol 1982; 50:201–214.
MacPherson N, Lesack D, Klasa R, et al: Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkitt-like) lymphoma: Cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation. J Clin Oncol 1999; 17:1558–1567.
Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, et al: The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Leuk Lymphoma 2004; 45:455–462.
Maitra A, McKenna RW, Weinberg AG, et al: Precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. A study of nine cases lacking blood and bone marrow involvement and review of the literature. Am J Clin Pathol 2001; 115:868–875.
Maldonado JE, Hanlon DG: Monocytosis: A current appraisal. Mayo Clin Proc 1965; 40:248–259.
Mansoor A, Medeiros LJ, Weber DM, et al: Cytogenetic findings in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia. Chromosomal abnormalities are associated with the polymorphous subtype and an aggressive clinical course. Am J Clin Pathol 2001; 116:543–549.
Marsden VS, Strasser A: Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. Annu Rev Immunol 2003; 21:71–105.
Martignetti JA, Heath KE, Harris J, et al: The gene for May–Hegglin anomaly localizes to a <1-mb region on chromosome 22q12.3-13.1. Am J Hum Genet 2000; 66:1449–1454.
Martin DA, Elkon KB: Mechanisms of apoptosis. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30:441–454.
Martinez-Climent JA, Garcia-Conde J: Chromosomal rearrangements in childhood acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. J Pediatr Hematol Oncol 1999; 21:91–102.
Martinez-Moczygemba M, Huston DP: Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. J Allergy Clin Immunol 2003; 112:653–666.
Matta H, Chaudhary PM: Activation of alternative NF-kappa B pathway by human herpes virus 8-encoded Fas-associated death domain-like IL-1 beta-converting enzyme inhibitory protein (vFLIP). Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:9399–9404.
Mbulaiteye SM, Parkin DM, Rabkin CS: Epidemiology of AIDS-related malignancies: an international perspective. Hematol Oncol Clin North Am 2003; 17:673–696.
Meerkin D, Ashkenazi Y, Gottschalk-Sabag S, et al: Plasma cell dyscrasia with marrow fibrosis. A reversible syndrome mimicking agnogenic myeloid metaplasia. Cancer 1994; 73:625–628.
Melhem MF, Meisler AI, Saito R, et al: Cytokines in inflammatory malignant fibrous histiocytoma presenting with leukemoid reaction. Blood 1993; 82:2038–2044.
Melo JV, Catovsky D, Gregory WM, et al: The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. Br J Haematol 1987; 65:23–29.
Menendez P, Vargas A, Bueno C, et al: Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. Leukemia 2004; 18:491–498.
Merchant SH, Viswanatha DS, Zumwalt RE, et al: Epstein–Barr virus-associated intravascular large T-cell lymphoma presenting as acute renal failure in a patient with acquired immune deficiency syndrome. Hum Pathol 2003; 34:950–954.
Mesa RA, Elliott MA, Schroeder G, et al: Durable responses to thalidomide-based drug therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. Mayo Clin Proc 2004; 79:883–889.
Michiels JJ, Juvonen E: Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the Thrombocythemia Vera Study Group. Semin Thromb Hemost 1997; 23:339–347.
Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, et al: Philadelphia (Ph) chromosome-positive thrombocythemia without features of chronic myeloid leukemia in peripheral blood: Natural history and diagnostic differentiation from Ph-negative essential thrombocythemia. Ann Hematol 2004; 83:504–512.
Michiels JJ, Kutti J, Stark P, et al: Diagnosis, pathogenesis and treatment of the myeloproliferative disorders essential thrombocythemia, polycythemia vera and essential megakaryocytic granulocytic metaplasia and myelofibrosis. Neth J Med 1999; 54:46–62.
Moliterno AR, Siebel KE, Sun AY, et al: A novel thrombopoietin signaling defect in polycythemia vera platelets. Stem Cells 1998; 16:185–192.
Montoto S, Lopez-Guillermo A, Altes A, et al: Predictive value of follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) in patients with follicular lymphoma at first progression. Ann Oncol 2004; 15:1484–1489.
Montserrat E, Rozman C: Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukemia: A review of its prognostic importance. Blood Cells 1987; 12:315–326.
Morice WG, Kimlinger T, Katzmann JA, et al: Flow cytometric assessment of TCR-Vbeta expression in the evaluation of peripheral blood involvement by T-cell lymphoproliferative disorders: A comparison with conventional T-cell immunophenotyping and molecular genetic techniques. Am J Clin Pathol 2004; 121:373–383.
Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. Science 1994; 263:1281–1284.
Moser B, Wolf M, Walz A, et al: Chemokines: Multiple levels of leukocyte migration control. Trends Immunol 2004; 25:75–84.
Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al: Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Blood 2003; 101:4279–4284.
Mroczek EC, Weisenburger DD, Grierson HL, et al: Fatal infectious mononucleosis and virus-associated hemophagocytic syndrome. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:530–535.
Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD: Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev 2004; 18:115–136.
Muller-Hermelink HK, Catovsky D, Montserrat E, et al: Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 127–130.
Muss HB, Moloney WC: Chloroma and other myeloblastic tumors. Blood 1973; 42:721–728.
Myers JL, Kurtin PJ, Katzenstein AL, et al: Lymphomatoid granulomatosis. Evidence of immunophenotypic diversity and relationship to Epstein–Barr virus infection. Am J Surg Pathol 1995; 19:1300–1312.
Naiman JL, Oski FA, Allen FH Jr, et al: Hereditary eosinophilia: Report of a family and review of the literature. Am J Hum Genet 1964; 16:195–203.
Nakagawa T, Ikemoto T, Takeuchi T, et al: Eosinophilic peroxidase deficiency: Identification of a point mutation (D648N) and prediction of structural changes. Hum Mutat 2001; 17:235–236.
Nara T, Hayakawa A, Ikeuchi A, et al: Granulocyte colony-stimulating factor-producing cutaneous angiosarcoma with leukaemoid reaction arising on a burn scar. Br J Dermatol 2003; 149:1273–1275.
Nathwani BN, Harris NL, Weisenburger D, et al: Follicular lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 162–167.
Nauseef WM: Lessons from MPO deficiency about functionally important structural features. Jpn J Infect Dis 2004; 57:S4–5.
Neiman RS, Barcos M, Berard C, et al: Granulocytic sarcoma: A clinicopathologic study of 61 biopsied cases. Cancer 1981; 48:1426–1437.
Neiman RS, Rosen PJ, Lukes RJ: Lymphocyte-depletion Hodgkin's disease. A clinicopathological entity. N Engl J Med 1973; 288:751–755.
Nicola MD, Carlo-Stella C, Mariotti J, et al: High response rate and manageable toxicity with an intensive, short--term chemotherapy programme for Burkitt's lymphoma in adults. Br J Haematol 2004; 126:815–820.
Niederwieser D, Gastl G, Rumpold H, et al: Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). Br J Haematol 1987; 65:301–305.
Niittyvuopio R, Juvonen E, Kekomaki R, et al: The predictive value of megakaryocytic and erythroid colony formation and platelet function tests on the risk of thromboembolic and bleeding complications in essential thrombocythaemia. Eur J Haematol 2004; 72:245–251.
Nimieri HS, Makoni SN, Madziwa FH, et al: Leukemoid reaction response to chemotherapy and radiotherapy in a patient with cervical carcinoma. Ann Hematol 2003; 82:316–317.
Nola M, Pavletic SZ, Weisenburger DD, et al: Prognostic factors influencing survival in patients with B-cell small lymphocytic lymphoma. Am J Hematol 2004; 77:31–35.
Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National cancer institute-sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphoma. Cancer 1982; 49:2112–2135.
Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132:1497–1500.
Oakley SP, Garsia RJ, Coates AS: Eosinophilic leukaemoid reaction and interleukin-5 in metastatic melanoma. Med J Aust 1998; 169:501.
Offit K, Parsa NZ, Filippa D, et al: t(9;14)(p13;q32) denotes a subset of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with plasmacytoid differentiation. Blood 1992; 80:2594–2599.
Oren H, Ozkal S, Gulen H, et al: Autoimmune lymphoproliferative syndrome: Report of two cases and review of the literature. Ann Hematol 2002; 81:651–653.
Orrenius S: Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Toxicol Lett 2004; 149:19–23.
Pahl HL: Diagnostic approaches to polycythemia vera in 2004. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:495–502.
Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, et al: Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. Blood 1998; 91:2240–2248.
Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S: Selectins: Critical mediators of leukocyte recruitment. Semin Immunol 2002; 14:73–81.
Patte C, Auperin A, Michon J, et al: The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: Highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. Blood 2001; 97:3370–3379.
Paul JR, Bunnell WW: The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. Am J Med Sci 1932; 183:90.
Pawade J, Wilkins BS, Wright DH: Low-grade B-cell lymphomas of the splenic marginal zone: A clinicopathological and immunohistochemical study of 14 cases. Histopathology 1995; 27:129–137.
Perkins SL: Appendix A. Normal blood and bone marrow values in humans. Table A. Leukocyte count and differential count reference values in children. *In* Greer JP, Foerster J, Lukens JN, et al: (eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, p. 2702.
Peterson L, Hrisinko MA: Benign lymphocytosis and reactive neutrophilia. Laboratory features provide diagnostic clues. Clin Lab Med, 1993; 13:863–877.
Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW: Structural biology of the bcl-2 family of proteins. Biochim Biophys Acta 2004; 1644:83–94.
Pichardo DA, Querfeld C, Guitart J, et al: Cutaneous T-cell lymphoma: A paradigm for biological therapies. Leuk Lymphoma 2004; 45:1755–1765.
Pierre R, Imbert M, Thiele J, et al: Polycythaemia vera. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 32–34.
Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al: NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. Nature 2004; 431:461–466.
Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, et al: Hodgkin's lymphoma: The pathologist's viewpoint. J Clin Pathol 2002; 55:162–176.
Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:7415–7419.
Ponzoni M, Arrigoni G, Gould VE, et al: Lack of CD 29 (beta1 integrin) and CD 54 (ICAM-1) adhesion mole-

cules in intravascular lymphomatosis. Hum Pathol 2000; 31:220–226.

Pui CH, Relling MV, Downing JR: Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2004; 350:1535–1548.

Esse artigo descreve alterações moleculares genéticas, fatores prognósticos, epidemiologia molecular e farmacogenética de leucomia linfoblástica aguda adulta e pediátrica.

Pullarkat V, Bass RD, Gong JZ, et al: Primary autoimmune myelofibrosis: Definition of a distinct clinicopathologic syndrome. Am J Hematol 2003; 72:8–12.

Purtilo DT: Immunopathology of the X-linked lymphoproliferative syndrome. Haematol Blood Transfus 1981; 26:207–214.

Purtilo DT, Paquin L, DeFlorio D, et al: Immunodiagnosis and immunopathogenesis of the X-linked recessive lymphoproliferative syndrome. Semin Hematol 1979; 16:309–343.

Raghavachar A, Bartram CR, Ganser A, et al: Acute undifferentiated leukemia: Implications for cellular origin and clonality suggested by analysis of surface markers and immunoglobulin gene rearrangement. Blood 1986; 68:658–662.

Rai KR, Chanana AD, Cronkite EP, et al: Studies on lymphocytes 18. Mechanism of lymphocytosis induced by supernatant fluids of *Bordetella pertussis* cultures. Blood 1971; 38:49–59.

Ralfkiaer E, Jaffe ES: Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 216–220.

Ralfkiaer E, Delsol G, Willemze R, et al: Primary cutaneous CD30-positive T-cell lymphoproliferative disorders. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 221–224.

Ralfkiaer E, Muller-Hermelink HK, Jaffe ES: Peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, pp 227–229.

Ramirez MJ, Titos E, Claria J, et al: Increased apoptosis dependent on caspase-3 activity in polymorphonuclear leukocytes from patients with cirrhosis and ascites. J Hepatol 2004; 41:44–48.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE: Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death Differ 2004; 11:372–380.

Raphael M, Borisch B, Jaffe ES: Lymphomas associated with infection by the human immune deficiency virus (HIV). *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 260–263.

Reilly JT: Pathogenesis and management of idiopathic myelofibrosis. Baillières Clin Haematol 1998; 11:751–767.

Reilly WA: The granules in the leukocytes in gargoylism. Am J Dis Child 1941; 62:482.

Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, et al. Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:1588–1592.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG: Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004; 42:941–945.

Rizzi R, Pastore D, Liso A, et al: Autoimmune myelofibrosis: Report of three cases and review of the literature. Leuk Lymphoma 2004; 45:561–566.

Rogers R, Windust A, Gregory J: Evaluation of a novel dry latex preparation for demonstration of infectious mononucleosis heterophile antibody in comparison with three established tests. J Clin Microbiol 1999; 37:95–98.

Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, et al: CXC chemokines: The regulatory link between inflammation and angiogenesis. Trends Immunol 2004; 25:201–209.

Roos D, Law SKA: Hematologically important mutations: Leukocyte adhesion deficiency. Blood Cells Mol Dis 2001; 27:1000–1004.

Rosenberg HF, Gallin JI: Neutrophil-specific granule deficiency includes eosinophils. Blood 1993; 82:268–273.

Rosenthal S, Canellos GP, DeVita VT Jr, et al: Characteristics of blast crisis in chronic granulocytic leukemia. Blood 1977; 49:705–714.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002; 346:1937–1947.

Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al: Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. J Exp Med 2003; 198:851–862.

Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000; 18:217–242.

Rot A, von Andrian UH: Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol 2004; 22:891–928.

Esse artigo recente apresenta uma visão geral da comunicação e dos mecanismos de sinalização das quimiocinas na imunidade.

Roufosse F, Cogan E, Goldman M: The hypereosinophilic syndrome revisited. Annu Rev Med 2003; 54:169–184.

Roussel M, Roue G, Sola B, et al: Dysfunction of the Fas apoptotic signaling pathway in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. Haematologica 2003; 88:239–240.

Ruka W, Rutkowski P, Kaminska J, et al: Alterations of routine blood tests in adult patients with soft tissue sarcomas: Relationships to cytokine serum levels and prognostic significance. Ann Oncol 2001; 12:1423–1432.

Ruoslahti E, Rajotte D: An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. Annu Rev Immunol 2000; 18:813–827.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, et al: Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene 2004; 23:2861–2874.

Sainati L, Matutes E, Mulligan S, et al: A variant form of hairy cell leukemia resistant to alpha-interferon: Clinical and phenotypic characteristics of 17 patients. Blood 1990; 76:157–162.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A: The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. Annu Rev Immunol 2000; 18:593–620.

Sansonno D, De Vita S, Cornacchiulo V, et al: Detection and distribution of hepatitis C virus-related proteins in lymph nodes of patients with type II mixed cryoglobulinemia and neoplastic or non-neoplastic lymphoproliferation. Blood 1996; 88:4638–4645.

Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM: Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. Br J Haematol 1997; 96:111–116.

Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al: The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. Blood 2003; 102:3871–3879.

Schinzel A, Kaufmann T, Borner C: Bcl-2 family members: Integrators of survival and death signals in physiology and pathology. Biochim Biophys Acta 2004; 1644:95–105.

Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, et al: Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. J Clin Oncol 2004; 22:1682–1688.

Schop RF, Fonseca R: Genetics and cytogenetics of Waldenstrom's macroglobulinemia. Semin Oncol 2003; 30:142–145.

Schulte C, Krebs B, Jelinek T, et al: Diagnostic significance of blood eosinophilia in returning travelers. Clin Infect Dis 2002; 34:407–411.

Schultz DR, Harrington WJ Jr: Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. Semin Arthritis Rheum 2003; 32:345–369.

Esse artigo revisa os mecanismos e as proteínas regulatórias e efetoras das vias extrínsecas e intrínsecas, além de incluir um glossário de termos no apêndice.

Seri M, Cusano R, Gangarossa S, et al: Mutations in MYH9 result in the May–Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May–Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. Nat Genet 2000; 26:103–105.

Seri M, Pecci A, Di Bari F, et al: MYH9-related disease: May–Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. Medicine (Baltimore) 2003; 82:203–215.

Sezer O, Heider U, Zavrski I, et al: RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. Blood 2003; 101:2094–2098.

Shadrach B, Warshawsky I: A comparison of multiplex and monoplex T-cell receptor gamma PCR. Diagn Mol Pathol 2004; 13:127–134.

Shapiro M, Wasik MA, Junkins-Hopkins JM, et al: Complete remission in advanced blastic NK-cell lymphoma/leukemia in elderly patients using the hyper-CVAD regimen. Am J Hematol 2003; 74:46–51.

Shephard RJ: Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. Sports Med 2003; 33:261–284.

Shtalrid M, Shvidel L, Vorst E: Polyclonal reactive peripheral blood plasmacytosis mimicking plasma cell leukemia in a patient with staphylococcal sepsis. Leuk Lymphoma 2003; 44:379–380.

Shurin SB: Pathologic states associated with activation of eosinophils and with eosinophilia. Hematol Oncol Clin North Am 1988; 2:171–179.

Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R, et al: An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: Developed for the American Society of Hematology. Blood 1999; 94:1517–1536.

Silverstein MN, Tefferi A: Treatment of essential thrombocythemia with anagrelide. Semin Hematol 1999; 36:23–25.

Simon HU, Plotz SG, Dummer R, et al: Abnormal clones of T cells producing interleukin-5 in idiopathic eosinophilia. N Engl J Med 1999; 341:1112–1120.

Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, et al: Epstein–Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N Engl J Med 1984; 310:1225–1230.

Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, et al: Bcl-6 and bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: Correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. Hum Pathol 1999; 30:803–808.

So CC, Wong KF: May–Hegglin anomaly. Br J Haematol 2003; 120:373.

Sobol RE, Bloomfield CD, Royston I: Immunophenotyping in the diagnosis and classification of acute lymphoblastic leukemia. Clin Lab Med 1988; 8:151–162.

Sobol RE, Mick R, Royston I, et al: Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1987; 316:1111–1117.

Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al: Follicular lymphoma international prognostic index. Blood 2004; 104:1258–1265.

Spangrude GJ, Sacchi F, Hill HR, et al: Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. J Immunol 1985; 135:4135–4143.

Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, et al: Updated Kiel classification for lymphomas. Lancet 1988; 1:292–293.

Starckx S, Van den Steen PE, Wuyts A, et al: Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. Leuk Lymphoma 2002; 43:233–241.

Starkebaum G: Chronic neutropenia associated with autoimmune disease. Semin Hematol 2002; 39:121–127.

Starr-Spires LD, Collman RG: HIV-1 entry and entry inhibitors as therapeutic agents. Clin Lab Med 2002; 22:681–701.

Stass SA, Mirro J, Jr: Lineage heterogeneity in acute leukaemia: Acute mixed-lineage leukaemia and lineage switch. Clin Haematol 1986; 15:811–827.

Stein H, Hummel M: Cellular origin and clonality of classic Hodgkin's lymphoma: Immunophenotypic and molecular studies. Semin Hematol 1999; 36:233–241.

Stein H, Delsol G, Pileri S, et al: Classical Hodgkin lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 244–253.

Stein H, Delsol G, Pileri S, et al: Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 240–243.

Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al: The expression of the Hodgkin's disease associated antigen ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: Evidence that Reed–Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. Blood 1985; 66:848–858.

Suwa T, Hogg JC, English D, et al: Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279:H2954–60.

Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. Jpn J Infect Dis 2004; 57:S1–2.

Suzuki R, Kagami Y, Takeuchi K, et al: Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. Blood 2000; 96:2993–3000.

Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PG, et al: Mantle cell lymphoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001, pp 168–170.

Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A: Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: The story so far. Ann N Y Acad Sci 2003; 1010:186–194.

Taguchi A, Miyazaki M, Sakuragi S, et al: Gamma/delta T cell lymphoma. Intern Med 2004; 43:120–125.

Tancrede-Bohin E, Ionescu MA, de La Salmoniere P, et al: Prognostic value of blood eosinophilia in primary cutaneous T-cell lymphomas. Arch Dermatol 2004; 140:1057–1061.

Taylor GH: Cytomegalovirus. Am Fam Physician 2003; 67:519–524.

Tefferi A: The forgotten myeloproliferative disorder: Myeloid metaplasia. Oncologist 2003; 8:225–231.

Thalhammer-Scherrer R, Mitterbauer G, Simonitsch I, et al: The immunophenotype of 325 adult acute leukemias. Am J Clin Pathol 2002; 117:380–389.

Thiele J, Imbert M, Pierre R, et al: Chronic myeloproliferative disease, unclassifiable. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 42–44.

Thiele J, Pierre R, Imbert M, et al: Chronic idiopathic myelofibrosis. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 35–38.

Thompson MP, Kurzrock R: Epstein–Barr virus and cancer. Clin Cancer Res 2004; 10:803–821.

Thorley-Lawson DA, Gross A: Persistence of the Epstein–Barr virus and the origins of associated lymphomas. N Engl J Med 2004; 350:1328–1337.

Tischkowitz M, Dokal I: Fanconi anaemia and leukaemia – clinical and molecular aspects. Br J Haematol 2004; 126:176–191.

Toren A, Rozenfeld-Granot G, Heath KE, et al: MYH9 spectrum of autosomal-dominant giant platelet syndromes: Unexpected association with fibulin-1 variant-D inactivation. Am J Hematol 2003; 74:254–262.

Tsaparas YF, Brigden ML, Mathias R, et al: Proportion positive for Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6, toxoplasma, and human immunodeficiency virus types 1 and 2 in heterophile-negative patients with an absolute lymphocytosis or an instrument-generated atypical lymphocyte flag. Arch Pathol Lab Med 2000; 124:1324–1330.

Valent P, Horny HP, Escribano L, et al: Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: A consensus proposal. Leuk Res 2001a; 25:603–625.

Valent P, Horny HP, Li CY, et al: Mastocytosis. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 293–302.

van Eeden SF, Terashima T: Interleukin 8 (IL-8) and the release of leukocytes from the bone marrow. Leuk Lymphoma 2000; 37:259–271.

Vardiman JW: Myelodysplastic/myeloproliferative diseases: Introduction. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 47–48.

Vardiman JW, Brunning RD, Harris NL: Chronic myeloproliferative diseases. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 15–17.

Vardiman JW, Imbert M, Pierre R, et al: Atypical chronic myeloid leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, pp 53–54.

Vardiman JW, Pierre R, Bain B, et al: Chronic myelomonocytic leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001d, pp 49–52.

Vardiman JW, Pierre R, Imbert M, et al: Juvenile myelomonocytic leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001e, pp 55–57.

Vardiman JW, Pierre R, Thiele J, et al: Chronic myelogenous leukaemia. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001f, pp 20–26.

Varindani MK, Pitchumoni CS, Lucariello RJ: Eosinophilic leukemoid reaction in pulmonary carcinoma. N Y State J Med 1982; 82:347–348.

Vignais PV: The superoxide-generating NADPH oxidase: Structural aspects and activation mechanism. Cell Mol Life Sci 2002; 59:1428–1459.

Viswanatha DS, Foucar K, Berry BR, et al: Blastic mantle cell leukemia: An unusual presentation of blastic mantle cell lymphoma. Mod Pathol 2000; 13:825–833.

von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, et al: Nodular sclerosing Hodgkin disease: New grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. Blood 2003; 101:4063–4069.

Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J: Chediak–Higashi syndrome: A clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. Curr Mol Med 2002; 2:469–477.

Weick JK, Hagedorn AB, Linman JW: Leukoerythroblastosis. Diagnostic and prognostic significance. Mayo Clin Proc 1974; 49:110–113.

Weiss LM, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, et al: Histiocytic sarcoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001a, pp 278–279.

Weiss LM, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, et al: Langerhans cell histiocytosis. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001b, pp 280–282.

Weiss LM, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, et al: Interdigitating dendritic cell sarcoma/tumour. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001c, pp 284–285.

Weiss LM, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, et al: Follicular dendritic cell sarcoma/tumour. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001d, pp 286–288.

Weiss LM, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, et al: Dendritic cell sarcoma, not otherwise specified. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001e, p 289.

Weiss LM, Grogan TM, Pileri SA, et al: Langerhans cell sarcoma. *In* Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al: (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001f, p 283.

Weksler ME, Hutteroth TH: Impaired lymphocyte function in aged humans. J Clin Invest 1974; 53:99–104.

Weng WK, Levy S: Hepatitis C virus (HCV) and lymphomagenesis. Leuk Lymphoma 2003; 44:1113–1120.

Wilson WH, Kingma DW, Raffeld M, et al: Association of lymphomatoid granulomatosis with Epstein–Barr viral infection of B lymphocytes and response to interferon-alpha 2b. Blood 1996; 87:4531–4537.

Wong M, Pagano JS, Schiller JT, et al: New associations of human papillomavirus, Simian virus 40, and Epstein–Barr virus with human cancer. J Natl Cancer Inst 2002; 94:1832–1836.

Woodruff RK, Malpas JS, Paxton AM, et al: Plasma cell leukemia (PCL): A report on 15 patients. Blood 1978; 52:839–845.

Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, et al: Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. Clin Infect Dis 2003; 37:1603–1606.

Wu ML, Kwaan HC, Goolsby CL: Atypical hairy cell leukemia. Arch Pathol Lab Med 2000; 124:1710–1713.

Yam LT, Li CY, Lam KW: Tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme in the reticulum cells of leukemic reticuloendotheliosis. N Engl J Med 1971; 284:357–360.

Yamaguchi K, Watanabe T: Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. Int J Hematol 2002; 76:240–245.

Yamaguchi M, Machii T, Shibayama H, et al: Immunophenotypic features and configuration of immunoglobulin genes in hairy cell leukemia – Japanese variant. Leukemia 1996; 10:1390–1394.

Yano T, van Krieken JH, Magrath IT, et al: Histogenetic correlations between subcategories of small noncleaved cell lymphomas. Blood 1992; 79:1282–1290.

Yasutomo K, Doyle C, Miele L, et al: The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. Nature 2000; 404:506–510.

Zeidler C, Welte K: Kostmann syndrome and severe congenital neutropenia. Semin Hematol 2002; 39:82–88.

Zinzani PL, Stefoni V, Tani M, et al: MACOP-B regimen followed by involved-field radiation therapy in early-stage aggressive non-Hodgkin's lymphoma patients: 14-year update results. Leuk Lymphoma 2001; 42:989–995.

Zipursky A, Poon A, Doyle J: Leukemia in Down syndrome: A review. Pediatr Hematol Oncol 1992; 9:139–149.

CAPÍTULO 33

Avaliação de neoplasias hematopoéticas por citometria de fluxo

Brent L. Wood MD PhD, Michael J. Borowitz MD PhD

Introdução 698

Considerações técnicas 698
- Equipamento 698
- Reagentes 699
- Planejamento do painel 700
- Manuseio e preparo da amostra 702
- Aquisição de dados 702

Considerações interpretativas 702
- Padrões normais de expressão antigênica 703
- Padrões anormais de expressão antigênica na neoplasia hematopoética 703

Resumo 714

Referências bibliográficas 715

PONTOS-CHAVE

- A citometria de fluxo é uma técnica eficiente, rápida e custo-efetiva para identificação e monitoramento de neoplasmas hematopoéticos.
- A implementação bem-sucedida da citometria de fluxo requer atenção cuidadosa aos detalhes que envolvem o desempenho do equipamento e dos reagentes.
- As células hematopoéticas normais são caracterizadas pelo ganho e perda reproduzíveis da expressão de antígenos com a maturação.
- Neoplasias hematopoéticas apresentam um desvio dos padrões normais de expressão antigênica, que permite seu diagnóstico e classificação.
- A detecção por citometria de fluxo de doenças residuais após a terapia possibilita o monitoramento da resposta terapêutica.

Introdução

O diagnóstico, a classificação e o monitoramento pós-terapêutico de neoplasias hematopoéticas foram significativamente beneficiados pela abrangente aplicação dos estudos de imunofenotipagem no decorrer das últimas duas décadas. A subdivisão das neoplasias hematopoéticas de acordo com o grau de correspondência às linhagens e estágios de diferenciação hematopoéticos normais constitui um dos princípios básicos dos sistemas atuais de classificação, entre os quais o da classificação da OMS (Jaffe, 2001). Essa informação é amplamente fornecida pela imunofenotipagem e resulta na incorporação de muitos dados imunofenotípicos à definição de diversos neoplasmas hematopoéticos, a ponto de certos diagnósticos serem apenas confidencialmente possíveis por meio de estudos de imunofenotipagem.

A citometria de fluxo é uma técnica rápida e conveniente para a geração de dados imunofenotípicos. A capacidade de realizar análises multiparamétricas no nível celular individual é uma característica ímpar dessa técnica, que oferece muitas vantagens em relação aos métodos de imunofenotipagem concorrentes, entre os quais está a imunocitoquímica. Foram publicadas diretrizes para o uso da citometria de fluxo na imunofenotipagem de células leucêmicas em laboratório clínico (NCCLS, 1998). Em 1995, sob patrocínio do NIH, foi convocada uma conferência de consenso sobre a análise de leucemia e linfoma por citometria de fluxo, em uma tentativa de padronizar a prática clínica (US-Canadian Consensus, 1997). Apesar desses esforços, ainda há uma considerável heterogeneidade no que se refere à aplicação clínica dessa técnica para avaliação de casos de leucemia e linfoma. Essa falta de padronização representa um desafio importante à capacidade de fornecer resultados de alta qualidade de forma consistente.

Atualmente, as indicações médicas para realização de citometria de fluxo no cenário clínico são agrupadas em quatro áreas principais:

1. Diagnóstico e classificação de neoplasias hematopoéticas. A capacidade de identificar com acurácia subpopulações anormais, linhagens e estágios de maturação celular soma-se a uma melhor reprodutibilidade do diagnóstico de neoplasmas hematopoéticos, particularmente quando se trata de distúrbios linfoproliferativos crônicos e leucemias agudas. A citometria de fluxo é amplamente utilizada para essa finalidade.
2. Avaliação de parâmetros biológicos associados ao prognóstico. A expressão de moléculas específicas no momento do diagnóstico tem sido associada ao resultado clínico a longo prazo e pode ser facilmente avaliada por citometria de fluxo. Um exemplo é a expressão de CD38 ou Zap-70 na leucemia linfocítica crônica, em que a expressão aumentada de qualquer uma dessas moléculas foi associada a uma sobrevida precária a longo prazo (Damle, 1999; Crespo, 2003).
3. Detecção de antígenos utilizados como alvos terapêuticos. Atualmente, há uma variedade de reagentes imunológicos disponíveis para uso terapêutico, dirigidos especificamente a antígenos-alvo expressos por neoplasias hematopoéticas (p. ex., CD20, CD52, CD33 etc.). A confirmação da expressão do antígeno de interesse no tumor é um pré-requisito necessário ao uso dessas terapias de alto custo.
4. Detecção de células neoplásicas residuais após a terapia. A capacidade da citometria de fluxo de identificar e quantificar rotineiramente a presença de células hematopoéticas anormais com uma sensibilidade de 0,01% tem sido cada vez mais utilizada como medida substituta da resposta à terapia e de recorrências iminentes (Campana, 2003).

Considerações técnicas

Equipamento

O princípio básico da citometria de fluxo consiste na injeção de uma suspensão de partículas (células) monodispersas no centro de uma corrente de fluxo de um líquido (bainha) que, então, atravessa um pequeno tubo capilar de quartzo a uma velocidade constante (Shapiro, 2003). A bainha de líquido serve para manter as partículas no centro da corrente de fluxo, onde podem ser iluminadas por uma ou mais fontes de focos de luz, tipicamente *lasers*. A luz dispersa pelas partículas é coletada por detectores posicionados a diversos ângulos em torno do capilar, para fornecer informação referente à área de seção transversal e, assim, ao tamanho (dispersor frontal ou de baixo ângulo) ou complexidade/granularidade (dispersor lateral ou de ângulo elevado) de cada partícula individual que transita pelo capilar. Além disso, se moléculas fluorescentes ou fluorocromos forem fixados às partículas, podem ser excitados pela luz incidente e dar origem a uma emissão fluorescente que, por sua vez, pode ser coletada com o auxílio de detectores e filtros ópticos adicionais (Fig. 33.1). O resultado líquido é uma análise multiparamétrica de cada partícula individual, em que

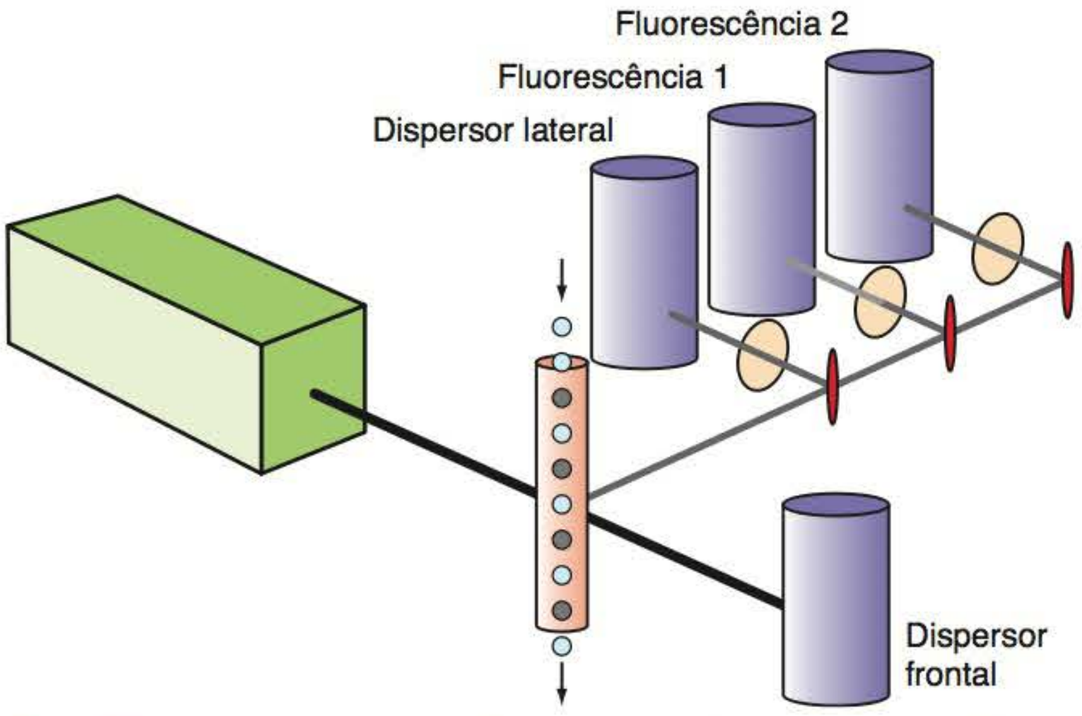


Figura 33.1 Esquema representativo de um citômetro de fluxo. Uma corrente de fluxo de partículas (centro) é iluminada por um *laser* (esquerda), e a resultante dispersão de luz de baixo ângulo (dispersor frontal) ou de ângulo direito (dispersor lateral) é coletada por detectores adequadamente posicionados. Além disso, moléculas fluorescentes acopladas às partículas podem ser excitadas pela luz do *laser*, enquanto a emissão resultante é direcionada por uma série de espelhos e filtros ópticos até os detectores apropriados (fluorescência 1 e fluorescência 2).

o número de parâmetros avaliados depende do número de moléculas fluorescentes utilizadas e do grau de complexidade do equipamento.

A otimização e padronização do desempenho do equipamento são críticas para o sucesso de qualquer estudo que envolve citometria de fluxo. No entanto, é particularmente importante na análise de neoplasias hematopoéticas, por causa da ampla faixa de intensidade de sinais que pode ser detectada. A abordagem preferida consiste em definir um conjunto de condições instrumentais que proporcione o desempenho ideal do equipamento, bem como submetê-lo a um controle de qualidade diário para que esse nível de desempenho seja alcançado de forma consistente. A aderência a um nível consistente e fixo de desempenho do equipamento simplifica bastante o controle de qualidade e gera dados reproduzíveis para interpretação subsequente. A avaliação diária da intensidade da fluorescência e do coeficiente de variação (CV), que utiliza partículas com fluorescência estável e moderadamente brilhante, bem como a avaliação do ruído produzido pelo equipamento, utilizando partículas não fluorescentes, constituem a base do controle de qualidade do equipamento.

Existem relativamente poucas variáveis instrumentais com as quais o operador controla o citômetro de fluxo. As principais variáveis são: limiar de detecção, ganho do detector, velocidade de fluxo da amostra e, para alguns equipamentos dotados de múltiplos *lasers*, tempo de retardo. O limiar de detecção ou discriminação está associado a um único parâmetro e constitui o valor a ser alcançado para que o sistema perceba a passagem de uma partícula pelo capilar e inicie o processamento do sinal. Tipicamente, utiliza-se um dispersor frontal para identificar partículas cujo tamanho ultrapassa um determinado valor desejado (p. ex., células de tamanho igual ou maior do que o tamanho de linfócitos). De especial importância é o ganho ou a voltagem fornecida a cada detector, que comumente é um tubo fotomultiplicador, pois este exerce impacto direto na capacidade de separar os sinais de interesse dos ruídos de fundo produzidos pelo equipamento (proporção sinal-ruído). A voltagem aplicada a cada detector deve ser ajustada de modo que otimize a proporção sinal-ruído e permita a detecção dos sinais mais fracos requeridos por cada detector. Isso, com frequência, resulta em populações celulares negativas, que são posicionadas de de forma que ocupem completamente a década mais inferior da escala logarítmica. Por fim, no caso de equipamentos com múltiplos *lasers* que cruzam a corrente capilar em diferentes pontos (em especial quando os *lasers* estão separados), é necessário fornecer um parâmetro para possibilitar uma sincronização do processamento de sinal que explique os diferentes momentos em que uma única partícula encontra cada *laser* conforme transita pelo capilar. Esse tempo de retardo do *laser* deve ser ajustado para maximizar a intensidade do sinal de cada *laser*. É preciso notar que o tempo de retardo do *laser* é muito dependente do tempo de trânsito da partícula pelo capilar e, assim, requer um sistema fluído estável que permaneça constante – um problema histórico no caso de certos equipamentos.

A velocidade com a qual a amostra é introduzida ou aspirada pelo sistema pode ser controlada pelo operador, embora seja limitada por dois fatores: a velocidade com a qual o componente eletrônico do equipamento consegue processar os sinais gerados; e a concentração da amostra. Se as partículas atravessarem o equipamento em uma velocidade mais rápida do que a velocidade de seu processamento pelo componente eletrônico, os dados referentes a um determinado subgrupo de partículas serão perdidos, enquanto outro subgrupo apresentará artefatos inusitados e indesejáveis que, tipicamente, correspondem a uma perda variável da intensidade do sinal ao longo de uma ampla faixa. É criticamente importante selecionar uma velocidade de aspiração e concentração da amostra que sejam adequadas ao equipamento em uso. Outro fenômeno que também está relacionado à concentração da amostra é o chamado coincidência. Trata-se da presença simultânea de mais de uma partícula no *laser*, que resulta no registro de um único evento que apresenta as características combinadas das partículas envolvidas. A coincidência pode representar um problema significativo para a detecção de eventos raros e pode ser minimizada pela introdução de métodos de discriminação dupla durante a análise – técnicas estas que fogem ao escopo desse capítulo.

Reagentes

A identificação das características celulares, além daquelas fornecidas pelas medidas de dispersão da luz, comumente envolve o uso de fluorocromos. As moléculas de fluorocromo podem interagir diretamente com estruturas celulares (p. ex., DNA) ou interagir de forma indireta por meio da conjugação a anticorpos. Cada fluorocromo possui um único espectro de excitação e emissão que determina parcialmente as características de desempenho do reagente e dita qual fluorocromo deve ser utilizado de forma simultânea (Fig. 33.2). Em um esforço para aumentar o número de fluorocromos que podem ser utilizados ao mesmo tempo a partir de uma única fonte de excitação, foram inventados fluorocromos em tandem. Um exemplo é o PE-Cy5, baseado na excitação de um fluorocromo primário (PE) que transfere sua energia a um fluorocromo secundário (Cy5), fornecendo a emissão do fluorocromo predominante a um comprimento de onda maior. Os fluorocromos em tandem são necessários à citometria de fluxo multicor de alto nível, contudo apresentam um espectro de emissão mais complexo e menor estabilidade sob certas circunstâncias. Outra característica importante do fluorocromo – a intensidade da emissão – está associada à relativa eficiência da excitação pelas fontes de luz utilizadas e à eficiência da quantidade do próprio fluorocromo (Fig. 33.3). As diferenças na intensidade de emissão estão diretamente correlacionadas às diferenças de sensibilidade de detecção e, conforme será discutido adiante, constituem uma consideração fundamental no planejamento dos painéis de reagente.

A análise de leucemia e linfoma requer o uso de múltiplos fluorocromos ao mesmo tempo (i. e., citometria de fluxo multicolorida), sendo 3 fluorocromos o número mínimo recomendado pelas diretrizes de consenso atualmente vigentes (US-Canadian Consensus, 1997). Uma vez que a maioria dos fluorocromos apresenta sobreposição de espectro de emissão, a determinação da fluorescência devida a um fluorocromo específico em um único detector requer subtração da parte correspondente à contribuição de sinais de cada um dos demais fluorocromos da amostra. Esse processo é denominado compensação. A quantidade apropriada de cada sinal a ser subtraído (i. e., o coeficiente de compensação) pode ser representada por *n* pela matriz *n*, em que *n* é o número de fluorocromos. Em consequência, à medida que aumenta o número de fluorocromos utilizados, o número de coeficientes de compensação a ser determinado aumenta geometricamente e logo surge a necessidade de utilizar um *software* para processar essa informação de forma correta. Para determinar coeficientes de compensação, é avaliada uma série de amostras marcadas uma a uma com cada fluorocromo, e a população positiva é tão brilhante quanto o sinal mais luminoso que se espera encontrar. Ao considerar que as características espectrais dos fluorocromos em tandem podem variar significativamente entre lotes e fabricantes distintos, muitas vezes é

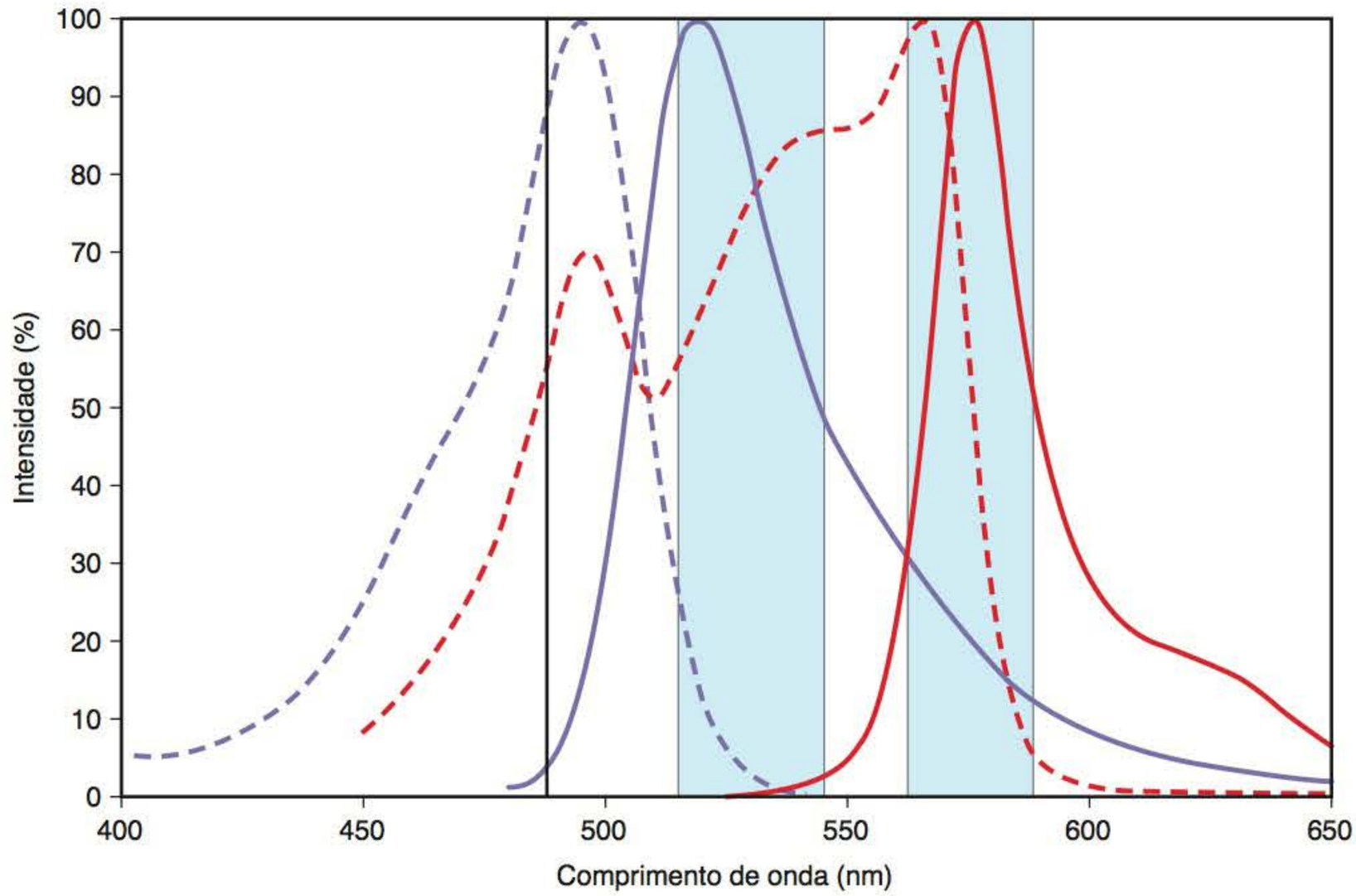


Figura 33.2 Espectro de emissão de fluorocromos. Cada molécula fluorescente possui um espectro de absorção (linha pontilhada) e outro de emissão (linha sólida) característicos. Os comprimentos de onda máximos desses espectros estão espectralmente separados, sendo o grau de separação denominado deslocamento de Stokes. Embora uma pequena quantidade de emissão de fluoresceína ocorra no mesmo comprimento de onda da ficoeritrina, a emissão fluorescente da fluoresceína (azul) pode ser separada da emissão da ficoeritrina (vermelha) com o uso de filtros ópticos adequados (áreas sombreadas). O *laser* de 488 nm comumente utilizado para excitar cada um desses fluorocromos é indicado pela linha azul.

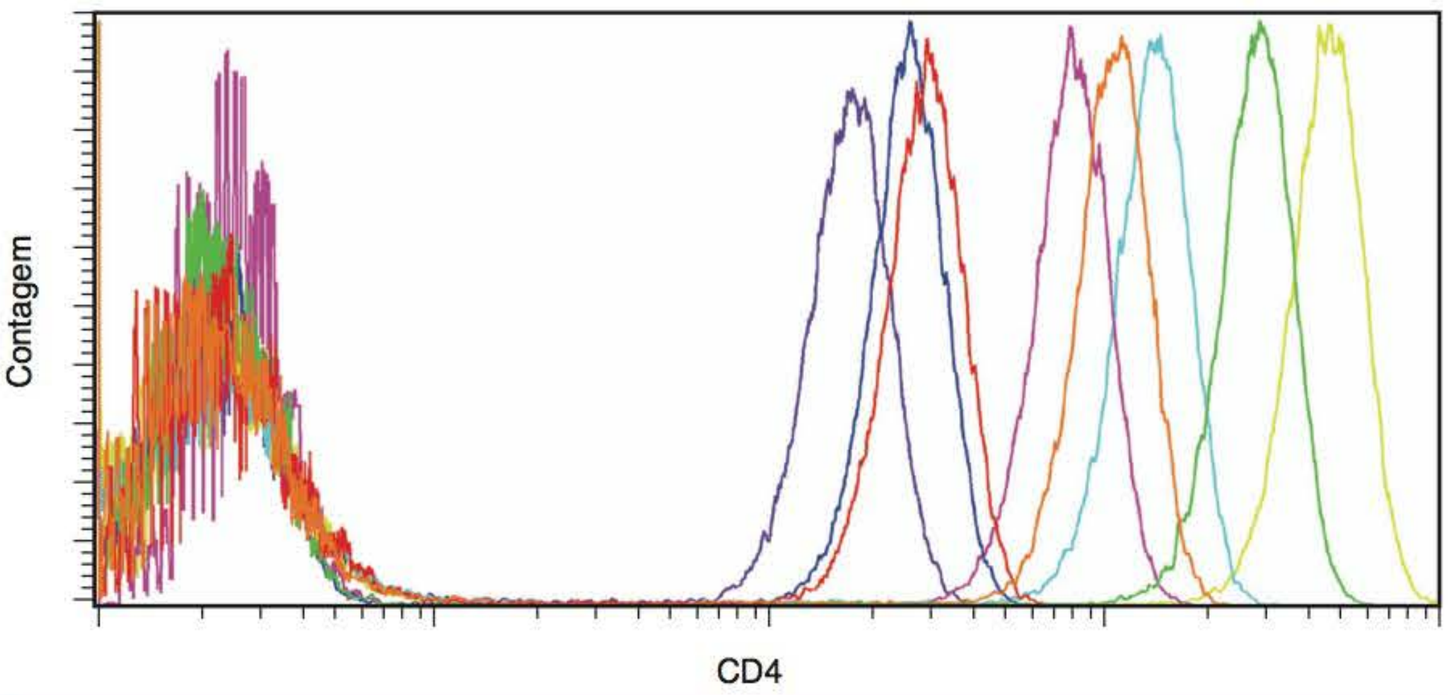


Figura 33.3 Comparação da intensidade da emissão de fluorocromos. Os fluorocromos são caracterizados por diferenças de intensidade relativa da emissão. É importante que essas diferenças sejam consideradas para obtenção de um grau de sensibilidade ideal. A intensidade da fluorescência relativa para a expressão de CD4 em linfócitos é representada para a fluoresceína (FITC) (azul), ficoeritrina (PE) (verde), PE-vermelho do Texas (alaranjado), PE-Cy5 (amarelo), PerCP-Cy5,5 (vermelho), PE-Cy7 (azul-claro), aloficocianina (APC) (vermelho-carmim) e APC-Cy7 (púrpura). As intensidades reais observadas dependem do clone de anticorpos utilizado, proporção fluorocromo-proteína no conjugado de anticorpo, método de preparo da amostra, características de desempenho do equipamento e método de configuração do equipamento.

necessário estabelecer controles de compensação separados para cada lote e conjugado desses reagentes. Os *softwares*, sejam no equipamento, sejam em computadores *offline*, são empregados para analisar os dados gerados e calcular os coeficientes de compensação.

Embora o processo de determinar e aplicar corretamente a compensação já seja simplificado pelos *softwares*, o uso de múltiplos fluorocromos pode resultar em um aparecimento significativo de artefatos que refletem a sensibilidade comprometida da detecção de baixo nível (Roederer, 2001). Isso é particularmente problemático quando se tenta detectar sinais de baixo nível na presença de emissões de fluorocromos muito luminosas com sobreposição. Compreender o impacto dos efeitos relacionados à compensação constitui o único aspecto mais difícil da citometria de fluxo multicolorida, e também o menos compreendido pela maioria dos usuários. As implicações da emissão sobreposta dos fluorocromos geram consequências diretas tanto para o planejamento do painel quanto para a interpretação dos resultados (Fig. 33.4). Quando os parâmetros de compensação são incompatíveis com os reagentes utilizados, surgem artefatos que podem levar tanto à falsa atribuição de uma positividade de baixo nível quanto à incapacidade de reconhecer a presença de subpopulações (Fig. 33.5). O uso de um *software* de compensação proporciona um método não destrutivo de coleta de dados e permite o ajuste dos parâmetros de compensação após a aquisição, fornecendo um meio de corrigir erros de compensação decorrentes de descuido.

Os anticorpos são parte integral da avaliação imunofenotípica da leucemia e do linfoma. É importante determinar a quantidade correta de cada anticorpo a ser utilizado por meio da avaliação de uma série de amostras marcadas com diferentes concentrações de anticorpos, ou seja, por meio de uma titulação (Stewart, 2000). A titulação visa a maximizar a proporção sinal-ruído ao fornecer o sinal mais luminoso possível em populações positivas e, ao mesmo, ao manter um baixo nível de ligação inespecífica de fundo. No caso de anticorpos altamente específicos utilizados na marcação de superfície celular, é preciso atingir a saturação – uma intensidade consistente em populações positivas com maiores concentrações de anticorpos – sem produzir aumentos significativos de fundo nas populações negativas. Se um anticorpo falhar em produzir esse efeito, significa que sua qualidade é ruim. Quando se trata de marcação intracelular, é típico não obter saturação por causa dos níveis relativamente altos de ligação inespecífica de anticorpos aos constituintes intracelulares, em geral segundo uma função linear da concentração de anticorpo. Desse modo, a otimização da proporção sinal-ruído por meio da titulação torna-se crítica para o desempenho adequado dos reagentes (Jacobberger, 2000).

Planejamento do painel

O emparelhamento de reagentes com fluorocromos adequados é um fator essencial para garantir que a intensidade do sinal e o grau de sensibilidade de detecção sejam apropriados. As quatro etapas descritas a seguir podem ajudar na construção de painéis de reagentes adequados.

1. Determinar o propósito de cada potencial combinação de reagentes. Cada combinação deve possuir um objetivo nitidamente definido, caso contrário deve ser descartada.

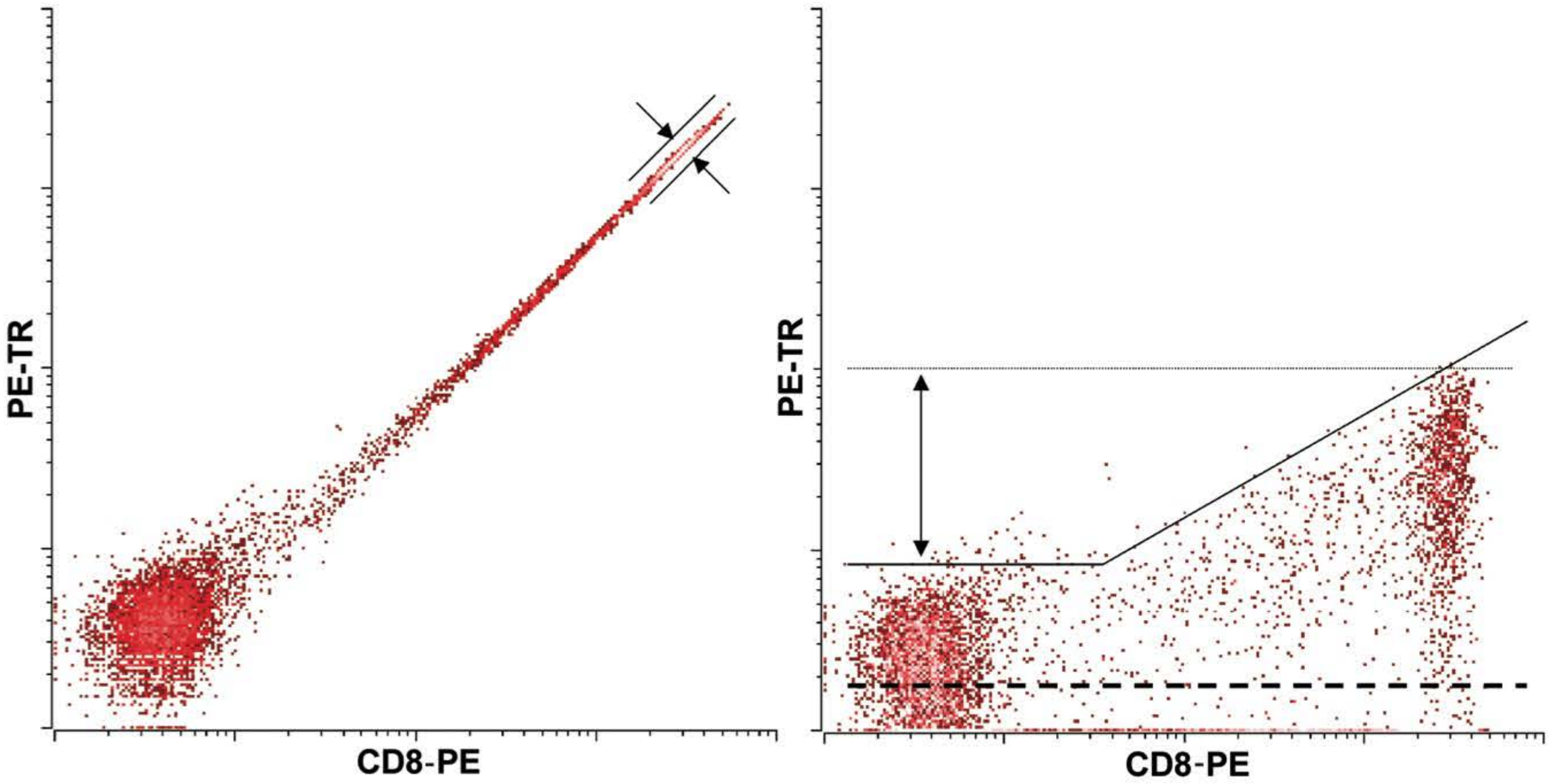


Figura 33.4 Compensação. A emissão de fluorescência de linfócitos marcados com CD8-PE aparece tanto no detector de PE quanto no detector de PE-vermelho do Texas. Isso ocorre porque a emissão da PE em ambas as regiões do espectro é examinada por esses detectores. Observe que nenhum anticorpo conjugado ao PE-vermelho do Texas foi utilizado nesse experimento. Sem a compensação aplicada (esquerda), as células com expressão abundante de CD8 apresentam sinais brilhantes tanto para PE quanto para PE-vermelho do Texas, com uma amplitude em relação à população (setas) devida aos erros de quantificação inerentes ao método. Uma vez que a compensação tenha sido corretamente aplicada (direita), os centros de populações positiva e negativa apresentam o mesmo nível baixo de emissão de PE-vermelho do Texas (linha pontilhada), com muitos eventos que caem sobre o eixo horizontal. Entretanto, a população PE-positiva mostra um grau muito maior de fluorescência de fundo aparente para PE-vermelho do Texas do que a população PE-negativa (linha sólida e seta). Se um anticorpo conjugado ao PE-vermelho do Texas tivesse sido utilizado, as células $CD8^+$ poderiam ter sido erroneamente interpretadas como duplo positivas, contudo essa aparente "positividade" seria resultado direto dos erros de quantificação e da exibição logarítmica dos dados. O resultado prático é que a sensibilidade para detecção de PE-vermelho do Texas de baixo nível fica comprometida em presença da fluorescência brilhante da PE.

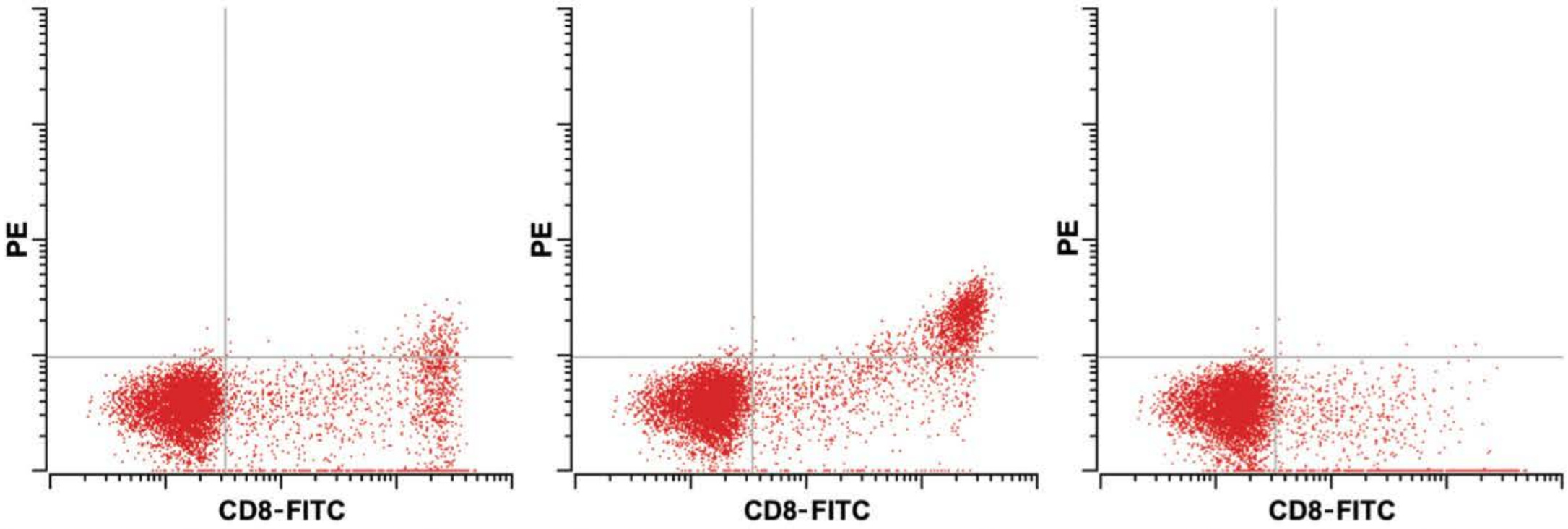


Figura 33.5 Compensação inadequada. A emissão de fluorescência de linfócitos levemente marcados com CD8-FITC mostra mínima fluorescência aparente de PE, em que 8% do sinal da FITC é subtraído do sinal da PE (i. e., na compensação correta) (esquerda). Se o grau de compensação for reduzido para 7,2% (centro), a população $CD8^+$ parece exibir uma baixa expressão de PE e pode ser erroneamente interpretada como aberração imunofenotípica, dependendo do anticorpo para PE incluído. Observe a falta de simetria e a extremidade pontuda apresentadas pela população positiva, evidenciando a compensação inadequada. Se a compensação for aumentada para 8,8%, a população positiva fica comprimida sobre o eixo X e parece nem mesmo existir.

2. Escolher um grupo de alvos celulares. O grupo escolhido de alvos ou antígenos deve atender ao propósito da combinação de reagentes com êxito. Deve, também, ser relativamente independente do fluorocromo ou da disponibilidade de conjugados comercializados. A combinação de reagentes deve corresponder ao mínimo necessário para responder à pergunta formulada. Há vários modos pelos quais os anticorpos são comumente combinados para o uso na identificação de populações hematopoéticas anormais. No entanto, esses meios em geral pertencem a uma das categorias destacadas na Tabela 33.1.

3. Atribuir um fluorocromo para cada alvo. Segundo o princípio básico, os antígenos altamente expressos devem ser acoplados a fluorocromos fracos, enquanto os antígenos fracamente expressos devem ser acoplados a fluorocromos luminosos. Esse princípio proporciona a obtenção de intensidades de sinal razoáveis e evita problemas de compensação decorrentes de uma fluorescência luminosa em excesso. A disponibilidade comercial muitas vezes limita a escolha dos fluorocromos, embora a maioria dos fabricantes ofereça serviços de conjugação personalizada que fornecem reagentes possivelmente mais adequados a uma finalidade

Tabela 33.1 Estratégias de planejamento do painel de reagentes para detecção de neoplasias hematopoéticas

Princípio	Exemplo de implementação
Ao menos um reagente para identificação da população	CD45 para tipos celulares em geral Antígeno associado à linhagem para linhagens celulares específicas (p. ex., CD19 para células B)
Múltiplos antígenos da mesma linhagem e estágio de maturação para identificar níveis de expressão inadequados	Uso simultâneo de CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 ou CD8 para avaliar células T maduras
Múltiplos antígenos da mesma linhagem, porém de estágios de maturação distintos, para identificar expressão dissincrônica e maturação normal	Uso simultâneo de CD13 e CD16 para demonstrar maturação neutrofílica
Separação de diferentes linhagens celulares	Uso simultâneo de CD11b e CD15 para separar a maturação monocítica da neutrofílica
Demonstração de clonalidade	Uso combinado de κ e λ com um reagente de linhagem de células B (p. ex., CD19)
Identificar expressão antigênica francamente aberrante	Uso associado de antígenos de células T ou NK, como CD7 ou CD56, combinados ao CD34

em particular do que os reagentes comercializados de uma forma mais geral.

4. Testar combinações de reagentes. A combinação de reagentes deve ser testada de forma empírica, a fim de garantir que as intensidades de sinal estejam de acordo com o esperado, a sensibilidade de baixo nível seja apropriada aos casos importantes e não ocorram interações inesperadas entre os reagentes. Uma amostra preparada com todos os reagentes de interesse deve ser comparada à mesma amostra elaborada com uma série de preparações em que cada uma delas não contenha um dos reagentes (controles de fluorescência-menos-um), bem como com uma segunda série de preparações que contenha cada reagente de forma independente (controles de coloração única). A ocorrência de alterações inesperadas na intensidade de um ou mais reagentes indica que a combinação de reagentes apresenta problemas potenciais.

Manuseio e preparo da amostra

Qualquer amostra a partir da qual uma suspensão de células individuais possa ser gerada é considerada apropriada para a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Exemplos desse tipo de amostra são as de sangue periférico, medula óssea, linfonodos etc. Amostras de sangue e medula óssea devem ser tratadas com anticoagulante EDTA, heparina ou ácido-citrato-dextrose (ACD). A heparina em geral é preferida, porque sua estabilidade melhora com o envelhecimento da amostra. Amostras de tecido são mais bem transportadas e armazenadas em meio de cultura de tecidos, como RPMI 1640. Nesse caso, a suspensão de células individuais é produzida pela dissociação mecânica do tecido com auxílio de bisturi e pinça, agulha e seringa, ou tela de malha metálica (Braylan, 1989), seguida de filtração em uma malha metálica delgada para remoção de agregados. Amostras de todos os tipos costumam ser armazenadas à temperatura ambiente antes do preparo da suspensão, ainda que a refrigeração retarde a degradação quando há necessidade de retardar a preparação.

A análise de leucócitos sanguíneos no sangue periférico ou na medula óssea requer a eliminação de eritrócitos para que a avaliação seja eficiente. A centrifugação em gradiente de densidade (p. ex., Ficoll-Hypaque) era utilizada historicamente com essa finalidade. Contudo, essa técnica resulta em perda seletiva de subpopulações celulares e fornece uma recuperação relativamente precária de amostras de medula óssea. A lise de eritrócitos com cloreto de amônio ou uma variedade de preparações comercializadas se transformou na técnica-padrão de preparo de amostras em laboratórios clínicos (Carter, 1992). Os métodos recomendados atualmente envolvem a adição de anticorpos a uma alíquota de sangue ou medula, seguida da lise de eritrócitos e lavagem com solução salina tamponada, como a salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*), para remoção de debris celulares, reagente de lise e anticorpos livres. A inclusão de uma pequena quantidade de formaldeído (0,25–0,50%), seja ao reagente de lise ou após a lavagem, é uma forma conveniente de estabilizar tanto a ligação do anticorpo quanto a estabilidade da amostra. Quando há necessidade de analisar a expressão da cadeia leve nas células B, as imunoglobulinas séricas devem ser removidas por lavagens repetidas antes da adição do anticorpo. Uma vez preparadas, as amostras devem ser submetidas assim que possível à aquisição no equipamento, a fim de evitar a degradação da amostra e do fluorocromo, mesmo que esse processo seja retardado pela fixação e pelo armazenamento sob refrigeração.

Aquisição de dados

Conforme a amostra preparada é analisada no citômetro de fluxo, é importante coletar um número suficiente de eventos que permita a detecção da população de interesse. Para uma população que representa um grande porcentual do total, é necessário fazer a aquisição de relativamente poucos eventos. Por outro lado, quando se trata de populações pouco frequentes, deve ser feita a aquisição de um número maior de eventos. Ao considerar que na avaliação de neoplasias hematopoéticas raramente se conhece a provável frequência da população de uma dada amostra, é mais conveniente fazer a aquisição de um número fixo de eventos totais que garanta o nível mínimo de sensibilidade desejado. Por exemplo, se a sensibilidade desejada é de 0,1% e foi determinado que 50 eventos são suficientes para identificar a população com segurança, então deve ser feita a aquisição de um total de 50.000 eventos de leucócitos sanguíneos. A aquisição de um número de eventos abaixo desse total comprometerá a capacidade de detectar populações de baixa frequência – uma importante consideração quando se trata da avaliação de doença residual subsequente à terapia e em situações nas quais a aquisição de um número maior de eventos frequentemente é desejável.

O transporte (*carryover*) entre amostras promovido pelo equipamento torna-se uma preocupação importante na avaliação da presença de pequenas populações anormais. Os equipamentos mais comercializados possuem uma especificação do fabricante referente a um transporte de aproximadamente 1%. Esse porcentual de transporte é considerado relativamente alto quando se busca identificar populações pouco frequentes. Para minimizá-lo, uma pequena quantidade de água deve ser passada pelo equipamento entre a aquisição de cada alíquota de amostra, até que a interferência de fundo retorne a níveis baixos aceitáveis. Se essa medida não for adotada, haverá o aparecimento esporádico de populações com imunofenótipos inesperados que podem ser confundidas com doença neoplásica.

Considerações interpretativas

A identificação de neoplasias hematopoéticas por imunofenotipagem baseia-se no princípio de que as células neoplásicas noticiam padrões de expressão antigênica distintos daqueles detectados em células normais. Nestas, a expressão de antígenos é um processo estritamente regulado que resulta em um padrão característico de aquisição e perda de antígenos acompanhado de maturação, que é específico da linhagem celular. As células neoplásicas em geral apresentam alterações não aleatórias da expressão antigênica, incluindo:

1. Ganho de antígenos cuja expressão normalmente está ausente nas células de um determinado tipo ou linhagem.
2. Aumento ou diminuição dos níveis de expressão (intensidades) de antígenos normalmente expressos pelas células de um dado tipo ou linhagem, inclusive com perda completa de antígenos normais em certos casos.
3. Expressão antigênica assincrônica, ou seja, expressão de antígenos normalmente expressos pelas células de um dado tipo ou linhagem, contudo em um momento inadequado, durante a maturação.
4. Expressão anormalmente homogênea de um ou mais antígenos por uma população que, em situação normal, exibe expressão mais heterogênea.

Como consequência, a identificação imunofenotípica da neoplasia hematopoética repousa no conhecimento completo dos padrões normais de antígenos expressos pelas células hematopoéticas.

Padrões normais de expressão antigênica

Todas as células hematopoéticas originam-se das células-tronco. Estas, por sua vez, constituem uma população de células quiescentes com potencial regenerativo de longa duração, que estão presentes em baixa frequência na medula óssea. No seres humanos, a população de células-tronco pode ser identificada se um número suficiente de células for avaliado e mostrar expressão luminosa de CD34, CD133, expressão de luminosidade intermediária de CD45, expressão de luminosidade fraca ou ausente de CD38, expressão variável de CD90 e expressão de luminosidade fraca de CD123, CD117, HLA-DR, CD13 e CD33. A maturação, visando à transformação em células progenitoras comprometidas com uma determinada linhagem, é acompanhada de uma leve diminuição da expressão de CD34 e CD45, perda da expressão de CD133 e CD90 e aumento da expressão de CD38 e HLA-DR. A continuidade da maturação ao longo de cada linhagem ocorre na medula óssea, até que células maduras e funcionais – ainda que de uma progênie naive – sejam liberadas no sangue periférico. As células T constituem exceção a essa regra. Seus precursores mais iniciais migram para o timo, onde sofrem o processo de maturação e se transformam em células funcionais. A mudança dos padrões antigênicos que ocorre com a maturação nas células B, células T, linhagens de células neutrofílicas, monocíticas e eritroides foi elucidada por diversos pesquisadores (Wood, 2004; Lucio, 1999; McClanahan, 1999; Almasri, 1998; Ginaldi, 1996b; Hoffkes, 1996; Harada, 1993; Inghirami, 1990; Terstappen, 1990a, b, c; 1992b; Loken, 1987, 1988). Resumos para cada uma dessas linhagens estão representados nas Figuras 33.6 a 33.10, respectivamente.

Padrões anormais de expressão antigênica na neoplasia hematopoética

A maioria dos neoplasmas hematopoéticos apresenta imunofenótipos anormais que são suficientemente característicos para permitir sua detecção, mesmo diante de baixos níveis de envolvimento. Em alguns casos, o imunofenótipo é característico o bastante para permitir a classificação ao utilizar apenas dados de imunofenotipagem. Entretanto, existe variabilidade suficiente dentro de cada grupo, e o diagnóstico correto consiste no reconhecimento do padrão imunofenotípico geral, em vez da expressão de antígenos individuais ou da aplicação rígida de padrões imunofenotípicos. A discussão a seguir enfatiza os princípios imunofenotípicos gerais úteis ao diagnóstico e classificação de neoplasias hematopoéticas, visto que uma discussão completa acerca das anormalidades antigênicas observadas em cada subtipo da doença foge ao escopo deste capítulo.

Leucemia aguda

Diagnóstico e classificação

O diagnóstico da leucemia aguda baseia-se na determinação do porcentual de blastos existentes no sangue periférico ou na medula óssea. O critério adotado atualmente pela classificação proposta pela OMS para o diagnóstico de leucemia aguda estabelece um porcentual de blastos acima de 20% (Jaffe, 2001). Na citometria de fluxo, a identificação de blastos consiste na demonstração da expressão de antígenos imaturos em uma população que expresse CD45 de forma adequada e exiba características de dispersão da luz. Embora seja o imunofenótipo geral que permita a identificação dos blastos, antígenos comumente empregados com essa finalidade incluem CD34, CD117, CD133 e TdT. Leucócitos sanguíneos exibem expressão de CD45 em níveis de intensidade distintos, característicos tanto da linhagem quanto do estágio de diferenciação que, aliados à dispersão de luz ortogonal (dispersor lateral), permitem delinear as principais populações de leucócitos sanguíneas (Borowitz, 1993; Stelzer, 1993) (Fig. 33.11). Essa é uma técnica particularmente útil na identificação dos blastos, dada a expressão intermediária de CD45 e a baixa dispersão lateral observadas, e a análise de CD45 *versus* dispersão lateral tornou-se a prática-padrão adotada pelos laboratórios clínicos para tal finalidade.

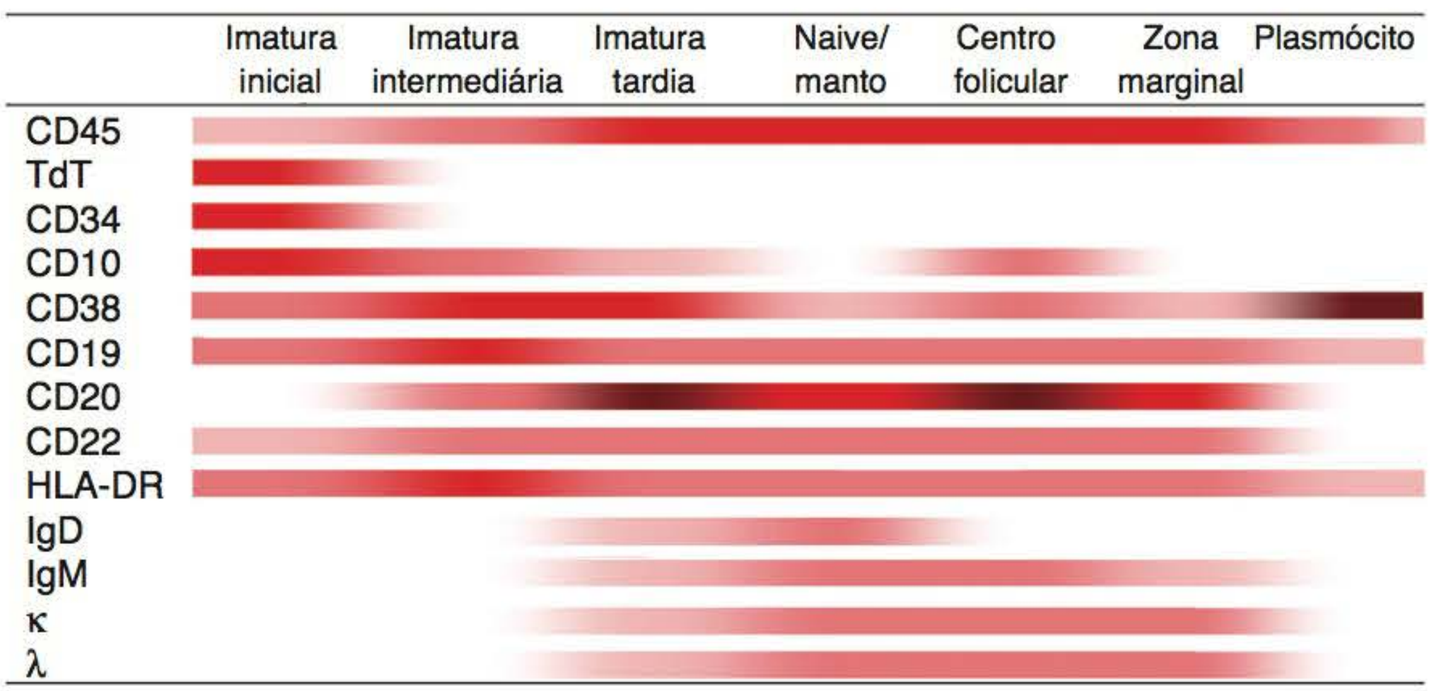


Figura 33.6 Diferenciação da célula B. A intensidade da expressão antigênica ao longo da maturação da célula B é representada para antígenos comumente utilizados no laboratório clínico. Células B maduras normais expressam cadeia κ ou λ, jamais ambas. A cor mais escura representa um nível maior de expressão antigênica.

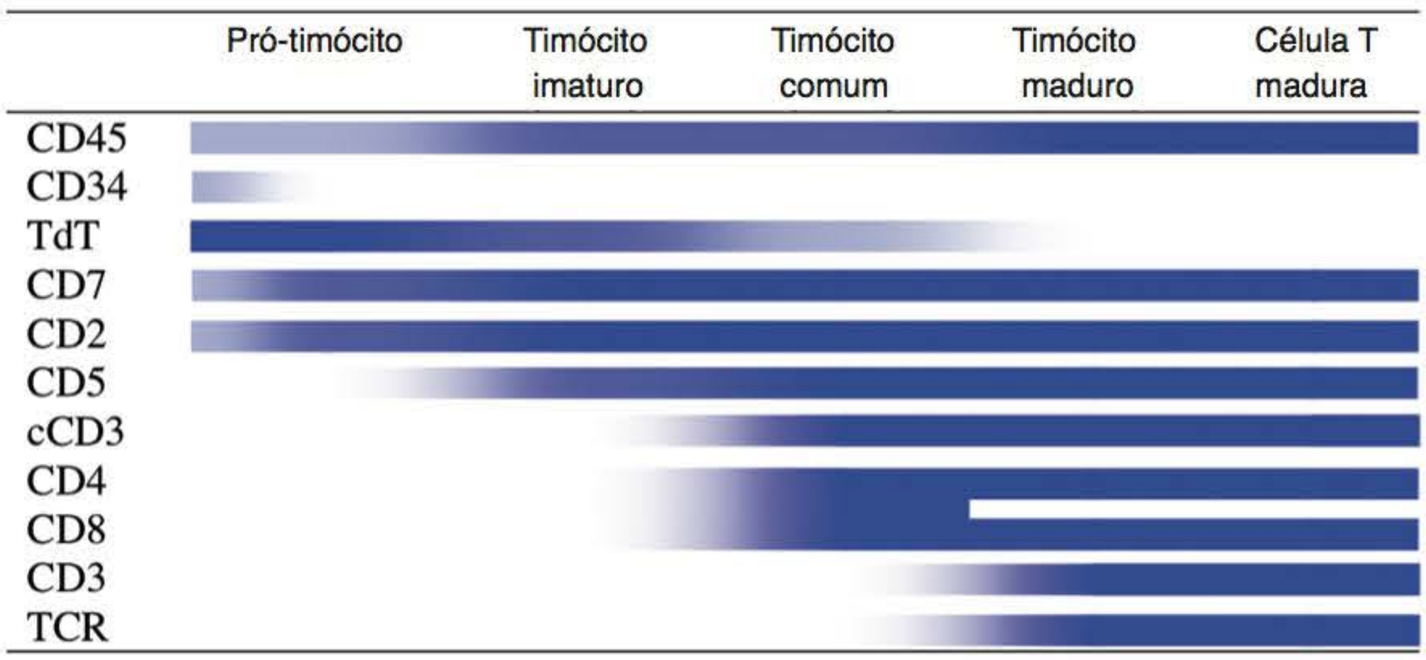


Figura 33.7 T Diferenciação da célula T. A intensidade da expressão antigênica no decorrer da maturação da célula T é representada para antígenos comumente utilizados no laboratório clínico. Uma grande parte da maturação da célula T se dá no timo, e a maioria dos estágios desse processo não será observada fora desse órgão. No estágio de timócito comum, as células T imaturas expressam tanto CD4 quanto CD8; nos estágios subsequentes, passam a expressar apenas uma ou outra, mas não ambas as moléculas. A cor mais escura representa um nível mais alto de expressão antigênica.

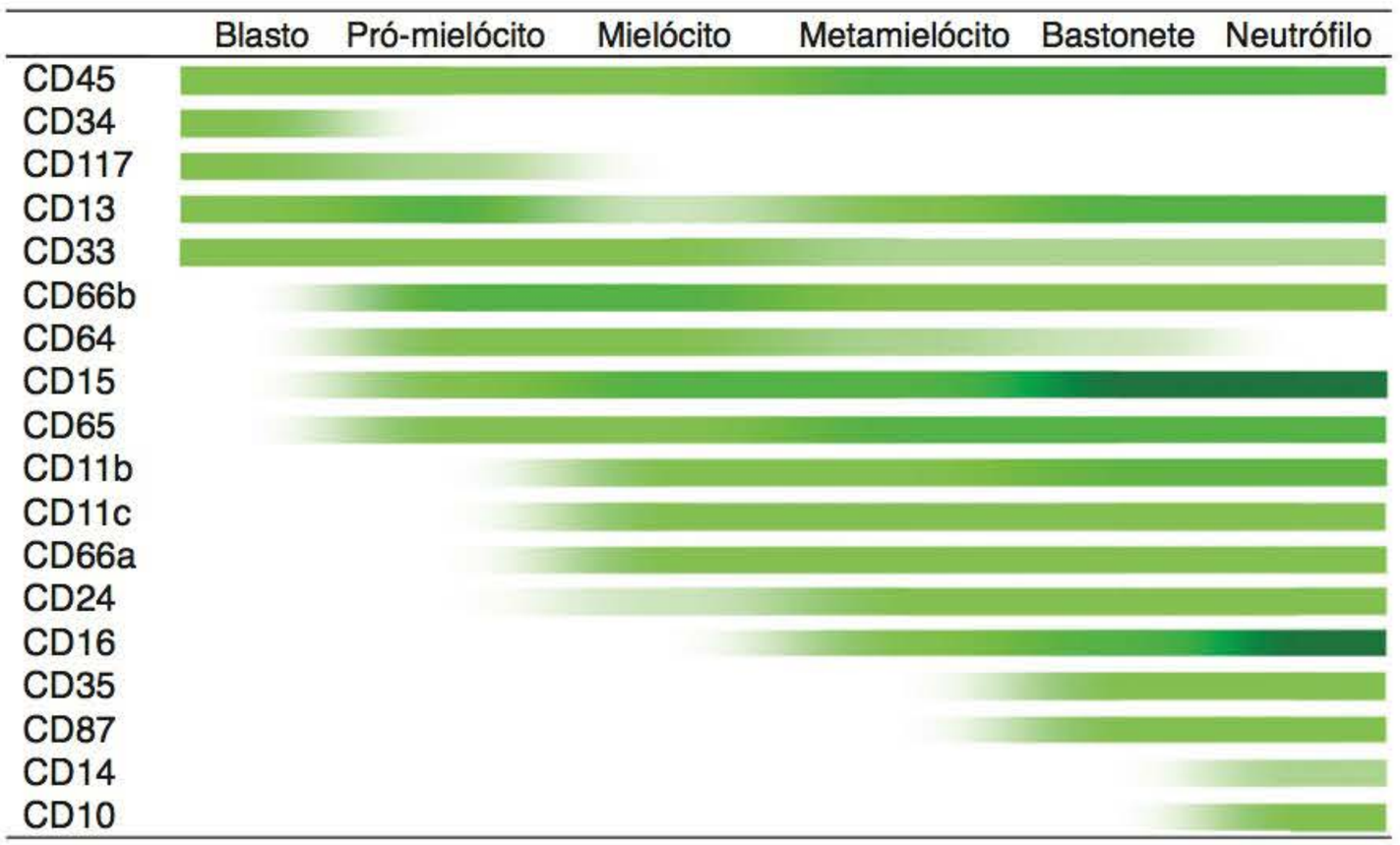


Figura 33.8 Diferenciação do neutrófilo. A intensidade da expressão antigênica no decorrer da maturação do neutrófilo é representada para antígenos comumente utilizados no laboratório clínico. A cor mais escura representa um nível mais alto de expressão antigênica.

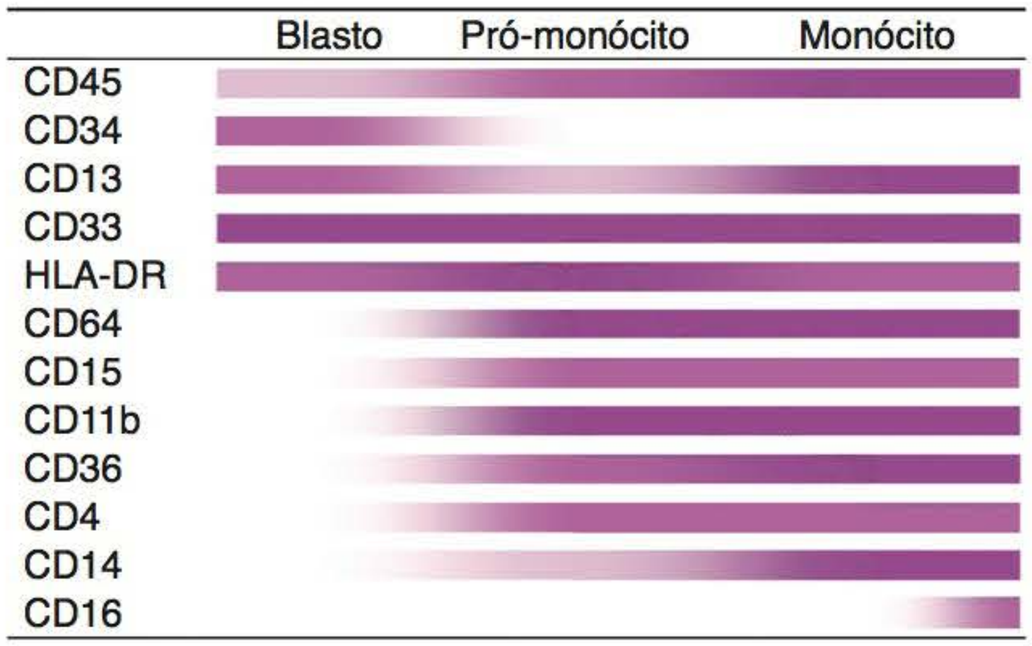


Figura 33.9 Diferenciação de monócitos. A intensidade da expressão antigênica no decorrer da maturação do monócito é representada para antígenos comumente utilizados no laboratório clínico. A cor mais escura representa um nível mais alto de expressão antigênica.

Embora a citometria de fluxo seja excelente para identificar e quantificar blastos, existem dois aspectos que apontam a necessidade de ter cautela ao utilizar percentuais de blastos determinados por esse método para estabelecer um diagnóstico inicial de leucemia aguda. Primeiro porque o porcentual de blastos obtidos a partir da análise de amostras de medula óssea com frequência é impreciso, em decorrência de uma combinação entre diluição do sangue periférico (diminuição artificial) e lise parcial de precursores eritroides nucleados durante o processamento da amostra (aumento artificial). Em segundo lugar, os blastos identificados por imunofenotipagem nem sempre correspondem diretamente aos blastos identificados por estudos morfológicos. Essa consideração realmente é válida uma vez que tanto as populações leucêmicas quanto as normais consistem em um *continuum* de maturação e não há uma concordância perfeita entre as alterações antigênicas específicas e as alterações morfológicas arbitrárias que distinguem os blastos das células mais diferenciadas. Além disso, em alguns tipos de leucemia, os precursores iniciais neutrofílicos (pró-mielócitos) e monocíticos (pró-monócitos) são propositadamente incluídos nas contagens morfológicas de blastos. Todavia, quando se presta atenção a tais limitações, o diagnóstico de leucemia aguda em geral pode ser sugerido de modo adequado.

Enquanto na maioria dos casos de leucemia aguda o diagnóstico (i. e., reconhecimento de um porcentual de blastos de 20%) é estabelecido com base na morfologia, a citometria de fluxo pode ser extremamente útil para excluir o diagnóstico dessa doença quando a medula óssea está povoada de células capazes de mimetizar a condição leucêmica. Uma situação comum em que isso pode ocorrer é diante de um aumento do número de precursores de células B normais morfologicamente parecidos com linfoblastos primitivos, em especial em amostras subótimas. Se por um lado essas células assemelham-se de maneira superficial aos linfoblastos precursores de células B leucêmicos em termos imunofenotípicos, por outro a citometria de fluxo multiparamétrica é capaz de distinguir de imediato esses precursores imaturos normais (hematogônias) de um caso de leucemia aguda (McKenna, 2001; Lucio, 1999; Weir, 1999). Além disso, alguns tumores não linfoides, como o carcinoma de células pequenas ou tumores pediátricos de pequenas células redondas, podem parecer blastos leucêmicos ao exame de esfregaços. No entanto, as células tumorais são prontamente distinguidas dos blastos leucêmicos pela citometria de fluxo, que as detecta como células $CD45^-$ sem marcadores de células B, T ou da linhagem mieloide e, muitas vezes, com dispersão lateral mais alta do que seria esperado para uma célula que contém tão pouco citoplasma (Chang, 2003).

O principal papel da citometria de fluxo na leucemia aguda reside na classificação. Esta, por sua vez, consiste em grande parte na atribuição de uma linhagem e na correlação com o estágio de maturação normal. A determinação da linhagem, em particular, constitui uma decisão de fundamental importância terapêutica, e a distinção primária consiste em identificar se a leucemia é de linhagem mieloide ou linfoide. As características imunofenotípicas da leucemia mieloide aguda (LMA)

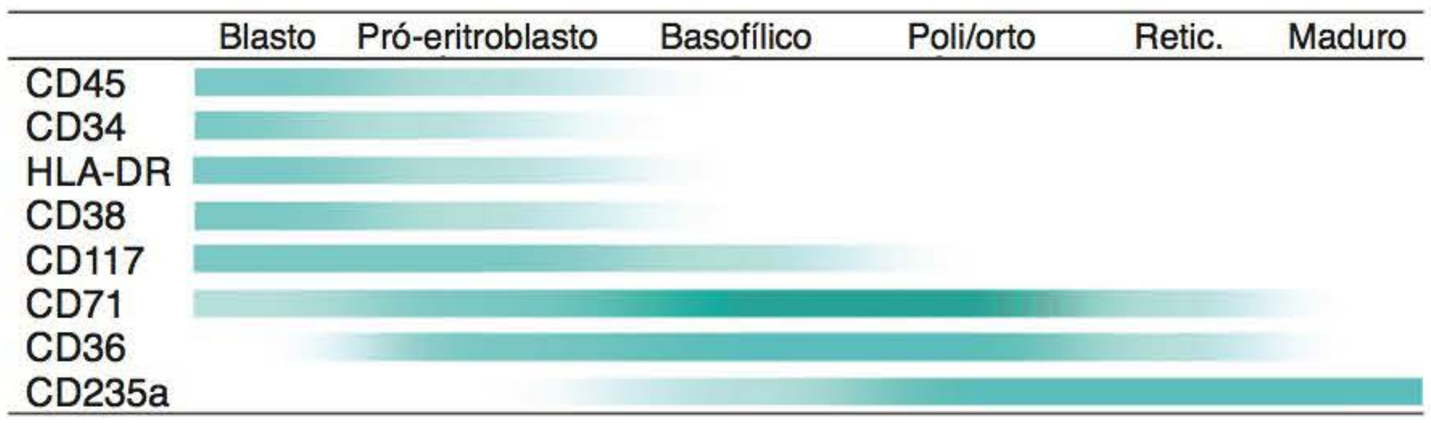


Figura 33.10 Diferenciação eritroide. A intensidade da expressão antigênica no decorrer da maturação do eritrócito é representada para antígenos comumente utilizados no laboratório clínico. A cor mais escura representa um nível mais alto de expressão antigênica.

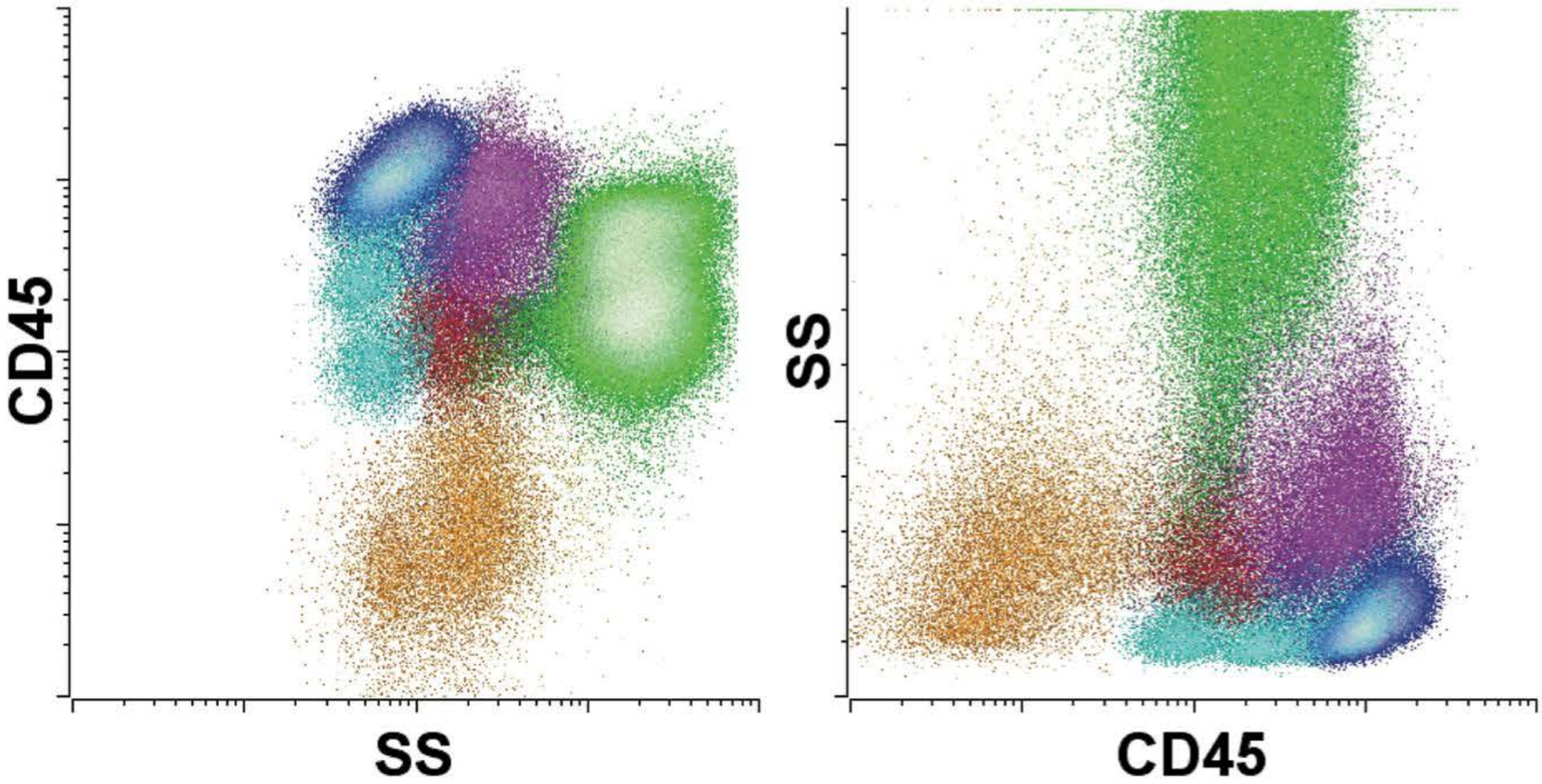


Figura 33.11 CD45 *versus* dispersão lateral. A exibição da expressão do CD45 *versus* dispersão lateral está sendo cada vez mais utilizada no laboratório clínico como ponto de partida para a identificação de populações de leucócitos sanguíneos. Os dados são comumente apresentados com a dispersão lateral em escala logarítmica (esquerda) ou linear (direita). As principais populações de leucócitos observadas na ilustração são de linfócitos (azul), células B (azul-claro), monócitos (púrpura), neutrófilos em maturação (verde), blastos (vermelho), basófilos (púrpura-escuro) e eritrócitos em maturação (alaranjado).

(Orfao, 2004; Weir, 2001; Khalidi, 1998; Macedo, 1995a, b; Bradstock, 1994; Reading, 1993; Terstappen, 1992a) e da leucemia linfoblástica aguda (Weir, 1999; Khalidi, 1999; Farahat, 1995), bem como suas similaridades em relação às populações normais, são bem descritas em inúmeras publicações. De uma forma geral, é o padrão global de expressão antigênica, em vez da expressão isolada de qualquer antígeno, que permite determinar a linhagem. Em parte, isso ocorre porque muitos dos antígenos comumente empregados na imunofenotipagem não possuem especificidade para linhagens. Via de regra, quanto mais próxima estiver a expressão de um antígeno dos níveis comumente observados nas células de uma determinada linhagem, maior é a probabilidade de esse antígeno refletir com acurácia a diferenciação da linhagem em questão. Exemplificando, a expressão fraca do antígeno CD19 na célula B apresenta uma especificidade relativamente baixa para a linhagem celular, já que pode ser detectada na LMA. Por outro lado, uma expressão de CD19 mais luminosa e uniforme, próxima aos níveis observados nas células B normais, é mais típica de uma leucemia linfoblástica de células B precursoras. Um subconjunto de antígenos citoplasmáticos corresponde aos antígenos linhagem-restritos conhecidos atualmente, que são utilizados para decidir a atribuição da linhagem nos casos em que o imunofenótipo de superfície é incerto. A Tabela 33.2 lista os antígenos utilizados com frequência na atribuição de linhagens. Em casos raros, as células leucêmicas podem apresentar diferenciação em mais de uma linhagem (Matutes, 1997; Bene, 1995; Hanson, 1993), mais comumente nas linhagens mieloide e de células B ou mieloide e de células T, conforme evidencia a natureza de células-tronco dessas formas de leucemia aguda. Quando uma única população de blastos apresenta esse tipo de diferenciação, é comum denominar a condição como uma leucemia aguda bifenotípica. Se houver duas populações de blastos anormais, cada qual de uma linhagem distinta, a condição é denominada leucemia aguda bilinear. As Figuras 33.12 a 33.15 ilustram exemplos de padrões imunofenotípicos observados na leucemia aguda.

Fatores prognósticos

Embora existam vários relatos acerca da importância prognóstica de marcadores de superfície específicos tanto na leucemia linfoide aguda quanto na leucemia mieloide (Schabath, 2003), a maior parte deles não resistiu à prova do tempo e, atualmente, não exercem impacto significativo sobre a terapia. Uma explicação para isso é que a presença de

Tabela 33.2 Antígenos utilizados para atribuição de linhagens na leucemia aguda

	LMA	LLA – célula B	LLA – célula T
Definitivo	MPO citoplasmática	CD79a citoplasmático CD22 citoplasmático	CD3 citoplasmática CD3 de superfície
Fortemente associado	CD117	CD19 CD10 (brilhante)	CD7 (brilhante)
Moderadamente associado	CD13 CD33	TdT – moderada a brilhante	CD5 CD2

anormalidades citogenéticas recorrentes na leucemia aguda passou a ser reconhecida como uma importante característica prognóstica com implicações terapêuticas. Tais anormalidades atualmente integram a classificação de leucemia aguda proposta pela OMS. Em muitos casos, a anomalia citogenética subjacente está associada a aspectos imunofenotípicos característicos que auxiliam a sugerir uma classificação apropriada (Hrusak, 2002; Porwit-MacDonald, 1996; Orfao, 1999). Com poucas exceções, uma vez que anormalidades citogenéticas sejam responsabilizadas, o imunofenótipo deixa de ser prognóstico. Entretanto, alguns marcadores, como a expressão de CD56 na LMA com t(8;21) (Baer, 1997), foram associados ao um prognóstico adverso na leucemia citogeneticamente definida. A Tabela 33.3 apresenta um resumo dos aspectos fenotípicos associados a anomalias citogenéticas ou moleculares.

Alvos terapêuticos

Na LMA, o anticorpo terapeuticamente dirigido contra antígeno-alvo mais utilizado é o antiCD33 (gemtuzumab ozogamicina). A expressão de CD33 é detectada na grande maioria dos casos de LMA e, embora às vezes seja de baixa densidade, isso não parece afetar a utilidade da terapia com anticorpos (Linenberger, 2005). Relativamente, pouco se sabe a respeito do papel do monitoramento das alterações da expressão de CD33. Na leucemia linfocítica aguda (LLA), até o momento existem poucos estudos que empregam anticorpos monoclonais terapêuticos, embora o antiCD22 (epratuzamab) e o anti-

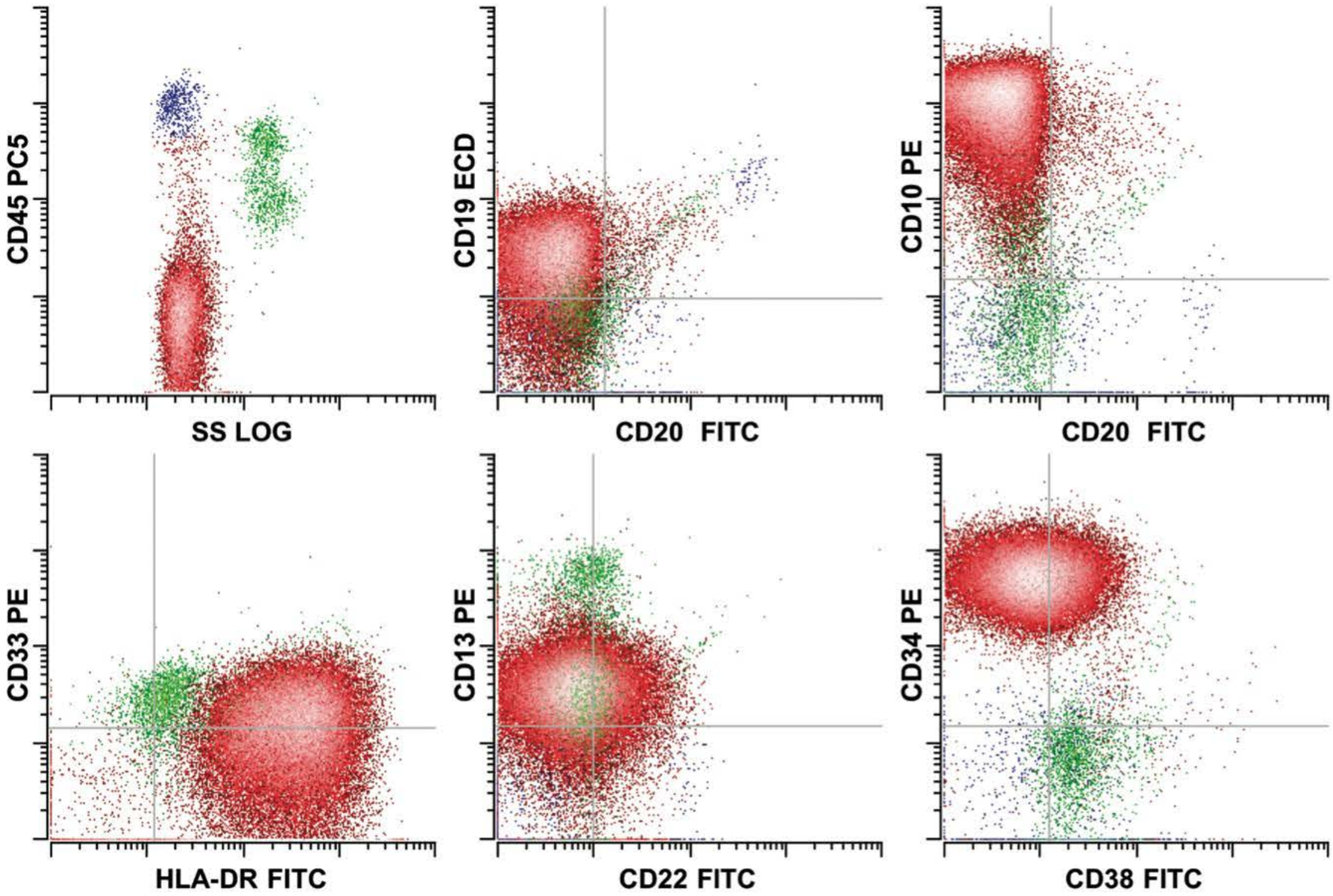


Figura 33.12 Linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de célula B (leucemia linfoblástica aguda). A população de células neoplásicas (vermelho), comparada à de células B imaturas normais, mostra expressão anormal de antígenos associados à célula B (CD19 – fraca; CD22 – muito fraca; e CD10 – brilhante) aliada à expressão aberrante de CD45 (ausente), CD34 (brilhante) e CD38 (fraca). O baixo nível de expressão de antígenos associados à célula mieloide (CD13 e CD33) é um aspecto frequentemente encontrado nesse distúrbio e, por si só, não sugere diferenciação mieloide. As células apresentam baixa dispersão lateral que é típica de blastos linfoides.

Tabela 33.3 Associação do imunofenótipo às anormalidades citogenéticas na leucemia aguda

	Imunofenótipo
Leucemia mieloide aguda	
t(15;17)	HLA-DR$^-$, CD15 baixo ou ausente, CD33 brilhante, CD34 baixo ou ausente
t(8;21)	CD34 brilhante, CD56$^+$, CD19 fraco, TdT$^+$, CD15$^+$
Leucemia linfoblástica aguda	
t(12;21) (por FISH)	CD10$^+$, CD20 baixo a negativo, CD9 baixo a negativo
MLL, p. ex., t(4;11)	CD10$^-$, CD15$^+$

CD52 (alentuzamab) sejam atualmente utilizados em algumas triagens clínicas. A expressão quase ubíqua do CD22 na LLA de células B precursoras limita o papel da citometria de fluxo na determinação da elegibilidade para esse tipo de triagem.

Monitoramento da doença residual na leucemia aguda

Uma grande parte dos inúmeros anticorpos que podem ser utilizados para ajudar a classificar a leucemia aguda não são, em si, essenciais para a determinação da linhagem. Todavia, um painel mais amplo de anticorpos, desde que adequadamente selecionados, pode ser muito útil para identificar diferenças específicas existentes entre a população leucêmica e os elementos de fundo normais e, assim, intensificar a adequação do uso da citometria de fluxo para detectar uma doença residual mínima. Dessa forma, o propósito da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico da leucemia aguda vai além da simples atribuição de linhagem e se estende à descrição de uma "assinatura imunofenotípica" característica da leucemia em questão, cujo conhecimento é útil para a avaliação de amostras de acompanhamento (Vidriales, 2003; Campana, 2003). Uma ressalva importante é a de que com frequência são observadas alterações imunofenotípicas entre as amostras diagnósticas obtidas e a doença persistente ou recorrente, em particular na LMA (Voskova, 2004; Baer, 2001). Do mesmo modo, é necessário monitorar mais de um padrão antigênico e não esperar que exatamente o mesmo imunofenótipo observado ao diagnóstico persista após a terapia. A Tabela 33.4 fornece exemplos de combinações particularmente informativas que são úteis para a detecção de expressão antigênica aberrante em uma doença residual mínima. Foi demonstrado que a detecção dessa doença residual mínima na leucemia aguda apresenta correlação com o risco de recaídas e a sobrevida global tanto na LMA (Feller, 2004; San Miguel, 2001) quanto na leucemia linfoblástica aguda (Dworzak, 2002; Coustan-Smith, 2000), além de ser cada vez mais utilizada para orientar a tomada de decisão terapêutica.

Linfoma

Diagnóstico e classificação

Assim como na leucemia, a citometria de fluxo pode contribuir tanto para o diagnóstico quanto para a classificação dos linfomas. O diagnóstico imunofenotípico do linfoma consiste na identificação de uma população expandida de linfócitos maduros anormais. De longe, o modo mais comum de avaliar essa expansão por citometria de fluxo é demonstrar a restrição da cadeia leve nas proliferações de células B. Como todas as células neoplásicas, os linfócitos neoplásicos originam-se de uma única célula precursora que sofre expansão clonal. Entretanto, ao contrário da maioria das células, cada linfócito normalmente expressa em sua superfície uma entre uma série de

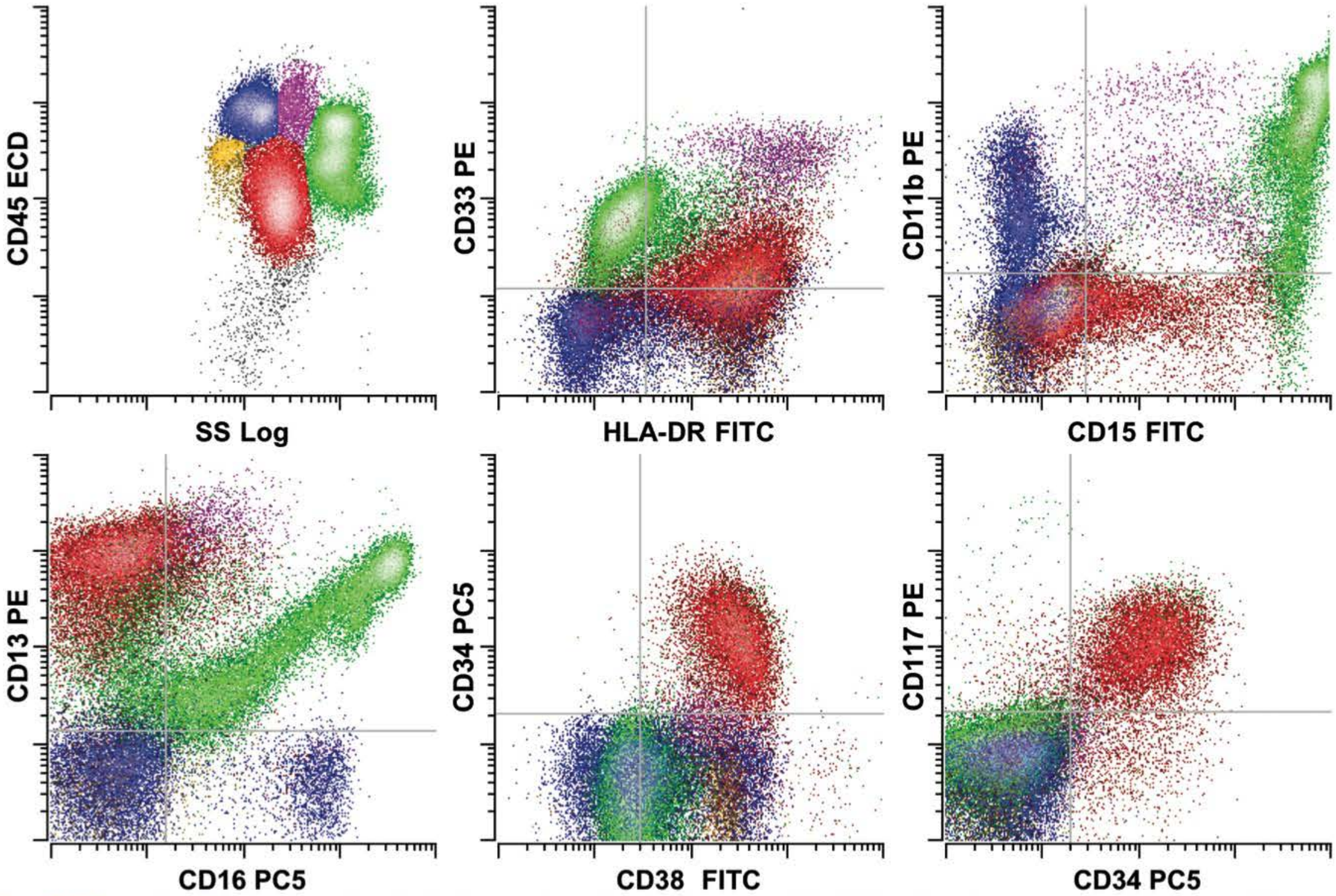


Figura 33.13 Leucemia mieloide aguda com diferenciação. A população de células neoplásicas é constituída de blastos (vermelho), que mostram expressão anormal de antígenos relacionados à célula mieloide (CD33 – fraca; CD13 – brilhante; e CD15 – parcialmente fraca) em associação a antígenos imaturos (CD34 e CD117). Os blastos não expressam mais os antígenos neutrofílicos maduros CD11b ou CD16 e constituem as formas típicas relativamente imaturas observadas em muitos casos de leucemia mieloide aguda. Os granulócitos maduros de fundo (verde) são normais e não pertencem à população leucêmica.

Tabela 33.4 Combinações de anticorpos de quatro cores úteis à detecção de doença residual mínima

Leucemia mieloide aguda	**Leucemia linfoblástica aguda – célula B**
CD34/CD33/HLA-DR/CD45	CD20/CD10/CD19/CD45
CD34/CD117/CD33/CD45	CD9/CD34/CD19/CD45
CD15/CD117/CD33/CD34	CD58/CD10/CD38/CD19
CD15/CD13/CD33/CD34	CD38/CD10/CD34/CD19
HLA-DR/CD117/CD33/CD34	CD20/CD10/CD19/CD34
Leucemia linfocítica crônica	**Leucemia linfoblástica aguda – célula T**
CD20/CD79a/CD19/CD5	TdT/CD5/CD3/CD7

Combinações de anticorpos de Vidriales (2003), Weir (1999) e Rawstron (2001).

moléculas polimórficas, a qual lhe confere uma identidade única. No caso da célula B, essa molécula identificadora é uma imunoglobulina. Como as moléculas individuais de imunoglobulina contêm uma entre duas variedades de cadeia leve (κ ou λ), reagentes direcionados contra as cadeias leves podem ser utilizados como marcadores de clonalidade de células B (Braylan, 1993; Fukushima, 1996; Geary, 1993).

No caso das proliferações de células T, o *locus* genético do receptor da célula T é mais complexo. No entanto, é possível utilizar uma série maior de reagentes dirigidos contra as famílias de cadeia β do receptor da célula T para demonstrar a clonalidade de células T (Lima, 2001; Morice, 2004). O uso de reagentes dirigidos contra receptores *killer*-inibitórios (antígenos KIR) foi também sugerido para permitir a demonstração da clonalidade de células NK (Morice, 2003). Por trás de todos esses ensaios, considera-se que a clonalidade equivale à malignidade. Enquanto a clonalidade é consequência necessária da neoplasia, a expansão clonal também é um componente normal e necessário da resposta imune que se segue à estimulação antigênica. Desse modo, a demonstração da clonalidade por si só não é inteiramente suficiente para estabelecer o diagnóstico de um linfoma.

Tem sido cada vez mais reconhecido que um subconjunto de indivíduos – que, não fosse por isso, seriam considerados normais – podem apresentar pequenas populações clonais de linfócitos, mais bem documentadas no caso das células B (Chen, 2004; Kussick, 2004; Rawstron, 2002). Ao contrário do que ocorre na leucemia aguda, ainda não foram desenvolvidos critérios numéricos bem definidos que representem o grau de envolvimento de uma população clonal necessário para estabelecer o diagnóstico. Assim, ainda não foi esclarecido se essas populações clonais representam um estágio inicial subclínico da doença, uma população precursora não totalmente complementada pelas anormalidades genéticas necessárias a uma neoplasia, ou um achado incidental sem consequências clínicas. Por conseguinte, torna-se necessário que os achados da citometria de fluxo sugestivos de linfoma sejam trazidos para o contexto morfológico e clínico antes de estabelecer um diagnóstico definitivo de linfoma.

Além da restrição da cadeia leve ou do uso restrito do gene do receptor β T, os linfomas, assim como as leucemias, apresentam alterações na expressão antigênica que promovem um desvio da maturação normal. Em muitos casos, essas alterações também fornecem evidências de neoplasia. Além disso, alterações específicas detectadas em tipos específicos de linfoma muitas vezes possibilitam a classificação e o diagnóstico. Um exemplo é a expressão aumentada do antígeno CD5 da célula T, seja na leucemia linfocítica crônica, seja no linfoma de

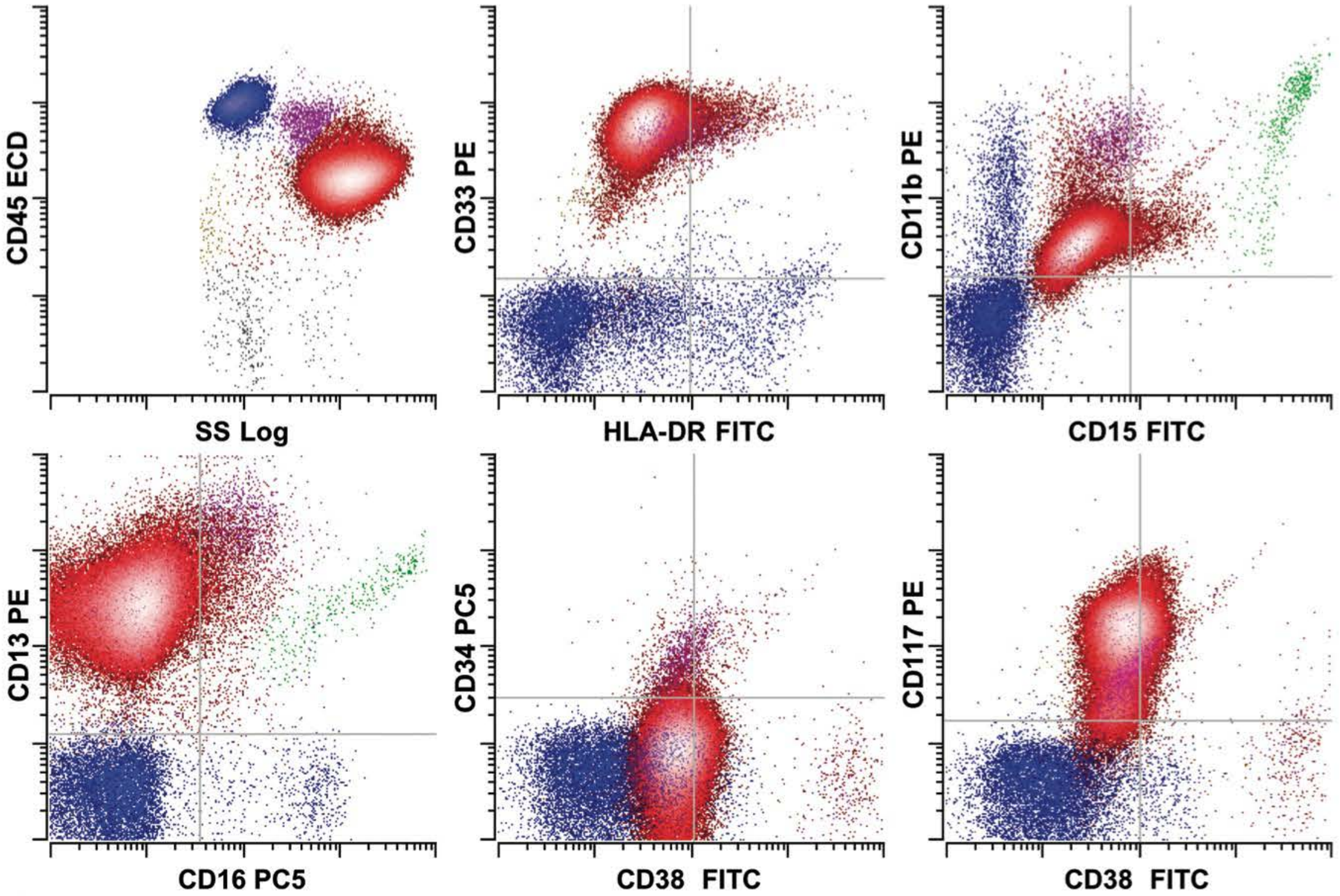


Figura 33.14 Leucemia pró-mielocítica aguda. A população de células neoplásicas é constituída de pró-mielócitos (vermelho) que apresentam expressão anormal dos antígenos relacionados à célula mieloide CD33 (brilhante) e CD13 (intermediária), além de uma intensa dispersão lateral que indica abundante granularidade citoplasmática. A população não exibe expressão de CD34 e HLA-DR, que são antígenos comumente detectados em blastos mieloides verdadeiros, porém retém a expressão de CD117, que é detectado em um subgrupo de pró-mielócitos normais. Todavia, em contraste com os pró-mielócitos normais, as células anormais não apresentam expressão significativa de CD15 – uma anormalidade característica e comum desse distúrbio.

células de revestimento (Matutes, 1994a; Tworek, 1998). A alteração da intensidade da expressão da imunoglobulina também constitui uma anomalia comum no linfoma de células B, e pode ser útil mesmo quando a expressão da imunoglobulina está totalmente ausente (Li, 2002). O linfoma de células T, de modo similar, muitas vezes apresenta alterações que envolvem a expressão de um ou mais antígenos de célula T (Picker, 1987; Ginaldi, 1996a). Entretanto, é preciso ter especial cuidado ao interpretar pequenas populações de células T fenotipicamente anormais, sobretudo em sítios incomuns, pois existe um grande número de condições reativas que podem estar associadas a expansões de populações que não são vistas com frequência no sangue ou linfonodos normais (McClanahan, 1999).

Um método ainda mais eficiente para diagnosticar linfomas consiste em combinar a detecção da clonalidade à capacidade de identificar alterações de intensidade antigênica por citometria de fluxo multicolorida. Exemplificando, o acoplamento da identificação de células B de centro folicular que utiliza CD19 e CD10 à detecção das cadeias leves κ e λ em uma análise com quatro cores permite reconhecer a existência de restrição de cadeias leves, especificamente na população de células B de centro folicular. Essa técnica aumenta de maneira significativa tanto a especificidade quanto a sensibilidade da análise. As Figuras 33.16 a 33.20 mostram exemplos de padrões imunofenotípicos observados em linfomas. Uma importante limitação desse tipo de análise refere-se à atual incapacidade de identificar na rotina casos de linfoma de Hodgkin ou linfoma de células B rico em células T, cujo aspecto comum é a dificuldade de detectar neoplasias compostas por grandes células atípicas, relativamente raras.

A classificação do linfoma baseia-se na identificação de padrões específicos de expressão antigênica, que são similares a alguns estágios de maturação normais, ainda que se desviem suficientemente para permitir o reconhecimento da população anormal. Entre os linfomas de células B, existem duas entidades que podem ser diagnosticadas e classificadas com alto grau de segurança, baseando-se apenas em dados imunofenotípicos: leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico pequeno (LLC/LLP) e leucemia de células pilosas. A LLC/LLP é caracterizada pela coexpressão de CD5 pelas células B anormais, intensidade reduzida da expressão clonal de cadeias leves, expressão diminuída de uma variedade de antígenos de células B maduras (incluindo CD20, CD22 e CD79b) e presença do antígeno de ativação CD23 sem FMC7 (um epítopo de CD20) significativo (Serke, 2001) (Fig. 33.16). Essa constelação de achados imunofenotípicos é diagnóstica da LLC/LLP (Matutes, 1994a; Tworek, 1998). A única outra neoplasia de células B em que há expressão consistente de CD5 é o linfoma de células de revestimento. Trata-se de um tipo de linfoma mais agressivo, cuja distinção da LLC/LLP se faz importante. Assim, em contraste com a LLC/LLP, o linfoma de células de revestimento apresenta uma expressão relativamente brilhante de antígenos de células B (como CD20 e CD79b), expressão clonal de imunoglobulina em níveis relativamente normais a elevados e expressão de FMC7 sem CD23 significativo (Fig. 33.17). Embora o linfoma de células de revestimento em geral possa ser distinguido de imediato da LLC/LLP, visto que outros distúrbios linfoproliferativos de baixo grau também expressam CD5 em determinadas ocasiões e mimetizam o fenótipo das células do manto, seu diagnóstico definitivo requer a demonstração de t(11;14) por FISH ou da superexpressão de ciclina D1 por imuno-histoquímica. Essas neoplasias de células B $CD5^+$ raras não podem ser distinguidas pelos critérios imunofenotípicos, sendo muitas vezes necessário combinar a história clínica e aos achados de anormalidades morfológicas e citogenéticas para obter uma classificação correta.

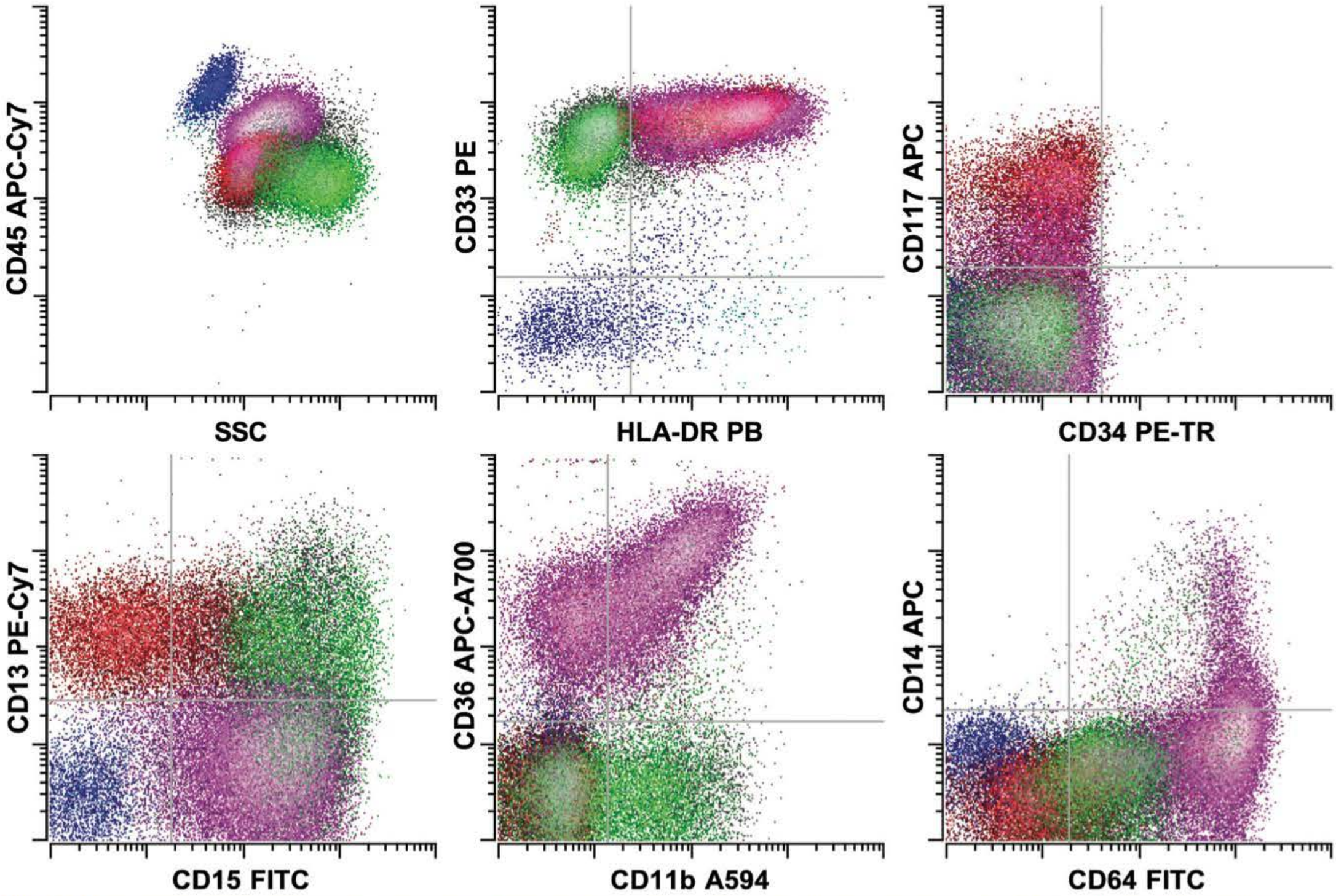


Figura 33.15 Leucemia mielomonocítica aguda. As células neoplásicas consistem em uma população relativamente pequena de blastos (vermelho) com uma população maior de células que apresentam diferenciação monocítica (violeta). Os blastos exibem expressão anormal de CD33 (brilhante), CD13 (intermediária), HLA-DR (intermediária) e CD117 (intermediária), e o CD34 está ausente. A diferenciação monocítica é refletida pela aquisição de antígenos de monócito precoce (CD64 – brilhante; e CD36 – intermediária a brilhante) em paralelo a outros antígenos de células mielomonocíticas mais maduras (CD15 – intermediária; e CD11b – baixa a intermediária), sem aquisição significativa do antígeno de monócitos maduros CD14 (ausente), nem o ganho marcante na expressão de CD45 observado nessas células. Esse achado sugere a diferenciação para o estágio de pró-monócito, que engloba uma população celular usualmente incluída nas contagens morfológicas de blastos. Observa-se também um menor grau de diferenciação neutrofílica (verde).

A leucemia de células pilosas caracteriza-se pelo aumento da expressão de uma variedade de antígenos de células B (incluindo CD19, CD20 e CD22), restrição clonal de cadeia leve de superfície, aumento marcante da expressão de moléculas de adesão celular (CD11c e CD103) e expressão da cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) (Fig. 33.18) (Matutes, 1994b; Robbins, 1994). As células exibem, ainda, grau variável de dispersão lateral decorrente do citoplasma abundante que possuem, muitas vezes conferindo-lhes características de dispersão da luz similares às dos monócitos. Esse achado, combinado à monocitopenia comum nesse distúrbio, constitui causa frequente de resultados falso-negativos, em particular quando se conta com portas relativamente estreitas para identificar a população de linfócitos, seja por meio de parâmetros de dispersão de luz, seja por CD45 *versus* dispersão lateral.

Outro achado imunofenotípico que auxilia a classificação do linfoma de células B é a detecção da expressão de CD10. A molécula CD10 é um antígeno presente em células B imaturas e em células B maduras normais, à medida que transitam pelo centro folicular. Entre os linfomas de células B, o CD10 é expresso na maioria dos casos de linfoma folicular (Almasri, 1998) (Fig. 33.19), em um subgrupo significativo de linfomas de células B grandes e no linfoma de Burkitt. Em cada um desses casos, a expressão de CD10 indica a origem a partir do centro folicular. No linfoma folicular, a expressão de CD10 muitas vezes está acoplada a uma diminuição da intensidade da expressão de CD19 (Yang, 2005), que difere dos níveis normais um pouco elevados dessa molécula detectados em células B normais do centro germinativo. A demonstração da superexpressão de Bcl-2 na população de células B $CD10^+$ pode ser bastante útil para confirmar uma neoplasia (Cook, 2003), particularmente nos casos em que a expressão da cadeia leve de superfície está ausente, além de refletir a ocorrência de uma t(14;18) subjacente característica do linfoma folicular. Se por um lado apenas a positividade para CD10 não permite uma classificação definitiva, a presença dessa molécula reduz significativamente a possibilidade de as entidades serem consideradas, e a morfologia em geral é necessária para estabelecer a classificação definitiva.

O papel da imunofenotipagem na classificação do linfoma de células T não é tão bem definido, embora tenham sido percebidas determinadas associações que requerem estudos mais amplos para serem validadas. Como regra geral, a maioria dos linfomas de células T é composta de células T $CD4^+$ e exibe padrões anormais de expressão antigênica. Em um linfoma de células T angioimunoblásticas, as células T anormais são $CD4^+$ e comumente apresentam perda ou diminuição da expressão de CD3 de superfície (Serke, 2000), além de coexpressão anormal de CD10 (Attygalle, 2002) (Fig. 33.20). Na micose fungoide/síndrome de Sézary, as células T anormais também são tipicamente $CD4^+$ e podem mostrar uma variedade de anormalidades imunofenotípicas, que comumente incluem alterações da intensidade da expressão de CD3 e CD4, bem como diminuição ou perda da expressão de CD7 (Bogen, 1996; Lima, 2003). Todavia, CD7 normalmente é expresso de forma variável em células T $CD4^+$. Uma expressão diminuída está associada a um imunofenótipo de memória normal, e subpopulações expandidas que apresentam esse imunofenótipo podem ser encontradas em uma variedade de condições reativas, como nas lesões cutâneas inflamatórias (Murphy, 2002). Como consequência, a demonstração de uma perda de CD7 não permite por si só estabelecer uma classificação definitiva nem um diagnóstico definitivo de linfoma e, em geral, necessita da presença de anormalidades antigênicas adicionais para se tornar informativa. A expressão de CD30 combinada

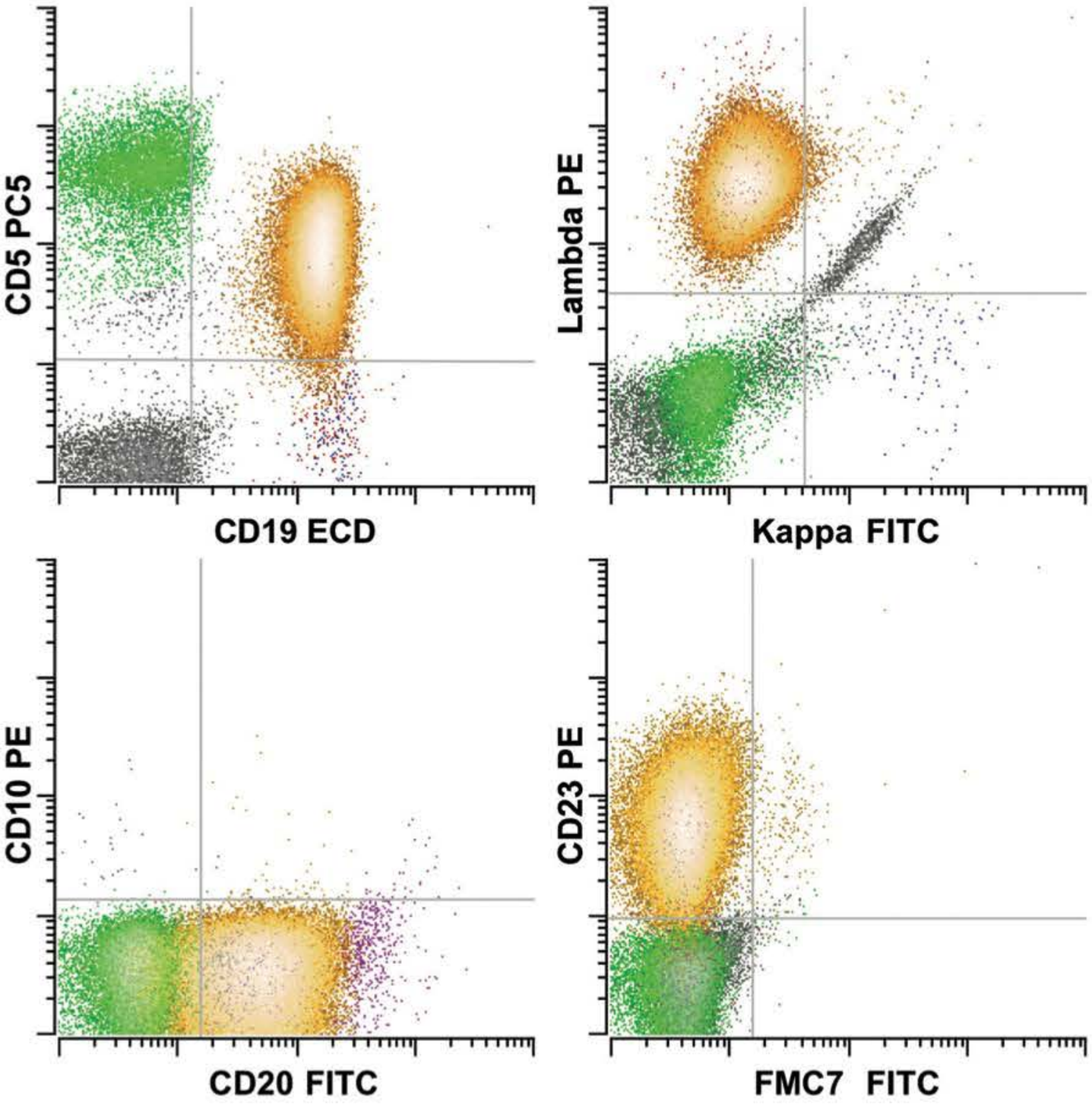


Figura 33.16 Leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico pequeno. A população neoplásica de células B (dourado) mostra expressão anormal dos antígenos de células B CD19 (intermediária) e CD20 (baixa), bem como expressão de cadeia leve de superfície λ (baixa) e coexpressão de CD5 e CD23 (intermediária). A combinação da coexpressão de CD5, baixo nível de restrição de cadeia leve, baixa expressão de CD20 e CD23 na ausência de FMC7 é diagnóstica desse distúrbio em particular. O diferencial importante se refere ao linfoma de células de revestimento (ver Fig. 33.17).

Figura 33.17 Linfoma de células de revestimento. A população neoplásica de células B (dourado) mostra expressão dos antígenos de células B CD19 (intermediária) e CD20 (intermediária), bem como restrição de cadeia leve κ (brilhante) e coexpressão de CD5 (intermediária) e FMC7 (intermediária), com CD23 apenas baixa. O padrão geral de expressão antigênica difere daquele observado na LLC/LLP (ver Fig. 33.16) e sugere um linfoma de células de revestimento. O diagnóstico definitivo requer a demonstração da t(11;14) por FISH ou a superexpressão de ciclina D1 por imuno-histoquímica.

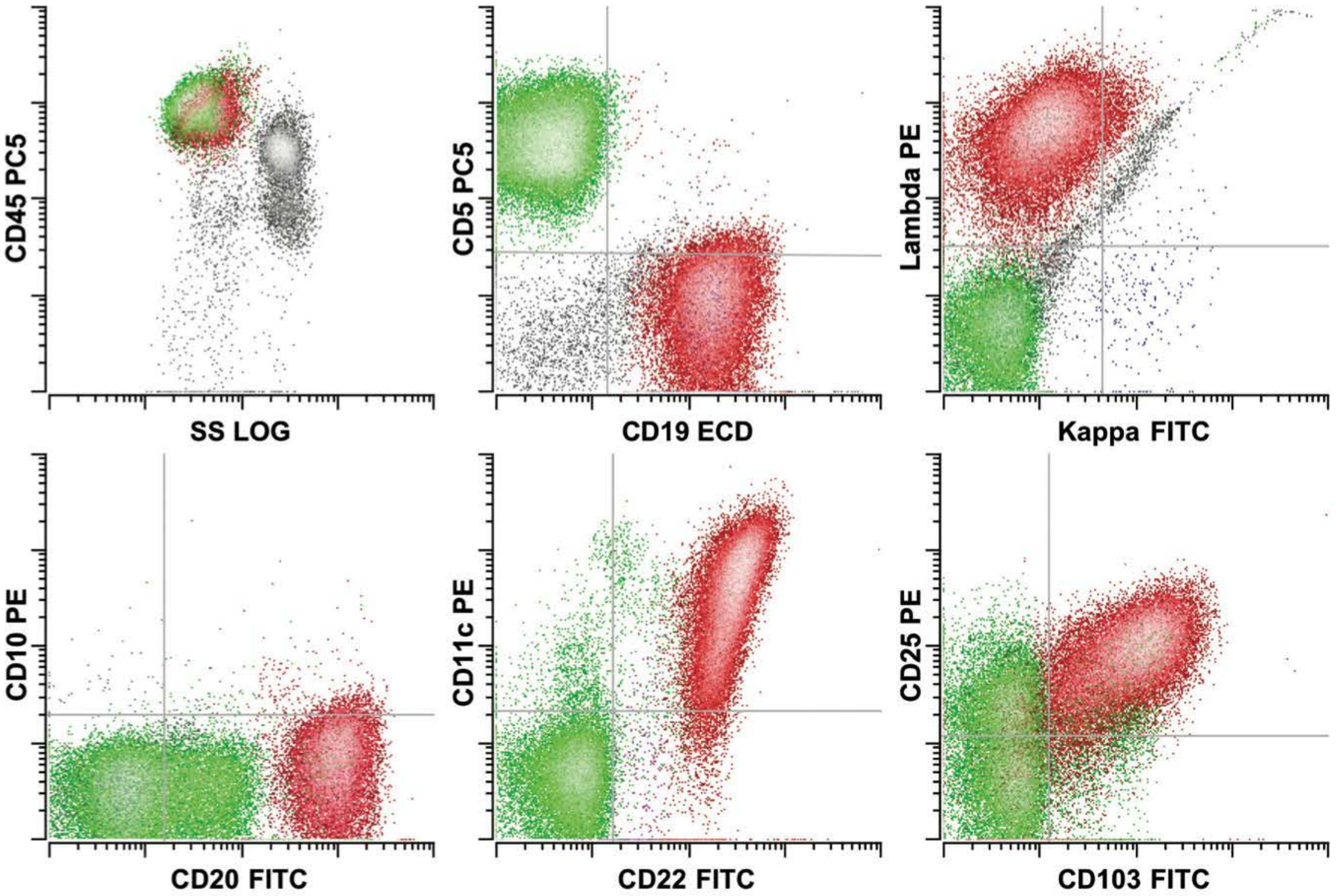


Figura 33.18 Leucemia de células pilosas. A população neoplásica de células B (vermelho) mostra expressão dos antígenos de células B CD19 (intermediária), CD20 (brilhante) e CD22 (brilhante), bem como restrição de cadeia leve de superfície λ (intermediária) com expressão aberrante das moléculas de adesão CD11c (luminosidade variável) e CD103 (intermediária), além de CD25 (intermediária). Esse imunofenótipo é diagnóstico da leucemia de células pilosas. Note a ausência de monócitos pela aquisição CD45 *versus* dispersão lateral, que é um achado característico desse tipo de leucemia.

Figura 33.19 Linfoma folicular. A população neoplásica de células B (dourado) mostra expressão anormal dos antígenos de células B CD19 (fraca) e CD20 (intermediária), bem como expressão de cadeia leve de superfície κ (intermediária) e coexpressão do antígeno associado ao centro folicular CD10 (intermediária). A neoplasia exibe superexpressão de Bcl-2 citoplasmática, em razão da presença da t(14;18) característica do linfoma folicular. A superexpressão de Bcl-2, por si só, não é diagnóstica desse tipo de linfoma, mas quando combinada à expressão de CD10 torna-se muito mais específica, pois espera-se que as células B foliculares $CD10^+$ sejam negativas.

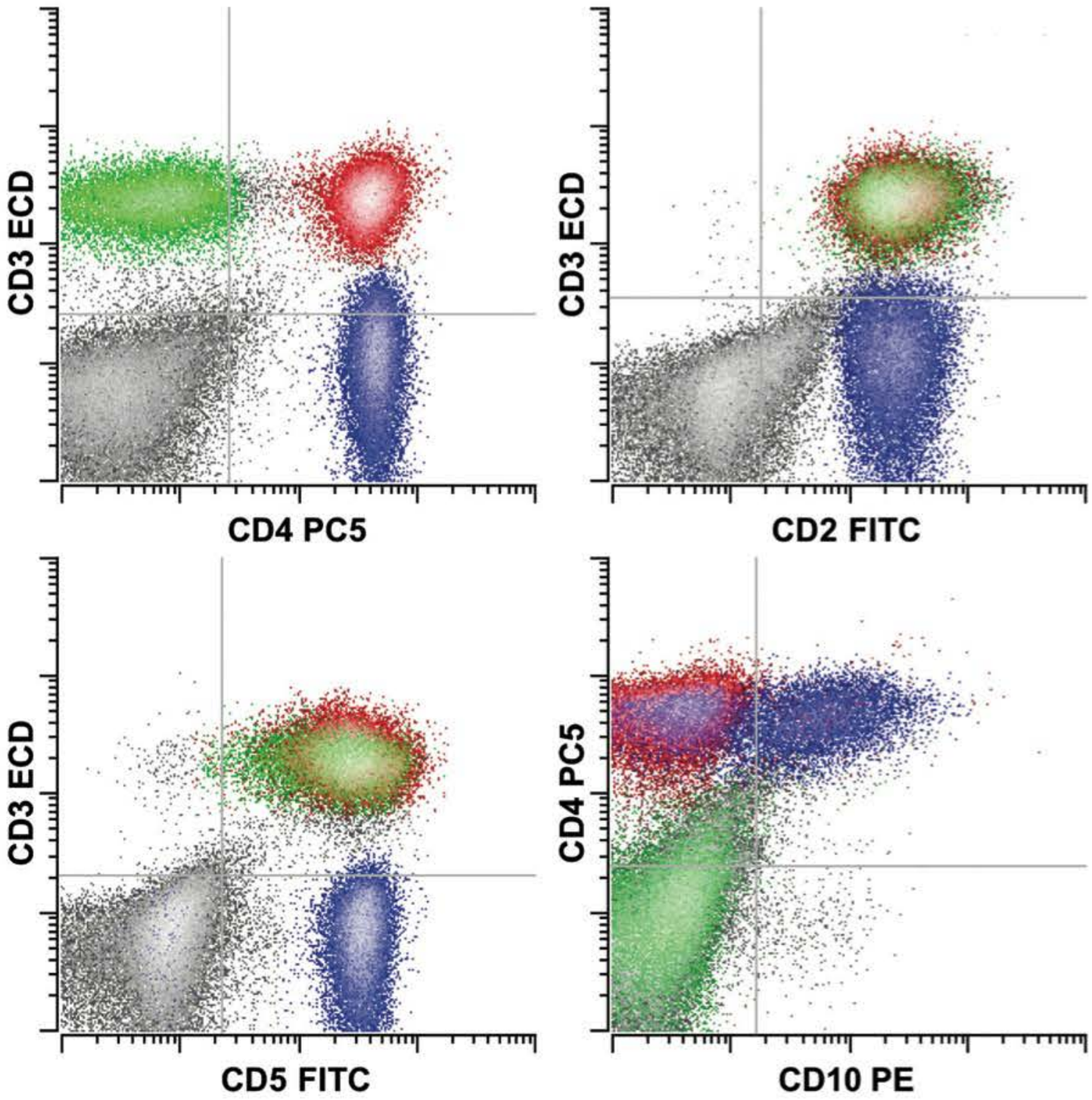


Figura 33.20 Linfoma angioimunoblástico de células T. A população neoplásica de células T (azul) mostra expressão dos antígenos associados à célula T CD2 (intermediária) e CD5 (intermediária), em paralelo ao antígeno CD4 da célula T auxiliar. A expressão de CD3, contudo, está ausente. Além disso, as células neoplásicas coexpressam CD10. O imunofenótipo composto é caracteristicamente aquele observado no linfoma de células T angioimunoblástico.

a um padrão aberrante de expressão de antígenos de célula T pode ser útil na identificação do linfoma de células anaplásicas grandes (Juco, 2003). Por fim, o distúrbio linfoproliferativo grande granular (leucemia linfocítica grande granular) em geral é caracterizado por uma expansão clonal de células T $CD8^+$ que apresentem uma expressão variável reduzida de CD5 ou CD7, bem como expressão de antígenos associados à célula NK, tais como CD57, CD56 ou CD16 (Richards, 1995). Entretanto, expansões clonais similares podem ser observadas em uma grande variedade de condições não neoplásicas, de modo que é necessário saber o contexto clínico em que as mesmas ocorrem para compreender seu significado clínico.

Fatores prognósticos

Como já mencionado, a citometria de fluxo é muito empregada para avaliar marcadores de importância prognóstica na LLC, entre os quais CD38 (Damle, 1999) e ZAP70 (Crespo, 2003). Apesar da ampla disponibilidade desses ensaios, a interpretação de seus resultados é problemática. A distribuição do CD38 nas células da LLC muitas vezes é contínua e indiscreta, e critérios arbitrários têm sido utilizados para distinguir casos positivos e negativos. Esse problema adquire proporções ainda maiores quando se avalia a expressão de ZAP70. Esta, por vezes, é muito fraca; assim, surgiram questões acerca do melhor método para determinar a positividade. Todavia, a maioria dos casos é claramente positiva ou negativa para cada um desses marcadores, e muitos trabalhos publicados, que utilizam técnicas variadas, demonstraram seu significado prognóstico. Entretanto, um certo número de casos com positividade limítrofe é considerado de maneira mais adequada como casos de expressão indeterminada. Até o presente, não foram encontrados marcadores prognósticos em outros tipos de linfomas que sejam tão bem estabelecidos quanto os marcadores da LLC/LLP.

Alvos terapêuticos

O anticorpo mais utilizado para fins terapêuticos é o antiCD20 (rituxamab). A determinação da expressão de CD20 é essencial para estabelecer a adequação dessa terapia, ainda que a molécula seja expressa na grande maioria dos linfomas de células B. Após a terapia, embora células B possam persistir, apresentam perda da expressão do CD20. A avaliação das amostras que empregam mais de um marcador de célula B, como a combinação de CD19 e CD20, é útil para demonstrar a presença de células B residuais que não expressam CD20. Anticorpos anti-CD52 (alemtuzamab) ocasionalmente são utilizados no tratamento de casos de linfoma refratários. Por conta dos efeitos colaterais associados a essa terapia, o registro da expressão dessa molécula se torna importante, ainda que a maioria dos linfomas expresse CD52.

Detecção de doença residual mínima

A detecção de baixos níveis de envolvimento pode ser importante para o estadiamento acurado de pacientes com linfoma (Douglas, 1999). Isso é particularmente aplicável aos estudos realizados em medula óssea, nos quais pequenas populações de células B com restrição de cadeia leve são detectadas em casos cuja morfologia é negativa ou equivocada (Stacchini, 2003; Sanchez, 2002; Palacio, 2001; Duggan, 2000), embora o aspecto custo-efetividade dessa abordagem tenha sido questionado (Hanson, 1999). De modo semelhante, o sangue periférico pode ser avaliado quanto à presença de linfomas, com a finalidade de auxiliar na determinação do momento ou da adequação da coleta de células-tronco. Nesse caso, o produto de células-tronco obtido pode ser testado quanto à presença de linfoma residual, a fim de minimizar a quantidade de tumor que é reinfundida nos pacientes submetidos a transplantes de medula óssea. Assim como na leucemia aguda, estudos sobre doença residual mínima foram aplicados a pacientes com LLC e demonstraram a existência de uma associação

entre a presença de doença residual após a terapia e a ausência de eventos e sobrevida geral (Moreton, 2005; Rawstron, 2001). Em tais casos, os métodos que demonstram as populações clonais de células B com restrição de cadeia leve não são tão sensíveis quanto aqueles que se baseiam na detecção de pequenas populações fenotipicamente aberrantes que adotam princípios similares aos empregados nos casos de leucemia aguda.

Neoplasias de plasmócitos

As neoplasias de plasmócitos em geral não são difíceis de identificar por citometria de fluxo (Ruiz-Arguelles, 1994; Ocqueteau, 1998). A expressão luminosa de CD38 e/ou CD138 é utilizada para reconhecer a população de plasmócitos, cujas anormalidades são a reduzida expressão de CD45 e CD19 e uma coexpressão anormal de CD56 ou CD117 combinadas à detecção de uma restrição de cadeia leve citoplasmática. A Figura 33.21 ilustra um exemplo de anormalidade imunofenotípica encontrada em neoplasias de plasmócitos. É importante admitir que a análise por citometria de fluxo tipicamente subestima o porcentual de plasmócitos presentes em uma determinada amostra, às vezes de forma dramática, possivelmente em decorrência de agregação e apoptose dessas células.

Síndromes mielodisplásicas e distúrbios mieloproliferativos

Os mesmos princípios adotados para identificar outras neoplasias hematopoéticas são aplicáveis à identificação das síndromes mielodisplásicas e distúrbios mieloproliferativos (Kussick, 2003a, b; Wells, 2003; Elghetany, 1998). Anormalidades que envolvem a expressão antigênica podem ser detectadas em blastos mieloides, neutrófilos e monócitos em maturação. Entre essas anormalidades, as mais comuns

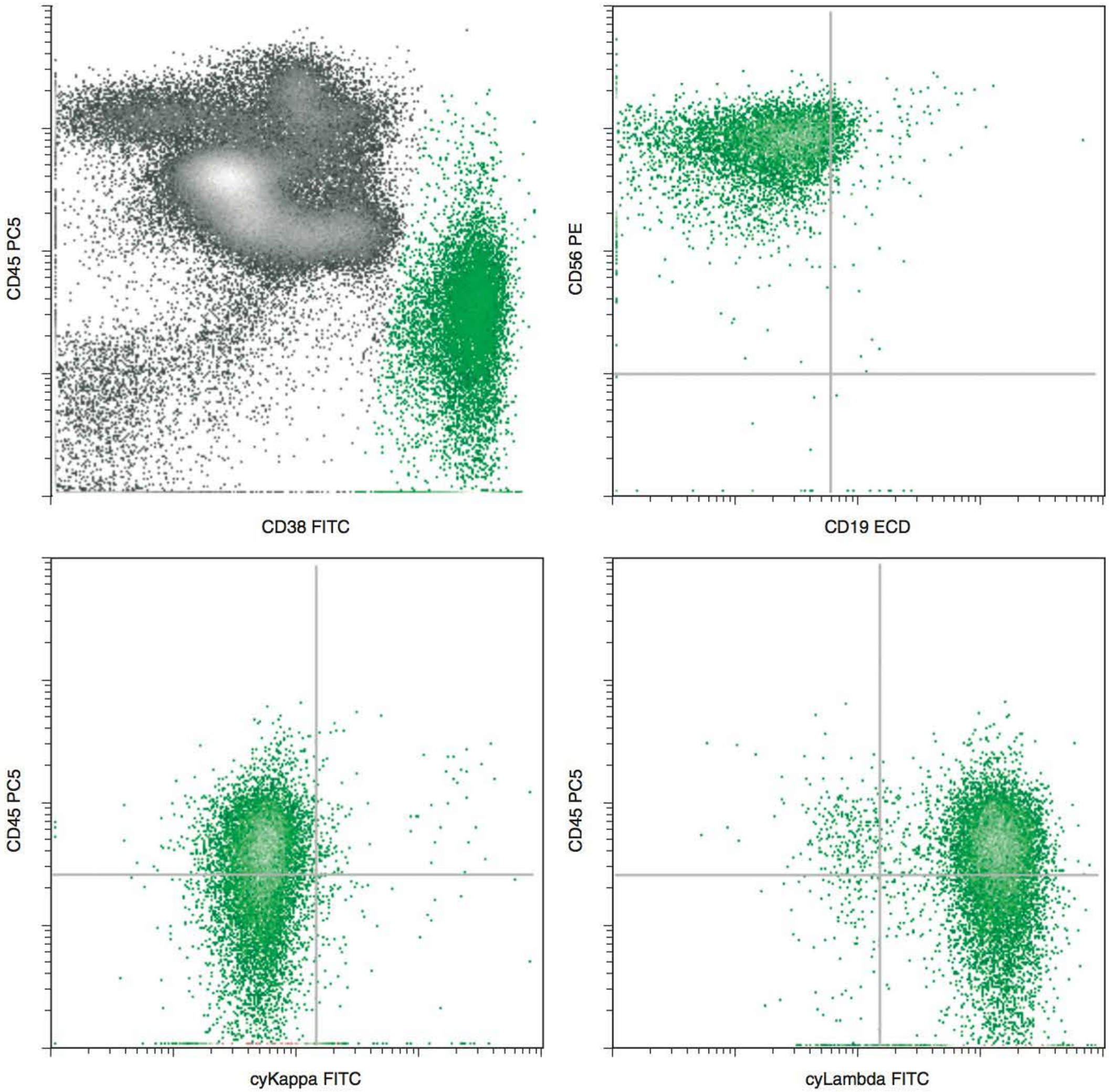


Figura 33.21 Neoplasia de plasmócitos. A população neoplásica de plasmócitos (verde) é identificada pela expressão brilhante de CD38, porém mostra expressão anormal de CD45 (baixa), CD19 (ausente) e restrição de cadeia leve citoplasmática λ, com expressão aberrante de CD56 (brilhante). Esse imunofenótipo é caracteristicamente aquele observado em uma variedade de neoplasias de plasmócitos, incluindo mieloma múltiplo, plasmocitoma e gamopatia monoclonal de significado incerto (MGUS). A classificação definitiva requer correlação clínica e laboratorial.

são alterações da intensidade da expressão de CD34, CD117 e HLA-DR, bem como expressão aberrante de antígenos como CD7 ou CD56 em blastos mieloides, padrões anormais de expressão de CD13 e CD16 e diminuição da dispersão lateral em neutrófilos em processo de maturação, além da expressão aberrante de CD56 em monócitos em maturação (Kussick, 2003b; Wells, 2003). Anomalias semelhantes e uma basofilia adicional podem ser identificadas em distúrbios mieloproliferativos (Kussick, 2003a), embora tenham sido menos estudadas. Enquanto as anormalidades podem ser demonstradas em essencialmente todos os casos que apresentam irregularidades citogenéticas, a mielodisplasia de baixo grau que afeta sobretudo a linhagem eritroide, bem como policitemia vera e trombocitemia essencial, não são identificadas de forma consistente até o momento, e novos métodos se fazem necessários. A Figura 33.22 ilustra um exemplo de anormalidade imunofenotípica encontrada na mielodisplasia.

Hemoglobinúria paroxística noturna

Certos distúrbios hematopoéticos não neoplásicos podem ser diagnosticados ao utilizar os mesmos princípios adotados para a identificação das neoplasias hematopoéticas. A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é um distúrbio clonal de células-tronco adquirido, que se caracteriza pela perda de proteínas de superfície celular em toda a progênie de células-tronco hematopoéticas, incluindo eritrócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas. A perda dessas proteínas decorre de uma mutação que envolve uma enzima essencial à síntese da ligação glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), utilizada para ligar essas proteínas à superfície celular. A perda das proteínas ligadas por GPI é prontamente detectada por citometria de fluxo (Richards, 2000), e este é o principal método diagnóstico para essa doença. Para fins de exame clínico, recomenda-se que ao menos dois antígenos ligados por GPI sejam avaliados em no mínimo duas linhagens celulares distintas. Os antígenos mais avaliados são CD55 e CD59, tanto em eritrócitos quanto em leucócitos sanguíneos; CD14 em monócitos; e CD66b em granulócitos. Plaquetas e linfócitos em geral não são avaliados. Outro reagente cada vez mais utilizado no diagnóstico da HPN é um derivado fluorescente de uma forma mutante de toxina bacteriana – a aerolisina. Essa molécula se liga especificamente à ligação GPI e pode identificar células deficientes dessa ligação com alto grau de sensibilidade e especificidade (Brodsky, 2000).

Resumo

A citometria de fluxo é uma técnica eficiente, rápida e custo-efetiva para identificação e monitoramento de neoplasias hematopoéticas. O sucesso de sua implantação requer atenção cuidadosa ao desempenho do equipamento e dos reagentes utilizados, bem como sólidos conhecimentos de trabalho acerca dos padrões normais de expressão antigênica das células hematopoéticas.

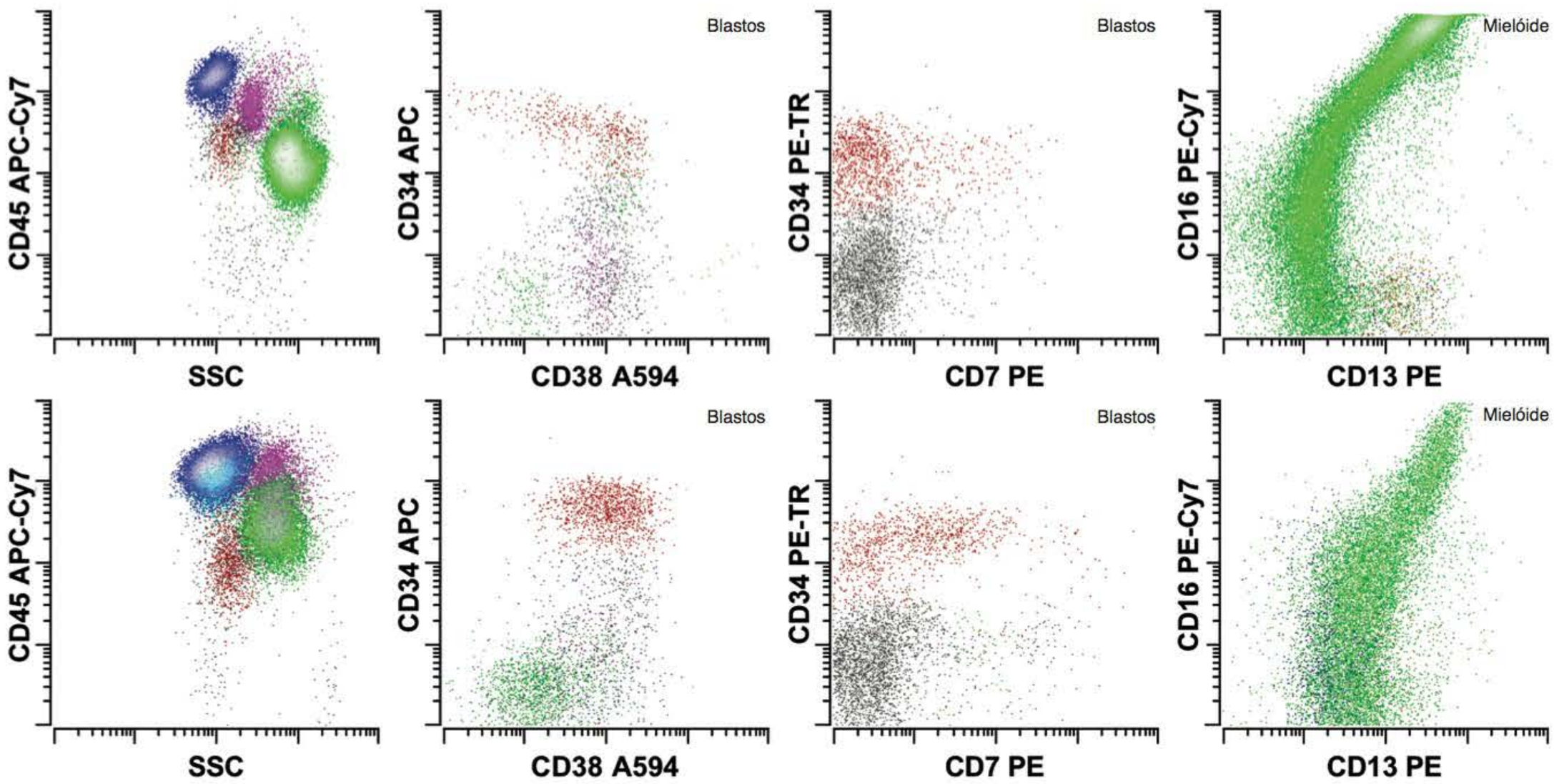


Figura 33.22 Mielodisplasia. Uma amostra obtida de paciente com mielodisplasia de baixo grau (linha inferior) é comparada a uma amostra de medula óssea normal (linha superior). As anormalidades comumente encontradas na mielodisplasia são hipogranularidade de neutrófilos indicada por uma reduzida dispersão lateral (esquerda), diminuição da expressão de CD45 em blastos (vermelho, esquerda), homogeneidade de blastos mieloides (vermelho, esquerda, centro), aquisição de antígenos associados à célula linfoide (CD2, CD5, CD7 ou CD56) em blastos mieloides (direita, centro) e padrões anormais de maturação mielomonocítica, como expressão irregular de CD13 e CD16 em formas neutrofílicas em maturação (direita). A redução da dispersão lateral é mais bem observada quando se compara as posições relativas de neutrófilos (verde) e monócitos (vermelho-carmim). É a presença combinada dessas anormalidades que sugere um distúrbio de células-tronco mieloides, como mielodisplasia.

Referências bibliográficas

Almasri NM, Iturraspe JA, Braylan RC: CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles. Arch Pathol Lab Med 1998; 122(6):539–544.

Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, et al: Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. Blood 2002; 99(2):627–633.

Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, et al: Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). Blood 1997; 90:1643–1648.

Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, et al: High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). Blood 2001; 97(11):3574–3580.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995; 9(10):1783–1786.

Bogen SA, Pelley D, Charif M, et al: Immunophenotypic identification of Sezary cells in peripheral blood. Am J Clin Pathol 1996; 106(6):739–748.

Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, et al: Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. Am J Clin Pathol 1993; 100(5):534–540.

Bradstock K, Matthews J, Benson E, et al: Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. Blood 1994; 84(4):1220–1225.

Braylan RC, Benson NA: Flow cytometric analysis of lymphomas. Arch Pathol Lab Med 1989; 113(6):627–633.

Braylan RC, Benson NA, Iturraspe J: Analysis of lymphomas by flow cytometry. Current and emerging strategies. Ann N Y Acad Sci 1993; 677:364–378.

Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al: Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. Am J Clin Pathol 2000; 114(3):459–466.

Campana D: Determination of minimal residual disease in leukemia patients. British Journal of Haematology 2003; 121:823–838.

Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, et al: Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. Cytometry 1992; 13(1):68–74.

Chang A, Benda PM, Wood BL, et al: Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. Am J Clin Pathol 2003; 119(5):643–655.

Chen W, Asplund SL, McKenna RW, et al: Characterization of incidentally identified minute clonal B-lymphocyte populations in peripheral blood and bone marrow. Am J Clin Pathol 2004; 122(4):588–595.

Cook JR, Craig FE, Swerdlow SH: bcl-2 expression by multicolor flow cytometric analysis assists in the diagnosis of follicular lymphoma in lymph node and bone marrow. Am J Clin Pathol 2003; 119(1):145–151.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 96:2691–2696.

Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine 2003; 348(18):1764–1775.

Damle RN, Wasil T, Fais F, et al: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94(6):1840–1847.

Douglas VK, Gordon LI, Goolsby CL, et al: Lymphoid aggregates in bone marrow mimic residual lymphoma after rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma. Am J Clin Pathol 1999; 112(6):844–853.

Duggan PR, Easton D, Luider J, et al: Bone marrow staging of patients with non-Hodgkin lymphoma by flow cytometry: correlation with morphology. Cancer 2000; 88(4):894–899.

Dworzak MN, Froschl G, Printz D et al: Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 99:1952–1958.

Elghetany MT: Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. Haematologica 1998; 83(12):1104–1115.

Farahat N, Lens D, Zomas A, et al: Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors. Br J Haematol 1995; 91(3):640–646.

Feller N, van der Pol MA, van Stijn A, et al: MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia. Leukemia 2004; 18(8):1380–1390.

Fukushima PI, Nguyen PK, O'Grady P, et al: Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. Cytometry 1996; 26(4):243–252.

Geary WA, Frierson HF, Innes DJ, et al: Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non--Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. Mod Pathol 1993; 6(2):155–161.

Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, et al: Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. Br J Haematol 1996a; 93(4):921–927.

Ginaldi L, Farahat N, Matutes E, et al: Differential expression of T cell antigens in normal peripheral blood lymphocytes: a quantitative analysis by flow cytometry. J Clin Pathol 1996b; 49(7):539–544.

Hanson CA, Abaza M, Sheldon S, et al: Biphenotypic leukaemia: immunophenotypic and cytogenetic analysis. Br J Haematol 1993; 84(1):49–60.

Hanson CA, Kurtin PJ, Katzmann JA, et al: Immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow in the staging of B-cell malignant lymphoma. Blood 1999; 94(11):3889–3896.

Harada H, Kawano MM, Huang N, et al: Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. Blood 1993; 81(10):2658–2663.

Hoffkes HG, Schmidtke G, Uppenkamp M, et al: Multiparametric immunophenotyping of B cells in peripheral blood of healthy adults by flow cytometry. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3(1):30–36.

Hrusak O, Porwit-MacDonald A: Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Leukemia 2002; 16:1233–1258.

Inghirami G, Zhu BY, Chess L, et al: Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the gamma/delta T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. Am J Pathol 1990; 136(2):357–367.

Jacobberger JW: Flow cytometric analysis of intracellular protein epitopes. *In* Stewart C, Nicholson JKA (eds): Immunophenotyping, 1st ed. New York, Wiley-Liss, 2000, pp 361–406.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 1st ed. Lyon, IARC Press, 2001.
Texto definitivo e bem ilustrado que expõe a classificação mais moderna e abrangente da doença hematopoética humana, obtida por meio do consenso internacional.

Juco J, Holden JT, Mann KP, et al: Immunophenotypic analysis of anaplastic large cell lymphoma by flow cytometry. Am J Clin Pathol 2003; 119(2):205–212.

Khalidi HS, Medeiros LJ, Chang KL, et al: The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French–American–British classification, and karyotypic abnormalities. Am J Clin Pathol 1998; 109(2):211–220.

Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, et al: Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French–American–British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol 1999; 111(4):467–476.

Kussick SJ, Wood BL: Four-color flow cytometry identifies virtually all cytogenetically abnormal bone marrow samples in the workup of non-CML myeloproliferative disorders. Am J Clin Pathol 2003a; 120(6):854–865.

Kussick SJ, Wood BL: 4 color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. Arch Pathol Lab Med 2003b; 127:1140–1147.

Kussick SJ, Kalnoski M, Braziel RM, et al: Prominent clonal B-cell populations identified by flow cytometry in histologically reactive lymphoid proliferations. Am J Clin Pathol 2004; 121(4):464–472.

Li S, Eshleman JR, Borowitz MJ: Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma. Am J Clin Pathol 2002; 118(2):229–234.

Lima M, Almeida J, Santos AH, et al: Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alphabeta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. Am J Pathol 2001; 159(5):1861–1868.

Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, et al: Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4+ Sezary's syndrome. Haematologica 2003; 88(8):874–887.

Linenberger ML: CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. Leukemia 2005; 9(2):176–182.

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, et al: Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. Blood 1987; 70(5):1316–1324.

Loken MR, Shah VO, Hollander Z, et al: Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. Pathol Immunopathol Res 1988; 7(5):357–370.

Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, et al: Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. Leukemia 1999; 13(3):419–427.

Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al: Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. Ann Hematol 1995a; 70(4):189–194.

Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, et al: Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. Leukemia 1995b; 9(6):993–998.

McClanahan J, Fukushima PI, Stetler-Stevenson M: Increased peripheral blood gamma delta T-cells in patients with lymphoid neoplasia: A diagnostic dilemma in flow cytometry. Cytometry 1999; 38(6):280–285.

McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, et al: Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood 2001; 98(8):2498–2507.

Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al: Immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia 1994a; 8(10):1640–1645.

Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al: The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. Leuk Lymphoma 1994b; 14 Suppl 1:57–61.

Matutes E, Morilla R, Farahat N, et al: Definition of acute biphenotypic leukemia. Haematologica 1997; 82(1):64–66.

Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al: Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. J Clin Oncol 2005; 23:1–9.

Morice WG, Kurtin PJ, Leibson PJ, et al: Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. Br J Haem 2003; 120:1026–1036.

Morice WG, Kimlinger T, Katzmann JA, et al: Flow cytometric assessment of TCR-Vbeta expression in the evaluation of peripheral blood involvement by T-cell lymphoproliferative disorders: a comparison with conventional T-cell immunophenotyping and molecular genetic techniques. Am J Clin Pathol 2004; 121(3):373–383.

Murphy M, Fullen D, Carlson JA: Low CD7 expression in benign and malignant cutaneous lymphocytic infiltrates: experience with an antibody reactive with paraffin-embedded tissue. Am J Dermatopathol 2002; 24(1):6–16.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical applications of flow cytometry: immunophenotyping of leukemic cells; approved guideline. NCCLS Document H43-A, Vol 18, No 8, 1998.
Documento de referência útil, que trata de questões técnicas relacionadas ao desempenho clínico da citometria de fluxo para leucemia e linfoma.
Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al: Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. Am J Pathol 1998; 152(6):1655–1665.
Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, et al: The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RAR alpha gene rearrangements. Haematologica 1999; 84(5):405–412.
Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, et al: Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. Cytometry A 2004; 58:62–71.
Palacio C, Acebedo G, Navarrete M, et al: Flow cytometry in the bone marrow evaluation of follicular and diffuse large B-cell lymphomas. Haematologica 2001; 86(9):934–940.
Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ, et al: Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Am J Pathol 1987; 128:181–201.
Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, et al: Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). Blood 1996; 87(3):1162–1169.
Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, et al: Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. Blood 2001; 98(1):29–35.
Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al: Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of 'indolent' chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. Blood 2002; 100(2):635–639.
Reading CL, Estey EH, Huh YO, et al: Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. Blood 1993; 81(11):3083–3090.
Richards SJ, Short M, Scott CS: Clonal CD3+CD8+ large granular lymphocyte (LGL)/NK-associated (NKa) expansions: primary malignancies or secondary reactive phenomena? Leuk Lymphoma 1995; 17(3–4):303–311.
Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P: Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cytometry 2000; 42(4):223–233.
Robbins BA, Ellison DJ, Spinosa JC, et al: Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. Blood 1994; 82(4):1277–1287.
Roederer M: Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. Cytometry 2001; 45:194–205.
Ruiz-Arguelles GJ, San Miguel JF: Cell surface markers in multiple myeloma. Mayo Clin Proc 1994; 69(7):684–690.
Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B et al: Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. Leukemia 2002; 16(8):1460–1469.
San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. Blood 2001; 98(6):1746–1751.
Schabath R, Ratei R, Ludwig WD: The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 2003; 16(4):613–628.
Serke S, van Lessen A, Hummel M, et al: Circulating CD4+ T lymphocytes with intracellular but no surface CD3 antigen in five of seven patients consecutively diagnosed with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Cytometry 2000; 42(3):180–187.
Serke S, Schwaner I, Yordanova M, et al: Monoclonal antibody FMC7 detects a conformational epitope on the CD20 molecule: evidence from phenotyping after rituxan therapy and transfectant cell analyses. Cytometry 2001; 46(2):98–104.
Shapiro HM: Practical Flow Cytometry, 4th ed. New York, Wiley-Liss, 2003.
Exposição definitiva de aspectos técnicos relacionados à citometria de fluxo.
Stacchini A, Demurtas A, Godio L, et al: Flow cytometry in the bone marrow staging of mature B-cell neoplasms. Cytometry B Clin Cytom 2003; 54(1):10–18.
Stelzer GT, Shults KE, Loken MR: CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. Ann N Y Acad Sci 1993; 677:265–280.
Stewart CC, Mayers GL: Kinetics of antibody binding to cells. *In* Stewart C, Nicholson JKA (eds): Immunophenotyping, 1st ed. New York, Wiley-Liss, 2000, pp 1–22.
O volume inteiro constitui uma referência geral excelente e moderna para uso na imunofenotipagem em uma variedade de circunstâncias.
Terstappen LW, Loken MR: Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow cytometry. Anal Cell Pathol 1990b; 2(4):229–240.
Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, et al: Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. Blood 1990a; 76(9):1739–1747.
Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, et al: Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. J Leukoc Biol 1990c; 48(2):138–148.
Terstappen LW, Safford M, Konemann S, et al: Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. Leukemia 1992a; 6(1):70–80.
Terstappen LW, Huang S, Picker LJ: Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. Blood 1992b; 79(3):666–677.
Tworek JA, Singleton TP, Schnitzer B, et al: Flow cytometric and immunohistochemical analysis of small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, and plasmacytoid small lymphocytic lymphoma. Am J Clin Pathol 1998; 110(5):582–589.
US–Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by cytometry. Bethesda, Maryland, November 16–17, 1995. Cytometry 1997; 30(5):213–274.
Descrição abrangente das diretrizes de consenso para o desempenho prático da citometria de fluxo clínica no diagnóstico da leucemia e do linfoma.
Vidriales M, San Miguel JF, Orfao A, et al: Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. Best Pract Res Clin Haem 2003; 16:599–612.
Voskova D, Schoch C, Schnittger S, et al: Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. Cytometry B Clin Cytom 2004; 62B(1):25–38.
Weir EG, Cowan K, LeBeau P, et al: A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. Leukemia 1999; 13(4):558–567.
Weir EG, Borowitz MJ: Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. Semin Hematol 2001; 38:124–138.
Wells DA, Benesch M, Loken MR, et al: Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2003; 102:394–403.
Wood BL: Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. Methods Cell Biol 2004; 75:559–576.
Yang W, Agrawal N, Patel J, et al: Diminished expression of CD19 in B-cell lymphomas. Cytometry B Clin Cytom 2005; 63(1):28–35.

CAPÍTULO 34

Imuno-hematologia

Wendy V. Beadling MS MT(ASCP)SBB, Laura Cooling MD MS

Conceitos imuno-hematológicos básicos 717
Antígenos dos grupos sanguíneos 717
Anticorpos para grupos sanguíneos 718
Sistema complemento e bancos de sangue 719

Antígenos eritrocitários e anticorpos 721
Sistema de grupo sanguíneo ABO (ISBT nºs 001 e 018) 721
Sistema de grupo sanguíneo MNSs (ISBT nº 002) 724
Sistema de grupo sanguíneo P (ISBT nºs 003 e 028) 727
Sistema de grupo sanguíneo Rh (ISBT nº 004) 729
Sistema de grupo sanguíneo Lutheran (ISBT nº 005) 734
Sistema de grupo sanguíneo Kell e Kx (ISBT nºs 006 e 019) 735
Sistema de grupo sanguíneo Lewis (ISBT nº 007) 738
Sistema de grupo sanguíneo Duffy (ISBT nº 008) 739
Sistema de grupo sanguíneo Kidd (ISBT nº 009) 741
Sistema de grupo sanguíneo Diego (ISBT nº 010) 741
Sistema de grupo sanguíneo Cartwright (ISBT nº 011) 743
Sistema de grupo sanguíneo Xg (ISBT nº 012) 744
Sistema de grupo sanguíneo Scianna (ISBT nº 013) 744
Sistema de grupo sanguíneo Dombrock (ISBT nº 014) 744
Sistema de grupo sanguíneo Colton (ISBT nº 015) 745
Sistema de grupo sanguíneo LW (ISBT nº 016) 746
Sistema de grupo sanguíneo Chido/Rodgers (ISBT nº 017) 746
Sistema de grupo sanguíneo Gerbich (ISBT nº 020) 747
Sistema de grupo sanguíneo Cromer (ISBT nº 021) 748
Sistema de grupo sanguíneo Knops (ISBT nº 022) 749
Sistema de grupo sanguíneo Indian (ISBT nº 023) 749
Sistema de grupo sanguíneo OK (ISBT nº 024) 750
Sistema de grupo sanguíneo RAPH (ISBT nº 025) 750
Sistema de grupo sanguíneo JMH (ISBT nº 026) 750
Sistema de grupo sanguíneo I (ISBT nº 027) 750
Sistema de grupo sanguíneo GIL (ISBT nº 029) 751

Testes e procedimentos imuno-hematológicos 751
Princípios básicos – hemaglutinação 751
Teste da antiglobulina humana 753
Provas de reação cruzada 755
Detecção de anticorpo 758
Técnicas especiais de identificação de anticorpo 764
Investigação de anemia hemolítica autoimune 768
Testes diretos positivos da antiglobulina e anemia hemolítica medicamentosa 770

Referências bibliográficas 771

PONTOS-CHAVE

- Os antígenos dos grupos sanguíneos desempenham uma variedade de papéis fisiológicos, como estruturas de membrana envolvidas na manutenção da integridade do citoesqueleto dos eritrócitos, no transporte na membrana, na sinalização celular, na regulação imune do complemento e como receptores/moduladores de doença.
- Os antígenos do grupo histossanguíneo ABO expressam-se em ampla escala por todo o corpo, sendo o único grupo sanguíneo mais importante para a seleção e a transfusão de hemoderivados, bem como um dos principais fatores considerados nos transplantes de órgãos sólidos e medula óssea.
- A resposta imune do receptor à exposição a antígenos eritrocitários estranhos em decorrência de transfusão ou gravidez pode incluir a produção de anticorpo e a ativação do complemento, resultando em hemólise (p. ex., reação transfusional; doença hemolítica do recém-nascido [DHRN]).
- Testes pré-transfusões e perinatais são realizados para prevenir as reações transfusionais e a DHRN, devendo incluir avaliações sorológicas básicas de tipagem para os antígenos ABO e Rh, detecção/identificação de anticorpo e reações cruzadas.
- Reagentes para a antiglobulina humana usados em testes diretos ou indiretos são parte integrante de praticamente todas as técnicas de detecção e identificação de anticorpos eritrocitários.
- Pacientes com problemas sorológicos complexos, como anticorpos contra antígenos de alta frequência e autoanticorpos, podem requerer a utilização de uma variedade de estudos imuno-hematológicos especiais (enzimáticos, de adsorção, de eluição) para que se possa fazer uma transfusão de sangue compatível.

Conceitos imuno-hematológicos básicos

O termo *imuno-hematologia* refere-se ao estudo sorológico, genético, bioquímico e molecular dos antígenos associados a estruturas da membrana nos constituentes celulares do sangue, além das propriedades imunológicas e das reações de todos os componentes e constituentes sanguíneos. As descobertas fundamentais na área da imuno-hematologia tiveram papel integral no desenvolvimento da *medicina da transfusão*, que representa um ramo da patologia clínica que abrange a transfusão de sangue e seus componentes e derivados (ver Cap. 35). Nessa relação integrada, os imuno-hematologistas realizam uma variedade de exames sorológicos laboratoriais, avaliam e interpretam as reações observadas e promovem investigações avançadas selecionadas para ajudar no estudo da patogênese, do diagnóstico, da prevenção e do tratamento da imunização associada à transfusão, à gestação e ao transplante de órgãos. A imunogenética passou a ter um papel maior, substituindo os métodos imuno-hematológicos empregados na resolução de problemas de paternidade. Com o passar dos anos, a pesquisa no campo da imuno-hematologia contribuiu de forma significativa para o entendimento fundamental da genética humana e da imunologia e a elucidação da estrutura e da função da membrana celular, além de sua aplicação nas áreas da antropologia e da ciência forense. A hemaférese facilitou e intensificou os bancos de tecido e as terapias direcionadas com a preparação e a modificação de hemocomponentes e hemoderivados.

Antígenos dos grupos sanguíneos

A expressão grupo sanguíneo refere-se não só aos sistemas de antígenos eritrocitários codificados geneticamente, mas também à diversidade imunológica expressa por outros constituintes sanguíneos, incluindo leucócitos, plaquetas e plasma. Os antígenos constituintes do sangue que são produzidos por alelos em um único *locus* gênico ou por um grupo de *loci* estreitamente ligados que constituem um sistema antigênico de grupo sanguíneo. A maioria dos genes de grupo sanguíneo, com poucas exceções, está localizada nos cromossomos autossômicos e é herdada de acordo com as regras mendelianas da hereditariedade, levando à sua aplicação como úteis marcadores genéticos. A maioria dos alelos de grupos sanguíneos também demonstra codominância, significando que heterozigotos gênicos em um *locus* particular expressam ambos os produtos gênicos.

Muitas estruturas associadas à membrana das células sanguíneas e dos constituintes do plasma podem ser definidas como *antígenos* por terem a capacidade de reagir com um anticorpo complementar ou um receptor celular. Em sua maioria, esses antígenos também são *imunógenos*, pois são capazes de desencadear uma resposta imunológica mediada por anticorpo se introduzidos como substância estranha em um hospedeiro responsivo. Cada antígeno pode ter uma variedade de epítopos diferentes ou determinantes antigênicos específicos. Epítopos são regiões imunologicamente ativas distintas do antígeno, cuja configuração molecular confere a capacidade de interagir com receptores da membrana do linfócito ou do anticorpo complementar secretado. No processo de estimulação antigênica, muitas células estão envolvidas no reconhecimento dos vários epítopos contidos dentro de um complexo antigênico.

Imunogenicidade

A capacidade de um antígeno de desencadear resposta imune é conhecida como sua imunogenicidade. A imunogenicidade de um antígeno é determinada não só por certas características inatas do próprio antígeno, mas também pela responsividade imune do hospedeiro, determinada geneticamente. As características dos antígenos que determinam sua imunogenicidade incluem o grau de estranheza; o tamanho e a configuração celular, que podem mudar com a temperatura, o pH e o ambiente iônico; e a complexidade antigênica, conforme medida realizada pelo número de epítopos disponíveis ou determinantes antigênicos.

Os antígenos dos grupos sanguíneos variam muito na sua capacidade de desencadear uma resposta imune. Os antígenos A, B e D (Rh_o) certamente são os mais imunogênicos e, portanto, todo sangue a ser transfundido tem de ser previamente testado com relação à presença desses antígenos, comparando-se o sangue do doador com o do receptor. Aproximadamente 50 a 75% dos indivíduos negativos para o antígeno D produzem anti-D se receberem a transfusão de apenas uma unidade de sangue D positivo. Depois do antígeno D, o K é o próximo mais imunogênico, seguido pelo Fy^a e pelos antígenos comuns Rh, com base na frequência com que são encontrados seus anticorpos correspondentes. Pelo mesmo critério, outros antígenos de grupos sanguíneos comuns, como Fy^b, Jk^a, Jk^b e s, são muito menos imunogênicos. As imunogenicidades relativas de alguns antígenos eritrocitários de importância clínica estão relacionados na Tabela 34.1.

Tabela 34.1 Imunogenicidade relativa de antígenos de grupos sanguíneos selecionados clinicamente importantes

D	0,70	K	0,10
C	0,041	E	0,0338
k	0,030	e	0,0112
Fy^a	0,0046	C	0,0022
Jk^a	0,0014	S	0,0008
Jk^b	0,0006	s	0,0006

* Esses valores representam a porcentagem aproximada de pessoas negativas para um antígeno específico que, se transfundido com uma unidade de sangue positivo para o antígeno correspondente, desenvolveriam anticorpos para aquele antígeno específico. Quando a potência relativa do antígeno K é de 0,1, conforme estimada por Kornstad (1958), a potência relativa de outros grupos sanguíneos pode ser estimada conforme mostrado por Mollison (1993).

Características químicas

A composição química, a complexidade e o tamanho molecular de um antígeno determinam a maioria de suas propriedades físicas e biológicas, inclusive a imunogenicidade. Como regra geral, polissacarídeos puros não são imunogênicos, exceto em certas espécies, como humanos e camundongos (Virella, 2001). Também lipídeos puros e ácidos nucleicos não são imunogênicos, mas podem ser antigênicos, pois podem agir como haptenos. Os haptenos são grupamentos químicos bem definidos e muito pequenos para serem imunogênicos em si, mas podem induzir uma resposta de anticorpo quando ligados a uma proteína carreadora.

Embora a proteína pura possa ser imunogênica, os imunógenos mais potentes em geral são glicoproteínas macromoleculares complexas e lipoproteínas. Assim, não é surpresa que os antígenos eritrocitários sejam glicoproteínas, lipoproteínas e glicolipídeos. Experimentos com polímeros de cadeia peptídica mostraram que aminoácidos aromáticos, como a tirosina e a fenilalanina, podem contribuir de forma significativa para a imunogenicidade global (Virella, 2001). Nas glicoproteínas, a imunogenicidade também pode ser influenciada pela extensão da ramificação nas cadeias laterais de polissacarídeos. Embora a imunogenicidade de um antígeno tenha relação com a estrutura molecular complexa total, as áreas em que o antígeno se combina com o anticorpo específico (i. e., os epítopos) em geral são limitadas a uma ou a poucas estruturas simples (açúcares terminais, aminoácidos) expostas na superfície exterior e móvel da molécula (Roitt, 2001), geralmente denominadas estruturas imunodominantes porque determinam a especificidade e a energia de ligação ótima das interações antígeno-anticorpo.

Densidade antigênica

O número de sítios antigênicos em uma substância estranha, seja uma molécula complexa ou uma célula, contribui para a força e o resultado final de uma resposta imunológica. Estudos sobre os antígenos dos grupos sanguíneos demonstraram que a densidade antigênica contribui para a eficiência da ligação do anticorpo e a extensão da ativação do complemento, determinando, assim, a probabilidade de hemólise de eritrócitos.

Várias técnicas foram empregadas ao longo dos anos para determinar o número de cópias de antígenos específicos na membrana do eritrócito. Em termos históricos, o radioimunoensaio (RIA) (Hughes-Jones, 1971), o ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (Caren, 1982) e a microscopia eletrônica com a utilização de anti-imunoglobulina marcada com ferritina (Masouredis, 1980) foram usados para calcular indiretamente o número de locais antigênicos nas membranas eritrocitárias. Mais recentemente, a citometria de fluxo foi usada para quantificar e analisar a distribuição do antígeno eritrocitário em numerosos sistemas de grupos sanguíneos (Nance, 1988). A Tabela 34.2 mostra as densidades estimadas dos antígenos eritrocitários comuns.

Anticorpos para grupos sanguíneos

Imunoglobulinas e ligação ao antígeno

Imunoglobulinas são moléculas de proteína produzidas em resposta à estimulação antigênica que demonstram atividade específica de anticorpo. Para entender os anticorpos, primeiro é preciso familiarizar-se com a estrutura e a função da imunoglobulina. Nas Tabelas 34.3 e 34.4 estão resumidas as informações sobre imunoglobulinas relevantes para os bancos de sangue.

A especificidade de um anticorpo é determinada pelas regiões hipervariáveis ou determinantes da complementariedade de uma molécula de imunoglobulina. Existem 3 regiões hipervariáveis em cada uma das cadeias leves e pesadas que compreendem a molécula da imunoglobulina (Roitt, 2001). A heterogeneidade da sequência de aminoácidos nas regiões hipervariáveis, que permite a modificação na configuração das cadeias peptídicas nas alças variáveis, determina a especificidade de combinação para cada anticorpo. O sítio combinante de um anticorpo, no qual ele fica em contato físico com um determinante antigênico ou um epítopo, é denominado *parátopo*. No caso de antígenos simples e lineares (epítopos sequenciais), o sítio de combinação pode estar em contato com 5 ou 6 aminoácidos ou unidades de hexose. No caso de um antígeno de proteína globular, até 16 aminoácidos do que geralmente é um epítopo descontínuo ou conformacional podem estar em contato com o sítio combinante de anticorpo (Roitt, 2001).

A ligação envolve a formação de múltiplas ligações não covalentes entre o antígeno e os aminoácidos do parátopo. As forças atrativas entre antígeno e anticorpo, que incluem forças eletrostáticas e de van der Waal, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, tornam-se significativas quando a distância entre os grupos que interagem é pequena. Como resultado, quanto melhor a adaptação física entre epítopo e parátopo, maiores a energia global da ligação e a afinidade da reação resultante entre anticorpo e antígeno (Roitt, 2001).

Tabela 34.2 Número de locais da membrana para antígenos eritrocitários nativos selecionados, estimado por radioimunoensaio*

Antígeno	Fenótipo	Número de locais antigênicos	Antígeno	Fenótipo	Número de locais antigênicos
A	A_1 adulto,	$810–1.170 \times 10^3$	D	DCce	$9,9–14,6 \times 10^3$
	recém-nascido	$250–370 \times 10^3$		Dce	$12–20 \times 10^3$
	A_2 adulto,	$240–290 \times 10^3$		DcEe	$14–16,6 \times 10^3$
	recém-nascido	140×10^3		DCe	$14,5–19,3 \times 10^3$
	A_1B adulto	$460–850 \times 10^3$		DcE	$15,5–33,3 \times 10^3$
	recém-nascido	220×10^3		DCcEe	$23–21 \times 10^3$
	A_2B adulto,	140×103		D – –	$110–202 \times 10^3$
B	B adulto	750×10^3		D fraco (D^u)	$0,8–3 \times 10^3$
	A_1B adulto	430×10^3	c	c+C–	$70–85 \times 10^3$
I	I+	500×10^3		c+C+	$37–53 \times 10^3$
K	K+k–	$6,1 \times 10^3$	e	e+E–	$18,2–24,4 \times 10^3$
	K+k+	$3,5 \times 10^3$		e+E+	$13,4–14,5 \times 10^3$
			E	e-E+	$0,45–25,6 \times 10^3$

* Valores de Mollison (1993).

Table 34.3 Propriedades importantes das classes de imunoglobulina (Ig) humana

	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Isotipo de cadeia pesada	γ	μ	α	δ	ε
Cadeias leves	K ou λ	K ou λ	K ou λ	K ou λ	K ou λ
Número de unidades de 4 peptídeos	1	5	1 a 2	1	1
Valência (ligação a antígeno)	2	5(10)*	2 a 4	2	2
Desenvolvimento de resposta imune	Primário tardio, secundário	Primário precoce			
Meia-vida *in vivo* (dias)	21	10	6	3	2
Concentração sérica (mg/mL)	8 a 16	0,5 a 2	1,4 a 4	0 a 0,04	Traço
Percentagem de Ig sérica total	80	6	13	0 a 1	
Distribuição extravascular	Tecido	Líquidos	Secreções		Secreções
Reagentes inativados por sulfidrilo	–	++++	±		
Atravessa a placenta	Sim	Não	Não	Não	Não
Induz aglutinação	+	++++	++		
Fixa complemento	++ (clássica)	+++ (clássica)	+ (alternativa)	–	–
Liga de receptores Fcγ	+++	–	+	–	+

* Valência de 10 só é observada com haptenos muito pequenos.

Dados de Roitt (2001).

Table 34.4 Algumas propriedades conhecidas das 4 subclasses de imunoglobulina G

Subclasse de cadeia pesada	γ1	γ2	γ3	γ4
Marcadores alotípicos	a, x, f, z	N	b0, b1, b3, g, s, t etc.	4a, 4b (isoalotipos)
Meia-vida *in vivo* (dias)	21	21	7	21
Concentração sérica relativa (%)	64 a 70	23 a 28	4 a 7	3 a 4
Transferência placentária	++	±	++	++
Fixação de complemento	+++	++	++++	±
Ligação a macrófagos	+++	+	+++	±
Ligação à proteína estafilocócica A	Sim	Sim	Não	Sim
Anticorpos que exibem restrição de subclasse	Anti-Rh	Antidextranos		Anti-AHF

Dados de Roitt (2001).

Subclasses IgG1 IgG2 IgG3 IgG4 da IgG

Aloanticorpos e autoanticorpos para grupos sanguíneos

A maioria dos anticorpos para grupos sanguíneos de importância clínica enquadra-se nas classes IgG ou IgM das imunoglobulinas, com formas de IgA ocasionais encontradas entre autoanticorpos e contra antígenos em certos sistemas de grupo sanguíneo. Os anticorpos de grupos sanguíneos em geral são classificados como (1) aloanticorpo, que reage com um antígeno estranho não presente nos eritrócitos do paciente, ou (2) autoanticorpo, que reage com um antígeno das próprias células do paciente. Os autoanticorpos eritrocitários são discutidos mais adiante neste capítulo.

Alguns aloanticorpos para os antígenos eritrocitários são denominados "de ocorrência natural" – ou seja, o estímulo antigênico é desconhecido. Os anticorpos de ocorrência natural podem aparecer regularmente no soro de pessoas que não têm o antígeno correspondente, assim como no sistema de grupo sanguíneo ABO. Outros anticorpos de ocorrência natural são produzidos apenas em pequenos subconjuntos de indivíduos.

A maioria dos aloanticorpos de grupos sanguíneos é produzida como resultado da imunização a antígenos eritrocitários estranhos ou por exposição mediante transfusão de componentes sanguíneos ou durante a gravidez, em geral no momento do parto. É a presença de tais aloanticorpos para os eritrócitos que requer a seleção de componentes específicos negativos para o antígeno para a transfusão. A identificação de aloanticorpos e a seleção de componentes sanguíneos compatíveis continua sendo a função mais importante de um serviço médico de transfusão.

Sistema complemento e bancos de sangue

O complemento desempenha papel fundamental na fisiopatologia da hemólise, por causa de seu envolvimento na sensibilização e na destruição de eritrócitos transfundidos por aloanticorpo ou da destruição de eritrócitos por autoanticorpos autólogos. O complemento também é importante nos testes imuno-hematológicos.

Papel do complemento na destruição dos eritrócitos

A ligação do anticorpo aos antígenos eritrocitários é a razão mais comum para a ativação do complemento na membrana eritrocitária

in vivo. O complemento também pode ser ativado nos eritrócitos via um complexo carreador/anticorpo hapteno, como eritrócitos cobertos por penicilina e anticorpos antipenicilina. Os componentes do complemento também podem se ligar à membrana via um mecanismo inespecífico induzido por certos fármacos, ou quando eritrócitos são "espectadores inocentes" em outra reação imune.

Os complexos eritrócito-anticorpo em geral ativam o complemento pela via clássica. No entanto, o modo de destruição e a extensão da hemólise de eritrócitos dependem primordialmente da imunoglobulina envolvida e da atividade do sistema reticuloendotelial (SRE) do indivíduo.

Hemólise intravascular. A hemólise intravascular de eritrócitos em geral é causada por anticorpos direcionados contra os antígenos ABO. Raramente outros anticorpos IgM do grupo sanguíneo, bem como alguns anticorpos IgG, que são ativadores potentes do complemento (p. ex., anticorpos do sistema Kidd de grupo sanguíneo), podem induzir hemólise intravascular. Ocorre lise intravascular quando grandes quantidades de complemento são ativadas rapidamente, resultando em ativação completa da cascata do complemento, com montagem do complexo de ataque terminal da membrana (C5b6789). Esse complexo polimeriza-se formando poros na membrana eritrocitária, de modo que o líquido extracelular entra na célula, fazendo com que ela intumesça e se rompa por lise osmótica.

Hemólise extravascular. Anticorpos IgG causam a maioria dos eventos de hemólise extravascular via SRE, que remove eritrócitos cobertos por complemento. Quando os anticorpos IgG ligam-se aos eritrócitos e ativam o complemento, as proteínas reguladoras do complemento comumente param o processo de ativação no nível C3/C4. O C3b ligado a eritrócitos é degradado em iC3b, que é enzimaticamente inativo, pelo fator I e pelo fator H. O iC3b é degradado, ainda, para C3c e C3dg pelo fator I e pelo CR1, um cofator e receptor de C3b/C4b (Freedman, 1994) (Fig. 34.1). O fator acelerador de decaimento (DAF) também participa do processo, inibindo a formação e promovendo a degradação da convertase do C3 (C4b2b). Nos eritrócitos, o CR1 e o DAF conduzem os antígenos dos grupos sanguíneos Knops e Cromer, respectivamente.

De início, os eritrócitos cobertos com C3b/iC3b são rapidamente sequestrados no fígado por monócitos e macrófagos, que têm receptores para o C3b (Tab. 34.5). Embora células fagocíticas também tenham receptores para o C4b, seu papel na hemólise imune de eritrócitos – se é que desempenha algum – não está definido (Freedman, 1994). Uma parte dos eritrócitos sequestrados no fígado é imobilizada e destruída por fagocitose, com meia-vida de cerca de 2 minutos (Mollison, 1993). Entretanto, em 15 a 20 minutos, a destruição fica mais lenta, e muitas das células escapam da destruição extravascular pela ação da proteína reguladora do complemento, o fator I, conforme já foi mencionado. O C3dg, o fragmento iC3b produzido pela clivagem do fator I, continua aderido aos eritrócitos, mas não tem propriedades enzimáticas ou de opsonização. Como resultado, os eritrócitos sequestrados cobertos pelo C3dg são liberados de volta na circulação e sobrevivem normalmente (Fig. 34.1). Na circulação, o C3dg é clivado, deixando C3d aderido à membrana do eritrócito.

Na ausência de ativação do complemento, os eritrócitos cobertos por IgG são removidos por células fagocíticas via receptores Fcg. Embora a fagocitose não dependa do complemento, Mollison (1989) demonstrou que os eritrócitos cobertos com IgG e complemento tendem a apresentar remoção acelerada pelo fígado, enquanto os eritrócitos cobertos apenas com IgG tendem a ser destruídos mais lentamente no baço, exibindo um padrão de remoção com meia-vida mínima de 20 minutos. Teoricamente, os eritrócitos cobertos apenas com anticorpo

Tabela 34.5 Receptores de complemento nas células humanas

Receptor	Ligante	Distribuição
CR1 (CD35)	C3b, C4b	Eritrócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos B, células dendríticas foliculares
CR2 (CD21)	C3d, C3dg, iC3b	Células B
CR3 (CD11b/CD18)*	iC3b	Monócitos, macrófagos, neutrófilos, células *natural killers*
CR4 (CD11c/CD18)*	iC3b	

* Membros da família de receptores da integrina.

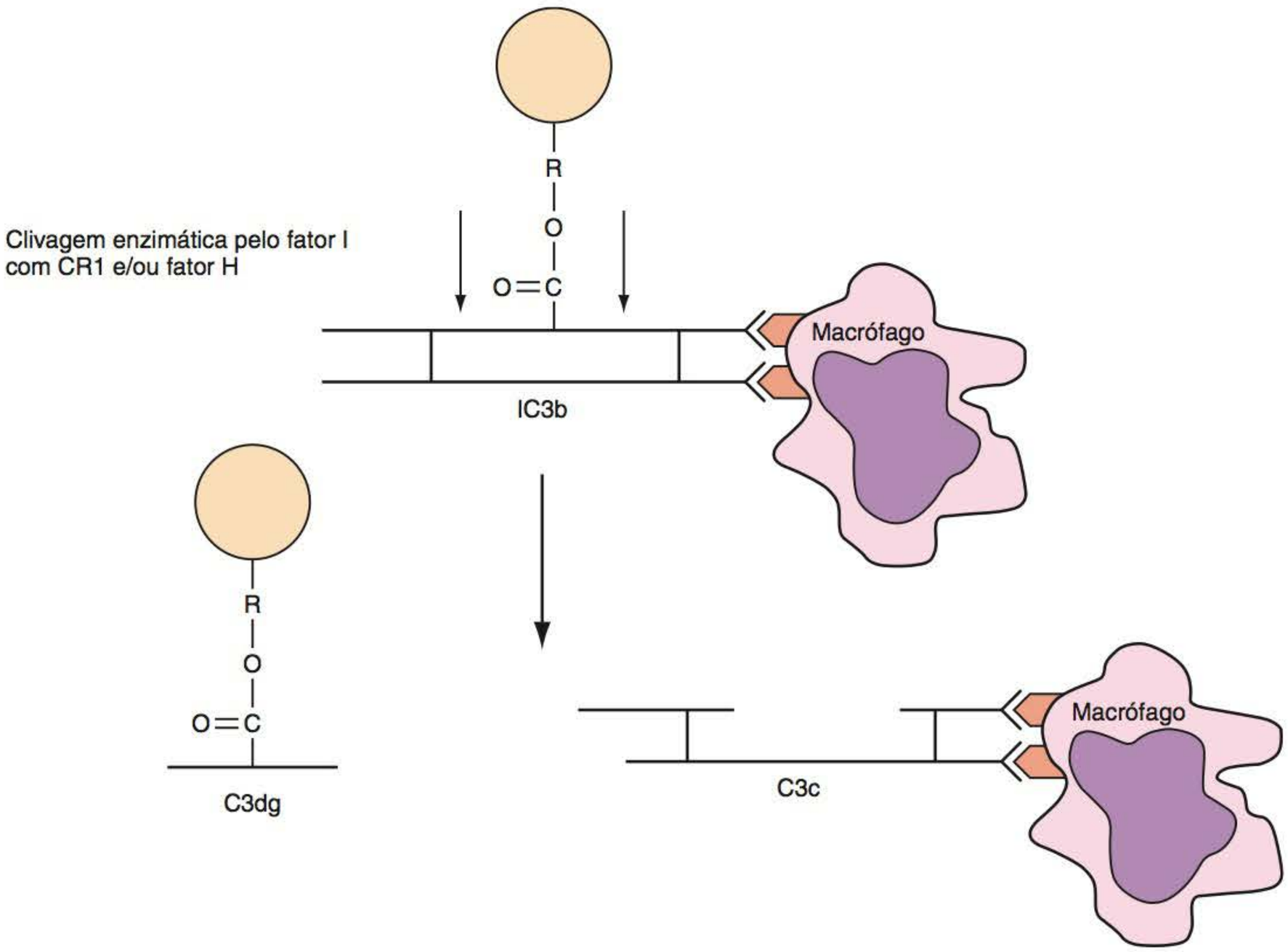


Figura 34.1 Ação do fator I na liberação de eritrócitos cobertos com C3b sequestrados do sistema reticuloendotelial.

IgG também poderiam ser os alvos de mecanismos de citotoxicidade celular dependente do anticorpo (Mollison, 1993) porque as células *natural killer* possuem receptores Fcg.

Antígenos eritrocitários e anticorpos

Mais de 700 antígenos eritrocitários foram relatados e organizados em 29 sistemas de grupos sanguíneos pela International Society of Blood Transfusion (ISBT) (Tab. 34.6). Muitos antígenos eritrocitários descritos são antígenos de alta frequência ou públicos expressos pela maioria dos doadores (mais de 90 a 99%), enquanto outros são extremamente raros (antígenos particulares). Na próxima seção, os antígenos eritrocitários e anticorpos mais comuns encontrados nos serviços de transfusão serão revistos. A Tabela 34.7 fornece um resumo dos vários aloanticorpos comumente encontrados, de acordo com sua classe de imunoglobulina, sua fase sorológica de detecção, seu significado clínico e as estatísticas sobre a existência de sangue compatível.

Sistema de grupo sanguíneo ABO (ISBT nºs 001 e 018)

Descoberto originalmente em 1900, o sistema ABO de grupo sanguíneo é o mais importante para a seleção e a transfusão de sangue. Os antígenos do grupo histossanguíneo, epítopos ABO, são encontrados em muitos tecidos e líquidos corporais, inclusive eritrócitos, plaquetas e células endoteliais (Issitt, 1998). Por sua ampla expressão, os antígenos ABO também são um dos principais elementos considerados nos transplantes de órgãos sólidos e medula óssea.

O sistema ABO de grupo sanguíneo consiste em 3 antígenos, A, B e H, e 4 fenótipos: grupos A, B, AB e O. A e B são antígenos codominantes autossômicos (ISTB nº 001) e expressam-se nos eritrócitos dos grupos A, B e AB, respectivamente. Em contraste, o fenótipo do grupo O é um fenótipo autossômico recessivo, refletindo a ausência de um gene *ABO* funcional. Os indivíduos do grupo O expressam o antígeno H (ISBT nº 018), o precursor biossintético dos antígenos A e B (Fig. 34.2). O grupo O é o fenótipo ABO mais frequente na maioria das populações testadas, em particular entre os nativos dos EUA. A expressão dos antígenos ABO nos eritrócitos em geral é acompanhada pela presença de anticorpos de ocorrência natural contra o(s) antígeno(s) antitético(s) perdido(s). A Tabela 34.8 mostra as reações sorológicas e as frequências dos 4 principais fenótipos ABO.

Fenótipos nulos e fracos

O sistema ABO também contém vários fenótipos associados à expressão do antígeno ABO enfraquecida, anômala ou mesmo completamente ausente. Os subtipos ABO mais comuns encontrados nos bancos de sangue são A_1 e A_2 (Tab. 34.9). Os doadores A1 distinguem-se dos doadores A_2 pela aglutinação dos eritrócitos A_1 pelo *Dolichos biflorus*. Uma comparação dos eritrócitos A_1 e A_2 indica diferenças

Tabela 34.6 Terminologia dos genes e dos produtos gênicos dos sistemas de grupo sanguíneo

Nomenclatura tradicional		Nomenclatura ISBT		Nomenclatura ISGN		Nome do produto gênico
Nome	Símbolo	Símbolo	Número	Gene	Cromossomo	
ABO	ABO	ABO	001	*ABO*	9q34.1	α1,3-*N*-acetilgalactosaminiltransferase (antígeno A) α1,3-galactosiltransferase (antígeno B)
MNS	MNSs	MNS	002	*GYPA* *GYPB* *GYPE*	4q28.2	Glicoforina A Glicoforina B Glicoforina E
P	P_1	P_1	003	*α4GalT1*	22q13	α1,4-galactosiltransferase (antígenos P^k, P_1)
Rh	Rh	RHD RHCE	004	*RHD* *RHCE*	1p36.1	Proteína RhD Proteína RhCE
Lutheran	Lu	LU	005	*LU*	19q13.2	Glicoproteína Lutheran, B-CAM
Kell	K	KEL	006	*KEL*	7q33	Glicoproteína Kell
Lewis	Le	LE	007	*FUT3*	19p13.3	α-3/4-fucosiltransferase
Duffy	Fy	FY	008	*DARC*	1q22	Glicoproteína Duffy associada ao receptor de citocina
Kidd	Jk	JK	009	*SLC14A1*	18q11	Transportador de ureia (HUT11)
Diego	Di	DI	010	*SLC4A1*	17q12	Intercambiador de ânion 1 (AE1, Faixa 3)
Yt	Yt	YT	011	*ACHE*	7q22	Acetilcolinesterase
Xg	Xg	XG	012	*XG*	Xp22.3	Glicoproteína Xg
Scianna	Sc	SC	013	*HERMAP*	1p34	Proteína eritroide humana associada à membrana
Dombrock	Do	DO	014	*ART4*	12p13.2	ADP-ribosiltransferase
Colton	Co	CO	015	*AQPI*	7p14	Aquaporina 1 (CHIP)
Landsteiner–Wiener	LW	LW	016	*LW*	19p13.3	Glicoproteína LW
Chido/Rodgers	Ch/Rg	CH/RG	017	*C4A, C4B*	6p21.3	Glicoproteínas do complemento C4A, C4B
Hh	Hh	H	018	*FUT1*	19q13.3	α1,2-fucosiltransferase
Kx	Kx	XK	019	*XK*	Xp21.1	Glicoproteína Kx
Gerbich	Ge	GE	020	*GYPC*	2q14	Glicoforina C e glicoforina D
Cromer	Cromer	CROM	021	*DAF*	1q32	CD55 (fator acelerador de decaimento)
Knops	Kn	KN	022	*CR1*	1q32	CD35 (receptor 1 do complemento)
Indian	In	IN	023	*CD44*	11p13	CD44
Ok	Ok	OK	024	*CD147*	19p13.3	CD147, indutor da metaloproteinase da matriz extracelular
Raph	Raph	MER2	025	*MER2*	11p15.5	Não definido
John Milton Hagen	JMH	*JMH*	026	*SEMA-L*	15q22.3	Semaforina CD108
I	I	I	027	*IGnT*	6p24	β1,6-*N*-acetilglucosaminiltransferase
Globoside	Gb4	GLOB	028	*β3GalT3*	3q25	β1,3-*N*-acetilgalactosaminiltransferase
GIL	GIL	GIL	029	*AQP3*	9p13	Aquagliceroporina

De Garratty (2000), Daniels (2002) e Reid (2004a).

Tabela 34.7 Características sorológicas e significado clínico dos aloanticorpos eritrocitários

Anticorpo	Classe Ig usual	Fase mais comum de reatividade			Significado clínico		% aproximada de doadores compatíveis	
		Solução fisiológica	Albumina	AGT	HTR	DHRN	Brancos	Negros
D	IgG	Pouco	X	X	Sim	Sim	15	8
C	IgG		X	X	Sim	Sim	30	68
E	IgG	Pouco	X	X	Sim	Sim	70	98
c	IgG		X	X	Sim	Sim	20	1
e	IgG		X	X	Sim	Sim	2	2
C^w	IgG/IgM	Algum	X	X	Sim	Sim	98	100
K	IgG	Raro		X	Sim	Sim	91	97
k	IgG		X		Sim	Sim	0,2	0,1
Kp^a	IgG	Raro		X	Sim	Sim	98	99,9
Kp^b	IgG		X		Sim	Sim	< 0,1	0,1
Js^a	IgG		X		Sim	Sim	> 99,9	81
Js^b	IgG		X		Sim	Sim	< 0,1	1
Fy^a	IgG		X		Sim	Sim	34	90
Fy^b	IgG		X		Sim	Sim	17	77
Jk^a	IgG		X		Sim	Sim	23	9
Jk^b	IgG		X		Sim	Sim	28	5
M*	IgM	X			Pouco	Sim	22	30
N	IgM	X			Raro	Raro	28	26
S	IgG/IgM		Algum	X	Sim	Sim	45	69
s	IgG			X	Sim	Sim	11	3
U	IgG			X	Sim	Sim	0	1
$Lu^{a\dagger}$	IgM	X			?	Sim	92	96
$Lu^{b\dagger}$	IgG			X	Sim	Discreto	< 0,1	< 0,1
$P_1^{\ddagger}$	IgM	X	Algum		Raro	Não	21	6
P	IgM	X	Algum	Algum	Provável	Sim	< 0,1	0,1
$PP_1P^{k\dagger}$	IgG/IgM	X	Algum	Algum	Provável	Sim	< 0,1	0,1
$Le^{a\ddagger}$	IgM	X	Algum		Sim	Não	78	77
$Le^{b\ddagger}$	IgM	X			Sim	Não	28	45
I	IgM	X	Pouco		Raro	Não	< 0,1	< 0,1
i	IgM	X	Pouco		?	Não	< 0,1	< 0,1

* A maioria dos exemplares de anti-M também tem um componente IgG pequeno mas significativo.

† Exibe padrão de aglutinação em campo misto característico.

‡ Ocasionalmente pode mostrar hemólise *in vitro*.

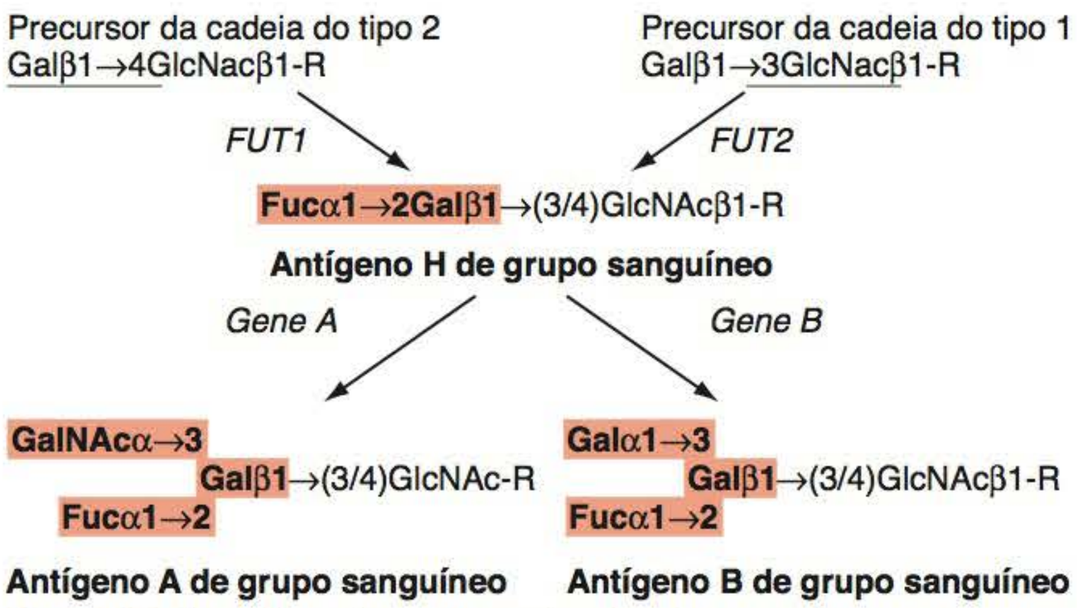


Figura 34.2 Síntese dos antígenos H e AB de cadeia do tipo 1 e do tipo 2. Os precursores (sublinhados) da cadeia do tipo 1 e do tipo 2 são fucosilados pelas fucosiltransferases *FUT1* e *FUT2* para formar o antígeno H. O antígeno H serve, então, como um substrato para as glicosiltransferases A e B. Os epítopos terminais de carboidratos denotando os antígenos de grupo sanguíneo H, A e B estão destacados. Fuc = fucose; Gal = galactose; GalNAc = *N*-acetilgalactosamina; R = outro oligossacarídeo.

tanto quantitativas quanto qualitativas na expressão do antígeno A entre os dois. O sistema ABO contém fenótipos adicionais A e B fracos. As características sorológicas de alguns subtipos A, B e O fracos são mostradas na Tabela 34.10.

Tabela 34.8 Resultados de rotina do grupo ABO e frequências dos fenótipos

Células contra antissoros conhecidos		Soro contra eritrócitos de fenótipo conhecido		Interpretação	Frequências (%) na população dos EUA			
Anti-A	Anti-B	A	B		Brancos	Negros	Nativos	Asiáticos
–	–	+	+	O	45	49	79	40
+	–	–	+	A	40	27	16	28
–	+	+	–	B	11	20	4	27
+	+	–	–	AB	4	4	< 1	5

Valores compostos calculados de Mourant (1976).

A expressão ABO anômala pode ser herdada (cis-AB, B[A]) ou adquirida (B adquirido). No fenótipo *cis*-AB, os antígenos A e B são sintetizados pela mesma enzima e herdados como um único alelo autossômico dominante. Da mesma forma, o fenótipo B(A), um fenótipo autossômico dominante que se caracteriza pela expressão do antígeno A na forma de traço sobre os eritrócitos do grupo B, deve-se à síntese de antígeno A pela enzima do gene B. O fenótipo B adquirido, por ou-

Tabela 34.9 Características diferenciais dos subgrupos A_1 e A_2

Grupo	A_1	A_2
Diferenças quantitativas		
Reação com anti-A diluído	++++	++
Nº de locais de antígeno: Adulto	1.000.000	250.000
Recém-nascido	310.000	140.000
Diferenças qualitativas		
Reação com lectina de *Dolichos biflorus* (anti-A_1)	++++	0
Anti-A_1 no soro	Não	1–8%
Diferenças bioquímicas/moleculares		
Variantes eritrocitárias de glicolipídeos contendo antígenos	A^a, A^b, A^c, A^d (cadeias lineares e complexas ramificadas)	A^a, A^b (apenas cadeias lineares)
Atividade de *N*-acetil galactosaminiltransferase	Atividade normal Ótimo em pH 6	Atividade diminuída Ótimo em pH 7
Gene Alelo A101	Consenso 101delC	Pro156>Leu, 1059- Estrutura + 21 aminoácidos extras

tro lado, é uma modificação enzimática adquirida dos eritrócitos do grupo A_1 *in vivo*. O fenótipo B adquirido em geral ocorre no contexto de infecção bacteriana ou câncer e reflete a desacetilação enzimática do antígeno do grupo A para formar um antígeno semelhante ao B nos eritrócitos. Os fenótipos *cis*-AB, B(A) e B adquirido em geral são detectados por causa de discrepências na tipagem ABO (Issitt, 1998).

Bombay e *para*-Bombay são dois fenótipos nulos raros, que se caracterizam pela ausência de todos os antígenos ABO nos eritrócitos. No fenótipo Bombay clássico (Oh), nem o antígeno AB nem o H estão presentes nos eritrócitos ou nas secreções. O *para*-Bombay também mostra poucos ou nenhum dos antígenos ABH nos eritrócitos, às vezes, acompanhados por expressão anormal de antígenos ABH em secreções e líquidos corporais.

Bioquímica

Os antígenos ABO são carboidratos e, portanto, representam uma modificação pós-tradução de glicoproteínas e glicolipídeos. Nas glicoproteínas e polilactosaminilceramidas dos eritrócitos, os antígenos ABO em geral expressam-se nas cadeias de oligossacarídeos do tipo 2, que se caracterizam pela repetição dos motivos lactosaminil (Galb 1-4GlcNAcb 1-3)$_n$ (Fig. 34.2). Nos glicoesfingolipídeos, os antígenos ABO podem expressar-se em múltiplos (cadeia dos tipos 1, 2, 3 e 4) precursores oligossacarídicos. Os antígenos ABH que se expressam nas glicoproteínas e na maioria dos glicoesfingolipídeos (cadeia dos tipos 2, 3 e 4) dos eritrócitos são de origem eritrocitária. Em contraste, a cadeia do tipo 1 de antígenos ABO é sintetizada pela mucosa gastrintestinal, secretada no plasma e adsorvida passivamente nas membranas dos eritrócitos. A síntese da cadeia do tipo 1 de antígenos ABO está ligada ao sistema Lewis de grupo sanguíneo.

A primeira etapa na síntese de antígenos ABH é a síntese do antígeno H ou do grupo O, o precursor biossintético imediato dos antígenos A e B. O antígeno H é formado pelo acréscimo de fucose (Fuc), em uma ligação a 1-2, a um terminal galactose. Essa reação é catalisada por 2 enzimas diferentes, dependendo do acréscimo da fucose a um aceptor oligossacarídico de cadeia do tipo 1 ou 2. A fucosiltransferase do tipo 1 (*FUT1*), o produto do gene H ou *FUT1*, catalisa a formação do antígeno H da cadeia do tipo 2. Em contraste, a fucosiltransferase do tipo 2 (*FUT2*), o produto do gene *Secretor*, catalisa a transferência de fucose para os precursores da cadeia do tipo 1, para formar o antígeno H, ou Le^d, da cadeia do tipo 1 (Lowe, 1994). Mutações inativadoras no *FUT1* são responsáveis pelo fenótipo Bombay e *para*-Bombay (Kelly, 1994). Bombay e *para*-Bombay não secretores também têm mutações inativadoras no *FUT2* (Lowe, 1994; Daniels, 2002).

Uma vez formado o antígeno H, ele pode servir como substrato para as glicosiltransferases dos genes *A* e *B*. O antígeno A é formado pela glicosiltransferase do gene *A*, que adiciona uma *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), em uma ligação a 1-3, à galactose subterminal do antígeno H. Do mesmo modo, o antígeno B é formado pelo acréscimo de uma a 1-3 galactose (Gal) à mesma galactose pela glicosiltransferase do gene *A*. Em termos bioquímicos, os antígenos A e B são muito semelhantes, diferindo apenas pela presença de um grupo *N*-acetil. É fascinante que tal modificação química mínima tenha consequências imunológicas tão profundas. A remoção do grupo *N*-acetil no antígeno A pelas enzimas desacetilases circulantes é responsável pelo fenótipo B adquirido (Issitt, 1998).

Tabela 34.10 Diferenciação sorológica dos grupos ABO

Fenótipo	Eritrócitos com anti- A	A_1	B	A, B	H	Soro com eritrócitos A_1	B	O	Substâncias na saliva de secretores	Nível de transferase no soro	Sítios de antígeno por eritrócito × 10^3
A^1	++++	++++	0	++++	0/+	0	++++	0	A, H	Normal (atividade ótima em pH 6,0)	810–1.170
A_{int}	++++	++	0	++++	++	0	++++	0	A, H		
A_2	++++	0	0	++++	+++	*	++++	0	A, H	Diminuído (atividade ótima em pH 7,0)	240–1.290
A_3	++[cm]	0	0	++[cm]	+++	*	++++	0	A, H	Baixo	30
A_x	0/±	0	0	++	++++	+[†]	++++	0	H	Muito baixo	4
A_m	0[‡]	0	0	0	++++	0	++++	0	A, H	Baixo (enzima A_1 ou A_2 pode estar presente)	0,2–1,9
B	0	0	++++	++++	++	++++	0	0	B, H	Normal	750
B_3	0	0	++[cm]	++[cm]	+++	++++	0	0	B, H	Baixo	
O	0	0	0	0	++++	++++	++++	0	H	Normal	1.700
O_h	0	0	0	0	0	++++	++++	++++	Nenhum[§] (Bombay clássico)	Normal	

* Pode ter anti-A_1 no soro.

† Os subgrupos A_x em geral têm anti-A_1, mas nem sempre.

‡ Uma especificidade de antígeno demonstrada apenas depois de procedimentos de adsorção-eluição.

§ Secretores Bombay (para-Bombay) foram relatados.

cm = campo misto (menor população de aglutinados).

Os genes para a síntese dos antígenos AB e H foram clonados. Tanto o *FUT1* (gene *H*) quanto o *FUT2* (gene *Se*) estão localizados juntos no cromossomo 19q13.3 e refletem uma duplicação gênica (Lowe, 1994). O *FUT1* é uma glicoproteína transmembrana do tipo II de 365 aminoácidos, composta por um grande domínio catalítico carbuxiterminal de 240 aminoácidos que está ancorado dentro do lúmen do complexo de Golgi por um domínio curto transmembrana e citosólico. Foram descritos mais de 20 alelos *FUT1* mutantes (Issitt, 1998; Fernandez-Mateos, 1998).

O *locus* do gene *ABO* está situado no cromossomo 9q34 e codifica as glicosiltransferases A e B (Yamamoto, 1995). O gene é grande, abrangendo 18 kb e contendo 7 éxons. O produto do gene *ABO* é uma glicoproteína transmembrana do tipo II de 41 kDa e 353 aminoácidos. Uma comparação entre as enzimas A e B mostra quase 98% de identidade, diferindo por 4 aminoácidos principais nos resíduos 176, 235, 266 e 268 (Tab. 34.11). O aminoácido 268 é absolutamente crítico na determinação da especificidade de atividade e substrato (UDP-GalNAc *vs* UDP-Gal) da enzima. A especificidade do substrato também é influenciada pelos resíduos dos aminoácidos 235 e 266. O polimorfismo no resíduo 176 não tem significado biológico (Yamamoto, 1990).

A clonagem e o sequenciamento do *locus* do gene *ABO* também revelou a base molecular do grupo O e dos subtipos ABO. São conhecidos mais de 20 alelos do grupo O, embora 2 mutantes de deleção (O^1 e O^{1var}) sejam os mais comuns e os genes ancestrais da maioria dos alelos do grupo O (Roubinet, 2004). É interessante o fato de que o alelo O^2 (O03), encontrado em muitos países europeus, contém uma única mutação de sentido errôneo (*missense*) no resíduo do aminoácido 268 (Tab. 34.11) (Yamamoto, 1995).

Vários subtipos ABO também são o resultado de mutações no *locus* do gene *ABO*. Duas mutações estão associadas ao alelo A^2: uma substituição Pro156>Leu e uma única deleção de nucleotídeo (nucleotídeo 1060). A última resulta na translação de 21 aminoácidos adicionais no término carboxi da enzima e é responsável pela menor atividade enzimática, pela alteração do ponto isoelétrico e pela especificidade restrita do substrato da glicosiltransferase A^2 (Yamamoto, 1995). De maneira similar, o alelo A^{el} caracteriza-se pela lise de um nucleotídeo, levando a uma mutação estrutural (aminoácido 269) e à translação de mais 37 aminoácidos (Olsson, 1995). A mutação estrutural no alelo A^{el} pode ser particularmente deletéria por sua proximidade imediata com o resíduo do aminoácido 268. Mutações pontuais isoladas parecem ser responsáveis pela menor atividade enzimática dos alelos A^3, A^x, A^{finn}, A^{end}, B^3, B^x e B^v (Yamamoto, 1995; Olsson, 2001). Em contraste, os alelos *cis*-AB e B(A), que podem sintetizar os antígenos A e B, são quimeras moleculares com características de ambos os alelos de consenso A^1 e do gene B (Tab. 34.11) (Yamamoto, 1995).

Tabela 34.11 Principais aminoácidos que distinguem glicosiltransferases A, B e híbrida*

Fenótipo dos eritrócitos	Número de aminoácidos de glicosiltransferase A/B					Tipo de gene†
	176	234	235	266	268	
A	Arg	Pro	Gly	Leu	Gly	AAAA
B	Gly	Pro	**Ser**	**Met**	**Ala**	BBBB
Cis-AB	Arg	Pro	Gly	Leu	**Ala**	AAAB
Cis-AB^{Taipei}	Arg	Pro	Gly	**Met**	Gly	AABA
Cis-AB	Gly	Pro	**Ser**	Leu	**Ala**	BBAB
B(A)	Gly	Pro	Gly	**Met**	**Ala**	BABB
B(A)	Gly	**Ala**	**Ser**	**Met**	**Ala**	BBBB
O03	Arg	Pro	Gly	Leu	**Arg**‡	AAAX

* Modificado de Reid (2004b); Daniels (2002). Os aminoácidos que diferem do alelo de consenso A101 (tipo A_1) estão realçados em negrito.

† O tipo de gene refere-se às posições dos aminoácidos 176, 235, 266 e 268. Essas 4 posições diferem entre os alelos A (AAAA) e B. Os aminoácidos nas posições 235, 266 e 268 influenciam fortemente a especificidade do substrato. Glicosiltransferases híbridas têm aminoácidos que combinam alelos A e B de consenso nessas posições.

‡ O alelo O03 (historicamente O^2), associado ao fenótipo do grupo O, tem uma mutação inativante de sentido errôneo no aminoácido 268.

Anticorpos ABO

Anticorpos contra os antígenos ABO são os mais importantes na medicina da transfusão. Em geral, os anticorpos ABO são de ocorrência natural. Acredita-se que o estímulo imune para sua formação dos possa ser a exposição a substâncias semelhantes à ABH encontradas na natureza (p. ex., polissacarídeos bacterianos). Os anticorpos ABO são fracos ou não estão presentes no soro de recém-nascidos de 3 a 6 meses de idade. Os níveis adultos de ABO são alcançados por volta dos 5 a 10 anos de idade e diminuem apenas um pouco com a idade avançada (Auf der Maur, 1993). O anti-A,B é encontrado exclusivamente em indivíduos do grupo O e parece reconhecer um epítopo comum aos antígenos A e B. Antes do desenvolvimento dos reagentes para tipagem de anticorpo monoclonal anti-A e anti-B, o anti-A,B era útil para a identificação dos subgrupos A_x e B fraco.

Em geral, os anticorpos ABO são detectados como aglutininas salinas à temperatura ambiente e a 4°C apresentam reatividade ótima (Tab. 34.7). A maioria dos anticorpos ABO de ocorrência natural é do isotipo IgM, embora também estejam presentes anticorpos IgA e IgG com especificidade ABO (Rieben, 1991). Os anticorpos ABO IgG, reativos a 37°C, também podem ocorrer após estimulação imune por transfusão ou gravidez. Geralmente, os títulos desses anticorpos são mais altos, e eles são menos rapidamente neutralizados por substâncias solúveis do grupo sanguíneo. Os anticorpos ABO podem fixar complemento e causar hemólise *in vivo* e *in vitro*.

Clinicamente, os anticorpos ABO se desenvolvem devido a reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica do recém-nascido (DHRN). Os anticorpos ABO também são uma causa de rejeição aguda nos transplantes de órgãos sólidos. Como resultado, tais transplantes devem ter compatibilidade ABO com o soro do receptor. No transplante de medula óssea incompatível com relação a ABO, os anticorpos ABO podem causar hemólise e atraso na recuperação das linhagens eritroide e de megacariócitos (Worel, 2003).

Anticorpos ABO menos comuns

Anti-A_1. O anti-A_1 é um anticorpo de ocorrência natural encontrado no soro de alguns indivíduos A_2, A_2B, A_x e A_3. O anti-A_1 hemaglutina eritrócitos A_1, mas não A_2 e outros fenótipos eitrocitários fracos. Embora incomum, o anti-A_1 está envolvido em reações transfusionais e rejeição de órgãos sólidos.

Anti-H. O anti-H em geral é um anticorpo benigno de ocorrência natural no soro de não secretores A_1 e A_1B. O anti-H reage mais fortemente com eritrócitos do grupo O, seguidos pelos A_2, A_2B, B, A_1 e A_1B (consultar a Tab. 34.48, adiante). Como o antígeno H está presente até certo ponto em todos os eritrócitos, o anti-H é um autoanticorpo na maioria dos indivíduos. Em contraste, o aloanti-H é um aloanticorpo clinicamente significativo nos indivíduos Bombay (O_h) e *para*-Bombay. Como todos os eritrócitos expressam algum antígeno H, pode ser extremamente difícil encontrar eritrócitos compatíveis nesses indivíduos.

Papel biológico

O papel biológico dos antígenos ABH ainda é desconhecido. Pode ocorrer depressão da expressão dos antígenos A e B na malignidade, estando frequentemente associada a maior potencial metastático. Além disso, múltiplos estudos ligaram tipos ABO específicos a maior incidência de muitas doenças, inclusive distúrbios autoimunes, neoplásicos e infecciosos. Para uma revisão completa da relação entre ABH e doença humana, o leitor deve consultar Issitt (1998) e Garraty (1994a).

Sistema de grupo sanguíneo MNSs (ISBT nº 002)

Descoberto em 1927, o sistema MNSs de grupo sanguíneo foi o segundo a ser identificado, depois do ABO. Hoje, consiste em mais de 43 antígenos, dos quais apenas 4 (M/N e S/s) são comumente encontrados no contexto clínico. Conforme mostrado na Tabela 34.12, os antígenos M e N estão distribuídos de forma razoavelmente uniforme em pessoas negras e brancas, com aproximadamente 25% de doadores homozigotos para o antígeno M ou do N. Em contraste, o

Tabela 34.12 Fenótipos do sistema MNSs

Antígenos da glicofornina A			Antígenos da glicofornina B				Fenótipo	Frequências do fenótipo (%)	
M	N	En (a)	'N'	S	s	U		Brancos	Negros
+	0	+					M+N–	28	26
+	+	+					M+N+	50	44
0	+	+					M–N+	22	30
			+	+	0	+	S+s–U+	11	3
			+	+	+	+	S+s+U+	44	28
			+	0	+	+	S–s+U+	45	69
Fenótipos nulos									
0	0	0	+	+/0	+/0	+	En (a–)	Raro	Raro
0	0	0	0	0	0	0	M^kM^k	Raro	Raro
			0	0	0	0	S–s–U–	Raro	< 1
			0	0	0	wk+	$S–s–U^{var}$ (23% Henshaw+)	Raro	< 1

antígeno S é quase 2 vezes mais frequente em pessoas brancas (57%) que nas negras (30%). Em uma minoria (menos de 1%) das pessoas negras, pode-se observar um fenótipo S–s– ou nulo. Como os antígenos Rh, os do grupo sanguíneo MNSs expressam-se apenas nos eritrócitos. Há cerca de um milhão de M/N, e 170 a 250 mil epítopos S/s por eritrócito.

Fenótipos nulos

Existem 3 principais fenótipos nulos no sistema MNSs, U-, M^k e En (a–). O fenótipo U– é o mais comum, sendo observado exclusivamente em pessoas negras. Nos indivíduos S-s-U-, há uma perda ou uma recombinação da glicoforina B, que leva os antígenos S/s e U. A glicoforina B recombinante, como o fenótipo Henshaw, pode reagir fracamente com alguns exemplares do anti-U humano, conhecidos como variantes U ($S–s–U^{var}$). O fenótipo En (a–) é um fenótipo M-N- decorrente da perda da glicoforina A, que carrega os antígenos M, N e En (a). O fenótipo M^kM^k perdeu todos os antígenos MNSs por causa da deleção de ambas as glicoforinas, A e B.

Bioquímica

Os antígenos M/N residem na glicoforina A, uma das principais glicoproteínas da membrana do eritrócito. Na membrana, a glicoforina A está presente como um dímero, geralmente associada à faixa 3, o intercambiador aniônico do eritrócito (AE1). Em termos estruturais, a glicoforina A é uma glicoproteína do tipo 1, de 31 kDa e 131 aminoácidos, composta por um grande domínio extracelular de 72 aminoácidos, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta (Fig. 34.3). A molécula é fortemente glicosilada, e possui 15 cadeias laterais de carboidrato ligadas ao *O* e 1 ao *N*. Os glicanos ligados ao *O* consistem em mono (17%), di (78%) e trissialo-oligossacarídeos (5%), ligados a um resíduo de serina ou treonina. Por causa do grande número de glicanos sialilados ligados ao *O* na glicoforina A, aproximadamente 60 e 50% do peso molecular total correspondem, respectivamente, a carboidrato e ácido siálico. Não é surpresa que a glicoforina A seja a principal sialomucina nos eritrócitos e contribua significativamente para a carga negativa total ou o potencial zero. Os antígenos M e N residem no amino terminal extremo da glicoforina A (Huang, 1995).

Os antígenos S/s e U residem na glicoforina B, uma glicoproteína de eritrócitos correlata (Fig. 34.3). A glicoforina B é uma glicoproteína de 20 kDa e 72 aminoácidos, composta por um grande domínio extracelular *N* terminal que contém 11 glicanos ligados ao *O*. Embora a glicoforina B compartilhe homologia considerável com a glicoforina A na terminação amino, a glicoforina B é menor, sendo que não possui glicano *N* ou cauda citoplasmática. Na membrana, a glicoforina B parece estar estreitamente associada ao complexo imune Rh. O epítopo S/s está localizado no aminoácido 29 (Issitt, 1998).

Biologia molecular

Os genes para as glicoforinas A (*GYPA*) e B (*GYPB*) residem no cromossomo 4q28-q31, como parte de um aglomerado gênico de 330 kb que codifica as glicoforinas A, B e E (5'-A-B-E-3'). Estudos indicam que as glicoforinas B e E surgem da glicoforina A, por duplicação gênica e recombinação não homóloga. Como muitos genes eritroides específicos, a região promotora contém sequências de consenso para Sp1 e GATA-1 (Rahuel, 1994). A maior estabilidade do mRNA da glicoforina A (> 24 horas) sobre o mRNA da glicoforina B (< 17 horas) pode explicar a maior quantidade de glicoforina A nos eritrócitos (Rahuel, 1994).

A natureza bioquímica dos antígenos MNSs é conhecida há muito tempo. Os antígenos M e N ficam na terminação amino extrema da glicoforina A (aminoácidos 1 a 5) e incluem tanto proteína quanto carboidrato como parte do epítopo imune. Contudo, é a diferença nas posições 1 e 5 do aminoácido que define os antígenos M e N (Tab. 34.13). Não é surpreendente que a baixa incidência de diversas variantes de M e N resulte de substituições diferentes dos aminoá-

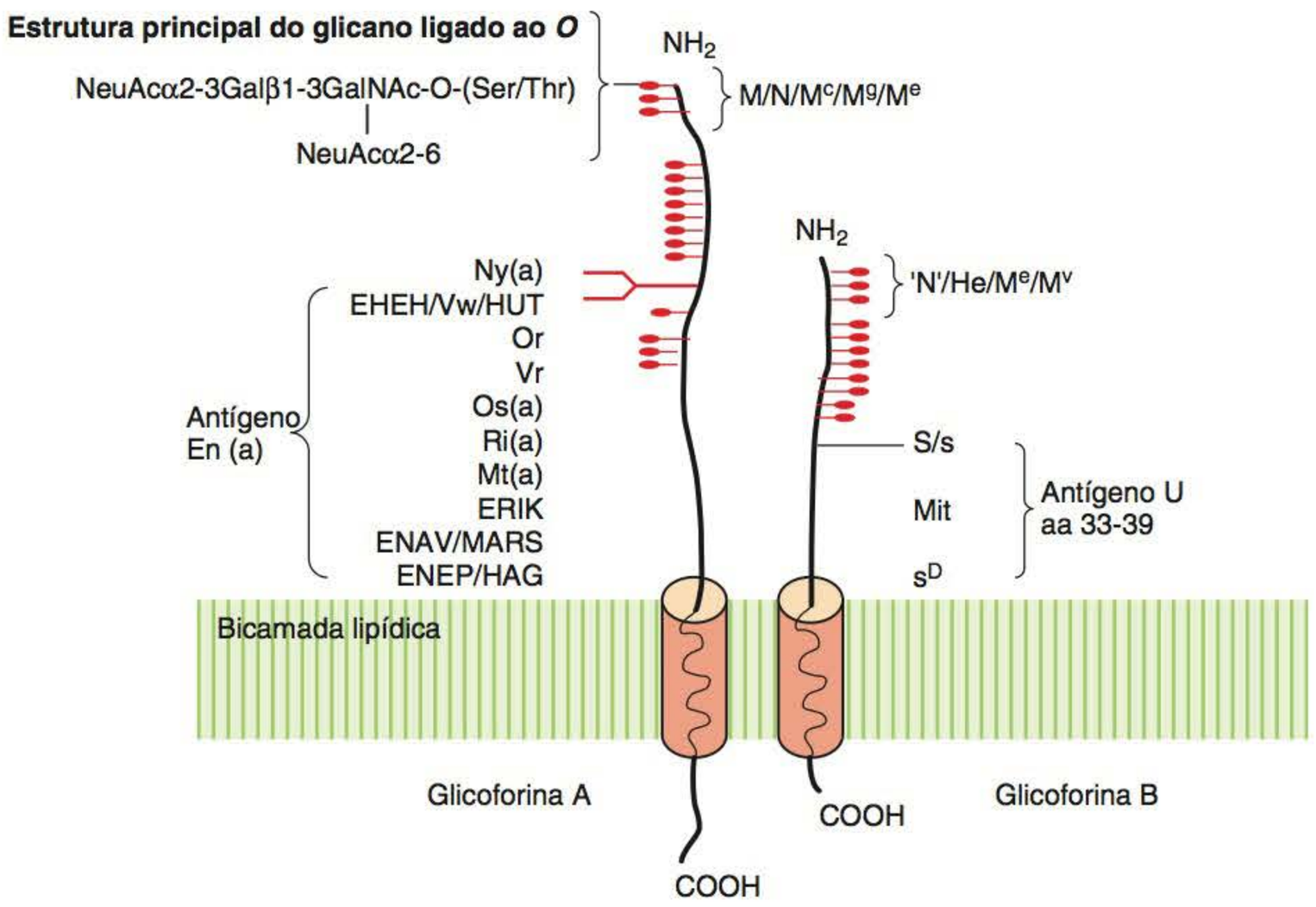


Figura 34.3 Glicoforinas A e B. A glicoforina A e a glicoforina B possuem de 11 a 15 glicanos ligados ao *O* (—•), consistindo predominantemente em um dissialotetrassacarídeo (78%), ao longo da metade amino terminal do domínio extracelular. A glicoforina A também possui um único *N*-glicano bicatenário, indicado por uma estrutura ramificada. O único domínio transmembrana de ambas as moléculas está indicado por um cilindro âmbar. Os antígenos alélicos, M e N, residem na terminação amino extrema da glicoforina A e diferem apenas por 2 aminoácidos nos resíduos 1 e 5. O antígeno N também está presente na terminação amino da glicoforina B e é designado antígeno "N". Os antígenos S/s estão localizados no aminoácido 29 da glicoforina B. As localizações dos antígenos de alta e baixa incidências são mostradas. Os antígenos En (a) e U envolvem grandes estiramentos da proteína perto da bicamada lipídica e são perdidos na deleção e nas glicoforinas recombinantes.

Tabela 34.13 Antígenos do grupo sanguíneo MNSs

Alta frequência		Frequência	Glicoforina*	Troca de amino-ácido (alto→baixo)	Frequência	Baixa frequência	
ISBT	**Nome**					**Nome**	**ISBT**
MNS1	M	78%	GPA	**Ser**[1]-Ser-Thr-Thr-**Gly**[5]			
MNS2	N	72%	GPA	**Leu**[1]-Ser-Thr-Thr-**Glu**[5]			
MNS4	s	89–93%	GPB	Thr29>Met	31–55%	S	MNS3
MNS5	U	≥ 99%	GPB	Aminoácidos 33–39		He	MNS6
			B-A^{M}-B	**Trp**[1]-Ser-Thr-Thr-**Gly**[5]	3–7% negros		
			B-A-B/A-B-A	Mutante GYP: éxons A2- Bψ[3]	Raro	Mi^{a}	MNS7
			GPA	**Ser**[1]-Ser-Thr-Thr-**Glu**[5]	Raro	M^{c}	MNS8
MNS40	ENEH	100%	GPA	Thr28>Met	Raro	Vw	MNS9
			GPA	Thr28>Lys	Raro	HUT	MNS19
			B-A-B	Mutante GYPB: pseudoéxon 3	6–9% de asiáticos	Mur	MNS10
			GPA	**Leu**[1]-Ser-Thr-**Asn**[4]-**Glu**[5]	Raro	M^{g}	MNS11
			GPA	Ser47>Tyr	Raro	Vr	MNS12
MNS13	M^{e}	78%	GPA/GP:He	Gly[5] de GPA e Henshaw+			
			GPA	Thr58>Ile	1% de tailandeses	Mt^{a}	MNS14
			B-A	Mutant GYP: éxons B2-A2/A4	2% de asiáticos	St^{a}	MNS15
			GPA	Glu55>Lys	Raro	Rl^{a}	MNS16
			Desconhecido	Desconhecido	Raro	Cl^{a}	MNS17
			GPA	Asp27>Glu	Raro	Ny^{a}	MNS18
			A-B/A-B-A	Mutante GYP: éxons A3-B4	6% de chineses	Hil	MNS20
			GPB	Leu[1]-Ser-**Ser**-Thr-Glu[5]	Raro	M^{v}	MNS21
				Desconhecido	Raro	Far	MNS22
			GPB	Pro39>Arg	Raro	s^{D}	MNS23
			GPB	Arg35>His	Raro	Mit	MNS24
			B^{s}-A	Mutante GYP: éxons B4-A5	0,5% de negros	Dantu	MNS25
			GPA	Arg49>Thr	0,7% de tailandeses	Hop	MNS26
MNS29	ENKT	100%	GPA	Arg49>Thr; Tyr52>Ser	Raro	Nob	MNS27
MNS28	En (a–)	100%	GPA	Molécula de GPA			
MNS30	'N'	> 99%	GYB	**Leu**[1]-Ser-Thr-Thr-**Glu**[5]			
			GPA	Arg31>Trp	Raro	Or	MNS31
			A-B-A	Mutante GYP: Asn45	0,4% de dinamarqueses	DANE	MNS32
			A-B^{S}	Mutante GYP: éxons A3-B4, S+	Raro	TSEN	MNS33
			A-B/B-A-B	Mutante GYP: éxons A3-B4	6% de chineses	MINY	MNS34
			B-A-B/A-ψB-A	Mutante GP: anti-Mur+HUT	6% de chineses	MUT	MNS35
			A-B	Mutante GYP: éxons A4-B5	Raro	SAT	MNS36
			GPA	Gly59>Arg	Raro	ERIK	MNS37
			GPA	Pro54>Ser	Raro	Os^{a}	MNS38
MNS39	ENEP	100%	GPA	Ala65>Pro	Raro	HAG	MNS41
MNS42	ENAV	100%	GPA	Glu63>Lys	15% de nativos americanos	MARS	MNS43

* Glicoforina A (GPA), glicoforina B (GPB) ou glicoforinas recombinantes híbridas que contêm elementos de GPA e GPB. ψB refere-se a pseudoéxons GPB.

De Daniels (2002) e Reid (2004).

cidos (M^g, M^c) e/ou de alterações na expressão dos glicanos ligados ao *O* (M_1, Tm, Can). Além da glicoforina A, o antígeno N também se expressa no amino-terminal extremo da glicoforina B, sendo conhecido como antígeno "N", para distingui-lo do antígeno N da glicoforina A (Issitt, 1998).

A glicoforina A também possui vários antígenos de alta incidência, inclusive En(a) e ENEP. O fenótipo En (a–) resulta da recombinação entre os genes *GYPA* e *GYPB* para formar o híbrido A-B do tipo Lepore (éxons A1-B2-B5), no qual falta a maior parte do *GYPA*. O alelo M^k, que também é M–N–En (a–), caracteriza-se por uma grande deleção de *GYPA* e *GYPB*, resultando em um híbrido *GYPA-E* não funcional. A perda da glicoforina A pode coincidir com a perda da expressão Wr^b, um antígeno da banda 3. Acredita-se que o Wr^b requer uma interação eletrostática entre um ácido glutâmico (Glu658) na banda 3, e o antígeno ENEP na glicoforina A (Poole, 1999).

Ao contrário da complexidade dos antígenos M/N, o antígeno S/s é um polimorfismo isolado de aminoácido na glicoforina B (Met29 Thr). O antígeno U tem alta incidência, envolvendo os aminoácidos 33 a 39 na glicoforina B. A perda dos antígenos S-s-U pode ser observada com M^k e outros alelos *GYPB* recombinantes, como o Henshaw. Estima-se que 90% dos eritrócitos Henshaw+ sejam U– ou U^{var}, sendo também responsável por 23% de todos os pacientes S–s–U–.

Os eventos de recombinação e conversão gênicas também são responsáveis por vários antígenos MNSs raros no sistema Miltenberger. Os antígenos Hil, SAT e Miltenberger das classes V e XI são híbridos do tipo Lepore da glicoforina A-B, enquanto St^a e Dantu são híbridos do tipo anti-Lepore da glicoforina B-A. Como o fenótipo Henshaw+, outros antígenos Miltenberger são consequência de conversão gênica em que segmentos de uma glicoforina são inseridos em outra para formar os híbridos glicoforina B-A-B e A-B-A (Reid, 2004b).

Anticorpos MNSs

Anti-M e anti-N

Anticorpos contra os antígenos M e N são de ocorrência natural do isotipo IgM, em geral detectados como aglutininas salinas à temperatura ambiente (Tab. 34.7). O anti-M e o anti-N podem mostrar baixa dosagem, reagindo mais fracamente com células heterozigotas (M/N) que com as homozigotas (M/M N/N). Como os antígenos M e N residem na glicoforina A, a reatividade do anti-M e do anti-N é destruída pelo tratamento prévio dos eritrócitos com enzimas proteolíticas ou neuraminidase. Alguns exemplares de anti-M e anti-N podem ser favorecidos pela acidificação do soro em pH 6,5, pelo uso de diluente ou pela incubação prévia dos eritrócitos em uma solução contendo glicose.

Em termos clínicos, o anti-M é um anticorpo comumente encontrado nos bancos de sangue. Em contraste, o anti-N é bastante incomum, apesar do fato de que 25% dos pacientes são negativos para o antígeno N (homozigotos M). A raridade do anti-N deve-se à presença do antígeno "N" na glicoforina B. Quando observado, o anti-N normalmente é um autoanticorpo, que reage tanto com o antígeno N quanto com o "N". O formaldeído usado para esterilizar equipamento de diálise reage comprovadamente com o terminal leucina nos antígenos N e "N", criando um neoantígeno (Issitt, 1998). Em geral, o anti-M e o anti-N são anticorpos insignificantes em termos clínicos, e apenas raramente causam reações transfusionais hemolíticas ou DHRN. Em contraste, são observados aloanticorpos anti-N hemolíticos potentes em pacientes sem a glicoforina B (S–s–U), nos quais são conhecidas reações hemolíticas graves e DHRN após exposição a eritrócitos N+.

Anti-S, anti-s e anti-U

Ao contrário do anti-M e do anti-N, os anticorpos contra os antígenos S, s e U sempre têm significado clínico (Tab. 34.7). Todos são anticorpos do isotipo IgG, reativos a 37°C, que surgem em decorrência de estimulação imune. Alguns exemplares de anti-S e anti-s mostram dosagem. A modificação enzimática de eritrócitos com proteases, mas não neuraminidase, pode diminuir a reatividade de alguns anti-S e anti-s. A reatividade do anti-U é resistente à digestão proteolítica. O anti-S, o anti-s e o anti-U podem causar reações transfusionais hemolíticas e DHRN.

Papel biológico

Apesar da prevalência das glicoforinas A e B nos eritrócitos, seu papel biológico ainda é desconhecido. Sua ausência não está associada a quaisquer sequelas hematológicas ou patológicas conhecidas. As glicoforinas A e B podem desempenhar um papel nas infecções por *Plasmodium falciparum*, o qual pode aderir aos eritrócitos via ácido siálico, altamente expresso nas glicoforinas. Fenótipos com deficiência de glicoforina, como o En (a-), são relativamente resistentes *in vitro* ao *P. falciparum*. Podem ser obtidos resultados similares após tratamento dos eritrócitos com neuraminidase (Garratty, 1994a).

Sistema de grupo sanguíneo P (ISBT n^{os} 003 e 028)

Consiste em 3 principais antígenos de grupo sanguíneo: P^k, P e P_1. Como o sistema Lewis (ver adiante), os antígenos do grupo P são glicoesfingolipídeos e consistem em uma metade carboidrato antigenicamente ativa e ligada de forma covalente a uma cauda lipídica ceramida. Os antígenos P^k e P são de alta frequência na maioria dos doadores de eritrócitos (mais de 99,9%). Os eritrócitos são particularmente ricos no antígeno P, o que corresponde até a aproximadamente 6% do total de lipídeo no eritrócito (van Deene, 1974). Os antígenos P^k e P também se expressam em células não eritroides, inclusive linfócitos, plaquetas, fibroblastos e células plasmáticas, renais, pulmonares, cardíacas, endoteliais, da placenta, do uroepitélio e sinoviais (Cooling, 1995, 1998; Spitalnik, 1995). Em contraste, o antígeno P_1 só se expressa exclusivamente nos eritrócitos (Cooling, 1998). Aproximadamente 79% dos doadores brancos e 94% dos negros expressam o P_1 em seus

Tabela 34.14 Sistema de grupo sanguíneo P

Fenótipo dos eritrócitos	Antígenos dos eritrócitos	Anticorpos possíveis	Base molecular		Frequências (%)	
			α4GalT1	*β3GalT3*	Brancos	Negros
P_1	P^k, P, P_1	Nenhum	Normal	Normal	79	94
P_2	P^k, P	Anti-P_1	ins-551C, -160C*	Normal	21	6
Fenótipos nulos						
P_1^k	P^k, P_1	Anti-P	Normal	Alelo nulo†	Raro	Raro
P_2^k	P^k	Anti-P, anti-P_1	ins-551C, -160C*	Alelo nulo†	Raro	Raro
p	Nenhum	Anti-P^k, P, P_1 (Tja)	Alelo nulo‡	Normal	Raro	Raro
Fenótipos fracos						
Variante P^k	P^k, ↓P	Anti-P	Desconhecido	Desconhecido	Raro	Raro
P fraco	↓P^k, ↓P	Nenhum	Desconhecido	Desconhecido	Raro	Raro

* A homozigosidade para um alelo que tenha uma inserção (ins-551C-550) e uma mutação de sentido errôneo (A-160>G) no promotor *α4GalT1* foi associada ao fenótipo P_2. A estrutura *α4GalT1* que abre a leitura codifica uma enzima funcional (Iwamura, 2003; Steffensen, 2000).

† Foram identificadas múltiplas mutações inativantes na estrutura *β3GalT3* que abre a leitura associadas ao fenótipo P^k (Hellberg, 2002).

‡ Foram identificadas múltiplas mutações inativantes na estrutura *α4GalT1* que abre a leitura associadas ao fenótipo p (Steffensen, 2000; Koda, 2002).

eritrócitos (Tab. 34.14). A expressão do P_1 é variável entre os indivíduos e pode ser perdida com o armazenamento *in vitro*.

Fenótipos nulos/fracos

Foram descritos vários fenótipos do grupo sanguíneo P (Tab. 34.14). Os fenótipos P_1 e P_2 são responsáveis por mais de 99% dos doadores. Ambos possuem os antígenos P^k e P, diferindo-se apenas na expressão do antígeno P_1. Foram identificados 3 fenótipos nulos autossômicos recessivos, bem como variantes fracas (Issitt, 1998; Kundu, 1978, 1980). A base molecular dos fenótipos nulos foi elucidada (Hellberg, 2002; Steffensen, 2000). Há uma associação entre a variante P^k e o fenótipo negativo LKE em alguns doadores (Cooling, 2001, 2003a). Como não possuem o antígeno P, os indivíduos p e P^k são resistentes ao parvovírus B19 (Brown, 1994).

Bioquímica

A síntese dos antígenos P_k, P e P_1 prossegue em etapas a partir do acréscimo de açúcares à lactosilceramida, uma ceramida di-hexose (CDH) (Fig. 34.4). A primeira etapa é a síntese do antígeno P^k, o precursor definitivo de todos os glicoesfingolipídeos do tipo globo. Para fazer o antígeno P^k, a Gb_3 sintase (α4GalT1) acrescenta uma galactose, em uma ligação a1-4, à CDH. O antígeno P^k pode, então, servir como substrato para a Gb_4 sintase (β3GalT3). Em algumas células, inclusive eritrócitos, o antígeno P é, ainda, alongado para formar outros antígenos da família globo, como o Luke (LKE), o Forssman e os antígenos ABH de cadeia do tipo 4 (globo-ABH).

Ao contrário dos antígenos P^k e P, o antígeno P_1 não é um globo-glicoesfingolipídeo, mas sim um membro da família neolacto (glicoesfingolipídeos de cadeia do tipo 2). Nos indivíduos P_1, uma galactose terminal α1,4 é acrescentada ao paraglobosídeo para formar P_1. O antígeno P_1 não se expressa nas glicoproteínas eritrocitárias, apesar da presença de múltiplos precursores de cadeia do tipo 2 (polilactosamina) nos glicanos ligados ao *N* (Yang, 1994).

Biologia molecular

Os genes responsáveis pelos antígenos P^k, P_1 e P foram clonados. O P^k e o P_1 são sintetizados pela α4GalT1, uma galactosiltransferase α1,4 (Steffensen, 2000; Iwamura, 2003). O gene *α4GalT1* reside no cromossomo 22q13 e está organizado em 2 éxons, dos quais apenas 1 (o éxon 2) codifica a enzima. A enzima α4GalT1 é uma glicoproteína do tipo II com 353 aminoácidos, contendo 2 locais de glicosilação *N* e 5 resíduos de cisteína. Como muitas galactosiltransferases, possui um motivo DXD, ou sítio de ligação UDP-Gal. Várias mutações de sentido errôneo (*missense*) e estruturais (*frameshift*) (inserções e deleções) no domínio catalítico da enzima foram identificadas entre indivíduos p (Steffensen, 2000; Koda, 2002). A ausência do antígeno P_1 nos indivíduos P_2 pode envolver mutações no promotor *α4GalT1*. Estudos com doadores P_2 mostraram homozigosidade para um alelo contendo uma inserção (-551C-500) e uma única substituição nucleotídica (T--160>C) na região 5' montante (Iwamura, 2003). Embora não tenham sido demonstradas diferenças significativas na atividade promotora nos ensaios relatados, foi levantada a hipótese de que a transcrição diminuída de a*4GalT1* seja a base para o fenótipo P_2.

O globosídeo ou antígeno P, uma β1,3 *N*-acetilgalactosaminiltransferase, é o produto de *β3GalT3* (Okajima, 2000). O gene reside no cromossomo 3q25 e contém 6 éxons, embora apenas o éxon 6 codifique a enzima. Sendo membro da família β1,3 galactosiltransferase, o *β3GalT3* possui 7 domínios conservados comuns à maioria das β1,3 galactosiltransferases, bem como um motivo DXD. De 4 indivíduos P^k estudados até o momento, foram identificadas 2 mutações de sentido errôneo (Glu266>Ala, Gly271>Arg), sem sentido (C102>Tstop) e estrutural (ins537A) (Hellberg, 2002). Em camundongos, a ausência de *β3GalT3* é letal (Vollrath, 2001).

A Figura 34.4 esclarece o aparecimento dos diferentes fenótipos do grupo sanguíneo P. Como quase todas as pessoas herdam tanto quanto *α4GalT1* como *β3GalT3*, ambos os antígenos P_k e P são sintetizados nos eritrócitos (fenótipo P_2). O antígeno P_1 está ausente na maioria dos indivíduos cujo alelo *α4GalT1* possui mutações no promotor. O fenótipo raro P^k não tem um gene *β3GalT3* funcional, o que resulta na ausência do antígeno P e em um acúmulo de CDH e P^k. Da mesma forma, o fenótipo p não tem um gene *α4GalT1* funcional, resultando na ausência de P_1 e de todos os globo-glicolipídeos. Em consequência, há maior síntese de antígeno "p" ou sialoparaglobosídeo (SPG; NeuAcα 2-3Galβ 1-4GlcNAcβ 1-3Galβ 1-4Glcβ 1-1Cer) nos eritrócitos p,

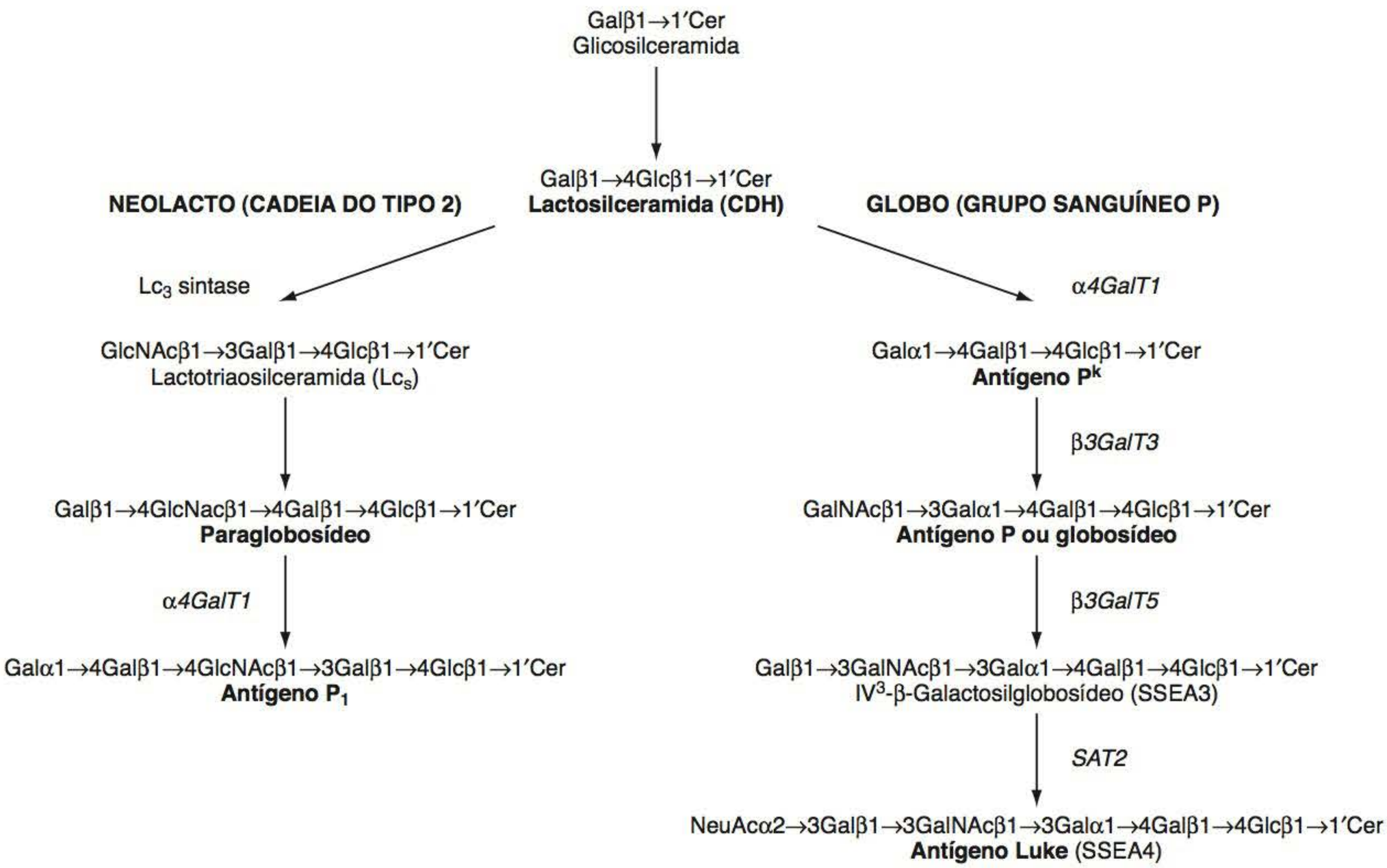


Figura 34.4 Síntese de antígenos P de grupo sanguíneo. Cer = ceramida; Gal = galactose; GalNAc = *N*-acetilgalactosamina; Glc = glicose; GlcNAc = *N*-acetilglicosamina; AEEE = antígeno embrionário estágio-específico; NeuAc = ácido acetilneuramínico.

em decorrência a um aumento compensatório na síntese de neolactoglicolipídeo. Os fenótipos P^k variante e P fraco descritos por Kundu (1980, 1978) hipoteticamente refletem menor expressão/atividade em β*3GalT3* e α*4GalT1*, respectivamente.

Anticorpos do grupo sanguíneo P

Anti-P_1

Clinicamente, o anticorpo mais comumente observado é o anti-P_1, detectado em 1/4 a 2/3 dos doadores P_2 (Issitt, 1998). O anti-P_1 é um anticorpo de ocorrência natural do isotipo IgM frequentemente detectado como uma aglutinina fraca à temperatura ambiente. Raros exemplares de anti-P1 são reativos a 37°C ou apresentam hemólise *in vitro*. Como a força da expressão de P_1 varia entre os indivíduos, o anti-P_1 pode não reagir com todas as células P_1-positivas testadas. O anti-P_1 pode ligar-se ao complemento e ser detectado no teste indireto da antiglobulina (IAT, *indirect antiglobulin test*) se for usada antiglobulina humana (AHG) poliespecífica. A reatividade do anticorpo pode ser eliminada pelo preaquecimento do soro ou pelo acréscimo de substância P_1 solúvel a partir de líquido de cisto hidático, minhocas ou ovos de pássaros. Os títulos de anti-P_1 em geral são elevados em pacientes com hidatidose, fasciolíase e criadores de pássaros (Issitt, 1998). Alguns exemplares de anti-P_1 têm especificidade para o grupo sanguíneo I (anti-IP_1).

De modo geral, o anti-P_1 não tem importância clínica e sua presença raramente requer transfusão de sangue negativo para o antígeno. A exceção é nos pacientes com anti-P_1 que apresentam hemólise *in vitro*. Em razão do risco de reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias, tais pacientes devem receber unidades compatíveis P_1-negativas (P_2). O anti-P_1 não causa DHRN.

Aloanti-PP_1P^k

O anti-PP_1P^k (historicamente conhecido como um anti-Tj^a) é uma mistura separável de anti-P, anti-P_1 e anti-P^k no soro dos indivíduos p. Tais anticorpos são de ocorrência natural e podem ser IgM apenas ou IgM mais IgG (IgG3). Como os anticorpos PP_1P^k são hemolisinas potentes, esses pacientes só podem receber transfusões com eritrócitos p. Em mulheres, o anti-PP_1P^k e o anti-P estão associados a DHRN e ao aborto espontâneo. Plasmaférese precoce e frequente tem sido utilizada com sucesso terapêutico em mulheres grávidas aloimunizadas dos fenótipos p e P^k (Spitalnik, 1995).

Aloanti-P

O anti-P também é um aloanticorpo IgM de ocorrência natural no soro de indivíduos P^k (e p). É uma hemolisina potente e pode causar hemólise *in vivo* após transfusão de eritrócitos P positivos (P_1 e P_2). O anti-P é uma causa de DHRN e está associado a abortos espontâneos.

Auto-anti-P (Donath-Landsteiner)

Observa-se um autoanticorpo com especificidade anti-P em pacientes com hemoglobinúria paroxística ao frio (HPF), uma síndrome clínica em crianças após infecção viral, em que um autoanti-P é uma hemolisina bifásica IgG capaz de ligar-se a eritrócitos em temperaturas frias, seguindo-se hemólise intravascular à temperatura corporal. Tal característica pode ser demonstrada *in vitro* no teste de Donath-Landsteiner. Ver a descrição completa sobre métodos imuno-hematológicos nas últimas seções.

Papel biológico

Ao contrário daquele exercido por muitos antígenos, o papel fisiológico dos antígenos do grupo sanguíneo P é desconhecido. Existe alguma evidência de que o antígeno P^k pode estar associado ao interferon-α e a receptores de complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility complex*) da classe II (Ghislain, 1994; George, 2001) e pode modular a sinalização celular via transporte lipídico (Kovbasnjuk, 2001). Os antígenos do grupo sanguíneo P também podem desempenhar um papel na diferenciação celular e nas neoplasias. Os antígenos P^k e P expressam-se de maneiras diferentes durante a embriogênese, a hematopoese e a diferenciação da mucosa intestinal (Jacewicz, 1995; Cooling, 2003b). O antígeno P^k é um marcador de apoptose nas células B do centro germinativo, no linfoma de Burkitt e na leucemia linfoblástica (Mangeney, 1991).

Vários antígenos do grupo sanguíneo P são receptores de patógenos microbianos. O antígeno P é o receptor do parvovírus B19, um vírus de DNA de fita única associado a múltiplas sequelas, inclusive crises aplásicas (Brown, 1994; Cooling, 1995). Os antígenos P_1 e P^k são receptores da toxina shiga, produzida por *Shigella dysenteriae* e por cepas de *Escherichia coli* êntero-hemorrágica (EHEC). Além da gastroenterite, a infecção por EHEC é a causa mais comum da síndrome hemolítico-urêmica adquirida na comunidade, provavelmente refletindo a ligação da toxina ao antígeno P^k no endotélio vascular glomerular e nas plaquetas (Boyce, 1995; Cooling, 1998; Karpman, 2001). Os antígenos P, P^k e Luke no epitélio urinário são receptores celulares de fímbrias P, uma adesina bacteriana e fator de colonização que se expressa em cepas de *E. coli* uropatogênicas. O antígeno P^k também serve como receptor para *Streptococcus suis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Spitalnik, 1995).

Sistema de grupo sanguíneo Rh (ISBT nº 004)

A primeira e mais importante caracterização dos antígenos do sistema Rh veio dos estudos publicados de Landsteiner e Wiener (1940) sobre experimentos com animais envolvendo a imunização de cobaias e coelhos com eritrócitos de macacos Rhesus. O antissoro resultante aglutinou 85% dos eritrócitos humanos, e o antígeno definido foi denominado fator Rh (Rhesus). Depois, houve relatos de que o anti-Rh tinha a mesma especificidade dos anticorpos anteriormente estudados por Levine e Stetson (1939), que eram responsáveis pela doença hemolítica do recém-nascido (DHRN). É interessante ter-se demonstrado depois que o anti-Rh desenvolvido por Landsteiner e Wiener reconhece um antígeno de grupo sanguíneo diferente, denominado LW por seus descobridores.

Atualmente, é provável que o sistema Rh seja o mais complexo dos sistemas de antígeno eritrocitário em humanos, abrangendo cerca de 50 antígenos e muitas variantes fenotípicas e relações etiológicas complexas. Por esse motivo, a revisão que se segue é importante e ressalta a informação mais atualizada. Para uma revisão detalhada e histórica do sistema Rh, o leitor deve consultar Issitt (1998) e Daniels (2002).

Teorias de herança e classificação do sistema Rh

Usando 5 antissoros básicos, anti-D, anti-C, anti-E, anti-c e anti-e, Wiener identificou 5 diferentes fatores ou antígenos (Tab. 34.15) que, a partir de estudos em populações e famílias, pareceram ser herdados como 2 complexos de até 3 fatores cada. Houve 8 combinações possíveis de complexos de 3 fatores caso incluíssem "d" como designando a ausência de D, porque nenhum anti-d foi demonstrado. Wiener propôs um sistema de hereditariedade de *locus* único com 8 alelos comuns alternativos codificando 2 aglutinógenos Rh, capazes de expressar até 3 determinantes antigênicos diferentes. A nomenclatura de Wiener para os 8 genes diferentes e as frequências alélicas estão nas Tabelas 34.16 e 34.17.

Fisher e Race propuseram depois uma teoria de hereditariedade e um sistema de nomenclatura diferentes, com base em evidência genética da natureza antitética ou alélica dos antígenos C/c e E/e (Race, 1948). Esses pesquisadores propuseram um sistema de 3 *loci* ou *subloci* intimamente ligados em cada cromossomo, que eram herdados como um bloco de genes (haplótipo). Também introduziram a nomenclatura DCE para nomear os alelos, inclusive o uso do "d" para designar a falta do *locus* D (Tab. 34.15). Rosenfeld propôs um sistema numérico para nomear os antígenos em 1962, porque o número crescente de antígenos Rh tornou a designação alfabética impraticável (Tab. 34.18).

Tabela 34.15 Comparação das nomenclaturas de Wiener, Fisher-Race e Rosenfield para os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh

Wiener	Fisher-Race	Rosenfield
Rh_o	D	RH1
rh′	C	RH2
rh″	E	RH3
hr′	c	RH4
hr″	e	RH5

Tabela 34.16 Nomenclaturas de Wiener e Fisher-Race para os haplótipos Rh e suas frequências na população*

Wiener	Fisher-Race†	Frequências na população dos EUA			
		Brancos	Negros	Nativos americanos	Asiáticos
R^0	Dce	0,04	0,44	0,02	0,03
R^1	DCe	0,42	0,17	0,44	0,70
R^2	DcE	0,14	0,11	0,34	0,21
R^z	DCE	0,00	0,00	0,06	0,01
r	dce	0,37	0,26	0,11	0,03
r′	dCe	0,02	0,02	0,02	0,02
r″	dcE	0,01	0,00	0,01	0,00
r^y	dCE	0,00	0,00	0,00	0,00

* Os valores foram calculados de Mourant (1976).

† Na nomenclatura de Fisher–Race, "d" indica a ausência do antígeno D.

Também se observou que essa nomenclatura não continha inferências como a herança genética dos antígenos.

Bioquímica

Houve um progresso notável no sentido de decifrar a bioquímica e a biologia molecular do sistema Rh de grupo sanguíneo. Agora está claro que o Rh consiste em 3 proteínas integrantes da membrana: RHD, RHCE e glicoproteína associada ao Rh (RHAG). RHD e RHCE são proteínas altamente homólogas, diferindo-se por aproximadamente 30 aminoácidos. Ambas são proteínas de 30 kDa e 416 aminoácidos de múltiplas passagens, contendo 12 domínios transmembrana, 6 alças extracelulares e uma terminação citoplasmática amino e carbóxi (Fig. 34.5). Ambas as proteínas possuem de 2 a 3 moléculas de palmitato (ácido graxo C16) ligadas de forma covalente a resíduos de cisteína transmembrana. A palmitoilação das proteínas Rh pode ajudar a manter a assimetria fosfolipídica da membrana eritrocitária (Avent, 1999).

A RHAG é uma glicoproteína de 45 a 70 kDa e múltiplas passagens, relacionada em termos evolutivos com as glicoproteínas RhD e RhCcEe. A RHAG é uma glicoproteína de 409 aminoácidos, com 12 domínios transmembrana e uma única cadeia lateral de carboidrato grande ligada ao N na primeira alça extracelular. No total, há aproximadamente 170.000 moléculas em cada proteína Rh e RHAG por eritrócito. RHD, RHCE e RHAG são proteínas eritroides específicas (Avent, 1999).

Na membrana do eritrócito, as proteínas RHD, RHCE e RHAG existem como parte de um complexo imune Rh, composto por 2 moléculas de Rh (RHD e RHCE) e 2 moléculas de RHAG (Eyers, 1994). A importância da RHAG para a expressão e a montagem correta das proteínas Rh não pode ser subestimada. Na ausência de proteína RHAG funcional, nem a proteína RHD nem a RHCE expressam-se (fenótipos Rh_{nulo} e Rh_{mod}). Além da RHAG, as proteínas Rh podem estar associadas em termos topológicos a CD47, glicoproteína LW (ICAM4), glicoproteína DARC ou Duffy, banda 3 e glicoforina B. Pelo menos 2 antígenos não Rh, Fy^5 e U, podem requerer interações não covalentes entre Rh, glicoproteína DARC (Fy^5) e glicoforina B (U), respectivamente (Ridgwell, 1994).

Biologia molecular

Os genes para as proteínas RHD (*RHD*) e RHCE (*RHCE*) abrangem 65 kb no cromossomo 1p34-36.1 e compartilham quase 92% da identidade da sequência. Os dois genes estão separados por apenas 30 kb e têm orientações opostas, cada um voltado para o outro nas suas extremidades 3' (Fig. 34.6). O gene RHD também está flanqueado por 2 sequências homólogas conhecidas como *boxes* Rhesus. O gene RHAG (*RHAG*) fica no cromossomo 6p11.1 e compartilha 36% de homologia com os genes *RHD* e *RHCE*. Todos os 3 genes possuem 10 éxons e pelo menos 1 sequência de consenso GATA-1 na região promotora (Iwamoto, 1998; Cherif-Zahar, 1994). Acredita-se que os genes RHAG e RH tenham surgido por duplicação gênica entre 250 e 350 milhões de anos. Uma segunda duplicação gênica entre 8 e 11 milhões de anos resultou nos alelos ce e D (haplótipo cDe ou R^o). Acredita-se que os alelos *RHCe* restantes sejam o produto de mutações pontuais e recombinação e conversão gênica dos genes RHD e RHCE (Aventt, 1999).

Antígeno D

A clonagem dos genes *RHD* e *RHCE* abriu as portas para o entendimento da imunologia complexa de muitos antígenos e fenótipos Rh. O antígeno D, o mais imunogênico de todos os antígenos Rh, reside na proteína RHD. Evidência atual sugere que D é um antígeno alta-

Tabela 34.17 Frequências dos fenótipos Rh comuns*

Reação com anti-†					Fenótipo		Genótipo		Frequências‡			
D	C	c	E	e	Rh	DCE	Rh	DCE	Brancos	Negros	Nativos dos EUA	Asiáticos
+	+	+	+	+	Rh_1Rh_2	DCcEe	R^1R^2	*DCe/DcE*	0,1176 (89%)	0,0374 (100%)	0,2992 (89%)	0,294 (97%)
							R_1r''	*DCe/dcE*	0,0084 (6%)		0,0088 (3%)	
							r^1R^2	*dCe/DcE*	0,0056 (5%)		0,0135 (4%)	0,0084 (2,8%)
							rR^z	*dce/DCE*		0,0132 (4%)	0,0006 (0,2%)	
+	+	+	−	+	Rh_1rh	DCce	R^1R^0	*DCe/Dce*	0,0168 (5%)	0,1495 (63%)	0,0176 (15%)	0,042 (50%)
							R^1r	*DCe/dce*	0,3108 (95%)	0,0884 (37%)	0,0968 (85%)	0,042 (50%)
+	−	+	+	+	Rh_2rh	DcEe	R^2R^0	*DcE/Dce*	0,0112 (10%)	0,0968 (63%)	0,0136 (15%)	0,0126 (50%)
							R^2r	*DcE/dce*	0,1035 (90%)	0,0572 (37%)	0,0748 (85%)	0,0126 (50%)
+	+	−	−	+	Rh_1Rh_1	DCe	R^1R^1	*DCe/DCe*	0,176 (91%)	0,029 (81%)	0,194 (92%)	0,490 (93%)
							R^1r^1	*DCe/dCe*	0,017 (9%)	0,007 (19%)	0,017 (8%)	0,028 (7%)
+	+	−	+	+	Rh_1Rh_z	DCEe	R^1R^z	*DCe/DCE*		0,053 (100%)		
+	−	+	+	−	Rh_2Rh_2	*DcE*	R^2R^2	*DcE/DcE*	0,02 (88%)	0,012 (100%)	0,116 (94%)	0,044 (100%)
							R^2r''	*DcE/dcE*	0,003 (12%)		0,007 (6%)	
+	+	+	+	−	Rh_2Rh_z	DCcE	R^2R^z	*DcE/DCE*			0,041 (100%)	
+	−	+	−	+	Rh_0Rh_0	Dce	R^0R^0	Dce/Dce	0,0016 (5%)	0,1936 (46%)	0,0004 (8%)	0,0009 (33%)
							R^0r	*Dce/dce*	0,0296 (95%)	0,2286 (54%)	0,0044 (92%)	0,0018 (67%)
−	−	+	−	+	rhrh	dce	*rr*	*dce/dce*	0,1369 (100%)	0,0676 (100%)	0,0121 (100%)	0,0009 (100%)
−	+	+	−	+	rh′rh	dCce	*rr′*	*dce/dCe*	0,0055 (100%)	0,0014 (100%)	0,0044 (100%)	0,0012 (100%)
−	−	+	+	+	rh″rh	dcEe	*rr″*	*dce/dcE*	0,0028 (100%)		0,0022 (100%)	

* Estimadas a partir das frequências dos haplótipos (p, q da Tab. 34.16), usando p2 para homozigotos e 2pq para heterozigotos.

† + = positivo; − = negativo.

‡ (%) = percentagem de genótipos de um determinado fenótipo.

Tabela 34.18 Base molecular dos antígenos RH

ISBT	Nome	Frequência (%)	Proteína RH (D ou CE)	Base molecular (proteína ou éxon do gene)	Comentários
RH1	D	85–92	D	RHD, alças 3,4,6	
RH2	C	68% dos brancos 27% dos negros	CE	Ser103 + Cys16	RH4 antitético
RH3	E	22–29	CE	Pro226	RH5 antitético
RH4	c	80	CE	Pro103	RH2 antitético
RH5	e	80	CE	Ala226	RH3 antitético
RH6	f	65	CE	Pro103 + Ala226	Antígeno composto
RH7	Ce	27–28	CE	Ser103 + Ala226	Antígeno composto
RH8	C^w	1–2	CE	Gln41>Arg	RH51 antitético
RH9	C^x	< 0,01	CE	Ala36>Thr	RH51 antitético
RH10	V	30% dos negros	CE	Leu235>Val, +Gly336	Em geral com RH20
RH11	E^w	< 0,01	CE	Met167>Lys	E variante tipo I
RH12	G	84–92	D, CE	Ser103	Anti-C+D
RH17	Hr_0	100	CE	RHCE alças 3,4,6	
RH18	Hr	100	CE	Met238	
RH19	hr^S	98	CE	Ala226, Met238	
RH20	VS	40% dos negros	CE	Leu226>Val	Em geral com RH10
RH21	C^G	68	CE	Ser103	
RH22	CE	1	CE	Ser103 + Pro226	Antígeno composto
RH23	D^w	< 0,01	D parcial	Gln233, RHD alças 3,6	
RH26	similar a c	80	CE	Gly96 + Pro103	
RH27	cE	22–28	CE	Pro103 + Pro226	Antígeno composto
RH28	hr^H	< 0,01	?	Desconhecida	
RH29	Total Rh	100	CE + D	RHD + RHCE	Feita por Rh_{nulo}
RH30	Go^a	2% dos negros	D parcial	Sobre DIVa	
RH31	hr^B	98	CE	Desconhecida	Ausente em R_2R_2
RH32	R^N	< 1% dos negros	D parcial	Éxons D4/a/CE5	RH46 antitético
RH33	Har	< 0,01	D parcial	Éxons CE4/a/D5	R^{oHar}
RH34	Hr^B	100	D + CE	Cys336	
RH35	1114(CeMA)	< 0,01	CE	(Arg114>Trp)	(CeMA) pode ser RH35
RH36	Be^a	< 0,1	CE	Desconhecida	c,e,f fracos
RH37	Evans	< 0,01	Híbrida D–CE	Éxons D6 a CE7	
RH39	similar a C	100	?	Desconhecida	Sobre eritrócitos C– e C+
RH40	Tar	< 0,01	D	Leu100>Pro	
RH41	similar a Ce	70	CE	Éxon 2, Ala226	
RH42	Ce^S	2% dos negros	D parcial	Leu245>Val	Associada a $dCce^S$
RH43	Crawford	1% dos negros	CE	Gln223, VS+	Eritrócitos VS+, V+
RH44	Nou	100	?	Desconhecida	
RH45	Riv	< 0,01	D parcial	Sobre DIVa	
RH46	Sec	100	CE	CE éxon 4	RH32 antitético
RH47	Dav	100	CE	Éxon 7	
RH48	JAL	< 0,01	?	Desconhecida	Associada a R^1, R^0
RH49	STEM	0,4% de indianos	?	Desconhecida	
RH50	FPTT	< 0,01	D parcial	Éxons CE4 a D5	
RH51	MAR	> 99	CE	Ala36, Gln41	RH8,9 antitético
RH52	BARC	< 0,01	D parcial	Éxons CE6 a D7	
RH53	JAHK	< 0,01	CE	Éxon D2 (Ser103), no Cys16	
RH54	DAK	< 0,01	D parcial	Desconhecida	
RH55	LOCR	< 0,01	?	Desconhecida	c,e,f fracos

De Wagner e Flegel (2004) e Reid (2004b).

mente complexo, dependendo tanto de aminoácidos específicos como da estrutura terciária da própria proteína RHD. Até o momento, foram identificados 9 aminoácidos "específicos de D" (Met169, Met170, Ile172, Phe223, Ala226, Glu233, Asp350, Ala353 e Gly354) como epítopos D funcionais. Eles ficam ao longo da terceira, da quarta e da sexta alças externas de apoproteína RHD, criando 6 aglomerados distintos de epítopo D ou "pegadas" (Fig. 34.5). Como o sistema imune reconhece esses aglomerados é motivo de intensa investigação (Avent, 1999).

Antígeno D fraco

Aproximadamente 1% dos indivíduos D positivos é do tipo D fraco (conhecido historicamente como Du), que se caracteriza por aglutinação fraca ou ausente de eritrócitos pelo anti-D durante teste sorológico. Nos indivíduos com fenótipo D fraco, o antígeno D normalmente requer antiglobulina humana (AHG). Pode ocorrer um fenótipo D fraco com muitos fenótipos D parciais, dCe em *trans* com supressão de RHD, no fenótipo Rh_{mod} e via herança autossômica recessiva de 2

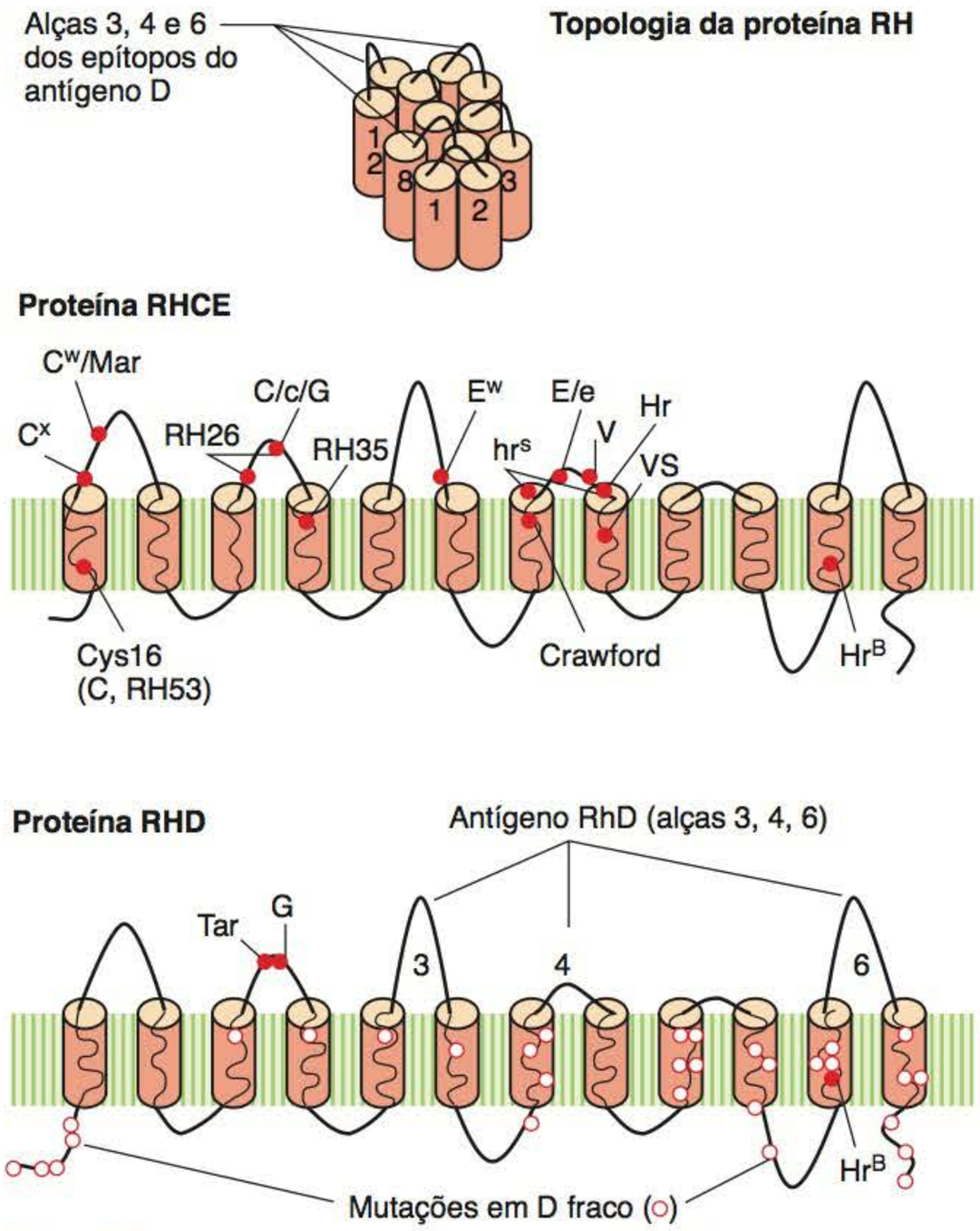


Figura 34.5 Proteínas RH. As proteínas RHD e RHCE são multietapas, com 12 domínios transmembrana, indicados por cilindros cor de âmbar. A localização dos antígenos Rh denotada por polimorfismos de aminoácido único está assinalada (•). O epítopo RhD é um antígeno complexo que envolve estruturas na terceira, na quarta e na sexta alças extracelulares. Mutações de sentido errôneo na RHD, levando a expressão fraca de D, estão indicadas por círculos abertos (o).

alelos RHD fracos, sendo essa última a responsável pela maioria dos fenótipos D fracos presentes na população geral. Até o momento, foram relatadas 18 mutações diferentes, representando 14 alelos RHD mutantes, em associação ao fenótipo D fraco. Todas as mutações descritas são de sentido errôneo, levando à substituição de aminoácidos, ao longo das regiões não conservadas dos domínios transmembrana e citoplasmático (Fig. 34.5). Por sua localização, existe a hipótese de que essas mutações possam interferir na montagem ou na inserção eficiente da proteína RHD. Além disso, como todas as mutações são intramembranosas ou intracelulares, presume-se que não alterem de forma significativa a apresentação dos epítopos D nas alças extracelulares (Wagner, 1999), o que pode explicar por que a maioria dos indivíduos com fenótipo D fraco não elabora o aloanti-D quando recebe transfusão de sangue D positivo (ver adiante).

Antígeno D parcial

Os antígenos D parciais são proteínas que perderam os epítopos D. Embora sejam do tipo D positiva, as pessoas com antígenos D parciais podem elaborar anticorpos aloanti-D reativos com eritrócitos alogênicos, mas não autólogos. O aloanti-D produzido por esses indivíduos reconhece epítopos D específicos perdidos em seus próprios eritrócitos (Fig. 34.6). O D parcial pode resultar de mutações de sentido errôneo ou recombinação genética dos genes *RHD* e *RHCE* (Avent, 1999). Os fenótipos D parciais que surgem de recombinação genética estão frequentemente associados à geração de novos antígenos de baixa incidência (Tab. 34.18).

Fenótipo Rh negativo

O fenótipo Rh negativo (D–) ocorre em aproximadamente 15% dos doadores brancos, quase sempre em associação ao fenótipo cde/cde ou rr. Na maioria das pessoas brancas, D– reflete uma deleção de todo o gene *RHD* (Fig. 34.6). Nas pessoas negras, D– pode resultar de deleção gênica ou herança de um pseudogene *RHD*. Quase 60% das pessoas D negativas negras herdam um alelo RHD mutante (RHyD) contendo uma duplicação interna de 37 pares de bases (bps) e uma mutação sem sentido (Avent, 1999). Genes *RHD* contendo mutações sem sentido e deleções de nucleotídeos também foram relatados em alguns doadores D negativos japoneses e brancos (Daniels, 2002).

Antígenos C/c, E/e e Rh composto

Em contraste com a complexidade do epítopo antígeno D, os antígenos C/c e E/e são polimorfismos de um único aminoácido na proteína RHCE (Fig. 34.5). Outros 3 polimorfismos de aminoácido (Cys16Trp, Ile60Leu e Ser68Asn) podem ajudar a estabilizar os antígenos C e c. Como os epítopos C/c e E/e estão presentes na mesma proteína, podem ocorrer aloanticorpos dependentes da expressão dos antígenos C/c e E/e. Foram descritos 4 aloanticorpos com especificidade Rh "composta": anti-ce (f ou RH6), anti-Ce (RH7), anti-cE (RH27) e anti-CE (RH22). Esses anticorpos reagem apenas com eritrócitos que carregam os antígenos pareados apropriados, em *cis*, na mesma proteína RHCE (Tab. 34.18), na qual ocorrem vários outos antígenos de alta e baixa incidências.

Antígeno G

O antígeno G (RH12) é um antígeno de alta frequência presente em praticamente todos os eritrócitos D positivos e C positivos. O G foi identificado como Ser103, um antígeno do tipo C, nas proteínas RHD e RHCE (Fig. 34.5). Não é surpreendente que os aloanticorpos anti-G tenham especificidade anti-C e anti-D (anti-C + D) e frequentemente sejam acompanhados por anti-C (anti-G + anti-C).

Fenótipos C/c e E/e fracos e deleção

Como no D, são conhecidos fenótipos C/c e E/e enfraquecidos ou ausentes. Podem resultar expressão E parcial e expressão e fraca de mutações isoladas de ponto ou deleções de nucleotídeos. Os fenótipos com deleções D••, D– – (D+, C–, c– E–, e–), DC– e Dc– resultam da recombinação genética entre os genes *RHCE* e *RHD*, para produzir híbridos RHCE-D-CE (Fig. 34.6). Como consequência, há uma ablação total dos epítopos Ee e/ou Cc, com muitos recombinantes expressando novos antígenos Rh de baixa frequência (Tab. 34.18). Além disso, muitos recombinantes (p. ex., D•• e D– –) demonstram expressão exaltada do antígeno D nos testes sorológicos, em conseguência a uma dose dupla de alguns epítopos D tanto na proteína RHD quanto na mutante RHCE-D-CE. Para um resumo detalhado, o leitor deve consultar Reid (2004b).

Fenótipo Rh_{nulo}

Todos os antígenos Rh estão ausentes nos eritrócitos com o fenótipo Rh_{nulo}, em decorrência de uma ausência aparente das proteínas RHD e RHCE. Além disso, esses eritrócitos não têm os antígenos de alta frequência Fy^5 e LW, podendo apresentar, ainda, expressão acentuadamente diminuída dos antígenos S/s e U. A ausência desses antígenos Rh reflete a associação topológica complexa das proteínas Duffy, LW e glicoforina B às proteínas Rh das membranas eritrocitárias.

Extremamente raras (< 1 em 6 milhões), as células com Rh_{nulo} têm anormalidades na morfologia eritrocitária (esferócitos, estomatócitos), no teor de água, no volume celular e no fluxo de cátions, além de assimetria dos fosfolipídeos. As células com Rh_{nulo} exibem maior fragilidade osmótica e uma meia-vida circulante encurtada, em geral acompanhadas por anemia hemolítica discreta (síndrome da deficiência de Rh). Como os indivíduos com o fenótipo Rh_{nulo} podem ficar sensibilizados a múltiplos antígenos Rh, inclusive os de alta frequência, o suporte por transfusão pode ser bastante difícil. Alguns indivíduos com fenótipo Rh_{nulo} aloimunizados podem produzir anti-RH29, que reage com todos os eritrócitos, exceto aqueles com Rh_{nulo}.

O fenótipo Rh_{nulo} pode surgir de 2 contextos genéticos distintos: regulador e amorfo. O tipo Rh_{nulo}-amorfo é o resultado de mutações sem sentido no gene RHCE em pessoas D negativas. Pela ausência das proteínas RHD e RHCE, os eritrócitos do fenótipo Rh_{nulo}-amorfo têm expressão reduzida (mas não ausente) da proteína RHAG (Daniels, 2002). O tipo regulador Rh_{nulo} surge de mutações pontuais na RHAG (Reid, 2004b).

Fenótipo Rh_{mod}

Também são observadas mutações do *RHAG* no fenótipo Rh_{mod}. Eritrócitos com esse fenótipo apresentam expressão acentuadamente

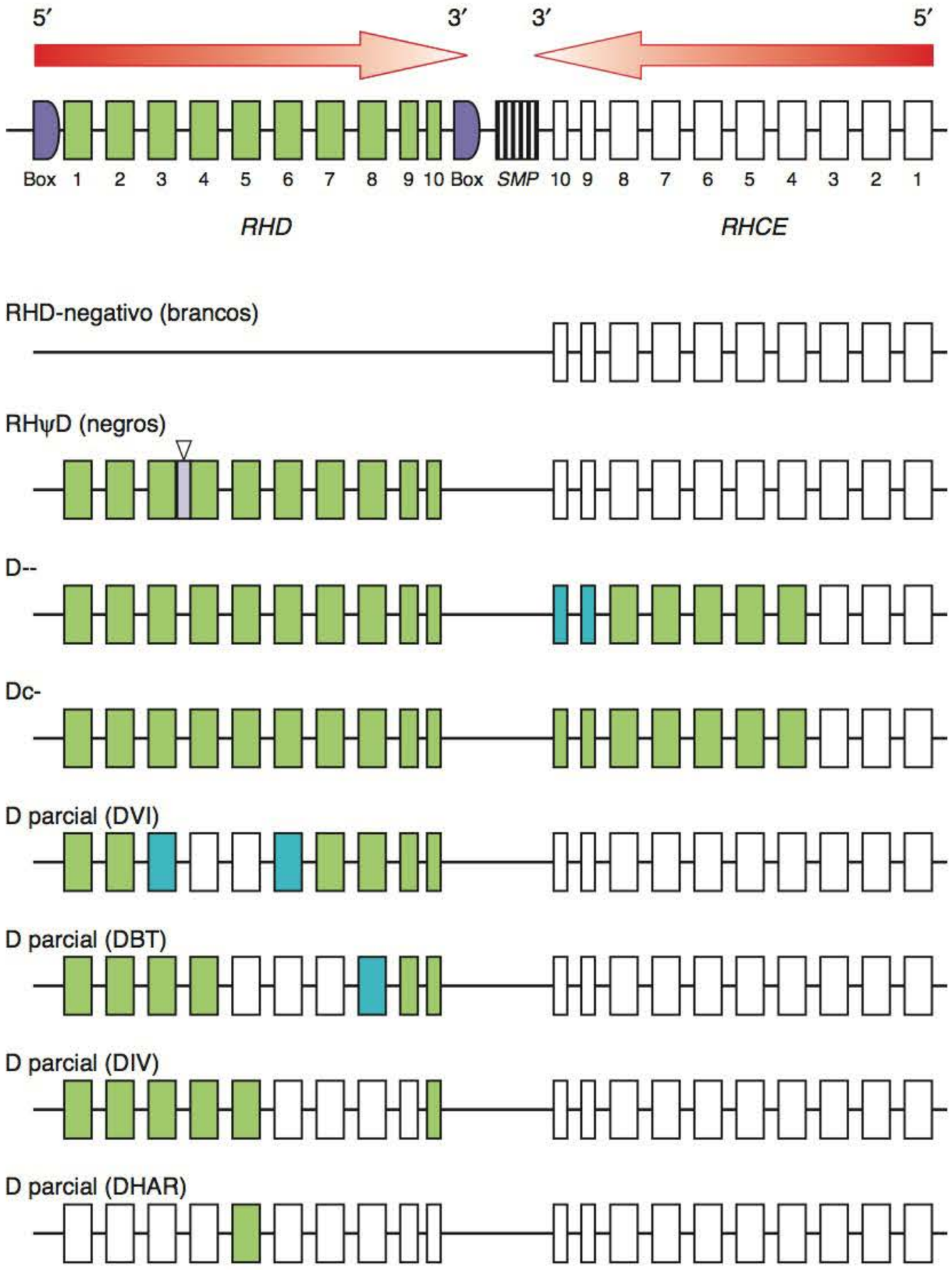


Figura 34.6 O aglomerado do gene Rh. Os genes *RHD* e *RHCE* estão situados bem próximos, um de frente para o outro em suas extremidades 3′. O gene *RHD* também é flanqueado por boxes Rh. *SMP* é um não gene relacionado. O fenótipo RHD-negativo pode resultar de deleção do gene RHD ou, em pessoas negras, uma inserção de 37 pares de base, levando a uma alteração estrutural (pseudogene). Também são mostrados exemplos de fenótipos D e CE parciais que resultam de recombinação entre os genes *RHD* e *RHCE*.

diminuída de RH e RHAG, detectável apenas mediante estudos cuidadosos de adsorção e eluição. Como os indivíduos com Rh_{nulo}, pessoas com Rh_{mod} podem ter evidência laboratorial de síndrome de deficiência do Rh com anemia hemolítica discreta. Foram estudadas 3 amostras de Rh_{mod}, cada uma contendo uma única mutação de sentido errôneo no gene *RHAG* (Reid, 2004b).

Anticorpos Rh

Anticorpos contra os antígenos Rh são encontrados rotineiramente em bancos de sangue (ver Tab. 34.7). O antígeno Rh mais imunogênico é o D, seguido por c, E, C e e (Harmening, 1999). Em geral, os anticorpos contra antígenos Rh resultam de estimulação imune por transfusão ou gravidez. As exceções são alguns exemplares de anti-C^w e anti-E, que podem ser de ocorrência natural. A maioria dos anticorpos contra antígenos Rh é do isotipo IgG (IgG1 e IgG3), embora sejam conhecidos raros exemplares de IgM e IgA. Os anticorpos anti-Rh são reativos a 37°C e normalmente detectados na fase AHG de teste. A reatividade dos anticorpos anti-Rh pode ser facilitada em eritrócitos tratados com enzima.

Clinicamente, os anticorpos contra Rh estão associados a reações transfusionais hemolíticas. No entanto, como os anticorpos Rh não fixam complemento, eritrócitos incompatíveis quase sempre são depurados por destruição extravascular. Para evitar sensibilidade ao antígeno D, pacientes Rh-negativos devem receber transfusões com eritrócitos Rh-negativos. Isso é praticamente verdadeiro no caso de mulheres jovens e em idade reprodutiva. Para transfusão em pacientes aloimunizados, as unidades de eritrócitos devem ser negativas para o antígeno Rh de interesse e compatíveis com o soro do receptor na fase AHG de teste. Uma exceção possível talvez sejam os pacientes R^1R^1 (CDe/CDe) que tenham desenvolvido aloanticorpos anti-E. Como tais pacientes correm alto risco de ter reações transfusionais hemolíticas tardias resultantes do desenvolvimento subsequente de anti-c, muitos bancos de sangue recomendam a transfusão apenas de unidades R^1R^1 a pacientes R^1R^1 (Shirey, 1994).

Anticorpos contra antígenos Rh também são uma das principais causas de DHRN. Todas as mulheres Rh-negativas devem receber imunoglobulina Rh (IgG anti-D) profilaticamente no meio da gravidez, após um procedimento invasivo (i. e., amniocentese) e imediatamente após o parto, para prevenir que ocorra aloimunização. A profilaxia com imunoglobulina Rh também é recomendada em mulheres com fenótipos D parciais, porque elas podem estar em risco de aloimunização D (Ansart-Pirenne, 2004). A imunoglobulina Rh também pode ser administrada após transfusão de concentrados de plaquetas RhD+ ou após transfusão acidental de eritrócitos RhD+. No último caso, administra-se a imunoglobulina Rh após a troca de 2 volumes de eritrócitos com eritrócitos RHD-negativos (Nester, 2004). É recomendável administrar um frasco de imunoglobulina Rh a cada 30 mL de sangue total ou 15 mL de concentrado de hemácias transfundidos. A imunoglobulina Rh deve ser administrada até 72 horas após a exposição, para evitar imunização ativa. Não se administra imunoglobulina Rh a mulheres Rh-negativas que já estejam imunizadas contra o antígeno D (i. e., tenham anti-D).

Também se recomenda administrar imunoglobulina Rh a mulheres Rh-negativas com aloanticorpos anti-G. Conforme mencionado an-

teriormente, o anti-G comporta-se como um anti-C + anti-D, em decorrência ao reconhecimento de uma Ser103 ou um antígeno do tipo C nas proteínas RHD e RHCE. Em geral, a DHRN secundária a anti-G ou anti-C + anti-G é discreta, em comparação com a DHRN que resulta de anti-D. Entretanto, como essas mulheres ainda podem ficar imunizadas aos epítopos D específicos da proteína RDH, em muitos bancos de sangue prefere-se dar imunoglobulina Rh a mulheres Rh-negativas com anticorpos anti-G (Shirey, 1997). A distinção entre um anti-G e um anti-C + anti-D verdadeiro é muito trabalhosa, requerendo adsorção sequencial e eluição (Yesus, 1985). Um indício sugestivo da presença de anti-G é um título anti-C pelo menos 4 vezes maior que o de anti-D (Shirey, 1997). Contudo, não é necessário separar anti-G anti-C + anti-D para transfusões rotineiras. Com raríssimas exceções, eritrócitos negativos para os antígenos C e D também são negativos para o antígeno G.

Papel biológico

A função específica das proteínas Rh ainda é desconhecida, mas há uma crença forte de que elas possam constituir um transportador de membrana. Essas proteínas são homólogas aos transportadores de amônio da família Mep/Amt. Além disso, foram descobertos homólogos similares ao Rh em formas de vida de invertebrados, como o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* e a esponja-marinha *Geodia cydonium* (Avent, 1999).

Sistema de grupo sanguíneo Lutheran (ISBT nº 005)

O sistema Lutheran (Lu) de grupo sanguíneo contém 18 antígenos, incluindo 4 pares de antígenos alélicos e 10 de alta incidência. O Lutheran é um pequeno constituinte da membrana eritrocitária, tendo em média apenas de 2.000 a 5.000 moléculas por célula, cuja força pode variar entre os doadores (Issit, 1998). Até em um mesmo indivíduo, há considerável heterogeneidade na sua expressão, com apenas 40 a 50% de eritrócitos positivos para os antígenos do Lutheran pela citometria de fluxo (El Nemer, 1998). A expressão dos antígenos do Lutheran é onipresente nos TES humanos. Além dos eritrócitos, a glicoproteína Lutheram expressa-se em ovários e testículos, cólon, no intestino delgado, na próstata, no timo, no baço, no pâncreas, nos rins, nos músculos esqueléticos, no fígado, na placenta, no cérebro e na medula óssea (Rahuel, 1996).

Fenótipos nulos/fracos

São conhecidos 3 fenótipos Lu_{nulo}, com padrões distintos de hereditariedade: autossômica recessiva, autossômica dominante (In(Lu)) e recessiva ligada ao X (Tab. 34.19). O fenótipo autossômico recessivo caracteriza-se pela ausência completa de antígenos Lutheran nos eritrócitos. Em consequência, os indivíduos podem elaborar um anticorpo para a glicoproteína Lutheran (anti-Lu3), que reage com todos os eritrócitos Lu-positivos.

As formas autossômica dominante e recessiva ligada ao X caracterizam-se por uma expressão Lutheran muito fraca, em geral detectada apenas por adsorção e eluição. Nos eritrócitos In(Lu), o fenótipo autossômico dominante Lu_{nulo} ocorre em 1:3.000 indivíduos e é identificado pela expressão fraca do antígeno Lutheran e de outros antígenos glicosilados (P_1, i, Indian/CD44) e pela expressão acentuada de CDw75 (Daniels, 2002). A forma ligada ao X tem expressão enfraquecida do Lutheran, acentuada do i e do CDw75 e normal de P_1, i e CD44. Como os fenótipos Lu_{nulo} In(Lu) e recessivo ligado ao X expressam algum antígeno Lutheran nos eritrócitos e outros tecidos, nenhum está associado ao desenvolvimento de anti-Lu3 (Rao, 1995). Os eritrócitos In(Lu) podem exibir anormalidades sutis, que incluem o aumento de pecilocitose e da hemólise durante armazenamento *in vitro* (Ballas, 1992).

Bioquímica

Os antígenos Lutheran situam-se em 2 glicoproteínas isoméricas do tipo 1, a glicoproteína Lu (85 kDa) e o antígeno do câncer epitelial (B-CAM, 78 kDa) (Parsons, 1987). A glicoproteína 85 kDa é a isoforma predominante, encontrada nos eritrócitos e tecidos normais. Como membros da superfamília das imunoglobulinas, as glicoproteínas 78 e 85 kDa compartilham um grande domínio extracelular comum (de 518 aminoácidos) com 5 regiões de imunoglobulina e 5 locais de *N*-glicosilação potenciais (Fig. 34.7). Três domínios de imunoglobulinas são do tipo da região 2 constante (C2), enquanto os 2 restantes são de domínios variáveis (V). A diferença de 7 kDa entre as isoformas do 78 e do 85kDa reflete o comprimento da cauda citoplasmática terminal COOH. Além de seu maior comprimento, o domínio citoplasmático da isoforma de 85 kDa possui um motivo SH3 e um sítio de ligação potencial para a proteína Src. O domínio citoplasmático também interage com a espectrina, uma proteína do citoesqueleto (Kroviarski, 2004). Por ser uma proteína altamente dobrada, estabilizada por pontes de dissulfeto, a Lutheran é destruída por agentes redutores de sulfidrila e muitas proteases.

Tabela 34.19 Fenótipos do sistema Lutheran

Reações com anti-			Fenótipo	Frequência (%) na população dos EUA		Comentários
Lu^a	Lu^b	Lu-3		Caucasiana	Negra	
+	0	+	Lu (a+b–)	0,1	0,1	
+	+	+	Lu (a+b+)	7	5	
0	+	+	Lu (a–b+)	93	95	
Fenótipos nulos (Lu_{nulo})						
0	0	0	Lu (a–b–)	Muito raro	Muito raro	Autossômico recessivo Normal CD44, i/I, CD75 Produção de anti-Lu-3
0/F*	0/f*	f*	Lu (a–b–)	Muito raro	Muito raro	Em (Lu), autossômico dominante ↓CD44, I/i; CD75
0/F*	0/f*	f*	Lu (a–b–)	Muito raro	Muito raro	Ligado ao X recessivo (*XS2*) Ausente CD75

* Antígenos Lu fracos detectados apenas por técnicas de adsorção e eluição.

Biologia molecular

O gene para a Lutheran (*LU*) fica no cromossomo 19q13.2-13.3, tem 12,5 kb e contém 15 éxons. A divisão alternada do éxon 13 é responsável pela isoforma menor de 78 kDa (El Nemer, 1997; Rahuel, 1996). Embora não haja *boxes* TATA ou GAAT na região 5' flanqueadora ou promotora do gene, ele possui sequências de consenso para vários elementos *cis*-reguladores, incluindo os onipresentes Sp1, AP2, EGR-1, Ets e GATA-1, uma proteína de ligação da transcrição eritroide (El Nemer, 1997).

A base molecular da maioria dos antígenos Lutheran já é conhecida (Tab. 34.20). A maioria resulta de polimorfismos de um único nucleotídeo (Crew, 2003; Daniels, 2002). Em contraste, a base molecular para os fenótipos Lu_{nulo} ainda é relativamente desconhecida. O fenótipo autossômico recessivo Lu_{nulo} verdadeiro surge da herança de 2 alelos amorfos silenciosos (*Lu*) (Cartron, 1998). Os genes responsáveis pelo autossômico dominante In(Lu) e pelo recessivo ligado ao X (XS2) não foram identificados ou clonados. Existe a hipótese de que os genes representem inibidores, capazes de suprimir ou infrarregular a transcrição do gene LU.

Anticorpos Lutheran

Em geral, os anticorpos Lutheran não têm significado clínico e raramente estão associados à DHRN e a reações hemolíticas transfusionais. O anti-Lu^a é o aloanticorpo Lutheran mais comum encontrado em bancos de sangue e geralmente uma aglutinina IgM à temperatura ambiente. Como nem todos os eritrócitos expressam antígenos Lu detectáveis (El Nemer, 1998), o anti-Lu^a pode exibir aglutinação mista em campo. O anti-Lu^b é um anticorpo IgG relativamente raro, tipicamente detectado no IAT. A reatividade do anti-Lu^a, do anti-Lu^b e de

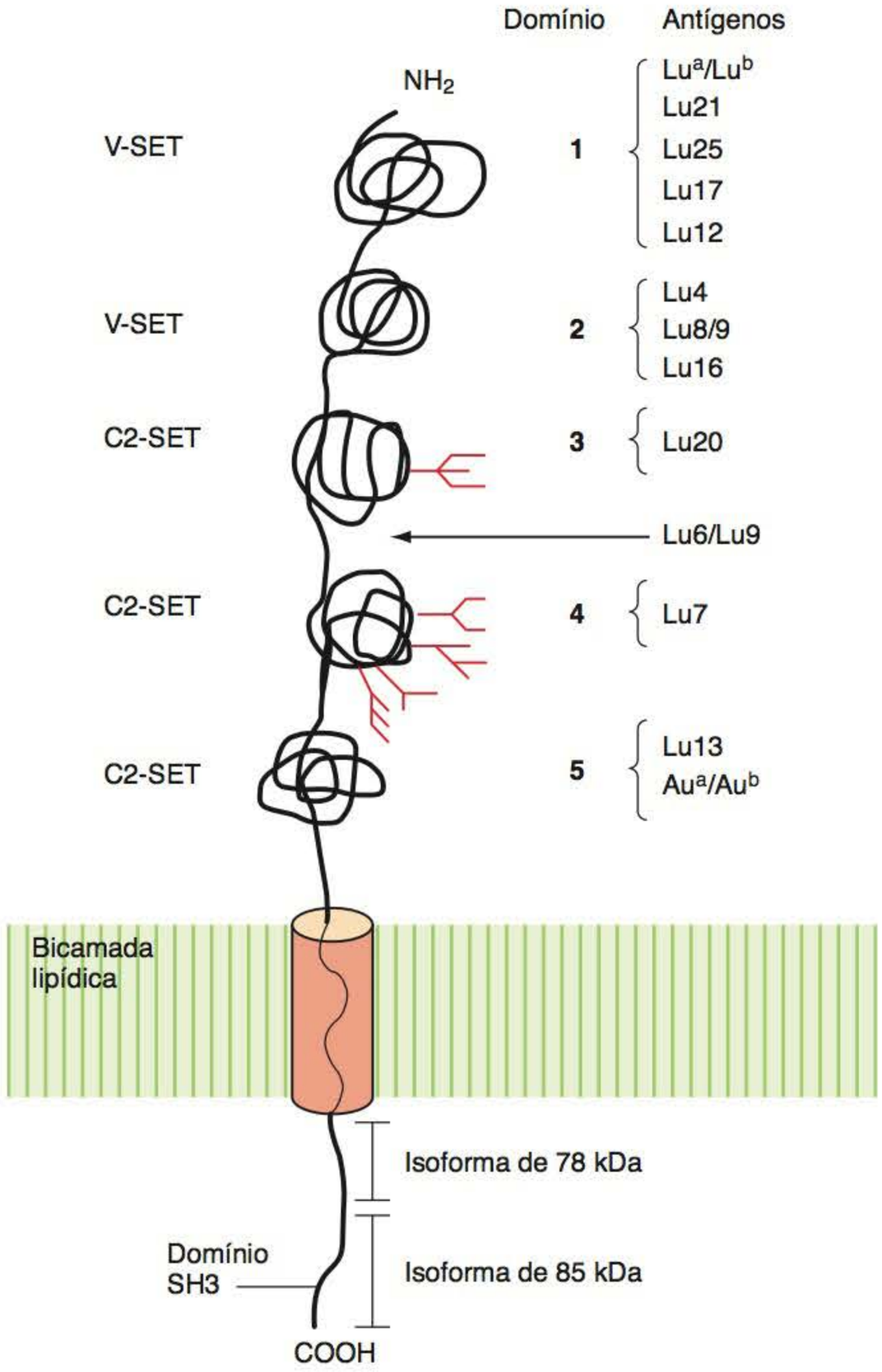


Figura 34.7 Glicoproteína Lutheran. Os antígenos Lutheran residem em 1 dos 5 domínios de imunoglobulina (V, C2-*like*). O domínio transmembrana está indicado por um cilindro âmbar. O comprimento do domínio citoplasmático pode variar de 19 (forma de 78 kDa) a 59 aminoácidos (isoforma de 85 kDa). O último também possui um motivo ligado a consenso para a proteína Src (domínio SH3).

outros anticorpos Lutheran pode ser inibida pelo tratamento prévio dos eritrócitos com quimotripsina, tripsina, AET e DTT.

Papel biológico

Em termos biológicos, o Lutheran é um receptor de alta afinidade para a laminina, uma proteína da membrana basal envolvida na diferenciação, na adesão, na migração e na proliferação celulares. A hiperexpressão da glicoproteína Lu no carcinoma de ovário e em outros cânceres supostamente facilita a adesão da célula tumoral e as metástases (Rahuel, 1996). Em pacientes com a doença falciforme, a expressão aumentada de Lu nos reticulócitos e nas células falciformes pode contribuir para a fisiopatologia das crises vaso-oclusivas. Pacientes com a doença falciforme têm evidência indireta de lesão vascular crônica, com desprendimento de células endoteliais microvasculares e exposição da membrana basal vascular (Solovey, 1997). Nesses pacientes, a maior exposição da laminina no subendotélio trombótico, acoplada à maior expressão de seu receptor nos reticulócitos e nas células falciformes, pode causar adesão dos eritrócitos e estase circulatória (El Nemer, 1998; Parsons, 2001). Como o Lu expressa-se tardiamente na diferenciação eritroide, ele não parece desempenhar um papel na adesão à matriz extracelular da medula óssea (El Nemer, 1998). No entanto, pode estar envolvido na migração de eritrócitos para fora da medula óssea (Southcott, 1999). Evidência recente mostrando uma interação entre Lu/B-CAM e a espectrina levantou a possibilidade de que o Lu também possa funcionar na sinalização celular (Kroviarski, 2004).

Sistemas de grupo sanguíneo Kell e Kx (ISBT nos 006 e 019)

Identificado pela primeira vez em 1945, o sistema Kell de grupo sanguíneo atualmente consiste em 24 antígenos de frequências alta e baixa (Tab. 34.21). Onze antígenos Kell pertencem a 5 conjuntos de antígenos alélicos, enquanto o restante é constituído predominantemente por antígenos de alta incidência (mais de 99% da população). Muitos antígenos Kell de baixa incidência (K, Js^a, Ul^a, Kp^a, Kp^c) apresentam diferenças raciais distintas. O antígeno Kell é concentrado nos eritrócitos, nas células progenitoras das séries eritroides e nos megacariócitos, do músculo esquelético e dos testículos. Os eritrócitos expressam aproximadamente de 2.000 a 6.000 cópias da proteína Kell por célula (Issitt, 1998).

Fenótipos nulos e fracos

K_oK_o é um fenótipo nulo verdadeiro, autossômico recessivo e completamete ausente de todos os antígenos Kell (Tab. 34.22). Em con-

Tabela 34.20 Antígenos do grupo sanguíneo Lutheran

Antígenos de alta frequência			Troca de aminoácido (alto → baixo)	Antígenos de baixa frequência		
ISBT	**Nome**	**Frequência**		**Frequência**	**Nome**	**ISBT**
LU2	Lu^b	99,8%	Arg77>His	5–8%	Lu^a	LU1
LU3	Lu^{ab}	> 99%	Desconhecida	Raro		
LU4	Barnes	> 99%	Arg175>Gln	Raro		
LU5	Beal	> 99%	Arg109>His	Raro		
LU6	Jan	> 99%	Ser275>Phe	1–2%	Mull	LU9
LU7	Gary	> 99%	Desconhecida (4ª IgSF)	Raro		
LU8	Taylor/MT	> 99%	Met204>Lys	1,8%	Hof	LU14
LU11	Reynolds	> 99%	Desconhecida	Raro		
LU12	Much	> 99%	Heterogênea Deleção de Arg34 + Leu35 Arg140>Gln	Raro		
LU13	Hughes	> 99%	Ser447>Leu Gln581>Leu	Raro		
LU17	Delcol	> 99%	Glu114>Lys	Raro		
LU18	Au^a	90%	Ala539>Thr	51% dos brancos 68% dos negros	Au^b	LU19
LU20		> 99%	Thr302>Met	Raro		
LU21		> 99%	Asp94>Glu	Raro		

Tabela 34.21 Antígenos dos grupos sanguíneos Kell e XK*

Antígeno (de alta freq.)		Percentagem de doadores	Troca de aminoácido (alta → baixa freq.)	Percentagem de doadores	Antígeno (de baixa freq.)	
ISBT	Nome				Nome	ISBT
KEL2	k	99,8%	Thr193>Met Ala423>Val	9% Desconhecida	K	KEL1 Fraco KEL2
KEL4	Kp^b	99,9%	Arg281>Trp Arg281>Gln	2% <0,1%	Kp^a Kp^c	KEL3 KEL21
KEL7	Js^b	>99,9%	Leu597>Pro	<1% dos brancos 19,5% dos negros	Js^a	KEL6
KEL11		>99,9%	Val302>Ala	0,3%	Wk^a	KEL17
KEL14		>99,9%	Arg180>Pro	<2%	cls	KEL24
KEL5	Ku	>99,9%	Heterogênea	0,8%	K^0	KELL NULL
			Heterogênea Glu494>Val	Raro 2,6% dos finlandeses <0,1% dos demais	Kmod UL^a	KEL10
KEL12		>99,9%	His548>Arg			
KEL13		>99,9%	Desconhecida			
KEL16		>99,8%	Desconhecida			
KEL18		>99,9%	Arg130>Trp Arg130>Gln			
KEL19		>99,9%	Arg492>Gln			
KEL20	Km	>99,9%	Desconhecida			
KEL22		>99,9%	Ala322>Val			
			Gln382>Arg	>0,1%		KEL23
			Arg248>Gln	<0,1%	VLAN	KEL25
			Arg406>Gln	Raro	TOU	KEL26
KEL27	RAZ	>99%	Glu249>Lys			
XK1	Kx	>99,9%	Mutação na proteína XK	Raro	McLeod	

* Segundo Lee et al. (1997 & errata de1998); Lee (2003b); Issitt (1998); Daniels (2002); Reid (2004b).

Tabela 34.22 Frequências dos fenótipos no sistema Kell

Reações com anti-									Fenótipo	Frequência (%) na popul ação dos EUA	
K	k	Kp^a	Kp^b	Js^a	Js^b	Ku	Km	Kx		Brancos	Negros
+	0					++*	++	f*	K+k–	0,2	Raro
+	+					++	++	f	K+k+	8,8	2
0	+					++	++	f	K–k+	91	98
		+	0			++	++	f	Kp(a+b–)	Raro	0
		+	+			++	++	f	Kp(a+b+)	2,3	Raro
		0	+			++	++	f	Kp(a–b+)	97,7	100
				+	0	++	++	f	Js(a+b–)	0	1
				+	+	++	++	f	Js(a+b+)	Raro	19
				0	+	++	++	f	Js(a–b+)	100	80
Fenótipos nulos											
0	0	0	0	0	0	0	0	++	K_o	Excepcionalmente raro	
0/f	0/f	0/f	0/f	0/f	0/f	f	f	++	K_{mod}	Raro	
0/f	0/f	0/f	0/f	0/f	0/f	0/f	0	0	McLeod	Raro	

* ++ = reatividade forte; f = reatividade fraca.

sequência, esses indivíduos podem elaborar um aloanticorpo para a glicoproteína Kell (anti-Ku). Ao contrário dos eritrócitos McLeod (ver adiante), os eritrócitos K_oK_o têm expressão acentuada do antígeno Kx, presente na proteína XK. É possível produzir um eritrócito K_oK_o em laboratório, tratando-se eritrócitos Kell-positivos com agentes redutores de sulfidrila.

Há uma diminuição significativa ou ausência dos antígenos Kell nos eritrócitos McLeod, um fenótipo recessivo ligado ao X que se caracteriza por ausência da proteína XK nos eritrócitos (antígeno Kx; XK1; ISBT 019), acantócitos e distúrbios neuromusculares. Como os indivíduos McLeod não têm as proteínas XK e Kell, podem formar aloanticorpos direcionados contra ambas as proteínas em questão. Em consequência, tais indivíduos são incompatíveis tanto com eritrócitos Kell-positivos quanto K_oK_o. Também se observa expressão deprimida nos eritrócitos K_{mod} e Gerbich-negativos, dois fenótipos autossômicos recessivos. Como o fenótipo K_oK_o, alguns indivíduos $Kell_{mod}$ apresentam expressão aumentada de Kx (KEL15) e podem desenvolver um anti-KEL5 (anti-Ku) após transfusão de eritrócitos. Foi relatada depressão transitória dos antígenos Kell em pacientes sépticos e anemia hemolítica autoimune devida a autoanticorpos anti-Kell (Judd, 1981; Issitt, 1998).

Bioquímica

Os antígenos Kell (ISBT nº 006) residem em uma glicoproteína de 93 kDa e 732 aminoácidos (CD239) com um curto domínio citosólico amino-terminal de 47 aminoácidos, um único domínio transmembrana e um grande domínio extracelular de 665 aminoácidos, que inclui a terminação carbóxi e 4 a 5 glicanos ligados ao *N* (Fig. 34.8). No fenótipo KEL1, uma substituição Thr183>Met evita o local de glicosilação, resultando em apenas quatro glicanos ligados ao *N* (Lee, 1997).

Em termos gerais, a molécula tem uma estrutura terciária complexa dobrada, graças à formação de múltiplas pontes de dissulfeto pelos 15 resíduos de cisteína presentes no seu domínio extracelular (Lee, 1997). Por causa de sua natureza altamente dobrada, a glicoproteína Kell é razoavelmente resistente à digestão proteolítica, mas perfeitamente sensível aos agentes redutores de sulfidrila, como o ditiotreitol (DTT), o brometo de aminoetilisotiourônio (AET), o 2-mercaptoetanol (2-ME) e a ZZAP, uma combinação de DTT e papaína ativada pela cisteína.

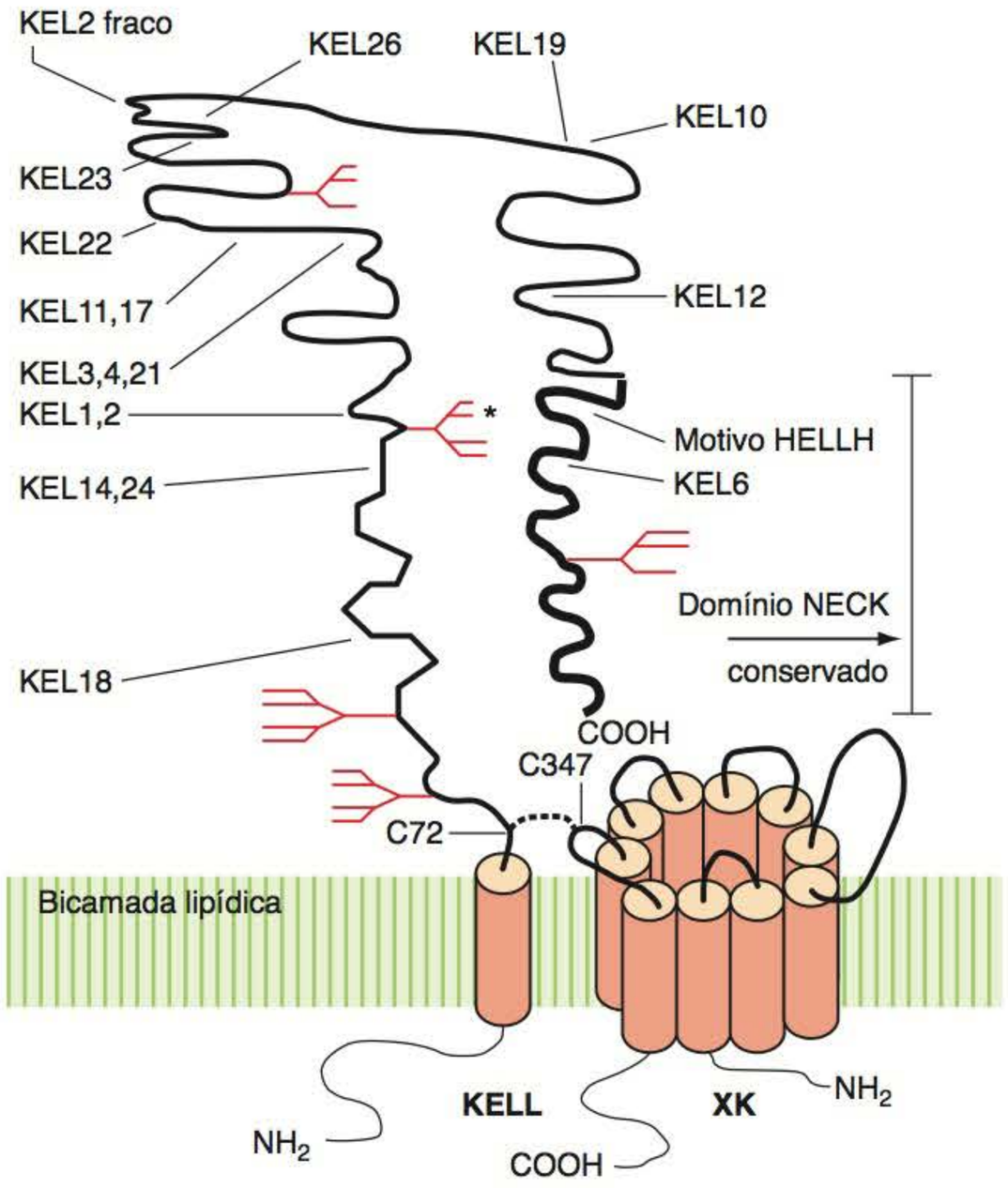


Figura 34.8 Diagrama das proteínas KELL e XK. KELL está covalentemente ligada à proteína XK por uma ponte de dissulfeto (- - - -) através da Cys72 de Kell e da Cys347 de XK. Os locais de antígenos Kell diferentes estão indicados por linhas contínuas. A área ressaltada na terminação carbóxi de KELL representa o domínio que compartilha a maior homologia com outras proteínas da família NECK (NEP-24.11, ECE-1, KELL). O motivo HELLH é uma sequência de consenso compartilhada por metaloproteinases dependentes de zinco. Os domínios transmembrana das proteínas KELL e XK estão indicados por cilindros de cor âmbar. Os locais de *N*-glicosilação estão indicados por estruturas ramificadas. O local de *N*-glicosilação assinalado com um asterisco não está presente em indivíduos com o fenótipo KEL1-positivo.

Na membrana do eritrócito, a glicoproteína Kell está ligada de forma covalente à proteína XK (ISBT nº 019), uma proteína multietapa não glicosilada de 444 aminoácidos que contém 10 domínios transmembrana. Codificada por um gene no cromossomo Xp21, supõe-se que a proteína XK seja uma proteína de transporte transmembrana, embora isso ainda não tenha sido demonstrado. Nos eritrócitos, a proteína XK está ligada de forma covalente à proteína Kell, por meio de uma ponte dissulfeto no Cys347 na quinta alça extracelular da proteína XK e no Cys72 da Kell. Na ausência da proteína XK (fenótipo McLeod), a expressão de Kell é menor nos eritrócitos, sugerindo que a proteína XK possa ajudar no transporte da Kell. Entretanto, estudos recentes de transfecção em células COS mostram transporte e dobramento normais da proteína Kell na ausência da proteína XK (Russo, a998). A expressão de XK também não é dependente da expressão da Kell. A proteína XK expressa-se em vários tecidos não eritroides, inclusive fígado, músculos esqueléticos, coração, cérebro e pâncreas (Ho, 1994).

Biologia molecular

Clonado em 1991, o gene Kell (*KEL*) contém 19 éxons que abrangem 21,5 kb no cromossomo 7q33 próximo do gene da fibrose cística. A região promotora e o éxon 1 contêm várias sequências de consenso ligadas para GATA-1, um fator de ligação regulador da transcrição eritroide. Kell é um membro da família da neprilisina M13 de endopeptidases zíncicas neutras e compartilha homologia com o antígeno comum da leucemia linfocítica aguda (CALLA, CD10), da enzima conversora de endotelina (ECE-1), da endopeptidase neutra 24.11 (NEP-24.11) e da PEX. A região de maior homologia fica na metade carboxiterminal da molécula (aminoácidos 550 a 652), às vezes sendo mencionada como o domínio NECK (N-24.11, EC-1, família K). Essa região relativamente conservada compartilha 34 a 36% de homologia com os domínios catalíticos carboxiterminais de NEP-24.11 e ECE-1, bem como um motivo pentamérico ligado ao zinco (HELLH), aspecto comum das metaloproteinases dependentes de zinco (Lee, 1997).

Com a clonagem do gene Kell, foi possível estabelecer a base molecular e a bioquímica de vários antígenos Kell. Conforme mostrado na Tabela 34.21, todos os aloantígenos Kell identificados e sequenciados são polimorfismos de um único aminoácido na proteína Kell traduzida. Além disso, quase todos os polimorfismos de aminoácido ocorrem na metade amino da molécula (Lee, 1997).

Vários indivíduos com a expressão Kell ausente ou deprimida também foram estudados. O fenótipo K_oK_o surge da homozigosidade de um gene *KEL* amorfo silencioso. Foram identificadas múltiplas mutações inativadoras do gene *KEL*, inclusive mutações no sítio de emenda e códons de parada prematuros (Lee, 1997; Daniels, 2002). Mutações de sentido errôneo são responsáveis pelo fenótipo K_{mod} (Lee, 2003b). Foram identificadas também várias mutações na proteína XK no Xp21, responsável pelo fenótipo McLeod (Russo, 2002). A base molecular da expressão diminuída do antígeno Kell com fenótipos Gerbich-negativos é desconhecida. Especula-se que a proteína Kell e a glicoforina C (Gerbich) possam ser vizinhas na membrana do eritrócito.

Anticorpos Kell

Os aloanticorpos contra antígenos no grupo sanguíneo Kell têm significado clínico (Tab. 34.7). Eles podem estar associados a reações hemolíticas transfusionais imediatas e tardias. Os anticorpos anti-Kell também estão associados à DHRN. A DHRN secundária a anticorpos anti-Kell maternos em geral caracteriza-se por reticulocitopenia, com pouca ou nenhuma bilirrubina. Atualmente, sabe-se que o anti-Kell materno (anti-KEL1) suprime diretamente os progenitores eritroides, ocasionando uma anemia reticulocitopênica grave no feto (Vaughan, 1998). Também há relatos de trombocitopenia neonatal, decorrente da supressão de megacariócitos na medula óssea pelo anti-KEL1 (Wagner, 2000).

O anticorpo encontrado mais comumente contra o grupo sanguíneo Kell é o anti-KEL1, que, em termos de imunogenicidade, perde apenas para o Rh D, ficando em segundo. Os anticorpos contra antígenos Kell são do isotipo IgG, surgindo da estimulação imune via transfusão ou gravidez, embora sejam conhecidos exemplos de aloanticorpos de ocorrência natural (Judd, 1981). Como os antígenos Kell são sensíveis aos agentes redutores de sulfidrila, a atividade dos anticorpos anti-Kell pode ser eliminada mediante o tratamento prévio dos eritrócitos com AET, DTT, 2-ME ou ZZAP.

Papel biológico

Apesar da homologia da proteína Kell com outras endopeptidases neutras, não foram descritas funções proteolíticas ou outras funções biológicas para ela. Também não existem síndromes clínicas conhecidas ou sequelas associadas ao fenótipo Kell nulo (K_o). No entanto, a capacidade do anti-Kell de suprimir a eritropoiese fetal sugere um papel possível da Kell durante a diferenciação e a maturação da linhagem eritroide (Vaughan, 1998). Além disso, estudos mostraram que a Kell é fosforilada *in vivo*, possivelmente pelas caseína quinases 1 e 2 (Carbonnet, 1998). Como a fosforilação da proteína regula um grande número de funções biológicas, tais resultados confirmam um papel fisiológico para a Kell. É interessante notar que a CALLA (CD10), outra proteína NECK, também serve como substrato para a caseína quinase 2 (Carbonnet, 1998). Mostrou-se que a Kell cliva a endotelina 3, um vasoconstritor potente e mitógeno envolvido na migração de células da crista neural e do sistema nervoso entérico (Lee, 1999).

Em contraste com a Kell, a ausência da proteína XK está fortemente associada a vários achados clínicos e laboratoriais anormais. Os eritrócitos McLeod têm sobrevida mais curta, são menos permeáveis à água e sua morfologia é anormal (acantócitos). A síndrome McLeod, que se caracteriza por anormalidades hematológicas e neuromusculares, manifesta-se tipicamente com arreflexia, distonia e movimentos coreiformes em uma fase tardia da vida. Distrofia muscular de início tardio e miocardiopatia também podem ser observadas. Acredita-se que os defeitos hematológicos e neuromusculares nos pacientes com McLeod resultam da ausência da proteína XK nos eritrócitos, no cérebro, no coração e na musculatura esquelética (Ho, 1994). É interessante que o gene da doença de Huntington, outro distúrbio neurodegenerativo, esteja localizado perto do gene XK no cromossomo X (Issitt, 1998).

O fenótipo McLeod também pode estar associado a doença granulomatosa crônica (DGC), um defeito funcional dos neutrófilos que resulta em infecções bacterianas graves, recorrentes e potencialmente fatais. Em 2/3 dos pacientes, a DGC resulta de uma deleção ou uma mutação do gene do citocromo b (*CYBB*) no cromossomo X. Como resultado da proximidade dos genes *CYBB* e *XK* no cromossomo X, aproximadamente 7% dos pacientes com DGC ligada ao X também expressam um fenótipo McLeod (Curnutte, 1995).

Sistema de grupo sanguíneo Lewis (ISBT nº 007)

Consiste primariamente em 2 antígenos, o Lewis^a (Le^a) e o Lewis^b (Le^b). Outros 4 antígenos (Le^{ab}, Le^{bH}, ALe^b, BLe^b) refletem a influência do ABO na síntese e na antigenicidade do Lewis. Nos eritrócitos, os antígenos Lewis residem em glicoesfingolipídeos, compostos por um grupo encabeçado por um carboidrato ativo Lewis ligado a uma cauda lipídica de ceramida (*N*-acil esfingosina). Ao contrário da maioria dos antígenos eritrocitários, os antígenos Lewis não são de origem eritroide, sendo sintetizados no trato gastrintestinal e adsorvidos passivamente nos eritrócitos a partir de um compartimento solúvel de substância Lewis secretada no plasma. Os tecidos e líquidos que expressam Lewis incluem plasma, saliva, eritrócitos, plaquetas, linfócitos, endotélio, uroepitélio e mucosa intestinal. Em alguns tecidos, os antígenos Lewis expressam-se em glicoesfingolipídeos, glicoproteínas e mucinas (Hauser, 1995; Issitt, 1998).

Observam-se 3 fenótipos Lewis em adultos, o Le (a+b-), o Le (a-b+) e o Le (a-b-). O Le (a+b+) só é observado raramente, em geral nos eritrócitos de crianças muito jovens e alguns indivíduos de origem polinésia, japonesa ou tailandesa (Issitt, 1998). Conforme mostrado na Tabela 34.23, o fenótipo Le (a-b-) é 5 vezes mais comum em pessoas negras do que nas brancas, também estando em número aumentado em recém-nascidos, em consequência à expressão tardia no desenvolvimento dos genes Lewis e Secretor. Por volta dos cinco anos de idade, a maioria das crianças expressa níveis adultos de antígenos Lewis em seus eritrócitos. A quantidade do antígeno Lewis nos eritrócitos também é influenciada pelo tipo ABO. Os eritrócitos Le (a-b+) de doadores do grupo O parecem ter mais Le^b que as células A_1 e B. Conforme será discutido adiante, doadores dos grupos A_1 e B podem converter Le^b em ALe^b BLe^b, respectivamente (Issitt, 1998).

Bioquímica

Embora tenham relação biossintética entre si, os antígenos Le^a e Le^b não são alélicos. Eles representam uma interação complexa de 2 glicosiltransferases distintas, a fucosiltransferase do tipo II (FUT2) e a fucosiltransferase do tipo III (FUT3), a última sendo o produto do gene Lewis (*Le/FUT3*) e uma fucosiltransferase α1-3/4. A FUT2, o produto do gene Secretor (*Se*), é uma fucosiltransferase α1-2 relacionada ao gene H. Na Tabela 34.23 e na Figura 34.9 é mostrado como os genes Le, Se e ABO interagem para produzir as combinações diferentes de eritrócitos e fenótipos plasmáticos.

Tabela 34.23 Sistema de grupo sanguíneo Lewis

Fenótipo	Frequências (%) em adultos nos EUA		Genótipo possível		Substâncias ABH e Lewis na saliva e no plasma		
	Brancos	Negros	Gene *Le*	Gene *Se*	Grupo O	Grupo A	Grupo B
Le (a+b–)	22	23	*Le/Le* ou *Le/le*	*se/se*	Le^a	Le^a	Le^a
Le (a–b+)	72	55	*Le/Le* ou *Le/le*	*Se/Se* ou *Se/se*	Tipo 1 H Le^a, Le^b	Tipo 1 H e A Le^a, Le^b, ALe^b	Tipo 1 H e B Le^a, Le^b, BLe^b
Le (a–b–)	6	22	*le/le*	*Se/se*	Tipo 1 H	Tipo 1 H e A	Tipo 1 H e B
			le/le	*se/se*	Precursor da cadeia do tipo 1 (Le^c)	Precursor da cadeia do tipo 1 (Le^c)	Precursor da cadeia do tipo 1 (Le^c)

A molécula precursora dos antígenos Lewis e de outros antígenos relacionados é uma cadeia precursora do tipo 1, historicamente conhecida como antígeno Le^c. Nos doadores (a+b-), FUT3 ou Lewis acrescenta uma fucose α1-4 ligada ao Le^c para formar o antígeno Le^a. Como esses doadores não têm o gene *Se/FUT2* (*se/se*), nenhuma cadeia H do tipo 1 (Le^d) é formada. Como resultado, apenas o antígeno Le^a está presente no plasma, na saliva e nos eritrócitos.

O fenótipo Le (a-b+) nos eritrócitos resulta da herança de ambos os genes *Le* e *Se*. A FUT3 converte, ainda, uma pequena quantidade de precursor da cadeia do tipo 1 em antígeno Le^a. No entanto, a maioria da substância Le^c é convertida em H ou Le^d da cadeia do tipo 1 pela FUT2 (Fig. 34.9). Subsequentemente, a FUT3 acrescenta uma segunda fucose para formar o antígeno Le^b (Lowe, 1994). Nas pessoas dos grupos A e B, o H da cadeia do tipo 1 é, ainda, modificado pela

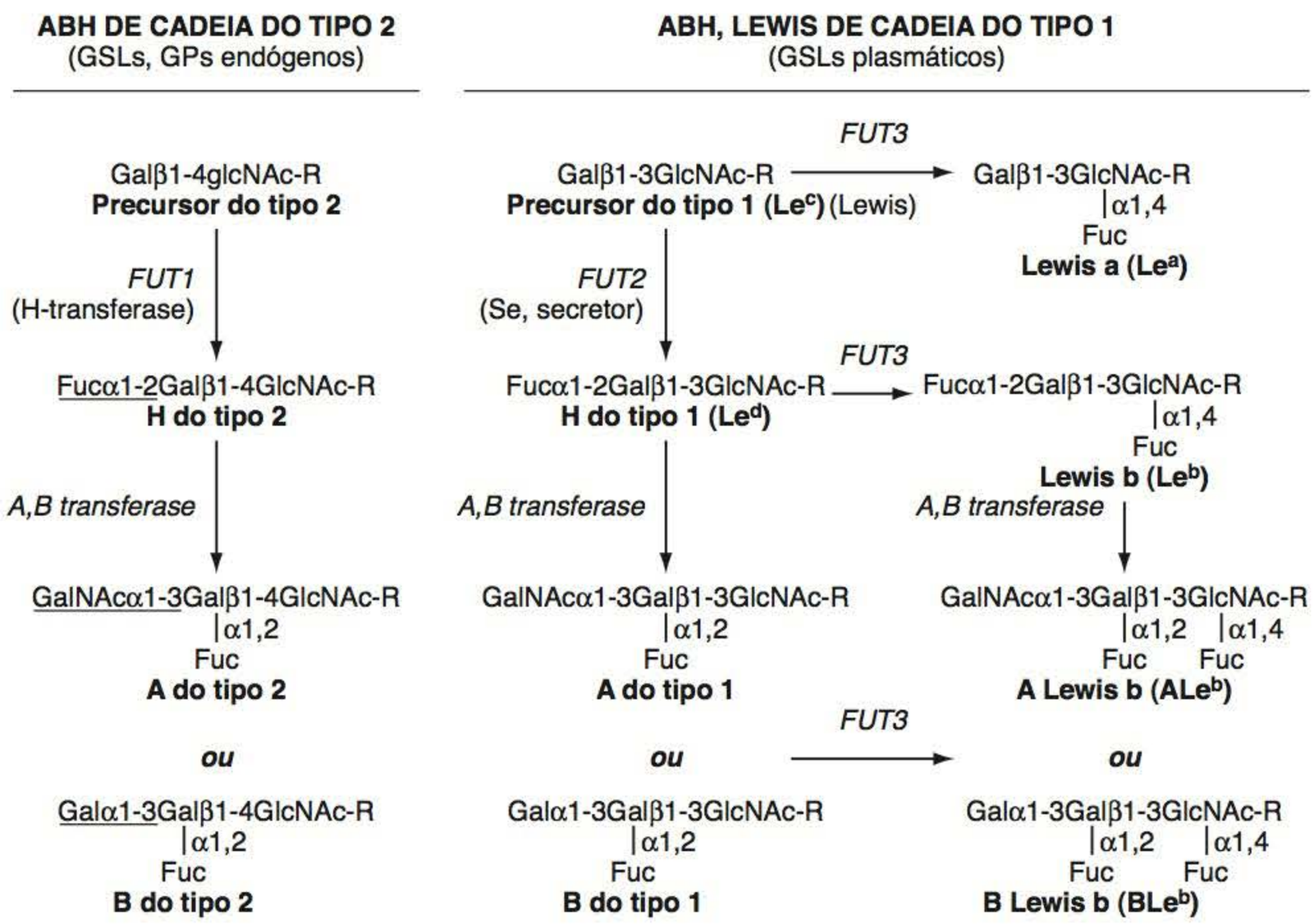


Figura 34.9 Síntese dos antígenos Lewis e ABH de cadeia do tipo 1. R = ceramida; Fuc = fucose; Gal = galactose; GalNAc = *N*-acetilgalactosamina; Glc = glicose; GlcNAc = *N*-acetilglicosamina; Le = Lewis.

glicosiltransferase A/B para formar os antígenos A e B da cadeia do tipo 1. Como os antígenos H e Le^c da cadeia do tipo 1, essas moléculas podem servir como substratos para a FUT3 formar ALe^b e BLe^b (Fig. 34.9). Nos doadores do grupo A_1, ALe^b é o principal antígeno Le^b encontrado no plasma (Lindstrom, 1992).

O fenótipo eritrocitário Le (a-b-) ocorre em indivíduos que não têm o gene *Le/FUT3*. Os indivíduos negativos para ambos os alelos *Le* e *Se* (*le/le, se/se*) são incapazes de sintetizar o antígeno Le^a ou os antígenos H da cadeia do tipo 1. Como resultado, apenas o precursor da cadeia do tipo 1 ou o antígeno Le^c está presente nas secreções e no plasma. Em contraste, indivíduos que herdam pelo menos um alelo *Se* podem expressar glicolipídeos da cadeia do tipo 1 com atividade ABH.

Biologia molecular

O gene *FUT3* ou Lewis reside no cromossomo 19p13.3, perto de 2 outros genes da fucosiltransferase α 1-3, *FUT5* e *FUT6*. Todas as 3 fucosiltransferases α 1-3 são altamente homólogas, o que é consistente com a duplicação do gene (Weston, 1992). O gene codifica uma glicoproteína do tipo II de 361 aminoácidos, com atividade de fucosiltransferase tanto α 1-3 (Le^a) quanto α 1-4 (Le^X). O *FUT3* expressa-se altamente no cólon, no estômago, no intestino delgado, nos pulmões e nos rins, com expressão mais fraca nas glândulas salivares, na bexiga, no útero e no fígado. O *FUT6* expressa-se em conjunto com o *FUT3* na maioria dos tecidos (Cameron, 1995).

O fenótipo Le (a-b-), ou nulo, surge de mutações inativadoras no *FUT3*. Foram identificadas mais de 10 mutações de sentido errôneo no gene *FUT3*, com a maioria dos alelos *FUT3* nulos tendo pelo menos 2 mutações (Daniels, 2002; Reid, 2004b). O fenótipo Lewis fraco (Le^w), que se caracteriza por um fenótipo eritrocitário Le (a-b-) e pela presença da substância Lewis ativa na saliva, deve-se a uma única mutação de sentido errôneo no domínio transmembrana (T59>G). A última tem atividade enzimática normal, porém retenção do complexo de Golgi diminuída (Mollicone, 1994).

O gene *FUT2* (*Se*) reside no cromossomo 19q13.3, como parte de um aglomerado gênico de 100 kb que inclui o gene *H* (*FUT1*) e *Sec1*, um pseudogene inativo semelhante ao *FUT2* (Kelly, 1995). Foram relatados múltiplos alelos nulos, com distribuições geográficas e étnicas distintas. A maioria dos alelos nulos resulta de mutações sem sentido (Daniels, 2002). O fenótipo secretor parcial foi ligado a uma mutação Ile29>Phe (Yu, 1995).

Anticorpos Lewis

Como o ABO, os anticorpos contra os antígenos Le^a e Le^b são anticorpos IgM de ocorrência natural (Tab. 34.7). A maioria dos exemplares é detectada como aglutininas à temperatura ambiente, entretanto alguns exemplares são reativos no IAT. Embora incomuns, alguns exemplares demonstram hemólise *in vitro*. Como Le^a e Le^b são glicoesfingolipídeos, a reatividade do anticorpo pode ser acentuada pelo tratamento prévio dos eritrócitos com enzimas. A reatividade do anticorpo é neutralizada pelo acréscimo da substância Lewis solúvel disponível no comércio ou de plasma contendo o antígeno Lewis solúvel de interesse. Pode-se observar anti-Le^b em indivíduos de fenótipo Le (a+b+) e Le (a-b-), enquanto anti-Le^a só é observado em indivíduos Le (a-b-). O anti-Le^a não é observado no fenótipo Le (a-b+) porque tais indivíduos sintetizam uma quantidade pequena de Le^a. É interessante o fato de que algumas mulheres Le (a-b+) podem apresentar o fenótipo Le (b-) transitoriamente, com o desenvolvimento de anti-Le^b, durante a gravidez. Alguns exemplos de anti-Le^b podem demonstrar especificidade ABH (anti-Le^{bH}, anti-Le^b, anti-Le^b), reagindo mais fortemente com eritrócitos Le^b-positivos ou tipos ABO específicos.

Os anticorpos anti-Lewis raramente têm significado clínico. Eles não estão associados à DHRN e apenas raras vezes associam-se a reações hemolíticas transfusionais. Especula-se que desempenhariam um papel na rejeição a enxerto renal em indivíduos negros Le (a-b-) (Spitalnik, 1984). Pacientes com anticorpos anti-Lewis reativos apenas à temperatura ambiente podem receber transfusões com segurança de eritrócitos compatíveis. Em contrapartida, exemplos de anti-Le^a ou anti-Le^b que são hemolíticos *in vitro* devem receber eritrócitos compatíveis negativos para o antígeno. Caso não se disponha de sangue negativo para o antígeno, a infusão de plasma contendo o antígeno Lewis solúvel de interesse pode ser útil para neutralizar ou inibir o anticorpo circulante antes da transfusão de eritrócitos (Mollison, 1993).

Papel biológico

Os antígenos do grupo sanguíneo Lewis desempenham um papel importante nos casos de doença. O *Helicobacter pylori*, agente causador de gastrite e úlceras, liga-se aos antígenos H, Le^b e Le^y via reconhecimento de um epítopo terminal Fuca1-2Gal (Boren, 1993), o que parece explicar a maior incidência de úlceras de câncer de estômago entre o grupo sanguíneo O e secretores. Um fenótipo Lewis nulo e/ou não secretor também foi ligado a maior incidência de vaginite por *Candida* e infecções do trato urinário (Sheinfeld, 1989; Hilton, 1995). Um fenótipo Le (a-b-) está associado a maior incidência de cardiopatia (Ellison, 1999). A expressão aberrante de Sialil-Le^a ocorre em muitos cânceres gastrintestinais e de células uroepiteliais, podendo contribuir para metástase tumoral. Sialil-Le^a é um ligante para a adesão endotelial da molécula de selectina E e pode mediar interações da célula tumoral com o endotélio (Takada, 1993). Sialil-Le^a também é o epítopo para o marcador tumoral CA 19-9, um marcador sorológico útil para monitorar pacientes com malignidades gastrintestinais, entre outras.

Sistema de grupo sanguíneo Duffy (ISBT nº 008)

O sistema Duffy (Fy) de grupo sanguíneo foi descoberto em 1951 e contém de 5 a 6 antígenos, Fy^a, Fy^b, Fy3, Fy5 e Fy6. Fy^a e Fy^b são antígenos autossômicos codominantes, ao passo que Fy3, Fy5 e Fy6 são antígenos de alta incidência, presentes em todos os eritrócitos, exceto com o fenótipo Duffy nulo. O antígeno Fy4, originalmente descrito nos eritrócitos Fy (a-b-), atualmente é tido como um antígeno distinto não relacionado. Os antígenos Fy^a e Fy^b são comuns em pessoas brancas, enquanto o fenótipo Duffy nulo, ou Fy (a-b-), é predominante em pessoas negras (Tab. 34.24). O Fy^x, caracterizado pela expressão

Tabela 34.24 Frequências dos fenótipos no sistema Duffy

Reações com anti-			Fenótipo dos eritrócitos	Brancos		Negros	
Fy^a	Fy^b	Fy3		Frequência*	Genótipos†	Frequência*	Genótipos*
+	–	+	Fy (a+b–)	17	*FY*A/FY*A*	9	FY*A/FY*A *FY*A/FY*Fy*
+	+	+	Fy (a+b+)	49	*FY*A/FY*B*	1	*FY*A/FY*B*
–	+	+	Fy (a–b+)	34	*FY*B/FY*B*	22	*FY*B/FY*B* *FY*B/FY**Fy*
–	–	–	Fy (a–b–)	Muito raro	*FY* amorfo*	68	*FY*Fy/FY*Fy*
+/–	f	f	Fy (a+b^f) Fy (a–b^f)	< 0,1%	*FY*A/FY*X* *FY*X*	Muito raro	*FY*A/FY*X* *FY*X FY*X/FY*Fy*

* Frequência (%) na população dos EUA.

† Abreviaturas: *FY*A* = alelo Fy^a; *FY*B* = alelo Fy^b; *FY*Fy* = *alelo FY*B* com uma mutação no promotor *GATA-1*; *FY*X* = gene *FY*B* contendo uma mutação de sentido errôneo ou no promotor *Sp1* com expressão fraca de Fy^b; *FY*amorfo* = gene *FY* silencioso, contendo mutações de ruptura (deleção, estruturais, sem sentido). Ver o texto.

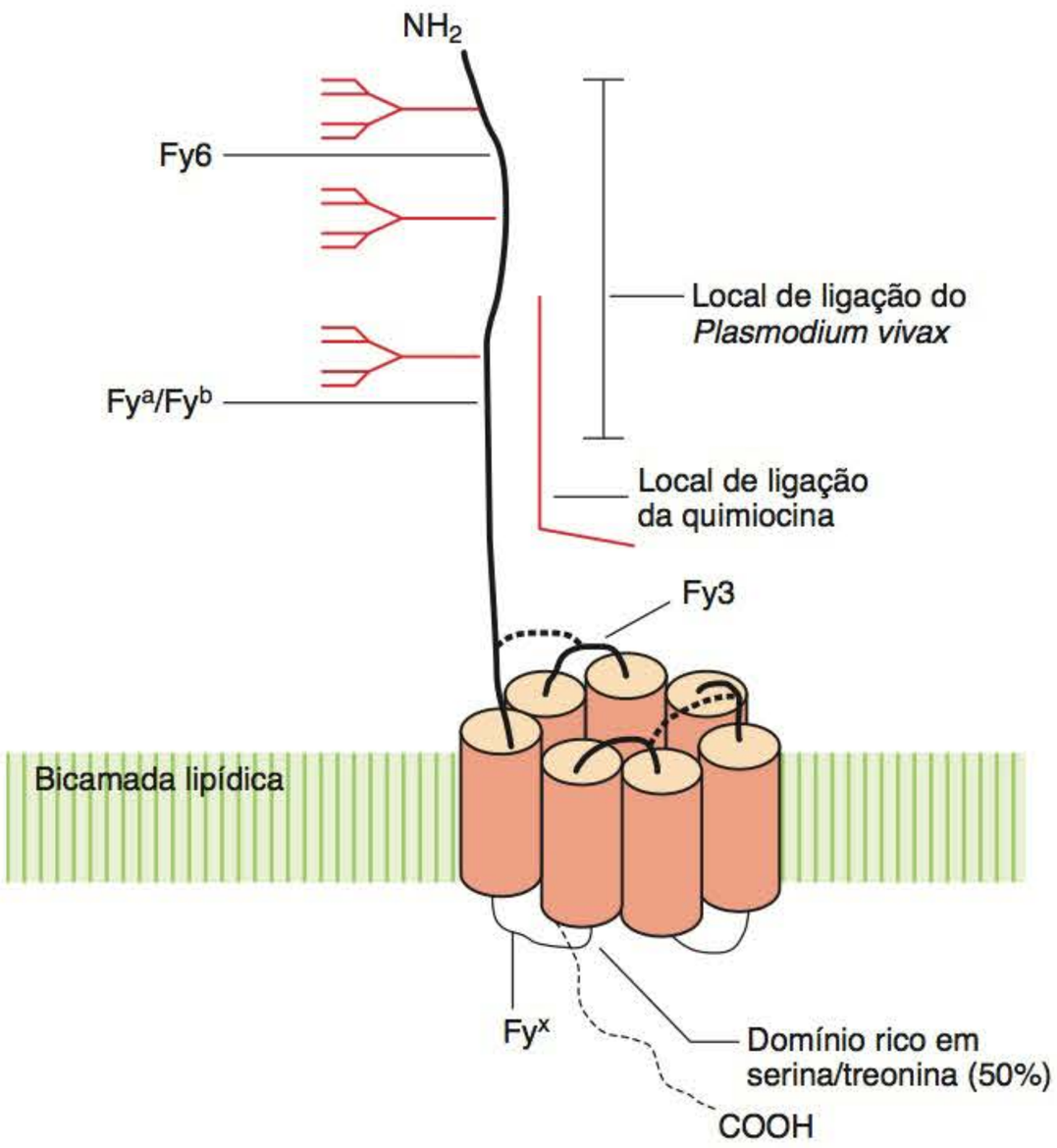


Figura 34.10 Glicoproteína Duffy ou DARC (receptor do antígeno *Duffy* para a molécula de quimiocina). A DARC contém um domínio amino-terminal extracelular de 62 aminoácidos e 7 domínios transmembrana, indicados por cilindros de cor âmbar. Há uma ponte de dissulfeto entre o domínio amino-terminal e a terceira alça extracelular. Existe uma segunda ponte de dissuleto entre a primeira e a segunda alças extracelulares. Três locais de *N*-glicosilação estão indicados por estruturas ramificadas. Os locais dos antígenos Fy3, Fy6 e Fy^a/Fy^b estão indicados por setas. O local de ligação para o *Plasmodium vivax* fica entre os aminoácidos 8 e 44 e inclui os antígenos Fy6 e Fy^a/Fy^b. O sítio de ligação da quimiocina fica em uma fenda entre o domínio amino-terminal e a terceira alça extracelular. A mutação que leva ao fenótipo Fy^x, caracterizada por expressão fraca de Fy^b, está presente na primeira alça citoplasmática.

extremamente baixa do Fy^b, é um tanto raro. Além dos eritrócitos, os antígenos Duffy expressam-se nas células de Purkinje cerebelares e nas células endoteliais de vênulas pós-capilares. Também há relatos de antígenos Duffy em células endoteliais de glomérulos renais, *vasa recta*, tireoide e capilares pulmonares, células descamativas alveolares do tipo 1 e células epiteliais dos túbulos coletores renais (Chaudhuri, 1997; Hadley, 1997). Os eritrócitos possuem aproximadamente 12.000 a 14.000 cópias da glicoproteína Fy (DARC) por célula (Daniels, 2002).

Bioquímica

Os antígenos *Duffy* residem no DARC (receptor do antígeno Duffy para quimiocinas) (Fig. 34.10), uma glicoproteína de 338 aminoácidos integrante da membrana que contém uma terminação amino extracelular de 62 aminoácidos, 7 domínios transmembrana e 1 terminação carbóxi intracelular rica em resíduos de serina e treonina. O domínio amino-terminal possui 3 locais de *N*-glicosilação e está ligado à terceira alça extracelular para uma ponte de dissulfeto para formar uma estrutura hepato-helicoidal. Existe uma segunda ponte de dissulfeto entre a primeira e a segunda alças extracelulares. Os antígenos Fy^a, Fy^b e Fy6 residem no domínio amino-terminal do DARC e são sensíveis à clivagem proteolítica. O domínio amino-terminal também é onde está localizada a ligação para o *Plasmodium vivax* e desempenha um papel na ligação de quimiocina. Acredita-se que o antígeno de alta incidência, Fy3, reside na terceira alça extracelular (Hadley, 1997; Wasniowska, 2004).

Biologia molecular

Localizado no cromossomo 1q22-23, o *Duffy* (*FY*) é um gene de 1.014 pares de bases que contém 2 éxons, um pequeno montante que codifica os 7 primeiros aminoácidos e um segundo que codifica o restante da molécula (Hadley, 1997). A região promotora contém sequências de consenso para múltiplos elementos *cis*-reguladores, incluindo AP-1, Sp1 e GATA-1, uma proteína de ligação ativadora da transcrição eritroide que controla a transcrição do DARC nas células eritroides (Iwamoto, 1996). Estudos filogenéticos indicam que *Fy*B* é o gene ancestral de humanos e primatas não humanos (Li, 1997). Estudos genéticos identificaram 4 alelos *Duffy*: *FY*A*, *FY*B*, *FY*Fy* e *FY*X*, responsáveis pelos fenótipos Fy^a, Fy^b, Fy nulo e Fy^x, respectivamente (Tab. 34.24). Os alelos codominantes *FY*A* e *FY*B* diferem por um único aminoácido (Asp42Gly; G131A). O fenótipo Fy^x (*FY*X*), que se caracteriza pela expressão extremamente fraca de Fy^b, surge de uma substituição Arg88>Cys na primeira alça citoplasmática, ocasionando instabilidade da proteína (Tournamille, 1998; Yazdanbakhsh, 2000).

Dois mecanismos distintos são responsáveis pelo fenótipo Fy nulo, ou Fy (a-b-). Em pessoas brancas, entre outras, o gene *FY* sofre ruptura (*FY* amorfo*), o que acarreta ausência completa de DARC em todos os tecidos (Daniels, 2002). Como resultado, esses indivíduos podem formar aloanticorpos para todos os antígenos Duffy, inclusive os de alta incidência (Fy3, Fy5). Em contraste, indivíduos negros Fy (a-b-) são homozigotos para *FY*Fy*, um alelo semelhante ao *FY*B* que tem uma mutação pontual no gene *FY* promotor que torna nulo o sítio de ligação de consenso para GATA-1, um fator de transcrição e ligação eritroide que regula a expressão de *FY* e outros genes nos eritrócitos (Iwamoto, 1996; Moulds, 1998). Como resultado, não há transcrição de *FY* nos eritrócitos, mas ela ocorre nas células endoteliais e epiteliais, que utilizam outros elementos promotores/facilitadores. Como o Fy^b expressa-se em células não eritroides, os indivíduos negros Fy (a-b-) não formam anti-Fy^b e apenas raramente formam anti-Fy3.

Anticorpos Duffy

Os anticorpos contra Fy^a, Fy^b e outros antígenos Duffy têm significado clínico e estão associados à DHRN e a reações hemolíticas transfusionais imediatas e tardias. Em geral, são do isotipo IgG, reativos a 37°C e detectados apenas no IAT. Os anticorpos contra os antígenos Fy^a, Fy^b e Fy6, que residem no longo domínio amino-terminal do DARC, podem ser inibidos pela digestão prévia dos eritrócitos por protease. Em contrapartida, os antígenos Fy5 e Fy3 são relativamente resistentes à digestão pela protease. Os anticorpos contra os antígenos Duffy podem demonstrar dosagem.

Em termos clínicos, o anti-Fy^a é o aloanticorpo mais comumente encontrado e pode ser observado em indivíduos Fy (a-) de todas as etnias. O anti-Fy^b é relativamente incomum, sendo observado primordialmente em pessoas não negras. Os aloanticorpos contra os antígenos de alta incidência Fy3 e Fy5 são raros, ocorrendo predominantemente em indivíduos brancos Fy nulos. O anti-Fy3 comporta-se como um anti-Fy^{a+b}, reagindo com todo eritrócito Duffy-positivo. O anti-Fy5 também reage como um anti-Fy^{a+b}, porém requer a presença de antígenos Rh para apresentar reatividade. O anti-Fy6 não foi observado na prática clínica, mas é o epítopo para um anticorpo monoclonal anti-Duffy (Daniels, 2002).

Papel biológico

O DARC é uma proteína de ligação para a quimiocina, capaz de ligar várias quimiocinas inflamatórias das famílias C-X-C e C-C (Gardner, 2004), inclusive interleucina-8, RANTES e MCP-1 (Fig. 34.10). O DARC não transmite um sinal intracelular sobre a ligação de quimiocinas, porém pode facilitar o recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação, ao estabelecer um gradiente de quimiocina e quimiocinas transportadoras por meio do endotélio ativado (Lee, 2003b). Em camundongos, o DARC age como um escoadouro de quimiocina, ajudando a manter as concentrações circulantes de quimiocina (Fukuma, 2003). Em humanos, não existe síndrome clínica associada a um fenótipo Fy nulo, porém o DARC e um fenótipo Fy nulo podem contribuir para a sobrevida precária do enxerto após transplante renal (Akalin, 2003; Segerer, 2003). O sítio de ligação da DARC para quimiocinas fica em uma fenda que envolve o domínio amino-terminal e a terceira alça extracelular (Fig. 34.10).

O DARC também é o receptor para o *P. vivax*, que se liga a ele perto do epítopo Fy6. Os reticulócitos de indivíduos Fy nulo são resistentes à infecção pelo *P. vivax*, proporcionando uma vantagem

Tabela 34.25 Fenótipos do sistema Kidd

Reações com anti-			Fenótipo	Frequência (%) na população dos EUA		Comentários
Jk^a	Jk^b	Jk3		Caucasianos	Negros	
+	0	+	Jk (a+b–)	28	57	Autossômico codominante
+	+	+	Jk (a+b+)	49	34	Sensível à ureia 2 M
0	+	+	Jk (a–b+)	23	9	
Fenótipos nulos (Jk_{nulo})						
0	0	0	Jk (a–b–)	Muito raro	Muito raro	Autossômico recessivo Resistente à ureia 2 M
0/f*	0/f*	f*	Jk (a–b–)	–	–	No (Jk) autossômico dominante Raro, apenas em japoneses Parcialmente resistente à ureia 2 M

* Antígenos Jk fracos detectados apenas por técnicas de adsorção e eluição.

seletiva para as populações que vivem em áreas onde a malária é endêmica, o que provavelmente explica a prevalência do fenótipo Fy nulo em pessoas negras.

Sistema de grupo sanguíneo Kidd (ISBT nº 009)

Consiste em 2 antígenos alélicos, Jk^a e Jk^b. A herança é autossômica codominante, com 3 fenótipos predominantes (Tab. 34.25). Um quarto fenótipo, o Jk_{nulo} ou Jk (a-b-), é muito raro, exceto entre os polinésios (≤1%) e os finlandeses. Além dos eritrócitos, os antígenos Kidd expressam-se ao longo das células endoteliais dos *vasa recta* descendentes da medula renal. Também há evidência sugestiva da expressão constitutiva em nível baixo do Kidd no coração, nos músculos esqueléticos, no cólon, no intestino delgado, no timo, no cérebro, no pâncreas, no baço, no PTT, na bexiga e no fígado (Olives, 1996). Há 14.000 epítopos Kidd por eritrócito humano (Lucien, 2002).

Fenótipos nulos

O Jk_{nulo} é autossômico recessivo, refletindo a homozigosidade para um alelo *JK*Jk* ou amorfo (Tab. 34.25). In(Jk) é um segundo fenótipo Jk_{nulo} que se caracteriza por expressão Kidd muito fraca. Como In(Lu), o fenótipo In(Jk) é autossômico dominante, em virtude de um gene supressor em um *locus* distante, não relacionado. É interessante que os eritrócitos Jk_{nulo} são resistentes à lise por ureia 2M, um agente lítico usado por alguns analisadores hematológicos automatizados. Os eritrócitos In(Jk) têm resistência intermediária à ureia (Issitt, 1998).

Bioquímica

A resistência aparente à ureia pelos eritrócitos Jk_{nulo} ficou clara com a clonagem e o isolamento do transportador eritroide da ureia humana (UT-B), uma glicoproteína multietapa de 43 a 45 kDa que compartilha 60% de homologia com o transportador de ureia sensível à vasopressina de coelhos (UT2) e humanos (HUT2, UT-A) (Lucien, 1998). A molécula é uma proteína de 391 aminoácidos com 10 domínios transmembrana e 1 terminação amino e carbóxi citosólica (Fig. 34.11). Um único glicano *N* está presente na terceira alça extracelular (Asn222) e expressa antígenos ABO (Lucien, 2002). Os antígenos Jk^a/Jk^b residem na quarta alça extracelular do aminoácido 280. A terceira alça extracelular pode desempenhar um papel fundamental no transporte da ureia.

Biologia molecular

A glicoproteína Kidd é codificada por um gene de 30 kb (*JK*, *SLC14A1*, *UT-B*) no cromossomo 18q12-21, a mesma localização do transportador de ureia humano HUT2/UT-A (61% de homologia), sugerindo que os 2 genes surgiram por duplicação gênica. O gene *JK* está organizado sobre 11 éxons, embora apenas os éxons 4 a 11 codifiquem a proteína madura (Lucien, 1998). Como muitos genes de grupo sanguíneo, a região promotora contém uma sequência de consenso GATA-1, bem como outros elementos *cis*-reguladores (AP-2, AP-3, NF-ATp, Sp1, Ets-1). Uma única transição de par de base (G823A) é a base molecular do polimorfismo Jk^a/Jk^b, resultando em Asp280 (Jk^a) ou Asn280 (Jk^b) (Lucien, 2002). No fenótipo autossômico recessivo Jk_{nulo}, foram identificadas 5 mutações inativadoras distintas, inclusive sítio de dobramento, mutações sem sentido e de sentido errôneo (Daniels, 2002). A etiologia do fenótipo In(Jk) é desconhecida.

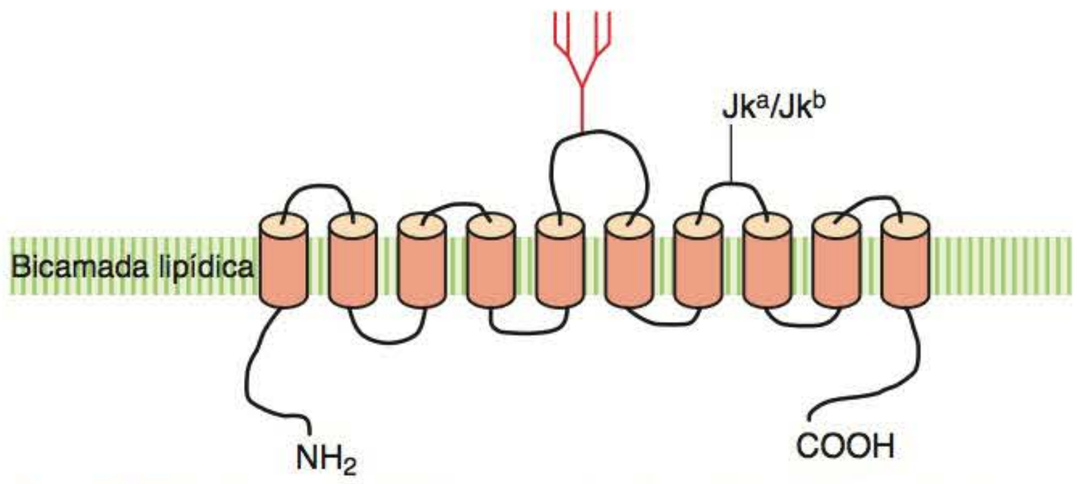


Figura 34.11 A glicoproteína Kidd transportadora de ureia. O sítio do polimorfismo Jk^a/Jk^b no resíduo 280 está indicado por uma linha contínua. O sítio de *N*-glicosilação está indicado por uma estrutura ramificada na terceira alça extracelular. Os 10 domínios transmembrana estão representados por cilindros de cor âmbar.

Anticorpos Kidd

Clinicamente, os anticorpos anti-Jk ou Kidd são causa comum de reações transfusionais hemolíticas, sendo responsáveis por quase 25% de todas as reações transfusionais hemolíticas e 75% daquelas com sequelas hemolíticas verdadeiras (Ness, 1990). Em geral, são do isotipo IgG1 ou IgG3 e capazes de ativar complemento (Tab. 34.7). A reatividade do anticorpo pode ser acentuada com o tratamento dos eritrócitos com enzima e pela presença de complemento. Anti-Jk^3, que reage com todos os eritrócitos exceto Jk_{nulo}, é observado em indivíduos Jk_{nulo} (Tab. 34.25).

Pode ser difícil detectar ou identificar os anticorpos anti-Jk nos bancos de sangue. Em geral, o título desses anticorpos é baixo e eles podem exibir dosagem *in vitro*. Além disso, com frequência eles são transitórios, desaparecendo rapidamente após estimulação imune. Em consequência, os pacientes previamente sensibilizados para os antígenos Kidd podem ser negativos para os anticorpos anti-Jk em amostras de sangue posteriores. Após transfusão de eritrócitos Jk-positivos "compatíveis", os pacientes podem elaborar uma resposta de anticorpo anamnésica, com hemólise rápida e extensa *in vivo* à medida que os eritrócitos são depurados por hemólise extra ou intravascular. Embora incomum, o anti-Jk pode causar DHRN discreta.

Papel biológico

Em termos biológicos, o JK/UT-B funciona no transporte facilitado da ureia. No rim, acredita-se que o transporte de ureia pelo JK/UT-B nas células endoteliais dos *vasa recta* ajude a estabilizar os gradientes osmóticos na medula renal durante a concentração da urina. Nos eritrócitos, o JK/UT-B pode ajudar a preservar a estabilidade osmótica dos eritrócitos à medida que eles passam pelo rim. Embora os indivíduos Jk_{nulo} exibam uma capacidade ligeiramente diminuída de concentrar a urina, a ausência de JK/UT-B não está associada a síndrome clínica. É provável que haja outros mecanismos para compensar ou reduplicar a função do JK/UT-B nos tecidos (Lucien, 1998).

Sistema de grupo sanguíneo Diego (ISBT nº 010)

Consiste em 21 antígenos, incluindo 4 conjuntos de antígenos alélicos (Tab. 34.26). Desses antígenos, 19 são raros, com os antígenos de baixa incidência presentes em menos de 1% dos doadores. Em geral, não há diferenças raciais aparentes na expressão da maioria dos antígenos Diego, exceto Di^a. Descrito inicialmente em 1955, o antígeno Di^a é raro em todas as populações, exceto as de origem mongólica, asiática e nativas da América do Sul. Em algumas populações indígenas sul-americanas, a frequência do Di^a pode chegar a 50% (Issitt, 1998). Além dos eritrócitos, os antígenos Diego expressam-se pelo rim hu-

Tabela 34.26 Antígenos do grupo sanguíneo Diego

Antígeno (de alta frequência)	Percentagem de doadores	Troca de aminoácidos* (alta → baixa frequência)	Percentagem de doadores	Antígeno (de baixa frequência)
Di^b	> 99,9%	Pro854>Leu	Muito raro†	Di^a
Wr^b	99%	Glu658>Lys	1%	Wr^a
		Val557>Met	< 0,1%	Wd^a
		Pro548>Leu	< 0,1%	Rb^a
		Thr552>Ile	< 0,1%	WARR
		Arg432>Trp	< 0,1%	ELO
		Gly565>Ala	< 0,1%	Wu
		Asn569>Lys	< 0,1%	Bp^a
		Arg656>His	< 0,1%	Mo^a
		Arg656>Cys	< 0,1%	Hg^a
		Tyr555>His	< 0,1%	Vg^a
		Lys551>Asn	< 0,1%	Tr^a
		Arg646>Gln	< 0,1%	Sw^a
		Glu429>Asp	< 0,1%	NFLD
		Pro566>Ser	< 0,1%	Jn^a
		Pro566>Ala	< 0,1%	KREP
		Pro561>Ser	< 0,1%	BOW
		Glu480>Lys	< 0,1%	Fr^a
		Arg646>Trp	< 0,1%	SWI

* De acordo com Jarolim et al. (1998); Issitt (1998); Reid (2004b).

† O antígeno Di^a tem uma incidência muito maior entre indígenas norte e sul-americanos, asiáticos e descendentes de mongóis (p. ex., do leste da Polônia).

mano ao longo dos ductos coletores (Tanner, a993). Há um milhão de cópias da glicoproteína Diego (AE1) por eritrócito.

Bioquímica

O sistema de grupo sanguíneo Diego reside na banda 3, também conhecida como proteína de troca aniônica 1 (AE1), uma glicoproteína de 100 kDa e 991 aminoácidos, que contém 2 domínios funcionalmente distintos: um grande domínio citoplasmático de 40 kDa amino-terminal e um domínio transmembrana que compreende a metade carbóxi terminal da molécula (Fig. 34.12). Nos eritrócitos, a AE1 é um oligômero, normalmente existente como um dímero ou tetrâmero pela formação de pontes de dissulfeto intramoleculares. O domínio citoplasmático amino-terminal liga várias proteínas citoesqueléticas (banda 4.1, banda 4.2 e anquirina) e 3 enzimas glicolíticas: a glutaraldeído-3-fosfato desidrogense (G3PD), a aldolase e a fosfofrutocinase (PFK). Acredita-se que a ligação de hemocromos ou hemoglobina desnaturada a terminação amino extrema da AE1 desempenhe um papel na formação dos corpúsculos de Heinz. Também há aparente associação não covalente da AE1 com glicoforina A nas membranas dos eritrócitos (Low, 1986).

O restante da AE1 está associado à membrana, contendo de 12 a 14 domínios transmembrana, que constituem a metade carbóxi terminal da molécula. Ainda que o domínio amino-terminal esteja envolvido na estabilidade da membrana, o domínio carbóxi terminal funciona como um transportador de ânion, facilitando a passagem dos ânions Cl^- e HCO_3^- através da membrana celular (Tanner, 1993). O domínio transmembrana carbóxi terminal também é a localização de todos os antígenos Diego descritos até o momento. Também há um único sítio de *N*-glicosilação, que exibe um polilactosaminoglicano maciço e altamente ramificado com atividade tanto do grupo sanguíneo ABO

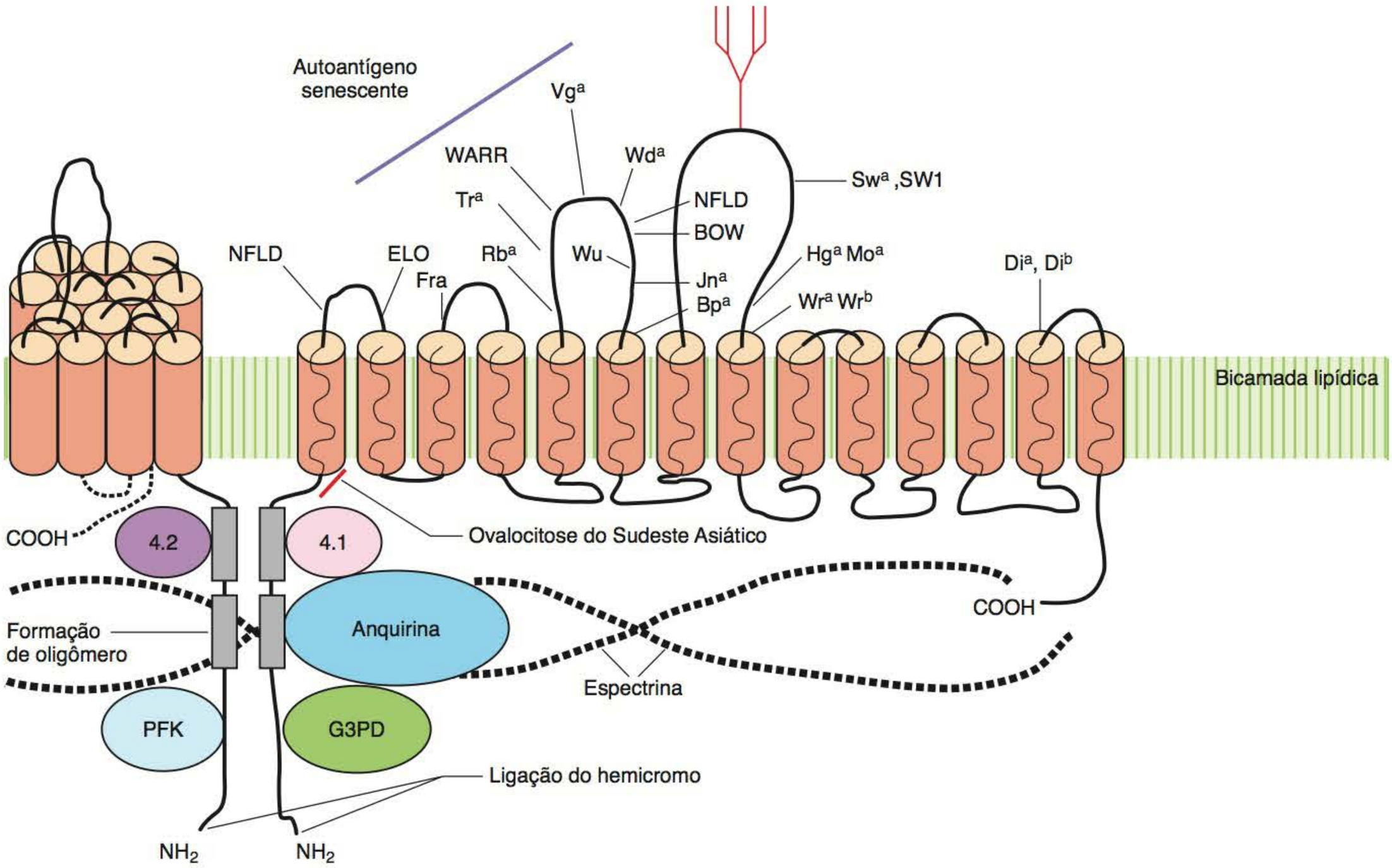


Figura 34.12 Estrutura da proteína de troca aniônica AE1 (banda 3). A AE1 é uma glicoproteína multietapa com 14 domínios transmembrana, indicados pelos cilindros de cor âmbar. Os antígenos do grupo sanguíneo Diego residem ao longo das alças extracelulares e estão indicados pelas linhas contínuas. O autoantígeno senescente AE1 está na terceira alça extracelular, entre os antígenos Rb^a e Vg^a. O *N*-glicano maciço é mostrado por uma estrutura ramificada na quarta alça extracelular. O grande domínio citoplasmático tem locais de ligação para as proteínas do citoesqueleto 4.2, 4.1 e anquirina, bem como para as enzimas glicolíticas fosfofrutocinase (PFK) e glutaraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD). Na membrana eritrocitária, a AE1 existe como oligômeros (dímeros, tetrâmeros) ligados por pontes de dissulfeto intercadeia ao longo do domínio citoplasmático amino-terminal (retângulos cheios). Uma deleção no aminoácido 8 no limite do domínio citoplasmático amino-terminal e no primeiro domínio transmembrana é responsável pela ovalocitose do Sudeste Asiático (OSA).

como do I (Fukuda, 1984). Estima-se que quase metade de todos os epítopos ABO nos eritrócitos estejam associados à AE1.

Biologia molecular

A AE1 é o produto de um gene de 20 éxons e 17 kb (*SLC4A1*) no cromossomo 17 (17qter). A clonagem do gene da AE1 não serviu para assinalar vários antígenos órfãos ao sistema Diego. Como muitos antígenos de grupo sanguíneo, cada antígeno Diego identificado até o momento é o resultado de uma mutação pontual, ocasionando um polimorfismo de aminoácido na proteína traduzida (Tab. 34.26, Fig. 34.12). A maioria desses polimorfismos de aminoácido ocorre entre resíduos de aminoácido não conservados, com base em uma comparação da AE1 com as sequências de outros transportadores de ânions (Jarolim, 1998; Reid, 2004b). O sistema Diego também contém 2 exemplares de antígenos alélicos de baixa incidência: Mo^a/Hg^a e Jn^a/KREP. Em cada caso, 2 substituições distintas de aminoácidos no mesmo resíduo de aminoácido leva a diferentes aloantígenos. Há um exemplar similar no sistema Kell (Kp^a, Kp^b e Kp^c).

No entanto, o antígeno Diego mais interessante é o Wr^b. Conforme mencionado anteriormente, a AE1 está tipicamente associada à glicoforina A na membrana do eritrócito. Eritrócitos que não têm glicoforina A (fenótipo En (a-)) são fenotipicamente Wr (a-b-), do que se deduz que o Wr^b está na glicoforina A. Evidência disponível atualmente sugere que o Wr^b é formado por uma interação eletrostática entre a glicoforina A e um ácido glutâmico (Glu658) na AE1. Ainda é discutível qual aminoácido específico na glicoforina A é crítico para a formação do Wr^b, mas é evidente que parte do epítopo Wr^b envolve aminoácidos na glicoforina A (ver Fig. 34.8) (Poole, 1999).

Anticorpos Diego

Os anticorpos contra o grupo sanguíneo Diego podem ser estimulados imunologicamente ou de ocorrência natural. Os anticorpos contra Di^a, Di^b, Wr^b e ELO em geral são estimulados imunologicamente e pertencem ao isotipo IgG, sendo detectados na fase AHG de teste. Anti-Di^a, Di^b e Wr^b podem estar associados a menor sobrevivência dos eritrócitos, a reações transfusionais hemolíticas e à DHRN. O anti-Wr^b também está associado a anemia hemolítica autoimune (Issitt, 1998).

Em contraste, os anticorpos contra a maioria de outros antígenos Diego costumam ser aglutininas salinas de ocorrência natural à temperatura ambiente. O anti-Wr^a é particularmente comum, ocorrendo em 1 de cada 100 doadores. Os anticorpos contra Wd^a e WARR também são razoavelmente comuns, com o anti-WARR relatado em 13 a 18% dos doadores (Issitt, 1998).

Papel biológico

Em termos funcionais, a AE1 desempenha um papel crítico no transporte de gás e no equilíbrio acidobásico. Para facilitar a remoção de CO_2, os eritrócitos o hidratam via carbono anidro para formar íons bicarbonato (HCO_3^-), que é prontamente solúvel no plasma. À medida que o nível intracelular de HCO_3^- aumenta, os eritrócitos trocam os íons HCO_3^- por Cl^- no plasma (desvio do Cl^- ou desvio de Hamburger). Esse processo é mediado pela AE1 à medida que os eritrócitos passam através dos capilares e de pequenas vênulas capilares. Em razão do alto número de cópias de AE1 na membrana do eritrócito, a troca aniônica está 90% completa em 0,4 a 0,5 s. No rim, a AE1 expressa-se ao longo da membrana basolateral das células intercaladas do tipo A dos ductos coletores renais, na qual trabalha na secreção de ácido e na readsorção de bicarbonato (Tanner, 1993). Dada a importância fisiológica da AE1, não surpreende que nenhum fenótipo Diego nulo tenha sido descrito até o momento.

A AE1 também desempenha papel no citoesqueleto do eritrócito (Fig. 34.12). A metade amino-terminal longa da molécula liga-se a várias proteínas periféricas envolvidas na estabilidade da membrana do eritrócito. Os tetrâmeros de AE1 ligam-se à anquirina, à proteína 4.2 e à proteína 4.1, o que ajuda a ancorar e estabilizar a membrana do eritrócito ao esqueleto subjacente (Tanner, 1993). A proteína AE1 serve, ainda, como autoantígeno senescente, marcando eritrócitos velhos para remoção pelo sistema reticuloendotelial. À medida que os eritrócitos envelhecem, eles ligam-se a uma quantidade cada vez maior de imunoglobulinas e complemento C3. Pelo menos um autoantígeno "senescente" nos eritrócitos está localizado na AE1, entre os aminoácidos 538 e 554 (entre os antígenos Rb^a e Vb^a; Fig. 34.12) (Kay, 1994).

Sistema de grupo sanguíneo Cartwright (ISBT nº 011)

Descoberto em 1956, o sistema de grupo sanguíneo Cartwright (Yt) consiste em 2 antígenos autossômicos codominantes, Yt^a e Yt^b. O Yt^a é um antígeno de alta incidência que se expressa em 99,8% dos doadores caucasianos. A incidência do Yt^b varia com a etnia, variando de 0% nos japoneses a 24 – 26% no Oriente Médio (Issitt, 1998). Os antígenos Yt estão ausentes nos eritrócitos HPN III, que são desprovidos de todas as glicoproteínas ligadas ao glicofosfoinositol (GPI). Além dos eritrócitos, os antígenos Cartwright expressam-se nas sinapses neurais e junções neuromusculares (Masson, 1994). Há de 7.000 a 10.000 moléculas de glicoproteína Yt por eritrócito.

Bioquímica

Os antígenos Cartwright estão localizados na acetilcolinesterase (ACHE), uma β-carboxiesterase responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. Foram isoladas várias formas moleculares diferentes de acetilcolinesterase, inclusive grandes formas heteroméricas compostas de várias subunidades catalíticas ligadas de maneira covalente ao colágeno. Nos eritrócitos, a acetilcolinesterase expressa-se como uma glicoproteína palmitoilada ligada ao glicofosfoinositol (GPI) (Fig. 34.13) (Li, 1991). A acetilcolinesterase do eritrócito huma-

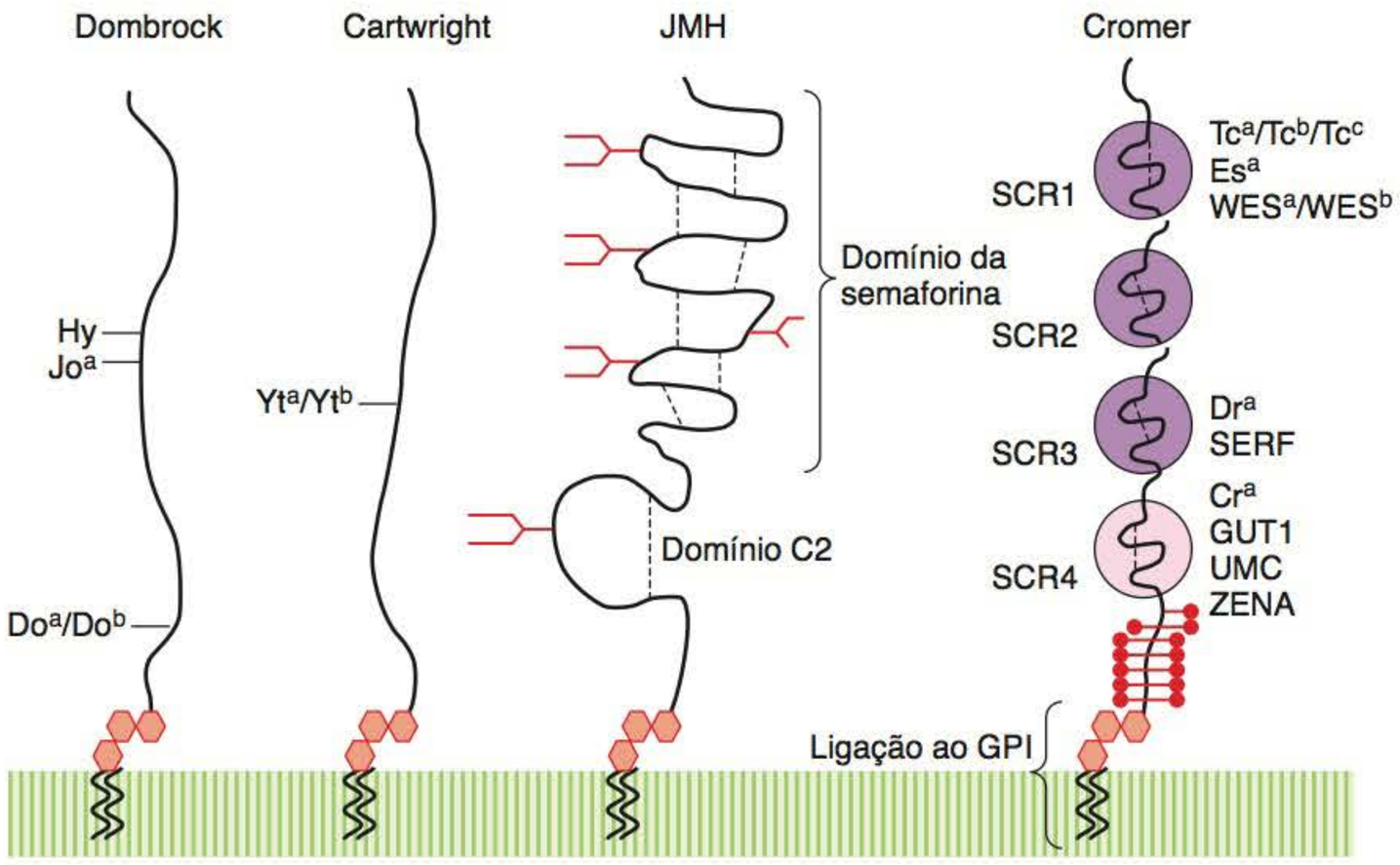


Figura 34.13 Antígenos de grupo sanguíneo nas glicoproteínas ligadas ao glicofosfoinositol.

no é única na palmitoilação ou na ligação covalente de um ácido graxo ao anel inositol, o que torna a molécula resistente à fosfolipase C. Na membrana do eritrócito, a ACHE em geral existe como um dímero de 160 kDa e tem glicanos ligados tanto ao *N* como ao *O*.

Biologia molecular

O gene para a acetilcolinesterase (*ACHE*) tem 4 éxons, ocupando 4,5 a 4,7 kb, no cromossomo 7q22. O desdobramento alternado do éxon 3 é responsável pela forma ligada ao GPI da acetilcolinesterase observada nos eritrócitos (Li, 1991). Os antígenos Yt^a e Yt^b representam um polimorfismo de aminoácido único no resíduo 322, em que His322 é Yt^a e Asn322 é Yt^b (Bartels, 1993). O polimorfismo Yt^a/Yt^b não está localizado perto do sítio catalítico da enzima e não tem efeito sobre a atividade enzimática (Masson, 1994).

Anticorpos Cartwright

Em geral, o anti-Yt^a e o anti-Yt^b são clinicamente benignos, embora haja relatos de menor sobrevivência dos eritrócitos e até reações transfusionais hemolíticas tardias. Nenhum deles está associado a DHRN (Issitt, 1998). O anti-Yt^a e o anti-Yt^b são do isotipo IgG, surgindo da estimulação imune e sendo normalmente detectados no IAT. Apesar da alta incidência de Yt^a na população geral, o anti-Yt^a é mais comum que o Yt^b, sugerindo que o Yt^a seja o antígeno mais imunogênico.

Papel biológico

A acetilcolinesterase é uma enzima fundamental, necessária para a degradação rápida da acetilcolina nas membranas pós-sinápticas de nervos e músculos. O papel da acetilcolinesterase nos eritrócitos é desconhecido.

Sistema de grupo sanguíneo Xg (ISBT nº 012)

É um sistema que contém um único antígeno, o Xg^a. Como resultado, são conhecidos apenas 2 fenótipos: Xg^a-positivo e Xg^a-negativo. Como o antígeno Xg^a é codificado por um gene no cromossomo X, a incidência do fenótipo Xg^a-positivo é maior entre mulheres. Entre caucasianos, aproximadamente 89% das mulheres e 66% dos homens são Xg^a-positivos. Foram encontrados resultados similares em outras populações étnicas (Byrne, 2004). O Xg parece ser específico dos eritrócitos. Há aproximadamente 9.000 moléculas de Xg^a por eritrócito (Reid, 2004b).

Bioquímica e biologia molecular

O antígeno Xg^a está localizado em uma glicoproteína de 24 a 29 kDa e 180 aminoácidos, denominada proteína XG. Sendo uma glicoproteína do tipo 1, a proteína XG tem grande domínio extracelular amino-terminal de 117 aminoácidos, um único domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta carbóxi terminal. Dos 11 sítios potenciais de *O*-glicosilação, apenas 3 parecem ser glicosilados. A proteína é codificada por um gene de 2,4 kb (*XG*), localizado no cromossomo X, no limite pseudoautossômico/específico do X (pAB1X).

Na membrana do eritrócito, a proteína XG pode estar associada a uma segunda proteína, MIC2 ou CD99. A última é uma glicoproteína de 32,5 kDa, bioquimicamente similar à proteína XG. Evidência sugestiva de uma relação de proximidade entre as proteínas XG e MIC2 inclui a inibição de anticorpos anti-Xg^a pela MIC2 e coimunoprecipitação de MIC2 por anti-Xg^a. E, finalmente, observa-se alta expressão de MIC2 nos eritrócitos Xg^a-positivos, mas não nos Xg^a-negativos (Daniels, 2002).

Tabela 34.27 Fenótipos do sistema Scianna

Reações com anti-Sc				Fenótipo	Aminoácido	Frequência (%) na população*
Sc1	Sc2	Sc3	Rd			
+	0	+	0	Sc (1, –2)	Gly57	99%
+	+	+	0	Sc (1, 2)		0,7%
0	+	+	0	Sc (–1, 2)	Arg57	< 0,01%
0	0	0	0	Sc (–1, –2, –3) ou Sc nulo	307del2	Raro
0/+	0/+	+	+	Rd+	Pro60>Ala	< 0,01%

* De Issitt (1998).

Anticorpos Xg^a

O anti-Xg^a não está associado a reações transfusionais hemolíticas nem à DHRN (Byrne, 2004) e pode ser imunoestimualdo ou de ocorrência natural. A maioria dos exemplos é do isotipo IgG, incluindo alguns capazes de ativar complemento. Por causa das diferenças no fenótipo Xg^a-positivo entre homens e mulheres, a maioria dos exemplos (mais de 85%) do anti-Xg^a é observada em homens.

Sistema de grupo sanguíneo Scianna (ISBT nº 013)

O sistema de grupo sanguíneo Scianna (Sc) (Tab. 34.27) contém 4 antígenos: Sc1, Sc2, Sc3 e Rd (Radin) (Wagner, 2003). O Sc1 e o Sc2 são antígenos antitéticos; o Sc3 é um antígeno de alta incidência, presente em todos os eritrócitos, exceto os Sc_{nulo} (–1, –2, –3); Rd é um antígeno de baixa incidência. O Scianna parece ser específico de eritrócitos e tecidos eritropoiéticos.

Bioquímica

Os antígenos Scianna residem em uma glicoproteína associada à membrana eritrocitária (ERMAP) de 60 a 68 kDa e 446 aminoácidos. Como as proteínas Lutheran, Ok e Lewis, a ERMAP é um membro da superfamília das imunoglobulinas. A molécula é uma proteína transmembrana do tipo 1 e de única etapa, que tem um único domínio IgV e um grande domínio citoplasmático, provavelmente envolvido na transdução do sinal. O último possui domínios SH3 e B30.2, bem como múltiplas sequências de fosforilação para a proteinocinase C, a tirosinocinase e a cinase II da caseína (Su, 2001). Três antígenos Scianna estão localizados no domínio extracelular, perto do domínio IgV. A molécula tem vários resíduos de cisteína e é sensível a agentes redutores de sulfidrila.

Biologia molecular

O gene da ERMAP reside no cromossomo 1p34 e consiste em 11 éxons que ocupam 19 kb. Sc1, Sc2 e Rd são o resultado de polimorfismos de aminoácido único (Tab. 34.27). De um Sc_{nulo} estudado até o momento, houve uma deleção e uma mutação estrutural (307del2), levando a uma molécula truncada, não funcional (Wagner, 2003).

Anticorpos Scianna

Os anticorpos Scianna são raros e geralmente benignos. Costumam ser do isotipo IgG, com alguns exemplos ligando complemento. A maioria dos exemplos é imunoestimulada, porém são conhecidos anticorpos Sc2 de ocorrência natural. Os antígenos são relativamente resistentes a enzimas, porém podem ser enfraquecidos por DTT e AET. Eles não causam reações transfusionais. O anti-Rd e o anti-Sc2 foram associados à DHRN. Autoanticorpos contra os antígenos Sc1 e Sc3 foram associados a anemia hemolítica autoimune moderada (Issitt, 1998).

Papel biológico

O papel biológico da ERMAP é desconhecido, embora sua estrutura sugira que ela desempenhe um papel na adesão e na sinalização do eritrócito. O domínio IgV tem uma sequência de reconhecimento C1q que pode mediar a adesão entre macrófagos medulares e eritroblastos nas ilhotas eritroides. Como a ERMAP compartilha homologia com a família de proteínas B7 (CD80, CD86) e autoantígenos neurais, especula-se que a ERMAP possa estar envolvida no reconhecimento imune e na anemia autoimune (Su, 2001).

Sistema de grupo sanguíneo Dombrock (ISBT nº 014)

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock contém 5 antígenos: Do^a (DO1), Do^b (DO2), Gy^a (DO3), Hy (DO4) e Jo^a (DO5). Do^a e Do^b são autossômicos codominantes expressos por, respectivamente, 67 e 82% dos doadores brancos (Tab. 34.28). Gy^a, Hy e Jo^a são antígenos de alta incidência, encontrados em praticamente todos os doadores (mais de 99%). Além dos eritrócitos, o mRNA do Dombrock foi identificado no fígado e no baço de fetos (Gubin, 2000).

Tabela 34.28 Fenótipos do sistema Dombrock

Reações com anticorpos anti-Dombrock					Fenótipo	Troca de aminoácido	Frequência (%) na população		Comentários
Do^a	Do^b	Gy^a	Hy	Jo^a			Brancos	Negros	
+	0	+	+	+	Do (a+b–)	Asn265	18	11	
+	+	+	+	+	Do (a+b+)		49	44	
0	+	+	+	+	Do (a–b+)	Asp265	33	45	
Fenótipos nulos/fracos									
0	0	0	0	0	Do_{nulo} ou Gy(a–)	Perdado éxon 2*	Raro	Raro	Associado à HPN III†
0	f	f	0	0/+	Hy–	Gly108>Val	0	Raro	
f	0/f	+	f	0	Jo (a–)	Thr350>Ile	0	Raro	

* A perda do éxon 2 foi associada a local de quebra, mutações estruturais e sem sentido (Reid, 2003a).

† Os eritrócitos com HPN III não têm glicoproteína ligadas ao GPI, incluindo os antígenos Dombrock, CD55 e CD59.

Fenótipos nulos/fracos

O fenótipo Do_{nulo}, ou Gy (a–), é um fenótipo autossômico recessivo raro (Tab. 34.28). É possível observar o fenótipo adquirido Do_{nulo} na hemoglobinúria paroxística noturna do tipo III (HPN-III). Um distúrbio de célula-tronco hematopoética, a HPN III caracteriza-se por hemólise crônica decorrente da ausência de todas as glicoproteínas ligadas ao GPI, incluindo fator acelerador do decaimento (DAF/grupo sanguíneo Cromer) e Dombrock.

Bioquímica

Os antígenos Dombrock residem em uma ADP-ribosiltransferase, que catalisa a transferência de ADP-ribose do NAD para um aceptor de proteína. A molécula clonada é uma glicoproteína de 47 a 58 kDa e 314 aminoácidos, ancorada na membrana do eritrócito via uma cauda glicolipídica de glicofosfoinositol (ligada ao GPI, Fig. 34.13). A molécula tem 5 cinco sítios potenciais de *N*-glicosilação, 2 sítios de miristoilação e 5 resíduos de cisteína (Gubin, 2000; Daniels, 2002). Em consequência, o Dombrock pode ser destruído por agentes redutores de dissulfeto e pela fosfolipase C do fosfatidilinositol (PI-PLC), que cliva as proteínas ligadas ao GPI (Gubin, 2000).

Biologia molecular

O gene para Dombrock (*DO*, *ART4*) abrange 14 kb no cromossomo 12p13.2-12.1. O gene consiste em 3 éxons, embora o éxon 2 codifique mais de 70% da proteína traduzida e inclua todos os 5 antígenos Dombrock. Do^a, Do^b, Jo^a e Hy resultam do polimorfismo de um único aminoácido (Tab. 34.28). O fenótipo Do_{nulo} ou Gy (a-) resulta de mutações que anulam o éxon 2 (Reid, 2003a).

Anticorpos Dombrock

Os anticorpos anti-Dombrock podem ter significado clínico, embora muitos exemplares sejam benignos. São comumente encontrados em misturas de aloanticorpos e podem ser de difícil identificação. Os anticorpos anti-Dombrock são capazes de diminuir a sobrevida dos eritrócitos e causar reações transfusionais hemolíticas agudas, não estando associados à DHRN. Em geral, são do isotipo IgG, surgindo de estimulação imune por transfusão ou pela gravidez. A reatividade do anticorpo pode ser facilitada pelo uso de eritrócitos tratados com papaína ou ficina. Em contrapartida, a reatividade dos anticorpos é diminuída ou abolida pelo tratamento dos eritrócitos com agentes redutores de sulfidrila (DTT, AET), tripsina, quimiotripsina e pronase.

Papel biológico

Embora o Dombrock seja uma ADP-acetiltransferase, nenhuma atividade enzimática foi relatada sobre a membrana eritrocitária (Reid, 2003a). Não há síndrome clínica conhecida associada ao fenótipo Dombrock. Também existe a hipótese de que o Dombrock desempenhe um papel na depuração do NAD+ circulante e/ou na modificação de proteínas após sua tradução (Reid, 2003a). É possível, ainda, que o Dombrock contribua para a adesão celular mediada pela integrina via um motivo RDG no antígeno Do^b: o motivo RDG é anulado no fenótipo Do^a.

Sistema de grupo sanguíneo Colton (ISBT nº 015)

O sistema de grupo sanguíneo Colton foi identificado pela primeira vez em 1967 e consiste em 2 antígenos autossômicos codominantes, Co^a e Co^b. O Co^a é um antígeno de alta incidência, presente em 99,7% dos doadores. O Co^b expressa-se em menos de 11% dos doadores, com apenas 0,3% sendo Co (a–b+). Embora muito raro, o fenótipo Co (a-b-), ou nulo, é relatado. Além dos eritrócitos, os antígenos Colton expressam-se nos túbulos renais proximais, no ramo fino descendente da alça de Henle, no endotélio dos *vasa recta*, no plexo coroide, no corpo ciliar, em microvasos, na vesícula biliar, na placenta e em algumas células epiteliais (Ma, 1998). Há de 120.000 a 160.000 moléculas de glicoproteína Colton por eritrócito.

Bioquímica

Os antígenos do grupo sanguíneo Colton residem na aquaporina 1 (AQP-1) ou na CHIP (proteína integral formadora de canal), um canal da membrana seletivo para a água (Fig. 34.14). Clonada em 1991, a AQP-1 é uma proteína multietapa de 269 aminoácidos integrante da membrana que contém 6 domínios transmembrana. Estudos cristalográficos sugerem que a primeira alça intracelular e a terceira extracelular dobram-se para trás na membrana plasmática, sobrepondo-se a 2 sequências Asp-Pro-Ala (NPA) para formar um canal de água. Existe um único sítio de *N*-glicosilação (Asn42), capaz de expressar antígenos ABH, na primeira alça extracelular perto do epítopo do grupo sanguíneo Colton (resíduo 45). O último é variavelmente glicosilado *in vivo*, levando a um espectro de glicoformas de AQP-1, que vão de 40 a 60 kDa (Agre, 1994). Nas membranas eritrocitárias, a AQP-1 existe como um "homotetrâmero", uma fileira quadrada de monômeros de AQP-1, o que pode ajudar a estabilizar a estrutura e a integridade funcional de monômeros individuais (Knepper, 1994).

Biologia molecular

O *AQP-1* é um gene de 17 kb no cromossomo 7p14. O gene tem 4 éxons e ambas as sequências de consenso TATA e Sp1 na região promotora (Moon, 1993). Os antígenos Co^a e Co^b resultam de um polimorfismo A314T, levando a Ala45 (Co^a) ou Val45 (Co^b) (Smith, 1994). Várias mutações inativadoras diferentes do gene *AQP-1* estão associadas ao fenótipo Colton nulo, incluindo a deleção do éxon 1 e

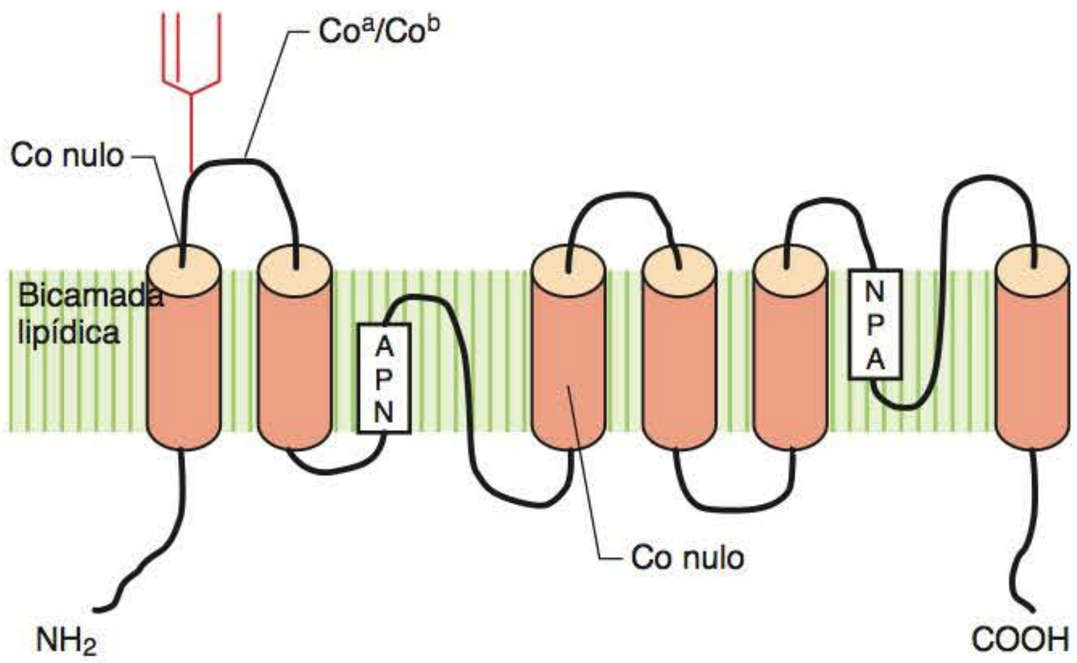


Figura 34.14 Estrutura da aquaporina-1 (AQP-1, CHIP). A AQP-1 é uma proteína multietapa que contém 6 domínios transmembrana, indicados pelos cilindros de cor âmbar. A primeira alça citoplasmática e a terceira alça extracelular dobram-se de novo na dupla camada lipídica, sobrepondo-se aos 2 motivos Asp-Pro-Ala (NPA), para formar um canal de água. O local de *N*-glicosilação está indicado por uma estrutura ramificada na primeira alça extracelular. O polimorfismo Co^a/Co^b no aminoácido 45 está indicado por uma linha contínua. Os locais de 2 mutações que levam ao fenótipo Colton nulo também são mostrados.

as mutações estruturais e de sentido errôneo. Um fenótipo Colton adquirido também é relatado em raros pacientes com monossomia do 7 e anemia diseritropoiética congênita (Agre, 1994).

Anticorpos Colton

Os anticorpos anto-Colton podem ter significado clínico e estar associados a encurtamento da vida dos eritrócitos, a reações transfusionais hemolíticas e à DHRN (Tab. 34.7). Os anticorpos para Co^a e Co^b em geral são do isotipo IgG, resultando da estimulação imune por transfusão ou pela gravidez. Há relatos de que alguns exemplares de anti-Co^a e anti-Co^b ligam complemento. Os anticorpos anti-Colton são detectáveis na fase AHG de teste e são acentuados com eritrócitos tratados com protease. Indivíduos com o fenótipo Colton nulo também podem produzir anti-Co3 (anti-Co^{a+b}), um aloanticorpo que reage igualmente bem com eritrócitos Co (a+b-) e Co (a-b+) (Issitt, 1998).

Papel biológico

Em termos biológicos, AQP-1 é um dos principais canais moleculares de água nos eritrócitos e facilita a concentração de urina nos rins (Ma, 1998). Apesar de sua importância na regulação da água, indivíduos com o fenótipo Colton nulo apresentam pouco ou nenhum efeito adverso. Os eritrócitos Colton nulo parecem morfologicamente normais em aspecto e número, embora haja relatos de diminuição discreta na vida dos eritrócitos (Mathai, 1996). É mais provável que a ausência de qualquer sequela hematológica significativa em indivíduos com Colton nulo deva-se à presença de uma segunda aquaporina, a AQP-3. Um transportador de glicerol e, talvez, de ureia, a AQP-3 (grupo sanguíneo GIL) é moderadamente permeável à água e parece ser responsável pela permeabilidade residual à água nos eritrócitos Colton nulos (Roudier, 1998).

Sistema de grupo sanguíneo LW (ISBT nº 016)

Denominado em homenagem a seus descobridores, o sistema de grupo sanguíneo LW, ou Landsteiner-Wiener, é mais importante por seu papel na história do sistema de grupo sanguíneo Rh. Landsteiner e Wiener desenvolveram originalmente anticorpos contra os antígenos LW imunizando coelhos com eritrócitos de macacos Rhesus. De início, acreditava-se que os anticorpos "anti-Rh" resultantes reconheciam o antígeno RHD, porém, mais tarde, pesquisadores provaram que os anticorpos desenvolvidos por Landsteiner e Wiener reconheciam um antígeno não Rh (LW).

O sistema de grupo sanguíneo LW consiste em 2 antígenos alélicos, LW^a e LW^b. O LW^a é um antígeno de alta frequência (99% de doadores brancos). A expressão do antígeno LW depende da expressão da proteína RhD, observando-se a mais alta expressão nos eritrócitos Rh-positivos. Oa antígenos LW estão ausentes de eritrócitos Rh_{nulo}. Também é possível observar um fenótipo LW (a-b-) ou nulo nos raríssimos indivíduos homozigotos para um alelo LW silencioso. O antígeno LW expressa-se em eritrócitos e na placenta. Há aproximadamente 3.600 a 5.000 moléculas de glicoproteína LW por eritrócito (Issitt, 1998).

Bioquímica

Os antígenos LW residem na molécula de adesão intracelular do tipo 4 (ICAM-4, CD242), uma glicoproteína de 40 a 47 kDa do tipo 1. Um membro da superfamília das imunoglobulinas, a ICAM consiste em 2 domínios extracelulares similares ao C2, um único domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. Há 4 sítios de *N*-glicosilação e evidência de *O*-glicosilação. A molécula tem 3 pontes de dissulfeto e é sensível para reduzir agentes como o DTT (Reid, 2004b).

Biologia molecular

O gene ICAM4 reside no cromossomo 19p13. Os antígenos LW^a e LW^b surgem de um polimorfismo de nucleotídeo único (A308G), levando a Gln70 (LW^a) ou Arg70 (LW^b). Dos 2 indivíduos com fenótipo LW nulo estudados, um tinha uma deleção de 10 bps na sequência codificadora (Hermand, 1995).

Anticorpos LW

Clinicamente benignos, os anticorpos anti-LW não causam reações transfusionais hemolíticas nem DHRN. Em geral, são do isotipo IgG e detectados no IAT. A atividade de anticorpo pode ser reduzida pelo EDTA ou pelo tratamento prévio dos eritrócitos com agentes redutores de sulfidrila (DTT, AET). Além de anti-LW^a e anti-LW^b, indivíduos com o fenótipo LW nulo podem elaborar um anti LW^{ab}, que reage tanto com eritrócitos LW (a+b–) como LW (a–b+).

Papel biológico

A glicoproteína LW é um receptor contador potencial para a proteína integrina b_2 Mac1 (CD11a/CD18). Existe a hipótese de que a glicoproteína LW possa participar em interações de adesão durante o desenvolvimento eritroide inicial. A expressão de LW é elevada em pacientes com células falciformes e pode estar envolvida na oclusão microvascular (Reid, 2004b). A glicoproteína LW também pode estar envolvida na senescência dos eritrócitos, por ligar-se a receptores Mac1 nos macrófagos esplênicos (Isdsitt, 1998).

Sistema de grupo sanguíneo Chido/Rogers (ISBT nº 017)

O sistema Chido/Rodgers (Ch/Rg) de grupo sanguíneo contém 10 antígenos, incluindo 2 pares de antígenos antitéticos e 3 antígenos conformacionais. O último requer a expressão de 2 antígenos CH/Rg espacialmente distintos, que, juntos, geram um terceiro antígeno conformacional (Tab. 34.29). A maioria dos antígenos Ch/Rg tem alta incidência (> 90%). Como os antígenos do grupo sanguíneo Lewis, os antígenos Ch/Rg são de origem plasmática, sendo adsorvidos passivamente nas membranas dos eritrócitos. O Ch/Rg expressa-se fraca-

Tabela 34.29 Antígenos do grupo sanguíneo Chido/Rodgers

Antígenos Chido (Ch)		Nome	Frequência*	Aminoácido	Frequência*	Nome	Antígenos Rodgers (Rg)	
	CH/RG1	Ch1	96%	Arg1191 Leu Ala1188 Val	98%	Rg1	CH/RG11	
CH/RG3†		Ch3	93%	Epítopo conformacional	95%	Rg2		CH/RG12†
	CH/RG6	Ch6	96%	Ser1157 Asn	95%	Rg3	CH/RG13	
CH/RG7†		WH	Raro	Epítopo conformacional (Ch6+Rg1)				
	CH/RG4	Ch4	96%	His1106 Asp Ile1105 Leu Ser1102 Lys Leu1101 Pro				
CH/RG2†		Ch2	91%	Epítopo conformacional (Ch4+Ch5)				
	CH/RG5	Ch5	94%	Gly1054 Asp				

* Calculado a partir de Giles (1987) e Issitt (1998).

† Epítopos conformacionais requerem a presença de 2 determinantes antigênicos Ch/Rg.

mente em eritrócitos medulares e alguns eritrócitos com deficiência de glicoforina A (Issitt, 1998).

Bioquímica e biologia molecular

Os antígenos Chido/Rodgers são determinantes antigênicos no fragmento C4d da molécula de complemento C4, a qual é o produto de 2 genes altamente homólogos (99% de identidade), *C4A* e *C4B*, no cromossomo 6p21.3, perto do *locus* HLA. No momento, há mais de 15 alelos C4 identificados, incluindo alelos nulos, o que dificulta bastante a genética desse sistema. Cada gene abrange aproximadamente 22 kb e está organizado em 41 éxons. Quatro aminoácidos no éxon 26 são responsáveis por distinguirem C4A de C4B. A maioria dos antígenos Chido/Rodgers é determinada por polimorfismos de aminoácidos codificados nos éxons 25 e 28 (Giles, 1998). Em geral, os antígenos Chido estão no C4B, e os antígenos Rodgers estão no C4A, embora sejam conhecidos exemplos de C4B que expressam antígenos Rodgers e vice-versa (Giles, 1998). À eletroforese de proteína, o C4A migra mais rápido que o C4B.

Anticorpos Chido/Rodgers

Anticorpos contra os antígenos Ch/Rg não causam reações transfusionais hemolíticas nem DHRN. Há relatos raros de anafilaxia após transfusão de plasma e plaquetas (Westhoff, 1992). Anticorpos anti-Ch/Rg são do isotipo IgG e em geral são detectados com AHG. A reatividade do anticorpo pode ser facilitada incubando-se eritrócitos em uma solução iônica baixa de sacarose. A reatividade do anticorpo pode ser inibida pelo plasma ou por tratamento dos eritrócitos com proteases (Reid, 2004b).

Papel biológico

A deficiência de C4 está associada a distúrbios autoimunes e susceti-bilidade a meningite bacteriana. Alotipos C4 específicos foram ligados a vários distúrbios autoimunes, inclusive artrite reumatoide e doença de Graves.

Sistema de grupo sanguíneo Gerbich (ISBT nº 020)

O sistema de grupo sanguíneo Gerbich (Ge) contém 7 antígenos: 3 de alta frequência (> 99%; Tab. 34.30) e 4 de baixa frequência. As glicoproteínas Gerbich (GPC/D; Fig. 34.15) estão em eritrócitos de fetos e adultos, nas plaquetas, nos rins e no fígado fetal. Existem 180.000 a 250.000 moléculas de Gerbich por eritrócito (Reid, 2004b).

Fenótipos nulos/fracos

Existem 3 fenótipos autossômicos recessivos associados à perda de antígenos Gerbich de alta incidência: Yus (Ge -2, 3, 4), Gerbich (Ge –2, –3, 4) e Leach (Ge –2, –3, –4). Os antígenos Gerbich estão diminuídos em pacientes com eliptocitose hereditária em decorrência da deficiência da proteína 4.1 (Daniels, 2002).

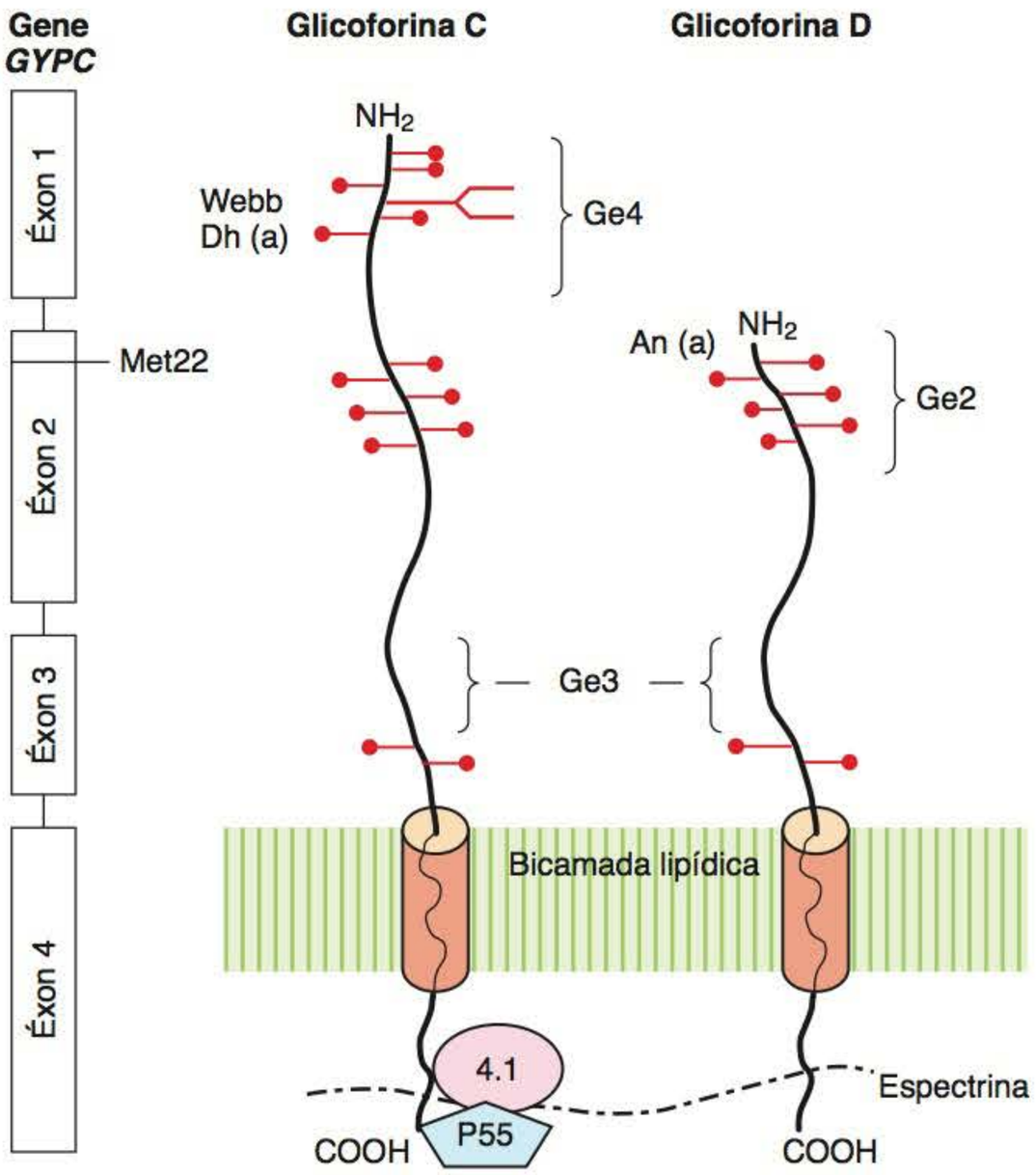


Figura 34.15 Antígenos Gerbich na glicoforina C e na glicoforina D. Glicanos ligados ao *O* (—•) e ao *N* são mostrados. Também é mostrada a relação do gene *GYPC* com ambas as proteínas. A glicoforina D é o resultado da tradução alternativa em Met22 no éxon 2. Duas deleções de diferentes éxons são responsáveis pelos 3 fenótipos Gerbich nulos. As glicoforinas C e D podem interagir com a espectrina e as proteínas 4.1 e p55 do citoesqueleto.

Bioquímica

Os antígenos Gerbich expressam-se em 2 glicoproteínas do tipo 1 relacionadas biossinteticamente, a glicoforina C (GPC; Fig. 34.15) e a glicoforina D (GPD). A GPC é uma glicoproteína de 40 kDa e 128 aminoácidos, que tem um glicano ligado ao *N* e 12 glicanos ligados ao *O*. A GPD é uma variante de 107 aminoácidos, faltando 21 aminoácidos na terminação amino (Reid, 2004b). O domínio citoplasmático

Tabela 34.30 Antígenos do grupo sanguíneo Gerbich

Alta frequência		Frequência	GP*	Troca de aminoácido	Frequência	Baixa frequência	
ISBT	Nome			(alta → baixa)		Nome	ISBT
GE2	Ge2	> 99%	GPD	Término N′			
GE3	Ge3	> 99%	GPC	aa 43–50			
			GPD	aa 22–29			
GE4	Ge4	> 99%	GPC	Terminação N			
GE5	Webb	> 99%	GPC	Ser8>Asn	Raro	(Webb–)	
			GPC+D	Duplicação do éxon 3	2% de negros 1,5% de finlandeses	Ls[a]	GE6
GE7	An[a]	> 99%	GPD	Ser2>Ala	0,01%	(An[a]–)	
GE8	Dh[a]	> 99%	GPC	Leu14>Ala	< 0,01%	(Dh[a]–)	
Fenótipos Gerbich nulos[†]							
			GPC	Deleção do éxon 2	Raro	Yus	(Ge–2,3,4)
			GPC	Deleção do éxon 3	10–50% de melanésios	Gerbich	(Ge–2,–3,4)
			GPC	Deleção dos éxons 3+4	Raro	Leach	(Ge–2,–3,–4)

* Glicoforina C (GPC) ou glicoforina D (GPD).

† Os fenótipos Yus e Gerbich resultam de alelos mutantes de GPC. Nenhuma GPD é encontrada nos fenótipos Yus, Gerbich ou Leach.

interage com várias proteínas do citoesqueleto, incluindo a espectrina, a proteína 4,1 e a p55.

Biologia molecular

A GPC e a GPD são produtos de um único gene, GYPC, no cromossomo 2a14-21. O gene abrange 13,5 kb e está organizado em 4 éxons. Os éxons 1 a 3 codificam o domínio extracelular, e o éxon 4 é responsável pelo domínio transmembrana e pela cauda citoplasmática. A região promotora contém as sequências clássicas CCAC e TATA, bem como sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1, GATA-1 e NF-E6. A GPD é o produto da translação avariada em um resíduo AUG alternativo a jusante (Met22).

Conforme mostrado na Tabela 34.30, os antígenos de alta frequência Ge2 e Ge4 são os términos NH_2 de GPD e GPC, respectivamente. Ge3 é codificado pelo éxon 3 e compartilhado por ambas as moléculas. Com exceção de Ls^a, os antígenos Ge de baixa frequência resultam de polimorfismos de aminoácido único. O fenótipo Gerbich nulo, ou Leach, resulta da deleção dos éxons 3 e 4. Como resultado, nenhuma proteína GPC ou GDP se expressa (Fig. 34.15). Os fenótipos Yus e Gerbich são mutantes de deleção que caracterizam-se pela síntese variante de GPC e pela perda completa da síntese de GPD. Como resultado, Yus e Gerbich podem expressar antígenos de alta incidência presentes na GPC (Ge3, Ge4), mas não na GPD (Ge2).

Anticorpos Gerbich

Os anticorpos anti-Gerbich normalmente têm significado clínico, mas nem sempre. Há relatos de sobrevida encurtada de eritrócitos e hemólise tardia após transfusão de eritrócitos Gerbich incompatíveis. Há um relato de DHRN grave. Autoanticorpos contra antígenos Gerbich foram associados a anemia hemolítica autoimune grave (Reid, 2004b).

Os anticorpos anti-Gerbich podem ser dos isotipos IgM ou IgG. A maioria é imunoestimulada, embora seja conhecido anti-Ge de ocorrência natural. Eles podem ser detectados à temperatura ambiente e realçados com AHG. Os antígenos Gerbich são resistentes à quimiotripsina, mas são sensíveis a outras proteases (tripsina, pronase).

Papel biológico

Como Diego/Banda 3, GPC/GPD ajudam a ancorar a membrana ao citoesqueleto subjacente. Em pacientes com deficiência da proteína 4.1 e eliptocitose hereditária, há diminuição de GPC/GPD (75% do normal). Da mesma forma, o fenótipo Ge nulo (Leach) está associado a eliptocitose acentuada decorrente da estabilidade reduzida e da deformabilidade da membrana (Daniels, 2002). Como são ricas em ácido siálico, GPC e GPD podem ligar o vírus influenza. GPC e GPD podem ligar o *P. falciparum*.

Tabela 34.31 Antígenos do grupo sanguíneo Cromer

Antígenos de alta frequência			Troca de aminoácido (alta → baixa)	Antígenos de baixa frequência		
ISBT	Nome	Frequência		Frequência	Nome	ISBT
CROM1	Cr^a	> 99%	Ala193>Pro	Raro		
CROM2	Tc^a	> 99%	Arg18>Leu	6% dos negros 0% dos brancos	Tc^b	CROM3
			Arg18>Pro	Raro	Tc^c	CROM4
CROM5	Dr^a	> 99%	Ser165>Leu	Raro		
CROM6	Es^a	> 99%	Ile46>Asn	Raro		
CROM7	IFC	> 99%	Heterogênea	Raro	Inab	
CROM9	Wes^b	> 99%	Leu48>Arg	2% dos negros < 0,5% dos brancos	Wes^{a*}	CROM8
CROM10	UMC	> 99%	Thr216>Met	Raro		
CROM11	GUT1	> 99%	Arg206>His	Raro		
CROM12	SERF	> 99%	Pro182>Leu	Raro		
CROM13	ZENA	> 99%	His208>Gln	Raro		

* Em decorrência da proximidade, Wes^a enfraquece a expressão de Es^a.

Sistema de grupo sanguíneo Cromer (ISBT nº 021)

O sistema Cromer (Cr/CROM) contém 13 antígenos, incluindo 5 antígenos antitéticos e 10 antígenos de alta incidência (Tab. 34.31). Os antígenos Cromer estão presentes no fator acelerador do decaimento (DAF, CD55), que se expressa amplamente nos tecidos e em secreções. O DAF foi identificado em todas as células hematopoéticas, no endotélio vascular, nos epitélios gastrintestinal e geniturinário, no cérebro e nos líquidos corporais (Storry, 2002). O Cromer expressa-se nos eritrócitos medulares.

Fenótipos nulos/fracos

O fenótipo Inab ou Cromer nulo é um fenótipo autossômico recessivo raro, que se caracteriza pela ausência completa de todos os antígenos Cromer, mas expressão normal de CD59 e outras glicoproteínas ligadas ao glicosil fosfoinositol (GPI). Muitos indivíduos com o fenótipo Inab sofrem de distúrbios gastrintestinais crônicos, em particular uma gastrenteropatia crônica com perda de proteína. Também há perda de CD55/Cromer nos eritrócitos de pacientes com HPN III, em que faltam glicoproteínas ligadas ao GPI. Observa-se expressão fraca de Cromer (40% do normal) no fenótipo Dr(a–).

Bioquímica

A CD55/DAF é uma glicoproteína altamente glicosilada de 70 kDa e 381 aminoácidos ligada ao GPI (Fig. 34.13). O domínio extracelular consiste em 4 domínios curtos de consenso repetidos (SCR), capazes de ligar componentes do complemento (C3b/C4b), seguidos por um trecho de 70 aminoácidos em glicanos ligados ao *O* (50% de serina/treonina). Cada domínio SRC contém 4 resíduos de cisteína altamente conservados, resultando em 2 pontes de dissulfeto intracadeia/SRC. Em consequência, a DAF é sensível aos agentes redutores de sulfidrila. A molécula contém um único sítio de *N*-glicosilação perto de SCR1 (Medof, 1987).

Biologia molecular

O gene DAF abrange 40 kb no cromossomo 1q32 e está organizado em 11 éxons. A maioria dos antígenos Cromer reflete polimorfismos de aminoácido único (Tab. 34.31) (Storry, 2002; Reid, 2003b, 2004a). O fenótipo Inab resulta de mutações sem sentido ou de desdobramentos. A etiologia do fenótipo Dr(a-) é bastante interessante. Um polimorfismo de aminoácido único (596C>T) leva a polimorfismo Ser165>Leu e um sítio alternativo de quebra. Em indivíduos Dr(a-), 2 espécies de mRNA são observadas, codificando uma proteína truncada com mutação que surge de dobramento alternado (transcrito maior) e a DAF completa trazendo o polimorfismo Leu165 (transcrito menor). Os eritrócitos Dr(a–) têm expressão enfraquecida da DAF e todos os antígenos Cromer (Storry, 2002).

Anticorpos Cromer

O significado clínico dos anticorpos anti-CR é variável. Em alguns indivíduos, os anticorpos anti-CR estão associados a menor sobrevida dos eritrócitos e reações transfusionais hemolíticas. Os anticorpos Cromer não causam DHRN graças à adsorção de anticorpos pela DAF no epitélio dos trofoblastos (Storry, 2002; Daniels, 2002).

Em geral, os anticorpos anti-Cromer são do isotipo IgG, surgindo de estimulação imune. São detectados no IAT e podem dar resultados fracos e variáveis (alto título, anticorpos de baixa avidez). O anti-Cromer pode ser inibido pelo plasma, pela urina e por concentrados de plaquetas. A reatividade dos anticorpos é altamente sensível ao tratamento prévio de eritrócitos com quimiotripsina e pronase, mas não com outras proteases. Os antígenos Cromer ficam enfraquecidos, mas não são destruídos, por AET e DTT.

Papel biológico

A CD55/DAF protege as células do complemento, ao promover o decaimento de 2 convertases C3, a C4b2 e a C3bBb (Lindahl, 2000). CD55 também é receptor para cepas uropatogênicas e intestinais de *E. coli* que trazem adesinas Afa/Dr e X, echovírus e o vírus Coxsackie B.

Tabela 34.32 Antígenos do grupo sanguíneo Knops

Alta frequência		Frequência	Troca de aminoácido (alta → baixa)	Frequência	Baixa frequência	
ISBT	Nome				Nome	ISBT
KN1	Kn^a	99%	Val1561>Met	4% dos brancos	Kn^b	KN2
KN3	Mc^a	99%	Lys1590>Glu	45% dos negros	Mc^b	KN6
KN4	Sl1 (Sl^a)	98% dos brancos 52% dos negros	Arg1601>Gly	Apenas negros	Sl2 (Vil)	KN7
	Sl4*	100% dos negros 96% dos brancos	Ser1610>Thr	4% dos brancos	Sl5*	
KN8	Sl3†		Arg1601+Ser1610			
KN5	Yk^a	92% dos brancos 98% dos negros	Desconhecida			

* SI4 e SI5 são antígenos teóricos não formalmente acrescentados à família Knops no momento.

† SI3 é um antígeno conformacional que requer a presença tanto de Sl1 (Arg1601) como de "Sl4" (Ser1610).

Sistema de grupo sanguíneo Knops (ISBT nº 022)

O grupo sanguíneo Knops contém de 7 a 10 antígenos, incluindo 6 antitéticos (Tab. 34.32). Vários antígenos Knops (Kn^b, Mc^b, Sl^a) são segregados etnicamente. Os antígenos Knops estão presentes em eritrócitos, neutrófilos, linfócitos B e células dendríticas de adultos e do cordão umbilical (Reid, 2004b). A força do Knops pode variar entre os indivíduos, com aproximadamente 1% de doadores apresentando expressão extremamente fraca do Knops (10% do normal, fenótipo Helgeson).

Bioquímica

O Knops reside no receptor 1 do complemento (CR1, CD35), uma glicoproteína de 220 kDa (Moulds, 2001). O domínio extracelular consiste em 30 repetições curtas de consenso (SCR), arranjadas em 4 regiões longas homólogas (LHR), capazes de ligar C4b e C3b. A molécula também tem 6 a 8 sítios de *N*-glicosilação.

Biologia molecular

O gene *CR1* reside no cromossomo 1q32. Há 4 alelos CR1 (CR*1-4), dos quais o CR1*1 é o mais comum (Daniels, 2002). A variação na força do CR1 e o número de cópias parecem ser determinados geneticamente. Até o momento, todos os antígenos Knops surgem de polimorfismos de aminoácido (Tab. 34.31; Moulds, 2001, 2002, 2004). Os antígenos KN4/7 (Sl/Vil) podem ser expandidos para incluir 5 antígenos, refletindo a influência de um segundo polimorfismo de aminoácido (Ser1610>Ser) e um antígeno conformacional (Sl3) que requer coexpressão de Sl1 e Sl4 (Moulds, 2002).

Anticorpos Knops

Os anticorpos Knops são clinicamente insignificantes. Eritrócitos incompatíveis com Knops têm sobrevida normal após transfusão. Os anticorpos Knops são do isotipo IgG, surgindo de estimulação imune, e, em geral, só são detectados com AHG. Classificados historicamente como anticorpos HTLA (alto título, baixa avidez), é notoriamente difícil trabalhar com os anticorpos Knops por causa de sua baixa avidez, da variação biológica na expressão Knops, da degradação do antígeno e da presença de especificidades adicionais de aloanticorpo. Os antígenos Knops são resistentes às proteases, mas são enfraquecidos por agentes redutores de sulfidrila (AET, DTT).

Papel biológico

Uma proteína reguladora do complemento, a CR1 pode ligar complexos imunes C3b/C4B, promovendo sua degradação pelo fator 1. A CR1 facilita a fagocitose de partículas cobertas por C3b/C4B e pode desempenhar um papel nas infecções por *Leishmania*, *Legionella* e micobactérias (Daniels, 2002). A CR1 também liga *P. falciparum* com formação de roseta – achado clínico associado a malária grave. Como os eritrócitos Sl(a–) mostram ligação reduzida ao *P. falciparum* e poucas rosetas, aventou-se a hipótese de que o fenótipo Sl(a)/Sl2, presente em 70% das pessoas negras na África, pode proteger contra a malária grave. No entanto, estudo recente não revelou correlação entre o fenótipo Sl1/Sl2 e a infecção por malária ou a gravidade da doença (Zimmerman, 2003). Apesar de tardia, a incidência extremamente alta do fenótipo Sl(a–) ou Sl2 na África sugere que no passado houve uma vantagem seletiva para o fenótipo Sl(a–) nessa população.

Sistema de grupo sanguíneo Indian (ISBT nº 023)

O grupo sanguíneo Indian (In) contém 2 antígenos autossômicos codominantes, In^a (IN1) e In^b (IN2). O In^b é um alelo de alta frequência (99% das pessoas brancas), enquanto o In^a é relativamente raro, exceto entre populações indianas (4%) e árabes (11–12%). O AnWj é outro antígeno de alta incidência que se acredita que pertença ao grupo sanguíneo Indian. Os antígenos Indian são carregados pela glicoproteína CD44 e expressam-se amplamente em todas as células hematopoéticas e epiteliais e no tecido neural. Há aproximadamente 6.000 a 10.000 moléculas de CD44 por eritrócito (Byrne 2004; Reid, 2004b).

Fenótipos nulos/fracos

Os antígenos Indian, inclusive o AnWj, estão deprimidos nos eritrócitos In(Lu). A quantidade de In e AnWj diminui transitoriamente nos eritrócitos do cordão umbilical durante a gravidez e na anemia hemolítica autoimune consequente ao autoanti-AnWj (Daniels, 2002).

Bioquímica

Os antígenos Indian estão presentes na CD44, uma glicoproteína onipresente em muitas membranas celulares. É heterogênea entre os tecidos em decorrência de diferenças específicas dos tecidos no processamento e na glicosilação do mRNA. Nos eritrócitos, a CD44 é uma glicoproteína do tipo 1 de 80 a 85 kDa e 341 aminoácidos, com um grande domínio extracelular fortemente glicosilado contendo 3 resíduos de cisteína, 6 *N*-glicanos, 3 sulfatos de condroitina e vários glicanos ligados ao *O*. Como Diego/Banda 3, a CD44 pode ligar proteínas do citoesqueleto, a proteína 4.1 e a anquirina (Daniels, 2002).

Biologia molecular

A CD44 reside no cromossomo 11p13. O gene abrange 50 kb e contém 20 éxons, que são capazes de gerar uma fileira de formas variantes desdobradas. Nos eritrócitos, a CD44 é codificada pelos éxons 1 a 5, 16, 17, 18 e 20. Um polimorfismo de aminoácido único é responsável pelos antígenos In^a (Pro46) e In^b (Arg46). A etiologia do antígeno AnWj é desconhecida.

Anticorpos Indian

Os anticorpos contra os antígenos Indian e AnWj podem ter significado clínico, encurtando a sobrevida dos eritrócitos e causando reações transfusionais. Eles não estão associados à DHRN. Anemia autoimune decorrente de autoanti-AnWj foi relatada. Anticorpos anti-Indian em geral são do isotipo IgG, surgindo de estimulação imune. Podem apresentar-se como aglutininas salinas e são acentuados por AHG. Os antígenos In^a e In^b, mas não o AnWj, são destruídos por proteases e AET. Os anticorpos anti-Indian também são inibidos por plasma, que contém CD44 solúvel.

Papel biológico

A CD 44 é uma molécula de adesão importante nos leucócitos. A CD44 liga um espectro de proteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e hialuron. Na medula óssea, a CD44 pode participar na adesão de progenitoras eritroides a fibroblastos do estroma. Nos leucócitos, a CD44 pode facilitar a adesão endotelial a eles, ajudando a localizar os pontos de inflamação para eles. A CD44

está envolvida na metástase tumoral, no remodelamento de feridas e na diferenciação embrionária. AnWj/CD44 também é um receptor para o *Haemophilus influenzae*.

Sistema de grupo sanguíneo OK (ISBT nº 024)

O sistema OK contém um único antígeno de alta frequência, Ok^a (> 99% dos doadores). A glicoproteína Ok^a está presente nos eritrócitos, leucócitos e células progenitoras hematopoéticas. O Ok^a reside na CD147, uma glicoproteína de 35 a 68 kDa e 251 aminoácidos ligados ao *N*. Membro da superfamília das imunoglobulinas, a CD147 tem um domínio IgC2 e um IgV. O gene para CD147 reside no cromossomo 19pter. O fenótipo Ok(a-) surge de uma mutação Glu92>Lys (Daniels, 2002). A CD147 é uma proteína associada à ativação de leucócitos e pode participar na adesão celular, na tumorigênese e na cicatrização de feridas via estimulação das enzimas necessárias para o remodelamento da matriz extracelular (Daniels, 2002).

Anti-Ok^a é raro e descrito apenas no Japão, pertence ao isotipo IgG, surge de estimulação imune e está associado a sobrevida encurtada dos eritrócitos após transfusão de eritrócitos incompatíveis com Ok^a. O antígeno Ok^a é resistente a enzimas, sialidases e agentes redutores de sulfidrila.

Sistema de grupo sanguíneo RAPH (ISBT nº 025)

O sistema de grupo sanguíneo RAPH contém um único antígeno, RAPH ou MER2. O RAPH expressa-se em 92% dos doadores e sua força pode variar. Está presente em células CD34+, fibroblastos e eritrócitos. Há uma queda progressiva na expressão de RAPH/MER2 com o aumento da maturação eritroide. O RAPH expressa-se em MER2, uma proteína de 40 kDa codificada por um gene no cromossomo 11p15. O antígeno é sensível à maioria das proteases, exceto a ficina. São conhecidos 3 exemplares de anti-MER2. Todos são do isotipo IgG, surgindo de transfusão e da gravidez. Dois exemplares fixaram complemento. Não existem relatos de reações transfusionais hemolíticas ou DHRN causadas pelo anti-RAPH.

Sistema de grupo sanguíneo JMH (ISBT nº 026)

O sistema de grupo sanguíneo JMH (John Milton Hagen) contém um único antígeno de alta incidência, o JMH (> 99% dos doadores). Além de estar presente nos eritrócitos, o JMH é encontrado em linfócitos, em macrófagos ativados, no timo, no cérebro, no epitélio respiratório, na placenta, nos testículos e no baço (Reid, 2004b).

Bioquímica e biologia molecular

O JMH é levado na CD108 (SEMA-L), uma glicoproteína da família semaforina (Fig. 34.13) com 666 aminoácidos e composta de um grande domínio sema de 500 aminoácidos, um domínio imunoglobulina do tipo C2, 5 sítios de *N*-glicosilação e 6 de miristoilação. A molécula está ancorada na membrana celular por uma cauda de glicofosfoinositol (ligado ao GPI) e é ausente nos eritrócitos de pacientes com HPN III. A molécula contém 19 resíduos de cisteína e é sensível a agentes redutores de sulfidrila. O gene para *SEMA-L* está no cromossomo 15q22.

Anticorpos JMH

Os anticorpos JMH não causam reações transfusionais hemolíticas nem DHRN, embora se tenha documentado encurtamento da vida dos eritrócitos. Os anticorpos são do isotipo IgG e podem ser de ocorrência natural. O antígeno JMH é sensível às proteases e ao DTT.

Papel biológico

Desconhecido. As proteínas semaforinas estão envolvidas na sinalização celular.

Sistema de grupo sanguíneo I (ISBT nº 027)

Contém 2 antígenos relacionados em termos biossintéticos, o I e o i. Precursor biossintético do antígeno I, o antígeno i encontra-se nas células do cordão umbilical, por causa de atrasos do desenvolvimento na enzima responsável pela síntese do antígeno I. Por volta dos 18 meses de idade, i diminui e I aumenta para os níveis observados nos eritrócitos de adultos (Hakomori, 1981). Ambos os antígenos expressam-se de forma onipresente em glicolipídeos e glicoproteínas de todos os tipos celulares.

Fenótipo nulo

O fenótipo i_{adulto} é um fenótipo autossômico recessivo raro, encontrado em 0,01 a 0,03% dos doadores. Na Ásia, pode estar associado a catarata congênita. Também se observa sua elevação em eritrócitos do cordão umbilical, nos reticulócitos e na eritropoiese estressada, como na HPN (Navenot, 1997). O antígeno i elevado, com hemólise crônica, também é observado na HEMPAS, uma anemia diseritropioética congênita. O aumento do antígeno i na HEMPAS é o resultado direto de defeitos na glicosilação (Fukuda, 1990).

Bioquímica

Oligossacarídeos de cadeia do tipo 2, os antígenos i e I terminam em um epítopo Galβ1-4GlcNAc ou lactosaminil e diferem apenas em termos de complexidade e multivalência. Conforme mostrado na Figura 34.16, o antígeno i é um oligossacarídeo linear. O antígeno I é derivado do antígeno i pela ação da β1-6 *N*-acetilglicosaminiltransferase, uma primeira etapa na síntese de grandes polilactosaminas complexas multivalentes ramificadas (Fig. 34.16). Tanto o i como o I podem, ainda, ser modificados por outras galactosiltransferases para produzir ABH, LeX e antígenos relacionados.

Biologia molecular

O antígeno I, uma β1-6 glicosaminiltransferase, é o produto de *IGnT*, gene que abrange aproximadamente 100 kb no cromossomo 6p34 e contém 5 éxons, que incluem o éxon 1 específico de 3 tecidos (Fig. 34.17). Em consequência, são possíveis 3 formas desdobra-

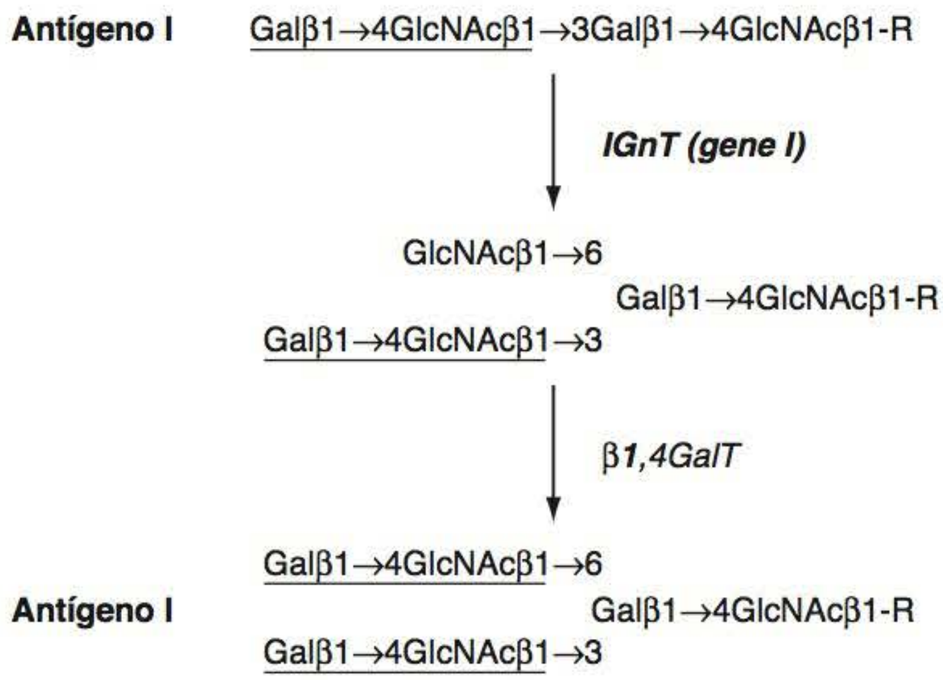


Figura 34.16 Estrutura dos antígenos I e i de grupo sanguíneo. Os epítopos lactosaminil terminais imunologicamente ativos estão sublinhados. A síntese do antígeno I requer a ação da IGnT, uma β1-6-*N*-acetilglucosaminiltransferase. Gal = galactose; GlcNAc = *N*-acetilgalactosamina; R = outro oligossacarídeo.

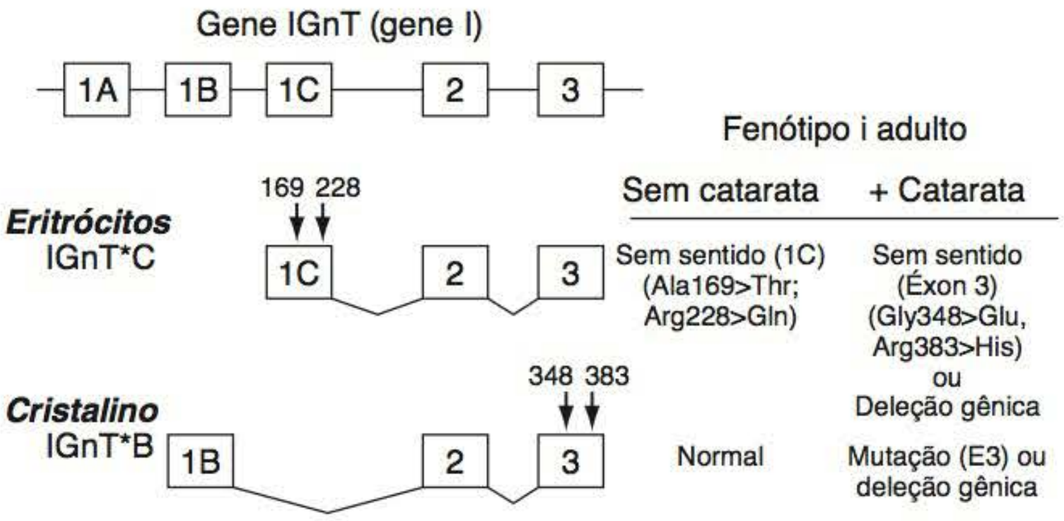


Figura 34.17 Gene I mostrando 3 diferentes éxons 1. Nos eritrócitos e lentes mRNA humanas, um RNAm diferente da IGnT é traduzido, com base em qual éxon 1 é utilizado. Mutações no gene I podem resultar em fenótipo i adulto e catarata. Nos europeus, as mutações em geral são apenas no éxon 1C e afetam a síntese do antígeno I nos eritrócitos. Na Ásia, o fenótipo adulto i envolve deleção gênica ou mutações no éxon 3. Como resultado, há perda da atividade da IGnT em todos os tecidos.

das diferentes de IGnT, dependendo de qual éxon 1 é utilizado (Inaba, 2003). O IgnT*C, composto dos éxons 1C, 2 e 3, é encontrado nos eritrócitos. O IgnT*B é sintetizado nas lentes humanas (Yu, 2003).

O fenótipo i_{adulto} e a catarata congênita foram ligados a mutações no *IGnT*. Em indivíduos adultos brancos com fenótipo i_{adulto} e sem catarata, foram encontradas mutações no éxon 1C (nt 505, 683), levando a uma perda de atividade do IGnT*C no éxon 3 (nt 1049, 1154) ou uma deleção maior do gene *IGnT*. Como resultado, há uma perda de atividade de IGnT*C e IGnT*B nos eritrócitos e na lente, respectivamente (Yu, 2003). Acredita-se que a perda de atividade de IGnT*B na lente é a base da formação de catarata.

Anticorpos anti-I e i

São do isotipo IgM, reativos à temperatura ambiente (Tab. 34.7). Autoanticorpos para o I são relativamente comuns e em geral são aglutininas frias de baixo título. Algum anti-I pode ter especificidade IH, reagindo mais fortemente com eritrócitos dos grupos O e A2 (ver Tab. 34.48, adiante). Embora geralmente benigna, observa-se hemólise secundária a altos títulos de anti-I na anemia hemolítica autoimune fria (CAD). A CAD pode ocorrer no contexto de malignidade e infecção, em particular por *Mycoplasma pneumoniae*. Esses anticorpos exibem uma grande amplitude térmica, em geral aglutinando eritrócitos a temperaturas de 30 a 34°C. Em contraste, o aloanti-I é relativamente raro, sendo encontrado como um anticorpo de ocorrência natural em adultos com fenótipo i_{adulto}. O anti-i também é incomum, mas foi relatado na mononucleose infecciosa e na cirrose alcoólica.

Sistema de grupo sanguíneo GIL (ISBT nº 029)

Contém um antígeno de alta incidência, o GIL (100% dos doadores). A proteína GIL tem alta expressão em eritrócitos, nos rins, no intestino delgado, no estômago, no cólon, no baço, nos olhos e no trato respiratório (Reid, 2004b).

Bioquímica

O GIL é levado por uma aquagliceroporina (AQP3), um membro da família MIP de canais de água. Como a Colton (AQP1), a AQP3 é uma proteína multietapa de 46 kDa que contém 6 domínios transmembrana e um único sítio de *N*-glicosilação. A molécula está presente na membrana celular como dímeros, trímeros e tetrâmeros (Daniels, 2002).

Biologia molecular

O gene *AQP3* abrange 6 kb no cromossomo 9p13 e está organizado em 6 éxons. O fenótipo GIL-negativo resulta de sítio de quebra e mutações estruturais no *AQP3*.

Anticorpos GIL

O anti-GIL está associado a reações transfusionais hemolíticas. Não há relatos de DHRN causado por anti-GIL, apesar de um efeito direto positivo no teste da antiglobulina direta (DAT). Em geral, o anti-GIL é do isotipo IgG, reativo a 37°C e realçado por AHG. O antígeno é resistente a proteases, sialidases e DTT.

Papel biológico

AQP3/Gil é um canal de água na membrana, capaz de transportar ureia e glicerol. Ver "Sistema de grupo sanguíneo Colton (ISBT nº 015)".

Testes e procedimentos imuno-hematológicos

Princípios básicos – hemaglutinação

A hemaglutinação específica é a reação imunológica *in vitro* mais importante nos bancos de sangue, por ser o ponto terminal de quase todos os sistemas de teste destinados a detectar antígenos e anticorpos eritrocitários. Na verdade, o processo de hemaglutinação ocorre em 2 estágios. No primeiro estágio, em geral conhecido como sensibilização eritrocitária, ocorre simplesmente a combinação de parátopo e epítopo em uma reação reversível que segue a lei da ação das massas e tem uma constante de equilíbrio associada. O antígeno e o anticorpo são mantidos juntos por atrações não covalentes. No segundo estágio, múltiplos eritrócitos com anticorpo ligado formam uma rede estável, por meio de pontes antígeno-anticorpo formadas entre células adjacentes, que é a base de todas as reações de aglutinação visíveis.

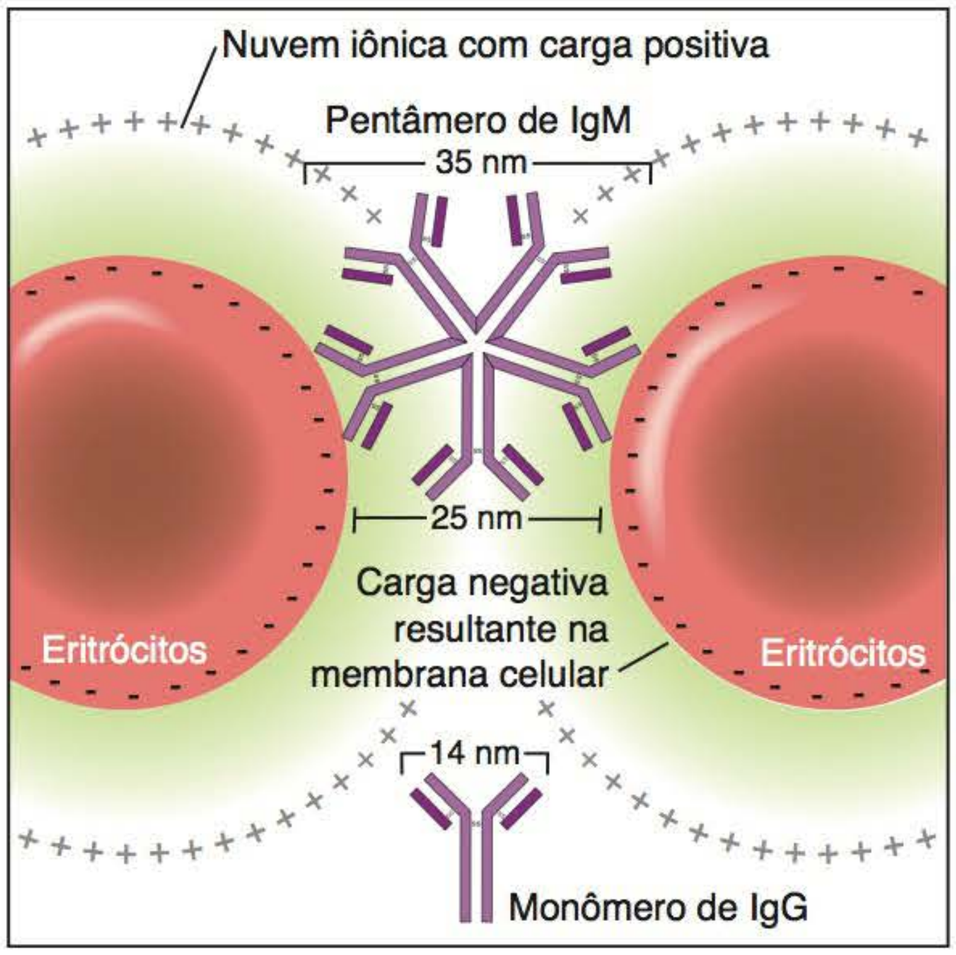


Figura 34.18 Eritrócitos são mantidos separados em um meio iônico pelo potencial zeta que, por sua vez, influencia a capacidade aglutinante de IgG e IgM.

A formação da rede durante o segundo estágio de hemaglutinação é naturalmente impedida pelo fato de que os eritrócitos em solução normalmente se repelem, por causa da carga líquida negativa da membrana do eritrócito, criada pelo ácido siálico. Se os eritrócitos forem suspensos em um meio iônico como solução fisiológica normal, os cátions se arranjarão em torno de cada célula, formando uma "nuvem iônica". Os cátions mais próximos da membrana celular ficam firmemente ligados e movem-se com o eritrócito, enquanto outros cátions movem-se livremente. A diferença de carga na superfície entre as camadas interna e externa de cátions, denominada superfície de cisalhamento, cria um potencial elétrico denominado potencial zeta (Fig. 34.18), o qual mantém os eritrócitos em solução a cerca de 25 nm de distância entre si (Lewis, 1999). Outro fator que pode ser importante para manter os eritrócitos separados é a água da hidratação. Proponentes dessa teoria sugerem que as cabeças polares hidrofílicas das moléculas de lipídeo fazem a dupla camada da membrana celular externa atrair moléculas de água. A água cria uma superfície de tensão que ajuda a manter as células separadas.

Uma situação em que a influência natural do potencial zeta de manter os eritrócitos separados é sobrepujada é o fenômeno da formação de *rouleaux*, ou "pseudoaglutinação". Pacientes com mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström e síndromes de hiperviscosidade têm altas concentrações de proteínas séricas anormais que mudam a carga resultante da superfície na membrana do eritrócito. As células, portanto, aglomeram-se unidas em grumos que lembram a hemaglutinação macroscópica. Expansores plasmáticos, como o dextrano e o amido hidroxietil, bem como alguns materiais de contraste radiográfico intravenosos, podem causar formação de *rouleaux*. Um *rouleaux* pode ser diferenciado da aglutinação verdadeira à microscopia direta: (1) pela formação clássica de "pilha de moedas" e (2) pela perda do *rouleaux* após lavagem e ressuspensão em solução fisiológica. Também é possível observar aglutinação inespecífica em amostras de sangue de cordão umbilical contaminadas com geleia de Wharton. A presença de ácido hialurônico e albumina no sangue do cordão umbilical é responsável por esse problema.

Fatores que afetam a hemaglutinação específica

A extensão da sensibilização dos eritrócitos e a facilitação do segundo estágio de formação da rede em treliça são influenciadas pri-

meiramente pelas características inerentes dos antígenos específicos e dos anticorpos envolvidos. Na maioria dos procedimentos de imuno-hematologia, os anticorpos IgM podem facilitar o segundo estágio de hemaglutinação, por causa de seu grande diâmetro (35 nm), que lhes permite ocupar a distância entre 2 eritrócitos adjacentes em solução (Fig. 34.18). Graças à sua capacidade aglutinante inata, os anticorpos IgM muitas vezes são mencionados como aglutininas diretas. Já os anticorpos IgG, em sua maioria, são consideravelmente menores (14 nm) e incapazes de induzir aglutinação visível sem a ajuda de reagentes secundários facilitadores. Por isso, os anticorpos IgG costumam ser chamados de aglutininas indiretas.

A densidade e a acessibilidade de antígenos específicos na membrana eritrocitária também são críticas no segundo estágio da formação de rede em treliça. Isso pode ser ilustrado comparando-se os antígenos ABO e Rh. Existem aproximadamente 1.000.000 de antígenos ABO por eritrócito, exibidos nas grandes glicoproteínas extramembranosas. Em decorrência de sua alta densidade e da fácil acessabilidade, os anticorpos ABO podem ligar-se prontamente a antígenos ABO expostos e aglutinar eritrócitos. Em contraste, os antígenos Rh ocupam em média apenas 10.000 a 30.000 sítios por célula e, como proteínas multietapas integrantes da membrana, são considerados intramembranosos. Em consequência, os antígenos Rh aglutinam com menor facilidade em antissoros Rh. Como outro exemplo da influência da densidade do antígeno, os eritrócitos homozigotos para um gene de determinado grupo sanguíneo particular em geral apresentam reações mais fortes que células heterozigotas, porque os homozigotos expressam 2 vezes mais cópias, ou uma dose dupla, do antígeno por célula. Nos testes imuno-hematológicos, esse fenômeno costuma ser designado dosagem.

Secundariamente às características inerentes dos antígenos e anticorpos, o primeiro e o segundo estágios de reação de hemaglutinação também podem ser influenciados pela manipulação de vários parâmetros físicos e/ou químicos do ambiente da reação. Na Tabela 34.33 há um esboço da maneira pela qual esses vários parâmetros podem ser controlados.

Gradação das reações de hemaglutinação

O teste de hemaglutinação no banco de sangue é analisado e graduado de acordo com a força da reação. A hemólise é considerada a reação positiva mais forte que pode ocorrer e indica a presença de um anticorpo potente que fixa complemento. Após incubar soro e eritrócitos reagentes em um recipiente, o soro deve ser primeiro examinado quanto a hemólise, antes da ressuspensão do botão celular. Ao ler a aglutinação, o tubo deve ser agitado, por meio de movimentos leves do punho, até que todas as células sejam desalojadas. É mais fácil conseguir isso mantendo o tubo em ângulo reto, de modo que o líquido faça um "corte" por meio do botão celular, possibilitando a fácil ressuspensão daquelas células. Quando as células não aderirem mais ao tubo, deve-se incliná-lo para trás e para a frente delicadamente, até que se observe uma suspensão uniforme de células (ou aglutinação). A iluminação adequada com um espelho côncavo é um auxílio inestimável para a leitura macroscópica. Colocando-se o tubo cerca de 6 cm acima de um espelho côncavo de 7,5 cm, é possível diferenciar com facilidade os agregados das células livres olhando no espelho em vez de no tubo.

Tabela 34.33 Fatores que afetam a reação de hemaglutinação

Parâmetro da reação	Efeito	Manipulação
Temperatura	Influencia a constante de equilíbrio e/ou a velocidade da reação, dependendo da classe de anticorpo envolvida	A diminuição da temperatura para 24°C, ou mesmo 4°C ,facilita a reação dos anticorpos IgM O preaquecimento ou a manutenção da reação em 37°C proporciona a temperatura ideal para a detecção de anticorpos IgG, ao mesmo tempo que impede a reação da maioria dos anticorpos IgM
Tempo de incubação	Reações ag/ac diferentes alcançam o equilíbrio em períodos de tempo diferentes	O aumento do tempo de incubação em determinado sistema de teste pode melhorar a detecção de um anticorpo fracamente reativo
pH	Em uma faixa de pH de 6,5 a 7,5, grupos químicos sobre ag e ac têm cargas opostas, o que proporciona forças iônicas ótimas de atração para a maioria dos anticorpos de grupos sanguíneos	A alteração no pH afeta a constante de equilíbrio de certos anticorpos, que podem reagir preferencialmente em um ambiente mais ácido – p. ex., anti-M e anti-Pr
Força iônica	Em um meio salino isotônico, os cátions de sódio e os ânions de cloreto aglomeram-se em torno do ag eritrocitário e do ac do grupo sanguíneo, respectivamente, agindo de forma a neutralizar as forças de atração entre ambos	SFIB (soluções de força iônica baixa) – o acréscimo dessas soluções reduz o efeito protetor sobre ac e ag de cargas opostas, aumentando, assim, a velocidade da reação e a constante de equilíbrio para a sensibilização de eritrócitos
Concentração de anticorpo	Pode afetar o primeiro e o segundo estágios da aglutinação, ao influenciar o número de moléculas de anticorpo aderidas a cada eritrócito	O aumento da concentração sérica de células resulta em aumento da velocidade da reação e/ou afeta a constante de equilíbrio da sensibilização de eritrócitos por anticorpos IgG. Pode ajudar a induzir o segundo estágio da aglutinação por anticorpos IgM PEG (polietilenoglicol) – o acréscimo dessa molécula que ocupa muito espaço aumenta efetivamente a concentração relativa de ag e ac respectiva ao volume da reação, aumentando bastante sua velocidade. Técnica só utilizada no teste com AHG para detectar anticorpos IgG
Potencial zeta	Faz os eritrócitos se repelirem em solução. Se o potencial zeta puder ser reduzido ou os eritrócitos puderem ser aproximados por meios físicos, o segundo estágio da aglutinação de eritrócitos sensibilizados pode ser facilitado	Centrifugação – força as células a se unirem, facilitando a formação da rede em treliça Enzimas – clivam resíduos de ácido siálico para baixar o potencial zeta e também aumentam a acessibilidade de certos antígenos de grupos sanguíneos Albumina – reduz o potencial zeta e/ou a água da hidratação, permitindo que os eritrócitos se aproximem mais Polibreno/protamina – fornecem excesso de cátions, que neutraliza a força repulsiva entre eritrócitos, proporcionando agregação inespecífica e formação da rede em treliça mediada por anticorpo. O acréscimo final de citrato de sódio dispersa agregados inespecíficos, enquanto os aglutinados específicos de ag e ac permanecem

ac = anticorpo; ag = antígeno; AHG = antiglobulina humana.

Tabela 34.34 Gradação da hemaglutinação

Grau	Aspecto	Pontuação
H	Hemólise – presença de hemoglobina livre no soro	10
4+	Um agregado sólido	10
3+	Vários agregados médios a grandes	8
2+	Muitos agregados pequenos a médios com fundo transparente	5
1+	Muitos agregados pequenos com fundo turvo	3
+ ou f	Alguns agregados pequenos com muitas células não aglutinadas	2
$\pm^m$ ou $+^m$	Agregados visíveis apenas sob aumento microscópico	1
0	Negativo – ausência de agregados; nenhuma célula aglutinada	0
mf	Aglutinação de campo misto – presença de população mínima de células aglutinadas superpostas em um fundo negativo	NA
R	*Rouleaux* – agregação inespecífica com aspecto de uma pilha de moedas; desaparece com o acréscimo de solução fisiológica	NA

A Tabela 34.34 relaciona 2 protocolos para avaliar a força da aglutinação, usando gradação numérica e/ou pontuação. A Figura 34.19 ilustra o aparecimento de graus de aglutinação diferentes. Embora o grau de aglutinação dê uma ideia aproximada da potência ou força de um anticorpo particular, o método da pontuação é muito mais útil nos procedimentos semiquantitativos, em particular quando usado em conjunto com a titulação para comparar as forças relativas de 2 soros diferentes.

Teste da antiglobulina humana

Mesmo com o uso de meios facilitadores, como albumina ou enzimas, e a etapa final de centrifugação, muitos anticorpos IgG continuam incapazes de produzir diretamente hemaglutinação detectável. Para visualizar reações com esses anticorpos, é preciso utilizar antiglobulinas humanas reagentes (AHG), que contêm anticorpos específicos para imunoglobulinas humanas ou componentes do complemento. Os anticorpos presentes nos soros com AHG agem

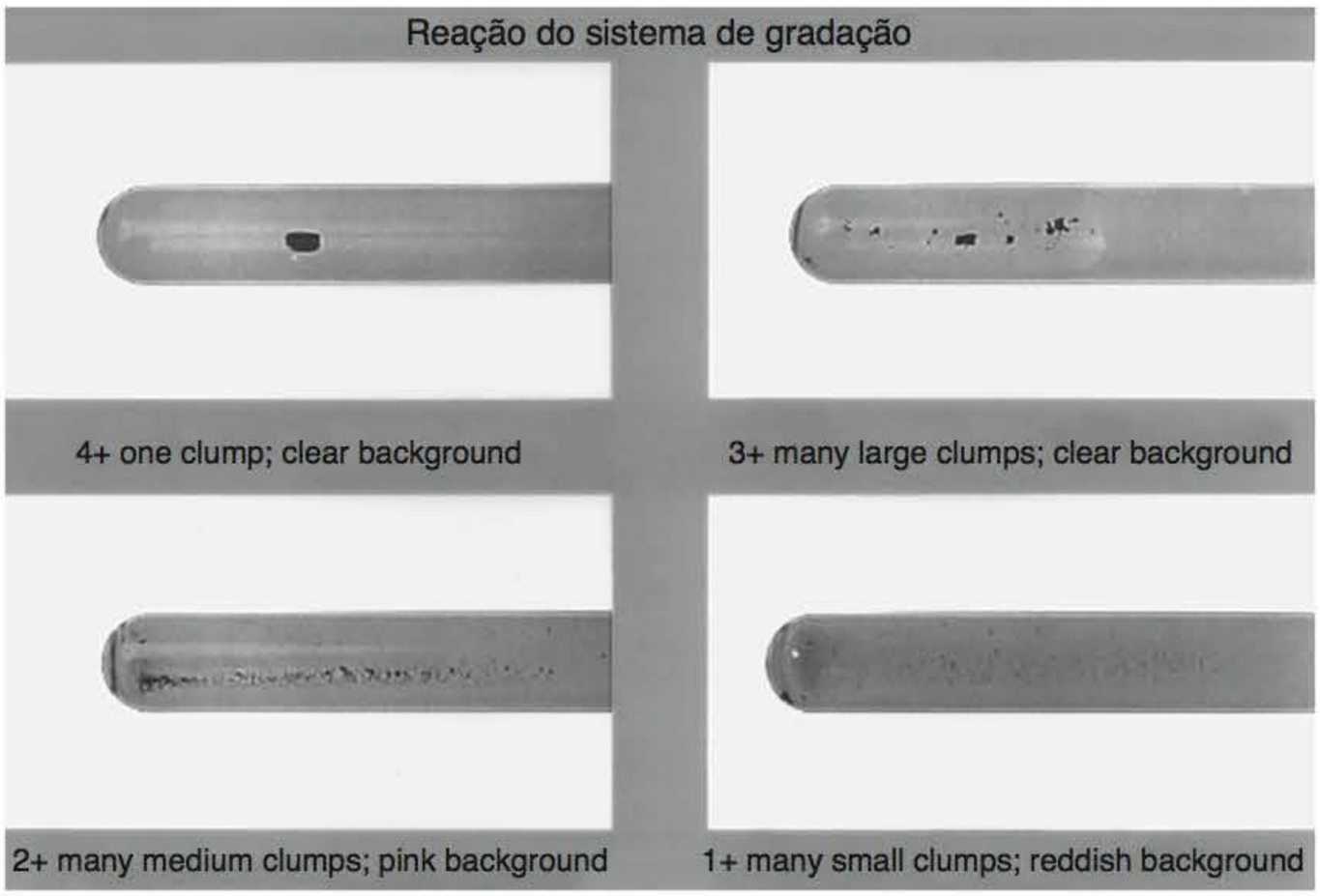


Figura 34.19 Sistema de gradação da aglutinação mostrando reações de hemaglutinação macroscópica.

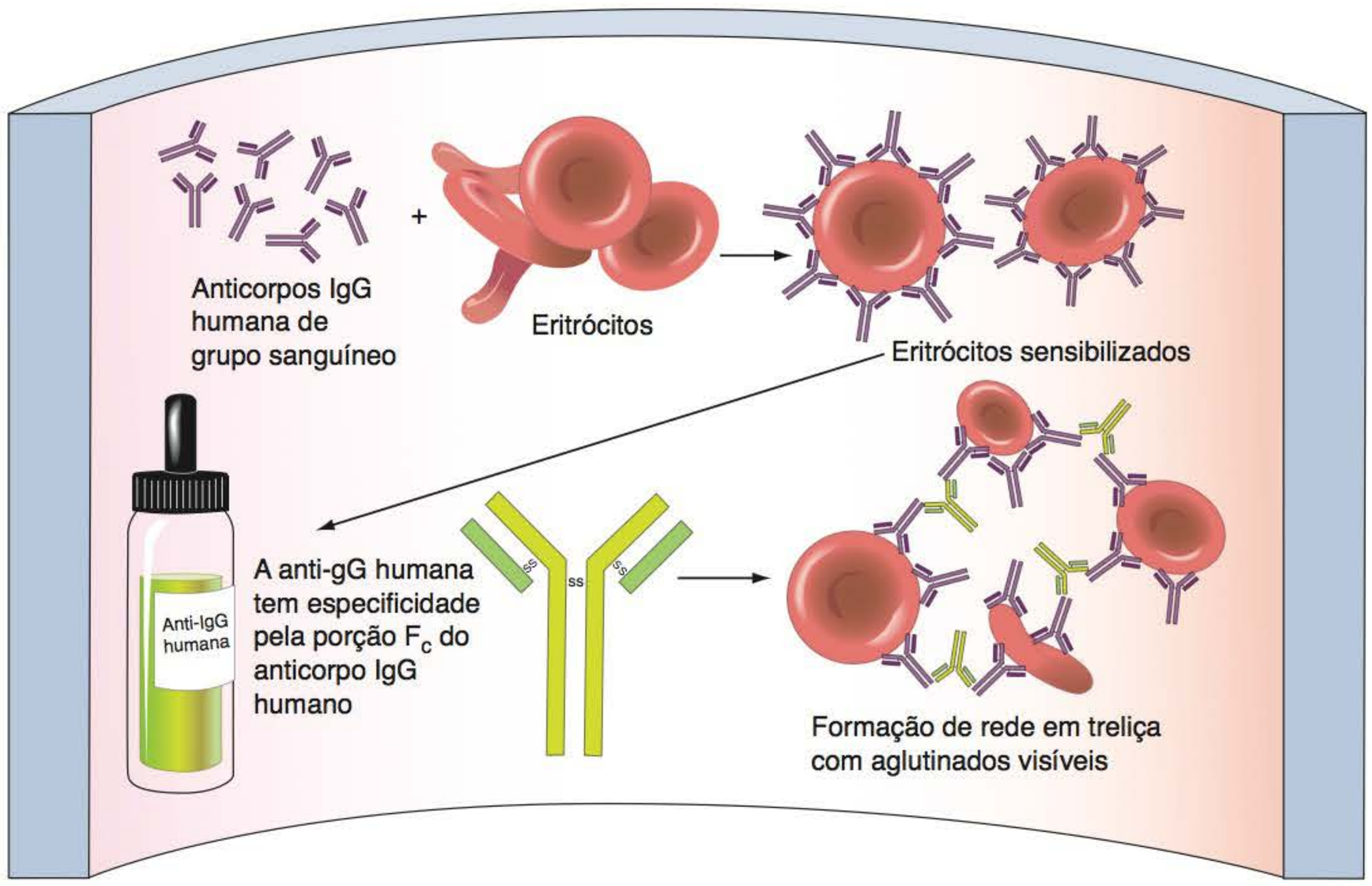


Figura 34.20 Os anticorpos de globulina humana formam uma ponte entre eritrócitos adjacentes sensibilizados com IgG humana ou componentes do complemento.

como pontes entre eritrócitos já sensibilizados com anticorpo ou complemento, para produzir a rede em treliça característica do segundo estágio da hemaglutinação (ver Fig. 34.20). Essa é a base do teste da antiglobulina humana.

O teste da antiglobulina humana também é conhecido como teste de Coombs, em homenagem a um dos primeiros pesquisadores a desenvolvê-lo para uso laboratorial (Coombs, 1954), embora o princípio tenha sido realmente descrito muito antes, em 1908, por Moreschi (Simpson, 1999). Quando se usa o teste para detectar anticorpos ou complemento ligados a eritrócitos *in vivo*, ele é chamado teste de antiglobulina direto (DAT). Quando usado para detectar a reação de anticorpo a eritrócitos *in vivo* após uma fase de incubação apropriada, chama-se teste de antiglobulina indireto (IAT).

Reagentes e procedimentos do teste de antiglobulina humana

Dispõe-se de várias preparações de soros com antiglobulina humana para testes em bancos de sangue, dependendo da aplicação (teste direto ou indireto) para a qual estiver sendo utilizado e de se o que se quer é detectar sensibilização de eritrócitos por IgG, componentes do complemento ou ambos.

Reagentes poliespecíficos

Reagentes AHG policlonais poliespecíficos são produzidos por animais hiperimunizados, em geral coelhos, com imunoglobulina purificada ou complemento, para produzir anticorpos IgG em alto título e de alta avidez. Para determinado lote de reagente, várias amostras de soro do animal são colhidas, reunidas, adsorvidas para remover aglutininas heterófilas, e, então, tituladas para poder se certificar da diluição necessária para reatividade ótima no uso rotineiro. A AHG poliespecífica convencional (também conhecida como de amplo espectro) contém anticorpos IgG policlonais para o espectro de subclasses de IgG humana e os produtos da clivagem do complemento C3, C3b e C3d. Alguma atividade C4B e C4d também pode estar presente. No entanto, a maioria dos fabricantes adsorve a atividade anti-C4 de seus reagentes para AHG poliespecíficos, por ter sido demonstrado que a ativação do complemento *in vitro* por aglutininas frias clinicamente insignificantes resulta em muito mais C4d ligado que C3b (Mollison, 1993). A exclusão da atividade anti-C4 reduz, assim, o número de falso-positivos tanto no DAT quanto no IAT, com a utilização de reagentes poliespecíficos. Como a imunização contra IgG também irá produzir anticorpos de cadeia antileve em uma resposta policlonal, deve-se lembrar que os soros com antiglobulina policlonal podem apresentar reação cruzada com cadeias leves de IgA ou IgM, a menos que o fabricante especifique que o componente anti-IgG é específico de cadeia pesada.

No momento, o reagente AHG poliespecífico mais comumente usado é o anti-IgG policlonal de coelho misturado com anticorpos monoclonais murinos para os componentes C3b e C3d do complemento. Também há um reagente poliespecífico disponível, derivado exclusivamente de anticorpos monoclonais para IgG, C3b e C3d. A atividade de anti-IgG e anticomplemento nos antissoros poliespecíficos, sejam policlonais ou monoclonais, irão variar um pouco entre os diferentes fabricantes e entre os lotes produzidos pelo mesmo fabricante. Entretanto, todos os soros com AHG precisam conter níveis de atividade anti-IgG e anti-C3d que satisfaçam ou excedam os padrões de referência do FDA (Food and Drug Administration) (21CFR660.52; Code of Federal Regulations, 2001b).

Reagentes monoespecíficos

Os reagentes monoespecíficos disponíveis no comércio e liberados pela FDA incluem anti-IgG, anti-C3b+C3d e anti-Cd3. Anti-IgG monoespecífico, ou anticomplemento, também pode ser de origem policlonal ou monoclonal. No caso do anti-IgG monoclonal, os fabricantes precisam misturar monoclonais contra uma variedade de epítopos IgG ou selecionar um clone com especificidade para um epítopo importante a todas variantes de IgG, de modo a assegurar que o espectro de subclasses de IgG humano irá reagir com seu reagente. No caso de anti-IgG policlonal monoespecífico, também é preciso lembrar que ele pode conter atividade de cadeia antileve, a menos que o fabricante rotule-o como específico para cadeia pesada.

A produção de misturas de monoclonais murinos de anticomplemento monoespecífico permitiu que os fabricantes desenvolvessem reagentes contendo quantidades de anti-C3b e C3d purificados de potência conhecida, que têm menor probabilidade de dar resultados falso-positivos graças a outras atividades anticomplemento encontradas em reagentes policlonais (Simpson, 1999).

Escolha do reagente AHG

O teste direto de antiglobina, ou DAT, é uma técnica sorológica diagnóstica importante, usada para a detecção da ativação do complemento mediada por anticorpo nas membranas eritrocitárias *in vivo*. Assim, os reagentes AHG poliespecíficos que contêm atividade tanto de anti-IgG quanto anticomplemento são tipicamente usados para a avaliação inicial pelo DAT. Isso é especialmente importante quando se usa o DAT para ajudar no diagnóstico de anemia hemolítica autoimune fria e algumas formas de anemia hemolítica medicamentosa, em que o complemento pode ser a única evidência de hemólise imunomediada. Eritrócitos circulantes envolvidos na ativação da cascata do complemento terão principalmente C3d na superfície, como resultado da degradação da proteína reguladora do complemento de C3b (Fig. 34.1). Portanto, os soros com AHG poliespecíficos usados no DAT precisam conter, no mínimo, reatividade anti-C3d e, em geral, também contêm alguma reatividade anti-C3b.

O teste indireto da antiglobulina, ou IAT, é usado para a detecção de ligação *in vitro* de anticorpo aos eritrócitos, qualquer que seja a capacidade do anticorpo de fixar complemento. Não está claro se a AHG poliespecífica, que contém reatividade anticomplemento, melhora a detecção de anticorpo sérico pelo IAT. Existem raros relatos de anticorpos que foram detectados apenas por sua capacidade de ligar complemento *in vitro*, o que não teria acontecido com o uso de reagentes anti-IgG monoespecíficos (Brecher, 2002). Uma vantagem possível de usar AHG poliespecífica contendo atividade anticomplemento é que as reações no IAT em geral são mais fortes que as observadas com anti-IgG monoespecífica apenas (Wright, 1979). No entanto, muitos laboratórios preferem usar anti-IgG monoespecífica nos testes para detecção e identificação de anticorpo e em procedimentos cruzados, porque o uso desse reagente evita a detecção de ativação de complemento por anticorpos ou autoaglutininas frias reativas sem significado clínico.

A Tabela 34.35 compara as várias aplicações das técnicas de DAT e IAT. O teste com antiglobulina pode ser realizado em tubos de ensaio, tubos capilares, placas de microtitulação ou técnicas com gel em microtubo (ver adiante em "Provas de reação cruzada"). Esses procedimentos podem ser semiautomatizados ou completamente automatizados, em particular onde se realiza um grande volume de testes, como em hemocentros. A menos que especificado de outra forma, os procedimentos mencionados neste capítulo utilizam tubos de ensaio. As publicações *Technical Manual* (Brecher, 2002), *Methods in Immunohematology* (Judd, 1994) e *Immunohematology Methods* (Mallory, 1993) da American Association of Blood Banks, são referências gerais excelentes sobre a maioria dos procedimentos comuns, bem como as técnicas mais especializadas.

Controle de qualidade do teste de antiglobulina humana

Para padronizar soros com antiglobulina e confirmar reações negativas verdadeiras com antiglobulina, normalmente são empregados 2 tipos de eritrócitos para o controle de qualidade: aqueles cobertos com IgG e aqueles cobertos com C3b e/ou C3d. Os eritrócitos cobertos com C3b são preparados incubando-se sangue total em meio de sacarose de baixa força iônica, ou com anti-Le^a ou anti-i humanos. Os eritrócitos cobertos com C3d são preparados incubando-se células cobertas com C3b com soro fresco ou tripsina para desdobrar C3b em C3d. Células de controle cobertas com IgG ou complemento devem dar uma reação 1+ a 2+ (Fig. 34.19) quando testadas com anti-IgG ou anti-C3b+C3d.

As células para controle de qualidade do teste com antiglobulina são conhecidas como células de verificação, de controle de Coombs e sensibilizadas. Em um teste negativo verdadeiro, a antiglobulina reagente ativa livre deve permanecer. As células de controle, sensibilizadas com IgG e/ou C3, são acrescentadas a todos os testes negativos e centrifugadas. A hemaglutinação das células de verificação confirma tanto

Tabela 34.35 Aplicações das técnicas direta e indireta com antiglobulina

	Aplicações	Objetivo	O que é detectado
Teste direto de antiglobulina	Investigação de RHT	Detectar eritrócitos circulantes do doador que estejam sensibilizados com anticorpo do receptor. Um DAT positivo é a primeira evidência imuno-hematológica de reação hemolítica após transfusão	DAT positivo em virtude de IgG e/ou C3d, dependendo dos anticorpos responsáveis
	Diagnóstico de DHRN	Detectar anticorpos maternos que tenham atravessado a placenta para sensibilizar eritrócitos fetais	DAT quase sempre positivo em virtude de IgG e, ocasionalmente, C3d, se houver anticorpos ABO envolvidos
	Diagnóstico de AHA	Detectar autoanticorpo que sensibilize os próprios eritrócitos do paciente	Autoanticorpos quentes: DAT quase sempre positivo em virtude de IgG Autoanticorpos frios: DAT pode ser positivo em virtude de C3d apenas
	Investigação de hemólise medicamentosa	Detectar anticorpo antifármaco/eritrócito e/ou ativação subsequente do sistema de complemento	O DAT pode ser positivo em virtude de IgG, Cd3 ou ambos, dependendo do mecanismo envolvido (ver adiante em "Investigação de anemia hemolítica autoimune")
Teste indireto de antiglobulina	Detecção de anticorpo (ou triagem de anticorpo)	Detectar aloanticorpos de importância clínica no receptor	Anticorpos IgG do receptor ligados a células reagentes de triagem*
	Identificação de anticorpo	Identificar especificamente aqueles anticorpos detectados pela triagem de células reagentes ou de eritrócitos do doador	Anticorpos IgG do receptor ligados a células reagentes de um painel de 10–12 doadores*
	Prova de reação cruzada	Detectar anticorpos que possam ter sido perdidos pela triagem de anticorpo por causa da ausência do antígeno correspondente ou pela presença de um anticorpo de dosagem	Anticorpos IgG do receptor ligados a eritrócitos do doador*
	Tipagem de antígeno eritrocitário	Fazer a tipagem dos eritrócitos do paciente ou do doador para antígenos que possam ser detectados por antissoros IgG reativos apenas pelo TGA. Um exemplo comum disso seria o teste D fraco	Ligação específica de anticorpos IgG reagentes a eritrócitos positivos para o antígeno correspondente

RHT = reação hemolítica transfusional; DHRN = doença hemolítica do recém-nascido; AHA = anemia hemolítica autoimune; TGA = teste da antiglobulina humana.

* Se o complemento for fixado *in vitro*, poderá ser detectado usando-se antiglobulina poliespecífica.

a presença como a reatividade da AHG reagente, validando assim o resultado negativo do teste. Se não houver aglutinação das células de controle em algum tubo, será necessário repetir os testes porque eles estão inválidos e podem ter produzido resultados falso-negativos. Podem ocorrer testes falso-negativos por uma variedade de razões, que estão relacionadas na Tabela 34.36.

Sensibilidade do teste de antiglobulina humana

Embora o teste da antiglobulina seja extremamente sensível, um teste negativo não exclui de forma alguma a possível presença de anticorpos nos eritrócitos. Estima-se que sejam necessárias 200 a 500 moléculas de IgG ou C3 ligadas por célula para a detecção de anticorpos antiglobulina (Brecher, 2002); um número menor de moléculas ligadas por eritrócito dará uma reação negativa. Soros com AHG também apresentam maior atividade contra algumas subclasses de IgG que contra outras; em consequência, certos soros com antiglobulina humana podem produzir resultados negativos com eritrócitos cobertos por uma subclasse particular de IgG.

Provas de reação cruzada

O termo "reação cruzada" tem sido usado historicamente como sinônimo de prova cruzada sorológica. Contudo, em seu contexto mais amplo, uma prova de reação cruzada é um processo inteiro de qualidade, composto por muitos procedimentos destinados a proporcionar o hemoderivado mais seguro possível para quem vai receber uma transfusão. Tais procedimentos incluem a manutenção de um registro apropriado, a identificação acurada do doador e do receptor, bem como os testes sorológicos realmente feitos com a amostra do receptor antes da transfusão. Nas próximas seções e na Tabela 34.37 estão delineadas as etapas de uma prova de reação cruzada exigidas pelos Standards for Blood Banks and Transfusion Services (Silva, 2004) da AABB e conhecidas como AABB Standards.

Exigências quanto à amostra

Identificação do receptor da amostra

A identificação adequada das amostras de sangue de pacientes e das unidades doadoras é absolutamente essencial nos bancos de sangue. As amostras de sangue de receptores precisam ser etiquetadas pelo flebotomista à beira do leito, diretamente a partir da informação contida na pulseira do paciente. Caso a pulseira não esteja no pulso do paciente por qualquer razão, alguém da equipe de enfermagem deve obter uma confirmação da identidade do paciente assinada antes da colheita do sangue. A etiqueta na amostra de sangue do receptor deve ser legível, incluir pelo menos o nome completo do paciente, o número de identificação do hospital e a data da colheita da amostra e estar bem colada no tubo que contém a amostra quando recebida pelo funcionário do banco de sangue. Amostras de sangue não etiquetadas ou etiquetadas de forma inadequada são inaceitáveis em quaisquer circunstâncias. Durante os testes, todos os tubos de ensaio ou outros tipos de frascos de fração ou reações também precisam ser identificados com acurácia, diretamente a partir da etiqueta do recipiente da amostra.

Antes da transfusão, cada amostra de sangue deve ser acompanhada por uma requisição ou solicitação apropriada, contendo pelo menos o nome completo do paciente e o número de identificação do hospital. A requisição deve conter a assinatura ou as iniciais do flebotomista, pois será um registro permanente daquela amostra colhida em particular. Quem receber a amostra deverá comparar a etiqueta no tubo com a informação contida na requisição, observando se há alguma discrepância. Caso surja alguma dúvida quanto à identidade da amostra, será preciso obter uma nova requisição.

Tipo de amostra

Tradicionalmente, soro é a amostra preferida para a prova de reação cruzada, embora cada vez mais se esteja utilizando plasma por causa das novas tecnologias (p. ex., teste em gel). Os problemas com plasma nas técnicas convencionais para antiglobulina são primordialmente

Tabela 34.36 Procedimentos básicos para os testes direto e indireto de antiglobulina pelo método do tubo

	Procedimento	Razões para reações inválidas nos testes da antiglobulina	
		Falso-positivo	**Falso-negativo**
Teste da antiglobulina direto (DAT)	1. Preparar uma suspensão a 3–5% de solução fisiológica normal dos eritrócitos a serem testados 2. Acrescentar 1 gota da suspensão de eritrócitos a um tubo e lavar 3–4 vezes com solução fisiológica 3. Secar o tubo após a última lavagem 4. Acrescentar 2 gotas de AHG poliespecífica (anti-IgG + anticomplemento) 5. Centrifugar e verificar se houve aglutinação* 6 Acrescentar células de verificação a todos os tubos negativos (ver adiante em "Controle de qualidade do teste de antiglobulina humana") Nota: para o DAT, as amostras de sangue devem ser colhidas com EDTA, para evitar fixação do complemento *in vitro* por aglutininas frias sem importância clínica	Centrifugação excessiva Aglutinação direta por aglutininas frias fortes Incubação excessiva com células tratadas com enzima Uso impróprio de PEG ou reagentes facilitadores com múltiplos cátions Ressuspensão inadequada do botão celular Formação de *rouleaux*‡ Vidro sujo Pequenos coágulos de fibrina podem aprisionar células e simular aglutinação As células com DAT positivo darão resultados falso-positivos em qualquer teste de antiglobulina indireto	Falha da AHG reagente† Falha no acréscimo dos reagentes de AHG† Lavagem imprópria ou inadequada† Lavagem tardia (eluição ou anticorpo aderido fracamente) Proporção soro/céulas muito baixa Falha em acrescentar o soro de teste ou reagentes facilitadores Centrifugação insuficiente Ressuspensão muito vigorosa do botão de células
Teste da antiglobulina indireto (IAT)	1. Colocar 1 gota de cada suspensão de eritrócitos a 3–5% a ser testada em um tubo (p. ex., células de doador, células reagentes de triagem) 2. Acrescentar 2–3 gotas de soro do paciente, ou o número recomendado de gotas dos antissoros preparados comerciais a cada tubo 3. Acrescentar o número recomendado de gotas dos meios facilitadores, como SFIB ou albumina, se indicado 4. Incubar a 37°C pelo tempo indicado para o ensaio realizado (15–60 minutos) 5. Se fizer parte do procedimento, centrifugar e verificar se houve hemólise no soro e aglutinação de células 6. Sendo feita ou não a etapa 5, continuar lavando o(s) tubo(s) 3–4 vezes com solução fisiológica normal 7. Secar os tubos após a última lavagem 8. Acrescentar 2 gotas de soros antiglobulina (anti-IgG poli ou monoespecífico) a todos os tubos 9. Centrifugar e verificar se houve aglutinação* 10. Acrescentar células de verificação a todos os tubos negativos		

* O protocolo pode incluir o exame microscópico opcional para confirmar testes negativos macroscopicamente.

† Será detectado pelo uso de células de controle de Coombs.

‡ *Rouleaux* causam resultados falso-positivos nos testes indiretos lidos após incubação a 37°C.

Tabela 34.37 Etapas necessárias das provas de reações cruzadas antes de transfusão*

Flebotomia/identificação do receptor	O flebotomista tem de identificar positivamente o receptor e a amostra de sangue do receptor • A solicitação para transfusão e a etiqueta da amostra de sangue do paciente precisam conter pelo menos 2 informações identificadoras independentes do paciente (p. ex., nome, número do hospital, data de nascimento) • O flebotomista tem de assinar a etiqueta de cada amostra e todas as requisições • O serviço de transfusão certifica-se de que a informação sobre identificação na requisição e na etiqueta da amostra está de acordo
Testes no receptor	Fazer a tipagem ABO e Rh da amostra de sangue do receptor – são necessários eritrócitos e soro para os testes Rever os registros prévios para comparação dos resultados atuais da tipagem e, também, para obter informação quanto à presença de anticorpos clinicamente importantes detectados anteriormente Testar soro ou plasma do receptor para detectar anticorpos de importância clínica • O método deve incluir incubação a 37°C com conversão para antiglobulina humana ou técnica equivalente validada
Testes no doador	Confirmar tipo ABO e Rh das unidades de eritrócitos do doador, conforme necessário • A confirmação do teste para grupo ABO é necessária em todas as unidades (não é preciso soro para teste) • A confirmação do tipo Rh é necessária apenas nas unidades etiquetadas como sendo de Rh negativo
Prova de reações cruzadas	Selecionar componentes eritrocitários ABO e Rh compatíveis para transfusão Fazer prova de reação cruzada sorológica ou eletrônica dos componetes eritrocitários • É necessário a prova de reação cruzada total com antiglobulina se a triagem atual de anticorpo for positiva ou o paciente tiver antecedentes conhecidos de anticorpos de importância clínica
Rotulagem	Etiquetar todos os produtos celulares ou outros componentes com a informação sobre identificação do receptor • A etiqueta precisa conter pelo menos 2 aspectos identificadores independentes do paciente, o número da unidade doadora e os resultados das provas de reações cruzadas, se tiverem sido realizadas

* Critérios de Brecher (2002) – ver aspectos específicos em AABB Standards (Silva, 2004).

técnicos: formação de pequenos coágulos de fibrina durante os testes podem aprisionar eritrócitos e lembrar aglutinação; a fibrina também pode aprisionar soro e causar neutralização da AHG reagente se não for previamente removida por lavagem. A formação de *rouleaux* pode ser facilitada no plasma se os níveis de fibrinogênio forem altos. Caso se utilize soro, as amostras de sangue devem ser colhidas em tubos lisos siliconizados, sem gel separador de soro.

Aspecto

Alguns laboratórios de bancos de sangue têm normas para rejeitar amostras de sangue visivelmente hemolisado como inaceitáveis para os testes pré-transfusão, a menos que não haja outra opção. O uso de soro já hemolisado pode mascarar a hemólise induzida por anticorpo que normalmente seria detectável nos testes de triagem para anticorpo. A lipemia pode, em casos raros, dificultar a avaliação dos resultados da hemaglutinação, embora geralmente não seja motivo para rejeitar uma amostra pré-transfusão.

Idade da amostra

De acordo com os AABB Standards, se uma paciente esteve grávida ou tenha recebido uma transfusão nos últimos 3 meses, ou se os dados a esse respeito forem incertos ou não estiverem disponíveis, todas as provas cruzadas e transfusões de hemácias de determinada amostra terão de ser feitas até 72 horas depois da colheita da amostra. A requisição de uma nova amostra antes da transfusão a cada 72 horas nesses indivíduos assegura que a amostra a ser testada seja razoavelmente representativa do estado imune atual do paciente.

Armazenamento da amostra

Os AABB Standards também exigem que todas as amostras antes de transfusão sejam armazenadas a 1 – 6°C por pelo menos 7 dias após o término dos testes, junto com pelo menos um segmento representativo de cada uma das unidades de doadores submetidas a provas cruzadas com o sangue do receptor. O objetivo disso é assegurar a possibilidade de repetir os testes ou realizar outros depois com o sangue do doador ou do paciente, se o paciente tiver uma reação hemolítica tardia ou outro efeito adverso em decorrência da transfusão.

Documentação e manutenção do registro

Considerações gerais

Todos os bancos de sangue precisam ter um manual ou um sistema informatizado para registro que contenha os resultados ou o desfecho de todos os testes e as atividades executados no banco de sangue. Os registros têm de ser completos e recuperáveis em um tempo razoável. A transferência ou disseminação da informação a partir de quaisquer registros sobre os pacientes precisa estar de acordo com as normas da instituição relativas à confidencialidade e conforme as leis e os regulamentos federais e estaduais. Os registros devem ser preservados por períodos diferentes, dependendo da legislação em vigor e dos critérios dos órgãos credenciadores.

A documentação de todo o processo da prova de reação cruzada tem de incluir registros da identificação do paciente, da autorização para entrada na instituição, das necessidades individuais especiais de transfusão, da data e do horário do teste, dos resultados dos testes do paciente, da identidade do técnico que fez os testes e do componente sanguíneo em questão. Um sistema informatizado é o ideal para captar essa informação e viabilizar a recuperação rápida e fácil desses dados sobre cada paciente, inclusive o registro de tipo ABO e Rh, problemas de anticorpo, histórico de transfusões e necessidade de tipos especiais de hemoderivados. A partir de uma perspectiva mais global, a recuperação informatizada dos dados de grupos de pacientes também facilita bastante a monitoração da utilização do hemoderivado na instituição, incluindo a solicitação e as práticas de transfusão dos médicos.

Os resultados e a interpretação de todos os testes dos pacientes devem ser documentados nos formulários adequados, preenchidos à mão ou feitos no computador, imediatamente após a observação dos resultados. Em um sistema de registro manuscrito, todos os formulários devem ser preenchidos a tinta, não a lápis. Se os resultados tiverem de ser modificados nesses formulários, os resultados originais não devem cancelados, devendo ser riscados e substituídos pelo técnico no espaço logo acima. Uma lista constantemente atualizada das iniciais usadas por todos que trabalham no banco de sangue deve fazer parte dos registros permanentes da instituição. Alterações nos resultados de um sistema informatizado também precisam ser completamente documentadas como parte de um registro informatizado com a capacidade de rastrear tanto os dados originais como os corrigidos (Brechet, 2002).

Verificação de registros prévios

Registros manuais ou informatizados precisam ser verificados quanto aos resultados prévios de determinado paciente quando se recebe uma amostra. Os resultados dos testes para ABO e Rh na amostra atual devem ser comparados com os prévios, se disponíveis, para confirmar se a amostra foi colhida do indivíduo correto. A informação de quaisquer anticorpos inesperados identificados previamente também é de extrema importância, pois o título de um anticorpo pode cair para níveis que podem não ser detectados por procedimentos de triagem de anticorpo. Caso um anticorpo de significado clínico tenha sido identificado anteriormente, o paciente precisa receber eritrócitos negativos para o antígeno correspondente (negativo para o antígeno), mesmo que os testes atuais para a detecção do anticorpo sejam negativos.

Grupo ABO

Antissoros e eritrócitos reagentes para o grupo ABO são bem padronizados e disponíveis com facilidade no comércio. A maioria dos laboratórios de bancos de sangue utiliza antissoros reagentes monoclonais derivados de anticorpos produzidos por linhagens celulares de hibridoma, embora alguns (Shulman, 2001) ainda usem reagentes de tipagem ABO policlonais elaborados a partir de conjuntos de anticorpos humanos de alta titulação. O grupo ABO consiste em 2 partes comumente referidas como grupo eritrocitário (tipo anterógrado) e grupo sérico (tipo retrógrado). No primeiro grupo, testa-se uma suspensão de eritrócitos a 3 – 5% com preparado comercial de anti-A e anti-B para teste de antígenos na membrana eritrocitária. No grupo inverso, testa-se soro do paciente ou doador contra células reagentes do fenótipo conhecido A_1 e B para verificar se há os anticorpos ABO esperados no soro do paciente (ver Tab. 34.8). O grupo ABO é levado para temperatura ambiente com apenas uma etapa de centrifugação imediata sendo necessária para promover uma reação de aglutinação macroscópica.

Grupo ABO de doadores

A coleta de sangue de todos os tipos de doadores na instituição é indispensável para tipagem ABO por métodos séricos. O serviço de transfusão, ou outro laboratório responsável pela prova de reação cruzada, precisa confirmar o grupo ABO de todas as unidades de eritrócitos e sangue total recebidas. A separação dos eritrócitos de acordo com o grupo é feita a partir de um segmento integral de cada unidade doadora. No caso de unidades rotuladas como sendo do grupo O, pode-se usar somente o anti-A,B para o teste confirmatório do doador, pois apenas os eritrócitos do grupo O não hemaglutinam com anti-A,B.

Tipagem ABO de receptores

Cada amostra de sangue de pacientes antes da transfusão também precisa ser testada quanto ao grupo ABO. São necessários tanto eritrócitos quanto soro para os testes iniciais de classificação ABO de todas as amostras de pacientes, e os resultados devem estar coerentes entre si (Tab. 34.8) antes de serem relatados e o sangue ser transfundido.

Alguns bancos de sangue rotineiramente incluem o uso de anti-A,B no procedimento de agrupar eritrócitos. No entanto, esse reagente em geral não fornece qualquer informação adicional, exceto a detecção dos subgrupos A_x ou B_x. O anti-A,B também é usado frequentemente como um reagente conveniente para repetir testes de modo a confirmar a tipagem inicial de um paciente do grupo O.

Discrepâncias na tipagem ABO

A interpretação dos resultados da tipagem ABO em geral é direta. Quando os resultados em eritrócitos e no soro não são concordantes, repetem-se os testes para excluir qualquer erro técnico ou de escrita. Se os resultados continuarem inalterados, há uma discrepância que pode ser decorrente de problemas com o soro ou as células do paciente.

Tabela 34.38 Algumas causas de discrepâncias no grupo ABO

	Problemas com os eritrócitos testados	Problemas com o soro testado
Reações positivas inesperadas	Antígeno B adquirido associado a cânceres gástricos e do cólon, obstruções intestinais	Presença de proteínas formadoras de *rouleaux*, p. ex., expansores plasmáticos, gamaglobulinas monoclonais
	Células do cordão umbilical contaminadas com geleia de Wharton	Aloanticorpo presente à temperatura ambiente, p. ex., anti-M, N, P_1
	Autoaglutinação causada por autoanticorpos frios	Aglutinina fria presente, p. ex., anti-I, IH
	Células maciçamente cobertas com autoanticorpo quente	Anticorpos ABO adquiridos passivamente
	Poliaglutinação	Subgrupo de A com anti-A_1 no soro
	Anticorpo acriflavina (contra o corante usado no anti-B)	*cis*-AB com anti-B fraco no soro
	Quimerismo genético*	
	Transplantes de medula óssea*	
	Administração de eritrócitos fora do grupo ABO*	
Reações negativas inesperadas	Subgrupos A ou B	Idade do paciente (idoso, recém-nascido)
	Depressão de antígeno causado por leucemia ou outras doenças	Hipogamaglobulinemia
	Altos níveis de substituições sanguíneas solúveis associadas a cisto ovariano pseudomucinoso	Imunossupressão
		Quimerismo genético

* Procurar por aparência de campo misto de reações com antissoros reagentes.

Em contraste com a tipagem dos eritrócitos, em que as reações geralmente são fortes e perceptíveis, no soro a força delas pode variar muito. Pode ser necessário um período estendido de incubação à temperatura ambiente ou a 4°C para demonstrar a presença de aglutininas ABO séricas fracas (Tab. 34.10). Células do grupo O também podem ser usadas nos testes com soro para confirmar a presença suspeita de um aloanticorpo inesperado reativo à temperatura ambiente. Caso se suspeite de anti-A_1 reativo no soro de um fenótipo do subgrupo A, podem ser testadas células A_2 e O no soro para confimar a presença de anti-A_1.

O reagente para tipagem anti-A_1 pode ser útil nos testes eritrocitários para confirmar um fenótipo suspeito do subgrupo A (Tab. 34.10). Para confirmar e classificar subgrupos ABO fracos e fenótipos ABO raros, podem ser necessárias técnicas especiais, como adsorção-eluição, estudos secretores ou testes para as transferases séricas A, B ou H. A observação de reações de campo mistas fracas (menor população de aglutinados) também pode ser informativa.

Na Tabela 34.38 estão listadas algumas das muitas razões para discrepâncias ABO. Brecher (2002) e Harmening (1999) reviram uma descrição mais completa desses problemas e os protocolos de resolução. Se houver necessidade de uma transfusão de emergência e ocorrer uma discrepância ABO que não pode ser resolvida a tempo, é possível transfundir concentrado de hemácias do grupo O, plasma fresco congelado AB ou ambos. Entretanto, é importante certificar-se de que foi obtida amostra de sangue do paciente em volume suficiente antes da transfusão, para que o trabalho possa prosseguir. Em alguns casos, pode ser necessário enviar uma amostra pré-transfusão para um laboratório de referência, para avaliação adicional.

Tipagem Rh

Dispõe-se de vários tipos de antissoro para a detecção do antígeno RhD. Atualmente, o reagente para tipagem anti-D mais comumente utilizado em tubos de ensaio é uma mistura monoclonal/policlonal pobre em proteína e reativa em solução fisiológica que contém anti-D IgM monoclonal murino para aglutinação direta imediata de eritrócitos D-positivos e IgG anti-D policlonal humano necessário para teste D fraco (antigamente denominado D^u). Também se dispõe de uma mistura reagente de IgM monoclonal e IgG monoclonal anti-D de linhagens humanas/murinas de hetero-hibridoma satisfatórias para teste direto e subsequente de D fraco com eritrócitos.

Antes da disponibilidade de reagentes mistos monoclonais, a maior parte da tipagem D rotineira era realizada usando-se tubo anti-D rápido feito com um conjunto de soros humanos e contendo aditivos proteicos de alto peso molecular que aumentavam a capacidade de aglutinação direta do IgG anti-D humano. Todavia, em virtude da alta concentração de proteína nesses reagentes rápidos em tubo, é possível observar agregação falso-positiva espontânea em pacientes com proteínas séricas anormais ou cujos eritrócitos estejam altamente sensibilizados com autoanticorpo. Como controle, os fabricantes de soro rico em proteína para tipagem Rh recomendam usar um controle diluente paralelo que não contenha anticorpo, para detectar reações falso-positivas. Quanto aos reagentes para tipagem Rh reativos à solução fisiológica atualmente em uso, uma reação concomitante negativa com anti-A ou anti-B é controle negativo suficiente. No entanto, pacientes que parecem ser AB Rh-positivos devem ser submetidos a uma nova tipagem para D, simultaneamente com anti-D e um reagente de controle inerte, como albumina bovina de 6 a 8%.

A tipagem direta para o antígeno D é feita à temperatura ambiente pela técnica rápida imediata, após misturar-se uma gota de suspensão de 3 a 5% de eritrócitos lavados em solução fisiológica e uma gota de anti-D comercial. Um teste paralelo com diluente de controle negativo é sempre incluído para o teste do D fraco.

Tipagem Rh de doadores

Conforme exigido pelos AABB Standards, todas as unidades de sangue total de doadores são testadas para o antígeno D por métodos de aglutinação direta em amostras colhidas na instituição. Faz-se um teste para o fenótipo D fraco em todas as unidades de sangue de doadores com resultado negativo pelos testes rotineiros de tipagem D. Se um teste D rotineiro ou D fraco for positivo, deve constar na etiqueta da unidade que ela é Rh-positiva. O serviço de transfusão precisa reconfirmar o tipo D de todas as unidades de eritrócitos rotuladas como Rh-negativas, testando os eritrócitos de um segmento integral aderido por um método anti-D de aglutinação direta. Os AABB Standards não exigem que o serviço de transfusão repita o teste de unidades de doadores para o D fraco.

Tipagem Rh de receptores

Cada amostra de sangue de receptores antes da transfusão precisa ser testada para o antígeno D por tipagem direta. O teste indireto para o D fraco em receptores não é necessário: os pacientes que não apresentam aglutinação após o teste de aglutinação direta são tipados como Rh-negativos. Alguns bancos de sangue fazem o teste do D fraco em amostras pré-natais, porém dados mais recentes mostram que muitos doadores tipados como D fracos têm um fenótipo D parcial e correm risco de aloimunização RhD. A tipagem de eritrócitos para os antígenos C, c, E e e do sistema Rh não é feita rotineiramente, mas pode ser realizada para determinar o genótipo Rh mais provável na avaliação de problemas com anticorpo e em estudos parentais.

Detecção de anticorpo

Todas as amostras submetidas a testes antes da transfusão precisam ser triadas quanto a anticorpos de significado clínico no soro receptor (triagem de anticorpo). Como os anticorpos de significado clínico costumam reagir à temperatura corporal, a maioria dos laboratórios omite completamente a incubação à temperatura ambiente. Os AABB Standards requerem que o método usado incorpore incubação à temperatura fisiológica ou corpórea (37°C), seguida pela conversão para o IAT. Caso seja usado outro método que não o IAT, será preciso docu-

Lista de triagem das células principais

FRASCO		Rh								MNSs				P	Lewis		Lutheran		Kell				Duffy		Kidd		Ligado ao sexo
	Doador	D	C	E	c	e	f	C^w	V	M	N	S	s	P_1	Le^a	Le^b	Lu^a	Lu^b	K	k	Kp^a	Js^a	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	Xg^a
I	R_1R_1	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+
II	R_2R_2	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+

Figura 34.21 O "antigrama" que acompanha cada lote de reagente para triagem de eritrócitos.

mentar e validar a sensibilidade equivalente na capacidade de detectar anticorpos clinicamente significativos (Brecher, 2002). Hoje há uma variedade de protocolos diferentes de triagem de anticorpo, com a utilização de tecnologias diferentes. Atualmente, nenhuma das tecnologias disponíveis é capaz de detectar todos os anticorpos eritrocitários.

Eritrócitos reativos

Os reagentes eritrocitários ou células de triagem usados para a detecção e a identificação de anticorpos no soro de um paciente em geral são obtidos de fabricantes comerciais. Os AABB Standards exigem que a detecção de anticorpo em receptores seja realizada com células reagentes e não de concentrados de eritrócitos. Tipicamente, a triagem de anticorpo nas células consiste em 2 a 3 células reagentes do grupo O secretadas de diferentes doadores de fenótipo conhecido. São preparados conjuntos de células, de modo que todos os antígenos para os anticorpos mais comumente encontrados nos grupos sanguíneos sejam representados e incluam os antígenos C, c, E, e, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, K, k, Le^a, Le^b, P_1, M, N, S e s. Um "antigrama" que lista o grupo sanguíneo antigênico de cada célula (Fig. 34.21) acompanha cada lote de eritrócitos para triagem. Quando possível, são usadas células homozigotas para antígenos selecionados, o que aumenta a probabilidade de detectar anticorpos fracos ou dosados. Um painel de triagem de 3 células assegura a homozigosidade para mais antígenos, como Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, S e s, contra os quais os anticorpos correspondentes são propensos a exibir dosagem, porém isso é mais dispendioso. Vários estudos (Cordle, 1990; Hoeltge, 1995; Judd, 1997) mostraram que o uso de 3 amostras de sangue para a detecção de anticorpo raramente revela um anticorpo de significado clínico não detectado por um procedimento de triagem de 2 células.

Protocolos de detecção de anticorpo

Testes em tubo de ensaio

Nos métodos convencionais de teste em tubo de ensaio, um volume de células reagentes de triagem e 2 volumes de soro do paciente (dando uma média de proporção volume/volume de soro para células de aproximadamente 50:1) são incubados a 37°C com um meio facilitador pelo tempo especificado pelo fabricante, centrifugados e examinados em busca de hemólise ou aglutinação. As células de triagem são, então, lavadas 3 ou 4 vezes com solução fisiológica, e a AHG reagente é acrescentada para detecção final de aloanticorpos IgG.

Como diferentes anticorpos de grupos sanguíneos comumente exibem padrões de reação pela técnica do IAT (Tab. 34.7), o exame atento em diferentes fases do teste nesse protocolo convencional pode trazer informação útil na avaliação de casos em que a triagem é positiva:

- A aglutinação direta das células em albumina ou soluções de força iônica baixa (SFIB ou LISS, *low ionic strenght solutions*) após incubação a 37°C frequentemente indica a presença de um anticorpo Rh.
- Os anticorpos IgM que têm uma faixa térmica, como o anti-I, o anti-P_1 e o Lewis, podem mostrar reações em albumina ou SFIB, porém essas reações em geral se tornam muito mais fracas após conversão para o IAT.
- Com raras exceções, a hemólise *in vitro* de células reagentes após incubação a 37°C indica a presença de anticorpos Lewis, Kidd, Ii, P, PP_1P^k ou Vel.
- A vasta maioria dos anticorpos IgG, com exceção do Rh, não será detectada antes da lavagem e da conversão para IAT.

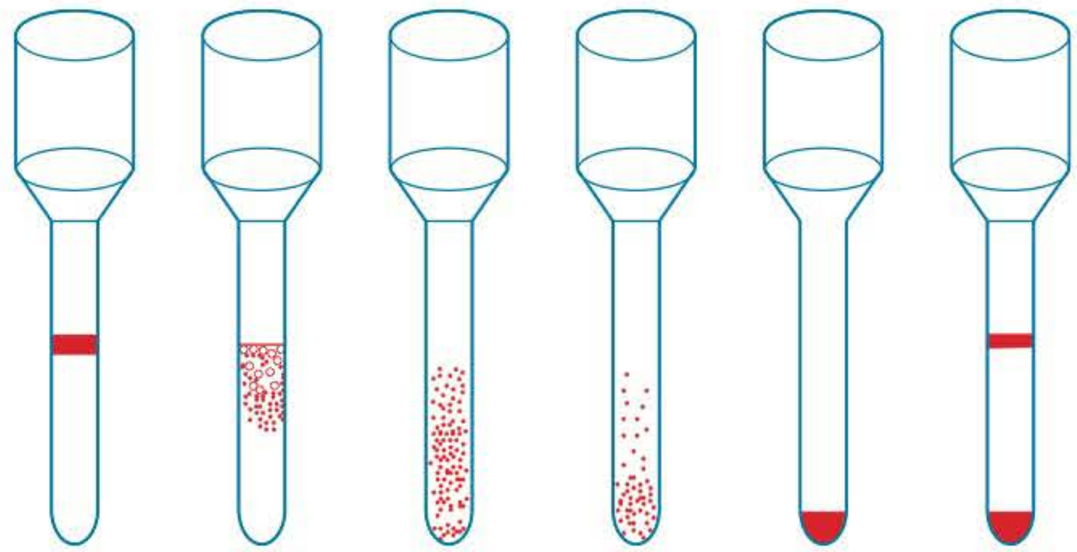


Figura 34.22 Aspecto dos padrões de reações e gradação para a tecnologia de aglutinação em gel ou coluna.

- A reação das diferentes células de triagem em múltiplas fases ou com forças variáveis normalmente indica que mais de um anticorpo está presente.

Tecnologias de aglutinação em coluna

Uma metodologia alternativa para detecção de aloanticorpo cuja utilização vem aumentando em muitos serviços de transfusão é a tecnologia da aglutinação em coluna, descrita pela primeira vez por Lapierre et al. em 1990. Essa tecnologia utiliza a migração diferencial de eritrócitos que se aglutinam em um pequeno tubo contendo um dextrano acrilamida, com exclusão por tamanho da coluna de gel. Com o ID-Microtyping System (ID-MTS) disponível comercialmente nos EUA (Ortho-Clinical Diagnostics; Raritan, NJ), são realizados testes de antiglobulina em gel em um cartão de plástico com aproximadamente 5 – 7 cm de dimensão que mantém 6 microtubos. Incorpora-se anti-IgG na coluna matriz de gel, e os volumes de eritrócitos de triagem reagentes são medidos com precisão (suspensão a 0,8% em SFIB), incubando-se plasma a 37°C na câmara de reação acima da coluna matriz. Com 6 microtubos por cartão, pode ser feita uma triagem de 2 células para 3 pacientes diferentes em um cartão de gel.

Após incubação, os cartões de plástico são centrifugados em condições cuidadosamente controladas. Os eritrócitos cobertos com IgG aglutinam-se à medida que entram em contato com a AHG reagente na matriz e ficam aprisionados. A força e o tamanho da reação determinam a migração dos aglutinados, variando dos maiores (4+) aglutinados no alto e migração dos aglutinados mais fracos e menores para a coluna de gel (Fig. 34.22). Eritrócitos não aglutinados passam facilmente através da coluna e são encontrados como um *pellet* no fundo. Como o plasma ou o soro permanece na câmara de reação acima da matriz, são desnecessárias etapas repetidas de lavagem e acréscimo de células de controle para verificar a atividade da AHG reagente. O ponto final das reações de hemaglutinação é muito estável, permitindo que os cartões sejam mantidos para revisão de reações questionáveis por um supervisor. É possível fazer fotocópias ou fotografias digitalizadas dos cartões e arquivá-los como dados laboratoriais permanentes.

Além da detecção de anticorpo, os cartões de gel anti-IgG podem ser usados para a identificação de anticorpo e provas de reação cruzada. Para o teste da antiglubulina direto, dispõe-se de cartões com anti-IgG ou anti-IgG poliespecífica + C3d. Também há cartões para tipagem

ABO/Rh com colunas de gel que incorporam tipagem de eritrócitos para anti-A, anti-B e anti-D, mais 2 colunas de gel neutro para o ABO sérico, em que suspensões a 0,8% de células reagentes A_1 e B são misturadas com soro do paciente.

Durante o desenvolvimento da tecnologia da aglutinação em coluna, ela provou ter sensibilidade equivalente, se não maior, à do teste em tubo SFIB padrão para a detecção de anticorpo (Lapierre, 1990). Na prática, o teste em gel realmente tem várias outras vantagens com relação aos procedimentos convencionais em tubo. Ante a atual diminuição de pessoal e a necessidade de técnicos de laboratório generalistas e comumente menos experientes nos bancos de sangue, durante anos houve uma procura por testes sorológicos padronizados com um ponto final menos subjetivo que a ressuspensão manual e a leitura da aglutinação usadas nos testes convencionais com tubos. A tecnologia da aglutinação em coluna contribuiu bastante para a padronização do IAT com aspectos que incluem a preparação precisa de suspensões de eritrócitos, a medida exata dos volumes de reagente liberados e um ponto final de aglutinação confiável e estável. A eliminação de etapas de lavagem e leituras manuais macroscópicas e/ou microscópicas repetitivas e o acréscimo de células de controle cobertas por anticorpo permitem que os técnicos utilizem seu tempo mais efetivamente ao realizar múltiplas tarefas. Além disso, os testes podem ser automatizados (ProVue™, Ortho Diagnostics, NJ), permitindo fazê-los em grande quantidade, com interpretação e validação eletrônicas e a documentação digital dos resultados.

Em um estudo retrospectivo de 12 meses realizado para comparar os primeiros 6 meses antes e após a implementação do ID-MTS no laboratório de um banco de sangue que antes usava o IAT convencional com SFIB, a repetição dos testes de triagem de anticorpo decorrente de resultados ambíguos na interpretação e/ou à falha de células de controle teve queda de uma taxa quase 3% para pouco mais de 0,5% com o teste em gel (Armstrong, dados não publicados). O estudo também demonstrou uma redução acentuada usando o método do gel na detecção e na avaliação de anticorpos frios clinicamente insignificantes. Ao rever a distribuição total das especificidades de anticorpo identificadas nos 6 meses antes e após a implementação do gel, os anticorpos clinicamente insignificantes (anti-Le^a, anti-Le^b, anti-P_1, anti-Sd^a, anti-I/HI) foram responsáveis por 56% de todos os testes com anticorpo com a utilização do tubo SFIB padrão, ao passo que, nos 6 meses após a implementação do gel, a percentagem caiu para 16%. Um último achado desse estudo foi o de que a eliminação das muitas manipulações inerentes nos testes convencionais com tubos com SFIB resultou em uma considerável economia de tempo. Embora não tenha havido um processo formal de análise, com estudos sobre o tipo e a triagem, o teste completo de compatibilidade com antiglobulina e a identificação de anticorpo indicaram um impacto acentuado sobre o fluxo de trabalho, que teria ainda maior significado se forem realizados lotes de testes.

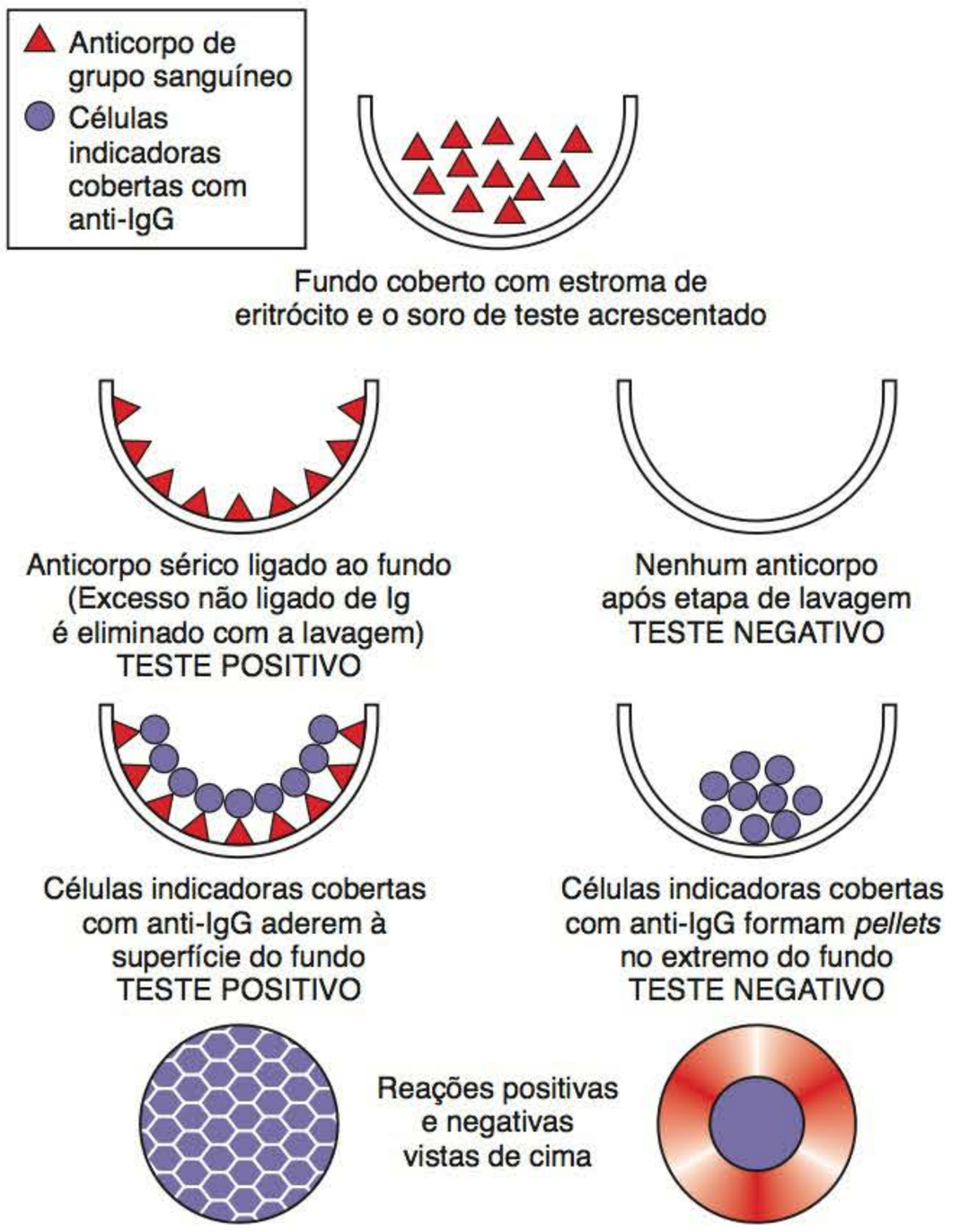


Figura 34.23 Princípio da tecnologia de aderência em fase sólida com o aspecto das reações positivas e negativas.

Testes de aderência em fase sólida

Mais uma alternativa aos testes em tubo para a detecção de aloanticorpo consiste nos sistemas de teste indireto de adesão em fase sólida. Nessa aplicação, eritrócitos reagentes são ligados ao fundo de microplacas. Soro e reagente facilitados são acrescentados e incubados a 37°C, permitindo que o aloanticorpo ligue-se à fase sólida. Após lavagem para remover globulinas séricas não ligadas, eritrócitos indicadores cobertos com anti-IgG humana são adicionados e as placas são centrifugadas. Se houver uma reação entre as células reagentes e o aloanticorpo sérico, as células indicadoras cobertas com antiglobulina irão ligar-se e cobrir a superfície da placa, enquanto um botão discreto no fundo da placa indica uma reação negativa (Fig. 34.23). As placas podem ser lidas manualmente ou com um dispositivo de leitura automatizado. Conforme na aglutinação em coluna, as reações positivas são muito estáveis, de modo que a placa pode ser coberta, armazenada a 2 – 8°C e lida ou relida até 2 dias depois.

Sistemas de teste em fase sólida também estão disponíveis para aplicações como tipagem ABO e Rh de eritrócitos. Para esses testes, microplacas são cobertas com os anticorpos apropriados. As células de teste são acrescentadas e incubadas, e as placas são então centrifugadas. No caso de reações positivas, os eritrócitos aderem a toda a superfície do fundo da placa coberta por anticorpo, enquanto reações negativas resultam em um botão bem compactado no fundo de placa. Existe instrumental para testes automatizados e semiautomatizados que empregam a tecnologia de fase sólida.

Identificação de anticorpo

Quando são detectados aloanticorpos eritrocitários no soro de um receptor prospectivo de sangue, conforme indicado por uma triagem positiva para anticorpo, é preciso identificar o anticorpo, para que sangue negativo para o antígeno possa ser providenciado para a transfusão, se necessária. A identificação do anticorpo é feita primeiro testando-se um painel estendido de eritrócitos reagentes de fenótipo conhecido contra o soro do receptor pela técnica do IAT. Um autocontrole é sempre incluído como parte do teste, para ajudar a diferenciar se há um autoanticorpo, um aloanticorpo ou ambos. O imuno-hematologista então compara o padrão de reações séricas positivas e negativas com o padrão do antígeno do fenótipo em um formulário impresso que acompanha cada painel, em busca de um correspondente.

Interpretação dos resultados da identificação de anticorpo

A Tabela 34.39 mostra um exemplo bastante simplificado de como comparar o padrão de reatividade sérica com o fenótipo do antígeno

Tabela 34.39 Exemplo de painel simples

Células em um painel	Composição antigênica conhecida					Soro de teste	
	D	C	c	E	e	Y	Z
Nº 1	+	+	+	0	0	+	0
Nº 2	+	+	0	+	+	+	+
Nº 3	+	0	+	0	+	+	0
Nº 4	0	0	+	0	+	0	0
Nº 5	0	0	+	0	+	0	0
Nº 6	0	+	0	+	+	0	+

em cada painel eritrocitário até encontrar correspondência. O soro Y reage com células de números 1 a 3, que são positivas para o antígeno D, mas não reage com as células de números 4 a 6, que são negativas para o antígeno D; assim, o padrão de reações séricas positivas e negativas se equipara ao padrão de fenótipo para o antígeno D, e, dessa forma, o soro Y parece conter anti-D. De maneira similar, o padrão de reatividade do soro Z se equipara ao padrão do fenótipo para o antígeno E, e, portanto, o soro Z parece conter anti-E. No entanto, antes de estabelecer tal identificação de forma conclusiva, é preciso avaliar a possibilidade de que o soro Z esteja reagindo por coincidência com outro antígeno que não o E, presente nas 2 células E-positivas e ausente das 4 células E-negativas, levando a uma conclusão errônea. A mesma possibilidade precisa ser considerada para o provável anti-D no soro Y. Portanto, ao identificar anticorpos, é preciso assegurar-se de que foi testado um número suficiente de células de composição antigênica diferente para se identificar de forma definitiva um único anticorpo ou uma combinação de anticorpos em determinado soro.

O método exato de Fisher tem sido empregado para calcular estatisticamente a probabilidade de que um único anticorpo tenha sido identificado corretamente dentro de um intervalo de confiança de 95% (i. e., a probabilidade de que seriam obtidos os mesmos resultados por chance aleatória por causa de um anticorpo diferente é de 1 em 20). Tal método compara o número de resultados positivos e negativos com o de células testadas que expressam ou não possuem o antígeno correspondente e com o número total de células testadas (Race, 1975).

A Tabela 34.40 lista os valores de probabilidade calculados pelo método exato de Fisher que são alcançados com combinações diferentes de células positivas e negativas no número total testado. Pode-se observar que um valor de *p* de 0,05 pode ser alcançado com um mínimo de 6 células, sendo 3 positivas para um antígeno que reage com o anticorpo e 3 negativas para o antígeno que não reage com o anticorpo. A maioria dos fabricantes fornece painéis de células reagentes com 10 a 11 células, com pelo menos uma das combinações de células positivas e negativas da Tabela 34.40 para a maioria dos antígenos para os quais comumente são encontrados anticorpos inesperados. Em consequência, a maioria das identificações de um único anticorpo é válida em um valor de *p* consideravelmente menor que 0,05, exceto nos casos em que há anticorpos para antígenos de baixa ou alta frequência ou quando há múltiplos anticorpos no mesmo soro. Em tais situações, pode ser preciso testar mais células de outros painéis para se conseguir fazer a identificação dentro do intervalo de confiança de 95%.

Tabela 34.40 Valores de probabilidade com base no método extenso de Fisher

Número total de células testadas	Células positivas para antígeno que reagem com anticorpo	Células negativas para antígeno que não reagem com anticorpo	Valor *p*
5	3	2	0,100
6	4	2	0,067
6	3	3	0,050
7	5	2	0,048
7	4	3	0,029
8	6	2	0,036
8	5	3	0,018
8	4	4	0,014
9	7	2	0,028
9	6	3	0,012
10	8	2	0,022
10	7	3	0,008
10	6	4	0,005
10	5	5	0,004

A Figura 34.24 mostra os resultados de um painel testado com soro de paciente por um método convencional de teste da antiglobulina em tubo e examinado quanto à aglutinação após a fase de incubação a 37°C e, por fim, após o acréscimo de antiglobulina humana. Ao observar rapidamente todo o painel de resultados, um imuno-hematologista verá que há aglutinação com células diferentes após centrifugação em ambas as fases do teste, indicando a provável presença de múltiplos anticorpos. Segue-se um esboço da estratégia usada para avaliar os resultados da identificação de anticorpo.

1. O autocontrole é negativo, indicando que a reatividade sérica deve-se mais provavelmente a aloanticorpos. No entanto, se o

Nome *John Doe*

Número do hospital *0001234.56*

		Rh								MNSs				P	Lewis		Lutheran		Kell*				Duffy		Kidd			Frasco			
Fenótipo Rh		D	C	E	c	e	f	C^w	V	M	N	S	s	P_1	Le^a	Le^b	Lu^a	Lu^b	K	k	Kp^a	Js^a	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	Xg^a		37C	AHG	CC
1	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	1	0	1	
2	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+	2	0	3	
3	r′r	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	3	0	0	2
4	r″r	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	4	1	2	
5	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	5	0	0	2
6	R_or	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	6	0	0	2
7	R_1R_1	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	7	0	0	2
8	R_1R_1	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	8	0	3	
9	$R_1R_1^w$	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	9	0	1	
10	R_2R_2	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	10	1	2	
11	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	0	11	0	1	
																												Auto	0	0	2

AHG = antiglobulina humana
CC = células de controle de Coombs
* A menos que especificado de outra forma, entende-se que todas as células são positivas para os antígenos de alta frequência Kp^b e Js^b

Figura 34.24 Painel típico mostrando um exemplo de resultados de identificação de anticorpo.

autocontrole fosse positivo, seria importante fazer o DAT para confirmar ou excluir sensibilização prévia *in vivo* das células do paciente. O DAT deve ser examinado com cuidado à procura do aparecimento de aglutinação de campo misto. Em pacientes que tenham recebido transfusões recentes, a adesão do aloanticorpo a uma população menor de eritrócitos transfundidos do doador causa a clássica aglutinação de campo misto e frequentemente é o primeiro sinal de uma resposta imune em desenvolvimento, que pode resultar em reação transfusional hemolítica tardia.

2. A primeira etapa cumprida por muitos imuno-hematologistas ao avaliar os resultados da identificação de anticorpo é *excluir* aqueles anticorpos que não apresentaram reação no soro com uma célula que tinha o antígeno correspondente. Embora não seja necessário, sempre que possível é melhor excluir anticorpos com base na ausência de reatividade com células que demonstrem a forma homozigota de um antígeno, bem como não excluir erroneamente anticorpos fracamente reativos que exibem dosagem. Ao usar a regra da homozigose para excluir anticorpos, as células de nos 3, 5, 6 e 7 não são reativas com o soro e podem ser usadas para excluir anti-D, anti-C, anti-c, anti-e, anti-M, anti-N, anti-s, anti-P_1, anti-Lu^b, anti-k, anti-Fy^b, anti-Jk^a e anti-Jk^b. A expressão dos antígenos f, V, Le^a, Le^b e Xg^a não pode ser caracterizada como homozigota por causa de seus mecanismos de hereditariedade, porém, como pelo menos 1 das 4 células citadas é positiva para esse antígeno e o soro não reage com elas, os anticorpos correspondentes podem ser desconsiderados.
3. Ante as reações observadas em fases diferentes e demonstrando forças de aglutinação diferentes, é provável que pelo menos 2 anticorpos estejam presentes no soro:
   - As células de nos 4 e 10 mostram aglutinação direta na fase a 37°C, seguida por aglutinação mais forte na fase da AHG, o que é bem típico de anticorpos do sistema Rh. São as 2 únicas células no painel positivas para o antígeno E, que não foi excluído. Portanto, é provável que o anti-E seja um dos anticorpos envolvidos.
   - As células de nos 2 e 8 exibem aglutinação muito forte apenas na fase da AHG. Ao examinar os antígenos no topo do painel que não foram excluídos, vê-se o fenótipo das células do painel para o antígeno K com reatividade sérica dessas 2 células. Assim, é provável que o anti-K seja o segundo anticorpo envolvido.
   - As reações séricas restantes com as células de nos 1, 9 e 11 não podem ser explicadas por anti-E nem anti-K, mas poderiam ser explicadas pelo anti-Fy^a, porque todas essas 3 células são positivas para o antígeno Fy^a e, portanto, ele não pode ser excluído.
4. O anti-S deve ser excluído para teste com outra célula positiva no estado homozigoto para o antígeno S que, ao mesmo tempo, é negativa para os antígenos Fy^a, K e E.
5. Os anticorpos para antígenos de baixa frequência, como C^w, Lu^a, Kp^a e Js^a, podem ser excluídos pelo teste com células apropriadas, se disponíveis. Como alternativa, anticorpos para antígenos de baixa frequência podem não ser excluídos por muitos bancos de sangue; em vez disso, a prova de reação cruzada com antiglobulina seria empregada para detectar qualquer incompatibilidade potencial entre as células do doador e a presença teórica de um ou mais desses anticorpos no soro do paciente.
6. A exclusão de outros anticorpos às vezes também pode ser obtida fazendo-se a tipagem das células do paciente para antígenos selecionados. Isso é particularmente útil quando o soro de um paciente contém múltiplos anticorpos e as fontes disponíveis de células reagentes para o banco de sangue são limitadas. Se um dos anticorpos que precisa ser excluído em uma mistura de anticorpos é o anti-Jk^a, por exemplo, as células do paciente podem ser submetidas à tipagem para o antígeno Jk^b com antissoros específicos. Se o paciente expressar o antígeno Jk^b, a presença do aloanticorpo para o Jk^b pode ser eliminada de forma definitiva.
7. No painel da Figura 34.24, há pelo menos 3 células negativas para todos os 3 antígenos – Fy^a, K e E – que não reagem com o soro. Entretanto, para identificar de forma conclusiva todos os 3 anticorpos com intervalo de confiança de 95%, é preciso que haja também 3 células separadas positivas apenas para o antígeno Fy^a, 3 positivas apenas para o antígeno K e 3 positivas apenas para o antígeno E que não reajam com o soro. Portanto, o anti-Fy^a pode ser identificado com confiança; contudo, mais 2 células positivas para o antígeno K e mais 1 célula positiva para o antígeno E precisam ser testadas com o soro para identificar de forma conclusiva a presença de anti-K e anti-E.
8. Se a identificação de anticorpo estiver sendo feita pela primeira vez em determinado paciente, é uma prática comum também fazer a tipagem dos eritrócitos do paciente para os antígenos contra os quais ele tenha desenvolvido anticorpos, como uma confirmação da identificação realizada. Os eritrócitos do paciente não devem ter os antígenos correspondentes aos anticorpos presentes.

Prova de reação cruzada

Por muitos anos, antes da administração de sangue total ou componentes eritrocitários, era necessária uma prova de compatibilidade sorológica principal antes de uma transfusão de sangue total ou papa de hemácias. Tal protocolo requeria incubação a 37°C, seguida por conversão para IAT, como nos testes para detecção de anticorpo. Todavia, em 1984, essa exigência foi eliminada pelos AABB Standards, desde que (1) a triagem atual de anticorpo no paciente fosse completamente negativa e (2) não houvesse antecedentes de anticorpos clinicamente significativos. Atualmente, no caso de pacientes que satisfaçam esses critérios, apenas um procedimento destinado a detectar incompatibilidade ABO precisa ser realizado e consiste em um procedimento sorológico imediato ou uma prova de reação cruzada eletrônica, descrito em mais detalhes a seguir.

Teste sorológico de reação cruzada imediata

O teste sorológico para detectar incompatibilidade ABO comumente consiste em um protocolo imediato que emprega uma suspensão de solução fisiológica a 3 – 5% de eritrócitos do doador preparados a partir de um segmento integral obtido da unidade selecionada do doador. Em geral, as células são lavadas uma vez para se remover qualquer anticoagulante ou proteína plasmática que poderia interferir no teste. Mistura-se uma gota da suspensão de células do doador com o soro do receptor, centrifuga-se imediatamente e examina-se em busca de hemólise e/ou aglutinação. Esse procedimento ficou conhecido como teste de compatibilidade abreviada ou imediata.

Seu uso em contextos clínicos mostrou ser uma alternativa segura e custo-efetiva a prova de reação cruzada com antiglobulina (Cordle, 1990; Judd, 1988; Shulman, 1990), embora haja relatos de falha dessa técnica em detectar incompatibilidade ABO quando o receptor apresenta títulos baixos de anticorpos ou quando as células do doador pertencem a um subgrupo ABO fraco (Berry-Dortch, 1985; Shulman, 1987). Podem ocorrer raros resultados falso-negativos em consequência a um efeito prozona na incompatibilidade principal do Grupo O/Grupo A, em particular se houver atraso na centrifugação (Judd, 1988). O efeito prozona ou o atraso aparentemente permitem a fixação do complemento C1 nas membranas eritrocitárias, o que prejudica estericamente a hemaglutinação. A suspensão de células do doador em solução fisiológica com EDTA elimina esse problema, ao quelar o cálcio necessário para a formação do complexo com complemento C1. Além dos resultados falso-negativos, a prova de reação cruzada imediata também pode causar resultados falso-positivos pela formação de *rouleaux*, anticorpos frios reativos e fibrina, e todos podem resultar na demora de levar o sangue para transfusão. Em uma pesquisa sobre práticas de transfusão em todo o território americano, conduzida de janeiro de 1995 a janeiro de 1996 (Maffei, 1998), um pouco mais da metade dos 1.047 hospitais reportou utilizar os protocolos rotineiros da prova de reação cruzada pelo método imediato para pacientes sem anticorpos de importância clínica.

Prova de reação cruzada eletrônica

Em 1994, Butch et al. relataram pela primeira vez um padrão proposto para operar o procedimento que substituiria o teste sorológico de compatibilidade por uma "prova de reação cruzada eletrônica" ou informatizado, ou EXM. Durante algum tempo, ele foi defendido pelos que argumentavam que o teste sorológico imediato ocasionalmente iria falhar no seu propósito final de identificar incompatibilidades ABO entre um receptor e uma unidade de doador incompatível escolhida erroneamente para reação cruzada. Os proponentes da prova de reação cruzada eletrônica estabeleceram que a melhor

Tabela 34.41 Critérios para a implementação do teste eletrônico de compatibilidade*

Sistema de informática validado, para assegurar que apenas componentes eritrocitários ABO-compatíveis sejam selecionados para transfusão
Pelo menos 2 determinações do grupo ABO do receptor, uma delas feita com a amostra atual
Confirmação sorológica do tipo da unidade de sangue do doador a partir de um segmento adaptado integralmente
O sistema deve conter os seguintes dados:
Número da unidade doadora
Nome do componente
Tipo ABO/Rh do componente
Interpretação dos resultados dos testes confirmatórios do doador
2 aspectos únicos que identifiquem o receptor
Grupo ABO/tipo Rh do receptor
Resultados da triagem atual de anticorpo do receptor†
Existência de um método para verificar a entrada correta dos dados antes da liberação de componentes
O *software* contém alertas para o usuário quanto a discrepâncias entre a etiqueta da unidade do doador e os resultados dos testes confirmatórios, ou sobre incompatibilidades ABO entre a unidade do receptor e a do doador

* Critérios de Brecher (2002) – ver aspectos específicos em AABB Standards (Silva, 2004).

† O teste eletrônico de compatibilidade pode ser usado apenas se os testes atuais para a detecção de anticorpo no receptor forem negativos e não houver antecedentes conhecidos de anticorpos de importância clínica.

maneira de garantir compatibilidade é reduzir o fator erro humano, que, em primeiro lugar, permitiria que unidades erradas fossem cruzadas ao se designar a verificação final de compatibilidade ABO entre doador e receptor para um sistema informatizado (Judd, 1991). Isso também eliminaria a investigação demorada de reações sorológicas falso-positivas.

Similarmente ao uso da prova de reação cruzada imediata, o eletrônico pode ser empregado apenas para pacientes em que não tenham sido detectados anticorpos de importância clínica no momento nem que tenham antecedentes de aloanticorpos. O EXM é permitido desde que os critérios específicos de teste sejam preenchidos e a validação extensa do sistema de informação do banco de sangue tenha sido realizada atendendo-se aos AABB Standards atuais e às exigências da FDA, conforme delineadas em um documento interno da FDA de 1997 (Judd, 2002). A exigência da FDA de que as instituições que queiram implementar a EXM submetam uma solicitação para variância ao Code of Federal Regulations for Compatibility Testing (21CFR606.151; 2001a) foi eliminada. A Tabela 34.41 resume as exigências dos AABB Standards.

Os principais elementos necessários para a validação informatizada do EXM (Judd, 1998) incluem *hardware* atualizado, interfaces de instrumentação, verificações de registros históricos, algoritmos para a interpretação de reações, funções de prevenção e alertas para designação/liberação ABO e avaliação da competência da equipe. Como a segurança desse procedimento será apenas tão boa quanto a informação eletrônica que entra e é arquivada no sistema, o uso máximo de códigos de barra para identificar tanto doadores como pacientes deve ser implementado. Após extensa experiência com a prova de reação cruzada eletrônica na University of Michigan (EUA), Judd (1998) recomenda que a identificação dos pacientes com código de barras seja obrigatória, tanto no momento da coleta da amostra quanto antes da transfusão, e que as etiquetas das amostras obtidas antes da transfusão sejam feitas a partir do código de barras de identificação da pulseira do paciente.

Na pesquisa das práticas pré-transfusão nos EUA já citada (Maffei, 1998), só 1% dos 1.047 hospitais respondeu relatando que usava a prova de reação cruzada eletrônica. Fora dos EUA, Suécia, Dinamarca, Austrália e Hong Kong publicaram relatos sobre sua experiência com o procedimento (Chan, 1996; Cox, 1997; Säfwenberg, 1997).

Prova de reação cruzada com antiglobulina

Conforme mencionado previamente, se a triagem de anticorpo antes da transfusão detecta um anticorpo clinicamente significativo, ou uma verificação do prontuário do paciente indica que tais anticorpos foram detectados anteriormente, será preciso fazer uma prova de reação cruzada principal entre o soro do receptor e os eritrócitos do doador pelo método de antiglobulina de uso rotineiro pelo laboratório em questão. O ideal é que as unidades de eritrócitos para transfusão também sejam submetidas à verificação do fenótipo com antissoros comerciais de potência conhecida, para demonstrar a ausência de antígenos contra os quais o paciente tenha formado anticorpos.

Um procedimento de antiglobulina completo também pode ser escolhido para toda prova de reação cruzada na discrição de determinado laboratório do banco de sangue. No caso de pacientes com uma triagem negativa para anticorpo, o teste de compatibilidade completo raramente consegue detectar aloanticorpos contra antígenos de baixa frequência não presentes nas células submetidas à triagem (p. ex., Kp^a, Wr^a). Além disso, os testes para detecção de anticorpo teoricamente poderiam falhar, pela presença de uma dosagem visível de anticorpo, à deterioração do antígeno a partir das células reagentes durante armazenamento ou por erro técnico. Entretanto, relatos na literatura sobre a experiência de várias instituições que eliminaram a prova de reação cruzada com antiglobulina (exceto nas circunstâncias em que é necessário) mostram que o valor preditivo da realização rotineira de uma prova de reação cruzada com antiglobulina é mínimo. A incidência real de um anticorpo *clinicamente importante* passar despercebido é muito baixa – inferior a 0,05% (Mintz, 1982; Cordle, 1990). Um estudo multicêntrico envolvendo 1.300.000 testes de compatibilidade imediatos demonstrou um risco observado de reação hemolítica aguda de apenas 0,0004% com o emprego dessa técnica (Shulman, 1990).

Prova de reação cruzada em emergências

Em situações de urgência, pode haver necessidade de sangue liberado para transfusão antes de serem completados as provas de reação cruzada, ou mesmo antes que se disponha de uma amostra de sangue do paciente. Se os tipos ABO e Rh do paciente não forem conhecidos, libera-se um concentrado de hemácias do grupo O-negativo. Caso se disponha de uma amostra de sangue, e haja tempo para realizar a tipagem ABO e Rh, pode-se liberar sangue do tipo específico. Todas as unidades são etiquetadas de forma bem visível para indicar que não foram submetidas a testes de compatibilidade e que o soro do paciente não foi submetido à triagem para anticorpos inesperados. Em tais situações, o médico do paciente precisa assinar um formulário de liberação em que conste que a situação clínica justifica a liberação de sangue não submetido a testes de compatibilidade. Em tais casos, a triagem de anticorpo é prontamente completada e as provas de reação cruzada são realizados de acordo com o protocolo do laboratório. No evento de uma triagem positiva ou incompatibilidade, o médico deve ser avisado imediatamente de quaisquer anticorpos ou incompatibilidade detectados.

Ocorre transfusão maciça quando o número de eritrócitos transfundidos se iguala ou excede o volume de sangue do paciente em um tempo relativamente curto (< 24 horas). Em tais circunstâncias, muitos bancos de sangue iniciam uma política de transfusão maciça que permite uma prova de reação cruzada imediato, mesmo em pacientes com aloanticorpos eritrocitários conhecidos. Nesses casos, o anticorpo sérico é tipicamente diluído e não detectável *in vitro* por causa do grande volume de sangue e líquidos transfundidos. A maioria dos protocolos para transfusão maciça volta a exigir o procedimento de reação cruzada rotineiro em 24 horas, quando o paciente está estabilizado. A transfusão de unidades positivas para antígeno pode resultar em aumento do título de anticorpo e levar a uma reação transfusional hemolítica tardia em pacientes com aloanticorpos.

Protocolos de prova de reação cruzada pré-operatórios

Estudos sobre a segurança e a eficácia do protocolo de detecção de anticorpo antiglobulina (Boral, 1977; Mintz, 1982; Cordle, 1990; Heddle, 1992) mostram que pelo menos 99% dos anticorpos de importância clínica são detectados por uma triagem de anticorpo padrão de 2 células. Na realidade, uma triagem com 2 células é mais que 99% efetiva na prevenção de transfusões incompatíveis, com base na ocor-

rência real de aloanticorpos comuns e frequências de antígenos na população geral (Boral, 1977). Como resultado desses relatos, a maioria dos serviços de transfusão adotou um tipo e um protocolo de triagem únicos para procedimentos cirúrgicos que rotineiramente não requerem transfusão. O tipo e o protocolo da triagem, quandos usada em conjunto com as diretrizes sanguíneas pré-operatórias (esquema de solicitação máxima de sangue para cirurgia: Friedman, 1976; Henry, 1977), permitem um inventário muito mais eficiente sobre o uso do sangue e uma redução na proporção C/T (teste de compatibilidade/transfusão). Para procedimentos cirúrgicos eletivos que rotineiramente não requerem transfusão, só é solicitado um tipo de triagem de anticorpo. As solicitações de sangue para procedimentos cirúrgicos eletivos que requerem transfusão são feitas em um nível que reflete os padrões de uso real de determinado procedimento cirúrgico em uma instituição em particular. Para que as solicitações de sangue sejam bem-sucedidas, elas devem ser submetidas a revisões periódicas, à medida que novos procedimentos cirúrgicos são adotados e as técnicas são aprimoradas.

O tipo e o protocolo de triagem pré-operatória não requerem mais pesquisa sorológica se o paciente for negativo para anticorpo e não houver antecedentes familiares conhecidos de anticorpos clinicamente significativos. Se um paciente precisa de transfusão inesperadamente durante uma cirurgia, são selecionadas unidades ABO e Rh compatíveis, e pode-se realizar uma prova de reação cruzada imediata ou EXM. Caso não seja detectada incompatibilidade ABO, o sangue pode ser liberado com segurança para o centro cirúrgico em tempo mínimo.

Se a triagem pré-operatória para anticorpo for positiva ou os registros prévios indicarem um anticorpo clinicamente significativo conhecido, os procedimentos cirúrgicos padrões devem especificar um número mínimo de unidades negativas para antígeno que seria mantido pelo banco de sangue para uso pelo paciente durante cirurgia. Essas unidades teriam de ser submetidas a testes de compatibilidade com o soro do paciente, usando-se um procedimento completo de compatibilidade com antiglobulina antes da transfusão.

Técnicas especiais de identificação de anticorpo

Pacientes submetidos a transfusões repetidas podem responder com a formação de múltiplos anticorpos inesperados de grupos sanguíneos. Autoanticorpos e aloanticorpos contra antígenos de alta frequência irão reagir com todas as células testadas, inclusive todos os eritrócitos usados para identificação de anticorpos, dificultando extremamente a detecção de outros aloanticorpos subjacentes. Quando problemas complexos como esses são encontrados, são necessárias técnicas especiais para resolvê-los e é preciso conseguir encontrar unidades compatíveis para a transfusão. As técnicas especiais usadas na identificação de anticorpo frequentemente envolvem: (1) uma tentativa de eliminar a reatividade do anticorpo selecionado que esteja interferindo na identificação de outras especificidades no mesmo soro ou (2) um esforço para acentuar ou caracterizar com maior clareza a reatividade de um anticorpo que escapou da identificação definitiva. Algumas dessas técnicas são delineadas adiante, bem como nas Tabelas 34.42 e 34.43. O leitor também deve consultar as publicações *Technical Manual* (Brecher, 2002), *Applied Blood Group Serology* (Issitt, 1998), *Methods in Immunohematology* (Judd, 1994) e *Immunohematology Methods* (Mallory, 1993) da American Association of Blood Banks como referências excelentes para procedimentos comuns, além de técnicas mais especializadas.

Procedimentos técnicos para eliminar a reatividade de um anticorpo

Inibição de hemaglutinação

A inibição da hemaglutinação é usada para neutralizar anticorpos de grupos sanguíneos selecionados com seu antígeno correspondente, encontrado na forma solúvel na saliva, no soro ou em outros líquidos corporais humanos, bem como em substâncias da natureza (ver Tab. 34.44). A identidade de um anticorpo suspeito é confirmada se não houver mais células reagentes positivas para o antígeno que aglutinem após o acréscimo de um antígeno solúvel. A inibição da hemaglutina-

Tabela 34.42 Técnicas especiais na identificação de anticorpo: procedimentos séricos

	Procedimento	Aplicação/efeito
Inibição da hemaglutinação	Inibe a reatividade ao misturar soro com uma fonte antigênica solúvel específica em paralelo com uma diluição de controle; testar novamente células positivas para antígeno conhecido	Confirma a especificidade ao neutralizar os seguintes anticorpos: anti-P_1, anti-Le^a e Le^b, anti-Sd^a, anti-ABH e anti-Ch/Rg. Também pode facilitar a identificação de outros anticorpos em uma mistura
Adsorção sérica	Adsorve anticorpos séricos com células autólogas, células alogênicas selecionadas ou estroma de eritrócitos de coelho (REST) à temperatura apropriada para reatividade de anticorpo	Remove fisicamente autoanticorpos ou aloanticorpos amplamente reativos do soro, pela reação com células absorventes, permitindo a detecção de anticorpos IgG subjacentes – particularmente útil em casos de AHAQ Pode ser combinada com a eluição em casos complicados que envolvam a identificação de múltiplos anticorpos
Reagentes sulfidrílicos	Pré-tratamento sérico com reagentes sulfidrílicos como 2-ME ou DTT	Destrói a estrutura pentamérica dos anticorpos IgM aglutinantes, desviando-os efetivamente de autoanticorpos e aloanticorpos frios reativos, o que permite a detecção de aloanticorpos IgG subjacentes
Titulação	Preparar diluições duplamente seriadas de soro e testar contra célula indicadora positiva para o antígeno	• Ajuda na identificação de anticorpos HTLA (título de 1:64 ou maior) • Usada para medir aumento na produção de anticorpos IgG durante a gravidez • Raramente, pode ser útil para identificar aloanticorpos de um título maior presentes com um autoanticorpo quente
Preaquecimento	Manter todos os componentes do teste (tubos, células, soro, solução fisiológica) a 37°C antes do teste; usar reagentes AHG anti-IgG monoespecíficos	Desloca a reatividade de autoaglutininas ou aloaglutininas frias de título e amplitude térmica limitados – impede a aglutinação direta de células de teste e/ou a ativação *in vitro* do complemento nos testes de detecção e identificação de anticorpo
Reposição salina	Nos testes em que os eritrócitos do paciente ou em teste ficam suspensos no soro e suspeita-se de que tenham formado *rouleaux*, o soro é removido e substituído pelo mesmo volume de solução fisiológica	Útil para a obtenção de resultados válidos na tipagem do grupo ABO ou para se avaliar a presença de aglutinação aparente ao examinar células de triagem após incubação a 37°C e centrifugação. A pseudoaglutinação decorrente de *rouleaux* irá dispersar-se com a remoção das proteínas agressoras e o acréscimo de um meio forte altamente iônico

* Ver também na Tabela 34.33 os efeitos da concentração de anticorpo, do pH, do tempo de incubação etc.

Tabela 34.43 Técnicas especiais para a identificação de anticorpo: procedimentos com eritrócitos

	Procedimento	Aplicação/efeito
Tratamento enzimático	Procedimento em 2 estágios (preferível): incubar os eritrócitos de teste com solução enzimática a 37°C; lavar bem as células para remover completamente a enzima e testar novamente as células com o soro a ser investigado	• Elimina alguma reatividade do anticorpo, ao destruir estruturas de antígenos correspondentes – MNS, Duffy, Ch/Rg; pode ser mais fácil captar especificidades diferentes em um soro que contenha múltiplos anticorpos • Acentua a sensibilização, a aglutinação e/ou a hemólise por outros anticorpos – Rh, Kidd, muitos anticorpos Ig e de grupos sanguíneos; pode facilitar a identificação de anticorpos fracamente reativos
AET/DTT	Tratar previamente os eritrócitos a serem testados com AET ou DTT; lavar as células para remover o reagente e testá-las novamente com o soro sendo investigado	Cria efetivamente células Kell "nulas" para uso na identificação de aloanticorpos em uma mistura que contenha anticorpo contra um antígeno de alta frequência no sistema Kell
Eluição	Remove e recupera anticorpo de eritrócitos por técnicas como uso de glicina ácida ou solventes orgânicos	Concentra o anticorpo que estava cobrindo os eritrócitos em uma solução apropriada para procedimentos de identificação. Usada na investigação de DAT positivo em casos de DHRN, RHT e anemias hemolíticas autoimunes
Difosfato de cloroquina	Eritrócitos compactados (papa de hemácias) lavados são incubados em uma proporção 1:4 com cloroquina à temperatura ambiente. O reagente é removido por múltiplas lavagens com solução fisiológica	Dissocia IgG dos eritrócitos do paciente com DAT positivo, de maneira que eles podem ser tipificados com reagentes de grupo sanguíneo que requeiram uma técnica de antiglobulina indireta. Deve-se usar apenas anti-IgG como reagente AHG, pois as proteínas do complemento não se dissociam com a cloroquina
ZZAP	Para adsorção, alíquotas de eritrócitos compactados (papa de hemácias) lavados são incubados a 37°C com ZZAP. As células em seguida são lavadas com grande volume de solução fisiológica para remover ZZAP. A combinação de DTT e enzimas destrói autoanticorpos IgG que cobrem os eritrócitos	• A remoção de autoanticorpos das células do paciente fornece locais livres de antígeno para adsorção de autoanticorpo a partir do soro • Também se pode usar ZZAP para destruir antígenos dos sistemas Kell, Cartwright, Gerbich e Dombrock
Dispersão da autoaglutinação mediada por IgG	Incubar suspensão de células com reagentes sulfidrílicos ou lavar as células múltiplas vezes com solução fisiológica a 37°C	A dissociação de autoaglutinação fria permite a tipagem ABO válida de eritrócitos e pode ajudar a avaliar os resultados do DAT
Tipagem com lectina	Reagentes comumente derivados de sementes vegetais são usados para testar a presença ou a ausência de um antígeno de grupo sanguíneo específico sobre a membrana eritrocitária – usados no lugar de anticorpo reagente	Útil na tipagem de antígenos específicos, como A_1, H e N, e na classificação das diferentes condições de poliaglutinação de eritrócitos
Técnicas de separação de células	Células lavadas do paciente são centrifugadas em tubos de micro-hematócrito, e a parte dos 5 mm superiores contendo as células mais leves é recolhida Pode-se fazer aglutinação diferencial com base nas diferenças conhecidas no fenótipo do antígeno entre doador e receptor	Úteis para: • Determinar o fenótipo de células autólogas em indivíduos que tenham recebido transfusão recentemente • Avaliar se uma RHTT pode estar evoluindo em um paciente com anemia hemolítica autoimune • Estimar a sobrevivência de células transfundidas

Tabela 34.44 Fontes de antígenos solúveis para inibição da hemaglutinação

Substância solúvel	Fonte
ABH	Saliva secretora
Le^a, Le^b	Saliva secretora
P_1	Líquido de cisto hidático ou ovos de pombos
Sd^a	Urina humana ou de cobaia
Ch^a, Rg^a	Plasma de indivíduos Ch/Rg (+)
I	Leite humano

ção pode ser particularmente útil quando se trabalha com uma amostra de soro que contém múltiplas especificidades. O princípio da inibição da hemaglutinação também é usado para determinar o estado secretor de indivíduos com subgrupos ABO fracos (Tab. 34.10).

Adsorção de anticorpo

A adsorção é um processo usado para remover fisicamente anticorpos do soro. O procedimento de adsorção pode ser realizado usando-se eritrócitos autólogos lavados tratados com enzimas, células alogênicas fenotipicamente compatíveis, células selecionadas para serem positivas para uma combinação específica de antígenos de grupo sanguíneo ou estroma de eritrócitos. A temperatura de incubação e os tempos usados no processos de adsorção dependem da classe da imunoglobulina e da variação térmica dos anticorpos que estão sendo adsorvidos. Em geral, o uso de uma baixa proporção entre anticorpo e célula aumenta a eficiência da adsorção.

A adsorção com o emprego de células alogênicas é útil para separar múltiplos aloanticorpos em uma mistura complexa (adsorção diferencial) ou eliminar a reatividade de um aloanticorpo contra um antígeno de alta frequência. Em pacientes com autoanticorpos, geralmente é feita a adsorção com eritrócitos autólogos, células compatíveis fenotipicamente e estroma de eritrócitos de coelhos (REST, *rabbit erythrocyte stroma*) para remover de forma seletiva autoanticorpos reativos quentes e frios, respectivamente. A remoção de autoanticorpos é necessária para identificar quaisquer aloanticorpos potenciais subjacentes que o paciente possa ter (ver "Investigação de anemia hemolítica autoimune" e Fig. 34.25).

Reagentes à base de tiol

Compostos sulfidrílicos, como o 2-mercaptoetanol (2-ME) ou o ditiotreitiol (DTT), clivam pontes de dissulfeto e são usados frequentemente para inativar a capacidade de aglutinação dos anticorpos IgM ao clivarem pontes de dissulfeto intersubunidades, bem como ligar subunidades de IgM à cadeia J (Mollison, 1993), destruindo, assim, a estrutura pentamérica da molécula de IgM. Esses reagentes são úteis na investigação da presença de aloanticorpos IgG clinicamente significativos em um soro que contenha autoanticorpos IgM frios altamente aglutinantes. Eles também podem ser usados para dissociar a autoaglutinação causada por esses anticorpos frios, que pode interferir na tipagem ABO/Rh e no DAT. Em estudos pré-natais, os reagentes sulfidrílicos são frequentemente utilizados para avaliar um soro que contenha um anticorpo como o anti-M, que comumente tem tanto

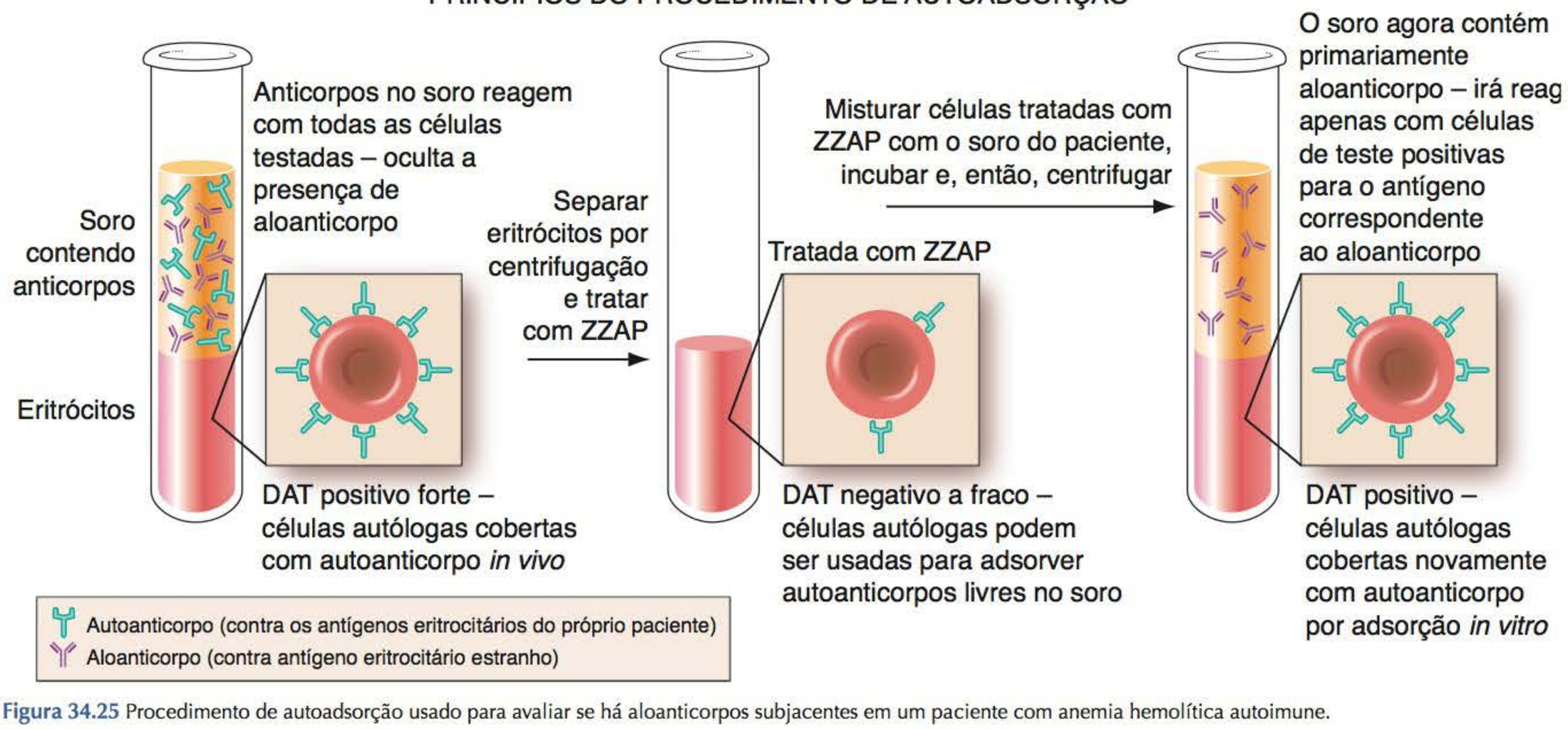


Figura 34.25 Procedimento de autoadsorção usado para avaliar se há aloanticorpos subjacentes em um paciente com anemia hemolítica autoimune.

um componente IgM como um IgG. Ao destruir o anti-M aglutinante, o soro pode ser testado para anti-M IgG que seja capaz de atravessar a placenta e causar DHRN.

Titulação de anticorpo sérico

A titulação sérica é um método usado para a determinação semiquantitativa da quantidade de anticorpo presente em um determinado soro. Diluições duplas seriadas de soro são preparadas e, então, testadas com eritrócitos que tenham o antígeno correspondente. Cada diluição é lida em busca de aglutinação macroscópica, e o título do anticorpo é expresso como a recíproca da diluição sérica mais alta que resulta em aglutinação macroscópica.

Usa-se a titulação de anticorpo na identificação presuntiva de anticorpos HTLA (alto título, baixa avidez). A maioria dos anticorpos (excluindo HTLA) que inicialmente resulta em reações fracas (± ou $\pm^m$) no IAT raras vezes reage em diluições maiores que 1:2. Em contraste, os anticorpos HTLA caracteristicamente dão as mesmas reações fracas (± ou $\pm^m$) em múltiplas diluições séricas, em geral reagindo em diluições maiores ou iguais a 1:64. Caso se suspeite de tal anticorpo, faz-se uma titulação para demonstrar que o anticorpo fracamente reativo ainda continua reativo em uma diluição alta, permitindo, assim, sua classificação como um HTLA. Em geral, esses anticorpos são direcionados contra antígenos Ch/Rg, JMH e Knops.

Em estudos pré-natais, aloanticorpos IgG clinicamente significativos capazes de causar DHRN são titulados periodicamente no soro materno durante a gravidez. Um título crescente em geral indica que células fetais têm o antígeno correspondente e estão estimulando a mãe a produzir mais anticorpo, proporcionando, assim, informação valiosa para o médico a respeito da maneira como a gravidez deve ser conduzida.

Tabela 34.45 Efeito da expressão do antígeno/da reatividade do anticorpo pelo tratamento enzimático* das células de teste

Efeito	Antígenos
Destruição	Fy^a, Fy^b
	M, N
	HTLA- Ch/Rg, JMH
	Pr
	Xg^a
Variável	Lu^a, Lu^b
	S, s
Acentuação	ABH
	I/I
	Jk^a, Jk^b
	Le^a, Le^b
	P
	Rh
Geralmente nenhum	Kell

* Usando-se ficina ou papaína.

Dados de Issitt (1998), Brecher (2002).

Procedimentos eritrocitários especiais para identificação de anticorpos

Eritrócitos reagentes ou do paciente podem ser modificados de várias maneiras pelo imuno-hematologista para anular ou acentuar a reatividade dos anticorpos correspondentes. As células do paciente também são submetidas a procedimentos destinados a remover anticorpo que estava ligado *in vivo*, de modo que possa ser recuperado e identificado e/ou fornecer eritrócitos para outros testes.

Destruição de antígenos eritrocitários

Os reagentes disponíveis para tratar eritrócitos com o objetivo de destruir certos antígenos de grupos sanguíneos incluem várias enzimas proteolíticas (p. ex., papaína, ficina), neuraminidase (remove ácido siálico), ZZAP (uma combinação de protease e reagente sulfidrílico), brometo de aminoetilissotiurônio (AET) e DTT. Em um soro que contenha múltiplos aloanticorpos, o pré-tratamento seletivo dos eritrócitos com enzimas pode destruir antígenos específicos, eliminando a reatividade específica do aloanticorpo. Acredita-se que as enzimas também removam a água da hidratação e diminuam o potencial zeta, permitindo que os eritrócitos aproximem-se mais uns dos outros. Como resultado, eles podem acentuar a reatividade de um anticorpo significativo potencialmente fraco e facilitar sua identificação. A Tabela 34.45 lista anticorpos cuja reatividade será acentuada ou eliminada pelo tratamento enzimático dos eritrócitos de teste. Deve-se lembrar que o AET e o DTT podem ser usados para criar eritrócitos negativos para todos os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Kell (exceto Kx); esses reagentes também podem destruir certos antígenos que reagem com anticorpos HTLA.

Eluição de anticorpo

Eluição é o processo usado para remover anticorpos ligados a eritrócitos *in vivo*, conforme indicado por um DAT positivo. A eluição é usada comumente para concentrar e solubilizar anticorpos de eritrócitos para estudos subsequentes de identificação. A eluição de um an-

Tabela 34.46 Técnicas de eluição de anticorpo

Método	Princípio*	Aplicação
Calor	Altera a constante de equilíbrio da reação antígeno-anticorpo e os anticorpos são liberados	• Recuperação de anticorpos ABO nos casos de DHRN ABO • A eluição em calor leve (a 45°C) pode ser útil para remover anticorpo das células que esteja causando resultados falso-positivos nos testes de hemaglutinação diretos
Congelamento-descongelamento	O dano causado à membrana do eritrócito pela hemólise altera a adaptação complementar entre antígeno e anticorpo	Recuperação de anticorpos ABO nos casos de DHRN ABO
Ácido (p. ex., digitonina ácida, glicina ácida/EDTA)	Em pH ácido, o antígeno e o anticorpo ficam com carga negativa e se repelem	• Boa recuperação da maioria dos anticorpos IgG de grupos sanguíneos (pode ser menos sensível para o Kidd) • Também se usa glicina/EDTA para dissociar anticorpo, mas deixar eritrócitos intactos para determinação do fenótipo
Solventes orgânicos (p. ex., clorofórmio, xileno, éter)	Causa ruptura da dupla camada lipídica da membrana eritrocitária, alterando a adaptação complementar e/ou revertendo as forças de atração selecionadas entre antígeno e anticorpo	Alta recuperação da maioria dos anticorpos IgG de grupos sanguíneos

* Issitt (1998).

ticorpo com especificidade conhecida por grupo sanguíneo e/ou medicamento pode ser diagnóstica na avaliação de reações transfusionais hemolíticas tardias, DHRN e anemia hemolítica autoimune induzida por medicação.

A eluição pode ser obtida por uma variedade de métodos que alteram ou revertem as forças de atração que mantêm o antígeno e o anticorpo unidos. Vários métodos envolvem o acréscimo de calor e a ruptura da estrutura do antígeno pela exposição da membrana do eritrócito ao congelamento e ao descongelamento, a solventes orgânicos e a alterações do pH para dissociar os complexos de eritrócito com anticorpo. Todos os métodos requerem numerosas lavagens antes da eluição para remover qualquer soro que contenha anticorpo não ligado. Para assegurar a remoção completa de anticorpo sérico, a solução fisiológica da última lavagem precisa ser testada contra células apropriadas para detectar qualquer anticorpo residual não ligado. O controle da última lavagem deve mostrar uma ausência de reatividade do anticorpo antes da realização do procedimento de eluição. O ideal é que os eluídos sejam testados no mesmo dia em que são preparados, mas podem ser armazenados a -20°C ou menos se houver demora para fazer o teste. A Tabela 34.46 lista alguns dos métodos comuns de eluição e suas aplicações. Para obter uma lista mais abrangente e as descrições específicas dos procedimentos de eluição, ver Mallory (1993).

Remoção de anticorpos dos eritrócitos para facilitar a tipagem de antígeno

Muitos antissoros para tipagem de antígeno eritrocitário requerem a técnica do IAT. Como resultado, as amostras de eritrócitos com DAT positivo não podem ser usadas para a tipagem de antígeno, porque essas células já estão cobertas com anticorpo IgG e darão um resultado falso-positivo. A maioria dos métodos de eluição que removem anticorpos de grupo sanguíneo destrói as células ou os antígenos. No entanto, o tratamento de eritrócitos cobertos com difosfato de cloroquina dissocia o anticorpo, deixando os antígenos relativamente intactos (Edwards, 1982). Também se pode usar glicina/EDTA em condições cuidadosamente controladas para dissociar IgG de eritrócitos, mas o tratamento excessivo com esse reagente pode causar dano irreversível à membrana dos eritrócitos. Após o tratamento com cloroquina ou glicina, os eritrócitos podem ser submetidos à tipagem para antígeno com antissoros reativos à antiglobulina humana. Deve-se observar que células tratadas com glicina/EDTA não podem ser submetidas à tipagem para antígenos do sistema Kell, porque seriam destruídas.

É preciso cuidado ao interpretar os resultados da tipagem de antígeno com células tratadas com cloroquina. Há relatos de que os antígenos Rh, e possivelmente outros antígenos de grupos sanguíneos, podem ser enfraquecidos, resultando em reações falso-negativas. Antissoros reativos à solução fisiológica, incluindo reagentes de grupos

Tabela 34.47 Lectinas úteis nos testes imuno-hematológicos

Lectina	Atividade inibida por	Especificidade sorológica	Aplicação
Ulex europaeus	α-L-fucose	Anti-H	Teste do estado secretor, classificação de subgrupos A fracos, investigação de fenótipo Bombay possível
Vicia graminea	Tetrassacarídeos do grupo sanguíneo N ligados ao *O* (galactose [β1,3] *N*-acetilgalactosamina)	Anti-N	Tipagem do antígeno eritrocitário
Griffonia simplicifolia I*	α-D-galactose	Anti-B, Tn	Tipagem do antígeno eritrocitário Investigação de B adquirido/poliaglutinação
Dolichos biflorus	α-*N*-acetil-D-galactosamina terminal	Anti-A, Tn, Cad	Classificação de subgrupos A, investigação de poliaglutinação
Griffonia simplicifolia II*	α- ou β-*N*-acetil-D-glucosamina	Anti-Tk	Confirmação de poliaglutinação Tk
Helix pomatia	α-*N*-acetil-D-galactosamina	Anti-A, Tn, Cad	Fornece reação distinta em campo misto com poliaglutinação VA
Arachis hypogaea	β-D-galactose	Anti-T, Tk, Th, Tx	Investigação de poliaglutinação
Glycine soja (max)	α-*N*-acetil-D-galactosamina	Anti-T, Tn	
Leonurus cardiaca	α-*N*-acetil-D-galactosamina	Anti-Cad específico na diluição apropriada	
Salvia sclerea	α-*N*-acetil-D-galactosamina	Anti-Tn específico	
Salvia horminum	α-*N*-acetil-D-galactosamina	Anti-Tn, Cad (separável)	
Vicia cretia	Galactose (β 1,3) *N*-acetil-galactosamina	Anti-T, Th	

* Anteriormente conhecida como *Bandeiraea simplicifolia* I e II.

monoclonais, não devem ser usados com células tratadas com cloroquina (Gamma Biologicals Inc., 2001). Para usar cloroquina ou glicina/EDTA, é prudente tratar células positivas para o antígeno em paralelo como controle. Só se deve usar anti-IgG monoespecífico no IAT, porque os componentes do complemento não estão dissociados dos eritrócitos DAT-positivos pela cloroquina.

Tipagem de eritrócitos com reagentes à base de lecitina

Os reagentes para tipagem à base de lecitina contêm proteínas que reconhecem carboidratos específicos na membrana eritrocitária, causando hemaglutinação direta. Em geral, são derivados de sementes vegetais, mas essas proteínas receptoras também são encontradas em alguns animais invertebrados e vertebrados inferiores. Por causa de sua potência, podem variar de acordo com a preparação, devendo cada lote ser padronizado antes do uso. Embora tenham sido descritas muitas lecitinas, apenas poucas têm utilidade nos bancos de sangue (Bird, 1988). As fontes de reagentes selecionados à base de lecitina e suas aplicações estão relacionadas na Tabela 34.47.

Separação de eritrócitos autólogos de transfundidos

Em pacientes submetidos a transfusão, pode ser preciso separar células autólogas das transfundidas. Podem ser necessários eritrócitos autólogos para tipagem de antígeno em um paciente submetido à transfusão com múltiplos aloanticorpos, um autoanticorpo quente e possíveis aloanticorpos ou um anticorpo contra um antígeno de alta incidência. A capacidade de fazer um DAT, e possivelmente até mesmo uma eluição, com células autólogas e/ou transfundidas pode ajudar a avaliar se um indivíduo com anemia hemolítica autoimune quente (AHAQ) que tenha recebido uma transfusão recente está desenvolvendo uma reação transfusional hemolítica tardia (RTHT) devida a novos aloanticorpos. Em casos raros, o DAT com eritrócitos autólogos separados pode ser necessário para diferenciar uma AHAQ de uma RTHT envolvendo um antígeno de alta incidência. Como uma aplicação final, pode-se estimar a proporção aproximada de eritrócitos sobreviventes transfundidos quando se suspeita de uma RTHT.

Duas técnicas básicas para separar eritrócitos autólogos dos transfundidos são a aglutinação diferencial e a separação por densidade com a utilização de centrifugação. Na primeira técnica, são usados anticorpos para aglutinar apenas uma população de células, com base nas diferenças antigênicas conhecidas entre receptor e doador. As células não aglutinadas são removidas fisicamente das aglutinadas e reagem sequencialmente com mais antissoro até que não haja mais formação de aglutinados. Na segunda técnica, eritrócitos compactados (papa de hemácias) lavados são centrifugados em múltiplos tubos vedados de micro-hematócrito. As células transfundidas são mais antigas, menores e mais densas que as células autólogas recém-formadas (reticulócitos) e circulam na direção do fundo do tubo. Após centrifugação, os 5 mm superiores de cada tubo são cortados, e as células desses pequenos segmentos são colhidas. Tais segmentos irão conter as células autólogas maiores e mais leves. Esse método só será efetivo se o paciente estiver produzindo reticulócitos normais ou em grande número.

Tipagem molecular

Também é possível determinar o fenótipo de um paciente por tipagem molecular do DNA genômico. Isso é particularmente útil em pacientes que receberam transfusões e apresentam problemas múltiplos ou complexos com anticorpo, inclusive autoanticorpos e aloanticorpos contra antígenos de alta incidência. De acordo com vários textos de referência sobre imuno-hematologia (Reid, 2004b), há iniciadores para amplificação e polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição. No momento, as amostras de pacientes para genotipagem são enviadas para alguns laboratórios de referência estabelecidos. Avanços rápidos no alto processamento da tipagem do DNA podem permitir a tipagem genética completa de pacientes no futuro.

Investigação de anemia hemolítica autoimune

Em geral, o sistema imune do indivíduo produz autoanticorpos contra um antígeno próprio ou outro antígeno que esteja presente no seu organismo. Embora sejam produzidos contra autoantígenos, esses anticorpos tipicamente reagem com o mesmo antígeno encontrado em outros indivíduos normais. Se os anticorpos produzidos foram contra células constituintes do sangue, o resultado patológico pode ser anemia hemolítica, trombocitopenia ou leucopenia. Em muitos casos, esses autoanticorpos não causam sintomas clínicos demonstráveis.

O DAT é parte integrante do diagnóstico de anemia hemolítica autoimune (AHA), porque pode confirmar a presença de anticorpo que tenha aderido *in vivo* aos eritrócitos do próprio paciente. O DAT pode ajudar a diferenciar a AHA de anemias congênitas causadas por anormalidades no citoesqueleto do eritrócito, nas enzimas ou na hemoglobina. O DAT pode ser positivo em decorrência de IgG e/ou componentes do complemento, dependendo da classe ou da subclasse de autoanticorpo envolvida. No entanto, um DAT positivo por si não significa que o indivíduo tem AHA. Aproximadamente 8% dos pacientes hospitalizados têm um DAT positivo sem quaisquer sinais de hemólise (Petz, 1993). Nos pacientes em que se suspeita de AHA, a triagem de anticorpo também pode ser positiva como resultado da presença de autoanticorpo livre no soro.

Os autoanticorpos são categorizados como frios (em geral IgM) ou quentes (geralmente IgG), com base na temperatura da reatividade *in vitro* no IAT. Em alguns casos, os pacientes podem ter AHA do tipo misto, com autoanticorpos reativos frios e quentes. Os anticorpos causadores dessas categorias de anemias estão descritos aqui; em outro capítulo há mais informações sobre a etiologia e a fisiopatologia da AHA.

Anemia hemolítica Autoimune quente (AHAQ)

Os indivíduos com autoanticorpos reativos quentes são responsáveis por aproximadamente 70 a 80% dos casos de AHA, com incidência global de cerca de 1 em 50.000 a 1 em 80.000 (Issitt, 1998). A anemia hemolítica autoimune quente (AHAQ) pode ser classificada em primária ou idiopática (de etiologia desconhecida) ou secundária. A AHAQ secundária em geral é observada em doenças autoimunes (frequentemente o lúpus eritematoso sistêmico), distúrbios linfoproliferativos e após infecções virais. Com o advento de procedimentos diagnósticos aprimorados, a percentagem de AHAQ classificada como idiopática caiu para cerca de 30% dos casos (Issitt, 1998). Pacientes com autoanticorpos quentes e DAT positivo não apresentarão anemia sintomática, mas ela pode ocorrer em um estado crônico compensado por algum tempo antes de progredir para anemia franca.

Características sorológicas

Os anticorpos causais na AHAQ em geral são IgG e de natureza policlonal, exibindo reatividade ótima a 37°C. A grande maioria dos anticorpos quentes presentes no soro e/ou recuperada em eluídos de eritrócitos de pacientes só pode ser demonstrada pela técnica do IAT.

Em cerca de 80% dos casos de AHAQ, autoanticorpos quentes serão demonstrados nos eritrócitos dos pacientes. Os perfis do DAT em vários grandes estudos mostram que 40 a 50% devem-se a IgG apenas, 45 a 60% são IgG e complemento e 0 a 15% são apenas complemento (Issitt, 1998). Nas circunstâncias em que o DAT é negativo, o uso de técnicas mais sensíveis, como de radioisótopos ou o teste da antiglobulina direto marcado com enzima, pode demonstrar níveis baixos de IgG ou, menos frequentemente, IgM e IgA nos eritrócitos (Englefriet, 1992).

Estudos sobre a subclasse de imunoglobulina na AHAQ indicam que os anticorpos causais são predominantemente IgG1 e/ou IgG3. Apesar da capacidade dessas subclasses de ativar complemento, a destruição imune das células autólogas do paciente ocorre bastante no baço e no fígado, pelas vias extravasculares. Pacientes cujos eritrócitos estão cobertos com anticorpos IgG3 são mais propensos a exibir anemia franca, aparentemente por causa da maior capacidade da IgG3 de ligar-se a receptores Fc nos macrófagos (Englefriet, 1992). Um estudo mais recente mostrou que a presença de múltiplas subclasses de IgG, e não de uma única subclasse, têm um efeito sinérgico sobre a intensidade da hemólise (Fabijanska-Mitek, 1997).

Em geral, os autoanticorpos quentes exibem ampla especificidade, reagindo com todos os eritrócitos normais. Muitos anticorpos amplamente reativos podem mostrar especificidade pelo Rh, falhando em reagir com eritrócitos Rh_{nulos}. Às vezes, os autoanticorpos demonstram uma única especificidade pelo Rh, como anti-e (mais frequentemente) ou anti-c. Também há relatos que incluem especificidade dos

autoanticorpos pelos sistemas de grupo sanguíneo Kell, Kidd, MNSs e ABO, bem como anti-Vel e anti-LW. Relativamente, poucos indivíduos com AHAQ terão uma única especificidade isolada (Issitt, 1998).

Ocasionalmente, um autoanticorpo poderá simular uma especificidade de aloanticorpo isolada, mas outros testes mostram que o anticorpo pode ser adsorvido à exaustão com células positivas ou negativas para o antígeno. Esses anticorpos simuladores podem ocorrer em pacientes positivos ou negativos para o antígeno correspondente, e o autoanticorpo pode ou não ser reativo *in vitro* (exceto por estudos de adsorção-eluição) com as próprias células do paciente (Issitt, 1998).

Testes sorológicos além do DAT

Em geral, evita-se ao máximo uma transfusão em pacientes com AHAQ. Se for necessária, é importante caracterizar o autoanticorpo e excluir a presença de aloanticorpos nos eritrócitos. As estratégias típicas de investigação devem incluir sempre adsorção do soro, seguida pela detecção e pela identificação do anticorpo no soro adsorvido. Também podem ser feitos testes subsequentes com o anticorpo eluído, embora raras vezes isso proporcione mais alguma informação útil, *a menos* que o soro não seja reativo.

Autoadsorção. Como um autoanticorpo sérico forte e amplamente reativo pode mascarar a presença de aloanticorpos significativos, devem ser realizados estudos de adsorção nesses pacientes. A autoadsorção usando-se células autólogas pode ser feita em pacientes que não tenham recebido transfusão recentemente (nos últimos 3 meses). No caso de pacientes com um DAT positivo forte, as células autólogas devem ser tratadas com ZZAP (Branch, 1982) antes da absorção. A ZZAP contém DTT, que reduz as pontes de dissulfeto nos autoanticorpos IgG que cobrem os eritrócitos. Isso desestabiliza a estrutura da imunoglobulina, tornando os autoanticorpos suscetíveis à digestão pela papaína ativada por cisteína, o segundo componente da ZZAP. Ao remover o autoanticorpo ligado das células, o tratamento com ZZAP aumenta a capacidade adsortiva dos eritrócitos autólogos (ver Fig. 34.25). Se o soro contiver uma alta concentração de autoanticorpo, podem ser necessárias autoabsorções múltiplas, sequenciais, para remover toda a atividade de anticorpo. Caso disponível em quantidade suficiente, deve-se usar soro autoadsorvido para fazer a prova de reação cruzada, em particular se os testes para detecção de anticorpo revelarem a presença de aloanticorpos subjacentes.

Se o paciente tiver recebido transfusões recentemente, e o fenótipo de seus eritrócitos for conhecido, a adsorção pode ser feita usando-se células alogênicas do mesmo fenótipo do paciente. Como alternativa, se o fenótipo dos eritrócitos do paciente for conhecido, podem ser feitas adsorções diferenciais em 3 alíquotas separadas do soro do paciente com amostras diferentes de eritrócitos dos fenótipos R_1, R_2 e rr. Em uma das amostras de eritrócitos não deve haver Jk^a e, em outra, Jk^b (Brecher, 2002). O tratamento com ZZAP das células em adsorção destrói efetivamente os antígenos Fy^a e Fy^b e todos do sistema Kell, além dos antígenos M, N, S e s, conferindo, assim, às amostras com células em adsorção, a capacidade de remover atividade de autoanticorpo, ao mesmo tempo que preserva os aloanticorpos potenciais no soro. As alíquotas diferentes de soro são, então, testadas contra células de fenótipo conhecido para detectar e/ou identificar especificidade de aloanticorpo.

Eluição. Na maioria dos casos de AHAQ, um eluído das células do paciente irá demonstrar o mesmo anticorpo amplamente reativo visto no soro. Nas raras circunstâncias em que o soro é apenas fracamente reativo ou negativo, um eluído pode concentrar o autoanticorpo quente para facilitar a identificação e a avaliação de seu espectro de reatividade. Se o eluído não for reativo com eritrócitos reagentes normais, a presença de autoanticorpos medicamentosos deve ser investigada (ver adiante).

Anemia hemolítica autoimune fria (AHAF)

Autoanticorpos frios podem ser detectados no soro de muitos indivíduos normais se testados sob as condições corretas. No entanto, a maioria desses anticorpos é de aglutininas frias benignas, que mostram reatividade ótima a 4°C e pouca ou nenhuma reatividade a 37°C. As aglutininas frias são mais frequentemente um mero aborrecimento que pode interferir na tipagem ABO/Rh, na detecção de anticorpo e na prova de reação cruzada usando AHG poliespecífica. Embora geralmente ignoradas como clinicamente insignificantes, as aglutininas frias podem se tornar patológicas em virtude da amplitude térmica expandida e de um aumento significativo no título, frequentemente em associação a certos estados mórbidos. O teste da antiglobulina direto, junto com a titulação sérica e a caracterização da amplitude térmica, constituem os testes sorológicos mais importantes na avaliação de um possível diagnóstico de AHAF. A Tabela 34.48 delineia algumas das características sorológicas diferenciais de vários autoanticorpos aglutinantes frios, tanto patológicos como benignos.

Doença por hemaglutinina fria (DAF)

A DAF é responsável por cerca de 20% do total de casos de AHA (Issitt, 1998). Como na AHAQ, a DAF pode ser idiopática ou secundária, em particular após infecções por certas bactérias ou vírus. O anti-A é o autoanticorpo mais frequente na DAF idiopática. Ele também pode causar DAF secundária de início agudo após infecções por *Mycoplasma pneumoniae*. Em contraste com as aglutininas frias anti-A em baixo título encontradas em soros normais (em geral menos de 1:64 quando testados a 4°C), o título de anti-I na DAF costuma ser muito

Tabela 34.48 Características diferenciais das autoaglutininas eritrocitárias frias

Especificidade de anticorpo	Significado clínico	Triagem de anticorpo pelo IAT*	Classe Ig	Forças relativas da reação com eritrócitos selecionados à temperatura ambiente†				
				O_{adulto}	$O_{cord.\ umb.}$	$A_{1\ adulto}$	$A_{2\ adulto}$	Autólogo
I	DAF aguda associada a *Mycoplasma pneumoniae* com títulos de anticorpo > 1.000 a 4°C	Positiva	IgM	3+	f+	3+	3+	3+
i	DAF aguda associada a mononucleose	Positiva	IgM	f+	3+	f+	f+	Mais fraco que $O_{cord.\ umb.}$
Pr	Causa rara de DAF‡	Positiva	Casos relatados de IgM, IgA, IgG	3+	3+	3+	3+	3+
P	HPF associada a certas infecções virais em crianças	Negativa	IgG§	Negativa nos testes de aglutinação rotineiros; autoanti-P é um hemolisina bifásica (anticorpo de Donath-Landsteiner)				
H	Benigno, exceto como aloanticorpo no fenótipo Bombay	Fraca a negativa	IgM	3+	3+	1+	2+	0 a f+
IH	Benigno	Fraca a negativa	IgM	3+	1+	1+	2+	0 a f+

* Expressão do antígeno: O_{adulto} (I+ i– $H+^s$); $O_{cordão\ umbilical}$ (I– i+ $H+^s$); A_1 (I+ i – $H+^w$); A_2 (I+ i – H+).

† Células reagentes mostrando aglutinação em fase a 37°C podem ser muito mais fracas após conversão para IAT.

‡ Pode ser diferenciado do anti-I por enzimas ou aumento do pH – a reatividade do anti-Pr diminui com ambas as técnicas.

§ Autoanti-P é o único autoanticorpo frio conhecido rotineiramente da classe IgG ao IAT.

alto, com variações de 1:10.000 a 1:1.000.000 (Prasad, 1993). O anticorpo também tem uma amplitude térmica expandida, reagindo com eritrócitos em temperaturas na faixa de 30 a 34°C *in vitro*, especialmente em testes com eritrócitos suspensos em albumina (Issitt, 1998). O DAT é tipicamente positivo com reagentes poliespecíficos e anti-C3.

A hemólise *in vitro* resulta da ligação do anticorpo aos eritrócitos de um paciente nos vasos periféricos das extremidades, que são mais frias (32°C e menos). À medida que as células recirculam para o centro do corpo e chegam à temperatura de 37°C, o complemento é ativado e as células são destruídas. A hemólise de células pode ocorrer no espaço intravascular, porém, de acordo com Garratty (1994b), ela ocorre mais comumente nas vias extravasculares (C3b), por macrófagos no sistema reticuloendotelial. A hemólise pode ser crônica ou episódica, dependendo da variação térmica do anticorpo, e pode ser desencadeada por exposição a temperaturas frias.

Como o anti-I reage em ampla escala com praticamente todos os eritrócitos adultos, o anticorpo pode causar grande dificuldade nas provas de reação cruzada. Conforme ocorre com os autoanticorpos quentes, uma das principais preocupações é detectar e identificar quaisquer aloanticorpos IgG potenciais subjacentes. As técnicas para evitar o autoanti-I no soro de teste podem incluir preaquecimento, autoadsorção fria, adsorção com estroma de eritrócito de coelho (REST) ou tratamento do soro com reagentes sulfidrílicos, como o DTT ou o 2-ME (ver "Técnicas especiais de identificação de anticorpo").

O anti-i é o segundo anticorpo que tem sido envolvido na AHAF, detectado mais comumente como um autoanticorpo IgM frio em pacientes com mononucleose infecciosa e certos distúrbios imunoproliferativos, nos quais podem ser vistas as formas monoclonais de anti-i. Possivelmente, de 10 a 20% dos pacientes com mononucleose infecciosa terão títulos significativos de aglutininas frias, porém poucos irão realmente desenvolver DAF decorrente do anti-i (Prasad, 1993).

Por fim, os anticorpos anti-Pr (originalmente denominado anti-Sp) são uma causa infrequente de DAF. Inicialmente, as especificidades anti-Pr podem reagir como anti-A, porém elas podem ser diferenciadas por suas reações igualmente fortes com eritrócitos de cordão umbilical e de adultos (Tab. 34.48). Além disso, o anti-Pr não é reativo com eritrócitos tratados com enzima, enquanto o anti-I é facilitado pelo tratamento enzimático. Em pacientes com DAF, o anti-Pr costuma ser monoclonal e pode ser IgG, IgM ou IgA (Issitt, 1998).

Hemoglobinúria paroxística fria

A hemoglobinúria paroxística fria (HPF) é uma síndrome hemolítica autoimune, observada geralmente em crianças após infecção por caxumba, catapora, sarampo e outros vírus. Em termos históricos, também foi observada em pacientes com sífilis. O autoanti-P, também conhecido como anticorpo de Donath-Landsteiner (DL), é o agente causador da HPF, sendo uma auto-hemolisina bifásica capaz de se ligar a eritrócitos em temperaturas frias e causar hemólise intravascular nessas células à temperatura corporal (Tab. 34.48). Tal característica pode ser demonstrada *in vitro* pelo procedimento diagnóstico de Donath-Landsteiner, para ajudar na confirmação da HPF. Nesse teste, são incubados 3 conjuntos de tubos contendo soro do paciente e células do grupo O, um a 4°C e depois a 37°C, um apenas a 4°C e um apenas a 37°C. Se o primeiro conjunto mostrar hemólise, mas os outros 2 não, isso indica a presença da hemolisina bifásica característica da HPF. O teste de Donath-Landsteiner requer o uso de uma amostra de sangue fresco, para assegurar que um fornecimento adequado de complemento esteja disponível, uma vez que o complemento é relativamente instável e deteriora durante o armazenamento. Também é importante não colher o sangue com anticoagulante, como EDTA, porque a quelação dos íons de cálcio impede a ativação do complemento e, portanto, a hemólise *in vitro*.

Como o autoanticorpo na HPF raramente reage acima de 4°C *in vitro*, os testes rotineiros de detecção de anticorpo em geral são negativos, e os de compatibilidade são compatíveis. É mais comum que eritrócitos do paciente sensibilizados pelo anticorpo DL resultem em um DAT positivo, em virtude apenas do C3, e geralmente só durante ou logo após um episódio de hemólise (Prasad, 1993). Como o anticorpo dissocia-se facilmente dos eritrócitos durante a lavagem, o DAT costuma ser negativo com anti-IgG. No entanto, é possível detectar IgG se as células forem lavadas com solução fisiológica fria e testadas com reagente anti-IgG frio (Brecher, 2002).

Tabela 34.49 Fármacos associados a DAT positivo e/ou hemólise decorrente de autoanticorpos medicamentosos

Mecanismo relatado	Fármaco
Indução de autoanticorpo	Clorpromazina, ibuprofeno, levodopa, ácido mefenâmico, metildopa, nomifensina, procainamida, tolmetina
Dependente de fármaco (adsorção de fármaco – alta afinidade de ligação à membrana celular)	Penicilina, carbenicilina, cefalotina, cefalosporinas de segunda e terceira gerações, eritromicina, meticilina, naficilina, tolbutamida
Dependente de fármaco (complexo imune – baixa afinidade de ligação à membrana celular, mas ativação eficiente do complemento)	Acetaminofeno, anti-histamínicos, cefalosporinas de segunda e terceira gerações, clorpromazina, isoniazida, fenacetina, quinidina, quinino, rifampicina, estibofeno, estreptomicina, derivados da sulfonilureia, tetraciclina
Adsorção de proteína não imunológica	Cefalotina, cisplatina, suramina

Dados de Brecher (2002).

Testes diretos positivos da antiglobulina e anemia hemolítica medicamentosa

Sabe-se que vários fármacos terapêuticos induzem DAT positivo e podem causar anemia hemolítica adquirida (ver Tab. 34.49). Também está bem documentado que pode ocorrer DAT positivo em pacientes que estejam recebendo terapia intravenosa com gamaglobulina em alta dose, por causa de anticorpos de grupos sanguíneos específicos adquiridos passivamente, bem como de ligação inespecífica a eritrócitos por dímeros de IgG e agregados na preparação de gamaglobulina (Knezevic-Maramica, 2003). Tradicionalmente, havia 4 mecanismos propostos para explicar a anemia hemolítica medicamentosa: indução de autoanticorpo, formação de complexo imune, adsorção de fármaco e adsorção de proteína inespecífica.

Mais recentemente, foi sugerido um modelo unificador (Salama, 1992) que pode ser aplicável a muitos diferentes fármacos que se acredita operarem via os mecanismos supracitados. A hipótese sugere que o processo imune seja iniciado por uma interação primária entre eritrócitos e o fármaco ou seus metabólitos, mesmo que o fármaco possa estar apenas fracamente ligado a eritrócitos *in vivo*. Isso fornece os determinantes compostos (ou neoantígenos) necessários para a produção de anticorpos farmacodependentes, como nos mecanismos de adsorção do medicamento e complexo imune, ou autoanticorpos farmacoindependentes, que reconhecem alterações sutis na membrana do eritrócito. Para uma discussão completa desse tópico, ver Garratty (1994b).

Estimulação da produção de autoanticorpo eritrocitário – farmacoindependente

Cerca de 20% dos pacientes hipertensos que tomam metildopa (Aldomet) por mais de 3 a 6 meses acabarão desenvolvendo DAT positivo, mas apenas 0,8% irão desenvolver anemia hemolítica (Petz, 1993). O DAT gradualmente torna-se negativo após a interrupção do tratamento com metildopa, embora isso possa levar meses a mais de 2 anos. Sorologicamente, autoanticorpos eluídos de eritrócitos, ou livres no soro, são indistinguíveis de autoanticorpos encontrados em pacientes com AHAQ. Em geral, os anticorpos são da classe IgG, com cadeias leves κ e λ, e muitos mostram especificidade Rh. Um mecanismo possível é que o fármaco se ligue à membrana celular e sutilmente altere a estrutura, formando neoantígenos que estimulam a formação de autoanticorpo. Cerca de 10% dos pacientes com doença de Parkinson que tomam L-dopa, um fármaco estreitamente relacionado, também desenvolvem autoanticorpos eritrocitários, mas esses casos raramente resultam em hemólise franca (Petz, 1993).

Autoanticorpos farmacodependentes

Anticorpos do tipo penicilina (mecanismo de adsorção de fármaco). Cerca de 3% dos pacientes que recebem altas doses de penicilina intravenosa (> 10–10^6 UI/dia) desenvolvem DAT positivo, embora apenas poucos desses pacientes terão anemia hemolítica (Garratty, 1993). Produtos da degradação da benzilpenicilina exibem alta afinidade de ligação pela membrana eritrocitária, o que resulta na formação de determinantes haptênicos benzilpeniciloil (BPO). Certos pacientes podem formar altos títulos de anticorpos contra metabólitos da penicilina e, em menor extensão, componentes da membrana eritrocitária. O complexo anticorpo-fármaco-eritrócito resultante produz um DAT positivo com anti-IgG. O DAT volta a tornar-se negativo dias a várias semanas após a interrupção da administração de penicilina. Em geral, tanto o soro do paciente como eluídos preparados a partir de eritrócitos do paciente reagem apenas com eritrócitos cobertos por penicilina nos testes *in vitro*.

Os anticorpos penicilínicos podem ser IgM ou IgG. Os primeiros são muito comuns se for empregado um método sensível para detecção. Os anticorpos associados a anemia hemolítica imune normalmente são do isotipo IgG (Garratty, 1993). A hemólise costuma ocorrer por destruição extravascular mediada por células do sistema RE, embora haja relatos de casos raros de hemólise intravascular mediada por complemento. Vários casos de anemia hemolítica adquirida também foram relatados em associação a cefalosporinas de primeira geração, cefalotina e cefalosporinas de última geração, por um mecanismo similar ao da penicilina.

Anticorpos da membrana celular/farmacológicos (complexo imune). Uma ampla variedade de fármacos pode causar anemia hemolítica via o chamado mecanismo do complexo imune (Tab. 34.49). No conceito unificador, esses fármacos ligam-se fracamente à membrana do eritrócito, com formação subsequente de anticorpos que reagem tanto com o fármaco como com componentes da membrana. O complexo célula-fármaco-anticorpo pode, então, estimular a ativação da cascata do complemento. Os fármacos que agem por esse mecanismo mais frequentemente estão associados a episódios de hemólise intravascular aguda, com hemoglobinemia e hemoglobinúria que podem ser fatais (Petz, 1993). O DAT nesses casos costuma ser positivo com anti-C3 apenas. Os anticorpos implicados podem ser IgM ou IgG (Brecher, 2002). Eles só podem ser detectados nos sistemas de teste em que soro ou eluído, células de teste e fármaco livre estão presentes simultaneamente. Embora o mecanismo que leve à produção de anticorpo possa ser semelhante ao da chamada adsorção de fármaco, os fármacos nessa categoria são classificados separadamente, principalmente pelo resultado do DAT (C3d+) e pela hemólise intravascular característica grave.

Adsorção não imunológica de proteínas séricas. Há relatos de que os pacientes que tomam cefalotina em altas doses (6 – 14 g/dia) por períodos prolongados desenvolvem DAT positivo, com uma frequência que varia amplamente de 3 a 81% (Garratty, 1993). A hemólise estar associada ao fenômeno é um evendo raro, se existente (Brecher, 2002). Subsequentemente, mostrou-se que eritrócitos expostos à cefalotina *in vitro* são capazes de adsorver de forma inespecífica proteínas plasmáticas e séricas (albumina, imunoglobulinas, complemento), que podem ser detectadas por soros AHG poliespecíficos no DAT. Levantou-se a hipótese de que a adsorção ocorra por causa de uma alteração nas propriedades da membrana eritrocitária induzidas pela cefalotina e por outros fármacos.

Referências bibliográficas

Agre P, Smith BL, Baumgarten R, et al: Human red cell aquaporin CHIP. Expression during normal fetal development and in a novel form of congenital dyserythropoietic anemia. J Clin Invest 1994; 94:1050–1058.

Akalin E, Neylan JF: The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. Transplantation 2003; 75:1496–1500.

Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec P-Y, et al: RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. Transfusion 2004; 44:1282–1286.

Auf der Maur C, Hodel M, Nydegger UE, Rieben R: Age dependency of ABO histo-blood group antibodies: Reexamination of an old dogma. Transfusion 1993; 33:915–918.

Avent ND: The rhesus blood group system: Insights from recent advances in molecular biology. Transfus Med Rev 1999; 13:245–266.

Ballas SK, Marcolina MJ, Crawford MN: In vitro storage and in vivo survival studies of red cells from persons with the In(Lu) gene. Transfusion 1992; 32:607–611.

Bartels CF, Zelinski T, Lockridge O: Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. Am J Hum Genet 1993; 52:928–936.

Berry-Dortch S, Woodside CH, Boral LI: Limitations of the immediate spin crossmatch when used for detecting ABO incompatibility. Transfusion 1985; 25:176–178.

Bird GWG: Lectins: A hundred years. Immunohematology 1988; 4:45–48.

Boral LI, Henry JB: The type and screen: A safe alternative and supplement in selected surgical procedures. Transfusion 1977; 17:163–168.

Boren T, Falk P, Roth KA, et al: Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science 1993; 262:1892–1895.

Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. N Engl J Med 1995; 333:364–367.

Branch DR, Petz LD: A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. Am J Clin Pathol 1982; 78:161–167.

Brecher M (ed): Technical Manual, 14th ed. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2002.
Técnicas e políticas para coleta, processamento, teste e distribuição de hemocomponentes.

Brown KE, Hibbs FR, Gallinella G, et al: Resistance to parvovirus B19 infection due to a lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). New Eng J Med 1994; 330:1192–1196.

Butch SH, Judd WJ, Steiner EA, et al: Electronic verification of donor–recipient compatibility: The computer crossmatch. Transfusion 1994; 34:105–109.

Byrne KM, Byrne PC: Review: other blood group systems-Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner–Wiener, and Indian. Immunohematology 2004; 20:50–58.

Cameron HS, Szczepaniak D, Weston BW: Expression of human chromosome 19p α (1,3) fucosyltransferase genes in normal tissues. J Biol Chem 1995; 270:20112–20122.

Caren LD, Bellavance R, Grumet FC: Demonstration of gene dosage effects on antigens in the Duffy, Ss and Rh systems using an enzyme-linked immunosorbent assay. Transfusion 1982; 22:475–478.

Carbonnet F, Hattab C, Cartron J-P, Bertrand O: Kell and Kx, two disulfide-linked proteins of the human erythrocyte membrane are phosphorylated in vivo. Biochem Biophys Res Commun 1998; 247:569–575.

Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, et al: Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. Vox Sang 1998; 74:29–64.

Chan A, Chan JC, Wong LY et al: From maximum surgical blood ordering schedule to unlimited computer crossmatching: evolution of blood transfusion for surgical patients at a tertiary hospital in Hong Kong. Transf Med 1996; 6:121–124.

Chaudhuri A, Nielsen S, Elkjaer ML, et al: Detection of Duffy antigens in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. Blood 1997; 89:701–712.

Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, et al: Organization of the gene (RHCE) encoding the blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. Genomics 1994; 19:68–74.

Code of Federal Regulations: Title 21 – Food and Drugs, Part 606, Subpart H-Laboratory Controls. Washington, DC, US Government Printing Office, 2001a.

Code of Federal Regulations: Title 21 – Food and Drugs, Part 660, Subpart F – Anti-human globulin. Washington, DC, US Government Printing Office, 2001b.

Cooling LL, Kelly K: Inverse expression of P^k and Luke blood group antigens on human RBCs. Transfusion 2001; 41:898–907.

Cooling LLW, Koerner TAW, Naides SS: Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19: J Infect Dis 1995; 172:1198–1205.

Cooling LLW, Walker KE, Gille T, Koerner TAW: Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (P^k antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. Infect Immun 1998; 66:4355–4366.

Cooling L, Hwang D, Gu Y: Globoside synthase can regulate Pk and LKE expression on human RBC: evidence for the P^k-variant phenotype among some LKE-weak and LKE-negative donors [abstract]. Transfusion 2003a; 43:SP194.

Cooling LLW, Zhang D-S, Naides SJ, Koerner TAW. Glycosphingolipid expression in acute nonlymphocytic leukemia: common expression of shiga toxin and parvovirus B19 receptors on early myeloblasts. Blood 2003b; 101:711–721.

Coombs RRA, Mourant AE, Race RR: A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br J Exp Pathol 1945; 26:255–266.

Cordle DG, Strauss RG, Snyder EL, et al: Safety and cost containment data that advocate abbreviated pretransfusion testing. Am J Clin Pathol 1990; 94:428–431.

Cox C, Enno S, Deveridge S, et al: Remote electronic blood release system. Transfusion 1997; 37:960–964.

Crew VK, Green C, Daniels G: Molecular bases of the antigens of the Lutheran blood group system. Transfusion 2003; 43:1729–1737.

Curnutte J, Bemiller L: Chronic granulomatous disease with McLeod phenotype: An uncommon occurrence [abstract]. Transfusion 1995; 35:S239 1995.

Daniels G: Human Blood Groups, 2nd ed. Oxford, UK, Blackwell Science, 2002.
Resume cada sistema de grupo sanguíneo, incluindo sorologia, bioquímica e base molecular dos principais sistemas de antígeno de grupo sanguíneo.

Edwards JM, Moulds JJ, Judd WJ: Chloroquine dissociation of antigen–antibody complexes: A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. Transfusion 1982; 22:59–61.

El Nemer W, Rahuel C, Colin Y, et al: Organization of the human LU gene and molecular basis of the Lu^a/Lu^b blood group polymorphism. Blood 1997; 89:4608–4616.

El Nemer W, Gane P, Colin Y, et al: The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesion molecules. J Biol Chem 1998; 273:16686–16693.

Ellison RC, Zhang Y, Myers RH, et al: Lewis blood group phenotype as an independent risk factor for coronary heart disease (The NHLBI Family Heart Study). Am J Cardiol 1999; 83:345–348.

Englefriet CP, Overbeeke MAM, von dem Borne AEG: Autoimmune hemolytic anemia. Semin Hematol 1992; 29:3–12.

Eyers SAC, Ridgwell K, Mawby WJ, Tanner MJA: Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group related polypeptides. J Biol Chem 1994; 269:6417–6423.

Fabijanska-Mitek J, Lopienska H, Zupanska B: Gel test application for IgG subclass detection in auto-immune haemolytic anaemia. Vox Sang 1997; 72:233–237.

Fernandez-Mateos P, Cailleau A, Henry S, et al: Point mutations and deletion responsible for the Bombay H null and the Reunion H weak blood groups. Vox Sang 1998; 75:37–46.

Freedman J, Semple JW: Complement in transfusion medicine. *In* Garraty G (ed): Immunobiology of Transfusion Medicine. New York, Marcel Dekker, 1994, pp 403–434.

Friedman BA, Oberman HA, Chadwick AR, et al: The maximum surgical blood order schedule and surgical blood use in the United States. Transfusion 1976; 16:380–387.

O padrão histórico para o projeto, o uso e a implementação do MSBOS para solicitação de sangue.

Fukuda M: HEMPAS disease: Genetic defect of glycosylation. Glycobiology 1990; 1:9–15.

Fukuda M, Dell A, Oates JE, Fukuda MN: Structure of branched lactosaminoglycan, the carbohydrate moiety of band 3 isolated from adult human erythrocytes. J Biol Chem 1984; 259:8260–8273.

Fukuma N, Akimitsu N, Hamamoto H, et al: A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. Biochem Biophys Res Comm 2003; 303:137–139.

Gamma Biologicals, Inc: Gamma-Quin chloroquine diphosphate solution for removal of red-cell-bound immunoglobulin – directions for use. Houston, TX, Gamma Biologicals, Inc., 2001.

Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, et al: The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. Biochem Biophys Res Comm 2004; 321:306–312.

Garratty G: Immune cytopenia associated with antibiotics. Transfus Med Rev 1993; 7:255–267.

Garratty G: Do blood groups have a biological role? *In* Garratty G (ed): Immunobiology of Transfusion Medicine. New York, Marcel Dekker, 1994a, pp 201–255.

Garratty G: Review: Immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests caused by drugs. Immunohematology 1994b; 10:41–50.

Garratty G, Issitt PD, Lublin DM, et al: Terminology for blood group antigens and genes – historical origins and guidelines in the new millennium. Transfusion 2000; 40:L477–489.

George T, Boyd B, Price M, et al: MHC class II proteins contain a potential binding site for the verotoxin receptor glycolipid CD77. Cell Mol Biol 2001; 47:1179–1185.

Ghislain J, Lingwood CA, Fish EN: Evidence for glycosphingolipid modification of the type 1 IFN receptor. J Immunol 1994; 153:3655–3663.

Giles CM: Three Chido determinants detected on the B5Rg+ allotype of human C4: their expression in Ch-typed donors and families. Human Immunol 1987; 18:111–112.

Giles CM, Uring-Lambert B, Goetz J, et al: Antigenic determinants expressed by human C4 allotypes; a study of 325 families provides evidence for the structural antigenic model. Immunogenetics 1988; 27:442–448.

Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, et al: Identification of the Dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. Blood 2000; 96:2621–2627.

Hadley TJ, Peiper SC: From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. Blood 1997; 89:3077–3091.

Hakomori S: Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: Chemistry, polymorphism, and their developmental change. Semin Hematol 1981; 18:39–62.

Harmening DM, Firestone D: The ABO blood group system. *In* Harmening DM (ed): Modern Blood Banking and Transfusion Practices, 4th ed. Philadelphia, FA Davis, 1999, pp. 90–125.

Hauser R: Le^a and Le^b tissue glycosphingolipids. Transfusion 1995; 35:577–581.

Heddle NM, O'Hoski P, Singer J, et al: A prospective study to determine the safety of omitting the antiglobulin crossmatch from pretransfusion testing. Br J Haematol 1992; 81:579–584.

Hellberg A, Poole J, Olsson ML: Molecular basis of the globoside-deficient P^k blood group phenotype. J Biol Chem 2002; 277:29455–29459.

Henry JB, Mintz PD, Webb W: Optimal blood ordering for elective surgery. JAMA 1977; 237:451.

Hermand P, Gane P, Mattei MG, et al: Molecular basis and expression of the LW^a/LW^b blood group polymorphism. Blood 1995; 86:1590–1594.

Hilton E, Chandrasekaran V, Rindos P, Isenberg HD: Association of recurrent candidal vaginitis with inheritance of Lewis blood group antigens. J Infect Dis 1995; 172:1616–1619.

Ho M, Chelly J, Carter N, et al: Isolation of the gene for McLeod syndrome that encodes a novel membrane transport protein. Cell 1994; 77:869–880.

Hoeltge GA, Domen RE, Rybicki LA, et al: Multiple red cell transfusions and alloimmunization. Arch Pathol Lab Med 1995; 119:42–45.

Huang CH, Blumenfeld O: MNSs blood groups and major glycophorins. *In* Carton JP, Rouger P (eds): Blood Cell Biochemistry, Vol 6: Molecular Basis of Human Blood Group Antigens. New York, Plenum Press, 1995, pp. 153–188.

Hughes-Jones NC, Gardner B, Lincoln P: Observations of the number of available c, D, e, and E antigen sites on red cells. Vox Sang 1971; 21:210–216.

Inaba N, Hiruma T, Togayachi A, et al: A novel I-branching β1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase involved in human blood group I antigen expression. Blood 2003; 101:2870–2876.

Issitt PD, Anstee DJ: Applied Blood Group Serology, 4th ed. Durham, NC, Montgomery Scientific Publications, 1998.

Texto abrangente detalhando a história, a sorologia, as associações com doença e o possível papel biológico dos antígenos e dos anticorpos de grupo sanguíneo.

Iwamura K, Furukawa K, Uchikawa M, et al: The blood group P_1 synthase gene is identical to the Gb3/CD77 synthase gene. J Biol Chem 2003; 278:44429–44438.

Iwamoto S, Li J, Sugimoto N, et al: Characterization of the Duffy gene promoter: Evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. Biochem Biophys Res Commun 1996; 222:852–859.

Iwamoto S, Omi T, Yamasaki M, et al: Identification of 5′ flanking sequence of RH50 gene and the core region for erythroid-specific expression. Biochem Biophys Res Commun 1998; 243:233–240.

Jacewicz MS, Acheson DWK, Mobassaleh M, et al: Maturational regulation of globotriaosylceramide, the shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. J Clin Invest 1995; 96:1328–1335.

Jarolim P, Rubin HL, Storry J, Reid ME: Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. Blood 1998; 92:4836–4843.

Judd WJ: Are there better ways than the crossmatch to demonstrate ABO incompatibility? Transfusion 1991; 31:192–194.

Judd WJ: Methods in Immunohematology, 2nd ed. Durham, NC, Montgomery Scientific Publications, 1994.

Judd WJ: Testing for unexpected red cell antibodies – two or three reagent red cell samples. Immunohematology 1997 13:90–92.

Judd WJ: Requirements for the electronic crossmatch. Vox Sang 1998; 74:409–417.

Resume os regulamentos federais, as exigências de informática e as questões de implementação para a prova de reação cruzada eletrônica.

Judd WJ: Red blood cell immunology and compatibility testing. *In* Simon TL, Dzik WH, Snyder EL (eds): Rossi's Principles of Transfusion Medicine, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2002, pp 69–88.

Judd WJ, Walter WJ, Steiner EA: Clinical and laboratory findings on two patients with naturally occurring anti-Kell agglutinins. Transfusion 1981; 21:184–188.

Judd WJ, Steiner EA, O'Donnell DB, et al: Discrepancies in reverse ABO typing due to prozone: How safe is the immediate-spin crossmatch? Transfusion 1988; 28:334–338.

Karpman D, Papdopoulou D, Nilsson K, et al: Platelet activation by shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. Blood 2001; 97:3100–3108.

Kay MMB: Cellular and molecular biology of senescent antigen. *In* Garratty G (ed): Immunobiology of Transfusion Medicine. New York, Marcel Dekker, 1994, pp 173–198.

Kelly RJ, Ernst LK, Larsen RD, et al: Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:5843–5847.

Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, et al: Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group α (1,2) fucosyltransferase gene (FUT2). J Biol Chem 1995; 270:4640–4649.

Knepper MA: The aquaporin family of molecular water channels. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6255–6258.

Knezevic-Maramica I, Kruskall MS: Intravenous immune globulins: an update for clinicians. Transfusion 2003; 43:1460–1480.

Koda Y, Soejima M, Sato H, et al: Three-base deletion and one-base insertion of the α(1,4)galactosyltransferase gene responsible for the p phenotype. Transfusion 2002; 42:48–51.

Kornstad L, Heisto H: The frequency of formation of Kell antibodies in recipients of Kell-positive blood. *In* Proceedings of the 6th Congress of the European Society of Haematology Copenhagen, 1958, pp 754–758.

Kovbasnjuk O, Edidin M, Donowitz M: Role of lipid rafts in shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. J Cell Science 2001; 114:4025–4031.

Kroviarski Y, El Nemer W, Gane P, et al: Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin. Br J Haematol 2004; 126:255–264.

Kundu SK, Steane SM, Bloom JEC, Marcus DM: Abnormal glycolipid composition of erythrocytes with a weak P antigen. Vox Sang 1978; 35:160–167.

Kundu SK, Evans A, Rizvi J, et al: A new P^k phenotype in the P blood group system. J Immunol 1980; 7:431–439.

Landsteiner K, Wiener AS: An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol Med 1940; 43:223–224.

Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al: The gel test: A new way to detect red cell antigen–antibody reactions. Transfusion 1990; 30:109–113.

Lee JS, Frevert CW, Wurfel MM, et al: Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. J Immunol 2003a; 170:5244–5251.

Lee S: Molecular basis of Kell blood group. Vox Sang 1997; 73:1–11.

Lee S, Lin M, Mele A, et al: Proteolytic processing of big endothelin-3 by the Kell blood group protein. Blood 1999; 94:1440–1450.

Lee S, Russo DCW, Reid ME, Redman CM: Mutations that diminish expression of Kell surface protein and lead to the Kmod RBC phenotype. Transfusion 2003b; 43:1121–1125.

Levine P, Stetson RE: An unusual case of intragroup agglutination. JAMA 1939; 113:126.

Lewis VN, Martin S: Fundamentals of immunology for blood bankers. *In* Harmening DM (ed): Modern Blood Banking and Transfusion Practices, 4th ed. Philadelphia, FA Davis, 1999, pp 36–70.

Li J, Iwamoto S, Sugimoto N, et al: Dinucleotide repeat in the 3′ flanking region provides a clue to the molecular evolution of the Duffy gene. Hum Genet 1997; 99:573–577.

Li Y, Camp S, Rachinsky TL, et al: The gene structure of mammalian acetylcholinesterase. J Biol Chem 1991; 266:23083–23090.

Lindahl G, Sjobring U, Johnsson E: Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. Curr Opin Immunol 2000; 12:44–51.

Lindstrom K, Breimer ME, Jovall P-A, et al: Non-acid glycosphingolipid expression in plasma of an A_1 Le(a–b+) secretor human individual: Identification of an ALe^b heptaglycosylceramide as major blood group component. J Biochem 1992; 111:337–345.

Low PS: Structure and function of the cytoplasmic domain for band 3: Center of erythrocyte membrane–peripheral protein interactions. Biochim Biophys Acta 1986; 864:145–167.

Lowe JB: Carbohydrate-associated blood group antigens: The ABO, H/Se, and Lewis loci. *In* Garratty G (ed): Immunobiology of Transfusion Medicine. New York, Marcel Dekker, 1994, pp 3–36.

Lucien N, Sidoux-Walter F, Olives B, et al: Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein. J Biol Chem 1998; 273:12973–12980.

Lucien N, Sidoux-Walter F, Roudier N, et al: Antigenic and functional properties of the human red blood cell urea transporter hUT-B1. J Biol Chem 2002; 277:34101–34108.

Ma T, Yang B, Gillespie AN, et al: Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. J Biol Chem 1998; 273:4296–4299.

Maffei LM, Johnson ST, Shulman IA, Steiner EA: Survey on pretransfusion testing. Transfusion 1998; 38:343–349.

Mallory D (ed): Immunohematology Methods, 1st ed. Rockville, MD, The American National Red Cross, 1993.

Mangeney M, Richard Y, Coulaud D, et al: CD77: An antigen of germinal center B cells entering apoptosis. Eur J Immunol 1991; 21:1131–1140.

Masouredis SP, Sudora E, Mahan L, et al: Quantitative immunoferritin microassay of Fy^a, Fy^b, Jk^a, V and Di^b antigen site numbers on human red cells. Blood 1980; 56:969–977.

Masson P, Froment MT, Sorenson RC, et al: Mutation His322Asn in human acetylcholinesterase does not alter electrophoretic and catalytic properties of the erythrocyte enzyme. Blood 1994; 83:3003–3005.

Mathai JC, Mori S, Smith BL, et al: Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. J Biol Chem 1996; 271:1309–1313.

Medof ME, Lublin DM, Holers VN, et al: Cloning and characterization of cDNAs encoding the complete sequence of decay-accelerating factor of human complement. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:2007–2011.

Mintz PD, Haines AL, Sullivan MF: Incompatible crossmatch following nonreactive antibody detection test: Frequency and cause. Transfusion 1982; 22:107–110.

Mollicone R, Reguigne I, Kelly RJ, et al: Molecular basis for Lewis α (1,3/4)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT3) found in Lewis-negative Indonesian pedigrees. J Biol Chem 1994; 269:20987–20994.

Mollison PL: Further observations on the patterns of clearance of incompatible red cells. Transfusion 1989; 39:347–354.

Mollison PL, Englefriet CP, Contreras M: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 9th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993.

Moon C, Preston GM, Griffin CA, et al: The human aquaporin-CHIP gene. J Biol Chem 1993; 268:15772–15778.

Moulds JM, Hayes S, Wells TD: DNA analysis of Duffy genes in American blacks. Vox Sang 1998; 74:248–252.

Moulds JM, Zimmerman PA, Doumbo OK, et al: Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. Blood 2001; 97:2879–2885.

Moulds JM, Zimmerman PA, Doumbo OK, et al: Expansion of the Knops blood group system and subdivision of Sl^a. Transfusion 2002; 42:251–256.

Moulds JM, Doumbo TO, Lyke DKE, et al: Identification of the Kn^a/Kn^b polymorphism and a method for Knops genotyping. Transfusion 2004; 44:164–169.

Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K: The Distribution of the Human Blood Groups and Other Biochemical Polymorphisms, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 1976.

Nance ST: Applications of flow cytometry in blood transfusion science. *In* Moore SB (ed): Progress in Immunohematology. Arlington, VA, American Association of Blood Banks, 1988, pp 1–30.

Navenot JM, Muller JY, Blanchard D: Expression of blood group i antigen and fetal hemoglobin in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Transfusion 1997; 37:291–297.

Ness PM, Shirey RS, Thomas SK, et al: The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: Incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. Transfusion 1990; 30:688–693.

Nester TA, Rumsey DM, Howell CC, et al: Prevention of immunization to D+ red blood cells with red blood cell exchange and intravenous RH immune globulin. Transfusion 2004; 44:1720–1723.

Okajima T, Nakamura Y, Uchikawa M, et al: Expression cloning of human globoside synthase cDNAs. J Biol Chem 2000; 275:40498–40503.

Olives B, Martial S, Mattei M-G, et al: Molecular characterization of a new urea transporter in the human kidney. FEBS Lett 1996; 386:156–160.

Olsson ML, Thuresson B, Chester MA: An A^{el} allele-specific nucleotide insertion at the blood group ABO locus and its detection using a sequence specific polymerase chain reaction. Biochem Biophys Res Commun 1995; 216:642–647.

Olsson ML, Irshaid NM, Maaf-Hosseini B, et al: Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. Blood 2001; 98:1585–1593.

Parsons SF, Mallinson G, Judson PA, et al: Evidence that the Lu^b blood group antigen is located on red cell membrane glycoproteins of 85 and 78 kd. Transfusion 1987; 27:61–63.

Parsons SF, Lee G, Spring FA, et al: Lutheran blood group and its newly characterized mouse homologue specifically bind α5 chain-containing human laminin with high affinity. Blood 2001; 97:312–320.

Petz LD: Drug-induced autoimmune hemolytic anemia. Transfus Med Rev 1993; 8:242–254.

Poole J, Banks J, Bruce LJ, et al: Glycophorin A mutation Ala65→Pro gives rise to a novel pair of MNS alleles ENEP (MNS39) and HAG (MNS41) and altered Wr^b expression: Direct evidence for GPA/band 3 interaction necessary for normal Wr^b expression. Transfus Med 1999; 9:167–174.

Prasad AS: Acquired hemolytic anemias. *In* Bick RL (ed): Hematology: Clinical and Laboratory Practice, 1st ed, Vol I. St Louis, Mosby, 1993, pp 391–407.

Race RR: The Rh genotypes and Fisher's theory. Blood 1948; 3:27–42.

Race RR, Sanger R: Blood Groups in Man, 6th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1975.

Rahuel C, Elouet J-F, Cartron J-P: Post-transcriptional regulation of the cell surface expression of glycophorins A, B, and E. J Biol Chem 1994; 269:32752–32758.

Rahuel C, Le Van Kim C, Mattei MG, et al: A unique gene encodes spliceoforms of the B-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein. Blood 1996; 88:1865–1872.

Rao N, Telen MJ: Lutheran antigens, Lutheran regulatory genes and Lutheran regulatory gene targets. *In* Cartron JP, Rouger P (eds): Blood Cell Biochemistry, Vol 6: Molecular Basis of Human Blood Group Antigens. New York, Plenum Press, 1995, pp 281–297.

Reid ME: The Dombrock blood group system: a review. Transfusion 2003a; 43:107–114.

Reid RE, Lomas-Francis C: The Blood Group Antigen Facts Book, 2nd ed. San Diego, CA, Elsevier Academic Press, 2004b.

Uma lista sucinta dos testes sorológicos e moleculares exigidos para cada anticorpo e antígeno de grupo sanguíneo.

Reid ME, Hue-Roye K, Powell V, et al: ZENA: A new high prevalence Cromer blood group antigen [abstract]. Transfusion 2004a; 44S:26A.

Reid ME, Storry JR, Hue-Roye K, et al: SERF: A new high prevalence antigen in the Cromer blood group system [abstract]. Transfusion 2003b; 43S:6A.

Ridgwell K, Eyers SAC, Mawby W, et al: Studies on the glycoprotein associated with Rh (rhesus) blood group antigen expression in the human red blood cell membrane. J Biol Chem 1994; 269:6410–6416.

Rieben R, Buchs JP, Fluckiger E, Nydegger UE: Antibodies to histo-blood group substances A and B: Agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. Transfusion 1991; 31:607–615.

Roitt I, Delves PJ: Roitt's Essential Immunology, 10th ed. Oxford; Malden, MA: Blackwell Science Ltd., 2001.

Roudier N, Verbavatz J-M, Maurel C, et al: Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. J Biol Chem 1998; 273:8407–8412.

Roubinet F, Despiau S, Calafell F, et al: Evolution of the O alleles of the human ABO blood group gene. Transfusion 2004; 44:707–715.

Russo D, Redman C, Lee S: Association of XK and Kell blood group proteins. J Biol Chem 1998; 273:13950–13956.

Russo DCW, Lee S, Reid ME, Redman CM: Point mutations causing the McLeod phenotype. Transfusion 2002; 42:287–293.

Säfwenberg J, Högman CF, Cassemar B: Computerized delivery control – a useful and safe complement to the type and screen compatibility testing. Vox Sang 1997; 72:162–168.

Salama A, Mueller-Eckhardt C: Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. Semin Hematol 1992; 29:54–63.

Segerer S, Bohmig GA, Exner M, et al: When renal allografts turn DARC: Transplantation 2003; 75:1030–1034.

Sheinfeld J, Schaeffer AJ, Cordon-Cardo C, et al: Association of the Lewis blood group phenotype with recurrent urinary tract infections in women. N Engl J Med 1989; 320:773–777.

Shirey RS, Edwards RE, Ness PM: The risk of alloimmunization to c (Rh4) in R_1R_1 patients who present with anti-E. Transfusion 1994; 34:756–758.

Shirey RS, Mirabella DC, Lumadue JA, Ness PM: Differentiation of anti-D, -C, and -G: Clinical relevance in alloimmunized pregnancies. Transfusion 1997; 37:493–496.

Shulman IA: The risk of an overt hemolytic transfusion reaction following the use of an immediate spin crossmatch. Arch Pathol Lab Med 1990; 114:412–414.

Shulman IA, Nelson JM, Lam HT, et al: Additional limitations of the immediate spin crossmatch to detect ABO incompatibility [Letter]. Am J Clin Pathol 1987; 87:677.

Shulman IA, Downes KA, Sazama K, et al: Pretransfusion compatibility testing for red blood cell administration. Curr Opin Hematol 2001; 8:397–404.

Silva MA (Committee chair): Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 23rd ed. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2004.

Padrões reguladores que determinam a coleta, o teste, o processamento, a distribuição, a transfusão e o rastreamento de hemocomponentes.

Simpson PP, Hall PE: The antiglobulin test. *In* Harmening DM (ed): Modern Blood Banking and Transfusion Practices, 4th ed. Philadelphia, FA Davis, 1999, pp 71–78.

Smith BL, Preston GM, Spring FA, et al: Human red cell aquaporin CHIP. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. J Clin Invest 1994; 94:1043–1049.

Solovey A, Lin Y, Browne P, et al: Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. N Engl J Med 1997; 337:1584–1590.

Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ: The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. Blood 1999; 93:4425–4435.

Spitalnik PF, Spitalnik SL: The P blood group system: Biochemical, serological and clinical aspects. Transfus Med Rev 1995 9:110–122.

Spitalnik S, Pfaff W, Cowles J, et al: Correlation of humoral immunity to Lewis blood group antigens with renal transplant rejection. Transplant 1984; 37:265–268.

Steffensen R, Carlier K, Wiels J, et al: Cloning and expression of the histo-blood group P^k UDP-galactose: Galβ1-4Glcβ1-1Cer α1,4 galactosyltransferase. J Biol Chem 2000; 275:16723–16729.

Storry JR, Reid ME: The Cromer blood group system: a review. Immunohematology 2002 18:95–103.

Su YY, Gordon CT, Ye TZ, et al: Human ERMAP: An erythroid adhesion/receptor transmembrane protein. Blood Cells Mol and Dis 2001 27:938–949.

Takada A, Ohmori K, Yoneda T, et al: Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. Cancer Res 1993; 53:354–561.

Tanner MJA: Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1). Semin Hematol 1993; 30:34–57.

Tournamille C, Kim CLV, Gane P, et al: Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy^x individuals. Blood 1998; 92:2147–2156.

Van Deenen LLM, de Grier J: Lipids of the red cell membrane. *In* Surgenor DM (ed): The Red Cell Membrane, 2nd ed. New York, Academic Press, 1974, pp 147–156.

Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, et al: Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. N Engl J Med 1998; 338:798–803.

Virella G, Bierer BE: The induction of an immune response: antigens, lymphocytes, and accessory cells. *In* Virella G (ed): Medical Immunology, 5th ed. New York, Marcel Dekker, Inc., 2001, pp 51–76.

Vollrath B, Fitzgerald KJ, Leder P: A murine homologue of the *Drosophila* brainiac gene shows homology to glycosyltransferases and is required for preimplantation development of the mouse. Mol Cell Biol 2001; 21:5688–5697.

Wagner FF, Flegel WA: Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. Immunohematology 2004; 20:23–36.

Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al: Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93:385–393 1999.

Wagner T, Bernascher G, Geissler K: Inhibition of megakaryocytopoiesis by Kell-related antibodies [letter]. New Engl J Med 2000; 343:72.

Wagner FF, Poole J, Flegel WA: Scianna antigens including Rd are expressed by ERMAP. Blood 2003; 101:752–757.

Wasniowska K, Lisowska E, Halverson GR, et al: The Fy^a, Fy6 and Fy3 epitopes of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy3 epitope. Br J Haematol 2004; 124:118–122.

Westhoff CM, Sipherd BD, Wylie DE, Toalson LD: Severe anaphylactic reactions following transfusions of platelets to a patient with anti-Ch. Transfusion 1992; 32:576–579.

Weston BW, Nair RP, Larsen RD, Lowe JB: Isolation of a novel human α (1,3) fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group α (1,3/4) fucosyltransferase gene. J Biol Chem 1992; 267:4152–4160.

Worel N, Kalhs P, Keil F, et al. ABO mismatch increases transplant-related morbidity and mortality in patients given nonmyeloablative allogeneic HPC transplantation. Transfusion 2003; 43:1153–1161.

Wright MS, Issitt PD: Anticomplement and the indirect antiglobulin test. Transfusion 1979; 19:688–694.

Yamamoto FI: Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. Vox Sang 1995; 69:1–7.

Yamamoto FI, Hakomori SI: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. J Biol Chem 1990; 265:19257–19262.

Yang Z, Bergstrom J, Karlsson K-A: Glycoproteins with Galα 1-4Gal are absent from human erythrocyte membranes, indicating that glycolipids are the sole carriers of P blood group activities. J Biol Chem 1994; 269:14620–14624.

Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, et al: Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. Transfusion 2000; 40:310–320.

Yesus YW, Akhter JE: Hemolytic disease of the newborn due to anti-C and anti-G masquerading as anti-D. Am J Clin Pathol 1985; 84:769–772.

Yu L-C, Yang Y-H, Broadberry RE, et al: Correlation of a missense mutation in the human secretor α 1,2-fucosyltransferase gene with the Lewis (a+b+) phenotype: A potential molecular basis for the weak secretor allele (Se^w). Biochem J 1995; 312:329–332.

Yu L-C, Twu Y-C, Cou M-L, et al: The molecular genetics of the human I locus and molecular background explain the partial association of the adult I phenotype with congenital cataracts. Blood 2003; 101:2081–2092.

Zimmerman PA, Fitness J, Moulds JM, et al: CR1 Knops blood group alleles are not associated with severe malaria in the Gambia. Genes Immunity 2003; 4:368–373.

CAPÍTULO 35

Medicina de transfusão

Robertson D. Davenport MD, Paul D. Mintz MD

Aspectos gerais 775
Coleta de sangue 776
Produção de componentes do sangue 777
- Hemácias 777
- Plasma 777
- Fator anti-hemofílico crioprecipitado 778
- Concentrados de plaquetas 778
- Componentes leucocitários 778
- Componentes do sangue com redução de leucócitos 778
- Componentes especiais 778
- Redução de patógenos 779

Seleção de componentes do sangue 779
- Hemácias 779
- Plaquetas 780

Teste pré-transfusional 780
Administração da transfusão 781
- Terapia com componentes do sangue 782
- Transfusão em massa 784
- Transfusão neonatal e pediátrica 784

Reações transfusionais 785
- Reações não hemolíticas febris 785
- Reações alérgicas 785
- Reações alérgicas (anafiláticas) severas 786
- Reações hemolíticas agudas 786
- Reações hemolíticas tardias 787
- Contaminação bacteriana dos componentes do sangue 787
- Lesão pulmonar aguda associada à transfusão (TRALI) 787
- Doença do enxerto *versus* hospedeiro 788
- Reações hipotensivas 789
- Hemólise não imune 789
- Sobrecarga circulatória associada à transfusão 789
- Doença transmitida por transfusão 789

Conclusão 791
Referências bibliográficas 791

PONTOS-CHAVE

- Os critérios de elegibilidade de doadores de sangue são estabelecidos pelo FDA com o objetivo de minimizar riscos, tanto para o doador como para o receptor da transfusão.
- Os componentes do sangue (hemácias, concentrados de plaquetas, plasma fresco congelado, crioprecipitados) são manufaturados e armazenados, de modo a minimizar a perda funcional dos constituintes de interesse.
- A redução de leucócitos dentre os componentes do sangue diminui a aloimunização aos antígenos do HLA, a transmissão de CMV e a ocorrência de reações febris. A irradiação dos componentes do sangue pode prevenir a doença do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH).
- A identificação acurada da amostra de sangue pré-transfusional e do receptor pretendido constitui a etapa mais importante da prevenção de reações transfusionais hemolíticas agudas.
- A transfusão restritiva de hemácias (concentração-alvo de hemoglobina [Hb] igual a 7–9 g/dL) está associada à melhora da sobrevida em pacientes criticamente doentes com menos de 55 anos de idade ou que apresentam pontuações mais baixas de APACHE II.
- A transfusão de plaquetas, em geral, é indicada para casos de sangramento microvascular, contagens plaquetárias < 10.000/mL ou contagens plaquetárias < 50.000/mL antes da realização de um procedimento invasivo.
- A falha em responder à transfusão de plaquetas pode ter causa imune (anticorpos plaqueta-específicos ou HLA), causa não imune clínica (sangramento, esplenomegalia, DIC, medicamentos) ou causas especificamente relacionadas ao produto (incompatibilidade ABO, idade do componente).
- A transfusão de plasma geralmente é indicada para casos de deficiência de fator de coagulação, DIC, coagulopatia por diluição, reversão urgente de Coumadin e TTP.
- Os efeitos adversos potencialmente severos da transfusão incluem reações hemolíticas, reações alérgicas, lesão pulmonar aguda associada à transfusão, contaminação bacteriana e DEVH.
- Atualmente, os riscos de transmissão transfusional de HIV ou hepatite são bastante baixos, contudo, os riscos de transmissão de outras doenças (CMV, parvovírus B-19, vírus West Nile) via transfusão podem ser significativos em algumas populações.

Aspectos gerais

A medicina de transfusão (MT) é uma especialidade multidisciplinar que abrange todos os aspectos envolvendo a doação de sangue, preparo de componentes do sangue, sorologia de células sanguíneas e terapia de transfusão de sangue. O termo "banco de sangue" tem sido amplamente substituído por medicina de transfusão, para enfatizar a importância da assistência ao paciente e dos resultados clínicos.

Em termos operacionais, a MT se divide em centros de sangue e serviços de transfusão. Os centros recrutam e coletam sangue de doadores, bem como manufaturam e distribuem os componentes do sangue. Os serviços de transfusão realizam provas de reação cruzada pré-transfusionais, selecionam e providenciam componentes sanguíneos para os pacientes e fornecem suporte médico para transfusões de sangue. A maioria dos serviços de transfusão hospitalares não coleta seu próprio sangue e, em vez disso, contam com os centros de sangue regionais.

Os centros de sangue e os serviços de transfusão (coletivamente conhecidos como estabelecimentos do sangue) são regulados pelo Food and Drug Administration (FDA). Todos os estabelecimentos devem ser registrados junto ao FDA, enquanto os centros que manufaturam componentes sanguíneos devem ser licenciados. É o FDA que define todos os critérios de aceitabilidade para doadores de sangue, desempenho de testes pré-transfusionais, manufaturamento de componentes sanguíneos, testes para detecção de doenças infecciosas em doadores e avaliação e relato de eventos adversos associados à transfusão. Os estabelecimentos de sangue estão sujeitos a inspeções periódicas do FDA sem aviso prévio. A adequação aos regulamentos federais é um aspecto essencial da MT. Organizações profissionais, como AABB, College of American Pathologists (CAP) e Joint Commission

on the Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO), possuem padrões de acreditação destinados aos serviços de transfusão e realizam inspeções com pares voluntários.

Coleta de sangue

Aproximadamente 60% da população adulta dos EUA é elegível para doar sangue, embora apenas cerca de 5% o façam a cada ano. São coletados, aproximadamente, 15 milhões de unidades de sangue total e hemácias por ano nos EUA. Em teoria, todos os doadores são voluntários e não recebem recompensas. Em média, os doadores de sangue são indivíduos do sexo masculino, com grau de instrução de nível superior, estão na faixa de 30 a 50 anos de idade, são casados e possuem renda acima da média. Entretanto, tem havido um crescimento do número de doações provenientes de mulheres e de grupos minoritários. À medida que aumenta a utilização de componentes do sangue e as exigências de seleção para os doadores se tornam mais rígidas, o recrutamento de novos doadores passa a ser crítico para assegurar um suprimento adequado de sangue.

Os critérios exigidos dos doadores são estabelecidos visando a garantir a proteção tanto do doador de sangue como do receptor da transfusão. Os atuais (2006) critérios de qualificação de doadores adotados estão listados na Tabela 35.1. Os itens que visam a proteger o doador são: a idade mínima de 17 anos, peso mínimo de 49,9 kg, sinais vitais normais, concentração mínima de Hb e intervalo de tempo (especificado) entre doações. Os critérios a serem observados para garantir a proteção do receptor são: história ou fatores de risco para transmissão de doença infecciosa (hepatite, HIV, malária, entre outras), risco de bacteremia, ingestão de certas medicações e história de malignidade. Os centros de sangue devem manter um registro de doadores deferidos e, antes de receber qualquer doação, é necessário checar se o doador está incluído nesse registro. É típico conceder ao doador uma oportunidade de indicar confidencialmente que sua doação não deve ser utilizada para fins de transfusão (autoexclusão). Por fim, cada doação deve ser testada quanto à presença de marcadores de doenças infecciosas, conforme as regulamentações do FDA. As atuais (2006) exigências do teste de doadores são listadas na Tabela 35.2.

O sangue deve ser coletado de modo a minimizar o risco de contaminação por bactérias. A pele e o sítio de punção venosa devem ser preparados por esfregação e lavagem com agente antibacteriano. Em seguida, o sangue total é coletado em bolsas estéreis contendo anticoagulante, as quais são presas a bolsas-satélite para facilitar a manufaturação do componente num sistema fechado. A velocidade do fluxo sanguíneo deve ser suficiente para prevenir a formação de coágulos durante a flebotomia. O volume de sangue retirado corresponde a menos de 10% do volume total de sangue estimado do doador. Normalmente, as doações de sangue total são de 450 ou 500 mL.

Os componentes do sangue também podem ser coletados por aférese. A vantagem da doação por aférese é a possibilidade de obter um volume maior dos componentes de interesse a partir de uma única doação. A doação por aférese é mais comumente realizada para coleta de plaquetas (plaquetas de doador único). O plasma também pode ser coletado dessa forma, tipicamente ao mesmo tempo que as plaquetas. A doação por aférese permite a coleta de duas unidades de hemácias a partir de doadores adequados. Também é possível coletar leucócitos por aférese. Nesse caso, a coleta é mais comumente realizada para obtenção de células progenitoras hematopoéticas para transplantação autóloga ou alogênica. Granulócitos e células mononucleares podem ser coletadas por aférese para fins especiais.

A doação autóloga consiste na coleta de sangue de um paciente antes da realização de uma cirurgia previamente agendada, para transfusão durante ou após a realização do procedimento, com o intuito de compensar a perda sanguínea esperada. A transfusão autóloga evita a transmissão de patógenos transmissíveis pelo sangue oriundos de doadores alogênicos, sendo preferida por certos pacientes. Contudo, não é totalmente isenta de risco, principalmente no que se refere à contaminação bacteriana. Ainda é controverso se a transfusão autológa verdadeiramente reduz (ou não) a necessidade de uma transfusão alogênica, ou se melhora o resultado apresentado pelo paciente. Nenhum benefício – em termos de redução da exposição ao sangue alogênico ou melhora de resultados – foi demonstrado através das triagens alea-

Tabela 35.1 Requerimentos para qualificação do doador alogênico

Categoria	Critérios
Idade	Idade mínima de 17 anos
Volume de sangue total coletado	Volume máximo de 10,5 mL/kg
Intervalo entre doações	8 semanas após uma doação de sangue total 16 semanas após a coleta de duas unidades de hemácias 4 semanas após uma aférese infrequente Ao menos 2 dias após uma aférese de plasma, plaquetas ou leucócitos
Pressão sanguínea	≤ 180 mmHg – sistólica ≤ 100 mmHg – diastólica
Pulsação	50–100 batimentos por minuto, sem irregularidades patológicas < 50 batimentos é considerado aceitável, desde que se trate de um atleta saudável
Temperatura	≤ 37,5°C oralmente
Hemoglobina	≥ 12,5 g/dL
Terapia farmacológica	Finasteride, isotretinoína – atrasar 1 mês após a última dose Dutasteride – atrasar 6 meses após a última dose Acitretin – atrasar 3 anos após a última dose Etretinate – protelar indefinidamente A ingestão de medicamentos inibidores irreversíveis da função plaquetária (aspirina) dentro de 36 horas após a doação impede o uso do doador como fonte única de plaquetas
História médica geral	Livre de doença em órgão importante, câncer, tendência a sangramentos anormais
Gravidez	Protelar por 6 meses
Receptor de transfusão de sangue ou transplante de tecido	Protelar por 12 meses História familiar de CJD, de ter sido receptor de dura-máter ou de hormônio de crescimento pituitário – protelar indefinidamente
Vacinações e imunizações	Receptor de vacinas contendo toxoide, partículas sintéticas ou de vírus morto, partículas bacterianas, entre outros tipos de vacina – não protelar Receptor de vacina contendo o vírus vivo atenuado ou vacina de bactéria – adiar 2 ou 4 semanas Vacina contra varíola – consultar as diretrizes estabelecidas pelo FDA vigentes Vacinas de imunoglobulina contra hepatite B e vacinas sem licença – adiar por 12 meses
Doenças infecciosas – adiar por tempo indeterminado	Hepatite viral após o 11° aniversário Teste positivo para detecção de antígeno de superfície da hepatite B Repetição de teste reativo para anticorpos anti-HBC em mais de uma ocasião Evidência clínica ou laboratorial de infecção por HCV, HTLV ou HIV, segundo as normas estabelecidas pelo FDA em vigor Doação prévia associada à transmissão de hepatite, HIV ou HTLV História de babesiose ou doença de Chagas Estigma do uso de fármacos parenterais Injeção de fármacos sem prescrição Risco de vCJD, de acordo com as atuais diretrizes do FDA
Doenças infecciosas – adiar por 12 meses	Membranas mucosas expostas ao sangue Pele não estéril ou perfuração com agulha Contato sexual com um indivíduo com confirmação de positividade ao teste de detecção de antígeno de superfície da hepatite B Contato sexual com um indivíduo com hepatite viral Contato sexual com um indivíduo infectado pelo HIV ou que apresente maior risco de contrair infecção pelo HIV Encarceramento em instituição de correção por mais de 72 horas consecutivas História de sífilis ou gonorreia
Vírus *West Nile*	Adiar, conforme as diretrizes estabelecidas pelo FDA em vigor
Malária	Diagnóstico confirmado – protelar por 3 anos até o indivíduo se tornar assintomático Viajar para ou residir em área endêmica, conforme definido pelo CDC – protelar seguindo as diretrizes estabelecidas pelo FDA

Tabela 35.2 Teste de detecção de doenças infecciosas para doadores

Antígeno de superfície da hepatite B
Anticorpo antinuclear da hepatite B (enzimaimunoensaio, EIA)
Anticorpo antiviral da hepatite C (enzimaimunoensaio, EIA)
Anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 (enzimaimunoensaio, EIA)
Anticorpos anti-HTLV-I e anti-HTLV-II (enzimaimunoensaio, EIA)
Teste sorológico para sífilis
RNA viral da hepatite C (teste do ácido nucleico)
RNA do HIV (teste do ácido nucleico)
DNA do vírus West Nile (teste do ácido nucleico, em avaliação)
DNA do vírus da hepatite B (teste do ácido nucleico, em avaliação)

tórias prospectivas controladas realizadas até o momento. Candidatos à doação autóloga não podem apresentar doenças subjacentes que os coloque em risco diante desse procedimento. Também não podem ser significativamente anêmicos, ainda que sejam aceitáveis níveis de Hb inferiores aos recomendados para doações alogênicas. Não podem apresentar risco de bacteremia, uma vez que a consequência adversa mais grave de uma transfusão autóloga é a contaminação por bactérias. Pacientes com doença cardíaca, em particular estenose aórtica, podem ser intolerantes à flebotomia. A gravidez em si não constitui uma contraindicação à doação autóloga, no entanto, esse tipo de doação somente tem valor para pacientes gestantes em situações de alto risco, como placenta prévia. A doação autóloga pode ser mais frequente do que as doações alogênicas. Tipicamente, 2 a 3 unidades devem ser coletadas várias semanas antes da realização da cirurgia. É ideal que, entre a doação e a cirurgia, haja tempo suficiente para a recuperação de uma porção substancial da massa de hemácias coletadas. Para tanto, é necessário que o paciente receba suplementação de ferro. A estimulação da eritropoetina tem sido empregada de forma adjunta na doação autóloga.

Alguns pacientes desejam escolher seus próprios doadores (doação dirigida ou designada), em vez de receberem sangue do suprimento sanguíneo da comunidade. Através dessa escolha, tais pacientes imaginam poder contar com maior segurança, embora não haja evidências de que a doação dirigida reduza o risco de transmissão de doenças por transfusão. Os doadores designados devem estar de acordo com os critérios estabelecidos para a doação de sangue alogênica. Além disso, tais doadores devem ser compatíveis com o pretenso receptor. Existem determinadas situações em que a doação dirigida é contraindicada. A doação materna de qualquer componente sanguíneo contendo plasma para seu filho é particularmente problemática, pois durante a gestação é comum haver formação de anticorpos maternos contra os antígenos HLA fetais. Desse modo, a transfusão desses anticorpos pode precipitar o aparecimento de lesão pulmonar aguda associada à transfusão (ver adiante). Transfusões envolvendo parentes próximos devem ser evitadas no caso de receptores de transplante de células progenitoras hematopoéticas, porque o risco de imunização ao HLA e outros antígenos de histocompatibilidade pode colocar em perigo a sobrevida do enxerto. Há raras circunstâncias em que a doação dirigida pode ser desejável, tais como ante a necessidade de compatibilidade envolvendo grupos sanguíneos raros e limitação da exposição de doadores em casos de pacientes com exigências transfusionais prolongadas (p. ex., anemia aplásica). Na trombocitopenia aloimune neonatal, a coleta de plaquetas maternas pode ser a melhor forma de obter plaquetas compatíveis antígeno-negativas. Antigamente, a transfusão doador-específica era utilizada na transplantação de rim. Entretanto, com os atuais regimes imunossupressores, esse tipo de transfusão passou a ter um valor questionável em termos de prolongamento da sobrevida do enxerto renal.

As doações podem produzir efeitos adversos. Até 36% dos doadores entrevistados 3 semanas após a doação relataram a ocorrência de algum efeito colateral, mínimo na maioria dos casos, como ferimento ou dor no braço (Newman, 2003). Efeitos adversos mais graves, tais como sintomas vasovagais, ocorrem em 5% dos doadores, enquanto 1% apresentam náusea e vômitos. Doadores veteranos são menos propensos a desenvolverem reações do que aqueles que fizeram sua primeira doação. Indivíduos de menor estatura correm risco maior de sofrer síncope pós-doação. A maior parte das reações de síncopes ocorre logo após a doação. Entretanto, também é possível haver reações tardias, que podem ter consequências bastante sérias caso o doador esteja trabalhando ou conduzindo um veículo. Muito raramente, pode ocorrer punção arterial ou lesão de nervo (Newman, 1996, 2001). Existem relatos de ataques convulsivos subsequentes a doações de sangue, embora seja improvável que haja alguma relação causal (Krumholz, 1995). Alguns doadores altamente apreensivos apresentam hiperventilação, com consequente alcalose respiratória e tetania. Casos como esse podem ser facilmente controlados, fazendo o paciente respirar dentro de um saco de papel.

A equipe que trabalha junto ao local de coleta deve estar preparada para tratar as possíveis reações que os doadores venham a apresentar. Uma síncope vasovagal em geral pode ser facilmente monitorada através do posicionamento do paciente em supinação, seguida da aplicação de uma compressa fria em sua testa. A administração de líquidos endovenosos raramente se faz necessária. O local deve contar com um médico para dar consultas e também deve haver disponibilidade de atendimento emergencial em casos de necessidade. As reações vasovagais podem ser minimizadas através da hidratação prévia do doador, ou com cafeína (Sauer, 1999).

Produção de componentes do sangue

É comum manufaturar doações de sangue total em componentes. Esse procedimento facilita o tratamento de diferentes pacientes que estejam necessitando de hemácias, proteínas plasmáticas ou plaquetas. A manufaturação de componentes do sangue objetiva preservar a viabilidade e a função, bem como evitar a ocorrência de alterações detrimentais ou contaminação dos constituintes de interesse.

Hemácias

As hemácias (células vermelhas sanguíneas [CVSs]) são preparadas a partir do sangue total por meio de centrifugação e remoção do plasma. A solução anticoagulante mais comumente utilizada para as CVSs é a CPDA-1, que é suplementada com dextrose e adenina para preservar os níveis de ATP das CVSs. As hemácias em CPDA-1 podem ser armazenadas por até 35 dias a 1 a 6°C. Durante o processo de manufaturação as CVSs também podem ser tratadas com uma solução aditiva contendo glicose e outras substâncias. Essa solução permite o armazenamento por períodos maiores (42 dias) e contam com um hematócrito menor. Durante o armazenamento, as hemácias sofrem alterações associadas à senescência semelhantes ao processo de envelhecimento *in vivo*, em que as hemácias são rapidamente eliminadas pelo baço. O tempo máximo de armazenamento das CVSs é definido pela necessidade de recuperar 70% das células transfundidas 24 horas após a transfusão. Durante o armazenamento das hemácias, há escape de potássio intracelular, cuja concentração no sobrenadante das CVSs pode chegar a 76 mmol/L – aparentemente bastante elevado. Entretanto, a concentração total de potássio contida em uma unidade de CVSs fora da data é pequena, quando comparada às necessidades fisiológicas diárias, sendo raro haver hipercalemia subsequente à transfusão, a não ser em circunstâncias especiais (ver adiante). As hemácias perdem 2,3-DPG intracelular durante o armazenamento, resultando no deslocamento da curva de dissociação de oxigênio-hemoglobina para a esquerda. Assim, pouco depois da transfusão, as hemácias apresentam uma afinidade relativamente alta pelo oxigênio. Os níveis normais de 2,3-DPG são restaurados em 24 horas após a transfusão. O deslocamento da associação do oxigênio que ocorre durante o armazenamento raramente possui significado clínico.

Plasma

O plasma pode ser armazenado no estado líquido a 1 a 6°C ou congelado para preservação por maior tempo. No estado líquido, sob as temperaturas do refrigerador, há perda de fatores de coagulação lábeis, principalmente dos fatores VIII e V. Dentro de um período de 8 horas após a coleta, o plasma fresco congelado (PFC) é separado das hemácias e mantido a –18°C, podendo ser armazenado por até 1 ano nessas condições ou sob temperaturas ainda mais baixas. Antes da transfusão, o PFC é descongelado a 37°C e deve ser utilizado em até

24 horas. O plasma descongelado que não for utilizado nesse período pode ser novamente rotulado como "plasma" e mantido na geladeira no máximo por 5 dias, ainda preservando níveis adequados de fatores V e VIII (Downes, 2001).

Fator anti-hemofílico crioprecipitado

O Fator Anti-hemofílico Criopreservado (crioprecipitado ou crio) constitui a porção insolúvel do plasma remanescente após o descongelamento do PFC, mantida sob refrigeração. Contém aproximadamente 50% do conteúdo total de Fator VIII e 20 a 40% do conteúdo total de fibrinogênio presente na unidade de plasma original. O crio também contém Fator de von Willebrand (vWF) e Fator XIII. As regulamentações estabelecidas pelo FDA determinam que a unidade de crioprecipitado contenha ao menos 80 UI de Fator VIII, embora a maioria dos centros de sangue consiga rendimentos mais altos na rotina. Uma unidade de crioprecipitado contém cerca de 250 mg de fibrinogênio; contudo, não é exigida a realização do teste para sua quantificação. O Fator Anti-hemofílico Criopreservado representou um avanço importante no tratamento da hemofilia A, anteriormente ao desenvolvimento de concentrados seguros de fator de coagulação purificado. Atualmente, o crio é utilizado principalmente como fonte de fibrinogênio.

Concentrados de plaquetas

Os concentrados de plaquetas (CPs) são preparados a partir do sangue total, através da centrifugação de plasma rico em plaquetas e expressão de plasma pobre em plaquetas. Os CPs devem conter no mínimo $5{,}5 \times 10^{10}$ plaquetas/unidade. São armazenados à temperatura ambiente (20–24°C), uma vez que o armazenamento das plaquetas na geladeira (1–6°C) resulta em significativa diminuição da sobrevida pós-transfusional. As atuais normas estabelecidas pelo FDA permitem que o CP seja armazenado por até 5 dias sob agitação suave contínua. Ao final do período de armazenamento, o pH do CP deve ser ≤ 6. É normal os CPs apresentarem uma pequena concentração de hemácias visivelmente aparente, além de poderem causar aloimunização aos antígenos eritrocitários. Os CPs contêm 30 a 50 mL de plasma. Comumente, é necessário agrupar 5 ou mais unidades de CP para obter a dose terapêutica típica de um paciente adulto.

CPs preparados por aférese (plaquetaférese ou plaquetas de doador único) são estocados e manipulados do mesmo modo que os CPs obtidos a partir de sangue total. Cada unidade de plaquetas de aférese deve conter, no mínimo, $3{,}0 \times 10^{11}$ plaquetas. É possível coletar duas unidades de plaquetas numa única sessão de aférese a partir de alguns doadores. Uma unidade de plaquetas de aférese tipicamente fornece uma dose terapêutica para um paciente adulto.

Componentes leucocitários

Os granulócitos podem ser preparados por aférese, podendo ser armazenados à temperatura ambiente por até 24 horas. Todavia, após permanecerem *in vitro* ainda que brevemente, os granulócitos perdem um pouco da capacidade de circular e migrar para áreas inflamatórias (McCullough, 1983). É desejável que essas células sejam transfundidas o mais rápido possível, logo após a coleta. Usualmente, é necessário estimular o doador com G-CSF para obter um número de granulócitos que seja suficiente para produzir a dose terapêutica de um paciente adulto (Heuft, 2002). As unidades de granulócitos contêm quantidade significativa de hemácias e deve ser compatível com o receptor em termos de grupo sanguíneo ABO.

Células mononucleares coletadas por aférese podem representar uma fonte de células progenitoras hematopoéticas (CPrHs) para transplantação autóloga ou alogênica. O número de CPrHs circulantes pode ser aumentado por meio da estimulação com fatores de crescimento (G-CSF ou GM-CSF). No caso de pacientes com linfoma ou malignidades hematológicas, CPrHs autólogas são tipicamente coletadas quando a medula óssea está se recuperando da quimioterapia, pois nesse momento há um número relativamente alto de células-tronco circulantes. As CPrHs podem ser congeladas e armazenadas por longos períodos, após serem tratadas com um agente crioprotetor (p. ex., DMSO). Após o descongelamento a 37°C, as CPrHs devem ser transfundidas o quanto antes. As células mononucleares também podem ser utilizadas como fonte de linfócitos para indução de efeito enxerto *vs.* tumor, conhecido como infusão de linfócitos do doador (DLI, *donor lymphocyte infusion*) (Gilleece, 2003).

Componentes do sangue com redução de leucócitos

Os leucócitos presentes entre os componentes do sangue, particularmente CVSs e CP, podem causar efeitos adversos. Tais efeitos são reações transfusionais não hemolíticas febris, imunização contra antígenos leucocitários (em particular dirigida ao HLA) com subsequente refratariedade a transfusões de plaquetas, transmissão de viroses associadas a leucócitos e DEVH. Para minimizar a maioria desses impactos adversos, muitos centros de sangue e serviços de transfusão instituíram o uso de componentes sanguíneos com redução de leucócitos para todas as transfusões (redução de leucócitos universal). É preciso notar que esse procedimento não parece reduzir a incidência da DEVH pós-transfusional e, portanto, não é utilizado para tal fim. Para considerar uma possível redução de leucócitos, os componentes do sangue devem ser preparados utilizando-se um método conhecido por diminuir o número total de leucócitos residuais a concentrações abaixo de 5×10^6 células/unidade de CVS ou de $8{,}3 \times 10^5$ células/CP derivado de sangue total (Fridey, 2003).

A redução de leucócitos é tipicamente obtida por meio de filtração, seja no momento da manufatura do componente (redução de leucócitos de pré-armazenamento) ou na transfusão (redução de leucócitos de pós-armazenamento). Ambos os métodos são efetivos para a remoção dos leucócitos. Entretanto, a redução de leucócitos de pré-armazenamento proporciona a vantagem de prevenir o acúmulo de modificadores da resposta biológica derivados de leucócitos, particularmente das citocinas, que podem provocar reações adversas (Heddle, 1999). Além disso, a filtração durante a manufaturação permite um melhor controle do processo. Certos dispositivos de aférese são capazes de produzir com segurança CPs contendo menos de 1×10^6 leucócitos. Com relação à distribuição dos subgrupos leucocitários, diferenças mínimas são observadas entre tais componentes e aqueles produzidos por filtração (Pennington, 2001). Essas diferenças, contudo, provavelmente não possuem significado clínico.

A redução de leucócitos pode apresentar falhas durante a filtração do sangue proveniente de doadores com característica falciforme. Tais falhas de filtração se devem à polimerização da Hb S num ambiente com baixa tensão de oxigênio e alta osmolalidade (Beard, 2004). A redução de leucócitos não é um meio efetivo de prevenir a DEVH (Hayashi, 1993). Evidentemente, granulócitos e CPrHs não podem sofrer redução de leucócitos.

Componentes especiais

O plasma reduzido de crioprecipitado (plasma pobre em crioprecipitado) consiste no sobrenadante remanescente da produção de crioprecipitado. Apresenta relativa deficiência das formas de alto peso molecular do fator de vWF e, ao mesmo tempo, retém níveis normais de metaloprotease clivadora de vWF (Blackall, 2001). Por essas razões, o plasma reduzido de crioprecipitado constitui alternativa atraente ao PFC para tratamento de paciente com púrpura trombocitopênica trombótica (TTP, *thrombotic thrombocytopenic purpura*). Por outro lado, até o momento não há evidências definitivas de que a troca de plasma por plasma reduzido de crioprecipitado resulte em melhora do resultado apresentado pelo paciente.

Após receberem agente crioprotetor (p. ex., glicerol), as hemácias podem ser armazenadas sob congelamento. As CVSs podem ser armazenadas em *freezers* mecânicos ou nitrogênio líquido por até 10 anos. As unidades congeladas são rapidamente descongeladas a 37°C. O agente crioprotetor deve ser removido por meio da adição gradual de soluções de lavagem com osmolalidade decrescente. A falha em eliminar o glicerol adequadamente das CVSs congeladas pode resultar na hemólise das mesmas. A criopreservação e eliminação do glicerol de hemácias falciformes por meio dos métodos padrão podem resultar na formação de uma massa gelatinosa. Isso pode ser evitado adotando-se um processo modificado (Meryman, 1976). Após a remoção do glicerol, as hemácias podem ser armazenadas por até 1 dia a 1 a

6ºC, caso tenham sido processadas pelo método aberto, ou por até 14 dias, se forem processadas pelo método fechado. O principal uso das CVSs congeladas reside na manutenção de um registro de unidades antígeno-negativas raras.

CVSs e CPs podem ser lavados para remoção de proteínas e eletrólitos plasmáticos. Essa lavagem pode ser realizada manualmente ou através de métodos automatizados. Durante o processo de lavagem, pode haver perda considerável de células. Além disso, a lavagem de plaquetas pode acarretar agregação e ativação com consequente redução da viabilidade (Pineda, 1989). Como se trata de um processo aberto, as hemácias lavadas podem ser estocadas por até 24 horas sob refrigeração, enquanto as plaquetas lavadas devem ser transfundidas dentro de 4 horas após a preparação. A principal aplicação dos componentes lavados consiste na prevenção de reações alérgicas severas. A lavagem não é um mecanismo efetivo para reduzir leucócitos.

A DEVH associada à transfusão (DEVH-AT) pode ser prevenida através da irradiação dos componentes que contêm linfócitos viáveis (CVS, CP, granulócitos e plasma não congelado). Para tanto, é feita a exposição aos raios γ ou raios X. O centro do frasco contendo sangue deve receber uma radiação mínima de 25 Gy, enquanto a periferia deve ser irradiada com pelo menos 15 Gy. A radiação provoca lesões cromossômicas que impedem a replicação dos linfócitos transfundidos no receptor. Por outro lado, as células irradiadas se tornam imunogênicas. Dessa forma, a irradiação não equivale à redução de leucócitos. A irradiação também causa lesões nas membranas das hemácias, aumentando o vazamento de potássio e diminuindo a sobrevida pós-transfusional (Moroff, 1999). As hemácias irradiadas devem ter seu prazo de validade restrito ao máximo de 28 dias contados a partir da data da irradiação. As plaquetas aparentemente sofrem danos mínimos em decorrência da irradiação e, assim, seu prazo de validade não precisa ser alterado (Sweeney, 1994). Nitidamente, as CPrHs não devem ser irradiadas. A irradiação é insuficiente para prevenir a transmissão de infecções virais (p. ex., CMV) ou a contaminação por bactérias.

Redução de patógenos

Embora um grande progresso tenha sido alcançado em termos de redução dos riscos de transmissão de doenças por transfusão, tais riscos não foram totalmente eliminados. Além disso, há a possibilidade de uma nova doença transmissível vir a emergir e, assim, ameaçar a segurança do sangue. Por esses motivos, no momento estão sendo ativamente desenvolvidas estratégias para inativar microrganismos contaminantes (redução de patógenos). Derivados do sangue, como albumina, concentrados de fatores de coagulação e imunoglobulinas, costumam ser tratados através de uma variedade de métodos. Dois desses métodos, aquecimento e solvente-detergente, são altamente eficazes contra os vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV). O processo de tratamento por solvente-detergente rompe o envelope lipídico de vírus como HIV, HBV e HCV. Entretanto, esse tratamento é ineficaz contra vírus de envelope não lipídico. Além disso, causa destruição das membranas celulares e, portanto, não é aplicável aos componentes celulares do sangue. O plasma tratado com solvente-detergente é disponibilizado na Europa e foi licenciado pelo FDA, embora atualmente não seja disponibilizado nos EUA. Esse tipo de plasma contém níveis previsíveis de todos os fatores de coagulação e é efetivo no tratamento da TTP (Horowitz, 1992; Moake, 1994). Contudo, pode conter níveis reduzidos de proteína S e seu uso tem sido associado ao aparecimento de complicações trombóticas (Doyle, 2003).

Os compostos à base de psoraleno se intercalam entre as bases de RNA e DNA, e previnem a replicação formando ligações cruzadas covalentes mediante exposição à luz UV. O tratamento com psoralen é altamente efetivo contra vírus, bactéria e protozoários (Lin, 2004). Numa triagem randomizada, um método de tratamento com psoralen destinado a CPs mostrou-se seguro e efetivo (McCullough, 2004). O processo de tratamento resulta numa redução pós-transfusional da recuperação de plaquetas que é significativa, tanto do ponto de vista estatístico como clínico. Como o tratamento à base de psoralen requer exposição à luz, sua aplicabilidade às hemácias é limitada. Uma abordagem alternativa à redução de patógenos consiste em utilizar uma poliamina que reage especificamente com a guanina em ácidos nucleicos (Inactine). Como resultado, há formação de um aduto que interrompe a replicação do ácido nucleico. Essa técnica também se mostrou altamente efetiva contra inúmeros vírus, bactérias e protozoários (Zavizion, 2003; Lazo, 2003). Se por um lado cada uma dessas técnicas é promissora, por outro ainda persiste a questão da toxicidade e imunogenicidade.

Seleção de componentes do sangue

Os componentes do sangue devem ser sorologicamente compatíveis com o receptor. A compatibilidade ABO é a primeira consideração. As hemácias transfundidas precisam ser compatíveis com os anticorpos do receptor, enquanto o plasma transfundido deve ser compatível com as hemácias do receptor. Portanto, o sangue total deve ser de tipo ABO idêntico ao do receptor. As hemácias contêm uma quantidade de plasma limitada e precisam ser compatíveis; no entanto, não necessariamente devem ter tipo ABO idêntico ao do receptor. De modo semelhante, concentrados de plasma e plaquetas contêm poucas ou nenhuma hemácia. A Tabela 35.3 resume a seleção de componentes sanguíneos com compatibilidade ABO. Do mesmo modo, para serem transfundidas em receptores aloimunizados, as hemácias devem ser negativas para antígenos clinicamente significativos. É altamente desejável transfundir apenas hemácias Rh^- em receptores também Rh^-, pois há um risco aproximado de 30% de haver imunização ao Rh (D) (Frohn, 2003). Esse aspecto é particularmente importante para mulheres potencialmente grávidas, devido ao risco de doença hemolítica do recém-nascido em gestações subsequentes.

Considerações especiais aplicam-se aos receptores de transplantes de CPrHs ABO-incompatíveis. No decorrer da transplantação, esses indivíduos sofrerão mudança de tipo sanguíneo. As hemácias transfundidas devem ser compatíveis com as iso-hemaglutininas tanto do doador como do receptor, enquanto os componentes contendo plasma transfundidos devem ser compatíveis com as hemácias de ambos. Dessa forma, a escolha ótima para esse tipo de paciente dependerá dos resultados de tipagem atuais e esperados.

Hemácias

A compatibilidade é o fator a ser primariamente considerado na seleção das CVSs, com o intuito de prevenir a ocorrência de reações transfusionais hemolíticas. Uma vez que a sobrevida pós-transfusional das hemácias é inversamente relacionada à duração do armazenamento, torna-se desejável selecionar unidades frescas (em geral, com menos de 10 dias de produção) nos casos em que é preciso limitar o número de transfusões, a exemplo das transfusões intrauterinas e neonatais. Para grandes volumes de transfusões envolvendo pacientes pediátricos (p. ex., transfusão de troca ou cirurgia cardíaca), talvez seja preferível selecionar unidades negativas para Hb S (falciforme-negativas). Do mesmo modo, é preferível escolher hemácias falciforme-negativas para realização de transfusões envolvendo pacientes com anemia falciforme (AF), pois a presença da Hb S nas hemácias do doador pode complicar o monitoramento da efetividade da terapia transfusional. Por outro lado, jamais foi demonstrado que a transfusão de hemácias provenientes de doadores com característica falci-

Tabela 35.3 Compatibilidade ABO

Tipo do doador	Tipo do receptor			
	O	**A**	**B**	**AB**
O	H P	H	H	H
A	P	H P		H
B	P		H P	H
AB	P	P	P	H H

H = hemácias compatíveis; P = componentes contendo plasma (plaquetas, PFC) compatíveis.

Tabela 35.4 Diretrizes para a transfusão de hemácias

Anemia sintomática em paciente euvolêmico
Perda de sangue aguda de < 15% do volume de sangue estimado
Níveis pré-operatórios de Hb < 9,0 g/dL com perda de sangue esperada > 500 mL
Hb < 7,0 g/dL em paciente criticamente doente
Hb < 8,0 g/dL em paciente com síndrome coronariana aguda
Hb < 10,0 g/dL com sangramento urêmico ou trombocitopênico
Anemia falciforme:
Sequestro agudo: Hb < 5,0 g/dL ou diminuída em 20% em relação ao nível basal
Síndrome torácica aguda: Hb-alvo = 10,0 g/dL, fração Hb S < 30%
Profilaxia do derrame: fração de Hb S-alvo < 30%
Anestesia geral: Hb-alvo = 10,0 g/dL, fração Hb S < 60%

forme assintomáticos é deletéria. Além disso, em casos associados a certos requerimentos raros, por exemplo, o uso de doadores com característica falciforme pode ser a única opção disponível. Pacientes submetidos a pesadas transfusões, como aqueles com AF, correm risco de desenvolver aloimunização e reações transfusionais hemolíticas (Vichinsky, 1990). Tais pacientes podem ser beneficiados pela administração profilática de hemácias antígeno-compatibilizadas, particularmente quanto ao Rh e Kell (Ambruso, 1987; Castellino, 1999).

A transfusão de troca do neonato com doença hemolítica do recém-nascido é um caso especial. Nessa situação, tanto as hemácias antígeno-negativas como o plasma (pressão oncótica e capacidade de ligação da bilirrubina) são necessários. As hemácias precisam ser compatíveis com os anticorpos maternos, incluindo os anticorpos ABO. Comumente, utiliza-se sangue total reconstituído e preparado através da combinação de CVSs e PFC compatíveis ao hematócrito de interesse (tipicamente 50%), embora possa ser utilizado sangue total eventualmente disponível.

Plaquetas

A compatibilidade ABO principal é um aspecto menos significativo na transfusão de plaquetas do que na transfusão de hemácias. Os antígenos ABO são semanalmente expressos nas plaquetas. Transfusões de plaquetas ABO-incompatíveis podem resultar em menor sobrevida pós-transfusional, ainda que usualmente insignificante do ponto de vista clínico. Reações hemolíticas agudas podem resultar da transfusão das iso-hemaglutinas contidas no plasma das plaquetas de aférese provenientes de doadores com altos títulos de anticorpos antiA ou antiB (Larsson, 2000). Sendo assim, se for necessário transfundir plaquetas que não sejam idênticas quanto ao antígeno ABO, é típico considerar primordialmente a compatibilidade do plasma com o receptor. Alguns centros submetem as plaquetas de aférese a triagens, a fim de garantir a não utilização de plaquetas contendo altos títulos de anticorpos antiA ou antiB incompatíveis (p. ex., reatividade < 1:200 na centrifugação imediata).

Comumente, considera-se refratariedade a incapacidade em alcançar o aumento esperado da contagem plaquetária após a transfusão de plaquetas em duas ou mais ocasiões. A falha em responder com um aumento adequado da contagem de plaquetas após a transfusão (refratariedade plaquetária) pode ter causas imunológicas (anticorpos para HLA ou específicos para plaquetas), causas clínicas não imunológicas (sangramento, esplenomegalia, CID, medicamentos), causas produto-específicas (incompatibilidade ABO; produtos mais velhos produzem incrementos menores), ou pode se dever ao fato de as plaquetas de alguns doadores serem pouco armazenáveis. Um fraco incremento após uma única transfusão de plaquetas não deve ser presumido como decorrente de aloimunização. A refratariedade muitas vezes é multifatorial e muda de acordo com a condição subjacente e a terapia recebida pelo paciente. Os anticorpos para antígenos HLA constituem a causa mais comum de refratariedade plaquetária imunomediada. Antígenos do HLA de classe I são expressos em plaquetas, enquanto os anticorpos de classe I são comuns em pacientes que já passaram por gestações ou transfusões de componentes sanguíneos sem redução de leucócitos. Foi demonstrado que a redução de leucócitos é eficaz em prevenir tanto a aloimunização como a refratariedade plaquetária em pacientes leucêmicos não submetidos à exposição prévia (Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group, 1997). Os anticorpos específicos para antígenos plaquetários constituem causa relativamente rara de refratariedade plaquetária. Existem diversas estratégias efetivas de seleção de plaquetas para receptores aloimunizados refratários. Usualmente, a primeira linha é o uso de plaquetas compatíveis à prova cruzada (O'Connell, 1990). Se as especificidades de anticorpos para antígenos HLA puderem ser definidas no paciente, torna-se possível selecionar doadores antígeno-negativos (Petz, 2000). É possível selecionar doadores com compatibilidade para antígenos HLA de classe I. Entretanto, devido às limitações impostas pela disponibilidade de doadores, pode ser bastante difícil encontrar compatibilidades ideais. Mesmo havendo uma grande base de doadores, muitas transfusões "HLA-compatíveis" apresentam compatibilização inadequada ao menos para um antígeno (Dahlke, 1984).

Teste pré-transfusional

A etapa mais crítica do teste pré-transfusional é a coleta e identificação adequadas da amostra de sangue proveniente do receptor. A causa mais comum de uma reação transfusional hemolítica aguda é a identificação errada de uma amostra ou paciente (Sazama, 1990; Linden, 2000). Cada um dos serviços de transfusão deve desenvolver e implantar políticas e procedimentos para identificação de pacientes e coleta de amostras. As amostras pré-transfusionais devem ser rotuladas no momento da flebotomia, comparando-se as informações com o identificador permanente (em geral, uma pulseira) do paciente. Esse rótulo deve conter no mínimo dois identificadores exclusivos, como o nome do paciente e seu número de registro hospitalar. A data da coleta da amostra e a identidade do flebotomista são informações que também devem ser registradas. Em situações emergenciais, quando a identidade do paciente é desconhecida, apenas um único identificador exclusivo deve ser atribuído. Esse identificador deve permanecer com o paciente ao longo de toda a transfusão, mesmo que este venha a ser identificado depois. Deve haver políticas e procedimentos que tratem da supervisão de pacientes cujos nomes sejam confidenciais ou pseudônimos.

As amostras destinadas ao teste pré-transfusional devem ser coletadas no máximo em até 3 dias antes da transfusão, a não ser que a paciente sabidamente não esteja grávida nem tenha recebido transfusões nos últimos 3 meses. Alguns desafios são impostos pela prática comum de admitir o paciente no mesmo dia de uma cirurgia eletiva. Em tal situação, as amostras pré-transfusionais podem ser coletadas durante uma visita anterior do paciente ao ambulatório. Uma opção consiste em solicitar a esse paciente que use uma pulseira de identificação, embora muitos pacientes não se disponham a obedecer. Outra alternativa é atribuir um número exclusivo à amostra pré-transfusional e afixar esse número num formulário de identificação que deve ser apresentado pelo paciente no dia da cirurgia (Butch, 1994). As amostras pré-transfusionais devem ficar retidas durante pelo menos 7 dias após a realização de cada transfusão. Os serviços de transfusão tipicamente retêm as amostras pré-transfusionais por um determinado período (p. ex., 56 dias).

Os testes pré-transfusionais consistem nas tipagens ABO e Rh(D), além da triagem para detecção de anticorpos inesperados que reconheçam hemácias. Caso a triagem de anticorpos resulte positiva, torna-se necessário realizar testes de identificação. Os resultados dos testes mais recentes devem ser comparados com os resultados mais antigos, que foram obtidos em testes anteriores, caso ainda estejam disponíveis. Os anticorpos dirigidos a hemácias que tenham significado clínico podem se tornar indetectáveis com o passar do tempo, mas podem causar reações hemolíticas tardias decorrentes de uma resposta anamnésica. Desse modo, uma história de detecção de anticorpos anti-hemácias clinicamente significativos requer a transfusão apenas de hemácias antígeno-negativas. Qualquer discrepância nos testes recentes ou possível desacordo com relação aos resultados anteriormente registrados deve ser resolvido antes da conclusão do teste pré-transfusional.

Alguns pacientes apresentam desafios particulares no teste pré-transfusional. Recém-nascidos tipicamente possuem iso-hemaglutininas fracas ou ausentes. Os anticorpos ABO esperados podem ser detectados somente após 6 meses de idade. Pacientes recém-transfundidos podem apresentar uma mistura de hemácias circulantes, caso não tenham recebido unidades com antígenos ABO idênticos. Anticorpos inesperados dirigidos contra hemácias podem ser adquiridos passivamente através

da transfusão de CPs ou imunoglobulinas. Em alguns pacientes, as iso-hemaglutininas esperadas podem estar ausentes em decorrência de doenças ou terapia imunossupressora. Receptores de transplantes alogênicos de CPrHs podem apresentar resultados de tipagem complexos e variados, que requerem como conclusão um tipo sanguíneo "declarado". Em casos urgentes, quando é impossível estabelecer o tipo sanguíneo, uma medida usualmente segura é a seleção de hemácias tipo O e plasma de tipo AB. Se os testes de identificação de anticorpos não puderem ser realizados, o julgamento médico deve estabelecer a urgência da transfusão e os riscos de incompatibilidade existentes. Pode ser desejável determinar quais especificidades antigênicas ausentes nas hemácias não podem ser excluídas, caso seja possível. O teste pré-transfusional pode ser complicado pela expressão fraca de um antígeno Rh(D).

A etapa final da prova de reação cruzada pré-transfusional é a prova cruzada, cujo propósito é fazer uma checagem final da compatibilidade ABO e, em menor extensão, detectar anticorpos não identificados. Uma importante prova cruzada é realizada entre o soro ou plasma do receptor e as hemácias do doador. Uma prova cruzada de menor significado, entre as hemácias do receptor e as hemácias ou plasma do doador, usualmente é desnecessária. Na ausência de anticorpos anti-hemácias inesperados, pode ser realizada uma prova cruzada por aglutinação direta ("centrifugação direta") para detecção de incompatibilidade ABO. Por outro lado, se tais anticorpos forem detectados, a prova cruzada deve ser realizada empregando-se a técnica da antiglobulina. Para os anticorpos julgados clinicamente significativos, são selecionadas células antígeno-negativas para a realização da prova cruzada. Uma alternativa para garantir a compatibilidade ABO é a conhecida prova cruzada por computador. Esse tipo de prova cruzada é aplicável quando precisam ser feitas no mínimo duas determinações de grupo ABO do receptor – ao menos uma delas utilizando amostra recente – e na ausência de anticorpos inesperados (Butch, 1997). Um sistema computacional validado pode, então, assegurar que os complementos sanguíneos em questão apresentam compatibilidade ABO. A presença de autoanticorpos dirigidos contra as hemácias constitui um problema especial. Nessa situação, é essencial excluir os aloanticorpos. A prova cruzada tipicamente resulta positiva. Muitos serviços de transfusão adotam a política de atribuir unidades "minimamente reativas", embora o valor dessa medida tenha sido questionado (Petz, 2003).

Em casos urgentes, pode haver indicação para liberação emergencial de complementos sanguíneos antes da finalização da prova de reação cruzada. Essa liberação emergencial visa a fornecer hemácias (capacidade de transporte de oxigênio) e plasma (conteúdo de fatores de coagulação) a pacientes apresentando sangramento rápido. A compatibilidade ABO é a prioridade mais importante (ver a discussão anterior sobre seleção de componentes). Anticorpos dirigidos aos antígenos de outros grupos sanguíneos tipicamente não produzem reações hemolíticas agudas e, por isso, são de menor prioridade. No entanto, havendo uma história de detecção prévia de anticorpos ou se os testes de identificação de anticorpos estiverem incompletos, pode ser preferível selecionar CVSs antígeno-negativas, caso seja possível. Por fim, usualmente após o ocorrido, deve ser obtida a documentação da solicitação médica de liberação emergencial de componentes sanguíneos.

Administração da transfusão

O serviço de transfusão é responsável pelo desenvolvimento e implantação de políticas e procedimentos para a administração de componentes do sangue. Para preparar, dispensar e administrar componentes sanguíneos é necessário haver solicitação médica. Idealmente, antes de providenciar componentes sanguíneos é necessário estabelecer um acesso venoso. A escolha da localização e do tipo de acesso depende do volume, tempo e duração esperada da terapia transfusional. O acesso periférico utilizando cateter ou agulha de 18 G em geral é suficiente. Cateteres menores também podem ser utilizados, entretanto, um fluxo de alta pressão através de um lúmen estreito pode acarretar hemólise (de la Roche, 1993). O acesso venoso central é indicado para a administração de grandes volumes ou terapia de longa duração.

Antes da administração de uma transfusão, é essencial identificar de forma acurada tanto o componente como o receptor em questão. Esse processo deve incluir, ao menos, dois identificadores exclusivos do paciente, como o nome e o número de registro, além de uma comparação com um identificador permanente, como uma pulseira. O identificador da unidade existente no frasco de sangue também deve ser checado em relação à documentação associada (formulário de transfusão ou etiqueta fixada). Os tipos ABO e Rh constantes no rótulo da unidade devem estar de acordo com a documentação associada, e é preciso verificar a compatibilidade do material com o tipo sanguíneo registrado como sendo do paciente. O prazo de validade e a data da manufaturação do componente do sangue devem estar dentro dos padrões aceitáveis. Diversas instituições designam dois funcionários qualificados para realizar a checagem de identidade antes do início da transfusão. A solicitação do médico e o consentimento do paciente para a realização da transfusão também devem ser verificados.

Todos os componentes do sangue devem ser administrados com auxílio de um filtro projetado para reter coágulos e partículas, com porosidade típica em torno de 170 a 260 μm. O aparato de administração deve conter uma câmara de gotejamento, a solução endovenosa compatível fixada e ferramentas de controle da velocidade de fluxo. Durante a cirurgia, uma prática de rotina consiste em adicionar um filtro microagregado pelo qual o componente sanguíneo deve fluir primeiro. Esse procedimento reduz a carga metabólica depositada sobre o frasco para o processamento de fibrina e debris celulares acumulados durante o armazenamento, além de ajudar a preservar a patência da linha intravascular. É preciso ter cuidado para evitar misturar os componentes sanguíneos a soluções endovenosas incompatíveis. Uma salina normal é a solução preferida para todas as transfusões. Soluções contendo cálcio devem ser evitadas, devido à possibilidade de precipitação da coagulação. As CVSs não devem ser administradas com dextrose a 5%, sob pena de ocorrer hemólise. Medicamentos não devem ser adicionados aos componentes do sangue. É possível utilizar filtros de redução de leucócitos para transfusões de CVSs ou CPs, a fim de reduzir a incidência de reações transfusionais febris, aloimunização de HLA ou transmissão de CMV. Deve ser selecionado um filtro apropriado de acordo com o componente do sangue, dada a possibilidade de entupimento ou mau funcionamento do filtro mediante o uso incorreto.

Pode ser desejável administrar componentes sanguíneos refrigerados (CVS ou plasma) com auxílio de um dispositivo aquecedor de sangue. A transfusão de componentes frios a uma velocidade acima de 100 mL/min durante 30 minutos pode aumentar o risco de parada cardíaca (Boyan, 1963). Os dispositivos aquecedores de sangue devem ser equipados com termômetro e alarme audível, a fim de evitar ultrapassar os limites de temperatura. Os componentes sanguíneos jamais devem ser aquecidos utilizando água morna, forno micro-ondas convencional ou qualquer aparelho de aquecimento inadequado a essa finalidade.

A taxa de administração desejável depende do volume de sangue do paciente, bem como do *status* cardíaco e hemodinâmico. Exceto na ressuscitação de emergência, uma transfusão deve ser iniciada lentamente (cerca de 2 mL/min durante os primeiros 15 minutos). O paciente deve ser observado com atenção durante os primeiros 15 minutos de infusão, uma vez que reações severas , como hemólise, anafilaxia ou sepse, podem se manifestar logo após a entrada de um pequeno volume na circulação. Subsequentemente, a velocidade de administração pode ser aumentada. Em geral, é desejável completar uma transfusão de hemácias em 2 horas, enquanto a transfusão de plaquetas ou plasma deve ocorrer em 30 a 60 minutos. Qualquer transfusão deve ser finalizada em até 4 horas após ter sido iniciada. Se o tempo total de administração exceder 4 horas, significa que é necessário fornecer volumes menores de componentes sanguíneos. Diante da necessidade de realizar a infusão a uma alta velocidade de fluxo, como ocorre em algumas ressuscitações ou cirurgias, pode ser utilizado um dispositivo de infusão sob pressão. Quando esse tipo de dispositivo é utilizado, é preciso ter cuidado para evitar a ocorrência de hemólise mecânica ou embolismo de ar. Durante a transfusão, os sinais vitais do paciente devem ser checados a intervalos regulares e, havendo qualquer suspeita de reação, a transfusão deve ser imediatamente interrompida e investigada.

Todas as decisões referentes à transfusão constituem julgamentos de caráter clínico que devem ser feitos levando-se em consideração os dados clínicos e laboratoriais disponíveis. Não existem indicações absolutas para as transfusões sanguíneas, e são poucas as contraindicações.

Transfusão de hemácias

As hemácias estão associadas à capacidade de transportar oxigênio. A transfusão de hemácias deve ser utilizada para tratar anemias agudas ou crônicas. A capacidade do paciente tolerar a anemia depende do grau de anemia, mecanismos fisiológicos adaptativos e existência de doença cardíaca ou respiratória. As adaptações fisiológicas normais à anemia incluem aumento do débito cardíaco, redistribuição do fluxo sanguíneo, aumento da extração de oxigênio e aumento do conteúdo de 2,3-DPC nas hemácias, que resultam no deslocamento à direita da curva de dissociação oxigênio-Hb. As diretrizes gerais para a transfusão de hemácias estão resumidas na Tabela 35.4. Independentemente da concentração de Hb, a existência de anemia sintomática num paciente euvolêmico é uma indicação para transfusão. Os sintomas de anemia incluem fadiga, taquicardia, dispneia ao esforço, hipotensão postural e comprometimento da atividade mental. A anemia pode precipitar angina em pacientes com doença arterial coronariana. De uma forma geral, a perda de sangue aguda equivalente a mais de 15% do volume de sangue total do paciente pode constituir uma indicação para a realização de transfusão de hemácias. Estudos sobre morbidade pós-cirúrgica entre pacientes que se recusaram a receber transfusão sanguínea indicaram a existência de uma relação pouco significativa entre mortalidade e grau de anemia no pré-operatório, em casos de pacientes com níveis mínimos de Hb da ordem de 6 g/dL no pré-operatório e sem doença arterial coronariana, que sustentaram uma perda sanguínea inferior a 2 g de Hb/dL (Carson, 1996). A mortalidade aumenta diante de níveis de Hb abaixo de 6 g/dL no pré-operatório (Spence, 1990). Entretanto, havendo uma perda de Hb de 2 a 4 g/dL, a mortalidade aumenta diante de níveis inferiores a 10 g/dL no pré-operatório. Esse risco é potencializado pela existência de uma doença cardiovascular (angina, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva ou doença vascular periférica). Num estudo realizado com pacientes submetidos a operações eletivas, a taxa de mortalidade observada foi nula, apesar dos níveis de Hb atingirem valores próximos a 6 g/dL mediante uma perda sanguínea inferior a 500 mL (Carson, 1988).

O estudo intitulado Transfusion Requirements in Critical Care (TRICC) foi a maior triagem prospectiva aleatorizada já realizada, que compara estratégias de transfusão restritivas e liberais (Hebert, 1999). A triagem TRICC envolveu 838 pacientes criticamente doentes, cujos níveis de Hb eram inferiores a 9,0 g/dL. Os pacientes foram aleatorizados para receber regimes de transfusão liberais ou restritivos. O regime liberal consistia em uma transfusão desencadeadora com concentração de 10 g/dL e concentração-alvo de 10 a 12 g/dL. O regime restritivo consistia em uma transfusão desencadeadora de 7,0 g/dL com uma concentração-alvo de 7,0 a 9,0 g/dL. O resultado primário não apresentou diferença estatisticamente significativa na mortalidade de 30 dias, embora tenha sido observada uma tendência favorável a uma taxa de mortalidade mais baixa no grupo submetido à estratégia restritiva (18,7% *vs.* 23,3%, $p = 0,11$). Eventos cardíacos, edema pulmonar primário e infarto do miocárdio foram mais frequentes no grupo submetido às transfusões liberais do que no grupo submetido às transfusões restritivas (21,0% *vs.* 13,2%, $p < 0,001$). A análise dos subgrupos, em que grau de severidade da doença foi medido pelos escores da Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II), revelou a existência de uma taxa de mortalidade menor entre os pacientes submetidos à estratégia restritiva que apresentavam doença menos severa (8,7% *vs.* 16,1%, $p = 0,03$), bem como entre os pacientes com menos de 55 anos de idade (5,77% *vs.* 13,07%, $p = 0,02$). Sendo assim, parece que muitos pacientes criticamente doentes são capazes de tolerar níveis de Hb inferiores a 10 g/dL.

Ainda há controvérsias quanto à possibilidade de generalizar os resultados obtidos no TRICC para os pacientes com síndromes coronarianas agudas. Um amplo estudo restrospectivo, envolvendo um grupo de pacientes com mais de 65 anos de idade que haviam sofrido infarto do miocárdio, examinou a associação existente entre os níveis de Hb no momento da admissão hospitalar e a taxa de mortalidade de 30 dias (Wu, 2001). Foi constatado que há uma nítida relação entre o aumento da mortalidade e níveis de Hb inicialmente mais baixos. Além disso, entre os pacientes que receberam transfusão, observou-se que havia menor probabilidade ajustada de mortalidade em 30 dias quando o hematócrito admissional era < 33%, sendo que a probabilidade de morte aumentava entre os pacientes transfundidos cujo hematócrito admissional era > 36%, após os devidos ajustes referentes aos fatores clínicos, medicamentos utilizados e preditores transfusionais. Tais resultados sugeriram que a transfusão de hemácias pode resultar em menor mortalidade a curto prazo entre pacientes idosos que sofreram infarto agudo do miocárdio e sobreviveram ao menos 2 dias, quando o hematócrito era ≤ 30% no momento da admissão. Entretanto, os inconvenientes associados ao planejamento do estudo retrospectivo, como a distorção da sobrevida, limitam as possíveis conclusões. Resultados um pouco diferentes foram obtidos ao analisar o efeito da transfusão sobre a mortalidade de 30 dias em pacientes afetados por síndromes coronarianas agudas (Rao, 2004). Trata-se de uma reanálise de três triagens farmacológicas intervencionistas, em que o resultado primário avaliado foi a mortalidade de 30 dias. Dos indivíduos que participaram desse estudo, apenas 10% receberam transfusão. Em relação aos que não receberam, os indivíduos transfundidos eram mais propensos a apresentar comorbidades, incluindo classes de Killip mais altas. A mortalidade cumulativa entre indivíduos transfundidos foi maior do que naqueles não transfundidos ($p < 0,001$). Para indivíduos com hematócrito de nadir igual a 20%, não foram observadas diferenças significativas em termos de probabilidade de morte entre indivíduos transfundidos e não transfundidos.

A transfusão para pacientes com AF impõe desafios exclusivos. As indicações para transfusão são aumentar a capacidade de transporte de oxigênio em casos de anemia severa, e melhorar a circulação microvascular diminuindo a proporção de hemácias falciformes. Na AF, a distribuição de oxigênio é dada pelo equilíbrio entre a capacidade de transportar oxigênio e a viscosidade do sangue. Uma distribuição de oxigênio ideal usualmente é alcançada quando o hematócrito pós-transfusional é de aproximadamente 30% (Schmalzer, 1987). Não existem parâmetros laboratoriais universalmente aceitos para transfusões na AF. Valores de Hb abaixo de 5 g/dL ou apresentando uma queda aguda de 20% em relação aos níveis basais durante uma doença aguda constituem indicações para realização de transfusão de hemácias. O sequestro esplênico agudo pode produzir hipovolemia repentina e colapso cardiovascular, necessitando de transfusão imediata. Nesse cenário, o aumento da concentração de Hb observado após a transfusão pode ser maior do que o esperado, devido à liberação das hemácias sequestradas. É essencial haver um monitoramento cuidadoso para evitar supertransfusões (Powell, 1992). A síndrome torácica aguda pode representar uma ameaça à vida. A imediata realização de uma transfusão pode prevenir sua progressão para um quadro de insuficiência respiratória (Mallouh, 1988). A abordagem típica consiste em realizar uma transfusão de troca com o objetivo de atingir níveis de Hb S ≤ 30% e hematócrito igual a 30%. A terapia transfusional crônica pode reduzir o risco de derrame entre indivíduos com AF. Nas crianças, a realização de uma transfusão com o intuito de manter os níveis de Hb S abaixo de 30% pode reduzir o risco de derrame (Adams, 1998). A duração do regime de transfusão crônico continua sendo uma questão em aberto. Mesmo após anos de terapia, suspendê-la pode resultar em reversão para o risco aumentado de derrame (Adams, 2004). Antes da anestesia geral, é indicado realizar uma transfusão para alcançar níveis de Hb da ordem de 10 g/dL e níveis de Hb S de aproximadamente 60% (Vichinsky, 1995). Quando se trata de uma gravidez sem complicações, a realização de uma transfusão de hemácias não traz benefícios. Entretanto, a transfusão pode ser indicada em casos de gravidez de alto risco ou quando há história de perda fetal anterior (Seoud, 1994).

Na anemia hemolítica autoimune, pode haver indicação para transfusão em pacientes que apresentam sintomas cardíacos ou neurológicos. A maioria dos pacientes com anemia hemolítica autoimune tolera a transfusão de células incompatíveis, quando os aloanticorpos são eliminados (Salama, 1992). Hemácias transfundidas usualmente não são eliminadas mais rapidamente que as próprias hemácias do paciente. É importante observar que uma transfusão de hemácias necessária jamais

deve ser suspendida por causa de incompatibilidade de prova cruzada. É bem mais arriscado não realizar a transfusão no paciente com anemia hemolítica autoimune.

A transfusão de hemácias pode ser benéfica em casos de sangramento associado à uremia. Existe uma relação inversa entre o hematócrito e o tempo de sangramento em pacientes que apresentam insuficiência renal crônica. A transfusão para obtenção de níveis de Hb da ordem de 10 g/dL pode ser benéfica ao paciente urêmico que apresenta sangramento (Fernandez, 1985).

Usualmente, pode-se esperar que a transfusão de uma unidade de hemácias para um indivíduo adulto promova uma elevação de 1 g/dL nos níveis de Hb, e aumento de 3% no hematócrito. Entretanto, o aumento esperado para o hematócrito pode variar entre 2 e 9%, dependendo do volume vascular do paciente (Gorlin, 2000).

Transfusão de plaquetas

A transfusão de plaquetas é indicada para prevenir ou tratar hemorragias decorrentes de trombocitopenia ou disfunção plaquetária, conforme resumido na Tabela 35.5. A transfusão profilática é indicada para casos em que a contagem de plaquetas está abaixo de 5.000/μL. Para pacientes estáveis submetidos à quimioterapia, um limite de transfusão de plaquetas de 10.000/μL é utilizado com frequência (Rebulla, 1997). A meta da terapia profilática é alcançar contagens plaquetárias superiores a 25.000/μL (Schlossberg, 2003). Se o paciente estiver febril, tipicamente adota-se um limite de transfusão profilática igual a 20.000/μL. Para pacientes com sangramento ou submetidos a procedimentos invasivos, tais como endoscopia ou cirurgia, a meta da terapia transfusional de plaquetas é atingir níveis que se mantenham acima de 40.000 a 50.000/μL (British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force, 2003). Usualmente, essa medida garante a hemostasia, ainda que demore mais do que o normal para alcançar tais concentrações. Por esse motivo, para pacientes com sangramento em áreas críticas, como a retina ou o sistema nervoso central, a prática adota como padrão o limite-alvo de 100.000/μL. Esse nível de plaquetas tipicamente assegura que não haja nenhum atraso anormal da hemostasia. No sangramento associado à disfunção plaquetária, ou no sangramento trombocitopênico associado à coagulopatia, não há um limite de transfusão único e a terapia deve ser orientada pela condição clínica do paciente. O desvio cardiopulmonar pode resultar na aquisição de uma disfunção plaquetária transiente, a qual pode se manifestar como sangramento microvascular. A contagem de plaquetas não costuma ser um indicador útil em tais casos. A transfusão de plaquetas profilática não é indicada em casos de desvio cardiopulmonar de rotina.

Uma transfusão de plaquetas é relativamente contraindicada para pacientes com púrpura trombocitopênica imune (ITP, *imune thrombocytopenic purpura*). Em tais circunstâncias, a sobrevida das plaquetas após a transfusão é extremamente breve e a transfusão plaquetária somente é indicada quando há hemorragia severa. Nitidamente, considerando o consumo intravascular de plaquetas, a transfusão deve ser realizada com grande cautela. A transfusão de plaquetas em pacientes com trombocitopenia induzida por heparina ou TTP pode ter consequências deletérias (Harkness, 1981; Gordon, 1987).

É típico esperar que a transfusão de uma unidade de plaquetas de aférese, ou de um grupo equivalente de CPs derivados do sangue total, produza um aumento de 20.000 a 40.000/μL na contagem de plaquetas de um indivíduo adulto. Por uma questão prática, é possível estimar que, em aproximadamente 1 hora após a transfusão, a contagem de plaquetas sanguíneas deva apresentar um aumento de 8.000 a 10.000/μL para cada 1×10^{11} plaquetas transfundidas/m^2 de área de superfície corporal (Strauss, 1995). Todavia, existem muitas razões pelas quais esse aumento pode não ser obtido. O consumo ou sangramento, esplenomegalia, anticorpos dirigidos contra plaquetas e fármacos constituem causas de uma resposta precária à transfusão de plaquetas. Entre os fármacos que podem acarretar um incremento inadequado, estão antibióticos, heparina, agentes antiplaqueta (clopidogrel, tirofiban), quinidina e globulina antitimócito, entre outros. Ao avaliar a efetividade da transfusão de plaquetas, é útil considerar a dose e o tamanho do corpo através do cálculo do incremento de contagem corrigido (CCI, *correct count increment*).

$$\text{CCI} = \frac{\text{Incremento na contagem de plaquetas} \times \text{ASC}}{\text{Número de plaquetas transfundidas } (\times 10^{11})}$$

ASC = área de superfície corporal (m^2).
Exemplo:
Contagem de plaquetas pré-transfusional = 8.000/μL
Contagem de plaquetas pós-transfusional = 36.000/μL
ASC = 1,5 m^2
Dose de plaquetas = 3×10^{11}

$$\text{CCI} = \frac{24.000 \times 1{,}5}{3} = 12.000$$

Uma transfusão bem-sucedida é geralmente indicada por uma CCI > 7.500 em 1 hora, ou CCI > 4.500 em 24 horas. Obter a contagem de plaquetas em 1 hora após o término da transfusão pode ser útil na distinção das causas imunológicas e não imunológicas de refratariedade plaquetária. A refratariedade imune tipicamente resulta na detecção de um incremento de plaquetas inadequado na determinação realizada após 1 hora. A refratariedade tipicamente não imunológica se manifesta como um valor de CCI apropriado em 1 hora, porém, com encurtamento do tempo de sobrevida, de modo que a contagem de plaquetas 24 horas após a transfusão pode retornar aos níveis basais. É preciso observar que o CCI não indica a obtenção de uma contagem de plaquetas adequada. O CCI apenas mostra o grau de adequação do incremento detectado na contagem de plaquetas em relação ao número de plaquetas transfundidas.

Transfusão de plasma

A Tabela 35.6 resume as diretrizes para transfusão de plasma. O plasma pode ser utilizado para repor qualquer deficiência de proteínas plasmáticas. Concentrados proteicos purificados, como os de Fator VIII, albumina ou imunoglobulina, são preferencialmente utilizados na reposição de deficiências específicas, por serem altamente purificados, padronizados e trazerem um risco mínimo de transmissão de doenças infecciosas. O plasma é mais comumente utilizado para reposição de deficiências de fatores de coagulação, quando não há disponibilidade de concentrados de fatores. Deficiências multifatoriais são comuns na doença hepática, sangramento massivo, falha multiorgânica sistêmica e terapia com warfarina. Nesses casos, o grau de contribuição da deficiência de fatores para o sangramento é controverso. Os testes de coagulação padrão, tais como o tempo de protrombina (PT) e o tempo parcial de tromboplastina ativada (aPTT, *activated partial thromboplastin time*), são comumente empregados para avaliar a necessidade de uma transfusão de plasma. Entretanto, esses testes são fracamente preditivos do risco de sangramento. Em geral, uma transfusão de plasma não traz benefícios quando PT e aPTT equivalem a menos de 1,5 vezes o ponto intermediário do intervalo de referên-

Tabela 35.5 Diretrizes para a transfusão de plaquetas

Trombocitopenia devido à diminuição da produção
Patente estável: contagem de plaquetas < 10.000/μL
Febre: contagem de plaquetas < 20.000/μL
Sangramento, procedimento invasivo ou cirurgia: contagem de plaquetas < 40.000–50.000/μL
Sangramento retinal ou no SNC: contagem de plaquetas < 100.000/μL
Sangramento microvascular decorrente de disfunção plaquetária

Tabela 35.6 Diretrizes para a transfusão de plasma

Deficiência de fator de coagulação, indisponibilidade de concentrado do fator
Coagulopatia de diluição
Hemorragia na doença hepática
Coagulação intravascular disseminada (CID)
Reversão com Coumadin
Púrpura trombocitopênica trombótica (TTP)

cia. Se o INR for utilizado, em geral a transfusão de plasma não traz benefícios diante de valores abaixo de 1,5. Em casos de hemorragia envolvendo o sistema nervoso e a retina, o plasma é razoavelmente utilizado mediante valores de INR > 1,3. Para obtenção de um efeito hemostático máximo, o plasma deve ser transfundido imediatamente antes da realização de um procedimento invasivo. Para pacientes apresentando sangramento, pode ser necessário repetir a transfusão de plasma a cada 3 a 4 horas, a fim de manter níveis adequados de fatores de coagulação. De uma forma geral, a obtenção do efeito hemostático requer uma dose de 10 a 20 mL/kg. O plasma é a opção preferida para a rápida reversão da warfarina, embora o concentrado de complexo de Fator IX também seja efetivo (Boulis, 1999). O plasma é fonte da atividade de protease do vWF, que pode estar deficiente na TTP.

Transfusão de crioprecipitado

A Tabela 35.7 resume as diretrizes gerais para a transfusão de crioprecipitado. O crio pode ser utilizado para reposição de Fator VIII ou vWF. Concentrados de fator recombinante ou de alto grau de pureza, contudo, são as melhores alternativas. O crio é uma boa fonte de fibrinogênio e Fator XIII. A maioria dos pacientes com hipofibrinogenemia também apresenta deficiências de outros fatores de coagulação e são mais adequadamente tratadas com PFC. Existem evidências de que o crio pode ser efetivo no tratamento do sangramento urêmico, possivelmente através do fornecimento de formas de vWF de alto peso molecular (Triulzi, 1990). A terapia de DDAVP é a preferida nessa situação, ainda que o DDAVP se torne ineficaz após o uso repetido a curto prazo. Nesse momento, a transfusão de crio deve ser iniciada. Quando misturado ao cálcio e à trombina, o crio pode ser utilizado na produção de um selante de fibrina tópico para uso cirúrgico, embora sejam comercialmente disponibilizados produtos mais concentrados e vírus-inativados. Estima-se que cada unidade de crioprecipitado contenha no mínimo 80 unidades de atividade de fator VIII e 250 mg de fibrinogênio, apesar do conteúdo real ser variável.

Transfusão em massa

A transfusão em massa, usualmente definida como sendo a reposição de um volume sanguíneo em 24 horas, requer uma abordagem sistemática. Muitas vezes, a perda de um grande volume de sangue é causada por traumatismo; no entanto, também ocorre em casos de hemorragia GI (em particular, na doença hepática crônica), ruptura de aneurismas aórticos e alguns procedimentos cirúrgicos, como a transplantação de fígado. Não existe um protocolo único de transfusão em massa que seja ideal para todos os pacientes, embora seja útil estabelecer uma política institucional, uma vez que tais casos podem se tornar caóticos. É preciso dispensar atenção especial à identificação do paciente e da amostra, a fim de evitar erros de transfusão.

A supervisão transfusional do sangramento em massa tem como prioridade prevenir ou tratar o choque hipovolêmico, manter uma capacidade adequada de transporte de oxigênio, manter a pressão oncótica, corrigir ou prevenir coagulopatias e evitar os efeitos adversos da transfusão. A avaliação inicial do paciente deve incluir a obtenção da história médica pertinente (em especial, a ocorrência de doenças hepáticas, renais, cardiovasculares e hematológicas), história de transfusões anteriores ou problemas detectados em testes pré-transfusionais, exame para detecção de sangramento microvascular, contagem sanguínea completa (CCS) e perfil de coagulação (PT, aPTT, fibrinogênio). Observe que na hipovolemia, a CCS subestima a perda sanguínea. Uma amostra deve ser obtida e processada o mais rápido possível para a realização do teste pré-transfusional. A ressuscitação inicial usualmente é feita com líquidos cristaloides. Uma transfusão de hemácias deve ser considerada diante de perdas maiores que 15% do volume sanguíneo estimado (cerca de 1.000 mL, num adulto típico) no decorrer de um sangramento. Sempre que possível, as transfusões de hemácias devem ser totalmente compatibilizadas. Todavia, o paciente não deve perecer por falta de hemácias sorologicamente compatíveis. A transfusão pode ser iniciada com a administração de hemácias pertecentes ao grupo O não compatibilizadas. Se o tipo Rh do paciente for desconhecido, é preferível administrar hemácias Rh(D)-negativas, em especial para receptores do sexo feminino potencialmente férteis.

Coagulopatias podem ocorrer durante a transfusão em massa, como resultado da diluição, consumo ou disfunção. Durante a ressuscitação com administração de hemácias e líquidos, os níveis de fatores e contagens de plaquetas mensurados muitas vezes atingem valores acima daqueles esperados com base apenas na diluição (Counts, 1979; Murray, 1995), havendo considerável variação entre os pacientes. As coagulopatias por consumo ocorrem em casos de CID, queimaduras, lesão cerebral, hipertermia e sepse. Suas manifestações usuais são PT e aPTT prolongados, concentração de fibrinogênio e contagem de plaquetas abaixo dos valores esperados, além de presença de produtos de degradação da fibrina ou D-dímeros. A disfunção de plaquetas ou de fatores de coagulação pode ocorre na hipotermia, acidose, doença hepática ou insuficiência renal. Não existe um protocolo único estabelecido para a realização de transfusões de plasma ou plaquetas em casos de sangramento em massa. Entretanto, o plasma é tipicamente administrado quando os valores de PT ou aPTT ultrapassam o equivalente a 1,5 vezes o intervalo de referência, enquanto a administração de plaquetas é feita diante de contagens inferiores a 50.000. Em caso de sangramento significativo, talvez seja prudente esperar para realizar a transfusão de plaquetas somente depois que tiver sido controlado cirurgicamente, pois é provável que a transfusão seja ineficaz durante uma rápida perda sanguínea. O crioprecipitado pode ser administrado se os níveis de fibrinogênio estiverem abaixo de 100 mg/dL; no entanto, a hipofibrinogenemia usualmente é acompanhada de uma deficiência de outros fatores e, por esse motivo, o plasma com frequência é a melhor opção. A terapia é melhor orientada mediante a avaliação frequente dos parâmetros da coagulação.

Entre as complicações da transfusão em massa, estão a hipotermia, hipocalcemia e distúrbios acidobásicos. A hipotermia pode ser evitada pelo uso de dispositivos de aquecimento de alto fluxo. Quando a velocidade da transfusão excede 100 mL/min, pode haver uma queda clinicamente significativa dos níveis de cálcio ionizado, devido ao acúmulo de citrato. Nesse caso, é indicada uma suplementação de cálcio. Doença hepática, hipotensão e hipotermia podem exacerbar a hipocalcemia, de modo que é útil monitorar o intervalo QT corrigido. A quantificação do cálcio total não indicará acuradamente os níveis de cálcio ionizado. Durante a transfusão rápida de hemácias, é possível que seja observada uma modesta diminuição do pH arterial (Vretzakis, 2000). Por outro lado, a alcalose metabólica é um fenômeno comum após a realização de transfusões em massa, devido ao metabolismo do citrato.

Tabela 35.7 Diretrizes para a transfusão de crioprecipitado

Deficiência do Fator VIII, indisponibilidade de concentrado do fator
Doença de von Willebrand, indisponibilidade de concentrado do fator
Hipofibrinogenemia
Deficiência do Fator XIII
Sangramento urêmico (DDAVP preferível)
Selante de fibrina tópico (produto comercial preferido)

Transfusão neonatal e pediátrica

Os recém-nascidos, particularmente, recebem transfusões de hemácias em decorrência de anemias prematuras, doença hemolítica de recém-nascido (DHRN) ou perda de sangue iatrogênica. A exclusiva fisiologia do período neonatal e a relativa fragilidade da vasculatura do cérebro ainda em desenvolvimento necessitam de uma abordagem diferente em relação àquelas adotadas para crianças maiores e adultos. A Tabela 35.8 resume as diretrizes para transfusões neonatais. Uma transfusão de hemácias a 15 mL/kg caracteristicamente produz uma elevação de 2 a 3 g/dL nos níveis de Hb, enquanto uma transfusão de plaquetas a 10 mL/kg costuma produzir um aumento de 40.000 a 50.000/μL nas contagens plaquetárias. Para transfusões envolvendo grandes volumes, como uma transfusão de troca ou cirurgia cardíaca, pode ser indicada a seleção de CVSs frescas (em geral, obtidas há menos de 10 dias). Contudo, considerando uma transfusão de 15 mL/kg, a maioria dos bebês tolera a transfusão de CVSs armazenadas ainda dentro do prazo de validade sem apresentar efeitos colaterais (Strauss, 1996). Para um bebê prematuro apresentando determinado requerimento de transfusão estimado, o uso de alíquotas de uma única unidade dentro do prazo

Tabela 35.8 Diretrizes para a transfusão neonatal

Transfusão de hemácias
Hematócrito < 20% com anemia sintomática
Hematócrito < 30% com suplementos de O_2 < 35% ou ventilação mecânica com MAP < 6 cmH_2O
Hematócrito < 35% com suplementos de O_2 > 35% ou ventilação mecânica com MAP > 6 cmH_2O
Hematócrito < 45% com doença cardíaca congênita cianótica ou oxigenação extracorporal
Transfusão de plasma
Deficiência de fator de coagulação, indisponibilidade de concentrado do fator
Coagulação intravascular disseminada (CID)
Transfusão de plaquetas
Contagem de plaquetas < 30.000/μL em bebê nascido a termo com produção de plaquetas insuficiente
Contagem de plaquetas < 50.000/μL em bebê prematuro estável
Contagem de plaquetas < 100.000/μL em bebê prematuro instável

Adaptado de Roseff 2002.

de validade pode reduzir significativamente o número de exposições a que o doador é submetido. Bebês prematuros e aqueles que nasceram com baixo peso corporal apresentam maior risco de contrair infecção por CMV e doença do enxerto *vs.* hospedeiro (ver adiante).

A transfusão de troca neonatal para casos de hiperbilirrubinemia usualmente é indicada diante de níveis de bilirrubina total acima de 25 mg/dL. A associação da bilirrubina ao total de horas decorridas desde o nascimento tem valor preditivo na determinação do risco de *kernicterus* (icterícia nuclear) (Bhutani, 1999). Nesses casos, é típico realizar uma troca de dois volumes de sangue, com uma expectativa de redução da bilirrubina total e da massa de hemácias fetais em 25 e 70%, respectivamente. Também é possível utilizar sangue total ou CVSs reconstituídas em plasma compatível a um hematócrito de 45%.

Reações transfusionais

As reações transfusionais constituem um grupo diverso de reações colaterais transfusionais, que usualmente surgem durante ou logo após a transfusão. O *work up* e tratamento de uma reação transfusional devem ser estabelecidos em função do quadro clínico, especialmente nos casos atípicos. Quando a reação ocorre durante a transfusão, esta deve ser imediatamente suspensa e a linha endovenosa deve ser aberta e mantida em solução salina. É importante reconhecer que a unidade contra a qual o paciente apresenta reação não é necessariamente a mesma que está sendo infundida. Todas as reações transfusionais suspeitas devem ser relatadas ao banco de sangue ou ao serviço de transfusão.

Reações não hemolíticas febris

Uma reação transfusional febril é definida como uma elevação de 1°C na temperatura corporal, possivelmente acompanhada de calafrios ou rigidez. Os sintomas usualmente se manifestam durante a transfusão, mas também podem aparecer em até 1 hora após a finalização do procedimento. Um paciente hipotérmico no início da transfusão que, em seguida, manifesta uma esperada elevação da temperatura até os níveis normais, sem apresentar nenhum sintoma, não está tendo uma reação febril. Em alguns pacientes, pode ser impossível distinguir uma reação transfusional febril de um episódio de febre associado a uma doença.

É importante excluir a ocorrência de uma reação transfusional hemolítica ou uma possível contaminação bacteriana da unidade. Agentes antipiréticos, como acetaminofeno (325–500 mg) podem ser administrados. Tais fármacos não são de fato requeridos, uma vez que a febre oriunda de reações transfusionais não hemolíticas é autolimitada e comumente se resolve em 2 a 3 horas. A difenil-hidramina (50–100 mg) usualmente é administrada em situações como essa; no entanto, é provável que não surta nenhum efeito sobre o curso das reações febris.

Há controvérsias quanto à possibilidade de reiniciar uma transfusão após uma reação ter sido diagnosticada e o paciente, tratado. O principal argumento favorável ao reinício da transfusão é a redução do número de exposições do doador, principalmente quando um agrupamento de CPs é utilizado (Oberman, 1994). Por outro lado, os argumentos desfavoráveis à retomada da transfusão incluem a possibilidade de o paciente apresentar uma reação febril contínua à unidade, além da provável ocorrência de uma reação severa em caso de não exclusão definitiva de reação hemolítica ou de contaminação bacteriana (Widmann, 1994). A decisão de reiniciar a transfusão deve ser orientada pela condição clínica do paciente, bem como pelos resultados obtidos no teste de reação transfusional.

A pré-medicação com antipiréticos é utilizada com frequência para prevenir as reações febris, embora a eficácia dessa medida ainda precise ser estabelecida. Uma triagem aleatorizada e controlada com placebo foi incapaz de demonstrar a prevenção das reações febris pelo uso de acetaminofeno e difenidramina; contudo, o número de indivíduos que participaram do estudo talvez tenha sido insuficiente para demonstrar uma diferença relativamente pequena (Wang, 2002).

Alguns estudos mostraram que houve uma redução na incidência de reações febris desde a introdução da redução universal de leucócitos (Ibojie, 2002; Dzik, 2002; Uhlmann, 2001). No entanto, está claro que a redução de leucócitos não previne todas as reações febris. Estas também podem ser atribuídas ao acúmulo de citocinas pirogênicas nas unidades durante o período de armazenamento (Muylle, 1993). Esses mediadores biológicos são produzidos primariamente pelos leucócitos. As reações febris à transfusão de plaquetas podem ser amenizadas através do uso de CPs com menos de 4 dias de preparação (Kelley, 2000). A filtração realizada no momento da transfusão não promove a remoção das citocinas pirogênicas contidas nas unidades de sangue, embora possa remover outras citocinas e componentes do complemento ativados (Snyder, 1996). Tem sido observado que a utilização da redução de leucócitos pré-armazenamento pode reduzir a geração de citocinas em plaquetas e hemácias armazenadas, bem como é mais eficaz na prevenção das reações febris do que a redução de leucócitos pós-armazenamento (Federowicz, 1995). As citocinas acumuladas podem ser removidas pela redução do plasma ou através da lavagem dos componentes celulares do sangue (Heddle, 1994). A remoção do plasma parece ser equivalente à redução de leucócitos pré-armazenamento em termos de prevenção das reações febris (Heddle, 2002). A remoção do plasma não previne todas as reações febris.

Reações alérgicas

As reações alérgicas brandas à transfusão são lugar-comum. Podem ocorrer com qualquer tipo de componente do sangue, inclusive CVSs autológas (Domen, 2003). Os sintomas são prurido, urticária, eritema e vermelhidão cutânea. Cerca de 10% das reações alérgicas apresentam sinais e sintomas; contudo, não há envolvimento cutâneo. Diante do envolvimento GI, pode haver náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia.

Havendo uma reação alérgica, a transfusão deve ser descontinuada e o acesso endovenoso, mantido. Havendo envolvimento das vias aéreas superiores, pode ser necessária a pronta entubação do paciente. O oxigênio deve ser administrado em caso de dispneia ou evidência de dessaturação. As reações alérgicas brandas usualmente respondem à inoculação por via i.v. de anti-histamínicos, como difenidramina (50–100 mg). As reações mais severas podem requerer epinefrina. Nas reações cutâneas brandas, a transfusão usualmente pode ser reiniciada após o tratamento, sem que o paciente apresente recorrência nem piora dos sintomas. Já nas reações mais sérias, particularmente quando há envolvimento das vias respiratórias, a retomada da transfusão não é recomendável.

Com exceção das deficiências de IgA e haptoglobina, o antígeno específico contra o qual o paciente reage usualmente não pode ser identificado. A pré-medicação com 25 a 50 mg de anti-histamínicos (p. ex., difenidramina) por via oral ou i.v. pode prevenir a ocorrência de reações alérgicas brandas. Esteroides, como metilprednisolona (125 mg), podem ajudar pacientes que manifestam reações alérgicas repetidamente, embora a eficácia dos esteroides ainda precise ser comprovada.

Pacientes que apresentam reações alérgicas recorrentes ou significativas podem ser beneficiados pela concentração dos componentes celulares do sangue, através da remoção da maior parte do plasma ou pela lavagem das hemácias e plaquetas. Entretanto, não há garantias quanto ao uso rotineiro de componentes lavados para pacientes com reações alérgicas cutâneas.

Reações alérgicas (anafiláticas) severas

Além dos sinais típicos associados às reações alérgicas mais brandas, as reações anafiláticas e anafilactoides manifestam instabilidade cardiovascular, incluindo hipotensão, taquicardia, perda da consciência, arritmia cardíaca, choque e parada cardíaca. O envolvimento respiratório com dispneia ou estridor pode ser mais pronunciado do que aquele usualmente observado nas reações alérgicas típicas.

Diante da ocorrência de uma reação anafilática, a transfusão deve ser suspensa e o acesso endovenoso, mantido. A assistência de suporte, incluindo entubação, oxigênio, líquidos endovenosos e colocação do paciente em posição de Trendelenburg, deve ser prontamente instituída. É preciso haver disponibilidade imediata de epinefrina. Diante de uma hipotensão irresponsiva às medidas de apoio ou de brocoespasmo significativo, pode ser feita a administração de 0,3 a 0,5 mg (0,3–0,5 mL de uma solução 1:1.000) de epinefrina por via s.c. Essa dose pode ser reptida a cada 20 a 30 minutos, no máximo 3 vezes. Alternativamente, pode ser feita a administração de 0,5 mg de epinefrina por via i.v. (5 mL de uma solução 1:10.000), com repetição a cada 5 a 10 minutos, em caso de hipotensão refratária.

Podem ser administrados 50 a100 mg de anti-histamínico (p. ex., difenidramina) por via i.v. particularmente se houver manifestações cutâneas, como urticária. A aminofilina (dose de carga de 6 mg/kg) pode ser útil em caso de broncoespasmo. É provável que os esteroides não sejam eficazes em casos agudos, mas havendo persistência dos sintomas, pode ser feita a administração de fármacos como a hidrocortisona (500 mg).

Pacientes com deficiência de IgA que desenvolvem anticorpos antiIgA podem apresentar reação anafilática (Vyas, 1969). Pacientes que apresentam reações alérgicas consideráveis devem ser quantitativamente avaliados quanto aos níveis de IgA. Transfusões recentes podem elevar os níveis séricos de IgA. Contudo, no caso de uma deficiência de IgA já estabelecida, deve ser realizado o teste para detecção de anticorpos antiIgA, usualmente por um laboratório de referência. Havendo necessidade, é possível obter plasma deficiente em IgA a partir dos registros de doadores raros. Hemácias e plaquetas podem ser lavadas para remoção de quantidades suficientes de IgA, a fim de evitar reações.

Pacientes com deficiência de haptoglobina podem apresentar reações transfusionais anafiláticas similares, devido à presença de IgG ou IgE anti-haptoglobina (Shimada, 2002). A deficiência de haptoglobina é uma condição rara na população norte-americana, porém é mais comum do que a deficiência de IgA em pacientes japoneses que apresentam reações anafiláticas.

Reações hemolíticas agudas

As reações transfusionais hemolíticas agudas (RTHA), por definição, manifestam-se dentro de 24 horas após a transfusão. A hemólise intravascular é bem mais comum nas reações hemolíticas agudas do que a hemólise extravascular. Os sinais apresentados pelo paciente são febre e calafrios, náusea, vômito, dor, dispneia, taquicardia, hipotensão, sangramento e hemoglobinúria. A febre pode ser o sinal inicial de uma RTHA. Dessa forma, um aumento de 1°C na temperatura corporal deve conduzir à interrupção da transfusão de hemácias e ao início de uma avaliação laboratorial. A insuficiência renal é complicação tardia. A dor na RTHA tem sido descrita como localizada nos flancos, nas costas, abdômen, tórax, cabeça e também no sítio da infusão. Uma sensação subjetiva de angústia às vezes é relatada. Sangramentos inesperados podem ser decorrentes de uma CID. Durante cirurgias, hipotensão e sangramento excessivo podem constituir os únicos sinais de RTHA. Ambos podem ser atribuídos a causas diversas. Portanto, os médicos precisam estar atentos quanto à possibilidade de haver uma reação hemolítica nessa situação.

Os achados laboratoriais nas RTHAs incluem hemoglobinemia, hemoglobinúria, elevação da LDH, hiperbilirrubinemia e baixos níveis de haptoglobina. Os níveis de nitrogênio ureico e creatinina deverão estar aumentados se o paciente apresentar insuficiência renal. O teste de antiglobulinas direto (DAT, *direct antiglobulin test*) pode apresentar resultados positivos com padrão de campo misto diante da presença de hemácias incompatíveis circulantes, eventualmente transfundidas. Os estudos para identificação de anticorpos anti-hemácias podem ou não apresentar resultados positivos, dependendo da especificidade do anticorpo envolvido e da quantidade de anticorpos presentes no soro. A incompatibilidade ABO devida a um erro clerical constitui a causa mais comum de RTHAs.

Diante de um evento de reação hemolítica aguda, a transfusão deve ser descontinuada e o acesso endovenoso, mantido. A identidade do paciente e da(s) unidade(s) de CVSs devem ser reconfirmadas, sendo que as demais unidades de CVSs anteriormente dispensadas ao paciente devem ser localizadas e deixadas em quarentena. A reação deve ser prontamente relatada ao banco de sangue. Caso seja descoberto um erro de identificação, provavelmente deve haver outro paciente (p. ex., com nome parecido) que também pode estar correndo risco de ter recebido sangue incompatível.

O tratamento de uma RTHA deve ser orientado pela resposta clínica do paciente. Pacientes apresentando sintomas mínimos podem ser mais bem supervisionados por meio de uma observação cuidadosa. Entretanto, quando ocorrem reações severas, uma intervenção rápida e vigorosa pode salvar a vida do paciente. Não é demais repetir que o grau de severidade das RTHAs está diretamente relacionado ao volume de sangue incompatível transfundido. Sendo assim, o reconhecimento logo no início, a suspensão e a prevenção da transfusão de mais unidades incompatíveis constituem as primeiras etapas fundamentais do tratamento. É preciso dispensar uma atenção inicial ao suporte cardiovascular. Se o paciente apresentar hipotensão, pode ser indicada a ressuscitação com líquidos e o suporte pressórico. No entanto, é preciso ter cuidado para evitar uma sobrecarga líquida, especialmente no caso de pacientes que apresentam comprometimento da função cardíaca ou renal.

Como a carga de hemácias incompatíveis circulantes determina a gravidade e o curso das RTHAs, a realização de uma transfusão de troca com sangue antígeno-negativo pode ser considerada. Mais uma vez, a decisão de realizar uma transfusão de troca deve ser orientada pela resposta clínica do paciente. É inadequado expor o paciente ao risco adicional de contrair uma doença infecciosa, caso o processo hemolítico esteja sendo bem tolerado. No caso da incompatibilidade ABO, porém, uma transfusão de troca pode reduzir consideravelmente as chances de morbidade ou morte do paciente.

Considerando que a insuficiência renal é um problema importante para alguns pacientes, é preciso atentar para preveni-la. O tratamento precoce da hipotensão e da CID constituem as intervenções mais importantes a limitar a extensão de um possível comprometimento renal. Uma prática que vem sendo adotada com sucesso é a manutenção do débito urinário por meio da administração de líquidos endovenosos e diuréticos, manitol ou furosemida, logo no início do curso da reação. Tem sido recomendada a hidratação do paciente com solução salina normal e dextrose a 5% (1:1), a uma velocidade de fluxo de 3.000 mL/m^2 ao dia, bem como a administração de bicarbonato de sódio para manter o pH urinário acima de 7 (Nussbaumer, 1995). Também tem sido recomendada a infusão de uma dose inicial de manitol a 20% a cada 30 a 60 minutos, a um fluxo de 100 mL/m^2, passando em seguida a um fluxo de 30 mL/m^2 por hora, durante as 12 horas subsequentes (Slavc, 1992). Entretanto, caso haja oligúria em face da euvolemia, a carga de líquidos pode ser contraindicada.

Novas transfusões de hemácias devem ser evitadas até que a causa da reação tenha sido estabelecida. Todavia, antes de tudo, nenhum paciente deve acabar exsanguinado por falta de sangue sorologicamente compatível. Se possível, devem ser obtidas hemácias de tipo sanguíneo O, que sejam isentas de outros antígenos clinicamente significativos para os quais o paciente provavelmente tenha desenvolvido anticorpos. Devem ser considerados os resultados de todos os testes sorológicos realizados até então, procedendo-se ao julgamento clínico. Considerando que nas RTHAs o foco da atenção está voltado para as hemácias, é preciso ter cautela para evitar a transfusão de plasma ou plaquetas que possam agravar a hemólise, principalmente quando a incompatibilidade ABO é uma causa provável. A pressa desnecessária, tanto na avaliação sorológica como na tomada de decisão,

deve ser evitada, pois a maioria dos erros humanos é cometida mais frequentemente sob pressão.

Reações hemolíticas tardias

Por definição, as reações transfusionais hemolíticas tardias (RTHTs) demoram no mínimo 24 horas para ocorrer após a transfusão de uma unidade agressora. O tempo decorrido desde a transfusão até o diagnóstico de uma RTHT é bastante variável. A maioria dos pacientes apresenta reação num período de 2 semanas após ter recebido a transfusão. Entretanto, o reconhecimento clínico de uma RTHT pode ser feito somente após 6 semanas. Quase todas as RTHTs resultam de uma resposta anamnésica a um antígeno das hemácias, para o qual o paciente produziu anticorpos previamente, cuja concentração é baixa demais para ser detectada no teste pré-transfusional. Em raras ocasiões, uma RTHT pode ocorrer por causa da aloimunização do paciente a um antígeno das hemácias. A hemólise é tipicamente extravascular, mas também pode ocorrer hemólise intravascular. Felizmente, essas reações tendem a ser bem menos severas do que as RTHAs e, por esse motivo, podem passar desapercebidas. Alguns pacientes apresentam somente anemia. Outros sinais clínicos incluem febre ou calafrios, icterícia, dor ou dispneia. Raramente, pode haver insuficiência renal. Em pacientes com anemia falciforme, as RTHTs podem precipitar uma crise falciforme (Mintz, 1986).

Os achados laboratoriais nas RTHTs incluem anemia, elevação dos níveis de LDH, hiperbilirrubinemia, níveis baixos de haptoglobina, leucocitose, presença de um novo anticorpo dirigido às hemácias e reação positiva ao DAT. O grau de hiperbilirrubinemia dependerá da taxa e de quanta hemólise foi produzida, bem como da função hepática. Tipicamente, os níveis de bilirrubina não conjugada estão aumentados durante a hemólise ativa. Níveis reduzidos de haptoglobina não necessariamente indicam hemólise intravascular, pois também podem ser detectados na hemólise extravascular.

Muitos pacientes apresentam uma boa tolerância às RTHTs e podem necessitar apenas de um cuidadoso acompanhamento. Em geral, não se recomenda uma carga de líquidos nem diurese, a menos que haja um processo de hemólise intravascular ativa. Complicações, como insuficiência renal ou crise falciforme, devem ser devidamente tratadas. Havendo uma grande carga de hemácias antígeno-positivas, deve ser considerada a realização de uma transfusão de troca. De um modo geral, recomenda-se evitar a transfusão até que o anticorpo causador da manifestação seja identificado e sejam obtidas unidades antígeno-negativas. Entretanto, assim como nas RTHAs, a falta de sangue sorologicamente compatível não deve jamais ser motivo para deixar que o paciente atinja um alto grau de morbidade por anemia. A escolha das hemácias para transfusão deve ser feita com base nos resultados do teste sorológico, sendo necessário haver uma boa comunicação entre o médico diretor do banco de sangue e o médico do paciente.

Como a hemólise extravascular é semelhante à AHA, em que a infusão de uma dose elevada de imunoglobulina endovenosa (IVIG, *intravenous immunoglobulin*) pode ser útil, também no tratamento das RTHTs pode ser considerada a realização de uma IVIG. Uma única dose de IVIG (400 mg/kg) infundida ao longo das 24 horas de transfusão tem sido empregada com sucesso na prevenção de reações em pacientes aloimunizados, para os quais talvez não seja possível obter sangue compatível (Kohan, 1994). Cinco pacientes tratados dessa forma apresentaram elevações sustentadas no hematócrito, sendo que não houve desenvolvimento de reações transfusionais em nenhum dos casos.

Contaminação bacteriana dos componentes do sangue

A apresentação clínica de uma reação transfusional causada por componentes sanguíneos contaminados com bactérias usualmente é dramática. O início dos sintomas, na maioria dos casos, ocorre durante ou logo após a transfusão. A manifestação tardia, que ocorre depois de pelo menos 1 dia, é mais raramente relatada em casos de transfusões de plaquetas contaminadas. Os sintomas mais comuns são febre, calafrios, hipotensão, choque, náuseas e vômitos (Perez, 2001; Kuehnert, 2001). O paciente também pode apresentar dispneia, dor e diarreia. O desenvolvimento de febre alta e hipotensão durante ou pouco depois da transfusão particularmente constitui indício da possível transfusão de uma unidade contaminada. As complicações clínicas decorrentes da contaminação bacteriana são significativas, muitas vezes resultando em choque, insuficiência renal, CID e morte do paciente. A taxa de mortalidade é elevada e depende do tipo de componente envolvido, carga e identidade do organismo causador, bem como condição clínica do paciente. Os fatores relativos ao paciente associados à ocorrência das reações clínicas são trombocitopenia e pancitopenia. Os fatores de risco de fatalidade incluem contaminação por bastonetes Gram-negativos, idade do paciente, menor volume de componente transfundido e menor tempo decorrido desde o preparo do CP armazenado. Esses dois últimos fatores são mais provavelmente os que refletem a presença de um maior número de microrganismos no componente. O organismo envolvido depende do tipo e do armazenamento do componente sanguíneo. Foram demonstradas hemácias contendo espécies de *Acinetobacter, Escherichia, Staphylococcus, Yersinia* e *Pseudomonas*. Há relatos da contaminação de CPs por bastonetes Gram-negativos, como *Acinetobacter, Klebsiella, Salmonella, Escherichia* e *Serratia*, e bastonetes Gram-positivos, como *Proprionibacterium* (Andreu, 2002; Kuehnert, 2001). Alguns serviços de transfusão fazem cultura de bactérias de todos os CPs que tenham causado uma reação transfusional febril, uma vez que, havendo um concentrado de hemácias proveniente da mesma doação, é possível eliminá-lo.

Usualmente, o tratamento deve ser iniciado antes da identificação do agente causador. Se o paciente apresentar reação, a transfusão deve ser descontinuada, a unidade e a tubulação associada devem ser removidas, e todas as demais bolsas de sangue recentemente transfundidas devem ser recuperadas. Cuidados de suporte para a circulação e a respiração devem ser iniciados, conforme a necessidade. A terapia de antibióticos inicialmente deve incluir uma cobertura de amplo espectro, como um β-lactâmico e um aminoglicosídeo, até que as colorações ou culturas microbiológicas apontem o agente causador da reação.

Os métodos empregados para limitar a contaminação bacteriana são cultura, inspeção de CPs para observação de "turbilhão" e quantificação do consumo de oxigênio (AuBuchon, 2002; Wagner, 1996; Ortolano, 2003). Alguns estudos demonstraram que o uso de plaquetas de aférese pode resultar em menor incidência de reações bacterianas (Ness, 2001). A tecnologia da redução de leucócitos futuramente poderá proporcionar uma significativa diminuição – ou até mesmo eliminação – das contaminações por bactérias (Lin, 1997; Zavizion, 2003).

Lesão pulmonar aguda associada à transfusão (TRALI)

A TRALI usualmente surge durante ou em algumas horas após a transfusão. Seus sintomas incluem dispneia, hipoxemia, taquicardia, febre, hipotensão e cianose (Kleinman, 2004). A febre e a hipotensão, quando presentes, usualmente são de grau moderado e respondem rapidamente à administração de antipiréticos e líquidos. Caracteristicamente, observa-se ausência de sons respiratórios anormais. O exame de raios X do tórax costuma apontar a presença de um edema pulmonar. Por definição, os sinais de insuficiência cardíaca estão ausentes. Pacientes com malignidades hematológicas ou doença cardíaca parecem estar expostos a um maior risco de desenvolver TRALI (Silliman, 2003). Essa maior propensão pode refletir o fato de serem esses grupos de pacientes os que recebem a maior parte das transfusões de plaquetas. A taxa de mortalidade relatada é de aproximadamente 20%, dependendo do grau de severidade da lesão pulmonar e do estado clínico subjacente do paciente. Existe uma ampla faixa de graus de severidade associada a esse tipo de reação. As formas mais brandas podem não ser imediatamente reconhecidas.

O diagnóstico diferencial inclui sobrecarga circulatória, contaminação bacteriana, reações alérgicas, síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*), embolia pulmonar e hemorragia pulmonar. O diagnóstico é estabelecido pela observação do edema pulmonar. Na artéria pulmonar, a pressão de encunhamento não é elevada. A TRALI é caracterizada pela resolução dentro de um período de 48 a 96 horas, contadas a partir do início da reação (Popovsky, 1992). A falha do paciente em apresentar uma melhora substancial após esse período deve pôr o diagnóstico em dúvida.

Embora os achados do exame de radiografia torácica possam persistir por mais de 7 dias, diferente do que se observa na ARDS, aparentemente não há desenvolvimento de nenhuma sequela pulmonar. Uma redução das contagens de leucócitos ou plaquetas pode ser útil como indício de TRALI causada por transfusão de anticorpos dirigidos ao HLA de classe I (Cooling, 2002).

O tratamento da TRALI é suportivo. É preciso suspender uma transfusão que esteja em andamento, bem como recuperar as bolsas de sangue das unidades recentemente transfundidas. O banco de sangue deve ser consultado quanto à avaliação da TRALI. A administração de oxigênio usualmente é indicada nesses casos. Pacientes gravemente afetados podem necessitar de ventilação mecânica. O uso de corticosteroides parece ter pouco ou nenhum valor. A diurese não é indicada diante da ausência de sinais de sobrecarga de líquidos.

A ocorrência de TRALI tem sido atribuída à presença de anticorpos no plasma da unidade transfundida, os quais são dirigidos contra o HLA ou antígenos de granulócitos presentes nos leucócitos do receptor (Kopko, 2002). O plasma doado por mulheres multíparas pode implicar maior risco de TRALI (Palfi, 2001). Essa lesão também tem sido atribuída aos mediadores lípidicos inflamatórios presentes na unidade, os quais ativam neutrófilos previamente condicionados (em decorrência de cirurgias, traumatismo ou inflamação) e, assim, causam lesão e extravasamento capilar (Silliman, 2003).

Doença do enxerto *versus* hospedeiro

A doença do enxerto *versus* hospedeiro associada à transfusão (DEVH-AT) pode ocorrer diante da proliferação de células T viáveis do doador, as quais não são reconhecidas como estranhas pelo sistema imune do receptor, mas que reconhecem e rejeitam o próprio hospedeiro como estranho. Pacientes que apresentam imunodeficiências celulares marcantes correm risco de desenvolver DEVH-AT (Tab. 35.9). Tais condições incluem imunodeficiências celulares congênitas (síndrome de DiGeorge, SCIDS [*severe combined immunodeficiency syndrome*]), imaturidade do sistema imune (transfusões intrauterinas, recém-nascidos apresentando peso corporal muito baixo), imunodeficiências associadas a doenças (doença de Hodgkin) e imunodeficiências celulares associadas à terapia (transplante de CPrHs, tratamento com fludarabina). As imunodeficiências humorais, como a imunodeficiência variável comum (CVID, *common variable immunodeficiency*), não constituem factores de risco para DEVH. Embora a infecção pelo HIV possa causar acentuada disfunção das células T, não aumenta o risco de DEVH-AT. Os regimes imunossupressivos comuns utilizados na transplantação de órgãos sólidos e os regimes quimioterápicos tipicamente empregados no tratamento de tumores sólidos também não intensificam o risco de DEVH-AT. Entretanto, há relatos de DEVH-AT em paciente submetidos à quimioterapia agressiva para tratamento de neuroblastoma, entre outros tumores. Pacientes com imunidade normal podem estar expostos ao risco de desenvolver DEVH-AT caso sejam homozigotos para um haplótipo HLA e recebam transfusão de doador que, apesar de heterozigoto, compartilha um haplótipo. Nesse caso, os linfócitos do receptor são incapazes de reconhecer como estranhos os linfócitos transfundidos; no entanto, as células transfundidas identificam como estranhas as próprias células do receptor (Fig. 35.1). Essa situação é mais provável nas doações envolvendo parentes próximos (primeiro ou segundo grau), mas também podem ocorrer ao acaso, particularmente em populações relativamente homogêneas (Aoun, 2003).

A DEVH-AT tipicamente se manifesta dentro de um período de 2 a 50 dias após a transfusão. Os achados característicos incluem erupção, diarreia, febre, disfunção hepática e pancitopenia. A mortalidade é maior que 90% e a maioria dos pacientes morre em decorrência

Tabela 35.9 Indicações da irradiação de componentes do sangue para prevenção de DEVH-AT

Indicações absolutas
Imunodeficiência celular congênita
Transplante de células progenitoras hematopoéticas
Doença de Hodgkin
Transfusões de granulócitos
Transfusões intrauterinas (TIU)
Transfusões para recém-nascidos que receberam TIU
Transfusões provenientes de pais biológicos
Quimioterapia com análogos de purina (fludarabina)
Indicações prováveis
Bebês com baixo peso corporal ao nascimento (< 1.200 g)
Malignidades hematológicas, exceto doença de Hodgkin
Concentrados de plaquetas HLA-compatíveis
Quimioterapia de doses elevadas, radioterapia e/ou imunoterapia agressiva
Indicações controversas
Transplante de órgãos sólidos
Transfusões de grande volume ou de troca para bebês que não receberam TIU
Anemia aplásica
Linfopenia absoluta (ALC < 500 µL)
Irradiação CONTRAINDICADA
Infecção por HIV
Hemofilia
Transfusões de volumes pequenos para bebês nascidos a termo que não receberam TIU
Pacientes idosos
Dose típica de terapia imunossupressora (exceto na terapia com análogos de purina)
Pacientes cirúrgicos imunocompetentes
Gravidez
Distúrbios de membrana celular, metabólicos ou da hemoglobina (p. ex., talassemia, AF)

Adaptado de Gorlin, 2005.

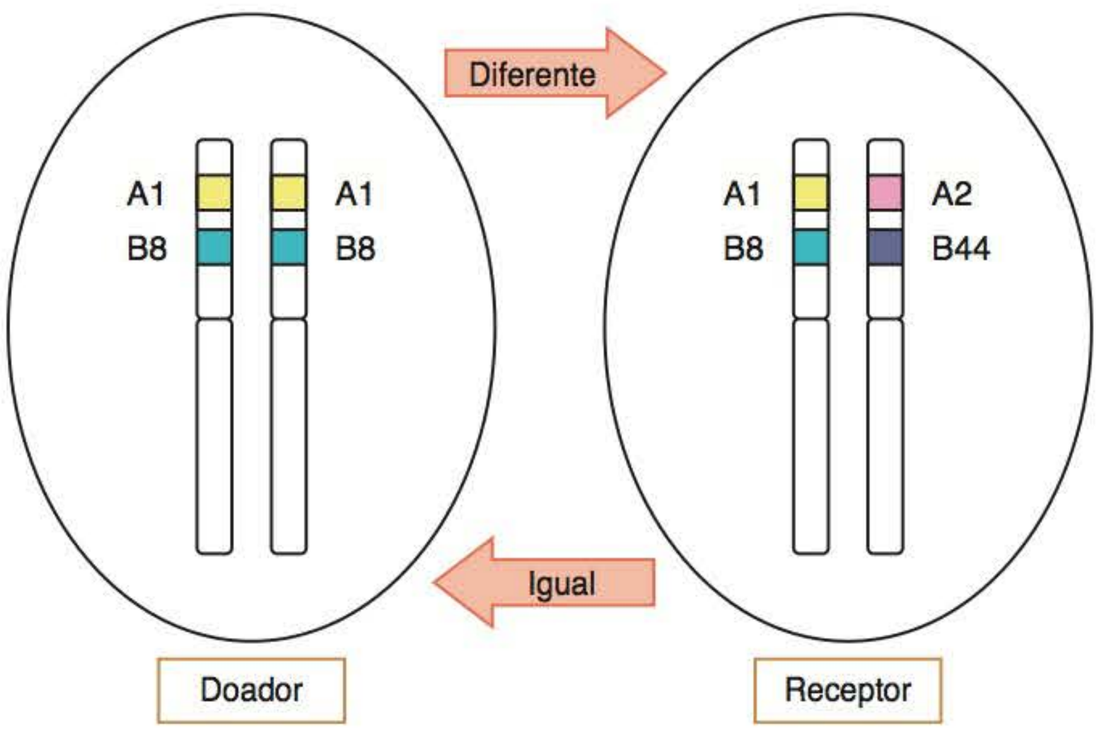


Figura 35.1 Mecanismo de DEVH-AT em pacientes imunocompetentes. O doador é homozigoto no lócus do HLA de classe I. O receptor é heterozigoto e compartilha um haplótipo com o doador. As células T enxertadas oriundas do doador reconhecem o receptor como estranho, contudo as células T do receptor não identificam como estranhas as células T do doador.

da infecção. Em contraste com a DEVH da transplantação de CPrHs alogênicas, na DEVH-AT a medula óssea tem o tipo do receptor e constitui o órgão-alvo. Tentativas de tratamento agressivo têm sido realizadas, contudo são raros os casos bem-sucedidos. Portanto, é fundamental adotar medidas preventivas.

Ainda não foi estabelecido o número mínimo necessário de células T transfundidas viáveis para causar DEVH-AT. No entanto, sabe-se que os métodos atuais de redução de leucócitos não bastam (Hayashi, 1993). A exposição à radiação ionizante (raios γ ou raios X) pode provocar danos cromossômicos e impedir a replicação dos leucócitos transfundidos. As diretrizes estabelecidas pelo FDA atualmente em vigor sugerem uma dose de plano médio de 25 Gy, com uma dose mínima de 15 Gy em qualquer ponto no frasco de sangue (ver a discussão anterior sobre componentes especiais). É possível que a tecnologia da redução de patógenos baseada na modificação do ácido nucleico seja efetiva na prevenção da DEVH-AT, mas isso ainda precisa ser estabelecido.

Reações hipotensivas

A hipotensão associada à transfusão é definida como aquela que ocorre durante a realização da transfusão, na total ausência de sinais ou sintomas de outras reações transfusionais, como febre, calafrios, dispneia, urticária ou rubor. O grau de hipotensão requerido para estabelecer o diagnóstico é controverso, porém é possível definir-lo razoavelmente como sendo equivalente a uma queda mínima de 10 mmHg na pressão arterial sistólica ou diastólica em relação aos valores basais pré-transfusionais. Entretanto, se a pressão sanguínea imediatamente pré-transfusional estiver elevada em relação à pressão sanguínea usual do paciente, e se a pressão arterial não cair abaixo da pressão sanguínea habitual do paciente, a reação observada não deve ser considerada hipotensiva. A hipotensão tem início durante a transfusão e é resolvida rapidamente com a interrupção da transfusão. Caso a hipotensão persista por mais de 30 minutos após a descontinuação da transfusão, outro diagnóstico deve ser fortemente considerado. As reações hipotensivas têm sido associadas às transfusões de hemácias e plaquetas. Algumas reações foram associadas ao uso de filtros de redução de leucócitos (Fried, 1996; Abe, 1997).

Caso haja hipotensão, a transfusão deve ser descontinuada e o acesso endovenoso, mantido. O paciente deve ser posicionado com a cabeça abaixada e os pés elevados (posição de Trendelenburg). Líquidos isotônicos devem ser administrados ao paciente. O suporte pressório é indicado apenas em caso de hipotensão severa e refratária aos líquidos endovenosos.

A causa da hipotensão associada à transfusão ainda precisa ser definitivamente estabelecida. Entretanto, é mais provável que essa condição se deva à liberação de bradicinina através da ativação da via de contato da coagulação. Algumas reações foram associadas à ação de fármacos inibidores da ACE (enzima conversora de angiotensina) no receptor e/ou ao uso de filtros de redução de leucócitos. A ACE é a principal enzima envolvida na quebra de bradicinina na circulação. Alguns filtros, em particular aqueles com carga líquida de superfície negativa, parecem causar ativação da calicreína e clivagem de cininogênio de alto peso molecular, resultando na liberação de bradicinina (Davenport, 1997; Shiba, 1997; Mair, 1998). Todavia, existe variabilidade, uma vez que nem todas as unidades filtradas mostram ativação.

Hemólise não imune

A lise de hemácias pode ser decorrente das condições de armazenamento, manuseio ou transfusão. A mistura de líquidos hiper ou hiposmóticos às hemácias pode acarretar uma lise significativa. Pacientes que recebem hemácias lisadas podem ser notavelmente tolerantes a elas. Entretanto, podem apresentar comprometimento transitório ao nível hemodinâmico, pulmonar e renal. Existe até mesmo um relato de morte de paciente transfundido com hemácias lisadas (Sazama, 1990). A transfusão de sangue autólogo de um paciente com hemoglobina falciforme pode resultar em hemólise e morte (DeChristopher, 1990). Os sinais clínicos usualmente são hemoglobinemia e hemoglobinúria. Pode haver hipercalemia, particularmente em pacientes com insuficiência renal. Também pode haver febre. O diagnóstico é estabelecido pela constatação da presença de hemácias lisadas na unidade transfundida acompanhada da exclusão de outras possíveis causas, como reações transfusionais hemolíticas. Todas as unidades de CVSs apresentam um discreto grau de hemólise após longos períodos de armazenamento, contudo este nível de hemólise não leva ao aparecimento de sinais clínicos após a transfusão. As principais complicações descritas envolvendo a hemólise não imunológica são insuficiência renal e arritmia cardíaca decorrente da hipercalcemia. Reações transfusionais hemolíticas raramente ocorrem quando nenhum anticorpo anti-hemácia é identificável (Davey, 1980). Pode ser impossível diferenciar essa condição de uma hemólise não imune, sem a realização de uma cuidadosa investigação acerca das circunstâncias em que se deu a transfusão.

Havendo hemólise não imune, a transfusão deve ser suspendida e o acesso endovenoso, mantido. A bolsa de sangue, com toda a tubulação e líquidos endovenosos acoplados, devem ser preservados para fins de investigação. Deve ser excluída a possibilidade de uma reação transfusional hemolítica. Os níveis séricos de potássio devem ser checados e um eletrocardiograma deve ser providenciado para avaliar a hipercalemia. É um tratamento de apoio. O débito urinário deve ser mantido por meio da hidratação do paciente, a menos que haja qualquer contraindicação, como insuficiência renal.

Sobrecarga circulatória associada à transfusão

A sobrecarga circulatória é uma reação transfusional bastante comum e evitável. Manifesta-se como insuficiência cardíaca congestiva durante ou pouco depois da transfusão. Os sinais e sintomas podem ser dispneia, ortopneia, cianose, taquicardia, elevação da pressão sanguínea, edema pulmonar, distensão da veia jugular, edema pedal e dor de cabeça. O diagnóstico diferencial inclui TRALI, reações alérgicas e causas de insuficiência congestiva não associadas à transfusão, tais como doença cardíaca valvular. É bem sabido que os pacientes portadores de doença cardíaca preexistente correm risco de apresentar sobrecarga circulatória ao serem submetidos a transfusões. Pode ser difícil estabelecer um diagnóstico de sobrecarga circulatória através do exame clínico e radiológico. A avaliação dos níveis de peptídeo natriurético cerebral (BNP, *brain natriuretic peptide*) pode ser útil na determinação do diagnóstico (Zhou, 2005).

A sobrecarga volumétrica deve ser antecipada no caso de pacientes que apresentam risco, bem como prevenida o quanto antes. O sangue deve ser transfundido devagar. Embora a transfusão usualmente termine em 4 horas, a duração do processo pode ser estendida mediante indicação médica. Todavia, caso a transfusão dure mais de 6 horas, devem ser consideradas estratégias alternativas. É possível transfundir pequenos volumes com intervalos adequados entre cada transfusão, de modo a permitir a realização da diurese. Para evitar exposições adicionais do doador, uma unidade pode ser dividida em partes de forma estéril e uma das partes pode ser conservada no banco de sangue para posterior transfusão. As unidades também podem ser concentradas através da remoção do plasma. Um diurético pode ser administrado antes ou durante a transfusão.

Doença transmitida por transfusão

As melhorias introduzidas na triagem e nos testes de doadores resultaram em dramática redução dos riscos de transmissão de doenças via transfusão nas duas últimas décadas. Por exemplo, nos EUA, o risco de transmitir HIV por transfusão de sangue foi reduzido de aproximadamente 1 a cada 100 transfusões em certas áreas urbanas, no início dos anos 1980, para quase 1 a cada 2 milhões em todo o país, nos dias de hoje. É quase impossível medir com exatidão os riscos atuais de hepatite e transmissão do HIV empregando metodologia epidemiológica. As estimativas de risco para HIV, HBV e HCV atualmente são feitas com base em modelos matemáticos, considerando a probabilidade de

Tabela 35.10 Riscos aproximados atuais de transmissão de doenças infecciosas por unidade

HIV	1 : 2.000.000
HBV	1 : 250.000–1 : 500.000
HCV	1 : 2.000.000
HTLV-I/II	1 : 3.000.000
Vírus West Nile	~ 1 : 7.000.000

haver doações em janela-fase com marcação-negativa, cepas de vírus detectadas de maneira não confiável pelos testes em uso, portadores anticorpos-negativos persistentes e erros de teste (Dodd, 2002). A Tabela 35.10 resume as atuais (2004) estimativas de risco.

Hepatite

Historicamente, o HCV tem sido o responsável pela maioria dos casos de hepatite pós-transfusional (HPT). Aproximadamente 10% das hepatites crônicas são atribuíveis a transfusões de sangue (Alter, 1999). A HPT é assintomática na maioria dos casos. Foram observados três padrões de elevação da transaminase: monofásica, polifásica e platô (Pastore, 1985). Cerca de 75 a 85% dos indivíduos apresentam infecção por HCV persistente, dos quais 50% apresentam evidências de hepatite crônica. Dos pacientes com HPT por HCV, 10% eventualmente manifestam doença hepática (Seeff, 1992). A HPT aguda causada por HBV é tipicamente mais grave em 25 a 30% dos indivíduos que apresentam icterícia, com um tempo de incubação de 40 a 60 dias (Walsh, 1970; Seeff, 1975). Menos de 10% dos indivíduos infectados progridem para um quadro de hepatite crônica. Quando adquirida antes dos 5 anos de idade, a hepatite aguda por HBV costuma ser menos severa, porém o risco de desenvolvimento de hepatite crônica é bem maior. O vírus da hepatite D (HDV) requer coinfecção com o HBV para que possa se replicar. Se adquirido ao mesmo tempo que o HBV, o HDV pode causar uma severa hepatite e insuficiência hepática. Quando adquirido durante as infecções crônicas por HBV (superinfecção), o HDV aumenta significativamente o risco de doença hepática crônica severa. A transmissão do HDV por transfusão é um evento raro, sendo que os métodos de triagem para HBV também são efetivos contra o HDV. Os vírus da hepatite A (HAV) e da hepatite E (HEV) apresentam períodos relativamente curtos de viremia e não levam à progressão ao estado de portador crônico. A transmissão desses vírus por transfusão é rara (Sherertz, 1984; Matsubayashi, 2004). O vírus da hepatite G (HGV, GBV-C) possui uma taxa de prevalência aproximada de 1% entre doadores de sangue assintomáticos (Roth, 1997). Ainda que seja sabidamente transmissível por transfusão, a infeção por GBV-C não apresenta uma relação causal estabelecida com a hepatite nem com a doença hepática crônica (Alter, 1997).

Vírus da imunodeficiência humana

As manifestações clínicas do HIV transmitido por transfusão são semelhantes àquelas da infecção por HIV adquirida através de outras vias. Uma síndrome viral aguda ocorre em cerca de 60% dos casos. A infecção não tratada e assintomática persiste por cerca de 10 anos antes que a doença definitiva da AIDS ocorra, embora a progressão tenda a ser mais rápida em indivíduos mais velhos (Blaxhult, 1990). O tempo de progressão da AIDS em receptores de transfusão pode ser menor do que no doador implicado; contudo, essa característica pode refletir o efeito da idade e de outros cofatores (Busch, 1994). Isolados virais do grupo O não são detectados de forma confiável pelos testes de EIA em uso. Atualmente, a prevalência do HIV do grupo O é baixa nos EUA, embora seja endêmica em algumas regiões da África Ocidental, sendo que também há a transmissão transfusional por emigrantes provenientes dessas áreas (Pau, 1996).

Vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV)

O HTLV-I (*human T cell lymphotropic virus-I*) está associado de forma causal ao linfoma/leucemia de células T do adulto (ATL, *adult lymphoma T cell*) e à mielopatia associada ao HTLV (HAM, *HTLV-associated myelopathy*) (Manns, 1999; Hall, 1996). A maioria dos portadores é assintomática. ATL ou HAM, ambos se desenvolvem apenas em uma minoria dos casos, após um período de latência de muitos anos. O HTLV-I é raro nos EUA. O HTLV-II é prevalente entre os usuários de drogas endovenosas nesse mesmo país, além de também estar associado à HAM (Murphy, 1997). Doadores de sangue HTLV-II positivos apresentam maior incidência de bronquite aguda, pneumonia, infecção da bexiga ou rim e artrite. Doadores HTLV-I positivos apresentam maior incidência de infecção da bexiga ou rim e artrite (Murphy, 2004).

Citomegalovírus

O CMV é comum na população em geral. Em indivíduos imunocompetentes causa sintomas menos importantes, porém se torna latente em virtualmente todos os casos (Larsson, 1998). Cerca de 50% dos doadores de sangue são soropositivos para CMV, embora o risco estimado de transmissão através de uma transfusão soropositiva seja de aproximadamente 1% (Preiksaitis, 1988). Em pacientes com imunodeficiência celular, o CMV pode causar pneumonite, hepatite, rinite e falência de múltiplos órgãos. A transmissão do CMV pode ser minimizada pelo uso de componentes sanguíneos soronegativos, embora diversos estudos tenham demonstrado o desenvolvimento de uma baixa taxa de infecção por CMV nesses pacientes. Falta esclarecer se esse achado foi devido a uma falha em detectar doadores potencialmente infectados ou se a transmissão viral ocorreu por outras vias. Vários estudos, incluindo uma triagem prospectiva aleatorizada, mostraram que componentes sanguíneos submetidos à redução de leucócitos são tão efetivos quanto componentes soronegativos na redução do risco de transmissão do CMV (Bowden, 1995).

Parvovírus B-19

O parvovírus B-19 também é comum na população em geral. A incidência de viremia entre doadores de sangue é variável e apresenta picos episódicos, porém corresponde em média a aproximadamente 1:5.000 (Hitzler, 2002). Na maioria dos indivíduos, o parvovírus B-19 causa uma doença febril autolimitada branda. Entretanto, é trófico para os precursores eritrocitários existentes na medula óssea, podendo causar aplasia particularmente diante de uma eritropoiese acelerada. A infecção por parvovírus transmitida por transfusão foi implicada como causa de anemia crônica após transplantes da medula óssea e na talassemia (Cohen, 1997; Zanella, 1995).

Vírus West Nile

O vírus West Nile (WNV) chegou nos EUA em 1999. Desde a epidemia inicial, em Nova York, o vírus tem se disseminado por todo o país. As aves são seu reservatório natural e os mosquitos atuam como vetores da transmissão. Os seres humanos são seus hospedeiros acidentais, sendo que a infecção ocorre durante os períodos de atividade do mosquito. As infecções mais agudas por WNV são assintomáticas, com a doença febril ocorrendo em 1 a cada 5 casos de infecção e a doença neuroinvasiva, em cerca de 1 a cada 150 casos de infecção (Petersen, 2002). Em 2002, o CDC confirmou a ocorrência de 23 casos de transmissão do WNV via transfusão (Pealer, 2003). Nas áreas de pico de atividade do WNV, a taxa estimada de viremia entre doadores de sangue era de 1,5 em 1.000 doadores (Biggerstaff, 2002). A triagem de doadores para detecção do vírus através do teste de ácido nucleico (NAT) foi implementada em julho de 2003, na América do Norte. Depois disso, raros casos de transmissão por transfusão de sangue foram relatados, mais provavelmente devido ao baixo número de cópias virais que escapam à detecção (Macedo de Oliveira, 2004).

Malária

Cerca de 1.300 casos de malária são relatados anualmente nos EUA. A transmissão da malária por transfusão ainda é rara (1–2 casos anualmente). Os doadores implicados usualmente apresentam em seu histórico viagem para uma área endêmica (Mungai, 2001).

Babesiose

As espécies de *Babesia* são endêmicas entre os mamíferos na América do Norte, e são transmitidas por carrapatos do gênero *Ixodes*. Inúmeros casos de babesiose são assintomáticos ou brandos. Entretanto, a doença pode ser mais severa em pacientes asplênicos ou imunossuprimidos. O parasita é capaz de sobreviver em hemácias refrigeradas. Cerca de 40 casos de babesiose transmitida por transfusão foram relatados nos EUA, embora seja possível que a transmissão em áreas endêmicas apresente uma incidência de 1 a cada 1.800 unidades de hemácias (Lux, 2003; Cable, 2001).

Tripanossoma cruzi

O *T. cruzi* é o agente causador da doença de Chagas e é endêmico em algumas regiões das Américas Central e do Sul. É possível que existam 50.000 a 100.000 portadores crônicos de *T. cruzi* nos EUA, em grande parte devido à imigração (Kirchhoff, 1987). Nesse país, foram relatados raros casos de transmissão da doença de Chagas via transfusão (Nickerson, 1989). O risco depende da demografia da população doadora. Entre os doadores de sangue, foram estimadas taxas de soropositividade de 1:7.500 em Los Angeles, 1:9.000 em Miami, e 1:25.000

ao nível nacional (Leiby, 2002). Todavia, a raridade dos casos confirmados de transmissão por transfusão, mesmo nas áreas de alto risco, sugere que a soropositividade superestima a infectividade.

Encefalopatias espongiformes transmissíveis

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) são causadas por uma proteína chamada príon. Essa proteína é capaz de assumir uma configuração anormal resistente à degradação enzimática e serve de molde para a deposição de mais príons anormais. A doença de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD) é uma EET humana que emergiu a partir de uma encefalopatia espongiforme bovina epidêmica, provavelmente como resultado da contaminação de suprimento alimentar humano com um príon patogênico oriundo do gado afetado. A transmissibilidade da vCJD através do sangue em modelos experimentais sugere que existe um possível risco de transmissão via transfusão. A magnitude desse risco atualmente é desconhecida. Entretanto, houve dois casos de aquisição de príon (um deles com vCJD) por indivíduos que receberam transfusões de doadores previamente diagnosticados com vCJD (Llewelyn, 2004; Peden, 2004).

Conclusão

A descoberta dos grupos sanguíneos A, B, e O por Carl Landsteiner em 1900 conduziu ao uso disseminado da terapia de transfusão de sangue no início do século XX. Esse tratamento proporcionou diretamente uma notável evolução na assistência cirúrgica, traumatológica e médica. Embora avanços marcantes tenham sido alcançados na identificação e redução das infecções transmissíveis por transfusão, a incidência dos principais riscos não infecciosos, TRALI e transfusões errôneas decorrentes de erros clericais vem se mantendo estável há muitos anos. Nos últimos anos, uma crescente atenção tem sido dispensada a essas últimas ameaças e, com isso, espera-se reduzir de forma significativa sua ocorrência. Embora continue havendo riscos associados à transfusão, a retirada de um componente do sangue clinicamente indicado impõe um prejuízo bem maior que a sua transfusão.

Referências bibliográficas

Abe H, Ikebuchi K, Shimbo M, Sidiguchi S: Hypotensive reactions with a white cell-reduction filter: Activation of kallikrein-kinin cascade in a patient (abstract). Transfusion 37 1997; (Suppl):39S.

Adams RJ, McKie VC, Hsu L, et al: Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. N Engl J Med 1998; 339:5–11.

Esta triagem prospectiva e randomizada demonstrou que a transfusão crônica para manter a HbS < 30% diminuiu o risco de derrame em crianças com anemia falciforme.

Adams RJ, Brambilla DJ, Granger S, et al: Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. Blood 2004; 103:3689–3694.

Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, et al: The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. N Engl J Med 1997; 336:747–754.

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan DV, et al : The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N Engl J Med 1999; 341:556–562.

Ambruso DR. Githens JH. Alcorn R. et al : Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. Transfusion 1987; 27:94–98.

Andreu G, Morel P, Forestier F, et al: Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. Transfusion 2002; 42:1356–1364.

Aoun E, Shamseddine A, Chehal A, et al: Transfusion-associated GVHD: 10 years' experience at the American University of Beirut-Medical Center. Transfusion 2003; 43:1672–1676.

AuBuchon JP, Cooper LK, Leach MF, et al: Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. Transfusion 2002; 42: 855–861.

Beard MJ, Cardigan R, Seghatchian J, et al: Variables determining blockage of WBC-depleting filters by Hb sickle cell trait donations. Transfusion 2004; 44:422–430.

Bhutani VK, Johnson L, Sivieri EM: Predictive ability of a predischarge hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns. Pediatrics 1999; 103:6–14.

Biggerstaff BJ, Petersen LR: Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. Transfusion 2002; 42:1019–1026.

Blackall DP, Uhl L, Spitalnik SL: Transfusion Practices Committee. Cryoprecipitate-reduced plasma: rationale for use and efficacy in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Transfusion 2001; 41:840–844.

Blaxhult A, Granath F, Lidman K, Giesecke J: The influence of age on the latency period to AIDS in people infected by HIV through blood transfusion. AIDS 1990; 4:125–129.

Boulis NM, Bobek MP, Schmaier A, Hoff JT: Use of factor IX complex in warfarin-related intracranial hemorrhage. Neurosurgery 1999; 45:1113–1118.

Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, et al: A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. Blood 1995; 86:3598–3603.

Essa triagem prospectiva e randomizada demonstrou que as reduções do número de leucócitos equivalem aos componentes do sangue soronegativo em termos de prevenção da transmissão do CMV. Entretanto, a doença causada pelo CMV foi mais comum no grupo que recebeu componentes contendo número reduzido de leucócitos, e essa constatação é motivo de controvérsia.

Boyan CP, Howland WS: Cardiac arrest and temperature of bank blood. JAMA 1963; 183:58–60.

British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force: Guidelines for the use of platelet transfusions. Br J Haematol 2003; 122:10–23.

Busch MP, Operskalski EA, Mosley JW, et al: Epidemiologic background and long-term course of disease in human immunodeficiency virus type 1-infected blood donors identified before routine laboratory screening. Transfusion 1994; 34:858–864.

Butch SH, Oberman HA: The computer or electronic crossmatch. Transfusion Medicine Reviews 1997; 11:256–264.

Butch SH, Stoe M, Judd WJ: Solving the same-day admission identification problem. Transfusion 1994; 34(Suppl):93S.

Cable RG, Badon S, Trauem-Trend J, et al: Evidence for transmission of Babesia microti from Connecticut blood donors to recipients. Transfusion 2001; 41(Suppl)12S–13S.

Carson JL, Duff A, Poses RM, et al: Effect of anaemia and cardiovascular disease on surgical mortality and morbidity. Lancet 1996; 348:1055–1060.

Esse estudo de coorte retrospectivo revelou que baixos níveis de hemoglobina pré-operatória ou uma substancial perda de sangue durante a operação aumentam o risco de morte ou de morbidade séria de modo mais significativo em pacientes com doença cardiovascular do que naqueles sem doença.

Carson JL, Poses RM, Spence RK, Bonavita G: Severity of anaemia and operative mortality and morbidity. Lancet 1988; 1(8588):727–729.

Castellino SM, Combs MR, Zimmerman SA, et al: Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: frequency, characteristics and significance. Br J Haematol 1999; 104:189–194.

Cohen BJ, Beard S, Knowles WA, et al: Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow transplant patient after platelet transfusion. Transfusion 1997; 37:947–952.

Cooling L, Distenfeld A, Kopko PM, et al: Transfusion-related acute lung injury. JAMA 2002; 288:315–316.

Counts R, Haisch C, Simon T, et al: Hemostasis in massively transfused trauma patients. Ann Surg 1979; 190:91–96.

Dahlke MB, Weiss KL: Platelet transfusion from donors mismatched for crossreactive HLA antigens. Transfusion 1984; 24:299–302.

Davenport RD, Penezina OP: Cleavage of high molecular weight kininogen induced by filtration of platelet concentrates. Transfusion 1997; 37(Suppl):104S.

Davey RJ, Gustafson M, Holland PV: Accelerated immune red cell destruction in the absence of serologically detectable alloantibodies. Transfusion 1980; 20:348–353.

de la Roche MR, Gauthier L: Rapid transfusion of packed red blood cells: effects of dilution, pressure, and catheter size. Ann Emerg Med 1993; 22:1551–1555.

DeChristopher PJ, Orlina AR: Sudden death associated with autologous transfusion in a surgical patient with hemoglobin SC disease. ISBT & AABB 1990 Joint Congress: Book of Abstracts. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1990, p 119.

Dodd RY, Notari EP, IV, Stramer SL: Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. Transfusion 2002; 42:975–979.

Domen RE, Hoeltge GA: Allergic transfusion reactions. An evaluation of 273 consecutive reactions. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:316–320.

Downes KA, Wilson E, Yomtovian R, Sarode R: Serial measurement of clotting factors in thawed plasma stored for 5 days. Transfusion 2001; 41:570.

Doyle S, O'Brien P, Murphy K, Fleming C, O'Donnell J: Coagulation factor content of solvent/detergent plasma compared with fresh frozen plasma. Blood Coagul Fibrinolysis 2003; 14:283–287.

Dzik WH, Anderson JK, O'Neill EM, et al: A prospective, randomized clinical trial of universal WBC reduction. Transfusion 2002; 42:1114–1122.

Essa triagem prospectiva e randomizada mostrou que a redução universal do número de leucócitos estava assoacida à ocorrência de menos reações transfusionais febris, mas não apresentava associação com a mortalidade durante a hospitalização, duração da internação nem com os custos hospitalares.

Federowicz I, Barrett B, Andersen J, et al: Characterization of reactions after transfusion of prestorage leukoreduced cellular blood components. Blood 1995; 86(Suppl):608a.

Fernandez F, Goudable C, Sie P, et al: Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions. Br J Haematol 1985; 59:139–148.

Fridey JL: Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 22nd ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2003.

Fried MR, Eastlund T, Christie B, et al: Hypotensive reactions to white cell-reduced plasma in a patient undergoing angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. Transfusion 1996; 36:900–903.

Frohn C, Dumbgen L, Brand JM, et al: Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. Transfusion 2003; 43:893–898.

Gilleece MH, Dazzi F: Donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia. Leuk Lymph 2003; 44:23–28.

Gordon LI, Kwaan HC, Rossi EC: Deleterious effects of platelet transfusions and recovery thrombocytosis in patients with thrombotic microangiopathy. Sem Hematol 1987; 24:194–201.

Gorlin JB, Cable R: What is a unit? Transfusion 2000; 40:263–265.

Gorlin JB, Mintz PD: Transfusion-associated graft-vs-host disease. In Mintz PD (ed): Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice, 2nd ed. Bethesda, MD: AABB Press, 2005, p 585.

Hall WW, Ishak R, Zhu SW, et al: Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1996; 13(Suppl 1):S204–S214.

Harkness DR, Byrnes JJ, Lian EC, et al: Hazard of platelet transfusion in thrombotic thrombocytopenic purpura. JAMA 1981; 246:1931–1933.

Hayashi H, Nishiuchi T, Tamura H, et al : Transfusion-associated graft-versus-host disease caused by leukocyte-filtered stored blood. Anesthesiology 1993; 79:1419–1421.

Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, et al: A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. N Engl J Med 1999; 340:409–417.

Essa triagem prospectiva e randomizada demonstrou que uma estratégia restritiva de transfusão de células vermelhas é no mínimo tão efetiva (e possivelmente superior) quanto uma estratégia de transfusão liberal para pacientes com doença grave. Uma possível exceção seriam os pacientes com infarto do miocárdio agudo e angina estável.

Heddle NM, Klama L, Singer J, et al: The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. N Engl J Med 1994; 331:670–671.

Essa triagem prospectiva e randomizada mostrou que a maioria das reações febris às transfusões plaquetárias são devidas a um constituinte do sobrenadante do plasma, que é mais provavelmente as citocinas pirogênicas liberadas durante o armazenamento.

Heddle NM, Klama L, Meyer R, et al: A randomized controlled trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. Transfusion 1999; 39:231–238.

Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, et al: A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. Transfusion 2002; 42:556–566.

Heuft HG, Goudeva L, Sel S, Blasczyk R: Equivalent mobilization and collection of granulocytes for transfusion after administration of glycosylated G-CSF (3 mg/kg) plus dexamethasone versus glycosylated G-CSF (12 mg/kg) alone. Transfusion 2002; 42:928–934.

Hitzler WE, Runkel S: Prevalence of human parvovirus B19 in blood donors as determined by a haemagglutination assay and verified by the polymerase chain reaction. Vox Sang 2002; 82:18–23.

Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, et al: Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. Blood 1992; 79:826–831.

Ibojie J, Greiss MA, Urbaniak SJ: Limited efficacy of universal leucodepletion in reducing the incidence of febrile nonhaemolytic reactions in red cell transfusions. Transfusion Med 2002; 12:181–185.

Kelley DL, Mangini J, Lopez-Plaza I, Triulzi DJ: The utility of £ 3-day-old whole-blood platelets in reducing the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions. Transfusion 2000; 40:439–442.

Kirchhoff LV, Gam AA, Gilliam FC: American trypanosomiasis (Chagas' disease) in Central American immigrants. Am J Med 1987; 82:915–920.

Kleinman S, Caulfield T, Chan P, et al: Towards an understanding of transfusion related acute lung injury: Statement of a Consensus Panel. Transfusion 2004; 44:1774–1789.

Essa declaração de painel de consenso resume o conhecimento atualmente existente sobre as causas, incidência, resultados e estratégias utilizadas para diminuir a lesão pulmonar aguda associada à transfusão.

Kohan AI, Niborski RC, Rey JA, et al: High-dose intravenous immunoglobulin in non-ABO transfusion incompatibility. Vox Sang 1994; 67:195–198.

Kopko PM, Marshall CS, MacKenzie MR, et al: Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation. JAMA 2002; 287:1968–1971.

Krumholz A, Ness PM, Hauser WA, et al: Adverse reactions in blood donors with a history of seizures or epilepsy. Transfusion 1995; 35:470–474.

Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. Transfusion 2001; 41:1493–1499.

Larsson LG, Welsh VJ, Ladd DJ: Acute intravascular hemolysis secondary to out-of-group platelet transfusion. Transfusion 2000; 40:902–906.

Larsson S, Soderberg-Naucler C, Wang FZ, Moller E: Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. Transfusion 1998; 38:271–278.

Lazo A, Tassello J, Jayarama V, et al: Broad-spectrum virus reduction in red cell concentrates using INACTINE PEN110 chemistry. Vox Sang 2002; 83:313–323.

Leiby DA, Herron RM Jr, Read EJ, et al: Trypanosoma cruzi in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. Transfusion 2002; 42:549–555.

Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP, et al: Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. Transfusion 1997; 37:423–435.

Lin L, Dikeman R, Molini B, et al : Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. Transfusion 2004; 44:1496–1504.

Linden JV, Wagner K, Voytovich AE, Sheehan J: Transfusion errors in New York State: an analysis of 10 years' experience. Transfusion 2000; 40:1207–1213.

Essa análise dos erros de transfusão relatada ao New York State Department of Health mostrou que os erros de transfusão representam um risco significativo. A maioria dos erros resulta de ações humanas e, assim, pode ser evitada. A maioria dos eventos ocorre fora do banco de sangue.

Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, et al: Possible transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease by blood transfusion. Lancet 2004; 363:417–421.

Lux JZ, Weiss D, Linden JV, et al: Transfusion-associated babesiosis after heart transplant. Emerg Infect Dis 2003; 9:116–119.

McCullough J, Weiblen BJ, Fine D: Effects of storage of granulocytes on their fate in vivo. Transfusion 1983; 23:20–24.

McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al: Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. Blood 2004; 104:1534–1541.

Essa triagem prospectiva e randomizada demonstrou que as plaquetas tratadas fotoquimicamente são bastante equivalentes às plaquetas convencionais, embora os incrementos na contagem de plaquetas pós-transfusionais e o número de dias até a próxima transfusão tenha diminuído em comparação ao observado com as plaquetas convencionais.

Macedo de Oliveira A, Beecham BD, et al: West Nile virus blood transfusion-related infection despite nucleic acid testing. Transfusion 2004; 44:1695–1699.

Mair B, Leparc GF: Hypotensive reactions associated with platelet transfusions and angiotensin-converting enzyme inhibitors. Vox Sang 1998; 74:17–30.

Mallouh AA, Asha M: Beneficial effect of blood transfusion in children with sickle cell chest syndrome. Am J Dis Child 1988; 142:178–182.

Manns A, Hisada M, La Grenade L: Human T-lymphotropic virus type I infection. Lancet 1999; 353:1951–1958.

Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. Transfusion 2004; 44:934–940.

Meryman HT, Hornblower M: Freezing and deglycerolizing sickle-trait red blood cells. Transfusion 1976; 16:627–632.

Mintz PD, Williams ME: Cerebrovascular accident during a delayed hemolytic transfusion reaction in a patient with sickle cell anemia. Ann Clin Lab Sci 1986; 16:214–218.

Moake J, Chintagumpala M, Turner N, et al: Solvent/detergent-treated plasma suppresses shear-induced platelet aggregation and prevents episodes of thrombotic thrombocytopenic purpura. 1994; Blood 84:490–497.

Moroff G, Holme S, AuBuchon JP, et al. Viability and in vitro properties of AS-1 red cells after gamma irradiation. Transfusion 1999; 39:128–134.

Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M, Parise M: Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. N Engl J Med 2001; 344:1973–1978.

Murphy EL, Fridey J, Smith JW, et al: HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. Neurology 1997; 48:315–320.

Murphy EL, Wang B, Sacher RA, et al: Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. Emerg Infect Dis 2004; 10:109–116.

Murray DH, Pennell BJ, Weinstein SL, Olsen JD: Packed red cells in acute blood loss: Dilutional coagulopathy as a cause of surgical bleeding. Anesth Analg 1995; 80:336–342.

Muylle L, Joos M, Wouters E, et al. Increased tumor necrosis factor a (TNF a), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: Relationship between TNF a and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. Transfusion 1993; 33:195–199.

Ness P, Braine H, King K, et al: Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. Transfusion 2001; 41:857–861.

Newman BH: Arterial puncture phlebotomy in whole-blood donors. Transfusion 2001; 41:1390–1392.

Newman BH, Waxman DA: Blood donation-related neurologic needle injury: evaluation of 2 years' worth of data from a large blood center. Transfusion 1996; 36:213–215.

Newman BH, Pichette S, Pichette D, Dzaka E: Adverse effects in blood donors after whole-blood donation: a study of 1000 blood donors interviewed 3 weeks after whole-blood donation. Transfusion 2003; 43:598–603.

Nickerson P, Orr P, Schroeder ML, et al: Transfusion-associated Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic area. Ann Int Med 1989; 111:851–853.

Nussbaumer W, Schwaighofer H, Gratwohl A, et al: Transfusion of donor-type red cells as a single preparative treatment for bone marrow transplants with major ABO incompatibility. Transfusion 1995; 35:592–595.

Oberman HA: Controversies in transfusion medicine: Should a febrile transfusion response occasion the return of the blood component to the blood bank? Con. Transfusion 1994; 34:353–355.

O'Connell BA, Schiffer CA: Donor selection for alloimmunized patients by platelet crossmatching of random-donor platelet concentrates. Transfusion 1990; 30:314–317.

Ortolano GA, Freundlich LF, Holme S, et al: Detection of bacteria in WBC-reduced PLT concentrates using percent oxygen as a marker for bacteria growth. Transfusion 2003; 43:1276–1285.

Palfi M, Berg S, Ernerudh J, Berlin G: A randomized controlled trial of transfusion-related acute lung injury: Is plasma from multiparous blood donors dangerous? Transfusion 2001; 41:317–322.

Pastore G, Monno L, Santantonio T, et al: Monophasic and polyphasic pattern of alanine aminotransferase in acute non-A, non-B hepatitis. Clinical and prognostic implications. Hepato-Gastroenterology 1985; 32:155–158.

Pau CP, Hu DJ, Spruill C, et al: Surveillance for human immunodeficiency virus type 1 group O infections in the United States. Transfusion 1996; 36:398–400.

Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al: Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. N Engl J Med 2003; 349:1236–1245.

Peden AH, Head MW, Ritchie DL, et al: Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. Lancet 2004; 364:527–529.

Pennington J, Garner SF, Sutherland J, Williamson LM: Residual subset population analysis in WBC-reduced blood components using real-time PCR quantitation of specific mRNA. Transfusion 2001; 41:1591–600.

Perez P, Salmi LR, Folléa G, et al: Determinants of transfusion-associated bacterial contamination: results of the French Bacthem Case-Control Study. Transfusion 2001; 41: 862–872.

Petersen LR, Marfin AA: West Nile virus: a primer for the clinician. Ann Int Med 2002; 137:173–179.

Petz LD: 'Least incompatible' units for transfusion in autoimmune hemolytic anemia: should we eliminate this meaningless term? A commentary for clinicians and transfusion medicine professionals. Transfusion 2003; 43:1503–1507.

Petz LD, Garratty G, Calhoun L, et al: Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. Transfusion 2000; 40:1446–1456.

Esse estudo retrospectivo demonstrou que uma estratégia para selecionar doadores de plaquetas com base nas especificidades de anticorpos para HLA do receptor foi tão efetiva quanto o emparelhamento do HLA ou a prova cruzada, além de ter pemitido um pool *bem maior de potenciais doadores.*

Pineda AA, Zylstra VW, Clare DE, et al: Viability and functional integrity of washed platelets. Transfusion 1989; 29:524–527.

Popovsky MA, Chaplin HC Jr, Moore SB: Transfusion-related acute lung injury: A neglected, serious complication of hemotherapy. Transfusion 1992; 32:589–592.

Powell RW, Levine GL, Yang YM, Mankad VN: Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: early detection and treatment. J Ped Surg 1992; 27:215–218.

Preiksaitis JK, Brown L, McKenzie M: The risk of cytomegalovirus infection in seronegative transfusion recipients not receiving exogenous immunosuppression. J Infect Dis 1988; 157:523–529.

Rao SV, Jollis JG, Harrington RA, et al: Relationship of blood transfusion and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. JAMA 2004; 292:1555–1562.

Rebulla P, Finazzi G, Marangoni F, et al: The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1997; 337:1870–1875.

Essa triagem prospectiva e randomizada demonstrou que a transfusão profilática de plaquetas a uma concentração < 10.000/mL é tão segura e efetiva quanto uma transfusão dessa mesma concentração em casos de leucemia aguda, além de reduzir substancialmente o número de transfusões a serem realizadas.

Roseff SD, Lugan NLC, Manno CS: Guidelines for assessing appropriateness of pediatric transfusion. Transfusion 2002; 42:1398–1413.

Roth WK, Waschk D, Marx S, et al: Prevalence of hepatitis G virus and its strain variant, the GB agent, in blood donations and their transmission to recipients. Transfusion 1997; 37:651–656.

Salama A, Berghofer H, Mueller-Eckhardt C: Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia. Lancet 1992; 340:1515–1517.

Sauer LA, France CR: Caffeine attenuates vasovagal reactions in female first-time blood donors. Health Psychol 1999; 18:403–409.

Sazama K: Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. Transfusion 1990; 30:583–590.

Schlossberg HR, Herman JH: Platelet dosing. Transfus Apheresis Sci 2003; 28:221–226.

Schmalzer EA, Lee JO, Brown AK, et al: Viscosity of mixtures of sickle and normal red cells at varying hematocrit levels. Implications for transfusion. Transfusion 1987; 27:228–233.

Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW: VA cooperative study of post-transfusion hepatitis, 1969–1974: incidence and characteristics of hepatitis and responsible risk factors. Am J Med Sci 1975; 270:355–362.

Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, et al: Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. N Engl J Med 1992; 327:1906–1911.

Seoud MA, Cantwell C, Nobles G, Levy DL: Outcome of pregnancies complicated by sickle cell and sickle-C hemoglobinopathies. Am J Perinatol 1994; 11:187–191.

Sherertz RJ, Russell BA, Reuman PD: Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. Arch Int Med 1984; 144:1579–1580.

Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, et al: Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. Transfusion 1997; 37:457–462.

Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y, et al: Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. Transfusion 2002; 42:766–773.

Silliman CC, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z, et al: Transfusion-related acute lung injury: Epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. Blood 2003; 101:454–462.

Slavc I, Urban CH, Schwinger W, et al: ABO-incompatible bone marrow transplantation: Prevention of hemolysis by alkaline hydration with mannitol diuresis in conjunction with red cell reduced buffy coat bone marrow. Wien Klin Wochenschr 1992; 104:93–96.

Snyder EL, Mechanic S, Baril E, Davenport RD: Removal of soluble biologic response modifiers (complement and chemokines) by a bedside leukoreduction filter. Transfusion 1996; 36:707–713.

Spence RK, Carson JA, Poses R, et al: Elective surgery without transfusion: influence of preoperative hemoglobin level and blood loss on mortality. Am J Surg 1990; 159:320–324.

Strauss RG: Clinical perspectives of platelet transfusions: defining the optimal dose. J Clin Apheresis 1995; 10:124–127.

Strauss RG, Burmeister LF, Johnson K, et al: AS-1 red cells for neonatal transfusions: A randomized trial assessing donor exposure and safety. Transfusion 1996; 36:873–878.

Sweeney JD, Holme S, Moroff G: Storage of apheresis platelets after gamma radiation. Transfusion 1994; 34:779–783.

Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group: Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. N Engl J Med 1997; 337:1861–1869.

Essa triagem prospectiva e randomizada demonstrou que a diminuição do número de leucócitos por filtração e a irradiação das plaquetas com radiação ultravioloeta do tipo B são medidas igualmente efetivas na prevenção da refratariedade às plaquetas. mediada por aloanticorpos, durante a quimioterapia para leucemia mieloide aguda. As plaquetas obtidas por aférese a partir de doadores individuais não proporcionaram nenhum benefício adicional, se comparadas à administração de um pool *de plaquetas concentradas oriundas de doadores selecionados ao acaso.*

Triulzi DJ, Blumberg N: Variability in response to cryoprecipitate treatment for hemostatic defects in uremia. Yale J Biol Med 1990; 63:1–7.

Uhlmann EJ, Isgriggs E, Wallhermfechtel M, Goodnough LT: Prestorage universal WBC reduction of RBC units does not affect the incidence of transfusion reactions. Transfusion 2001; 41:997–1000.

Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, et al: Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. N Engl J Med 1990; 322:1617–1621.

Vichinsky EP, Haberkern CM, Neumayr L, et al: A comparison of conservative and aggressive transfusion regimens in the perioperative management of sickle cell disease. N Engl J Med 1995; 333:206–213.

Essa triagem prospectiva e randomizada demonstrou que a estratégia de transfusão conservativa (aumentar os níveis de hemoglobina para 10 g/dL) é tão efetiva quanto um regime agressivo de transfusão (diminuição dos níveis de HbS para < 30%) na prevenção de complicações perioperatórias em pacientes com anemia falciforme, resultando em um número significativamente menor de transfusões..

Vretzakis F, Papaziogas B, Matsaridou E, et al: Continuous monitoring of arterial blood gasses and pH during intraoperative rapid blood administration using a Paratrend sensor. Vox Sang 2000; 78:158–163.

Vyas GN, Holmadahl L, Perkins HA, Fudenberg HH: Serologic specificity of human anti-IgA and its significance in transfusion. Blood 1969; 34:573–581.

Wagner SJ, Robinette D: Evaluation of swirling, pH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. Transfusion 1996; 36:989–993.

Walsh JH, Purcell RH, Morrow AG, et al. Posttransfusion hepatitis after open-heart operations. Incidence after the administration of blood from commercial and volunteer donor populations. JAMA 1970; 211:261–265.

Wang SE, Lara PN Jr, Lee-Ow A, et al: Acetaminophen and diphenhydramine as premedication for platelet transfusions: A prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. Am J Hematol 2002; 70:191–194.

Widmann FK: Controversies in transfusion medicine: Should a febrile transfusion response occasion the return of the blood component to the blood bank? Pro Transfusion 1994; 34:356–358.

Wu WC, Rathore SS, Wang Y, et al: Blood transfusion in elderly patients with acute myocardial infarction. N Engl J Med 2001; 345:1230 Controversies in transfusion medicine 1236.

Zanella A, Rossi F, Cesana C, et al: Transfusion-transmitted human parvovirus B19 infection in a thalassemic patient. Transfusion 1995; 35:769 Controversies in transfusion medicine 772.

Zavizion B, Serebryanik D, Serebryanik I, et al: Prevention of Yersinia enterocolitica, Pseudomonas fluorescens, and Pseudomonas putida outgrowth in deliberately inoculated blood by a novel pathogen-reduction process. Transfusion 2003; 43:135 Controversies in transfusion medicine 142.

Zhou L, Giacherio D, Cooling L, Davenport RD: Use of B-natriuretic peptide (BNP) as a diagnostic marker in the differential diagnosis of transfusion-associated circulatory overload (TACO). Transfusion 2005; 45:1056–1063.

CAPÍTULO 36

Hemaférese

Jeffrey L. Winters MD, Alvaro A. Pineda MD

Introdução 794
Definições 794
Princípios básicos 795
Citaférese de doação 796
Plaquetaférese de doação 796
Leucaférese de doação 797
Eritroférese de doação 800
Aférese de doação de múltiplos componentes 801
Coleta de células progenitoras hematopoéticas 801
Plasmaférese de doação 804
Indicações para hemaférese terapêutica 804
Citaférese terapêutica 804
Plasmaférese terapêutica 810
Complicações envolvendo doador/paciente comuns a todos os procedimentos de hemaférese 818
Distúrbios eletrolíticos e acidobásicos 819
Reações alérgicas, anafilactoides e anafiláticas 821
Inibidores da enzima conversora de angiotensina 821
Hipovolemia e reações vasovagais 822
Hidroxietilamido e coagulopatia 822
Hidroxietilamido e outros efeitos colaterais 822
Êmbolos de ar 822
Resumo 822
Referências bibliográficas 823

PONTOS-CHAVE

- Hemaférese é o processo de remoção de componentes normais ou anormais do sangue circulante.
- A citaférese envolve a remoção de componentes celulares, enquanto a plasmaférese envolve a remoção do plasma – o componente líquido do sangue.
- A separação dos componentes do sangue baseia-se no tamanho (aparelhos de filtração), na densidade (equipamentos de centrifugação) ou em uma combinação de ambos.
- A aférese de doação maximiza a coleta a partir de uma fonte escassa, permitindo ao doador fornecer somente o necessário, e devolvendo a ele os componentes remanescentes.
- A aférese de doação é altamente controlada. Os requisitos para eligibilidade do doador, a frequência de doações e a quantidade de produto permitida para coleta são fatores que variam de acordo com os componentes de interesse coletados, os instrumentos utilizados para a coleta e a frequência das doações de aférese.
- A coleta de Células Progenitoras Hematopoéticas (CPrHs) a partir do sangue periférico apresenta vantagens em relação à coleta a partir da medula óssea, incluindo a maior rapidez com que o enxerto ocorre, a ausência da necessidade de submeter o doador a uma anestesia geral, a recuperação mais rápida do doador e a redução dos custos.
- Existe uma carência de triagens clínicas aleatorizadas, controladas por placebo, que envolvam aférese. Para tratar dessa necessidade, a American Association of Blood Banks (AABB) e a American Society for Apheresis (ASFA) classificaram as doenças tratadas com aférese de acordo com as evidências que sustentam seu uso.
- A citorredução terapêutica, destinada aos casos de leucocitose ou trombose, é indicada para distúrbios primários que apresentam sintomas de hiperviscosidade ou fatores de risco de desenvolvimento de complicações.
- Um volume de troca de plasma da ordem de 1 a 1,5 corresponde a uma remoção de 70% de uma substância que esteja presente no plasma. O tratamento de volumes adicionais de plasma resulta na remoção de um percentual fixo da substância remanescente, acarretando retornos decrescentes diante do tratamento de mais de 1,5 volume de plasma.
- A troca de plasma não é seletiva, removendo substâncias patológicas ou benéficas, tais como fatores de coagulação e fármacos ligados a proteínas.
- As complicações resultantes da aférese de doação são menos comuns que aquelas decorrentes da doação de sangue total, embora tenha sido relatada uma maior taxa de reações requerendo hospitalização.
- As reações mais comuns à aférese de doação, em ordem decrescente de frequência, são: hematoma/dor; hipocalcemia causada por citrato anticoagulante; reações vasovagais com síncope; e reações vasovagais sem síncope.
- Relatos indicam a ocorrência de complicações em cerca de 5% dos pacientes submetidos a tratamentos com aférese terapêutica. Incluindo-se as complicações decorrentes à colocação de acesso venoso central, os relatos apontam uma taxa de 17%.
- As reações mais comuns aos procedimentos de aférese terapêutica, em ordem decrescente de frequência, são: reações transfusionais à reposição de líquidos; hipocalcemia causada por citrato anticoagulante; hipotensão; reações vasovagais; taquicardia; angústia respiratória; tetania/convulsões; e rigidez/calafrios.

Introdução

Definições

O termo "aférese" deriva da palavra grega *aphairesis*, que significa "separar", "tirar à força" ou "remover". A hemaférese é o processo de remoção de constituintes normais ou anormais do sangue circulante. Pode ser dividida em citaférese (remoção dos componentes celulares do sangue) e plasmaférese (remoção da fração do plasma sanguíneo). A citaférese pode ser seletiva, destinada à remoção de hemácias (eritroférese), plaquetas (plaquetaférese) ou leucócitos (leucaférese). A plasmaférese, por sua própria natureza, não é seletiva e envolve a remoção de todos os constituintes plasmáticos, além da reposição do volume removido com igual volume de plasma ou, mais comumente, de um substituto de plasma (p. ex., albumina a 5%). Quando um ou mais volumes de plasma são removidos e repostos com um volume similar de coloide ou cristaloide, o procedimento é melhor descrito pela expressão "troca de plasma" ou "plasmaférese terapêutica". É possível fazer a remoção seletiva de componentes específicos por meio da perfusão do plasma. Nesse caso, o plasma é coletado por plasmaférese e, em seguida, perfundido em colunas que removem seletivamente a substância de interesse, seja ela patológica ou não. O plasma assim modificado é devolvido ao paciente.

Princípios básicos

Inicialmente, todos os instrumentos de aférese fracionavam o sangue total em seus componentes por centrifugação. Nesse processo, a força centrífuga é aplicada ao sangue total de modo que seus vários componentes são separados de acordo com suas gravidades específicas (densidade). Assim, o componente mais denso deposita-se mais longe do eixo de rotação, enquanto o componente menos denso deposita-se mais proximamente. Os componentes de densidades intermediárias depositam-se entre esses dois extremos, em ordem crescente de densidade. A Figura 36.1 ilustra a ordem de densidade dos componentes sanguíneos que, do menos ao mais denso, é a seguinte: plasma, plaquetas, linfócitos, granulócitos e hemácias (Burgstaler, 2003). Há certo grau de mistura entre as interfaces das várias camadas, resultando em alguma contaminação com componentes de camadas adjacentes. Exemplificando, presença de hemácias na camada de granulócitos.

Os separadores à base de centrifugação podem ser agrupados em duas classes: centrífugas de fluxo intermitente e centrífugas de fluxo contínuo. Nas centrífugas de fluxo intermitente, a cuba é preenchida com o sangue total a ser separado e é aplicada a força centrífuga. Após a separação, o componente de interesse é removido. A centrífuga é parada, a cuba é esvaziada e o conteúdo é devolvido ao paciente/doador. Em seguida, o ciclo é repetido com o sangue total sendo processado em pequenos lotes. Na centrífuga de fluxo contínuo, cada uma das camadas de componentes individuais é removida e a de interesse é retida, enquanto as demais são misturadas fora da câmara de separação e devolvidas. Isso significa que, conforme o volume é retirado da câmara de separação, é possível repô-lo continuamente com sangue total, resultando em um processo de separação ininterrupto. A câmara não é esvaziada até que todo o procedimento tenha sido terminado (Burgstaler, 2003).

Além da centrifugação, a aférese também pode ser realizada por filtração. Nesse método, os componentes do sangue total são separados com base no tamanho, em vez de na densidade. O sangue total flui através de uma membrana com poros, cujos tamanhos permitem a passagem apenas do componente de interesse. Os elementos remanescentes são devolvidos. Tais separadores podem ser constituídos de um sistema de fibras ocas ou de placas achatadas. O primeiro consiste em feixes de tubos com paredes porosas. O sangue entra nos tubos e o plasma sai através dos poros existentes nessas paredes, sendo coletado. Ao mesmo tempo, os elementos celulares saem pela extremidade oposta dos tubos. Os separadores constituídos por placas achatadas são formados por duas membranas porosas. O sangue total flui entre essas membranas e os elementos celulares são retidos e coletados na extremidade oposta das placas, enquanto o plasma atravessa as membranas e é coletado na superfície externa da placa (Burgstaler, 2003).

É possível combinar os processos de centrifugação e de filtração. Nesses aparelhos, o sangue entra em uma câmara estacionária que contém um filtro giratório central. À medida que esse filtro gira, o sangue se move e é separado em camadas. Como resultado, os elementos mais densos afastam-se do filtro, e o plasma fica diretamente adjacente a ele. Assim, o plasma atravessa o filtro e é extraído, enquanto os elementos celulares são coletados a partir da periferia da câmara estacionária. A vantagem de combinar a centrifugação à filtração dessa forma é que os elementos celulares não entopem os poros do filtro. Com isso, torna-se possível utilizar filtros com áreas de superfície menores, comparativamente aos filtros utilizados nos aparelhos de filtração, bem como forças *g* mais baixas que as empregadas nos aparelhos de centrifugação (Burgstaler, 2003).

Outro aspecto básico da aférese consiste em determinar o volume de sangue do doador/paciente. Esse procedimento é necessário para limitar a quantidade de sangue junto ao aparelho e à tubulação conectada ao doador / paciente (circuito extracorporal), a fim de evitar hipotensão e complicações. Os Standards for Blood Banks and Transfusion Services limitaram previamente o volume de sangue extracorporal para doadores a 15% do volume de sangue total (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 1997). Por esse motivo, tornou-se necessário determinar o volume de sangue do doador. Essa determinação é mais frequentemente realizada por meio da elaboração de normogramas ou de cálculos efetuados pelo aparelho utilizado no procedimento. Para tanto, o operador deve fornecer dados específicos do paciente/ doador, tipicamente, altura, peso, sexo e hematócrito. Existem inúmeras equações e regras que podem ser empregadas para essa determinação (Gilcher, 1996; Nadler, 1962). Por exemplo, as equações 36.1 e 36.2 podem ser utilizadas para determinar o volume de sangue em homens e mulheres, respectivamente (Nadler, 1962).

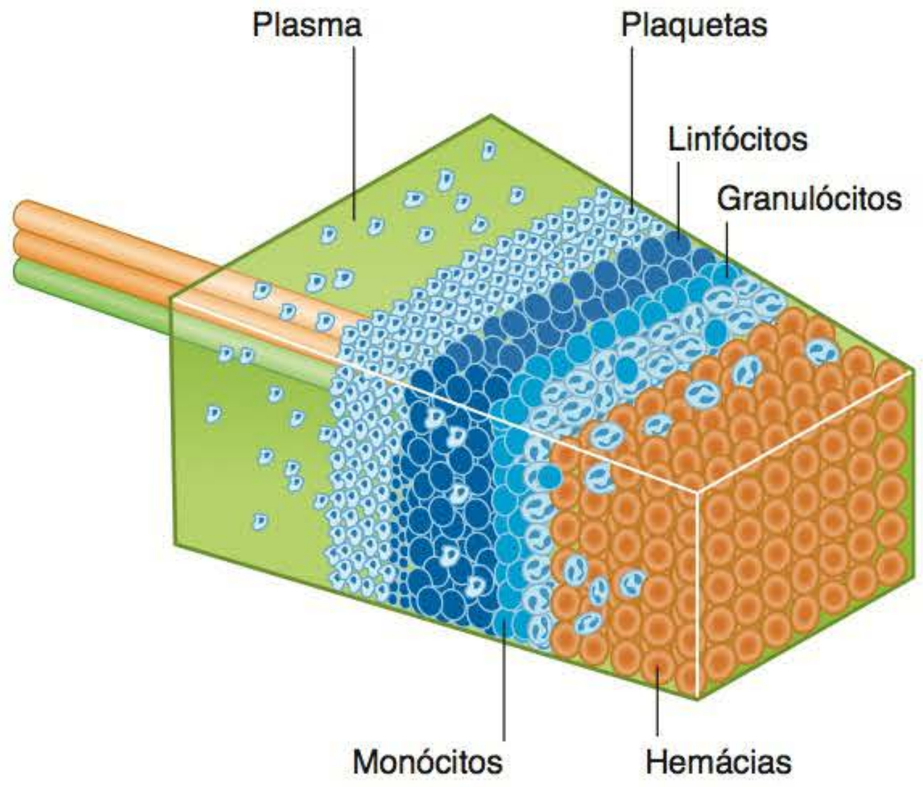


Figura 36.1 Separação dos componentes sanguíneos em câmara separadora de centrífuga. Os componentes do sangue são transferidos para a centrífuga e separados de acordo com suas respectivas densidades. Os elementos mais densos (hemácias) se distanciam mais do eixo de rotação, enquanto aqueles menos densos (plasma) ficam mais próximos. Cortesia de Sergio Torloni, MD, Diretor de Medicina da Transfusão, Mayo Clinic Scottsdale AZ.

$$\text{Homens: } VS = (0{,}3669 \times A^3) + (0{,}03719 \times P) + (0{,}6041) \quad (36.1)$$
$$\text{Mulheres: } VS = (0{,}3561 \times A^3) + (0{,}03308 \times P) + (0{,}1833) \quad (36.2)$$

Obs.: VS = volume de sangue em litros; A = altura em metros; P = peso em quilogramas.

Como o volume de sangue nos tecidos varia de acordo com a proporção de tecido adiposo presente, por meio desses cálculos, o volume sanguíneo pode ser superestimado em pacientes obesos e subestimado em pacientes musculosos. Essa tendenciosidade é parcialmente corrigida por fórmulas em que a altura do paciente é elevada ao cubo (Mollison, 1998). A necessidade regulatória de calcular o volume sanguíneo foi simplificada na 19ª edição do Standards for Blood Banks and Transfusions Services. Em vez de limitar o volume extracorporal a 15%, a quantidade máxima permitida no circuito extracorporal foi estabelecida em 10,5 mL/kg de peso do doador (*Standards Committee of the American Association of Blood Banks*, 2004). Mesmo assim, ainda é necessário calcular o volume de sangue para "prescrever" apropriadamente os volumes a serem processados na citaférese terapêutica. Além disso, as trocas de plasma podem ser feitas utilizando o volume de sangue para calcular o volume de plasma, como mostra a equação 36.3 (Buffaloe, 1983):

$$VP = VS\,[1 - (0{,}91)(0{,}96)\,HCV/100] \quad (36.3)$$

Em que: VP = volume de plasma em litros; HCV = hematócrito centrifugado venoso.

Por fim, o volume de plasma pode ser utilizado para calcular o volume de troca, sendo que o volume processado no procedimento de troca de plasma é dado pela equação 36.4 (Buffaloe, 1983):

$$VT = VP \times VPT \quad (36.4)$$

Em que: VT = volume de troca em litros; VPT = número desejado volumes de plasma para troca.

Essas equações permitem determinar corretamente os volumes a serem processados nos vários procedimentos terapêuticos descritos ao longo deste capítulo.

O último aspecto básico da hemaférese aplicável a todos os procedimentos, tanto terapêuticos como de doação, é o acesso venoso. Na hemaférese de doação, utiliza-se um acesso venoso periférico, que usualmente são as veias da fossa antecubital. O uso do acesso venoso

central nesse caso, devido ao potencial de haver sérias complicações, seria arriscado demais para o doador. Se o acesso venoso periférico de um doador não puder ser utilizado, então outro doador deve ser localizado. Uma possível exceção seria a coleta de CPrHs periféricas alogênicas, em que pode haver indisponibilidade de um doador alternativo. Obviamente, os riscos envolvendo o doador e os benefícios proporcionados ao receptor devem ser considerados com cuidado. Do mesmo modo, o doador deve dar seu consentimento informado para que o acesso venoso central possa ser utilizado.

No cenário dos procedimentos de hemaférese terapêutica, o acesso central com frequência é considerado essencial diante do dano às veias periféricas causado por tratamentos médicos anteriores (p. ex., quimioterapia), e também quando há necessidade de terapia prolongada para certas doenças. O Canadian Cooperative Multiple Sclerosis Study Group (Noseworthy, 1989) constatou que, entre 294 pacientes com esclerose múltipla submetidos a procedimentos de troca de plasma por um período de 20 semanas, apenas 4,4% dos pacientes não puderam ser tratados em decorrência de um estado precário do acesso venoso. Entre os que iniciaram o tratamento, apenas 5,4% perderam o acesso venoso de modo a impedir a continuidade do curso terapêutico (Noseworthy, 1989). Em um estudo semelhante, Grishaber et al. (1992), analisando 46 pacientes com doença neurológica necessitando de hemaférese, constataram que em 50% dos casos foi possível completar o curso da terapia utilizando somente o acesso periférico. Os fatores associados à necessidade de realizar acesso central foram a presença da síndrome de Guillain-Barré (SGB) ou a hospitalização em unidade de tratamento intensivo (Grishaber, 1992). Contrariando a crença popular, esses autores também demonstraram que não há diferenças entre os tipos periférico e central de acesso venoso em termos de tempo requerido para realização dos procedimentos terapêuticos (Grishaber, 1992). Esses estudos indicam que o acesso venoso periférico, com sua menor taxa de complicações, deve ser a tentativa inicial na hemaférese terapêutica. O acesso venoso central deve ser reservado às ocasiões em que o acesso periférico falha.

Quando é impossível realizar um acesso venoso periférico, tanto o serviço de hemaférese como o médico encarregado de instalar o cateter devem determinar o tipo de cateter central a ser implantado. Muitos dos cateteres centrais empregados na rotina são inadequados ao uso na hemaférese, uma vez que suas paredes são moles demais e acabam desabando, são longos demais e possuem um diâmetro muito estreito. Essas características disparam os alarmes de pressão dos equipamentos. Os cateteres ideais devem possuir paredes relativamente rígidas para evitar desabamentos, bem como diâmetros amplos e comprimento curto para permitir o fluxo máximo. Exemplos de cateteres apropriados são o cateter Mahurkar de lúmen duplo (Kendall, Mansfield, MA), PermCath (Kendall, Mansfield, MA), Cateteres Hickman Hemodialysis e de Plasmaférese (C. R. Bard, Inc., Cranston, RI), e cateter Neostar Pheres-Flow (Horizon Medical Products, Inc., Manchester, GA). O cateter Neostar é especificamente projetado para uso prolongado na medula óssea ou para transplantes de CPrHs. Outros cateteres também podem ser utilizados, como o cateter Hickman de acesso vascular com lúmen duplo (C. R. Bard, Inc., Cranston, RI) ou cateteres de lúmen triplo, porém estes somente são empregados como linhas de retorno, e não como linhas de extração, portanto requerem acesso periférico. Grishaber et al. (1992) encontraram taxas de falha inaceitáveis associadas ao uso desses cateteres e, assim, não puderam recomendar sua inserção apenas para procedimentos de aférese. Uma regra de ouro é que, se um cateter pode ser utilizado para diálise, a velocidades de fluxo maiores que aquelas da aférese, esse cateter também pode ser utilizado na aférese.

Citaférese de doação

Plaquetaférese de doação

Benefícios das plaquetas de aférese

O uso de plaquetas de aférese aumentou de 25% das plaquetas transfundidas em 1987 (Wallace, 1993) para 66% em 1999 (National Blood Data Resource Center, 2001). Esse aumento deveu-se, em parte, à incapacidade de aumentar a quantidade de plaquetas derivadas das doações de sangue total. Além disso, existe uma percepção de que as plaquetas de aférese são mais vantajosas que aquelas obtidas a partir do sangue total. Os benefícios relatados para os produtos plaquetários de aférese são descritos na Tabela 36.1.

Uma vantagem adicional das plaquetas de aférese em relação às coleções de vários produtos obtidos sem aférese consiste na simplificação da supervisão do inventário. Os produtos agrupados, por serem preparados em sistema aberto, apresentam meia-vida de prateleira de 4 horas após serem reunidos. Os produtos de aférese não necessitam de agrupamento e, em consequência, retêm sua meia-vida de prateleira de 5 dias. Em situações nas quais os produtos de plaquetas são inicialmente requisitados e, no entanto, acabam não sendo transfundidos, o uso dos produtos de aférese pode evitar o desperdício. Certamente, as desvantagens associadas às plaquetas de aférese são o custo adicional de sua obtenção e a disponibilidade limitada em algumas áreas.

Requisitos para produtos plaquetários

O Standards for Blood Banks and Transfusions Services exige que o número mínimo de plaquetas contido em um produto de aférese seja $3{,}0 \times 10^{11}$ em 90% das unidades testadas (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Já o Food and Drug Administration (FDA) requer, no mínimo, $3{,}0 \times 10^{11}$ plaquetas em 75% das unidades testadas (CFR, 2003). Espera-se que tais exigências conflitantes sejam sincronizadas futuramente. Todavia, o resultado desses requerimentos é que o produto de plaquetas de aférese contém ao menos a mesma quantidade de plaquetas contida em um agrupamento de plaquetas obtidas de seis doações de sangue total.

Seleção do doador de plaquetaférese

Os requisitos para o doador de plaquetaférese são os mesmos exigidos para a doação de sangue total, incluindo a proibição do uso de doadores que tenham consumido medicação contendo aspirina em um período de 36 horas, como única fonte de plaquetas para um dado receptor (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). O Standards for Blood Banks and Transfusions Services também exige a avaliação do uso de plaquetas oriundas de um doador sob tratamento com "medicamentos conhecidos por causarem inibição irreversível da função plaquetária" (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Além desses requerimentos, também há exigências específicas para hemaférese e plaquetaférese. Primeiramente, um doador pode realizar até duas transfusões por semana, respeitando o limite máximo de 24 doações por ano (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Essa limitação do número de doações é baseada no fato de que, antigamente, os aparelhos produziam produtos de plaquetas contendo números significativos de linfócitos (Strauss, 1994). Isso gerava preocupações no sentido de que as doações de plaquetas prolongadas pudessem acarretar depleção de linfócitos e causar subsequente distúrbio de função imunológica. Essa questão é novamente discutida na seção sobre os aspectos relacionados ao doador de plaquetaférese.

Indivíduos que fazem uma doação após terem doado sangue total, ou após a falha de um aparelho que resulte na incapacidade de determinar o volume sanguíneo extracorporal, devem aguardar 8 semanas antes de fazer uma doação por aférese. Constitui uma exceção o volume extracorporal calculado pelo aparelho inferior a 100 mL, ou se a perda de hemácias for menor que 200 mL. Em tais circunstâncias, o doador é elegível a uma doação por aférese após o período normal de adiamento (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004).

Tabela 36.1 Benefícios atribuídos aos produtos plaquetários de aférese

Diminuição da exposição do doador com redução do risco de contrair doenças transmissíveis por transfusão
Diminuição da exposição do doador com retardo da aloimunização ao HLA (Sintnicolaas, 1981)
Diminuição do risco de reações transfusionais plaquetárias sépticas (Ness, 2001)
Redução de leucócitos de pré-armazenamento com retardo da aloimunização ao HLA (Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group, 1997), redução da incidência de reações transfusionais febris (Heddle, 1995) e de infecções por citomegalovírus (Bowden, 1995)

Os doadores também devem atender aos requerimentos mínimos de contagem de plaquetas. As contagens plaquetárias não são exigidas do doador na doação inicial, nem para doações que não excedam uma frequência de 4 semanas (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Caso o doador faça doações com uma frequência maior que a cada 4 semanas, a contagem plaquetária mínima aceita é de 150.000/μL (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2003). Essa contagem deve ser determinada mesmo como contagem pós-aférese – que é uma contagem realizada após um procedimento para determinar a elegibilidade para o procedimento subsequente – ou como contagem de pré-aférese (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004).

A seleção do doador para plaquetaférese pode ser influenciada por inúmeros fatores distintos, além das considerações regulatórias. O rendimento de um procedimento de plaquetaférese é determinado, em grande parte, pela contagem de plaquetas do doador. Contagens plaquetárias maiores estão associadas a rendimentos maiores (Glowitz, 1980; Goodnough, 1999). Mulheres doadoras, em média, apresentam contagens plaquetárias mais altas que os homens (Glowitz, 1980; Goodnough, 1999; Lasky, 1981). Alguns autores obtiveram maiores rendimentos de plaquetas de mulheres doadoras, comparado aos homens doadores (Glowitz, 1980; Lasky, 1981). No entanto, esse rendimento não foi alcançado em todos os estudos (Dettke, 1998; Goodnough, 1999). Além disso, o maior volume de plasma nas mulheres intensifica a separação e a coleta de plaquetas em alguns equipamentos, sendo que esse fato pode ter contribuído para os maiores rendimentos obtidos.

Surgem considerações adicionais relacionadas ao doador, diante da seleção de produtos de plaquetas para pacientes aloimunizados. Estes pacientes, por meio de transfusão ou gestações prévias, desenvolvem anticorpos contra antígenos expressos em plaquetas, mais frequentemente anticorpos dirigidos ao HLA de classe I. Como resultado, desenvolvem um estado imunológico refratário que é definido por incrementos plaquetários inadequados pós-transfusionais, medidos pela determinação da contagem de plaquetas em amostras coletadas entre 10 minutos a 1 hora após o término da transfusão plaquetária. Os anticorpos contra os antígenos expressos nas plaquetas são isolada ou parcialmente responsáveis por 1/3 dos casos de pacientes refratários a transfusões de plaquetas (Doughty, 1994). A presença desse estado requer a procura de doadores de plaquetas compatíveis. Para tanto, três estratégias têm sido empregadas. Na primeira delas, se são conhecidas as especificidades dos aloanticorpos anti-HLA e o fenótipo HLA de classe I do paciente, procede-se a tentativas de obter plaquetas de um doador que não possua tais antígenos (Hussein, 1996; Schiffer, 1987). Uma segunda estratégia, utilizada quando se sabe o tipo de HLA de classe I do paciente e as especificidades dos anticorpos anti-HLA são desconhecidas ou amplas, consiste em tentar compatibilizar o tipo de HLA do paciente com o do doador da forma mais aproximada possível (Duquesnoy, 1978). Por fim, a prova cruzada de plaquetas pode ser realizada nos casos em que são desconhecidos os tipos de HLA de classe I do receptor ou dos potenciais doadores, ou quando incrementos fracos continuam ocorrendo mesmo com a compatibilização HLA. Esse teste envolve a combinação das plaquetas do doador com o soro do receptor em um ensaio de aderência de hemácias em fase sólida (Bock, 1989; Murphy, 1991; O'Connell, 1992; Schiffer, 1987).

Aspectos associados ao doador de plaquetaférese

O típico doador de plaquetas sofre uma queda de 20 a 29% na contagem de plaquetas após a doação (Heyns, 1985; Katz, 1981; Szymanski, 1973). Essa queda costuma ser mais intensa em mulheres doadoras (Dettke, 1998; Rogers, 1995). A queda na contagem de plaquetas não apresenta relação com o rendimento da plaquetaférese. Ou seja, a queda é inferior àquela prevista pelo rendimento e reflete a mobilização de plaquetas a partir do baço (Heyns, 1985). Para doadores homens, são necessários 4 dias para que a contagem retorne ao valor basal após a aférese de doação de plaquetas. Nas mulheres doadoras, um aumento dos níveis de trombopoetina retarda a normalização das contagens plaquetárias (Dettke, 1998). Em doadores submetidos a coletas em dias alternados, foi demonstrado que a contagem plaquetária e o rendimento da aférese voltam aos níveis basais no 10º dia de coleta, e nas coletas subsequentes as contagens e rendimentos se mantêm estáveis (Glowitz, 1980). Também foi observada uma consequente elevação da contagem plaquetária com aumento do rendimento de plaquetas após a execução repetida dos procedimentos (Szymanski, 1973). Em doadores com baixas contagens plaquetárias (150.000 – 180.000/mL), a realização de plaquetaférese com tempos de coleta prolongados para obter os rendimentos de plaquetas exigidos pelas regulamentações não acarretou nenhum problema clinicamente significativo em 291 procedimentos, apesar das baixas contagens plaquetárias (69.000/mL) no pós-procedimento (Rogers, 1995). Os resultados desses estudos indicam que, mesmo nos doadores submetidos a repetidas plaquetaféreses, as contagens plaquetárias retornam imediatamente aos níveis normais, e é raro haver complicações envolvendo sangramento.

Embora alguns estudos tenham demonstrado a rápida recuperação das contagens plaquetárias após a doação de plaquetas, existe uma limitação dos estudos que tratam dos efeitos a longo prazo da doação de plaquetas sobre as contagens plaquetárias do doador. Stohlawetz et al. (1998) examinaram os níveis de plaquetas reticuladas – uma medida de trombopoiese – após a doação de plaquetas em doadores que faziam sua primeira doação e naqueles que já vinham fazendo doações a cada 2 semanas, há 18 meses. Os doadores frequentes apresentaram um pico significativamente menor de níveis de plaquetas reticuladas, bem como uma elevação mais prolongada (Stohlawetz, 1998). Não foram observadas diferenças entre as contagens plaquetárias de ambos os grupos, contudo, esses achados levaram os autores a postular que a frequente realização de aférese de doação de plaquetas pode levar a uma "relativa exaustão da trombopoiese" (Stohlawetz, 1998). Lazarus et al. (2001) conduziram um estudo retrospectivo com 939 doadores que haviam realizado 11.464 doações de plaquetas em um período de 4 anos. Esses pesquisadores constataram a ocorrência de uma diminuição significativa e continuada da contagem de plaquetas, que estava diretamente relacionada à frequência das doações (Lazarus, 2001). Embora a doação regular tenha resultado em contagens plaquetárias mais baixas, não foi observada uma trombocitopenia clinicamente significativa (Lazarus, 2001). Esses achados originaram a preocupação de que a frequente realização de aférese de doação de plaquetas poderia causar trombocitopenia.

As plaquetaféreses empregando os antigos aparelhos de hemaférese foram associadas a perdas de 5 a 10×10^9 linfócitos/procedimento pelos doadores (Strauss, 1994). Com base em estudos envolvendo linfocitaférese terapêutica e drenagem crônica do ducto torácico, demonstrou-se que seria possível tornar a imunidade celular anormal por meio da perda de $1 - 1{,}5 \times 10^{11}$ linfócitos em um período de poucas semanas (Strauss, 1994). Esse estudo e outros, que demonstraram diminuição das contagens de linfócitos totais e linfócitos T acompanhada da redução dos níveis de IgG decorridos 8 meses da doação, geraram preocupações relacionadas à indução de imunossupressão. Como resultado, foram criadas regulamentações limitando a 24 o número de doações anuais de plaquetaférese (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004) e alertando os potenciais doadores de plaquetaférese sobre a possibilidade de depleção de linfócitos (Division of Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 1988), além da sugestão de alguns pesquisadores de que as doações devem ser adiadas em casos de doadores com contagens de linfócitos abaixo de $1{,}2 \times 10^9$/L (Strauss, 1994). Estudos mais recentes, envolvendo doadores que realizaram doações utilizando aparelhos de hemaférese mais modernos, mostraram que não há diferenças quanto às contagens de linfócitos, subgrupos de linfócitos ou níveis de IgG comparativamente aos indivíduos não doadores, doadores de plaquetaférese ou doadores de sangue total (Lewis, 1999). De fato, a perda de linfócitos no decorrer de 24 doações utilizando equipamento de hemaférese moderno é equivalente à perda de linfócitos de uma única doação de sangue total (Strauss, 1994). Em razão dos relatos de diminuição das contagens plaquetárias mediante aféreses frequentes, todavia, essa restrição ainda é garantida.

Leucaférese de doação

Transfusões de granulócitos

Sete triagens controladas, comparando antibióticos *versus* antibióticos + transfusões de granulócitos, surgiram na literatura e foram revisadas por Strauss (1993). Nesses estudos, os doadores de granulócitos foram estimulados com esteroides. O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) não foi utilizado. Cinco dessas triagens

relataram que a transfusão de granulócitos foi ao menos parcialmente bem-sucedida no tratamento de infecções em pacientes neutropênicos, cujas infecções eram irresponsivas aos antibióticos. Os dados obtidos com tais estudos foram subsequentemente analisados por meio de estudos quantitativos de metanálise, sendo demonstrado que a dose de neutrófilos transfundidos, bem como a taxa de sobrevida dos controles, foram os fatores primariamente responsáveis pelas diferentes taxas de sucesso alcançadas pelos estudos (Vamvakas, 1996). Os autores afirmaram que as transfusões de granulócitos deveriam ser consideradas para pacientes neutropênicos apresentando infecções com alta taxa de mortalidade, e que deveriam ser utilizadas as maiores doses possíveis de granulócitos ($> 4 \times 10^{10}$ neutrófilos) (Vamvakas, 1996). Desde a realização desses estudos, foi publicada apenas uma triagem aleatorizada envolvendo doadores estimulados com G-CSF. Esse estudo demonstrou que os grupos de estudo não diferiram entre si quanto à sobrevida (Hubel, 2002). A maioria dos estudos e relatos que descreve transfusões de granulócitos em receptores adultos envolve pacientes neutropênicos apresentando infecções bacterianas irresponsivas. Alguns estudos voltaram-se para a utilidade das transfusões de granulócitos em pacientes infectados por fungos, porém os resultados obtidos nessas triagens foram mistos (van Burik, 2003).

Outro grupo de pacientes frequentemente considerado para transfusões de granulócitos é o de recém-nascidos sépticos. Foram publicados seis estudos controlados que avaliaram as transfusões de granulócitos nesse contexto, dos quais quatro relataram benefícios (Baley, 1987; Cairo, 1987, 1984; Christensen, 1982; Laurenti, 1981; Wheeler, 1987). A metanálise desses estudos identificou a dose de granulócitos como razão primária de discordância no estudo dos resultados. Os estudos que utilizaram granulócitos derivados do creme leucocitário demonstraram inexistência de vantagens, enquanto aqueles que empregaram granulócitos derivados de leucaférese demonstraram benefícios (Vamvakas, 1996). Mais uma vez, todas essas triagens foram anteriores à diponibilização do G-CSF. Não há relatos de nenhuma triagem de transfusão de granulócitos estimulados por G-CSF.

As transfusões de granulócitos podem beneficiar pacientes neutropênicos, especialmente se grandes doses puderem ser coletadas. Entre as recomendações relativas a quem deve ser considerado para transfusões de granulócitos, estão os pacientes adultos em estado de profunda neutropenia, pacientes para os quais se prevê uma neutropenia com duração mínima de 1 semana e aqueles com infecções que progrediram, apesar do tratamento com os devidos antibióticos (Schiffer, 1990). O paciente também deve contar com a possibilidade de recuperar a produção de granulócitos. No caso de recém-nascidos, as indicações para transfusão de granulócitos são a existência de evidências de sepse bacteriana com contagens absolutas de neutrófilos inferiores a 3.000 células/μL, e a diminuição dos estoques de neutrófilos da medula óssea com menos de 7% (de células nucleadas) de metamielócitos ou mais formas maduras (Blanchette, 1991; Strauss, 1991).

Requisitos para produtos de granulócitos

Um dos fatores críticos para o sucesso das transfusões de leucócitos é a dose de granulócitos fornecida. O Standards for Blood Banks and Transfusions Services exige que 75% dos componentes granulócitos extraídos contenham no mínimo $1{,}0 \times 10^{10}$ granulócitos (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). É preciso notar que essa dose representa um valor mínimo, sendo que são desejáveis doses mais altas.

Os granulócitos são armazenados à temperatura ambiente (20–24°C), sem agitação, apresentando um prazo de validade de 24 horas (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Os neutrófilos, contudo, sofrem apoptose durante o armazenamento. O acúmulo de granulócitos transfundidos nos sítios de inflamação diminui com o aumento do tempo de armazenamento, de modo que essas células devem ser transfundidas o quanto antes após a coleta (Price, 1979).

Seleção do doador de granulócitos

Assim como na plaquetaférese, os doadores de leucaférese devem atender a todos os requisitos aplicáveis à doação de sangue total. As plaquetas também são removidas durante a coleta e, assim, uma medida prudente é incluir entre as exigências uma contagem de plaquetas equivalente a 150.000/μL para doadores de granulócitos. Outra consideração a ser feita na seleção de doadores é o tipo ABO do receptor e do doador. Há um número significativo de hemácias presentes nos produtos de granulócitos. Sendo o conteúdo de hemácias maior que 2 mL, o Standards for Blood Banks and Transfusions Services exige que o produto seja compatível na prova cruzada (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Se for possível obter um produto de granulócitos com menos de 2 mL de hemácias, então o tipo ABO pode ser ignorado, pois não influenciará a sobrevida ou a migração dos granulócitos transfundidos (McCullough, 1988).

Outra consideração quanto à seleção do doador é o *status* de infecção por CMV do doador e do receptor. As transfusões de granulócitos foram associadas a casos de infecção por CMV em receptores soronegativos para vírus (Buckner, 1983; Winston, 1980). Portanto, doadores para receptores com sorologia negativa para CMV também devem ser soronegativos para esse vírus.

Por fim, quando se trata de pacientes aloimunizados, é fundamental selecionar doadores com compatibilidade HLA ou na prova cruzada. Estudos envolvendo pacientes aloimunizados demonstraram um grau mínimo ou nulo de recuperação, sobrevida ou localização em sítios de infecção diante do uso de granulócitos provenientes de doadores escolhidos ao acaso (Dutcher, 1983; McCullough, 1986).

Estimulação do doador de granulócitos

A dose de granulócitos é crítica para a efetividade da terapia de granulócitos. O método mais comumente utilizado para aumentar o rendimento de granulócitos é a administração de esteroides aos doadores 10 a 12 horas antes da coleta. A administração oral de prednisona (Jendiroba, 1998; MacPherson, 1976) ou dexametasona (Higby, 1977) aumenta em até 2 vezes o rendimento de granulócitos, comparado àquele obtido de doadores não estimulados. O efeito dos esteroides aparentemente resulta da mobilização de granulócitos a partir dos estoques existentes na medula óssea. Estudos demonstraram que a estimulação com esteroides não tem efeito sobre a capacidade de os neutrófilos fagocitarem partículas e fungos, destruírem bactérias ou responderem a estímulos quimiotáticos, em comparação aos granulócitos obtidos de doadores não estimulados (Glasser, 1977). Além disso, constatou-se que a estimulação com esteroides não afeta o acúmulo dos granulócitos transfundidos nos sítios de lesão (Price, 1979) e inibe a apoptose durante o armazenamento (Liles, 1995).

A disponibilização de G-CSF resultou na capacidade de gerar doses ainda maiores de granulócitos e tem levado ao ressurgimento do interesse nas transfusões de granulócitos. A administração de 5 μg/kg de G-CSF, seja diariamente ou em dias alternados, resulta em coletas de granulócitos equivalentes a 4 a 5 vezes aquelas obtidas de doadores não estimulados e em coletas ainda maiores que as obtidas a partir de doadores estimulados com prednisona (Jendiroba, 1998). Foi demonstrado que o uso de transfusões estimuladas com G-CSF resulta em incrementos significativos e continuados das contagens de neutrófilos nos pacientes (Adkins, 1997b). O momento ideal para coletar os granulócitos de doadores estimulados com G-CSF é 12 horas após a administração do fator (Price, 1998).

Assim como para os esteroides, surgiram questionamentos sobre a função dos granulócitos estimulados com G-CSF. Estudos demonstraram fagocitose, quimiotaxia, quimioluminescência e produção de ânion superóxido normais (Caspar, 1993), bem como acúmulo normal nos sítios de lesão (Adkins, 1997a). Também foi demonstrado que o G-CSF intensifica a atividade microbicida (Lieschke, 1992) e inibe a apoptose de neutrófilos durante o armazenamento (Adachi, 1994). Surgiram, ainda, preocupações com relação à possibilidade de a função do granulócito ser adversamente afetada pela administração de repetidas doses de G-CSF. Mais uma vez, os efeitos observados foram a intensificação da fagocitose e da explosão oxidativa após múltiplas administrações de G-CSF (Joos, 2002).

Estudos foram realizados para avaliar o efeito da combinação de esteroides e G-CSF (Dale, 1998; Liles, 1997). A administração de 8 mg de dexametasona com 300 ou 600 μg de G-CSF resultou em maiores rendimentos de granulócitos que qualquer um dos agentes isoladamente. Decorridas 12 horas da estimulação, houve um aumento de 10 vezes na contagem de neutrófilos. A combinação da dexametasona a 600 μg de G-CSF produziu um rendimento significativamente maior que a com-

binação da dexametasona a 300 μg do fator (Liles, 1997). Quando esse regime de combinações foi empregado, a função dos granulócitos não apresentou nenhum defeito (Dale, 1998). Estudos subsequentes, comparando doses de 450 μg *versus* 600 μg de G-CSF combinadas a 8 mg de dexametasona, encontraram uma equivalência em termos de Contagem Absoluta de Neutrófilos (CAN) em 12 horas e de efeitos colaterais exibidos, ambos, pelo doador (Liles, 2000). Por fim, a via de administração de G-CSF, quando combinada à dexametasona, também influencia a cinética dos granulócitos. A administração via subcutânea fornece uma CAN maior e continuada, em comparação aos resultados obtidos com a administração intravenosa (Stroncek, 2002).

Procedimento de coleta de granulócitos

É igualmente possível aumentar os rendimento de granulócitos intensificando a separação das hemácias e dos granulócitos durante o processo de centrifugação. Esses tipos celulares possuem densidades e taxas de sedimentação semelhantes e, em consequência, a separação por centrifugação é precária. A adição de agentes de sedimentação, como hidroxietilamido (HEA) pode melhorar essa separação e, do mesmo modo, a coleta de granulócitos (Iacone, 1981). O mecanismo de ação do HEA consiste na indução da formação do empilhamento (*rouleaux*) entre as hemácias. A resultante taxa de sedimentação aumentada e o maior fluxo ascendente de plasma durante a centrifugação melhoram a separação (Lee, 1995b). Os diferentes tipo de HEA existentes incluem o hetamino de alto peso molecular e o pentamilo de baixo peso molecular. Foi demonstrado que esses dois agentes apresentam perfis de segurança equivalentes (Strauss, 1986, 1987), embora o pentamilo traga o benefício de ser rapidamente excretado. Como resultado, o perigo de haver acúmulo de HEA é menor, assim como a possibilidade de surgirem complicações (ver a discussão no final do capítulo). Se por uma lado o perfil de segurança do pentamilo pode ser superior, por outro há um estudo controlado demonstrando que o hetamino gera rendimentos de granulócitos maiores (Lee, 1995b).

Aspectos associados ao doador de granulócitos

Além dos granulócitos, plaquetas e números significativos de hemácias também estão presentes no produto de leucaférese. O hematócrito do doador tipicamente sofre uma queda de 7% após a coleta de granulócitos (Hester, 1995). Essa queda deve-se não só à perda de hemácias, mas também aos efeitos diluentes da expansão volumétrica provocada pelo uso de HEA durante o procedimento. A contagem de plaquetas é tipicamente reduzida em 22% após cada procedimento – uma queda equivalente àquela observada na plaquetaférese (Hester, 1995). De novo, há certo grau de efeito diluente. Uma causa adicional para uma queda da contagem de plaquetas é percebida em doadores estimulados com G-CSF (Bensinger, 1993). Doadores sadios tratados com esse fator durante 10 dias costumam apresentar declínio da contagem de plaquetas a partir do 8º dia de estimulação, com diferenças significativas em relação aos valores basais em 10 e 11 dias. O mecanismo subjacente a esse efeito é incerto e pode representar uma distribuição de plaquetas alterada, uma redução da produção de plaquetas ou um aumento do volume intravascular (Korbling, 1998). A recuperação da contagem de plaquetas também parece ser prolongada, necessitando de 7 a 10 dias em doadores de células-tronco *versus* 4 a 6 dias entre doadores de plaquetas (Stroncek, 1996b).

Ambos, G-CSF e corticosteroides, podem causar inúmeros efeitos colaterais distintos (Tab. 36.2). Esses efeitos colaterais são bastante comuns, ocorrendo em 90% dos doadores alogênicos tratados com G-CSF para mobilização de CPrHs (Stroncek, 1996a), e usualmente são brandos, podendo ser tratados de modo sintomático. Por exemplo, as dores nas costas e na cabeça, que tendem a estar associadas à dose (Murata, 1999; Stroncek, 1996a), tipicamente respondem a analgésicos suaves. Náusea e vômitos são mais comuns em mulheres, enquanto dores de cabeça são mais comuns em indivíduos com menos de 35 anos de idade (Murata, 1999). Os efeitos colaterais mais significativos do G-CSF são ruptura esplênica, hemorragia na retina, irite aguda, artrite gotosa e trombose (Korbling, 1998; Volk, 1999). Considera-se que tais efeitos refletem uma exacerbação de doenças subjacentes apresentadas pelo doador/paciente. Os doadores, seja de granulócitos ou de coleções de CPrHs alogênicas do sangue periférico, devem ser avaliados quanto a essas doenças para determinar se são adequados à doação (Tab. 36.3). Há um relato de um doador de CPrHs alogênicas de sangue periférico que apresentou uma síndrome de vazamento capilar com risco de vida, caracterizada por hipoxemia, ascite, efusão pericárdica, efusão pleural, choque e lesão hepatocelular subsequentemente à administração de G-CSF e coleta de CPrHs (Azevedo, 2001). Tais efeitos foram atribuídos à ativação promovida pela aférese de um grande número de neutrófilos gerados pelo G-CSF (Azevedo, 2001).

Enquanto os efeitos a curto prazo promovidos pelo G-CSF são predominantemente brandos, os efeitos a longo prazo são incertos. Há uma certa preocupação acerca da possibilidade de os receptores desenvolverem doenças hematológicas, como mielodisplasia ou leucemia mielógena crônica (Korbling, 1998; Volk, 1999). Isto se deve, em parte, à ocorrência de transformação leucêmica pós-terapia com G-CSF em 10 a 15% dos pacientes com neutropenia congênita submetidos ao tratamento prolongado com esse fator (Bonilla, 1994). Além disso, estudos envolvendo doadores normais tratados com G-CSF demonstraram a indução de uma pequena população de células mieloides tetraploides (Kaplinsky, 2003), bem como replicação alélica assincrônica temporária e aneuploidia persistente em até 265 dias após a administração do fator (Nagler, 2004). Todavia, até o momento, estudos envolvendo números limitados de doadores normais (3–281) e seguimento restrito (12–60 meses) não relataram a ocorrência de nenhuma anomalia nos doadores de granulócitos e de CPrHs (Stroncek, 1997a; Volk, 1999). Estima-se que, para detectar um aumento da frequência de leucemia equivalente a 10 vezes a frequência basal de 0,05% da população, seria necessário realizar um estudo de seguimento envolvendo 2 mil doadores estimulados com duração mínima de 10 anos. Os doadores a serem submetidos à estimulação com G-CSF devem dar o consentimento informado antes do início do procedimento. Além disso, é necessário obter uma revisão institucional apropriada para que seja possível

Tabela 36.2 Efeitos colaterais de curta duração dos medicamentos utilizados para mobilização de granulócitos (Volk, 1999)

Medicamento	Efeitos colaterais
Corticosteroides	Dor de cabeça Vermelhidão Insônia Euforia Palpitações Acidez epigástrica Hiperglicemia
G-CSF	Dor óssea Mialgias Artralgias Dor de cabeça Febre Calafrios Desconforto gastrintestinal Parestesias Dor torácica Edema Fadiga

Tabela 36.3 Doenças/condições relativamente contraindicadas às medicações empregadas para mobilização de granulócitos (Korbling, 1998; Technical Manual Committee, 2002)

Medicação	Condição
Corticosteroides	Hipertensão Diabetes Doença da úlcera péptica
G-CSF	Condições inflamatórias Gota Fatores de risco para trombose

utilizar o G-CSF com essa finalidade sem o consentimento do FDA. Também é recomendada a criação de registros de doadores, com o intuito de monitorar as consequências a longo prazo da estimulação pelo G-CSF (Korbling, 1998).

O tratamento prolongado com esteroides está associado a inúmeros efeitos colaterais bem conhecidos, incluindo o desenvolvimento de Cataratas Subcapsulares Posteriores (CSP). Conforme essas complicações vão surgindo durante o uso crônico, talvez pareça que a estimulação de curta duração dos doadores de granulócitos com esteroides não deveria estar associada a tais efeitos. No entanto, não é isso que ocorre. Um estudo duplo-cego comparou a presença de cataratas em 9 doadores de plaquetas de aférese e 11 doadores de granulócitos agrupados de acordo com idade, sexo e respectivo número de doações (Ghodsi, 2001). A frequência de cataratas que não estavam associadas à administração de esteroides foi equivalente entre os dois grupos, porém as cataratas associadas ao uso de esteroides – as CSPs – foram estatisticamente mais frequentes nos doadores de granulócitos quando todos os olhos foram considerados (5 de 22 olhos *versus* 0 de 18 olhos; $p = 0{,}040$) (Ghodsi, 2001). Os autores notaram que a estimulação com esteroides foi a explicação mais provável para tais achados e recomendaram a realização de estudos adicionais para tentar determinar o risco de formação de catarata diante da estimulação de granulócitos (Ghodsi, 2001).

Eritroférese de doação

Benefícios da eritroférese

Utilizando a aférese, é possível coletar uma única unidade de hemácias ou o equivalente a 2 unidades de hemácias. Diante da atual falta de hemácias nos Estados Unidos e com a redução do tamanho do grupo de doadores, a coleta de hemácias – seja com a coleta concomitante de outros produtos sanguíneos ou como coleta dupla de hemácias – pode maximizar os escassos recursos disponíveis. A Tabela 36.4 lista as vantagens e desvantagens das coletas duplas de hemácias.

Tabela 36.4 Vantagens e desvantagens da coleta dupla de hemácias

Vantagens
Menor incidência de reações de doação comparativamente à doação de sangue total (Wiltbank, 2002)
Diminuição do número de doadores necessário para produzir determinado número de unidades de hemácias (Gilcher, 2003)
Dose de hemácias padronizada (Gilcher, 2003)
Redução da quantidade de processamento de componentes (i. e., um conjunto de testes laboratoriais para 2 unidades de hemácias) (Beeler, 1997)
Redução da exposição do doador, caso o paciente receba ambas as partes da coleta dupla de hemácias (Gilcher, 2003)
Desvantagens
Maior complexidade da coleta (Gilcher, 2003)
Necessidade de mais tempo para realizar a doação (Gilcher, 2003)

Requisitos para os produtos de eritroférese

O Standards for Blood Banks and Transfusion Services da American Society of Blood Banks exige que a férese de hemácias seja coletada e preparada por um método conhecido por resultar em um valor médio de hemoglobina da unidade > 60 g, ou em um volume de hemácias concentradas igual a 180 mL. Além disso, ao menos 95% das unidades amostradas devem conter > 50 g de hemoglobina ou um volume de 150 mL de hemácias concentradas (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Caso as unidades de hemácias tenham sido submetidas à redução de leucócitos, então a concentração média de hemoglobina deve ser > 51 g ou o volume de hemácias concentradas deve ser igual a 153 mL. Nesse caso, ao menos 95% das unidades testadas devem conter > 42,5 g de hemoglobina ou 128 mL de hemácias concentradas (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004).

O FDA não define os requisitos para produtos quando se tratam de hemácias coletadas por aférese, sejam únicas ou duplas. No entanto, determina que 95% dos produtos coletados devem possuir o "volume-alvo" ou "volume esperado de CVSs" e atender a "quaisquer outros parâmetros especificados no manual do usuário do equipamento" (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001). O FDA também define o modo como devem ser realizados a validação e os testes, sendo que validação inicial consiste em testar "100 unidades consecutivas de CVSs", enquanto os testes subsequentes devem incluir ao menos 50 unidades por mês, considerando produtos de hemácias únicos e duplos. Se um centro coletar menos de 50 unidades, todas elas devem ser testadas (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001).

Seleção do doador de eritroférese

Doadores por aférese de eritrócitos alogênicos devem satisfazer os critérios definidos pela FDA e pela AABB para uma doação de sangue completa. Além disso, eles são exigidos para atender a qualquer outra seleção de critérios definida pelo manual de dispositivos médicos (Division of Blood Products, Center for Biologics Evaluations and Research, 2001).

O FDA e a AABB não definem um valor mínimo de hemoglobina/hematócrito para a doação de hemácias duplas. Em vez disso, exige-se que o centro de coletas siga as recomendações do fabricante do equipamento (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001; Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Entretanto, o FDA exige a determinação dos níveis de hemoglobina/hematócrito pelo uso de um método quantitativo (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001). Como resultado, o método do sulfato de cobre não pode ser empregado para qualificar um doador para uma doação dupla de hemácias.

A AABB limita o volume total de hemácias a serem removidas, de forma a impedir que o hematócrito e os níveis de hemoglobina do doador sejam < 30% e < 10 g/dL, respectivamente, após a reposição volumétrica (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). O FDA não estabelece restrições específicas e apenas exige que sejam seguidas as orientações do fabricante (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001).

O tipo de produto coletado determina o intervalo entre as doações após a realização da doação de hemácias de hemaférese. Doadores que fornecem uma única unidade de hemácias devem ser protelados por 8 semanas. A única exceção a essa regra, conforme descrito na seção sobre plaquetaférese de doação, é que tais indivíduos podem doar plaquetas ou plaquetas com plasma concomitantemente, enquanto o volume de hemácias extracorporal no aparelho coletor for inferior a 100 mL (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001). Doadores que fornecem 2 unidades de hemácias são protelados por 16 semanas e, durante esse período, é proibido realizar coletas automatizadas ou manuais (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001).

Caso um doador passe por um procedimento incompleto, ou seja, se a coleta-alvo não for alcançada, o FDA define a duração do adiamento com base na perda absoluta de hemácias, tanto na coleta inicial como nas coletas subsequentes. Se um doador sofre uma perda de hemácias > 300 mL, o tempo de adiamento é de 16 semanas. Se a perda de hemácias for de 200 a 300 mL, o doador é protelado por 8 semanas. Caso a perda de hemácias sofrida pelo doador tenha sido < 200 mL, esse doador pode realizar uma nova doação após 8 semanas. Durante uma segunda doação, se o doador perder < 100 mL de hemácias (perda total em 8 semanas < 300 mL), então deve ser protelado por 8 semanas, contadas a partir da data da segunda doação. Caso a perda de hemácias em 8 semanas seja > 300 mL, o doador deve ser protelado por 16 semanas, após a segunda doação (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001).

Aspectos associados ao doador de eritroférese

Em decorrência da remoção de 2 unidades de hemácias, uma das preocupações mais comuns é saber se as reações são mais frequentes nas coletas duplas de hemácias ou nas de sangue total. Estudos demonstraram que não há aumento na incidência de reações nas coletas duplas de hemácias automatizadas, em comparação às doações de sangue total (Gorlin, 2003; Wiltbank, 2002). Wiltbank (2002) relatou

menor taxa de incidência de reações moderadas a severas com a coleta dupla de hemácias automatizada (6,8/10.000 e 1,2/10.000 coletas, respectivamente), em comparação ao observado nas doações de sangue total (14,5/10.000 e 1,2/10.000 coletas, respectivamente). A menor taxa de reações, apesar da remoção de uma massa de hemácias maior, resulta do fato de os doadores estarem isovolêmicos ao final da coleta em decorrência da infusão de salina.

Doadores submetidos à doação dupla de hemácias apresentam uma queda transiente de 9% no hematócrito (Taylor, 2002). Isso deve-se à perda de hemácias e também à expansão volumétrica decorrente da administração de salina. Apesar dessa queda, estudos demonstraram que os doadores sofrem efeitos mínimos após a realização de doações duplas de hemácias. Meyer et al. (1993), em um estudo envolvendo 40 doadores de sangue, constataram que os doadores submetidos a doações duplas de hemácias demoraram 1 a 2 dias a mais que os doadores de sangue total para retornar aos níveis basais da sensação de bem-estar. Smith et al. (1996) não encontraram diferenças significativas de pressão sanguínea e pulsação monitoradas em ambulatório de indivíduos submetidos a coletas de 1 unidade de hemácias, 2 unidades de hemácias e coletas simuladas. Quintana et al. (1995) constataram que a doação dupla de hemácias não produziu efeito significativo sobre a capacidade de praticar exercícios, determinada pela avaliação da redução do consumo máximo de oxigênio, limiar anaeróbio, frequência cardíaca máxima, taxa de trocas respiratórias e potência máxima nos dias 0, 2, 7 e 14 após a doação.

Uma questão final relativa às doações duplas de hemácias é se, ao fazerem esse tipo de doação, os doadores correm maior risco de desenvolver deficiência de ferro que aqueles que fazem doações de sangue total. Meyer et al. (1993) acompanharam doadores em doações duplas de hemácias e em doações de sangue total ao longo de 1 ano. Foram realizadas avaliações quantitativas de ferritina sérica, ferro sérico, capacidade total de ligação ao ferro, saturação da transferrina e proporções de zinco protoporfirina/heme. Metade dos doadores em cada grupo recebeu suplementação de ferro. Em termos de equilíbrio dos níveis de ferro, não foram encontradas diferenças significativas entre os que fizeram doações duplas de hemácias e os doadores de sangue total.

Aférese de doação de múltiplos componentes

Com os equipamentos modernos, é possível coletar diferentes combinações de produtos do sangue a partir de um mesmo doador. Isso permite a utilização ótima de cada doador. Exemplificando, poderia ser coletada a quantidade máxima de plasma de um doador com tipo sanguíneo AB, sem necessidade de coletar suas hemácias – que frequentemente perdem a validade de uso antes de serem transfundidas. Um doador de tipo sanguíneo O e Rh^- ou Rh^+ poderia fornecer uma dupla doação de hemácias, sem necessariamente ser coletado seu plasma – que em geral fornece suprimento adequado. As várias combinações de coleta atualmente disponíveis são mostradas na Tabela 36.5. É preciso mencionar que todas as várias regulamentações aplicáveis às coletas individuais de aférese, no que se refere aos critérios de adequação do doador e à frequência de doações, também se aplicam às coletas de múltiplos componentes. Por exemplo, um doador submetido à coleta dupla de hemácias e coleta concomitante de plasma deve atender tanto às exigências para dupla coleta de hemácias como para coleta de plasma frequente ou infrequente, conforme aplicável.

Tabela 36.5 Combinações de produtos sanguíneos disponíveis para coletas de múltiplos componentes

Hemácias e plasma
Hemácias e plaquetas
Hemácias, plasma e plaquetas
Dupla de hemácias
Dupla ou tripla de plaquetas
Plaquetas e única ou dupla de plasma
Dupla de plaquetas e única de plasma
Dupla ou tripla de plasma

Coleta de células progenitoras hematopoéticas

Benefícios da coleta de células progenitoras hematopoéticas

A coleta de CPrHs por hemaférese proporciona inúmeras vantagens, tanto ao doador como ao receptor, que resultam na reposição da medula óssea coletada em muitos pacientes. Os doadores toleram a hemaférese melhor que a coleta de medula óssea, pois aquela não requer procedimento cirúrgico com necessidade de anestesia geral. Em consequência, o procedimento da hemaférese é mais barato, mais conveniente (por poder ser realizado no paciente de ambulatório) e evita as potenciais complicações geralmente encontradas na anestesia geral e cirurgia. Do mesmo modo, o doador se recupera mais rápido do procedimento, sem a dor e a incapacitação temporárias que frequentemente acompanham a coleta de medula óssea (Lee, 1995a). O uso de CPrHs sanguíneas periféricas na transplantação restaura a função hematopoiética e imunológica mais rapidamente do que se fosse utilizada medula óssea. Para o receptor, isso significa menos dias de imunossupressão e menos exposições aos produtos sanguíneos alogênicos (Bensinger, 2001; Moog, 1998). Na transplantação autóloga, a coleta de CPrHs periféricas por hemaférese pode ser realizada diante do envolvimento maligno da medula ou antes da ocorrência de irradiação pélvica, evitando a coleta da medula (Lee, 1995a).

Embora a coleta de CPrHs por hemaférese proporcione inúmeros benefícios que não são obtidos por meio da coleta de medula óssea, seu uso também envolve algumas desvantagens comparativamente a esse outro procedimento. Tais desvantagens incluem possíveis efeitos colaterais dos regimes de mobilização, coleta mais demorada, possibilidade de transfundir um maior volume de componentes durante a transplantação e, em muitos casos, necessidade de acesso venoso central com todos os riscos e complicações associadas (Lee, 1995a). Além disso, há evidências conflitantes na transplantação alogênica, sugerindo maior frequência de DEVH crônica (Brown, 1997; Duhrsen, 1988) ou de DEVH mais refratária à terapia-padrão (Flowers, 2002). Isso pode ser resultado da presença de um maior número de células T junto aos produtos de células-tronco do sangue periférico, em comparação à medula óssea.

Coleta de células progenitoras hematopoéticas autólogas versus alogênicas

No início, as coletas de CPrHs limitavam-se à transplantação autóloga. Isso ocorria em consequência do uso da quimioterapia como método de mobilização de CPrHs. A transplantação de CPrHs coletadas, dessa forma, restringia-se a doenças como malignidades sólidas, doença de Hodgkin e linfomas não Hodgkin, além de mieloma múltiplo. Subsequentemente, o uso de CPrHs foi expandido e passou a incluir a transplantação para leucemias, entre as quais a leucemia mielógena crônica (Gillespie, 1996; Lee, 1995a; Moog, 1998). Conforme foram sendo disponibilizados métodos de mobilização independentes da quimioterapia, a coleta de CPrHs do sangue periférico também passou a ser aplicada às doações alogênicas. O uso inicial da coleta de CPrHs periféricas nesse cenário limitava-se à retransplantação em receptores com doença recorrente ou insucesso na pega do enxerto (Gillespie, 1996; Lee, 1995a; Moog, 1998). Atualmente, o uso de CPrHs alogênicas do sangue periférico em transplantes iniciais está mais disseminado.

Dose de células progenitoras hematopoéticas

Um fator importante na determinação do sucesso da transplantação de CPrHs é a dose de células infundidas. Infelizmente, não existe um método disponível para contagem definitiva das CPrHs. Sabendo-se que as CPrHs são encontradas junto ao componente de células mononucleares sanguíneas, a contagem de Células Mononucleares (CMNs) tem sido utilizada como indicador para interrupção da coleta de CPrHs. Estudos demonstraram que uma dose total de 6–6,5 × 10^8 CMN/kg é suficiente para produzir uma rápida pega do enxerto (Kessinger, 1989, 1995). Embora a concentração de CMNs não esteja diretamente relacionada à dose de CPrHs, é possível determiná-la de forma conveniente e fácil.

Uma maneira mais exata de determinar a dose de CPrHs consiste em determinar o número de colônias de unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) crescidas em meio

ágar simples. Coletas de CPrHs contendo 0,5 a 2 × 10^5 CFU-GM/kg estão associadas a uma pega rápida do enxerto (Bender, 1992). É lamentável que os ensaios para determinação de CFU-GM sejam tecnicamente desafiadores e de difícil padronização. Em consequência, é preciso ter cautela ao comparar diretamente os dados entre instituições e estudos. Além disso, o ensaio tem duração de 2 semanas.

Um terceiro método para definição da dose de CPrHs é a determinação da contagem de células $CD34^+$ presentes no produto. As CPrHs constituem um subgrupo de células $CD34^+$. Como resultado, a quantificação do número de células $CD34^+$ fornece uma melhor indicação da dose de CPrHs que aquela obtida pela quantificação de CMNs, além de estar correlacionada às CFU-GMs (Lee, 1995a). Uma dose mínima de células $CD34^+$ necessária à pega do enxerto parece ser 2,5 × 10^6 células $CD34^+$/kg (Bensinger, 1995; Korbling, 1995). Essa dose de células $CD34^+$ resulta em pega imediata dos leucócitos infundidos. Entretanto, Bensinger et al. (1995) constataram que uma dose mais alta (5,0 × 10^6 células $CD34^+$/kg) resultou em uma pega equivalente de leucócitos e também em uma pega mais rápida de plaquetas. Embora seja mais fácil determinar o conteúdo de células $CD34^+$ que o conteúdo de CFU-GM, também há dificuldades inconvenientes de padronização decorrentes das variações metodológicas (Lee, 1995a). Felizmente, esse problema parece estar sendo solucionado pela disponibilização de *kits* e aparelhos por parte de inúmeros fabricantes.

É importante mencionar que, no cenário da transplantação de CPrHs alogênicas, bem como em diversas situações no decorrer da vida, algo bom em excesso pode ser ruim. Enquanto a pega imediata de um enxerto requer um número mínimo de células $CD34^+$/kg, alguns estudos associaram uma quantidade exagerada de células ao risco aumentado de desenvolvimento de DEVH crônica (Heimfeld, 2003; Zaucha, 2001). Zaucha et al. (2001) observaram maior incidência de uma extensiva DEVH crônica em pacientes que receberam transplantes alogênicos de mais de 8,0 × 10^6 células $CD34^+$/kg.

Alguns autores sugeriram que a dose de células $CD34^+$ necessária à pega do enxerto pode variar com o número de procedimentos de coleta de CPrHs (Smolowicz, 1999). Acredita-se que seja necessária uma dose total mais alta quando as células $CD34^+$ são coletadas por meio de múltiplos procedimentos. Isso parece dever-se às alterações que ocorrem nos subgrupos de células $CD34^+$ no curso de múltiplas coletas (Smolowicz, 1999).

Mobilização de células progenitoras hematopoéticas

As tentativas iniciais de extrair CPrHs a partir do sangue periférico foram bem-sucedidas, contudo eram trabalhosas e dispendiosas. O sangue periférico contém apenas 10% da fração de células $CD34^+$ encontrada na medula óssea (Lee, 1995a). Isso significa que, quando as CPrHs são coletadas no estado de equilíbrio dinâmico (i. e., sem mobilização) pode ser necessário realizar um número considerável de procedimentos para obter uma dose suficiente (p. ex., 12 procedimentos em um estudo) (Moog, 1998). Assim, a utilidade da hemaférese para coleta de CPrHs é limitada durante o estado de equilíbrio dinâmico.

A descoberta de que as CPrHs periféricas podem ser mobilizadas da medula óssea significou a possibilidade de coletar doses terapêuticas de CPrHs por hemaférese utilizando um número menor de procedimentos, tornado o método mais atrativo. A mobilização das CPrHs a partir da medula óssea pode ser feita por quimioterapia, citocinas ou uma combinação de ambas (Gillespie, 1996; Lee, 1995a; Moog, 1998). A Tabela 36.6 fornece uma comparação geral da efetividade desses três regimes de mobilização.

O regime inicialmente empregado para a mobilização foi a quimioterapia. Durante o período de hematopoese de rebote, subsequente ao tratamento quimioterápico, o número de CPrHs presentes no sangue periférico aumenta dramaticamente (Tab. 36.6). Esse aumento possibilita uma coleta efetiva de CPrHs e também serve para reduzir a carga tumoral junto ao doador/receptor. A limitação desse método de mobilização, contudo, está na aplicabilidade apenas para transplantes autólogos.

Citocinas, como G-CSF e GM-CSF, também induzem um dramático aumento na concentração de CPrHs no sangue periférico e proporcionam o benefício adicional de apresentarem mínima toxicidade a curto prazo (Tab. 36.2). Em consequência, torna-se possível mobilizar CPrHs em doadores normais e empregar hemaférese na transplantação alogênica. Os mecanismos de ação dessas citocinas são indiretos, em termos de efeitos sobre as CPrHs. Essas células, na medula óssea, ligam-se a células estromais via moléculas de adesão. Tais moléculas incluem VLA-4 e CXCR4, nas CPrHs, e VCAM-1 e SDF-1, nas células estromais. O G-CSF promove aumento do número de neutrófilos na medula. Como resultado, aumenta a concentração de enzimas proteolíticas, como a elastase e MMP-9, que são liberadas pelos neutrófilos. Essas enzimas clivam VCAM-1 e SDF-1 soltando as CPrHs das células estromais e permitindo que as CPrHs entrem na circulação periférica (Lapidot, 2002).

Tabela 36.6 Comparação de diferentes regimes de mobilização (Gillespie, 1996)

Regime	Dia aproximado em que o pico de concentração de CPrHs é alcançado	Aumento da concentração de CPrHs acima do estado de equilíbrio dinâmico
Quimioterapia	14º dia após o término da quimioterapia	5–15 ×
Citocinas (G-CSF e GM-CSF)	5º dia após o início da terapia com citocinas	60 ×
Quimioterapia e citocinas	5º dia após o início da terapia com citocinas	1.000 ×

De modo geral, G-CSF e GM-CSF produzem a mesma magnitude de aumento da concentração de células $CD34^+$, contudo existem diferenças quanto à recuperação da hematopoese no receptor e à ocorrência de efeitos colaterais entre ambos os agentes. Nos receptores de células CPrHs mobilizadas com GM-CSF a recuperação da produção de plaquetas é mais demorada que nos receptores de CPrHs mobilizadas com G-CSF (13 dias *versus* 18 dias) (Gillespie, 1996). Embora os tratamentos com GM-CSF e G-CSF produzam os mesmos efeitos colaterais, estes tendem a ser mais severos nos doadores tratados com GM-CSF (Bolwell, 1994). O uso de G-CSF ou GM-CSF para doadores normais está associado a um pico de células $CD34^+$ em aproximadamente 5 dias após o início da terapia (Bensinger, 1996). O uso de G-CSF para doadores normais por períodos superiores a 5 dias foi associado a uma diminuição do número de células $CD34^+$ coletadas após o 10º de estimulação (Stroncek, 1996a).

Além do G-CSF e do GM-CSF, inúmeras citocinas e anticorpos monoclonais dirigidos contra as moléculas de adesão das células-tronco estão sendo avaliados quanto ao efeito de mobilização de CPrHs. Alguns exemplos são AMD-3100, fator de células-tronco, interleucina-3, c-kit ligante e anti-VLA-4 (Filshie, 2002; Fruehauf, 2003; Gillespie, 1996; Lee, 1995a).

Por fim, os efeitos da mobilização por quimioterapia e citocinas são independentes uns dos outros. Isso significa que a combinação de ambos os regimes permite coletar números ainda maiores de CPrHs que o uso isolado de cada regime.

Em doadores alogênicos sadios, o regime de mobilização ideal parece ser 10 a 16 μg de G-CSF/kg divididos em duas doses administradas via subcutânea (Kroger, 2002). Embora o G-CSF apresente um efeito dose-resposta, doses acima de 10 a 16 μg/kg resultam na produção de mais efeitos colaterais no doador sem nenhum aumento significativo no rendimento de células $CD34^+$. Entretanto, se o doador for um mobilizador fraco, doses mais altas podem ser administradas (Kroger, 2002). Foi demonstrado que, nessas condições, a administração de uma dose duas vezes ao dia é melhor que uma única dose diária. Acredita-se que isso se deva à meia-vida relativamente curta do G-CSF (3–4 horas) (Kroger, 2002).

Em doadores autólogos, a mobilização é complicada por doenças subjacentes e terapia prévia. Na coleta de CPrHs autólogas, são necessárias doses de G-CSF > 16 μg/kg. Se a mobilização for fraca, o paciente/doador deve ser submetido a uma nova mobilização com quimioterapia seguida da administração de fator de crescimento ou com doses mais altas de fator de crescimento (Kessinger, 2003).

Além desses regimes de mobilização, as CPrHs também podem ser mobilizadas pelo próprio procedimento de coleta em si. Estudos sobre cinética de CPrHs durante a execução de procedimentos de hemafére-

se mostraram que o número de CPrHs recuperadas é superior àquele esperado com base apenas no número de células presentes no sangue periférico. Isso significa que, conforme CPrHs vão sendo removidas durante o procedimento, ocorre uma liberação adicional de mais CPrHs a partir da medula (Smolowicz, 1999).

Infelizmente, apesar das tentativas de otimização dos regimes mobilizadores, nem todos os pacientes fornecem coletas de CPrHs de sangue periférico em quantidade suficiente para a transplantação. A Tabela 36.7 mostra os fatores que prejudicam a coleta de CPrHs. Alguns autores observaram que o número de células $CD34^+$ existente na medula óssea serve para predizer a capacidade de mobilização do paciente, e pode auxiliar a decidir se ele deve ser submetido a uma hemaférese ou a uma coleta de medula óssea (Passos-Coelho, 1995a).

Embora a mobilização aumente o número de CPrHs presentes no sangue periférico, também exerce efeitos detrimentais sobre o doador e o produto de CPrHs. Conforme discutido na seção sobre os aspectos associados ao doador na coleta de granulócitos, o uso do G-CSF está associado a efeitos colaterais mínimos a curto prazo, bem como a efeitos adversos desconhecidos a longo prazo. No caso da coleta autóloga, tais efeitos e preocupações são irrelevantes em relação ao risco imposto pela doença ao paciente. Além disso, o uso desses agentes nessas circunstâncias acelera a recuperação de leucócitos subsequentemente à quimioterapia – um efeito benéfico. No cenário da doação autóloga, é preciso explicar ao doador, durante o processo de consentimento, a incerteza dos riscos impostos a longo prazo pela mobilização com citocinas. Do mesmo modo, o atraso na recuperação de plaquetas, que ocorre após o tratamento com G-CSF e a coleta de granulócitos, também é observado na coleta de CPrHs (Gillespie, 1996; Stroncek, 1996b). Em doadores autólogos, esse atraso é combinado a uma supressão da medula óssea por ação da quimioterapia recente, podendo tornar necessária a realização de uma transfusão de plaquetas. A mobilização também está associada ao risco aumentado de desenvolvimento de trombose com o uso de cateter (Lee, 1995a). Por fim, além da mobilização das CPrHs, alguns pesquisadores (Brugger, 1994; Gazitt, 1996) – mas outros não (Passos-Coelho, 1995b) – demonstraram que os regimes previamente descritos também mobilizam células tumorais para o sangue periférico. O estudo conduzido por Brugger et al. (1994) demonstrou a mobilização de células tumorais nos dias 1 a 7 após o início da quimioterapia em pacientes com medula óssea intacta, bem como decorridos 9 a 16 dias em pacientes com envolvimento medular (Brugger, 1994). A mobilização de células tumorais nestes últimos ocorreu no prazo de coleta de CPrHs. Similarmente, Gazitt et al. (1996), estudando pacientes com mieloma múltiplo, observaram uma mobilização de plasmócitos mais tardia (5–6 dias) que a mobilização de células-tronco (1–3 dias). As diferenças relativas à mobilização de células tumorais *versus* CPrHs levaram muitos a sugerir que a simples coleta no início do curso da mobilização pode render melhores resultados que a realização de múltiplas coletas. É importante notar que, apesar de haver contaminação com células tumorais, o efeito dessa contaminação sobre a reincidência é incerto.

Tabela 36.7 Fatores de influência negativa sobre a mobilização na coleta de células-tronco autólogas (Kessinger, 2003)

Idade*
Envolvimento da medula
LNH folicular em comparação ao LNH difuso
Radioterapia anterior
Maior número de ciclos de quimioterapia
Baixa contagem de plaquetas
Baixo número de células NK
Terapia anterior com rituximabe

* Irrelevante, caso a mobilização seja por quimioterapia. Quando o G-CSF é administrado isoladamente, doadores/pacientes mais jovens apresentam melhor mobilização que doadores/pacientes mais velhos (Bensinger, 1995; Moog, 1998).

Procedimento de coleta de células progenitoras hematopoéticas

Um dos primeiros fatores a ser considerado ao realizar uma coleta de CPrH é o momento em que o procedimento deve ser iniciado. Em doadores alogênicos, a prática de escolha parece ser iniciar a coleta no 5º dia após o início da administração de G-CSF, uma vez que doadores alogênicos saudáveis respondem de forma relativamente reprodutível a esse fator (Kroger, 2002). No caso de doadores autólogos, inúmeros critérios podem ser adotados para determinar quando iniciar a terapia. Entre esses critérios, têm sido utilizados a mielocitose e os níveis crescentes de monócitos (Lee, 1995a); um aumento de 2 vezes na contagem total de CBSs em um período de 24 horas (Lee, 1995a); o momento em que ocorre a primeira elevação da contagem de plaquetas (Gillespie, 1996); o 14º dia após o início da quimioterapia (Gillespie, 1996); e uma contagem de CBSs de 10.000 células/μL (Dreger, 1993). Com relação a este último indicador, Dreger et al. (1993) demonstraram a ocorrência de um pico de CFU-GM em 1 a 2 dias após a contagem de CBSs ter chegado a 10.000 células/μL. Iniciar a coleta nesse momento evitou perder o pico subsequente de CFU-GM. Outro método amplamente utilizado é a realização de contagens seriadas de células $CD34^+$ por citometria de fluxo. Esse método pode ser empregado para detectar a elevação do número de células $CD34^+$ e desencadear a coleta de CPrHs. Os níveis desencadeadores descritos na literatura devem ser vistos com cautela, em decorrência da atual falta de padronização das quantificações de células $CD34^+$ (Lee, 1995a). As instituições devem determinar individualmente seus próprios critérios desencadeantes.

Uma vez tomada a decisão de iniciar a coleta, é possível modificar inúmeros aspectos do procedimento que possam vir a influenciar a qualidade do produto. Primeiramente, o aparelho utilizado na coleta de CPrHs determina as características do produto. Existem diversos aparelhos disponíveis, sendo os dois mais comumente utilizados o CS3000 Plus (Baxter Healthcare Co., Round Lake, IL) e o COBE Spectra (Gambro BCT Inc., Lakewood, CO). A comparação direta desses equipamentos demonstrou que ambos não diferem quanto à eficiência na coleta de células $CD34^+$ (Stroncek, 1997b). Constatou-se que o produto fornecido pelo COBE Spectra continha maior número de neutrófilos. Esse achado poderia ser considerado importante se o produto de CPrHs tivesse de ser modificado (p. ex., depletado de células T), uma vez que essas células adicionais podem interferir no processo de depleção (Stroncek, 1997b).

Outra variável a ser considerada é a velocidade de fluxo do sangue total durante a execução do procedimento. Poderia parecer que velocidades de fluxo mais rápidas resultariam em maior volume processado e, ao mesmo tempo, em maior número de CPrHs coletadas. Quando se usa o COBE Spectra, é isso mesmo que ocorre (Lin, 1995). Já com o CS3000, velocidades de fluxo mais altas foram associadas a um efeito detrimental de redução do conteúdo de CMNs do produto, bem como a um efeito benéfico de diminuição da contagem de plaquetas (Lin, 1995). Isso pode ter sido causado por um tempo de permanência no campo de centrifugação que foi insuficiente para proporcionar a adequada centrifugação na velocidade de fluxo mais rápida.

Embora a velocidade de fluxo do sangue total possa afetar adversamente a eficiência da coleta, considera-se válido o conceito de aumentar a quantidade de sangue processado para aumentar o rendimento de CPrHs. A coleta-padrão de CPrHs envolve o processamento de 1,5 a 3 volumes de sangue por procedimento (Lee, 1995a). Alternativamente, a Leucaférese de Grande Volume (LGV) envolve o processamento de mais de 5 volumes de sangue ou de mais de 15 L (Reik, 1997). Os benefícios desse tipo de procedimento incluem a coleta de grande quantidade de CPrHs a cada procedimento, com consequente necessidade de realizar menos procedimentos de coleta, bem como a maior mobilização de CPrHs durante o processo (Lee, 1995a; Moog, 1998). Também foi obtido um melhor rendimento de CPrHs a partir de pacientes mobilizadores fracos (Smolowicz, 1997). Por outro lado, as desvantagens da LGV incluem a maior demora para concluir o procedimento e a incidência aumentada de reações ao citrato (ver a discussão ao final deste capítulo) (Moog, 1998). Durante a execução dos procedimentos-padrão de leucaférese, a complicação mais frequente é a trombose associada ao uso de cateteres centrais (Goldberg, 1995). Por outro lado, as reações ao citrato predominam na LGV, ocorrendo em 33% das doações (Lin, 1995). Isto se deve à maior quantidade de citrato anticoagulante infundida. Alguns autores tentaram minimizar

essas reações adicionando heparina ao anticoagulante (Reik, 1997) e/ou fornecendo suplementação intravenosa de cálcio durante a execução do procedimento (Bolan, 2002; Buchta, 2003).

Aspectos associados ao doador de células progenitoras hematopoéticas

Além das reações associadas ao G-CSF, descritas na seção sobre coleta de granulócitos, e dos aspectos observados na LGV, a trombocitopenia também é um fator preocupante nas coletas de CPrHs, tanto autólogas como alogênicas. Schlenke et al. (2000) reportaram perdas médias de plaquetas da ordem de 24,2 ± 12,5% durante a coleta de grandes volumes de CPrHs de sangue periférico utilizando o CS3000. Perdas menores de plaquetas foram relatadas com o uso do Baxter Amicus (Burgstaler, 2004). Os pacientes submetidos a coletas de células-tronco autólogas do sangue periférico também podem desenvolver trombocitopenia em decorrência da quimioterapia rotineiramente empregada como parte do regime de mobilização. Tais pacientes não costumam apresentar complicações envolvendo sangramento (Goldberg, 1995), entretanto, podem requerer transfusões de plaquetas antes ou após a coleta, dependendo da contagem plaquetária, a fim de evitar tais complicações.

Plasmaférese de doação

Produtos do plasma

Dois tipos de produtos do plasma são coletados por plasmaférese de doação: Plasma Fresco Congelado (PFC) e plasma fonte. O plasma fonte é o plasma subsequentemente utilizado para manufaturar produtos derivados. Estes, por sua vez, incluem a albumina, imunoglobulinas, concentrados de fatores de coagulação e reagentes de laboratório. O PFC é o componente líquido do sangue total que foi congelado em 6 a 8 horas após a coleta. O benefício de coletar PFC por plasmaférese está na possibilidade de obter 600 a 700 mL de plasma a partir de um único doador. Esse volume pode ser dividido em múltiplas unidades de volumes equivalentes ao de PFC derivado das doações de sangue total. Alternativamente, todo o volume obtido pode ser congelado como "plasma gigante". Essas unidades grandes proporcionam o benefício de limitar a exposição do doador nas situações em que um paciente requer grandes volumes de PFC, como na troca de plasma para casos de púrpura trombocitopênica trombótica. Outro benefício é que a coleta de um grande volume pode maximizar a produção de produtos utilizados com frequência ou de produtos raros, tais como PFC de tipo AB ou PFC deficiente de IgA.

Seleção do doador de plasma

Os critérios para seleção de doadores de plasmaférese variam de acordo com a frequência das doações. Aqueles que doam plasma com frequência inferior a 4 semanas são classificados como doadores "infrequentes" e devem possuir todos os requisitos necessários aos doadores de sangue total. Aqueles com frequência de doações maior que a cada 4 semanas são classificados como doadores "frequentes", devendo atender a todos os critérios estabelecidos pelo Code of Federal Regulations (CFR) (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004). Essas exigências assemelham-se, em muitos aspectos, às exigências estabelecidas para doações de sangue total, diferindo apenas quanto aos adiamentos em casos de malária e exposição a doenças transmissíveis por transfusão (CFR, 2003). O CFR também determina que os doadores de plasma frequentes possuam uma concentração sérica de proteínas mínima de 6,0 g/dL, sendo que a avaliação dessa concentração e também uma eletroforese de proteínas séricas ou uma imunodifusão quantitativa devem ser realizadas a cada 4 meses (CFR, 2003). Por fim, exige-se a realização de um exame médico anual. O CFR limita, ainda, o volume de plasma a ser doado. Os doadores podem fornecer, no máximo, 1.000 mL (1.200 mL, no caso de doadores com peso corporal acima de 79,4 kg) a cada 48 horas, e não mais que 2.000 mL (2.400 mL, no caso de doadores com peso corporal acima de 79,4 kg) em um período de 7 dias (CFR, 2003).

Aspectos associados ao doador de plasma

Os riscos para o doador de plasmaférese são os mesmos associados à realização de qualquer procedimento de hemaférese. Surgem, ainda, preocupações relacionadas a uma possível depleção de imunoglobulinas ou remoção de fatores de coagulação mais rapidamente do que se consegue repô-los, em especial no caso dos doadores frequentes. Tais preocupações não foram sustentadas por estudos envolvendo doadores a longo prazo (Wasi, 1991), bem como doadores infrequentes (Ciszewski, 1993).

Indicações para hemaférese terapêutica

Os procedimentos de aférese terapêutica, tanto de citaférese como de plasmaférese, são utilizados no tratamento de uma ampla variedade de doenças, com frequência sem um embasamento científico bem definido para obtenção de qualquer benefício esperado. Um número limitado de triagens controladas aleatorizadas foram realizadas (Shehata, 2002). Nesse sentido, considera-se a aférese análoga à sangria realizada no início do século 18, à qual tem sido frequentemente comparada. Como resultado, torna-se difícil em certos casos determinar para quais doenças e distúrbios a hemaférese deve ser realmente indicada. Para ajudar a fazer essa determinação, a American Society for Apheresis (ASFA) e a AABB publicaram listas (regularmente atualizadas) fornecendo recomendações para o uso da aférese (American Association of Blood Banks Hemapheresis Committee, 1995; American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000). Ambas as listas classificam cada doença/distúrbio em uma entre quatro categorias. A Tabela 36.8 mostra as categorias e suas respectivas definições. A Tabela 36.9 lista as doenças que foram avaliadas pela AABB e ASFA.

A discussão de todos os distúrbios listados na Tabela 36.9 está além do escopo do presente capítulo. Caso o leitor tenha interesse em saber mais sobre o assunto, pode consultar três fontes: os livros-texto *Apheresis: Principles and Practice* (McLeod, 2003) e *Guidelines for Therapeutic Hemapheresis* (American Association of Blood Banks Hemapheresis Committee, 1995) – ambos publicados pela AABB –, além da edição especial do *Journal of Clinical Apheresis* intitulada "The Clinical Applications of Therapeutic Apheresis", publicada pela ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Citaférese terapêutica

Plaquetaférese terapêutica

Trombocitose

A trombocitose é definida como um aumento do número de plaquetas presentes no sangue. Tais aumentos podem ser discretos ou resultar em concentrações de plaquetas maiores que 1×10^6 μ/L. Os casos mais preocupantes são os pacientes que sofrem os maiores aumentos. A trombocitose pode surgir a partir de uma variedade de doenças (Tab. 36.10). Esses processos podem ser primários ou secundários (reativos), sendo estes últimos observados na maioria (82%) dos pacientes de um dado estudo que apresentaram contagens de plaquetas acima de 1×10^6 μ/L apresentadas (Buss, 1994).

Tabela 36.8 Classificação da ASFA / AABB das indicações de aférese

Categoria	Descrição
I	A aférese é uma terapia-padrão e aceitável. Classificação baseada em triagens controladas aleatorizadas bem planejadas ou em ampla experiência não controversa publicada
II	A aférese geralmente é aceita como terapia complementar ou de suporte. Foram realizadas triagens controladas aleatorizadas para alguns distúrbios, porém outros são sustentados apenas por pequenas séries de casos
III	O benefício é sugerido, contudo as evidências existentes no momento são insuficientes para estabelecer a eficácia e/ou esclarecer as proporções de risco-benefício
IV	A aférese não é indicada. Nenhum benefício foi demonstrado em triagens controladas

Introdução ao terceiro artigo especial: Clinical applications of the therapeutic apheresis. McLeod, BC. Copyright © 2000 J Clin Apheresis 15:1-5. Reimpresso com permissão de Wiley-Liss, Inc., uma subsidiária da John Wiley & Sons, Inc.

Tabela 36.9 Doenças tratadas por hemaférese

Distúrbio	Procedimento de hemaférese	Categoria atribuída pela ASFA	Categoria atribuída pela AABB
Transplantes de medula ABO incompatíveis	Plasmaférese	II	III
Doença desmielinizante inflamatória do sistema nervoso central aguda	Plasmaférese	II	NC
Polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (síndrome de Guillain-Barré)	Plasmaférese	I	I
AIDS	Plasmaférese	NC	IV
Esclerose lateral amiotrófica (ALS)	Plasmaférese	NC	IV
Doença do anticorpo antimembrana basal (síndrome de Goodpasture)	Plasmaférese	I	I
Anemia aplástica	Plasmaférese	III	IV
Queimaduras com choque	Plasmaférese	NC	III
Polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP)	Plasmaférese	I	I
Inibidores de fatores de coagulação	Plasmaférese	II	III
Doença da aglutinina fria	Plasmaférese	NC	II
Crioglobulinemia	Plasmaférese	II	I
Crioglobulinemia com polineuropatia	Plasmaférese	II	NC
Linfoma de células T cutâneo	Fotoférese/leucaférese	I/III	II/II
Polineuropatia desmielinizante com IgG/IgA	Plasmaférese/imunoadsorção	I/III	NC
Superdosagem de fármacos	Plasmaférese	III	II
Síndrome de Lambert-Eaton	Plasmaférese	II	II
Eritrocitose/policitemia vera	Eritroférese/flebotomia	II/I	NC
Hipercolesterolemia familiar	Plasmaférese/remoção seletiva	II/I	I/NC
Glomerulonefrite segmentar focal recorrente	Plasmaférese	III	III
Rejeição de transplante cardíaco	Plasmaférese/fotoférese	III/III	NC
Coleta de células progenitoras hematopoéticas	Leucaférese	NC	I
Doença hemolítica do recém-nascido (tratamento materno)	Plasmaférese	III	III
Reação transfusional hemolítica	Eritroférese	NC	III
Síndrome urêmica hemolítica (HUS)	Plasmaférese	III	II
Insuficiência hepática	Plasmaférese	III	IV
Hipereosinofilia	Leucaférese	NC	IV
Hiperviscosidade	Plasmaférese	II	I
Púrpura trombocitopênica idiopática (ITP)	Plasmaférese/coluna de proteína estafilocócica A	NC/II	IV/III
Miosite de corpúsculos de inclusão	Plasmaférese/leucaférese	III/IV	NC
Leucemia com hiperleucocitose	Leucaférese	I	I
Leucemia sem hiperleucocitose	Leucaférese	NC	IV
Nefrite lúpica	Plasmaférese	NC	IV
Malária (hiperparasitemia)	Eritroférese	III	II
Esclerose múltipla (global)	Plasmaférese	NC	III
Recidivante	Plasmaférese	III	NC
Progressiva	Plasmaférese/linfaférese	III/III	NC/NC
Miastenia grave	Plasmaférese	I	I
Rim de mieloma	Plasmaférese	II	NC
Mieloma múltiplo com polineuropatia	Plasmaférese	III	NC
Rejeição de transplante de órgão	Plasmaférese/fotoférese/leucaférese	NC/NC/NC	NC/III/III
Síndromes paraneoplásicas	Plasmaférese	III	NC
Distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes pediátricos associados a infecções estreptocócicas (PANDAS)	Plasmaférese	II	NC
Pênfigo vulgar	Plasmaférese/fotoférese	NC	II/NC
Doença do armazenamento de ácido fitânico (doença de Refsum)	Plasmaférese	I	I
Refratividade plaquetária devida a aloanticorpos	Plasmaférese/coluna de proteína estafilocócica A	NC	III/NC
Síndrome POEMS	Plasmaférese	III	NC
Polimiosite/dermatomiosite	Plasmaférese/leucaférese	III/IV	IV/IV
Polineuropatia com IgM	Plasmaférese/imunoadsorção	II/III	NC
Púrpura pós-transfusional (PTP)	Plasmaférese	I	I
Esclerose sistêmica progressiva (escleroderma)	Plasmaférese/fotoférese/leucaférese	III/NC/NC	III/III/NC
Psoríase	Plasmaférese	NC	IV
Trombocitopenia induzida por quinina/quinidina	Plasmaférese	NC	II
Glomerulonefrite rapidamente progressiva	Plasmaférese	II	II

(Continuação)

Tabela 36.9 Doenças tratadas por hemaférese (*continuação*)

Distúrbio	Procedimento de hemaférese	Categoria atribuída pela ASFA	Categoria atribuída pela AABB
Encefalite de Rasmussen	Plasmaférese	III	III
Doença de Raynaud	Plasmaférese	III	NC
Aplasia de hemácias	Plasmaférese	III	III
Rejeição de transplante renal	Plasmaférese	IV	IV
Transplante renal (para remoção de anticorpos anti-HLA antes do transplante)	Plasmaférese	III	NC
Artrite reumatoide	Plasmaférese/leucaférese/imunoadsorção	NC/II/II	IV/III/NC
Esquizofrenia	Plasmaférese	NC	IV
Anemia falciforme	Eritroférese	I	I
Anemia falciforme (tratamento materno durante a gestação)	Eritroférese	NC	III
Síndrome do homem rígido	Plasmaférese	III	NC
Coreia de Sudenham	Plasmaférese	II	NC
Amiloidose sistêmica	Plasmaférese	IV	NC
Lúpus eritematoso sistêmico (SLE)	Plasmaférese	III	NC
Trombocitose (sintomática)	Plaqueta	I	I
Púrpura trombocitopênica trombótica (TTP)	Plasmaférese	I	I
Tempestade tireóidea	Plasmaférese	NC	III
Vasculite	Plasmaférese	III	NC
Anemia hemolítica autoimune a quente	Plasmaférese	III	III

Ver na Tabela 36.8 a explicação das categorias estabelecidas pela ASFA e AABB. NC = não classificado.

Da Tabela 13.1, *Aférese: princípios e prática* (McLeod, 2003).

Tabela 36.10 Doenças associadas à trombocitose (Buss, 1994)

Primária	Trombocitemia essencial
	Metaplasia mieloide agnogênica
	Policitemia vera
	Leucemia mielógena crônica
Secundária (reativa)	Esplenectomia
	Hemorragia aguda
	Deficiência de ferro
	Doenças inflamatórias crônicas
	Malignidades sólidas
	Mielossupressão após o rebote

Reproduzido de Am J Med Vol. 96, Buss DH, Cashell AW, O'Connor ML et al: Occurrence, etiology and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases, pp. 247-253, Copyright 1994, com permissão de Excerpta Medica, Inc.

A preocupação com pacientes que apresentam contagens plaquetárias tão altas se deve à possibilidade de haver complicações em decorrência da presença de um número de plaquetas extremamente elevado. Tais complicações são trombóticas e hemorrágicas. As complicações hemorrágicas consistem, predominantemente, em sangramento mucocutâneo (Schafer, 1996). As complicações trombóticas abrangem a trombose microvascular (p. ex., eritromelalgia) e a macrovascular (p. ex., infarto do miocárdio). Entre os casos de trombose macrovascular, a trombose arterial predomina mais frequentemente nos sítios cerebrovascular, vascular periférico e na circulação arterial coronariana (Schafer, 1996). Essas complicações são raras em casos de trombocitose secundária (4%), contudo são relativamente comuns entre as causas primárias (56%) (Buss, 1994). Os fatores de risco associados a tais complicações na trombocitose primária são listados na Tabela 36.11.

Em decorrência da preocupação em torno da ocorrência dessas complicações, os estudos sobre o assunto dirigiram o foco para a tentativa de reduzir as elevadas contagens plaquetárias. Os tratamentos utilizados incluem agentes quimioterápicos, tais como agentes alquilantes, fósforo radiativo (^{32}P) e hidroxicarbamida, além de outras medicações, como interferon-α e Anagrelide (Schafer, 1996). Todos esses agentes se mostraram efetivos em reduzir as contagens plaquetárias por um período variável de dias a semanas, no entanto, também produzem efeitos colaterais significativos, como leucemogênese por agentes alquilantes, ^{32}P e hidroxicarbamida. Como resultado, e em razão do baixo risco de haver complicações em pacientes com distúrbios secundários, essas intervenções para redução do número de plaquetas não são utilizadas nessas circunstâncias e o distúrbio subjacente é tratado (Buss, 1994). Entretanto, quando se trata dos distúrbios primários, tomar uma decisão é algo mais difícil e controverso. Mesmo assim, a menos que o paciente seja sintomático, como resultado da elevada contagem plaquetária, muitos autores recomendam não realizar tratamento. Isso, em parte, deve-se ao fato de alguns estudos terem demonstrado não haver evidências convincentes de que a redução da contagem de plaquetas realmente evita complicações (Schafer, 1984). Outro motivo é a falta de correlação entre a contagem de plaquetas e o risco de trombose (Tefferi, 1994).

Tabela 36.11 Fatores associados a complicações na trombocitose primária (Cortelazzo, 1990; Tefferi, 1994)

Trombose	Idade avançada
	Evento trombótico prévio
	Maior duração da trombocitemia
Hemorragia	Contagem de plaquetas > 2.000.000/μL
	Ingestão de NSAID

Indicações da plaquetaférese terapêutica

O papel da hemaférese no tratamento da trombocitose consiste em intervir quando o paciente se torna sintomático, bem como em estabilizar a condição desse paciente até que a supervisão médica reduza a contagem de plaquetas. Conforme já mencionado, a contagem de plaquetas não apresenta relação com o risco de trombose, mesmo diante de contagens > 1×10^6 μ/L (Buss, 1994; Schafer, 1984, 1996; Tefferi, 1994). Como resultado, a plaquetaférese deve ser utilizada no tratamento de pacientes que manifestam sintomas por apresentarem contagens plaquetárias elevadas. Adicionalmente, a plaquetaférese também pode ser empregada para reduzir a contagem de plaquetas e, talvez, prevenir sangramentos no pré-operatório, e também no tratamento de mulheres grávidas (Isbister, 1997). Nesse último grupo de pacientes, o benefício proporcionado pela plaquetaférese continua sendo incerto,

pois não há relação entre a contagem plaquetária e o resultado da gravidez (Schafer, 1996). Embora a hemaférese seja complementar à terapia, em vez de modalidade de tratamento primário, Baron et al. (1993) observaram que a aférese pareceu intensificar a sensibilidade dos pacientes à terapia com busulfan. Esse efeito resultou em maior resposta de plaquetas, porém também implicou maior risco de pancitopenia (Baron, 1993). É importante destacar que os efeitos da plaquetaférese na trombocitose são temporários, podendo durar horas ou dias, e a supervisão médica deve ser instituída concomitantemente.

A plaquetaférese, nessas circunstâncias, pode ser realizada com auxílio de qualquer aparelho de coleta de plaquetas a partir de doadores. Tipicamente, a meta do procedimento é processar 1 a 1,5 volume de sangue (Baron, 1993) ou conduzir o processamento durante um período definido (p. ex., 3 horas) (Burgstaler e Pineda, 1994). Em um estudo comparativo sobre a capacidade de os sistemas de aférese reduzirem as contagens plaquetárias, Burgstaler e Pineda (1994) constataram que o processamento durante 3 horas resultou em uma redução de 43% da contagem de plaquetas por meio do COBE Spectra. Como inexiste um nível definido em que a trombose ocorre, também não há um objetivo definido para a redução de plaquetas. Os sintomas do paciente devem ser tratados tendo em vista sua melhora/resolução como meta final.

Segundo a ASFA, a trombocitose é uma indicação de categoria I para plaquetaférese (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Leucaférese terapêutica

Hiperleucocitose

A hiperleucocitose consiste na elevação extrema da contagem de CBSs. Essa elevação pode ser causada por doenças malignas ou não malignas, sendo que as contagens mais altas são provocadas por malignidades. Como resultado, podem surgir diversas síndromes, incluindo leucostasia do Sistema Nervoso Central (SNC) – caracterizada por déficits neurológicos – e leucostasia pulmonar – caracterizada pela falta de oxigenação e dor torácica (Isbister, 1997). De maneira tradicional, considera-se que as contagens de CBSs extremamente elevadas provocam aumento da viscosidade e consequentes alterações no fluxo sanguíneo junto à microvasculatura. Os leucócitos, principalmente os granulócitos, são mais rígidos que as hemácias (Isbister, 1997). Acredita-se que as contagens elevadas de CBSs possam causar oclusão da microvasculatura, resultando em leucostasia e isquemia. Contudo, esses efeitos talvez não reflitam inteiramente o quadro do paciente. A contagem de CBSs não necessariamente apresenta relação com o início dos sintomas. Evidências mais recentes sugerem que as interações das moléculas de adesão expressas em blastos leucêmicos e células endoteliais também podem contribuir para a oclusão vascular e lesão endotelial (Liesveld, 1997; Porcu, 2000; Stucki, 2001).

Além dos sintomas de oclusão vascular da hiperleucocitose, outro potencial problema resultante das elevadas contagens de CBSs é a síndrome da lise tumoral (Isbister, 1997). O paciente apresenta essa síndrome durante a quimioterapia inicial, como resultado da liberação de produtos da degradação de células tumorais, causando danos aos rins e/ou iniciando um processo de coagulação intravascular disseminada.

Durante a primeira semana de terapia, taxas de mortalidade mais altas são observadas em pacientes cujas contagens de CBSs ultrapassam 100.000 células/μL. Esses casos de morte foram associados a um número significativamente maior de hemorragias no SNC que aquele observado em pacientes com contagens < 50.000 células/μL (Dutcher, 1987). De modo similar, a presença de leucostasia pulmonar também está associada à mortalidade inicial (Lester, 1985). Em um estudo, a sobrevida geral dos pacientes com leucostasia pulmonar foi de 0,2 mês, *versus* 15,4 meses para pacientes com leucostasia no SNC e 10,8 meses para pacientes sem leucostasia (Lester, 1985). Assim como na trombocitose, o tratamento definitivo das elevadas contagens de CBSs consiste em tratar a doença subjacente – nesse caso, a leucemia.

Indicações da leucaférese terapêutica

Como na plaquetaférese, o papel da leucaférese na hiperleucocitose consiste em reduzir a contagem de CBSs para aliviar os sintomas e/ou prevenir a síndrome da lise tumoral. Similarmente à plaquetaférese, a indicação para tratar o paciente é a presença de sintomas indicativos de leucostasia. Além disso, a leucaférese também pode ser empregada no tratamento de mulheres grávidas para prolongar a gestação até que o bebê possa nascer e a mãe inicie a quimioterapia. Mais uma vez, a hemaférese tem caráter complementar à terapia e não constitui uma modalidade de tratamento primário. A terapia definitiva é a quimioterapia, que deve ser iniciada ao mesmo tempo ou pouco depois do início da hemaférese, uma vez que a redução da contagem de CBSs promovida pela leucaférese é temporária. Dito isso, é importante mencionar dois aspectos. Embora a hemaférese possa reverter ou diminuir os sintomas da leucostasia em alguns pacientes, nenhuma relação foi encontrada entre o grau de leucorredução – tanto em valor absoluto como em percentual – e a sobrevida (Porcu, 1997). Adicionalmente, apesar de a leucaférese reduzir as taxas de mortalidade de 2 semanas e aumentar as taxas de remissão completa, parece não afetar a sobrevida a longo prazo ou a sobrevida global desses pacientes (Giles, 2001).

Os procedimentos de leucaférese compartilham semelhanças com os de coleta de granulócitos previamente descritos. O HEA pode ser utilizado para intensificar a separação dos componentes celulares durante a centrifugação, resultando em uma remoção mais eficaz de leucócitos. Isso é especialmente importante quando as células em questão são granulócitos mais maduros, como aqueles observados na Leucemia Mielógena Crônica (LMC). O volume de sangue total processado é, usualmente, 8 a 10 L ou o equivalente a 2 volumes de sangue (McLeod, 1993). Relatos descrevem reduções de 50 a 85% da contagem de CBSs com o emprego dessa estratégia (Burgstaler, 1994; Steeper, 1985). Como na plaquetaférese, não há uma meta definida para a redução da contagem de CBSs, e o objetivo final é melhorar/resolver os sintomas apresentados pelo paciente.

Segundo a ASFA, a hiperleucocitose é uma indicação de categoria I para leucaférese (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Eritroférese terapêutica

A eritroférese terapêutica, ou troca de hemácias (Red Cell Exchange – RCE), é um tipo de citaférese que remove as hemácias do paciente e as substitui por hemácias alogênicas. Esse tipo de hemaférese é, ocasionalmente, utilizado no tratamento da hiperparasitemia em casos de malária (Lercari, 1992; Rouvier, 1988) e outras infecções parasíticas envolvendo hemácias, como a babesiose (Evenson, 1998). É mais comumente utilizada no tratamento da anemia falciforme.

Anemia falciforme

A anemia falciforme é um distúrbio autossômico recessivo presente em 1 a cada 200 a 500 recém-nascidos afro-americanos (Wayne, 1993) e também tem sido encontrada em indivíduos que vivem na região subsaariana, África Ocidental, países árabes, bacia do Mediterrâneo e Índia (Davis, 1997). Resulta de uma mutação que substitui uma valina por ácido glutâmico na posição seis da cadeia β-globina da hemoglobina S (Davis, 1997). Essa alteração diminui a solubilidade da hemoglobina quando desoxigenada, de modo a formar cristais que alteram o formato da hemácia e danificam sua membrana. Episódios repetidos levam ao afoiçamento irreversível da célula. Mesmo na ausência de afoiçamento, na anemia falciforme, as hemácias são anormalmente "viscosas". A combinação dessa "viscosidade" ao afoiçamento acarreta a oclusão de pequenos vasos, dano ao endotélio e trombose (Davies, 1997; Wayne, 1993).

A anemia falciforme é caracterizada por uma anemia hemolítica crônica e pela ocorrência de crises (episódios de doença aguda). As crises são mais comumente decorrentes da oclusão vascular e infarto, podendo ser crise de dor, aplasia, sequestro esplênico, hemólise, derrames, síndrome da dor torácica aguda e priapismo. São tratadas pela correção dos fatores que intensificam o afoiçamento: desidratação, hipóxia e acidose. Para tanto, o paciente é submetido à hidratação, alcalinização e administração de oxigênio suplementar (Davies, 1997; Wayne, 1993). Em adição, as crise dolorosas também são tratadas pela administração de analgésicos. Também é possível tratar as crises por meio de transfusão de hemácias.

Na anemia falciforme, a transfusão de hemácias pode ser classificada em três categorias: transfusão simples aguda, transfusão simples crônica e transfusão de troca de hemácias. A transfusão simples aguda consiste na transfusão de hemácias para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio, sendo indicada para o tratamento da anemia

sintomática, crise de sequestro esplênico, crise aplástica, perda de sangue, hemólise acelerada e preparação pré-operatória (Wayne, 1993). A transfusão simples crônica consiste na realização de transfusões de hemácias regulares em uma tentativa de suprimir a produção de hemácias, com o intuito de manter o percentual de hemácias com hemoglobina S abaixo de 30%. Esse tipo de terapia é indicado em casos de doença cerebral vascular e manifestação de sintomas vaso-oclusivos debilitantes. Também pode ser empregada no tratamento de casos de anemia falciforme complicados por doença pulmonar, doença cardíaca, gravidez de alto risco e preparação pré-operatória (Wayne, 1993).

A RCE, na anemia falciforme, é utilizada para remover as hemácias contendo hemoglobina S e substituí-las por hemácias contendo hemoglobina A. A meta da RCE é fazer com que o paciente apresente um hematócrito de 30% e um "*sicklecrit*" (percentual de células contendo hemoglobina S) inferior a 30% (Davies, 1997; Wayne, 1993). Para tanto, a Fração de Hemácias Remanescentes (FHR) deve ser calculada com base no percentual de hemoglobina S real apresentado pelo paciente e o percentual de hemoglobina S desejado. Esse cálculo pode ser executado com auxílio da equação 36.5. Se o hematócrito do paciente for aumentado pelo procedimento, então a FHR ajustada deve ser calculada de acordo com a equação 36.6 (COBE BCT, 1997). É preciso notar que um aumento exagerado do hematócrito pode resultar em diminuição da distribuição de oxigênio em decorrência do aumento da viscosidade. Isso ocorre porque tanto as células falciformes como o endotélio desses pacientes são mais "pegajosos" que o normal.

$$\%\ \text{FHR desejado} = (\text{hemoglobina S desejada}/\text{hemoglobina S real}) \times 100 \quad (36.5)$$

$$\%\ \text{FHR ajustado} = (\%\ \text{FHR desejado}) \times (\text{hematócrito real}/\text{hematócrito desejado}) \times 100 \quad (36.6)$$

Esse valor é introduzido com os demais valores no aparelho de hemaférese para que seja determinado o volume de hemácias necessário à execução do procedimento. Os benefícios da RCE em relação às outras estratégias de transfusão constam na Tabela 36.12.

A síndrome torácica aguda é uma crise caracterizada pela manifestação de sintomas respiratórios, dor torácica e abdominal, detecção de infiltrados à radiografia do tórax e exame torácico anormal. Acredita-se que a dor oriunda da imobilização de costelas ou embolismo gorduroso resulta em hipoventilação e consequente atelectasia. Esta, por sua vez, causa hipóxia e leva à oclusão de pequenos vasos no pulmão, além de uma possível trombose nas artérias pulmonares (Davies, 1997). A síndrome afeta 20 a 50% dos pacientes com anemia falciforme e está associada a uma taxa de mortalidade de 2 a 14%. Episódios repetidos podem progredir para doença pulmonar crônica (Wayne, 1993). A RCE é utilizada para remover as hemácias contendo hemoglobina S e foi associada à promoção de melhora marcante da condição dos pacientes (Wayne, 1993).

O priapismo é uma ereção dolorosa e continuada, que resulta da oclusão por hemácias falciformes de vasos localizados no corpo cavernoso. Está associado à desidratação e acidose. É tratado com suplementação de oxigênio, hidratação e analgésicos (Wayne, 1993). Quando prolongado (mais de 6 horas), é referido como priapismo fulminante e pode requerer intervenção cirúrgica ou RCE. Um percentual significativo desses pacientes apresentará impotência, caso não sejam tratados (Davies, 1997). Embora haja relatos de que a RCE é efetiva no tratamento do priapismo, existem riscos envolvidos. Foi relatada a ocorrência de uma síndrome de eventos neurológicos denominada síndrome ASPEN (associação de anemia falciforme, priapismo, transfusão de troca e eventos neurológicos) em alguns pacientes tratados com RCE. Esta síndrome envolve a manifestação de eventos neurológicos que variam desde uma dor de cabeça e atividade convulsiva à obtundação com necessidade de ventilação de suporte. Acredita-se que seja decorrente de uma diminuição do fluxo sanguíneo cerebral causada por uma elevação abrupta do hematócrito, bem como pela liberação de substâncias vasoativas a partir da detumescência peniana. O tratamento agressivo está associado a uma completa recuperação neurológica (Siegel, 1993). Pacientes que sofrem de priapismo e são submetidos à RCE devem ser monitorados quanto aos sintomas da síndrome ASPEN.

Os distúrbios e crises adicionais em pacientes com anemia falciforme, para os quais a RCE é indicada, são derrames, vaso-oclusão da artéria retiniana, insuficiência hepática e choque séptico. A RCE também tem sido utilizada para diminuir o percentual de hemoglobina S no início da terapia de transfusão simples crônica, visando a prevenir o afoiçamento por corante de contraste durante a realização de angiogramas cerebrais, e na preparação para cirurgias (Wayne, 1993). É importante notar que, conforme demonstrado por um estudo, a RCE não proporciona nenhum benefício se comparada ao regime de transfusão conservativo empregado para aumentar os níveis de hemoglobina para 10 g/dL na prevenção de complicações cirúrgicas (Vichinsky, 1995).

Segundo a ASFA, a anemia falciforme é uma indicação de categoria I para eritroférese. A malária e outras doenças parasitárias pertencem à categoria III (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Fotoférese

A fotoférese, também chamada de Fotoquimioterapia Extracorporal (FQE), é um tipo de leucaférese. Nesse procedimento, coleta-se um pequeno percentual dos leucócitos do paciente por hemaférese de fluxo intermitente. Essas células são, então, tratadas por incubação com um composto psoraleno e, em seguida, expostas à radiação ultravioleta A (UVA) no equipamento. Após a irradiação, as células são reinfundidas no paciente (Zic, 1999). Como resultado, parece ser produzido um efeito imunomodulador. Dependendo da doença a ser tratada, esse procedimento pode estimular ou suprimir a resposta imune. Atualmente, essa terapia é aprovada pelo FDA apenas para o tratamento de Linfomas de Células T Cutâneos (LCTC).

Indicações da fotoférese

Linfoma de células T cutâneo. A primeira doença tratada por fotoférese foi o LCTC. Trata-se de um linfoma de células T localizado na pele, que se caracteriza por uma longa fase pré-maligna (4–10 anos) com aparecimento de lesões cutâneas eczematosas. Após essa fase, a doença progride ao longo de uma série de fases caracterizadas pelo envolvimento crescente da pele até o desenvolvimento de uma fase tumoral. Esta, por sua vez, caracteriza-se pelo aparecimento de massas cutâneas. O LCTC, então, pode avançar para uma fase leucêmica conhecida como síndrome de Sézary, em que são encontradas células T malignas no sangue circulante. As sobrevidas medianas dependem do estágio da doença no momento do diagnóstico, sendo que as sobrevidas de 10 anos variam de 20 a 85%, respectivamente, para o estágio tumoral e a fase de placa inicial (Zic, 1999).

Em 1987, Edelson et al. relataram a ocorrência de resposta em 64% dos 37 pacientes com LCTC tratados por fotoférese. Subsequentemente, o uso da fotoférese no tratamento do LCTC foi aprovado pelo FDA em 1988 (Zic, 2003). A análise combinada de mais de 400 relatos de pacientes constantes na literatura permitiu constatar a existência de uma resposta global à fotoférese em 55,7% dos pacientes, sendo que 17,6% apresentaram respostas completas. As taxas de resposta variam de 64% para pacientes em estágio IB (manchas e placas generalizadas) a 27,3% para pacientes em estágio IVB (envolvimento visceral) (Zic, 2003). A Tabela 36.13 lista os fatores preditivos da reposta à fotoférese. O tempo mediano decorrido até a eliminação das lesões cutâneas nesses pacientes é 11 meses, sendo que os pacientes apresentando respos-

Tabela 36.12 Benefícios da troca de hemácias por aférese em comparação à transfusão simples ou crônica (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000)

Quantidade reduzida de hemoglobina S sem elevação do hematócrito e, portanto, da viscosidade
Uso de menos unidades de hemácias para conseguir o mesmo percentual de hemoglobina S
Menor contribuição para a sobrecarga de ferro em pacientes submetidos à transfusão crônica

American Society for Apheresis Clinical Applications Committee: Clinical applications of therapeutic apheresis, McLeod BC, Copyright © 2000 J Clin Apheresis 15:1–5. Reproduzido com permissão de Wiley-Liss, Inc., uma subsidiária da John Wiley & Sons, Inc.

Tabela 36.13 Características indicadoras dos melhores respondedores à fotoférese entre pacientes com LCTC (Zic, 2003)

Estágio de pele eritrodérmica
Contagem de CBSs < 15.000/mm^3
Doença de curta duração
Percentual normal de células CD8
Paciente imunocompetente
Ausência de linfonodos volumosos ou doença visceral
Presença de células Sézary na circulação

Tabela 36.14 Fatores associados ao desenvolvimento de doença do enxerto *versus* hospedeiro (Foss, 2002)

Idade avançada do doador
Idade avançada do receptor
Disparidade HLA
Doador sem parentesco
DEVH aguda anterior
Doador do sexo feminino aloimunizado

ta prematura (eliminação em 6–8 meses) mantiveram a resposta (Zic, 1999). A fotoférese também foi associada a um maior tempo de sobrevida, contado a partir do momento do diagnóstico (mais de 60 meses para pacientes tratados com fotoférese *versus* 31 meses para pacientes submetidos à quimioterapia) (Christensen, 1991).

No LCTC, o mecanismo de ação da fotoférese ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que a fotoférese induz uma resposta de células T CD8$^+$ voltada aos clones expandidos de células T patológicas junto ao paciente (Zic, 2003). É provável que essa resposta ocorra porque, após a exposição à radiação UVA, o 8-metoxipsoraleno (8-MOP) reage com constituintes celulares e liga-se de modo irreversível ao DNA, proteínas e lipídios. Essa ligação induz um aumento do número de moléculas HLA de classe I presentes nas células expostas, além da apoptose. Notavelmente, a apoptose ocorre nos linfócitos expostos, entre os quais as células T malignas, mas não afeta os monócitos. Estes, em decorrência da exposição a temperaturas suprafisiológicas e ao contato com as paredes da tubulação durante a coleta e fotoativação, se diferenciam em Células Dendríticas (CDs) imaturas. As CDs, então, são capazes de fagocitar as células T malignas apoptóticas e, em seguida, apresentar antígenos tumorais dessas células no contexto das moléculas de HLA de classe I. Mediante a reinfusão do produto de leucaférese exposto à radiação UVA, essas células apresentadoras de antígeno ativam as células T citotóxicas, resultando em uma resposta imune dirigida aos clones de células T anormais (Zic, 2003). Essa resposta está associada a uma mudança no perfil de citocinas produzidas pelo paciente, de resposta Th2 para resposta Th1 (Zic, 2003). Os efeitos benéficos do procedimento não resultam de uma citotoxicidade direta do 8-MOP e da radiação UVA sobre as células T anormais ou as células tumorais, uma vez que apenas 10 a 15% do grupo de linfócitos é coletado e menos de 5% das células de LCTC são tratadas (Christensen, 1991).

Segundo a ASFA, o LCTC é uma indicação de categoria I para fotoférese (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Doença do enxerto *versus* hospedeiro e rejeição de órgão sólido. A DEVH crônica ocorre em 27 a 50% dos casos de transplante entre irmãos compatíveis, e 42 a 72% dos transplantes de células-tronco periféricas ou de medula óssea envolvendo indivíduos sem parentesco (Foss, 2002). Os fatores associados à DEVH crônica são descritos na Tabela 36.14.

Inúmeros estudos relataram o uso da fotoférese na DEVH crônica (Foss, 2002). Em tais estudos, pacientes com a doença, irresponsivos a outras terapias, apresentaram melhora das lesões cutâneas, orais e viscerais (hepáticas). Esse efeito foi associado à normalização da proporção CD4/CD8 e à diminuição do número de células NK. O tratamento permitiu afunilar as doses de esteroides e manteve as respostas, em média, por 12 meses. Não houve aumento das taxas de infecção ou ativação de CMV nos pacientes estudados (Foss, 2002). Os pacientes mais propensos a responder foram aqueles que iniciaram a terapia em 10 meses após o transplante.

Assim como no LCTC, o mecanismo por trás da fotoférese na DEVH crônica permanece obscuro. É notável que a terapia associada à ativação imune em uma doença esteja associada à supressão imune em outra. Nos pacientes com DEVH crônica, a fotoférese está associada à diminuição do reconhecimento e processamento antigênico pela CD, bem como à redução do números de CDs. Em consequência, há diminuição da estimulação de CD8 e mudança da resposta Th1 para Th2 por meio da anulação da inibição da secreção de citocinas Th2 (Foss, 2002). O resultado é a redução da alorreatividade das células T.

Como na DEVH crônica, a rejeição de órgãos sólidos também constitui um distúrbio de células T alorreativas. Similarmente, a fotoférese tem sido empregada no tratamento da rejeição de transplantes de coração, pulmão, rim e fígado. No transplante cardíaco, foi demonstrado que o uso da fotoférese promoveu uma reversão histológica de 89% dos episódios de rejeição e sem causar efeitos colaterais. Taxas semelhantes também foram descritas para outros tipos de transplante (Dall'Amico, 2002).

A DEVH não foi classificada pela ASFA quanto à indicação para fotoférese (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000). A rejeição de órgãos sólidos, por outro lado, foi classificada como indicação de categoria III para fotoférese (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Outras doenças. A Tabela 36.15 lista certas doenças que também são tratadas com fotoférese. Essas doenças seguem uma linha comum de alo- ou autorreatividade de células T.

Procedimento de fotoférese

O procedimento de fotoférese é realizado com auxílio do UVAR XTS (Therakos Inc., Exton, PA). Após a venipuntura, 125 mL ou 225 mL de sangue total são coletados em uma cuba de centrífuga Latham, onde os componentes são separados. Como anticoagulantes, podem ser utilizados heparina ou ácido-citrato-dextrose (ACD). O creme leucocitário fica retido na bolsa de coleta e os demais componentes sanguíneos são devolvidos ao paciente. Como se trata de uma centrífuga intermitente, são realizados seis ciclos com 125 mL ou três ciclos com 225 mL de coleta de sangue total para coletar 270 mL de suspensão de CMNs. Esta, por sua vez, consiste em 80 mL de plasma, 90 mL de salina e 100 mL de CMNs. Terminada a coleta, adiciona-se 8-MOP à bolsa. A suspensão de CMNs, então, é bombeada através de uma câmara de fotoativação. Essa câmara é constituída de placas acrílicas transparentes entre as quais há um canal tortuoso. Adjacente às placas, há uma fonte de luz UVA que irradia o creme leucocitário contendo 8-MOP. A suspensão de CMNs é fotoativada durante 30 minutos. Após o término da fotoativação, o creme leucocitário é reinfundido. O tempo total necessário para realizar o tratamento é de cerca de 3 horas (Zic, 2003). Um curso de fotoférese típico consiste na realização de dois tratamentos em dias consecutivos, a cada 4 semanas (Christensen, 1991). Após

Tabela 36.15 Doenças em que a fotoférese é comprovadamente efetiva (van Iperen, 1997; Zic, 1999)

Malignidades	Linfoma de células T cutâneo (LCTC)
Doença do enxerto *vs* hospedeiro	DEVH mucocutânea
	DEVH hepática
Rejeição de órgãos	Coração
	Rim
	Pulmão
Doenças autoimunes	Lúpus eritematoso sistêmico
	Artrite reumatoide
	Dermatomiosite juvenil
	Pênfigo vulgar
	Epidermólise bolhosa adquirida
Doenças infecciosas	Artrite de Lyme crônica
	Complexo relacionado à AIDS (ARC)
Outras doenças	Dermatite atópica severa
	Psoríase

a melhora dos sintomas da doença, o intervalo entre os procedimentos pode ser prolongado e o paciente pode ser desmamado da fotoférese.

Um aspecto importante desse procedimento é a nítida separação do sangue total em plasma e creme leucocitário. O produto deve permitir a transmissão da luz UVA para que ocorra a fotoativação do 8-MOP. A presença de um número significativo de hemácias no produto de leucaférese fará com que a irradiação UVA seja refletida ou absorvida, resultando na falha da fotoativação do produto. Sendo assim, é crítico que o hematócrito do produto de leucaférese seja inferior a 7% (Zic, 1999). Similarmente, também é importante que não haja excesso de plasma, pois este pode diluir o conteúdo de leucócitos e resultar em menor número de passagens de cada célula pela câmara de fotoativação (Zic, 1999).

Pacientes submetidos à fotoférese são sensíveis à luz solar (Knobler, 1993). Por esse motivo, devem evitar a exposição direta ou indireta à luz do sol por um período de 24 horas após a finalização do procedimento. Isso é feito cobrindo a pele exposta, aplicando protetor solar e usando óculos de sol que bloqueie os raios UV e tenha proteção lateral. Outra possível complicação da fotoférese pode ser a mutagênese consequente à indução de danos ao DNA pela fotoativação do 8-MOP. Teoricamente, esse efeito da fotoativação pode levar à reinfusão de células com DNA danificado capazes de se multiplicar. Essas células, então, podem originar malignidades hematológicas. Embora não haja evidências sustentando essa preocupação, tal procedimento ainda é considerado teoricamente arriscado (van Iperen, 1997).

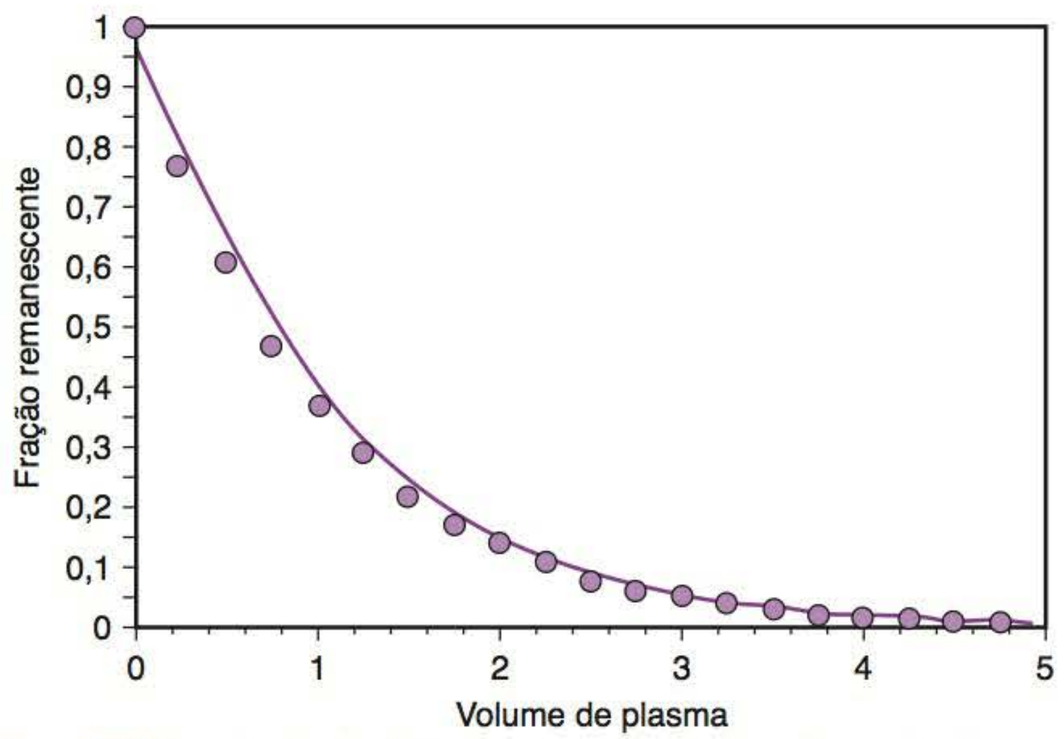


Figura 36.2 Remoção de substâncias durante a troca de plasma. A remoção de substâncias limitada ao compartimento intravascular, seja patológica ou normal, pode ser prevista com auxílio de uma equação exponencial (equação 36.7). Um percentual fixo das substâncias remanescentes é removido com cada volume de sangue. Isso significa que, conforme aumenta o número de volumes de sangue processados, uma quantidade progressivamente menor da substância passa a ser removida. Como resultado, os retornos diminuem.

Plasmaférese terapêutica

Eficácia da remoção

A meta da plasmaférese terapêutica – mais conhecida como troca de plasma – consiste em remover uma substância patológica presente no plasma pela remoção do plasma do paciente seguida de sua reposição por um líquido de substituição. A remoção é inespecífica e envolve todas as substâncias presentes no plasma, incluindo os componentes normais. É possível predizer a remoção de uma substância pela aplicação da equação 36.7, conforme mostra a Figura 36.2 (Derksen, 1984b):

$$Y/Y_o = e^{-x} \qquad (36.7)$$

Em que, Y = concentração final da substância; Y_o = concentração inicial da substância; x = número total de trocas do volume do paciente.

Esse modelo considera que o compartimento intravascular é fechado e que não há troca entre os compartimentos intra- e extravascular. Com base nessa equação, 30% da quantidade inicial de uma substância permanece no plasma do paciente após a troca de um volume plasmático, enquanto apenas 10% permanece após a troca de dois volumes de plasma. Conforme mais volumes de plasma vão sendo trocados, uma porção fixa da substância remanescente é removida, de modo que quantidades cada vez menores vão sendo eliminadas. A observação da Figura 36.2 permite constatar que há um declínio do benefício marginal da remoção de volumes adicionais de plasma após a troca de 1,5 a 2 volumes de plasma. Desse modo, os procedimentos de troca de plasma que apresentam maior ação terapêutica limitam-se de 1 a 1,5 troca de plasma.

O pressuposto de que não ocorrem trocas entre os compartimentos intra- e extravascular durante o procedimento não é válido para todas as substâncias. Em consequência, a quantidade removida e a concentração do plasma verificadas ao final do procedimento talvez não correspondam aos valores previstos. Exemplificando, a IgM localiza-se, predominantemente, junto ao espaço intravascular (76%), apresentando um influxo negligível para o espaço extravascular (Derksen, 1984b). Como resultado, durante o procedimento de plasmaférese, a equação preverá corretamente a remoção de IgM. A IgA, contudo, está uniformemente distribuída pelos espaços intra- e extravascular e se move entre ambos os compartimentos. Durante a troca de plasma, diante da falha em concentrar a IgA no espaço intravascular, a IgA presente no espaço extravascular segue o gradiente de concentração e se move para dentro do espaço intravascular. Como resultado, após o término do procedimento, a concentração plasmática de IgA não é tão baixa quanto o previsto e poderia levar a crer que o procedimento não apresentou a eficácia esperada (Derksen, 1984b). Quando se considera a quantidade de substância removida pela quantificação total de IgA na bolsa de coleta, é possível constatar que o conteúdo total de IgA removido foi maior que o previsto e, portanto, o procedimento foi mais eficiente que o esperado. A IgA foi removida de ambos os compartimentos, intra- e extravascular (Derksen, 1984b).

Foram identificados quatro padrões de remoção na troca de plasma utilizando solução de albumina a 5% como líquido de reposição. No primeiro padrão, observado com o fibrinogênio e a molécula C3, a concentração sofre uma maior redução do que o esperado. Isso provavelmente se deve à combinação da remoção ao consumo desses fatores durante o procedimento de hemaférese. No segundo padrão, como ocorre com a IgM, o colesterol e a ALP, a alteração na concentração da substância corresponde ao previsto. Essas substâncias ficam confinadas ao espaço intravascular ou movem-se pouco entre os compartimentos. No terceiro padrão, observado com a LD e CPK, a concentração é inferior à esperada em decorrência da movimentação das substâncias entre os compartimentos. Por fim, no quarto padrão, as concentrações são bem maiores que o previsto ou não mudam, e são decorrentes do rápido equilíbrio. Este padrão é observado para moléculas inorgânicas e orgânicas, como potássio, bicarbonato e glicose (Orlin, 1980).

No caso das imunoglobulinas, o padrão de remoção durante a troca de plasma depende de a substância em questão ser uma imunoglobulina normal ou uma paraproteína. Foi relatado que a remoção da IgG normal é previsível pela aplicação da equação 36.7, em razão de seu comportamento, como se fosse totalmente intravascular (Chopek, 1980; Orlin, 1980). Entretanto, existem outros relatos que descrevem um comportamento semelhante ao de uma substância em equilíbrio entre ambos os compartimentos (Derksen, 1984b). No caso das paraproteínas, a remoção das imunoglobulinas pode parecer corresponder à metade da concentração esperada, quando se considera a concentração plasmática (Chopek, 1980). Essa diferença é atribuída à expansão do volume plasmático decorrente da presença da paraproteína (Chopek, 1980). Em outras palavras, o volume de plasma do paciente é maior que o previsto nas equações-padrão (p. ex., equação 36.3), de modo que ao utilizá-las para calcular 1,5 troca de volume de plasma, o volume realmente trocado será menor.

Além do efeito sobre a remoção da substância a partir do plasma, a distribuição e a capacidade de movimentação entre os compartimentos intra- e extravascular também influenciam a elevação dos níveis plasmáticos da substância após a troca de plasma. Há um rápido aumento da concentração de substâncias que se difundem rapidamente e possuem um grande componente extravascular. O aumento da concentração das substâncias predominantemente intravasculares dependerá da taxa de síntese da substância. A maioria das substâncias retorna aos níveis normais em 48 a 72 horas, exceto fibrinogênio, complemento

e imunoglobulinas, cujas taxas de recuperação em 48 horas foram de 65, 65 e 44% dos valores basais, respectivamente. O colesterol também apresenta recuperação lenta, com 67 a 72% dos valores de pré-aférese alcançados em uma semana após a hemaférese (Orlin, 1980).

Para a maioria das substâncias removidas por troca de plasma, a taxa de síntese não aumenta após o procedimento (Derksen, 1984a). Para algumas substâncias, especialmente as imunoglobulinas, pode haver rebote. O rebote é o aumento da concentração a níveis superiores ao inicial, que ocorre após a realização de um procedimento (Dau, 1995; Derksen, 1984a). Pode resultar da remoção de substâncias inibitórias por meio do procedimento ou da remoção da retroalimentação negativa na célula responsável. Em consequência, é sugerido realizar o tratamento concomitante com agentes citotóxicos durante a execução do procedimento, a fim de evitar o rebote (Dau, 1995). Além disso, a troca de plasma pode aumentar a eficácia dos agentes citotóxicos ao aumentar a atividade metabólica de células imunológicas autorreativas, tornado-as mais sensíveis a tais agentes (Dau, 1995). Outro ponto relacionado a esse aspecto é que a queda dos níveis de substância patológica promovida pela troca de plasma será apenas temporária, a menos que uma terapia adicional seja instituída para cessar sua produção. Na maioria dos casos, isso significa que a troca de plasma deve ser vista como um procedimento complementar a outras terapias.

Líquidos de reposição

Na plasmaférese terapêutica, 1 a 1,5 volume de plasma são removidos e, portanto, esse volume deve ser reposto com outro líquido. Existem inúmeros líquidos de reposição disponíveis, cada um com suas vantagens e desvantagens. Entre os líquidos de reposição utilizados na troca de plasma estão a solução de albumina a 5%, PFC, plasma sobrenadante de crio (plasma pobre em crio), salina e HEA.

A solução de albumina a 5% é mais amplamente utilizada como líquido de reposição. Trata-se de um líquido hiperoncótico para a maioria dos pacientes e que, portanto, resulta na produção de um fluxo de líquidos final a partir do espaço extravascular. Esse efeito pode resultar em uma anemia branda por diluição (Chopek, 1980). A principal vantagem da solução de albumina a 5% é não transmitir doenças virais. Por outro lado, as desvantagens são o custo elevado e a ocasional falta de disponibilidade, devido aos *recalls* ordenados pelo FDA. Há relatos de ocorrência de reações hipotensivas, em virtude da ativação de pré-calicreína (Alving, 1978), e de reações febris causadas por pirógenos (Pool, 1995). Esses dois tipos de reação ocorrem raramente. Além disso, a albumina pode não funcionar de modo comparável à albumina presente no plasma antes da troca. Embora a solução de albumina a 5% forneça concentrações fisiológicas da proteína, os sítios de ligação a fármacos e metabólitos da albumina encontram-se ocupados por substâncias presentes na preparação, como caprilato de sódio, e podem estar indisponíveis para a realização das funções fisiológicas normais (Koch-Weser, 1976). A prática-padrão consiste em usar a solução de albumina a 5% para repor 60 a 70% do volume removido. O restante do volume é reposto com cristaloide (salina normal).

O PFC é empregado como líquido de reposição primária no tratamento da púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) (ver a discussão sobre essa doença) e também pode ser utilizado para prevenir a coagulopatia por diluição observada após repetidas trocas de plasma. O PFC pode, ainda, ser utilizado no tratamento da deficiência severa do fator XI em paciente que, sabidamente, apresenta sangramento decorrente desse distúrbio e necessita ser submetido a um procedimento cirúrgico. Como não existem concentrados de fator XI disponíveis e a quantidade de PFC necessária à infusão para alcançar níveis terapêuticos causaria sobrecarga volumétrica, a troca com PFC imediatamente antes do procedimento cirúrgico pode proporcionar hemostasia. As vantagens do PFC são o custo relativamente baixo e o fornecimento de concentrações fisiológicas de fatores de coagulação. As desvantagens são risco de transmissão de doenças virais transmissíveis por transfusão, ocorrência de reações transfusionais, necessidade de o produto ter compatibilidade ABO e maior frequência de reações ao citrato (ver a discussão ao final do capítulo). Esta última desvantagem advém do fato de o paciente ser infundido não só com anticoagulante citrato, mas também com PFC contendo citrato. Quando utilizado no tratamento da TTP, o PFC corresponde a 60 a 70% do volume reposto, enquanto o volume restante é resposto com salina normal. Na prevenção de coagulopatias, 2 unidades de PFC são administradas ao final do procedimento, sendo que a maior parte da reposição volumétrica é feita com solução de albumina a 5%.

O plasma pobre em crio também é utilizado no tratamento da TTP, especificamente em casos de pacientes irresponsivos à troca de plasma com PFC. As vantagens e desvantagens proporcionadas pelo uso do plasma pobre em crio são as mesmas do uso de PFC, exceto que o plasma pobre em crio não fornece concentrações fisiológicas de todos os fatores de coagulação, faltando fibrinogênio e fator VIII.

A salina é utilizada em uma parcela da maioria dos procedimentos de troca de plasma (30–40%), bem como no condicionamento de aparelhos e no preparo da solução anticoagulante. O uso da salina para volumes maiores é problemático, pois trata-se de um cristaloide (em vez de coloide) e pode ser redistribuída para o espaço extravascular causando hipotensão e edema após a realização do procedimento. As vantagens do uso da salina são o baixo custo e a ausência de risco de transmissão de doenças.

A opção final é o uso de líquidos coloidais sintéticos, como HEA. O HEA é derivado de amidos vegetais e constituído por grandes moléculas de amido que podem ser adicionadas à salina para produzir uma solução coloidal. Foram descritas trocas de plasma utilizando HEA como líquido de reposição (Burgstaler, 1990; Rock, 1997). Os benefícios do uso do HEA residem no baixo custo e na ausência de transmissão de doenças. Uma desvantagem é que um pequeno percentual dos indivíduos tratados apresenta reações alérgicas ao HEA (ver a discussão ao final deste capítulo). Do mesmo modo, o hetamido (HEA de alto peso molecular) tem meia-vida de 25,5 horas e, assim, quantidades significativas do composto podem persistir após a realização frequente de procedimentos de troca de plasma. Como resultado, há expansão volumétrica e alterações do PTT, conteúdo de proteína total, albumina, hematócrito e fibrinogênio (Rock, 1997). Tais alterações são menos comuns quando se usa pentamilo (HEA de baixo peso molecular), pois apresenta meia-vida curta. O HEA também foi associado a alterações envolvendo a hemostasia (Rock, 1997), contudo serve de solução de reposição alternativa para pacientes que sabidamente apresentam reações à albumina ou ao PFC (Burgstaler, 1990). Também pode ser usado quando houver necessidade de troca de plasma, contudo existem certas crenças religiosas que impedem o uso de líquidos de reposição derivados do sangue.

Aspectos associados ao paciente

A troca de plasma é um método não seletivo de remoção de substâncias do plasma e, como resultado, muitas das questões relacionadas aos pacientes submetidos a esse procedimento envolvem a remoção de substâncias não desejadas, tais como fármacos terapêuticos e fatores de coagulação. Embora a plasmaférese seja uma modalidade de tratamento para diversas doenças há 30 anos, existe pouca informação disponível acerca de seus efeitos sobre fármacos terapêuticos. Teoricamente, fármacos altamente associados a proteínas ou lipídeos devem ser removidos de maneira eficiente pela plasmaférese. Conforme já discutido, o volume de distribuição também influencia a remoção do fármaco. Por exemplo, um fármaco que se liga intensamente a proteínas e limita-se, em grande parte, ao compartimento intravascular deve ser removido de forma eficaz. Já um fármaco que se liga intensamente a proteínas e é distribuído por todo o corpo não será removido de maneira efetiva, assim como um fármaco de associação fraca.

O efeito da plasmaférese sobre a concentração de fármacos pode ser determinado calculando-se a meia-vida do fármaco durante a troca de plasma (Sketris, 1986). Esses cálculos, então, podem ser utilizados para determinar a dose adicional possivelmente necessária após a troca de plasma. Não se trata de um procedimento usualmente empregado para a maioria das medicações. O efeito da troca de plasma sobre diversos medicamentos é mostrado na Tabela 36.16. De um ponto de vista prático, uma vez que a troca de plasma pode remover parte de uma dose de fármaco, medicamentos administrados uma vez ao dia devem ser suspendidos até a finalização do procedimento, quando possível. Fármacos administrados com maior frequência também devem ser programados de modo a não serem aplicados diretamente antes da plasmaférese.

Outra possível forma de interação da plasmaférese com os fármacos terapêuticos é pela remoção das enzimas necessárias ao metabolismo

Tabela 36.16 Efeito da troca de plasma sobre a medicação conforme relatos da literatura (Balogun, 2001; Hale, 2000; Hausfater, 2002; Kale-Pradhan, 1997; Mansur, 1995; McClellan, 1997; Przepiorka, 1994)

Medicações que dispensam suplementação da dose devido à insignificante remoção, redistribuição a partir dos estoques teciduais ou ligação de fármacos a hemácias
Digoxina
Digitoxina
Prednisona
Prednisolona
Ciclosporina
Tacrolimus
Propranolol
Ácido valproico
Fenobarbital
Ceftriaxona
Ceftazidima
Vancomicina
Medicações que podem requerer suplementação da dose
Fenitoína*
Tobramicina
Interferon-α

* É necessário monitorar a fenitoína para determinar a quantidade de suplementação, uma vez que concentrações totais levarão à superestimação (Kale-Pradhan, 1997). Mansur et al. (1995) observaram um rebote nos níveis plasmáticos de fenitoína 30 minutos após a troca de plasma, com retorno aos níveis de pré-aférese em 120 minutos. Em consequência, foi possível detectar sinais e sintomas de toxicidade por fenitoína apesar da redução dos níveis totais de fenitoína no corpo.

e de proteínas transportadoras. A pseudocolinesterase plasmática é removida durante a plasmaférese e, em consequência, agentes bloqueadores neuromusculares (p. ex., succinilcolina ou mivacurium) podem exercer efeito prolongado em pacientes recém-submetidos à troca de plasma (Naik, 2002; Wood, 1978). Tais agentes devem ser evitados imediatamente após a troca de plasma.

Depois da troca de plasma utilizando solução de albumina a 5% como líquido de reposição, foram observadas reduções dos níveis e atividade dos fatores de coagulação (Flaum, 1979; Orlin, 1980), bem como resultados anormais de testes de coagulação (Flaum, 1979). Flaum et al. (1979) demonstraram redução significativa dos níveis de fatores V, VII, VIII, IX, X e da atividade do fator de von Willebrand (vWF) subsequentemente à troca de plasma. Os valores normais foram retomados em 24 horas após o procedimento, exceto para os fatores VIII, IX e atividade de vWF, que foram normalizados depois de 4 horas (Flaum, 1979). Orlin e Berkman (1980) notaram uma queda dos níveis de fibrinogênio para 25% dos valores pré-aférese. Os níveis de fibrinogênio atingiram 66% dos níveis pré-aférese em 72 horas (Orlin, 1980). Tais estudos indicam que há risco de sangramento em pacientes submetidos ao desafio hemostático após a plasmaférese. Isso é particularmente válido para pacientes submetidos a procedimentos seriados em dias consecutivos, em que pode não haver tempo suficiente para recuperação dos níveis hemostáticos. Pacientes expostos ao risco, como aqueles submetidos ou que serão submetidos a procedimentos cirúrgicos ou biópsias próximo da data agendada para a troca de plasma, podem necessitar de PFC como parte do líquido de reposição. Este deve ser administrado ao final do procedimento, a fim de prevenir sua remoção.

Além do risco aumentado de sangramento, há também um possível risco de trombose. Em decorrência da natureza inespecífica da remoção, agentes inibidores da coagulação (p. ex., antitrombina) também são removidos durante a troca de plasma (Chirnside, 1981; Volkin, 1982). Isso, teoricamente, pode levar à trombose.

Por fim, as plaquetas são igualmente perdidas durante a troca de plasma terapêutica (Perdue, 2001). Em um estudo envolvendo 71 pacientes submetidos à troca de plasma terapêutica com COBE Spectra, Fresenius AS104 (Fresenius HemoCare, Redmond, WA) ou Haemonetics LN9000 (Haemonetics, Braintree, MA), foram detectadas perdas de plaquetas da ordem de 0 a 71% (Perdue, 2001). Entre os fatores influenciadores da perda observada, estão o equipamento utilizado (com o uso do Fresenius AS104 associado a perdas de 18,6%, *versus* 2,6% e 1,6%, respectivamente, com o uso do Haemonetics LN9000 e do COBE Spectra) e o tipo de doença da qual o paciente está sendo tratado. Entre os pacientes participantes desse estudo, aqueles que apresentaram as maiores perdas manifestaram síndrome de hiperviscosidade decorrente de disproteinemias (Perdue, 2001). Entretanto nenhuma complicação envolvendo sangramento foi detectada (Perdue, 2001). As maiores perdas associadas ao uso do Fresenius AS104, em comparação ao COBE Spectra, foram atribuídas às diferenças de força *g* e tempo de permanência existentes entre os dois aparelhos (Burgstaler, 2001).

Procedimentos para remoção seletiva de componentes do plasma

Como discutido anteriormente, a plasmaférese não é seletiva. Cada troca de plasma remove cerca de 150 g de proteínas plasmáticas (110 g de albumina e 40 g de globulina) (Lysaght, 1985; Randerson, 1982) para eliminar 1 a 2 g de substância patológica (Randerson, 1982). Com a realização de repetidas trocas de plasma, isso pode provocar sangramento decorrente da perda de fatores de coagulação, bem como imunodeficiência por perda de imunoglobulinas. Caso outros líquidos de reposição sejam utilizados, o paciente pode estar sujeito a riscos adicionais, como transmissão de doenças e reações alérgicas. Por causa dessas desvantagens, inúmeros procedimentos foram desenvolvidos para obtenção da remoção seletiva de determinado componente plasmático, possibilitando devolver ao paciente seu plasma "limpo". Esses procedimentos proporcionam a vantagem de evitar a remoção de componentes plasmáticos normais e a necessidade de administrar líquidos de reposição. O ponto desfavorável é o custo mais alto da execução, comparado ao custo da troca de plasma, pois as colunas de remoção seletiva são caras.

Os procedimentos de remoção seletiva envolvem, mais comumente, uma etapa de separação inicial, em que os elementos celulares do sangue total são isolados do plasma. Em seguida, o plasma é perfundido com auxílio de um aparelho de remoção seletiva em que a substância de interesse é removida por meio de processos químicos, físicos ou imunológicos. O plasma tratado é, então, recombinado aos componentes celulares e reinfundido. O dispositivo de remoção seletiva pode ser regenerado, sendo que a substância é eliminada e desviada para uma bolsa de coleta de descarte. Após essa etapa, o dispositivo de remoção seletiva é utilizado para tratar mais plasma. Se esse dispositivo não puder ser regenerado, deve ser descartado. Nas próximas seções são discutidos alguns exemplos de procedimentos de remoção seletiva.

Colunas com proteína estafilocócica A

A proteína estafilocócica A é um componente da parede bacteriana capaz de ligar-se à molécula de IgG por meio do receptor de Fc. Além disso, a proteína também pode ligar-se a um domínio Fab codificado pela família de genes *clan III* da cadeia pesada variável (VH) (Matic, 2001). Liga-se fortemente à IgG1, IgG2 e IgG4, porém apresenta graus variáveis de ligação à IgG3, IgM e IgA. Existem dois tipos disponíveis de colunas de proteína estafilocócica A: a coluna de proteína estafilocócica A-agarose (PAA, *Protein A-agarose*) (Immunosorba, Fresenius HemoCare, Redmond, WA) e a coluna de proteína estafilocócica A-sílica (PAS, *Protein A-silica*) (Presorba, Fresenius HemoCare, Redmond, WA). Para ambas as colunas, o plasma do paciente é separado dos elementos celulares com auxílio de outro aparelho, como uma centrífuga ou aparelho de filtração de aférese. Em seguida, o plasma é perfundido através das colunas.

A coluna de PAS, uma vez saturada, não pode ser regenerada, e é descartada. Isso limita a quantidade de plasma passível de tratamento a 2 L (Matic, 2001). A coluna de PAA, ao contrário, pode ser perfundida com tampão eluente de pH 2,2 para remoção das imunoglobulinas ligadas. O tampão eluente é, então, esguichado a partir da coluna com um tampão de pH 7. Após essa etapa, a coluna pode ser utilizada para tratar mais plasma. A coluna de PAA é empregada em um sistema de duas colunas. A primeira coluna é perfundida com plasma até se tornar saturada. Em seguida, o fluxo de plasma é direcionado para a segunda coluna, enquanto a outra é regenerada. Esse sistema permite

tratar um volume de plasma ilimitado, contudo requer o uso de um sistema de monitoramento à parte (Citem 10, Fresenius HemoCare, Redmond, WA) para garantir a regeneração das colunas e prevenir o retorno do tampão eluente ao paciente. As colunas PAA são reutilizáveis por até 20 sessões de tratamento (Matic, 2001).

Considera-se que o mecanismo de ação da coluna de PAA se deve à ligação e consequente remoção das imunoglobulinas (Matic, 2001). O mecanismo de ação da coluna de PAS é mais complexo. Além de remover imunoglobulinas livres, a coluna de PAS também remove imunocomplexos circulantes. A quantidade total de imunoglobulinas e imunocomplexos removidos, no entanto, pode ser bastante pequena e não justifica a eficácia do procedimento. Parece que, opostamente à simples remoção de substâncias, o tratamento em coluna de PAS promove uma imunomodulação que permite ao sistema imune responder ao distúrbio subjacente. Acredita-se que essa ação seja mediada por alguns possíveis mecanismos. Primeiramente, a presença de pequenos imunocomplexos é considerada indutora de imunossupressão, uma vez que tais complexos não podem ser removidos pelo Sistema Reticuloendotelial (SRE) e resultam em excesso de antígenos frente à quantidade de anticorpos disponíveis. A remoção desses antígenos reduz o excesso antígeno-anticorpo e elimina a imunossupressão. Em segundo lugar, quando a IgG liga-se à proteína estafilocócica A, ocorre fixação de complemento. A geração de fragmentos de complemento na coluna que é, então, infundida no paciente pode ativar o sistema imune. Em terceiro lugar, a proteína estafilocócica A é mitógena para células T e B. A proteína eluída da coluna durante o tratamento pode resultar na proliferação de células T e B. Por fim, acredita-se que no corpo humano os autoanticorpos sejam controlados por anticorpos anti-idiótipos. Estes são anticorpos que se ligam à porção Fab do autoanticorpo. Demonstrou-se que o tratamento na coluna de PAS resulta em aumento da concentração de anticorpos anti-idiótipos. Esse efeito pode ser consequente a alterações da conformação do autoanticorpo e do tamanho do imunocomplexo, que aumentam a antigenicidade desses anticorpos (Levy, 2003).

A coluna de PAA conta com a aprovação do FDA, sob isenção humanitária do dispositivo, para o tratamento de inibidores dos fatores VIII e IX. A coluna de PAS foi aprovada pelo FDA para o tratamento da Púrpura Trombocitopênica Idiopática (ITP) refratária à terapia-padrão e da artrite reumatoide (Matic, 2001). Outras doenças tratadas com colunas de PAA e PAS estão listadas na Tabela 36.17. A ITP e a artrite reumatoide são consideradas indicações de categoria II para imunoadsorção, de acordo com a ASFA. A hemofilia com inibidores não recebeu classificação da ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

O uso de colunas de proteína estafilocócica A foi associado à ocorrência de inúmeros efeitos colaterais. Os tipos e graus de severidade dos efeitos colaterais variam de acordo com a coluna utilizada. Os efeitos adversos associados ao uso da coluna de PAA são dor musculoesquelética, náusea, vômitos e hipotensão. Tais efeitos são observados em 26 a 30% dos procedimentos (Huestis, 1996). Os efeitos colaterais associados ao uso da coluna de PAS são febre e calafrios, náusea, vômitos, dor, hipotensão, dispneia, reações alérgicas, dor de cabeça, hipertensão e taquicardia. Houve relatos de ocorrência de reações em 34% dos procedimentos (Huestis, 1996). Acredita-se que essas reações resultem de numerosos mecanismos. Como já descrito, a ligação de IgG à proteína estafilocócica A resulta na fixação de complemento e uma grande parte dessas reações pode ser explicada pela infusão de fragmentos de complemento ativados, como o C5a. Outras causas possíveis poderiam ser a contaminação da coluna e subsequente infusão de endotoxina, bem como lixiviação da proteína estafilocócica A (Huestis, 1996). A maioria das reações é branda e inicia-se em uma hora após tratamento, durando 1 a 2 horas. Reações severas, inclusive resultando na morte do paciente, são mais comumente relatadas com o uso da coluna de PAS que com o tratamento na coluna de PAA. Os quatro padrões de reações severas associados à coluna de PAS são anafilaxia, vasculite, trombose de veia calibrosa e exacerbação da doença subjacente (Huestis, 1996).

Tabela 36.17 Doenças comprovadamente tratáveis com colunas de proteína estafilocócica A (Levy, 2003; Matic, 2001)

Artrite reumatoide
Púrpura trombocitopênica imune (ITP)
ITP associado ao HIV
Inibidores de fatores VIII e IX aloimunes e autoimunes
Doença do anticorpo antimembrana basal (síndrome de Goodpasture)
Granulomatose de Wegener
Glomerulosclerose segmentar focal
Púrpura trombocitopênica trombótica induzida por quimioterapia (TTPc)
TTP refratária
Lúpus eritematoso sistêmico
Miastenia grave
Polineuropatia desmielinizante aguda (síndrome de Guillain-Barré)
Aloimunização plaquetária
Malignidades sólidas

Tabela 36.18 Indicações de uso para aférese de LDL

Homozigotos hipercolesterolêmicos funcionais como LDL colesterol > 500 mg/dL
Heterozigotos hipercolesterolêmicos funcionais como LDL colesterol ≥ 300 mg/dL*
Heterozigotos hipercolesterolêmicos funcionais como LDL colesterol ≥ 200 mg/dL e doença arterial coronariana documentada*

* Antes de iniciar a terapia, é preciso tentar uma triagem de 6 meses de terapia farmacológica máxima e uma dieta de etapa II da American Heart Association.

Remoção seletiva de lipoproteínas de baixa densidade

A troca de plasma ou remoção seletiva de LDL – também chamada de aférese de LDL – é indicada para o tratamento da hipercolesterolemia familiar em indivíduos homozigotos, bem como em heterozigotos irresponsivos à terapia farmacológica (Thompson, 1995). Este distúrbio resulta em um acelerado processo aterosclerótico em decorrência da incapacidade do fígado de eliminar o LDL colesterol existente no sangue. Foram publicados critérios para seleção de pacientes a serem submetidos a qualquer uma das alternativas de tratamento (Gordon, 1994). A Tabela 36.18 fornece os critérios para o tratamento de pacientes por meio da aférese de LDL. Existem relatos de comparações da expectativa de vida entre pacientes tratados por meio dessas técnicas e respectivos irmãos não tratados (Thompson, 1985), bem como estudos em série (Kamanabroo, 1988) e relatos de caso (Leren, 1993). Os benefícios observados foram reduções significativas dos níveis de colesterol, melhora dos xantomas, desaparecimento de anormalidades ao ECG, regressão de lesões na artéria coronariana, melhora da tolerância ao exercício e prolongamento da expectativa de vida (Kamanabroo, 1988; Leren, 1993; Matsuzaki, 2002; Thompson, 1985). Existem inúmeros métodos disponíveis para a remoção seletiva da LDL.

O primeiro método é a plasmaférese secundária ou de dupla filtração. A LDL é um dos maiores componentes plasmáticos e, como tal, possibilita construir filtros para sua remoção. Na filtração secundária, o plasma é separado do sangue total tanto por centrifugação, filtração ou uma combinação de ambas. Em seguida, o plasma é passado por um segundo filtro cujos poros são pequenos demais para permitir a passagem da LDL. O filtrado de plasma resultante contém 83% da albumina, 68% da IgG e 47% do HDL colesterol contidos no plasma original. No entanto, o filtro retém 94% do LDL colesterol, 92% da IgM e 90% do fibrinogênio. Constatou-se que, em comparação à troca de plasma, a filtração secundária produz uma redução similar do conteúdo de LDL colesterol, porém resulta em perda menor de HDL colesterol (Leitman, 1989).

Um segundo método de aférese de LDL é a precipitação de lipoproteína de baixa densidade extracorporal induzida por heparina (HELP, *Heparin-induced Extracorporeal Low-density Lipoprotein Precipitation*) (B Braun Medical Inc., Bethlehem, PA). Nessa técnica, o plasma é separado do sangue total com auxílio de um separador de fibra oca. Um tampão de acetato de sódio (pH 4,84) contendo heparina é adi-

cionado ao plasma para precipitar a LDL. Esta, então, é removida por filtração, sendo que a heparina é adsorvida do plasma por um filtro de dietilaminoetil celulose. O acetato e o volume extra são removidos por um processo de diálise/ultrafiltração em bicarbonato. O plasma tratado é combinado aos elementos celulares e devolvido ao paciente (Bambauer, 2003). Os resultados do tratamento de uma triagem demonstraram uma redução do conteúdo de LDL colesterol de mais de 30%, com redução do HDL e fibrinogênio de 15 e 58%, respectivamente (Lane, 1993).

Um terceiro método de remoção é a absorção em sulfato de dextrana (Liposorber, Kaneka, Osaka, Japão). Neste método, duas colunas de sulfato de dextrana são continuamente utilizadas para remover o colesterol LDL. O plasma é separado do sangue total com auxílio de um separador de fibra oca e bombeado por meio da coluna de sulfato de dextrana. O plasma tratado é, em seguida, misturado aos elementos celulares e devolvido ao paciente. Na coluna, o sulfato de dextrana negativamente carregado interage com a apolipoproteína B-100 de carga positiva, presente na molécula de LDL, resultando em sua remoção. Quando a primeira coluna se torna saturada, o fluxo é deslocado para a segunda coluna, enquanto a outra é lavada com uma solução de NaCl a 4,1% para remoção do LDL colesterol. Após essa etapa, a coluna é preenchida com salina normal contendo heparina e está pronta para ser novamente utilizada (Bambauer, 2003). Estudos empregando esse sistema demonstraram uma redução de 53% do conteúdo de colesterol na troca de um volume de plasma (Thompson, 1995), bem como uma redução de 36% do conteúdo de fibrinogênio e uma perda de 5% de HDL (Schulzeck, 1992).

O quarto método de remoção da LDL é a imunoadsorção (Therasorb-LDL, Miltenyi Biotec, Cologne, Alemanha). Este sistema emprega duas colunas contendo pérolas de agarose com anticorpos de carneiro policlonais antiapolipoproteína B-100 humana unidos por ligações covalentes. Similarmente aos demais métodos, uma das colunas é perfundida com plasma enquanto a outra é regenerada. Nesse caso, é utilizado um tampão glicina/HCl para remover a LDL contendo ApoB ligada (Bambauer, 2003). Um estudo sobre o uso desse tipo de aférese de LDL demonstrou a capacidade do sistema de manter os níveis de colesterol em torno de 165 mg%, bem como de aumentar o conteúdo de HDL (Richter, 1993).

O último método disponível é o da hemoperfusão de lipoproteína (DALI, Fresenius, St. Wendel, Alemanha). Esse sistema é constituído por colunas contendo pérolas de poliacrilamida recobertas com poliacrilato. Assim como o sulfato de dextrana, essas pérolas possuem carga negativa e, em consequência, se ligam à LDL contendo ApoB positivamente carregada. Para essa coluna, a separação do plasma é dispensável, pois é possível fazer a passagem de sangue total anticoagulado por meio da coluna. Diferente dos sistemas previamente descritos, essa coluna não é regenerada e sim utilizada uma única vez. A coluna é disponibilizada em diversos tamanhos para o tratamento de volumes de sangue distintos (Bambauer, 2003; Bosch, 2001a).

Entre os sistemas já descritos, o sistema do sulfato de dextrana e o sistema HELP atualmente são aprovados pelo FDA para uso nos EUA. Comparações realizadas entre esses sistemas mostraram a promoção de reduções similares do conteúdo de LDL colesterol, Lp(a), HDL e outros componentes plasmáticos (Bambauer, 2003; Jovin, 1996; Matsuda, 1994; Parhofer, 2000), com menores reduções do conteúdo de HDL, de fibrinogênio e de outros componentes plasmáticos que aquelas obtidas com a troca de plasma. Os sistemas também demonstraram taxas de reação semelhantes, porém diferiram quanto ao custo e simplicidade da operação (Matsuda, 1994).

Alguns sistemas, como o HELP e a filtração secundária, removem componentes plasmáticos adicionais, como o fibrinogênio. Por removerem grandes macromoléculas distintas da LDL, tais sistemas têm sido empregados para alterar as características do fluxo sanguíneo em certos estados patológicos. Esse tipo de aférese é referido como reoférese. Esses dispositivos são utilizados no tratamento de casos de degeneração macular associada à idade (Klingel, 2003), perda auditiva sensorioneural repentina (Suckfull, 1999, 2002), derrame (Jaeger, 1999) e isquemia do miocárdio (Jaeger, 1999).

A hipercolesterolemia familiar é considerada uma indicação de categoria I para a aférese de LDL, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Tabela 36.19 Condições em que a plasmaférese é aceita

Distúrbios neurológicos	Polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (AIDP)
	Polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP)
	Miastenia grave
Distúrbios hematológicos	Púrpura trombocitopênica trombótica
	Síndrome da hiperviscosidade
Distúrbios metabólicos	Hipercolesterolemia familiar
Outros distúrbios	Doença do anticorpo antimembrana basal (síndrome de Goodpasture)
	Crioglobulinemia
	Glomerulonefrite
	Condicionamento para transplante renal

Indicações terapêuticas para plasmaférese

A Tabela 36.19 lista distúrbios selecionados para os quais a troca de plasma é indicada e que são brevemente discutidos a seguir.

Distúrbios neurológicos

Polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda. A SGB é um distúrbio neurológico de origem imunológica. Ocorre com maior frequência no distúrbio paralítico (Ropper, 1992; Guillain-Barré Syndrome Study Group, 1985). Afeta principalmente os homens e é mais comum com o avanço da idade (Hughes, 1993). Caracteriza-se, inicialmente, por uma fraqueza nas pernas que avança para as regiões proximais e envolve os braços, a face e os músculos da orofaringe (Ropper, 1992). A perda sensorial é branda, mas pode incluir parestesia nos dedos das mãos e dos pés. A progressão da doença cessa ao redor da terceira semana após o início da doença e, então, o indivíduo melhora após um período variável de estabilidade (Ropper, 1992).

Considera-se que a patofisiologia da SGB envolve danos causados por anticorpos à mielina de nervos periféricos, seguida de uma resposta inflamatória. Nos pacientes, foram identificados anticorpos fixadores de complemento que reconhecem a mielina periférica (Koski, 1985). Os títulos desses anticorpos relacionam-se ao curso clínico dos pacientes (Koski, 1986), e também à resposta e à recidiva após a plasmaférese (Vriesendorp, 1991). O tratamento da SGB consiste na assistência de suporte para fornecer nutrição, suporte ventilatório e prevenção a infecções e embolismo pulmonar (Ropper, 1992). A administração de Imunoglobulina Intravenosa (IGIV) também é benéfica para o tratamento da síndrome (Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group, 1997), ao contrário dos corticosteroides (Hughes, 1978), e pode interferir na resposta à hemaférese (Mendell,1985).

A troca de plasma está associada à melhora da incapacitação, maior probabilidade de recuperação funcional e curso menos duradouro (Guillain-Barré Syndrome Study Group, 1985). Infelizmente, é provável que pacientes com necessidade de ventilação de suporte por vários dias antes do início da plasmaférese não sejam beneficiados de imediato pelo procedimento. Entretanto, esses pacientes se mantêm dependentes da ventilação por menos tempo (Guillain-Barré Syndrome Study Group, 1985). A plasmaférese deve ser iniciada em 14 dias após o aparecimento dos sintomas (Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group, 1997; Guillain-Barré Syndrome Study Group, 1985) e deve consistir na realização de 5 a 6 procedimentos em um período de 8 a 13 dias (Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group, 1997; Guillain-Barré Syndrome Study Group, 1985). O líquido de reposição a ser utilizado é a solução de albumina. Os tratamentos devem continuar durante pelo menos 10 a 14 dias, pois a suspensão da plasmaférese durante a fase ativa é caracterizada pela recidiva (Ropper, 1988). Dez por cento dos pacientes podem apresentar recaída decorridos 16 a 21 dias da terapia (Ropper, 1988).

Uma revisão do Cochrane Neuromuscular Disease Group Register (Registro do Grupo da Doença Neuromuscular de Cochrane) resumiu os resultados obtidos em triagens aleatorizadas e semialetorizadas de trocas de plasma *versus* terapia de suporte (Raphael, 2002). Um total de seis triagens envolvendo 649 pacientes foram identificadas, as quais atendiam aos critérios para avaliação. De acordo com os autores da revisão, os resultados revelaram que a TPE é "o primeiro e único tratamento comprovadamente superior ao tratamento de suporte isolado" (Raphael, 2002). Os autores também constataram que a TPE

se mostrava mais efetiva quando iniciada 7 dias após o surgimento da doença. Em casos de polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (AIDP, *Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*), a realização de 2 sessões de TPE é mais efetiva que a não aplicação da terapia, 4 sessões são mais efetivas que 2, e 6 sessões não trazem mais benefícios que a realização de 4 sessões (Raphael, 2002).

A AIDP é considerada uma indicação de categoria I para a troca de plasma, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica. A polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP, *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*) é um distúrbio neurológico, provavelmente de origem autoimune, caracterizado por uma disfunção nervosa periférica motora e/ou sensorial, progressiva ou recidivante, envolvendo mais de um dos membros e desenvolvendo-se ao longo de 2 meses (Cornblath, 1991). O paciente também apresenta hipo- ou arreflexia, sendo que estudos sobre condução nervosa indicaram a ocorrência de desmielinização, enquanto as biópsias mostraram desmielinização e remielinização (Cornblath, 1991). Outras causas de polineuropatia, como exposição à toxina, devem ser excluídas. Há uma predominância de pacientes do sexo masculino, com pico de idade em que a doença se manifesta em torno 5ª à 6ª década de vida (Dyck, 1975). Os pacientes tipicamente apresentam disestesias com ardência, dores musculares e dores fulgurantes, além de fraqueza muscular distal (Dyck, 1975). Acredita-se que a patofisiologia seja o dano imunomediado à mielina periférica, com consequente desmielinização e degeneração de nervos. As evidências que sustentam o envolvimento de um mecanismo imunológico são a ocorrência de desmielinização em macacos tratados com imunoglobulinas derivadas de paciente (Heininger, 1984), a deposição de imunoglobulinas em biópsias de nervos (Dalakas, 1980a) e a presença de IgG no LCE de alguns pacientes (Dalakas, 1980b). Alguns pacientes com CIDP respondem aos corticosteroides, porém são mais propensos a desenvolver complicações decorrentes do uso dessa medicação, em decorrência da necessidade de um tratamento prolongado (Dyck, 1975). Também foi demonstrado que a administração de IGIV produz efeitos benéficos (van Doorn, 1990), especialmente em um grupo seleto de pacientes apresentando achados específicos (van Doorn, 1991).

O primeiro estudo cruzado, placebo-controlado e duplo-cego sobre o uso da troca de plasma na CIDP demonstrou uma melhora em 5 entre 15 pacientes submetidos à realização de dois procedimentos por semana, durante 3 semanas. O benefício proporcionado pelo tratamento desapareceu gradualmente em 10 a 14 dias após a suspensão da terapia (Dyck, 1986). Um estudo mais recente, envolvendo procedimentos mais frequentes (quatro procedimentos na primeira semana, três na segunda, dois na terceira e um na quarta), demonstrou melhora em 80% dos pacientes. Essa melhora usualmente tornava-se aparente em torno do 3º ao 6º dia de tratamento (Hahn, 1996). Infelizmente, 66% dos respondedores apresentaram recaída após o encerramento da terapia (Hahn, 1996). Comparando-se a plasmaférese à terapia com IGIV, foi possível notar que em ambas as modalidades de tratamento ocorrem respostas rápidas semelhantes (Dyck, 1994). A terapia usualmente consiste em um curso intensivo inicial de quaro a seis procedimentos ao longo de 2 semanas, seguido de uma a duas sessões de tratamento por semana, ou a intervalos maiores, conforme a tolerância do paciente. Em geral, a melhora é observada já na primeira semana (Hahn, 1996), contudo dura apenas 2 semanas (Dyck, 1986). O líquido de reposição utilizado é a solução de albumina a 5%.

A CIDP é considerada uma indicação de categoria I para a troca de plasma, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Miastenia grave. A Miastenia Grave (MG) é um distúrbio autoimune caracterizado pelo enfraquecimento dos grupos musculares voluntários. Pode envolver apenas os músculos extraoculares ou ser generalizada, envolvendo os músculos apendiculares e do tronco. A ocorrência de enfraquecimento do músculo bulbar pode levar à aspiração diante do enfraquecimento do diafragma. Em consequência, o indivíduo desenvolve um severo comprometimento respiratório e, por esse motivo, a MG foi a principal causa de muitas mortes no passado. A doença decorre da formação de autoanticorpos dirigidos contra o receptor da acetilcolina na placa terminal motora. Esses autoanticorpos impedem o funcionamento normal do receptor intensificando sua taxa de renovação, bloqueando a ligação da acetilcolina e fixando complemento com consequente degradação do receptor (Lindstrom, 1976; Maselli, 1994). O distúrbio pode estar associado a um outro fenômeno autoimune e apresenta associação com anomalias tímicas, entre as quais o timoma (Sanders, 1994). O tratamento da MG é voltado para o aumento da concentração de acetilcolina na placa terminal motora pelo uso de inibidores da esterase da acetilcolina, tais como piridostigmina e neostigmina, bem como à diminuição da produção de anticorpos pela administração de medicamentos imunossupressores, como corticosteroides ou azatioprina (Sanders, 1994). Além disso, as IGIV têm sido empregadas no tratamento da MG com produção de efeitos benéficos semelhantes àqueles obtidos com a troca de plasma (Gajdos, 1997).

A troca de plasma é realizada com vistas à diminuição dos níveis de anticorpos antirreceptor de acetilcolina, embora também haja relatos de sua aplicação bem-sucedida nos 10 a 15% de pacientes com sintomas de MG que não apresentam anticorpos detectáveis. Cursos intensivos de troca de plasma são recomendados para casos de pacientes com MG que apresentam doença severa, com comprometimento da função respiratória, da deglutição e da locomoção (Sanders, 1994), bem como no preparo dos pacientes para realização de timectomia ou cirurgia (Iwasaki, 1993). Esses cursos podem consistir na realização de trocas de 1 a 1,5 volume de plasma diárias, por um período de 5 a 6 dias (Dau, 1977). Pacientes com doença crônica estável apresentando discreta exacerbação podem ser tratados com cursos mais curtos (duas a três trocas de plasma) (Antozzi, 1991), enquanto alguns pacientes podem ser tratados com até uma a quatro trocas por mês (Dau, 1980). O curso da terapia deve ser individualizado de acordo com as necessidades do paciente. A solução de albumina a 5% é utilizada como líquido de reposição. Uma terapia imunossupressora concomitante também é realizada para prevenir o rebote dos anticorpos (Dau, 1977).

A MG é considerada uma indicação de categoria I para plasmaférese, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Distúrbios hematológicos

Púrpura trombocitopênica trombótica. A TTP é um distúrbio caracterizado por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, disfunção neurológica, febre e certo grau de disfunção renal. Além da trombocitopenia, outras anormalidades laboratoriais encontradas são esquistócitos e hemácias nucleadas em esfregaços de sangue periférico, bem como níveis elevados de LD. Embora se considere que a elevação dos níveis de LD decorra da hemólise, um estudo envolvendo dez pacientes demonstrou que, na maioria dos casos, sua origem é hepática (Cohen, 1998). A TTP também pode ser dividida em primária (idiopática) e secundária. Algumas causas de TTP secundária são SLE (Nesher, 1994), transplante de medula óssea (Pettitt, 1994), ciclosporina (Wiener, 1997), gravidez (McCrae, 1997), ticlopidina (Bennett, 1998), infecção pelo HIV (Hymes, 1997) e diversos agentes quimioterápicos.

A TTP primária pode ser subdividida em diversas variantes. O episódio inicial da TTP idiopática consiste em um único evento sem associação com qualquer outra causa. A TTP intermitente caracteriza-se pela ocorrência de recidivas após o episódio inicial. A TTP recidivante crônica também consiste em episódios recorrentes que surgem durante a infância e reaparecem a intervalos previsíveis (Moake, 1995).

A histologia de pacientes com TTP revelou a presença de trombos plaquetários junto à microvasculatura. Estudos de imuno-histoquímica demonstraram que essas estruturas são constituídas de plaquetas, vWF e um pouco de fibrina (Asada, 1985). Além disso, outros estudos demonstraram que no início do curso da TTP, multímeros anormalmente grandes de vWF (UL-vWF, *Unusually Large-vWF*) circulam no plasma dos pacientes (Moake, 1989). Esses multímeros possuem maior afinidade pela glicoproteína Ib-IX existente nas plaquetas e são considerados indutores da agregação plaquetária sob condições de estresse produzidas por forças de cisalhamento elevadas. Normalmente, esses multímeros de UL-vWF são encontrados junto ao endotélio e, quando liberados na circulação, são clivados em fragmentos menores por uma metaloprotease denominada ADAMTS13 (Levy, 2001a). Foi demonstrado que nos pacientes com TTP inicial idiopática, TTP intermitente e TTP associada à ticlopidina, existe um anticorpo que inibe a atividade da ADAMTS13 (Furlan, 1998a, b; Rice, 1998; Tsai,

1998). Na TTP recidivante crônica, foi demonstrada a ausência da atividade de ADAMTS13 em presença de um autoanticorpo que representa uma deficiência genética na produção da enzima (Furlan, 1997). Essa síndrome congênita de TTP também é conhecida pelo epônimo de síndrome de Schulman-Upshaw. Exceto nos pacientes com TTP induzida por ticlopidina e, possivelmente, naqueles com TTP induzida pelo HIV, nem os autoanticorpos nem a deficiência da atividade da ADAMTS13 parecem estar envolvidos na TTP secundária. Um estudo sobre a TTP associada ao transplante de medula óssea demonstrou atividade normal de ADAMTS13 (van der Plas, 1999). Foi postulado que o dano endotelial observado em muitos casos secundários resulta na liberação de UL-vWF que, por sua vez, suplanta a atividade da protease. De modo semelhante, estudos envolvendo pacientes que sofriam de síndrome urêmica hemolítica associada à diarreia (HUS, *Hemolytic Uremic Syndrome*) também detectaram atividade normal de ADAMTS13 (Tsai, 2001).

O tratamento primário da TTP é a plasmaférese. Antes da adoção da troca de plasma, a taxa de mortalidade da TTP era de 95%. Após a disseminação do uso da troca de plasma, essa taxa de mortalidade caiu para 15% (Rock, 1991). Acredita-se que o mecanismo de ação da plasmaférese seja a combinação da remoção de autoanticorpos e UL-vWF à infusão de ADAMTS13. Uma terapia alternativa à troca de plasma é a infusão de plasma, embora, na maioria dos casos, esta alternativa não seja tão eficaz quanto a troca de plasma (Rock, 1991). Isso ocorre porque o volume de plasma passível de infusão é limitado pela capacidade do sistema cardiovascular do paciente de suportar esse volume. Coppo et al. (2003) estudaram a infusão de grandes volumes de plasma comparativamente à troca de plasma. Nessa triagem, procurou-se infundir o mesmo volume fornecido durante a troca. Com relação ao resultado obtido, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os pacientes aleatorizados para a troca ou infusão de plasma. Todavia, os pesquisadores observaram a ocorrência de maiores complicações no grupo de pacientes tratado com infusão, em decorrência de uma sobrecarga volumétrica. Em razão dessa complicação, foi necessário substituir a infusão pela troca de plasma em 8 dos 19 pacientes desse grupo. Existem duas situações em que há indicação da infusão de plasma para tratamento da TTP. Primeiramente, pacientes com deficiência genética de ADAMTS13 manifestada como TTP recidivante crônica podem receber infusão de PFC para prevenção da exacerbação. Além disso, a infusão de plasma pode ser utilizada no tratamento de um paciente durante a preparação para realização da troca de plasma. Outras terapias adicionais para a TTP são as medicações antiplaquetárias (Amorosi, 1977), vincristina (Gutterman, 1982), esplenectomia (Crowther, 1996), IGIV (Centurioni, 1995), ciclosporina (Hand, 1998) e corticosteroides (Bell, 1991).

O tratamento da TTP consiste na realização de trocas diárias de um a dois volumes de plasma utilizando PFC como líquido de reposição até que a contagem de plaquetas se torne superior a 100.000/μL a 150.000/μL, os níveis de LD sejam normalizados e não haja evidências de disfunção neurológica (Bell, 1991; Dawson, 1994). Se o paciente permanecer estável por 24 a 48 horas sob terapia de troca de plasma, então o afunilamento pode ser iniciado com a realização de uma aférese em dias alternados (Dawson, 1994). Contudo, é preciso ter em mente que os benefícios do afunilamento não foram comprovados (Bandarenko, 1998) e esse procedimento não é adotado por alguns centros. Como os pacientes podem sofrer uma piora repentina dos sinais e sintomas diante da interrupção precoce de um longo curso de troca de plasma (Bell, 1991), muitos recomendam a realização do afunilamento. Seja como for, é preciso que o paciente seja monitorado de perto quanto ao estado neurológico, contagem de plaquetas e níveis de LD durante e após a troca de plasma. No caso de pacientes irresponsivos à troca de plasma com PFC, pode ser benéfico substituir o PFC por plasma pobre em sobrenadante de crio, pois foi demonstrado que essa substituição induz a remissão da doença em alguns pacientes (Rock, 1996). É provável que esse efeito se deva à falta de vWF no plasma pobre em sobrenadante de crio. Essa descoberta deu origem a uma dúvida frequente sobre a adequação do uso rotineiro de plasma pobre em sobrenadante de crio como líquido de reposição na troca de plasma para TTP. O North American TTP Group realizou uma triagem aleatorizada prospectiva envolvendo multicentros, na qual o PFC e o plasma pobre em sobrenadante de crio foram comparados como líquidos de reposição utilizados durante a manifestação inicial de TTP primária. Nessa triagem, ambos os líquidos de reposição foram equivalentes na população estudada (Zeigler, 2001). Além disso, o plasma pobre em sobrenadante de crio não é disponibilizado de forma rotineira em muitos hemocentros, pois é descartado como subproduto da produção de crioprecipitado.

Embora a troca de plasma seja efetiva no tratamento da TTP idiopática, seu papel é incerto em casos secundários que não apresentam deficiência de ADAMTS13. Estudos demonstraram que a plasmaférese é ineficaz em casos de TTP induzida por transplante de medula óssea (Sarode, 1995).

A TTP é considerada uma indicação de categoria I para plasmaférese, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Síndrome da hiperviscosidade. A síndrome da hiperviscosidade caracteriza-se por alterações do estado mental, diátese de sangramento envolvendo mucosas e trato gastrintestinal, retinopatia com hemorragia e papiledema, além de hipervolemia com insuficiência cardíaca congestiva (Foerster, 1993b). Trata-se de uma síndrome que afeta menos de 5% dos pacientes com mieloma múltiplo, porém ocorre em até 70% dos pacientes com macroglobulinemia de Waldenström (Foerster, 1993b). Mais raramente, pacientes com a síndrome podem apresentar elevações policlonais dos níveis de imunoglobulinas. As diferenças observadas na frequência dos distúrbios envolvendo plasmócitos se devem às diferenças relacionadas às proteínas monoclonais produzidas em tais condições. No mieloma múltiplo, as imunoglobulinas usualmente produzidas são do tipo IgG ou IgA. Na macroglobulinemia de Waldenström há produção de IgM. Na síndrome da hiperviscosidade, a presença de grandes concentrações de paraproteínas aumenta a viscosidade do sangue ao promover aglutinação das hemácias, resultando na oclusão da microcirculação com consequente isquemia do órgão (McGrath, 1976). Os sintomas usualmente aparecem quando a viscosidade do sangue sofre um aumento de 4 a 6 unidades de Ostwald (a viscosidade do sangue normal é de 1,5 a 1,8 unidade de Ostwald), contudo, o paciente pode permanecer assintomático mesmo diante de concentrações proteicas e viscosidades bastante altas (Bloch, 1973). Embora a viscosidade dependa da concentração, demonstrando uma relação exponencial (Bloch, 1973), também depende da natureza da proteína. A característica exponencial da relação existente entre concentração e viscosidade significa que, após uma concentração crítica ter sido alcançada, pequenas alterações resultam em grandes aumentos ou reduções da viscosidade.

O tratamento da síndrome de hiperviscosidade é duplo. Primeiramente, a meta a longo prazo é reduzir a produção de paraproteínas utilizando quimioterapia. A segunda meta consiste em diminuir a concentração de proteínas e melhorar o fluxo sanguíneo. Este último objetivo pode ser atingido com a plasmaférese, pela troca de 1 a 1,5 volume de plasma por uma solução de albumina a 5% ou iguais volumes de albumina e salina. Na síndrome da hiperviscosidade associada à IgM monoclonal, uma a duas trocas de plasma podem ser suficientes para remover uma quantidade de proteína que permita melhorar a viscosidade, uma vez que a IgM está localizada quase totalmente junto ao espaço intravascular. No caso das paraproteínas IgG e IgA, a imunoglobulina também está presente no espaço extravascular e pode ser necessário realizar mais procedimentos para diminuir os níveis de paraproteínas. A meta da terapia deve ser aliviar os sintomas, com subsequente adaptação da frequência às necessidades do paciente. Nos casos de macroglobulinemia de Waldenström resistente à terapia, repetidas sessões de plasmaférese têm sido empregadas para controlar a hiperviscosidade por períodos prolongados de até 17 anos (Salmon, 1997). É importante notar que, em razão da presença de imunoglobulinas extravasculares no mieloma múltiplo, é possível que os pacientes apresentem hipovolemia após a execução dos procedimentos, visto que a pressão oncótica determina a movimentação de líquidos para fora do espaço intravascular.

A hiperviscosidade é considerada uma indicação de categoria II para plasmaférese, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Rim de mieloma

O rim de mieloma é encontrado em pacientes com mieloma múltiplo que excretam cadeias leves livres – proteínas de Bence Jones – pela urina. Caracteriza-se por uma insuficiência renal aguda acompanhada dos achados laboratoriais esperados. Acomete 3 a 9% dos

pacientes com mieloma múltiplo (Bear, 1980; Johnson, 1980; Solling, 1988) e está associada a um mau prognóstico. O rim de mieloma é causado pela filtração de cadeias leves monoclonais com deposição nos túbulos renais. Como consequência, eventualmente há dilatação e atrofia dos túbulos, além de insuficiência renal (Bernstein, 1982; Cohen, 1984; DeFronzo, 1978). Diferentemente da síndrome da hiperviscosidade, a quantidade ou características da cadeia leve não apresentam relação com a doença. O diagnóstico do rim de mieloma baseia-se no exame de biópsia renal. A prevenção do desenvolvimento dessa complicação consiste no tratamento da doença subjacente. Um outro método de tratamento é a alcalinização da urina para aumentar a excreção da proteína.

A troca de plasma é empregada no tratamento do rim de mieloma para diminuir a quantidade de cadeias leves. Embora essa redução possa ser realizada por meio de diálise, a plasmaférese mostrou-se mais eficiente (Bear, 1980; Johnson, 1980; Solling, 1988). Apesar de a insuficiência renal no mieloma múltiplo estar associada a um mau prognóstico, duas triagens controladas (Johnson, 1990; Zucchelli, 1984) demonstraram a recuperação da função renal em pacientes submetidos à diálise e tratados com uma combinação de quimioterapia e plasmaférese. No rim de mieloma, a troca de plasma é realizada 1 vez ao dia ou 3 vezes por semana durante 1 a 4 semanas, até que a função renal melhore. Uma terapia subsequente pode ser instituída, conforme a necessidade do paciente, para manter a função renal (McGrath, 1976).

O rim de mieloma é considerado uma indicação de categoria II para plasmaférese, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Distúrbios nefrológicos

Doença do anticorpo antimembrana basal. A doença do anticorpo antimembrana basal (síndrome de Goodpasture) é um raro distúrbio caracterizado pela combinação de hemorragias pulmonares e renais. É mais comum entre os homens que nas mulheres, com maior incidência entre 18 e 35 anos de idade. Trata-se de um distúrbio autoimune em que há formação de anticorpos contra o colágeno de tipo IV junto às membranas basais glomerular e pulmonar. A produção desse anticorpo é usualmente temporária, e pode ser desencadeada por um dano ao sistema respiratório, já que a síndrome é frequentemente precedida por uma infecção ou agressão química. Os pacientes afetados costumam apresentar sintomas pulmonares, como tosse, hemoptise e dispneia. Os valores laboratoriais evidenciam insuficiência e inflamação renal. A taxa de mortalidade pode chegar a 50%. O tratamento da síndrome de Goodpasture é voltado, principalmente, para a supressão da produção de anticorpos e da inflamação, bem como para a remoção do anticorpo. A inibição da produção de anticorpos e da inflamação é feita pelo uso de agentes imunossupressores, como ciclofosfamida e prednisona (Wiseman, 1993).

A plasmaférese é utilizada para remover os anticorpos antimembrana basal. O tratamento consiste na troca de 1 a 1,5 volume de plasma e reposição com solução de albumina a 5%. A terapia, de maneira usual, é realizada diariamente, por 7 a 14 dias, e, havendo imunossupressão concomitante, resulta na diminuição dos níveis de anticorpos e na melhora clínica do paciente (Erickson, 1979; Johnson, 1985; Pusey, 1983). Como os anticorpos são apenas temporários, o tratamento comumente dura menos de 6 meses (Pusey, 1983). É importante salientar que a troca de plasma deve ser iniciada cedo, pois é improvável haver recuperação da função renal após a atrofia dos glomérulos e túbulos (Johnson, 1978). A troca de plasma provavelmente não trará benefícios a pacientes que precisem ser submetidos à diálise e apresentem níveis de creatinina acima de 6,8 mg/dL, oligúria e 100% dos glomérulos crescênticos ao exame de biópsia renal (Levy, 2001b). Nessas circunstâncias, a troca de plasma pode ser reservada para o início da hemorragia pulmonar (Levy, 2001b). Pacientes com níveis de creatinina < 5,7 g/dL e menos de 50% dos glomérulos crescênticos ao exame de biópsia renal apresentam sobrevida global e sobrevida "renal" de 1 ano iguais a 100 e 95%, respectivamente (Levy, 2001b).

A doença do anticorpo antimembrana basal é considerada uma indicação de categoria I para plasmaférese, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Crioglobulinemia. Crioglobulinas são imunoglobulinas que precipitam de forma reversível a baixas temperaturas. Existem três categorias de crioglobulinas. As crioglobulinas de tipo I são proteínas monoclonais únicas e usualmente observadas no mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström ou outros distúrbios linfoproliferativos. Em geral, a imunoglobulina é uma IgG ou IgM (Foerster, 1993a). A crioglobulina de tipo II consiste em uma mistura de imunoglobulinas policlonais com uma proteína monoclonal. Essa proteína monoclonal usualmente é uma IgM-reativa contra IgG policlonal. A crioglobulinemia de tipo II está associada à hepatite C crônica, distúrbios autoimunes e malignidades produtoras de IgM (Foerster, 1993a). Por fim, a crioglobulina de tipo III é constituída por imunoglobulinas policlonais, geralmente IgM, que apresentam atividade contra IgG policlonal. Estão associadas a condições autoimunes e também a infecções (Foerster, 1993a). As crioglobulinas produzem sintomas ao precipitarem em áreas de baixa temperatura, como a pele ou as extremidades, acarretando oclusão vascular. Em consequência, o indivíduo apresenta uma variedade de sintomas, entre os quais acrocianose, fenômeno de Raynaud, úlceras cutâneas, púrpura cutânea e glomerulonefrite (Foerster, 1993a).

A precipitação de crioglobulinas depende da concentração de imunoglobulinas. Conforme essa concentração aumenta, a temperatura em que ocorre a precipitação da proteína também aumenta (Hillyer, 1996). Como resultado, alguns pacientes podem apresentar sintomas quando expostos apenas a pequenas quedas de temperatura, como as observadas nas extremidades distais quando o paciente permanece em ambiente ao ar livre.

O tratamento da crioglobulinemia é voltado para a doença subjacente (Berkman, 1980). Além disso, a troca de plasma pode ser utilizada para reduzir a concentração proteica e, assim, diminuir a temperatura em que ocorre a precipitação (Berkman, 1980; McLeod, 1980). O tratamento usualmente consiste na troca de 1 a 1,5 volume de plasma utilizando solução de albumina a 5%. Mais uma vez, intensidade, duração e frequência da terapia são determinadas pelos sintomas apresentados pelo paciente. Como essas proteínas precipitam à temperatura ambiente, talvez seja necessário utilizar aquecedores de sangue (em ambas as linhas, de extração e de retorno) para evitar que ocorra precipitação dentro do aparelho de aférese. Em alguns pacientes que apresentam elevadas concentrações de crioglobulinas e consequente precipitação a temperaturas mais altas, pode ser necessário realizar procedimentos de hemaférese a temperaturas ambiente ≤ 37°C para prevenir a precipitação (Hillyer, 1996).

A crioglobulinemia, com ou sem polineuropatia, é considerada uma indicação de categoria II para plasmaférese, de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Glomerulonefrite. Uma grande parte dos casos de glomerulonefrite resulta da deposição de complexos antígeno-anticorpo junto aos glomérulos, levando ao dano glomerular. Esses complexos, assim como seus componentes constituintes, podem ser encontrados circulando na corrente sanguínea. Por esse motivo, é teoricamente possível empregar a plasmaférese para remover tais substâncias e, desse modo, parar e, talvez, reverter a produção de novas lesões glomerulares. Inúmeros casos de glomerulonefrite têm sido tratados com plasmaférese. Assim como em diversas doenças tratadas com hemaférese, as investigações se limitam aos estudos de caso e de pequenas séries de caso, sem triagens controladas e aleatorizadas. O tratamento de algumas doenças renais glomerulares selecionadas é mostrado na Tabela 36.20.

Terapia de condicionamento para transplantação renal

O transplante de rim atualmente constitui a terapia ideal para casos de insuficiência renal crônica. Infelizmente, o fornecimento de rins por doadores mortos é inadequado para atender à demanda de órgãos nos EUA, onde existem 50 mil pessoas na lista de espera de rins de doadores mortos da United Network for Organ Sharing (UNOS) (United Network for Organ Sharing, 2000). O tempo de espera para transplantes renais de doadores mortos ultrapassa quatro anos (United Network for Organ Sharing, 2001). Se um paciente pertence ao grupo sanguíneo O ou B, o tempo de espera médio é ainda maior. Além disso, 5 mil das 50 mil pessoas constantes na lista de espera apresentam Painel Reativo de Aloanticorpos (PRA) > 80% (United Network for Organ Sharing, 2000). Menos de 300 desses pacientes recebem transplantes a cada ano, e muitos dos pacientes mais altamente sensibilizados requerem um rim com compatibilidade HLA

Tabela 36.20 Glomerulonefrite tratada com troca de plasma

Doença	Categoria ASFA/AABB*	Substância putativa removida	Eficácia relatada
Glomerulosclerose segmentar focal primária (Bosch, 2001b)	NC/NC	Fator de permeabilidade de 50 kD	Remissão parcial ou completa da proteinúria em 44% dos pacientes
Glomerulosclerose segmentar focal recorrente após transplante renal (Bosch, 2001b)	III/III	Fator de permeabilidade de 50 kD	Remissão de longa duração em 44% dos pacientes adultos e em 74% dos pacientes pediátricos
Nefrite lúpica (Mistry-Burchardi, 2001)	NC/IV	Anticorpos antinucleares, anticorpos antiDNA	Sem benefícios em relação à imunossupressão, seja na terapia isolada ou complementar
Glomerulonefrite rapidamente progressiva pauci-imune (Gaskin, 2001)	NC/NC	Anticorpos antineutrofílicos citoplasmáticos (ANCA)	Possíveis benefícios quando a função renal é comprometida a ponto de haver necessidade de diálise
Nefropatia por IgA (Chambers, 1999)	NC/NC	IgA	Sem evidências conclusivas que sustentem o uso na glomerulonefrite rapidamente progressiva decorrente da nefropatia por IgA

* Ver na Tabela 36.8 a explicação das categorias estabelecidas pela ASFA/AABB. NC = não classificado.

perfeita. Como são muito poucos os pacientes altamente sensibilizados que recebem rins de doadores mortos, não é possível estimar o tempo de espera médio para esse grupo (Stegall, 2002).

Enquanto esses indivíduos aguardam um rim de doador morto com antígenos HLA ou ABO compatíveis, sua condição médica se deteriora. Essa espera está associada a uma taxa de mortalidade anual de 5 a 8%. No passado, tentativas de transplantação renal ABO incompatível ou com incompatibilidade em prova cruzada foram associadas ao desenvolvimento de rejeição hiperaguda. As isoaglutininas ABO préformadas ou os anticorpos anti-HLA ligam-se aos antígenos-alvo na superfície do endotélio vascular do órgão incompatível no momento da reperfusão do enxerto. O resultado é a fixação de complemento seguida de lesão endotelial, trombose e oclusão da microvasculatura do órgão, resultando em sua perda imediata. Para contornar a rejeição hiperaguda e aumentar a disponibilidade de órgãos, foram desenvolvidos inúmeros protocolos que empregam plasmaférese ou imunoabsorção combinadas à imunossupressão para reduzir os títulos de isoaglutininas ABO ou anticorpos anti-HLA. Há relatos de que esses protocolos possibilitam uma transplantação bem-sucedida de rins incompatíveis doados por doadores vivos.

Tanabe et al. (1998) utilizaram três a quatro procedimentos de imunoabsorção e/ou um a dois procedimentos de plasmaférese de filtração dupla na tentativa de reduzir os títulos de isoaglutininas ABO para menos de 16, antes da transplantação de rins doados por doadores vivos ABO incompatíveis. Esse tratamento, aliado a uma intensa imunossupressão e esplenectomia realizada no momento da transplantação, resultou na ausência de rejeição hiperaguda em 67 pacientes. A sobrevida dos pacientes submetidos à transplantação ABO incompatível foi equivalente à sobrevida dos pacientes que receberam transplantes ABO compatíveis. A sobrevida do enxerto foi significativamente menor em até 3 anos após o transplante (79%), contudo passou a apresentar equivalência decorridos 4 anos ou mais da transplantação (Tanabe, 1998). Nosso grupo relatou o uso de quatro trocas de plasma antes da transplantação, realizadas para reduzir os títulos de isoaglutininas a menos de quatro. Esse procedimento, aliado a um regime intensivo de imunossupressão com esplenectomia, possibilitou o sucesso da transplantação sem ocorrência de rejeição hiperaguda em 26 transplantes ABO incompatíveis (Winters, 2004). As sobrevidas de 1 ano do enxerto e do paciente foram discretamente menores que as observadas nas transplantações ABO compatíveis realizadas no mesmo período (89% *versus* 96% e 94% *versus* 99%, respectivamente) (Gloor, 2003b).

A troca de plasma está associada à redução dos escores e títulos de isoaglutininas no momento da transplantação (Aikawa, 2001; Winters, 2004). Após o transplante, todavia, esses títulos se tornam mais altos que aqueles detectados durante a realização da transplantação, embora continuem sendo menores que os títulos iniciais (Aikawa, 2001; Winters, 2004). Além disso, os níveis de antígenos ABO permanecem os mesmos no enxerto (Aikawa, 2001). Apesar dessas elevações dos títulos de anticorpos, os episódios de rejeição limitam-se ao início do curso do transplante e podem ser revertidos por meio da plasmaférese e de uma imunossupressão intensificada (Winters, 2004). Estudos sugeriram que, no cenário da transplantação de rins ABO incompatíveis, ocorre "acomodação" (Delikouras, 2003). Esse fenômeno parece ser decorrente de uma ativa autoproteção do enxerto por meio da alteração da expressão genética (Park, 2003).

A transplantação de órgãos ABO incompatíveis não é classificada de acordo com a ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Há relatos de diversos grupos que obtiveram sucesso na transplantação de rins incompatíveis à prova cruzada, provenientes de doadores vivos, utilizando uma combinação de plasmaférese, administração de IGIV, imunossupressão e esplenectomia (Gloor, 2003a; Montgomery, 2000; Schweitzer, 2000). A realização de quatro a seis trocas de plasma concomitantes à terapia imunossupressora e administração de IGIV foi bem-sucedida na conversão de pacientes com baixos títulos de anticorpos anti-HLA (< 16) para compatibilidade na prova cruzada no mesmo dia da transplantação. Nenhum dos pacientes tratados desenvolveu rejeição hiperaguda. Episódios de rejeição humoral aguda foram observados em 43% dos pacientes tratados por Gloor et al. (2003a), contudo, tais episódios foram revertidos com a realização de plasmaféreses adicionais e administração de esteroides (Gloor, 2003a). As sobrevidas do enxerto de 100% (Schweitzer, 2000) e 79% (Gloor, 2003a) foram relatadas decorridos 12 meses da transplantação. Diferentemente dos transplantes ABO incompatíveis, há relatos de uma perda continuada de anticorpos específicos para o HLA doador após o condicionamento e a transplantação de rins com incompatibilidade de prova cruzada (Zachary, 2003). Ademais, assim como nos transplantes ABO incompatíveis acomodados, os transplantes com incompatibilidade de prova cruzada acomodados sofreram uma alteração na expressão genética que resultou na inibição da apoptose das células endoteliais do enxerto (Salama, 2001).

A plasmaférese para a transplantação renal com incompatibilidade de prova cruzada não foi classificada pela ASFA (American Society for Apheresis Clinical Applications Committee, 2000).

Complicações envolvendo doador/paciente comuns a todos os procedimentos de hemaférese

Os procedimentos de hemaférese, tanto de doação como terapêuticos, são seguros e oferecem risco mínimo de complicações. As estimativas da taxa de reações entre doadores submetidos a esses procedimentos são de 2,18% (McLeod, 1998) e 0,81% (Despotis, 1999). Esse valores são inferiores à taxa de reações de 11 a 21% descrita para doações de sangue total (Newman, 1997). Entretanto, a taxa de reações graves, em que há necessidade de hospitalização do paciente, foi estimada em 0,01% (duas a cada 19.736 doações) (Despotis, 1999), sendo

20 vezes maior que aquela descrita para doações de sangue total alogênico (uma a cada 198.119 doações ou 0,0005%) (Popovsky, 1995). Portanto, embora a doação de aférese pareça estar associada a uma taxa de reações menor que a doação de sangue total, o risco de desenvolvimento de reações graves é maior.

A reação mais comumente observada por McLeod et al. (1998) entre doadores de aférese foram as lesões decorrentes de punção venosa. A Tabela 36.21 lista os efeitos adversos da doação de aférese relatados por esses pesquisadores, incluindo sua frequência e a frequência comparável entre doadores de sangue total. Assim como na doação de sangue total, os doadores que faziam sua primeira doação desenvolveram reações com mais frequência que os doadores experientes. Notavelmente, constatou-se que as reações eram mais frequentes entre doadores de plaquetas que entre doadores de plasma ou granulócitos (12% *versus* 5,9 e 9,4%, respectivamente), sendo essa diferença possivelmente em razão do maior número de doadores iniciantes nesse grupo (McLeod, 1998). Despotis et al. (1999) encontraram associações com citrato e reações hipotensivas, peso do doador, sexo e tipo de instrumento de coleta utilizado. Para as complicações relacionadas à punção venosa, somente as doadoras estavam associadas a um fator de risco. O equipamento utilizado na coleta também influenciou as taxas de reações. McLeod et al. (1998) constataram que o Fenwal CS3000 produziu menos reações em comparação a outros instrumentos. Possivelmente, isso pode ser explicado pela menor taxa de infusão de citrato empregada por esse aparelho, bem como pela capacidade dos demais equipamentos de realizar procedimentos com uma única agulha. Tais procedimentos executados com uma agulha só, que alternam extração e retorno por meio de uma única linha endovenosa, resultam em volumes extracorporais maiores (McLeod, 1998). Despotis et al. (1999) notaram que a relação existente entre o peso do doador e as reações ao citrato eram diferentes quando se comparava o COBE Spectra e o Fenwal CS3000. Doadores com menor peso corporal apresentavam maior probabilidade de desenvolver reações ao citrato diante do uso do Fenwal CS3000, enquanto aqueles com peso corporal maior eram mais propensos a desenvolver reações diante do uso do COBE Spectra. Os autores desse estudo sugeriram que essa relação era decorrente dos métodos pelos quais esses equipamentos determinam a taxa de infusão do anticoagulante.

Relatos apontam a ocorrência de reações entre procedimentos de hemaférese em 4,75% dos casos (McLeod, 1999). As reações identificadas e suas respectivas frequências globais são mostradas na Tabela 36.22. A taxa de reações variou de acordo com o procedimento, líquido de reposição e paciente. Exemplificando, as taxas de reações para troca de plasma utilizando solução de albumina foram de 3,35%, comparadas às taxas de 7,81% para plasmaférese utilizando plasma como líquido de reposição. A leucaférese exibiu uma taxa de reações de 5,71%, enquanto a coleta de CPrHs apresentou uma taxa de 1,66%, sendo que 18 pacientes submetidos à plaquetaférese terapêutica não desenvolveram reações. Pacientes com distúrbios neurológicos apresentaram maior propensão ao desenvolvimento de reações vasovagais em comparação às demais categorias de pacientes (McLeod, 1999). É importante notar que esse estudo não considerou as complicações ou reações decorrentes do acesso venoso. Outros estudos que incluíram esses dados encontraram maiores taxas de reações associadas à hemaférese terapêutica. Por exemplo, Couriel e Weinstein (1994) observaram a ocorrência de efeitos adversos em 17% dos procedimentos de aférese terapêutica. Tais reações eram predominantemente discretas e dirigidas contra o citrato, no entanto, 6,15% dos procedimentos foram complicados pela ocorrência de reações severas, envolvendo risco de vida para o paciente ou resultando na suspensão do procedimento. Todas essas reações foram decorrentes do acesso venoso central, sendo constituídas de pneumotórax, hemopneumotórax, bacteremia associada ao uso de cateter e hematoma esternoclidomastóideo. O paciente com hemopneumotórax sangrava por causa da complicação (Couriel e Weinstein, 1994). Embora apenas um caso de morte tenha sido relatado por esses pesquisadores e nenhuma morte tenha sido atribuída à hemaférese terapêutica no estudo de McLeod et al., há relatos de morte descritos por outros pesquisadores. A maioria das mortes foram atribuídas à parada cardiorrespiratória durante a hemaférese, tendo como causas adicionais anafilaxia, embolia pulmonar e perfuração vascular decorrente de acesso venoso central. Huestis et al. (1989) estimaram uma taxa de mortalidade de 0,03% (três a cada 10 mil procedimentos) para hemaférese terapêutica. Mokrzycki e Kaplan (1994), por sua vez, basearam-se em uma revisão da literatura existente e estimaram uma taxa de mortalidade de 0,05% dos procedimentos.

Conforme discutido nas descrições de cada procedimento, a ocorrência de complicações específicas está associada especificamente aos procedimentos utilizados, como aquelas decorrentes da administração de G-CSF na coleta de granulócitos. A seguir, são discutidas as complicações e riscos comuns a todos os procedimentos de hemaférese.

Tabela 36.21 Taxas de reação entre doadores de aférese (McLeod, 1998) e de sangue total (Newman, 1997)

Reação	Doações de aférese (%)	Doações de sangue total (%)
Hematoma ou dor	1,15	9–16
Toxicidade por citrato	0,4	NA
Vasovagal branda	0,05	2–5
Vasovagal com síncope	0,08	0,1–0,3

Tabela 36.22 Taxas de reação entre pacientes submetidos a procedimentos de aférese terapêutica (McLeod, 1999)

Reação	Frequência (%)
Reações transfusionais	1,6
Toxicidade por citrato	1,2
Hipotensão	1,0
Reações vasovagais	0,5
Palidez e diaforese	0,5
Taquicardia	0,4
Angústia respiratória	0,3
Tetania e convulsões	0,2
Calafrios e rigidez	0,2

Distúrbios eletrolíticos e acidobásicos

O citrato é utilizado como anticoagulante primário em procedimentos de aférese de doação e terapêutica, por sua eficácia em prevenir a coagulação, ação de curta duração e facilidade de reversão, diferentemente da heparina. Os íons citrato quelam os íons de cálcio produzindo um complexo solúvel. Como resultado, os íons de cálcio quelados tornam-se indisponíveis para utilização nas reações biológicas, entre as quais a cascata de coagulação. No equipamento de aférese, a concentração plasmática de citrato atinge 15 a 24 mmol/L, diminuindo a concentração de íons de cálcio para menos de 0,2 a 0,3 mmol/L (concentração necessária à coagulação) (Strauss, 1996). Esses níveis de cálcio ionizado requerem a infusão de aproximadamente 500 mL de solução de ACD-A, considerado incompatível com a vida. Entretanto, o paciente/doador não morre, graças aos mecanismos compensatórios. No retorno do sangue do aparelho de hemaférese para o paciente/doador, há diluição do citrato no volume total de líquido extracelular. Além disso, o fígado, rins e músculos rapidamente metabolizam o citrato, liberando o cálcio a ele ligado (Strauss, 1996). Por fim, o corpo também responde à diminuição da concentração de cálcio ionizado pelo aumento dos níveis de PTH, com consequente mobilização de cálcio a partir dos estoques esqueléticos e intensificação da absorção pelos rins (Silberstein, 1986).

Nos procedimentos de plasmaférese terapêutica, o volume de plasma removido deve ser reposto por um volume semelhantes de líquido de reposição. Na troca de plasma que utiliza como líquido de reposição PFC ou plasma reduzido de crioprecipitado, os anticoagulantes presentes nessas soluções representam uma fonte adicional de citrato infundida no paciente. Por isso é comum observar sintomas de toxicidade por citrato nos pacientes submetidos ao procedimento. Na troca de plasma que emprega solução de albumina como líquido de reposição, espera-se que a toxicidade por citrato seja menos problemática. Contudo, nem sempre é assim. Normalmente, 40 a 55% do cálcio sérico encontra-se ligado à albumina, sendo que a parte não ligada

constitui o cálcio ionizado fisiologicamente ativo. As preparações de albumina são depletadas desse tipo de cálcio e, como resultado, a proteína liga-se ao cálcio durante a infusão na troca de plasma. Essa ligação pode acarretar uma queda da concentração de cálcio ionizado com subsequente aparecimento de sintomas decorrentes de hipocalcemia. Goss e Weinstein (1999) demonstraram maior incidência de reações ao citrato, bem como maiores reduções dos níveis de cálcio ionizado em pacientes de neurologia submetidos à troca de plasma com reposição à base de solução de albumina a 5%, em comparação àqueles que receberam uma solução de pentamilo a 10% como líquido de reposição. Um estudo subsequente demonstrou que a adição de gliconato de cálcio à preparação de albumina antes da administração ao paciente foi mais eficaz em reduzir a incidência de toxicidade por citrato, quando comparada à aplicação i.v. de gliconato de cálcio ou à administração de carbonato de cálcio via oral (Weinstein, 1996). O efeito deveu-se à saturação dos sítios de ligação ao cálcio existentes na albumina, que manteve os níveis de cálcio ionizado no paciente.

Apesar dos mecanismos compensatórios, a infusão de citrato pode resultar na diminuição dos níveis de cálcio ionizado que leva à manifestação de sintomas pelo doador/paciente. Tais sintomas são causados pela diminuição da concentração de cálcio ionizado a níveis em que a excitabilidade das membranas dos nervos aumenta ao ponto de haver despolarização espontânea (Strauss, 1996). Os sinais e sintomas resultantes podem incluir parestesias periorais, parestesias acrais, arrepios, tonturas, contrações espasmódicas e tremores. Além disso, alguns pacientes também apresentam náusea e vômitos. À medida que os níveis de cálcio ionizado caem ainda mais, esses sintomas podem progredir para um espasmo carpopedal, tetania e convulsões (Strauss, 1996). Por isso, é importante deduzir a ocorrência de sintomas iniciais no paciente/doador, de modo a possibilitar a adoção de medidas interventivas antes da manifestação de sintomas mais graves. Além dos sintomas já descritos, também há relatos de prolongamento do intervalo QT no ECG, depressão da contração miocárdica e arritmias fatais (Strauss, 1996). Do mesmo modo, pode haver hipotensão diante da reação ao citrato (Goodnough, 1999), a qual talvez seja decorrente da referida depressão da função do miocárdio e também do relaxamento da musculatura lisa (Bunker, 1962).

Os fatores que influenciam a taxa de reações ao citrato, tanto na aférese de doação como na terapêutica, incluem alcalose decorrente de hiperventilação (Strauss, 1996); tipo de solução anticoagulante utilizada, com taxas maiores associadas ao ACD-A em comparação ao ACD-B (Szymanski, 1978); taxa de infusão da solução de anticoagulante (Strauss, 1996); quantidade de citrato infundida (Strauss, 1996); e níveis séricos de albumina do doador antes do início do procedimento de coleta (Bolan, 2003a). É preciso destacar que procedimentos de hemaférese com fluxo intermitente tendem a provocar reações ao citrato com mais frequência, uma vez que a taxa de infusão de citrato é maior quando a câmara de separação é esvaziada que nos procedimentos de aférese contínua. Ainda, o método pelo qual um aparelho calcula a dose de anticoagulante pode influenciar a taxa de reações entre certos subgrupos de doadores (Despotis, 1999).

O tratamento das reações ao citrato é relativamente simples quando as reações são detectadas logo no início. O tratamento inclui a redução da velocidade da reinfusão para permitir a diluição e metabolização do citrato, o aumento da proporção sangue/citrato do paciente/doador para reduzir a quantidade de citrato infundida, a administração oral de cálcio em forma de antiácidos de cálcio, e a administração de cálcio via i.v. (Strauss, 1996).

A administração oral de carbonato de cálcio e seus efeitos sobre a toxicidade do citrato em doadores de plaquetas de aférese foram estudados por Bolan et al. (2003a, b). Constatou-se que a administração de 2 g de carbonato de cálcio estava associada a uma redução estatisticamente significativa do grau de severidade das parastesias (Bolan, 2003b). Em termos fisiológicos, entre todas as doses avaliadas, essa dose também estava associada à melhora mais satisfatória dos níveis de cálcio ionizado e cálcio total (Bolan, 2003a), embora não tenha apresentado relação com a redução do desenvolvimento de sintomas globais nem tenha afetado a ocorrência dos sintomas mais graves (Bolan, 2003b).

A administração endovenosa de cálcio (gliconato de cálcio ou cloreto de cálcio) usualmente é desnecessária em procedimentos de doação, embora seja comum em procedimentos de aférese terapêutica. Na coleta de CPrHs, foi demonstrado que a infusão contínua de gliconato de cálcio ou de cloreto de cálcio previne o desenvolvimento de sintomas hipocalcêmicos (Bolan, 2002; Buchta, 2003). O cloreto de cálcio mantém níveis maiores de cálcio ionizado (Buchta, 2003). Foi feita a comparação entre uma infusão contínua de gliconato de cálcio, uma infusão profilaticamente realizada no início da coleta de PFC e uma outra realizada no momento do aparecimento dos sintomas. Constatou-se que a infusão contínua manteve níveis de cálcio mais elevados, enquanto os demais tipos de administração promoveram alterações insignificantes (Kishimoto, 2002). No tratamento dos sintomas, usualmente é feita a administração i.v. de uma dose de 10 mL de gliconato de cálcio, infundida em 10 a 15 minutos (Hester, 1983). Em pacientes apresentando baixos níveis de cálcio ionizado antes do procedimento, o gliconato de cálcio pode ser administrado para fins profiláticos.

O magnésio é outro cátion divalente fisiologicamente importante. De modo semelhante ao cálcio, o magnésio também se liga ao citrato. Como resultado, a infusão do citrato nas condições de plasmaférese diminui em 30% o conteúdo de magnésio ionizado (Mercan, 1997). Mercan et al. (1997) também constataram que os níveis de magnésio caem mais rápido que os de cálcio durante a infusão de citrato, bem como se recuperam mais lentamente. A hipomagnesemia pode induzir sinais e sintomas similares aos da hipocalcemia, tais como espasmos musculares, fraqueza muscular, diminuição do tônus vascular e comprometimento da contratilidade cardíaca. Além disso, a hipomagnesemia também pode comprometer a homeostasia do cálcio e do potássio, com inibição da liberação do PTH diante de reduções acentuadas (Mercan 1997). Consequentemente, pacientes que apresentam baixos níveis de magnésio antes de serem submetidos à aférese podem desenvolver sinais e sintomas de toxicidade por citrato em decorrência da hipomagnesemia e não por causa da hipocalcemia. Pacientes que liberam cátions ligados, por serem incapazes de metabolizar rapidamente o citrato, também correm risco de exibir tais manifestações (Kamochi, 2002). Esses sintomas podem ser irresponsivos à suplementação com cálcio. Para evitar a hipomagnesemia, os níveis de magnésio anteriores à iniciação e suplementação com magnésio são quantificados, em algumas instituições, antes do início dos procedimentos, quando há indicação.

Como descrito, o citrato é rapidamente metabolizado. Esse processo consome íons de hidrogênio e, por esse motivo, é possível que o paciente desenvolva alcalose metabólica em decorrência da infusão do citrato. O risco de alcalose é maior em pacientes com doença renal que não excretam adequadamente o bicarbonato (Kelleher, 1987), bem como naqueles que recebem líquido de reposição contendo citrato (Dzik, 1988; Kelleher, 1987). Em um estudo comparativo, foi demonstrado que o grupo de pacientes com TTP submetidos à troca de plasma e reposição com PFC apresentou maior incidência de alcalose metabólica que os pacientes com MG submetidos à troca de plasma e reposição com solução de albumina (Marques, 2001). Os pacientes com TTP apresentaram níveis médios de creatinina de 1,3 mg/dL e BUN médio de 24,8 mg/dL (Marques, 2001). Embora a alcalose metabólica observada nesses pacientes não tenha atingido valores críticos (> 35 mEq/L de HCO_3^-) e a suspensão da plasmaférese a tenha eliminado, foi associada a quedas críticas nos níveis de potássio (< 3 mEq/L) durante a execução dos procedimentos (Mercan, 1997). A ocorrência de alcalose pode piorar a hipocalcemia (Edmondson, 1975) e lentificar o metabolismo do citrato (Dzik, 1988). Infelizmente, os sintomas de alcalose metabólica são inespecíficos, usualmente se manifestando como piora dos sintomas de hipocalcemia. A alcalose se resolve com o tempo ou pelo uso da diálise, podendo ser evitada pela redução da quantidade de citrato infundida, que é obtida pelo ajuste da proporção sangue/citrato e/ou pelo uso de líquidos de reposição isentos de citrato (Pearl, 1985).

A alcalose metabólica decorre de um deslocamento dos íons de hidrogênio a partir de localizações intracelulares (em uma tentativa de compensar o pH) acompanhado de um fluxo concomitante de potássio em direção ao meio intracelular, para manutenção da neutralidade elétrica. Em consequência, é possível haver quedas significativas dos níveis de potássio durante a coleta de grandes volumes de CPrHs, além daquelas observadas em pacientes com TTP anteriormente descritas. Schlenke et al. (2000) detectaram uma diminuição média de 11,3 ± 7% dos níveis de potássio em um estudo envolvendo 96 casos de leucaférese de grandes volumes. Apesar desse declínio, nenhum dos pacientes

envolvidos no estudo apresentou sintomas atribuíveis à hipocalemia, que incluem fraqueza, hipotonia ou arritmia cardíaca (Schlenke, 2000). O tratamento de tais complicações consistiria na reposição do potássio, seja por via oral ou endovenosa. Uma alternativa prudente seria prevenir a reação determinando os níveis de potássio antes de iniciar o procedimento, e administrar a suplementação, quando indicado.

Reações alérgicas, anafilactoides e anafiláticas

As reações alérgicas, anafilactoides e anafiláticas resultam da liberação de substâncias vasoativas, tais como histamina, leucotrieno C_4, leucotrieno D_4, prostaglandina D_2 e fator ativador de plaquetas, a partir de mastócitos e basófilos. A liberação dessas substâncias envolve anticorpos IgE existentes na superfície dessas células, sendo desencadeada pela ligação do antígeno-alvo à molécula de IgE. Como consequência, são produzidos diversos sintomas e há contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Mastócitos e basófilos também podem ser ativados por fatores derivados do complemento, tais como C3a e C5a, que podem ser gerados pela interação antígeno-IgG entre outros mecanismos (Vamvakas, 2001). Esses tipos de reações podem variar de urticárias brandas a reações anafiláticas com risco de vida. Os sinais e sintomas envolvidos são prurido, urticária, eritema, rubor, angioedema, obstrução das vias aéreas superiores e inferiores, hipotensão, choque, náusea, vômitos e diarreia (Vamvakas, 2001).

Há relatos de reações alérgicas tanto em doadores como em pacientes submetidos aos procedimentos de hemaférese. Entre os doadores, foram descritas reações envolvendo plaquetas, plasma e granulócitos. Nas doações de plaquetas e de plasma, foram descritas reações ao gás óxido de etileno, utilizado na esterilização do aparato de tubulações empregado na execução dos procedimentos (Leitman, 1986; Muylle, 1986). Essas reações ocorrem, predominantemente, em doadores submetidos a numerosos procedimentos anteriores. Acredita-se que, durante a execução dos procedimentos, o gás óxido de etileno, existente no plástico da tubulação, liga-se às proteínas plasmáticas. Estas, por sua vez, atuam como moléculas de transporte, enquanto o óxido de etileno serve de hapteno. A interação de ambos resulta na geração de uma resposta imune com produção de anticorpos IgE dirigidos contra o óxido de etileno. Na maioria dos doadores em que ocorre o fenômeno alérgico, são detectados anticorpos IgE contra o óxido de etileno (Leitman, 1986). As reações variam de urticária, vermelhidão e edema periorbital (Leitman, 1986) a uma reação anafilática constituída de sibilos, vermelhidão, inchaço dos lábios e hipotensão (Muylle, 1986). Em um dos estudos, a taxa global de reações foi de 1% para os doadores de plaquetas. Notavelmente, as reações também foram mais frequentes com o uso do Fenwal CS3000, em comparação ao Haemonetics V-50 (Haemonetics, Braintree, MA). Essa constatação foi atribuída ao fato de, no início do processamento com o Fenwal CS3000, ter sido infundida no paciente uma mistura de salina e anticoagulantes utilizada no condicionamento da bolsa. Isso não aconteceu quando o V-50 foi utilizado. Postulou-se que essa infusão resultou na formação de um bolo de óxido de etileno com consequente produção dos sintomas (Leitman, 1986).

Também há relatos da ocorrência de reações entre doadores de granulócitos. Além das reações ao óxido de etileno, pode haver outros mecanismos envolvidos. Os doadores de granulócitos são expostos ao HEA, seja de baixo ou de alto peso molecular, para intensificar a sedimentação das hemácias. Embora essas substâncias sejam imunógenos fracos incapazes de induzir formação de anticorpos, ocorrem reações alérgicas diante do uso de HEA na hemaférese (Dutcher, 1984) e como expansor de volume (Ring, 1977). O mecanismo por trás da produção das reações anafilactoides ao HEA parece decorrer da capacidade dessa substância de ativar a cascata do complemento. Como resultado, há produção de C3a e C5a, que causam degranulação de mastócitos e basófilos (Dutcher, 1984). As reações ao HEA descritas incluem urticária branda e reações severas, com parada respiratória e cardíaca. Em um estudo envolvendo pacientes tratados com HEA para expansão volumétrica, a taxa de reações foi de 0,085%, com reações severas (anafiláticas) ocorrendo em 0,006% dos casos (Ring, 1977). As reações ocorreram a ambas as formas de HEA – de alto peso molecular (hetamido) (Ring, 1977) e de baixo peso molecular (pentamilo) (Kannan, 1999). Em razão do risco desses efeitos, Dutcher et al. (1984) recomendaram a exclusão de indivíduos com história de alergias para doações de granulócitos.

Entre os pacientes submetidos à hemaférese terapêutica, podem ocorrer reações tanto ao óxido de etileno como ao HEA. Além disso, os procedimentos de plasmaférese terapêutica, com frequência, utilizam produtos do plasma, seja PFC ou plasma com sobrenadante de crio, como soluções de reposição. Em consequência, esses pacientes também correm risco de desenvolver reações alérgicas e anafiláticas decorrentes de reações transfusionais. A reação alérgica mais comum diante da infusão de produtos de plasma é a urticária. Essa reação ocorre em 1 a 3% das infusões de plasma e consiste no aparecimento de pápulas disseminadas na superfície corporal. A anafilaxia ocorre em um a cada 20 a 47 mil transfusões (Vamvakas, 2001). A causa mais comum dessa última reação é a infusão de plasma contendo IgA em indivíduos com deficiência de IgA que possuem anticorpos anti-IgA (Vamvakas, 2001).

O tratamento das reações alérgicas, anafilactoides e anafiláticas depende do grau de severidade de cada uma delas. Nas reações que ocorrem em doadores, o procedimento deve ser suspenso. Reações simples, como urticária, podem ser tratadas com anti-histamínicos orais (i. e., difenil-hidramina). O mesmo tratamento pode ser dispensado em caso de procedimentos terapêuticos, embora, nesse caso, seja possível reiniciar o procedimento após a administração do anti-histamínico; e também, o paciente pode ser pré-medicado com anti-histamínicos antes de iniciar procedimentos subsequentes.

As reações anafiláticas impõem risco de vida ao paciente. O procedimento, seja de doação, seja terapêutico, deve ser imediatamente descontinuado. O acesso vascular deve permanecer aberto utilizando-se salina. Nas reações menos severas, pode ser feita a administração de 0,3 a 0,5 mg de epinefrina via s.c., com repetição da dose a cada 20 a 30 minutos, no máximo 3 vezes. Além disso, o paciente pode receber 6 mg de aminofilina/kg para tratar broncoespasmos. Essa dose de carga deve ser acompanhada de uma infusão de 0,5 a 1 mg/kg por hora. Para casos de hipotensão, uma expansão volumétrica pode ser realizada com solução salina normal ou solução de Ringer lactato. Pacientes com angústia respiratória devem receber oxigênio. As reações severas devem ser tratadas com a administração de 0,5 mg de epinefrina via endovenosa, repetindo-se a dose a cada 5 a 10 minutos. A hipotensão irresponsiva ao volume também pode ser tratada com dopamina. As vias aéreas devem ser protegidas, sendo que pode haver indicação de intubação endotraqueal (Vamvakas, 2001).

Obviamente, o melhor curso de ação é evitar essas reações. Doadores que já desenvolveram tais reações devem ser excluídos para doações futuras. Pacientes que apresentam reações brandas devem ser pré-medicados com anti-histamínicos. Aqueles que apresentam reações severas por IgA devem receber líquidos de reposição isentos de IgA, sendo que, na maioria dos procedimentos, é possível utilizar solução de albumina ou salina. No caso de procedimentos que requerem reposição com plasma, como na troca de plasma para TTP, produtos de plasma isentos de IgA devem ser utilizados como líquido de reposição.

Inibidores da enzima conversora de angiotensina

O uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) por pacientes submetidos a procedimentos de hemaférese está associado à ocorrência de reações que apresentam diversas similaridades com as reações alérgicas previamente descritas. Tais reações consistem em vermelhidão, hipotensão, bradicardia e dispneia (Strauss, 1996). Foram observadas em pacientes submetidos à troca de plasma (Owen, 1994), aférese de LDL com colunas de sulfato de dextrana (Agishi, 1994) e tratamento com colunas de proteína estafilocócica A (Owen, 1994). Essas reações resultam da ativação do sistema de cininas e da geração de bradicinina quando o paciente entra em contato com o aparato de plástico de aférese negativamente carregado. Em circunstâncias normais, a bradicinina é rapidamente inativada pelas cininases I e II. Os inibidores de ACE, contudo, bloqueiam as ações dessas enzimas levando ao acúmulo de altas concentrações do mediador que produzem os sintomas anteriormente descritos (Strauss, 1996). Durante a troca de plasma com solução de albumina, o fator ativador de pré-calicreína contido na albumina também pode desencadear a formação de bradicinina (Owen, 1994). Mais uma vez, a presença de inibidores da ACE

evita a degradação dessa substância. É possível evitar essas reações com a retenção dos inibidores de ACE por 24 a 48 horas antes da realização dos procedimentos de hemaférese (Owen, 1994). Alguns inibidores de ACE mais modernos possuem meia-vida mais prolongada, de modo que pode ser necessário reter os fármacos por mais tempo ou substituí-los por inibidores de ACE com meia-vida mais curta.

Hipovolemia e reações vasovagais

A hipotensão pode ser observada na hemaférese de doação e também na hemaférese terapêutica, como resultado de dois mecanismos patofisiológicos distintos. No primeiro mecanismo, a hipotensão é consequência de uma depleção do volume intravascular causada pela presença de um volume excessivo no circuito extracorporal. Essas reações caracterizam-se tanto pelo aumento do tônus vascular como pelo aumento do débito cardíaco, uma vez que o sistema nervoso simpático tenta compensar a hipovolemia (Strauss, 1996). Um aumento da frequência cardíaca e da contratilidade leva ao aumento do débito cardíaco. Tais reações são incomuns entre doadores de hemaférese, pois os Standards for Blood Banks and Transfusion Services limitam a 10,5 mL/kg o volume permitido junto ao circuito extracorporal (Standards Committee of the American Association of Blood Banks, 2004) e os doadores também atendem às exigências de saúde e peso corporal estabelecidas. Nos procedimentos terapêuticos, o paciente possui uma doença subjacente que pode predispô-lo à hipovolemia. Exemplificando, constatou-se que a hipotensão é mais comum em pacientes com doenças neurológicas (McLeod, 1999). O Standards for Blood Banks and Transfusion Services não estabelece limites para o volume extracorporal durante a realização dos procedimentos de hemaférese terapêutica, ainda que a aplicação dos limites empregados durante o procedimento de hemaférese de doação possam parecer mais prudentes (Strauss, 1996).

O segundo mecanismo causador de hipotensão durante os procedimentos de hemaférese é a reação vasovagal. Nesta reação, a hipovolemia resulta na diminuição da pressão sanguínea. Como mencionado anteriormente, a resposta compensatória destina-se a aumentar o débito cardíaco e o tônus vascular. Durante a reação vasovagal, o débito parassimpático – que normalmente se contrapõe ao débito simpático – aumenta de maneira desproporcional e provoca diminuição da frequência cardíaca e do tônus vascular, resultando em hipotensão (Strauss, 1996). Os fatores associados a tais reações em doadores de sangue total incluem idade menor, baixo peso corporal, primeira doação e negligência da equipe (Newman, 1997). Tomita et al. (2002) avaliaram a incidência de reações vasovagais entre doadores de aférese e doadores de sangue total em um mesmo centro de coleta. Esses pesquisadores observaram que a incidência dessas reações entre os doadores de aférese aumentava com a idade, diferentemente das informações existentes sobre doadores de sangue total. O aumento da incidência das reações vasovagais associado à idade foi ainda mais comum entre mulheres, sendo considerado resultante de um menor volume de sangue circulante nessas populações (idosos e mulheres). Com isso, um maior percentual de sangue de doadores permanece junto ao circuito extracorporal durante a coleta. A consequente queda mais significativa da pressão sanguínea durante a coleta, por sua vez, provoca mais reações. Também foi observado um aumento da incidência com o aumento do número de ciclos durante a coleta, sendo teorizado que a hipocalemia estava envolvida no início das reações vasovagais (Tomita, 2002).

As reações hipovolêmicas e vasovagais são tratadas de modo semelhante. O procedimento deve ser temporariamente interrompido e um bolo líquido deve ser infundido. Se a reação foi causada pela hipovolemia, a pressão sanguínea deve aumentar e a frequência da pulsação deve cair em resposta a essa intervenção. Se a reação foi decorrente de uma reação vasovagal, a resposta será diferente. Os tratamentos adicionais para reações vasovagais incluem colocar o doador/paciente em posição de Trendelenburg (com a cabeça para baixo), aplicar compressas frias na testa e no pescoço, e tranquilizar o doador/paciente (Strauss, 1996).

Hidroxietilamido e coagulopatia

Conforme discutido na seção sobre plasmaférese, a remoção de plasma do paciente durante o procedimento de hemaférese terapêutica e a reposição do volume extraído com solução de albumina ou outro líquido isento de fatores de coagulação podem produzir anormalidades temporárias na coagulação. Essas alterações, em geral, têm curta duração e os níveis da maioria dos fatores de coagulação voltam ao normal em 24 a 48 horas. O uso de HEA, seja para reposição de volume ou como agente de sedimentação, também está associado a alterações dos níveis de fatores de coagulação. Ambas as formas de HEA, de alto (hetamido) e baixo (pentamilo) peso molecular, prolongam o PTT e diminuem os níveis de fibrinogênio. Acredita-se que essas ações resultem dos efeitos de diluição produzidos quando essas substâncias são infundidas. Apenas o HEA de alto peso molecular também está associado à diminuição da atividade do fator VIII, antígeno fator VIII e antígeno vWF, bem como ao prolongamento do tempo de sangramento (Strauss, 1988). Este último efeito é considerado resultante da diminuição dos níveis de antígeno vWF e pode representar um estado adquirido análogo ao da doença de von Willebrand. Por causa dessas alterações, há um risco de desenvolvimento de coagulopatias com o uso desses agentes. Esse risco parece ser dose-dependente. No cenário da expansão volumétrica na assistência crítica, foi sugerida uma dose máxima de HEA de 20 mL/kg/24 horas para evitar tais complicações. Doses de até 3.600 mL foram administradas nessas condições sem nenhuma dificuldade (Nearman, 1991). O perigo associado aos procedimentos de hemaférese reside na possível necessidade de realizar múltiplas coletas ou procedimentos terapêuticos em um doador/paciente em dias consecutivos. Como possui meia-vida longa, especialmente em sua forma de alto peso molecular, o HEA pode acumular-se durante o curso dos procedimentos de hemaférese e também há um potencial risco de desenvolvimento de coagulopatia.

Hidroxietilamido e outros efeitos colaterais

Como já mencionado, o HEA possui meia-vida longa. Esta, por sua vez, depende do metabolismo do HEA por uma α-amilase e subsequente excreção renal dos produtos de quebra (Yacobi, 1982). Foi relatado que o aparecimento de um prurido persistente em decorrência da deposição de HEA na pele é uma das complicações mais frequentes da administração de HEA. Foram detectados depósitos cutâneos da substância em um período de até 4 anos após a administração (Sirtl, 1999; Stander, 2001).

Além dos depósitos cutâneos, um relato de caso descreveu insuficiência de medula e de órgãos em um paciente submetido à troca de plasma crônica (20 meses) utilizando HEA como líquido de reposição. Nesse paciente, foram encontrados macrófagos espumosos contendo HEA substituindo a medula óssea, bem como infiltrando a mucosa duodenal, fígado, peritônio e dura-máter. Essas células também estavam presentes no líquido ascítico (Auwerda, 2002).

Êmbolos de ar

Êmbolos de ar constituem uma rara complicação dos procedimentos de hemaférese. Ocorrem diante da entrada de ar no sistema venoso por um vazamento no aparelho de hemaférese ou pelo acesso venoso. A entrada de ar no ventrículo direito e na artéria pulmonar resulta em obstrução do débito ventricular direito e vasoconstrição da artéria pulmonar (Montacer-Kuhssari, 1994). Os sintomas de embolismo de ar incluem dispneia, taquipneia, cianose, taquicardia e hipotensão. Trata-se de uma complicação rara porque todos os equipamentos modernos de hemaférese possuem sensores que detectam a presença de ar junto ao circuito extravascular e interrompem o procedimento. Caso ocorra formação de um êmbolo de ar, todavia, o tratamento consiste em colocar o doador/paciente em posição de Trendelenburg sobre a lateral esquerda do corpo. Esta manobra prende o ar no ápice do ventrículo direito, longe do fluxo do trato pulmonar, melhorando o fluxo ventricular direito. O ar se dissolve com o passar do tempo.

Resumo

Resumindo, a hemaférese representa uma técnica segura e efetiva para a produção de componentes sanguíneos necessários, bem como para o tratamento de diversas doenças. Embora seja frequentemente comparada à sangria praticada no século 18, a hemaférese tem poucas características em comum com essa técnica. É seletiva quanto ao que remove do doador/paciente e, além disso, é fundamentada na medicina baseada em evidências. Apesar de os procedimentos de hemaférese serem considerados seguros, não são isentos de risco e seu uso deve ser destinado apenas aos casos de doenças e distúrbios em que há real possibilidade de benefícios ou para os quais existam evidências sustentado tais benefícios.

Referências bibliográficas

Adachi S, Kubota M, Lin Y, et al: In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival in vitro. Eur J Haematol 1994; 53:129–134.

Adkins D, Goodgold H, Hendershott L, et al: Indium-labeled white blood cells apheresed from donors receiving G-CSF localize to sites of inflammation when infused into allogeneic bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant 1997a; 19:809–812.

Adkins D, Spitzer G, Johnston M, et al: Transfusions of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized granulocyte components to allogeneic transplant recipients: analysis of kinetics and factors determining post-transfusion neutrophil and platelet counts. Transfusion 1997b; 37:737–748.

Agishi T: Anion-blood contact reaction (ABC reaction) in patients treated by LDL apheresis with dextran sulfate-cellulose column while receiving ACE inhibitors. JAMA 1994; 271:195–196.

Aikawa A, Hadano T, Ohara T, et al: Donor specific antibody suppression in ABO incompatible kidney transplantation. Transplant Proc 2001; 33:395–397.

Alving BM, Hojima Y, Pisano JJ, et al: Hypotension associated with prekallikrein activator (Hageman-factor fragments) in plasma protein fraction. N Engl J Med 1978; 299:66–70.

American Association of Blood Banks Hemapheresis Committee: Guidelines for Therapeutic Hemapheresis. Bethesda, American Association of Blood Banks, 1995.

American Society for Apheresis Clinical Applications Committee: The clinical applications of therapeutic apheresis. J Clin Apheresis 2000; 15: 1–5.

Revisão atualizada da aférese. Inclui a classificação das indicações com base nas evidências científicas disponíveis, discussões dessas evidências e protocolos de tratamento recomendados.

Amorosi EL, Karpatkin S: Antiplatelet treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 1977; 86:102–106.

Antozzi C, Gemma M, Regi B, et al: A short plasma exchange protocol is effective in severe myasthenia gravis. J Neurol 1991; 238:103–107.

Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, et al: Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. Thromb Res 1985; 38:469–479.

Auwerda JJ, Wilson JH, Sonneveld P: Foamy macrophage syndrome due to hydroxyethyl starch replacement: a severe side effect in plasmapheresis. Ann Intern Med 2002; 137:1013–1014.

Azevedo AM, Tabak DG: Life-threatening capillary leak syndrome after G-CSF mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation. Bone Marrow Transplant 2001; 28:311–312.

Baley JE, Stork EK, Warkentin PI, et al: Buffy coat transfusions in neutropenic neonates with presumed sepsis: a prospective, randomized trial. Pediatrics 1987; 80:712–720.

Balogun RA, Sahadevan M, Sevigny J, et al: Impact of therapeutic plasma exchange on cyclosporine kinetics during membrane-based lipid apheresis. Am J Kidney Dis 2001; 37:1286–1289.

Bambauer R, Schiel R, Latza R: Low-density lipoprotein apheresis: An overview. Ther Apher Dial 2003; 7:382–390.

Bandarenko N, Brecher ME: United States Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Apheresis Study Group (US TTP ASG): multicenter survey and retrospective analysis of current efficacy of therapeutic plasma exchange. J Clin Apheresis 1998; 13:133–141.

Baron BW, Mick R, Baron JM: Combined plateletpheresis and cytotoxic chemotherapy for symptomatic thrombocytosis in myeloproliferative disorders. Cancer 1993; 72:1209–1218.

Bear RA, Cole EH, Lang A, et al: Treatment of acute renal failure due to myeloma kidney. Can Med Assoc J 1980; 123:750–753.

Beeler SA, Giandelone JA, Axelrod FB: A blood center's motivation toward total apheresis collection. Transfusion 1997; 37(Suppl):113S.

Bell WR, Braine HG, Ness PM, et al: Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. N Engl J Med 1991; 325:398–403.

Bender JG, To LB, Williams S, et al: Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. J Hematother 1992; 1:329–341.

Bennett CL, Weinberg PD, Rozenberg-Ben-Dror K, et al: Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine. A review of 60 cases. Ann Intern Med 1998; 128:541–544.

Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, et al: Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. J Clin Oncol 1995; 13:2547–2555.

Bensinger WI, Price TH, Dale DC, et al: The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. Blood 1993; 81:1883–1888.

Bensinger WI, Buckner CD, Rowley S, et al: Treatment of normal donors with recombinant growth factors for transplantation of allogeneic blood stem cells. Bone Marrow Transplant 1996; 17:S19–S21.

Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al: Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. N Engl J Med 2001; 344:175–181.

Berkman EM, Orlin JB: Use of plasmapheresis and partial plasma exchange in the management of patients with cryoglobulinemia. Transfusion 1980; 20:171–178.

Bernstein SP, Humes HD: Reversible renal insufficiency in multiple myeloma. Arch Intern Med 1982; 142:2083–2086.

Blanchette VS, Hume HA, Levy GJ, et al: Guidelines for auditing pediatric blood transfusion practices. Am J Dis Child 1991; 145:787–796.

Bloch KJ, Maki DG: Hyperviscosity syndromes associated with immunoglobulin abnormalities. Semin Hematol 1973; 10:113–124.

Bock M, Heim MU, Schleich I, et al: Platelet crossmatching with Capture P: clinical relevance. Infusionstherapie 1989; 16:183–185.

Bolan CD, Cecco SA, Wesley RA, et al: Controlled study of citrate effects and response to i.v. calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation. Transfusion 2002; 42:935–946.

Bolan CD, Cecco SA, Yau YY, et al: Randomized placebo-controlled study of oral calcium carbonate supplementation in plateletpheresis: II. Metabolic effects. Transfusion 2003a; 43:1414–1422.

Bolan CD, Wesley RA, Yau YY, et al: Randomized placebo-controlled study of oral calcium carbonate administration in plateletpheresis: I. Associations with donor symptoms. Transfusion 2003b; 43:1403–1413.

Bolwell BJ, Goormastic M, Yanssens T, et al: Comparison of G-CSF with GM-CSF for mobilizing peripheral blood progenitor cells and for enhancing marrow recovery after autologous bone marrow transplant. Bone Marrow Transplant 1994; 14:913–918.

Bonilla MA, Dale D, Zeidler C, et al: Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenias. Br J Haematol 1994; 88:723–730.

Bosch T: Direct adsorption of lipoproteins from whole blood by DALI apheresis: technique and effects. Ther Apher 2001a; 5:239–243.

Bosch T, Wendler T: Extracorporeal plasma treatment in primary and recurrent focal segmental glomerular sclerosis: A review. Ther Apher 2001b; 5:155–160.

Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, et al: A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. Blood 1995; 86:3598–3603.

Brown RA, Adkins D, DiPersio J, et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is associated with an increased risk of chronic graft versus host disease. Blood 1997; 90:225a.

Brugger W, Bross KJ, Glatt M, et al: Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. Blood 1994; 83:636–640.

Buchta C, Macher M, Bieglmayer C, et al: Reduction of adverse citrate reactions during autologous large-volume PBPC apheresis by continuous infusion of calcium-gluconate. Transfusion 2003; 43:1615–1621.

Buckner CD, Clift RA, Thomas ED, et al: Early infectious complications in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia: effects of prophylactic measures. Infection 1983; 11:243–250.

Buffaloe GW, Heineken FG: Plasma volume nomograms for use in therapeutic plasma exchange. Transfusion 1983; 23:355–357.

Bunker JP, Bendixen HH, Murphy AJ: Hemodynamic effects of intravenously administered sodium citrate. N Engl J Med 1962; 266:372–377.

Burgstaler EA: Current instrumentation for apheresis. *In* McLeod BC, Price TH, Weinstein R (eds): Apheresis: Principles and Practice, 2nd ed. Bethesda, AABB Press, 2003, pp 95–130.

Burgstaler EA, Pineda AA: Hydroxyethylstarch as replacement in therapeutic plasma exchange. Prog Clin Biol Res 1990; 337:395–397.

Burgstaler EA, Pineda AA: Therapeutic cytapheresis: continuous flow versus intermittent flow apheresis systems. J Clin Apheresis 1994; 9:205–209.

Burgstaler EA, Pineda A: Therapeutic plasma exchange: A paired comparison of Fresenius AS104 vs. COBE Spectra. J Clin Apheresis 2001; 16:61–66.

Burgstaler EA, Pineda AA, Winters JL: Hematopoietic progenitor cell large volume leukapheresis (LVL) on the Fenwall Amicus blood separator. J Clin Apheresis 2004; 19:103–111.

Buss DH, Cashell AW, O'Connor ML, et al: Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: A study of 280 cases. Am J Med 1994; 96:247–253.

Cairo MS, Rucker R, Bennetts GA, et al: Improved survival of newborns receiving leukocyte transfusions for sepsis. Pediatrics 1984; 74:887–892.

Cairo MS, Worcester C, Rucker R, et al: Role of circulating complement and polymorphonuclear leukocyte transfusion in treatment and outcome in critically ill neonates with sepsis. J Pediatr 1987; 110:935–941.

Caspar CB, Seger RA, Burger J, et al: Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor. Blood 1993; 81:2866–2871.

Centurioni R, Bobbio-Pallavicini E, Porta C, et al: Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with high-dose immunoglobulins. Results in 17 patients. Italian Cooperative Group for TTP. Haematologica 1995; 80:325–331.

Chambers ME, McDonald BR, Hall FW, et al: Plasmapheresis for crescentic IgA nephropathy: a report of two cases and review of the literature. J Clin Apheresis 1999; 14:185–187.

Chirnside A, Urbaniak SJ, Prowse CV, et al: Coagulation abnormalities following intensive plasma exchange on the cell separator. II. Effects on factors I, II, V, VII, VIII, IX, X and antithrombin III. Br J Haematol 1981; 48:627–634.

Chopek M, McCullough J: Protein and biochemical changes during plasma exchange. *In* Berkman EM and Umlas J (eds): Therapeutic Hemapheresis. Washington, American Association of Blood Banks, 1980, pp 13–52.

Christensen I, Heald P: Photopheresis in the 1990s. J Clin Apheresis 1991; 6:216–220.

Christensen RD, Rothstein G, Anstall HB, et al: Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia, and depletion of mature marrow neutrophils. Pediatrics 1982; 70:1–6.

Ciszewski TS, Ralston S, Acteson D, et al: Protein levels and plasmapheresis intensity. Transfus Med 1993; 3:59–65.

COBE BCT: COBE Spectra red blood cell exchange inservice student workbook. Lakewood, COBE BCT, 1997.

Code of Federal Regulations. 21 CFR 640, Washington, DC: Government Printing Office, 4-1-2003.

Cohen DJ, Sherman WH, Osserman EF, et al: Acute renal failure in patients with multiple myeloma. Am J Med 1984; 76:247–256.

Cohen JA, Brecher ME, Bandarenko N: Cellular source of serum lactate dehydrogenase elevation in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. J Clin Apheresis 1998; 13:16–19.

Coppo P, Bussel A, Charrier S, et al: High-dose plasma infusion versus plasma exchange as early treatment of

thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic-uremic syndrome. Medicine (Baltimore) 2003; 82:27–38.
Cornblath DR, Asbury AK, Albers JW, et al: Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Report from an ad hoc subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. Neurology 1991; 41:617–618.
Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, et al: Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. J Clin Oncol 1990; 8:556–562.
Couriel D, Weinstein R: Complications of therapeutic plasma exchange: a recent assessment. J Clin Apheresis 1994; 9:1–5.
Crowther MA, Heddle N, Hayward CP, et al: Splenectomy done during hematologic remission to prevent relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 1996; 125:294–296.
Dalakas MC, Engel WK: Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy. Arch Neurol 1980a; 37:637–640.
Dalakas MC, Houff SA, Engel WK, et al: CSF 'monoclonal' bands in chronic relapsing polyneuropathy. Neurology 1980b; 30:864–867.
Dale DC, Liles WC, Llewellyn C, et al: Neutrophil transfusions: kinetics and functions of neutrophils mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone. Transfusion 1998; 38:713–721.
Dall'Amico R, Murer L: Extracorporeal photochemotherapy: a new therapeutic approach for allograft rejection. Transfus Apheresis Sci 2002; 26:197–204.
Dau PC: Plasmapheresis therapy in myasthenia gravis. Muscle Nerve 1980; 3:468–482.
Dau PC: Immunologic rebound. J Clin Apheresis 1995; 10:210–217.
Dau PC, Lindstrom JM, Cassel CK, et al: Plasmapheresis and immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis. N Engl J Med 1977; 297:1134–1140.
Davies SC, Roberts-Harewood M: Blood transfusion in sickle cell disease. Blood Rev 1997; 11:57–71.
Dawson RB, Brown JA, Mahalati K, et al: Durable remissions following prolonged plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Clin Apheresis 1994; 9:112–115.
DeFronzo RA, Cooke CR, Wright JR, et al: Renal function in patients with multiple myeloma. Medicine (Baltimore) 1978; 57:151–166.
Delikouras A, Dorling A: Transplant accommodation. Am J Transplant 2003; 3:917–918.
Derksen RH, Schuurman HJ, Gmelig Meyling FH, et al: Rebound and overshoot after plasma exchange in humans. J Lab Clin Med 1984a; 104:35–43.
Derksen RH, Schuurman HJ, Meyling FH, et al: The efficacy of plasma exchange in the removal of plasma components. J Lab Clin Med 1984b; 104:346–354.
Despotis GJ, Goodnough LT, Dynis M, et al: Adverse events in platelet apheresis donors: A multivariate analysis in a hospital-based program. Vox Sang 1999; 77:24–32.
Dettke M, Hlousek M, Kurz M, et al: Increase in endogenous thrombopoietin in healthy donors after automated plateletpheresis. Transfusion 1998; 38:449–453.
Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, et al: Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. Vox Sang 1994; 66:200–205.
Dreger P, Marquardt P, Haferlach T, et al: Effective mobilisation of peripheral blood progenitor cells with 'Dexa-BEAM' and G-CSF: Timing of harvesting and composition of the leukapheresis product. Br J Cancer 1993; 68:950–957.
Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, et al: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. Blood 1988; 72:2074–2081.
Duquesnoy RJ: Donor selection in platelet transfusion therapy of alloimmunized thrombocytopenic patients. *In* Greenwalt TJ, Jamieson GA (eds): The blood platelet in transfusion therapy. New York, Alan R Liss, 1978, pp 229–243.
Dutcher JP, Schiffer CA, Johnston GS, et al: Alloimmunization prevents the migration of transfused indium-111-labeled granulocytes to sites of infection. Blood 1983; 62:354–360.
Dutcher JP, Aisner J, Hogge DE, et al: Donor reaction to hydroxyethyl starch during granulocytapheresis. Transfusion 1984; 24:66–67.
Dutcher JP, Schiffer CA, Wiernik PH: Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. J Clin Oncol 1987; 5:1364–1372.
Dyck PJ, Lais AC, Ohta M, et al: Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. Mayo Clin Proc 1975; 50:621–637.
Dyck PJ, Daube J, O'Brien P, et al: Plasma exchange in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. N Engl J Med 1986; 314:461–465.
Dyck PJ, Litchy WJ, Kratz KM, et al: A plasma exchange versus immune globulin infusion trial in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Ann Neurol 1994; 36:838–845.
Dzik WH, Kirkley S: Citrate toxicity during massive blood transfusion. Transfus Med Rev 1988; 2:76–94.
Edmondson JW, Brashear RE, Li T: Tetany: Quantitative interrelationships between calcium and alkalosis. Am J Physiol 1975; 228:1082–1086.
Erickson SB, Kurtz SB, Donadio JV Jr, et al: Use of combined plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of Goodpasture's syndrome. Mayo Clin Proc 1979; 54:714–720.
Evenson DA, Perry E, Kloster B, et al: Therapeutic apheresis for babesiosis. J Clin Apheresis 1998; 13:32–36.
Filshie RJ: Cytokines in haemopoietic progenitor mobilisation for peripheral blood stem cell transplantation. Curr Pharm Des 2002; 8:379–394.
Flaum MA, Cuneo RA, Appelbaum FR, et al: The hemostatic imbalance of plasma-exchange transfusion. Blood 1979; 54:694–702.
Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, et al: Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. Blood 2002; 100:415–419.
Foerster J: Cryoglobulins and cryoglobulinemia. *In* Lee GR, Bithell TC, Foerster J (eds): Wintrobe's Clinical Hematology. 9th ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1993a, pp 2284–2293.
Foerster J: Plasma cell dyscrasias: General considerations. *In* Lee GR, Bithell TC, Foerster J (eds): Wintrobe's Clinical Hematology. 9th ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1993b, pp 2202–2218.
Food and Drug Administration (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research): Guideline for the Collection of Platelets, Pheresis Prepared by Automated Methods. Bethesda, Maryland, 1988.
Food and Drug Administration (Division of Blood and Blood Products, Center for Biologics Evaluation and Research): Recommendations for Collecting Red Blood Cells by Automated Apheresis Methods. Bethesda, MD, Maryland, 2001.
Foss FM, Gorgun G, Miller KB: Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant 2002; 29:719–725.
Fruehauf S, Seggewiss R: It's moving day: factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement. Br J Haematol 2003; 122:360–375.
Furlan M, Lammle B: Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Baillières Clin Haematol 1998a; 11:509–514.
Furlan M, Robles R, Solenthaler M, et al: Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1997; 89:3097–3103.
Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle B: Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1998b; 91:2839–2846.
Gajdos P, Chevret S, Clair B, et al: Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Clinical Study Group. Ann Neurol 1997; 41:789–796.
Gaskin G, Pusey CD: Plasmapheresis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. Ther Apher 2001; 5:176–181.
Gazitt Y, Tian E, Barlogie B, et al: Differential mobilization of myeloma cells and normal hematopoietic stem cells in multiple myeloma after treatment with cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1996; 87:805–811.
Ghodsi Z, Strauss RG: Cataracts in neutrophil donors stimulated with adrenal corticosteroids. Transfusion 2001; 41:1464–1468.
Gilcher RO: Apheresis: principles and practice. *In* Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould SA (eds): Principles of Transfusion Medicine. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, pp 537–545.
Gilcher RO: It's time to end RBC shortages. Transfusion 2003; 43:1658–1660.
Giles FJ, Shen Y, Kantarjian HM, et al: Leukapheresis reduces early mortality in patients with acute myeloid leukemia with high white cell counts but does not improve long-term survival. Leuk Lymphoma 2001; 42:67–73.
Gillespie TW, Hillyer CD: Peripheral blood progenitor cells for marrow reconstitution: mobilization and collection strategies. Transfusion 1996; 36:611–624.
Glasser L, Huestis DW, Jones JF: Functional capabilities of steroid-recruited neutrophils harvested for clinical transfusion. N Engl J Med 1977; 297:1033–1036.
Gloor JM, DeGoey SR, Pineda AA, et al: Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. Am J Transplant 2003a; 3:1017–1023.
Gloor JM, Lager DJ, Moore SB, et al: ABO-incompatible kidney transplantation using both A2 and non-A2 living donors. Transplantation 2003b; 75:971–977.
Glowitz RJ, Slichter SJ: Frequent multiunit plateletpheresis from single donors: Effects on donors' blood and the platelet yield. Transfusion 1980; 20:199–205.
Goldberg SL, Mangan KF, Klumpp TR, et al: Complications of peripheral blood stem cell harvesting: Review of 554 PBSC leukaphereses. J Hematother 1995; 4:85–90.
Goodnough LT, Ali S, Despotis G, et al: Economic impact of donor platelet count and platelet yield in apheresis products: Relevance for emerging issues in platelet transfusion therapy. Vox Sang 1999; 76:43–49.
Gordon BR, Stein E, Jones P, et al: Indications for low-density lipoprotein apheresis. Am J Cardiol 1994; 74:1109–1112.
Gorlin J, Stefan M: Evaluation of adverse events of donating two unit-red blood cells on a new automated component collection system. Transfusion 2003; 43(Suppl):43A.
Goss GA, Weinstein R: Pentastarch as partial replacement fluid for therapeutic plasma exchange: Effect on plasma proteins, adverse events during treatment, and serum ionized calcium. J Clin Apheresis 1999; 14:114–121.
Grishaber JE, Cunningham MC, Rohret PA, et al: Analysis of venous access for therapeutic plasma exchange in patients with neurological disease. J Clin Apheresis 1992; 7:119–123.
Guillain–Barré Syndrome Study Group: Plasmapheresis and acute Guillain–Barré syndrome. Neurology 1985; 35:1096–1104.
Gutterman LA, Stevenson TD: Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with vincristine. JAMA 1982; 247:1433–1436.
Hahn AF, Bolton CF, Pillay N, et al: Plasma-exchange therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, sham-controlled, cross-over study. Brain 1996; 119:1055–1066.
Hale GA, Reece DE, Munn RK, et al: Blood tacrolimus concentrations in bone marrow transplant patients undergoing plasmapheresis. Bone Marrow Transplant 2000; 25:449–451.
Hand JP, Lawlor ER, Yong CK, et al: Successful use of cyclosporine A in the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1998; 100:597–599.
Hausfater P, Cacoub P, Assogba U, et al: Plasma exchange and interferon-alpha pharmacokinetics in patients with hepatitis C virus-associated systemic vasculitis. Nephron 2002; 91:627–630.
Heddle NM: Febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelets. Curr Opin Hematol 1995; 2:478–483.
Heimfeld S: Bone marrow transplantation: how important is CD34 cell dose in HLA-identical stem cell transplantation? Leukemia 2003; 17:856–858.

Heininger K, Liebert UG, Toyka KV, et al: Chronic inflammatory polyneuropathy. Reduction of nerve conduction velocities in monkeys by systemic passive transfer of immunoglobulin G. J Neurol Sci 1984; 66:1–14.
Hester JP, McCullough J, Mishler JM, et al: Dosage regimens for citrate anticoagulants. J Clin Apheresis 1983; 1:149–157.
Hester JP, Dignani MC, Anaissie EJ, et al: Collection and transfusion of granulocyte concentrates from donors primed with granulocyte stimulating factor and response of myelosuppressed patients with established infection. J Clin Apheresis 1995; 10:188–193.
Heyns AP, Badenhorst PN, Lotter MG, et al: Kinetics and mobilization from the spleen of Indium-111-labeled platelets during platelet apheresis. Transfusion 1985; 25:215–218.
Higby DJ, Henderson ES, Burnett D, et al: Filtration leukapheresis: effects of donor stimulation with dexamethasone. Blood 1977; 50:953–959.
Hillyer CD, Berkman EM: Plasma exchange in dysproteinemias. *In* Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould SA (eds): Principles of Transfusion Medicine. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, pp 569–575.
Hubel K, Carter RA, Liles WC, et al: Granulocyte transfusion therapy for infections in candidates and recipients of HPC transplantation: A comparative analysis of feasibility and outcome for community donors versus related donors. Transfusion 2002; 42:1414–1421.
Huestis DW: Risks and safety practices in hemapheresis procedures. Arch Pathol Lab Med 1989; 113:273–278.
Huestis DW, Morrison FS: Adverse effects of immune adsorption with staphylococcal protein A columns. Transfus Med Rev 1996; 10:62–70.
Hughes RA: Plasma exchange in Guillain–Barré syndrome and related disorders. Transfus Sci 1993; 14:3–8.
Hughes RA, Newsom-Davis JM, Perkin GD, et al: Controlled trial prednisolone in acute polyneuropathy. Lancet 1978; 2:750–753.
Hussein MA, Lee EJ, Fletcher R, et al: The effect of lymphocytotoxic antibody reactivity on the results of single antigen mismatched platelet transfusions to alloimmunized patients. Blood 1996; 87:3959–3962.
Hymes KB, Karpatkin S: Human immunodeficiency virus infection and thrombotic microangiopathy. Semin Hematol 1997; 34:117–125.
Iacone A, Di Bartolomeo P, Di Girolamo G, et al: Hydroxyethyl starch and steroid improved collection of normal granulocytes with continuous flow centrifugation gravity leukapheresis. Haematologica 1981; 66:645–655.
Isbister JP: Cytapheresis: the first 25 years. Ther Apher 1997; 1:17–21.
Iwasaki Y, Kinoshita M, Ikeda K, et al: Neuropsychological function before and after plasma exchange in myasthenia gravis. J Neurol Sci 1993; 114:223–226.
Jaeger BR, Marx P, Pfefferkorn T, et al: Heparin-mediated extracorporeal LDL/fibrinogen precipitation – H.E.L.P. – in coronary and cerebral ischemia. Acta Neurochir Suppl (Wien.) 1999; 73:81–84.
Jendiroba DB, Lichtiger B, Anaissie E, et al: Evaluation and comparison of three mobilization methods for the collection of granulocytes. Transfusion 1998; 38:722–728.
Johnson JP, Whitman W, Briggs WA, et al: Plasmapheresis and immunosuppressive agents in antibasement membrane antibody-induced Goodpasture's syndrome. Am J Med 1978; 64:354–359.
Johnson WJ, Kyle RA, Dahlberg PJ: Dialysis in the treatment of multiple myeloma. Mayo Clin Proc 1980; 55:65–72.
Johnson JP, Moore J Jr, Austin HA III, et al: Therapy of anti-glomerular basement membrane antibody disease: analysis of prognostic significance of clinical, pathologic and treatment factors. Medicine (Baltimore) 1985; 64:219–227.
Johnson WJ, Kyle RA, Pineda AA, et al: Treatment of renal failure associated with multiple myeloma. Plasmapheresis, hemodialysis, and chemotherapy. Arch Intern Med 1990; 150:863–869.
Joos K, Herzog R, Einsele H, et al: Characterization and functional analysis of granulocyte concentrates collected from donors after repeated G-CSF stimulation. Transfusion 2002; 42:603–611.
Jovin IS, Taborski U, Muller-Berghaus G: Comparing low--density lipoprotein apheresis procedures: difficulties and remedies. J Clin Apheresis 1996; 11:186–170.
Kale-Pradhan PB, Woo MH: A review of the effects of plasmapheresis on drug clearance. Pharmacotherapy 1997; 17:684–695.
Revisão extensiva da literatura sobre os efeitos da troca de plasma na depuração e metabolismo de fármacos. O artigo fornece sugestões para modificações de terapia, bem como sugestões de pesquisas futuras.
Kamanabroo D, Ulrich K, Grobe H, et al: Plasma exchange in type II hypercholesterolemia. Prog Clin Biol Res 1988; 255:347–354.
Kamochi M, Aibara K, Nakata K, et al: Profound ionized hypomagnesemia induced by therapeutic plasma exchange in liver failure patients. Transfusion 2002; 42:1598–1602.
Kannan S, Milligan KR: Moderately severe anaphylactoid reaction to pentastarch (200/0.5) in a patient with acute severe asthma. Intensive Care Med 1999; 25:220–222.
Kaplinsky C, Trakhtenbrot L, Hardan I, et al: Tetraploid myeloid cells in donors of peripheral blood stem cells treated with rhG-CSF. Bone Marrow Transplant 2003; 32:31–34.
Katz AJ, Genco PV, Blumberg N, et al: Platelet collection and transfusion using the Fenwal CS-3000 cell separator. Transfusion 1981; 21:560–563.
Kelleher SP, Schulman G: Severe metabolic alkalosis complicating regional citrate hemodialysis. Am J Kidney Dis 1987; 9:235–236.
Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, et al: High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. Blood 1989; 74:1260–1265.
Kessinger A, Bishop MR, Anderson JR, et al: Comparison of subcutaneous and intravenous administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony--stimulating factor for peripheral blood stem cell mobilization. J Hematother 1995; 4:81–84.
Kessinger A, Sharp JG: The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. Bone Marrow Transplant 2003; 31:319–329.
Kishimoto M, Ohto H, Shikama Y, et al: Treatment for the decline of ionized calcium levels during peripheral blood progenitor cell harvesting. Transfusion 2002; 42:1340–1347.
Klingel R, Fassbender C, Fassbender T, et al: Clinical studies to implement rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine. Transfus Apheresis Sci 2003; 29:71–84.
Knobler RM, Trautinger F, Graninger W, et al: Parenteral administration of 8-methoxypsoralen in photopheresis. J Am Acad Dermatol 1993; 28:580–584.
Koch-Weser J, Sellers EM: Binding of drugs to serum albumin (first of two parts). N Engl J Med 1976; 294:311–316.
Korbling M: Effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy subjects. Curr Opin Hematol 1998; 5:209–214.
Korbling M, Huh YO, Durett A, et al: Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. Blood 1995; 86:2842–2848.
Koski CL, Humphrey R, Shin ML: Anti-peripheral myelin antibody in patients with demyelinating neuropathy: quantitative and kinetic determination of serum antibody by complement component 1 fixation. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:905–909.
Koski CL, Gratz E, Sutherland J, et al: Clinical correlation with anti-peripheral-nerve myelin antibodies in Guillain–Barré syndrome. Ann Neurol 1986; 19:573–577.
Kroger N, Zander AR: Dose and schedule effect of G-GSF for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. Leuk Lymphoma 2002; 43:1391–1394.
Lane DM, McConathy WJ, Laughlin LO, et al: Weekly treatment of diet/drug-resistant hypercholesterolemia with the heparin-induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation (HELP) system by selective plasma low-density lipoprotein removal. Am J Cardiol 1993; 71:816–822.
Lapidot T, Petit I: Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol 2002; 30:973–981.
Lasky LC, Lin A, Kahn RA, et al: Donor platelet response and product quality assurance in plateletpheresis. Transfusion 1981; 21:247–260.
Laurenti F, Ferro R, Isacchi G, et al: Polymorphonuclear leukocyte transfusion for the treatment of sepsis in the newborn infant. J Pediatr 1981; 98:118–123.
Lazarus EF, Browning J, Norman J, et al: Sustained decreases in platelet count associated with multiple, regular plateletpheresis donations. Transfusion 2001; 41:756–761.
Lee JH, Klein HG: Collection and use of circulating hematopoietic progenitor cells. Hematol Oncol Clin North Am 1995a; 9:1–22.
Lee JH, Leitman SF, Klein HG: A controlled comparison of the efficacy of hetastarch and pentastarch in granulocyte collections by centrifugal leukapheresis. Blood 1995b; 86:4662–4666.
Leitman SF, Boltansky H, Alter HJ, et al: Allergic reactions in healthy plateletpheresis donors caused by sensitization to ethylene oxide gas. N Engl J Med 1986; 315:1192–1196.
Leitman SF, Smith JW, Gregg RE: Homozygous familial hypercholesterolemia. Selective removal of low-density lipoproteins by secondary membrane filtration. Transfusion 1989; 29:341–346.
Lercari G, Paganini G, Malfanti L, et al: Apheresis for severe malaria complicated by cerebral malaria, acute respiratory distress syndrome, acute renal failure, and disseminated intravascular coagulation. J Clin Apheresis 1992; 7:93–96.
Leren TP, Fagerhol MK, Leren P: Sixteen years of plasma exchange in a homozygote for familial hypercholesterolemia. J Int Med 1993; 233:195–200.
Lester TJ, Johnson JW, Cuttner J: Pulmonary leukostasis as the single worst prognostic factor in patients with acute myelocytic leukemia and hyperleukocytosis. Am J Med 1985; 79:43–48.
Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 2001a; 413:488–494.
Levy J, Degani N: Correcting immune imbalance: The use of Prosorba column treatment for immune disorders. Ther Apher Dial 2003; 7:197–205.
Levy JB, Turner AN, Rees AJ, et al: Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. Ann Intern Med 2001b; 134:1033–1042.
Lewis SL, Kutvirt SG, Bonner PN, et al: Effect of long-term platelet donation on lymphocyte subsets and plasma protein concentrations. Transfus Sci 1999; 18:205–213.
Lieschke GJ, Burgess AW: Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). N Engl J Med 1992; 327:99–106.
Liesveld JL: Expression and function of adhesion receptors in acute myelogenous leukemia: parallels with normal erythroid and myeloid progenitors. Acta Haematol 1997; 97:53–62.
Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ: Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. Blood 1995; 86:3181–3188.
Liles WC, Huang JE, Llewellyn C, et al: A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for the mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. Transfusion 1997; 37:182–187.
Liles WC, Rodger E, Dale DC: Combined administration of G-CSF and dexamethasone for the mobilization of granulocytes in normal donors: optimization of dosing. Transfusion 2000; 40:642–644.
Lin JS, Burgstaler EA, Pineda AA, et al: Effects of whole blood flow rates on mononuclear cell yields during peripheral blood stem cell collection using Fenwal CS 3000 Plus. J Clin Apheresis 1995; 10:7–11.
Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, et al: Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. Neurology 1976; 26:1054–1059.

Lysaght MJ, Samtleben WS: Closed-loop plasmapheresis. *In* MacPherson JL, Kasprisin DO (eds): Therapeutic Hemapheresis. Boca Raton, CRC Press, 1985, pp 149–168.

McClellan SD, Whitaker CH, Friedberg RC: Removal of vancomycin during plasmapheresis. Ann Pharmacother 1997; 31:1132–1136.

McCrae KR, Cines DB: Thrombotic microangiopathy during pregnancy. Semin Hematol 1997; 34:148–158.

McCullough J, Clay M, Hurd D, et al: Effect of leukocyte antibodies and HLA matching on the intravascular recovery, survival, and tissue localization of 111-indium granulocytes. Blood 1986; 67:522–528.

McCullough J, Clay M, Loken M, et al: Effect of ABO incompatibility on the fate in vivo of 111indium granulocytes. Transfusion 1988; 28:358–361.

McGrath MA, Penny R: Paraproteinemia: Blood hyperviscosity and clinical manifestations. J Clin Invest 1976; 58:1155–1162.

McLeod BC: Introduction to the third special issue: Clinical applications of therapeutic apheresis. J Clin Apheresis 2000; 15:1–5.

McLeod BC, Sassetti RJ: Plasmapheresis with return of cryoglobulin-depleted autologous plasma (cryoglobulinpheresis) in cryoglobulinemia. Blood 1980; 55:866–870.

McLeod BC, Strauss RG, Ciavarella D, et al: Management of hematological disorders and cancer. J Clin Apheresis 1993; 8:211–230.

McLeod BC, Price TH, Owen H, et al: Frequency of immediate adverse effects associated with apheresis donation. Transfusion 1998; 38:938–943.

McLeod BC, Sniecinski I, Ciavarella D, et al: Frequency of immediate adverse effects associated with therapeutic apheresis. Transfusion 1999; 39:282–288.

McLeod BC, Price TH, Weinstein R (eds): Apheresis: Principles and Practice, 2nd ed. Bethesda, AABB Press, 2003.

Livro-texto abrangente, que aborda a aférese tanto do doador como terapêutica, incluindo a história da aférese, instrumentação atualmente disponível e discussão aprofundada dos mecanismos de ação e da fisiologia da aférese.

MacPherson JL, Nusbacher J, Bennett JM: The acquisition of granulocytes by leukapheresis: a comparison of continuous flow centrifugation and filtration leukapheresis in normal and corticosteroid-stimulated donors. Transfusion 1976; 16:221–228.

Mansur LI, Murrow RW, Garrelts JC, et al: Rebound of plasma free phenytoin concentration following plasmapheresis in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. Ann Pharmacother 1995; 29:592–595.

Marques MB, Huang ST: Patients with thrombotic thrombocytopenic purpura commonly develop metabolic alkalosis during therapeutic plasma exchange. J Clin Apheresis 2001; 16:120–124.

Maselli RA: Pathophysiology of myasthenia gravis and Lambert–Eaton syndrome. Neurol Clin 1994; 12:285–303.

Matic G, Bosch T, Ramlow W: Background and indications for protein A-based extracorporeal immunoadsorption. Ther Apher 2001; 5:394–403.

Matsuda Y, Malchesky PS, Nose Y: Assessment of currently available low-density lipoprotein apheresis systems. Artif Organs 1994; 18:93–99.

Matsuzaki M., Hiramori K, Imaizumi T, et al: Intravascular ultrasound evaluation of coronary plaque regression by low density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: the Low Density Lipoprotein-Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial (LACMART). J Am Coll Cardiol 2002; 40:220–227.

Mendell JR, Kissel JT, Kennedy MS, et al: Plasma exchange and prednisone in Guillain–Barré syndrome: a controlled randomized trial. Neurology 1985; 35:1551–1555.

Mercan D, Bastin G, Lambermont M, et al: Importance of ionized magnesium measurement for monitoring of citrate-anticoagulated plateletpheresis. Transfusion 1997; 37:418–422.

Meyer D, Bolgiano DC, Sayers M, et al: Red cell collection by apheresis technology. Transfusion 1993; 33:819–824.

Mistry-Burchardi N, Schonermarck U, Samtleben W: Apheresis in lupus nephritis. Ther Apher 2001; 5:161–170.

Moake JL: Thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 1995; 74:240–245.

Moake JL, McPherson PD: Abnormalities of von Willebrand factor multimers in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. Am J Med 1989; 87:9N–15N.

Mokrzycki MH, Kaplan AA: Therapeutic plasma exchange: Complications and management. Am J Kidney Dis 1994; 23:817–827.

Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M: Appendix 5. *In*: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed. Malden, Blackwell Science, 1998, pp 561–561.

Montacer-Kuhssari J, Voller H, Keller F: Pulmonary air embolism. Intensive Care Med 1994; 20:166–167.

Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, et al: Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. Transplantation 2000; 70:887–895.

Moog R, Muller N: Technical aspects and performance in collecting peripheral blood progenitor cells. Ann Hematol 1998; 77:143–147.

Murata M, Harada M, Kato S, et al: Peripheral blood stem cell mobilization and apheresis: analysis of adverse events in 94 normal donors. Bone Marrow Transplant 1999; 24:1065–1071.

Murphy MF, Waters AH: Clinical aspects of platelet transfusions. Blood Coagul Fibrinolysis 1991; 2:389–396.

Muylle L, Baeten M, Avonts G, et al: Anaphylactoid reaction in platelet-pheresis donor with IgE antibodies to ethylene oxide. Lancet 1986; 2:1225.

Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T: Prediction of blood volume in normal human adults. Surgery 1962; 5:224.

Nagler A, Korenstein-Ilan A, Amiel A, et al: Granulocyte colony-stimulating factor generates epigenetic and genetic alterations in lymphocytes of normal volunteer donors of stem cells. Exp Hematol 2004; 32:122–130.

Naik B, Hirshhorn S, Dharnidharka VR: Prolonged neuromuscular block due to cholinesterase depletion by plasmapheresis. J Clin Anesth 2002; 14:381–384.

National Blood Data Resource Center (National Blood Data Resource Center): Comprehensive Report on Blood Collection and Transfusion in the United States in 1999. Bethesda, MD, Maryland, 2001.

Nearman HS, Herman ML: Toxic effects of colloids in the intensive care unit. Crit Care Clin 1991; 7:713–723.

Nesher G, Hanna VE, Moore TL, et al: Thrombotic microangiographic hemolytic anemia in systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1994; 24:165–172.

Ness P, Braine H, King K, et al: Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. Transfusion 2001; 41:857–861.

Newman BH: Donor reactions and injuries from whole blood donation. Transfus Med Rev 1997; 11:64–75.

Noseworthy JH, Shumak KH, Vandervoort MK: Long-term use of antecubital veins for plasma exchange. The Canadian Cooperative Multiple Sclerosis Study Group. Transfusion 1989; 29:610–613.

O'Connell BA, Lee EJ, Rothko K, et al: Selection of histocompatible apheresis platelet donors by cross-matching random donor platelet concentrates. Blood 1992; 79:527–531.

Orlin JB, Berkman EM: Partial plasma exchange using albumin replacement: Removal and recovery of normal plasma constituents. Blood 1980; 56:1055–1059.

Owen HG, Brecher ME: Atypical reactions associated with use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and apheresis. Transfusion 1994; 34:891–894.

Parhofer KG, Geiss HC, Schwandt P: Efficacy of different low-density lipoprotein apheresis methods. Ther Apher 2000; 4:382–385.

Park WD, Grande JP, Ninova D, et al: Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. Am J Transplant 2003; 3:952–960.

Passos-Coelho JL, Braine HG, Davis JM, et al: Predictive factors for peripheral-blood progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony--stimulating
factor mobilization. J Clin Oncol 1995a; 13:705–714.

Passos-Coelho JL, Ross AA, Moss TJ, et al: Absence of breast cancer cells in a single-day peripheral blood progenitor cell collection after priming with cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1995b; 85:1138–1143.

Pearl DG, Rosenthal MH: Metabolic alkalosis due to plasmapheresis. Am J Med 1985; 79:391–393.

Perdue JJ, Chandler LK, Vesely SK, et al: Unintentional platelet removal by plasmapheresis. J Clin Apheresis 2001; 16:55–60.

Pettitt AR, Clark RE: Thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1994; 14:495–504.

Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain–Barré Syndrome Trial Group: Randomised trial of plasma exchange, intravenous immunoglobulin, and combined treatments in Guillain–Barré syndrome. Lancet 1997; 349:225–230.

Pool M, McLeod BC: Pyrogen reactions to human serum albumin during plasma exchange. J Clin Apheresis 1995; 10:81–84.

Popovsky MA, Whitaker B, Arnold NL: Severe outcomes of allogeneic and autologous blood donation: frequency and characterization. Transfusion 1995; 35:734–737.

Porcu P, Danielson CF, Orazi A, et al: Therapeutic leukapheresis in hyperleucocytic leukaemias: lack of correlation between degree of cytoreduction and early mortality rate. Br J Haematol 1997; 98:433–436.

Porcu P, Cripe LD, Ng EW, et al: Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: A review of pathophysiology, clinical presentation and management. Leuk Lymphoma 2000; 39:1–18.

Price TH: Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized granulocyte concentrate transfusions. Curr Opin Hematol 1998; 5:391–395.

Price TH, Dale DC: Blood kinetics and in vivo chemotaxis of transfused neutrophils: Effect of collection method, donor corticosteroid treatment, and short-term storage. Blood 1979; 54:977–986.

Przepiorka D, Suzuki J, Ippoliti C, et al: Blood tacrolimus concentration unchanged by plasmapheresis. Am J Hosp Pharm 1994; 51:1708.

Pusey CD, Lockwood CM, Peters DK: Plasma exchange and immunosuppressive drugs in the treatment of glomerulonephritis due to antibodies to the glomerular basement membrane. Int J Artif Organs 1983; 6(Suppl 1):15–18.

Quintana R, Smith KJ, James DS: Exercise performance in blood donors: a randomized, double blind comparison of sham, 1U, and 2U red cell donation. Transfusion 1995; 35(Suppl):14S.

Randerson DH, Blumenstein M, Habersetzer R, et al: Mass transfer in membrane plasma exchange. Artif Organs 1982; 6:43–49.

Raphael JC, Chevret S, Hughes RA, et al: Plasma exchange for Guillain–Barré syndrome. Cochrane Database Syst Rev 2:CD001798, 2002.

Revisão abrangente e crítica de toda a literatura disponível sobre a efetividade da troca de plasma no tratamento da AIDP.

Reik RA, Noto TA, Fernandez HF: Safety of large-volume leukapheresis for collection of peripheral blood progenitor cells. J Clin Apheresis 1997; 12:10–13.

Rice L, Tsai HM, Chow TW, et al: Increased von Willebrand factor (vWf)-platelet binding and decreased vWf-metalloproteinase in ticlopidine-induced thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Blood 1998; 92(Suppl 2):706a.

Richter WO, Jacob BG, Ritter MM, et al: Three-year treatment of familial heterozygous hypercholesterolemia by extracorporeal low-density lipoprotein immunoadsorption with polyclonal apolipoprotein B antibodies. Metabolism 1993; 42:888–894.

Ring J, Messmer K: Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. Lancet 1977; 1:466–469.

Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al: Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1991; 325:393–397.

Rock G, Shumak KH, Sutton DM, et al: Cryosupernatant as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. Members of the Canadian Apheresis Group. Br J Haematol 1996; 94:383–386.

Rock G, Sutton DM, Freedman J, et al: Pentastarch instead of albumin as replacement fluid for therapeutic plas-

ma exchange. The Canadian Apheresis Group. J Clin Apheresis 1997; 12:165–169.
Rogers RL, Johnson H, Ludwig G, et al: Efficacy and safety of plateletpheresis by donors with low-normal platelet counts. J Clin Apheresis 1995; 10:194–197.
Ropper AE, Albert JW, Addison R: Limited relapse in Guillain–Barré syndrome after plasma exchange. Arch Neurol 1988; 45:314–315.
Ropper AH: The Guillain–Barré syndrome. N Engl J Med 1992; 326:1130–1136.
Rouvier B, Maudan P, Debue JF, et al: Traitement par erythropherese d'un acces pernicieux palustre. Ann Fr Anesth Reanim 1988; 7:257–260.
Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, et al: Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. Am J Transplant 2001; 1:260–269.
Salmon SE, Cassady RJ: Plasma cell neoplasms. *In* DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Cancer: Principles and Practice of Oncology. 2nd ed. New York, Lippincott-Raven, 1997, pp 2344–2386.
Sanders DB, Scoppetta C: The treatment of patients with myasthenia gravis. Neurol Clin 1994; 12:343–368.
Sarode R, McFarland JG, Flomenberg N, et al: Therapeutic plasma exchange does not appear to be effective in the management of thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1995; 16:271–275.
Schafer AI: Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. Blood 1984; 64:1–12.
Schafer AI: Management of thrombocythemia. Curr Opin Hematol 1996; 3:341–346.
Schiffer CA: Management of patients refractory to platelet transfusion – an evaluation of methods of donor selection. Prog Hematol 1987; 15:91–113.
Schiffer CA: Granulocyte transfusions: an overlooked therapeutic modality. Transfus Med Rev 1990; 4:2–7.
Schlenke P, Frohn C, Steinhardt MM, et al: Clinically relevant hypokalemia, hypocalcemia, and loss of hemoglobin and platelets during stem cell apheresis. J Clin Apheresis 2000; 15:230–235.
Schulzeck P, Olbricht CJ, Koch KM: Long-term experience with extracorporeal low-density lipoprotein cholesterol removal by dextran sulfate cellulose adsorption. Clin Investig 1992; 70:99–104.
Schweitzer EJ, Wilson JS, Fernandez-Vina M, et al: A high panel-reactive antibody rescue protocol for cross-match-positive live donor kidney transplants. Transplantation 2000; 70:1531–1536.
Shehata N, Kouroukis C, Kelton JG: A review of randomized controlled trials using therapeutic apheresis. Transfus Med Rev 2002; 16:200–229.
Resumo de todas as triagens randomizadas controladas envolvendo a aférese terapêutica. Inclui diversas tabelas de resumo das triagens, bem como recomendações referentes aos protocolos de tratamento.
Siegel JF, Rich MA, Brock WA: Association of sickle cell disease, priapism, exchange transfusion and neurological events: ASPEN syndrome. J Urol 1993; 150:1480–1482.
Silberstein LE, Naryshkin S, Haddad JJ, et al: Calcium homeostasis during therapeutic plasma exchange. Transfusion 1986; 26:151–155.
Sintnicolaas K, Vriesendorp HM, Sizoo W, et al: Delayed alloimmunisation by random single donor platelet transfusions. A randomised study to compare single donor and multiple donor platelet transfusions in cancer patients with severe thrombocytopenia. Lancet 1981; 1:750–754.
Sirtl C, Laubenthal H, Zumtobel V, et al: Tissue deposits of hydroxyethyl starch (HES): dose-dependent and time-related. Br J Anaesth 1999; 82:510–515.
Sketris IS, Parker WA, Jones JV: Effect of plasma exchange on drug removal. *In* Valbonesi M, Pineda AA, Biggs JC (eds): Therapeutic Hemapheresis. Milan, Wichtig Editore, 1986, pp 15–20.
Smith KJ, James DS, Hunt WC, et al: A randomized, double-blind comparison of donor tolerance of 400 mL, 200 mL, and sham red cell donation. Transfusion 1996; 36:674–680.
Smolowicz AG, Villman K, Tidefelt U: Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. Transfusion 1997; 37:188–192.
Smolowicz AG, Villman K, Berlin G, et al: Kinetics of peripheral blood stem cell harvests during a single apheresis. Transfusion 1999; 39:403–409.
Solling K, Solling J: Clearances of Bence-Jones proteins during peritoneal dialysis or plasmapheresis in myelomatosis associated with renal failure. Contrib Nephrol 1988; 68:259–262.
Standards Committee of the American Association of Blood Banks, Menitove JE (ed): Standards for Blood Bank and Transfusion Services, 18th ed. Bethesda, American Association of Blood Banks, 1997.
Standards Committee of the American Association of Blood Banks, Silva MA (ed): Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 23rd ed. Bethesda, American Association of Blood Banks, 2004.
Stander S, Szepfalusi Z, Bohle B, et al: Differential storage of hydroxyethyl starch (HES) in the skin: an immunoelectron-microscopical long-term study. Cell Tissue Res 2001; 304:261–269.
Steeper TA, Smith JA, McCullough J: Therapeutic cytapheresis using the Fenwal CS-3000 blood cell separator. Vox Sang 1985; 48:193–200.
Stegall MD, Dean PG, McBride MA, Wynn JJ: Survival of mandatorily shared cadaveric kidneys and their paybacks in the zero mismatch era. Transplantation 2002; 74:670–675.
Stohlawetz P, Stiegler G, Jilma B, et al: Measurement of the levels of reticulated platelets after plateletpheresis to monitor activity of thrombopoiesis. Transfusion 1998; 38:454–458.
Strauss RG: Transfusion therapy in neonates. Am J Dis Child 1991; 145:904–911.
Strauss RG: Therapeutic granulocyte transfusions in 1993. Blood 1993; 81:1675–1678.
Strauss RG: Effects on donors of repeated leukocyte losses during plateletpheresis. J Clin Apheresis 1994; 9:130–134.
Strauss RG: Mechanisms of adverse effects during hemapheresis. J Clin Apheresis 1996; 11:160–164.
Strauss RG, Hester JP, Vogler WR, et al: A multicenter trial to document the efficacy and safety of a rapidly excreted analog of hydroxyethyl starch for leukapheresis with a note on steroid stimulation of granulocyte donors. Transfusion 1986; 26:258–264.
Strauss RG, Villhauer PJ, Imig KM, et al: Selecting the optimal dose of low-molecular-weight hydroxyethyl starch (pentastarch) for granulocyte collection. Transfusion 1987; 27:350–352.
Strauss RG, Stansfield C, Henriksen RA, et al: Pentastarch may cause fewer effects on coagulation than hetastarch. Transfusion 1988; 28:257–260.
Stroncek DF, Clay ME, Petzoldt ML, et al: Treatment of normal individuals with granulocyte-colony--stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. Transfusion 1996a; 36:601–610.
Stroncek DF, Clay ME, Smith J, et al: Changes in blood counts after the administration of granulocyte-colony--stimulating factor and the collection of peripheral blood stem cells from healthy donors. Transfusion 1996b; 36:596–600.
Stroncek DF, Clay ME, Herr G, et al: Blood counts in healthy donors 1 year after the collection of granulocyte--colony-stimulating factor-mobilized progenitor cells and the results of a second mobilization and collection. Transfusion 1997a; 37:304–308.
Stroncek DF, Clay ME, Smith J, et al: Comparison of two blood cell separators in collecting peripheral blood stem cell components. Transfus Med 1997b; 7:95–99.
Stroncek DF, Matthews CL, Follmann D, et al: Kinetics of G-CSF-induced granulocyte mobilization in healthy subjects: effects of route of administration and addition of dexamethasone. Transfusion 2002; 42:597–602.
Stucki A, Rivier AS, Gikic M, et al: Endothelial cell activation by myeloblasts: Molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. Blood 2001; 97:2121–2129.
Suckfull M: Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial. Lancet 2002; 360:1811–1817.
Suckfull M, Thiery J, Schorn K, et al: Clinical utility of LDL-apheresis in the treatment of sudden hearing loss: a prospective, randomized study. Acta Otolaryngol 1999; 119:763–766.
Szymanski IO: Ionized calcium during plateletpheresis. Transfusion 1978; 18:701–708.
Szymanski IO, Patti K, Kliman A: Efficacy of the Latham blood processor to perform plateletpheresis. Transfusion 1973; 13:405–411.
Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, et al: Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single-center experience. Transplantation 1998; 65:224–228.
Taylor H, Sawyer S, Whitley P, et al: Donor safety and physiologic response to automated collection of double red cell collection on ALYX. J Clin Apheresis 2002; 17:143.
Technical manual committee, Brecher ME (ed): Technical Manual, 14th ed. Bethesda, American Association of Blood Banks, 2002.
Tefferi A, Hoagland HC: Issues in the diagnosis and management of essential thrombocythemia. Mayo Clin Proc 1994; 69:651–655.
Thompson GR, Miller JP, Breslow JL: Improved survival of patients with homozygous familial hypercholesterolemia treated by plasma exchange. Br Med J 1985; 291:1671–1673.
Thompson GR, Maher VM, Matthews S, et al: Familial Hypercholesterolaemia Regression Study: a randomised trial of low-density-lipoprotein apheresis. Lancet 1995; 345:811–816.
Tomita T, Takayanagi M, Kiwada K, et al: Vasovagal reactions in apheresis donors. Transfusion 2002; 42:1561–1566.
Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group: Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. N Engl J Med 1997; 337:1861–1869.
Tsai HM, Lian EC: Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1998; 339:1585–1594.
Tsai HM, Chandler WL, Sarode R, et al: von Willebrand factor and von Willebrand factor-cleaving metalloprotease activity in *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Pediatr Res 2001; 49:653–659.
United Network for Organ Sharing, Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Office of Special Programs, Division of Transplantation, United Network for Organ Sharing: US Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: Annual report 2000. Transplant Data 1990–1999. Rockville MD, Richmond VA, Maryland, 2000.
United Network for Organ Sharing, Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration. Office of Special Programs, Division of Transplantation: 2001 Annual Report of the US Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry for Transplant Recipients: Transplant Data 1991–2000. Rockville MD, Richmond VA, Ann Arbor MI, Maryland, 2001.
Vamvakas EC, Pineda AA: Meta-analysis of clinical studies of the efficacy of granulocyte transfusions in the treatment of bacterial sepsis. J Clin Apheresis 1996; 11:1–9.
Vamvakas EC, Pineda A: Allergic and anaphylactic reactions. *In* Popovsky MA (ed): Transfusion Reactions, 2nd ed. Bethesda, AABB Press, 2001, pp 83–127.
van Burik JA: Granulocyte transfusions as treatment or prophylaxis for fungal infections? Curr Opin Investig Drugs 2003; 4:921–925.
van der Plas RM, Schiphorst ME, Huizinga EG, et al: von Willebrand factor proteolysis is deficient in classic, but not in bone marrow transplantation-associated, thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1999; 93:3798–3802.
van Doorn PA, Brand A, Strengers PF, et al: High-dose intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a double--blind, placebo-controlled, crossover study. Neurology 1990; 40:209–212.
van Doorn PA, Vermeulen M, Brand A, et al: Intravenous immunoglobulin treatment in patients with chronic

inflammatory demyelinating polyneuropathy. Clinical and laboratory characteristics associated with improvement. Arch Neurol 1991; 48:217–220.
van Iperen HP, Beijersbergen van Henegouwen GM: Clinical and mechanistic aspects of photopheresis. J Photochem Photobiol B 1997; 39:99–109.
Vichinsky EP, Haberkern CM, Neumayr L, et al: A comparison of conservative and aggressive transfusion regimens in the perioperative management of sickle cell disease. The Preoperative Transfusion in Sickle Cell Disease Study Group. N Engl J Med 1995; 333:206–213.
Volk EE, Domen RE, Smith ML: An examination of ethical issues raised in the pretreatment of normal volunteer granulocyte donors with granulocyte colony-stimulating factor. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:508–513.
Volkin RL, Starz TW, Winkelstein A, et al: Changes in coagulation factors, complement, immunoglobulins, and immune complex concentrations with plasma exchange. Transfusion 1982; 22:54–58.
Vriesendorp FJ, Mayer RF, Koski CL: Kinetics of anti--peripheral nerve myelin antibody in patients with Guillain–Barré syndrome treated and not treated with plasmapheresis. Arch Neurol 1991; 48:858–861.
Wallace EL, Surgenor DM, Hao HS, et al: Collection and transfusion of blood and blood components in the United States, 1989. Transfusion 1993; 33:139–144.
Wasi S, Santowski T, Murray SA, et al: The Canadian Red Cross plasmapheresis donor safety program: changes in plasma proteins after long-term plasmapheresis. Vox Sang 1991; 60:82–87.
Wayne AS, Kevy SV, Nathan DG: Transfusion management of sickle cell disease. Blood 1993; 81:1109–1123.
Weinstein R: Prevention of citrate reactions during therapeutic plasma exchange by constant infusion of calcium gluconate with the return fluid. J Clin Apheresis 1996; 11:204–210.
Wheeler JG, Chauvenet AR, Johnson CA, et al: Buffy coat transfusions in neonates with sepsis and neutrophil storage pool depletion. Pediatrics 1987; 79:422–425.
Wiener Y, Nakhleh RE, Lee MW, et al: Prognostic factors and early resumption of cyclosporin A in renal allograft recipients with thrombotic microangiopathy and hemolytic uremic syndrome. Clin Transplant 1997; 11:157–162.
Wiltbank TB: Donor reaction rates: A preliminary comparison of automated vs. whole blood procedures. Transfusion 2002; 42(Suppl):67S.
Winston DJ, Ho WG, Young LS, et al: Prophylactic granulocyte transfusions during human bone marrow transplantation. Am J Med 1980; 68:893–897.
Winters JL, Gloor JM, Pineda AA, et al: Plasma exchange conditioning for ABO-incompatible renal transplantation. J Clin Apheresis 2004; 19:79–85.
Wiseman KC: New insights on Goodpasture's syndrome. ANNA J 1993; 20:17–26.
Wood GJ, Hall GM: Plasmapheresis and plasma cholinesterase. Br J Anaesth 1978; 50:945–949.
Yacobi A, Stoll RG, Sum CY, et al: Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch in normal subjects. J Clin Pharmacol 1982; 22:206–212.
Zachary AA, Montgomery RA, Ratner LE, et al: Specific and durable elimination of antibody to donor HLA antigens in renal-transplant patients. Transplantation 2003; 76:1519–1525.
Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, et al: CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. Blood 2001; 98:3221–3227.
Zeigler ZR, Shadduck RK, Gryn JF, et al: Cryoprecipitate poor plasma does not improve early response in primary adult thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). J Clin Apheresis 2001; 16:19–22.
Zic JA: The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis. Dermatol Ther 2003; 16:337–346.
Zic JA, Miller JL, Stricklin GP, et al: The North American experience with photopheresis. Ther Apher 1999; 3:50–62.
Zucchelli P, Pasquali S, Cagnoli L, et al: Plasma exchange therapy in acute renal failure due to light chain myeloma. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1984; 30:36–39.

CAPÍTULO 37

Banco de tecidos e células progenitoras

Charlene A. Hubbell BS MT (ASCP) SBB, Lazaro Rosales MD

Fontes de tecidos	829	Tecido reprodutor	833
Atividades do banco de tecidos	830	Banco de células progenitoras hematopoéticas	833
Triagem de doadores	830	Fontes de células hematopoéticas	834
Criopreservação	831	Enxertos hematopoéticos não mieloablativos	836
Banco de pele	831	Purga	836
Tecidos musculoesqueléticos	831	Criopreservação de enxertos hematopoéticos	838
Válvulas cardíacas	832	Reinfusão de produtos de células progenitoras	838
Córnea	832	Referências bibliográficas	838

PONTOS-CHAVE

- Uma ampla gama de tecidos alogênicos é utilizada para fins de transplante.
- O tecido de aloenxerto passa por uma triagem, é testado e processado para melhorar sua segurança.
- O tecido de aloenxerto é armazenado por meio de uma variedade de métodos, entre eles a criopreservação.
- Existem riscos e complicações associadas ao uso do tecido de enxerto.
- Há uma ampla variedade de técnicas de reprodução assistida disponíveis para indivíduos e casais inférteis.
- As células progenitoras hematopoéticas podem ser derivadas a partir de múltiplas fontes e transplantadas de diversos modos, dependendo das necessidades do receptor.
- Avaliar o equilíbrio existente entre a reação do enxerto *versus* hospedeiro e o efeito enxerto *versus* leucemia.

Em todo o território dos Estados Unidos, bancos de tecidos fornecem centenas de produtos que não só prolongam a vida como também, em muitos casos, melhoram significativamente a qualidade de vida dos pacientes atendidos. Mais de 400.000 enxertos de ossos (American Association of Tissue Banks, 2004) e cerca de 46.000 córneas (Eye Bank Association of America, 2004) são transplantadas anualmente no país – um número bem maior que os 25.000 transplantes de órgãos sólidos realizados ao ano (United Network for Organ Sharing, 2003). As aplicações clínicas, tanto dos tecidos alogênicos como dos autólogos, e os tipos de tecido disponíveis cresceram exponencialmente nas duas últimas décadas. Todavia, à parte dos pacientes e médicos servidos por esses bancos de tecidos, ainda são muitos os que desconhecem o vasto escopo das atividades envolvendo banco de tecidos atualmente conduzidas no cenário da assistência à saúde. Nos últimos 20 anos, os bancos de tecidos americanos evoluíram de um sistema hospitalar incidental de bancos de ossos ou esperma para um sistema regulado e dotado de instalações certificadas, bem mais próximo dos bancos de sangue, fornecendo uma extensa variedade de produtos de alta qualidade, que são submetidos a cuidadosos procedimentos de triagem e teste realizados por médicos (Tab. 37.1).

Muitos bancos de tecidos fornecem uma gama de produtos e serviços para obtenção, processamento e armazenamento de pele, ossos e válvulas cardíacas. Por outro lado, alguns bancos de tecidos se concentram na prestação de serviços em áreas especializadas, como de tecido reprodutivo ou células progenitoras hematopoéticas (CPrHs). Um banco pode recrutar doadores, cuidar da obtenção e processamento de tecidos, como pele para pacientes com queimadura ou ossos para realização de reparos ortopédicos. Outro banco, por sua vez, pode coletar, processar e armazenar CPrHs destinadas a transplantes de medula óssea para salvar vidas. O processamento de tecidos musculoesqueléticos e válvulas cardíacas, que requer consideráveis aparelhagem, pessoal e garantia de qualidade, é primariamente realizado por poucos grandes bancos de tecidos. Esses subcontratam outros bancos de tecidos que, então, realizam a coleta, o armazenamento e a administração desses produtos. Além disso, tem havido um crescimento exponencial do número de bancos de reprodução nas duas últimas décadas, que prestam assistência a indivíduos ou casais inférteis.

Fontes de tecidos

Os tecidos utilizados para transplantes são obtidos a partir de duas fontes principais: doadores vivos e mortos. Os doadores vivos podem ser indivíduos que doam produtos para uso próprio (esperma ou CPrHs autólogas), para serem utilizados por um receptor predeterminado (doação de CPrHs alogênicas ou de espermatozoides), ou altruisticamente para uso de receptores desconhecidos (ossos descartados em cirurgias, doação de espermatozoides, doação de CPrHs alogênicas via programas nacionais de doação de medula). A grande maioria dos ossos, pele e válvulas cardíacas utilizadas na transplantação, bem como do tecido ocular, é proveniente de doadores mortos. Diferente da doação de órgãos sólidos, em que é necessário obter os órgãos mediante manutenção da circulação, os tecidos oriundos de doadores mortos podem ser obtidos horas após a morte do doador; se o corpo permanecer sob refrigeração, em até 24 horas. Esse aspecto aumenta substancialmente o número de doadores de tecidos disponíveis. Como o tecido da córnea permanece relativamente em mínimo contato com o sistema circulatório, torna-se possível aceitar como doadores de córneas alguns indivíduos que de outra forma seriam excluídos como doadores de outros tecidos.

Tecidos oriundos de doadores mortos são adquiridos em salas cirúrgicas ou necrotérios hospitalares, e também em consultórios de médicos legistas. A coleta de tecidos é realizada sob ambiente estéril e limpo, empregando técnicas assépticas. Muitos tecidos, como os ossos, são congelados em seguida, para subsequente processamento e recongelamento ou congelamento-dessecação. Tecidos especializados, como a córnea, são processados imediatamente e estocados apenas durante um curto período (48–72 horas) antes de serem transplantados. Tecidos provenientes de doadores vivos são obtidos tanto na sala cirúrgica (medula óssea ou osso cirurgicamente resgatado) ou em ambientes limpos e especializados adequadamente fornecidos pelos centros de hemaférese e pelos bancos de esperma equipados para esse fim. Esses tecidos são coletados sob condições estéreis, processados imediatamente e utilizados em menos de 24 horas, ou congelados para posterior transplantação.

Tabela 37.1 Categorias de tecidos transplantáveis

Musculoesquelético
Osso
Cartilagem
Menisco
Tendão
Ligamento
Fáscia
Pele
Cardiovascular
Válvulas cardíacas
Veia safena
Córnea (olhos)
Reprodutivo
Espermatozoide
Óvulo
Embrião
Hematopoético
Medula óssea
Células progenitoras de sangue periférico
Células progenitoras do sangue do cordão umbilical
Outros
Ossículos do ouvido
Dura-máter
Paratireoides
Células das ilhotas pancreáticas

Atividades do banco de tecidos

As principais atividades dos bancos de tecidos estão destacadas na Tabela 37.2. Nos Estados Unidos, uma das principais motivações para a criação de bancos de tecidos formais e credenciados foi a preocupação com transmissão de doenças via transfusão. Assim como os bancos de sangue e serviços de transfusão (Caps. 35 e 36), para os bancos de tecidos são críticas as funções de recrutamento, triagem e testes de doadores. Desde o início da década de 1990, casos registrados de transmissão de doenças mostraram que uma triagem cuidadosa, seja pela revisão dos registros médicos ou por meio da realização de testes sorológicos, bem como a manutenção de registros detalhados são ações críticas na prática segura de banco de tecidos e, assim, na aceitação de aloenxertos teciduais pelo público e pelos prestadores de assistência à saúde. Os médicos que utilizam tais tecidos devem reconhecer e relatar a ocorrência de reações adversas, principalmente infecções, ao banco de tecidos de origem. A Joint Commission on the Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO) estabeleceu padrões de práticas de banco de tecidos, os quais se destinam principalmente ao estabelecimento em que é realizado o transplante.

Esses padrões enfocam a necessidade dos estabelecimentos que realizam implante manterem registros claros e precisos do recebimento, armazenamento e uso de tecidos, de modo a possibilitar o rastreamento de todos os tecidos alogênicos desde o doador até o receptor. Segundo os padrões da JCAHO, as instituições também devem estabelecer um mecanismo para que a ocorrência de reações adversas seja relatada pelos médicos e comunicada ao banco de tecidos de origem. Bancos de tecidos credenciados que prestam serviço completo, do mesmo modo que os bancos de sangue, investigam extensivamente a ocorrência de reações suspeitas ou complicações. Revisões retroativas devem incluir uma revisão de complicações associadas a outro tecido fornecido pelo mesmo doador, condição de saúde atual do doador (caso esteja vivo) e quarentena dos seus demais tecidos oriundos. A American Association of Tissue Banks (AATB)* estabelece padrões estritos e certificação para organizações envolvidas em qualquer área

* *AATB, 1350 Beverly Rd. #220A, McLean, VA.*

Tabela 37.2 Atividades do banco de tecidos

Recrutamento e triagem de doadores
Aquisição de tecidos
Processamento e armazenamento de tecidos
Fornecimento de tecidos para transplante
Educação pública e profissional
Garantia de qualidade e manutenção de registros
Registros de receptores

de transplante de tecidos. Vários estados americanos também exigem que seus bancos de tecidos obtenham licença, enquanto o Food and Drug Administration (FDA) regulamenta a triagem dos tecidos doados destinados ao transplante (FDA, 2004). Além disso, a FDA atualmente recomenda que, em caso de uso de amostras de sangue cadavérico para realização de testes de detecção de marcadores de doenças infecciosas, seja utilizado um teste especificamente indicado pelo fabricante para essa finalidade. A FDA mantém um *site* (www.fda. gov/cber/tissue/prod/htm) em que estão listados os fabricantes de testes aprovados para essa função.

Triagem de doadores

Os doadores de tecidos são cuidadosamente submetidos a uma triagem com o intuito de prevenir a transmissão de doenças bacterianas, virais e/ou genéticas, bem como para garantir a qualidade do tecido obtido (Tab. 37.3). Em contraste com os doadores de sangue, no caso dos doadores de tecidos já falecidos, a informação referente à história médica e social que não for obtida a partir dos registros médicos deve ser fornecida pelos familiares ou amigos. Os registros obtidos no início da década de 1990 enfatizavam a transmissão tanto do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Simonds, 1992) como do vírus da hepatite C (Conrad, 1995) a partir dos produtos de tecido humano. Mais recentemente, tem sido enfatizada a transmissão de vírus não submetidos à triagem (Kainer, 2004) e de outros agentes infecciosos, como o da doença de Creutzfeldt-Jakob (Centers for Disease Control, 2003), por tecidos sorologicamente negativos, destacando-se a necessidade da realização de uma triagem cuidadosa de doadores de tecidos e órgãos, bem como de testes laboratoriais. Fazer as perguntas corretas de maneira apropriada constitui função crítica, que deve ser realizada por funcionários bem treinados e experientes, capazes de identificar possíveis riscos seja por meio da história médica do doador, informações sobre possíveis comportamentos de risco ou dados de laboratório

Tabela 37.3 Exames realizados nos doadores

Triagem de doadores
Revisão da história e dos registros médicos
Doenças infecciosas (incluindo histórico de viagens ao exterior)
Doença maligna
Doenças colágenas e imunocomplexas
História de doenças genéticas
Traumatismo
Exposição a drogas, substâncias tóxicas ou ameaças biológicas
Exame físico de doadores vivos
Revisão dos registros de autópsia de doadores mortos
Revisão da história social para avaliação de comportamentos de risco
Teste sorológico de doadores
Anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana
Anticorpos contra o vírus linfotrófico de células T humanas
Anticorpos contra o vírus da hepatite C
Antígeno de superfície da hepatite B
Anticorpos contra o antígeno central da hepatite B
Testes sorológicos para sífilis
Teste bacteriológico de produtos teciduais

rio disponíveis. Outras partes do processo de revisão visam assegurar a qualidade do tecido doado. Doadores de tecido musculoesquelético precisam passar por cuidadosa triagem para avaliar qualquer história de trauma que possa resultar em um enxerto ósseo estruturalmente enfraquecido. Doações de espermatozoides são revistas não só quanto à possibilidade de doenças genéticas, mas também para garantir que espermatozoides viáveis tenham chances razoáveis de promover uma fertilização bem-sucedida. O uso de sangue do cordão umbilical para transplante de medula óssea alogênica e sangue periférico requer a realização de triagem e testes na mãe e no próprio sangue do cordão. Quando o tecido é obtido de doador vivo, exceto no caso das CPrHs, ele é congelado e mantido em quarentena por um período mínimo de 180 dias. Ao final desse período, o teste sorológico do doador é repetido. Esse procedimento previne o uso de tecidos oriundos de qualquer doador que apresente o período de "janela" do HIV ou do vírus da hepatite C, ou seja, de doadores que foram expostos a esses vírus mas não apresentaram anticorpos no momento da doação.

Criopreservação

Tecidos como CPrHs, espermatozoides, pele e alguns tipos de tecido musculoesquelético requerem a presença de células viáveis e apresentam tempo de prateleira muito curto à temperatura do refrigerador. Por isso, é necessário criopreservar esses tecidos. A meta de todas as técnicas de criopreservação é estender o período de armazenamento em que o material congelado se mantém útil, por meio da redução da demanda metabólica das células sob baixas temperaturas, sem que haja nenhuma perda da viabilidade decorrente dos procedimentos de congelamento ou descongelamento. A criopreservação de espermatozoides de animais estabeleceu-se há décadas como prática agrícola; e os pesquisadores puderam lucrar consideravelmente com as experiências advindas dessa prática. De uma forma geral, a criopreservação de tecidos humanos faz uso de agentes crioprotetores, como dimetilsufóxido (DMSO) ou glicerol, meios de cultura de tecidos balanceados e certos tipos de suplementação proteica, como plasma autólogo, albumina e outras suspensões coloidais. O congelamento propriamente dito com frequência é realizado em *freezer* com controle de taxa, uma máquina que controla a taxa de congelamento dos tecidos, usualmente –1°C/min até a temperatura de –80°C. O DMSO é o agente crioprotetor de escolha para tecidos como pele, CPrHs e outros tecidos ou suspensões de células nucleadas, enquanto o glicerol em geral é empregado no congelamento de espermatozoides. Os agentes crioprotetores atuam evitando a formação de cristais de gelo intracelulares durante o congelamento, além de equilibrarem a pressão osmótica e as concentrações de água intra *versus* extracelular durante o descongelamento. A formação de cristais de gelo extracelulares ou um aumento rápido demais da pressão osmótica extracelular causam danos às células e, assim, perda da viabilidade. Os agentes crioprotetores, como o DMSO, retardam a taxa de ocorrência de modificações (Gorin, 1986). A maioria dos bancos de tecidos emprega nitrogênio líquido e processadores de congelamento com controle de taxa, os quais são programados para compensar o calor liberado, denominado calor de fusão, durante a mudança do estado líquido para o estado congelado (Gorin, 1986). Se permanecer descompensado, o calor de fusão pode acarretar diminuição da viabilidade das células ou tecidos em processo de congelamento.

Uma vez congelados, os tecidos criopreservados são estocados sob diversas temperaturas, a partir de –80°C em um *freezer* mecânico até a fase de vapor (–100°C) ou líquida (–196°C) do nitrogênio líquido. O prazo de validade para tecidos criopreservados em geral é de 5 anos, embora esse valor seja um limite arbitrário e o real tempo de armazenamento possível para muitos tecidos permaneça indeterminado. Outros tecidos que dispensam a presença de células viáveis, como osso estrutural, podem ser congelados ou liofilizados por uma variedade de métodos distintos. Alguns tecidos submetidos à liofilização possuem prazos de validade de 5 anos, enquanto outros podem ser armazenados por tempo indeterminado.

Banco de pele

O uso mais comum de enxertos de pele alogênicos é como cobertura provisória para pacientes com queimaduras extensas de terceiro grau, até que a pele autóloga ou autogênica possa ser recuperada e enxertada. Em razão da concentração de antígenos de histocompatibilidade e de células apresentadoras de antígeno (APCs), todos os enxertos de pele alogênicos eventualmente são rejeitados (Medawar, 1946). Quando utilizados para cobrir queimaduras, os enxertos costumam ser substituídos periodicamente até que seja possível realizar o autoenxerto. A maior parte das doações de pele provenientes de doadores mortos para utilização como aloenxerto é constituída de um enxerto parcialmente espesso contendo uma fina camada de epiderme sem derme. Por esse motivo, esse tipo de enxerto dispensa a compatibilização ABO (Eastlund, 1998). Sendo temporários, contudo, os enxertos de pele de espessura parcial fornecem cobertura imediata vital, servindo de barreira contra infecções e evitando a perda de líquidos, eletrólitos e calor a partir de extensas áreas de queimadura, favorecendo a estabilização do paciente e a eventual realização de autoenxerto.

Em geral, a pele é coletada de doadores mortos com pele livre de infecções e defeitos, cuja área de superfície seja inferior a 1,75 m^2. A pele é coletada com um dermátomo a partir de áreas localizadas nas costas, pernas e porção superior dos braços. A pele usualmente é desinfetada antes da coleta, bem como imersa em solução de cultura de tecidos contendo antibiótico até ser utilizada ou congelada.

A pele pode ser armazenada a 2 a 8°C por vários dias (AATB, 2002), ou criopreservada e armazenada durante vários anos. Por causa da atual necessidade de realizar uma extensiva revisão dos registros da história do doador e dos dados laboratoriais, os enxertos de pele são mais comumente congelados para uso subsequente. O agente crioprotetor de escolha é o glicerol a 10 a 15% (AATB, 2002). O enxerto geralmente é incubado por certo período (20 a 30 minutos) em solução de congelamento, a fim de permitir que a solução permeie o enxerto. Em seguida, a pele é congelada em tiras sustentadas por gazes e em posição horizontal (achatadas) (Eastlund, 1996). A pele pode ser ou não congelada em *freezer* com controle de taxa, sendo facilmente armazenada entre –50°C e –80°C. Todavia, diversos bancos de tecidos comumente empregam temperaturas mais baixas para armazenamentos mais prolongados (Kearney, 1998). Os enxertos de pele congelados são rapidamente descongelados a 37°C, podendo ser utilizados em seguida ou lavados com soluções fisiológicas para diluir o agente crioprotetor.

O limitado suprimento de aloenxertos de pele estimulou esforços no sentido de encontrar substitutos xenogênicos, como pele de porco e barreiras artificiais. Mais recentemente, houve tentativas de cultivar e multiplicar células epiteliais para, assim, expandir a pele autóloga disponível. Outro produto tecidual homólogo que passou a ser amplamente utilizado é o Alloderm (Lifecell Corporation, The Woodlands, Texas, EUA). Trata-se de um enxerto de matriz dérmica acelular processado a partir de um aloenxerto de pele humana. O tecido é enzimaticamente processado para remoção de células imunologicamente ativas, o que preserva apenas uma rede colágena acelular. Esse tratamento permite a infiltração de fibroblastos, deposição de colágeno e neoepitelização. Como as células imunologicamente ativas são removidas, o enxerto é tolerado, sem haver rejeição, por um período significativamente maior que o tempo de tolerância dos aloenxertos de pele humana tradicionais. O Alloderm tem sido empregado não só como enxerto de pele para queimaduras, mas também com aplicações oftálmicas, plásticas, em cirurgias de ouvido, nariz e garganta e odontológicas (Shorr, 2000). É um produto fabricado com tecido humano alogênico e deve ser utilizado mediante os mesmos consentimentos e acompanhamento do paciente adotados para outros produtos teciduais humanos.

Tecidos musculoesqueléticos

O banco de tecidos teve início há várias décadas, quando os médicos passaram a armazenar ossos descartados durante cirurgias, principalmente cabeças de fêmur removidas em cirurgias de substituição articular, para uso futuro em outros procedimentos ortopédicos, com frequência em fusões espinais. Em geral, essa prática envolvia o simples armazenamento do osso em *freezer* sem monitoramento, em alguma parte do hospital. Muitas vezes não eram realizados testes nem processamento do osso cirurgicamente descartado, as condições de estocagem não eram monitoradas, as fontes de tecido e os receptores não eram rastreados e, em certos casos, não era sequer solicitado o consentimento do doador original/paciente. Hoje, essas práticas foram quase

eliminadas com o uso de tecidos musculoesqueléticos provenientes de bancos de tecidos certificados e registrados. Desse modo, os pacientes podem optar com segurança pelo recebimento de aloenxerto ósseo como parte de um procedimento cirúrgico (Tomford, 1993). Além dos enxertos ósseos autogênicos, ossos doados por doador vivo ainda são utilizados como fonte de alguns tipos de osso. Os doadores vivos atualmente passam por triagem e testes, devendo informar seu consentimento. Além disso, o tecido ósseo obtido é, ainda, processado para redução do risco de transmissão de doenças infecciosas, sendo elaborados registros detalhados sobre a fonte doadora e o receptor para fins de rastreamento e seguimento.

Tanto o osso descartado por cirurgia como o osso obtido de doador morto são processados de modo semelhante. Tecidos estranhos, sangue e elementos de medula são removidos por uma lavagem por pulso de alta pressão, e o tecido é embebido em solução contendo antibióticos. Culturas bacteriológicas do tecido são realizadas no momento da coleta, durante o processamento e antes do congelamento. Os tecidos podem requerer a presença de células viáveis, como é o caso da cartilagem, da cabeça femoral, da tíbia, do tendão ou do osso integral. Esses tecidos usualmente são lavados, embebidos em solução e congelados a temperaturas entre –60°C e –150°C. Quando se trata de outros tipos de tecido, cuja viabilidade não constitui fator relevante, pode ser utilizada a imersão em etanol para remoção do conteúdo lipídico, em geral na etapa da preparação de ossos desmineralizados e liofilizados, que também ajuda a diminuir o grau de infectividade do tecido em questão. A maioria dos tecidos ósseos passa por uma nova esterilização por meio da exposição a baixas doses de radiação. Além disso, a liofilização, aplicável aos produtos ósseos (p. ex., lascas de ossos esponjoso e cortical) também parece reduzir a imunogenicidade e, ainda, o grau de infectividade desses produtos. O uso de óxido de etileno para esterilização final de tecido ósseo foi eliminado em grande parte, em consequência aos relatos de ocorrência de efeitos colaterais em múltiplos receptores (Jackson, 1990). O tecido ósseo é cortado e moldado para, em seguida, ser preservado por congelamento ou liofilização.

Os enxertos de osso servem principalmente de suporte mecânico e esboço para as células formadoras de osso do hospedeiro substituírem o tecido perdido. A função osteoindutora do enxerto ósseo depende parcialmente da presença de certos fatores de crescimento glicoproteicos (Mohan, 1991); contudo, parecem não causar significativas reações de rejeição ao aloenxerto por parte do hospedeiro. Como o tecido ósseo é processado para remoção de sangue, medula e outros tecidos estranhos, a maioria dos estudos falhou em demonstrar a presença de antígenos ABO (Ezra-Cohen, 1961). A antigenicidade do produto resultante é baixa e, assim, a histocompatibilidade e a compatibilização de tipo sanguíneo são desnecessárias. Por causa do processamento incompleto dos enxertos osteoarticulares extensos, como ocorre com enxertos integrais de osso-patela-tendão, esse tecido pode conter hemácias residuais. Assim, há relatos de casos de imunização aos antígenos do sistema Rh (Hill, 1974). Muitos cirurgiões, ao utilizarem enxertos maiores, tentam fornecer tecido Rh-compatível a mulheres Rh^- em idade fértil.

Além dos ossos autogênicos, o enxerto ósseo é utilizado em cirurgias de fusão espinal, substituição de articulações protéticas falidas, concentração de cistos ósseos benignos, reconstrução de déficits maxilares faciais, restauração de osso alveolar em bolsas periodontais e até mesmo substituição de ossos extirpados em decorrência da presença de tumor (p. ex., osteossarcoma) (Eastlund, 1996). Enxertos de tendão e cartilagem são empregados primariamente em cirurgias de reparo de joelho. Alguns pacientes se deparam com a opção de recuperar o tecido autólogo a partir da própria crista ilíaca em diversos procedimentos ortopédicos eletivos, ou de receber tecido de aloenxerto proveniente de um banco de tecidos. Para cada caso, existem vantagens e desvantagens (p. ex., autoenxerto *vs* aloenxerto). Os autoenxertos aparentemente são incorporados mais rapidamente, não são imunogênicos e não transmitem doenças. Contudo, estão associados a um tempo maior de anestesia, maior perda de sangue e recuperação mais demorada do sítio doador. O amplo suprimento de aloenxertos torna possível realizar ajustes exatos, não requer a recuperação de um sítio doador e, em geral, a duração da cirurgia é menor. Todavia, o risco de transmissão de doenças, mesmo que reduzido em grande parte pelos procedimentos modernos, ainda existe. O uso de enxertos autólogos para outros propósitos é impossível.

Válvulas cardíacas

As válvulas cardíacas humanas dispensam o uso de anticoagulantes pelos pacientes após a implantação, assim como as próteses mecânicas e as válvulas de porco utilizadas na substituição da válvula aórtica. Como consequência, há baixa incidência de tromboembolismo e infecções. São ideais para uso pediátrico, em gestantes ou para pacientes com história de endocardite bacteriana. Seu uso é menos frequente porque a execução dos procedimentos de colocação de válvulas é tecnicamente mais difícil. As válvulas aórtica e pulmonar são comumente extraídas de doadores de órgãos mortos, quando todo o coração se torna inadequado para transplante em consequência de certos eventos, como parada cardíaca, mas sem prejuízo da integridade ou da função das válvulas aórtica e pulmonar. A obtenção é realizada na sala cirúrgica. As válvulas são cuidadosamente dissecadas com um manguito de miocárdio, inspecionadas quanto à integridade e congeladas em *freezer* com controle de taxa, em nitrogênio líquido, utilizando DMSO como agente crioprotetor (O'Brien, 1988). Se por um lado os antígenos de grupos sanguíneos foram demonstrados no endotélio de corações criopreservados, a função mecânica principal dessas estruturas depende apenas de tecido conjuntivo inviável. Após o transplante, as células do hospedeiro eventualmente repõem o endotélio do doador. Vários estudos relatam que a compatibilidade ABO é irrelevante para a função das válvulas aloenxertadas a longo prazo (Weipert, 1995). Mais recentemente, alguns cirurgiões cardiotorácicos tentaram utilizar enxertos de veia safena para realizar procedimentos de desvio da artéria coronária ou de desvio de artérias obstruídas localizadas em membro inferior, em caso de indisponibilidade de aloenxertos. Dada a controvérsia em torno do papel da compatibilização ABO na função desses tecidos a longo prazo , em geral emprega-se tecidos que apresentam compatibilidade ABO (Laub, 1992). Considerando que o descongelamento dos aloenxertos de válvula é normalmente realizado pelo pessoal da sala cirúrgica e por técnicos inexperientes de bancos de tecidos, é necessário detalhar instruções e protocolos, a fim de evitar danos às válvulas. Embora o uso de aloenxertos de válvulas constitua uma prática bem-sucedida há muitos anos, os resultados da maioria dos estudos sobre aloenxerto de veia obtidos até o momento são desapontadores (Walker, 1993).

Córnea

O transplante de córnea tem sido regularmente realizado nos Estados Unidos desde 1961, embora o primeiro registro de transplante de córnea tenha sido realizado em 1905. Atualmente, mais de 46.000 transplantes de córnea são realizados a cada ano (Eye Bank Association of America, 1999). Nos EUA, existem 108 bancos de córneas certificados envolvidos no recrutamento, triagem, obtenção e transplantação de tecido de córnea, bem como na educação pública e profissional. A perda da visão decorrente de doença da córnea pode resultar de infecção, traumatismo, queimaduras ou doenças congênitas. As taxas de sucesso a longo prazo (> 10 anos) para alotransplantes de córnea são bem maiores que 90%.

Muitos doadores podem doar córneas, mesmo que os demais tecidos do corpo não possam ser recuperados em decorrência da idade, traumatismo ou doença. O tecido da córnea pode ser recuperado de doadores com até 80 anos de idade. Em geral, a enucleação ocular é realizada na sala de cirurgias ou no necrotério em até 6 horas após a morte do doador. Subsequentemente, a córnea é removida em ambiente estéril no banco de córneas e transferida para meio de cultura tecidual estéril. As córneas são armazenadas a 4°C e transplantadas em 48 a 72 horas. Esse procedimento permite realizar uma triagem sorológica adequada do doador, além de garantir a viabilidade máxima do enxerto.

O enxerto de córnea há muito tempo é considerado um "sítio imunologicamente privilegiado" (Medawar, 1948). Como a córnea é praticamente avascular, as APCs e os linfócitos efetores do hospedeiro não circulam pelo enxerto de córnea. Portanto, não há necessidade de histocompatibilidade nem de compatibilização de grupo sanguíneo. Um pequeno percentual de enxertos de córnea apresenta vascularização, e alguns são rejeitados. O uso de transplantes de córnea compatibilizados para antígenos leucocitários humanos (HLA) como tentativa de realizar transplantes bem-sucedidos nesse grupo de pacientes tem alcançado seu intento, com taxas de sucesso variáveis (Volker-Dieben, 1987).

Tecido reprodutor

Em decorrência do crescimento exponencial do conhecimento sobre desenvolvimento fetal, bem como das tecnologias de reprodução, em particular da fertilização *in vitro* (FIV), 1 a 3% dos nascimentos ocorridos na maioria dos países ocidentais atualmente são assistidos por tecnologias de reprodução (Evers, 2002). Bancos de reprodução atualmente são capazes de prestar auxílio a um número maior de indivíduos e casais que desejam manter ou alcançar a fertilidade. A maioria dos bancos de reprodução hoje existentes nos Estados Unidos atuam como corporações lucrativas. Apesar disso, e por causa de inúmeros fatores, como demanda de consumidores, necessidade de segurança por parte do consumidor e regulamentação governamental, no século XXI, os bancos de esperma funcionam segundo os mais altos padrões médicos e éticos. Assim, médicos e pacientes podem utilizar os serviços desses bancos sem preocupações. As diretrizes e os padrões que envolvem a doação anônima de espermatozoides para os bancos foram estabelecidos pela American Society for Reproductive Medicine e pela AATB.

Os bancos de reprodução servem a dois tipos de doadores: doadores dirigidos a clientes e doadores anônimos. As doações de espermatozoides dirigidas a clientes em geral se destinam às parceiras íntimas de homens que, por diversos motivos, preocupam-se com a fertilidade no futuro. Entre esses estão indivíduos prestes a serem submetidos a quimioterapia, radioterapia ou cirurgia para tratamento de malignidades que afetarão sua capacidade reprodutiva. Outros pré-depositam o esperma antes de se submeterem à vasectomia, com o intuito de se precaverem contra eventuais mudanças de vida, ou seja, para o caso de voltarem a querer ter mais filhos. Indivíduos com baixa contagem de espermatozoides podem guardar o esperma em bancos, a fim de obter um número de gametas que seja suficiente para a fertilização da parceira íntima. Menos frequentemente, homens sujeitos a exposição ocupacional (p. ex., trabalhadores de plataformas de usina nuclear) capaz de provocar infertilidade ou potencial desenvolvimento de defeitos genéticos podem escolher guardar seu esperma. O esperma coletado e armazenado para parceiras íntimas é testado do mesmo modo que as coleções obtidas de doadores anônimos passam pela triagem. O sêmen de doadores infectados, que ainda pode ser utilizado pela parceira íntima, deve ser deixado na quarentena e armazenado à parte dos depósitos dos demais clientes. Os bancos de esperma também recebem doações diretas destinadas a indivíduos específicos que não são parceiras íntimas.

Os bancos de esperma também fornecem esperma de doadores anônimos a indivíduos ou casais inférteis. Esses bancos mantêm bibliotecas de doadores de esperma, possibilitando ao cliente selecionar doadores que apresentem características físicas semelhantes, como cabelo e cor dos olhos, raça e assim por diante. Os doadores de esperma anônimos passam por uma rigorosa triagem, não só para garantir a segurança do receptor e da prole em potencial como também para proporcionar a maior probabilidade de fertilização bem-sucedida. O esperma coletado desses doadores permanece em quarentena por 180 dias antes de ser adicionado à coleção. Durante esse período, o doador é mensalmente submetido a testes sorológicos padrão aplicados a todos os doadores de tecidos, bem como a testes de detecção de infecções, como citomegalovírus, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia*. Os doadores de esperma também passam por testes para detecção de doenças genéticas, entre as quais doença de Tay-Sachs, fibrose cística, anemia falciforme e talassemia. Usualmente, é feita a cariotipagem genética completa dos doadores de esperma anônimos (Cap. 69). As coleções também são examinadas quanto ao número, à função e à viabilidade dos espermatozoides. O tecido é liberado para uso somente depois que todos esses critérios são cumpridos e revistos pelo diretor-médico do banco de espermas.

A FIV e o banco de embriões são igualmente oferecidos por diversos bancos de reprodução, além dos centros de reprodução hospitalares. Desde o sucesso original da FIV como forma de tratamento da obstrução tubária, em 1983 (Steptoe, 1983), os avanços significativos ocorridos nessa área intensificaram seu sucesso. Tais avanços incluem a introdução de inovações técnicas nos meios de cultura e criopreservação de embriões, bem como a adoção de critérios morfológicos para seleção dos melhores embriões a serem transferidos (Houghton, 2002). Além do uso por mulheres com doença falopiana, o sucesso da injeção intracitoplasmática de espermatozoides no oócito (Palermo, 1992) fez que a FIV se tornasse a técnica preferida por casais inférteis. Nesse caso, utiliza-se esperma proveniente do parceiro ou de um doador, sendo obtidas taxas de fertilização mais altas que aquelas geradas por inseminação artificial (Boyle, 2004). Ainda, a FIV proporciona aos casais com certas doenças genéticas (p. ex., hemofilia e fibrose cística) a oportunidade de realizar o diagnóstico genético pré-implantação e subsequente seleção de embriões, em uma tentativa de reduzir o risco de transmissão da doença à prole.

As tentativas de criar bancos de óvulos não foram tão bem-sucedidas quanto a criopreservação de embriões. Óvulos não fertilizados apresentam uma taxa muito baixa de fertilização ao serem subsequentemente descongelados e utilizados em tentativas de FIV. Além dos oócitos estimulados pelo congelamento, também foram realizadas tentativas de criopreservar o tecido ovariano para futuras implantações. Nesse último caso, não se obteve uma gravidez bem-sucedida com seres humanos. Tentativas recentes de aprimorar o banco de oócitos se concentraram na introdução de modificações tanto no meio de cultura como nos gradientes de temperatura de liofilização (Boldt, 2003). Pacientes do sexo feminino, diante da perda da fertilidade em decorrência de avanço da idade, doença ou quimioterapia, e que têm um parceiro íntimo, ainda são frequentemente encaminhadas para FIV seguida da criopreservação dos embriões resultantes para posterior implantação. O uso de esperma de doadores e FIV muitas vezes constituem o método recomendado para mulheres que não possuem parceiro íntimo até que a criopreservação de oócitos demonstre resultados mais promissores. Muitos bancos de reprodução também fornecem serviço de coleta de óvulos de doadoras para indivíduos inférteis. Essas doadoras passam por triagem, do mesmo modo como os doadores de esperma anônimos são submetidos a testes.

O sêmen coletado é misturado a uma solução contendo glicerol e gema de ovo, que atua como agente crioprotetor. A gema de ovo fornece suplemento adicional de proteínas que ajuda a preservar o esperma durante o processo de dessecação. A mistura sêmen-conservante é dividida em pequenos frascos pré-resfriados à temperatura de 5°C, congelada em *freezer* com controle de taxa em nitrogênio líquido, e armazenada na fase líquida do nitrogênio a –196°C. O esperma criopreservado pode ser utilizado tanto para inseminação artificial como para FIV. As doações para clientes específicos são mantidas por tempo indeterminado, enquanto as amostras de esperma doadas de forma anônima para o banco usualmente são mantidas por 5 anos. Para indivíduos que desejam realizar inseminação artificial, essas tentativas nem sempre são bem-sucedidas, de modo que os clientes são aconselhados a depositar esperma suficiente para realização de vários procedimentos reprodutivos.

O advento de todas essas tecnologias deu origem a inúmeros aspectos científicos e éticos. A eliminação de embriões não utilizados, a realização da triagem pré-implantação de embriões e as gestações múltiplas, além dos riscos genéticos desconhecidos envolvidos afetando a saúde das crianças concebidas por FIV (Lucifero, 2004) criaram a necessidade de uma abordagem multidisciplinar nessa área, a fim de incluir membros de grupos públicos de interesse, bem como profissionais cientistas e médicos (Cetin, 2003).

Banco de células progenitoras hematopoéticas

O transplante de células hematopoéticas teve início há 40 anos, quando transplantes de medula óssea eram realizados entre indivíduos geneticamente idênticos (gêmeos idênticos), sob tratamento com altas doses de agentes quimioterápicos mieloablativos e/ou radioterapia, em uma tentativa de curar malignidades hematopoéticas (Thomas, 1959). Trabalhos mais antigos haviam demonstrado a presença de unidades formadoras de colônias (CFU, *colony-forming units*) ou células no baço ou na medula de camundongos, capazes de restaurar a função hematopoética entre irmãos da mesma ninhada (geneticamente idênticos) que foram expostos a doses letais de radiação (Lorenz, 1951). A restauração da hematopoiese no receptor humano depende do transplante de células progenitoras hematopoéticas pluripotentes em número equivalente a cerca de 1% da concentração de células normais da medula, e com capacidade tanto de replicar como de se diferenciar em células sanguíneas de diferentes linhagens (Cap. 30). A identificação do sistema HLA como o principal complexo de histocompatibilidade no homem, bem

como a capacidade dos laboratórios de tipagem tecidual de identificar tipos de HLA de indivíduos ao nível de alelo, foram os fatores que possibilitaram o transplante de medula óssea entre indivíduos HLA-compatíveis. Esses indivíduos em geral eram parentes de primeiro grau, geneticamente distintos. Atualmente, os bancos de células progenitoras constituem bancos de tecidos altamente especializados que realizam a coleta, o processamento, o armazenamento e a reinfusão de produtos de CPrHs extraídos da medula óssea, sangue periférico ou até mesmo do sangue de cordão umbilical para o tratamento de pacientes apresentando uma ampla variedade de doenças (Tab. 37.4). Não só os enxertos de CPrHs são realizados da forma tradicional – exposição de pacientes com doença maligna a doses letais de quimioterapia e/ou radioterapia (transplantes mieloablativos) e para restaurar a função normal em pacientes com defeitos de hematopoiese (anemia aplástica, anemia falciforme) – como também são realizados transplantes hematopoéticos após a administração de uma terapia de indução mínima a certos pacientes (transplantes não mieloablativos). O sucesso desses transplantes depende do efeito "enxerto *versus* doença" produzido pelos linfócitos T do doador, no sentido de eliminar a doença residual em pacientes que apresentam doença maligna. No ano de 2000, aproximadamente 18 mil pacientes em todo o mundo foram tratados com alguma forma de enxerto hematopoético (Storb, 2003). A terminologia em transição é mostrada na Tabela 37.5.

Fontes de células hematopoéticas

O tecido hematopoético utilizado na transplantação pode ser obtido junto a uma ou mais fontes (Tab. 37.6). Indivíduos submetidos a enxertos autólogos ou autogênicos doam suas próprias células, as quais são congeladas e dessecadas antes da exposição a altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia. Imediatamente após a realização desse tratamento mieloablativo, as células do próprio paciente são dessecadas e nele reinfundidas. As CPrHs do próprio paciente transplantadas se alojam e reimplantam no estroma da medula, diferenciando-se em elementos formadores de células sanguíneas maduros. Outros pacientes que não são candidatos à transplantação autóloga, em decorrência da presença de células tumorais circulantes (p. ex., leucemias agudas), serão candidatos ao transplante alogênico. Nesse caso, o tecido hematopoético provém de um indivíduo que apresenta compatibilidade HLA satisfatória. O tecido hematopoético contém linfócitos viáveis capazes de reconhecer os antígenos HLA estranhos do hospedeiro e produzir uma reação enxerto *versus* hospedeiro (EVH). A intensidade dessa resposta imune do enxerto contra o hospedeiro pode variar de branda (grau 1) a severa (graus 3 e 4). A reação EVH, em particular de graus 3 e 4, continua sendo um dos riscos de morbidade e mortalidade mais significativos associados ao transplante de CPrHs alogênicas. Por esse motivo, os doadores são selecionados para que sejam escolhidos aqueles com a melhor compatibilidade HLA.

Esses doadores podem ser irmãos ou outros familiares HLA-compatíveis. Outra possibilidade é o paciente receber o enxerto de um indivíduo HLA-compatível que não pertença a sua família e tenha sido selecionado entre os inúmeros doadores registrados ao redor do mundo. Esses registros – dos quais o maior, nos EUA, é o do National Marrow Donor Program (NMDP) – recrutam indivíduos sadios que se disponham a doar altruisticamente suas medulas ósseas ou células progenitoras do sangue periférico (CPSPs) a indivíduos que necessitam de transplantes e não possuem nenhum doador HLA-compatível. Os doadores cadastrados nesses registros têm a medula ou CPSPs extraídas em um hospital ou centro hematológico localizado próximo de suas casas. Os enxertos assim obtidos são, então, transportados por um mensageiro até o centro de transplantação. O caráter anônimo é preservado tanto para o doador como para o receptor. Devido à necessidade de haver uma compatibilidade HLA quase perfeita, os registros devem incluir milhões de voluntários para que o paciente conte com uma probabilidade razoável de encontrar um doador compatível. Como não expressam antígenos ABO, as células progenitoras hematopoéticas pluripotentes se implantam no estroma da medula de indivíduos ABO incompatíveis. Em consequência, é eliminada a necessidade de haver compatibilidade entre os doadores, contanto que sejam removidas as hemácias maduras contidas nesses enxertos.

Tabela 37.4 Indicações para transplante hematopoético

Leucemia mieloide aguda
Leucemia linfoblástica aguda
Leucemia mielógena crônica
Mieloma múltiplo
Linfoma não Hodgkin
Síndromes mielodisplásicas
Doença de Hodgkin
Neuroblastoma
Sarcoma de Ewing
Rabdomiossarcoma
Anemia aplástica
Anemia falciforme
Talassemia
Imunodeficiência severa combinada

Tabela 37.5 Terminologia em transição

CPrH	Células progenitoras hematopoéticas, antigamente denominadas células-tronco hematopoéticas
CPrH, aférese	Células progenitoras hematopoéticas, aférese, antigamente denominadas células progenitoras de sangue periférico ou células-tronco hematopoéticas
CPrH, medula	Células progenitoras hematopoéticas derivadas da medula óssea
CPrH, sangue de cordão umbilical	Células progenitoras hematopoéticas derivadas de sangue de cordão

Tabela 37.6 Comparação entre fontes e produtos de células progenitoras hematopoéticas quanto às formas de coleta e complicações associadas

	Sangue de cordão (CPrH, CPrH-SCU)	**Autólogo (CPrH, aférese + medula)**	**Alogênico (CPrH, aférese + medula)**
Tipo de doador	Sangue de cordão umbilical	Paciente	Doador com ou sem grau de parentesco
Produto	Células-tronco/ progenitoras de sangue de cordão	Medula óssea ou células progenitoras do SP	Medula óssea ou células progenitoras do SP
Coleta	Cordão umbilical da placenta ao nascimento	Hemaférese ou medula durante o intraoperatório	Hemaférese ou medula durante o intraoperatório
Principal complicação	Células progenitoras em número insuficiente	Recorrência da doença original	Doença do enxerto *vs.* hospedeiro

CPrH, aférese = CPSP = células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico; CPrH, medula = CPMO = células progenitoras hematopoéticas da medula óssea; CPrH, SCU = CPSCU = células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical.

Medula óssea

A medula óssea é extraída a partir da crista ilíaca do doador, na sala cirúrgica e sob condições estéreis. Os doadores serão eleitos para receber anestesia geral ou espinal. A quantidade de medula a ser coletada depende do tamanho do receptor; em geral, é suficiente fornecer 2×10^8 células nucleadas/kg de peso corporal do receptor. Considerando um adulto de 70 kg, seria necessário coletar cerca de 700 mL de medula. A técnica envolve a coleta de aproximadamente 3 a 5 mL/aspiração em seringa heparinizada. A aspiração de um volume excessivo a partir

de um único sítio resultará na diluição da medula com sangue periférico. Usualmente, 2 pessoas executam o procedimento de coleta ao mesmo tempo, uma de cada lado da crista ilíaca do doador. Conforme é coletada, a medula aspirada vai sendo filtrada através de filtros com poros grandes para remoção de espículas ósseas e coágulos, sendo adicionado anticoagulante suplementar. Como as CPrHs estão contidas na fração de células nucleadas, a medula coletada muitas vezes é novamente processada para redução de volume, separando o creme leucocitário de uma ampla proporção de hemácias e volume plasmático. O creme leucocitário pode ser ainda mais processado para remoção de todas as hemácias, caso o doador e o receptor sejam ABO-incompatíveis, ou quando se quer depletar as células T. A medula óssea de doadores autogênicos é congelada e armazenada antes do uso. Por outro lado, as doações de medula alogênica em geral não são coletadas antes do dia da realização do transplante e, portanto, não requerem armazenamento.

Enquanto a medula óssea extraída da crista ilíaca constituía a fonte original e duradoura de CPrHs para transplantação, o desenvolvimento de novas tecnologias na última década permitiu coletar essas células a partir do sangue periférico tanto de pacientes como de doadores normais, e até mesmo do sangue de placenta ou cordão umbilical.

Células progenitoras do sangue periférico

O estímulo ao desenvolvimento de tecnologias que possibilitassem a coleta de CPrHs a partir do sangue periférico foi seu potencial uso em transplantes autólogos nos casos em que há grande preocupação com a contaminação da medula por células tumorais malignas. Graças à relativa facilidade de execução da coleta por hemaférese quando comparada à coleta de medula óssea, as células progenitoras obtidas do sangue periféricos estão sendo cada vez mais utilizadas em condições alogênicas. Uma das áreas em que esse tipo de coleta deve exercer impacto significativo se refere aos doadores não aparentados ou voluntários. Esse impacto deve resultar no aumento do número de indivíduos que se tornam voluntários nos programas nacionais de doação de medula, diante da oferta da hemaférese como alternativa à coleta de medula óssea tradicional. A aparelhagem e os procedimentos utilizados para coleta de células progenitoras do sangue periférico são descritos no Capítulo 36.

Nitidamente, a grande vantagem da obtenção de células progenitoras do sangue periférico em relação à obtenção de células da medula está no tempo necessário para a formação de enxerto de neutrófilos e plaquetas: 8 a 12 dias em média para células progenitoras do sangue periférico mobilizadas, comparado a 2 – 4 semanas para células da medula óssea (Gianni, 1989). Essa rápida recuperação reduz visivelmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas à ocorrência de neutropenia/trombocitopenia profunda, além de diminuir os custos associados à internação hospitalar, suporte transfusional, tratamento de complicações e assim por diante.

Há 3 décadas já era sabido que as CPrHs podem ser encontradas no sangue periférico após a recuperação da quimioterapia (Richman, 1976). Somente mais tarde, no entanto, foram desenvolvidos sistemas de hemaférese que permitiram a coleta segura dessas células em números adequados para implantação no receptor após a quimioterapia (Kessinger, 1988). Para a maioria dos pacientes submetidos ao transplante autólogo, a coleta por aférese de grandes volumes (14–20 L/procedimento) atualmente está bem estabelecida como forma eficiente de coletar números adequados de CPrHs realizando um número razoável de procedimentos, a fim de proporcionar uma recuperação hematopoética apropriada.

As CPrHs são morfologicamente indistinguíveis das demais células mononucleares encontradas na medula ou no sangue periférico, ainda que a coleta de um número adequado de células seja essencial para sustentar a formação do enxerto de medula no receptor. De forma tradicional, as coletas de medula óssea objetivam extrair células nucleadas em quantidade suficiente para garantir a obtenção de um número mínimo de células progenitoras. É possível testar os enxertos de medula quanto à atividade de células progenitoras por meio de ensaios de formação de colônias (Iscove, 1971). Essa técnica consiste em cultivar uma amostra de células mononucleares em meio de metilcelulose suplementada com fatores de crescimento hematopoético e aminoácidos essenciais durante 10 a 14 dias. Ao final desse período, as placas de cultura são examinadas quanto ao número e ao tipo de CFUs características, incluindo unidade formadora de explosão eritroide (BFU-E), colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) e colônias mistas – granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (CFU-GEMM). Grupos contendo mais de 50 células são classificados como colônias. Coleções contendo mais de 1×10^5 CFUs/kg de peso do receptor são consideradas adequadas.

Conforme a coleta de enxertos de células progenitoras passou a ser realizada utilizando procedimentos de hemaférese de sangue periférico, tornou-se necessário desenvolver um ensaio que fosse concluído em um único dia e pudesse ser empregado para determinar o número requerido de coletas de hemaférese. A quantificação do número de células expressando antígeno CD34 por citometria de fluxo ganhou ampla aceitação como método de avaliação do grau de adequação das coletas de células progenitoras do sangue periférico. A expressão do antígeno CD34 é restrita às células primitivas de todas as linhagens (Civin, 1989). Foi demonstrado que a coleta de produtos de hemaférese empregando a quantificação de células $CD34^+$ como índice de eficácia do enxerto resulta na sustentação do enxerto hematopoético (Berenson, 1991). A padronização do ensaio celular para detecção de CD34 e a disponibilidade da análise por citometria de fluxo resultaram na utilização da quantificação de células $CD34^+$ pela maioria dos programas, com o objetivo de determinar o número e o grau de adequação das coletas de células progenitoras do sangue periférico (Sutherland, 1994). De uma forma geral, coletas de células progenitoras do sangue periférico contendo 3×10^6 células $CD34^+$/kg de peso corporal do receptor são consideradas adequadas à promoção da formação de enxertos de neutrófilos em 8 a 10 dias.

A coleta de CPrHs de doador ou paciente não mobilizado requer a execução de múltiplos procedimentos de aférese ou coletas, uma vez que o número de CPrHs existentes no sangue periférico representa cerca de 1/10 a 1/100 do número de células encontrado na medula. Assim, é necessário realizar terapias de "mobilização" para aumentar o número de CPrHs circulantes e, desse modo, melhorar a eficácia da coleta por hemaférese. Richman (1976) constatou que a queda do número de células $CD34^+$ circulantes após a quimioterapia é seguida de um aumento de 4 a 5 vezes do percentual dessas células exatamente quando a contagem absoluta de neutrófilos começa a se recuperar, usualmente 14 a 21 dias após a terapia. Esse aumento da concentração de células $CD34^+$ circulantes atinge o máximo quando são empregados agentes quimioterápicos como citoxan e etoposídeo. Se a coleta por hemaférese for realizada durante essa janela, é possível recuperar um número elevado de CPrHs executando um número limitado de procedimentos, mesmo que a contagem total de células brancas seja inferior a 10.000 células/μL. Como é curto o período (2 a 3 dias) em que os níveis de células $CD34^+$ circulantes se mantêm altos, é crítico monitorar cuidadosamente a contagem de células brancas e de células $CD34^+$ no sangue periférico do paciente, bem como o momento em que a coleta por hemaférese é realizada. Além disso, alguns investigadores perceberam que a coleta de CPrHs autólogas durante a fase de recuperação da quimioterapia diminui a probabilidade de contaminação do produto de aférese por células tumorais. O uso de fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF) e de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) também resulta em aumento significativo do número de células $CD34^+$ circulantes no sangue periférico (Siena, 1989). A administração de doses de 5 a 10 μg/kg de peso corporal durante 4 a 5 dias resultará em aumento de 5 a 10 vezes do número de células CPrHs no sangue periférico. Foi demonstrado que o uso isolado de G-CSF é mais eficaz que o condicionamento quimioterápico para coleta de células $CD34^+$. A combinação do condicionamento quimioterápico ao uso de fatores de crescimento (principalmente G-CSF) produz máxima mobilização de CPSPs e minimiza o número de procedimentos de hemaférese necessários para coletar uma dose de transplante de CPrHs. Essa é a estratégia adotada pela maioria dos programas de transplante autogênico.

Investigou-se a administração de G-CSF ao doador alogênico sadio para mobilizar CPrHs e, além da ocorrência de efeitos suaves (p. ex., dor óssea e dor de cabeça), o procedimento foi bem tolerado (Anderlini, 1997). Cada vez mais, os programas de transplante estão utilizando sangue periférico, em vez de medula, como fonte de CPrHs para realização tanto de transplantes alogênicos como de autogênicos. O maior risco de desenvolvimento de doença do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH) por receptores alogênicos de CPrHs de sangue periférico comparativamente aos receptores de CPrHs de medula (Cutler, 2001)

tem estimulado a realização de triagens em busca de novas tecnologias modificadoras desses enxertos (ver adiante: purga de células T).

Sangue de cordão umbilical

O fato de haver maiores números de células de unidades formadoras de colônia ou células progenitoras no sangue de cordão umbilical é conhecido há muitos anos. Todavia, somente em 1989 foram realizadas as primeiras tentativas de utilizar células recuperadas a partir de cordões umbilicais de placenta no transplante hematopoético (Gluckman, 1989). O aparente sucesso de vários desses transplantes iniciais utilizando sangue de cordão conduziu à organização de diversos bancos de sangue de cordão nos Estados Unidos e na Europa, em uma tentativa de fornecer outra fonte de tecido de células progenitoras para pacientes que necessitam de transplante alogênico. Além disso, como as células progenitoras são obtidas a partir do sangue do cordão, parece haver maior tolerância a certo grau de incompatibilidade HLA possivelmente existente entre o doador e o receptor, sem produção de reações EVH de graus 3 ou 4. Assim, o transplante hematopoético pode ser disponibilizado a alguns pacientes que, de outro modo, não poderiam contar com um doador HLA-compatível (Laughlin, 2001). As células progenitoras do sangue de cordão umbilical são coletadas por canulação das veias placentárias enquanto a placenta ainda está no útero ou, mais comumente, após o parto, ou ainda pela expressão direta da placenta para extração do sangue de cordão após o parto. O número de CPrHs recuperado é diretamente proporcional ao volume de sangue de cordão coletado. Esse, por sua vez, varia conforme o tamanho do bebê e da placenta, e também conforme o grau de experiência de quem realiza a coleta (Wagner, 1992). Comumente, são obtidos volumes de 40 a 150 mL em centros experientes. Essa quantidade resultará na coleta de aproximadamente 4 a 11 × 10^8 células nucleadas. Coletas cujo volume é inadequado (< 40 mL) costumam ser descartadas. Em geral, as coletas de sangue de cordão umbilical não são novamente processadas para redução de volume, sendo diretamente congeladas com DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido. Uma equipe especialmente treinada e a postos na sala de parto não é distraída pela prestação de assistência à mãe e/ou ao bebê, além de reduzir o risco de contaminação bacteriana do sangue de cordão.

É essencial obter a história médica da mãe, bem como submetê-la a testes para garantir a segurança do produto de sangue de cordão e constatar a ausência de doenças genéticas. Além das determinações laboratoriais padrão para detecção de doenças sorologicamente transmissíveis, também são realizados testes para detecção de doenças virais e bacterianas.

Embora o banco de sangue de cordão ofereça um estimulante potencial para graus de histocompatibilidade menores e, assim, de maior disponibilidade de pacientes, existem aspectos críticos que precisam ser abordados: métodos para expandir o número de células a fim de fornecer quantidade adequada de CPrHs para receptores maiores e os custos envolvidos no estabelecimento e na manutenção dos bancos de sangue de cordão (Grewal, 2003).

Enxertos hematopoéticos não mieloablativos

A eliminação de células tumorais pode ser parcialmente conseguida por meio da quimioterapia ou radioterapia utilizada em regimes condicionantes de doses altas. Além disso, devido às maiores taxas de morbidade e mortalidade associadas a enxertos alogênicos de CPrHs com doses elevadas, inúmeros pacientes são excluídos como possíveis candidatos aos tradicionais transplantes de CPrHs em decorrência da idade ou por apresentarem comorbidades. Esses e outros dados que demonstram o potencial benefício proporcionado por transplantes de CPrHs alogênicas *versus* autólogas conduziram à investigação em torno de protocolos de transplante não mieloablativos – também denominados transplantes de CPrHs alogênicas de intensidade reduzida.

Estudos iniciais realizados com camundongos demonstraram que receptores de enxertos alogênicos apresentaram maior sobrevida quando comparados aos receptores de enxertos singênicos (Barnes, 1957). Estudos posteriores realizados com seres humanos demonstraram a ocorrência desse mesmo efeito enxerto *vs.* leucemia em pacientes transplantados para curar leucemias agudas. Esse efeito pareceu estar correlacionado ao desenvolvimento de DEVH crônica pelo receptor (Weiden, 1981). A dependência desse efeito em relação aos linfócitos T do doador foi novamente demonstrada pela alta taxa de recidivas apresentada pelos pacientes que haviam recebido enxertos de CPrHs depletados de células T (Marmont, 1989). Os esforços iniciais se concentraram na infusão de linfócitos T do doador após o transplante das CPrHs em pacientes que haviam apresentado recaída (Kolb, 1990). Essa técnica passou a ser conhecida como infusão de linfócitos do doador (ILD). Como esses pacientes não foram submetidos à quimioterapia adicional, a abordagem seguinte foi uma tentativa de transplantar CPrHs de sangue periférico sem realizar condicionamento (Porter, 1999). Com isso, rapidamente ficou claro que era necessário realizar alguma terapia condicionante (principalmente imunossupressora) para permitir a implantação das células do doador. Atualmente, os regimes condicionantes para transplantes não mieloablativos objetivam fornecer imunossupressão suficiente para permitir a implantação das células do doador, em vez de eliminar a carga tumoral. Uma maior concentração de linfócitos T presente em enxertos de CPrHs de sangue periférico, em comparação ao observado nos enxertos de células de medula, parece reduzir o risco de rejeição ao enxerto. Essa ação se dá pela supressão dos linfócitos T do hospedeiro, bem como pelo favorecimento do desenvolvimento de um efeito enxerto *versus* leucemia. A ILD também pode ser realizada posteriormente, caso a implantação das células T do doador tenha sido insuficiente ou o paciente apresentar recaída.

Nos transplantes de CPrHs não mieloablativos, o controle da doença é mediado pelo reconhecimento de células tumorais residuais pelas células T do doador. Para que isso ocorra, é necessário haver estabelecimento de um quimerismo de linfócitos T ao menos parcial, quando não a completa substituição por células T do doador. Tal é a cinética da formação do enxerto de células T em transplantes de CPrHs não mieloablativos, que pode ser necessário um período de até 1 ano para haver remissão completa da doença (Childs, 1999). Portanto, essa terapia é inadequada para pacientes com leucemias agudas sem história de remissão, ou em casos de malignidade agressiva que possam apresentar recidiva precoce. Enquanto menores taxas de morbidade e mortalidade estão associadas ao regime de condicionamento para transplantes de CPrHs não mieloablativos, o maior risco de desenvolver DEVH continua sendo o mesmo observado após a instituição de regimes condicionantes com doses elevadas. Por causa do maior risco de desenvolvimento de DEVH e de rejeição do enxerto em transplantes de CPrHs envolvendo indivíduos sem parentesco, principalmente se houver incompatibilidade HLA, ainda se faz necessário verificar se esse grupo de pacientes será beneficiado pela realização de transplantes de CPrHs não mieloablativos (Niederwieser, 2003).

A reduzida toxicidade dos regimes de preparação viabiliza seu uso para pacientes idosos e também está associada a uma menor carga transfusional, além de internações hospitalares mais curtas (Weissinger, 2001). A menor toxicidade e os melhores resultados produzidos por essa terapia contribuíram para o rápido crescimento da comunidade de transplantes hematopoéticos. O European Group for Blood and Marrow Transplantation relatou uma incidência de 27% de transplantes de CPrHs não mieloablativas envolvendo receptores de transplantes alogênicos, no ano 2000 (Gratwohl, 2002).

Purga

Uma vez coletadas as CPrHs, seja a partir da medula ou do sangue periférico, com frequência é vantajoso processar novamente o produto de CPrHs coletado em uma tentativa de reduzir uma possível contaminação com células tumorais ou, em caso de transplantação alogênica, de reduzir o número de linfócitos T. Para tanto, têm sido adotadas duas abordagens não mutualmente exclusivas. A primeira delas tem como objetivo eliminar as células tumorais e constitui a base das conhecidas técnicas de purga ou de seleção negativa. A outra abordagem emprega métodos para separar e coletar apenas CPrHs $CD34^+$, descartando a fração celular remanescente, na qual provavelmente estão contidas as células tumorais. Esses métodos usualmente são referidos como técnicas de seleção positiva (Tab. 37.7).

As técnicas de purga originalmente empregavam uma variedade de métodos específicos e inespecíficos para remover a população de célu-

Tabela 37.7 Métodos de purga de células-tronco

Seleção positiva
Seleção de células CD34+
Colunas de fase sólida
Pérolas magnéticas
Seleção negativa
Farmacológica
4-hidroxiperoxiciclofosfamida (4-HC)
Etoposídeo (VP-16)
Imunológica
Célula tumoral + AcMo + toxina
Toxina = complemento/ricina/outra substância
Célula tumoral + AcMo + fase sólida
Fase sólida = coluna com pérolas

las indesejadas. Os métodos originais empregavam o uso de fármacos citotóxicos, como 4-hidroxiperoxiciclofosfamida (4-HC) e etoposídeo (VP-16), para remover células tumorais contaminantes (Yeager, 1986). Esses métodos são o equivalente *in vitro* da quimioterapia de altas doses e, assim, o principal efeito negativo que produzem é danificar as CPrHs. Outras tecnologias incluíam o uso de lectinas e/ou formação de rosetas para eliminar populações celulares indesejadas, principalmente células T. Mais recentemente, anticorpos monoclonais dirigidos contra um receptor celular específico foram utilizados tanto com complemento ou acoplados a imunotoxinas (p. ex., ricina) para realmente lisar a população de células tumorais contaminantes. Do mesmo modo, com o advento da tecnologia das pérolas imunomagnéticas, é possível acoplar anticorpos monoclonais a essas pérolas. O complexo anticorpo-pérola-célula tumoral é, então, removido através da passagem da suspensão de células por um campo eletromagnético. As populações celulares indesejadas ficarão retidas nesse campo, enquanto as CPrHs serão lavadas e coletadas.

As técnicas de seleção positiva se concentram na presença seletiva do marcador CD34 nas CPrHs, bem como na disponibilidade de anticorpos monoclonais contra esse marcador. Enquanto a tecnologia original empregava uma coluna em que haviam anticorpos monoclonais ligados, os métodos atuais utilizam pérolas ou esferas imunomagnéticas. A fração celular mononuclear proveniente da coleta de medula óssea ou da coleta por hemaférese é incubada com anticorpos monoclonais anti-CD34 ou outro anticorpo monoclonal de interesse. Em seguida, é adicionada uma suspensão de pérolas imunomagnéticas marcadas com um segundo anticorpo. Esse anticorpo secundário se liga ao anticorpo monoclonal anti-CD34, formando um complexo pérola-célula-alvo. Quando a suspensão celular subsequentemente atravessa um campo magnético, o complexo célula $CD34^+$-pérola magnética fica retido, sendo eliminada a suspensão de células mononucleares remanescentes que contêm células tumorais ou células T $CD3^+$. As células progenitoras $CD34^+$ são, assim, soltas das pérolas magnéticas pela ação de um agente liberador, enquanto as pérolas são removidas pela reaplicação do campo magnético. A suspensão obtida contém em torno de 90% de células $CD34^+$. A redução do número de células T $CD3^+$ equivale a uma depleção da ordem de 3,5 $\log_{10}$. A recuperação média de células $CD34^+$ equivale a aproximadamente 50% da concentração inicial de células $CD34^+$ existente no produto de hemaférese. Há controvérsias quanto aos benefícios proporcionados pelas seleções positiva e negativa de purga dos enxertos de CPrHs, em termos de redução da contaminação por células tumorais e das taxas de recaída de doença (de Lima, 2004). Essas técnicas, exceto a depleção de células T, têm sido intensamente investigadas, porém ainda são consideradas experimentais.

Depleção de células T

Técnicas empregadas para reduzir o número de linfócitos T em enxertos hematopoéticos alogênicos, principalmente de medula, têm sido direcionadas à redução da incidência e grau de severidade da DEVH. Uma grande parte das técnicas para purgar células tumorais mencionadas, como a seleção positiva de células $CD34^+$, também tem sido aplicada na redução da população de células T presente no enxerto (Tab. 37.8). Outras técnicas dirigidas especificamente às células T incluem aglutinação com lectina de soja, formação de roseta-E, combinações desses dois, elutriação por contracorrente e anticorpos monoclonais.

Tabela 37.8 Métodos de depleção de linfócitos T

Lectinas
Lectina da soja com formação de rosetas-E
Centrifugação por contracorrente
Imunológicos
Anticorpo
Anticorpo + complemento
Anticorpo + fase sólida
Seleção positiva

A lectina de soja produz uma aglutinina específica para o receptor CD2 expresso em linfócitos e, portanto, aglutina células T $CD2^+$. A adição de uma etapa de formação de roseta com eritrócitos de carneiro elimina células T remanescentes que não foram aglutinadas pela lectina. Essa metodologia resulta na depleção de células T da ordem de 2 a 3 $\log_{10}$ (Reisner, 1982). As triagens atualmente realizadas utilizando anticorpos monoclonais têm se baseado no uso de anticorpos anti-CD52 tanto *in vitro*, para tratamento do produto de CPrHs, como *in vivo*, para reduzir a população de linfócitos T do hospedeiro (Chakraverty, 2002).

A elutriação por contracorrente consiste em um método empregado para depletar células T, que utiliza a característica separação de células em campo centrífugo, com base no tamanho e na densidade das várias populações celulares. Uma das vantagens desse sistema reside no fato de não serem adicionados agentes quimioterápicos nem anticorpos à população de CPrHs. Dessa forma, a função celular não é comprometida. Concentrados de creme leucocitário obtidos a partir da medula são introduzidos na centrífuga a diferentes velocidades de fluxo, permitindo a coleta de frações celulares de diferentes tamanhos e densidades. O sistema é altamente eficaz em termos de separação da fração rica em CFU-GM de uma fração de linfócitos $CD3^+$. Como as células não sofrem alterações, a fração $CD3^+$ pode ser quantificada e parcialmente devolvida à fração CFU-GM com o intuito de fornecer uma dose controlada de células $CD3^+$, caso haja interesse clínico (Noga, 1990). O grau de recuperação celular é alto e, dada a biocompatibilidade do meio de elutriação, é possível reinfundir o(s) produto(s) sem a necessidade de etapas de lavagem adicionais. As principais desvantagens desse procedimento são o custo dos equipamentos utilizados e a necessidade de contar com operadores experientes.

A introdução de técnicas que utilizam pérolas imunomagnéticas para seleção positiva de células $CD34^+$ também conduziu ao uso das mesmas em condições de transplantação alogênica, pela resultante depleção de células T $CD3^+$, em particular nas coletas de células progenitoras de sangue periférico. A tecnologia das pérolas imunomagnéticas é facilmente aplicável aos produtos de células progenitoras de hemaférese, bem como aos produtos mais volumosos da coleta de medula óssea. Há relatos de diversos centros que utilizaram com sucesso esses novos métodos para redução da população de células T $CD3^+$ na transplantação alogênica, em particular quando doador e receptor eram apenas parcialmente compatíveis quanto ao HLA (Henslee-Downey, 1997).

Uma vantagem extra proporcionada por ambas as técnicas – de purga e seleção positiva – é o volume resultante significativamente reduzido de produto de células progenitoras a ser congelado, dessecado e reinfundido no paciente. Em consequência, há uma significativa redução das tonicidades associadas à reinfusão de produtos contendo DMSO, bem como dos custos envolvidos nas etapas de congelamento e armazenamento para o laboratório de células progenitoras. Atualmente, as tecnologias certificadas para purga e/ou seleção positiva objetivando a redução da contaminação com células tumorais são onerosas, e há necessidade de obter mais dados que permitam avaliar a eficácia clínica desses procedimentos em termos de redução da concentração de células tumorais. Há relatos de alguns centros que conseguiram melhorar os resultados clínicos graças ao uso combinado das técnicas de purga e seleção positiva (Clarke, 1998).

Ambas as técnicas de seleção – positiva e negativa – incorrem em uma perda concomitante de até 50% do número original de células $CD34^+$, seja por toxicidade do agente (quimioterápicos, complemento), captura por complexos contendo pérolas magnéticas ou perdas ocorridas durante as etapas de lavagem requeridas. A hemaférese ou coleta de medula óssea de células $CD44^+$ inicial deve ser intensificada para cobrir subsequentes perdas ocorridas durante o processamento. Essa tarefa pode ser difícil no caso de pacientes que apresentam dificuldades de mobilização.

A principal desvantagem associada à depleção de células T reside no consequente aumento da incidência de recaídas de doenças. Pacientes que desenvolvem DEVH suave parecem exibir menor incidência de recaída de doenças neoplásicas em comparação aos pacientes que não desenvolvem DEVH. A presença de uma população de células T do doador parece ser crítica à manifestação do efeito enxerto *vs.* leucemia, em que o reconhecimento dos antígenos do hospedeiro pelas células T do doador gera uma resposta imune que elimina células tumorais residuais presentes no hospedeiro. Estudos mais recentes também demonstraram um papel para as células *natural killer* (NK) no efeito enxerto *versus* leucemia. Há trabalhos que utilizaram combinações de técnicas, como seleção de $CD34^+$ e elutriação por contracorrente, para criar uma fração rica em células $CD34^+$ e outra rica em células NK/depletada de células T, aproveitando o fato de as células NK aparentemente possuírem atividade antitumoral sem, no entanto, contribuírem para o efeito EVH (Skiera, 1999).

Criopreservação de enxertos hematopoéticos

Enxertos de CPrHs de todas as coletas autogênicas e de parte significativa das coletas alogênicas são criopreservados e armazenados antes do uso. O protocolo mais comum envolve a utilização de DMSO a 10% como agente crioprotetor, congelamento com controle de taxa e armazenamento em nitrogênio, seja em sua fase gasosa ou líquida. O uso de DMSO proporciona uma melhora significativa da viabilidade pós-dessecação, em comparação a outros agentes, como o glicerol. Devido às toxicidades associadas à infusão pós-dessecação de produtos de células progenitoras contendo DMSO, outros investigadores se voltaram à utilização de menores concentrações, adição de hetamido ou outros aditivos, todavia o DMSO ainda permanece sendo empregado pela maioria dos programas. Tentativas de lavagem dos produtos após a dessecação para reduzir o conteúdo de DMSO resultaram em uma perda considerável de células progenitoras. As estratégias atualmente adotadas objetivam reduzir o volume de produto no pré-congelamento e, assim, diminuir a quantidade de DMSO necessária.

Reinfusão de produtos de células progenitoras

Independentemente da fonte de enxerto de células progenitoras, as CPrHs são infundidas no receptor de modo bastante similar à transfusão de qualquer produto sanguíneo. As células progenitoras pluripotentes, com seus receptores de membrana exclusivos, se alojam no espaço medular, formam enxerto e se replicam. Produtos submetidos à criopreservação com DMSO, na maioria dos casos, são dessecados e imediatamente reinfundidos sem serem lavados. CPrHs coletadas por hemaférese sem processamento adicional podem vir acompanhadas de um número considerável de hemácias. A criopreservação com DMSO não preserva a integridade da membrana celular das hemácias, de modo que esses produtos apresentam grande quantidade de hemoglobina livre após a dessecação. As reações desenvolvidas pelo receptor variam de suave – caracterizadas por náusea, calafrios ou dor de cabeça – a mais severas – com hipotensão, sepse, insuficiência renal ou até mesmo parada cardíaca (Stroncek, 1991). Esses efeitos adversos estão listados na Tabela 37.9. Receptores de produtos de células progenitoras criopreservados em geral são pré-medicados com anti-histamínicos e/ou anti-heméticos. Hidratação adequada e uso de diuréticos também são indicados para a redução das toxicidades renais associadas à hemoglobina livre e às infusões de maior volume.

Tabela 37.9 Reações adversas observadas em pacientes transfundidos com produtos de células progenitoras criopreservadas

Comuns
Calafrios
Náusea
Êmese
Febre
Dor de cabeça
Dispneia
Incomuns
Insuficiência renal
Parada cardíaca
Hipotensão
Sepse
Fatores contribuintes
Volume de produto reinfundido
Tipo e quantidade de crioprotetor infundido
Volume de hemácias incompatíveis (produtos alogênicos)
Contaminação bacteriana

Referências bibliográficas

American Association of Tissue Banks (AATB): Standards for Tissue Banking. McLean, VA, American Association of Tissue Banks, 2002.

American Association of Tissue Banks (AATB): Annual Statistical Report. McLean, VA, American Association of Tissue Banks, 2004.

Anderlini P, Korbling M, Dale D, et al: Allogenic blood stem cell transplantation: Consideration for donors. Blood 1997; 90:903–908.

Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF: Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow II. Br J Haematol 1957; 3:241–252.

Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, et al: Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. Blood 1991; 77:1717–1722.

Boldt J, Cline D, McLaughlin D: Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. Hum Reprod 2003; 18:1250–1255.

Boyle KE, Vlahos N, Jarow JP: Assisted reproductive technology in the new millennium: part II. Urology 2004; 63:217–224.

Trata-se, na parte I, de uma excelente revisão sobre as abordagens para casos de infertilidade atualmente adotadas.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Update: Creutzfeldt–Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts – Japan, 1979–2003. Morbidity & Mortality Weekly Report 2003; 52:1179.

Cetin I, Pardi G; A multidisciplinary approach to the future of reproduction. Placenta 2003; 24: s3–s4.

Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, et al: Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. Blood 2002; 99:1071–1078.

Destaca os riscos, benefícios e novos métodos para realização de transplantes hematológicos em pacientes que não possuem doador compatível.

Childs R, Clave E, Contentin N, et al: Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogenic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. Blood 1999; 94:3234–3241.

Civin C, Trischman T, Fackler MJ, et al: Summary of CD34 cluster workshop section. In Knapp W, Dorken B, Gilks WR, et al: (eds): Leukocyte Typing IV. Oxford, Oxford University Press, 1989; pp 818–824.

Clarke E, Potter MN, Hale G, et al: Double T cell depletion of bone marrow using sequential positive and negative cell immunoaffinity or CD34+ cell selection followed by Campath-1M; effect on CD34+ cells and progenitor cell recoveries. Bone Marrow Transplant 1998; 22:117–24.

Conrad EU, Gretch D, Obermeyer KR, et al: The transmission of hepatitis C virus by tissue transplantation. J Bone Joint Surg 1995; 77-A:214–224.

Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, et al: Acute and chronic graft-versus-host disease after allogenic peripheral blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. J Clin Onc 2001; 19:3685–3691.

De Lima M, Shpall EJ: Ex-vivo purging of hematopoietic progenitor cells. Current Hematology Reports 2004; 3:257–264.

Boa revisão sobre os métodos e triagens da purga ex-vivo.

Eastlund T: Tissue and organ preservation and transplantation. In Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould SA (eds): Principles of Transfusion Medicine. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, pp 825–831.

Uma visão geral das práticas atuais de Transplante de Tecidos, incluindo ossos e aloenxertos de pele.

Eastlund T: The histo-blood group ABO system and tissue transplantation. Transfusion 1998; 38:975–988.

Evers JL: Female subfertility. Lancet 2002; 360:151–159.

Eye Bank Association of America: Annual Statistical Report. Washington, DC, Eye Bank Association of America, 1999.

Eye Bank Association of America: Annual Statistical Report. Washington, DC, Eye Bank Association of America, 2004.

Ezra-Cohen HE, Cook SF, et al: Blood typing compact human bone tissue. Nature 1961; 191:1267–1268.

Food and Drug Administration. Current good tissue practice for human cell, tissue and cellular and tissue-based product establishments, inspection and enforcement, final rule. 21 Code of Federal Regulations, parts 16, 1270 and 1271: November 24, 2004.

Gianni AM, Bregni M, Siena S, et al: Rapid and complete hematopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells. A changing role for high-dose chemo-radiotherapy? Hematol, Oncol 1989; 7:139–148.

Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach A, et al: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321:1174–1178.

Gorin NC: Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cell. In Gladstone AH (ed): Clinics in Haematology. London, WB Saunders Company, 1986, pp 19–48.

Uma longa e abrangente descrição sobre a fisiologia e as práticas de congelamento de células.

Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, et al: Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey. Bone Marr Transp 2002; 30:813–831.

Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE: Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? Blood 2003; 101:4233–4244.

Henslee-Downey PJ, Abhyankar SH, Parrish RS, et al: Use of partially mismatched related donors extends access to allogenic marrow transplant. Blood 1997; 89:3864–3872.

Hill Z, Vacl J, Kalasova E, et al: Haemolytic disease of the newborn due to anti-D antibodies in a Du positive mother. Vox Sang 1974; 27:92–94.

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al: Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. Hum Reprod 2002; 17:999–1005.

Iscove NN, Senn JS, Till JE, McCulloch EA: Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: Effect of conditioned medium from human leukocytes. Blood 1971; 37:1–5.

Jackson DW, Windler GE, Simon TM: Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. Am J Sports Med 1990; 18:1–10.

Kainer MA, Linden JV, Whaley DN, et al: Clostridium infections associated with muscoskeletal-tissue allografts. N Engl J Med 2004; 350:2564–2571.

Kearney JN: Quality issues in skin banking: A review. Burns 1998; 24:299–305.

Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, et al: Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. Blood 1988; 71:723–727.

Fornece o trabalho mais antigo e os últimos refinamentos introduzidos nos transplantes hematopoéticos autólogos realizados por um dos primeiros grupos a descrever esta terapia.

Kolb HJ, Mittermulller J, Clemm CH, et al: Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood 1990; 76:2462–2465.

Laub GW, Muralidharan S, Clancy R: Cryopreserved allograft veins as alternative coronary artery bypass conduits: Early phase results. Ann Thorac Surg 1992; 54:826–831.

Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, et al: Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. New Engl J Med 2001 344:1815–1822.

Revisão excelente sobre as triagens de transfusões de sangue de cordão umbilical.

Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. Natl Cancer Inst 1951; 12:197–201.

Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM: Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. Hum Reprod 2004; 10:3–18.

Marmont AM, Gale RP, Butturini A, et al: T-cell depletion in allogenic bone marrow transplantation: progress and problems. Haematologica 1989; 74(3):235–248.

Medawar PB: Relationship between antigens of blood and skin. Nature 1946; 157:161–170.

Medawar PB: Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. Br J Exp Pathol 1948; 29:58–62.

Mohan S, Baylink DJ: Bone growth factors. Clin Orthop 1991; 263:30–48.

Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, et al: Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. Blood 2003; 101:1620–1629.

Noga SJ, Wagner JE, Rowley SD, et al: Using elutriation to engineer bone marrow allografts. Prog Clin Biol Res 1990; 333:345–359.

O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH: Cryopreserved viable allograft aortic valves. In Yankoh AC, Hetzer R, Miller DC, et al: (eds): Cardiac Valve Allografts 1972–1987. New York, Springer-Verlag, 1988, pp 311–318.

Palermo GD, Joris H, Devroey P: Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoan into an oocyte. Lancet 1992; 340:17–18.

Porter DL, Connors JM, Van Deerlin VM, et al: Graft-versus-tumor induction with donor leukocyte infusions as primary therapy for patients with malignancies. J Clin Oncol 1999; 17:1234.

Reisner Y, Kapoor N, Hodes MZ, et al: Enrichment for CFU-C from murine and human bone marrow using soybean agglutinin. Blood 1982; 59:360–363.

Richman CM, Weiner RS, Yankee RA: Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. Blood 1976; 47:1031–1039.

Shorr N, Perry J, Goldberg RA, et al: The safety and applications of acellular human dermal allograft in ophthalmic plastic and reconstructive surgery: a preliminary report. Ophthal Plast Reconstr Surg 2000; 16:223–230.

Siena S, Bregni M, Brando B, et al: Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Blood 1989; 74:1905–1914.

Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, et al: Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 1992; 326:726–732.

Skiera D, Zeller W, Zander AR: Graft engineering of G-CSF-mobilized allogenic leukapheresis products by counterflow centrifugal elutriation after CD34 column. J Hematol 1999; 8:299–304.

Steptoe P, Edwards R: Pregnancy in an infertile patient after transfer of an embryo fertilized in vitro. Brit Med J 1983; 286:1351–1352.

Storb R: Allogenic hematopoietic stem cell transplantation – yesterday, today, and tomorrow. Exp Hem 2003; 31:1–10.

Revisão interessante, não técnica, realizada por um dos líderes em transplantação hematopoética.

Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, et al: Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. Transfusion 1991; 31:521–526.

Sutherland DR, Keating A, Nayar R, et al: Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral blood and cord blood by flow cytometry. Exp Hematol 1994; 22:1003–1010.

Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, et al: Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. J Clin Invest 1959; 38:1709–1716.

Tomford WW: Musculoskeletal Tissue Banking. New York, Raven Press, 1993.

United Network for Organ Sharing: 2002 Annual Report. United Network for Organ Sharing, Richmond, VA, 2003, p 1.

Volker-Dieben HJ, D'Amaro J, Kok-van Alphen CC: Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. Aust N Z J Ophthalmol 1987; 15:11–18.

Wagner WE, Broxmeyer HE, Cooper S: Umbilical cord and placental blood hematopoietic stem cells: Collection, cryopreservation and storage. J Hematother 1992; 1:167–175.

Walker PJ, Mitchell RS, McFadden PM: Early experience with cryopreserved saphenous vein allografts as a conduit for complex limb-salvage procedures. J Vasc Surg 1993; 18:561–568.

Weiden PL, Sullivan KM, Flourneoy N, et al: Antileukemic effects of chronic graft vs host disease. Contribution to improved survival after allogenic marrow transplantation. N Eng J Med 1981; 304:1529–1533.

Weipert J, Meisner H, Mendler N: Allograft implantation in pediatric cardiac surgery: Surgical experience from 1982–1994. Ann Thorac Surg 1995; 60(Suppl):S101–S104.

Weissinger F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al: Decreased transfusion requirements for patients receiving nonmyeloablative allogenic hematopoietic stem cell transplants from HLA-identical siblings. Blood 2001; 98:3584–3588.

Yeager AM, Kaizer H, Santos GW, et al: Autologous bone marrow transplantation in patients with acute nonlymphocytic leukemia, using ex vivo marrow treatment with 4-hydroperoxycyclophosphamide. N Engl J Med 1986; 315:141–147.

PARTE V

Hemostasia e trombose

Editor

Jonathan L. Miller MD PhD

CAPÍTULO 38

Coagulação e fibrinólise

Alvin H. Schmaier MD, Courtney D. Thornburg MD MS, Steven W. Pipe MD

Generalidades sobre a coagulação e a fibrinólise 843
Hemostasia fisiológica 843
- Endotélio e plaquetas 844
- Sistema de proteínas da coagulação 845
- Formação de fibrina e o sistema fibrinolítico 846
- Sistemas de proteína de anticoagulação 846
- Hipótese atual para iniciação do sistema hemostático 848
- Hemostasia e laboratório clínico 848
- Hemostasia fisiológica *versus* ensaios clínicos 848
- Testes de triagem para distúrbios da coagulação 849
- Ensaios usados nos testes clínicos de coagulação 849
- Interpretação dos testes de triagem do sistema de coagulação 851
- Abordagem clínica para pacientes com distúrbios de coagulação 851

Defeitos hereditários das proteínas da coagulação 852
- Deficiência do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B) 852
- Deficiências hereditárias de outros fatores da coagulação 854

Deficiências adquiridas de proteínas da coagulação 857
- Coagulação intravascular disseminada 857
- Doença hepática 858
- Deficiência de vitamina K 858
- Transfusão maciça 858
- Inibidores de proteínas da coagulação adquiridos 858

Referências bibliográficas 859

PONTOS-CHAVE

- A hemostasia clínica consiste na coagulação do plasma, na fibrinólise e sistemas de proteínas da coagulação.
- A hemostasia fisiológica é iniciada pelo fator VIIa e pelo fator tecidual.
- A hemostasia fisiológica não é completamente representada pelos ensaios atuais usados para detectar anormalidades da coagulação, como o tempo de tromboplastina tecidual ativada e o tempo de protrombina.
- No entanto, os ensaios atuais para avaliar anormalidades de proteínas da coagulação têm bom potencial diagnóstico no sentido de reconhecer defeitos específicos nas proteínas da coagulação.
- Os defeitos em alguma proteína da coagulação em geral refletem distúrbios clínicos gerais, em vez de defeitos em proteínas específicas.

Generalidades sobre a coagulação e a fibrinólise

A hemostasia (ou cessação do sangramento) ocorre no compartimento vascular revestido pelo endotélio. A hemostasia normal e a trombose envolvem inúmeros fatores, que incluem plaquetas, granulócitos e monócitos, bem como coagulação (formação do coágulo) e sistemas fibrinolítico (lise do coágulo) e de proteínas anticoagulantes (regulador). Cada um dos três sistemas de proteína equilibra as atividades do outro. Além disso, a integridade do endotélio da parede vascular também contribui. Nos últimos anos, a compreensão do sistema hemostático fisiológico evoluiu muito (Fig. 38.1). Durante décadas, o sistema hemostático foi citado como a "cascata da coagulação", de acordo com a hipótese de Ratnoff, Davies e MacFarland, que publicaram, quase simultaneamente, uma sequência de reações proteolíticas que começava com a ativação do fator XII (fator de Hageman) e terminava com a trombina formada que induzia a proteólise do fibrinogênio para formar um coágulo (Ratnoff, 1964; MacFarland, 1964). No entanto, quando surgiu, tal hipótese era insustentável. Na época de sua publicação, sabia-se que a deficiência do fator XII não estava associada a sangramento (Ratnoff, 1955). Portanto, a base fisiológica desse sistema no sentido de ser ativado pelo fator XII foi questionada. Além disso, em meados da década de 1970, foram identificados os cofatores para a ativação do fator XII, a pré-calicreína e o cininogênio de alto peso molecular, e deficiências dessas proteínas não estavam associadas a sangramentos (Weuppers, 1972; Colman, 1975; Saito, 1975). Foram pesquisados outros mecanismos da hemostasia fisiológica. Em 1977, Osterud e Rappaport reconheceram que o fator VIIa é capaz de ativar o fator IX em fator IXa (Osterud, 1977). Tempos depois, Broze et al. reconheceram que a cinética do inibidor da via do fator tecidual (TFPI) era tal que, em circunstâncias fisiológicas, o complexo fator VIIa-fator tecidual não pode ativar diretamente o fator X, sendo necessária a ativação do fator IX (Broze, 2003). Esses dois últimos estudos indicam o papel importante da via do fator VIIa-fator tecidual para a hemostasia fisiológica. Uma dúvida ainda era como o fator XI, cuja deficiência está associada a sangramento, seria ativado em circunstâncias fisiológicas. Em 1991, Gailiani e Broze descobriram que a trombina formada pode ativar o fator XI, resultando em amplificação do sistema de coagulação sob estresse (Gailiani, 1991). Atualmente, acredita-se que a hemostasia fisiológica seja um sistema de interação entre a ativação e a amplificação de vários zimogênios que se tornam proteases serinas. Quem inicia a hemostasia fisiológica é o fator VIIa, quando ligado ao seu cofator, fator tecidual. A regulação da expressão do fator tecidual proporciona a principal modulação da hemostasia fisiológica. A trombina, por sua vez, amplifica o processo ativando o fator XI, o que acarreta ativação adicional do fator IX. O papel do sistema fibrinolítico é promover a lise do coágulo formado pela trombina. O papel do sistema de anticoagulação é regular todas as enzimas da coagulação e os sistemas fibrinolíticos, de modo que não haja coagulação nem sangramento em excesso.

É importante que o patologista entenda a base fisiológica da hemostasia, mas os ensaios clínicos usados em laboratório para avaliar o sistema da coagulação baseiam-se na hipótese original da cascata da coagulação. Embora esses testes não representem a hemostasia fisiológica, ainda são muito úteis no diagnóstico de potenciais distúrbios hemorrágicos. Portanto, o patologista precisa compreender a distinção entre coagulação fisiológica, fibrinólise e anticoagulação, bem como os testes usados para medir esses sistemas. Neste capítulo, pretendemos esclarecer essa distinção para o leitor. Na primeira parte, serão apresentados os detalhes da coagulação fisiológica, da fibrinólise e da regulação da coagulação. Na segunda parte, serão descritos os ensaios realizados para quantificar os distúrbios hemorrágicos, com uma discussão de suas limitações no sentido de caracterizar hemostasia fisiológica. Na terceira parte, será apresentada uma visão geral dos distúrbios hemorrágicos congênitos. Por fim, serão abordados os distúrbios hemorrágicos adquiridos, as formas de sangramento mais comuns.

Hemostasia fisiológica

O sistema hemostático fisiológico, um equilíbrio muito bem regulado entre a formação e a dissolução dos tampões hemostáticos, moduladas por uma série de enzimas e proteínas estruturais, é constituído por duas

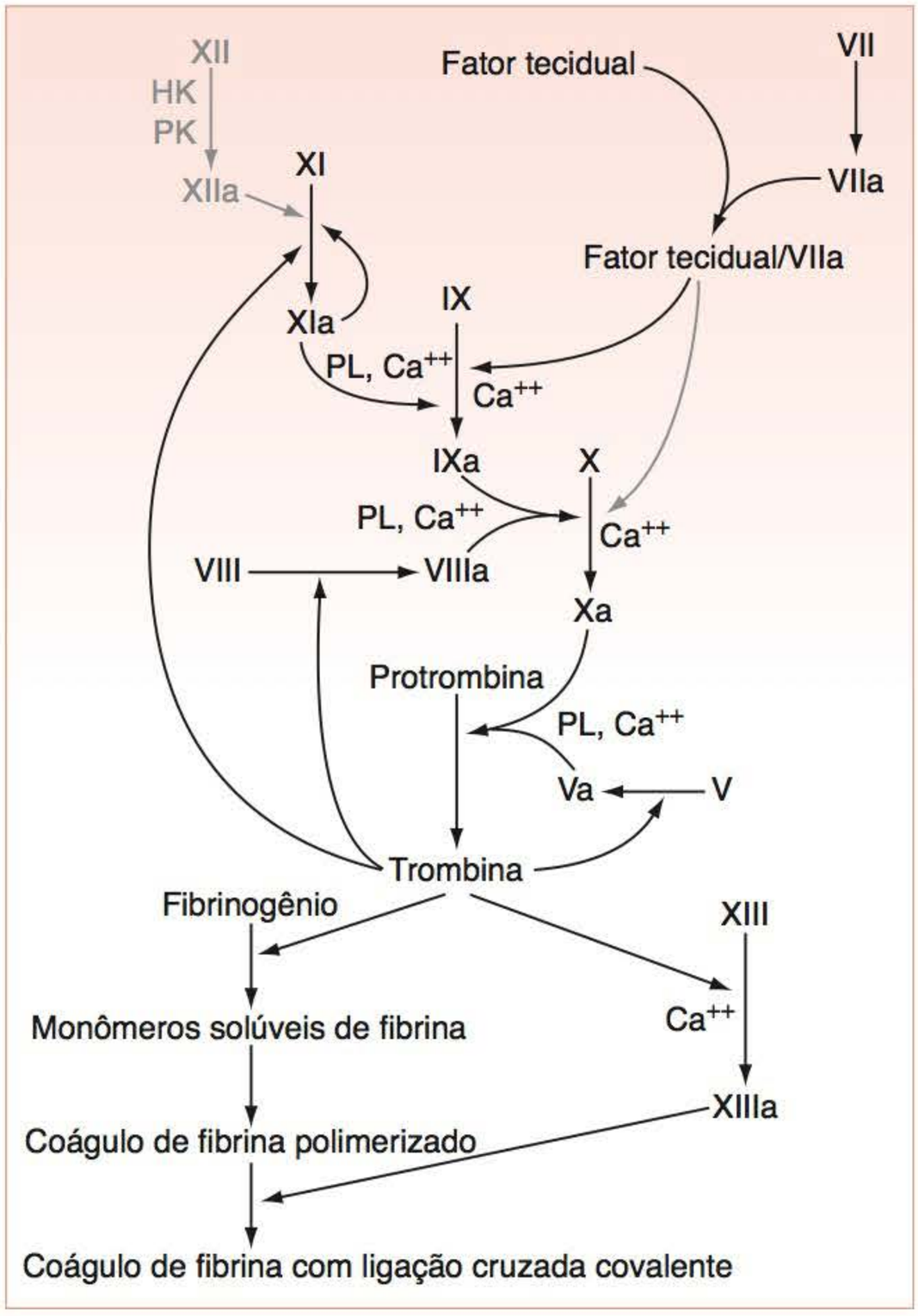


Figura 38.1 Diagrama esquemático da hemostasia fisiológica. Note que os fatores da "fase de contato" incluem o XII, HK (cininogênio de alto peso molecular) e PK (pré-calicreína), mostrados em cinza; embora o fator XI possa ser ativado por essa via em condições *in vitro*, como no teste do PTT (ver Fig. 38.8), *não* se acredita que essa via contribua para a hemostasia fisiológica normal. De forma semelhante, embora o fator tecidual/VIIa possa ativar diretamente o X em Xa no teste do PT *in vitro* em condições com concentrações suprafisiológicas de fator tecidual, essa reação é mostrada em cinza porque *não* contribui de forma significativa para a formação do coágulo em condições fisiológicas normais *in vivo*. Assim, a coagulação normal *in vivo* é iniciada quando há fator tecidual/VIIa disponível suficiente para ativar o fator IX em IXa. Subsequentemente, na presença de VIIIa, o IXa ativa o X em Xa, que por sua vez ativa a protrombina em trombina na presença do Va. A trombina não apenas prossegue então para formar o coágulo de fibrinogênio e ativar plaquetas (ver Fig. 38.2), como também exerce *feedback* positivo muito importante ativando os fatores VIII e V. Mostrou-se ainda que a trombina é capaz de ativar o fator XI, fornecendo assim mais uma via para a ativação do fator IX. O PL (fosfolipídeo presente na superfície das membranas das plaquetas *in vivo*) e o Ca^{++} (íons de cálcio) contribuem para as reações, conforme indicado.

partes principais. A primeira é seu componente celular, que consiste principalmente em plaquetas e células endoteliais, mas também inclui neutrófilos e monócitos. A segunda parte é constituída por um grande grupo de proteínas plasmáticas, que participam da formação do coágulo (coagulação) e de sua dissolução (fibrinólise), e por proteases serinas inibidoras de ocorrência natural que terminam a atividade de várias enzimas dos sistemas da coagulação e fibrinolítico.

Endotélio e plaquetas

Inúmeros fatores estão envolvidos nas reações da coagulação e da fibrinólise. A hemostasia normal envolve a interação de componentes celulares e proteínas envolvidas na formação e na lise do coágulo. Normalmente, o endotélio que reveste o compartimento vascular contribui para sua natureza anticoagulante constitutiva. As células endoteliais têm glicosaminoglicanos que se ligam à antitrombina (Marcum, 1984). A trombomodulina nas membranas da célula endotelial é um *locus* no qual a proteína C é ativada por baixos níveis de trombina (Esmon, 1981). Células endoteliais intactas secretam uma ectonucleotidase (ectoADPase), a CD39, que degrada o difosfato de adenosina (ADP) (Pinsky, 2002). As células endoteliais também secretam prostaciclina e óxido nítrico, que impedem a ativação das plaquetas (Hong, 1980; Palmer, 1987). Além disso, as células endoteliais ligam-se ao plasminogênio, ao ativador tecidual do plasminogênio e a uma urocinase de cadeia única, todos contribuindo para a fibrinólise e a manutenção de um estado anticoagulante (Barnathan, 1988; Cesarman, 1994). Quando ocorre lesão da parede de um vaso, o colágeno fica exposto e as plaquetas aderem ao local da lesão. O fator de Von Willebrand ajuda as plaquetas a aderirem à parede do vaso danificada, ligando-se tanto ao colágeno exposto como ao complexo receptor de plaquetas GP Ib-IX-V (He, 2003). Esse evento de adesão ativa as plaquetas, iniciando uma cascata sinalizadora dentro delas (Zaffran, 2000). As plaquetas estimuladas liberam o conteúdo de seus grânulos e ajudam a gerar trombina em sua superfície. Como resultado da ativação das plaquetas e da formação de trombina, há agregação plaquetária e forma-se um tampão hemostático (Fig. 38.2).

Adjacente ao local da lesão, o fator tecidual (FT) é suprarregulado no subendotélio e forma um complexo com o fator VIIa (FVIIa). O complexo FVIIa-TF transforma o fator IX em fator IXa, que converte o zimogênio fator X no fator Xa enzimaticamente ativo (Fig. 38.1). Na presença do fator Va, o fator Xa transforma a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), a principal enzima da coagulação. Em circunstâncias normais, o componente limitador da velocidade de formação do complexo protrombinase e a última geração da atividade da trombina é a concentração do fator Xa (Rand, 1996). A trombina então proteolisa o fibrinogênio para formar fibrina. Nos sistemas *in vitro* estáticos, apenas 5 a 10 pM de fator tecidual são suficientes para induzir a formação do coágulo, levando a uma amplificação de 1.000 a 2.000 vezes do processo que traz a concentração de trombina para 10 a 20 nM, o bastante para iniciar a formação do coágulo (Mann, 2003). Em um modelo estático de coagulação do sangue, Mann *et al.* mostraram que o acréscimo de 5 pM de fator tecidual resulta em um tempo médio de coágulo de 4,7 ± 0,2 min ($n = 35$ experimentos individuais). Durante a geração de trombina no sangue total, há uma ativação sequencial de plaquetas, fatores V e VIII, bem como liberação de fibrinopeptídeos A e B (ver adiante) em um estágio inicial da formação de trombina (Mann, 2003). A trom-

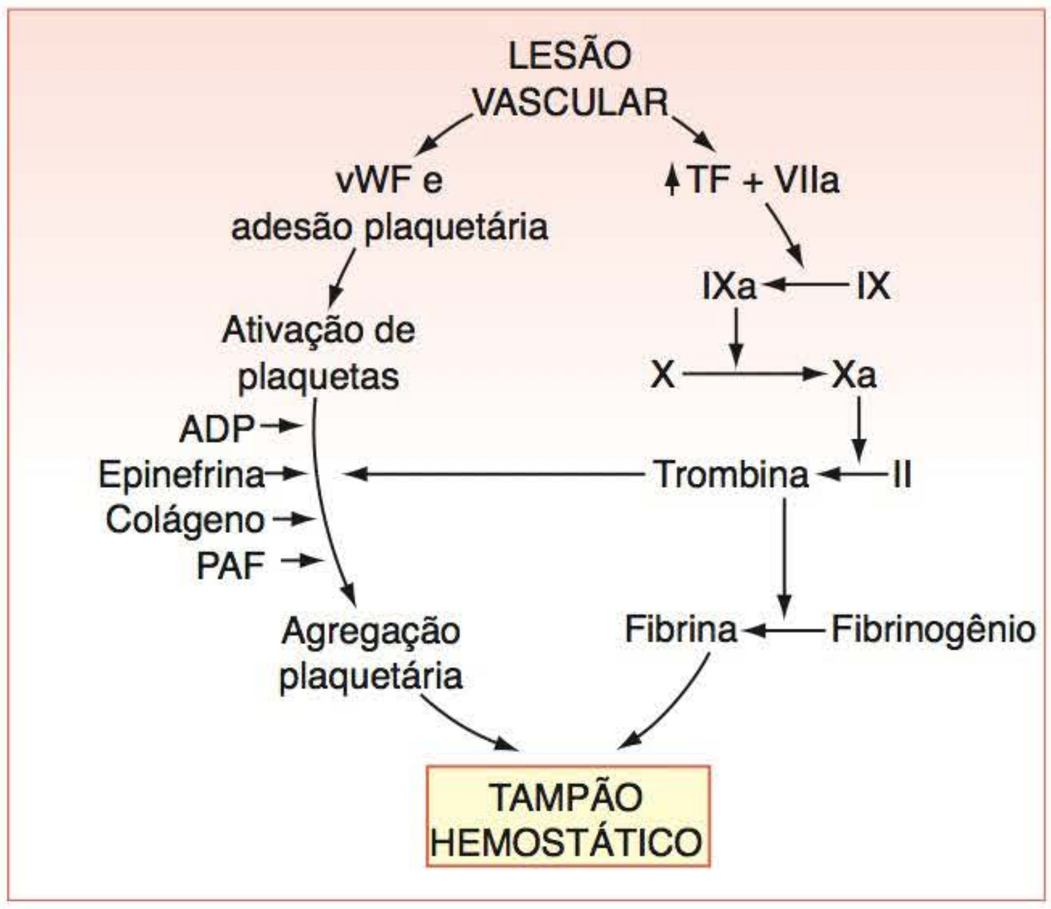


Figura 38.2 Diagrama esquemático da hemostasia. Quando ocorre lesão em um vaso, as plaquetas aderem ao local da lesão via fator von Willebrand (vWF), depois são ativadas e liberam o conteúdo dos grânulos. O ADP liberado e o colágeno exposto recrutam mais plaquetas para o local da lesão. A exposição externa da fosfatidilserina nas plaquetas ativadas estimula ainda mais as reações da coagulação dependentes de fosfolipídeo (não mostradas). Simultaneamente no local da lesão, o fator tecidual é suprarregulado e, com o fator VIIa, ativa o fator IX em IXa e, em sequência, o fator X em Xa e a protrombina em trombina. A trombina estimula mais plaquetas, favorecendo a formação do tampão plaquetário, e também proteolisa o fibrinogênio para formar monômero de fibrina, que então se polimeriza em um coágulo de fibrina. Tais eventos ocorrem na superfície ativada da plaqueta ou próximo dela.

bina também é considerada um dos principais ativadores fisiológicos das plaquetas, junto com outros agonistas como o colágeno, o ADP, o fator ativador de plaquetas (PAF) e a epinefrina. É provável que as pesquisas inativadas circulem sem promover a coagulação. Quando as plaquetas são ativadas, sua membrana torna-se um local para mais formação de trombina. As reações críticas para a formação de fator Xa e trombina são aceleradas sobre a superfície das plaquetas. Quando alteradas ou lesadas, as membranas da célula endotelial funcionam de maneira semelhante, expressando FT e fator V. É provável que as reações de importância fisiológica na coagulação e fibrinolíticas ocorram na superfície das células, no compartimento intravascular. As reações importantes de ativação e inibição de proteínas também ocorrem nas membranas de neutrófilos e monócitos ativados.

Sistema de proteínas da coagulação

Caracterização das proteínas da coagulação

As proteínas envolvidas no sistema da coagulação são formadas por zimogênios e cofatores (Tab. 38.1). Os zimogênios do sistema da coagulação podem ser categorizados como proenzimas ligadas a fosfolipídeos (zimogênios) e proenzimas dependentes da superfície. Os zimogênios ligados a fosfolipídeos constituem o sistema hemostático de importância fisiológica. Tais proteínas são dependentes de vitamina K, a qual é necessária para uma reação de γ-carboxilação essencial e ocorre em cada um desses resíduos de ácido glutâmico localizados nas extremidades aminoterminais (ver Cap. 41, Fig. 41.1). Essa reação de carboxilação permite que essas proteínas liguem-se ao fosfolipídeo e às membranas celulares, em que são ativadas. Sem essa reação de carboxilação, essas proteínas não funcionariam normalmente no sistema hemostático. Essas proenzimas incluem o fator X, uma proteína de 58 kDa; o fator IX (fator de Christmas), uma proteína de 56 kDa; o fator VII, uma proteína de 50 kDa, e o fator II (protrombina), uma proteína de 72 kDa.

As proenzimas ligadas à superfície são proteínas do sistema plasmático calicreína/cinina (Tab. 38.1) e incluem o fator XII (fator de Hageman), uma proteína de 80 kDa; a pré-calicreína (fator de Fletcher), uma proteína de 85 a 88 kDa; e o fator XI, uma proteína de 160 kDa. Esses zimogênios também são conhecidos como "sistema de contato" porque o fator XII se autoativa quando associado a uma superfície de carga negativa como um tubo de vidro (Wiggins, 1979; Miller, 1980). A autoativação do fator XII resulta em ativação da pré-calicreína e amplificação adicional do fator XI. A formação do fator XIa então induz a série de reações proteolíticas (a "cascata" da coagulação) que *in vitro* resulta na formação de trombina e na proteólise subsequente do fibrinogênio pela trombina para formar um coágulo. No entanto, deficiências de fator XII e pré-calicreína não estão associadas a sangramento. Portanto, esse sistema não pode ser fisiológico para a hemostasia. O fenômeno de autoativação do fator XII, entretanto, serve para um teste de laboratório comum, o tempo de tromboplastina parcial ativada (PTT), usado para avaliar a integridade do sistema da coagulação (ver adiante), pois é um ensaio útil para avaliar muitas proteínas da coagulação, mas só ele não descreve a hemostasia fisiológica. Assim, é importante lembrar que os ensaios usados para avaliar muitas proteínas da coagulação baseiam-se no evento não fisiológico da autoativação do fator XII. Embora absolutamente essenciais para um PTT normal, as proteínas do sistema plasmático calicreína/cinina não desempenham um papel fisiológico na ativação do sistema de coagulação; em vez disso, participam da regulação da pressão sanguínea e da fibrinólise, servindo ainda para contrabalançar o sistema renina/angiotensina (Schmaier, 2002, 2003, 2004). Em circunstâncias fisiológicas *in vivo*, a pré-calicreína, quando montada nas células endoteliais, é ativada primeiro por uma enzima endotelial, a prolilcarboxipeptidase, e, em seguida, o fator XII é ativado pela calicreína plasmática formada – eventos exatamente opostos ao que ocorre em um tubo de ensaio (Shariat-Madar, 2002; Rojkjaer, 1998).

Tabela 38.1 Proteínas plasmáticas do sistema de coagulação

Zimogênios ligados à superfície	Zimogênios dependentes de vitamina K	Cofatores/substratos
Fator XII	Fator VII	Cininogênio de alto peso molecular
Pré-calicreína	Fator IX	Fator VIII
Fator XI	Fator X	Fator V
	Fator II	Fibrinogênio
	Proteína C	Proteína S

Pode-se considerar que os cofatores hemostáticos das reações enzimáticas do sistema da coagulação agem como receptores para proteínas da coagulação. Por exemplo, o cininogênio de alto peso molecular serve como um receptor para a ligação da pré-calicreína às células endoteliais (Motta, 1998; Schmaier, 1988). Os fatores VIIIa e Va funcionam como correceptores dos fatores IXa e Xa, respectivamente (Miletich, 1978; Ahmad, 2000). Todas essas três proteínas servem como cofatores que aceleram as reações em que participam. Por exemplo, o cininogênio de alto peso molecular acelera a ativação de pré-calicreína e fator XI pelo fator XIIa. Os fatores VIIIa e Va aceleram o fator X e a ativação de protrombina, respectivamente, pelos fatores IXa e Xa. Cada cofator também funciona como substrato para uma ou mais enzimas que participam na sua formação e na sua inativação. De acordo com isso, o cininogênio de alto peso molecular é um substrato para o fator XIIa, a calicreína plasmática e o fator XIa. Os fatores VIII e V são substratos para a trombina e a proteína C ativada. O fibrinogênio é um substrato para a trombina.

O fator VIII (fator anti-hemofílico) é uma proteína de 330 kDa. Quando ativado em fator VIIIa, é um cofator para o fator IXa na ativação do fator X. Sua ausência está associada ao distúrbio hemorrágico mais grave reconhecido clinicamente: a hemofilia A. O fator V também é uma proteína de 330 kDa que tem homologia com o fator VIII. Quando ativado em fator Va, serve como cofator para o fator Xa na ativação do fator II (protrombina) em trombina. O fibrinogênio é uma proteína de 330 kDa que não é apenas o principal substrato para a trombina (fator IIa), mas também a principal molécula de adesão que atua na agregação plaquetária. Quando proteolisada em trombina, forma-se um monômero de fibrina, que se associa a outros monômeros, extremidade com extremidade e lado a lado, para formar um coágulo de fibrina, estabilizado pelo fator XIII ativado, uma transglutaminase tecidual que faz ligações cruzadas com os filamentos de fibrina associados. O fator tecidual (FT) (proteína de 47 kDa) é um cofator essencial para o fator VIIa ativado, sendo encontrado na maioria dos tecidos e células. A suprarregulação do FT resulta na formação de complexos com o fator VII, que induzem a iniciação das reações hemostáticas. Por fim, o cininogênio de alto peso molecular (HK, também conhecido como fator de Fitzgerald ou fator de Williams) é uma proteína de 120 kDa que age como um cofator para a ativação do fator XII, da pré-calicreína e do fator XI em superfícies artificiais e membranas de células endoteliais, sendo ainda um substrato para a calicreína, os fatores XII e XI ativados e a plasmina, bem como o composto parental da bradicinina, um peptídeo biologicamente ativo que regula a pressão sanguínea e a biologia vascular. Nas células endoteliais, o HK é um receptor para a pré-calicreína e o fator XI, embora haja ligação significativa do fator XII às células endoteliais independente do HK (Mahdi, 2003).

Montagens fisiológicas de proteína

Há certas montagens de proteína que são críticas nas reações hemostáticas que aceleram as reações proteolíticas. As proteínas do sistema da coagulação essenciais para a hemostasia ou o controle de sangramentos foram identificadas originalmente observando-se pacientes acometidos e, mais recentemente, em estudos com camundongos *knockout*. As deficiências dos fatores VIII e IX da coagulação são os distúrbios hemorrágicos mais graves que ocorrem em pacientes que sobrevivem à gestação e ao nascimento. Os raros pacientes com deficiências congênitas aparentes dos fatores VII, X, V e II da coagulação em geral não apresentam estados hemorrágicos graves. Em contraste, modelos murinos demonstraram que embriões de camundongos que contêm *knockouts* genéticos completos dos fatores VII, X, V ou II morrem por causa de hemorragia maciça durante a gestação ou o nascimento. Essa informação sugere que o paciente humano com deficiência dos fatores VII, X, V ou II pode ter algum fator, talvez menos de 1%, que permita um fenótipo clínico mais brando que o observado em modelos murinos. Direta ou indiretamente, todos esses pacientes participam de duas montagens clinicamente importantes que são essenciais para a hemostasia normal: "tenase" e "protrombinase".

O complexo *tenase* compreende a montagem do fator IXa e do fator VIIIa ativado pela trombina nas superfícies fosfolipídicas ou membranas celulares em uma estrutura ordenada com o fator X para acelerar sua ativação em fator Xa. Quando todos esses componentes estão presentes, a velocidade de ativação do fator X pelo fator IXa aumenta $1{,}4 \times 10^8$ vezes com relação à ativação do fator X apenas pelo fator IXa. De maneira análoga, o complexo *protrombinase* compreende a montagem do fator Xa e do fator Va ativado pela trombina nas membranas fosfolipídicas ou celulares em uma estrutura ordenada com o fator II (protrombina) para acelerar sua ativação em fator IIa (trombina). Quando todos esses componentes estão presentes, a velocidade de ativação do fator II pelo fator Xa aumenta $1{,}7 \times 10^8$ vezes com relação à ativação do fator II apenas pelo fator Xa. Como essas reações da coagulação ocupam pontos reguladores críticos dentro do sistema hemostático fisiológico, também formam a área visada de numerosos agentes anticoagulantes atualmente em uso ou em desenvolvimento.

Formação de fibrina e o sistema fibrinolítico

As seis cadeias de peptídeos da molécula de fibrinogênio estão organizadas em uma estrutura descrita como tendo um domínio central E e dois domínios terminais D. Quando a trombina é formada, ela cliva o fibrinopeptídeo A da cadeia Aα e o fibrinopeptídeo B da cadeia Bβ do fibrinogênio na região do domínio E (Doolittle, 1981). O restante desse fibrinogênio proteolisado pela trombina é o denominado monômero solúvel de fibrina. Os monômeros solúveis de fibrina então são montados extremidade com extremidade e lado a lado, formando um polímero de fibrina não covalente (Fig. 38.3). O fator XIII ativado, uma transglutaminase, faz ligações cruzadas entre subunidades monoméricas de fibrina, originando um coágulo de fibrina insolúvel. Quando insolúvel, a fibrina com ligação cruzada é feita, ocorre uma nova ligação entre os domínios D de dois monômeros de fibrina adjacentes e no processo forma-se um neoepítopo de interação (Fig. 38.3).

O sistema proteico fibrinolítico consiste no zimogênio plasminogênio e em seus ativadores de ocorrência natural. O plasminogênio é ativado, tornando-se a principal enzima de lise do coágulo, a plasmina, pelo ativador tecidual endógeno do plasminogênio (tPA), pelo ativador urocinase de cadeia única do plasminogênio (ScuPA) e pelo ativador urocinase de cadeia dupla do plasminogênio (TcuPA). Esses ativadores são encontrados no endotélio, bem como em granulócitos e monócitos. Os ativadores naturais do plasminogênio, tPA, ScuPA e TcuPA, convertem o zimogênio plasminogênio na enzima ativa plasmina (Fig. 38.4). O inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) é o principal inibidor do tPA e do TcuPA. A α_2-antiplasmina, uma protease serina inibidora (serpina), é o principal inibidor da plasmina formada. Contudo, a concentração plasmática de α_2-antiplasmina corresponde apenas a cerca da metade da concentração plasmática de plasminogênio.

Quando a plasmina é formada, tem múltiplos substratos. Ela irá degradar o fibrinogênio solúvel para dar origem aos produtos de degradação do fibrinogênio (Fig. 38.5A). A plasmina cliva o fibrinogênio em um fragmento X de massa molecular semelhante, ao eliminar partes da cadeia α (Marder, 1974). A plasmina então cliva assimetricamente o fragmento X entre os domínios D e E para produzir o fragmento Y. Em seguida, a plasmina degrada o fragmento Y para produzir domínios D e E solúveis que são denominados produtos solúveis da degradação do fibrinogênio ou, no caso de digestão da fibrina pela plasmina, produtos de degradação da fibrina, cuja presença indica que houve formação de plasmina. Ela também irá degradar a fibrina insolúvel de ligação cruzada (Fig. 38.5B). Ao fazer isso, libera um domínio do dímero D–D formado como resultado do neoepítopo entre esses dois domínios (Fig. 38.5B) (Marder, 1976). A presença de dímero D solúvel indica que, primeiro, a trombina foi formada, em seguida ocorreu coagulação, o coágulo fez ligação cruzada com o fator VIIIa e, por fim, houve a formação de plasmina, que clivou o coágulo de fibrina insolúvel com ligação cruzada. Conforme será discutido adiante, a estimativa do dímero D é um teste confirmatório para coagulação intravascular disseminada (CID).

Sistemas de proteína de anticoagulação (Fig. 38.6)

Dois sistemas anticoagulantes principais regulam as enzimas do sistema proteico da coagulação, ajudando a inibir a formação do coágulo. Tais sistemas são o da proteína C/proteína S e o inibidor plasmático pro-

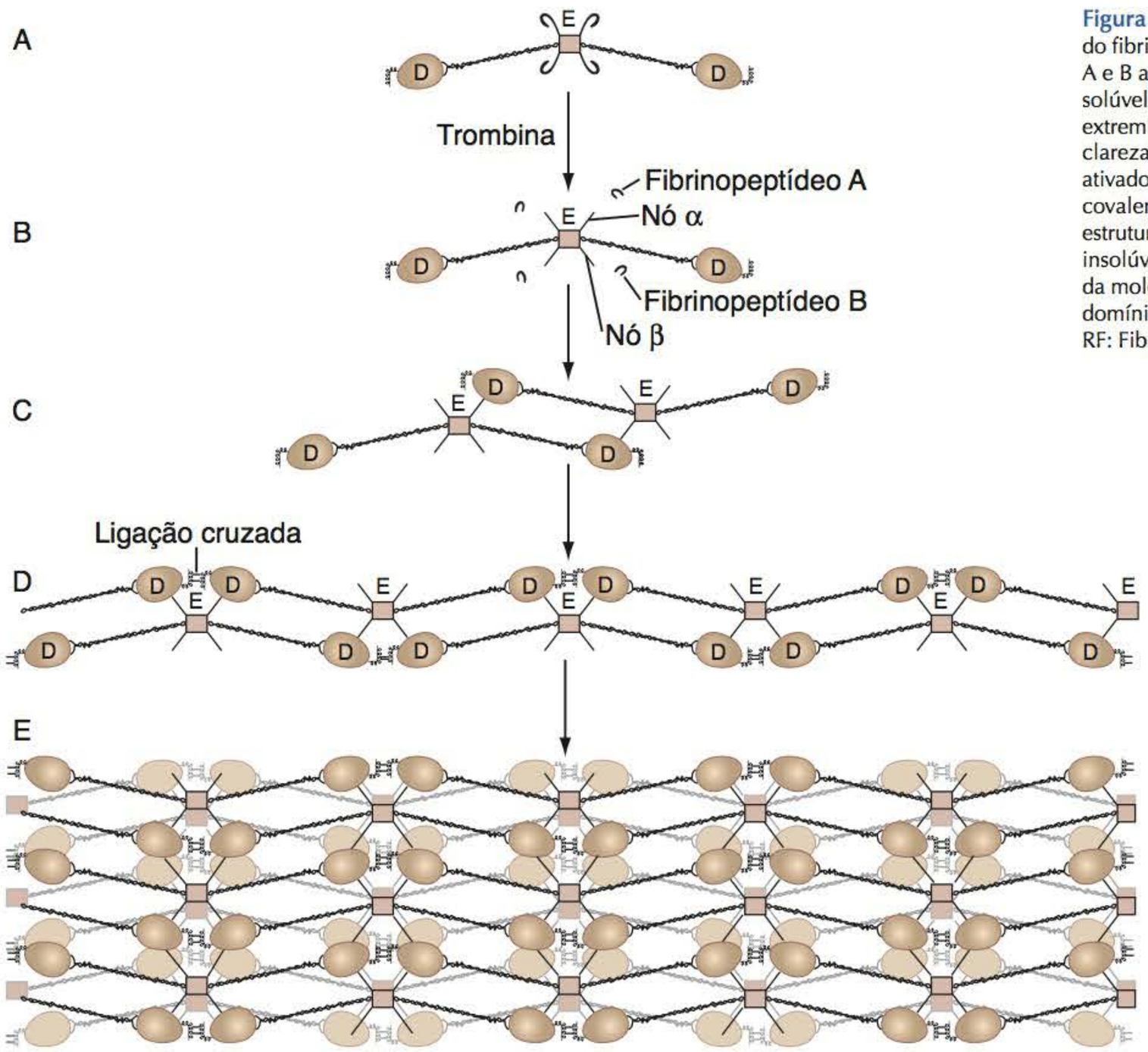


Figura 38.3 Formação de um coágulo de fibrina. *A*, Esquema do fibrinogênio. *B*, A trombina proteolisa os fibrinopeptídeos A e B a partir do fibrinogênio, deixando um monômero solúvel de fibrina que então associa-se lado a lado (*C*) e extremidade com extremidade (não mostrado para maior clareza) para formar polímeros de fibrina. *D*, O fator XIII ativado pela trombina (fator XIIIa) faz ligações cruzadas covalentes com polímeros de fibrina, originando uma estrutura cada vez mais complexa e, por fim, um coágulo insolúvel (*E*). Notar que "E" corresponde ao domínio central da molécula original de fibrinogênio e "D" corresponde aos domínios periféricos. (Modificada com permissão de Doolittle RF: Fibrinogen and fibrin. Sci Am 1981, 245:126-135.)

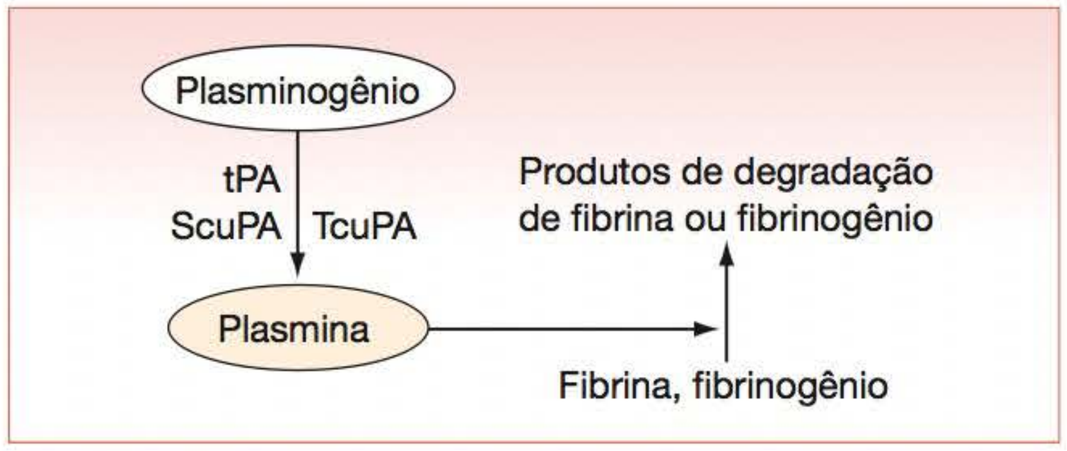


Figura 38.4 Fibrinólise. O plasminogênio zimogênio é convertido em plasmina pelo ativador do plasminogênio tecidual (tPa), pelo ativador do plasminogênio urocinase de cadeia única (ScuPa) e pelo ativador do plasminogênio urocinase de cadeia dupla (TcuPa). A plasmina formada degrada o fibrinogênio ou a fibrina para formar os produtos de degradação do fibrinogênio ou da fibrina, respectivamente.

tease serina. A antitrombina (antitrombina III) é o principal inibidor das enzimas da coagulação do sistema inibidor plasmático protease serina.

O sistema proteína C/proteína S é considerado o principal sistema anticoagulante *in vivo*. Quando ativada, a proteína C, uma proteína de 62 kDa dependente da vitamina K, é uma enzima que funciona como inibidor. A proteína C é ativada pela trombina que se ligou a uma proteína da célula endotelial denominada trombomodulina. A proteína C ativada inativa os fatores Va e VIIIa para diminuir a velocidade de formação de trombina. A proteína S, uma proteína de 69 kDa também dependente da vitamina K, não é uma enzima. É um cofator, ou receptor, da proteína C ativada e presente nas membranas celulares. Ela permite que a proteína C ativada ligue-se às superfícies celulares de maneira a orientar-se para ativar os fatores Va e VIIIa. A enzima usa esse cofator como um receptor para localizar sua atividade e cumprir sua função inibitória. A proteína S plasmática está em equilíbrio entre a forma livre e uma forma ligada em complexo com a proteína de ligação C4b; apenas a forma livre funciona como cofator para a proteína C ativada. Esta última também se liga a uma proteína nas células endoteliais denominada receptor de proteína C da célula endotelial (ECPR) e então ativa o receptor ativado da protease (PAR)1. A ativação da PAR1 nas células endoteliais pode contribuir para a função anticoagulante da proteína C ativada ao liberar o ativador tecidual do plasminogênio. Portanto, a proteína C ativada também reduz a formação de trombina e estimula a fibrinólise, diminuindo o risco de trombose.

A antitrombina é uma protease serina inibidora de 58 kDa que inibe cada uma das seguintes enzimas hemostáticas: IIa, Xa, VIIa, IXa, XIa, calicreína e XIIa. Ela exerce seu efeito anticoagulante primariamente inibindo os fatores IIa e Xa. A capacidade da antitrombina de funcionar como inibidora de enzimas da coagulação é potencializada pela heparina. De fato, é a presença de antitrombina que confere à heparina suas propriedades anticoagulantes. Na presença de heparina, a antitrombina é um inibidor 1.000 vezes mais efetivo do fator IIa.

Além da antitrombina, há outras serpinas que regulam mais enzimas dos sistemas hemostático e inflamatório. O cofator heparina é uma serpina que inibe especificamente a trombina na presença de sulfato de dermatano. O inibidor da proteína Z é uma serpina que inibe especificamente o fator Xa na presença de seu cofator proteína Z – uma proteína dependente de vitamina K. O inibidor C1 (da esterase) é o inibidor mais potente do fator XIIa, da calicreína e do fator XIa no plasma. Sua

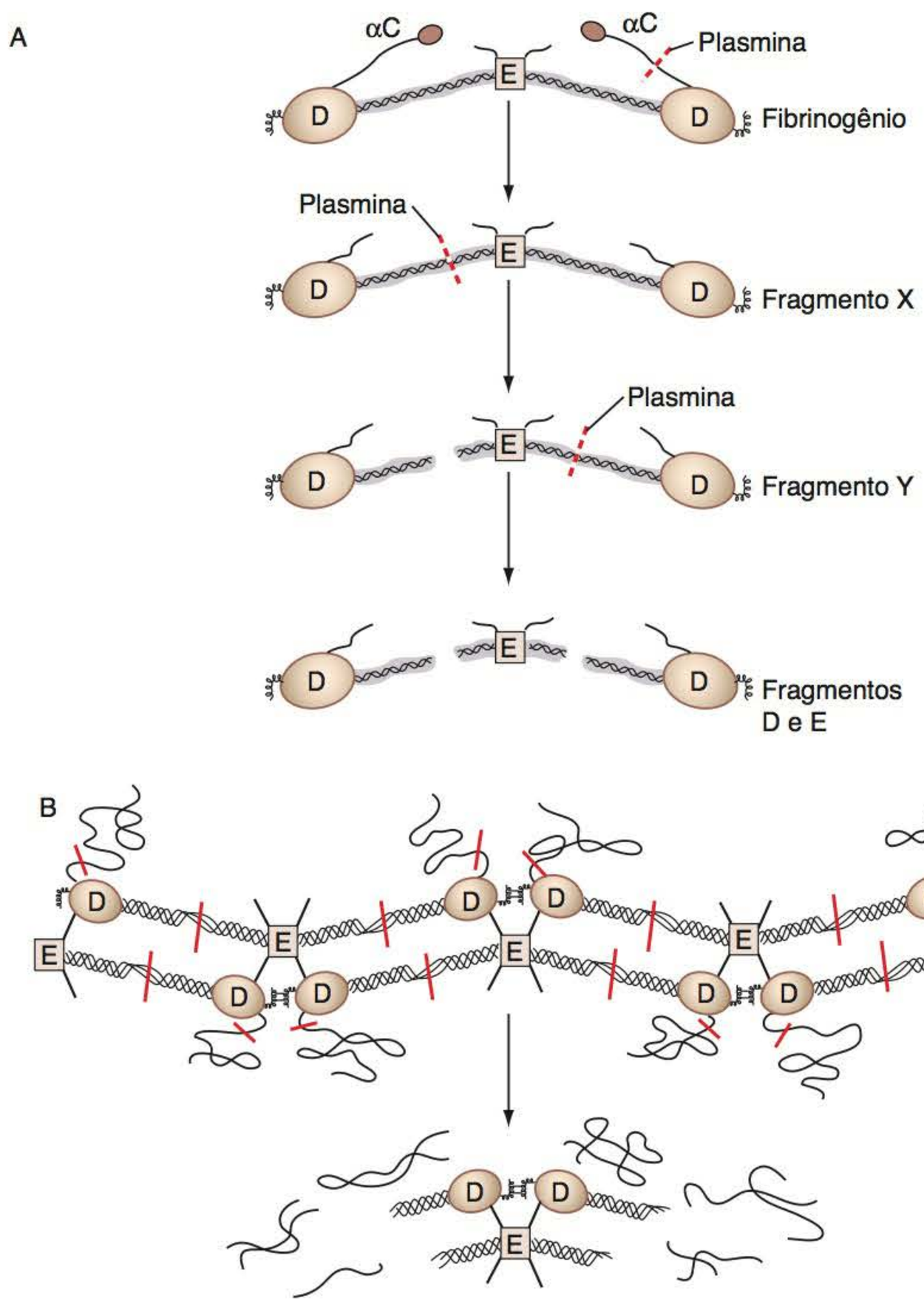


Figura 38.5 *Painel A*: fibrinogênio ou fibrina solúvel clivados pela plasmina. Quando a plasmina cliva o fibrinogênio, inicialmente pequenas porções da cadeia α (αC) são removidas para formar o fragmento X. O fragmento X é então clivado assimetricamente em fragmento D e fragmento Y. O fragmento Y é clivado ainda pela plasmina em fragmentos D e E. (Modificada com permissão de Greenberg CS, Lai T-S: Fibrin formation and stabilization. Em Loscalzo J, Schaffer AI (eds.): Thrombosis and Hemorrhage, 3ª ed. Philadelphia, PA, Lippincott, Williams and Wilkins, 2003, Fig. 5.3B, p. 83.) *Painel B*: fibrina insolúvel com ligação cruzada clivada pela plasmina. Quando insolúvel, a fibrina com ligação cruzada é proteolisada pela plasmina, o neoepítopo entre os domínios D é preservado, e o fragmento liberado consiste no dímero D junto com um domínio E. (Modificada com permissão de Doolittle RF: Fibrinogen and fibrin. Sci Am 1981, 245:126-135.)

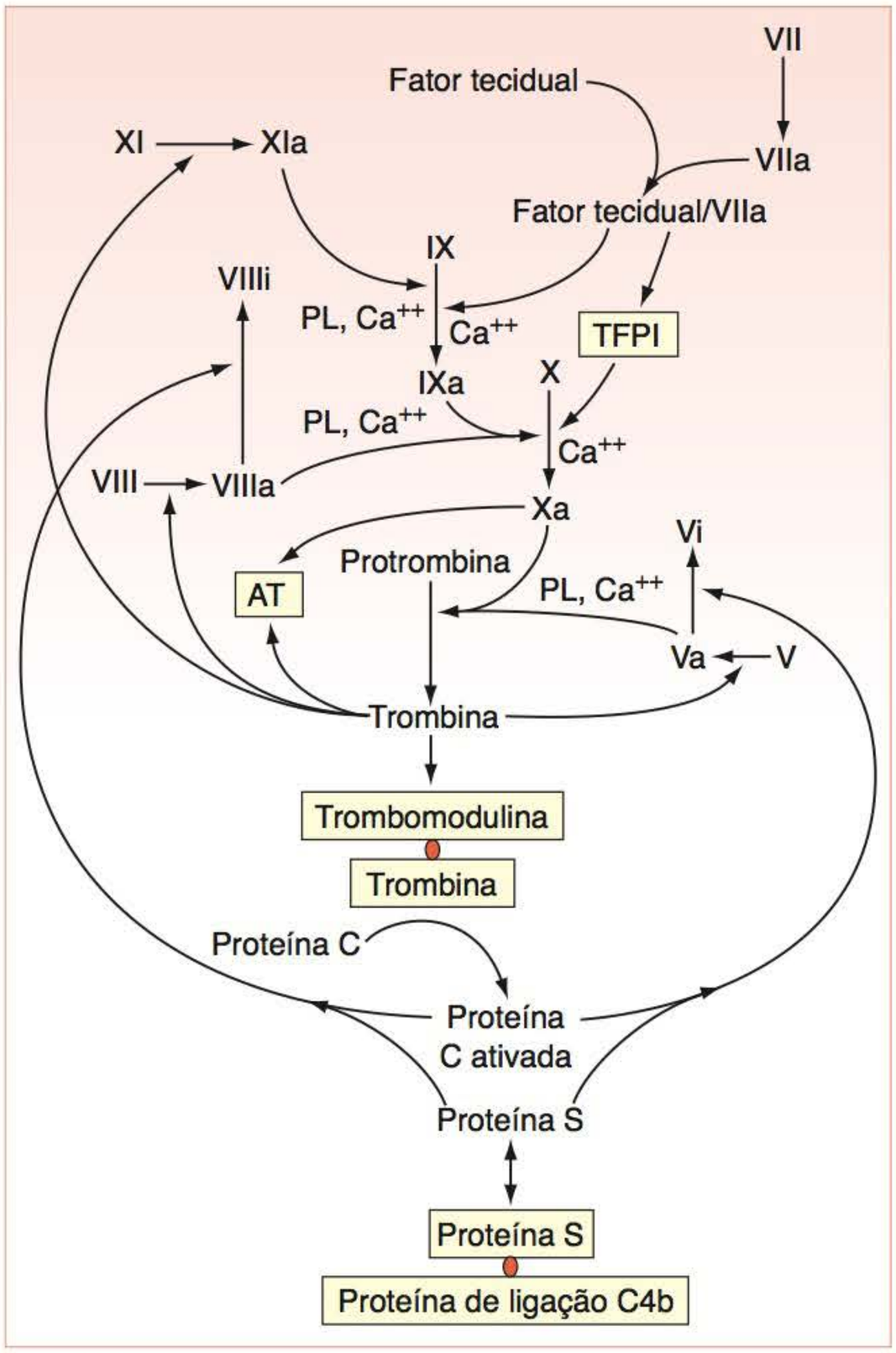


Figura 38.6 Inibidores naturais da coagulação: AT (antitrombina III, antitrombina); componentes da via da proteína C (trombomodulina, proteína C, proteína S); TFPI (inibidor da via do fator tecidual). Ver detalhes sobre os mecanismos inibitórios no texto.

principal função é regular a quantidade de bradicinina livre no compartimento intravascular (Han, 2002; Schmaier, 2002).

Além das serpinas, há outro grupo de proteases serinas inibidoras – o tipo Kunitz. O inibidor da VIa do fator tecidual (TFP1), uma protease serina inibidora, é o inibidor mais potente do complexo fator VIIa/fator tecidual. Em condições fisiológicas, o TFP1 impede que esse complexo ative o fator X diretamente. Para que o TFP1 funcione, ele forma um complexo quaternário com o fator VIIa/fator tecidual e o fator X. Outra protease serina inibidora do tipo Kunitz, o amiloide precursor da proteína β, está presente nas plaquetas e no cérebro e regula os fatores XIa, IXa, Xa, VIIa/fator tecidual e plasmina (Van Nostrand, 1990; Schmaier, 1993, 1995; Mahdi, 1995, 2000). Esse inibidor não inibe a antitrombina. A função exata desse inibidor não é completamente conhecida, mas acredita-se que seja um anticoagulante cerebral.

Hipótese atual para a iniciação do sistema hemostático

Muitas proteínas participam de reações da coagulação *in vitro*. No entanto, poucas proteínas são críticas para as reações hemostáticas *in vivo*. Uma hipótese mais recente para substituir a cascata da coagulação foi apresentada para as reações hemostáticas (Gailiani, 1991). As reações das proteínas da coagulação são iniciadas pelo FT, que se liga ao fator VIIa. O fator tecidual é onipresente em todo o corpo, embora seja abundante no cérebro, nos pulmões e na placenta. Sua expressão é suprarregulada após lesão. A regulação da expressão do fator tecidual é um dos principais mecanismos de controle para a iniciação da hemostasia. Alguns pesquisadores acreditam que haja fator tecidual circulante, embora atualmente tal noção não tenha aceitação universal. Esse complexo então ativa o fator IX, o que por sua vez acarreta a ativação do fator X. É preciso lembrar particularmente que, nas concentrações comumente presentes no corpo, o FT-VIIa *não* ativa diretamente quantidades apreciáveis de fator X por causa da presença de TFP1 – ponto enfatizado de forma esquemática em cinza nessa reação na Figura 38.1 –, apesar da capacidade dessa reação de predominar em condições bastante artificiais usadas no teste "TP" *in vitro* (ver adiante). A formação do fator Xa resulta na ativação da protrombina em trombina. Esta última proteolisa o fibrinogênio para formar fibrina. Embora as reações da coagulação dependentes do FT sejam inibidas rapidamente pelo TFPI, se o estímulo para a formação de trombina for suficientemente forte, a coagulação é mantida durante a ativação do fator XI pela trombina (Meijers, 2000). A transformação do fator XI em fator XIa resulta na maior ativação do fator IX e eventualmente na maior formação da trombina. Uma modulação maior do equilíbrio hemostático na direção da formação do coágulo é exercida pelo TAFI, inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (também conhecido como carboxipeptidade U). Entre suas ações, o TAFI cliva os resíduos de lisina C terminais da fibrina, diminuindo assim a ligação do plasminogênio ao coágulo e a lise do coágulo (ver revisão de Leurs e Hendriks, 2005).

Hemostasia e laboratório clínico

Ante um paciente com hemorragia, o médico precisa usar uma abordagem analítica para determinar a causa do problema. A etiologia subjacente em quase todos os casos é um defeito ou deficiência em uma proteína plasmática, um defeito no número ou na função das plaquetas, ou um defeito nas interações de aderência entre as plaquetas e a parede do vaso.

Qualquer defeito de proteína da coagulação pode ser na verdade uma deficiência de proteína, um inibidor que ative o local da proteína, uma proteína anormal que não possa participar em sua(s) função(ões) biológica(s) ou surgir como resultado de maior depuração da proteína, manifestando-se como se fosse deficiência. Em geral, os inibidores de uma proteína da coagulação são imunoglobulinas, embora estados hipergamaglobulinêmicos ou a produção anormal de heparina endógena, fibronectina ou crioglobulinas também tenham sido relatados como inibidores adquiridos das proteínas da coagulação. As proteínas anormais que estão presentes mas não funcionam normalmente ocorrem como resultado de sentido errático, deleção e translocações de seu DNA. Por último, em geral ocorre maior depuração de proteínas da coagulação como resultado da formação de complexo antígeno-anticorpo. A depuração aumentada resultante da proteína simula uma deficiência, mas o mecanismo real é uma depuração mais exacerbada. As manifestações clínicas típicas dos distúrbios hemorrágicos são mostradas na Tabela 38.2. Em geral, hemartrose e hemorragias espontâneas de tecido mole e intramuscular caracterizam defeitos na proteína plasmática, como hemofilia A e B (deficiência dos fatores VIII e IX). Petéquias no tecido mole, púrpura ou equimoses caracterizam doença de von Willebrand ou distúrbios do número ou da função de plaquetas. No entanto, às vezes é difícil distinguir o mecanismo potencial de sangramento. Portanto, o laboratório clínico é essencial para o diagnóstico definitivo do distúrbio hemorrágico no paciente.

Hemostasia fisiológica *versus* ensaios clínicos

Na prática da hemostasia clínica, há uma dicotomia entre a hemostasia fisiológica e os ensaios usados no laboratório clínico para detectar defeitos nas proteínas da coagulação. Conforme indicado na Figura 38.1, a hemostasia fisiológica é iniciada por um aumento na formação de complexos fator tecidual/fator VIIa. No momento, não há bons ensaios no laboratório clínico para avaliar esse evento precoce de forma específica. Em vez disso, o evento relativamente tardio da real formação do coágulo é monitorado. Os dois ensaios mais comumente usados para examinar o sistema da coagulação são (1) o tempo de tromboplastina parcial ativada induzido pela ativação da superfície (contato) do sistema e (2) o tempo de protrombina (PT), induzido pelo acréscimo de fator tecidual em excesso. Ocorre ativação por contato do sistema da coagulação em tubo de ensaio porque o fator XII associa-se à sua superfície de vidro ou pela presença de partículas artificiais com carga negativa no reagente, que resulta em autoativação do fator XII, que por sua vez inicia a cascata de reações proteolíticas do sistema da coagulação. Como veremos adiante, esse teste mede mais proteínas que as necessárias para a hemostasia fisiológica. No teste do PT, o acréscimo de excesso de fator tecidual cria uma alteração muito não fisiológica na relação estequiométrica normal de fatores, permitindo assim que o fator VIIa supere o efeito inibidor do inibidor da VIa do fator tecidual (TFPI) e favoreça a ativação direta do fator X em fator Xa sem a

necessidade fisiológica habitual de prosseguir por meio da ativação do fator IX. Embora nenhum dos testes represente a hemostasia fisiológica, ambos os ensaios são extremamente úteis para a detecção de problemas hemorrágicos potenciais em um paciente (ver adiante).

Testes de triagem para distúrbios da coagulação

Vários testes de triagem são usados no laboratório clínico para um paciente com um problema hemorrágico, no intuito de classificar e diagnosticar a base do distúrbio. "Hemostasia primária" refere-se à reatividade plaquetária no local da lesão vascular, assunto abordado no Capítulo 39. A contagem de plaquetas é um exemplo de ensaio de triagem para hemostasia primária. Nesta seção, serão descritos ensaios para a "hemostasia secundária" – ou seja, a coagulação do plasma. Quando realizados simultaneamente com uma amostra de plasma, os resultados desses ensaios identificam quase todas as categorias diagnósticas de uma coagulopatia. Embora não descreva a hemostasia fisiológica, a hipótese da cascata de 40 anos em que se baseiam os testes da coagulação ainda tem o mérito de explicar o(s) mecanismo(s) da formação do coágulo visto(s) nos testes de triagem para reações da coagulação. De acordo com essa hipótese, as proteínas da coagulação são classificadas como membros do "sistema intrínseco", do "sistema extrínseco" ou da via comum (Fig. 38.7). Essa abordagem permite um diagnóstico diferencial prático no sentido de definir qual(is) proteína(s) pode(m) ser afetada(s) com base nos resultados de uma série de testes de triagem. Os fatores da coagulação específicos envolvidos em cada teste são mostrados esquematicamente na Figura 38.7. Os aspectos metodológicos desses testes (Fig. 38.8) serão abordados a seguir,

Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) (Fig. 38.8A)

Para realizar esse teste comum da coagulação, incuba-se uma mistura de superfície com carga negativa, fosfolipídeo e plasma anticoagulado do paciente por vários minutos. O anticoagulante recomendado é o citrato de sódio, 3,2 g%, porque induz menos variação do normal em amostras de sangue e pacientes em tratamento com anticoagulantes colhidos nessa concentração de anticoagulante (Adcock, 1997, 1998). Quando se colhe sangue total, a proporção de anticoagulante com relação a ele é a de uma parte de anticoagulante para nove partes de sangue total. Acrescenta-se então cloreto de cálcio e mede-se o tempo necessário para a formação de um coágulo. O aPTT avalia as proteínas da coagulação do chamado sistema intrínseco e da via comum (ver adiante). Esse ensaio é conhecido comumente como PTT, mas na verdade é um PTT "ativado", pois seus reagentes contêm uma superfície com carga negativa que acelera a velocidade da reação (Proctor, 1961).

Tempo de protrombina (PT) (Fig. 38.8B)

Para realizar esse ensaio comum da coagulação, a tromboplastina tecidual (de origem animal ou recombinante) e o plasma do paciente são incubados por vários minutos, e, em seguida, o plasma é recalcificado mediante o acréscimo de 30 mM de $CaCl_2$, verificando-se o tempo necessário para a formação do coágulo. O PT avalia as proteínas da coagulação do chamado sistema extrínseco e da via comum (ver adiante) (Quick, 1935). Tradicionalmente, a tromboplastina tecidual era uma preparação de fator tecidual de cérebro cru de animal. Hoje, usa-se fator tecidual recombinante na preparação de vários reagentes comerciais para o PT. Em geral, a variação do tempo de prolongamento de um tempo de protrombina anormal aumenta quando se usa fator tecidual recombinante, o que torna o ensaio mais sensível.

Tempo de trombina (TT) ou tempo de coagulação da trombina (TCT) (Fig. 38.8C)

Para realizar esse ensaio, acrescenta-se trombina purificada exógena ao plasma para determinar o tempo de formação do coágulo. É uma estimativa direta da função do fibrinogênio, usada para confirmar se há um defeito nela. O tempo de trombina será prolongado nos estados hipofibrinogenêmicos e se houver uma proteína fibrinogênica anormal (disfibrinogenemia).

Ensaios usados nos testes clínicos de coagulação

A base dos testes clínicos da coagulação é a utilização de ensaios funcionais que verificam a velocidade da formação do coágulo. Nesses ensaios ocorre uma sequência de reações proteolíticas que levam à formação de trombina e à proteólise do fibrinogênio (Mann, 2003). A proteólise do fibrinogênio resulta na formação do coágulo, na precipitação de proteínas solúveis, detectada por aumento da impedância ou da turbidez, ou ainda por menos clareza óptica etc., com base na instrumentação usada para medir o resultado. Qualquer defeito ao longo da via de formação do coágulo dará um resultado anormal. Além disso, como é preciso que ocorra uma série de reações para a formação final do coágulo, qualquer defeito abaixo de um ponto específico levará a um resultado anormal acima do defeito. Por exemplo, um inibidor do fator VIII dará um fator XI anormal. Da mesma forma, um fibrinogênio deficiente ou anormal irá afetar os resultados de todos os testes da coagulação.

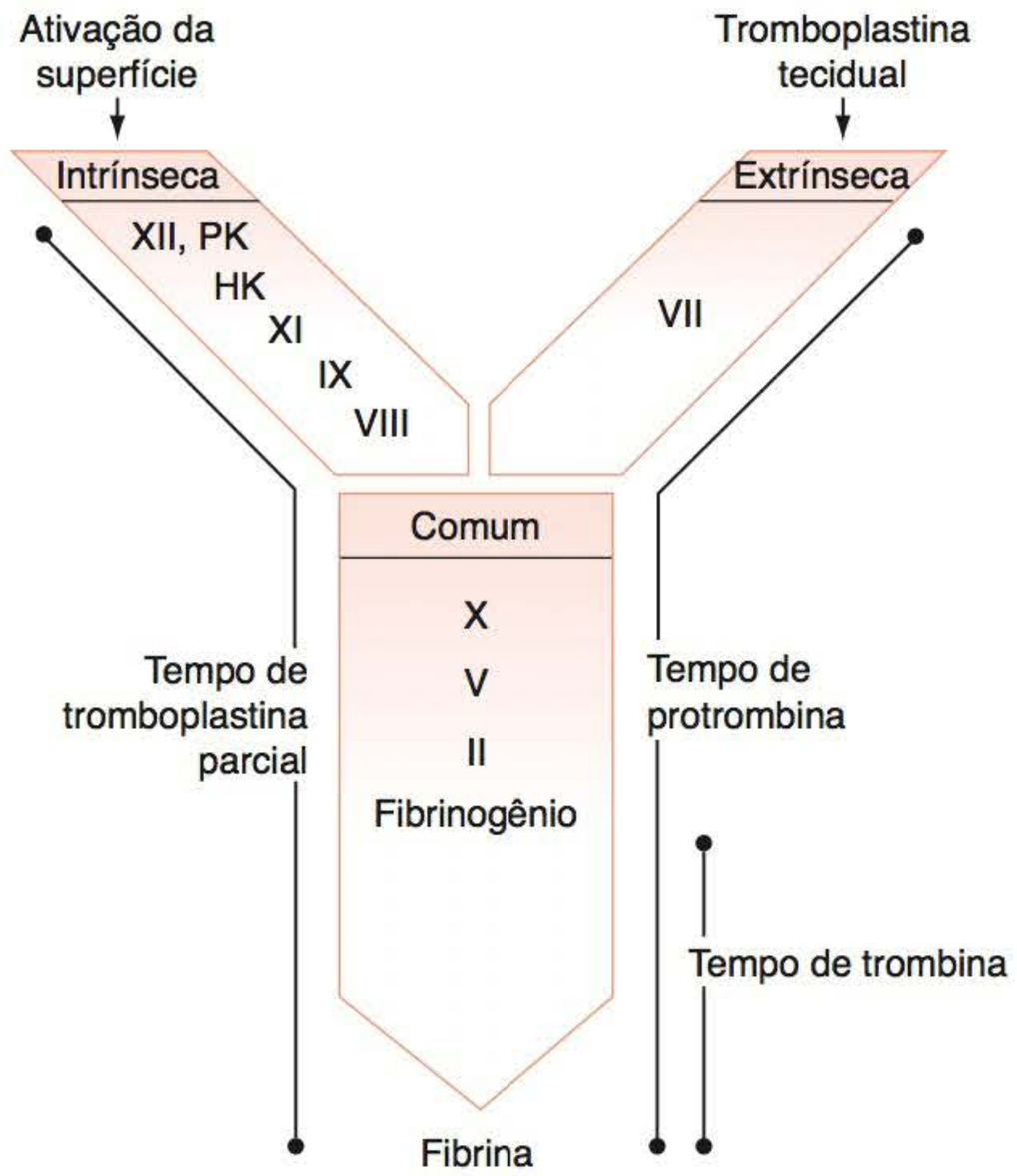


Figura 38.7 Organização do sistema da coagulação com base nos ensaios atuais. O sistema "intrínseco" da coagulação consiste nas proteínas conhecidas como fatores XII, XI, IX e VIII, mais a pré-calicreína (PK) e o cininogênio de alto peso molecular (HK). O sistema "extrínseco" da coagulação consiste no fator tecidual (tromboplastina tecidual) e no fator VII. A "via comum" do sistema da coagulação consiste nos fatores X, V, II e fibrinogênio (I).

Tabela 38.2 Padrões de sangramento clínico nos distúrbios da hemostasia

Características	Hemostasia primária (plaquetas/problema vascular)	Hemostasia secundária (problema com fator da coagulação)
Início	Espontâneo, imediato após traumatismo	Tardio após traumatismo
Locais	Pele, mucosas	Tecidos profundos
Forma	Petéquias, equimoses	Hematomas
Mucosas	Comum (nasal, oral, gastrintestinal, geniturinária)	Menos comum
Outros locais	Rara	Articulações, músculos, sistema nervoso central, retroperitoneal
Exemplos clínicos	Trombocitopenia, defeitos nas plaquetas, doença de von Willebrand, escorbuto	Deficiência de fator, doença hepática, inibidores adquiridos

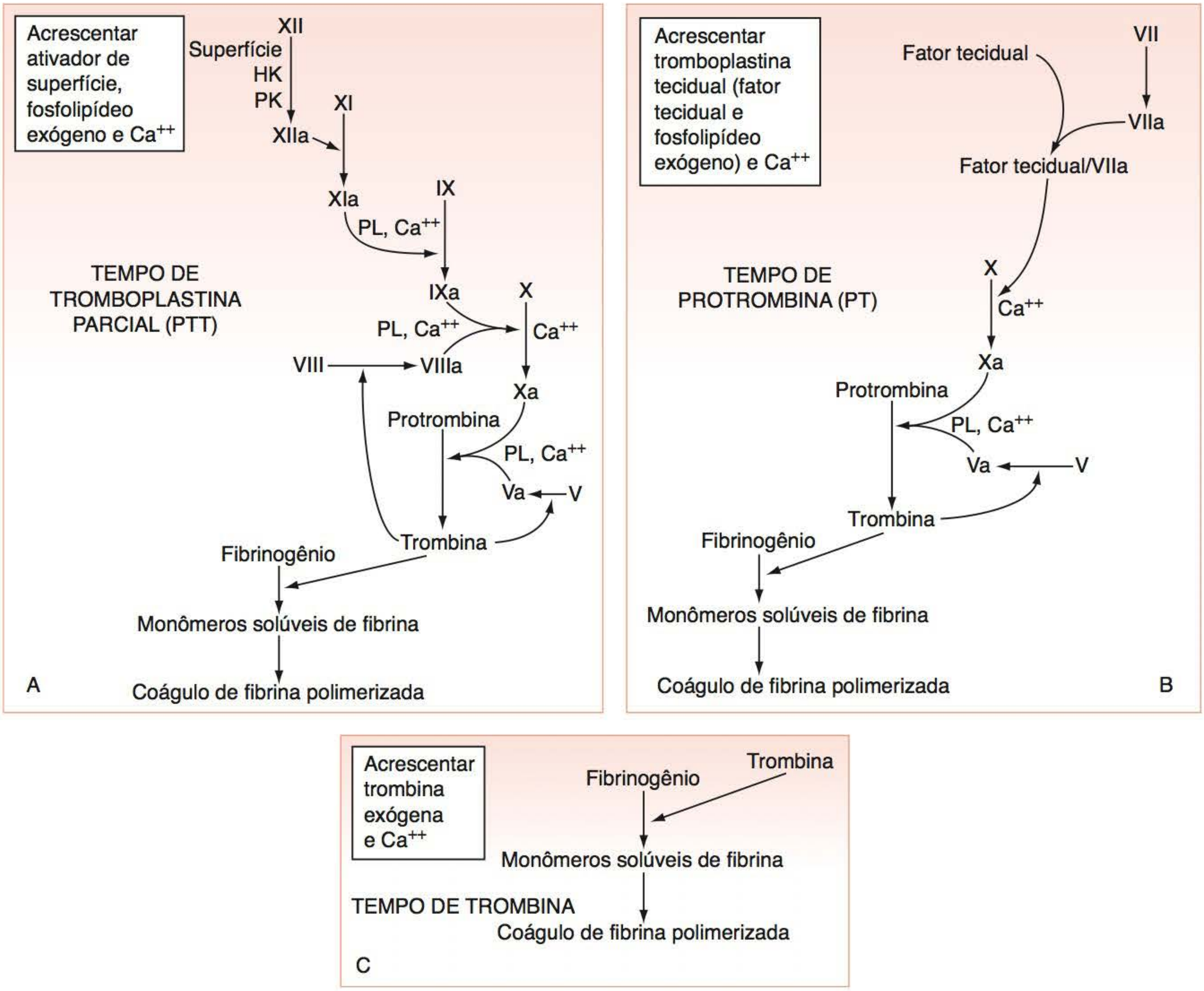


Figura 38.8 Testes de triagem para coagulação. *Painel A*: o tempo de tromboplastina parcial ativada (PTT) requer a presença de cada proteína, exceto fator tecidual e fator VII. *Painel B*: o tempo de protrombina (PT) requer fator tecidual e os fatores VII, X, V, II e fibrinogênio. *Painel C*: no tempo de trombina (ou tempo de coagulação da trombina), acrescenta-se trombina exógena ao plasma para proteolisar o (coágulo) fibrinogênio. O ponto final em cada um desses testes é o número de segundos até a detecção de um coágulo, após o acréscimo dos reagentes indicados ao plasma citratado sem plaquetas do paciente. Como praticamente todos os sistemas de medição empregados detectam a formação de um coágulo de fibrina polimerizada, havendo ou não ligação cruzada da fibrina, nenhum desses testes fornece qualquer informação a respeito da atividade do fator XIIIa.

Todos os fatores da coagulação do sistema intrínseco (XII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular, XI, IX e VIII) são medidos em ensaios que utilizam o PTT como sua plataforma. Esses ensaios tornaram-se amplamente disponíveis por causa da identificação de pacientes com cada fator deficiente no plasma que serve como substrato para eles. Por exemplo, um ensaio do fator VIII é uma mistura de reagente do PTT, plasma deficiente em fator VIII e plasma de teste (desconhecido). O Fator VII, junto com os fatores de coagulação da via comum (X, V e II), geralmente é medido em ensaios usando o PT como plataforma. Por exemplo, um ensaio de fator X é uma mistura de reagente do PT que contém fator de tecido (tromboplastina), plasma deficiente em fator X e plasma de teste (desconhecido). O Fator VII, junto com os fatores da coagulação da via comum (X, V e II), geralmente é medido em ensaios usando o PT como plataforma. Por exemplo, um ensaio de fator X consiste na mistura de reagente do PT, que contém fator tecidual (tromboplastina), plasma deficiente em fator X e plasma de teste (desconhecido). Após incubação por alguns minutos, o tempo de coagulação é iniciado pelo acréscimo de cloreto de cálcio. A quantidade de fator presente na amostra de um paciente é determinada comparando-se a amostra do paciente com uma curva padrão feita com amostras de plasma que contêm quantidades variáveis do fator específico misturadas com o plasma deficiente no fator e o reagente apropriado para o PTT ou o PT do fator que está sendo submetido ao ensaio.

Os ensaios baseados na coagulação são sensíveis e específicos, além de muito mais simples de fazer que os ensaios com antígenos para cada uma das proteínas da coagulação. Outros ensaios, como o tempo de trombina e o tempo da reptilase (ver adiante) verificam especificamente a integridade do fibrinogênio, pois é acrescentada uma enzima que proteolisa o fibrinogênio para formar um coágulo de fibrina. Ao estabilizar um tempo de trombina clinicamente útil, é importante reduzir a concentração de trombina para cerca de 4 U/mL, de modo que o tempo de um ensaio normal seja de cerca de 20 segundos. Tal ensaio terá sensibilidade suficiente para detectar anormalidades sutis na proteína. Os ensaios baseados na coagulação examinam a função da proteína, os ensaios com antígeno estabelecem a presença dessas proteínas e, combinados, ambos são capazes de detectar proteínas com função diminuída e, no entanto, massa normal, situação que ocorre quando se trata do fibrinogênio. O meio mais útil de determinar se o fibrinogênio é anormal é medir o fibrinogênio coagulável e o antígeno do fibrinogênio. Se a quantidade do coagulável for inferior a 90% da quantidade do antígeno, tudo indica que a proteína produzida tem alguma anormalidade.

Além dos ensaios baseados no coágulo, o laboratório moderno de coagulação faz ensaios com antígenos de várias proteínas. Ensaios cromogênicos também são usados para medir certas enzimas (plasmina, proteína C ativada) e vários inibidores da protease plasmática (antitrombina, inibidor C1). A capacidade de neutralizar a atividade enzi-

mática do fator Xa ou da trombina é um meio útil de avaliar o nível de anticoagulantes que inibem o fator Xa ou a trombina. Um ensaio cromogênico direto foi útil para avaliar o grau de anticoagulação de um paciente com varfarina que também tinha anticoagulantes lúpicos, os quais interferem no tempo de protrombina.

Interpretação dos testes de triagem do sistema de coagulação

Utilizando a hipótese da cascata da coagulação e seu grupo de proteínas do sistema da coagulação, os testes de triagem para proteínas da coagulação podem ser usados para identificar várias deficiências ou anormalidades nas proteínas da coagulação (Tab. 38.3, Fig. 38.7).

No PTT, o fator XII é ativado ao ser exposto a uma superfície artificial com carga negativa. Como já foi dito, esse evento *in vitro* inicia a sequência de reações da cascata da coagulação. O PTT mede as proteínas do sistema intrínseco da coagulação (fator XII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular, fator XI e fator VIII) e as da via comum (fatores X, V, II e fibrinogênio) (Fig. 38.8A). É importante lembrar que um fator da coagulação pode estar diminuído em diferentes níveis antes que os ensaios de triagem sejam sensíveis e mostrem uma anormalidade. Por exemplo, os reagentes mais comerciais para PTT detectam uma queda no fator VIII quando o nível da proteína está abaixo de 35 a 45% do normal (0,35 a 0,45 U/mL). Já o fator XII e o cininogênio de alto peso molecular precisam estar em um nível de 10 a 15% do normal para que sejam detectadas anormalidades marcantes ao PTT. De forma semelhante, níveis abaixo de 35 a 40% do fator VII começam a ser detectados pelo PT. Ao avaliar novos lotes de reagentes da coagulação, é importante determinar seu nível de sensibilidade para detectar deficiências de proteínas da coagulação. Além disso, níveis muito altos do fator VIII podem mascarar um defeito em outros fatores da coagulação. Níveis muito altos do fator VIII também podem mascarar um nível diminuído de proteína C em um ensaio para proteína C ativada baseado no coágulo.

O PT mede a via extrínseca da coagulação, que consiste em fator VII ativado (fator VIIa), fator tecidual e proteínas da via comum (fatores X, V, II e fibrinogênio) (Fig. 38.8B).

O tempo de trombina mede apenas a capacidade da trombina exógena de proteolisar (coagular) o fibrinogênio (Fig. 38.8C), sendo usado para caracterizar a função do fibrinogênio.

Sabendo o que cada teste mede, pode-se usar a seguinte abordagem para avaliar o risco de sangramento em pacientes que apresentem prolongamento de um ou mais desses ensaios (Tab. 38.3, Fig. 38.7). Por exemplo, se um paciente tem apenas PTT prolongado, a determinação do risco de tal paciente ter sangramento pode começar com o acréscimo de alguma informação a respeito de seus antecedentes clínicos. Se o prolongamento apenas do PTT em um paciente do sexo masculino estiver associado a sangramento, então o diagnóstico diferencial em probabilidade decrescente de frequência é deficiência de fator VIII, fator IX ou fator XI. Tais distúrbios serão discutidos na próxima seção. Se apenas o PTT estiver prolongado e não houver história de sangramento, a causa mais comum é um anticoagulante lúpico. As proteínas específicas do sistema intrínseco da coagulação associadas a um PTT prolongado mas sem história de sangramento incluem, em ordem decrescente de frequência, fator XII, pré-calicreína e cininogênio de alto peso molecular. É essencial saber a respeito dessas três últimas proteínas para avaliar um PTT prolongado, mesmo que o paciente não corra risco de sangramento, para que não receba uma reposição desnecessária de plasma nem tenha procedimentos cirúrgicos adiados sem necessidade. No entanto, se o paciente tiver apenas um PT prolongado associado a sangramento, isso em geral indica deficiência parcial do fator VII. Às vezes, defeitos em algumas proteínas da via comum (fibrinogênio, fatores II, V e X) podem surgir primeiro como um prolongamento do PT isoladamente, mas, se forem graves, os defeitos nessas proteínas resultarão em PT e PTT prolongados. Geralmente, os defeitos nas proteínas da via comum (fibrinogênio, fatores II, V e X) resultam em prolongamento do PT e do PTT. Entretanto, ao nos depararmos com resultados laboratoriais de um paciente com PT e PTT prolongados, é importante não considerar simplesmente as proteínas específicas mencionadas, mas também incluir no diagnóstico diferencial estados clínicos gerais como terapia anticoagulante, coagulação intravascular disseminada, doença hepática, deficiência de vitamina K e transfusão maciça. Cada uma dessas entidades será descrita adiante na seção sobre distúrbios hemorrágicos adquiridos.

Tabela 38.3 Diagnóstico diferencial nos testes de triagem de coagulação anormal

Apenas tempo de tromboplastina parcial (PTT) anormal
Associado a sangramento: defeitos de VIII, IX, XI
Não associado a sangramento: XII, pré-calicreína (PK), cininogênio de alto peso molecular, anticoagulantes lúpicos
Apenas tempo de protrombina (PT) anormal
Factor VII defects
PT e PTT anormais combinados
Condições clínicas: anticoagulantes, CID, doença hepática, deficiência de vitamina K, transfusão maciça
Raramente disfibrinogenemias, defeitos nos fatores V, X e II

CID = coagulação intravascular disseminada.

Também existem alguns distúrbios hemorrágicos raros que não serão detectados nos testes rotineiros de coagulação e triagem de plaquetas. Essas entidades incluem, em ordem de frequência, defeitos do fator XIII, da α_2-antiplasmina, do inibidor 1 do ativador do plasminogênio e da α_1-antitripsina$_{PITTSBURGH}$. A deficiência de fator XIII será discutida a seguir. Os defeitos da α_2-antiplasmina e do inibidor 1 do ativador do plasminogênio, tanto congênitos como adquiridos, acarretam estados hipofibrinolíticos como resultado da menor inibição da plasmina, do ativador do plasminogênio tecidual ou da urocinase, respectivamente. Além dos ensaios específicos para essas proteínas, existem vários testes de triagem que podem ser empregados para detectar esses distúrbios raros (ver adiante). A α_1-antitripsina$_{PITTSBURGH}$ é uma entidade extremamente rara, sendo um distúrbio hemorrágico decorrente de uma mutação na antitripsina que resulta em inibição potente da trombina, impedindo a formação do coágulo.

Abordagem clínica para pacientes com distúrbios da coagulação

Os pacientes com ensaios da coagulação anormais podem ser avaliados pelo diagnóstico diferencial de uma anormalidade isolada do PTT, do PT ou de ambos. Os defeitos específicos nas proteínas da coagulação serão discutidos com mais detalhes na próxima seção. Na vigência de um ensaio da coagulação prolongado, o diagnóstico diferencial geralmente fica entre uma deficiência verdadeira ou um inibidor de uma proteína específica da coagulação. Há duas abordagens para se chegar ao diagnóstico específico. Com a primeira, é possível descobrir o defeito específico de um ensaio da coagulação prolongado fazendo-se todos os ensaios relevantes para fatores da coagulação. Se um estiver diminuído, então pode-se fazer o ensaio específico para o inibidor daquele fator da coagulação. Uma abordagem geral para procurar um inibidor específico pode ser feita misturando-se várias proporções de plasma do paciente com plasma normal (p. ex., 1:1, 2:1, 4:1, 1:2, 1:4), incubando as amostras por 2 horas a 37°C e então medindo o nível do fator específico na mistura. Simultaneamente, o plasma do paciente e o plasma normal também são incubados nas mesmas condições. No momento do ensaio, obtém-se a atividade porcentual do fator específico sendo pesquisado no plasma normal, no plasma do paciente e em cada mistura. Se o *valor observado* em qualquer proporção de plasma do paciente com relação ao plasma de controle for menor do que o *valor esperado* da mistura dos dois plasmas nas várias proporções (p. ex., 1:1, 2:1, 1:2 etc.), pode-se concluir que há um inibidor no plasma do paciente, que é transferido para a amostra do plasma normal. Por exemplo, se houver 100% de atividade (1 U/mL) do fator estudado em uma amostra não diluída, uma diluição 1:1 de plasma normal com plasma deficiente no fator deve levar a um nível de atividade de cerca de 50%. Se o mesmo plasma normal foi incubado com plasma do paciente na proporção 1:1 e o valor obtido foi de 32% de atividade, deve-se concluir que há algo no plasma do paciente que é transferido e inibe a atividade do fator no plasma normal (i. e., a definição de um inibidor). Essa abordagem é um método não quantitativo geral para avaliar um inibidor de fator da coagulação. Na seção sobre defeitos hereditários de proteínas da coagulação, será apresentado um método especificamente quantitativo para determinar os inibidores

do fator VIII e tal abordagem é aplicável a qualquer fator medido em um ensaio coagulante.

Uma segunda maneira de abordar o problema de determinar um defeito em fator específico da coagulação é começar misturando o teste do paciente com plasma normal. Estudos de misturas baseados no PT ou no PTT são interpretados pelo fato de que um nível de 50% de qualquer fator da coagulação é suficiente para dar um valor normal de PT e PTT, isso porque ambos esses testes têm curvas hiperbólicas (i. e., uma diminuição de um fator não acarreta em um prolongamento linear do outro). Com níveis de 50% de qualquer fator da coagulação, o tempo de coagulação ficará dentro da variação normal. Apenas com valores bem abaixo de 50% o PT e o PTT começam a ficar prolongados. Conforme dito anteriormente, a sensibilidade do PT e do PTT em termos de prolongamento com a diminuição dos níveis de fatores da coagulação varia de acordo com o fator e o reagente feito pelo fabricante. Portanto, se o plasma do paciente for misturado na proporção 1:1 com plasma normal, o PT ou o PTT devem manter-se normais se não houver um fator inibidor no plasma do paciente. No entanto, se a mistura não se mantiver nos valores normais, considera-se que há algo no plasma do paciente que interfere na função da proteína existente no plasma normal.

A maneira como são feitos os ensaios de triagem para inibidores é um tanto subjetiva em cada laboratório. Quase não existem estudos que forneçam evidência baseada em um laboratório clínico sobre como realizar estudos de triagem para inibidores. Foram desenvolvidas algumas abordagens usando misturas para testar anticoagulantes lúpicos, mas todas têm seus próprios aspectos peculiares (Brandt, 1995a, b). Questões críticas ao fazer esses estudos com misturas são a proporção de plasma do paciente e plasma normal (1:1 a 1:4), o tempo de incubação da mistura (imediato a 2 horas) e os ensaios a serem usados para medir o resultado (PT, PTT). Uma investigação recente examinou a sensibilidade e a especificidade de estudos com misturas para avaliar deficiências de fator e anticoagulantes (Chang, 2002). Nesse estudo, foram incubados plasma normal e do paciente a 37°C por 1 hora antes de fazer o teste, em proporções de 1:1 ou 4:1 (paciente:normal). Em um PTT de uma mistura na proporção de 1:1 com correção porcentual de 70 a 75% calculada por uma fórmula específica (ver a fórmula na referência), a sensibilidade e a especificidade para reconhecer a deficiência de um fator ou anticoagulante foram de 100 e 33% ou 33 e 100%, respectivamente. Quando a correção porcentual foi de 50%, calculada a partir da proporção de 4:1 paciente:normal para o PTT no plasma misturado, a sensibilidade e a especificidade para reconhecer uma deficiência de fator ou anticoagulante foram de 88 e 100% ou 100 e 88%, respectivamente (Chang, 2002). Da mesma forma, o PT em uma mistura de 1:1 com uma correção porcentual de 70 a 75% calculada por uma fórmula específica (ver a fórmula na referência), a sensibilidade e a especificidade para reconhecer uma deficiência de fator ou anticoagulante foram de 95 e 50% ou 50 e 95%, respectivamente. Quando a correção porcentual foi maior do que 40%, calculada a partir de uma proporção de 4:1 paciente:normal na mistura de plasma para o PT, a sensibilidade e a especificidade para reconhecer uma deficiência de fator ou anticoagulante foram de 96 e 100% ou 100 e 96%, respectivamente (Chang, 2002). Outros estudos mostraram que o ensaio após uma mistura imediata *versus* incubação por 1 hora a 37°C teve sensibilidade e especificidade menores.

Os estudos citados indicam a abordagem de uma instituição ao fazer estudos de triagem com misturas. Deficiências de múltiplos fatores, como quando um paciente está usando varfarina, em geral não se corrigem porque há tanto deficiências nos níveis plasmáticos de proteínas como produção de moléculas anormais em consequência do defeito na carboxilação que funcionam como inibidoras em ensaios baseados no coagulante. Uma vez determinado que um inibidor está presente, serão necessários ensaios específicos para o fator para isolar a proteína específica à qual o inibidor está direcionado. Em geral, nosso laboratório visa descobrir se um fator específico está afetado quando os testes de triagem são anormais e então determinar se há um inibidor específico dele.

Defeitos hereditários das proteínas da coagulação

Conforme descrito anteriormente, deficiências de proteína ou fator podem ser quantitativas ou qualitativas. Nos distúrbios quantitativos, o nível do fator determinado pelos métodos rotineiros baseados no coágulo (ensaios de atividade funcional) é semelhante ao resultado obtido por ensaios imunológicos (com antígeno). Nos distúrbios qualitativos, o resultado do ensaio funcional está reduzido, mas o nível do antígeno está significativamente mais alto ou normal, indicando a presença de uma proteína disfuncional ou um inibidor da função daquela proteína.

Deficiência do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B)

A hemofilia A (deficiência do fator VIII) é o distúrbio hemorrágico congênito grave mais comum que permite a gestação e o parto normal, afetando 1 em cada 5.000 a 10.000 indivíduos do sexo masculino. A hemofilia B (deficiência do fator IX) também é um distúrbio hemorrágico congênito grave, que acomete 1 em cada 25.000 a 30.000 indivíduos do sexo masculino. Os genes do fator VIII e do fator IX estão ambos localizados no cromossomo X, de modo que as hemofilias A e B são distúrbios recessivos ligados ao X que afetam primariamente indivíduos do sexo masculino. Mulheres com uma mutação para hemofilia em um de seus dois cromossomos X são portadoras. A hemofilia A pode acometer mulheres quando portadoras têm lionização desequilibrada do cromossomo X normal, síndrome de Turner ou são filhas de um homem acometido e uma mulher portadora.

As manifestações hemorrágicas das hemofilias A e B, que são problemas de fatores da coagulação, abrangem hemartrose; hematomas em tecido mole, inclusive nos músculos; equimoses de fácil ocorrência; sangramento excessivo em cirurgias, traumatismos, extrações dentárias e circuncisão; sangramento no trato gastrintestinal ou geniturinário; epistaxe; má cicatrização de feridas e, incomumente, sangramento no coto umbilical (Tab. 38.2). Podem ocorrer hemorragias intracranianas, em particular após traumatismo. A gravidade da hemofilia é classificada com base no nível plasmático do fator (Tab. 38.4). A hemofilia grave manifesta-se por sangramento espontâneo duas a quatro vezes por mês e requer tratamento frequente ou terapia profilática com reposição de produtos que contenham o fator deficiente. Na outra extremidade do espectro, a hemofilia discreta manifesta-se por sangramento prolongado após traumatismo ou cirurgia de grande porte e os pacientes raramente precisam de reposição intravenosa do fator.

Suspeita-se de hemofilia quando há sintomas hemorrágicos ou história da doença na família do paciente. Cerca de um terço dos casos de hemofilia A surge de mutações espontâneas. A avaliação laboratorial da hemofilia deve incluir um PTT e um PT. O diagnóstico é confirmado por um ensaio para o fator VIII ou o fator IX. É importante lembrar que dois níveis da curva padrão para a atividade coagulante do fator VIII precisam ser preparados para caracterizar completamente os pacientes com deficiência grave do fator VIII, pois a curva não é linear com valores baixos. Na instituição em que os autores deste capítulo trabalham, níveis do fator VIII acima de 10% são avaliados com uma curva padrão que abrange 10 a 150% de atividade do fator VIII. Níveis baixos do fator VIII são avaliados com uma curva padrão que varia entre níveis de 0,24% e 15%. A etiologia mais comum da hemofilia A grave é uma inversão parcial do gene do fator VIII até e incluindo o íntron 22, responsável por até 40 a 45% dos indivíduos com hemofilia (Naylor, 1992; Lakich, 1993) (Fig. 38.9). Essas inversões devem-se à recombinação homóloga entre a região que inclui o gene *F8A* no íntron 22 e uma das duas outras regiões homólogas localizadas a mais de 400 kb 5' (telomérica) do gene do fator VIII (Lakich, 1993; Kaufman, 2001). Foram descritos vários tipos dessas inversões (Kaufman, 2001). Se a inversão do íntron 22 não for detectada, é difícil definir a mutação responsável por causa do grande tamanho do gene do fator VIII. Em contraste, o gene do fator IX tem um terço do tamanho do DNA complementar do fator VIII, e as mutações responsáveis pela hemofilia B são mais fáceis de definir por análise genética.

Além do que acabamos de mencionar, podem ser necessários mais testes diagnósticos para pacientes com deficiência discreta a moderada do fator VIII sem história de hemofilia A (p. ex., uma paciente com fator VIII baixo e herança autossômica aparente). Em pacientes com doença de von Willebrand, pode ocorrer uma deficiência secundária de fator VIII (ver Cap. 39), pois esse fator normalmente está ligado e estabilizado pelo de von Willebrand no plasma (Weiss, 1977). Além disso, foi descrita uma única anormalidade no fator de von Willebrand em que uma mutação errática nele prejudica sua capacidade de ligar-se ao

Tabela 38.4 Classificação das hemofilias A e B

	Classificação		
	Grave	**Moderada**	**Discreta**
Porcentagem de pacientes	50–70	10	30–40
Atividade do fator VIII ou fator IX (%)	<1	1–5	6–30
Padrão dos episódios de sangramento	2–4 por mês aproximadamente	4–6 por ano aproximadamente	Incomum
Etiologia do sangramento	Espontâneo	Traumatismo mínimo	Traumatismo maior Cirurgia

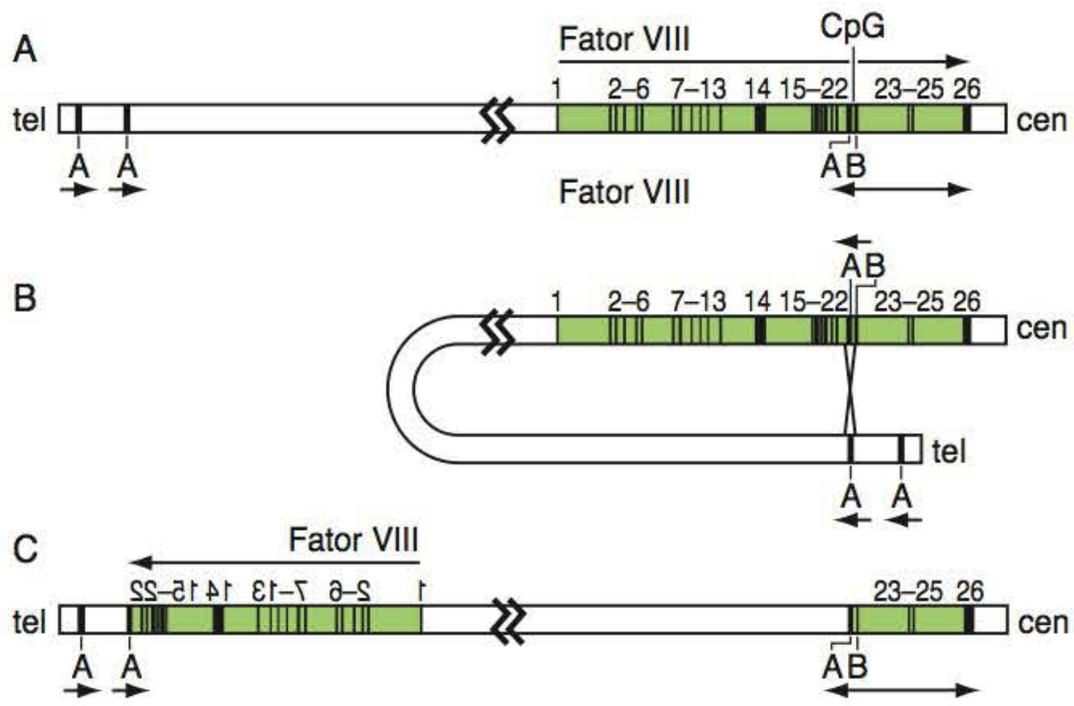


Figura 38.9 Inversão do gene do fator VIII na hemofilia A. O painel superior ilustra uma região do cromossomo Xq28, com o gene do fator VIII sombreado. Além disso, há duas cópias de uma região que tem alta homologia com a sequência dentro do fator VIII, denominada "gene A", que ocupa a contracorrente do fator VIII, bem como uma terceira cópia do gene A presente na orientação inversa dentro do íntron 22 do próprio gene do fator VIII. A seta no alto do esquema indica a direção da transcrição. Na linha *B*, é mostrada uma recombinação homóloga proposta entre a cópia do íntron 22 do gene A e uma das duas cópias na contracorrente. Na linha *C*, o *crossover* entre duas regiões idênticas, na orientação mostrada, resulta em uma inversão da sequência entre os dois genes recombinados. Tal gene bloquearia toda a transcrição do fator VIII. Essa figura representa um tipo de recombinação. Pode ocorrer uma recombinação em qualquer parte da região de homologia do gene. (Redesenhada com permissão de Lakich D, Kazazian H, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversion disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe hemophilia A. Nat Gen 1993; 5:236-241.)

fator VIII e promover a secreção plasmática do último. Essa anormalidade, descrita pela primeira vez em um paciente francês da Normandia, foi denominada doença de von Willebrand "Normandia" ou tipo 2N. É reconhecida quando um paciente com exames normais para o fator de von Willebrand mas níveis reduzidos de fator VIII tem herança autossômica recessiva em vez de ligada ao sexo (Schneppenheim, 1996).

Os níveis de atividade do fator IX durante a infância permanecem em cerca de 75% dos níveis encontrados em adultos. Há um incremento de 25% na expressão do fator VIII que começa na puberdade em ambos os sexos (Andrew, 1992). Foi levantada a hipótese de que isso resulta da ação de hormônio esteroide. É interessante o fato de que há uma forma rara de deficiência de fator IX, a hemofilia B Leyden, que apresenta resolução fenotípica pós-puberal. Os pacientes com essa condição apresentam-se com hemofilia B no início da infância, com a atividade do fator IX variando de menos de 1 a 13% do normal. Os níveis plasmáticos sobem até 70% do normal após o início de puberdade, com resolução das complicações hemorrágicas (Reitsma, 2001). Mutações na hemofilia B Leyden foram identificadas na região promotora do gene do fator IX, dentro da qual está localizada uma sequência de consenso para ligação de receptor esteroide (Crossley, 1992).

Avaliação de portadores

A detecção de portadores é útil para prever os sintomas e fazer o aconselhamento pré-natal. Os portadores podem ter níveis baixos o bastante de fator VIII ou IX para serem sintomáticos, apresentando equimoses com facilidade, menorragia e complicações hemorrágicas de cirurgias e traumatismos (Arun, 2001). Na hemofilia A, se a mutação é conhecida, pode-se testar o portador potencial para a inversão comum no íntron 22. Quando disponível, a análise genética detalhada da mulher, do homem acometido e de outros membros da família pode definir a mutação. Tais técnicas proporcionam uma probabilidade extremamente alta de detectar portadores quando todos os membros da família estão disponíveis para estudo. Do contrário, pode-se usar a proporção de atividade do fator VIII com relação ao nível do antígeno do fator de von Willebrand na mulher para predizer o estado de portadora. Proporções inferiores a 1 identificam 91 a 99% de portadores da hemofilia A (Fishman, 1982; Graham, 1986; Green, 1986). O diagnóstico pré-natal das hemofilias pode ser feito em vários centros de obstetrícia de alto risco por amostragem de vilosidade coriônica às 12 semanas de gestação ou por amniocentese após a 16ª semana. Se a base genética da doença é conhecida em uma família, então pode-se fazer a análise mutacional ou o exame de inversão do íntron 22 em amostras de células (Ljung, 1999; Arun, 2001). A amostragem fetoscópica de sangue pode se feita às 20 semanas de gestação para análise de fator da coagulação, embora implique alto risco e seja menos precisa. Na hemofilia B, 30 a 40% dos portadores serão perdidos pela estimativa da atividade do fator IX, e a análise de mutação é importante para definir o estado de portador (Graham, 1979; Ljung, 1999). Como a hemofilia A, a hemofilia B surge espontaneamente em um terço dos pacientes.

Tratamento da hemofilia

Produtos recombinantes dos fatores são agora o padrão de cuidados no tratamento das hemofilias A e B em países desenvolvidos. Os fatores da coagulação são dosados com base no peso e na atividade plasmática desejada. O plasma com 100% de atividade de fator da coagulação tem 1 U/mL daquele fator. Por convenção, uma unidade de fator da coagulação é a quantidade do fator presente em 1 mL de *pool* de plasma humano normal. Cada unidade de fator VIII recombinante/kg aumenta 2% a atividade plasmática do fator VIII e cada unidade de fator IX recombinante/kg e aumenta cerca de 1% a atividade plasmática do fator IX. Para aumentar a atividade plasmática do fator VIII para 100% em um homem com 70 kg, a dose será calculada como a seguir:

peso corporal (kg) × 0,5 unidade internacional/kg × aumento desejado na atividade do fator VIII (%) = dose necessária, ou

(70 kg) (0,5) (100) = 3.500 unidades a serem infundidas.

A meia-vida plasmática do fator VIII é de cerca de 12 horas. Para aumentar a atividade plasmática do fator IX para 100% em um homem com 70 kg, a dose calculada será:

peso corporal (kg) × aumento desejado da atividade do fator IX (%) × 1 unidade internacional/kg = dose necessária; ou

(70 kg) (100) = 7.000 unidades a serem infundidas (Shapiro, 2005).

Cerca de um terço dos pacientes com deficiência do fator IX têm uma recuperação menor após a infusão de fator IX recombinante, necessitando de uma dose 20% maior. A meia-vida plasmática do fator IX é de cerca de 24 horas.

Complicações do tratamento

Anticorpos inibidores do fator VIII ou do IX são uma complicação importante da terapia. A incidência de inibidores em pacientes com hemofilia A é de aproximadamente 15 a 35% e em pacientes com hemofilia B é de aproximadamente 1 a 4%. Na hemofilia A, é provável que os inibidores desenvolvam-se quando o indivíduo é acometido gravemente e se, em um paciente que não foi tratado antes, há 9 a 12 dias de exposição à terapia (Arun, 2001).

O teste para inibidor no paciente com hemofilia está indicado se:

- a hemorragia do paciente não é controlada com uma dose apropriada do fator;
- o nível do fator VIII com relação ao tempo do fator de infusão no gráfico mostra uma queda muito rápida da curva;
- o nível do fator no plasma do paciente parece aumentar quando se faz o ensaio com a amostra em diluições maiores.

Por exemplo, no último caso, em geral faz-se a estimativa do nível do fator em várias diluições (p. ex., 1:10, 1:20, 1:40). Se a porcentagem de atividade do fator na diluição maior for significativamente mais alta que a observada na diluição menor, pode-se concluir que algo que inibe a

atividade do fator está sendo diluído. O reconhecimento de tal fenômeno pode ser o primeiro indício da presença de um inibidor no plasma do paciente.

A caracterização de um inibidor específico do fator VIII ou IX ou de qualquer outra proteína da coagulação requer exame cuidadoso. Um simples teste de mistura como descrito antes para o PT e o PTT pode subestimar a presença de um inibidor. Além disso, conforme indicado na seção anterior, não há unanimidade sobre qual ensaio com mistura deve ser feito. Recomenda-se que, ao realizar uma triagem para inibidor do fator VIII ou do IX, deve-se fazer um ensaio "Bethesda" para o inibidor (Kasper, 1975). Em geral, essa abordagem para avaliar a presença de inibidores de fator da coagulação é mais confiável para todos os inibidores de proteínas da coagulação. Esse ensaio padroniza a quantidade de plasma na mistura e o tempo de incubação, e ainda normaliza a interpretação do inibidor, de maneira que é passível de interpretar universalmente. Nesse ensaio, uma parte de plasma do paciente é misturada com uma parte de plasma normal e incubada por 2 horas a 37°C. O controle é uma mistura 1:1 de um conjunto de plasma de vários indivíduos com tampão. Em uma variação do ensaio Bethesda original, a chamada modificação Nijmegen, o controle do plasma conjunto é incubado com plasma deficiente em fator VIII e o normal usado no ensaio é tamponado para evitar desvios do pH durante as 2 horas de incubação (Verbruggen, 1995). Após a incubação, faz-se o ensaio com o plasma do paciente ou a mistura de controle para a atividade do fator VIII, e a porcentagem do fator VII residual é determinada em cada diluição pela proporção mistura do paciente:mistura de controle. Uma "unidade Bethesda" arbitrária (BU) foi criada para quantificar os inibidores de fator da coagulação. Assim, no caso do fator VIII, uma BU é definida como a quantidade de plasma do paciente que destrói metade da atividade do fator VIII no plasma de controle (Fig. 38.10). Portanto, considera-se que uma atividade residual do fator VIII de 50% no plasma do paciente contenha uma unidade Bethesda de inibidor por mililitro. Se esse mesmo plasma tivesse sido diluído 10 vezes antes do ensaio para o inibidor, então esse resultado indicaria valores do inibidor de 10 BU/mL. Esse ensaio é sensível, mas às vezes difícil de reproduzir. Ele pressupõe que no plasma normal usado há 100% de atividade do fator VIII. O plasma normal usado nesse ensaio deve ser submetido a teste e seu nível de fator VIII é o utilizado no cálculo do fator VIII residual após incubação com plasma inibidor do paciente. Além disso, várias diluições de plasma podem produzir estimativas diferentes do título do inibidor. Ao decidir o nível de unidades Bethesda, a diluição que fica mais próxima de 50% de fator residual é escolhida para o cálculo do título do inibidor do fator VIII. Essa abordagem para determinar o nível de unidades inibidoras de qualquer fator da coagulação é prontamente adaptável para determinar os níveis inibidores de qualquer outro fator da coagulação.

Há inúmeras opções terapêuticas para pacientes com inibidores do fator VIII. A escolha de qual usar tem de ser criteriosa, pois o custo de tratar esses pacientes pode ter um impacto financeiro sério na instituição. As opções terapêuticas para tratar pacientes com inibidores do fator VIII incluem grandes doses de fator VIII; o uso de "agentes de desvio" como concentrados do complexo protrombina ativada e não ativada ou fator VIIIa recombinante (Abshire, 2004; Roberts, 2004; Zeitler, 2005), indução de tolerância imune mediante exposição regular ao fator VIII com ou sem o uso de fármacos imunossupressores e plasmaférese que pode incluir adsorção de anticorpos. O uso de inibidores mais fortes com doses maciças de fator VIII ou do fator VIIa recombinante sem dúvida são as formas mais dispendiosas de terapia. No entanto, às vezes o uso do fator VIIa recombinante pode salvar a vida.

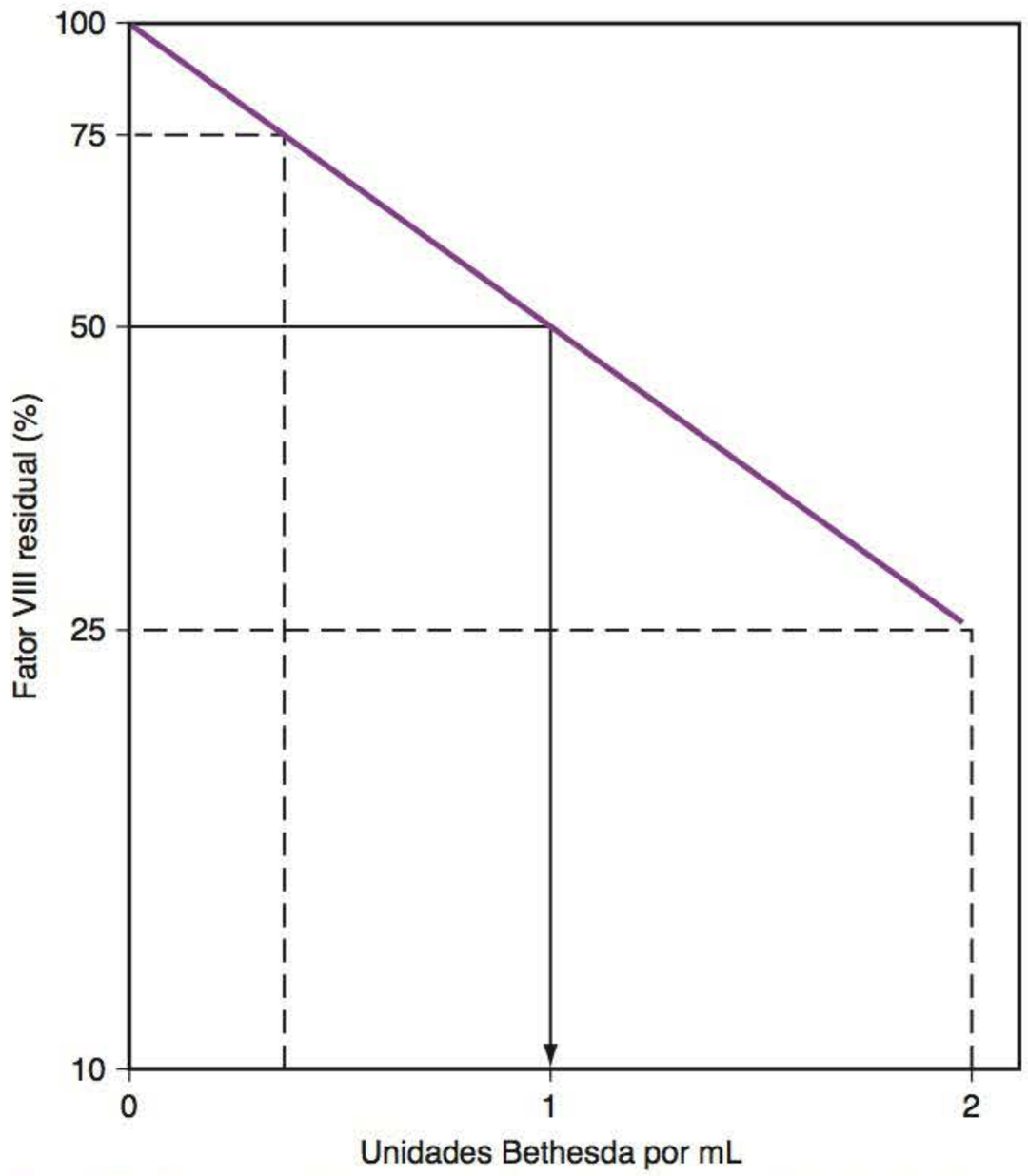


Figura 38.10 Expressão do título de inibidor do fator VIII em Unidades Bethesda. Nesse ensaio para um inibidor do fator VIII, a atividade residual desse fator em porcentagem no plasma normal é determinada após incubação com plasma do paciente. Por convenção, uma Unidade Bethesda do inibidor é a quantidade de anticorpo que destrói 0,5 U da atividade do fator VIII após 2 horas de incubação a 37°C. Como mostrado na figura, a porcentagem de atividade residual do fator VIII em uma escala logarítmica é colocada no gráfico contra Unidades Bethesda/mL em uma escala linear. Para que uma amostra possa ser avaliada nesse ensaio, o nível de atividade do fator VIII deve cair entre 25 a 75%. Amostras de pacientes que produzem atividade residual do fator VIII abaixo de 25% precisam ser mais diluídas para que se encontre o ponto de atividade residual de 50% do fator VIII. (Redesenhada com permissão de Bockenstedt PL: Laboratory Methods in Hemostasis. Em Loscalzo J, Schafer AI (eds.): Thrombosis and Hemorrhage, 3ª ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2003, Fig. 21.7, p. 370.)

Deficiências hereditárias de outros fatores da coagulação

As outras deficiências hereditárias de fatores da coagulação têm herança autossômica recessiva (Tab. 38.5). Com exceção da deficiência do fator XI, tais distúrbios são muito raros. Entretanto, têm alta prevalência em áreas onde são praticados casamentos consanguíneos (Mannucci, 2004). Em geral, a maior parte dos pacientes com deficiências das proteínas da coagulação dos fatores VII, V e II provavelmente tem defeitos parciais porque apresentam diabetes hemorrágicos relativamente brandos. A maior parte dos ensaios baseados na coagulação é insensível para valores abaixo de 5 a 10% nos níveis dos fatores. A presença mesmo desse pequeno nível de fator da coagulação pode influenciar bastante o risco de sangramento. Tal avaliação baseia-se nos achados em camundongos *knockout* que indicam que uma ausência verdadeira de cada uma dessas proteínas está associada a praticamente 100% de mortalidade por hemorragia antes do nascimento ou no momento dele. Diante de deficiências hereditárias de fatores, os indivíduos heterozigotos para a deficiência têm aproximadamente 50% (mais comumente 30 a 60%) do nível normal do fator em questão. Os sintomas desses distúrbios são bastante variáveis (Tab. 38.6). Pode-se suspeitar de deficiências de fatores da coagulação com base nos sintomas, na história familiar ou em testes de triagem anormais, e o laboratório confirma o diagnóstico por meio de ensaios específicos para o fator. Uma vez reconhecida uma deficiência de proteína específica, as bases clínicas em geral distinguem um defeito congênito de um adquirido (ver adiante).

Diagnóstico diferencial de um PTT prolongado e um PT normal

Fator XI

A deficiência de fator XI é comum em judeus asquenazis, em que a frequência de heterozigotos é de 8% (Asakai, 1991). Essa população étnica constitui cerca de 50% dos pacientes com deficiência do fator XI nos EUA. A maior parte dos pacientes com essa deficiência raras vezes tem hemorragias espontâneas. Os sangramentos ocorrem comumente após lesão ou cirurgia, em particular nas que envolvem áreas do corpo em que há alta atividade fibrinolítica (boca, nariz, trato geniturinário) (Tab. 38.6). Mulheres podem ter menorragia e hemorragia pós-parto. Os sangramentos podem ocorrer em heterozigotos e não necessariamente correlacionam-se com o nível residual do fator XI. (Leiba, 1965; Bolton-Maggs, 1988). Todavia, a tendência hemorrágica também pode ser modificada

Tabela 38.5 Deficiências de fatores da coagulação

Fator	Localização do gene	Meia-vida circulante normal	Incidência	Herança	Gravidade do sangramento
Fibrinogênio	4q31.3–q32.1	2–4 dias	1:1 milhão	Recessiva	Discreta a grave*
II	11p11.2	3–4 dias	Muito rara	Recessiva	Discreta a moderada
V	1q24.2	36 h	1:1 milhão	Recessiva	Moderada
V e VIII combinados	LMAN1:18q21.32 MCFD2:2p21	36 h para FV; 10–14 h para FVIII	1:2 milhão	Recessiva	Discreta a moderada
VII	13q34	3–6 h	1:500.000	Recessiva	Discreta a grave
VIII	Xq28	10–14 h	1:10.000	Ligado ao sexo	Discreta a grave
IX	Xq27	18–24 h	1:30.000	Ligado ao sexo	Discreta a grave
X	13q34	40–60 h	1:500.000	Recessiva	Discreta a grave
XI	4q35.2	40–70 h	Rara†	Recessiva	Discreta a moderada
XII	5q33-qter	50–70 dias	Rara	Recessiva	Sem sangramento
PK	4q33-q35	Desconhecida	Muito rara	Recessiva	Sem sangramento
HK	3q27	9–10 h	Extremamente rara	Recessiva	Sem sangramento
XIII	A:6p25.1 B:1q31.3	11–14 dias	<1:1 milhão	Recessiva	Moderada a grave

* Pode estar associada a trombose. † Rara, exceto em descendentes de judeus asquenazi.
HK = cininogênio de alto peso molecular; PK = pré-calicreína.

por defeitos adicionais como a hemofilia, a doença de von Willebrand e defeitos da função plaquetária (Brenner, 1997). O diagnóstico depende da determinação da atividade do fator XI abaixo dos parâmetros de referência. A maioria dos reagentes amplamente usados para o PTT dará resultados prolongados para amostras de pacientes com atividade abaixo de 20 a 25% e resultados mistos quando os níveis forem de 25 a 60%. O limite inferior da variação normal é provavelmente de 60 e 70% (Bolton-Maggs, 1995). Portanto, um PTT normal não exclui uma deficiência discreta de fator XI. Nos casos em que pode haver elevação acentuada do fator VIII, o PTT pode ser normalizado mesmo quando outros fatores estão reduzidos (Lawrie, 1998). Em todos os pacientes com deficiência do fator XI, o tratamento pré-operatório é crítico para evitar complicações hemorrágicas. Os pacientes com deficiência grave (fator XI <10 a 20%) devem receber tratamento com plasma fresco congelado para elevar seus níveis de fator XI. Em geral, a terapia de reposição com uma dose de ataque de 20 mL/kg e dose de manutenção de 5 a 10 mL/kg a cada 24 horas é suficiente para pacientes com deficiência grave do fator XI poderem ser submetidos a uma cirurgia eletiva (Kessler, 1996). Pacientes com níveis entre 20 a 70% podem apresentar sangramento. Uma história de hemorragia e a natureza da cirurgia proposta vão orientar o tratamento. O desenvolvimento de inibidores do fator XI em pacientes com deficiência desse fator foi descrito mas é raro (Salomon, 2003).

Fator XII, pré-calicreína e cininogênio de alto peso molecular

A deficiência de fator XII, pré-calicreína (PK) e cininogênio de alto peso molecular (HK) está associada a um PTT prolongado, mas não a qualquer risco de sangramento. A deficiência de fator XII é mais comum, ocorrendo em todos os grupos raciais e étnicos. Está associada a um PTT muito longo. A deficiência de pré-calicreína é menos comum, porém observada em todos os grupos étnicos nos EUA, e está associada a um PTT levemente prolongado que volta ao normal quando o tubo de ensaio é colocado em repouso por 1 hora a 37°C. A deficiência de cininogênio de alto peso molecular é um distúrbio muito raro, também associado a um PTT muito longo. Essas proteínas são essenciais para um PTT normal, pois nele é o fator XII que se autoativa na superfície do tubo de ensaio ou com material particulado de carga negativa no reagente, que inicia a chamada cascata de reações proteolíticas que leva à formação de trombina *in vitro*, conforme descrito antes (Wiggins, 1979; Miller, 1980). Não obstante, essas deficiências de proteína não estão associadas a sangramento – aspecto enfatizado de forma esquematizada na Figura 38.1, ressaltado em cinza na parte da "cascata" da coagulação. Como não há necessidade de terapia de reposição para a hemostasia nas deficiências de fator XII, PK ou HK, é importante reconhecer esses defeitos para evitar uma transfusão desnecessária. Além disso, as deficiências de fator XII e HK têm sido associadas ao risco de trombose. Embora ainda experimentais, os dados sugerem que elas contribuem para a natureza anticoagulante constitutiva do compartimento intravascular (Ratnoff, 1968; Colman, 1992; Hasan, 2003; Zito, 2002). As deficiências de fator XII e HK resultam em PTT muito longo, enquanto na deficiência de pré-calicreína o PTT está apenas ligeiramente prolongado, como dito antes. Ante a suspeita de deficiência de proteínas no sistema calicreína/cinina, em primeiro lugar devem ser feitos ensaios para o fator XII, porque sua deficiência é mais comum.

Tabela 38.6 Manifestações clínicas das deficiências de fatores da coagulação

Tipo de sangramento	Deficiências de fator da coagulação
Equimoses com facilidade	FII, FVIII, FIX
Hematomas	FII, FVIII, FIX
Sangramento de mucosas	FII, FVIII, FIX, FXI
Hemartrose	FVIII, FIX, FX
Sangramento pós-cirurgia	Fibrinogênio, FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXIII
Hemorragia intracraniana	FVII, FVIII, FIX, FXIII
Cicatrização demorada de feridas	Fibrinogênio, FXIII
Sangramento no cordão umbilical	FX, FXIII
Aborto	Fibrinogênio, FXIII
Trombose	Fibrinogênios anormais
Assintomático	FXII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular

PTT e PT prolongados

Distúrbios do fibrinogênio

As deficiências de fibrinogênio (fator I) podem prolongar o PT e o PTT se a concentração plasmática da proteína estiver suficientemente baixa, em geral menos de 100 mg/dL. A afibrinogenemia é autossômica recessiva, representa uma ausência total de fibrinogênio e resulta em um distúrbio hemorrágico de gravidade variável (Fried, 1980; Lak, 1999). Sangramento no coto umbilical e em mucosas são mais comuns, bem como uma incidência maior nos sistemas musculoesquelético e nervoso central. Os pacientes também exibem má cicatrização de feridas. Hipofibrinogenemia é um nível de fibrinogênio abaixo do normal, com um padrão similar, porém mais brando de sangramento. Tanto a afibrinogenemia como a hipofibrinogenemia estão associadas a abortos recor-

rentes e hemorragia antes e após o parto (Goodwin, 1989; Kobayashi, 2000). Paradoxalmente, há relatos de eventos trombóticos em pacientes com afibrinogenemia (Chafa, 1995; Lak, 1999; Dupuy, 2001).

Disfibrinogenemia é uma deficiência qualitativa de fibrinogênio, caracterizada pela produção de fibrinogênio disfuncional. A maior parte dos pacientes com disfibrinogenemia congênita é heterozigota, por causa dos defeitos moleculares na proteína produzida, embora haja relatos de raros casos de homozigotos. As disfibrinogenemias são adquiridas mais comumente em associação à doença hepática. A maioria dos casos de disfibrinogenemia adquirida deve-se a modificações translacionais da proteína fibrinogênio, como resultado de sua síntese em um fígado anormal. No laboratório clínico, foram relatados casos de homozigotos congênitos e adquiridos. Os pacientes com disfibrinogenemia em geral são assintomáticos ou têm sangramentos discretos, mas ocorrem alguns casos de trombose, com ou sem antecedentes de sangramento (Hanss, 2001). O tempo de trombina e o de reptilase, que mede o tempo de coagulação durante a conversão do fibrinogênio em fibrina, em geral estão prolongados na disfibrinogenemia. Quando a trombina proteolisa o fibrinogênio no tempo de trombina, os fibrinopeptídeos A e B são liberados das cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio. A reptilase coagula o fibrinogênio apenas com a liberação do fibrinopeptídeo A (Funk, 1971). A proteólise do fibrinopeptídeo A a partir do fibrinogênio é suficiente para induzir a formação do coágulo. A liberação do fibrinopeptídeo B aumenta a velocidade de associação dos monômeros de fibrina, mas não o coágulo fisiológico normal (Martinelli, 1980; Nawarawong, 1991). O risco de sangramento está associado apenas a defeitos na liberação do fibrinopeptídeo A, não aos do fibrinopeptídeo B. Portanto, um paciente pode ter um PT e um PTT prolongados em decorrência de um defeito na liberação de fibrinopeptídeo B e não correr risco algum de sangramento. Essa é a razão pela qual são utilizados o tempo de trombina e o de reptilase para avaliar as disfibrinogenemias. Os ensaios que medem o fibrinogênio coagulável mostrarão níveis inferiores aos observados nos ensaios que medem o antígeno do fibrinogênio. A proporção entre a atividade do fibrinogênio coagulável e a do antígeno do fibrinogênio é superior a 95%. Proporções menores sugerem uma disfibrinogenemia. O crioprecipitado é uma boa fonte de fibrinogênio quando a reposição é necessária. Agentes antifibrinolíticos podem reduzir o sangramento associado a procedimentos como extração dentária, mas devem ser evitados nos indivíduos sob risco ou com antecedentes familiares de trombose venosa.

Deficiência do fator II

A deficiência de protrombina pode ser a deficiência hereditária mais rara de um fator da coagulação (1:2.000.000) (Bolton-Maggs, 2004). Uma deficiência verdadeira de protrombina no camundongo é incompatível com a vida após o nascimento. A hipoprotrombinemia (deficiência do tipo I) manifesta-se como uma redução concomitante na atividade da protrombina e nos níveis de antígeno. Os sintomas hemorrágicos incluem sangramento de mucosas, hematomas e hemartrose. A disprotrombinemia (deficiência do tipo II) apresenta-se com atividade reduzida e níveis normais de antígeno. A apresentação clínica da disprotrombinemia é menos previsível e os pacientes podem estar assintomáticos ou ter apenas manifestações hemorrágicas discretas (Bolton-Maggs, 2004). Dependendo da sensibilidade dos reagentes, tanto o PT como o PTT podem estar prolongados na deficiência de protrombina. No entanto, é melhor realizar um ensaio específico na vigência de suspeita clínica ou história familiar positiva diante de testes de triagem normais. Um ensaio para protrombina com reagente para PT em plasma deficiente no fator é mais conveniente. Concentrados com o complexo protrombina são o tratamento de escolha, embora plasma fresco congelado possa servir como fonte alternativa de protrombina.

Deficiência do fator V

A deficiência heterozigota do fator V é assintomática. A deficiência homozigota do fator V é rara (1:1000.000), apresentando-se em crianças que desenvolvem equimoses com facilidade e sangramento de mucosas (Girolami, 1998; Lak, 1999). Tais indivíduos precisam ter alguma quantidade de fator V funcional, porque 50% dos camundongos verdadeiramente sem esse fator morrem na época do desenvolvimento cardiovascular (9 a 11 dias) e a outra metade ao nascimento por hemorragia (Cui, 1996). Podem ocorrer hematomas e hemartrose com lesão, mas raras vezes espontaneamente. Está associada a prolongamento do PTT e do PT (mas a um tempo de trombina normal) e é confirmada por um tempo de protrombina baseado no reagente, o ensaio para o fator V de estágio único. Nos pacientes com deficiência do fator V, também se deve fazer um ensaio para o fator VIII, para avaliar a deficiência combinada de ambos esses fatores (Nichols, 1998; Zhang, 2004). O único produto para reposição disponível é plasma fresco congelado. O objetivo da reposição deve ser elevar pelo menos 15% o nível do fator V (Peyvandi, 1999).

Deficiência do fator X

A deficiência heterozigota do fator X é assintomática. A deficiência homozigota do fator X é um distúrbio hemorrágico grave que se manifesta na infância. Os sintomas incluem sangramento no cordão umbilical, em mucosas, hematomas graves em tecido mole e hemartrose (Peyvandi, 1998a). Ensaios para o fator X baseados no PT de estágio único são suficientes para o diagnóstico, embora haja ensaios comerciais disponíveis. Como no caso de todos os fatores da coagulação dependentes de vitamina K, é importante excluir a deficiência de vitamina K ou outra causa adquirida da deficiência do fator X antes de estabelecer o diagnóstico de uma deficiência hereditária. Por exemplo, a deficiência do fator X é a mais comumente associada a amiloidose primária, ocorrendo em 8,7% dos pacientes (Uprichard, 2002) e provavelmente em função da adsorção do fator X nas fibrilas amiloides. A terapia atual para a deficiência do fator X inclui concentrados do complexo de protrombina, embora o VIIa recombinante tenha sido usado com sucesso para tratar a deficiência de fator X associada à amiloidose (Boggio, 2001).

Deficiência combinada dos fatores V e VIII

É um distúrbio autossômico recessivo raro e resulta de um único defeito genético, não da herança simultânea de defeitos nos genes de ambos os fatores. Os pacientes costumam ter níveis desses fatores entre 5% e 30%. Em dois terços dos pacientes, isso resulta da expressão nula do LMAN1 (antigamente conhecido como ERGIC-53) (Nichols, 1998). O LMAN1 circula entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi e acredita-se que facilite o transporte da proteína através da via de secreção (Zhang, 2003). Outros pacientes têm uma mutação do MCFD2, que interage diretamente com o LMAN1 (Zhang, 2003). As manifestações hemorrágicas incluem epistaxe, equimoses com facilidade, menorragia e hemorragia pós-parto, bem como sangramento após cirurgia, extrações dentárias e traumatismo (Seligsohn, 1982; Peyvandi, 1998b) (Tab. 38.6). Os testes em geral demonstram um prolongamento desproporcional do PTT, em comparação com o PT. A terapia de reposição inclui concentrados de fator VIII e plasma fresco congelado (como fonte do fator V).

Deficiência combinada de fatores da coagulação dependentes de vitamina K

A deficiência combinada de fatores da coagulação dependentes da vitamina K (fatores II, VII, IX e X; DCFVK) ocorre nos casos de deficiência de vitamina K e disfunção hepática, mas também resulta de disfunção hereditária da enzima hepática γ-glutamil carboxilase (tipo I) ou do complexo enzimático epóxido redutase da vitamina K (tipo II) (Brenner, 1998; Zhang, 2004; ver também Cap. 41). Os indivíduos gravemente acometidos podem manifestar, quando neonatos, sangramento do coto umbilical ou hemorragia intracraniana espontânea; na primeira infância ou início da segunda, surgem hemartroses, hematomas em tecido mole ou hemorragias gastrintestinais; na fase adulta, ocorrem equimoses com facilidade, sangramento de mucosas e após cirurgia (Tab. 38.6). O diagnóstico é estabelecido pelo prolongamento do PTT e do PT e reduções associadas nos níveis dos fatores coagulantes dependentes de vitamina K. Esses pacientes podem responder à vitamina K (oral ou parenteral), com normalização do PTT, do PT e dos níveis dos fatores, bem como resolução dos sintomas hemorrágicos. Tal fato determina o diagnóstico de uma anormalidade hereditária difícil, pois outras causas adquiridas de deficiência de vitamina K (doença hemorrágica do recém-nascido, doença hepática e uso prolongado de antibióticos de amplo espectro) ou administração factícia de varfarina poderiam manifestar-se de maneira semelhante. No caso de pacientes que não respondam completamente à administração de vitamina K, pode-se usar plasma fresco congelado para sangramento agudo ou cirúrgico.

PTT normal e PT prolongado

Deficiência do fator VII

A deficiência do fator VII é comum, em comparação às deficiências hereditárias raras de outros fatores da coagulação. As manifestações

hemorrágicas são bastante variáveis, com relatos constantes de epistaxe, menorragia e sangramento de mucosas (Peyvandi, 1997) (Tab. 38.6). A deficiência grave do fator VII é autossômica recessiva, em geral manifesta-se logo após o nascimento e pode ter uma apresentação dramática, com hemorragia intracraniana em 15 a 60% dos casos (Ragni, 1981). Suspeita-se do diagnóstico ante um prolongamento isolado do PT, mas o nível do fator VII, um fator da coagulação dependente de vitamina K, é baixo em recém-nascidos e também pode estar baixo na deficiência de vitamina K. Portanto, a reavaliação de lactentes com deficiências leves é necessária depois de alguns meses de vida ou após a reposição de vitamina K em pacientes com mais idade. A atividade funcional do fator VII é medida por um ensaio da coagulação com plasma deficiente em fator VII, baseado no PT. O uso de tromboplastina recombinante humana pode dar resultados que mais provavelmente refletem os níveis *in vivo* do fator VII. As amostras para testes do fator VII também não devem ser armazenadas a 4°C, pois isso pode ocasionar ativação a frio do fator VII como resultado da inativação do inibidor C1 e da formação de fator XIIa no tubo com ativação do fator VII (Kitchen, 1992). A ativação a frio do fator VII resulta em uma hiperestimativa do nível plasmático real do fator VII. As opções terapêuticas incluem plasma fresco congelado, concentrados de complexos de protrombina e fator VIIa recombinante. Para cirurgia de grande porte, são suficientes níveis de fator VII de pelo menos 20% (Bolton-Maggs, 2004).

Embora a deficiência do fator VII seja o exemplo clássico de uma entidade que dará PT prolongado e PTT normal, em certas circunstâncias, especialmente quando se usa tromboplastina recombinante humana, defeitos discretos na via comum das proteínas podem manifestar-se por anormalidades apenas leves do PT. Mais comumente, os defeitos serão disfibrinogenemias, mas deficiências discretas ou inibidores dos fatores X, V e II podem apresentar-se primeiro como defeitos apenas leves do PT.

Além disso, às vezes pode ocorrer um PT prolongado, mas com um PTT normal, quando há deficiência de um fator da via comum como X, V ou II em conjunto com uma elevação acentuada no nível do fator VIII. Nessa situação, o nível elevado do fator VIII pode ser capaz de normalizar um valor de PTT que de outra forma estaria alto por causa da deficiência do fator, mas o fator VIII naturalmente não exerceria efeito comparável sobre o PT.

PTT e PT normais

Deficiência do fator XIII

O fator XIII estabiliza o coágulo após a formação de um coágulo de fibrina. Portanto, o PT e o PTT continuam normais mesmo com uma deficiência grave do fator VIII. Os testes para deficiência do fator XIII estão indicados com história de sangramento positiva, em particular aspectos como sangramento tardio, no coto umbilical ou abortos, em que o PT e o PTT estão normais (Anwar, 1999) (Tab. 38.6). Dos pacientes com deficiência grave do fator XIII, 30% morrem na meia-idade em decorrência de hemorragia intracerebral espontânea, a menos que estejam recebendo terapia profilática (Lorand, 1980). O diagnóstico da deficiência grave do fator XIII (atividade <5%) pode ser confirmado pelo teste da estabilidade do coágulo de ureia 5 M ou um ensaio cromogênico. Os coágulos formados com atividade normal do fator XIII permanecem estáveis em ureia 5 M, enquanto os de pacientes com deficiência do fator XIII dissolvem-se na ureia. A razão disso é que o fator XIIIa inicia a formação de uma nova ponte intermolecular de γ-glutamil-ε-lisina entre as moléculas de fibrina (Lorand, 1980). Essa nova interação aumenta a rigidez mecânica da estrutura do coágulo e sua resistência à lise. Há ensaios para a atividade quantitativa baseados na ligação cruzada do éster glicina-etil em um peptídeo específico (Fickenscher, 1991) ou na incorporação de um substrato amina no fibrinogênio (Kohler, 1998). Ambos os ensaios empregam a ativação do fator XIII pela trombina. A deficiência adquirida do fator XIII foi descrita em uma variedade de doenças, inclusive a púrpura de Henoch-Schönlein, o tratamento com isoniazida para tuberculose, várias formas de colite, gastrite erosiva e algumas formas de leucemia (Board, 1993), embora a determinação do nível do fator XIII e o tratamento terapêutico sejam controversos. Como a meia-vida do fator XIII é muito longa, a reposição com plasma fresco congelado em geral é suficiente para a maioria dos pacientes. Concentrados de fator XIII e fator XIII recombinante estão sendo avaliados atualmente em ensaios clínicos.

Distúrbios hemorrágicos hereditários da fibrinólise

Os distúrbios hemorrágicos hereditários resultantes de fibrinólise são raros. Foi relatada uma deficiência de α_2-antiplasmina em poucas famílias com tendência hemorrágica (Fay, 1992; Aoki, 1980). Embora não recomendado para uso rotineiro como ensaio de triagem, o tempo de lise do coágulo em sangue total pode ser útil como um primeiro teste para detectar deficiências de α_2-antiplasmina. Em suma, deixa-se o sangue total coagular, registrando-se o tempo de lise do coágulo. Em indivíduos normais, a presença de α_2-antiplasmina impede efetivamente essa lise *in vitro*, mesmo 24 horas após a formação inicial do coágulo. Em contraste, na presença de uma deficiência grave de α_2-antiplasmina ou em alguns estados fibrinolíticos, pode-se observar lise do coágulo várias horas depois. Em tais circunstâncias, deve-se fazer o acompanhamento com testes específicos para a atividade da α_2-antiplasmina. A deficiência adquirida de α_2-antiplasmina é comum na leucemia aguda (Okajima, 1994; Schwartz, 1986). O plasma também pode ser misturado com ácido diluído para precipitar uma fração relativamente rica em ativador do plasminogênio, plasminogênio e fibrinogênio, mas relativamente pobre em antiplasminas. Essa fração "euglobina" pode ser redissolvida subsequentemente em tampão e coagulada por recalcificação, medindo-se então o tempo de lise do coágulo. Tal *lise do coágulo de euglobina* normalmente se completa em 2 a 4 horas, mas pode ser encurtada com o aumento da fibrinólise, em particular em associação à maior atividade do ativador do plasminogênio. É evidente que o ativador do plasminogênio, seu inibidor e o próprio plasminogênio também podem ser quantificados individualmente.

Deficiências adquiridas de proteínas da coagulação

Os distúrbios hemorrágicos adquiridos ocorrem por causa da anticoagulação, coagulação intravascular disseminada, doença hepática, deficiência de vitamina K, transfusão maciça e inibidores únicos das proteínas da coagulação. O tópico sobre anticoagulante é abordado no Capítulo 41 e não será comentado aqui. Em geral, o surgimento de PT e PTT prolongados em um paciente deve fazer parte de um diagnóstico diferencial, como discutido na seção a seguir sobre anticoagulantes, CID, doença hepática, deficiência de vitamina K e transfusão maciça. Só após esses estados clínicos serem excluídos é que o patologista deve pensar em defeitos específicos nas proteínas que possam estar influenciando o PT e o PTT.

Coagulação intravascular disseminada

A CID é uma condição clinicopatológica em que há ativação dos sistemas da coagulação e da fibrinólise, resultando na formação simultânea de trombina e plasmina com consumo de fatores da coagulação e inibidores do sistema que resultam no fenótipo clínico laboratorial de um PT e um PTT prolongados e trombocitopenia. Surge em pacientes por causa da sepse, malignidade, complicações obstétricas ou lesão tecidual maciça (Schmaier, 1991). A CID pode aparecer durante cirurgia, como resultado da liberação de material tromboplástico no tecido. Nas operações com parada circulatória no arco da aorta ou nas artérias pulmonares principais, a CID é uma complicação frequente em razão de resfriamento do paciente e destruição do tecido. Placenta abrupta e placenta prévia estão associadas a CID hemorrágica aguda, enquanto a retenção de um feto morto está associada a CID não hemorrágica, mas trombótica. A CID decorrente de sepse também pode ocorrer no período pós-operatório. A CID com sepse é observada mais comumente em infecções por Gram-negativos e no paciente imunossuprimido com fungemia. O equilíbrio entre a formação de trombina e plasmina em cada paciente traduz-se clinicamente em um estado pró-trombótico *versus* hemorrágico, respectivamente.

O diagnóstico de CID depende dos resultados dos testes clínicos apropriados no contexto clínico correto. O achado de PT e PTT prolongados com contagem de redução do fibrinogênio e da contagem de plaquetas em geral indica CID no paciente hospitalizado, até prova em contrário (Colman, 1972). É mais provável que esse fenótipo clínico laboratorial de CID resulte de um estado hipofibrinolítico e é a forma de CID mais comumente reconhecida. Um estado pró-trombótico como resultado de CID em geral está associado a PT e PTT normais com contagem de plaquetas discretamente reduzida e fibrinogênio normal ou elevado. O diagnóstico de CID é feito por um teste confirmatório que mostre a pre-

sença simultânea de formação de trombina e plasmina. Atualmente, o ensaio com dímero D é o teste confirmatório que, se positivo, mostra que houve formação de trombina e plasmina. Esse teste mede a fibrina insensível, de ligação cruzada, clivada pela plasmina, que originalmente surge da clivagem do fibrinogênio pela trombina (Figs. 38.3 e 38.5B). Os ensaios com dímero D são característicos para CID, mas não patognomônicos, e podem ser positivos em indivíduos com trombose de grande vaso em resolução e hematomas de tecido mole. No passado, os produtos da degradação da fibrina (PDF) eram usados para se reconhecer a CID (Fig. 38.5A), mas eles indicam apenas o fibrinogênio clivado pela plasmina, fibrina solúvel ou fibrina insolúvel. Sua presença não indica a fibrina insolúvel de ligação cruzada clivada pela plasmina. O monômero de fibrina é uma proteína de grande massa molecular de fibrinogênio que permanece após a liberação dos fibrinopeptídeos A e B, podendo estar elevado na CID, mas, se esta for grave, pode estar ausente. Portanto, não é um ensaio confiável para detectar esse distúrbio.

Doença hepática

É importante reconhecer a doença hepática nos pacientes porque, conforme discutido no Capítulo 19, a maioria dos fatores da coagulação é sintetizada no fígado. Assim, pacientes com problemas hepáticos correm maior risco de sangramento. Os pacientes com doença hepática grave terão PT e PTT prolongados. Não só a síntese dessas proteínas fica reduzida, como também às vezes são anormais, funcionando como inibidores da coagulação normal. Por exemplo, fibrinogênios anormais (disfibrinogenemias) são muito comuns em pacientes com doença hepática. Conforme já foi dito, se houver defeitos na liberação de fibrinopeptídeos A ou B dessas proteínas, o tempo de trombina será anormal; o tempo de reptilase será anormal com defeitos na liberação apenas do fibrinopeptídeo A. Em termos gerais, é possível haver fibrinogênios anormais quando há uma proporção anormal entre fibrinogênio coagulável (uma medida de sua atividade) e antígeno do fibrinogênio (medido por imunodifusão radial ou outro imunoensaio). O achado de menos atividade com relação à massa é característico de uma molécula anormal. De forma semelhante, todas as proteínas dependentes da vitamina K (fatores II, VII, IX e X, proteínas C, S e Z) diminuem na doença hepática. Essas proteínas podem ter reações de γ-carboxilação anormais dos resíduos de ácido glutâmico na sua porção amino terminal, reduzindo assim a atividade do fator, com níveis relativamente altos do antígeno daquele fator (ver seção seguinte). Em geral, a pré-calicreína é uma das primeiras proteínas cujos níveis diminuem na vigência de doença hepática. Os fatores VIII e V tornam-se ausentes no estágio anepático do transplante de fígado, mas o fator VIII está elevado em pacientes com doença inflamatória hepatocelular. Além disso, a antitrombina e outros inibidores plasmáticos da proteína serpina também diminuem na doença hepática. Portanto, esses pacientes têm pró-coagulantes e anticoagulantes reduzidos, ajustando sua linha basal da hemostasia em outro nível que não foi observado em indivíduos normais.

Deficiência de vitamina K

A vitamina K, uma vitamina lipossolúvel, é fornecida pela ingestão dietética de vegetais folhosos verdes e pela síntese da microbiota intestinal. Na medicina clínica, a deficiência de vitamina K é observada principalmente em pacientes muito enfermos que estejam recebendo antibióticos e nutrição parenteral. Não é frequente a suplementação dessa vitamina nos líquidos intravenosos. Após 4 a 6 semanas de nutrição parenteral e tratamento com antibióticos, o paciente apresenta deficiência de vitamina K, que também pode ser observada naqueles com desvio anatômico do intestino delgado, má absorção, obstrução do trato biliar e, raramente, consumo dietético reduzido. Por exemplo, alcoólicos costumam ter deficiência de vitamina K. A varfarina também inibe a via enzimática necessária para a utilização dessa vitamina (ver Fig. 41.1 no Cap. 41). A vitamina K tem um papel crítico na reação de γ-carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico, do ácido γ-carboxiglutâmico, das chamadas proteínas da coagulação dependentes de vitamina K, fatores II, VII, IX e X, e das proteínas C, S e Z. Essa reação em certos aminoácidos no amino terminal dessas proteínas é crítica para essas proteínas ligarem-se a células e fosfolipídeos, para que possam participar das reações fisiológicas da coagulação. Portanto, esses pacientes terão níveis reduzidos de fator coagulável no caso dos fatores dependentes de vitamina K, ou seja, os fatores II, VII, IX e X. Se os níveis de antígenos desses pacientes forem medidos, estarão elevados. Em geral, os pacientes com um nível terapêutico de varfarina (i. e., INR entre 2 e 3), têm cerca de 5 a 15% de atividade coagulável, enquanto seus níveis de antígeno são de 25 a 40%. Conforme explicado no Capítulo 41, o índice de normalização internacional (INR, do inglês *international normalization rate*) é uma convenção que a comunidade da patologia clínica especializada em coagulação adotou para poder interpretar os tempos de protrombina de pacientes anticoagulados com varfarina. Como há muitos reagentes disponíveis no comércio e equipamento para fazer esses ensaios, o INR foi desenvolvido (Loeliger, 1985). O INR é a proporção: (PT do paciente/valor médio do PT normal da instituição)^{ISI}. O valor do ISI para um reagente é uma medida da responsividade de dada tromboplastina à redução de fatores da coagulação dependentes de vitamina K, sendo fornecido pelos fabricantes com base no grau de variação da tromboplastina de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS), que foi estabelecido como sendo de 1, conforme determinado pelo logaritmo de um PT por segundo determinado com o padrão da OMS (z) e x sendo o logaritmo do PT em segundos determinado com a preparação de teste de acordo com a equação $z = a_1 + b_1x$ (ver o significado de a_1 e b_1 em Pollar, 1991). Caso se use tromboplastina recombinante humana, o valor do ISI será de cerca de 1. Quanto mais alto o valor do ISI, menos sensível a tromboplastina. Em geral, a terapia de reposição de vitamina K é feita por via oral, mas se necessário pode ser feita por via parenteral, preferindo-se intramuscular (IM) à intravenosa (IV) pela maior segurança de administração.

Transfusão maciça

A transfusão maciça foi definida como a reposição de mais de 1,5 volume de sangue em 24 horas. Por exemplo, em um homem com 70 kg de peso, 7% do peso corporal ou 4,9 kg ou litros correspondem ao seu volume sanguíneo (~10 unidades). A falha hemostática pode resultar da diluição de fatores da coagulação, de CID ou disfunção plaquetária adquirida. A coagulopatia dilucional resulta da reposição com concentrado de hemácias e solução fisiológica normal na ausência de fatores da coagulação ou plaquetas. Os testes para hemostasia costumam mostrar prolongamento do PT e do PTT, redução do fibrinogênio e trombocitopenia (Leslie, 1991).

No passado, foram feitas tentativas para evitar esse problema juntando-se 1 unidade de plasma fresco congelado a cada 4 a 6 unidades de hemácias transfundidas. Contudo, tal estratégia nem sempre corrige todos os defeitos hemostáticos e pode esgotar os estoques de sangue. É importante lembrar que, com 1,5 volume de transfusão sanguínea, o paciente terá recebido 10% de anticoagulante. Em um indivíduo com 70 kg, a quantidade circulante de anticoagulante pode ser de 735 mL. Alguma forma de infusão de cálcio é útil para neutralizar o anticoagulante citrato circulante. As recomendações atuais sugerem não usar plasma fresco congelado e plaquetas profilaticamente em pacientes que recebam transfusões maciças. No entanto, o sangramento associado a prolongamento laboratorial do PT e do PTT além de 1,5 vez deve significar em primeiro lugar transfusão imediata com crioprecipitado para aumentar os níveis de fibrinogênio acima de 80 a 100 mg/dL. Se o sangramento persistir, deve-se fazer transfusão de plasma fresco congelado ou plaquetas caso haja trombocitopenia significativa.

Inibidores de proteínas da coagulação adquiridos

Inibidores adquiridos de proteínas da coagulação ocorrem e, em alguns casos, aumentam o risco de sangramento. O fenótipo clínico laboratorial desses pacientes depende da proteína para a qual o inibidor de proteína da coagulação está direcionado. O inibidor adquirido de proteína da coagulação mais grave é aquele contra o fator VIII. Esses pacientes apresentam hemorragia e PTT prolongado. Esse tipo inibidor é característico em pacientes idosos, com malignidades da célula B, com distúrbios do tecido conjuntivo como lúpus eritematoso sistêmico e no pós-parto. Tais pacientes são tratados com terapia de reposição aguda (fator VIII em alta dose, concentrados de fator da coagulação ativado pela vitamina K, ou rVIIa), mas a longo prazo o tratamento é imunossupressão com citoxano, prednisona ou rituximabe (Lian, 1989; Aggarwal, 2005). As decisões quanto ao tratamento desses pacientes são influenciadas pela gravidade do sangramento e pelo título do inibidor do fator VIII, conforme determinado pelo ensaio de Bethesda.

Também são observadas deficiências ou inibidores adquiridos em várias condições clínicas. A amiloidose sistêmica está associada a reduções plasmáticas de fator X ou IX como resultado de adsorção das proteínas da coagulação sobre a proteína amiloide (McPherson, 1977; Furie, 1981; Mumford, 2000). No primeiro caso, o PT e o PTT podem ser afetados, mas no último apenas o PTT. Os estados hipergamaglobulinêmicos vistos com mieloma múltiplo ou na macroglobulinemia de Waldenström (imunoglobulina M) podem estar associados a pan-inibidores da função de proteínas da coagulação (Glaspy, 1992). Disfibrinogenemias também são comuns nesses pacientes. Esses fenômenos são reconhecidos quando são feitos ensaios específicos para o fator contra uma ou mais proteínas afetadas em diluições múltiplas do plasma do paciente. Em geral, como o ensaio para o fator é feito em diluições menores (p. ex., 50%, 25% e 10% de plasma normal), o grau de inibição do fator da coagulação diminui, sugerindo que, conforme se dilui o plasma, o efeito do inibidor se perde.

O último tipo de inibidor encontrado é o anticoagulante lúpico ou anticorpo antifosfolipídeo, que influencia as reações das proteínas da coagulação. Tais inibidores são descritos em detalhes no Capítulo 40. Em suma, são anticorpos direcionados para epítopos de proteínas ligadas a fosfolipídeos. Na verdade, os anticorpos são proteínas e a influência sobre os fosfolipídeos pode ser ácida (fosfatidilserina, fosfatidilcolina) ou neutra (fosfatidiletanolamina) (Lafer, 1981; Levine, 2002). O anticoagulante lúpico interfere de forma variável no PTT e no PT. O grau de interferência depende da natureza do reagente comercial. É característico um anticoagulante lúpico ter maior efeito sobre um ensaio da coagulação, pois os reagentes no ensaio são diluídos fora. Por exemplo, o grau de prolongamento de um PT ou PTT em uma amostra de plasma será maior em uma diluição de 1:50 e 1:500 do reagente do ensaio em um paciente com um anticoagulante lúpico do que em um paciente com um inibidor específico de uma proteína da coagulação. No último caso, o nível do inibidor só irá mudar quando se diluir o plasma do paciente, não o reagente para ensaio. Foram desenvolvidos critérios específicos para reconhecer anticoagulantes lúpicos (Brandt, 1995a; Levine, 2002). Em geral, os ensaios com alguma diluição do reagente coagulante (PT diluído ou ensaio de inibição da tromboplastina tecidual, PTT diluído, tempo do veneno da víbora de Russell diluído (TVVRD), tempo de coagulação do caolim) são úteis mas não especificamente diagnósticos da condição (Levine, 2002). Paradoxalmente, esses pacientes não correm risco de apresentar sangramento, mas sim trombose, que às vezes pode ser um estado pró-trombótico vicioso (Mueh, 1980, Rand, 2003). Os anticorpos antifosfolipídeo interferem em vários mecanismos da anticoagulação, como a anexina V, estimulando assim a produção de protrombinase e prostaciclina nas células endoteliais, tópico discutido em maiores detalhes no Capítulo 40.

Referências bibliográficas

Abshire T, Kenet G: Recombinant factor VIIa: review of efficacy, dosing regimens and safety in patients with congenital and acquired factor VIII or IX inhibitors. J Thromb Haemost 2004; 2:899–909.

Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA: Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. Am J Clin Pathol 1997; 107:105–110.

Artigo importante que justifica o uso do citrato de sódio a 3,3 g% como padrão de anticoagulação para coleta de amostras destinadas ao teste de coagulação clínico.

Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA: Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing; dependence on citrate concentration. Am J Clin Pathol 1998; 109:595–599.

Aggarwal A, Grewal R, Green RJ, et al: Rituximab for autoimmune haemophilia: a proposed treatment algorithm. Haemophilia 2005; 11:13–19.

Ahmad SS, Scandura JM, Walsh PN: Structural and functional characterization of platelet receptor-mediated factor VIII binding. J Biol Chem 2000; 275:13071–13081.

Andrew M, Vegh P, Johnston M, et al: Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood 1992; 80:1998–2005.

Anwar R, Miloszewski KJ: Factor XIII deficiency. Br J Haematol 1999; 107:468–484.

Aoki N, Sakata Y, Matsuda M, Tateno K: Fibrinolytic states in a patient with congenital deficiency of alpha 2-plasmin inhibitor. Blood 1980; 55:483–488.

Arun B, Kessler CM: Clinical manifestations and therapy of the hemophilias. *In* Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al (eds): Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4th edition. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 2001.

Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U: Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. N Engl J Med 1991; 325:153–158.

Barnathan ES, Kuo A, van der Keyl H, et al: Binding of tissue type plasminogen activator to human endothelial cells: evidence for two distinct binding sites. J Biol Chem 1988; 263:7792–7799.

Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJ: Factor XIII: inherited and acquired deficiency. Blood Rev 1993; 7:229–242.

Boggio L, Green D: Recombinant human factor VIIa in the management of amyloid-associated factor X deficiency. Br J Haematol 2001; 112:1074–1075.

Bolton-Maggs PH, Young Wan-Yin B, McCraw AH, et al: Inheritance and bleeding in factor XI deficiency. Br J Haematol 1988; 69:521–528.

Bolton-Maggs PH, Patterson DA, Wensley RT, Tuddenham EG: Definition of the bleeding tendency in factor XI-deficient kindreds – a clinical and laboratory study. Thromb Haemost 1995; 73:194–202.

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, et al: The rare coagulation disorders – review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. Haemophilia 2004; 10:593–628.

Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I: Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant: an update. Thromb Haemost 1995a; 74:1185–1190.

Artigo importante que começa a definir os critérios para estabelecer o diagnóstico de um anticoagulante lúpico.

Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the secondary international workshop for identification of lupus anticoagulants. Thromb Haemost 1995b; 74:1597–1603.

Brenner B, Laor A, Lupo H, et al: Bleeding predictors in factor-XI-deficient patients. Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8:511–515.

Brenner B, Sanchez-Vega B, Wu SM, et al: A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. Blood 1998; 92:4554–4559.

Broze GJ Jr: The rediscovery and isolation of TFPI. J Thromb Haemost 2003; 1:1671–1675.

Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA: An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin
II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. J Biol Chem 1994; 269:21198–21203.

Chafa O, Chellali T, Sternberg C, et al: Severe hypofibrinogenemia associated with bilateral ischemic necrosis of toes and fingers. Blood Coagul Fibrinolysis 1995; 6:549–552.

Chang SH, Tillema V, Scherr D: A percent correction formula for evaluation of mixing studies. Am J Clin Pathol 2002; 117:62–73.

Artigo importante que começa a fornecer informações de medicina laboratorial baseada em evidências sobre como podem ser conduzidos os estudos de mistura de triagem.

Colman RW, Robboy SJ, Minna JD: Disseminated intravascular coagulation (DIC): an approach. Am J Med 1972; 52:679–689.

Colman RW, Bagdasarian A, Talarnos RC, et al: Williams trait. Human kininogen deficiency with diminished levels of plasminogen proactivator and prekallikrein associated with abnormalities of the Hageman factor-dependent pathways. J Clin Invest 1975; 56: 1650–1662.

Colman RW: Contributions of Mayme Williams t
o the elucidation of the multiple functions of plasma kininogens. Thromb Haemost 1992; 68:99–101.

Crossley M, Ludwi M, Stowell KM, et al: Recovery from hemophilia B Leyden: an androgen-responsive element in the factor IX promoter. Science 1992; 257:377–379.

Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, et al: Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. Nature 1996; 384:66–68.

Doolittle RF: Fibrinogen and fibrin. Sci Am 1981; 245:126–135.

Dupuy E, Soria C, Molho P, et al: Embolized ischemic lesions of toes in an afibrinogenemic patient: possible relevance to in vivo circulating thrombin. Thromb Res 2001; 102:211–219.

Esmon CT, Owen WG: Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalytic activation of protein C. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:2249–2252.

Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, et al: Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation. N Engl J Med 1992; 327:1729–1733.

Fickenscher K, Aab A, Stuber W: A photometric assay for blood coagulation factor XIII. Thromb Haemost 1991; 65:535–540.

Fishman DJ, Jones PK, Menitove JE, et al: Detection of the carrier state for classic hemophilia using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Blood 1982; 59:1163–1168.

Fried K, Kaufman S: Congenital afibrinogenemia in 10 offspring of uncle–niece marriages. Clin Genet 1980; 17:223–227.

Funk C, Gmür J, Herold R, Straub PW. Reptilase®-R – A new reagent in blood coagulation. Br J Haematol 1971; 21:43–52.

Furie B, Voo L, McAdam KP, *et al.* Mechanism of factor X deficiency in systemic amyloidosis. N Engl J Med 1981; 304:827–830.

Gailiani D, Broze G: Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. Science 1991; 253:909–912.

Artigo clássico que apresenta, pela primeira vez, uma visão moderna sobre montagem e interação das proteínas do sistema de coagulação.

Girolami A, Simioni P, Scarano L, et al: Hemorrhagic and thrombotic disorders due to factor V deficiencies and abnormalities: an updated classification. Blood Rev 1998; 12:5–51.

Glaspy JA: Hemostatic abnormalities in multiple myeloma and related disorders. Hematol Oncol Clin North Am 1992; 6:1301–1314.

Goodwin TM: Congenital hypofibrinogenemia in pregnancy. Obstet Gynecol Surv 1989; 44:157–161.

Graham JB: Genotype assignment (carrier detection) in the haemophilias. Clin Haematol 1979; 8:115–145.

Graham JB, Rizza CR, Chediak J, *et al*: Carrier detection in hemophilia A: a cooperative international study. I. The carrier phenotype. Blood 1986; 67:1554–1559.

Green PP, Mannucci PM, Briet E, *et al:* Carrier detection in hemophilia A: a cooperative international study. II. The efficacy of a universal discriminant. Blood 1986; 67:1560–1567.

Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, *et al*: Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. J Clin Invest 2002; 109:1057–1063.

Hanss M, Biot F: A database for human fibrinogen variants. Ann N Y Acad Sci 2001; 936:89–90.

Hasan AAK, Warnock M, Nieman M, et al: The mechanisms of Arg-Pro-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285:H183–H193.

He L, Pappan LK, Grenache DG, et al: The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. Blood 2003; 102:3652–3657.

Hong SL: Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical cord vein. Thromb Res 1980; 18:787–795.

Kasper CK, Aledort L, Counts RB, et al: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. Thromb Diathes Haemorrh 1975; 34:869–872.

Kaufman RJ, Antonarakis SE, Fay PJ: Factor VIII and hemophilia A. *In* Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al (eds): Hemostasis and Thrombosis, 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001, pp 135–156.

Kessler CM, Hoyer L, Feinstein DI: The hemophilias.

In. McArthur JR, Schechter GP (eds): Hematology. The Educational Program of the American Society of Hematology. Washington, DC, American Society of Hematology, 1996, pp 95–105.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE: A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. Thromb Haemost 1992; 68:301–305.

Kobayashi T, Kanayama N, Tokunaga N, et al: Prenatal and peripartum management of congenital afibrinogenaemia. Br J Haematol 2000; 109:364–366.

Kohler HP, Ariens RA, Whitaker P, Grant PJ: A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. Thromb Haemost 1998; 80:704.

Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski C Jr, Mudd D, Furie B, Furie B, et al: Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. J Exp Med 1981; 153:897–909.

Lak M, Keihani M, Elahi F, et al: Bleeding and thrombosis in 55 patients with inherited afibrinogenaemia. Br J Haematol 1999; 107:204–206.

Lakich D, Kazazian H, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversion disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe hemophilia A. Nat Gen 1993; 5:236–241.

Lawrie AS, Kitchen S, Purdy G, et al: Assessment of Actin FS and Actin FSL sensitivity to specific clotting factor deficiencies. Clin Lab Haematol 1998; 20:179–186.

Leiba H, Ramot B, Many A: Heredity and coagulation studies in ten families with Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency. Br J Haematol 1965; 11:654–665.

Leslie SD, Toy PT. Laboratory hemostatic abnormalities in massively transfused patients given red blood cells and crystalloid. Am J Clin Pathol 1991; 96:770–773.

Levine JS, Branch W, Rauch J: The antiphospholipid syndrome. N Engl J Med 2002; 346:752–763.

Artigo importante que apresenta os critérios para diagnóstico de anticoagulantes lúpicos e da síndrome do anticorpo antifosfolipídeo.

Lian EC, Larcada AF, Chiu A Y-Z : Combination immunosuppressive therapy after factor VIII infusion for acquired factor VIII inhibitor. Ann Intern Med 1989; 110:774–778.

Loeliger EA: ICSH/ICTH recommendation for reporting prothrombin time in oral anticoagulation control. Thromb Haemost 1985; 53:155–156.

Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJM: Human factor XIII: fibrin-stabilizing factor. In: Spaet TH (ed): Progress in Hemostasis and Thrombosis, 1980; 5:245–29.

Ljung RCR: Prenatal diagnosis of haemophila. Haemophilia 1999; 5:84–87.

MacFarland, D: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its functions as a biochemical amplifier. Nature 1964; 202:498–499.

McPherson RA, Onstad JW, Ugoretz RJ *et al.* Coagulopathy in amyloidosis: combined deficiency of factors IX and X. Am J Hematol 1977; 3:225–235.

Mahdi F, Van Nostrand, WE, Schmaier AH. Protease nexin-2/amyloid β-protein precursor inhibits factor Xa in the prothrombinase complex. J Biol Chem 1995; 270:23468–23474.

Mahdi F, Rehemtulla A, Van Nostrand WE, et al. Protease nexin-2/amyloid β-protein precursor regulates factor VIIa and the factor VIIa–tissue factor complex. Thrombosis Res 2000; 99:267–276.

Mahdi F, Shariat-Madar Z, Schmaier AH: The relative priority of prekallikrein and factors XI/XIa assembly on cultured endothelial cells. J Biol Chem 2003; 278:43983–43990.

Mann KG. Thrombin formation. Chest 2003; 124:4S–10S.

Mannucci PM, Duga S, Peyvandi F: Recessively inherited coagulation disorders. Blood 2004; 104:1243–1252.

Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD: Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to endothelium. J Clin Invest 1984; 74:341–350.

Marder VJ, Budzynski AZ: Degradation products of fibrinogen and cross-linked fibrin-projected clinical applications. Thromb Diath Haemorrh 1974; 32:49–56.

Marder VJ, Budzynski AZ, Barlow GH: Comparison of the physio-chemical properties of fragment D derivatives of fibrinogen and fragment D-D of cross-linked fibrin. Biochim Biophys Acta 1976; 427:1–14.

Artigo clássico que descreveu o que é um D-dímero.

Martinelli RA, Scheraga HA: Steady state kinetic study of the bovine thrombin-fribrinogen interaction. Biochemistry 1980; 19:2343–2350.

Meijers JCM, Tekelenburg WL, Bouma BN, *et al*: High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. N Engl J Med 2000; 342:696–701.

Miletich JP, Majerus DW, Majerus PW: Patients with congenital factor V deficiency have decreased factor Xa binding sites on their platelets. J Clin Invest 1978; 62:824–831.

Miller G, Silberberg M, Kaplan AP: Autoactivability of human Hageman factor. Biochem Biophys Res Commun 1980; 92:803–810.

Motta G, Rojkjaer R, Hasan AAK *et al*: High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: A novel mechanism for contact activation. Blood 1998; 91:516–528.

Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI: Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. Ann Intern Med 1980; 92:156–159.

Mumford AD, O'Donnell J, Gillmore JD, et al: Bleeding symptoms and coagulation abnormalities in 337 patients with AL-amyloidosis. Br J Haematol 2000; 110:454–460.

Nawarawong W, Wyshock E, Meloni FJ, Weitz J, Schmaier AH: The rate of fibrinopeptide B release modulates the rate of clot formation: a study with an acquired inhibitor to fibrinopeptide B release. Br J Haematol 1991; 79:296–301.

Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F: Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. Lancet 1992; 340:1066–1067.

Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, et al: Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. Cell 1998; 93:61–70.

Okajima K, Kohno I, Soe G, *et al*: Direct evidence for systemic fibrinogenolysis in patients with acquired alpha-2-plasmin inhibitor deficiency. Am J Hematol 1994; 45:16–24.

Osterud B, and Rappaport SI: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:5260–5264.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987; 327:524–526.

Peyvandi F, Mannucci PM, Asti D, et al: Clinical manifestations in 28 Italian and Iranian patients with severe factor VII deficiency. Haemophilia 1997; 3:242–246.

Peyvandi F, Mannucci PM, Lak M, et al: Congenital factor X deficiency: spectrum of bleeding symptoms in 32 Iranian patients. Br J Haematol 1998a; 102:626–628.

Peyvandi F, Tuddenham EG, Akhtari AM, et al: Bleeding symptoms in 27 Iranian patients with the combined deficiency of factor V and factor VIII. Br J Haematol 1998b; 100:773–776.

Peyvandi F, and Mannucci PM: Rare coagulation disorders. Thromb Haemost 1999; 82:1207–1214.

Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, et al: Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. J Clin Invest 2002; 109:1031–1040.

Pollar L: Oral anticoagulation. *In* Kopke JA (ed): Practical Laboratory Hematology. New York, Churchill Livingstone, 1991.

Excelente descrição do que é um INR e do modo como os valores ISI são calculados para os reagentes da tromboplastina.

Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. Am J Clin Pathol 1961; 36:212–219.

Descrição do APTT.

Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. Am J Med Sci 1935; 190:501–511.

Descrição do tempo de protrombina.

Ragni MV, Lewis JH, Spero JA, Hasiba U: Factor VII deficiency. Am J Hematol 1981; 10:79–88.

Rand MD, Lock JB, van't Veer C, et al: Blood clotting in minimally altered whole blood. Blood 1996; 88:3432–3445.

Rand JH: Antiphospholipid syndrome and lupus anticoagulants. *In* Loscalzo J, Schafer AI (eds): Thrombosis and Hemorrhage. Philadelphia, PA, Lippincott, Williams & Wilkins, 2003.

Ratnoff OD, Margolius Jr. A: Hageman trait: an asymptomatic disorder of blood coagulation. Trans Assoc Am Physicians 1955; 68:149–153.

Ratnoff OD, Davies E: Waterfall sequence for intrinsic blood coagulation. Science 1964; 145:1310–1312.

Ratnoff OD, Busse RJ, and Sheon RP: Medical intelligence: the demise of John Hageman. N Engl J Med 1968; 279:760–761.

Reitsma PH: Genetic principles underlying disorders of procoagulation and anticoagulation proteins. *In* Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al (eds): Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4th edition. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 2001.

Roberts HR, Monroe DM III, Hoffman M: Safety profile of recombinant factor VIIa. Semin Hematol 2004; 41:101–108.

Rojkjaer R, Hasan AAK, Motta G, et al: Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells. Thromb Haemost 1998; 80:74–81.

Saito H, Ratnoff OD, Waldmann R, Abraham JP: Fitzgerald trait: deficiency of a hitherto unrecognized agent, Fitzgerald factor, participating in surface mediated reactions of clotting, fibrinolysis, generation of kinins, and the property of diluted plasma enhancing vascular permeability. J Clin Invest 1975; 55:1082–1089.

Salomon O, Zivelin A, Livnat T, et al: Prevalence, causes, and characterization of factor XI inhibitors in patients with inherited factor XI deficiency. Blood 2003; 101:4783–4788.

Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, et al: Expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. J Biol Chem 1988; 263:16327–16333.

Schmaier AH. Disseminated intravascular coagulation – pathogenesis and management. J Intens Care Med 1991; 6:209–228.

Schmaier AH, Dahl LD, Rozemuller AJM, et al: Protease nexin-2/amyloid β-protein precursor: A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. J Clin Invest 1993; 92:2540–2545.

Schmaier AH, Dahl LD, Hasan AAK, et al: Factor IXa inhibition by protease nexin-2/amyloid β-protein precursor on phospholipid vesicles and cell membranes. Biochemistry 1995; 34:1171–1178.

Schmaier AH: The plasma kallikrein/kinin system counterbalances the renin angiotensin system. J Clin Invest 2002; 109:1007–1009.

Schmaier AH: The kallikrein/kinin and the renin angiotensin systems have a multi-layered interaction. Am J Physiol: Reg Integr Comp Physiol 2003; 285:R1–R13.

Schmaier AH: The physiologic basis of assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system. Thromb Haemost 2004; 91:1–3.

Schneppenheim R, Budde U, Krey S, et al: Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. Thromb Haemost 1996; 76:598–602.

Schwartz BS, Williams EC, Conlan MG, Mosher DF: Epsilon-aminocaproic acid in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia and acquired alpha-2-plasmin inhibitor deficiency. Ann Intern Med 1986; 105:873–877.

Seligsohn U, Zivelin A, Zwang E: Combined factor V and factor VIII deficiency among non-Ashkenazi Jews. N Engl J Med 1982; 307:1191–1195.

Shapiro AD, Paola JD, Cohen A, et al: The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe hemophilia B. Blood 2005; 105:518–525.

Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator. J Biol Chem 2002; 277:17962–17969.

Artigo que identifica um fator ativador fisiológico do sistema da calicreína/cinina – o conhecido sistema de ativação por contato.

Uprichard J, Perry DJ: Factor X deficiency. Blood Rev 2002; 16:97–110.

Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cunningham DD: Protease nexin-II (amyloid β-protein precursor): A platelet α-granule protein. Science 1990; 248:745–748.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al: The Nijmegan modification of the Bethesda assay for FVIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost 1995; 73:247–251.

Artigo que descreve um modo aprimorado de realizar estudos de inibição específicos para o fator VIII.

Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW: Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. J Clin Invest 1977; 60:390–404.

Weuppers KD, Cochrane CG: Plasma prekallikrein: isolation, characterization, and mechanism of action. J Exp Med 1972; 135:1–20.

Wiggins RC, Cochrane CC: The autoactivability of human Hageman factor. J Exp Med 1979; 150:1122–1133.

Zaffran Y, Meyer SC, Negrescu E, et al: Signaling across the platelet adhesion receptor glycoprotein Ib-IX induces $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation both in platelets and a transfected Chinese hamster ovary cell system. J Biol Chem 2000; 275:16779–16787.

Zeitler H, Ulrich-Merzenish G, Hess L *et al*: Treatment of acquired hemophilia by the Bonn-Malmö Protocol: documentation of an in vivo immunomodulating concept. Blood 2005; 105:2287–2293.

Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC, et al: Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. Nat Genet 2003; 34:220–225.

Zhang B, Ginsburg D: Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. J Thromb Haemost 2004; 2:1564–1572.

Zito F, Lowe GDO, Rumley A, et al: WOSCOPS Study Group. Association of the factor XII 46C>T polymorphism with risk of coronary heart disease (CHD) in the WOSCOPS study. Atherosclerosis 2002; 165:153–158.

CAPÍTULO 39

Plaquetas sanguíneas e doença de von Willebrand

Jonathan L. Miller MD PhD, A. Koneti Rao MD

Biologia normal das plaquetas 861
Estrutura das plaquetas 861
Glicoproteínas da membrana das plaquetas 861
Atividades plaquetárias na hemostasia e suas estimativas laboratoriais 862
Distúrbios quantitativos das plaquetas 869
Trombocitopenia 869
Trombocitose 872
Distúrbios de função plaquetária hereditários 872
Distúrbios da adesão plaquetária 873
Distúrbios da agregação plaquetária 873
Distúrbios da secreção e transdução de sinal plaquetárias 874
Defeitos na montagem do citoesqueleto 875
Distúrbios da atividade pró-coagulante das plaquetas 875
Frequências relativas das várias anormalidades congênitas das plaquetas 876
Fator e doença de von Willebrand 876
Biologia do fator de von Willebrand 876
Distúrbios de função plaquetária adquiridos 878
Distúrbios mieloproliferativos 879
Leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas 879
Disproteinemias 879
Uremia 879
Doença do compartimento de armazenamento adquirida 880
Anticorpos antiplaqueta e função plaquetária 880
Fármacos inibidores da função plaquetária 880
Avaliação de pacientes com suspeita de distúrbios plaquetários 881
Terapia para defeitos congênitos da função plaquetária 881
Referências bibliográficas 882

PONTOS-CHAVE

- Plaquetas são células altamente complexas que participam de reações fundamentais para a hemostasia e a trombose, incluindo adesão ao subendotélio, secreção do conteúdo dos grânulos, agregação e fornecimento da superfície da membrana para ativação de fatores da coagulação.
- Anormalidades do número de plaquetas ou da função plaquetária podem ter papel importante no equilíbrio da hemostasia e da trombose.
- Praticamente única para o laboratório clínico e a patologia clínica, a avaliação de patologias plaquetárias pode ser feita em tempo real com células vivas obtidas do paciente.
- O fator de von Willebrand é uma proteína multimérica sintetizada por células endoteliais e megacariócitos que desempenham um papel central nas interações da adesão plaquetária.
- As contagens de plaquetas e a função plaquetária são afetadas por processos autoimunes, uma ampla variedade de fármacos e inúmeros distúrbios adquiridos.

Biologia normal das plaquetas

Estrutura das plaquetas

As plaquetas sanguíneas são células anucleadas altamente complexas, derivadas dos megacariócitos da medula óssea. Um esfregaço sanguíneo bem preparado oferece a oportunidade de avaliar o número de plaquetas, seu tamanho, sua distribuição e sua estrutura à microscopia óptica. Embora anormalidades sutis da estrutura das plaquetas em geral requeiram análise à microscopia eletrônica, a ausência ou assimetria macroscópica de granulação e superfícies plaquetárias visivelmente aberrantes podem ser evidentes. Em esfregaços de amostras não coaguladas obtidas da ponta do dedo, espera-se alguma aglomeração de plaquetas. Quando tais anormalidades são observadas, é preciso considerar sempre a ocorrência de artefatos resultantes de colheita ou manipulação inadequadas da amostra e repetir o processo, obtendo uma nova amostra se a explicação da anormalidade não for evidente.

Nos casos de suspeita de anormalidades estruturais das plaquetas, a microscopia eletrônica possibilita uma caracterização mais exata do defeito (White, 2004). É fundamental seguir à risca os protocolos estabelecidos para colheita e processamento das amostras destinadas ao estudo ultraestrutural das plaquetas, para evitar confundir as alterações decorrentes da ativação inadvertida *in vitro* com anormalidades características verdadeiras das plaquetas *in vivo*.

Os aspectos normais das plaquetas que podem ser visualizados à análise ultraestrutural estão ilustrados na Figura 39.1. A superfície externa da plaqueta, o glicocálice, é rica em glicoproteínas. Uma faixa submembranosa de microtúbulos, composta pela proteína tubulina, fornece apoio estrutural à célula normalmente discoide. Também é possível observar microfilamentos contráteis, compostos principalmente por actina e miosina plaquetárias. Com uma variedade de métodos demonstrou-se a existência de um sistema canalicular aberto extenso dentro da plaqueta, em comunicação direta com o sistema extracelular. Geralmente visto em grande proximidade com o sistema canalicular está o sistema tubular denso, aparentemente derivado do retículo endoplasmático liso, que se cora positivamente para atividade plaquetária da peroxidase (Breton-Gorius, 1972), de acordo com seu papel como local para o metabolismo do ácido araquidônico dentro da plaqueta. O sistema tubular denso também funciona como uma bomba sequestradora de cálcio, fornecendo níveis baixos de cálcio citoplasmático para a plaqueta em repouso.

É possível reconhecer uma variedade de inclusões no citoplasma da plaqueta. Tanto mitocôndrias como glicogênio podem ser identificados. Grânulos α menos corados, uma parte central densa menos frequente (ou "olho de touro"), grânulos, lisossomos e peroxissomos também podem ser vistos. Os grânulos α contêm várias proteínas diferentes, inclusive fibrinogênio plaquetário, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de von Willebrand (vWF), o fator V de ligação da proteína multimerina (Hayward, 1991; 1993), P-selectina (Stenberg, 1985; Berman 1986), β-tromboglobulina (bTG) e o fator plaquetário neutralizante da heparina (PF)4. Os grânulos da parte central densa são conhecidos como locais de armazenamento, compartimentos não metabólicos de difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e cálcio.

Glicoproteínas da membrana das plaquetas

O estudo das glicoproteínas da membrana das plaquetas levou ao melhor entendimento da função plaquetária. Mediante marcação radioativa e, subsequentemente, química com biotina não radioativa (Fabris, 1992; Solum, 1995; Sachs, 2000) da superfície das glicopro-

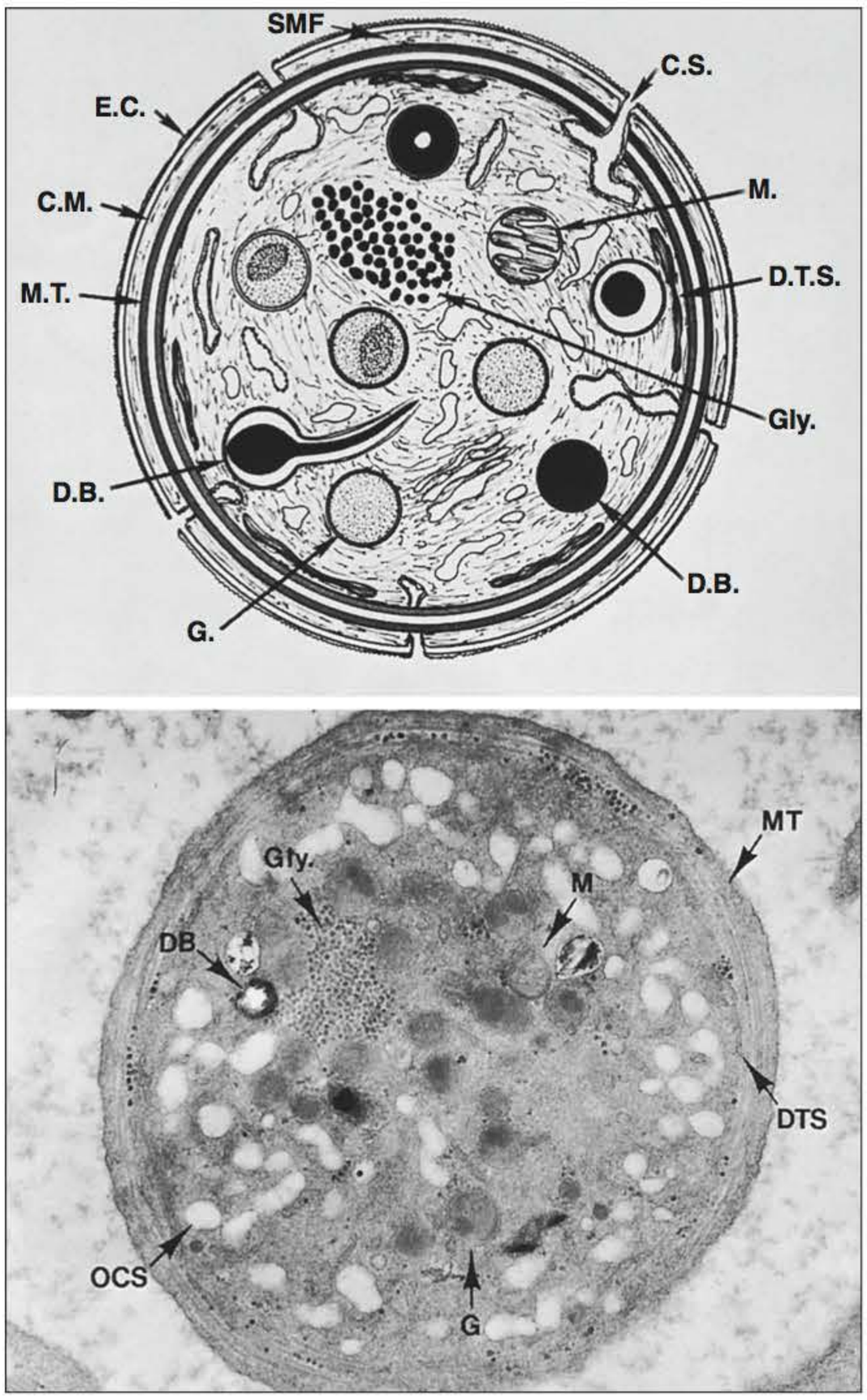


Figura 39.1 Plaquetas discoides. O esquema resume os aspectos ultraestruturais observados em cortes finos de plaquetas discoides feitos no plano equatorial. Os componentes da zona periférica incluem a camada exterior (EC), a unidade trilaminar de membrana (CM) e a área da submembrana contendo filamentos especializados (SMF) que formam a parede da plaqueta e revestem canais da superfície conectados ao sistema canalicular (CS). A matriz do interior da plaqueta é a zona sol-gel que contém microfilamentos de actina, filamentos estruturais, a faixa circunferencial de microtúbulos (MT) e glicogênio (Gly). Os elementos formados embebidos na zona sol-gel incluem mitocôndrias (M), grânulos (G) e corpúsculos densos (DB). Coletivamente, constitutem a zona da organela. Os sistemas da membrana incluem o sistema canalicular (CS) de superfície conectado e o sistema tubular denso (DTS), que serve como o retículo sarcoplasmático da plaqueta. A micrografia eletrônica mostra a plaqueta seccionada no plano equatorial (× 30.000), que revela a maioria das estruturas indicadas no diagrama. (Com permissão de White JG, Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds.): Hemostasia and Thrombosis. New York, Churchill Livingstone, 1994.)

teínas, solubilização das membranas das plaquetas, separação eletroforética das proteínas solubilizadas em géis de poliacrilamida e visualização subsequente dos géis, é possível avaliar as glicoproteínas das plaquetas dos pacientes. Na verdade, a aplicação dessa metodologia às plaquetas de pacientes com vários distúrbios hemorrágicos congênitos levou à descoberta de que tais distúrbios devem-se à ausência de glicoproteínas importantes da membrana. Além disso, foi precisamente a observação da ausência de múltiplas faixas de glicoproteína, conforme ilustrado na Figura 39.2, que levou à descoberta de que as principais glicoproteínas plaquetárias existiam na forma de complexos de múltiplas cadeias. Na Tabela 39.1 há um resumo das glicoproteínas que, atualmente, acredita-se que funcionem como receptores para ligantes de adesividade. Em termos quantitativos, o complexo receptor GP IIb/IIIa (também conhecido como $a_{IIb}\beta_3$) predomina, com aproximadamente 50.000 cópias por plaqueta, seguido pelo complexo receptor GP Ib/IX, com aproximadamente 25.000 cópias por plaqueta. (Repare que uma denominação alternativa desse receptor pode ser GP Ib/IX/V ou GP Ib/V/IX, em reconhecimento pelo fato de que o GP V forma uma estreita associação não covalente com o GP Ib e o GP IX.) Acredita-se que o número dos complexos restantes seja muito baixo. Atualmente, está em andamento em diversos laboratórios a análise de uma variedade de polimorfismos dentro das principais glicoproteínas da membrana da plaqueta quanto à sua possível associação a maior risco de trombose (Kunicki, 2004; Yee, 2004). É provável que essas abordagens baseadas em laboratório – seja em nível fenotípico, seja em nível genotípico – venham a ser cada vez mais importantes, em particular no sentido de prever as respostas individuais de cada paciente à terapia antitrombótica (Michelson, 2000).

Embora não sejam visualizados com facilidade em micrografia eletrônicas de plaquetas, os fosfolipídeos da membrana da plaqueta, e em particular a fosfatidilserina, têm uma importância adicional significativa. Por causa da assimetria dos fosfolipídeos, a fosfatidilserina com carga negativa não se expressa com abundância no folheto externo da membrana da plaqueta em repouso (Fig. 39.3) (Zwaal, 2005); a alteração dessa assimetria sobre a ativação da plaqueta leva à formação de uma superfície plaquetária procoagulante (Solum, 1999a). Monitorar essa alteração associada à ativação na exposição do fosfolipídeo pode ser feita no laboratório aumentando-se a ligação da anexina V à superfície da plaqueta usando-se citometria de fluxo (Fig. 39.4).

Atividades plaquetárias na hemostasia e suas estimativas laboratoriais

Ativação das plaquetas

Com a ativação do sistema da coagulação, há produção de trombina, que serve como estímulo potente para a ativação plaquetária. Sob estimulação da trombina, do colágeno ou de vários outros agentes, a forma das plaquetas muda de discoide para esférica. Elas emitem pseudópodes, sofrem contração interna resultando na centralização de seus grânulos α e densos do centro, e por fim o conteúdo desses grânulos é liberado pela célula. Dependendo da força do estímulo, pode haver liberação do conteúdo dos grânulos α, dos grânulos densos do centro ou mesmo de grânulos lisossômicos. Como resultado da ativação plaquetária, ocorrem alterações na conformação do complexo de glicoproteínas IIb/IIIa (Frelinger, 1991; Phillips, 1991; Sims, 1991; Calvete, 1999), resultando na formação de receptores capazes de ligação com várias proteínas plasmáticas, mais notavelmente o fibrinogênio (Bennett, 1979; Cox, 2004).

Após lesão vascular, as plaquetas sanguíneas aderem rapidamente ao subendotélio exposto. Em condições de menor cisalhamento, como aquelas características da circulação venosa, as plaquetas podem ligar-se diretamente ao colágeno exposto por meio da GP VI e do GP Ia/IIa ($\alpha_2\beta_1$). Nas condições de maior cisalhamento presentes na circulação arterial, acredita-se que a adesão seja iniciada pelo vWF circulante ao colágeno subendotelial exposto e o vWF ligado à superfície então ligue-se à plaqueta via complexo receptor GP Ib/IX da plaqueta (Auger, 2005). Contudo, para a formação de um tampão plaquetário estável, é preciso que ocorra uma alteração na conformação do GP IIb/IIIa (Fig. 39.5), tornando-o, assim, competente para ligar-se ao fibrinogênio. O fibrinogênio serve como um dos principais ligantes de adesão para o GP IIb/IIIa ($\alpha_{II}b\beta_3$) (Auger, 2005) e nessa capacidade está um componente essencial da agregação plaquetária. Na doença trombastênica de Glanzman, descrita adiante, há uma ausência ou defeito do GP IIb/IIIa, que resulta em agregação plaquetária defeituosa. A citometria de fluxo mostrou-se útil não apenas para medir a expressão dos principais receptores de glicoproteína na superfície da plaqueta, como também para avaliar a capacidade do GP IIb/IIIa de alterar sua conformação sob o desafio de plaquetas com os agonistas apropriados (Fig. 39.6). *In vivo*, os agregados de plaquetas que se desenvolvem dentro dos vasos são denominados trombos.

Além da alteração altamente significativa na conformação do complexo GP IIb/IIIa na membrana da plaqueta que ocorre como resultado da ativação da plaqueta, também há uma translocação notável da P-selectina de seu local de armazenamento intracelular no grânulo α para a superfície da membrana externa da plaqueta. Nas condições de ativação plaquetária em que micropartículas brotam da membrana

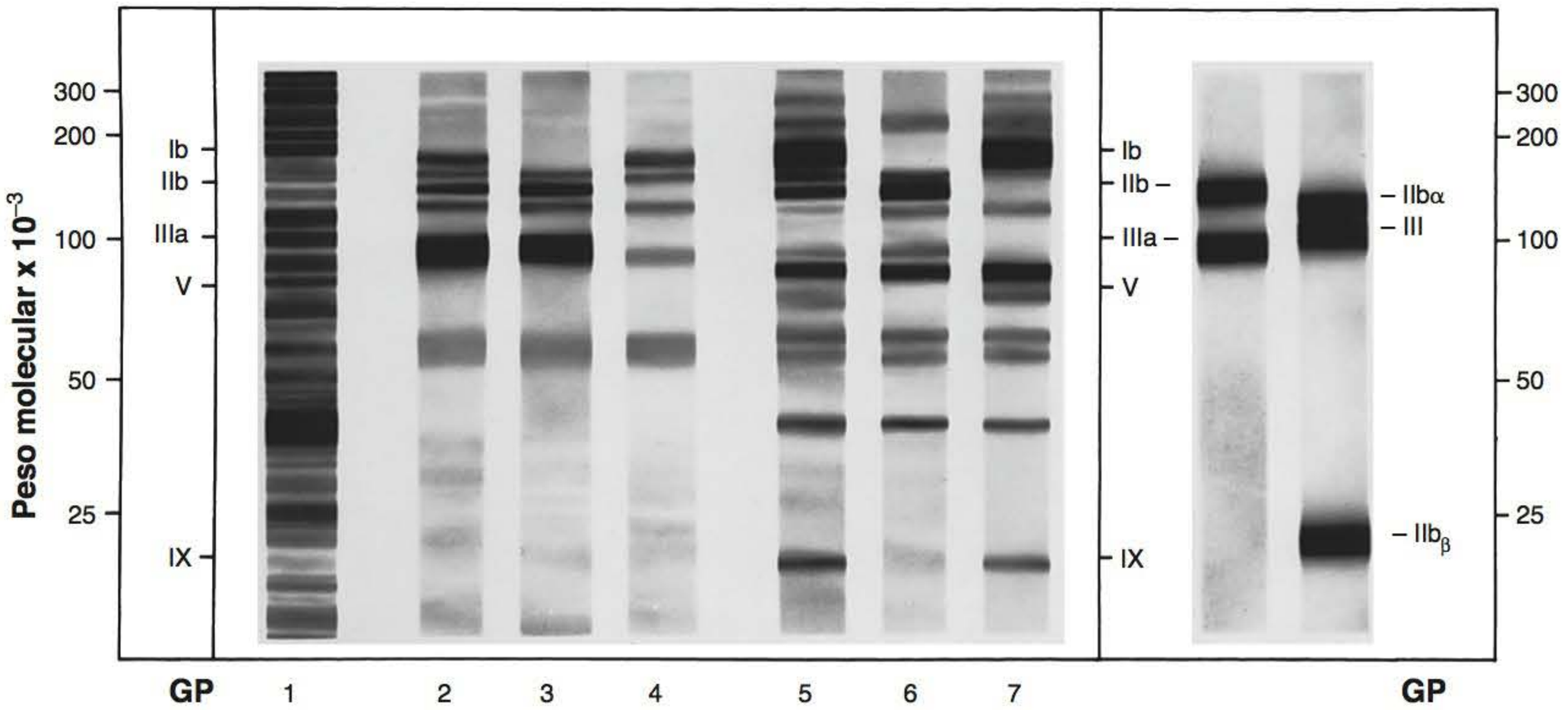


Figura 39.2 Análise das proteínas da plaqueta e anticorpos antiplaqueta por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *immunoblotting*. Esta figura é uma interpretação do artista do material original para se ter uma apresentação mais clara e consistente das análises típicas. As proteínas plaquetárias solubilizadas foram separadas por eletroforese em um bloco de gel contendo de 7 a 12% de um gradiente exponencial de poliacrilamida. Todas as amostras não estão reduzidas, exceto a faixa 9, em que as proteínas estão reduzidas com 5% de β-mercaptoetanol. As ordenadas assinalam a posição das principais glicoproteínas da membrana plaquetária na forma não reduzida; portanto, essas anotações não são aplicáveis à faixa 9. A faixa 1 representa uma coloração com azul brilhante de Coomassie da proteína de plaquetas normais em sangue total. Entre as principais glicoproteínas da membrana, apenas a GP IIb está separada de outros polipeptídeos e está presente como uma faixa distinta. As faixas 2-4 representam autorradiografias das proteínas da superfície celular da plaqueta marcadas por meio de radioiodinação catalisada por lactoperoxidase, e as faixas 5-7 representam fluorografias de plaquetas marcadas por tratamento sequencial com neuraminidase, galactose oxidase e [^{3}H]boroidrato de sódio (carboidrato usado para marcar a superfície celular). As faixas 2 e 5 representam plaquetas normais. As faixas 3 e 6 representam plaquetas de um paciente com síndrome de Bernard-Soulier. A falta de GP Ib pode ser vista com ambas as técnicas, enquanto a ausência aparente de GP V, GP IX e uma faixa de alto peso molecular que pode conter complexos de GP IIb só podem ser vistas na faixa 6. As faixas 4 e 7 representam plaquetas de um paciente com trombastenia de Glanzmann, demonstrando sua deficiência de GP IIb e GP IIIa. As faixas 8 e 9 são *Western blots* de proteínas plaquetárias não reduzidas (faixa 8) e reduzidas (faixa 9) usando-se uma mistura de antissoros policlonais de coelho com anti-GP IIb e anti-GP IIIa como anticorpos primários. A redução da ligação dissuleto causa a dissociação da GP IIb em duas subunidades: GP $IIb_α$, com migração um pouco mais rápida que a GP IIb, e GP $IIb_β$, que pode ser vista na posição de M_r = 22.000. A GP IIIa aparentemente é rica em ligações intramoleculares de dissuleto, ficando de maior tamanho e com menor migração eletroforética após redução. As faixas 8 e 9, esquerda e direita, respectivamente, ocorrem na caixa retangular menor à extrema direita. (Com permissão de Nurden AT, George JN, Phillips DR: Platelet membrane glycoproteins: their structure, function, and modification in disease. Em Phillips DR, Shuman MA (eds.): Biochemistry of Plaquetas. Orlando, Academic Press, 1986, p. 159-224.)

Tabela 39.1 Glicoproteínas adesivas da membrana da plaqueta

	Designação alternada	Peso molecular (reduzido)* da subunidade α	Subunidade β	Gene familiar	Ligante	Função	Expressão da glicoproteína†
GP IIb/IIIa	$α_{IIb}β_3$	125 kDa, 23 kDa	110 kDa	Integrina	Fibr, vWF, FN, VN	Agregação Adesão	C, S
Vitronectina receptor	$α_vβ_3$	135 kDa, 25 kDa	110 kDa	Integrina	VN, ?vWF, fibr	Adesão	C
GP Ic/IIa	VLA-5	135 kDa, 27 kDa	130 Da	Integrina	FN, laminina	Adesão	C
$α_6$/IIa	VLA-6	125 kDa	130 kDa	Integrina	Laminina	Adesão	C
GP Ia/IIa	VLA-2	167 kDa	130 kDa	Integrina	colágeno	Adesão	C
GP Ib/IX		145 kDa, 24 kDa	17 kDa	Rica em leucina Glicoproteína	vWF, THR	Adesão	C
P-selectina	GMP 140, PADGEM, CD-62	140 kDa		Selectina	PSGL-1, ligado ao O carboidrato	Plaqueta–leucócito interações	S
PECAM-1	CD31	130 kDa		Imunoglobulina	?	Plaqueta-endotelial interações celulares	C
GP IV	GP IIIb, CD36	88 kDa		?	TSP, colágeno	Adesão	C
GP VI		61 kDa		?	Colágeno	Sinalização	C
PETA-3		27 kDa		Tetraspan	?	?Agregação	C

* Os números separados por vírgulas representam o peso molecular de cadeias α e β ligadas a dissulfeto da respectiva subunidade α ou β do receptor.

† C = expressão constitutiva; S = expressão na membrana requer estimulação da plaqueta.

fibr = fibrinogênio; FN = fibronectina; PETA-3 = antígeno plaquetário tetraspan 3 da célula endotelial; PSGL-1 = ligante 1 da P-selectina à glicoproteína; THR = trombina; TSP = trombospondina; VN = vitronectina; vWF = fator de von Willebrand.

Fonte: modificada com permissão de Peerschke EIB, Lopez JA: Platelet membranes and receptors. Em Loscalzo J, Schafer AI (eds): Thrombosis and Hemorrhage, 2.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1998, p. 253.

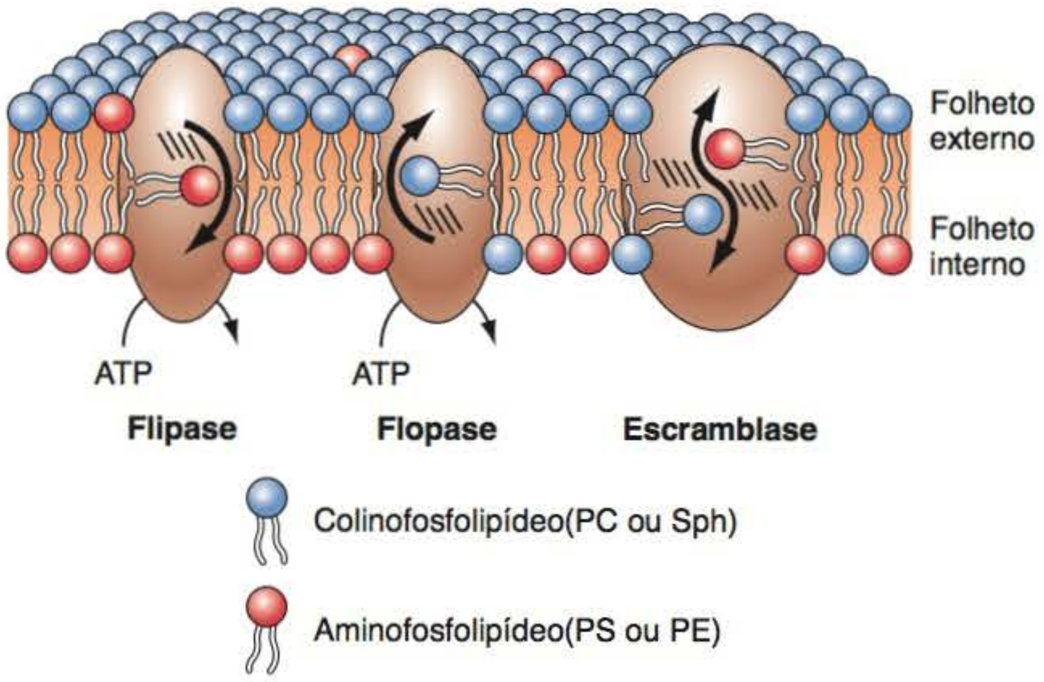


Figura 39.3 Intercâmbio controlado por transportador de fosfolipídeos entre ambos os folhetos de lipídeos da membrana celular. O transporte unidirecional de fosfolipídeos pela flipase é direcionado para dentro, enquanto a flopase promove transporte para fora. Ambos os transportadores são dependentes de ATP e frequentemente movem fosfolipídeos contra seus respectivos gradientes de concentração. Por exemplo, a aminofosfolipídeo translocase (flipase) lança rapidamente a PS e a PE do folheto externo para o interno, enquanto a ABCC1 (flopase) move a colina e aminofosfolipídeos mais lentamente na direção do folheto externo. Acredita-se que a ação conjunta de ambos os transportadores crie um estado de assimetria dinâmica, em que a monocamada externa é rica em colinofosfolipídeos, enquanto os aminofosfolipídeos ocupam predominantemente o folheto interno. O transporte bidirecional de fosfolipídeos é catalisado por uma escramblase cuja ativação pode ocorrer após influxo de Ca^{2+} ou quando as células entram em apoptose. Como a atividade da escramblase move todas as principais classes de fosfolipídeos de volta e para a frente entre os dois folhetos, promove o colapso da assimetria da membrana fosfolipídica, com aparecimento de PS na superfície externa das células. PC = fosdatidilcolina; SPH = esfingosina; PS = fosfatidilserina; PE = fosfatidiletanolamina. (Modificada com permissão de Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. Cell Mol Life Sci 2005; 62:971-988.)

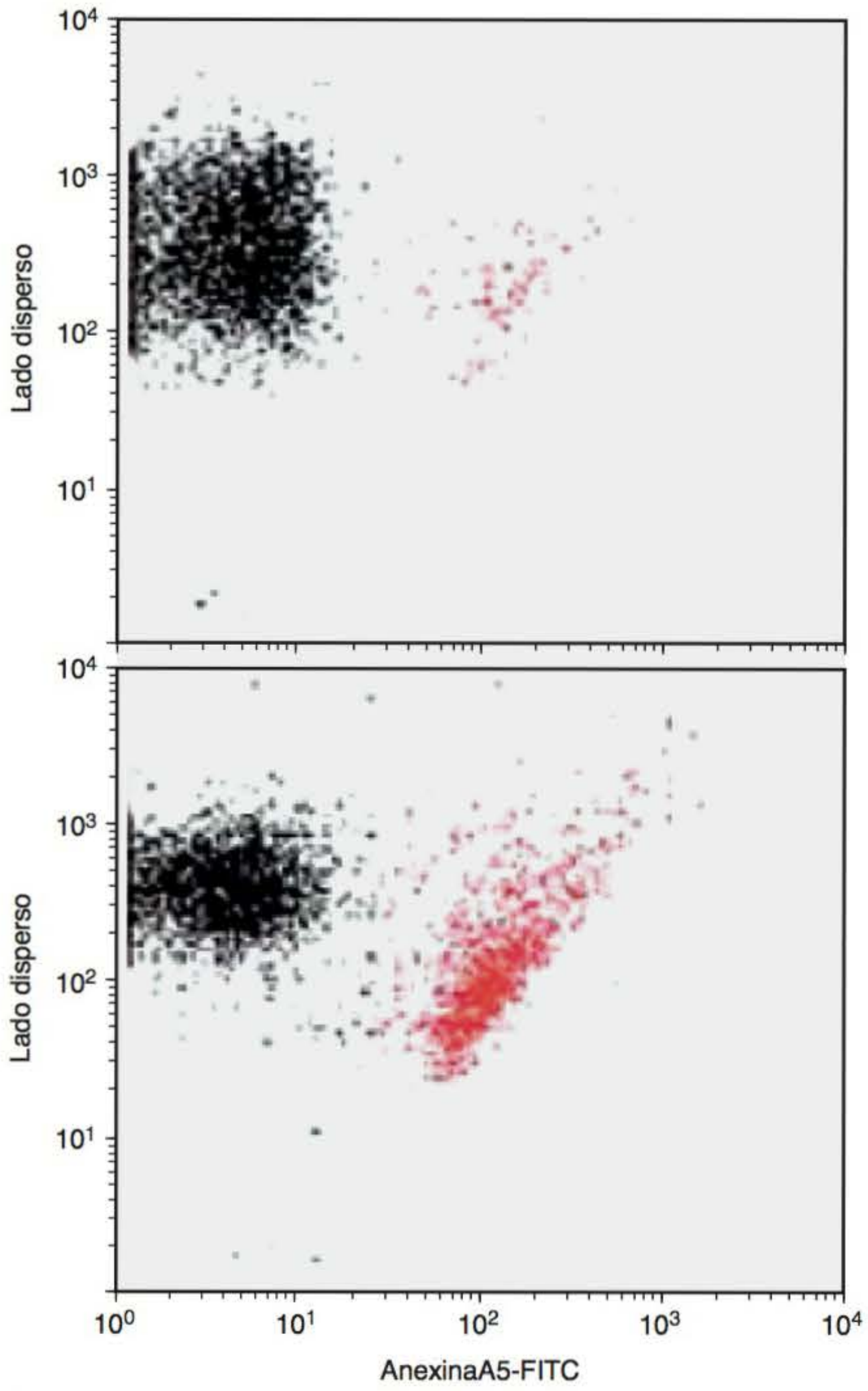


Figura 39.4 Análise por citometria de fluxo da ligação da anexina A5 com marcação fluorescente (FITC) a plaquetas ativadas. Os pontos típicos de fluorescência *versus* o lado disperso das plaquetas de controle (painel superior) e plaquetas ativadas (painel inferior) por 10 µg/mL de colágeno mais 1 nM de trombina por minuto. A anexina A5 ligada à fração da plaqueta exposta à PS está representada por pontos vermelhos. A escramblase é ativa em plaquetas positivas para a anexina A5 (pontos vermelhos), enquanto a aminofosfolipídeo translocase é ativa em plaquetas negativas para a anexina A5 (pontos pretos). (Modificada com permissão de Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. Cell Mol Life Sci 2005; 62:971-988.)

plaquetária, a P-selectina também fica exposta à superfície externa das micropartículas. A micropartícula P-selectina, ou P-selectina derivada de outras fontes, é capaz de unir-se ao ligante glicoproteína (PSGL)-1 expresso por monócitos, que por sua vez leva à expressão do fator tecidual circulante (Cambien, 2004). A P-selectina plaquetária também se liga ao PSGL expresso por neutrófilos, células endoteliais danificadas e uma variedade de outras células em certas doenças (Evangelista, 1999; Warkentin, 1999b; Andre, 2004; Cambien, 2004; Furie, 2004).

A avaliação laboratorial inicial dos distúrbios plaquetários inclui uma contagem de plaquetas. Tal estimativa passou a ser agora parte da rotina de um hemograma completo na era dos aparelhos de contagem eletrônica. Além disso, muitos outros instrumentos também fornecem um valor para o volume médio das plaquetas (VMP) e podem exibir um histograma de volumes plaquetários. Em indivíduos sadios, o VMP varia inversamente com a contagem das plaquetas, de modo que a interpretação dos valores de VMP como anormais baixos ou altos é mais bem feita com referência à contagem de plaquetas do paciente (Bessman, 1981, 1986). Alguns instrumentos automatizados avaliam ainda a maturidade das plaquetas, conforme refletida no conteúdo de RNA de "plaquetas reticuladas" – o que é análogo às estimativas de reticulócitos na série eritroide, discutida adiante. Tais estimativas oferecem a oportunidade de detectar uma resposta trombopoiética da medula óssea em um ou mais dias antes que possa ser detectada por abordagens mais tradicionais. A avaliação do esfregaço periférico deve permitir pelo menos uma corroboração plausível da contagem medida e do volume da distribuição das plaquetas. Como as plaquetas podem sofrer graus variáveis de ativação e disseminação subsequente durante a preparação do esfregaço sanguíneo, a distribuição aparente das plaquetas no esfregaço às vezes pode desviar-se bastante dos volumes de distribuição reais. Nos casos de trombocitopenia grave abaixo da linearidade estabelecida de determinado instrumento automatizado, ou se fragmentos celulares puderem estar afetando prejudicialmente a contagem automatizada, pode-se fazer uma contagem manual por contraste de fase (Brecher, 1950). No entanto, é preciso lembrar que tais contagens manuais realizadas com um número relativamente pequeno de plaquetas tem um coeficiente muito mais alto de variação que o encontrado quando são usados instrumentos automatizados dentro de variações lineares, a menos que essas contagens sejam feitas por alguém experiente, pode haver uma oportunidade significativa de erro. O intervalo de referência para a contagem de plaquetas é de aproximadamente 150 a 400 × 10^9/L.

Estudos de triagem da função plaquetária

Nos dias de hoje, nenhum exame de laboratório disponível reflete de forma confiável a capacidade da plaqueta de executar essa série extremamente complexa de funções de maneira consistente com a hemostasia normal. Por muitos anos, muitos laboratórios usaram o modelo do teste do tempo de sangramento como uma espécie de teste "global" da adequação da hemostasia primária. Para executar tal procedimento, usa-se um dispositivo descartável que consiste em uma lâmina acionada por uma mola e que atravessa verticalmente a epiderme (descrito em detalhes por Hoyer, 1982), ou uma lâmina que corta a epiderme à medida que faz um arco giratório (Buchanan, 1989). Nesses testes, coloca-se um manguito de pressão sanguínea em torno da parte superior do braço, insuflando-o até manter uma pressão constante de 40 mmHg. Um corte padronizado então é feito

II Integrina em uma baixa afinidade, estado fechado
V Integrina em uma alta afinidade, estado aberto

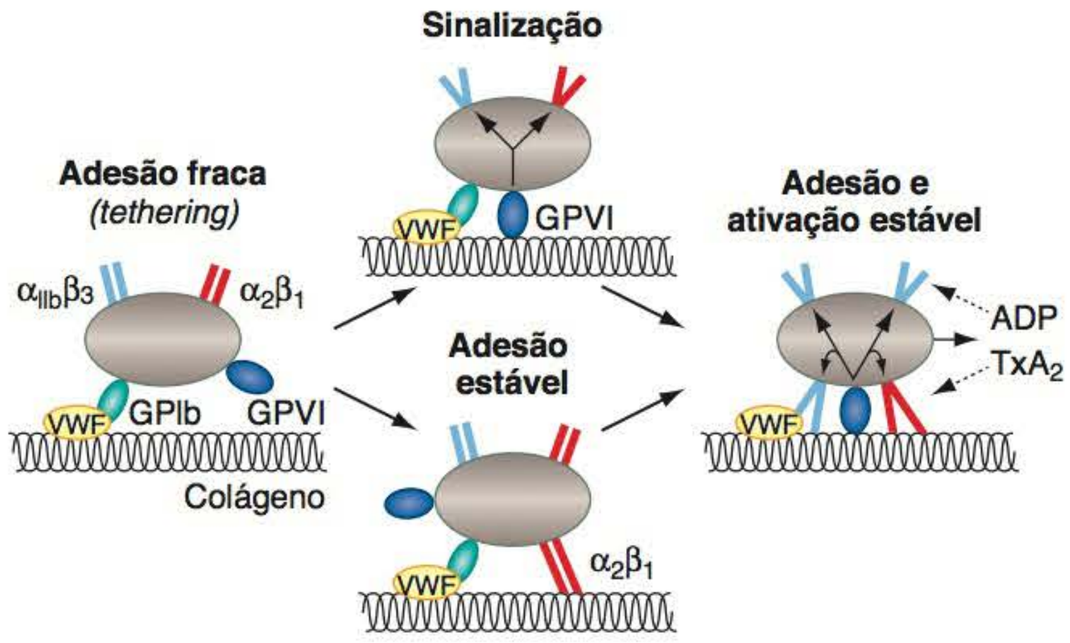


Figura 39.5 Modelo unificado da adesão plaquetária ao colágeno ao cisalhamento arterial. Estão ilustradas duas vias diferentes pelas quais as plaquetas humanas e de camundongos aderem firmemente ao colágeno com o cisalhamento arterial. Em ambas, a maioria das plaquetas inicialmente adere ao colágeno via GP Ib/IX/V, interagindo com o vWF ligado ao colágeno (à esquerda), embora uma minoria de plaquetas interaja diretamente com o colágeno, independentemente de vWF/GP Ib/IX/V. Na primeira via (parte superior da figura), a sinalização da GP VI leva primeiro à ativação das integrinas α2β1 (GP Ia/IIa) e αIIbβ3 (GP IIb/IIIa). As integrinas ativadas, então, unem firmemente a plaqueta ao colágeno, seja diretamente (β2α1) ou via vWF ligado ao colágeno (αIIbβ3) (à direita). Na segunda via (parte inferior da figura), as plaquetas primeiro aderem ao colágeno via integrina α2β1, antes que a GP VI englobe o colágeno e induza a ativação. É provável que essas duas vias reforcem uma a outra e os eventos de formação do trombo. A liberação de mediadores secundários (ADP e TxA2) potencializaria ainda mais esses eventos (à direita). (Redesenhada de Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA: Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. FASEB J 2005;19:825-827.)

Tabela 39.2 Tempos de fechamento (TF) do PFA-100 nos distúrbios plaquetários congênitos e adquiridos, não induzidos por fármacos.

	Número total de indivíduos relatados	CADP CT	CEPI CT
Distúrbios com contagens normais de plaquetas			
Trombastenia de Glanzmann	23	P	P
Defeito similar ao causado pelo AAS	6	N	P
Deficiência de $P2Y_{12}$	4	N ou P	N ou P
Deficiência de grânulos densos	30	N ou P	N ou P
Síndrome de Hermansky-Pudlak	44	N ou P	N ou P
Defeitos primários da secreção	30	N	N ou P
Defeito procoagulante plaquetário	1	N	N
Distúrbios com contagens reduzidas ou normais de plaquetas			
Síndrome de Bernard-Soulier	8	P	P
Doença de von Willebrand do tipo plaquetário	3	P	P
Síndrome da plaqueta cinzenta	3	P	P
Síndrome de Wiskott-Aldrich	5	N ou P	N ou P
Macrotrombocitopenia hereditária associada a miosina não muscular Síndromes da cadeia pesada IIa	5	N	N ou P
Macrotrombocitopenia de causa indefinida	11	N ou P	N ou P
Trombocitopenia autossômica dominante indefinida	1	N	N
Distúrbios primários da medula óssea			
Síndromes mielodisplásicas ou mieloproliferativas com ou sem trombocitose	69	N ou P	N ou P

Note que os dados relatados com cartuchos CADP e CEPI indicados como normais (N) ou prolongados (P) baseiam-se em pequenos números de relatos.
Fonte: modificada com permissão de Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, et al. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorder and platelet function. J Thromb Haemost 2006; 4:312-319.

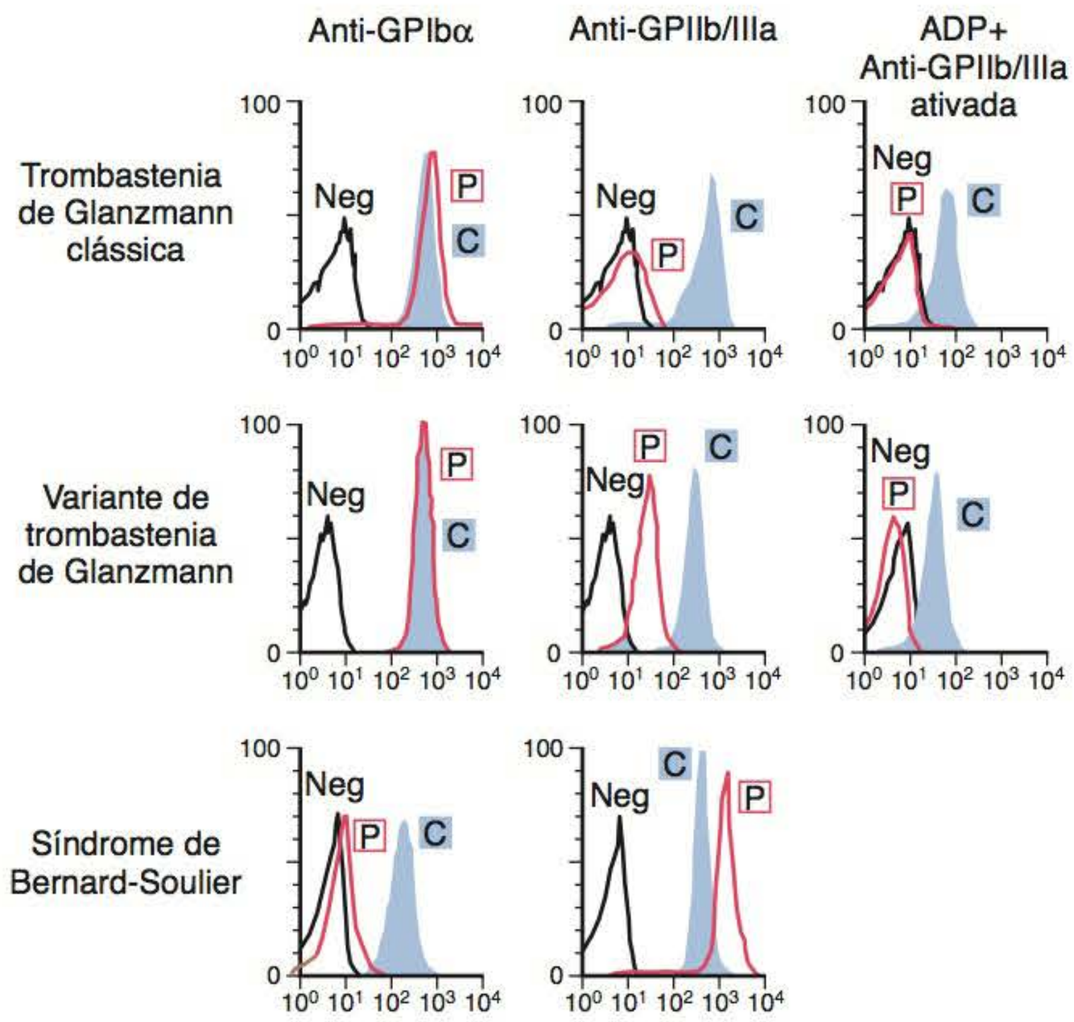


Figura 39.6 Avaliação por citometria de fluxo dos distúrbios plaquetários nas glicoproteínas da membrana. As plaquetas de controles normais (C) ou de pacientes (P) foram incubadas com anticorpos monoclonais contra GP Ibα, GP IIb/IIIa ou um anticorpo monoclonal (Pac1) que reconhece apenas a forma "ativa" com alteração conformacional do GP IIb/IIIa, que normalmente ocorre após estimulação da plaqueta com agonistas (p. ex., ADP). No paciente com a trombastenia de Glanzmann clássica mostrado no painel superior, há uma ausência virtual de GP IIb/IIIa, embora a GP Ibα esteja presente em níveis normais. Na variante de trombastenia de Glanzmann mostrada no painel do meio, embora pareça haver um nível intermediário de expressão de GP IIb/IIIa, há uma perda mais grave da capacidade de o receptor adotar a conformação ativa após estimulação das plaquetas com ADP. No paciente com a síndrome de Bernard–Soulier mostrado no painel inferior, há uma deficiência grave da expressão de GP Ibα, mas não há diminuição da expressão de GP IIb/IIIa. (Modificada com permissão de Nurden AT, George JN: Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and other disorders. Em Colman RW (ed.): Hemostasia and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, 4.ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.)

na superfície volar do antebraço, aciona-se um cronômetro e, a cada intervalo de 30 segundos, as gotas resultantes de sangue são colocadas em um frasco contendo filtro de papel (com cuidado para o papel não tocar diretamente a borda do frasco). Quando o sangue parar de corar o papel do filtro, interrompe-se a contagem do tempo no cronômetro. Contagens de plaquetas acima de 100×10^9/L correspondem a tempos de sangramento dentro do intervalo de referência estabelecido pelo laboratório. Tempos de sangramento prolongados, nesses casos, estão associados mais frequentemente ao consumo prévio de fármacos com ação antiplaquetária (p. ex., ácido acetilsalicílico), doença de von Willebrand, anormalidades congênitas das plaquetas ou distúrbios adquiridos da função plaquetária (p. ex., uremia, conforme discutido adiante).

Embora um teste de tempo de sangramento feito com cuidado possa trazer informação útil durante a avaliação de um paciente com história de sangramento, sua utilidade é menos clara no contexto frequentemente encontrado de triagem hemostática pré-operatória de pacientes assintomáticos. Em uma revisão extensa de artigos publicados sobre a extensão do sangramento clínico em diversas situações, Rodgers e Levin (1990) concluíram que os dados disponíveis não fornecem evidência convincente de que a relação entre a contagem de plaquetas e o tempo de sangramento seja útil em termos preditivos em cada paciente encontrado tipicamente na prática clínica. Além disso, concluíram também que o grau de sangramento de um modelo padronizado de corte na pele não pode ser confiável em determinado paciente para prever o risco de sangramento em qualquer parte do corpo, como locais de cirurgia. Em um estudo prospectivo feito com 40 pacientes que tinham antecedentes negativos de sangramento e consumo recente de anti-inflamatórios não esteroides e foram submetidos a cirurgia de

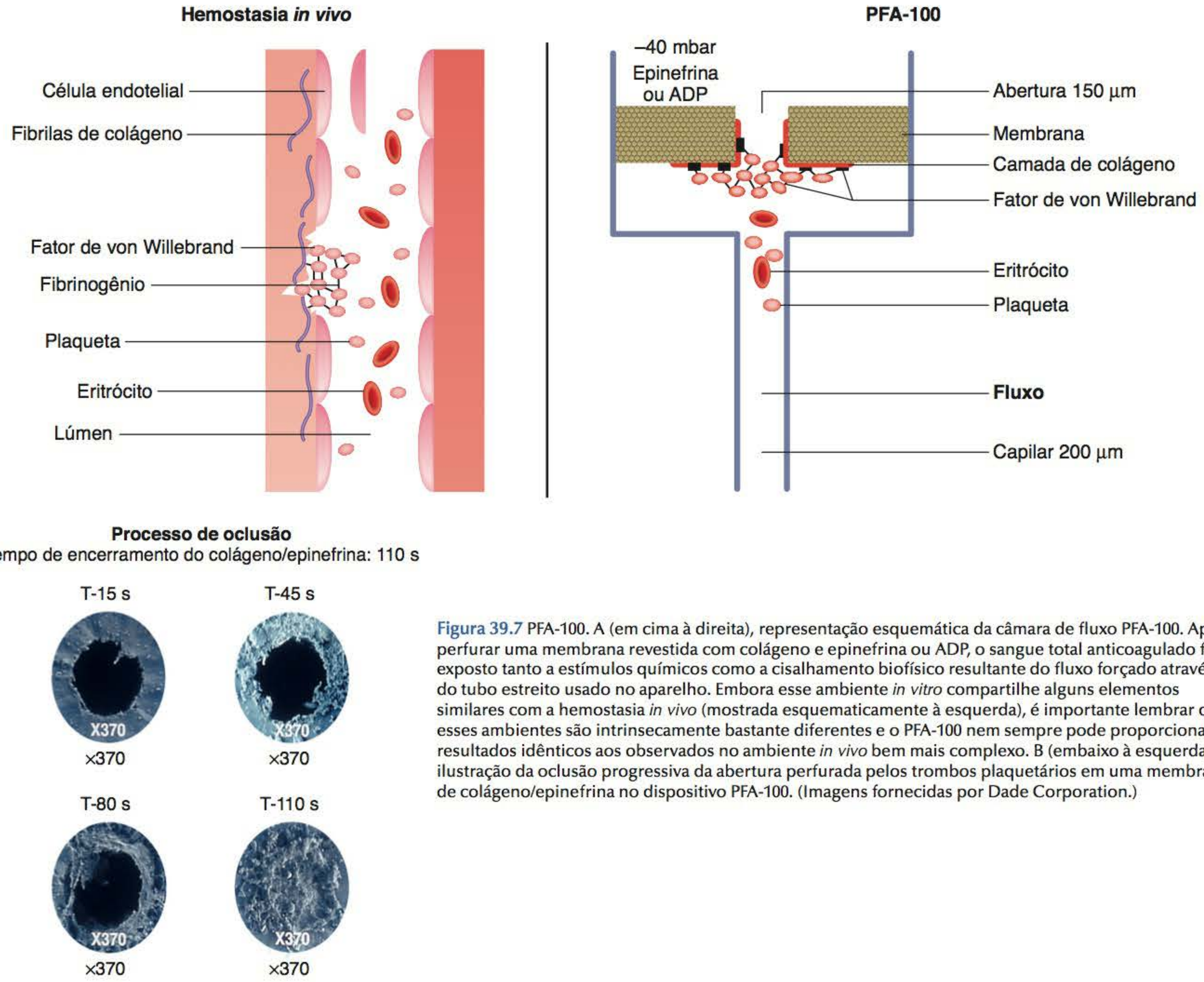


Figura 39.7 PFA-100. A (em cima à direita), representação esquemática da câmara de fluxo PFA-100. Após perfurar uma membrana revestida com colágeno e epinefrina ou ADP, o sangue total anticoagulado fica exposto tanto a estímulos químicos como a cisalhamento biofísico resultante do fluxo forçado através do tubo estreito usado no aparelho. Embora esse ambiente *in vitro* compartilhe alguns elementos similares com a hemostasia *in vivo* (mostrada esquematicamente à esquerda), é importante lembrar que esses ambientes são intrinsecamente bastante diferentes e o PFA-100 nem sempre pode proporcionar resultados idênticos aos observados no ambiente *in vivo* bem mais complexo. B (embaixo à esquerda), ilustração da oclusão progressiva da abertura perfurada pelos trombos plaquetários em uma membrana de colágeno/epinefrina no dispositivo PFA-100. (Imagens fornecidas por Dade Corporation.)

derivação (*bypass*), não foi encontrada relação preditiva entre o teste do tempo de sangramento no pré-operatório e a ocorrência de sangramento no peri ou pós-operatório (De Caterina, 1994). Embora a maioria concorde que um tempo de sangramento muito prolongado, na ausência de artefato técnico, seja forte indício de um distúrbio subjacente da hemostasia primária, a interpretação de tempos de sangramento apenas discreta ou moderadamente prolongada é decididamente menos clara. Por causa da limitação no valor preditivo, do risco de fibrose e da considerável habilidade técnica e tempo de desempenho associados aos tempos de sangramento, o uso desse procedimento caiu consideravelmente nos últimos anos. Ao mesmo tempo, aumentou a popularidade das estimativas da reatividade plaquetária *in vitro*, mais notavelmente o analisador da função plaquetária (PFA-100), instrumento em que o sangue total anticoagulado flui sob alta força de cisalhamento através de um orifício estreito feito na membrana externa revestida por colágeno e epinefrina ou ADP (Fig. 39.7A). A combinação de cisalhamento biofísico e estimulação bioquímica inicialmente promove adesão plaquetária às margens externas da membrana cortada e, subsequentemente, a agregação de uma plaqueta a outra leva à oclusão total do canal, o que é registrado como "tempo de fechamento" (Fig. 39.7B). Embora a inibição da via da ciclo-oxigenase plaquetária pelo ácido acetilsalicílico (melhor discutida no Cap. 23) ou outras alterações discretas a moderadas da função plaquetária prolonguem os tempos de fechamento nas membranas de colágeno/epinefrina, apenas o comprometimento mais profundo da função plaquetária ou do vWF costuma ser capaz de prolongar os tempos de fechamento nas membranas de colágeno/ADP. Trombocitopenia ou anemia também prolongam os tempos de fechamento. Embora anormal em alguns distúrbios plaquetários, cada vez mais admite-se que o PFA-100 não tem sensibilidade ou especificidade suficiente para ser confiável como recurso para o rastreamento de distúrbios plaquetários (ver Tab. 39.2; Hayward, 2006). A identificação definitiva de anormalidades do vWF nas plaquetas requer estudos mais especializados.

Foram desenvolvidos vários outros sistemas experimentais *ex vivo* em que as forças de cisalhamento desempenham um papel importante. Incluem tanto variações dos viscômetros de cone e placa como câmaras de fluxo em placas paralelas (Michelson, 2002). Tais dispositivos oferecem o potencial de detectar distúrbios hereditários e adquiridos relacionados com plaquetas e vWF, dependendo, evidentemente, da gravidade do distúrbio em questão.

Agregação e secreção plaquetárias

A avaliação adicional de um defeito suspeito na função plaquetária pode ser feita mediante um exame laboratorial de agregação e secreção plaquetárias em resposta a uma bateria de agentes estimuladores de plaquetas. Quando se mistura continuamente plasma citratado rico em plaquetas em um agregômetro e passa-se um feixe de luz através da suspensão, a agregação plaquetária em resposta a um estímulo químico acrescentado pode ser monitorada por alterações na capacidade de transmissão da luz (Zucker, 1989). Observa-se a alteração na forma de discoide para esferoide como uma queda inicial nessa capacidade, enquanto a formação subsequente de aglomerados de plaquetas permite que mais luz passe através da suspensão para o fotodetector e seja registrada como um aumento na transmissão da luz. Em instrumentos equipados com um segundo canal para monitorar a secreção, a liberação de ATP dos grânulos plaquetários densos é medida simultane-

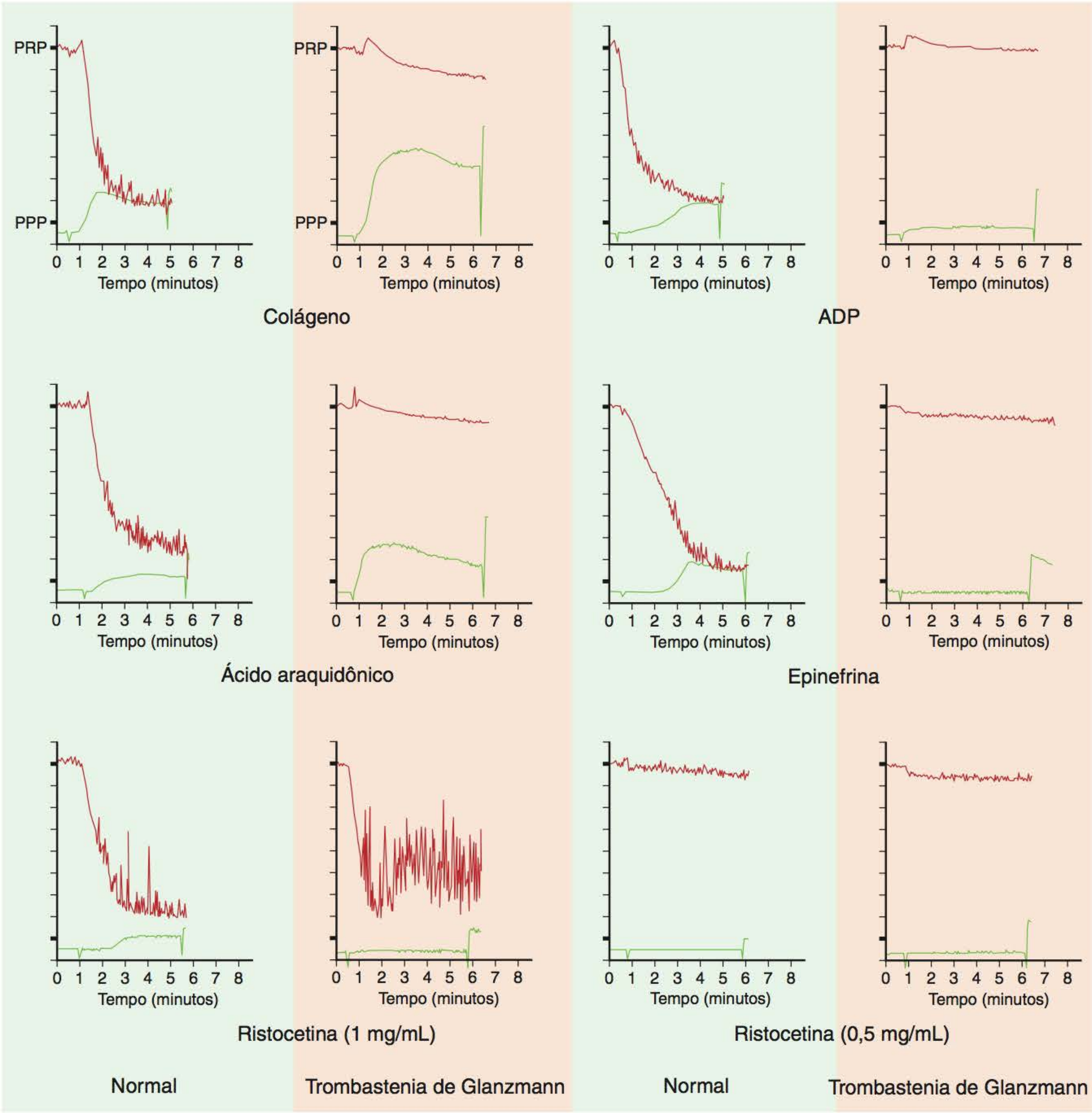


Figura 39.8 Estudos diagnósticos da lumiagregação plaquetária na trombastenia de Glanzmann. Agregação plaquetária e secreção de ATP medidas simultaneamente (lumiagregação). Em cada painel, o traçado superior exibe a agregação plaquetária, com o aumento da agregação mostrado como uma deflexão para baixo. Com plasma rico em plaquetas (PRP) inicialmente colocado em uma escala vertical completa de 90% e plasma pobre em plaquetas (PPP) de 10%, a deflexão máxima possível para baixo seria o nível da linha PPP. O traçado inferior em cada painel exibe a secreção plaquetária de ATP (monitorada como luminescência quando o ATP secretado reage com o reagente luciferina-luciferase presente no recipiente) como uma deflexão para cima. A deflexão abrupta ao término de cada traçado de secreção representa a resposta ao ATP acrescentado como um padrão de calibração interna. A medida simultânea da agregação e de um marcador da secreção dos grânulos densos pode potencialmente permitir a discriminação entre o distúrbio plaquetário que está afetando a etapa final da agregação plaquetária (como nesse exemplo de trombastenia de Glanzmann), ao contrário de uma anormalidade de um receptor para um agonista plaquetário específico ou uma anormalidade da sinalização intracelular que poderia prejudicar as respostas secretoras e até mesmo de agregação a agonistas plaquetários mais fracos (como ADP ou epinefrina), ainda que não prejudicasse acentuadamente as respostas aos agonistas plaquetários mais fortes (como o ácido araquidônico ou o colágeno). Notar que as plaquetas do paciente com trombastenia de Glanzmann agregam-se exclusivamente com concentrações moderadas ou altas de ristocetina: mesmo na ausência de GP IIb/IIIa para funcionar como um receptor para a formação de uma ponte entre as plaquetas pelo fibrinogênio, a ristocetina pode facilitar essa ponte de plaquetas mediante a ligação do fator de von Willebrand plasmático às cadeias de GP Ibα presentes em número normal nas plaquetas afetadas pela trombastenia de Glanzmann (ver Fig. 39.6). (Modificada com permissão de Miller JL, Schumackher H, Rock W, Stass S (eds.): Handbook of Hematologic Pathology. New York, Marcel Dekker, 2000.)

amente (Fig. 39.8). Isso é conseguido acrescentando-se um substrato que cause luminiscência e enzima, luciferina e luciferase, ao plasma rico em plaquetas; o ATP liberado então funciona como um cofator na produção da reação entre a luciferina e a luciferase que produz luz, e a emissão de luz é registrada como um segundo fotodetector. Em decorrência da separação das ondas luminosas, a agregação e os canais liberadores podem ser monitorados independentemente (Miller, 1984). Na maioria dos casos, pode-se pressupor que a liberação de ATP reflita a liberação de outros constituintes dos grânulos densos, medidos com menos facilidade (ADP, serotonina, cálcio). A estimativa direta da serotonina também pode ser realizada (Holmsen, 1989). Como alternativa aos estudos de lumiagregação, é possível estudar a secreção plaquetária em paralelo com a agregação deixando-se que as plaquetas captem serotonina radioativa e, em seguida, medindo-se a liberação de radioatividade pelas plaquetas à medida que são desafiadas com agentes agregantes (Lan, 2005).

Conforme ilustrado na Figura 39.9, há múltiplos receptores agonistas localizados na membrana da plaqueta. Após a ligação do agonista ao receptor, inicia-se uma série complexa de etapas sinalizadoras internas. Vários desses agonistas naturais, junto a diversos outros estímulos plaquetários, podem ser usados no laboratório de diagnóstico para determinar se uma ou mais dessas vias sinalizadoras de receptor de agonista estão funcionando normalmente. Os agonistas empregados frequentemente incluem colágeno, epinefrina, ADP, U46619 (um análogo do tromboxano A_2 [TxA_2]), ristocetina, ácido araquidônico e o ionóforo cálcio A23187. Embora tenha importância fundamental como estimulante das plaquetas *in vivo*, é difícil empregar a trombina com plasma rico em plaquetas, por causa da interferência decorrente da formação de fibrina. Entretanto, a trombina γ parcialmente tripsinizada retém a atividade estimulante de plaquetas mesmo perdendo quase toda a atividade coagulante, podendo ser útil (Charo, 1977). Além disso, sequências TRAP (peptídeo ativador do receptor de trombina, SFLLRN), derivadas da região do "ligando agarrado" extracelular do receptor da proteína G plaquetária de sete ligações no domínio transmembrana (Furman, 1998), podem ser úteis nos testes de função plaquetária.

Pela medida da impedância, é possível avaliar a agregação de plaquetas não apenas no PRP (plasma rico em plaquetas) como também no sangue total (Cardinal, 1980). Após o acréscimo de um agonista plaquetário à amostra misturada, a condutância entre dois eletrodos cai à medida que as plaquetas agregam-se nas superfícies dos eletrodos. As curvas resultantes de impedância *versus* o tempo compartilham muitas similaridades com as da transmissão da luz *versus* o tempo, embora sejam observadas diferenças características entre essas duas abordagens (Ingerman-Wojenski, 1984; Joseph, 1987). Quando a agregometria de impedância é combinada com a estimativa da secreção de ATP em amostras de sangue total (Ingerman-Wojenski, 1984), é possível fazer a avaliação rápida da função plaquetária com apenas um pequeno volume de sangue. Além disso, pode-se monitorar opticamente a agregação plaquetária no sangue total por meio da coagregação de contas revestidas com fibrinogênio impregnadas de um corante que absorve luz na região infravermelha do espectro eletromagnético. Essa abordagem inovadora foi introduzida recentemente para avaliar a eficácia do tratamento com uma variedade de inibidores plaquetários (ver Cap. 41). As capacidades contráteis das plaquetas ativadas também resultam em contração (ou "retração") dos coágulos formados. No tubo de ensaio, a retração do coágulo pode ser avaliada de forma quantitativa (Taylor, 1970). Na trombocitopenia ou na trombastenia de Glanzman, a retração do coágulo é demorada ou incompleta. Conforme demonstrado por estudos de inibição de anticorpo monoclonal (Coller, 1983), parece que o GP IIb/IIIa é necessário para a retração do coágulo. Embora o reconhecimento da sequência de tripeptídeos Arg-Gli-Asp (RGD) nos locais de ligação do fibrinogênio tenha um papel importante na ligação do fibrinogênio ao GP IIb/IIIa, com subsequente agregação plaquetária mediada pelo fibrinogênio, estudos recentes identificaram locais específicos dentro da cadeia γ do fibrinogênio que parecem ter influência na retração do coágulo (Podolnikova, 2003). Como esta facilita acentuadamente a lise subsequente do coágulo (Carroll, 1981), por meio desse processo as plaquetas podem ter um papel importante, facilitando a lise eventual do coágulo formado.

Papel das plaquetas na coagulação

Não apenas as plaquetas servem como os principais mediadores da hemostasia primária, como também desempenham um papel vital na coagulação. Embora a via do fator tecidual envolvendo a formação sequencial dos fatores VIIa e Xa resulte inicialmente na formação de quantidades mínimas de trombina, essa via é substituída rapidamente pela do inibidor tecidual (TFPI) (Deykin, 1982) e é provável que ela mesma não seja adequada para manter a hemostasia normal (Broze, 1990). No entanto, as quantidades mínimas de trombina que são formadas podem ter um papel crítico na ativação do fator XI em XIa na superfície das plaquetas ativadas. A ativação plaquetária (p. ex., pelo ADP ou pelo colágeno) resulta na geração de locais de ligação de alta afinidade pelo fator XI. O cininogênio de alto peso molecular ou a pro-

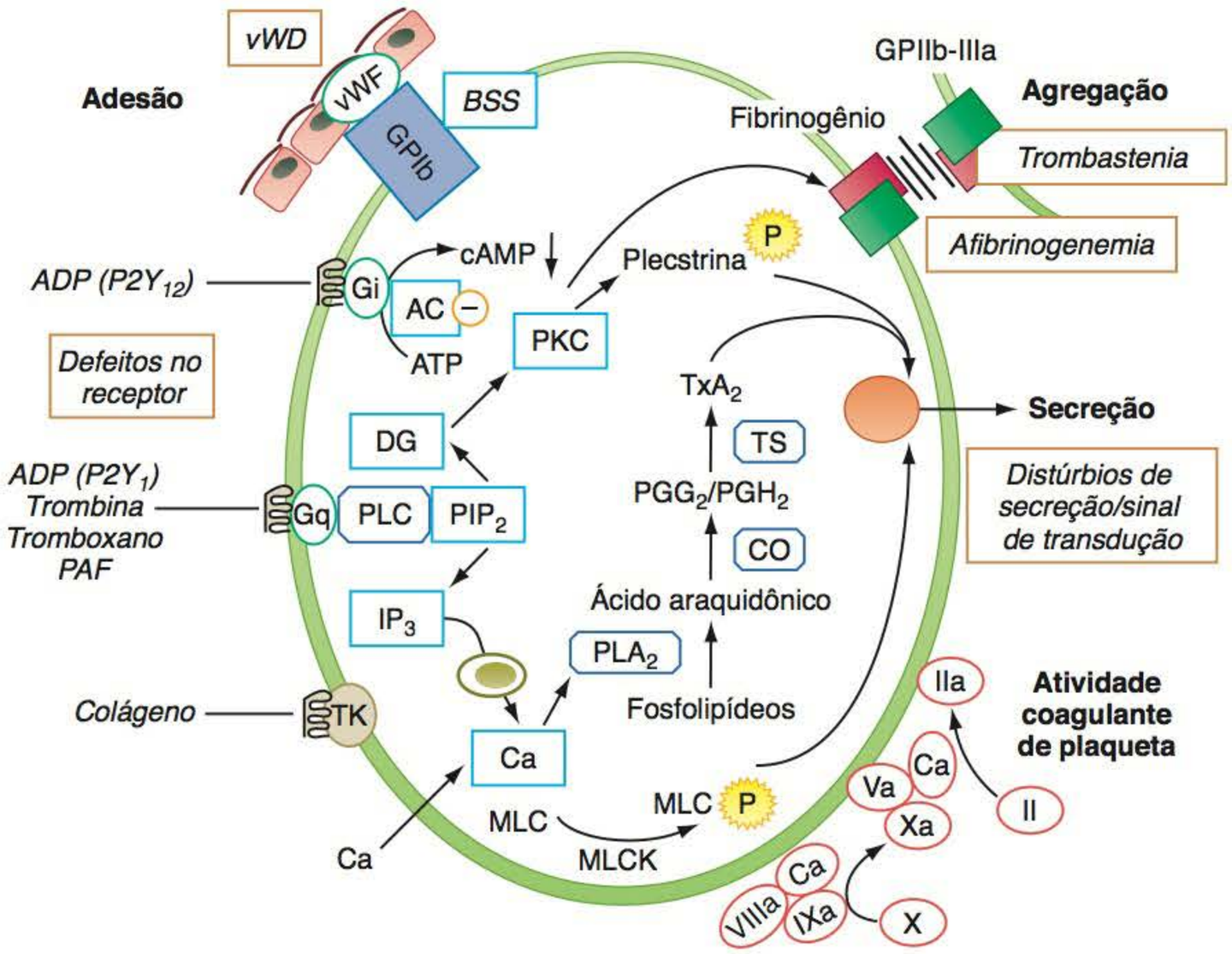


Figura 39.9 Representação esquemática de respostas plaquetárias selecionadas à ativação e aos distúrbios congênitos da função plaquetária. AC = adenililciclase; SBS = síndrome de Bernard-Soulier; CO = ciclo-oxigenase; DG = diacilglicerol; G = proteína de ligação ao GTP; IP_3 = inositol trisfosfato; CLM = cadeia leve da miosina; CLMQ = cadeia leve da miosina quinase; $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ = receptores de ADP acoplados à proteína G; PAF = fator ativador de plaquetas; PGG_2/PGH_2 = intermediários araquidônicos da via da prostaglandina; PIP_2 = fosfatidilinositol bisfosfato; PKC = proteinocinase C; PLA_2 = fosfolipase A_2; TK = tirosinocinase; PLC = fosfolipase C; TS = tromboxano sintase; TxA_2 = tromboxano A_2; DvW = doença de von Willebrand; vWF = fator de von Willebrand. Os algarismos romanos nos círculos representam fatores da coagulação e as letras P em amarelo indicam fosforilação. (Modificada com permissão de Rao AK: Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion. Am J Med Sci 1998; 316:69-76.)

trombina podem então servir como cofatores para a ativação pela trombina do fator XI ligado às plaquetas (Baglia, 1998; Oliver, 1999). Além disso, recentemente identificou-se uma interação específica entre resíduos dentro do fator XI e uma região localizada da cadeia α da GP Ib na plaqueta (Baglia, 2004a, 2004b). Sabe-se agora que, ao contrário do fator XI, os chamados "fatores de contato" (fator XII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular etc.) não são necessários para a hemostasia secundária efetiva. Esses achados parecem uma base estrutural razoável para se entender como a superfície da plaqueta pode facilitar a interação entre a via do fator tecidual e a via intrínseca da coagulação.

Após a estimulação das plaquetas por agonistas, há uma perda progressiva da assimetria da membrana fosfolipídica das plaquetas, o que resulta da maior movimentação da camada dupla ou "flip-flop" da fosfatidilserina e de outros fosfolipídeos das superfícies interna e externa da membrana (Fig. 39.3) (Hemker, 1983; Zwaal 2005). Acredita-se que uma proteína transmembrana denominada "escramblase" (Fig. 39.3) (Comfurius, 1996; Zhou, 1997) esteja envolvida nesse processo (Zwaal, 2005). A disponibilidade de superfícies altamente ordenadas de fosfolipoproteína permite que ocorra a ativação dos fatores IX, X e da protrombina na superfície da plaqueta. Além disso, as plaquetas contêm o fator endógeno V, que parece ter um papel fundamental na formação de um receptor na superfície da plaqueta para o fator X ativado (Miletich, 1978). O receptor celular da protease efetora (EPR)-1, uma proteína da membrana plaquetária dependente de ativação (Bouchard, 1997), junto com o fator V ativado, é necessário para mediar a ligação ao fator Xa à superfície de plaquetas ativadas para formar um complexo protrombinase funcional. Os complexos funcionais da coagulação foram descritos em detalhes no capítulo anterior.

Vias sinalizadoras intracelulares

Nos últimos anos, houve um progresso considerável na elucidação das vias sinalizadoras subjacentes à função plaquetária. De forma característica, essas vias envolvem a ativação de um receptor associada a uma sinalização inicial de fora para dentro e, por fim, de dentro para fora, que muda a conformação do GP IIb/IIIa de modo que permita a ligação do fibrinogênio. Após o evento primário de uma ligação extracelular do ligante a um receptor plaquetário específico (como receptores de ADP purinérgicos, receptores adrenérgicos de epinefrina, receptores de trombina etc.), a ocupação do receptor dispara um sinal que é traduzido pelas proteínas G e outros efetores (Fig. 39.9). Segue-se então uma cascata de eventos sinalizadores, inclusive a fosforilação de proteínas específicas. Como resultado desses processos, vários eventos discerníveis podem ser desencadeados, inclusive mudança de forma, secreção do conteúdo dos grânulos das plaquetas e uma modificação no estado conformacional do GP IIb/IIIa, que torna esse complexo glicoproteico competente para ligar o fibrinogênio e outras proteínas da adesão plaquetária, conforme descrevemos antes. A mobilização do ácido araquidônico dos fosfolipídeos da membrana e seu metabolismo pela via da ciclo-oxigenase até o potente agente pró-agregador TxA_2 constituem agora um mecanismo intermediário bem definido que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos às plaquetas. Todavia, mesmo após agentes inibidores potentes da ciclo-oxigenase como o ácido acetilsalicílico ("aspirina") terem bloqueado completamente essa via, estímulos fortes como a trombina, altas concentrações de colágeno e o ionóforo cálcio A23187 continuam capazes de induzir respostas agregatórias completas.

O cálcio desempenha vários papéis importantes na função plaquetária. Como a alteração na conformação do GP IIb/IIIa, que torna esse receptor competente para ligar o fibrinogênio (ver anteriormente), é dependente da presença de cálcio extracelular, a agregação induzida por praticamente todos os agonistas plaquetários, por sua vez, é dependente de cálcio. Uma exceção a esse princípio geral ocorre quando o ligante de adesão vWF une as plaquetas entre si por meio dos receptores de GP Ib/IX nas plaquetas adjacentes (ver adiante) – um processo independente de cálcio, mencionado às vezes como aglutinação de plaquetas para distingui-lo da agregação dependente de cálcio mediada pelo GP IIb/IIIa. Além disso, o cálcio é necessário para promover os mecanismos contráteis e secretores das plaquetas. De acordo com isso, também se pode esperar que defeitos hereditários e adquiridos na mobilização do cálcio pelas plaquetas após ativação, e agentes que interferem nos fluxos intraplaquetários de cálcio (p. ex., anestésicos locais), proteínas ligadoras de cálcio (p. ex., fenotiazinas) ou o cálcio livre extracelular (p. ex., agentes quelantes) exerçam efeitos inibitórios quando se testa a função das plaquetas.

Distúrbios quantitativos das plaquetas

Trombocitopenia

Trombocitopenia congênita

As trombocitopenias congênitas estão sendo reconhecidas cada vez com mais frequência, tendo sido documentadas várias anormalidades genéticas distintas nos pacientes que a possuem (Drachman, 2004). Um grupo diverso de síndromes autossômicas dominantes, incluindo a anomalia de May-Hegglin, a síndrome de Fletcher, a síndrome de Epstein e a síndrome de Sebastian, compartilha a característica de aumento de tamanho da plaqueta e demonstrou surgir de mutações no gene MYH9, que codifica a cadeia II de miosina pesada não muscular. Outras trombocitopenias congênitas que se caracterizam por aumento no tamanho das plaquetas incluem a síndrome de Bernard-Soulier, a síndrome velocardiofacial de DiGeorge, a trombocitopenia de Paris-Trousseau e mutações no fator de transcrição GATA 1.

Anormalidades nos pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich e trombocitopenia ligada ao X surgem de mutações no gene WAS, com os pacientes caracteristicamente tendo plaquetas pequenas. Nos pacientes com o distúrbio plaquetário familiar e predisposição para a leucemia mieloide aguda (DPF/LMA), a trombocitopenia autossômica dominante é secundária a mutações no gene CBFA2/AML1 e as plaquetas são de tamanho normal. Outras causas de trombocitopenias congênitas incluem a trombocitopenia amegacariocítica congênita, um distúrbio aaotossômico recessivo associado a mutações no receptor MPL da trombopoietina, a síndrome da plaqueta cinzenta e a trombocitopenia com ausência do osso rádio. Os pacientes com trombocitopenias congênitas podem ter defeitos associados nas respostas plaquetárias, além das baixas contagens de plaquetas.

Estabelecer a etiologia de uma trombocitopenia congênita em um caso individual pode ser um desafio que requer técnicas rotineiras especializadas e moleculares/citogenéticas. Tais técnicas podem incluir ensaio para a trombopoietina plasmática, ensaio do domínio extracelular da cadeia α da glicoproteína plaquetária Ib liberada pela trombopoietina plasmática ("glicocalicina") e análise *in vitro* da megacariocitopoiese (van den Oudenrijn, 2002).

As anemias aplásicas adquiridas que envolvem as linhagens eritroide e granulocítica, bem como a dos megacariócitos, são vistas mais comumente que as aplasias megacariocíticas puras. Exposições a substâncias químicas tóxicas, doenças virais e, frequentemente, causas inexplicadas podem ocasionar aplasia.

O estudo da medula óssea pode ser necessário para se avaliar se a trombocitopenia deve-se, pelo menos em parte, a alguma falha na produção de plaquetas. Em geral, os aspirados de medula óssea são menos confiáveis que as biópsias de medula óssea para se determinar o número existente real de megacariócitos. Em certas circunstâncias, podem ser encontradas anormalidades na estrutura dos megacariócitos, embora a mera presença de uma proporção aumentada das formas magacariocíticas mais imaturas, basofílicas, não deva ser considerada evidência de um distúrbio magacariocítico qualitativo.

Em contraste com as estimativas do número de megacariócitos, em geral é difícil avalar anormalidades no tamanho dessas células ou no seu padrão de lobulação a partir de cortes de biópsia ou coágulos, porque um corte pode ser uma amostra apenas de pequena parte do megacariócito, uma célula relativamente grande. Com tal finalidade, um esfregaço bem-preparado corado pelo Wright-Giemsa, ou de aspirado ou de biópsia por contato, costuma ser mais útil. Pode-se observar um número baixo de plaquetas circulantes na esplenomegalia de qualquer causa, em decorrência do aumento resultante no sequestro de plaquetas pelo baço. Essas considerações são discutidas em detalhes nos Capítulos 29 e 30.

Púrpura trombocitopênica imune

Conforme ilustrado por numerosos exemplos específicos na Tabela 39.3, uma ampla variedade de mecanismos pode levar à trombocitope-

Tabela 39.3 Mecanismos de destruição de plaquetas

Tipo de trombocitopenia	Exemplo(s) específico(s)
Imunomediados	
Destruição de plaquetas pelo sistema reticuloendotelial (SRE) mediada por autoanticorpo	Púrpura trombocitopênica imune primária; trombocitopenia imune "secundária" associada a doença linfoproliferativa, doença vascular do colágeno, infecções como a mononucleose infecciosa, a síndrome da imunodeficiência humana
Destruição de plaquetas pelo SRE mediada por aloanticorpo	Trombocitopenia neonatal aloimune; púrpura pós-transfusão; trombocitopenia passiva aloimune; refratariedade à transfusão de plaqueta aloimunes
Destruição de plaquetas pelo SRE mediada por autoanticorpo e dependente de fármacos	Púrpura trombocitopênica imune medicamentosa por anticorpo mediada por plaqueta (p. ex., quinino)
Ativação de plaquetas por ligação do Fc da imunoglobulinaG (IgG), de IgG dependente de fármacos a receptores plaquetários FcγIIa	Trombocitopenia induzida pela heparina
Não imunomediados	
Síndromes de ativação de plaquetas pela trombina ou citocinas pró-inflamatórias	Coagulação intravascular disseminada, septicemia/síndromes de resposta inflamatória sistêmica
Ingestão por macrófagos linfoproliferativos (hemofagocitose)	Infecções, certos distúrbios malignos
Destruição de plaquetas via interações de plaquetas com o vWF alterado	Púrpura trombocitopênica trombótica; síndrome hemolítico-urêmica
Perdas de plaquetas em superfícies artificiais	Cirurgia de derivação cardiopulmonar; uso de cateteres intravasculares
Sobrevida diminuída das plaquetas associada a doenças cardiovasculares	Cardiopatia congênita e adquirida; cardiomiopatia; embolia pulmonar

Fonte: modificada com permissão de Warkentin TE, Kelton JG: Thrombocytopenia due to plaqueta destruction and hypersplenism. Em Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, et al. (eds.): Hematology: Basic Principles and Practice. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2005, pp. 2305–2325.

Tabela 39.4 Características clínicas da púrpura trombocitopênica imunológica

	Crianças	Adultos
Ocorrência		
Pico etário (anos)	2–4	15–40
Sexo (F:M)	Igual	2.6:1
Apresentação		
Início	Agudo (maioria com sintomas há menos de 1 semana)	Insidioso (maioria com sintomas há mais de 2 meses)
Sintomas	Púrpura (menos de 10% com sangramento grave)	Púrpura (tipicamente sangramento sem gravidade)
Contagem de plaquetas	Maioria <20.000/μL	Maioria >20.000/μL
Evolução		
Remissão espontânea	83%	2%
Doença crônica	24%	43%
Resposta à esplenectomia	71%	66%
Recuperação completa eventual	89%	64%
Morbidade e mortalidade		
Hemorragia cerebral	<1%	3%
Morte por hemorragia	<1%	4%
Mortalidade por doença refratária crônica	2%	5%

Ver também análise mais detalhada das limitações pertinentes a essas distinções em George JN, Rizvi MA: Thrombocytopenia. Em Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds.): Hematology. New York, McGraw-Hill, 2001, p. 1495-1539.

Fonte: modificada com permissão de Diz-Kucukkaya R, Gushiken FC, Lopez JA: Thrombocytopenia. Em: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, eds. Williams Hematology. 7ª ed. New York: McGraw-Hill; 2006: 1758.

nia, resultando em maior destruição de plaquetas. Uma das formas mais importantes encontradas de aumento do consumo de plaquetas é o distúrbio adquirido denominado púrpura trombocitopênica imune (PTI). A história clínica, em geral, será mais útil para se chegar a um diagnóstico provável, em particular para distinguir as formas crônicas da doença (Tab. 39.4). O estudo das imunoglobulinas associadas às plaquetas nos pacientes em que existe suspeita da presença de PTI tem sido amplamente empregado na tentativa de identificar processos imunomediados (Nowak, 1996). No entanto, o valor preditivo de achados positivos, em tais casos, é questionável, porque a imunoglobulina que não influencia a sobrevivência ou a função das plaquetas pode estar associada a plaquetas em uma variedade de contextos clínicos (Kelton, 1982) e pode existir uma elevação inespecífica da IgG associada a plaquetas nos distúrbios associados a elevação da IgG plasmática. Como alternativa, dispõe-se de uma variedade de técnicas para ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), colocando-se anticorpos eluídos das próprias plaquetas do paciente ou soro do paciente para reagir com complexos de glicoproteínas purificados, imobilizados tipicamente em compartimentos por anticorpos monoclonais murinos. Muitos anticorpos patológicos podem falhar em reconhecer seus epítopos dentro de alvos glicoproteicos fornecidos dessa maneira artificial (especialmente no caso de GP Ib). Além disso, podem ocorrer resultados positivos falsos quando se usa soro do paciente que contenha anticorpos humanos antimurinos em título suficiente.

Uma orientação prática publicada pela American Society of Hematology, em 1996 (George, 1996), apresentou um ponto de vista bastante desanimador quanto ao valor realmente fornecido pelos testes para imunoglobulinas associadas a plaquetas ou anticorpos antiplaqueta na avaliação ante a suspeita de PTI. Contudo, os esforços para desenvolver melhores abordagens prosseguiram. Uma citometria de fluxo altamente inovadora emprega a transferência da fluorescência da energia de ressonância entre anticorpos do paciente e anticorpos monoclonais, conhecidos como anti-GP IIb/IIIa ou anti-GP Ib, para aumentar a especificidade da detecção de anticorpos (Koksch, 1995). Todavia, esse teste não tem sido muito utilizado, por causa das dificuldades de padronização. Alguns laboratórios também têm usado a mobilização de anticorpo monoclonal do antígeno plaquetário (MAIPA) para detectar autoanticorpos, seja obtido diretamente do soro de pacientes ou eluído de plaquetas, que é direcionado para complexos plaquetários específicos de glicoproteína (Kiefel, 1987; Hewitt, 1994; Clofent-Sanchez, 1996; Cordiano, 1996). Como os ensaios MAIPA preservam os antígenos plaquetários visados em uma forma mais original que a maioria das técnicas antes mencionadas, o MAIPA passou a ter o *status* de "melhor padrão" para a detecção de anticorpos antiplaqueta específicos. A propósito, é válido mencionar que recentemente foram relatados resultados bem semelhantes aos do ensaio MAIPA mediante o uso de uma abordagem inovadora, a técnica de citometria de fluxo multicolorida (Nguyen, 2004). Pode ser relevante continuar a avaliar essas e outras técnicas, para que os métodos laboratoriais venham a ocupar um papel central na avaliação da PTI (Beardsley, 1998).

Trombocitopenia medicamentosa

É preciso considerar sempre a trombocitopenia medicamentosa como causa de trombocitopenia aguda. Pode ser particularmente difícil identificar pacientes que estejam tomando vários medicamentos. Certos fármacos como heparina, quinidina, ouro e antibióticos à base de sulfa, têm tido uma frequência relativamente maior como causadores de trombocitopenia do que outros fármacos. Em particular, no caso desses fármacos, o laboratório pode ter um papel útil ao identificar o agente agressor se puder ser demonstrado um aumento

nos anticorpos do paciente direcionados contra um alvo plaquetário usando-se um dos ensaios descritos para PTI pela inclusão *in vitro* do fármaco em questão no ensaio realizado. É interessante o fato de que, se praticamente todas as plaquetas normais têm um local de ligação para anticorpos antiplaqueta surgindo em pacientes com hipersensibilidade à quinidina ou ao quinino, as plaquetas de pacientes com doença de Bernard-Soulier não parecem ter esse receptor (Kunicki, 1978b). Berndt (1985) forneceu evidência de que tais anticorpos podem ligar-se à subunidade β da glicoproteína IX, ou a uma região definida pela associação de glicoproteínas Ib e IX. No entanto, Pfueller (1988) sugeriu que a trombocitopenia induzida por quinino e quinidina pode resultar de anticorpos bastante heterogêneos entre os pacientes, reconhecendo neoantígenos compostos por vários epítopos sobre a superfície da plaqueta e o fármaco, ou novas conformações das glicoproteínas plaquetárias induzidas pelo fármaco. Além disso, em alguns pacientes, os anticorpos dependentes de quinidina também podem ser direcionados contra epítopos presentes dentro do complexo GP IIb/IIIa (Pfueller, 1988; Chong, 1991; Visentin, 1991; Nieminen, 1992).

Foram desenvolvidos fármacos antagonistas do GP IIb/IIIa plaquetário como o abciximabe, a eptifibatida, o tirofibano e vários outros agentes orais ou parenterais para inibir a responsividade das plaquetas. Uma variedade de técnicas também foi desenvolvida para monitorar a ocupação do receptor do GP IIb/IIIa, no intuito de otimizar a dosagem (Greilich, 1999; Quinn, 1999). Além da inibição antecipada da função plaquetária, alguns pacientes podem ter graus variáveis de trombocitopenia aguda após uma única exposição a antagonistas do GP IIb/IIIa (Madan, 1999). A trombocitopenia aguda resulta de anticorpos preexistentes dependentes do fármaco que se ligam ao complexo GP IIb/IIIa; além disso, os anticorpos dependentes do fármaco podem surgir subsequentemente como uma resposta imune à administração do fármaco (Aster, 2004).

Trombocitopenia induzida pela heparina

A exposição de um epítopo ainda não mostrado de uma proteína plaquetária de ocorrência natural a um fármaco também pode ser a etiologia subjacente da trombocitopenia induzida pela heparina (TIH), distúrbio em que os pacientes submetidos à terapia com heparina desenvolvem anticorpos que parecem ligar-se à região Fab'_2 do PF4, liberados de seus locais de aramazenamento intracelulares (Amiral, 1999). Acredita-se que a especificidade do anticorpo da TIH esteja direcionada contra epítopos dentro do PF4 que são expostos quando se formam complexos de heparina com PF4 (Rauova, 2005), conforme descrito em maiores detalhes no Cap. 41. Foram desenvolvidos ensaios para detectar que empregam o PF4 em complexo com a heparina ou uma molécula parceira semelhante como um alvo para os anticorpos existentes no soro de pacientes suspeitos de terem TIH (Amiral, 1992). Em contraste com os ensaios para antígeno, há uma série de ensaios para detectar ativação de plaquetas, em que o plasma ou soro dos pacientes é incubado com plaquetas de teste lavadas e um ou mais de uma variedade de eventos subsequentes podem então ser avaliados. Tais eventos incluíram a estimativa da secreção de serotonina radioativa previamente captada pelas plaquetas, liberação de quimioluminiscência do nucleotídeo adenina endógeno, agregação plaquetária e produção de micropartículas de plaquetas (Warkentin, 1999a). O bom desempenho dos ensaios para verificar a ativação de plaquetas depende da seleção dos doadores de plaquetas, as quais sejam sensíveis à ativação por soro de pacientes com TIH. Em geral, os ensaios para antígeno tendem a ser mais sensíveis à presença de formação de anticorpo contra TIH que os ensaios para ativação de plaquetas, e podem ser úteis para monitorar a soroconversão subclínica de anticorpos contra a TIH (Zwicker, 2004). Por outro lado, em razão da maior sensibilidade dos ensaios para antígeno na detecção de anticorpos sinais clínicos, sugeriu-se que os para ativação de plaquetas na verdade podem ter maior valor preditivo positivo na TIH clínica (Warkentin, 1999a). É interessante notar que um estudo recente que empregava imunoensaios enzimáticos revelou que o teste exclusivamente para anticorpos IgG aumenta a especificidade diagnóstica, evitando anticorpos não patogênicos frequentes das classes IgM e IgA (Warkentin, 2005a). Orientações detalhadas para a integração dos testes laboratoriais para a TIH em pacientes que estejam recebendo heparina foram publicadas recentemente (Warkentin, 2004; Zwicker, 2004). Vale ressaltar a recomendação baseada em evidência recente contra o teste rotineiro para anticorpo da TIH na ausência de trombocitopenia, trombose, lesões cutâneas induzidas pela heparina ou outras sequelas da TIH; a contagem rotineira de plaquetas em pacientes que estejam recebendo terapia com heparina, ao contrário, pode ser de grande auxílio para identificar corretamente os pacientes que precisam de testes mais específicos para a TIH (Warkentin, 2004). Nos pacientes com diagnóstico estabelecido de TIH, é preciso instituir formas alternativas de terapia anticoagulante, como os inibidores diretos da trombina, lepirudina ou argatrobano. A monitoração laboratorial dos inibidores diretos da trombina é discutida no Capítulo 41.

Nos casos em que a etiologia da trombocitopenia de um paciente continua obscura apesar de uma avaliação abrangente, pode-se considerar a avaliação da sobrevivência das plaquetas. Isso pode ser feito mediante a marcação das próprias plaquetas do paciente ou heterólogas com um isótopo radioativo, observando-se então a sobrevivência das plaquetas reinfundidas. O cromo-51 e o fósforo-32 DF usados no passado apresentam inúmeros problemas metodológicos, tendo sido suplantados em grande parte pelo índio-111 (Heaton, 1979, 1989; Leissinger, 2001). Embora haja relatos de sucesso na estimativa do tempo de vida da plaqueta com o marcador não radioativo biotina em cães (Heilmann, 1993) e camundongos (Ault, 1995; Manning, 1996), tal método não tem sido aplicado em humanos. A avaliação da cinética plaquetária normalmente não faz parte da avaliação de pacientes trombocitopênicos. Contudo, em casos excepcionais de trombocitopenias crônicas refratárias ao tratamento, observou-se que em alguns grupos a estimativa da sobrevivência das plaquetas foi útil para distinguir distúrbios da produção de plaquetas daqueles de sua destruição, em particular no contexto de uma decisão quanto a possível esplenectomia (Rossi, 2002; Bader-Meunier, 2003).

Púrpura trombocitopênica trombótica

Até recentemente, os distúrbios microangiopáticos conhecidos como púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) e síndrome hemolítico-urêmica (SHUS) eram considerados muito parecidos e mais bem distinguidos com base na apresentação clínica que nos achados laboratoriais. Tal situação mudou radicalmente em 1998, quando dois grupos independentes (Furlan, 1998; Tsai, 1998) demonstraram que a patogênese da PTT estava relacionada com a atividade deficiente de uma metaloproteinase plasmática que cliva o vWF, agora conhecida como ADAMTS-13. Isso resulta em moléculas incomumente grandes de vWF (chamadas "UlvWF"), capazes de ligar-se a plaquetas e produzir trombos plaquetários na microcirculação (Moake, 1986; Tsai, 1998). Em contraste, a atividade de uma protease que cliva o vWF parece ser normal na SHU (Furlan, 1998). Assim, tanto a sensibilidade como a especificidade dos níveis plasmáticos de ADAMTS-13 para o diagnóstico de PTT têm sido questionadas em vários estudos. Portanto, nem a presença de um nível normal de ADAMTS-13 (implicando produto gênico normal), nem a ausência de anticorpos neutralizantes demonstráveis no plasma de pacientes que satisfazem os demais critérios para PTT é suficiente para excluir o diagnóstico (George, 2004; Peyvandi, 2004). Tem-se observado também que pacientes com uma variedade de distúrbios sistêmicos do tecido conjuntivo (Mannucci, 2003), bem como aqueles com PTI, coagulação intravascular disseminada e uma variedade de outros distúrbios, têm níveis diminuídos de ADAMTS-13 (Moore, 2001). Até o momento, não se sabe até que ponto esses achados refletem idiossincrasias dos testes empregados, em vez de refletirem mecanismos fisiopatológicos compartilhados ou distintos entre esses diversos distúrbios. Sem dúvida, os ensaios desenvolvidos originalmente envolviam um grande número de etapas no processo dos testes, inclusive fazendo-se o plasma do paciente reagir com um substrato livre da protease do vWF previamente desnaturado com guanidina ou ureia, realizando-se eletroforese em gel com o vWF degradado, *immunoblotting* e então demonstrando-se uma persistência anormal de multímeros de vWF de alto peso molecular. Foram feitos esforços contínuos para simplificar e encurtar o tempo necessário para os ensaios para ADAMTS-13. Uma das primeiras modificações desse método foi na etapa final, em que um ensaio ELISA tenicamente menos exigente da capacidade residual do vWF de ligar-se a uma superfície revestida por colágeno foi substituído por uma análise multimérica do vWF (Gerritsen, 1999). Mais recentemente, os esforços

voltaram-se para o desenvolvimento de ensaios simplificados em uma etapa da atividade proteolítica plasmática contra moléculas que captam novamente os resíduos críticos de vWF necessários para a proteólise pela ADAMTS-13 (Kokame, 2004; Whitelock, 2004). Embora tais ensaios tenham vantagens nítidas em termos de tempo, com relação à tomada de decisão diagnóstica, seu papel potencial em tal tomada de decisão ainda não está esclarecido.

Trombocitose

O aumento da contagem de plaquetas, ou trombocitose, pode ser visto como um processo reativo benigno (Tab. 39.5) e uma manifestação de um distúrbio mieloproliferativo (Griesshammer, 1999; Schafer, 2004). O esfregaço sanguíneo deve confirmar uma contagem eletrônica de células, mostrando que o aumento de partículas na verdade corresponde a plaquetas e não a fragmentos celulares ou outras entidades. O esfregaço também oferece uma oportunidade para avaliar desvios no tamanho das plaquetas, no aspecto morfológico delas e tendências à formação de aglomerados. Indícios de que se está lidando com um processo clonal autônomo ou reativo secundário podem ser fornecidos por vários achados clínicos e laboratoriais (Tab. 39.6).

Estabeleceu-se que os processos reativos não resultam tipicamente em contagens de plaquetas acima de 1.000×10^9 L, mas os processos mieloproliferativos frequentemente o fazem; apesar disso, esse critério não é confiável para o diagnóstico nem para a decisão de instituir terapia antiplaquetária. Particularmente no caso de síndromes mieloproliferativas, o paciente pode estar assintomático, ter tendência a sangramento ou a desenvolver eventos trombóticos; no momento, a abordagem clínica mais apropriada parece ser uma resposta a tais tendências assim que ficam evidentes. A menos que haja outros fatores de risco, é menos provável que ocorram eventos trombóticos na trombocitopenia secundária que na primária (Griesshammer, 1999). Em casos documentados de síndromes mieloproliferativas, há relatos de anormalidades na estrutura das plaquetas e dos megacariócitos, nos receptores da superfície da membrana das plaquetas, nos padrões de agregação plaquetária, na atividade coagulante das plaquetas e no metabolismo do ácido araquidônico. Apesar de anormalidades estatisticamente significativas quando se comparam populações de pacientes com distúrbios mieloproliferativos ou trombocitose, no paciente individual é improvável que estudos de parâmetros como o tamanho e a função das plaquetas sejam capazes de diferenciar esses distúrbios (Sehayek, 1988).

Tabela 39.5 Condições reativas em que podem ser encontradas contagens plaquetárias elevadas

Processos transitórios
Perda sanguínea aguda
Recuperação ("rebote") da trombocitopenia
Infecção aguda ou inflamação
Resposta ao exercício
Processos mantidos
Deficiência de ferro
Anemia hemolítica
Asplenia (p. ex., após esplenectomia)
Câncer
Doenças crônicas inflamatórias ou infecciosas
Distúrbios do tecido conjuntivo
Arterite temporal
Doença intestinal inflamatória
Tuberculose
Pneumonite crônica
Reações medicamentosas
Vincristina
Ácido all-transretinoico
Citocinas
Fatores de crescimento

Fonte: com permissão de Schafer AI: Thrombocitosis. N Engl J Med 2004; 350:1211-1219.

Tabela 39.6 Achados clínicos que podem distinguir entre trombocitose clonal e secundária (reativa)

Achado	Trombocitose clonal*	Trombocitose secundária (reativa)
Doença sistêmica subjacente	Não	Em geral clinicamente aparente
Isquemia digital ou cerebrovascular	Característica	Não
Trombose arterial ou venosa de grande vaso	Risco aumentado	Não
Complicações hemorrágicas	Risco aumentado	Não
Esplenomegalia	Sim, em cerca de 40% dos pacientes	Não
Esfregaço de sangue periférico	Plaquetas gigantes	Plaquetas normais
Função plaquetária	Pode estar anormal	Normal
Megacariócitos na medula óssea:		
Número	Aumentado	Aumentado
Características morfológicas	Formas gigantes displásicas com maior ploidia; associadas a grandes massas de restos plaquetários	Normais

* A trombocitose clonal inclui trombocitemia essencial e outros distúrbios mieloproliferativos.

Fonte: com permissão de Schafer AI: Thrombocytosis. N Engl J Med 2004; 350:1211-1219.

Distúrbios de função plaquetária hereditários

A Tabela 39.7 fornece uma classificação baseada nas funções plaquetárias ou respostas anormais (Fig. 39.7). Embora alguns desses distúrbios sejam raros, elucidam muito sobre a fisiologia da plaqueta. Em pacientes com defeitos nas interações entre a plaqueta e a parede dos vasos (distúrbios da adesão), a adesão das plaquetas ao subendotélio é anormal. Os dois distúrbios nesse grupo são a doença de von Willebrand (vWF), decorrente de deficiência ou anormalidade no vWF plasmático, e a síndrome de Bernard-Soulier (SBS), em que as plaquetas têm deficiência de GP Ib (e GP V e GP IX); em ambas, a interação entre as plaquetas e o vWF está comprometida. Os distúrbios caracterizados por interações anormais entre as plaquetas (distúrbios da agregação) surgem por causa de uma deficiência grave de fibrinogênio plasmático (afibrinogenemia congênita) ou uma anormalidade quantitativa ou qualitativa da membrana da plaqueta (trombastenia de Glanzman). Pacientes com defeitos na secreção de plaquetas e na transdução do sinal são um grupo heterogêneo considerado em conjunto mais por conveniência de classificação do que com base no entendimento da anormalidade subjacente específica. As principais características em comum nesses pacientes, conforme se percebe atualmente, são respostas anormais de agregação e uma incapacidade de liberação do conteúdo dos grânulos intracelulares após ativação do plasma rico em plaquetas com agonistas como o ADP, a epinefrina e o colágeno. Nos estudos sobre a agregação, a segunda onda de agregação é anulada ou está ausente. Uma pequena proporção desses pacientes tem uma deficiência de armazenamento nos grânulos densos (deficiência do compartimento de armazenamento). Em alguns outros pacientes, a secreção prejudicada resulta de aberrações nos eventos de transdução do sinal que determinam respostas finais como a secreção e a agregação. Por fim, alguns pacientes têm uma anormalidade nas interações de plaquetas com proteínas do sistema de coagulação, mais bem descrita na síndrome de Scott. Além dos grupos citados, há pacientes com função plaquetária anormal associada a distúrbios sistêmicos como a síndrome de Down e a anomalia de May-Hegglin, cujos mecanismos plaquetários aberrantes específicos ainda não estão esclarecidos.

Tabela 39.7 Classificação dos distúrbios hereditários da função plaquetária

1. Defeitos na interação da plaqueta com a parede vascular (distúrbios da adesão)
   i. Doença de von Willebrand (deficiência ou defeito no fator de von Willebrand plasmático)
   ii. Síndrome de Bernard-Soulier (deficiência ou defeito no GP Ib/IX)
2. Defeitos na interação entre plaquetas (distúrbios da agregação)
   i. Afibrinogenemia congênita (deficiência de fibrinogênio plasmático)
   ii. Trombastenia de Glanzmann (deficiência ou defeito no GP IIb/IIIa)
3. Distúrbios da secreção plaquetária e anormalidades dos grânulos
   i. Deficiência do compartimento de armazenamento
   ii. Distúrbio de plaquetas de Quebec
4. Distúrbios da secreção plaquetária e defeitos da transdução do sinal (defeitos primários da secreção)
   i. Defeitos na interação da plaqueta com o agonista (defeitos no receptor)
   Defeitos no receptor: tromboxano A_2, colágeno, ADP, epinefrina
   ii. Defeitos na ativação da proteína G
   - Deficiência de $G\alpha_q$
   - Anormalidades das $G\alpha_s$
   - Deficiência de $G\alpha_{i1}$

   iii. Defeitos no metabolismo do fosfatidilinositol
   Deficiência de fosfolipase C-β2
   iv. Defeitos na mobilização do cálcio
   v. Defeitos na fosforilação de proteína (plequistrina)
   - Deficiência de PKC-θ

   vi. Anormalidades nas vias do ácido araquidônico e na síntese do tromboxano A_2
   - Comprometimento da liberação de ácido araquidônico
   - Deficiência de ciclo-oxigenase
   - Deficiência de tromboxano sintase
5. Defeitos na regulação do citoesqueleto
   Síndrome de Wiskott-Aldrich
6. Distúrbios da interação da plaqueta com a proteína coagulante (defeitos nos fosfolipídeos da membrana)
   Síndrome de Scott
7. Diversos

Fonte: modificada com permissão de Rao AK: Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion. Am J Med Sci 1998; 316:69-76.

Distúrbios da adesão plaquetária

Síndrome de Bernard-Soulier

A síndrome de Bernard-Soulier (SBS) é um distúrbio autossômico recessivo da função plaquetária que resulta de uma anormalidade no complexo plaquetário GP Ib-IX, que medeia a ligação do vWF às plaquetas e, portanto, que desempenha um papel importante na adesão plaquetária ao subendotélio, especialmente com índices maiores de cisalhamento. A GP Ib existe nas plaquetas na forma de complexo, consistindo em GP Ib, GP IX e GP V. Há aproximadamente 25.000 cópias de GP Ib/X nas plaquetas, que estão reduzidas ou anormais na SBS. Embora a GP V também esteja diminuída nas plaquetas em pacientes com SBS, não é necessária para a expressão da GP Ib/IX na superfície das plaquetas. O tempo de sangramento está acentuadamente prolongado, as contagens de plaquetas estão moderadamente diminuídas e, no esfregaço de sangue periférico, as plaquetas são de tamanho maior. Nos estudos de agregação plaquetária, as respostas aos agonistas de uso comum ADP, epinefrina, trombina e colágeno são normais. Caracteristicamente, a agregação em plasma rico em plaquetas em resposta à ritocetina está diminuída ou ausente, aspecto compartilhado com pacientes com DvW. Entretanto, o vWF e o fator VIII plasmáticos estão normais na SBS. A secreção (de grânulos densos) à ativação com trombina pode estar diminuída.

O esfregaço sanguíneo de um paciente com SBS pode lembrar o de alguns pacientes com PTI, porque as plaquetas tendem a ser maiores que o normal e há trombocitopenia discreta a moderada. Os achados no agregômetro são quase recíprocos dos encontrados na trombastenia de Glanzmann: a agregação e a liberação são normais com todos os agentes, exceto a ristocetina. Além disso, a reação de liberação induzida pela trombina pode estar diminuída.

Ao contrário da DvW, em que a aglutinação de plaquetas também está diminuída em resposta à ristocetina, na SBS o acréscimo de vWF exógeno (presente em frações de crioprecipitado de plasma) não restabelece a aglutinação de plaquetas induzida pela ristocetina. Essa diferença importante é atribuível ao achado de que, enquanto na DvW há uma deficiência no vWF plasmático, na SBS a deficiência é no receptor da membrana das plaquetas ao qual o vWF precisa ligar-se para promover a hemostasia normal.

Quando as glicoproteínas da superfície plaquetária de pacientes com SBS são analisadas (Fig. 39.2), observa-se uma queda acentuada na glicoproteína Ib (Nurden, 1975). Entretanto, quando são empregadas técnicas muito sensíveis para a detecção dessa glicoproteína, quantidades residuais de Ib podem ser detectadas (Drouin, 1988; Finch, 1990). Estudos moleculares identificaram uma variedade de mutações pontuais ou deleções na GP Ibα, na GP Ibβ e na GP IX que, quando presentes em homozigose ou heterozigose dupla, resultam em um fenótipo clássico de SBS. Uma mutação pontual na região rica em leucina da cadeia da GP Ib também pode ocasionar um fenótipo de Bernard-Soulier quando se expressa apenas por um único alelo (Miller, 1992; Ware, 1993).

Anormalidades da glicoproteína Ia/IIa e da glicoproteína VI

Nieuwenhuis (1985, 1986) relatou a ausência da glicoproteína Ia de alto peso molecular (168kDa) em uma mulher de 33 anos de idade com um distúrbio hemorrágico leve cujas plaquetas não exibiram resposta ao colágeno. Kehrel (1988) identificou uma segunda paciente com achados similares, mas cujas plaquetas apresentavam, além disso, ausência de trombospondina intacta. O mais interessante é que não apenas a tendência a sangramento mas também as anormalidades estruturais e funcionais desapareceram nessa paciente no início da menopausa. Anormalidades da GP VI foram associadas a maior tendência a sangramento; além disso, polimorfismos da GP VI estão sendo estudados como possíveis fatores de risco para trombose (Moroi, 1989; Arai, 1995; Nieswandt, 2001; Cabeza, 2004; Nurden, 2004; Yee, 2004).

Doença de von Willebrand

Ver seção "Fator de von Willebrand e doença de von Willebrand", adiante.

Distúrbios da agregação plaquetária

Trombastenia de Glanzmann

A trombastenia de Glanzmann é um distúrbio autossômico recessivo raro, que se caracteriza por agregação plaquetária acentuadamente comprometida, um tempo de sangramento prolongado e manifestações hemorrágicas mucocutâneas relativamente mais graves que na maioria dos distúrbios da função plaquetária (Nurden, 2001). Há relatos sobre grupos populacionais em que a consanguinidade é comum. As plaquetas normais em repouso têm aproximadamente complexos de 50.000-80.000 GP IIb/IIIa na superfície. A anormalidade primária na trombastenia é um defeito quantitativo ou qualitativo no complexo GP IIb/IIIa, um heterodímero que consiste em GP IIb e GP IIIa cuja síntese é determinada por genes distintos localizados no cromossomo 17. Portanto, a trombastenia pode surgir de uma mutação em cada gene, com menor expressão plaquetária do complexo. Por causa disso, a ativação e a agregação do fibrinogênio ligado às plaquetas ficam prejudicadas. Foi descrita uma variedade de mutações distintas envolvendo a GP IIb e a GP IIIa em pacientes com trombastenia (French, 2000). A retração do coágulo, uma função da interação do complexo GP IIb/IIIa com o citoesqueleto das plaquetas, também fica comprometida.

Em esfregaços de sangue não anticoagulado de pacientes com trombastenia de Glanzmann, as plaquetas estão presentes em número e aspecto normais, mas mostram uma tendência característica a permanecerem isoladas, sem a aglomeração entre elas observada em esfregaços sanguíneos normais. A característica diagnóstica da trom-

bastenia é a ausência ou diminuição acentuada da agregação plaquetária (Fig. 39.8), em resposta a praticamente todos os agonistas plaquetários (exceto a ristocetina), com ausência tanto da onda primária como da secundária de agregação; a resposta de alteração da forma é preservada. A secreção de grânulos densos pode estar diminuída com agonistas fracos (p. ex., o ADP), mas normal na ativação pela trombina. Heterozigotos têm aproximadamente a metade do número de complexos GP IIb/IIIa nas plaquetas, porém as respostas de agregação plaquetária são completamente normais.

Como o antígeno plaquetário Pl^{A1} está associado à glicoproteína IIIa, encontra-se tipicamente diminuído em pacientes com trombastenia de Glanzmann (Kunicki, 1978a; von dem Borne, 1981). A estimativa relativa de moléculas de glicoproteínas IIb/IIIa mediante a ligação de anticorpos monoclonais específicos permite o diagnóstico de trombastenia de Glanzmann pela citometria de fluxo, sendo necessários apenas pequenos volumes de sangue para o ensaio (Montgomery, 1983; Kempfer, 1991). Embora não costumem fazer parte dos exames diagnósticos clínicos de rotina, análises de glicoproteína plaquetária, como as mostradas na Figura 39.2, tiveram considerável importância histórica ao demonstrar as relações entre estrutura e função de tais distúrbios. A caracterização definitiva de homozigosidade verdadeira ou heterozigosidade composta de diferentes mutações pode ser feita por técnicas moleculares (Bray, 1994; French, 1998; Rosenberg, 1998; Ruan, 1998; Gonzalez-Manchon, 1999). Embora a afibrinogenemia congênita também se caracterize por uma ausência similar de agregação plaquetária, nesse distúrbio o TP, o TTPA e o tempo de trombina estão acentuadamente prolongados, enquanto estão normais na trombastenia.

Distúrbios da secreção e transdução de sinal plaquetárias

Como um tema unificado, os pacientes inclusos nesse grupo heterogêneo em geral manifestam comprometimento da secreção do conteúdo dos grânulos e ausência da segunda onda da agregação, após estimulação de plasma rico em plaquetas com ADP ou epinefrina; as respostas ao colágeno, ao análogo do tromboxano (U46619), ao ácido araquidônico e ao fator ativador de plaquetas (PAF) também podem estar comprometidas. Em termos conceituais, a função plaquetária é anormal nesses pacientes quando o conteúdo dos grânulos está diminuído (deficiência do compartimento de armazenamento, SPD) ou quando há uma aberração na ativação dos mecanismos que determinam a agregação e a secreção (Tab. 39.6).

Deficiência dos estoques dos grânulos

O termo SPD (*storage pool deficiency*) aplica-se aos pacientes com deficiências de conteúdo dos grânulos densos plaquetários (δ-SPD), grânulos α (α-SPD) ou ambos os tipos de grânulo (αδ-SPD) (Hayward, 1997; Rao, 2005b). O distúrbio de plaquetas Quebec é um distúrbio hemorrágico autossômico dominante associado a proteólise anormal e deficiência de proteínas no grânulo d (Kahr, 2001; McKay, 2004).

Os pacientes com deficiência no compartimento de armazenamento δ (SPD-δ) têm uma diátese hemorrágica discreta a moderada associada a um tempo de sangramento prolongado. Nos estudos plaquetários, a segunda onda de agregação em resposta ao ADP e à epinefrina está ausente ou bloqueada, e a resposta ao colágeno está acentuadamente comprometida. No entanto, foram observadas respostas de agregação comprometidas (Weiss, 1981) e normais (Ingerman, 1978) ao ácido araquidônico. As respostas à epinefrina também podem ser variáveis, observando-se uma segunda onda de agregação em alguns pacientes (Weiss, 1988). É interessante o fato de que a SPD-δ foi documentada (Nieuwenhuis, 1987; Israels, 1990) em pacientes com tempos de sangramento prolongados e respostas de agregação normais. A secreção de hidrolases ácidas induzida pela trombina também fica comprometida nas plaquetas afetadas pela SPD, o que é corrigido pelo acréscimo de ADP endógeno.

Plaquetas normais têm três a oito grânulos densos (cada um com 200–300nm de diâmetro) (Israels, 1990). À microscopia eletrônica, os grânulos densos estão diminuídos nas plaquetas afetadas pela SPD (White, 1971; Israels, 1990). Outros métodos que demonstram uma diminuição na quantidade de grânulos densos incluem a macroscopia por imunofluorescência após coloração das plaquetas com metacrina (quinacrina), que se localiza nos grânulos densos por causa da alta afinidade pelo ATP, e coloração específica por íons de uranil (reação uranafínica) tanto da membrana como da parte central dos grânulos densos. A citometria de fluxo também pode ser aplicada para avaliar a coloração fluorescente desses grânulos (Linden, 2004). De acordo com estimativas bioquímicas diretas, o total de plaquetas e o conteúdo de ATP e ADP dos grânulos estão diminuídos (Holmsen, 1979), da mesma forma que outros constituintes dos grânulos densos, como cálcio, fosfato e serotonina. Dois terços do ATP e do ADP plaquetários ficam nos grânulos densos, com uma quantidade menor no compartimento metabólico, havendo proporcionalmente mais ADP que ATP nos grânulos densos (Holmsen, 1979). Assim, nas plaquetas afetadas pela SPD-δ, a proporção do total de ATP e ADP aumenta (mais de duas vezes e meia), em comparação com plaquetas normais. A incubação de plaquetas normais com serotonina marcada pelo carbono 14 resulta em sua incorporação nos grânulos densos e subsequente secreção após ativação. Nas plaquetas de pacientes com SPD, a taxa inicial de captação de serotonina marcada pelo carbono 14 é normal, mas os níveis de saturação e sua rotação após 4-6 horas diminuem.

Outras anormalidades relatadas na SPD-δ incluem síntese diminuída de prostaglandinas, TxA_2 e malonildialdeído nas plaquetas ativadas com colágeno e epinefrina, mas não araquidonato (Weiss, 1988), liberação comprometida de ácido araquidônico dos fosfolipídeos da membrana (Rendu, 1978) e elevação nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} induzida pelo ADP mas não pela trombina (Lages, 1997). Foi relatado comprometimento da atividade pró-coagulante plaquetária (atividade de protrombinase) induzida após ativação, associado a uma incapacidade de manter níveis intracelulares elevados de Ca^{2+} (Weiss, 1997).

Há relatos de SPD-δ associada a outros distúrbios hereditários, como a síndrome de Hermansky-Pudlak (SHP) (albinismo oculocutâneo e aumento do ceroide reticuloendotelial), a síndrome de Chediak-Higashi, a síndrome de Wiskott-Aldrich, a síndrome de trombocitopenia e ausência do rádio, e a síndrome de Griscelli (Menasche, 2000; Gunay-Aygun, 2004). A ocorrência simultânea de SPD-δ e defeitos nos grânulos cutâneos de pigmento, como na SHP, apontam a falta de inter-relação dos dois tipos de grânulos quanto ao controle genético, conceito ainda mais nítido em modelos animais (Novak, 1984, 1985; Huizing, 2001; Gunay-Aygun, 2004).

As membranas dos grânulos densos têm as proteínas lisossômicas (LAMP)2 e CD63 (granulofisina ou LAMP3) (Nishibori, 1993; Israels, 1996), bem como a P-selectina e o complexo GP IIb/IIIa. Há deficiência de granulofisina nas plaquetas de pacientes com SHP (Gerrard, 1991). Estudos com o anticorpo antigranulofisina demonstraram a presença do número anormal de grânulos nas plaquetas de dois pacientes não albinos com SPD (McNicol, 1994); portanto, esses pacientes têm os grânulos, mas seu conteúdo está reduzido.

Uma quantidade substancial de nossa informação sobre a SPD foi obtida de pacientes com SHP, que se caracteriza por albinismo oculocutâneo, plaquetas com SPD e lipofuscinose (Gunay-Aygun, 2004). Há um grande grupo de pacientes com SHP no noroeste de Porto Rico, onde a doença ocorre em 1 de cada 1.800 indivíduos (frequência gênica de 1 em 21) (Witkop, 1990). Há pelo menos 7 genes conhecidos como causadores de SHP, resultando em 7 subtipos de SHP humana, com a maioria dos pacientes tendo SHP-1 e sendo de Porto Rico (Gunay-Aygun, 2004). Existem pelo menos 14 modelos de SHP em camundongos relatados até o momento, dos quais 7 constituem modelos para os subtipos humanos (Gunay-Aygun, 2004). Em conjunto, os modelos humanos e de camundongos têm sido uma fonte inestimável de informação sobre a formação de vesículas e sinalização. Os subtipos humanos de SHP são autossômicos recessivos e os heterozigotos não apresentam achados clínicos. Além do albinismo, que varia entre os subtipos de SHP, a maioria dos pacientes tem nistagmo congênito e acuidade visual reduzida. Há duas manifestações adicionais nos pacientes com SHP: colite granulomatosa e fibrose pulmonar (Gunay-Aygun, 2004).

A síndrome de Chediak-Higashi é um distúrbio autossômico recessivo raro que se caracteriza por SPD, albinismo oculocutâneo, deficiência imune, disfunção neurológica e presença de inclusões citoplasmáticas gigantes em células diferentes (Huizing, 2001). Os pacientes com essa síndrome apresentam células T citotóxicas e defeito na

função das células destruidoras naturais (*natural killer*). A síndrome surge de mutações no gene regulador lisossômico da sinalização (LYST) no cromossomo 1. A proteína codificada por esse gene interage com várias proteínas, inclusive o complexo SNARE da proteína HRS e proteínas sinalizadoras, e participa das reações de fusão da membrana intracelular e da sinalização para as vesículas (Tchernev, 2002).

A designação de "síndrome da plaqueta cinzenta" (SPC) derivou da observação inicial de Raccuglia (1971) de um aspecto cinzento das plaquetas, com pobreza de grânulos nos esfregaços de sangue periférico de um paciente com um distúrbio hemorrágico vitalício. Caracterizada por uma deficiência isolada de conteúdo dos grânulos α, os pacientes com essa síndrome têm uma diátese hemorrágica hereditária autossômica recessiva por toda a vida, além de trombocitopenia discreta e tempo de sangramento prolongado (Weiss, 1979; Gerrard, 1980). À microscopia eletrônica, as plaquetas e os megacariócitos revelam ausência ou diminuição acentuada de grânulos α (Levy-Toledano, 1981). As plaquetas apresentam deficiência grave e seletiva de proteínas nos grânulos α: PF4, tromboglobulina b, vWF, trombospondina, fibronectina, fator V, cininogênio de alto peso molecular e PDGF (Gerrard, 1980; Nurden, 1982). As respostas de agregação plaquetária têm sido variáveis. As respostas ao ADP e à epinefrina foram normais na maioria dos pacientes; em alguns, as respostas de agregação plaquetária à trombina, ao colágeno e ao ADP estavam prejudicadas. Comprometimento da mobilização do Ca^{2+} induzido pela trombina e aumento do transporte de Ca^{2+} foram relatados em alguns pacientes.

Foram encontrados níveis plasmáticos elevados de PF4 e βTG (Gerrard, 1980), sugerindo que o defeito não é na sua síntese pelos megacariócitos, mas no seu acondicionamento nos grânulos. Estudos feitos com megacariócitos cultivados de sangue periférico de três pacientes com SPC mostraram que o vWF é sintetizado, mas secretado no espaço extracelular, em vez de ser acondicionado normalmente no grânulo α. Os neutrófilos desses pacientes também têm menos grânulos (Drouin, 2001). Há aumento da reticulina na medula óssea nesses pacientes (Breton-Gorius, 1981; Levy-Toledano, 1981), atribuído aos níveis plasmáticos elevados de PDGF. Usando microarranjos de cDNA, Hyman (2003) encontrou suprarregulação de proteínas do citoesqueleto, inclusive a fibronectina 1, as trombospondinas 1 e 2 e o colágeno VIa em fibroblastos de um paciente com a SPC.

O distúrbio de plaquetas de Quebec é autossômico dominante e associado a sangramento tardio e proteólise anormal das proteínas do grânulo α, em virtude das quantidades elevadas de ativados plaquetário do plasminogênio tipo urocinase (Kahr, 2001; McKay, 2004). Os pacientes caracterizam-se por contagens de plaquetas normais a reduzidas, degradação proteolítica de proteínas solúveis da membrana dos grânulos α, deficiência de uma proteína ligadora do fator V no grânulo α denominada multimerina e agregação defeituosa seletiva com a epinefrina. O fator V plaquetário, mas não o fator V plasmático, é degradado com outras proteínas do grânulo α, fibrinogênio, vWF, trombospondina, osteonectina, fibronectina e P-selectina. As plaquetas apresentam maior atividade fibrinolítica. Em contraste com a síndrome das plaquetas cinzentas, elas parecem morfologicamente normais à microscopia óptica. Os pacientes com o distúrbio de plaquetas de Quebec apresentam sangramento mucocutâneo, em geral 12 a 24 horas após lesão, e que não responde a transfusões de plaquetas, mas o faz a inibidores fibrinolíticos (McKay, 2004).

Defeitos na transdução do sinal plaquetário

Os mecanismos de transdução do sinal abrangem processos que são iniciados pela interação de agonistas com receptores plaquetários específicos e incluem respostas como a ativação da proteína G e de enzimas efetoras como a fosfolipase C e a fosfolipase A_2. Se os componentes fundamentais na transdução do sinal forem os receptores de superfície, as proteínas G e os efetores, já existe evidência de anormalidades específicas em cada um desses níveis.

Nos pacientes com defeitos na interação entre plaqueta e agonista, as respostas estão comprometidas por causa de uma anormalidade no receptor de superfície da plaqueta a um agonista específico. Tais defeitos em receptor foram documentados com relação à epinefrina, ao colágeno, ao ADP e ao TxA_2 (Rao, 2004). Hirata (1994) descreveu uma mutação na Arg 60 para Leu do receptor humano de TxA_2 em um distúrbio hemorrágico de herança dominante. Os pacientes descritos por Cattaneo (1992; 1997) e Nurden (1995) tinham um defeito no receptor P2Y12 do ADP, que está acoplado à inibição da adenilil ciclase. Como o ADP e o TxA_2 desempenham um papel sinérgico nas respostas plaquetárias a vários agonistas, esses pacientes manifestam respostas anormais a múltiplos agonistas. Mais recentemente, foram documentadas deficiências específicas nos receptores P2Y1 (Oury, 1999) e P2X (Oury, 2000) do ADP. Foram descritos poucos pacientes em que a anulação isolada das respostas plaquetárias estavam associadas a deficiências das glicoproteínas da membrana GP Ia e GP VI (Kahn, 2004).

As proteínas G são um grupo heterogêneo de proteínas que se ligam a receptores de superfície e enzimas efetoras intracelulares; defeitos em sua ativação podem prejudicar a transdução do sinal. Pacientes com deficiências no nível de $G\alpha_q$ (Gabbeta, 1997) e $G\alpha_{i1}$ (Patel, 2003) foram descritos. O paciente com deficiência de $G\alpha_q$ tinha um distúrbio hemorrágico leve, respostas anormais de agregação e secreção a numerosos agonistas e atividade diminuída da GTPase (um reflexo da função da subunidade a da proteína G) à ativação. Achados plaquetários anormais praticamente idênticos foram relatados em camundongos *knockout* com deficiência de $G\alpha_q$ (Offermanns, 1997).

A transdução do sinal também é prejudicada por defeitos na ativação da fosfolipase C, na mobilização do cálcio e na fosforilação da plequistrina. Foram identificados vários pacientes que tinham uma diátese hemorrágica relativamente discreta e comprometimento da secreção nos grânulos densos, embora suas plaquetas tivessem estoques normais de grânulos e, em geral, sintetizassem quantidades substanciais de TxA_2. Aos testes laboratoriais, esses pacientes apresentam agregação e secreção anormais, em particular em resposta a agonistas fracos (ADP, epinefrina, PAF); a resposta a agonistas relativamente mais fortes, como o ácido araquidônico e altas concentrações de colágeno, pode ser normal. Tais pacientes parecem ser mais comuns que aqueles com SPD ou defeitos na síntese de TxA_2. Defeitos nos eventos iniciais da ativação plaquetária, inclusive a mobilização de Ca^{2+}, a hidrólise de fosfatidil inositol e a fosforilação da plequistrina (uma proteína fosforilada pela proteinocinase C) foram descritos (Rao, 2004). Deficiências específicas no nível de fosfolipase C-β_2 (Lee, 1996; Yang, 1996) e na proteinocinase C-θ (Sun, 2004) foram documentados.

A ativação da GP IIb/IIIa e a ligação do fibrinogênio plaquetário são pré-requisitos para a agregação e um processo dependente da transdução do sinal. Defeitos na ativação da GP IIb/IIIa devidos a defeitos na transdução do sinal foram observados em alguns pacientes (Gabbeta, 1996).

Uma das principais respostas plaquetárias à ativação é a liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos e sua subsequente oxigenação em TxA_2, que tem um papel sinérgico na resposta a vários agonistas. Foram descritos pacientes com comprometimento da liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos da membrana durante a estimulação de plaquetas, bem como com deficiências congênitas da sintase da ciclo-oxigenase e do tromboxano (Rao, 2004).

Defeitos na montagem do citoesqueleto

A síndrome de Wiskott-Aldrich é um distúrbio hereditário ligado ao X que afeta os linfócitos T e as plaquetas, caracterizado por trombocitopenia, imunodeficiência e eczema (Remold-O'Donnell, 1996). As manifestações hemorrágicas são variáveis. Diversas anormalidades plaquetárias, inclusive deficiência nos grânulos densos e de GP Ib, GPiib/IIIa e GP Ia, foram relatadas. A síndrome de Wiskott-Aldrich surge de mutações no gene que codifica uma nova proteína de 502 aminoácidos que se liga a várias outras proteínas sinalizadoras, inclusive a Cdc42 (uma GTPase) e a p47nck (uma proteína adaptadora que contém SH3) (Remold-O'Donnell, 1996; Zigmond, 2000). Essa proteína constitui uma ligação entre o citoesqueleto e as vias sinalizadoras, sendo o principal regulador da montagem do citoesqueleto.

Distúrbios da atividade pró-coagulante das plaquetas

As plaquetas desempenham um papel fundamental na coagulação sanguínea, ao fornecerem uma superfície em que ocorrem várias reações enzimáticas específicas e importantes. Conforme dito antes, nas plaquetas em repouso, há uma assimetria na distribuição de alguns dos fosfolipídeos, de maneira que a fosfatidilserina (PS) e a fos-

fatidiletanolamina estão localizadas predominantemente no folheto interno, enquanto a fosfatidilcolina tem a distribuição oposta. A ativação da plaqueta resulta em uma redistribuição com expressão de PS na superfície externa, mediada pela escramblase de fosfolipídeo (Fig. 39.3). A exposição da PS à superfície externa é um evento importante para a expressão das atividades plaquetárias pró-coagulantes. Poucos pacientes foram descritos, nos quais a contribuição plaquetária para a coagulação sanguínea está comprometida, o que é conhecido como síndrome de Scott (Weiss, 1994; Solum, 1999b). Em tais pacientes, que tinham um distúrbio hemorrágico, o tempo de sangramento e as respostas de agregação eram normais, além de TP e TPP também normais. No paciente descrito por Weiss (1994), havia menos locais de ligação do fator Xa nas plaquetas, bem como dos fatores IXa e VIIIa, problema associado a uma expressão menor da PS na superfície após ativação plaquetária.

Frequências relativas das várias anormalidades congênitas das plaquetas

A trombastenia e a SBS são distúrbios raros. Embora não haja dados publicados, é provável que os pacientes atualmente classificados na categoria heterogênea de defeitos na secreção plaquetária e na transdução do sinal constituam aqueles com as anormalidades na função plaquetária encontradas com maior frequência, excluindo a DvW. De acordo com nossa experiência, a SPD está presente em menos de 10 a 15% dos pacientes com defeitos congênitos das plaquetas. Ocorrem anormalidades na produção de tromboxano em cerca de 20% desses pacientes. Dos pacientes restantes, uma grande proporção que apresenta agregação e secreção anormais demonstra estoques adequados nos grânulos densos e produz quantidades substanciais de TxA_2. Em alguns desses pacientes, há evidência de defeitos nos mecanismos sinalizadores (Rao, 2004).

Fator e doença de von Willebrand

Biologia do fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand é uma proteína fundamental na hemostasia, desempenhando papéis importantes tanto na primária como na secundária. No último caso, o vWF serve como uma proteína carreadora para o fator VIII – na ausência de vWF, o fator VIII é rapidamente depurado do plasma (ver Cap. 39). Quanto à hemostasia primária, o vWF serve como um ligante da adesividade plaquetária que leva a plaqueta a unir-se ao colágeno exposto nos locais de lesão vascular. O vWF circulante no plasma sanguíneo deriva da secreção por células endoteliais. Tal secreção tem um componente constitutivo principal, mas além disso há um compartimento de vWF liberável armazenado nos corpúsculos de Weibel-Palade. Os megacariócitos também sintetizam vWF, que é armazenado nos grânulos α das plaquetas. O compartimento do vWF só é liberado após ativação plaquetária, como parte da reação de liberação plaquetária mais geral. Embora tal vWF liberado, geralmente, não seja capaz de elevar o nível total de vWF no plasma de forma apreciável, o aumento local de vWF onde há lesão pode ser significativo.

O gene do vWF está localizado no cromossomo 12 e tem 178 kB de comprimento, estendendo-se por 52 exons. A presença de uma duplicação parcial, mas não funcional, do gene do vWF no cromossomo 22 (pseudogene do vWF) é uma consideração importante para a elaboração de iniciadores para amplificação do gene do vWF. Após a clivagem de um fragmento polipeptídico N terminal, a proteína vWF madura com 2.050 aminoácidos é composta por uma série de domínios funcionais, conforme mostrado na Figura 39.10. As unidades monoméricas individuais do vWF estão unidas por uma série de pontes de dissulfeto que ocorrem tanto perto das terminações N como C (Tsai, 2003). Os multímeros resultantes podem alcançar pesos moleculares que ultrapassam 20 MDa. Contudo, logo após sua secreção, os multímeros de vWF sofrem reparo proteolítico pela metaloproteinase ADAMTS-13. Embora haja um sítio de clivagem potencial entre Tir842 e Met843 dentro do domínio A2 de cada multímero do vWF, após certo grau de proteólise, a proteólise pela ADAMTS-13 de locais potenciais dentro do vWF é interrompida – presumivelmente em razão do obstáculo estérico imposto pela ADAMTS-13 ao penetrar

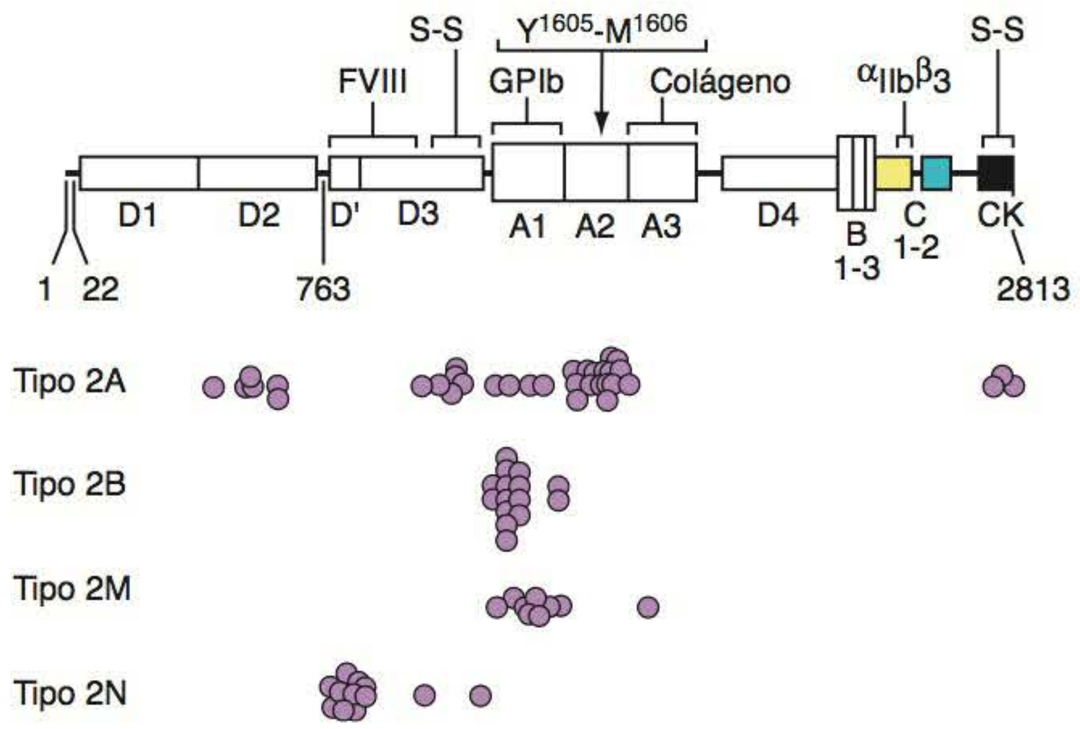


Figura 39.10 Estrutura do fator de von Willebrand (vWF) e mutações na doença de von Willebrand (DvW) do tipo 2. O vWF precursor consiste em um peptídeo sinalizador (resíduos 1-22), um pró-peptídeo (resíduos 23-763) e a subunidade madura (resíduos 764-2813). As localizações estão indicadas para domínios repetidos (A, B, C, D, CK); locais de ligação para o fator VIII (FVIII), a glicoproteína Ib (GP Ib), o colágeno e a integrina $\alpha_{II}b\beta_3$; intersubunidade de ligações dissulfeto (S–S); e a ligação Tir-Met clivada pela ADAMTS-13 (Y^{1605}–M^{1606}). Abaixo da estrutura esquemática do vWF, são mostradas as localizações de mutações que causam os subtipos específicos de DvW do tipo 2. (Sadler JE: New concepts in von Willebrand disease. Annu Rev Med 2005; 56:175, fig. 1. Reproduzida com permissão de Annual Review of Medicine, Volume 56 © 2005 by Annual Reviews www. annualreviews.org.)

profundamente na estrutura multimérica do vWF. A deficiência de ADAMTS-13, seja em virtude da anormalidade congênita ou da formação de autoanticorpos contra a enzima, resulta em multímeros de vWF "incomumente grandes" circulando no plasma. Tais formas são capazes de agregar espontaneamente as plaquetas, bem como de formar grandes faixas ancoradas à P-selectina endotelial (Padilla, 2004), que podem resultar em fragmentação de eritrócitos – dois atributos característicos do distúrbio denominado púrpura trombocitopênica trombótica (PTT).

Nos locais de lesão vascular, o vWF liga-se ao colágeno subendotelial exposto. Particularmente em condições de alto cisalhamento, em que o fluxo sanguíneo é relativamente alto nos vasos de menor diâmetro, o vWF ligado e a GP Ibα na superfície das plaquetas do sangue circulante são capazes de juntar-se, fazendo a plaqueta aderir efetivamente ao local da lesão. Essa interação do ligante com o receptor produz ainda uma sinalização de fora para dentro através da membrana da plaqueta, levando à ativação plaquetária. Um componente dessa ativação consiste em uma sinalização de dentro para fora no interior do GP IIb/IIIa, que torna esse complexo receptor competente para unir-se ao ligante fibrinogênio agregador. No laboratório clínico, é possível fazer a avaliação antigênica, funcional e até estrutural do vWF. Embora antigamente o antígeno do vWF fosse quantificado por uma variedade de abordagens eletroforéticas em gel, agora pode ser medido com alta precisão por métodos rápidos como ELISA ou procedimentos imunoturbométricos.

Doença de von Willebrand e seus subtipos

Conforme mostrado na Tabela 39.8, há uma variedade de condições clínicas associadas a anormalidades do vWF. Na DvW do tipo 1, moléculas qualitativamente normais de vWF estão presentes no plasma, mas em menor quantidade. Assim, há uma distribuição normal de multímeros de vWF de todos os tamanhos, embora em quantidades menores do que as normais de cada um (Fig. 39.11). Em um sentido, a DvW do tipo 3 representa uma extensão extrema da anormalidade quantitativa, pois há ausência total do produto gênico vWF. Todavia, embora a DvW do tipo 1 hereditária se expresse tipicamente de forma autossômica dominante, a do tipo 3 é autossômica recessiva, com nenhum parente de um paciente acometido exibindo doença sintomática. Como uma das principais funções do vWF é servir como molécula carreadora para o fator VIII, os pacientes com o tipo 3 não apenas sofrem com a função plaquetária como também correm maior risco hemostático, por causa das quantidades muito baixas de fator circulante VIII.

Tabela 39.8 Classificação da doença de von Willebrand

Tipo	Descrição
1	Deficiência quantitativa parcial do fator de von Willebrand (vWF)
2	Deficiência qualitativa de vWF
2A	Função diminuída do vWF dependente de plaqueta com deficiência seletiva de multímeros de alto peso molecular
2B	Maior afnidade pela glicoproteína Ib plaquetária
2M	Função diminuída do vWF dependente de plaqueta com multímeros presentes de alto peso molecular
2N	Ligação acentuadamente diminuída do fator VIII ao vWF
3	Deficiência completa de vWF

Fonte: adaptada de Sadler JE: A revised classification of von Willebrand disease. Thromb Haemost 1994; 71:520-525.

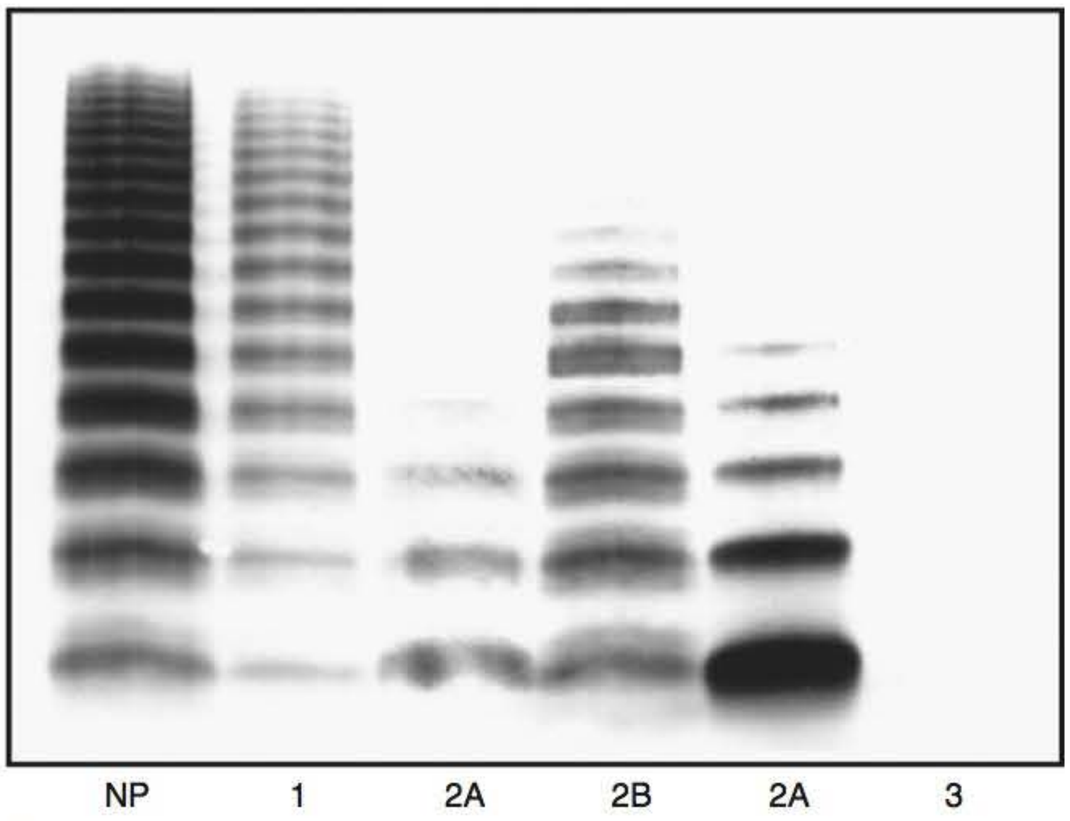


Figura 39.11 Os padrões multiméricos em variantes selecionadas da DvW. Amostras de plasma foram analisadas para o vWF por eletroforese em gel de agarose-SDS e *Western blotting*. São mostrados os padrões para plasma normal (NP) e pacientes com os tipos indicados de DvW. Notar que, tanto no exemplo 2A como no 2B há uma perda relativa de multímeros de alto peso molecular, embora em proporções variáveis. É importante notar que a extensão real da perda de multímeros é altamente variável entre pacientes de cada subtipo, e as diferenças na extensão da perda de multímeros entre os subtipos 2A e 2B ilustradas nesses exemplos, em particular, não devem ser consideradas como base para a distinção correta entre esses subtipos nos estudos diagnósticos. Em vez disso, são necessários estudos funcionais para distinguir entre o subtipo 2A, com diminuição da função, e o subtipo 2B, com aumento da função (ver texto). (Adaptada com permissão de Sadler JE: New concepts in von Willebrand disease. Annu Rev Med 2005; 56:173–191 e Sadler JE: von Willebrand disease. Em Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds.): Hemostasia and Thrombosis. New York, Churchill Livingstone, 1994, pp. 843-857.)

Os pacientes com DvW do tipo 2 têm uma ou outra das muitas anormalidades qualitativas descritas dessa proteína complexa. Com objetivos práticos, essas anormalidades têm sido agrupadas em um pequeno número de subtipos. Na DvW do tipo 2A, não há multímeros de alto peso molecular (Fig. 39.11), com perda correspondente da funcionalidade do vWF, em virtude de mutações que impedem a multimerização adequada, ou aumentam a suscetibilidade do vWF completamente formado à proteólise pela ADAMTS-13 ou por outras enzimas proteolíticas. É interessante que em algumas circunstâncias o vWF sintetizado por megacariócitos e estocado nos grânulos α das plaquetas parece ter um complemento mais pleno de multímeros que o vWF plasmático derivado da secreção por células endoteliais; pode ser que isso seja um reflexo dos efeitos protetores da proteólise decorrente do sequestro dentro dos grânulos α. Na DvW do tipo 2B, mutações pontuais dentro da molécula do vWF realmente conferem um aumento da capacidade funcional com relação à habilidade de ligação da proteína GP Ib plaquetária ao receptor. A ligação de moléculas anormais de vWF do tipo 2B a plaquetas circulantes na ausência de lesão hemostática apropriada acarreta uma depleção não compensada dos multímeros plasmáticos de alto peso molecular do vWF (Fig. 39.11) e tipicamente também uma trombocitopenia discreta a moderada. No laboratório clínico, esse aumento de função pode ser demonstrado pela habilidade de concentrações anormalmente baixas (em geral 0,3 a 0,5 mg/mL) do modulador ristocetina agregarem o plasma rico em plaquetas de tais pacientes. Em contraste, no caso da DvW do tipo 2A ou do tipo 1, a extensão e/ou a taxa de agregação cai abaixo do normal nas concentrações consideradas como padrão de ristocetina, de 1 a 1,5 mg/mL. Pacientes com DvW do tipo 2M compartilham um fenótipo similar de diminuição da função com a DvW do tipo 2A, mas as mutações responsáveis por esse subtipo de DvW não resultam em uma perda da estrutura multimérica normal do vWF. Se, em vez de testar o plasma do próprio paciente rico em plaquetas, for testado plasma do paciente sem plaquetas quanto à atividade do cofator ristocetina, o nível estará baixo não apenas nos tipos 1, 2A e 2M, mas também no 2B, por causa da deficiência adquirida de multímeros de alto peso molecular realmente remanescentes no plasma do paciente. Na DvW do tipo 1, o nível de antígeno do vWF e a atividade do cofator ristocetina em geral caem ao mesmo tempo. Em contraste, nos pacientes com o tipo 2, é típica uma queda mais acentuada na atividade do cofator ristocetina que no nível do antígeno do vWF, pois é precisamente a perda de multímeros de alto peso molecular que é crítica para a interação do vWF com a plaqueta, que é medida por esse ensaio funcional. Pode-se observar uma discrepância semelhante entre a atividade de ligação do vWF ao colágeno e o antígeno do vWF. Por fim, pacientes com a DvW do tipo 2N (Normandy) têm mutações pontuais dentro da molécula do vWF que prejudicam especificamente a capacidade dessa molécula de ligar-se ao fator VIII. Assim, pacientes com o tipo 2N podem exibir níveis bastante normais do antígeno do vWF e mesmo da atividade do cofator ristocetina, mas isso será responsável pelos níveis anormalmente baixos do fator VIII circulante. Como o gene do vWF é transmitido de forma autossômica, deve-se suspeitar da DvW do tipo 2N nos casos em que parece haver um padrão autossômico de herança para a deficiência do fator VIII. O diagnóstico definitivo é feito quando se demonstra o comprometimento da ligação do fator VIII normal ao vWF no paciente, como por um ensaio ELISA e por métodos diagnósticos moleculares.

Considerando que, pelo menos em termos conceituais, a base para diagnosticar a DvW dos tipos 2 e 3 parece clara, o mesmo não se pode dizer quanto ao tipo 1 (Sadler, 2003, 2005). O nível de vWF circulante resulta de influências multigênicas. Não apenas os genes que codificam o vWF, como também os que codificam proteínas transportadoras intracelulares – genes ABO que afetam as modificações pós-tradução da molécula do vWF, genes que afetam a proteólise do vWF e, sem dúvida, ainda outros fatores genéticos – influenciam a quantidade e a funcionalidade do vWF. Por exemplo, pode-se esperar que os indivíduos que herdam os mesmos genes do vWF têm 20% ou menos dos níveis circulantes de vWF se forem do grupo sanguíneo do tipo O e não do tipo AB. Em algumas circunstâncias, isso pode fazer a diferença entre ser considerado como tendo um nível normal ou deficiente de vWF. Além disso, Sadler (2003) argumentou que, em razão da prevalência relativamente alta tanto de sintomas hemorrágicos brandos como deficiências leves de vWF, pode ser errôneo concluir que a simples demonstração de uma queda discreta a moderada no nível plasmático de vWF seja a causa real da maior tendência hemorrágica de um paciente. Em tais circunstâncias, pode ser importante ainda investigar outras etiologias possíveis de um aparente distúrbio da hemostasia primária, especificamente uma anormalidade da agregação ou secreção plaquetária em resposta a um ou mais agonistas plaquetários.

No distúrbio hemorrágico autossômico dominante denominado doença de von Willebrand do tipo plaquetário (Miller, 1982; Weiss, 1982), os pacientes caracteristicamente têm contagens de plaquetas baixas e normais, atividade coagulante do fator VIII normal, antígeno do vWF normal ou diminuído e menor atividade do cofator ristocetina. À eletroforese em gel de agarose do plasma, há uma queda seletiva de multímeros de alto peso molecular, semelhante à observada na DvW do tipo 2B. No entanto, ao contrário das plaquetas de pacientes com DvW do tipo 2B, as de pacientes com DvW do tipo plaquetário mostram maior capacidade de ligar o vWF normal (Miller, 1983). No

laboratório diagnóstico, essa ligação aumentada reflete-se na habilidade de concentrações incomumente baixas de ristocetina (0,3–0,5 mg/mL) produzirem forte agregação plaquetária nesse distúrbio, achado também observado na DvW do tipo 2B (Ruggeri, 1980). Todavia, o crioprecipitado (que contém vWF) acrescentado a plaquetas de pacientes com DvW do tipo plaquetário sem agentes agregantes adicionais é capaz de induzir agregação; em contraste, o crioprecipitado acrescentado a plaquetas normais ou de pacientes com DvW do tipo 2B não acarreta agregação. Plaquetas de pacientes com DvW do tipo plaquetário também exibem reações únicas de aglutinação com vWF desialilado (vWF asialo) (Miller, 1987). Mostrou-se que a base molecular da DvW do tipo plaquetário é uma mutação em uma única base que resulta na substituição de uma glicina por valina no resíduo 233 de aminoácido da cadeia α da glicoproteína Ib (Miller, 1991). Uma substituição da valina por metionina seis aminoácidos à frente, no resíduo 239, foi relatada subsequentemente em duas outras famílias (Takahashi, 1995; Russell, 1993). Acredita-se que cada uma dessas mutações induza alterações na conformação do receptor, acarretando a ligação de vWF com peso anormal (Pincus, 1991; Miller, 1996). Mais recentemente, também foi relatado um fenótipo semelhante resultante da deleção de nove aminoácidos em uma região inesperadamente distante da cadeia α da glicoproteína Ib (Othman, 2005).

Testes laboratoriais para o vWF

Como fica evidente a partir da consideração da estrutura do domínio do vWF (Fig. 39.10), esse fator é potencialmente capaz de ligar-se a várias moléculas diferentes. A avaliação de tal ligação compreende um grupo de testes funcionais da molécula do vWF. Os principais testes funcionais para o vWF empregados atualmente na avaliação de pacientes centralizam-se na ligação do vWF às plaquetas, ao colágeno e ao fator VIII.

Embora, como ocorre com várias outras proteínas plasmáticas, o vWF contenha uma sequência de tripeptídeos RGD por meio da qual potencialmente pode ligar-se à integrina plaquetária GP IIb/IIIa, o principal receptor plaquetário para o vWF avaliado no laboratório clínico é o complexo GP Ib/IX/V. Em termos específicos, o vWF liga-se à cadeia α da molécula de GP Ib (GP Ibα). Como as próprias plaquetas contêm uma reserva disponível de vWF nos seus grânulos α, e a ligação do vWF exógeno a plaquetas normais e saudáveis pode levar à liberação daquele vWF armazenado (ver antes), é preciso que os ensaios para vWF plasmático evitem a contribuição de tal vWF liberado. Felizmente, a fixação de plaquetas normais com formalina preserva a reatividade da GP Ibα ao vWF, ao mesmo tempo que destrói efetivamente as respostas metabólicas da célula necessárias para manter a secreção. Além disso, tais plaquetas fixadas podem ser liofilizadas e então reconstituídas no momento do teste. Quando essas plaquetas são incubadas em condições de mistura com ristocetina, a taxa e a extensão de sua agregação tornam-se uma função da quantidade de vWF contida em amostras de plasma usadas no ensaio. Esse teste da reatividade do vWF com plaquetas é denominado "atividade do cofator ristocetina sobre o vWF", e pode ser realizado manualmente em um agregômetro padrão ou por uma variedade de abordagens mais automatizadas. Como as estimativas da atividade do cofator ristocetina tradicionalmente tinham um coeficiente de variação relativamente alto (i. e., baixa precisão), em comparação com outros testes para coagulação realizados em laboratório, foram buscadas estimativas alternativas da interação entre o vWF e a GP Ibα plaquetária, inclusive ensaios baseados no ELISA ou outras tecnologia (Vanhoorelbeke, 2000, 2002). Conforme comentado antes, os multímeros de alto peso molecular são mais ativos na ligação a plaquetas que os de baixo peso molecular, de modo que se espera que a atividade do cofator ristocetina esteja diminuída na vigência de deficiência de multímeros de alto peso molecular, mesmo que a quantidade total de vWF seja normal (i. e., nos casos em que há uma abundância relativa de multímeros apenas de alto peso molecular).

A estimativa da atividade de ligação do vWF ao colágeno é mais direta que a da atividade do cofator ristocetina, em geral avaliada como a ligação do vWF a células revestidas por colágeno em imunoensaios como o ELISA. Essa atividade também é maior nos multímeros de alto peso molecular que nos de baixo peso molecular, de modo que frequentemente a atividade de ligação do vWF ao colágeno é similar à do vWF e do cofator ristocetina.

A análise dos multímeros do vWF contribuiu significativamente para o fundamento original que definiu os vários fenótipos da DvW já comentados aqui. Tradicionalmente, essa técnica era muito trabalhosa para ser executada nos laboratórios, exceto em um pequeno número daqueles de referência, embora o surgimento de abordagens mais automatizadas potencialmente permitiriam a realização de tais análises de maneira mais disseminada. Em baixa resolução, a análise multimérica determina a distribuição relativa do vWF por variação do peso molecular. Em resolução maior, os padrões anormais dos multímeros dentro de uma variação estreita de tamanho ainda podem ser resolvidos. Os padrões típicos dos multímeros do vWF vistos nas principais variantes da DvW já foram discutidos neste capítulo.

Doença de von Willebrand adquirida

A maior parte dos pacientes com DvW adquirida (DvWA) tem mais de 40 anos sem manifestações prévias nem antecedentes familiares de uma diátese hemorrágica. Os diversos distúrbios associados nesses pacientes incluem tanto problemas hematológicos benignos como malignos (Federici, 2000; Kumar, 2002). Nos pacientes com doenças mieloproliferativas (leucemia mielógena crônica, trombocitopenia essencial, policitemia vera) e na trombocitose reativa, há uma correlação impressionante entre anormalidades no vWF plasmático e contagens elevadas de plaquetas (Budde, 1997). A DvWA foi relatada em pacientes com distúrbios autoimunes, inclusive lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia e doença mista do tecido conjuntivo, hipotireoidismo e síndrome do anticorpo antifosfolipídeo (Federici, 2000; Kumar, 2002). Vários agentes terapêuticos foram associados à DvWA: ciprofloxacina (Castaman, 1995), ácido valproico, griseofulvina e um expansor plasmático, o amido hidroxietil. A DvWA foi relatada em pacientes com tumores sólidos, mais notavelmente o tumor de Wilms, mas relatos de caso associaram a DvWA também a outros tumores (carcinoma adrenocortical, carcinoma pulmonar, carcinoma gástrico). Os pacientes com estenose aórtica e cardiopatia valvular congênita podem ter sangramento excessivo (em particular gastrintestinal) e vários relatos documentaram DvWA nesses pacientes (Gill, 1986; Vincentelli, 2003); é digno de nota que as anormalidades plasmáticas são corrigidas após cirurgia.

A DvWA surge de diversos mecanismos, que incluem: anticorpos direcionados contra domínios funcionais do vWF (Kumar, 2002), com inibição pelo plasma do paciente da atividade do cofator ristocetina no plasma normal; maior depuração do vWF mediada por anticorpos que não são direcionados para uma região funcional do vWF; proteólise do vWF, induzida pela exposição do vWF a alto estresse, como ocorre na estenose aórtica grave (Sadler, 2005); e adsorção celular e remoção do vWF por células malignas ou por outras células (incluindo plaquetas nas doenças mieloproliferativas). Por último, a síntese diminuída de vWF foi invocada em pacientes com hipotireoidismo (Levesque, 1993) e naqueles que recebem valproato (Kreuz, 1990).

Distúrbios de função plaquetária adquiridos

Ocorrem alterações na função plaquetária em muitos distúrbios adquiridos de etiologias diversas. As aberrações bioquímicas e fisiopatológicas específicas que acarretam disfunção plaquetária são pouco entendidas na maioria dos casos. Em alguns, como os distúrbios mieloproliferativos (DMP), há produção de plaquetas intrinsecamente anormais pela medula óssea. Em outros, a disfunção resulta da interação de plaquetas com fatores exógenos como agentes farmacológicos, superfícies artificiais (derivação cardiopulmonar), compostos que se acumulam no plasma em decorrência de comprometimento da função renal, e anticorpos. Nesses distúrbios de disfunção plaquetária, o sangramento em geral é mucocutâneo, com um espectro amplo e quase sempre imprevisível de gravidade. Os testes laboratoriais usuais que identificam a disfunção plaquetária são um PFA-100 ou tempo de sangramento prolongados e estudos da agregação plaquetária *in vitro* anormais. Não é recomendável confiar no PFA-100 ou no tempo de sangramento como discriminadores válidos, pois observou-se que ambos podem ser variavelmente anormais e, com frequência, normais em indivíduos com comprometimento das respostas de agregação ou secreção plaquetárias. Por exemplo, o consumo de ácido acetilsalicílico prejudica as respostas de agregação e secreção plaquetárias aos ago-

nistas de uso comum (como ADP, epinefrina, ácido araquidônico e doses baixas de colágeno) em quase todos os indivíduos, mas prolonga o tempo de sangramento em cerca de metade deles (Mielke, 1969, 1983). Da mesma forma, os resultados do PFA-100 podem ser normais em alguns pacientes com defeitos plaquetários (Hayward, 2006). Em geral, a correlação entre as anormalidades observadas no tempo de sangramento, no PFA-100 ou nos estudos de agregação plaquetária e sangramento clínico continua fraca.

Distúrbios mieloproliferativos

A tendência a sangramento, complicações tromboembólicas e defeitos qualitativos das plaquetas são todos reconhecidos nas doenças mieloproliferativas (DMP), que incluem trombocitemia essencial, policitemia vera, mielofibrose idiopática crônica e leucemia mielógena crônica (Schafer, 1984; Landolfi, 1997). As anormalidades das plaquetas refletem seu desenvolvimento a partir de um clone anormal de células-tronco, mas algumas das alterações podem ser secundárias à maior ativação plaquetária *in vivo*. O impacto clínico dos defeitos plaquetários qualitativos *in vitro*, que ocorrem mesmo em pacientes assintomáticos, em geral é incerto.

Vários estudos examinaram a função e a morfologia das plaquetas em pacientes com DMP (Schafer, 1984; Landolfi, 1997). À microscopia eletrônica, os achados plaquetários incluem redução dos grânulos densos e grânulos α, alterações nos sistemas abertos canalicular e de túbulos densos, além de redução de mitocôndrias (Maldonado, 1974). O tempo de sangramento está prolongado em uma minoria (menos de 17%) dos pacientes com DMP e não se correlaciona com maior risco de sangramento (Schafer, 1984). As respostas de agregação plaquetária são altamente variáveis e em geral variam no mesmo paciente com o tempo. Respostas plaquetárias diminuídas são mais comuns, embora alguns pacientes demonstrem maiores respostas aos agonistas. Em uma análise (Schafer, 1984), as respostas ao ADP, ao colágeno e à epinefrina estavam diminuídas em 39, 37 e 57% dos pacientes, respectivamente. O comprometimento na agregação, em resposta à epinefrina, é encontrado mais comumente com outros agentes, mas uma resposta diminuída à epinefrina não é patognomônica de DMP. O comprometimento da resposta à epinefrina na DMP foi atribuído a uma queda no número de receptores plaquetários α_2-adrenérgicos. Menor produção de TxA_2 induzida pela epinefrina, secreção de grânulos densos e mobilização do Ca^{2+} também foram relatadas em pacientes com comprometimento da resposta de agregação induzida pela epinefrina. Foram documentadas reduções dos complexos GP IIb/IIIa, GP Ib e GP Ia/IIa na superfície da plaqueta em casos de DMP. Também há evidência de comprometimento da transdução do sinal dependente da ativação do GP IIb/IIIa (Kaplan, 2000). Observou-se aumento da GP IV plaquetária (CD36), outra GP de membrana relacionada com interações das plaquetas com o colágeno ou com a trombospondina na trombocitemia essencial (Legrand, 1991). Os receptores plaquetários para a porção Fc da IgG estão aumentados nas plaquetas de pacientes com DMP (Moore, 1981).

A ativação plaquetária resulta na liberação de ácido araquidônico livre, que é metabolizado por duas vias bem reconhecidas: a da ciclo-oxigenase, que leva à produção de TxA_2, e a da 12-lipoxigenase que leva à formação dos ácidos 12-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE) e 12-hidroxieicosatetraenoico (12-HETE). A formação reduzida de plaquetas, a partir de produtos da via da 12-lipoxigenase, foi relatada em pacientes com DMP (Schafer, 1982) e associada à maior produção de TxA_2 (Schafer, 1982).

Foram descritos defeitos nos mecanismos de sinalização plaquetária, inclusive na mobilização do cálcio (Fujimoto, 1989), na sinalização para o receptor de TxA_2 (Ushikubi, 1992) e na fosforilação de proteína por deficiência da proteinocinase dependente do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Eigenthaler, 1993) em pacientes com DMP. Cooper (1978) relatou uma queda na ativação da adenililciclase induzida por PGD_2, associada a uma redução de 50% nos receptores plaquetários de PGD_2, indicando um comprometimento nos mecanismos plaquetários inibidores. Mostrou-se que as plaquetas de pacientes com policitemia vera e mieolofibrose idiopática, mas não ET ou leucemia mielógena crônica, tinham menor expressão do receptor para trombopoietina (Mpl) e também menos fosforilação de proteínas tirosina induzida pela trombopoietina (Moliterno, 1998).

Foram documentadas anormalidades no vWF plasmático em pacientes com DMP (e provavelmente contribuem para o defeito hemostático). O vWF plasmático estava diminuído, em particular seus grandes multímeros, em proporção inversa com as contagens de plaquetas, tendo melhorado após a citorredução (Budde, 1997). Essas alterações no vWF plasmático também ocorrem em pacientes com trombocitose reativa. Aumentos observados nos fragmentos proteolíticos de 140 e 160 kDa do vWF levantam a suspeita de que pode estar ocorrendo favorecimento da proteólise pela ADAMTS-13, possivelmente por causa dos efeitos na conformação do vWF plasmático induzidos pelas plaquetas (Elliott, 2005).

Leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas

A principal causa de sangramento nessas condições é trombocitopenia. No entanto, em pacientes com contagens de plaquetas normais ou elevadas, as complicações hemorrágicas estão associadas a disfunção plaquetária (Rao, 2005a). Defeitos plaquetários associados a sangramento clínico são mais comuns na leucemia mielógena aguda, mas têm sido relatados nas leucemias linfoblástica aguda e mielomonoblástaica aguda, na leucemia de células pilosas e nas síndromes mielodisplásicas. Respostas de agregação reduzidas ao ADP, à epinefrina e ao colágeno foram relatadas com secreção diminuída de nucleotídeo, menor produção de TxA_2, e PDGF e tromboglobulina β plaquetárias. Formas adquiridas de DvW e o defeito plaquetário similar à SBS foram descritos na leucemia de células pilosas e nas síndromes mielodisplásicas. Nas leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas, as plaquetas podem ser morfologicamente anormais, e estudos estruturais mostraram menor número de microtúbulos e grânulos densos, estes também de menor tamanho, além de excesso de sistemas membranosos. Os megacariócitos exibem displasia.

Disproteinemias

Pode ocorrer sangramento excessivo em pacientes com disproteinemias, e isso parece estar relacionado com múltiplos mecanismos, incluindo disfunção plaquetária, anormalidades específicas da coagulação, hiperviscosidade e alterações nos vasos sanguíneos decorrentes da deposição de amiloide. Ocorrem defeitos qualitativos das plaquetas em alguns desses pacientes e foram atribuídos ao revestimento das plaquetas por paraproteína.

Uremia

A patogênese do defeito hemostático na uremia continua incerta, mas disfunção plaquetária e comprometimento da interação da plaqueta com a parede vascular são consideradas as principais causas. Os pacientes em diálise têm maior número de plaquetas reticuladas circulantes, indicando renovação acelerada das plaquetas (Himmelfarb, 1997). Muitos anos atrás, demonstrou-se que o tempo de sangramento estava prolongado na uremia. Uma das principais razões para isso é a anemia frequentemente observada na uremia, e de fato os tempos de sangramento prolongados estão tipicamente encurtados após transfusões de hemácias ou tratamento com eritropoietina (Livio, 1982; Moia, 1987). Múltiplas anormalidades plaquetárias são reconhecidas na uremia (Boccardo, 2004). A adesão de plaquetas ao subendotélio, uma etapa inicial da hemostasia, envolve a interação de vWF, plaquetas e o subendotélio. Segundo um relato, a adesão de plaquetarias de sangue total urêmico perfundido na aorta desendotelializada de coelhos estava prejudicada (Castillo, 1986). A maioria dos estudos revelou atividade e níveis plasmáticos normais ou aumentados do antígeno do vWF (cofator ristocetina), embora em alguns casos a atividade do vWF estivesse bem abaixo do nível do antígeno. A estrutura multimérica do vWF era normal. O número de locais para GP Ib e GP IIb/IIIa por plaqueta foi relatado como normal na uremia (Gralnick, 1988), mas observaram-se níveis diminuídos de GP Ib e um defeito funcional na interação do vWF com o GP IIb/IIIa. Muitos estudos mostraram comprometimento das respostas de agregação plaquetária a vários agonistas na uremia, com resultados às vezes conflitantes. Os níveis plasmáticos de PF4 e tromboglobulina β estão elevados na uremia e aumentam ainda mais com a hemodiálise, refletindo depuração renal reduzida, bem como

ativação plaquetária por dialisadores de membrana. Vários estudos mostraram reduções nos produtos do metabolismo do ácido araquidônico (PGG_2/PGH_2, TxA_2) em plaquetas urêmicas, o que implicou a agregação e a secreção defeituosas observadas. O TxA_2 reduzido pode surgir por causa do ciclo-oxigenase disfuncional ou da liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos pela ativação da fosfolipase A_2. Outros defeitos plaquetários descritos na uremia incluem aumento dos níveis de AMPc e adenilil ciclase nas plaquetas (o que pode inibir as respostas plaquetárias) e diminuição da mobilização de Ca^{2+} induzida por agonista, da retração do coágulo e da atividade pró-coagulante plaquetária.

Há evidência convincente de que a patogênese do defeito hemostático na uremia está ligada ao acúmulo de moléculas dialisáveis e não dialisáveis no plasma urêmico. Um desses compostos, o ácido guanidinossuccínico, inibe as plaquetas *in vitro* e estimula a geração de óxido nítrico (ON), que inibe a adesão plaquetária e as respostas das plaquetas por causa dos níveis aumentados de GMPc (Boccardo, 2004). A exposição de células endoteliais humanas ao plasma urêmico aumenta a produção de ON. Observou-se maior atividade semelhante à da prostaciclina no plasma urêmico (Remuzzi, 1978). A diálise agressiva é um componente importante do tratamento global e corrige a diátese hemorrágica em alguns pacientes, mas em outros é apenas parcialmente efetiva. A elevação do hematócrito com concentrado de hemácias ou eritropoietina recombinante encurta o tempo de sangramento, melhora a adesão plaquetária e corrige o sangramento discreto em pacientes urêmicos.

Doença do compartimento de armazenamento adquirida

Há relatos sobre vários pacientes em que a SPD de grânulos densos parece ser adquirida. Em geral, é provável que esse defeito reflita a liberação *in vivo* do conteúdo dos grânulos densos das plaquetas em virtude da ativação ou da produção de plaquetas anormais pela medula óssea. Observou-se SPD adquirida em pacientes com anticorpos antiplaqueta, lúpus eritematoso sistêmico, PTI crônica, coagulação intravascular disseminada, síndrome hemolítico-urêmica, rejeição a transplante renal, hemangioma cavernoso congênito múltiplo, DMP, leucemias agudas e crônicas, doença valvular grave, bem como em pacientes submetidos a derivação cardiopulmonar e concentrados de plaquetas armazenados após transfusão.

Anticorpos antiplaqueta e função plaquetária

A ligação de um anticorpo às plaquetas pode induzir vários efeitos, inclusive destruição acelerada, ativação plaquetária, lise celular, agregação, secreção do conteúdo dos grânulos e exposição externa da fosfatidilseriana. A interação da plaqueta com o anticorpo pode ocasionar comprometimento da função, tanto em consequência da ativação como pela ligação do anticorpo a glicoproteínas específicas. Nos pacientes com PTI, as plaquetas têm menor sobrevida e pode haver comprometimento da função plaquetária e tempos de sangramento anormalmente prolongados, mesmo com contagens adequadas de plaquetas. Os anticorpos podem induzir disfunção plaquetária por múltiplos mecanismos. Em muitos pacientes, os anticorpos são direcionados contra glicoproteínas específicas da superfície da membrana da plaqueta, como a GP Ib (Woods, 1984a), a GP IIb/IIIa (Woods, 1984b), a GP Ia/IIa (Deckmyn, 1994), a GP VI (Sugiyama, 1987; Boylan, 2004) e os glicoesfingolipídeos (van Vliet, 1987; Koerner, 1989). Em um relato, o anticorpo anti-GP VI induziu uma depuração do complexo GP VI/FcRr, a partir da superfície da plaqueta (Boylan, 2004). Alguns desses anticorpos, com efeito, induzem formas adquiridas de SBS e trombastenia.

Fármacos inibidores da função plaquetária

Muitos fármacos afetam a função plaquetária (Tab. 39.9). Os efeitos de vários deles têm sido estudados *in vitro*, mas não está bem estabelecida a relevância desses achados com relação aos níveis encontrados dos fármacos na prática clínica. Mesmo entre aqueles que mostram alterar as respostas plaquetárias *ex vivo*, o impacto sobre a hemostasia em geral permanece incerto. Além disso, o impacto da administração concomitante de múltiplos fármacos, cada um com um efeito discreto sobre a função plaquetária, é desconhecido, embora isso tenha relevância

Tabela 39.9 Fármacos que afetam a função plaquetária

- Inibidores da ciclo-oxigenase
  - Acido acetilsalicílico (AAS, "aspirina")
  - Agentes anti-inflamatórios não esteroides
    - Indometacina, fenilbutazona, ibuprofeno, sulfimpirazona, sulindaco, ácido meclofenâmico
- Antagonistas do receptor de ADP
  - Ticlopidina, clopidogrel
- Antagonistas do receptor de GP IIb/IIIa
  - c7E3 (abciximabe), tirofibano, eptifibatrida
- Fármacos que aumentam o AMP cíclico ou o GMP cíclico nas plaquetas
- Ativadores da adenilato ciclase
  - Prostaglandinas I_2, D_2, E_1 e análogos
- Inibidores da fosfodiesterase
  - Dipiridamol
  - Cilostazol
  - Anagrelida
  - Milrinona
  - Metilxantinas
    - Cafeína, teofilina, aminofilina
- Óxido nítrico e doadores de óxido nítrico
- Antimicrobianos
  - Penicilinas
  - Cefalosporinas
  - Nitrofurantoína
  - Hidroxicloroquina
  - Miconazol
- Fármacos cardiovasculares
  - Bloqueadores β-adrenérgicos (propranolol)
  - Vasodilatores (nitroprussiato, nitroglicerina)
  - Diuréticos (furosemida)
  - Bloqueadores do canal de cálcio
  - Quinidina
  - Inibidores da enzima conversora de angiotensina
- Anticoagulantes
  - Heparina
- Agentes trombolíticos
  - Estreptocinase, ativador do plasminogênio tecidual, urocinase
- Psicotrópicos e anestésicos
  - Antidepressivos tricíclicos
    - Imipramina, amitriptilina, nortriptilina
  - Fenotiazinas
    - Clorpromazina, prometazina, trifluoperazina
  - Anestésicos locais
  - Anestesia geral (halotano)
- Agentes quimioterápicos
  - Mitramicina
  - Carmustina
  - Daunorrubicina
- Outros agentes
  - Dextranos e hidroxietilamido
  - Agentes redutores de lipídeos (clofibrato, halofenato)
  - Ácido ε-aminocaproico
  - Anti-histamínicos
  - Etanol
  - Vitamina E
  - Agentes de contraste radiográfico
  - Itens alimentares (aminoácidos ômega-3, vitamina E, cebola, alho, gengibre, cominho, cúrcuma (açafrão-da-índia), cravo-da-índia, cogumelo preto das árvores, Ginko)

Fonte: com permissão de Rao AK: Acquired disorders of platelet function. Em Colman RW (ed.): Hemostasia and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

clínica. Em razão do seu uso disseminado, o ácido acetilsalicílico (AAS) e os agentes anti-inflamatórios não esteroides são uma causa importante de inibição plaquetária na prática clínica. O consumo de AAS resulta em inibição da agregação e da secreção plaquetárias após estimulação pelo ADP, pela epinefrina e por baixas concentrações de colágeno. O AAS acetila, de forma irreversível e inativa, a ciclo-oxigenase plaquetária, ocasionando inibição da síntese de endoperóxidos (PGG_2 e PGH_2) e TxA_2. Tipicamente, é recomendável esperar de cinco a sete dias após interromper o uso de AAS para a realização de estudos destinados a avaliar a função plaquetária basal. Diversos outros anti-inflamatórios não esteroides também prejudicam a função plaquetária ao inibirem a enzima a ciclo-oxigenase e podem prolongar o tempo de sangramento. Em comparação com o AAS, a inibição da ciclo-oxigenase por esses agentes em geral dura pouco e é reversível. No caso do ibuprofeno, por exemplo, 24 horas após a interrupção dessa medicação constituem um intervalo suficiente para testar a função plaquetária basal.

A ticlodipina e o clopidogrel são derivados da tienopiridina administrados por via oral que inibem a função plaquetária ao inibirem as respostas de agregação plaquetária a vários agonistas, inclusive o ADP, colágeno, epinefrina e trombina, em magnitude variável, dependendo das concentrações dos agonistas. Os antagonistas do receptor de GP IIb/IIIa são uma classe de compostos que inibem a ligação do fibrinogênio e a agregação plaquetária. Eles incluem um anticorpo monoclonal contra o receptor de GP IIb/IIIa (abciximabe), um peptídeo sintético que contém a sequência KGD (eptifibatida) e um peptideomimético (tirofibano). São todos inibidores potentes da agregação (tanto primária como secundária) em resposta a todos os agonistas usuais, exceto a ristocetina; todos prolongam o tempo de sangramento e são inibidores plaquetários tão potentes quanto o AAS. A trombocitopenia imunomediada (secundária a anticorpos dependentes de fármacos) é uma complicação potencial dos antagonistas do GP IIb/IIIa (Aster, 2004; ver também Cap. 42).

Uma variedade de outros medicamentos e agentes, inclusive substâncias contidas em alimentos, inibe as respostas plaquetárias, mas o significado clínico de muitos não está esclarecido, tendo sido revistos em outros textos (Rao, 2005a). Diante do aumento do uso de medicamentos à base de ervas e suplementos alimentares, seu papel e a interação com fármacos precisam ser considerados na avaliação de pacientes com sangramento inexplicado.

Avaliação de pacientes com suspeita de distúrbios plaquetários

A avaliação de pacientes com antecedentes clínicos ou sintomas sugestivos de tendência hemorrágica envolve a consideração dos sistemas fibrinolítico e da coagulação, bem como das plaquetas sanguíneas. Uma anamnese bem conduzida pode ser o fator isolado mais importante para se chegar ao diagnóstico em muitos pacientes. Mais importante ainda é determinar se o distúrbio é congênito ou adquirido. Uma contagem de plaquetas pode ajudar a determinar se a tendência hemorrágica pode ser explicada apenas por uma diminuição no número de plaquetas. O prolongamento do PFA-100 ou do tempo de sangramento pode ajudar a determinar se há outra anormalidade. Como a DvW é sem dúvida mais comum que os distúrbios congênitos da função plaquetária, uma avaliação de alteração na hemostasia primária quase sempre irá exigir análise do complexo formado pelo fator VIII com o vWF.

As manifestações hemorrágicas em pacientes com defeitos hereditários da função plaquetária são altamente variáveis. As razões habituais para encaminhamento para avaliação incluem sangramentos mucocutâneos, sangramento excessivo após procedimentos clínicos invasivos ou cirurgia e prolongamento do PFA-100 ou do tempo de sangramento com contagem de plaquetas razoável. Nos pacientes em que se suspeita de algum defeito da função plaquetária, os principais exames laboratoriais disponíveis em ampla escala incluem a contagem de plaquetas, o PFA-100 e os que avaliam as respostas de agregação e secreção plaquetárias *in vitro*. Os estudos de plaquetas em geral são realizados usando-se plasma rico em plaquetas obtido de sangue anticoagulado, monitorando-se as respostas a vários agentes, inclusive ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidônico, um análogo do TxA_2 (U46619), peptídeos receptores de trombina e ristocetina. Os padrões de resposta observados, em geral, podem fornecer indícios da natureza do defeito plaquetário subjacente, embora técnicas específicas, disponíveis em ampla escala nos laboratórios de pesquisa, sejam necessárias para delinear os mecanismos plaquetários exatos que estão alterados. Os pacientes com trombastenia clássica caracterizam-se pela ausência das ondas tanto primária como secundária da agregação em resposta a todos os agonistas de uso comum, exceto a ristocetina com uma resposta de alteração na forma normal. O comprometimento ou a ausência de resposta à ristocetina, mas com resposta normal de agregação a outros agonistas, sugere DvW ou SBS. No último distúrbio, as contagens de plaquetas estão diminuídas e o tamanho das plaquetas é maior. Embora tais achados possam ocorrer em algumas variantes da DvW (p. ex., no tipo 2B), os níveis plasmáticos de vWF e fator VIII, bem como o padrão multimérico do vWF, são normais na SBS, mas anais da DvW. Pacientes com comprometimento da secreção pelos grânulos ou menor conteúdo nos grânulos densos, em geral, mostram uma segunda onda diminuída ou ausente de agregação em resposta ao ADP, à epinefrina e ao PAF, respostas nulas a outros agonistas (colágeno, U46619), associadas à liberação acentuadamente diminuída do conteúdo dos grânulos.

Terapia para defeitos congênitos da função plaquetária

As transfusões de plaquetas e a administração de 1-desamino-8D-arginina vasopressina (DDAVP) têm sido as pedras fundamentais da terapia em pacientes com defeitos plaquetários hereditários. Graças à ampla disparidade nas manifestações hemorrágicas, as abordagens terapêuticas precisam ser individualizadas. Transfusões de plaquetas são efetivas para controlar as manifestações hemorrágicas, mas implicam os riscos potenciais associados aos hemoderivados, inclusive aloimunização. Os pacientes com trombastenia podem desenvolver anticorpos contra o GP IIb/IIIa que comprometem a eficácia de transfusões subsequentes de plaquetas. Uma alternativa viável às transfusões de plaquetas é a administração intravenosa de DDAVP, que mostrou encurtar o tempo de sangramento em um número substancial de pacientes com defeitos na função plaquetária (Rao, 1995; Mannucci, 1998). O efeito sobre o tempo de sangramento durou cerca de quatro a cinco horas. Tal resposta parece ser dependente das anormalidades que acarretam disfunção plaquetária. A maior parte dos pacientes com trombastenia de Glanzmann não respondeu à infusão de DDAVP com encurtamento do tempo de sangramento. As respostas em pacientes com distúrbios da secreção plaquetária, transdução do sinal ou deficiência do compartimento de armazenamento foram variáveis, com encurtamento do tempo de sangramento em alguns pacientes. A administração de DDAVP induz um aumento nos níveis plasmáticos de vWF, fator VIII e ativador do plasminogênio tecidual. As respostas anormais de agregação ou secreção plaquetárias *in vitro* não são corrigidas pela DDAVP (Rao, 1995).

Mais recentemente, o fator VIIa recombinante foi desenvolvido em um fármaco importante para o tratamento de eventos hemorrágicos em pacientes com trombastenia de Glanzmann e alguns outros defeitos hereditários (Poon, 2000; Almeida, 2003). Outras abordagens que têm sido utilizadas para melhorar a hemostasia em pacientes com defeitos plaquetários hereditários incluem um curso rápido (três a quatro dias) de prednisona (20–50mg) (Mielke, 1981) e a administração de agentes antifibrinolíticos como o ácido ε-aminocaproico ou o ácido trenaxâmico. O transplante alogênico de medula óssea tem sido feito agora com sucesso na correção completa em pacientes com trombastenia, embora o desenvolvimento de anticorpos direcionados contra o complexo GP IIb/IIIa continue sendo um problema potencial (Flood, 2005; Fujimoto, 2005).

Referências bibliográficas

Almeida AM, Khair K, Hann I: The use of recombinant factor VIIa in children with inherited platelet function disorders. Br J Haematol 2003; 121:477–481.

Amiral J: Antigens involved in heparin-induced thrombocytopenia. Semin Hematol 1999; 36:7–11.

Amiral J, Bridey F, Dreyfus M: Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost 1992; 68:95–96.

Andre P: P-selectin in haemostasis. Br J Haematol 2004; 126:298–306.

Arai M, Yamamoto N, Moroi M: Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. Br J Haematol 1995; 89:124–130.

Aster RH, Curtis BR, Bougie DW: Thrombocytopenia resulting from sensitivity to GPIIb-IIIa inhibitors. Semin Thromb Hemost 2004; 30:569–577.

Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA: Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. FASEB J 2005;

Ault KA, Knowles C: In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. Exp Hematol 1995; 23:996–1001.

Bader-Meunier B, Proulle V, Trichet C: Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood. J Pediatr Hematol Oncol 2003; 25:548–552.

Baglia FA, Gailani D, Lopez JA: Identification of a binding site for glycoprotein Ibα in the Apple 3 domain of factor XI. J Biol Chem 2004a; 279:45470–45476.

Baglia FA, Shrimpton CN, Emsley J: Factor XI interacts with the leucine-rich repeats of glycoprotein Ibα on the activated platelet. J Biol Chem 2004b; 279:49323–49329.

Baglia FA, Walsh PN: Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin. Biochemistry 1998; 37:2271–2281.

Beardsley DS, Ertem M: Platelet autoantibodies in immune thrombocytopenic purpura. Transfus Sci 1998; 19:237–244.

Bennett JS, Vilaire G: Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. J Clin Invest 1979; 64:1393–1401.

Artigo clássico demonstrando que o fibrinogênio serve como o ligante adesivo crítico para a agregação plaquetária.

Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD: A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. J Clin Invest 1986; 78:130–137.

Berndt MC, Chong BH, Bull HA: Molecular characterization of quinine/quinidine drug-dependent antibody platelet interaction using monoclonal antibodies. Blood 1985; 66:1292–1301.

Bessman JD: Automated blood counts and differentials. A practical guide. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1986.

Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR: Mean platelet volume. Am J Clin Pathol 1981; 76:289–293.

Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M: Platelet dysfunction in renal failure. Semin Thromb Hemost 2004; 30:579–589.

Bouchard BA, Catcher CS, Thrash BR: Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. J Biol Chem 1997; 272:9244–9251.

Boylan B, Chen H, Rathore V: Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. Blood 2004; 104:1350–1355.

Bray PF: Inherited diseases of platelet glycoproteins: considerations for rapid molecular characterization. Thromb Haemost 1994; 72:492–502.

Brecher G, Cronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets. J Appl Physiol 1950; 3:365

Breton-Gorius J, Guichard J: Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelets and megakaryocytes. Am J Pathol 1972; 66:277–293.

Breton-Gorius J, Vainchenker W, Nurden A: Defective α-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome: ultrastructural studies of bone marrow cells and megakaryocytes growing in culture from blood precursors. Am J Pathol 1981; 102:10

Broze GJJ, Girard TJ, Novotny WF: Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. Biochemistry 1990; 29:7539–7546.

Buchanan GR, Holtkamp CA: A comparative study of variables affecting the bleeding time using two disposable devices. Am J Clin Pathol 1989; 91:45–51.

Budde U, van Genderen PJ: Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. Semin Thromb Hemost 1997; 23:425–431.

Cabeza N, Li Z, Schulz C: Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells. Diabetes 2004; 53:2117–2121.

Calvete JJ: Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222:29–38.

Cambien B, Wagner DD: A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. Trends Mol Med 2004; 10:179–186.

Cardinal DC, Flower RJ: The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. J Pharmacol Methods 1980; 3:135–158.

Carroll RC, Gerrard JM, Gilliam JM: Clot retraction facilitates clot lysis. Blood 1981; 57:44–48.

Castaman G, Lattuada A, Mannucci PM: Characterization of two cases of acquired transitory von Willebrand syndrome with ciprofloxacin: evidence for heightened proteolysis of von Willebrand factor. Am J Hematol 1995; 49:83–86.

Castillo R, Lozano T, Escolar G: Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. Blood 1986; 68:337–342.

Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM: Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. Blood 1992; 80:2787–2796.

Cattaneo M, Lombardi R, Zighetti ML: Deficiency of (^{33}) P-2MeS-ADP binding sites on platelets with secretion defect, normal granule stores and normal thromboxane A_2 production. Thromb Haemost 1997; 77:986–990.

Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC: Interrelations of platelet aggregation and secretion. J Clin Invest 1977; 60:866–873.

Artigo clássico caracterizando a inibição do anticorpo monoclonal da GP IIb/IIIa plaquetária.

Chong BH, Du X, Berndt MC: Characterization of the binding domains on platelet glycoproteins Ib-IX and IIb/IIIa complexes for the quinine/quinidine-dependent antibodies. Blood 1991; 77:2190–2199.

Clofent-Sanchez G, Lucas S, Laroche-Traineau J: Autoantibodies and anti-mouse antibodies in thrombocytopenic patients as assessed by different MAIPA assays. British Journal of Haematology 1996; 95:153–160.

Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE: A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. J Clin Invest 1983; 72:325–338.

Artigo clássico caracterizando a inibição do anticorpo monoclonal da GP IIb/IIIa plaquetária.

Comfurius P, Williamson P, Smeets EF: Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. Biochemistry 1996; 35:7631–7634.

Cooper B, Schafer AI, Puchalsky D: Platelet resistance to protaglandin D2 in patients with myeloproliferative disorders. Blood 1978; 52:618–626.

Cordiano I, Salvan F, Randi ML: Antiplatelet glycoprotein autoantibodies in patients with autoimmune diseases with and without thrombocytopenia. J Clin Immunol 1996; 16:340–347.

Cox D: Ligand-binding assays: fibrinogen. Methods Mol Biol 2004; 273:125–138.

De Caterina R, Lanza M, Manca G: Bleeding time and bleeding: An analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding. Blood 1994; 84:3363–3370.

Deckmyn H, Zhang J, Van Houtte E: Production and nucleotide sequence of an inhibitory human IgM autoantibody directed against platelet glycoprotein Ia/IIa. Blood 1994; 84:1968–1974.

Deykin D, Janson P, McMahon L: Ethanol potentiation of aspirin-induced prolongation of the bleeding time. N Engl J Med 1982; 306:852–854.

Drachman JG: Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. Blood 2004; 103:390–398.

Drouin A, Favier R, Masse JM: Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. Blood 2001; 98:1382–1391.

Drouin J, McGregor JL, Parmentier S: Residual amounts of glycoprotein Ib concomitant with near-absence of glycoprotein IX in platelets of Bernard–Soulier patients. Blood 1988; 72:1086–1088.

Eigenthaler M, Ullrich H, Geiger J: Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. J Biol Chem 1993; 268:13526–13531.

Elliott MA, Tefferi A: Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. Br J Haematol 2005; 128:275–290.

Evangelista V, Manarini S, Sideri R: Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11β/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. Blood 1999; 93:876–885.

Fabris F, Cordiano I, Mazzuccato M: Labeling of platelet surface glycoproteins with biotin derivatives. Thromb Res 1992; 66:409–419.

Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P: Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. Thromb Haemost 2000; 84:345–349.

Finch CN, Miller JL, Lyle VA: Evidence that an abnormality in the glycoprotein Ib alpha gene is not the cause of abnormal platelet function in a family with classic Bernard–Soulier disease. Blood 1990; 75:2357–2362.

Flood VH, Johnson FL, Boshkov LK: Sustained engraftment post bone marrow transplant despite anti-platelet antibodies in Glanzmann thrombasthenia 1. Pediatr Blood Cancer 2005; 14 Mar (e-pub ahead of print).

Frelinger AL, Du X, Plow EF: Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. J Biol Chem 1991; 266:17106–17111.

French DL, Coller BS, Usher S: Prenatal diagnosis of Glanzmann thrombasthenia using the polymorphic markers BRCA1 and THRA1 on chromosome 17. Br J Haematol 1998; 102:582–587.

French DL, Seligsohn U: Platelet glycoprotein IIb/IIIa Receptors and Glanzmann's thrombasthenia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:607–610.

Fujimoto T, Fujimura K, Kuramoto A: Abnormal Ca^{2+} homeostasis in platelets with myeloproliferative disorders: low levels of Ca^{2+} influx and efflux across the plasma membrane and increased Ca^{2+} accumulation into the dense tubular system. Thromb Res 1989; 53:99–108.

Fujimoto TT, Kishimoto M, Ide K: Glanzmann thrombasthenia with acute myeloid leukemia successfully treated by bone marrow transplantation 2. Int J Hematol 2005; 81:77–80.

Furie B, Furie BC: Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. Trends Mol Med 2004; 10:171–178.

Revisão recente sobre a P-selectina e seus papéis na trombose e na hemostasia.

Furlan M, Robles R, Galbusera M: von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic–uremic syndrome. N Engl J Med 1998; 339:1578–1584.

Artigo excelente que levou ao reconhecimento da ADAMTS-13.

Furman MI, Liu L, Benoit SE: The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:3082–3087.

Gabbeta J, Yang X, Kowalska MA: Platelet signal transduction defect with Gα subunit dysfunction and diminished Gαq in a patient with abnormal platelet responses. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:8750–8755.

Gabbeta J, Yang X, Sun L: Abnormal inside-out signal transduction-dependent activation of glycoprotein IIb–IIIa in a patient with impaired pleckstrin phosphoryla-

tion. Blood 1996; 87:1368–1376.
George JN, Vesely SK, Terrell DR: The Oklahoma Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-Hemolytic Uremic Syndrome (TTP-HUS) Registry: a community perspective of patients with clinically diagnosed TTP-HUS. Semin Hematol 2004; 41:60–67.
George JN, Woolf SH, Raskob GE: Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. Blood 1996; 88:3–40.
Gerrard JM, Lint D, Sims PJ: Identification of a platelet dense granule membrane protein that is deficient in a patient with the Hermansky–Pudlak syndrome. Blood 1991; 77:101–112.
Gerrard JM, Phillips DR, Rao GHR: Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome: selective deficiency of platelet α granules. J Clin Invest 1980; 66:102
Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP: Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Thromb Haemost 1999; 82:1386–1389.
Gill JC, Wilson AD, Endres-Brooks J: Loss of the largest von Willebrand factor multimers from plasma of patients with congenital cardiac defects. Blood 1986; 67:758–761.
Gonzalez-Manchon C, Fernandez-Pinel M, Arias-Salgado EG: Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the glycoprotein (GP) IIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia: disruption of the 674–687 disulfide bridge in GPIIb prevents surface exposure of GPIIb–IIIa complexes. Blood 1999; 93:866–875.
Gralnick HP, McKeown LP, Williams SB: Plasma and platelet von Willebrand's factor defects in uremia. Am J Med 1988; 85:806–810.
Greilich PE, Alving BM, Longnecker D: Near-site monitoring of the antiplatelet drug abciximab using the Hemodyne analyzer and modified thrombelastograph. J Cardiothorac Vasc Anesth 1999; 13:58–64.
Griesshammer M, Bangerter M, Sauer T: Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. J Intern Med 1999; 245:295–300.
Gunay-Aygun MHMGW: Molecular defects that affect platelet dense granules. Semin Thromb Hemost 2004; 30:537–547.
Hayward CPM: Inherited disorders of platelet α-granules. Platelets 1997; 8:197–209.
Hayward CP, Bainton DF, Smith JW: Multimerin is found in the alpha-granules of resting platelets and is synthesized by a megakaryocytic cell line. J Clin Invest 1993; 91:2630–2639.
Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P: Multimerin: a series of large disulfide-linked multimeric proteins within platelets. Blood 1991; 77:2556–2560.
Heaton WA, Davis HH, Melch MJ, et al: Indium-111: a new radionuclide label for studying human platelet kinetics. Br J Haematol 1979; 42:613
Heaton WA, Heyns ADP, Joist JH: Measurement of in vivo platelet turnover and organ distribution using ^{111}In-labeled platelets. Methods Enzymol 1989; 169:172–187.
Heilmann E, Friese P, Anderson S: Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span. Br J Haematol 1993; 85:729–735.
Hemker HC, van Rijn JL, Rosing J: Platelet membrane involvement in blood coagulation. Blood Cells 1983; 9:303–317.
Hewitt J, Burton IE: Incidence of autoantibodies to GPIIb/IIIa in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura may be overestimated by the MAIPA. Br J Haematol 1994; 86:418–420.
Himmelfarb J, Holbrook D, McMonagle E: Increased reticulated platelets in dialysis patients. Kidney Int 1997; 51:834–839.
Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F: Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A_2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. J Clin Invest 1994; 94:1662–1667.
Holmsen H: Secretable storage pools in platelets. Annu Rev Med 1979; 30:119–134.
Holmsen H, Dangelmaier CA: Measurement of secretion of serotonin. Methods Enzymol 1989; 169:205–211.
Hoyer L: The assessment of von Willebrand's disease. In Bloom AL (ed.): Methods of Hematology. New York, Churchill Livingstone, 1982, pp 106–121.
Huizing M, Anikster Y, Gahl WA: Hermansky–Pudlak syndrome and Chediak–Higashi syndrome: disorders of vesicle formation and trafficking. Thromb Haemost 2001; 86:233–245.
Hyman T, Huizing M, Blumberg PM: Use of a cDNA microarray to determine molecular mechanisms involved in grey platelet syndrome. Br J Haematol 2003; 122:142–149.
Ingerman CM, Smith JB, Shapiro S: Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency. Blood 1978; 52:332–344.
Ingerman-Wojenski CM, Silver MJ: A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood lumi-aggregometer. Thromb Haemost 1984; 51:154–156.
Israels SJ, McMillan EM, Robertson C: The lysosomal granule membrane protein, LAMP-2, is also present in platelet dense granule membranes. Thromb Haemost 1996; 75:623–629.
Israels SJ, McNicol A, Robertson C: Platelet storage pool deficiency: diagnosis in patients with prolonged bleeding times and normal platelet aggregation. Br J Haematol 1990; 75:118–121.
Joseph R, Welch KMA, D'Andrea G: Epinephrine does not induce platelet aggregation in citrated whole blood. Thromb Res 1987; 45:871–872.
Kahn ML: Platelet-collagen responses: Molecular basis and therapeutic promise. Semin Thromb Hemost 2004; 30:419–425.
Kahr WH, Zheng S, Sheth PM: Platelets from patients with the Quebec platelet disorder contain and secrete abnormal amounts of urokinase-type plasminogen activator. Blood 2001; 98:257–265.
Kaplan R, Gabbeta J, Sun L: Combined defect in membrane expression and activation of platelet GPIIb–IIIa complex without primary sequence abnormalities in myeloproliferative disease. Br J Haematol 2000; 111:954–964.
Kehrel B, Balleisen L, Kokott R: Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. Blood 1988; 71:1074–1078.
Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ: A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1982; 60:1050–1053.
Kempfer AC, Frontroth JP, Lazzari MA: Visualization of platelet glycoproteins Ib and IIIa by immunoenzymatic stain using avidin-biotin peroxidase complex. Thromb Res 1991; 64:395–404.
Kiefel V, Santoso S, Weisheit M: Monoclonal antibody-specific immunobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood 1987; 70:1722–1726.
Koerner TA, Weinfeld HM, Bullard LS: Antibodies against platelet glycosphingolipids: detection in serum by quantitative HPTLC-autoradiography and association with autoimmune and alloimmune processes. Blood 1989; 74:274–84.
Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y: VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. Blood 2004; 103:607–612.
Koksch M, Rothe G, Kiefel V: Fluorescence resonance energy transfer as a new method for the epitope-specific characterization of anti-platelet antibodies. J Immunol Methods 1995; 187:53–67.
Kreuz W, Linde R, Funk M: Induction of von Willebrand disease type I by valproic acid. Lancet 1990; 335:1350–1351.
Kumar S, Pruthi RK, Nichols WL: Acquired von Willebrand disease. Mayo Clin Proc 2002; 77:181–187.
Kunicki TJ, Aster RH: Deletion of the platelet-specific alloantigen Pl^{A1} from platelets in Glanzmann's thrombasthenia. J Clin Invest 1978a; 61:1225–1231.
Um dos primeiros artigos demonstrando a relação entre um aloantígeno plaquetário proeminente e um receptor principal de glicoproteína.
Kunicki TJ, Head S, Salomon DR: Platelet receptor structures and polymorphisms. Methods Mol Biol 2004; 273:455–478.
Kunicki TJ, Johnson MM, Aster RH: Absence of the platelet receptor for drug-dependent antibodies in the Bernard–Soulier syndrome. J Clin Invest 1978b; 62:716–719.
Lages B, Weiss HJ: Enhanced increases in cytosolic Ca^{2+} in ADP-stimulated platelets from patients with δ-storage pool deficiency – a possible indicator of interactions between granule-bound ADP and the membrane ADP receptor. Thromb Haemost 1997; 77:376–382.
Lan Z, Schmaier AH: Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma – description of procedures with the aim to develop standards in the field. Am J Clin Pathol 2005; 123:172–183.
Revisão metodológica recente dos testes de função plaquetária.
Landolfi R, Marchioli R, Patrono C: Mechanisms of bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. Thromb Haemost 1997; 78:617–621.
Lee SB, Rao AK, Lee K-H: Decreased expression of phospholipase C-β_2 isozyme in human platelets with impaired function. Blood 1996; 88:1684–1691.
Legrand C, Bellucci S, Disdier M: Platelet thrombospondin and glycoprotein IV abnormalities in patients with essential thrombocythemia: effect of α-interferon treatment. Am J Hematol 1991; 38:307–313.
Leissinger CA: Platelet kinetics in immune thrombocytopenic purpura and human immunodeficiency virus thrombocytopenia. Curr Opin Hematol 2001; 8:299–305.
Levesque H, Borg JY, Cailleux N: Acquired von Willebrand's syndrome associated with decrease of plasminogen activator and its inhibitor during hypothyroidism. Eur J Med 1993; 2:287–288.
Levy-Toledano S, Caen JP, Breton-Gorius J: Gray platelet syndrome: α-granule deficiency: its influence on platelet function. J Lab Clin Med 1981; 98:831.
Um dos primeiros artigos caracterizando a síndrome da plaqueta cinzenta.
Linden MD, Frelinger AL3, Barnard MR: Application of flow cytometry to platelet disorders. Semin Thromb Hemost 2004; 30:501–511.
Livio M, Gotti E, Marchesi D: Uraemic bleeding: role of anemia and beneficial effect of red cell transfusions. Lancet 1982; 2:1013–1015.
McKay H, Derome F, Haq MA, et al: Bleeding risks associated with inheritance of the Quebec platelet disorder. Blood 2004;104:159–165.
McNicol A, Israels SJ, Robertson C: The empty sack syndrome: a platelet storage pool deficiency associated with empty dense granules. Br J Haematol 1994; 86:574–582.
Madan M, Berkowitz SD: Understanding thrombocytopenia and antigenicity with glycoprotein IIb–IIIa inhibitors. Am Heart J 1999; 138:317–326.
Maldonado JE, Pintado T, Pierre RV: Dysplastic platelet and circulating megakaryocytes in chronic myeloproliferative diseases. I. The platelets: ultrastructure and peroxidase reaction. Blood 1974; 43:797–809.
Manning KL, Novinger S, Sullivan PS: Successful determination of platelet lifespan in C3H mice by in vivo biotinylation. Lab Anim Sci 1996; 46:545–548.
Mannucci PM: Hemostatic drugs. N Engl J Med 1998; 339:245–253.
Mannucci PM, Vanoli M, Forza I: Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in 123 patients with connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis). Haematologica 2003; 88:914–918.
Menasche G, Pastural E, Feldmann J: Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. Nat Genet 2000; 25:173–176.
Michelson AD (ed.): Platelets. Amsterdam: Academic Press; 2002.
Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P: Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. Circulation 2000; 101:1013–1018.
Mielke CH: Influence of aspirin on platelets and the bleeding time. Am J Med 1983; 74:72–78.
Mielke CH, Kaneshiro MM, Maher IA: The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. Blood 1969; 34:204–215.
Padronização do tempo de sangramento.
Mielke CH Jr, Levine PH, Zucker S: Preoperative predni-

sone therapy in platelet function disorders. Thromb Res 1981; 21:655–662.

Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW: Properties of the factor Xa binding site on human platelets. J Biol Chem 1978; 253:6908–6916.

Miller JL: Platelet function testing: an improved approach utilizing lumi-aggregation and an interactive computer system. Am J Clin Pathol 1984; 81:471–476.

Miller JL: Platelet-type von Willebrand disease. Thromb Haemost 1996; 75:865–869.

Miller JL, Castella A: Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. Blood 1982; 60:790–794.

Descoberta de uma mutação de aumento da função no receptor plaquetário do vWF que mimetiza a DvW do tipo 2B.

Miller JL, Cunningham D, Lyle VA: Mutation in the gene encoding platelet glycoprotein Ibα in platelet-type von Willebrand disease. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4761–4765.

Miller JL, Kupinski JM, Castella A: Von Willebrand factor binds to platelets and induces aggregation in platelet-type but not type IIB von Willebrand disease. J Clin Invest 1983; 72:1532–1542.

Miller JL, Lyle VA, Cunningham D: Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib alpha leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard–Soulier disease. Blood 1992; 79:439–446.

Miller JL, Ruggeri ZM, Lyle VA: Unique interactions of asialo von Willebrand factor with platelets in platelet-type von Willebrand disease. Blood 1987; 70:1804–1809.

Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA: Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. J Clin Invest 1986; 78:1456–1461.

Moia M, Mannucci PM, Vizzotto L: Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. Lancet 1987; 8570:1227–1229.

Moliterno AR, Siebel KE, Sun AY: A novel thrombopoietin signaling defect in polycythemia vera platelets. Stem Cells 1998; 16:185–192.

Montgomery RR, Kunicki TJ, Taves C: Diagnosis of Bernard–Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia with a monoclonal assay on whole blood. J Clin Invest 1983; 71:385–389.

Desenvolvimento de técnicas imunológicas para o diagnóstico de distúrbios plaquetários hereditários.

Moore A, Nachman RL: Platelet Fc receptor: increased expression in myeloproliferative disease. J Clin Invest 1981; 67:1064–1071.

Moore JC, Hayward CP, Warkentin TE: Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. Blood 2001; 98:1842–1846.

Moroi M, Jung SM, Okuma M: A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J Clin Invest 1989; 84:1440–1445.

Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C: A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. Br J Haematol 2004; 127:552–560.

Nieminen U, Kekomaki R: Quinidine-induced thrombocytopenic purpura: clinical presentation in relation to drug-dependent and drug-independent platelet antibodies. Br J Haematol 1992; 80:77–82.

Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W: Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001; 20:2120–2130.

Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP: Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. Nature 1985; 318:470–472.

Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Sixma JJ: Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. Blood 1987; 70:620–623.

Nieuwenhuis HK, Sakariassen KS, Houdijk PM: Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. Blood 1986; 68:692–695.

Nishibori M, Cham B, McNicol A: The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky–Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. J Clin Invest 1993; 91:1775–1782.

Novak EK, McGarry MP, Swank RT: Correction of symptoms of platelet storage pool deficiency in animal models for Chediak–Higashi syndrome and Hermansky–Pudlak syndrome. Blood 1985; 66:1196

Novak EK, Swank RT, Hui SW: Platelet storage pool deficiency in mouse pigment mutations associated with seven distinct genetic loci. Blood 1984; 63:536–544.

Nowak G, Bucha E: Quantitative determination of hirudin in blood and body fluids. Semin Thromb Hemost 1996; 22:197–202.

Nurden AT, Caen JP: Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. Nature 1975; 255:720–722.

Artigo clássico iniciando o campo da biologia e da fisiopatologia da glicoproteína plaquetária.

Nurden AT, George JN: Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann thrombasthenia, Bernard–Soulier syndrome, and other disorders. In Colman RW (ed.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 921–943.

Nurden AT, Kunicki TJ, Dupuis D, et al: Specific protein and glycoprotein deficiencies in platelets isolated from two patients with the gray platelet syndrome. Blood 1982; 59:709–718.

Nurden P, Jandrot-Perrus M, Combrie R: Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. Blood 2004; 104:107–114.

Nurden P, Savi P, Heilmann E: An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb–IIIa complex function. J Clin Invest 1995; 95:1612–1622.

Offermanns S, Toombs CF, Hu YH: Defective platelet activation in Gαq-deficient mice. Nature 1997; 389:183–186.

Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR: Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:170–177.

Othman M, Notley C, Lavender FL, et al: Identification and functional characterisation of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. Blood 2005; 105:4330–4336.

Oury C, Lenaerts T, Peerlinck K: Congenital deficiency of the phospholipase C coupled platelet P2Y1 receptor leads to a mild bleeding disorder. Thromb Hemost 1999(Suppl): 20–21.

Oury C, Toth-Zsamboki E, Van Geet C: A natural dominant negative P2X1 receptor due to deletion of a single amino acid residue. J Biol Chem 2000; 275:22611–22614.

Padilla A, Moake JL, Bernardo A: P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. Blood 2004; 103:2150–2156.

Patel YM, Patel K, Rahman S: Evidence for a role for Gαi1 in mediating weak agonist-induced platelet aggregation in human platelets: reduced Gαi1 expression and defective Gi signaling in the platelets of a patient with a chronic bleeding disorder. Blood 2003; 101:4828–4835.

Peyvandi F, Ferrari S, Lavoretano S: von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2004; 127:433–439.

Pfueller SL, Bilston RA, Logan D: Heterogeneity of drug-dependent platelet antigens and their antibodies in quinine- and quinidine-induced thrombocytopenia: involvement of glycoproteins Ib, IIb, IIIa, and IX. Blood 1988; 72:1155–1162.

Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM: GPIIb–IIIa: The responsive integrin. Cell 1991; 65:359–362.

Pincus MR, Dykes DC, Carty RP: Conformational energy analysis of the substitution of Val for Gly 233 in a functional region of platelet GPIbα in platelet-type von Willebrand disease. Biochim Biophys Acta 1991; 1097:133–139.

Podolnikova NP, Yakubenko VP, Volkov GL: Identification of a novel binding site for platelet integrins alpha IIb beta 3 (GPIIbIIIa) and alpha 5 beta 1 in the gamma C-domain of fibrinogen. J Biol Chem 2003; 278:32251–32258.

Poon MC, d'Oiron R: Recombinant activated factor VII (NovoSeven) treatment of platelet-related bleeding disorders. International Registry on Recombinant Factor VIIa and Congenital Platelet Disorders Group. Blood Coagul Fibrinolysis 2000; 11(Suppl 1):55–68.

Quinn M, Deering A, Stewart M: Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. Circulation 1999; 99:2231–2238.

Raccuglia G: Gray platelet syndrome: a variety of qualitative platelet disorder. Am J Med 1971; 51:818

Rao AK: Acquired disorders of platelet function. In Clagett P (ed.): Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins 2005a, in press.

Rao AK: Inherited disorders of platelet secretion and signal transduction. In Clagett P (ed.): Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005b, in press.

Rao AK, Ghosh S, Sun L: Effect of mechanism of platelet dysfunction on response to DDAVP in patients with congenital platelet function defects. A double-blind placebo-controlled trial. Thromb Haemost 1995; 74:1071–1078.

Rao AK, Jalagadugula G, Sun L: Inherited defects in platelet signaling mechanisms. Semin Thromb Hemost 2004; 30:525–535.

Revisão recente e abrangente da biologia da sinalização e da fisiopatologia da plaqueta.

Rauova L, Poncz M, McKenzie SE: Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. Blood 2005; 105:131–138.

Remold-O'Donnell E, Rosen FS, Kenney DM: Defects in Wiskott–Aldrich syndrome blood cells. Blood 1996; 87:2621–2631.

Remuzzi GD, Marchesi M, Livio AE: Altered platelet and vascular prostaglandin-generation in patients with chronic renal failure and prolonged bleeding times. Thromb Res 1978; 13:1007–1115.

Rendu F, Breton-Gorius J, Trugnan G: Studies on a new variant of the Hermansky–Pudlak syndrome: qualitative, ultrastructural, and functional abnormalities of the platelet-dense bodies associated with a phospholipase A defect. Amer J Hemat 1978; 4:387–399.

Rodgers RPC, Levin J: A critical reappraisal of the bleeding time. Semin Thromb Hemost 1990; 16:1–20.

Artigo de destaque (e todo o tema do periódico) demonstrando o valor preditivo do tempo de sangramento em uma ampla variedade de contextos clínicos.

Rosenberg N, Dardik R, Rosenthal E: Mutations in the alphaIIb and beta3 genes that cause Glanzmann thrombasthenia can be distinguished by a simple procedure using transformed B-lymphocytes. Thromb Haemost 1998; 79:244–248.

Rossi G, Cattaneo C, Motta M: Platelet kinetic study in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) refractory or relapsing after corticosteroid treatment. Hematol J 2002; 3:148–152.

Ruan J, Peyruchaud O, Alberio L: Double heterozygosity of the GPIIb gene in a Swiss patient with Glanzmann's thrombasthenia. Br J Haematol 1998; 102:918–925.

Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM: Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. N Engl J Med 1980; 302:1047–1051.

Artigo clássico sobre a descoberta da mutação de aumento da função do vWF responsável pela DvW do tipo 2B.

Russell SD, Roth GJ: Pseudo-von Willebrand disease: A mutation in the platelet glycoprotein Ibα gene associated with a hyperactive surface receptor. Blood 1993; 81:1787–1791.

Sachs UJH, Kiefel V, Bohringer M: Single amino acid substitution in human platelet glycoprotein Ib beta is responsible for the formation of the platelet-specific alloantigen Iy(a). Blood 2000; 95:1849–1855.

Sadler JE: Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. Blood 2003; 101:2089–2093.

Artigo intrigante questionando se níveis plasmáticos diminuídos de vWF deveriam ser considerados simplesmente um fator de risco aumentado de sangramento, em vez de uma doença real.

Sadler JE: New concepts in von Willebrand disease. Annu Rev Med 2005; 56:173–191.
Revisão recente e abrangente da biologia do fator de von Willebrand e da doença de von Willebrand.
Schafer AI: Deficiency of platelet lipoxygenase activity in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 1982; 306:381–386.
Schafer AI: Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. Blood 1984; 64:1–12.
Artigo clássico explorando a relação entre as plaquetas e os distúrbios mieloproliferativos.
Schafer AI: Thrombocytosis. N Engl J Med 2004; 350:1211–1219.
Sehayek E, Ben-Yosef N, Modan M: Platelet parameters and aggregation in essential and reactive thrombocytosis. Am J Clin Pathol 1988; 90:431–436.
Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF: Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb–IIIa complex. J Biol Chem 1991; 266:7345–7352.
Solum NO: Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999a; 19:2841–2846.
Solum NO, Holme PA, Pedersen TM: Detection of biotinylated proteins in crossed immunoelectrophoresis gels: Studies on platelet membrane receptors and microparticles. Electrophoresis 1995; 16:1408–1413.
Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. J Cell Biol 1985; 101:880–886.
Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F: A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. Blood 1987; 69:1712–1720.
Sun L, Mao G, Rao AK: Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC-θ and impaired receptor--mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. Blood 2004; 103:948–954.
Takahashi H, Murata M, Moriki T: Substitution of Val for Met at residue 239 of platelet glycoprotein 16 alpha in Japanese patients with platelet-type von willebrand disease. Blood 1995; 85:727–733.
Taylor FB, Jr., Muller-Eberhard HJ: Qualitative description of factors involved in the retraction and lysis of dilute whole blood clots and in the aggregation and retraction of platelets. J Clin Invest 1970; 49:2068–2085.
Tchernev VT, Mansfield TA, Giot L: The Chediak–Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. Mol Med 2002; 8:56–64.
Tsai HM: Shear stress and von Willebrand factor in health and disease. Semin Thromb Hemost 2003; 29:479–488.
Tsai HM, Lian EC: Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1998; 339:1585–1594.
Artigo marcante que levou ao reconhecimento da ADAMTS-13.
Ushikubi F, Ishibashi T, Narumiya S: Analysis of the defective signal transduction mechanism through the platelet thromboxane A_2 receptor in a patient with polycythemia vera. Thromb Hemost 1992; 67:144–146.
Van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, Bussel J, de Haas M, von dem Borne AE: Three parameters, plasma thrombopoietin levels, plasma glycocalicin levels and megakaryocyte culture, distinguish between different causes of congenital thrombocytopenia. Br J Haematol 2002; 117:390–398.
Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vandecasteele G: A reliable von Willebrand factor: ristocetin cofactor enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between type 1 and type 2 von Willebrand disease. Semin Thromb Hemost 2002; 28:161–166.
Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S: A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. Thromb Haemost 2000; 83:107–113.
Van Vliet HH, Kappers-Klunne MC, van der Hel JW: Antibodies against glycosphingolipids in sera of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1987; 67:103–108.
Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T: Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. N Engl J Med 2003; 349:343–349.
Visentin GP, Newman PJ, Aster RH: Characteristics of quinine- and quinidine-induced antibodies specific for platelet glycoproteins IIb and IIIa. Blood 1991; 77:2668–2676.
Von dem Borne AEG, van Leeuwen EF, von Reisz LE: Neonatal alloimmune thrombocytopenia: detection and characterization of the responsible antibodies by the platelet immunofluorescence test. Blood 1981; 57:649–656.
Ware J, Russell SR, Marchese P: Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard–Soulier syndrome. J Clin Invest 1993; 92:1213–1220.
Warkentin TE: Heparin-induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. Thromb Haemost 1999a; 82:439–447.
Warkentin TE: Heparin-induced thrombocytopenia: a ten-year retrospective. Annu Rev Med 1999b; 50:129–147.
Warkentin TE, Greinacher A: Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest 2004; 126:311S–337S.
Revisão recente abrangente da trombocitopenia induzida pela heparina.
Warkentin TE, Kelton JG: Thrombocytopenia due to platelet destruction and hypersplenism. In: Hoffman R, Benz EJJr, Shattil SJ et al, editors: In: Hematology: Basic Principles and Practice. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2005a.2305–2325
Warkentin TE, Sheppard J-A I, Moore JC: Laboratory testing for the antibodies that cause heparin-induced thrombocytopenia: How much class do we need? J Lab Clin Med 2005b; 146:341–346.
Weiss HJ: Scott syndrome: a disorder of platelet coagulant activity. Semin Hematol 1994; 31:312–319.
Weiss HJ, Lages B: Platelet malondialdehyde production and aggregation responses induced by arachidonate, prostaglandin-G_2, collagen, and epinephrine in 12 patients with storage pool deficiency. Blood 1981; 58:27–33.
Weiss HJ, Lages B: The response of platelets to epinephrine in storage pool deficiency – evidence pertaining to the role of adenosine diphosphate in mediating primary and secondary aggregation. Blood 1988; 72:1717–1725.
Weiss HJ, Lages B: Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb–IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity – a comparison with Scott syndrome. Blood 1997; 89:1599–1611.
Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R: Pseudo von Willebrand's disease: an intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. N Engl J Med 1982; 306:326–362.
Descoberta de uma mutação de aumento na função no receptor plaquetário para o vWF que mimetiza a DvW do tipo 2B.
Weiss HJ, Witte LD, Kaplan KL: Heterogeneity in storage pool deficiency: Studies on granule-bound substances in 18 patients including variants deficient in -granules, platelet factor-4, β-thromboglobulin and platelet-derived growth factor. Blood 1979; 54:1296.
White JG: Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. Methods Mol Biol 2004; 272:47–63.
Métodos definitivos de microscopia eletrônica da plaqueta.
White JG, Edson JR, Desnick SJ: Studies on platelets in a variant of the Hermansky–Pudlak syndrome. Am J Pathol 1971; 63:319
Whitelock JL, Nolasco L, Bernardo A: ADAMTS-13 activity in plasma is rapidly measured by a new ELISA method that uses recombinant VWF-A2 domain as substrate. J Thromb Haemost 2004; 2:485–491.
Witkop CJ, Babcock MN, Rao GHR: Albinism and Hermansky–Pudlak syndrome in Puerto Rico. Bol Asoc Puerto Rico 1990; 82:333–339.
Woods VL, Jr, Kurata Y, Montgomery RR, et al: Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood 1984a; 64:1596–1560.
Woods, VL, Jr, Oh EH, Mason D, McMillan R: Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. Blood 1984b; 63:368–375.
Yang X, Sun L, Ghosh S: Human platelet signaling defect characterized by impaired production of 1,4,5 inositoltrisphosphate and phosphatic acid, and diminished pleckstrin phosphorylation. Evidence for defective phospholipase C activation. Blood 1996; 88:1676–1683.
Yee DL, Bray PF: Clinical and functional consequences of platelet membrane glycoprotein polymorphisms. Semin Thromb Hemost 2004; 30:591–600.
Zhou Q, Zhao J, Stout JG: Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. J Biol Chem 1997; 272:18240–18244.
Zigmond SH: How WASP regulates actin polymerization. J Cell Biol 2000; 150:117–120.
Zucker MB: Platelet aggregation measured by the photometric method. Methods Enzymol 1989; 169:117–133.
Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. Cell Mol Life Sci 2005; 62:971–988.
Zwicker JI, Uhl L, Huang WY: Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost 2004; 2:2133–2137.

CAPÍTULO 40

Abordagem laboratorial do risco trombótico

Richard A. Marlar PhD, Louis M. Fink MD, Jonathan L. Miller MD PhD

Vias anticoagulantes fisiológicas 886
Fatores ou proteínas trombofílicas 887
- Antitrombina 888
- Proteína C 888
- Proteína S 889
- Resistência à proteína C ativada e Fator V_{Leiden} 889
- Protrombina-20.210 889
- Níveis elevados de fator de coagulação 889
- Disfibrinogenemia 890
- Mecanismos hipofibrinolíticos 890
- Outros defeitos possíveis 890

Estados hipercoaguláveis adquiridos 890
- Síndrome antifosfolipídeo e anticoagulante lúpico 890
- Hiper-homocisteinemia 892

Aspectos gerais da avaliação laboratorial do risco trombótico 892

Referências bibliográficas 893

PONTOS-CHAVE

- A quantidade de coágulo formada é regulada por vários mecanismos regulatórios importantes. Sob condições normais, esses mecanismos controlam o excesso de formação de coágulo e cessam a trombose venosa. Os principais sistemas são o mecanismo da antitrombina, o sistema proteína C/proteína S e o mecanismo inibidor da via do fator tecidual.
- Deficiências – genéticas ou adquiridas – envolvendo as principais proteínas regulatórias (antitrombina, proteína C e proteína S) intensificam o risco de desenvolvimento de trombose venosa.
- Níveis aumentados de fatores pró-coagulantes ou polimorfismos (causadores de alteração funcional) também aumentam o risco de trombose venosa. Um polimorfismo bastante comum envolvendo o fator V (fator V_{Leiden}) reduz a capacidade do fator V ativado ser negativamente modulado pela proteína C ativada. Uma pretensa elevação dos níveis de protrombina (decorrente de um polimorfismo específico no par de bases 20.210) e níveis aumentados de fator VIII também agravam o risco de desenvolvimento de trombose.
- Outros defeitos herdados ou adquiridos envolvendo hemostasia (disfibrinogenemia e fibrinólise) e sistemas não hemostáticos (homocisteína) igualmente aumentam o risco de trombose venosa.
- A síndrome antifosfolipídeo (SAF) e o anticoagulante lúpico (AL) são distúrbios autoimunes que afetam o sistema de coagulação e intensificam o risco de desenvolvimento de trombose venosa e arterial. Os anticorpos do AL são heterogêneos e estão associados a uma variedade de anomalias laboratoriais, que somente podem ser detectadas por meio de uma bateria de testes.Uma das abordagens utilizadas para identificar a SAF e o AL está descrita.
- Ao avaliar o paciente quanto ao risco trombótico, é importante planejar o momento adequado para realizar o teste, a fim de evitar erros de interpretação associados a uma diminuição dos níveis de anticoagulantes naturais secundária ao consumo por trombose ou à anticoagulação de deficiências herdadas.

Mecanismos regulatórios hemostáticos limitam a quantidade, a localização e a duração da formação de coágulos. Uma disfunção envolvendo os principais sistemas regulatórios da coagulação sanguínea pode levar à condição de formação de coágulos em excesso (trombose). Deficiências ou anormalidades, genéticas ou adquiridas, que afetem os fatores regulatórios são capazes de aumentar o risco de tromboembolismo. O presente capítulo discute inúmeros fatores que influenciam o equilíbrio relacionado ao sangramento ou à trombose, bem como o papel do laboratório na identificação de anormalidades associadas a tais fatores.

Vias anticoagulantes fisiológicas

A antitrombina (antigamente denominada antitrombina III) é um inibidor de serina protease plasmático circulante que regula a trombina e o fator Xa, além dos fatores IXa, XIa, XIIa e VIIa em menor extensão (Stassen, 2004). A função da antitrombina é significativamente mais forte na superfície das células endoteliais, em decorrência da ação das glicosaminoglicanas ligadas às células (heparan sulfato, dermatan sulfato e pequenas quantidades de heparina) (Fig. 40.1) e também, farmacologicamente, por ação da heparina (Cap. 41).

O segundo sistema regulatório antitrombótico mais importante é a via da proteína C, com um aparente mecanismo de dois forcados constituído por um componente anticoagulante principal (Fig. 40.2) e outro pró-fibrinolítico indireto. A via é complexa, envolvendo múltiplos fatores que precisam interagir para gerar um mecanismo de múltiplas etapas (Esmon, 2003a, b). A proteína central, proteína C, é uma pró-enzima plasmática dependente de vitamina K. O sistema é iniciado com a geração de um excesso de trombina não acoplada a coágulo, que rápida e firmemente se liga a uma glicoproteína transmembrânica presente na célula endotelial, a trombomodulina (TM, na Fig. 40.2). A trombina ligada a esse complexo sofre uma dramática alteração em termos de especificidade do substrato. Sendo, no passado, a enzima pró-coagulante *sine qua non* do sistema de coagulação e um potente ativador de plaquetas, a nova habilidade de ativar a proteína C transforma a trombina em uma poderosa enzima anticoagulante. A trombina acoplada à trombomodulina, aliada ao receptor da proteína C na célula endotelial (EPCR, *endothelial protein C receptor*), cliva rapidamente um pequeno peptídeo de ativação a partir da molécula da proteína C (Stearns-Kurosawa, 1996; Esmon, 2004). Esse processo gera uma enzima serina protease ativa, denominada proteína C ativada (PCA). Uma segunda proteína plasmática inibitória dependente de vitamina K – a proteína S (PS, na Fig. 40.2) – serve de cofator crítico para a PCA. A proteína S é uma molécula que atua como cofator não enzimático, ligando-se em equilíbrio a uma grande proteína do complemento – a proteína ligadora de C4b (Rigby, 2004). Somente a forma não ligada (ou "livre") da proteína S possui atividade de cofator. O complexo PCA e proteína S na superfície fosfolipídica das plaquetas ou de outras células rapidamente inativa os fatores Va e VIIIa, diminuindo de forma significativa a geração de trombina nas vias pró-coagulantes (Esmon, 2003a, b). O sistema da proteína C também parece exercer uma significativa atividade pró-fibrinolítica, ainda que indiretamente. Acredita-se que essa atividade envolva o inibidor fibrinolítico trombina-ativado (TAFI, *thrombin-activated fibrinolytic inhibitor*) (van de Wouwer, 2004), bem como o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor 1*). O TAFI é uma carboxipeptidase plasmática rapidamente ativada pelo complexo trombina-trombomodulina (van de Wouwer, 2004). A forma ativa da carboxipeptidase cliva os resíduos de lisina C-terminal da fibrina que já sofreu clivagem proteolítica por ação da plasmina. A perda desses resíduos compromete a eficiência da ligação das proteínas ativadoras de plasminogênio à fibrina e, assim,

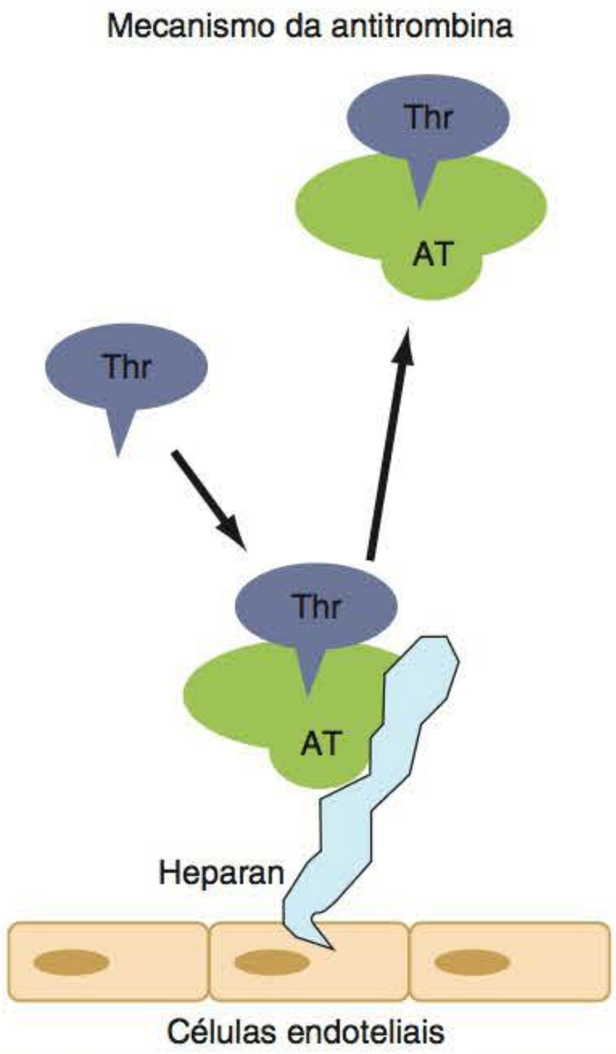


Figura 40.1 Mecanismos do inibidor antitrombina. AT = antitrombina (anteriormente denominada antitrombina III); Heparan = heparan sulfato (glicosaminoglicana); Thr = trombina (ou outra enzima de coagulação, como o fator X).

modula negativamente o processo fibrinolítico. A PCA, através da inativação do fator Va, provoca a diminuição da geração de trombina, com consequente retardo da ativação do TAFI. PAI-1 é inibido pela PCA e com isso a atividade fibrinolítica global é intensificada (Madden, 1991). Segundo experimentos realizados *in vitro* e com animais, o sistema da proteína C também pode apresentar outras propriedades de defesa importantes, incluindo atividade anti-inflamatória e atividade de complemento (Esmon, 2003a).

Conforme ilustra a Figura 40.3, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) constitui outro sistema regulatório que controla a iniciação da via do fator tecidual (também denominada "via extrínseca") da coagulação (Smithies, 2004). Esse inibidor apresenta dois sítios de ligação reativos: um para o fator Xa (previamente ativado pelo complexo fator tecidual-fator VIIa) e outro para o próprio complexo fator tecidual-fator VIIa (Esmon, 2003b).

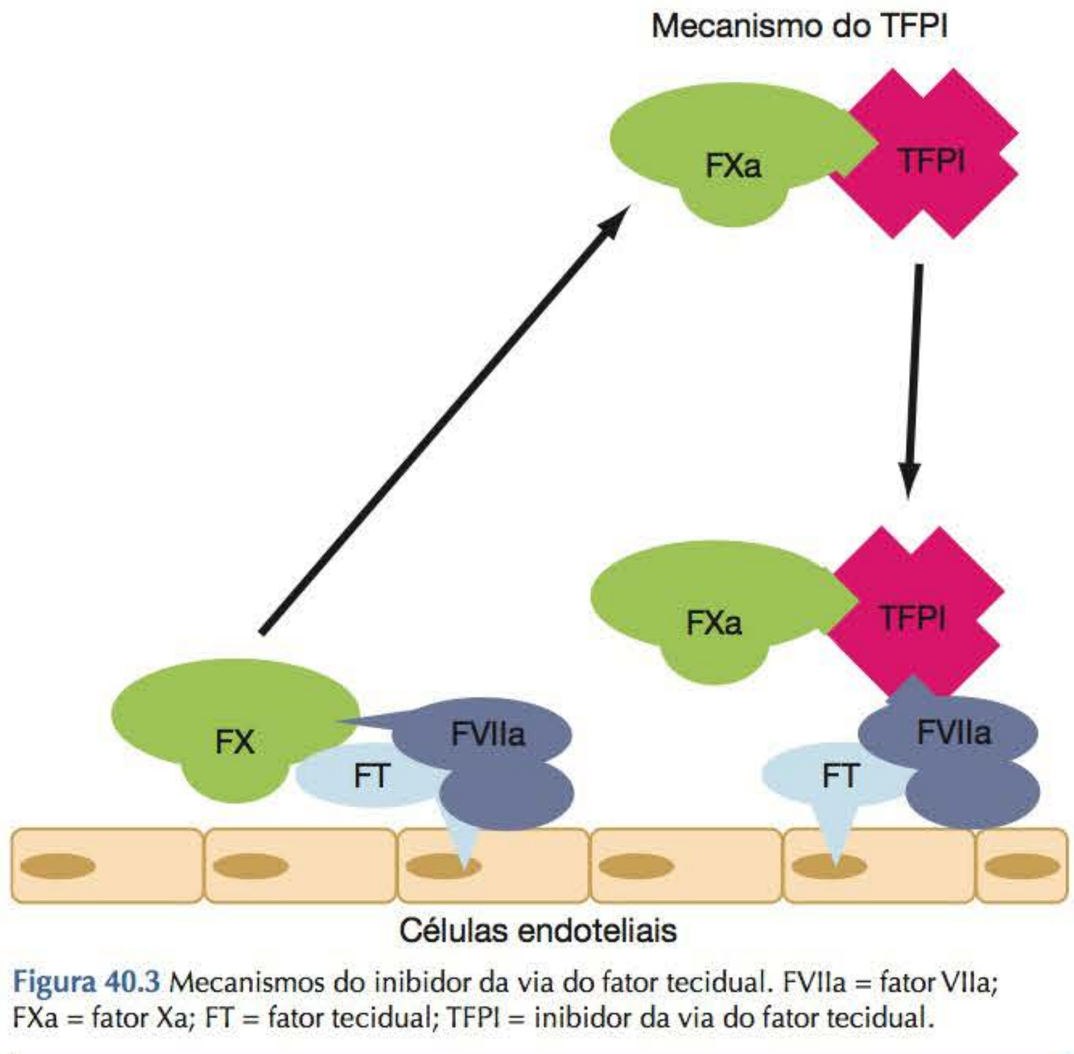


Figura 40.3 Mecanismos do inibidor da via do fator tecidual. FVIIa = fator VIIa; FXa = fator Xa; FT = fator tecidual; TFPI = inibidor da via do fator tecidual.

Um pouco de fator Xa é gerado, então – e somente então – o TFPI inibe o complexo fator tecidual-fator VIIa. A ligação dessas proteínas pelo TFPI elimina sua capacidade de contribuir ainda mais para a formação do coágulo. O TFPI, do mesmo modo, exerce um mecanismo de retroalimentação negativa para modular negativamente o processo de coagulação (Esmon, 2003b).

Fatores ou proteínas trombofílicas

Um desequilíbrio entre os sistemas pró-coagulantes e os mecanismos regulatórios pode acarretar sangramentos ou trombose. Um aumento dos níveis de fatores pró-coagulantes ou uma queda dos níveis de fatores reguladores inclinarão o equilíbrio para a produção excessiva de fibrina, com consequente formação de trombo (Lane, 2000). Tais desequilíbrios podem ser causados por fatores genéticos ou adquiridos, ou por uma combinação de ambos (Tabs. 40.1 e 40.2). Entretanto, o processo que conduz à formação excessiva de trombina não é tão simples quanto a ocorrência desproporcional de um único

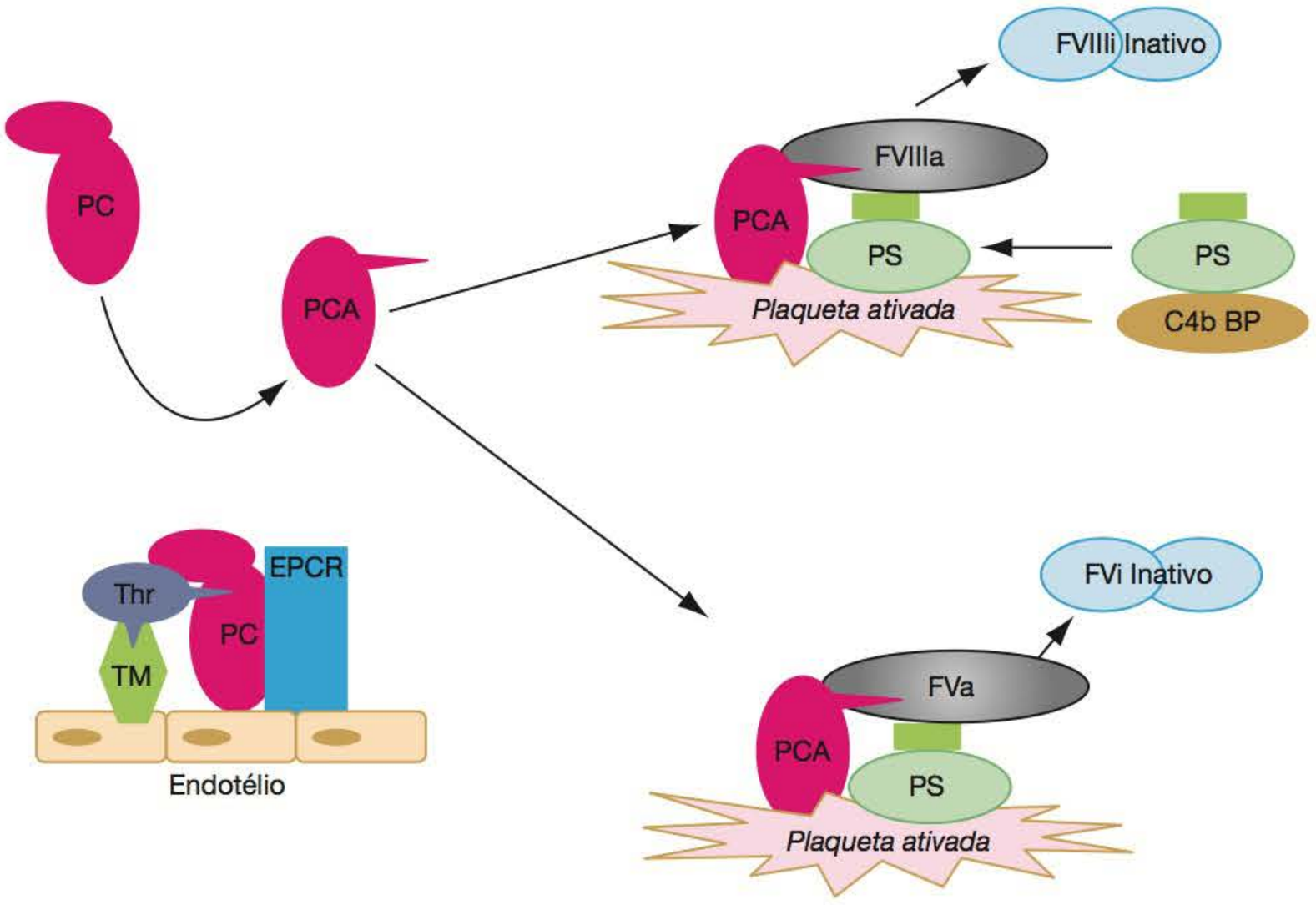


Figura 40.2 Via da proteína C. PCA = proteína C ativada; C4b BP = proteína ligadora do fator 4b do complemento; EPCR = receptor da proteína C da célula endotelial; FVa = fator Va; FVIIIa = fator VIIIa; PC = proteína C; PS = proteína S; Thr = trombina; TM = trombomodulina.

Tabela 40.1 Prevalência e risco trombótico aumentado estimado para fatores trombóticos

Fatores de risco para trombose	Prevalência na população geral (%)	Prevalência na população trombofílica (%)	Risco trombótico estimado (vezes)
Antitrombina diminuída	<0,01	<1	12–20
Proteína C diminuída	0,3	4–8	8–10
Proteína S diminuída	0,2	7–12	10–15
PCA-R/fator V_{Leiden}	3–4*	10–40*	1,8–2,6
Protrombina G20.210A	2–3*	10–15*	1,5–2,2
Fator VIII elevado	10–15	20–35	2–4,5
Fibrinogênio elevado	5–12	20–30	2–3
Disfibrinogenemia	<0,01	0,3–0,8	1,5–3
Trombomodulina mutante	<0,01	0,2–0,8	2–4
Homocisteína elevada	3–5	8–15	2–4,5
Anticoagulante lúpico	<1,0	10–30	2–10
Anticoncepcionais orais	N/A	N/A	2–3
Gravidez	N/A	N/A	4–8

* Prevalência de fator V_{Leiden} e protrombina 20.210 na população caucasiana; entretanto, as populações africana e asiática apresentam prevalências muito baixas (< 0,01%).

Tabela 40.2 Risco trombótico estimado para cooperatividade de fatores múltiplos

Fator de risco 1	Fator de risco 2	Risco combinado (vezes)
Proteína C	Fator V_{Leiden}	25–45
Proteína S	Fator V_{Leiden}	25–50
Fator V_{Leiden}	Fator VIII elevado	12–20
Fator V_{Leiden}	Anticoncepcionais orais	8–20
Fator V_{Leiden}	Gravidez	25–40

fator em relação aos demais. Trata-se, em vez disso, de uma combinação de fatores discreta a moderadamente desequilibrados entre si que resulta na formação excessiva de fibrina no sítio de lesão inicial. Como consequência, ocorre oclusão vascular e acúmulo de fibrina (Franco, 2001). Esse paradigma multifatorial, no qual tais fatores interagem de forma cooperativa, conduz a um risco significativo de desenvolvimento de trombose. Sendo assim, é necessário realizar uma completa avaliação dos fatores de risco identificados e estabelecidos, a fim de determinar o potencial risco global apresentado por um dado indivíduo. Os fatores descritos a seguir são os principais componentes conhecidos associados ao risco aumentado de desenvolvimento de trombo (ver na Tab. 40.1 um resumo sobre a prevalência e risco relativo).

Antitrombina

Foram identificadas deficiências de antitrombina, tanto hereditárias como adquiridas (Egeber, 1965; Bloemenkamp, 2003). A deficiência genética da antitrombina é um distúrbio raro (1 em cada 10.000 indivíduos) na população em geral, ocorrendo em cerca de 1% dos pacientes diagnosticados com trombose venosa familiar (Adcock, 1997). A antitrombina é codificada por um gene autossômico, cuja expressão aparentemente é dominante e apresenta alta penetrância. São conhecidos inúmeros mutantes desse gene (Adcock, 1997; Lane, 1997). Indivíduos heterozigotos apresentam níveis plasmáticos de antitrombina equivalentes a cerca de 50% dos níveis normais, sendo usualmente sintomáticos (em contraste com os indivíduos heterozigotos para deficiências de fatores, que costumam ser assintomáticos). Tanto as mutações de tipo I (atividade reduzida e concomitante diminuição da concentração de antígenos) como as de tipo II (atividade reduzida com níveis normais de antígeno) foram descritas em indivíduos com deficiência de antitrombina (Lane, 1997). A deficiência de antitrombina homozigota é incompatível com a vida, exceto no caso das mutações únicas de tipo II envolvendo a região de ligação à heparina, em que os pacientes tipicamente manifestam trombose venosa (Kuhle, 2001). A apresentação clínica mais comum é a trombose venosa profunda (TVP), que ocorre nos membros inferiores, e a embolia pulmonar (EP). Notavelmente, também pode haver formação de trombos nas veias retinal, mesentérica e esplênica (Bloemenkamp, 2003). As deficiências de antitrombina adquiridas ocorrem em coagulação intravascular disseminada (CID) (Asakura, 2001), doença hepática, síndrome nefrótica, durante o período agudo subsequente à trombose venosa e durante a terapia com heparina (Marlar, 1990b). Em alguns casos, defeitos adquiridos podem estar associados a níveis plasmáticos equivalentes a 30 a 50% dos níveis normais e, assim, serem confundidos com deficiências genéticas. Durante a fase de recém-nascido, os níveis de antitrombina são também caracteristicamente baixos, atingindo os níveis observados no adulto por volta dos 6 meses de idade (Streif, 1999).

Tanto a atividade antitrombina como o antígeno podem ser determinados no plasma com auxílio de *kits* comerciais. A atividade de antitrombina é determinada com base em um método cromogênico, empregando fator Xa ou trombina como enzima inibida. O antígeno antitrombina é tipicamente determinado com o uso de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) ou por nefelometria. As faixas normais para ambos – atividade e antígeno antitrombina – são bem estreitas, usualmente ao redor de 80 a 120% do normal (Adcock, 1997; Kuhle, 2001).

Proteína C

A proteína C – proteína central na via da proteína C – é dependente de vitamina K. Deficiências de proteína C, genéticas ou adquiridas, aumentam o risco de desenvolvimento de trombose. Mais de 100 mutações foram descritas para ambos os tipos: tipo 1 (atividade e concentração de antígenos diminuídas) e tipo 2 (atividade reduzida com níveis normais de antígeno) (Lane, 1996). Como mostra a Tabela 40.1, pesquisas envolvendo a população geral constataram a existência de um número significativo de indivíduos apresentando níveis diminuídos de proteína C. Um aspecto interessante observado ao se comparar níveis de proteína C, tipos de mutação e estilos de vida foi a ausência de diferenças entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos. A diferença existente entre as deficiências de proteína C sintomáticas e assintomáticas provavelmente se deve a outras influências exercidas por fatores de risco trombótico adicionais, encontrados na população sintomática (Marlar, 1990a). Na deficiência de proteína C homozigota, indivíduos severamente deficientes (< 1% atividade de proteína C) manifestam complicações neurológicas e oftálmicas durante o desenvolvimento intrauterino. Esses indivíduos subsequentemente desenvolvem púrpura fulminante e CID durante a fase de recém-nascido (Peters, 1988; Marlar, 1990c). Esse distúrbio é incompatível com a vida, a menos que seja tratado com reposição da proteína C (plasma fresco congelado ou concentrado de proteína C) e terapia anticoagulante. A meia-vida plasmática da proteína C é relativamente curta (6 a 8 horas). A iniciação da terapia anticoagulante oral (em especial com altas doses de carga), sem sobreposição com anticoagulação prévia por heparina em indivíduos heterozigotos para deficiência da proteína C, pode conduzir a uma condição pouco frequente (porém devastadora) em que há aparecimento de lesões cutâneas trombóticas, conhecida como necrose cutânea induzida por varfarina (Marlar, 1990b; Moll, 2004; Tai, 2004).

O teste para detecção de proteína C é realizado em amostras de plasma, empregando ensaios de determinação de atividade de coagulação ou de base cromogênica ou, ainda, um dos vários tipos de ensaios antigênicos. O ensaio de determinação da atividade mede a função da molécula no plasma. Entretanto, há a possibilidade de os ensaios cromogênicos relatarem erroneamente a presença de moléculas de proteína C funcionais que, na verdade, não apresentam funcionalidade em relação a seus substratos coagulantes naturais. Por esse motivo, um ensaio baseado na coagulação é recomendado para avaliação da atividade funcional da proteína C (Resende, 2004). Na deficiência de proteína C de tipo I, a atividade funcional e os níveis de antígeno encontram-se reduzidos a cerca de 50% dos níveis normais. Já na deficiência de tipo II, os níveis funcionais estão reduzidos em média a 50% dos níveis normais, porém os níveis de antígeno equivalem a 100% dos níveis normais.

Proteína S

Ambas as formas de deficiência de proteína S – genética e adquirida – estão associadas a risco aumentado de trombose (Esmon, 2003a). Conforme discutido anteriormente, a proteína S, aliada à PCA, se liga à superfície fosfolipídica de uma plaqueta ou outra célula e intensifica a inativação enzimática dos fatores Va e VIIIa (Hackeng, 1994; van Wijnen, 1996). Cerca de 40% do conteúdo de proteína S aparece livremente no plasma, enquanto os 60% restantes estão acoplados a uma proteína do complemento – proteína ligadora de C4b (C4bBP, *C4b-binding protein*) (Nelson, 1992). Diversas condições patológicas e fisiológicas podem alterar a proporção proteína S livre/ligada, modulando efetivamente a via inibitória da proteína C (Mackie, 2001). Os níveis de proteína S sofrem uma queda característica durante a gravidez e, a partir da 10ª semana de gestação, atingem valores médios equivalentes a 60% dos valores observados nos controles (Cerneca, 1997).

O gene codificador da proteína S é autossômico e se expressa com penetrância variável (Rezende, 2004). Foram descritas mais de 50 mutações associadas ao risco trombótico aumentado (Simmonds, 1998). Há relatos da ocorrência da tradicional deficiência quantitativa de tipo I (diminuição da atividade da proteína S e diminuição concomitante dos níveis de antígeno), bem como da deficiência qualitativa de tipo II (diminuição da atividade de proteína S e manutenção de níveis normais de antígeno livre e total). Por causa do equilíbrio existente entre a proteína S e a C4bBP, foi identificado um terceiro tipo de mutação (Simmonds, 1998): a deficiência de tipo III é similar à deficiência de tipo I, contudo, a reduzida atividade da proteína S está associada à proteína S livre normal, apesar da diminuição dos níveis de proteína S total. Estudos recentes sugeriram, todavia, que os raros indivíduos com deficiência de tipo III na verdade talvez não apresentem risco aumentado de trombose (Brouwer, 2005; Libourel, 2005). A deficiência de proteína S homozigota com severa redução dos níveis dessa molécula (< 1% da atividade) foi descrita com mesma apresentação e tratamento similar ao adotado para indivíduos homozigotos com deficiência de proteína C (Brouwer, 2005). Os sintomas são púrpura fulminante e CID durante a fase de recém-nascido, com desenvolvimento de complicações oftálmicas e neurológicas na vida intrauterina. Esse distúrbio é incompatível com a vida, a menos que seja tratado com terapia de reposição (plasma fresco congelado) e terapia anticoagulante.

A determinação dos níveis plasmáticos de proteína S é feita por ensaio para determinação da atividade coagulante da proteína S e ensaio antigênico para quantificação dos níveis de antígeno de proteína S livre e total. Pode ser bastante difícil estabelecer o diagnóstico final de deficiência de proteína S, dada a complexidade da interação da mesma com a C4bBP (Nelson, 1992; Goodwin, 2002; Persson, 2003). O ensaio de atividade mede a fração funcional de proteína S existente na amostra de plasma, porém há relatos de detecção de níveis falsamente baixos de atividade de proteína S (Goodwin, 2002). Existem 2 tipos de ensaios antigênicos disponíveis. Os ensaios cujas quantificações incluem ambas as frações de proteína S, livre e ligada, medem a quantidade total de proteína S em uma amostra de plasma ("antígeno de proteína S total"). Já os ensaios para a fração livre da proteína S medem apenas a fração não ligada da proteína, o que pode ser conseguido com uso de anticorpo monoclonal para proteínas S não ligadas ou pela inclusão de uma etapa de precipitação com polietilenoglicol, na qual são removidas as moléculas constituintes da fração ligada da proteína S (Comp, 1986; Goodwin, 2002; Persson, 2003). Um ensaio funcional baseado na coagulação é recomendado para avaliação inicial da proteína S. Nesse ensaio, caso sejam detectados níveis baixos de proteína, um teste reflexo deve ser realizado para determinação das frações livre e total dos antígenos de proteína S. Estabelecer um diagnóstico definitivo de deficiência congênita de proteína S é uma tarefa desafiadora, em decorrência da complexidade da interação existente entre essa proteína e a C4bBP, as condições adquiridas capazes de modificar o equilíbrio existente entre as formas livre e ligada e a presença de antagonistas de vitamina K (Simmonds, 1998; Mackie, 2001; Goodwin, 2002; Rezende, 2004).

Resistência à proteína C ativada e Fator V_{Leiden}

Considera-se que a resistência à proteína C ativada (PCA-R) está presente quando a adição de PCA exógena ao plasma não resulta em prolongamento antecipado dos testes de tempo de coagulação, entre os quais o tempo parcial de tromboplastina (PTT) (Dahlbäck, 1999). A PCA-R é considerada um dos fatores de risco genético mais comuns para trombose venosa. Entretanto, enquanto a população caucasiana apresenta uma prevalência média de 4%, as populações africana e asiática apresentam prevalências menores (Ridker, 1995; Heijmans, 1998). Em condições normais, a PCA inativa enzimaticamente os fatores Va e VIIIa, prolongando o tempo de coagulação do plasma. Na PCA-R, a habilidade da PCA de promover a degradação enzimática do fator Va está significativamente reduzida. O polimorfismo existente em um dos sítios de clivagem no fator Va é um resíduo de arginina substituído por um resíduo de glutamina (R506Q), que torna o sítio resistente à clivagem (Aparicio, 1996). A substituição do aminoácido se deve a uma alteração envolvendo um único nucleotídeo do gene, denominado V_{Leiden} (Bertina, 1994). O fator V_{Leiden} aumenta em 2 a 3 vezes o risco relativo de desenvolvimento de trombose em indivíduos heterozigotos para a condição, e em 8 a 12 vezes em indivíduos homozigotos (Svensson, 1997; De Stefano, 1999). Existem inúmeras variações do ensaio para PCA-R, e algumas são bastante específicas para o fator V_{Leiden}. Para os ensaios de PCA-R, são utilizados 2 testes de coagulação: com e sem PCA. Se a proporção do tempo de coagulação com adição de PCA dividido pelo tempo de coagulação na ausência de PCA for suficientemente alta (usualmente > 2), significa que a PCA-R ou o fator V_{Leiden} estão ausentes. Proporções menores, em contraste, sugerem que a amostra é PCA-resistente e, portanto, indicam a presença do fator V_{Leiden} no paciente. Dependendo do método utilizado, foram identificadas inúmeras causas adquiridas de resistência à PCA (Tripodi, 1997). Malignidades, SAF, gravidez e até mesmo hospitalização podem gerar resultados anormais (Cumming, 1995; Graf, 2003). O polimorfismo específico do fator V_{Leiden} é determinado por meio de métodos de diagnóstico molecular (Aparicio, 1996; Tripodi, 1997).

Protrombina-20.210

Um polimorfismo encontrado no gene da protrombina, envolvendo o par de base 20.210 consiste em uma substituição de guanina por adenina na região 3' não traduzida do gene (Colucci, 2004). Esse polimorfismo duplica o risco de trombose venosa (Eikelboom, 1999). Indivíduos heterozigotos caracteristicamente apresentam níveis plasmáticos de protrombina mais altos em comparação àqueles que não possuem o polimorfismo. No entanto, até mesmo esses níveis mais altos usualmente caem dentro do intervalo referencial estabelecido para a atividade de protrombina pela maioria dos laboratórios. Do mesmo modo, é necessário realizar procedimentos de diagnóstico molecular para estabelecer o diagnóstico de protrombina 20.210 (Poort, 1996; Gruenewald, 2000). Acredita-se que ocorra aumento da transcrição do gene em seu produto, provavelmente como resultado do prolongamento do período em que as moléculas de RNA-m são traduzidas (De Stefano, 1999). A protrombina 20.210 constitui um fator de risco comum para desenvolvimento de trombose venosa em populações de descendentes de europeus (cerca de 3%), com menor prevalência em outras populações não europeias (De Stefano, 1999).

Níveis elevados de fator de coagulação

Além da elevação dos níveis de protrombina atuando como fator de risco para desenvolvimento de trombose, há relatos de que a elevação dos níveis de vários fatores de coagulação distintos também implica em intensificação do risco de trombose. Como os níveis dos fatores VII, VIII, IX, XI ou de fibrinogênio são elevados, os riscos relativos de desenvolvimento de trombose aumentam proporcionalmente (1,5 a 6 vezes) (Kannel, 1987; O'Donnell, 1997; Kyrle, 2000; Meijers, 2000; Weltermann, 2003). O mais estudado e complexo dentre os fatores de risco descritos é o fator VIII. Esse fator é regulado por mecanismos genéticos e fisiológicos que aumentam os níveis de fator VIII em situações de estresse e atividade física. Há relatos de elevação familiar dos níveis desse fator; contudo, é possível detectar níveis transitoriamente altos em pacientes expostos ao estresse decorrente de diversas condições clínicas. Níveis de fator VIII equivalentes a 120–150% dos níveis normais estão associados a um risco de trombose 1,5 a 2 vezes maior. Níveis equivalentes a 300–400% implicam em risco relativo 3 a 6 vezes maior (O'Donnell, 1997).

Disfibrinogenemia

O fibrinogênio é a proteína final na formação do coágulo e constitui um dos principais componentes de um trombo venoso. São raros os relatos publicados de anormalidades associadas ao risco aumentado de trombose decorrente da disfunção de moléculas de fibrinogênio (Haverkate, 1995). A incidência dos casos reconhecidos de disfibrinogenemia na trombose familiar é de aproximadamente 0,8%. Considera-se que as disfibrinogenemias aumentam o risco de trombose em cerca de 2 a 6 vezes. Na atualidade, os únicos ensaios usualmente empregados para avaliar o fibrinogênio são ensaios funcionais de coagulabilidade e ensaios antigênicos. Conforme discutido no Capítulo 39, um desequilíbrio na proporção desses ensaios fornece indicação de uma disfibrinogenemia por diminuição de função. Infelizmente, as sutilezas envolvendo as habilidades do fibrinogênio – e talvez mais significativamente da fibrina resultante – de se ligar a proteínas que influenciam no equilíbrio da hemostasia e da trombose (p. ex., ativador de plasminogênio tecidual) não são captadas por tais ensaios. É igualmente possível que a frequência da disfibrinogenemia subjacente aos eventos trombóticos seja ainda maior do que se admite no momento.

Mecanismos hipofibrinolíticos

A função comprometida do sistema fibrinolítico intensifica o risco de trombose. No entanto, ainda há escassez de ensaios clínicos globais suficientemente completos para permitir estimar o grau do referido risco (Collen, 1999). O tempo de lise do coágulo de euglobulina (ECLT ou ELT, *euglobulin clot lysis time*) fornece uma medida de alguns aspectos do sistema fibrinolítico (Sartori, 2003). Em resumo, o plasma tratado com citrato é diluído e acidificado, com consequente precipitação seletiva de muitas proteínas, entre as quais o fibrinogênio, o ativador de plasminogênio e o plasminogênio, ao mesmo tempo em que outras moléculas (p. ex., α_2-antitripsina) permanecem em solução. Em seguida, essa "fração euglobulina" precipitada é redissolvida em tampão apropriado e coagulada pela trombina, e, por fim, o tempo de lise do coágulo é registrado. Um ECLT anormalmente prolongado ajuda a direcionar a avaliação laboratorial subsequente para uma determinada anomalia subjacente associada a um componente crítico do sistema fibrinolítico. Esse resultado fornece suporte adicional à decisão de proceder à realização de testes mais detalhados do sistema fibrinolítico, como os ensaios específicos para ativador de plasminogênio, plasminogênio e outras proteínas moduladoras positivas ou negativas da fibrinólise.

Embora tenham sido descritas deficiências de plasminogênio, a principal enzima responsável pela quebra do coágulo de fibrina (Cap. 38), a associação ao risco trombótico ainda não está bem fundamentada (Schulman, 1996). Um polimorfismo envolvendo o gene PAI-1 foi referido em relatos que mostraram um discreto aumento do risco trombótico; no entanto, essa associação não está bem estabelecida. Por esse motivo, até o momento ainda não há indicações para que esse polimorfismo seja testado (Iacoviello, 1998). Defeitos afetando inibidores (PAI-1 e PAI-2) e ativadores de plasminogênio (tPA) regulados pela célula endotelial, leucócitos sanguíneos e plaquetas são suspeitos – porém não de forma comprovada – de atuar como fatores de risco (van der Bom, 1997). A avaliação das propriedades mecânicas dos coágulos ao longo de todo o período de sua formação e subsequente lise com auxílio do Thromboelastograph (Sonoclot), ou dispositivos semelhantes, constitui uma abordagem bastante diferente. A padronização adequada desse método pode permitir a detecção de uma fibrinólise anormal (Vig, 2001; Salooja, 2001; Kamada, 2001). Instrumentos desse tipo trabalham detectando a "rigidez" ou "força" durante a formação e processo de quebra do coágulo. Mais detalhes sobre a metodologia podem ser vistos nas seguintes referências: Vig (2001), Salooja (2001) e Kamada (2001).

Outros defeitos possíveis

Foram relatadas anormalidades envolvendo outras proteínas regulatórias da coagulação, bem como proteínas plaquetárias. Entretanto, a dificuldade em avaliar tais proteínas e a falta de uma correlação conclusiva com o risco trombótico aumentado impedem que essas moléculas sejam estabelecidas como fatores de risco importante para trombose venosa.

Os defeitos afetando a trombomodulina (TM, na Fig. 40.2) foram descritos por diversos grupos, que demonstraram a existência de uma boa associação com a trombose (2 a 6 vezes). Como parece haver inúmeros defeitos abrangendo uma parte considerável do gene da trombomodulina, os quais são essencialmente detectáveis apenas por meio de um extensivo sequenciamento, detectar tais anomalias continua sendo um desafio para os laboratórios clínicos (Ohlin, 1995; 1997).

O cofator da heparina II, um inibidor trombina-específico homólogo à antitrombina, ainda não foi comprovadamente associado a um risco trombótico aumentado (Tollefsen, 2002; Giri, 2005). O polimorfismo PLA-1/PLA-2 do complexo de glicoproteínas plaquetárias IIb/IIa foi associado ao risco aumentado de desenvolvimento de trombose arterial e venosa (Weiss, 1996). Os efeitos desses polimorfismos estão adquirindo importância crescente na emergente área de estudos da farmacogenética antitrombótica. O polimorfismo PLA-1/PLA-2, assim como outros polimorfismos de glicoproteínas plaquetárias, atualmente está sendo avaliado de maneira crítica com o intuito de determinar seu potencial papel como ensaio clínico para avaliação trombótica (Lindoff, 1997; Heit, 2000; Robert, 2000; Paganin, 2003). Além disso, os tipos não O dos grupos sanguíneos ABO foram implicados como fatores de risco trombótico aumentado em comparação ao tipo sanguíneo O, possivelmente decorrentes dos níveis aumentados de fator de von Willebrand e fator VIII (De Visser, 2003).

Estados hipercoaguláveis adquiridos

Numerosas condições adquiridas foram associadas ao risco aumentado de trombose venosa. O risco relativo para uma grande parte dessas condições está estabelecido e parece combinar-se às causas genéticas para aumentar o risco global de trombose. Condições comuns que apresentam uma forte associação com a trombose venosa incluem traumatismo, cirurgia e período pós-operatório, gravidez, imobilidade, obesidade e dieta, tabagismo e história de trombose prévia. Além disso, malignidades, CID crônica, uso de contraceptivos orais e de reposição hormonal, trombocitopenia induzida por heparina, síndrome nefrótica, trombocitemia essencial, policitemia vera e condições inflamatórias foram todas associadas ao risco aumentado de trombose venosa. Por fim, como discutido no Capítulo 39, anormalidades envolvendo a enzima ADAMTS13 foram associadas ao distúrbio trombótico da púrpura trombocitopênica trombótica (TTP).

Síndrome antifosfolipídeo e anticoagulante lúpico

A SAF constitui um dos fatores de risco trombótico mais comumente adquiridos e é a principal causa da perda de gravidez. Essa síndrome parece resultar da formação de anticorpos dirigidos contra a β_2-glicoproteína I (β_2-GPI) ou outra proteína ligadora de fosfolipídeos (como protrombina, proteína S, trombomodulina, entre outras). Esses anticorpos se ligam a diversos epitopos presentes nas proteínas ligadoras de fosfolipídeo. Quando a interação anticorpo-antígeno ocorre *in vivo*, o resultado é uma reação pró-trombótica. Assim, é irônico que a demonstração funcional da presença de anticorpos associados à SAF nas análises laboratoriais seja evidenciada pela inibição de reações pró-coagulantes. O termo "anticoagulante lúpico" (AL), aplicável a esses anticorpos funcionalmente demonstráveis, é igualmente enganoso, uma vez que o efeito correspondente *in vivo* seja, na realidade, pró-trombótico. É ainda mais enganoso uma vez que a maioria dos pacientes portadores de ALs não tem lúpus, embora essa associação tenha sido observada nas descrições originais da entidade em questão. Por fim, apesar de o alvo de tais anticorpos serem os epítopos localizados nas proteínas ligadoras de fosfolipídeos (ver discussão anterior), os estudos originais que identificaram esses anticorpos empregaram como antígeno a cardiolipina, a fosfatidilserina ou outros fosfolipídeos no ensaio de ligação. Como resultado, os anticorpos associados à SAF continuam sendo referidos como "anticorpos anticardiolipina", "anticorpos antifosfatidilserina" etc. Uma parte considerável desses "anticorpos antifosfolipídeo" (AAFs) também gera resultados falso-positivos nos testes para detecção de sífilis (VDRL) (Riboldi, 2003; McCrae, 2001; Galli, 2003).

Os mecanismos pelos quais os AAFs interferem nos processos hemostáticos parecem ser multifatoriais, provavelmente reforçando a considerável diversidade das proteínas-alvo associadas a fosfolipídeos que exercem papéis críticos na hemostasia e na trombose. Relatos

sobre mecanismos que ocorrem *in vivo* incluem inibição de trombomodulina ou proteína S, ativação plaquetária e ativação da célula endotelial. Um importante subgrupo desses anticorpos tem como alvo a molécula da protrombina. Tais anticorpos neutralizam a molécula de protrombina e intensificam a depuração da mesma a partir do sangue. Foi demonstrado que esses anticorpos antiprotrombina estão presentes em cerca de 76% dos pacientes com AL, ainda que os níveis plasmáticos de protrombina não estejam reduzidos (Guerin, 1998).

Numerosos estudos relataram a ocorrência de testes anormais de AL ou anticardiolipina em 2 a 25% da população geral, aparentemente assintomática, com uma parte considerável desses anticorpos exibindo caráter temporário (Galli, 2003). A persistência dos ALs, no entanto, está associada a um risco aproximado de 30% de desenvolvimento dos sintomas característicos da SAF. No decorrer da evolução da SAF, não é incomum AL ser demonstrável e não ser possível demonstrar AAF, ou, contrariamente, AAF ser demonstrável e não ser possível demonstrar AL. Nos ensaios baseados em ELISA para detecção de AAFs, são realizadas determinações isoladas de anticorpos das classes IgG, IgM e, muitas vezes, IgA. Parece haver uma relação entre os níveis de AAFs e o risco trombótico. Diversos laboratórios interpretam os níveis de "anticardiolipina" como discretamente elevados, moderadamente elevados ou intensamente elevados. Entretanto, o ajuste preciso dos limites superiores de corte para distinguir doença e normalidade em diferentes sistemas de teste ainda precisa ser padronizado.

Estudos recentes realizados pelo laboratório de Groot conduziram à proposta de um mecanismo fisiopatológico, em que a β_2-GPI primeiramente se liga às membranas plaquetárias e, depois, sofre alterações conformacionais que expõem sítios de ligação para o anticorpo anti-β_2-GPI. A ligação do anticorpo, por sua vez, causa ativação da plaqueta (de Groot, 2005). Testes laboratoriais para identificar o subgrupo de anticorpos anti-β_2-GPI funcionais por esse mecanismo fisiopatológico provavelmente irão requerer um sistema de ensaio que reproduza os eventos ocorridos no sistema *in vivo*, incluindo a necessária alteração conformacional de β_2-GPI (de Laat, 2006).

Considerando que atualmente falta uma abordagem uniforme para o diagnóstico dos AAFs, é evidente que, pela heterogeneidade desses anticorpos, a presença de um AL não pode ser excluída diante de uma simples falha em detectá-lo através de um sistema de testes qualquer. O laboratório precisa contar com, no mínimo, 2 sistemas de teste disponíveis (Brandt, 1995a; Levine, 2002) (Tab. 40.3). Mais comumente, o PTT e o DRVVT são utilizados para essa finalidade. PTT e DRVVT constituem os principais ensaios de coagulação padronizados e prontamente disponibilizados em instrumentos automatizados. Como esses ensaios reconhecem diferentes aspectos das reações de coagulação dependentes de fosfolipídeos, eles são capazes de detectar a maioria dos anticorpos AL. Os reagentes de PTT sensíveis ao AL contêm uma mistura de fosfolipídeos que interage com anticorpos AL em 2 pontos críticos no sistema intrínseco. O DRVVT emprega uma concentração diluída de fosfolipídeos em uma única etapa fosfolipídeo-dependente junto à via da coagulação, facilitando a detecção dos anticorpos AL.

Conforme mencionado anteriormente, um sistema de testes comumente utilizado para detecção de ALs é o PTT. Um AL normalmente prolonga o tempo de coagulação do teste realizado com o plasma do paciente. Quando são misturadas partes iguais desse plasma e de plasma controle normal, a maioria dos ALs irá prolongar o tempo de coagulação da mistura em, no mínimo, 5 segundos em relação ao tempo de coagulação do plasma controle normal. A pré-incubação do plasma do paciente com uma fonte adequada de proteína fosfolipídica, contudo, pode "neutralizar" efetivamente o AL e acarretar um significativo encurtamento do tempo de coagulação em uma avaliação subsequente. As substâncias neutralizantes variam de "fosfolipídeos de fase hexagonal" purificados a lisados bem mais complexos de plaquetas sequencialmente congeladas, dessecadas e lavadas (procedimento de neutralização de plaquetas [PNP]). Como enfatizado por Graves et al. (2000), a atenção aos inúmeros detalhes metodológicos envolvidos no teste para AL pode ser crítica à interpretação dos resultados (Jennings, 2002). Por exemplo, empregar uma proporção de tempos de coagulação de paciente/controle em cada fase do teste no sistema DRVVT (Fig. 40.4) e incluir um agente neutralizador de heparina são medidas que aumentam a robustez desse sistema de testes. Além disso, os reagentes utilizados no teste PTT para detecção de ALs devem ser

Tabela 40.3 Abordagem laboratorial para detecção do anticoagulante lúpico

Estágio do teste	Método de detecção
Teste inicial	A primeira etapa consiste na prolongação da coagulação em ao menos um ensaio de coagulação *in vitro* dependente de fosfolipídeos, utilizando plasma pobre em plaquetas. Esses ensaios podem ser subdivididos de acordo com a porção da cascata de coagulação que avaliam, do seguinte modo: • via de coagulação "extrínseca" (p. ex., PT com diluição) • via de coagulação "intrínseca" (p. ex., PTT ativado) • via de coagulação "final comum" (p. ex., DRVVT)
Mistura	A segunda etapa consiste na falha em corrigir o tempo de coagulação prolongado através da mistura do plasma do paciente com plasma normal (note que, em alguns protocolos, há uma etapa de correção/neutralização logo após a etapa de teste inicial, com omissão da etapa de mistura)
Correção/ neutralização	A terceira etapa é a confirmação da presença de anticorpos para anticoagulante lúpico por encurtamento ou correção do tempo de coagulação prolongado, após a adição de um excesso de fosfolipídeos ou plaquetas previamente submetidas ao congelamento e subsequente dessecação
Exclusão	A quarta etapa consiste em excluir outras coagulopatias empregando ensaios para fatores específicos, caso o teste confirmatório resulte negativo ou houver suspeita de um fator inibidor específico

O uso de 2 ou mais ensaios sensíveis aos anticorpos para anticoagulante lúpico é recomendado antes da exclusão da presença desses anticorpos. Ao menos um desses ensaios deve se basear na baixa concentração de fosfolipídeos (PT com diluição, PTT ativado com diluição, tempo de coagulação com sílica coloidal, tempo de coagulação com caulim ou DRVVT). Ambos os ensaios devem avaliar porções distintas da cascata de coagulação (p. ex., PTT ativado e DRVVT). (Adaptado de Levine [2002] e Brandt [1995b]).

DRVVT = tempo de coagulação com veneno de víbora de Russell diluído; PTT = tempo parcial de tromboplastina; PT = tempo de protrombina.

A

Anticoagulantes lúpicos: sistema de testes DRVVT

- Primeiro estágio da DRVVT: resultados expressos como proporção de DRVVT de paciente/DRVVT controle, com faixa representativa normal < 1,06
- Prolongamentos da proporção, decorrentes de deficiências do fator ou presença de inibidores
- Segundo estágio da DRVVT: mais especificidade para um possível AL obtido pela pré-incubação de amostras de plasma do paciente e do controle com alta concentração de fosfolipídeos

B

Anticoagulantes lúpicos: sistema de testes DRVVT

- Correção percentual:

$$\frac{\left(\frac{\text{DRVVT do paciente}}{\text{DRVVT controle}}\right) - \left(\frac{\text{DRVVT do paciente com alta concentração de fosfolipídeos}}{\text{DRVVT controle com alta concentração de fosfolipídeos}}\right)}{\left(\frac{\text{DRVVT do paciente}}{\text{DRVVT controle}}\right)}$$

- Uma correção percentual acima de um valor de corte estabelecido (p. ex., 16%) é considerada positiva, além de sugerir a presença de um AL

Figura 40.4 Exemplo de um teste de tempo de coagulação com veneno de víbora de Russell diluído (DRVVT) na avaliação de um possível anticoagulante de lúpico (AL). *A*, descrição do sistema de teste. *B*, estágio de correção (neutralização) do teste de DRVVT.

V

cuidadosamente escolhidos, no sentido de apresentarem grau de sensibilidade aos ALs adequado.

Enquanto inibidores de fatores específicos, como aqueles dirigidos contra o fator VIII, são tipicamente dependentes do tempo e da temperatura (Cap. 38), os ALs costumam apresentar ação mais imediata até mesmo à temperatura ambiente. É interessante notar que os ALs se destacam por interferir na quantificação dos fatores de coagulação ensaiados em sistemas baseados no PTT. Um padrão indicador que por si só deve levantar a suspeita da presença de um AL é o aumento persistente da atividade aparente de um fator, diante de diluições crescentes do plasma do paciente utilizado no ensaio. Tais aumentos aparentes da atividade do fator resultam de diluições correspondentes do AL presente na amostra.

Hiper-homocisteinemia

A homocisteína é um aminoácido que atua como molécula imediata para produção e regulação do aminoácido metionina, que contém enxofre (Guba, 1996; Refsum, 1998; Cattaneo, 2001). Perturbações genéticas ou adquiridas envolvendo o mecanismo regulatório dessa via podem acarretar elevação dos níveis de homocisteína e do risco trombótico associado. A mais devastadora delas afeta o gene da cistationina-β-sintetase (CBS) que, no estado homozigoto, conduz à trombose severa e aterosclerose (Mudd, 1985). As causas adquiridas, em sua maioria associadas à dieta e à ingestão de vitaminas, também constituem fatores significativos de elevação dos níveis de homocisteína no plasma. O risco de trombose associado aos níveis elevados de homocisteína constitui uma resposta graduada em que quanto maiores os níveis plasmáticos, maior é o risco. Chama atenção a existência de dois polimorfismos associados à enzima metabolizadora da homocisteína – metilenetetra-hidrofolato redutase (MTHFR). Inicialmente, pensou-se que esses polimorfismos estavam associados ao risco aumentado de trombose (Tosetto, 1997; Franco, 1999). Todavia, estudos epidemiológicos importantes falharam em confirmar tanto um risco trombótico aumentado associado aos polimorfismos da MTHFR como a ocorrência de um aumento correspondente dos níveis plasmáticos de homocisteína. Em consequência, a avaliação dos polimorfismos da MTHFR como causa de trombose venosa atualmente não é recomendada (Franco, 1999; Legnani, 1997). Por outro lado, os níveis plasmáticos de homocisteína devem ser determinados como parte da investigação.

Aspectos gerais da avaliação laboratorial do risco trombótico

A avaliação laboratorial da trombofilia é complexa e tem mudado rapidamente. Inclui os testes apropriados a serem solicitados, o momento certo de solicitar esses testes e quem deve ser submetido aos mesmos. Falta um teste que permita graduar o *status* do risco trombótico de um indivíduo. Assim, é necessário solicitar uma série de testes individuais para conseguir uma boa avaliação desse risco. Diversos fatores fisiológicos, patológicos e farmacológicos (Tab. 40.4) podem influenciar alguns ou todos os testes baseados na análise do plasma, como os testes de gravidez, varfarina, CID, doença hepática e idade. Os testes de diagnóstico molecular, em contraste, não são afetados por tais influências. Da perspectiva laboratorial, devem ser utilizados os ensaios apropriados. Sempre que possível, devem ser utilizados ensaios de avaliação de atividade para determinar a funcionalidade da molécula. A simples determinação dos níveis de antígeno pode não detectar moléculas de tipo II e identificar erroneamente a condição do paciente como sendo normal (Rezende, 2004). Para fins de avaliação, é necessário que cada paciente responda certo número de perguntas: o paciente ou seus familiares apresentam história que realmente justifique uma avaliação? Os testes solicitados são apropriados para incluir os principais fatores de risco aceitos? Os intervalos estabelecidos são adequados para obter uma avaliação satisfatória? Existem condições terapêuticas, patológicas ou fisiológicas subjacentes que possam interferir na interpretação dos resultados?

A melhor forma de realizar as avaliações é com o paciente assintomático e na ausência de qualquer terapia de anticoagulação. Infelizmente, o período pós-trombótico antes da anticoagulação é aquele em que os fatores plasmáticos são consumidos, quando há possibilidade de estabelecer diagnósticos errados. A heparina diminui significativamente os níveis de antitrombina, aumenta os níveis de proteína S e pode mascarar a presença de ALs (a menos que seja incluída no ensaio uma molécula neutralizadora de heparina, como a protamina ou o polibrene). A varfarina reduz os níveis de proteínas C e S. Os únicos marcadores de risco que podem ser avaliados em todos os momentos são os marcadores genéticos ensaiados por técnicas de diagnóstico molecular. Foram feitas tentativas de contornar as anormalidades apresentadas pelo teste, decorrentes de uma anticoagulação oral, com o uso de proporções de proteína C ou proteína S em relação a um ou outro fator de coagulação dependente de vitamina K. Todavia, essas proporções podem apresentar uma considerável variabilidade, o que dá oportunidade a erros de diagnóstico. Por esse motivo, tal abordagem não é recomendada. Os períodos assintomáticos subjacentes, como pós-operatório e gravidez, também podem diminuir ou alterar os fatores plasmáticos, conduzindo a diagnósticos equivocados. A Tabela 40.5 detalha os testes recomendados e os respectivos *timings* de execução apropriados.

Talvez, até mais do que em uma grande parte das demais áreas da medicina clínica, é criticamente importante comunicar as implicações desses resultados laboratoriais ao paciente, de modo a não subestimar nem superestimar o papel do risco trombótico na vida do paciente. Certas decisões, como o uso ou de anticoncepcionais orais, supervisão da gestação e adesão à terapia anticoagulante, podem ser difíceis tanto para o paciente como para o prestador de assistência. Quando se trata de distúrbios hereditários, o aconselhamento genético pode ter importância significativa. Em todos os casos desse tipo, o conhecimento acerca da disponibilidade do teste e dos limites na interpretação dos mesmos pode contribuir enormemente para a tomada de decisões clínicas mais apropriadas.

Tabela 40.4 Fatores que afetam a quantificação de fatores trombofílicos

Fisiológico	Patológico	Farmacológico
Recém-nascido	Coagulação intravascular disseminada (CID)	Varfarina
Infância	Trombose	Heparina
Gravidez	Doença hepática	Inibidores de trombina
	Síndrome nefrótica	
	Diabetes	
	Hospitalização	

Tabela 40.5 Bateria de testes recomendada para avaliação da trombofilia

Teste	Assintomático e sem anticoagulação	Sintomático ou com heparina ou anticoagulação oral	Teste reflexo
PCA-R Fator V_{Leiden}	PCA-R	Fator V_{Leiden}	Fator V_{Leiden}
Proteína C	Atividade de proteína C		Antígeno de proteína C
Proteína S	Atividade de proteína S		Antígeno de PS livre, antígeno de PS total
Antitrombina	Atividade de antitrombina		Antígeno de antitrombina
Protrombina-20.210	Protrombina 20.210	Protrombina 20.210	
Síndrome antifosfolipídeo	Anticoagulante lúpico; anticardiolipina		Confirmar em 6–8 semanas
Homocisteína Fibrinogênio	Homocisteína Fibrinogênio	Homocisteína	Homocisteína Antígeno de fibrinogênio
Fator VIII	Fator VIII		Confirmar em 3–6 semanas

Referências bibliográficas

Adcock DM, Fink L, Marlar RA: A laboratory approach to the evaluation of hereditary hypercoagulability. Am J Clin Pathol 1997; 108:434–449.

Aparicio C, Dahlbäck B: Molecular mechanisms of activated protein C resistance: properties of factor V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene. Biochem J 1996; 313:467–472.

Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, et al: Decreased plasma activity of antithrombin or protein C is not due to consumption coagulopathy in septic patients with disseminated intravascular coagulation. Eur J Haematol 2001; 67:170–175.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369:64–67.

Bloemenkamp KW, Helmerhorst FM, Rosendaal FR, et al: Thrombophilias and gynaecology. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2003; 17:509–528.

Brandt JT, Barna LK, Triplett DA: Laboratory identification of lupus anticoagulants: result of the Second International workshop for identification of lupus anticoagulants. Thromb Haemost 1995a; 74:1597–1603.

Brandt JT, Triplett DA, Alving B: Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/ Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. Thromb Haemost 1995b; 74:1185–1190.

Brouwer JL, Veeger NJ, Schaaf W, et al: Difference in absolute risk of venous and arterial thrombosis between familial protein S deficiency type I and type III. Results from a family cohort study to assess the clinical impact of a laboratory test-based classification. Br J Haematol 2005; 128:703–710.

Cattaneo M Hyperhomocysteinemia and thrombosis. Lipids 2001; 36(Suppl):S13–S26.

Cerneca F, Ricci G, Simeone R, et al: Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1997; 73:31–36.

Collen D: The plasminogen (fibrinolytic) system. Thromb Haemost 1999; 82:259.

Colucci M, Binetti BM, Tripodi A, et al: Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. Blood 2004; 103:2157–2161.

Comp PC, Thurnau GR, Welsh J, et al: Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. Blood 1986; 68:881–885.

Conard J, Horellou MH, Van Dreden P, et al: Thrombosis and pregnancy in congenital deficiencies in AT III, protein C or protein S: study of 78 women. Thromb Haemost 1990; 63:319–320.

Cumming AM, Keeney S, Salden A, et al: The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a UK anticoagulant clinic population. Br J Haematol 1997; 98:353–55.

Cumming AM, Tait RC, Fildes S, et al Development of resistance to activated protein C during pregnancy. Br J Haematol 1995; 90: 725–727.

Dahlbäck B: Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. Semin Thromb Hemost 1999; 25:273–289.

De Groot PG, Derksen RH: Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. J Thromb Haemost 2005; 3:1854–1860.

De Laat B, Derksen RH, van Lummel M, et al: Pathogenic anti-β_2-GPI antibodies recognize domain I of β_2-GPI only after a conformational change. Blood 2006; 107.

De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, et al: The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. N Engl J Med 1999; 341:801–806.

De Visser MC, Sandkuijl LA, Lensen RP, et al: Linkage analysis of factor VIII and von Willebrand factor loci as quantitative trait loci. J Thromb Haemost 2003; 1:1771–1776.

Egeberg O: Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. Thromb Diath Haemorrh 1965; 13:516–520.

Eikelboom JW, Ivey L, Ivey J, et al: Familial thrombophilia and the prothrombin 20210A mutation: association with increased thrombin generation and unusual thrombosis. Blood Coagul Fibrinolysis 1999; 10:1–5.

Esmon CT: Inflammation and thrombosis. J Thromb Haemost 2003a; 1:1343–1348.

Boa descrição dos mecanismos regulatórios de homeostasia, especialmente do sistema da proteína C.

Esmon CT: The protein C pathway. Chest 2003b; 124(Suppl):26S–32S.

Esmon CT: Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. Crit Care Med 2004; 32(Suppl):S298–S301.

Franco RF, Morelli B, Lourenco D, et al: A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. Br J Haematol 1999; 105:556–559.

Franco RF, Reitsma PH: Genetic risk factors of venous thrombosis. Hum Genet 2001; 109:369–384.

Os autores revisam marcadores de risco comuns e genéticos importantes da trombose venosa.

Galli M, Luciani D, Bertolini G, et al: Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. Blood 2003; 101:1827–1832.

Giri TK, Ahn CW, Wu KW, et al. Heparin cofactor II levels do not predict the development of coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [Letter to the editor]. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:2689–2690.

Goodwin AJ, Rosendaal FR, Kottke-Marchant K, et al: A review of the technical, diagnostic, and epidemiologic considerations for protein S assays. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:1349–1366.

Graf LL, Welsh CH, Qamar Z, et al: Activated protein C resistance assay detects thrombotic risk factors other than factor V Leiden. Am J Clin Pathol 2003; 119:52–60.

Greaves M, Cohen H, Machin SJ, et al: Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. Br J Haematol 2000; 109:704–715.

Gruenewald M, Germowitz A, Beneke H, et al: Coagulation factor II activity determination is not useful as a screening tool for the G20210A prothrombin gene allele [letter]. Thromb Haemost 2000; 84:141–142.

Guba SC, Fink LM, Fonseca V: Hyperhomocysteinemia: an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. Am J Clin Pathol 1996; 105:709–722.

Guerin J, Smith O, White B, Sweetman G, Feighery C, Jackson J: Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. Br J Haematol 1998; 102:896–902.

Hackeng TM, van't Veer C, Meijers JC, et al: Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. J Biol Chem 1994; 269:21051–21058.

Haverkate F, Samama M: Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Thromb Haemost 1995; 73:151–161.

Heijmans BT, Westendorp RG, Knook DL, et al: The risk of mortality and the factor V Leiden mutation in a population-based cohort. Thromb Haemost 1998; 80:607–609.

Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, et al: Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism – A population-based cohort study. Arch Intern Med 2000; 160:761–768.

Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, et al: The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. Thromb Haemost 1998.; 80:1029–1035

Jennings I, Greaves M, Mackie IJ, et al: Lupus anticoagulant testing: improvements in performance in a UK NEQAS proficiency testing exercise after dissemination of national guidelines on laboratory methods. Br J Haematol 2002; 119:364–369.

Trata-se de uma revisão atual sobre o método mais apropriado para avaliar a síndrome antifosfolipídica e a anticoagulação lúpica.

Kamada Y, Yamakage M, Niiya T, et al: Celite-activated viscometer Sonoclot can measure the suppressive effect of tranexamic acid on hyperfibrinolysis in cardiac surgery. J Anesth 2001; 15:17–21.

Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB: Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: the Framingham Study. JAMA 1987; 258:1183–1186.

Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, et al: Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. Blood 1995; 86:1062–1071.

Kuhle S, Lane DA, Jochmanns K, et al: Homozygous antithrombin deficiency type II (99 Leu to Phe mutation) and childhood thromboembolism. Thromb Haemost 2001; 86:1007–1011.

Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, et al: High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. N Engl J Med 2000; 343: 457–462.

Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al: Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. Thromb Haemost 1997; 77:197–211.

Lane DA, Gant PJ: Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. Blood 2000; 95:1517–1532.

Artigo de revisão sobre fatores de risco trombótico genéticos importantes.

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, et al: Inherited thrombophilia. Thromb Haemost 1996; 76:651–662.

Legnani C, Palareti G, Grauso F, et al: Hyperhomocyst(e)inemia and a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation (Ala 223Val MTHFR) in patients with inherited thrombophillic coagulation defects. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:2924–1929.

Levine JS, Branch DW, Rauch J: The antiphospholipid syndrome. N Engl J Med 2002; 346:752–763.

Revisão abrangente sobre a síndrome antifosfolipídica e os anticoagulantes lúpicos.

Libourel EJ, Bank I, Veeger NJ: Protein S type III deficiency is no risk factor for venous and arterial thromboembolism in 168 thrombophilic families: a resprospective study. Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16-135–16-142.

Lindoff C, Ingemarsson I, Martinsson G, et al: Preeclampsia is associated with a reduced response to activated protein C. Am J Obstet Gynecol 1997; 176:457–460.

McCrae KR, Feinstein DI, Cines DB: Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome. In Colman W, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (eds): Haemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 1339–1356.

Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, et al: High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. N Engl J Med 2000; 342:696–701.

Mackie IJ, Piegsa K, Furs SA, et al: Protein S levels are lower in women receiving desogestrel-containing combined oral contraceptives (COCs) than in women receiving levonorgestrel-containing COCs at steady state and on cross-over. Br J Haematol 2001; 113:898–904.

Madden RM, Levin EG, Marlar RA: Thrombin and the thrombin–thrombomodulin complex interaction with plasminogen activator inhibitor, type 1. Blood Coag Fibrinolysis 1991; 2:471–476.

Marlar RA, Adcock DM, Madden RM: Hereditary dysfunctional protein C molecules (type II): assay characterization and proposed classification. Thromb Haemost 1990a; 63:375–379.

Marlar RA, Mastovich S: Hereditary protein C deficiency: a review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment. Blood Coag Fibrinol 1990b; 1:319–330.

Marlar RA, Neumann A: Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. Semin Thromb Hemost 1990c; 16:299–309.

Moll S: Warfarin-induced skin necrosis. Br J Haematol 2004; 126:628.

Mudd SH, Skovby F, Levy HL, et al: The natural history of homocystinuria due to cystathionine β-synthase deficiency. Am J Hum Genet 1985; 37:1–31.

Nelson RM, Long GL: Binding of protein S to C4b-binding protein: mutagenesis of protein S. J Biol Chem 1992; 267:8140–8145.

O'Donnell J, Tuddenham EG, Manning R, et al: High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis

and relationship to the acute phase reaction. Thromb Haemost 1997; 77:825–828.
Ohlin AK, Marlar RA: The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old male presenting with thromboembolic disease. Blood 1995; 85:330–336.
Ohlin AK, Norlund L, Marlar RA: Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. Thromb Haemost 1997; 78:396–400.
Paganin F, Bourde A, Yvin JL, et al: Venous thromboembolism in passengers following a 12-h flight: a case–control study. Aviat Space Environ Med 2003; 74:1277–1280.
Persson KE, Dahlbäck B, Hillarp A: Diagnosing protein S deficiency: analytical considerations. Clin Lab 2003; 49:103–110.
Peters C, Casella JF, Marlar RA, et al: Homozygous protein C deficiency: observations on the nature of the molecular abnormality and the effectiveness of warfarin therapy. Pediatrics 1988; 81:272–276.
Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al: A common genetic variation in the 3?-untranslated region of the prothrombin gene. Blood 1996; 88:3698–3703.
Refsum H, Ueland PM, Nygard O, et al: Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998; 49:31–62.
Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA: Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. Blood 2004; 103:1192–1201.
Riboldi P, Gerosa M, Raschi E, et al: Endothelium as a target for antiphospholipid antibodies. Immunobiology 2003; 207:29–36.
Ridker PM, Miletich JP, Stampfer MJ, et al: Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism. Circulation 1995; 92:2800–2807.
Rigby AC, Grant MA: Protein S: a conduit between anticoagulation and inflammation. Crit Care Med 2004; 32(Suppl):S336–S341.
Robert A, Aillaud MF, Eschwege V, Randrianjohany et al: ABO blood group and risk of venous thrombosis in heterozygous carriers of factor V Leiden. Thromb Haemost 2000; 83:630–631.
Salooja N, Perry DJ: Thromboelastography. Blood Coag Fibrinolysis 2001; 12:327–337.
Sartori MT, Saggiorato G, Spiezia L, et al: Influence of the Alu-repeat I/D polymorphism in t-PA gene intron 8 on the stimulated t-PA release after venous occlusion. Clin Appl Thromb Hemostas 2003; 9:63–69.
Schulman S, Wiman B: The significance of hypofibrinolysis for the risk of recurrence of venous thromboembolism: Duration of Anticoagulation (DURAC) Trial Study Group. Thromb Haemost 1996; 75:607–611.
Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, et al: Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. Ann Intern Med 1998; 128:8–14.
Smithies MN, Weaver CB: Role of the tissue factor pathway in the pathogenesis and management of multiple organ failure. Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15(Suppl):S11–S20.
Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H: The hemostatic system. Curr Med Chem 2004; 11:2245–2260.
Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, et al: The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:10212–10216.
Streif W, Mitchell LG, Andrew M: Antithrombotic therapy in children. Curr Opin Pediatr 1999; 11:56–64.
Svensson PJ, Zoller B, Dahlbäck B: Evaluation of original and modified APC-resistance tests in unselected outpatients with clinically suspected thrombosis and in healthy controls. Thromb Haemost 1997; 77:332–335.
Tai CY, Lerardi R, Alexander JB: A case of warfarin skin necrosis despite enoxaparin anticoagulation in a patient with protein S deficiency. Ann Vasc Surg 2004; 18:237–242.
Tollefsen DM: Heparin cofactor II deficiency. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:1394–1400.
Tosetto A, Missiaglia E, Fressato M: The VITA project: C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism. Br J Haematol 1997; 97:804–806.
Tripodi A, Negri B, Bertina RM, et al: Screening for the FV:Q506 mutation. Evaluation of thirteen plasma-based methods for their diagnostic efficacy in comparison with DNA analysis. Thromb Haemost 1997; 77:436–439.
Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM: Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24:1374–1383.
Van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, et al: Tissue plasminogen activator and the risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study. Circulation 1997; 95:2623–2630.
Van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, et al: The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. Thromb Haemost 1996; 76:397–403.
Vig S, Chitolie A, Bevan DH, et al: Thromboelastography: a reliable test? Blood Coag Fibrinolysis 2001; 12:555–561.
Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al: A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. N Engl J Med 1996; 334:1090–1094.
Weltermann A, Eichinger S, Bialonczyk C, et al: The risk of recurrent venous thromboembolism among patients with high factor IX levels. J Thromb Haemost 2003; 1:28–32.

CAPÍTULO 41

Terapia antitrombótica

Louis M. Fink MD, Richard A. Marlar PhD, Jonathan L. Miller MD PhD

Variáveis pré-analíticas e controles	895
Antagonistas da vitamina K	895
Heparina	897
Heparinas de baixo peso molecular	898
Trombocitopenia induzida por heparina	898
Monitoramento de anticoagulação com teste rápido	900
Inibidores de trombina diretos	900
Novos anticoagulantes	900
Terapia antiplaquetária	901
Apêndice: diretrizes pré-analíticas do Clinical and Laboratory Standards Institute	902
Armazenamento das amostras	902
Controle de qualidade	902
Referências bibliográficas	902

PONTOS-CHAVE

- A warfarina é o anticoagulante oral mais comumente utilizado. Atua como antagonista da vitamina K e bloqueia a γ-carboxilação de uma série de resíduos glutâmicos durante a síntese dos fatores II, VII, IX, X, proteína C e proteína S. A resultante funcionalidade diminuída dos fatores de coagulação é monitorada por prolongamentos de tempo de protrombina/proporção normalizada internacional.
- Pela ligação à antitrombina e pelo consequente aumento de sua capacidade de inibir a trombina, o fator Xa e (em menor grau) outros fatores de coagulação serina protease, a heparina é considerada um inibidor de trombina "indireto". A intensidade da ação anticoagulante da heparina comumente é monitorada pelo tempo de tromboplastina parcial, com a real determinação da atividade anticoagulante da heparina sendo ensaiada como atividade antifator Xa. Nos casos em que se faz necessário monitorar a terapia à base de heparina de baixo peso molecular, esse monitoramento somente é possível por meio da determinação da atividade antifator Xa.
- A trombocitopenia induzida pela heparina (TIH) é uma complicação da terapia à base de heparina, em que há desenvolvimento de anticorpos dirigidos contra os complexos de fator plaquetário 4 (PF4, *platelet factor* 4) e heparina. Nos casos mais graves, os anticorpos resultantes se ligam às plaquetas de modo a ativá-las, causando trombose arterial e/ou venosa. Ensaios tanto imunológicos quanto funcionais são empregados na avaliação de uma possível TIH.
- Novos anticoagulantes emergentes atuam como inibidores diretos da trombina ou do fator Xa. O monitoramento efetivo da atividade desses inibidores, bem como a identificação de possíveis interferências causadas por eles por meio de testes para detecção de outras anomalias hemostáticas, constituem novos desafios para o laboratório diagnóstico.
- A terapia direcionada para a inibição da reatividade plaquetária está sendo cada vez mais empregada tanto em casos agudos quanto crônicos. O laboratório pode monitorar a resultante da reatividade plaquetária dos pacientes tratados e, às vezes, detectar uma aparente resistência à aspirina ou a outros agentes terapêuticos.

Existe uma ampla gama de agentes capazes de alterar a síntese ou a ação dos fatores de coagulação, afetar a função plaquetária ou modificar as respostas ao nível dos vasos sanguíneos. Medicamentos, prescritos ou não, com atividade anticoagulante ou antiplaquetária, estão entre os fármacos mais comumente administrados. Tais agentes podem se comportar como "uma faca de dois gumes" ao prevenir a formação ou extensão de um trombo e também ao produzir ou exacerbar um sangramento. O laboratório clínico exerce papel importante no monitoramento da terapia antitrombótica.

Variáveis pré-analíticas e controles

Todos os padrões de acurácia e precisão para o monitoramento da terapia anticoagulante têm pouco valor quando a amostra de sangue não é obtida nem processada de maneira definida. O Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais, antigamente conhecido como National Committee for Clinical Laboratory Standards – Comitê Nacional de Padrões Clínicos Laboratoriais) estabeleceu diretrizes úteis para a coleta, o armazenamento e o preparo de amostras de sangue ou plasma antes da realização do teste de coagulação. Essas diretrizes são apresentadas sob a forma de apêndice no final deste capítulo (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998).

Um relatório ideal deve conter o registro do horário e da data da amostragem, bem como do horário da última dose de anticoagulante administrada. Os resultados dos exames laboratoriais devem igualmente ser interpretados em conjunto com a história clínica, para regulação ótima da terapia anticoagulante. Sempre que houver manipulação computacional de dados analíticos de saída, como a conversão do tempo de protrombina (PT) dado em segundos para uma proporção normalizada internacional (INR, *international normalized ratio* – definida adiante), deve ser realizada uma checagem periódica para verificar se as constantes e a manipulação adequada dos dados estão sendo praticadas de acordo com as definições estabelecidas pelos procedimentos operacionais padrão do laboratório.

Antagonistas da vitamina K

A warfarina é o antagonista oral de vitamina K mais comumente prescrito. Consiste em uma mistura racêmica de estereoisômeros (S)-warfarina e (R)-warfarina. A (S)-warfarina apresenta efeito anticoagulante mais potente. A warfarina inibe a vitamina K redutase (vitamina K 2,3-epóxido redutase) e bloqueia a regeneração da forma ativa da vitamina K, que é necessária para a formação de ácido γ-carboxiglutâmico em uma série de resíduos de aminoácidos (denominados "domínio Gla") junto aos fatores II, VII, IX, X, proteína C e proteína S (Fig. 41.1). Com a extensão cada vez menor da γ-carboxilação nos domínios Gla, as proteínas afetadas perdem parte da capacidade de ligação aos complexos de proteína-Ca^{2+}-fosfolipídeo altamente ordenados, os quais são componentes críticos da cascata de coagulação (Ansell, 2004). Os testes dependentes do funcionamento adequado desses fatores resultarão mais anormais diante da intensidade aumentada da terapia anticoagulante oral.

O grau de anticoagulação promovido pela warfarina é tipicamente quantificado pelo sistema de teste de PT, embora prolongamentos do PTT também sejam comumente observados. Como a síntese de fibri-

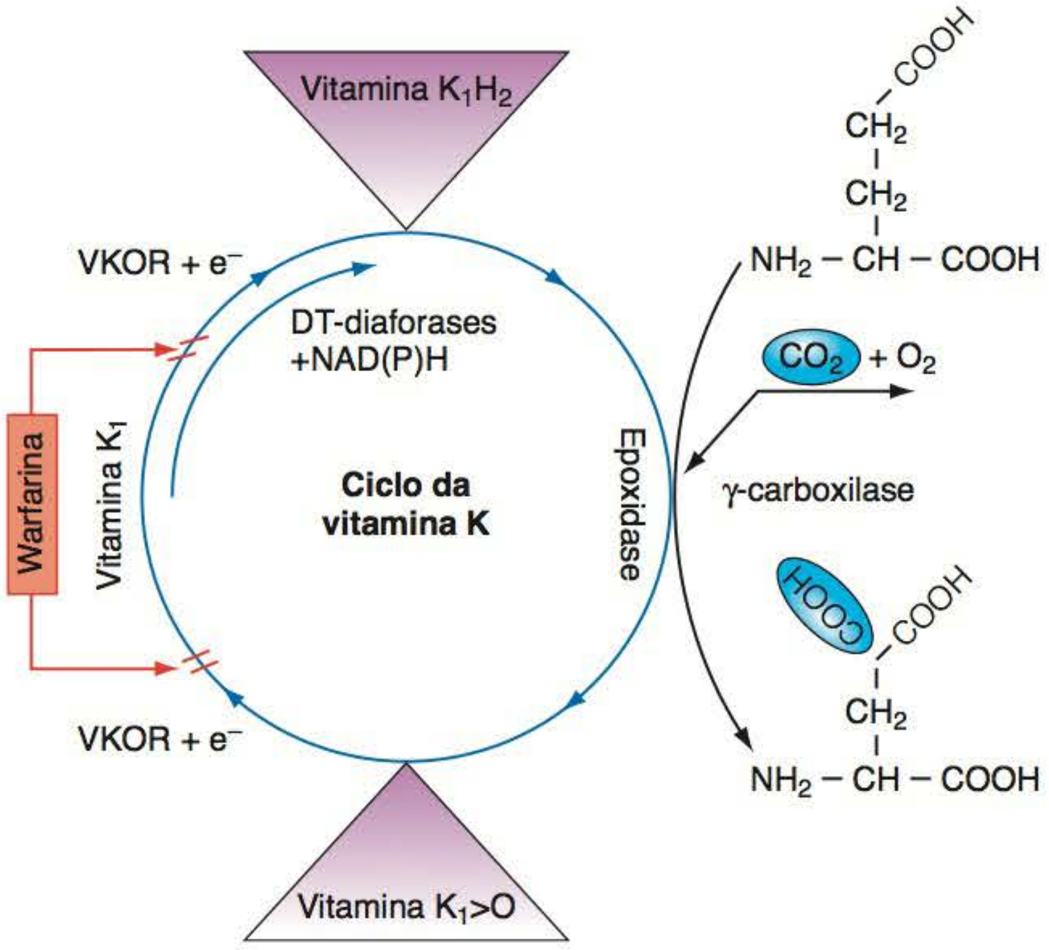


Figura 41.1 Sistema de γ-carboxilação dependente de vitamina K. A γ-carboxilase converte proteínas dependentes de vitamina K em proteínas contendo ácido γ-carboxiglutâmico (Gla), adicionando CO_2 aos resíduos de ácido glutâmico (Glu) existentes nas proteínas recém-sintetizadas. A γ-carboxilase requer vitamina K reduzida (vitamina K_1H_2) como cofator nessa reação de modificação pós-transducional. Concomitantemente à γ-carboxilação, a vitamina K_1H_2 é convertida em vitamina K_1 2,3-epóxido (vitamina K_1 > O). O epóxido é reduzido por uma enzima sensível à warfarina – vitamina K_1 2,3-epóxido redutase (VKOR) – em cofator vitamina K_1H_2. Esse ciclo de interconversão de metabólitos da vitamina K constitui o ciclo da vitamina K. Diante de altas concentrações teciduais, a vitamina K_1 quinona (vitamina K_1) pode ser reduzida à vitamina K_1H_2 pela via alternativa do ciclo. Essa via é catalisada por desidrogenases NAD(P)H (DT-diaforases), que não são inibidas pela warfarina (Wallin, 2004).

nogênio independe da vitamina K, o tempo de trombina (TT) permanece normal. É preciso enfatizar que o prolongamento inicial do PT mediante instituição da terapia com warfarina não reflete fielmente a intensidade global da anticoagulação. O motivo dessa observação não intuitiva é que, enquanto a meia-vida relativamente curta do fator VII (4–6 horas) é subjacente ao prolongamento contemporâneo do PT, as meias-vidas dos demais fatores dependentes da vitamina K na verdade se estendem por vários dias. Somente depois que todos esses fatores atingem um estado de equilíbrio dinâmico, com nível reduzido de γ-carboxilação, torna-se possível antecipar a obtenção de uma queda global do sistema de coagulação (como a que poderia ser refletida pela real produção de trombina). Por isso, em geral recomenda-se aguardar no mínimo 4 a 6 dias de terapia anticoagulante oral para, então, assumir que o monitoramento laboratorial realmente reflete o estado de equilíbrio dinâmico de anticoagulação. Quando é necessário iniciar mais rapidamente uma anticoagulação efetiva, a heparina é administrada antes ou ao mesmo tempo que a warfarina. Decorridos pelo menos 4 dias de terapia combinada, a heparina pode ser descontinuada e a dose de warfarina ajustada de acordo com a INR-alvo prescrita. Enquanto a terapia com warfarina ordinariamente produz um efeito líquido anticoagulante, em certos casos, (p. ex., TIH) a resultante diminuição da carboxilação e da atividade da proteína C e/ou S podem dominar o equilíbrio hemostático, levando ao desenvolvimento de púrpura fulminante ou outras manifestações de trombose venosa (Martin, 1998).

Como discutido no Capítulo 38, o PT é realizado primeiramente pela adição de uma fonte de fator tecidual (tromboplastina) e fosfolipídeo, seguida da recalcificação do plasma livre de plaquetas tratado com citrato. O tempo (em segundos) decorrido até a subsequente formação de um coágulo é determinado tanto por medidas mecânicas quanto por medidas ópticas. Entretanto, o verdadeiro grau de prolongamento do PT em resposta à terapia com warfarina é bastante dependente em particular do reagente tromboplastina, além do sistema instrumental empregado. A cooperação estabelecida entre diversos laboratórios situados em diferentes países resultou no desenvolvimento do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) e de uma INR, os quais atualmente são utilizados de forma universal em uma tentativa de melhorar a padronização do relato dos dados de PT ao redor do mundo. Resumindo, os logaritmos dos PTs obtidos sobre uma série prescrita de pacientes normais e tratados com warfarina, com a utilização de tromboplastina de referência internacional primária ou calibradores de plasma, são plotados contra os logaritmos de PTs obtidos pelo uso de reagente tromboplastina individual. A curva resultante dessa plotagem é a ISI para a combinação reagente tromboplastina e instrumento (Adcock, 2002; Poller, 2004; van der Besselaar, 2004). A INR é definida pela proporção de PT do paciente dividida pelo PT médio normal do laboratório local e elevada à potência de ISI:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT do paciente dado em segundos}}{\text{média do PT normal dado em segundos}} \right)^{\text{ISI}}$$

Dito de outro modo, a INR representa a proporção PT que seria obtida se a tromboplastina de referência internacional tivesse sido utilizada de forma acurada no teste do paciente.

Conforme demonstrado por Ng (1993) e Cunningham (1994), todavia, na prática, pode ser bastante difícil obter uma INR totalmente ensaio-independente.

Em virtude da importância do monitoramento adequado da terapia anticoagulante, é fundamental enfatizar inúmeros pontos adicionais referentes à ISI e à INR. A ISI deve ser corretamente especificada não só para cada tipo, mas também para cada novo lote de tromboplastina, somada ao modelo de instrumento específico que está sendo utilizado em um dado laboratório. As tromboplastinas menos sensíveis (tipicamente derivadas do cérebro ou de outros tecidos) apresentam valores de ISI em torno de 2 ou superiores. Por outro lado, os reagentes mais sensíveis, que derivam dos tecidos, possuem ISI na faixa de 1 a 1,7. O fator tecidual recombinante é a tromboplastina mais sensível, cujos valores de ISI se aproximam de 1. A maioria dos laboratórios relata os resultados simplesmente como INR, contudo existem aqueles que acrescentam os resultados expressos como PT (em segundos), acompanhados do valor da média do PT considerado pelo laboratório. No início da anticoagulação, pode ser necessário realizar determinações mais frequentes do PT até a INR ser estabilizada. No plasma oriundo de pacientes tratados tanto com heparina quanto com warfarina, é possível avaliar a contribuição anticoagulante da warfarina desde que a heparina seja primeiramente removida ou neutralizada antes da realização do teste de PT (ver adiante). A menos que recursos sejam disponibilizados para remoção ou neutralização dos inibidores diretos da trombina (IDT), as intensidades terapêuticas de tais inibidores podem ser o suficiente para prolongar o PT e, do mesmo modo, influenciar o valor de INR (Tobu, 2004; Walenga, 2004). Enquanto a maioria dos anticoagulantes lúpicos exerce um efeito mais pronunciado sobre o PTT do que sobre o PT, em alguns pacientes a presença de um anticoagulante lúpico pode tornar o PT inadequado como forma de monitorar a terapia à base de warfarina. Isso depende do reagente utilizado (Moll, 1997). Nesses casos, um ensaio direto de fator X, utilizando um método cromogênico em vez de um ensaio de coagulação, pode ajudar a monitorar a intensidade da anticoagulação (Rosborough, 2004).

A meia-vida da warfarina varia entre 20 e 60 horas, sendo que a média da meia-vida plasmática é igual a 40 horas. O efeito máximo de uma dose dura até 48 horas após a administração. A (S)-warfarina é metabolizada pela enzima CYP2C9, enquanto a (R)-warfarina é metabolizada pelas enzimas CYP1AZ e CYP3A4. A CYP2C9 apresenta polimorfismos e o conhecimento dos alelos do paciente pode ter valor preditivo para determinar quem irá necessitar de doses maiores ou menores de warfarina (Higashi, 2002; Linder, 2002; Adcock, 2004). A resistência genética à terapia com warfarina é incomum. Nos casos em que são produzidas respostas inadequadas marcantes e persistentes a esse anticoagulante, é possível quantificar os metabólitos utilizando-se metodologia que empregue HPLC (Lombardi, 2003) (ver Cap. 4). Tais quantificações também podem ser utilizadas para checar a complacência. Fármacos que afetam o metabolismo da (S)-warfarina podem produzir alterações marcantes na potência dos tratamentos à base de warfarina. Alguns fármacos ou medicamentos à base de ervas induzem CYP450 e aceleram o metabolismo da warfarina. Esses fármacos diminuem os efeitos da warfarina. Por outro lado, fármacos que ini-

bem a metabolização da warfarina intensificam seus efeitos. Existem centenas de compostos conhecidos por alterarem o metabolismo da warfarina (Poller, 1996; Ansell, 2004). Os antibióticos podem tanto interferir no metabolismo dessa substância quanto modificar a flora intestinal, que fornece uma quantidade significativa de vitamina K para os seres humanos. Alimentos, em particular os vegetais verdes e folhosos, que são ricos em vitamina K, podem prevenir a ação anticoagulante adequada da warfarina. Os produtos da warfarina podem apresentar diferentes potências, de modo que qualquer troca entre os tipos de Coumadin pode requerer monitoramento mais frequente e ajustes de dose (Bongiorno, 2004).

A warfarina é mais comumente utilizada para prevenção de derrames tromboembólicos em pacientes com fibrilação atrial, sendo também empregada de forma profilática e terapêutica em uma ampla gama de situações, podendo até mesmo ser utilizada de forma vitalícia por certos pacientes em particular, que apresentam alto risco de sofrerem eventos trombóticos recorrentes. A American Association of Chest Physicians revisa periodicamente as diretrizes destinadas à terapia anticoagulante e publica seu relatório de consenso na revista *Chest* (Hirsh, 2004a). O tratamento-alvo recomendado é uma INR de 2–3 para a maioria dos pacientes com doença tromboembólica venosa ou fibrilação atrial (Ansell, 2004).

Como a warfarina é influenciada pela função hepática, pela dieta, pela absorção intestinal e pelo cotratamento com outros fármacos ou medicamentos feitos com ervas, é comum os pacientes apresentarem INRs elevadas ou reduzidas. Elevações discretas do INR podem ser tratadas pela modificação do esquema de doses. Elevações mais significativas podem ser tratadas com a administração oral de 2 mg de vitamina K. Em casos de risco significativo de sangramento, podem ser administradas doses mais altas de vitamina K. Entretanto, nesse caso, o paciente pode se tornar resistente a uma nova terapia com warfarina, tornando-se necessário substituir outro anticoagulante. Se o paciente estiver apresentando sangramento, é possível transfundir plasma fresco congelado, complexos de protrombina ativada ou fator VIIa recombinante, para que a hemostasia seja alcançada (Ansell, 2004).

É preciso ter extremo cuidado ao tratar pacientes com warfarina. Esse anticoagulante não deve ser utilizado em pacientes que apresentem qualquer evidência de hemorragia. Pacientes sob tratamento com warfarina devem ser checados quanto a possíveis perdas de sangue e ocorrência de anemia. A warfarina é teratogênica, sendo contraindicada para mulheres grávidas (Bates, 2004). Diante da suspeita de um estado de deficiência de proteína C, a administração de heparina ou outro anticoagulante deve ser iniciada antes ou concomitantemente à terapia com warfarina, que não é recomendada para pacientes com TIH, em virtude da possibilidade de redução dos níveis de proteína C e da promoção de gangrena venosa em membros (Warkentin, 1997).

O monitoramento da INR é utilizado para manter os pacientes submetidos à terapia com warfarina dentro de uma faixa que previna futuros episódios de trombose, mas sem acarretar sangramento. Enquanto uma meta de INR com intensidade anticoagulante de 2–3 define o intervalo de referência usual, INRs ainda mais altas podem ser solicitadas em determinadas circunstâncias clínicas. Pacientes, familiares e prestadores de assistência devem receber esclarecimentos sobre a terapia, bem como saber a importância da checagem rotineira da INR. É possível ensinar aos pacientes o modo correto de utilizar coagulômetros de teste rápido para obter a medida da INR (ver adiante).

Heparina

A heparina é um polímero de glicosaminoglicanas sulfatadas. A heparina não fracionada (HNF) é empregada profilática ou terapeuticamente para casos de trombose venosa e arterial. O peso molecular da HNF varia de 20.000 a 50.000 Da. A HNF para uso sistêmico é preparada a partir de intestino de porco. Para uso tópico, a HNF é obtida de pulmão bovino. A heparina é um inibidor de trombina "indireto": em vez de exercer seu efeito ligando-se diretamente à trombina, liga-se à antitrombina de modo a aumentar a potência da ação inibitória de antitrombina da atividade de serina esterase da trombina (Fig. 41.2). O efeito anticoagulante é derivado da inibição de fatores de coagulação serina protease, sendo que as inibições mais criticas são a do fator IIa (trombina) e a do fator Xa. Entretanto, a heparina produz efeitos adicionais, incluindo

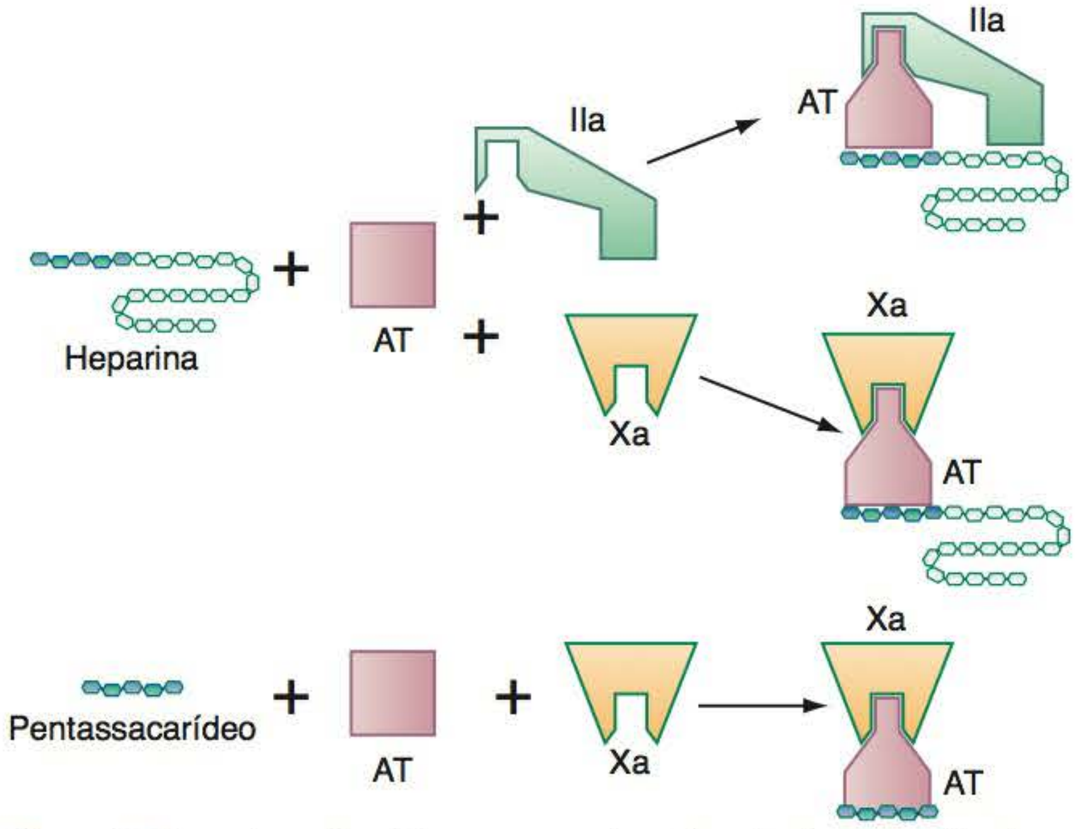


Figura 41.2 Mecanismos hipotéticos para a regulação heparina/heparan sulfato das interações proteína-proteína. A interação da antitrombina (AT) com a trombina (IIa) é catalisada por uma alteração conformacional induzida pela heparina na ATIII e pela ligação inespecífica da trombina à heparina (HNF), aproximando ambas as proteínas (modelo da aproximação). Nem a heparina de baixo peso molecular (HBPM) nem o pentassacarídeo isolado compartilham esse mecanismo com a HNF. A interação de AT com o fator Xa serina protease (Xa) é catalisada por uma alteração conformacional na ATIII induzida pela ligação a uma sequência específica de pentassacarídeo específica da heparina encontrada na heparina não fracionada (HNF), na HBPM e no pentassacarídeo isolado (fondaparinux). (Modificada com permissão de Nugent MA: Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:10301-3.)

liberação de inibidor da via do fator tecidual; aumento dos níveis de ativador de plasminogênio (tPA) e fibrinólise; além do comprometimento da função plaquetária (Saltzman, 1980). A HNF pode ser administrada via subcutânea ou endovenosa. O início de sua ação é rápido (Bussey, 2004; Hirsh, 2004b). É importante alcançar uma anticoagulação efetiva em pacientes com doença veno-oclusiva, pois a trombina sequestrada pode permitir subsequente propagação do trombo (Hull, 1997).

Uma variedade de métodos pode ser empregada para quantificar a HNF. Entre esses métodos, estão PTT, TT, protamina reversa, inibição de fator Xa e tempo de coagulação ativado (ACT, *activated clotting time* – ver adiante). O PTT é o ensaio mais comumente utilizado, porém os reagentes de PTT variam quanto a sensibilidade à heparina. Desse modo, mudanças de lote de heparina ou dos reagentes empregados no teste requerem uma reavaliação do teste. A faixa terapêutica para o PTT deve ser determinada pela plotagem do PTT contra a concentração direta de heparina, determinada pelo ensaio de inibição de fator Xa (Olson, 1998; 2004). A comparação entre PTT e os níveis de heparina das amostras deve ser realizada utilizando-se amostras do paciente, e não no plasma tratado com heparina *in vitro*. Essa necessidade decorre da indução de alterações *in vivo* pela heparina, as quais não são mimetizadas pela adição de heparinas exógenas. Entretanto, atualmente, falta padronização uniforme em termos de monitoramento da heparina por PTT (Van der Velde, 1995; Francis, 2004a). A faixa-alvo do PTT para a HNF é definida por um ensaio de heparina anti-Xa e deve ser fornecida ao médico responsável pelo tratamento (van ser Basselaar, 2002). O PTT é mais sensível aos efeitos da HNF do que o PT, contudo doses elevadas também aumentam o PT.

A contaminação com heparina constitui causa frequente de prolongamento do PTT e do TT, sendo que, de fato, pode complicar o desempenho de diversos testes baseados na coagulação. Isso é válido particularmente para os casos em que as amostras são extraídas com cateteres endovenosos. Alguns *kits* de testes comerciais contêm polibrene ou outros agentes neutralizadores da heparina. A presença de heparina pode ser determinada caso um PTT prolongado apresente encurtamento após o tratamento com heparinase (obtida de *Flavobacterium heparinum*). Em amostra com PTT bastante prolongado, pode ser necessário realizar um segundo tratamento com heparinase para remover totalmente a heparina e produzir um PTT normal. Uma abordagem similar possível

consiste em empregar celulose ligadora de heparina (ECTEOLA), que absorve a heparina contida no plasma do paciente. Esse procedimento de absorção apresenta apenas efeitos mínimos sobre os demais fatores de coagulação, exceto quanto a uma leve redução dos níveis de fator IX (Hutt, 1972; Thompson, 1976; Cowan, 1981; Newman, 1995).

A heparina é extensivamente utilizada para prevenir a formação de trombos durante cirurgias de desvio cardíaco. O ACT é um ensaio de coagulação de sangue total, em que frequentemente é utilizada terra diatomácea como agente de ativação. O ACT é mais comumente utilizado para monitorar a heparina em determinadas situações, como na cirurgia de desvio cardiopulmonar, sendo mais útil quando os níveis de heparina estão altos (2-4 U/mL) e apresentam ampla flutuação. Nessa faixa, o PTT é inútil. Para os casos em que há necessidade de um monitoramento mais preciso, podem ser considerados ensaios de inibição do fator Xa, especialmente úteis para pacientes obesos, com insuficiência renal, gestantes, com anticoagulante lúpico ou que manifestem resistência à heparina. Esses ensaios são menos afetados do que o ACT pela presença do inibidor de proteases aprotinina, que muitas vezes é utilizado em cirurgias cardíacas. Quando o paciente deixa o desvio cardíaco, a heparina comumente é revertida pelo tratamento com sulfato de protamina. O progresso da neutralização com protamina pode ser determinado pela titulação do ACT. Cerca de 1 mg de protamina neutraliza 130 unidades de HNF. Em casos raros, quando o paciente é alérgico à protamina, plaquetas podem ser administradas para ajudar a neutralizar a heparina (Hirsh, 2004b).

Existem situações em que os pacientes parecem ser resistentes à heparina, embora a definição dessa resistência possa depender de condições clínicas específicas.

No contexto do tromboembolismo venoso, a resistência à heparina é definida como a necessidade de administrar mais de 35.000 U/24 horas para prolongar a permanência do PTT dentro da faixa terapêutica. Em contraste, durante a execução de procedimentos de desvio cardíaco, a definição de resistência à heparina se baseia no ACT – devendo haver ao menos um ACT inferior a 400 s após a heparinização – e/ou na necessidade de administrar antitrombina exógena (Anderson, 2002).

As causas da resistência à heparina incluem: trombose maciça, com liberação de proteínas ligadoras de heparina; níveis elevados de fator VIII (muitas vezes evidenciados por PTTs basais baixos); tratamento com aprotinina ou nitroglicerina; obesidade severa; deficiência de antitrombina; TIH; câncer (Edson, 1967; Young, 1992; Bharadwaj, 2003; Francis, 2004a). Em certos casos de aparente resistência à heparina, conforme medida fornecida pelo PTT, como ocorre diante de níveis elevados de fator VIII, a simples mudança para ensaios de antifator Xa pode constituir uma média mais apropriada dos níveis de heparina (Hirsh, 2004b).

Heparinas de baixo peso molecular

As heparinas de baixo peso molecular (HBPMs) derivam da HNF. Apresentam massas moleculares na faixa de 2.000 a 10.000 Da (Tab. 41.1). Em virtude de seu pequeno tamanho, as HBPMs são ineficazes em permitir que a antitrombina inative o fator IIa, contudo inativam o fator Xa mesmo assim. Os ensaios anti-Xa, em vez do PTT, são utilizados quando há necessidade de quantificar a HBPM (Boneu, 2001). A faixa terapêutica geral para HBPM em pacientes sob tratamento para distúrbios tromboembólicos venosos é diferente para cada composto. Em razão da diminuição da ligação às proteínas plasmáticas, é possível esperar uma resposta previsível às HBPMs na maioria dos casos, as quais podem ser administradas via subcutânea 1 a 2 vezes/dia (Bounameaux, 2004; Harenberg, 2004). Os níveis plasmáticos de HBPM normalmente não são monitorados, exceto durante o tratamento de crianças, gestantes e pacientes notavelmente obesos ou com insuficiência renal. Quando esse monitoramento é realizado, é comum coletar uma amostra de sangue em aproximadamente 4 horas após a administração da última dose, uma vez que esse é o momento previsto para a ocorrência dos níveis de pico (Bounameaux, 2004; Harenberg, 2004).

Complicações de osteopenia e TIH são menos frequentes quando se utiliza HBPM, em vez de HNF (Pettila, 2002; Schulman, 2002). Entretanto, pacientes com TIH estabelecida não devem ser submetidos à anticoagulação com HBPM. Se por um lado as HBPMs inicialmente são menos imunogênicas, uma vez que os anticorpos já tenham sido realmente produzidos após a administração da HNF, também pode ocorrer uma interação antígeno-anticorpo com a administração subsequente de HBPM (Warkentin, 1997; Schenk, 2003).

Tabela 41.1 Comparação das propriedades da HBPM, fondaparinux e idraparinux

Aspecto	HBPM	Fondaparinux	Idraparinux
Modo de administração	Subcutânea	Subcutânea	Subcutânea
Biodisponibilidade (%)	80 – 90	100	100
Meia-vida (h)	4	17	80
Alvo	Fator Xa e trombina	Fator Xa	Fator Xa
Depuração renal	Sim	Sim	Sim
Neutralização por sulfato de protamina	Parcial	Não	Não

Fonte: Bates SM, Weitz JI: New anticoagulants: beyond heparin, low-molecular-weight heparin and warfarin. Br J Pharmacol 2005; 144:1017–1028.

Trombocitopenia induzida por heparina

A trombocitopenia que surge no contexto da terapia com heparina pode ocorrer de duas formas. Acredita-se que a trombocitopenia não imune associada à heparina (TAH) resulte da ativação plaquetária subsequente à ligação direta da heparina às plaquetas (Horne, 2001). O grau de trombocitopenia geralmente é brando e transiente. São bem mais preocupantes os processos imunomediados, às vezes referidos como "trombocitopenia induzida por heparina de tipo II" – o nome mais comum é simplesmente "TIH". Além disso, quando a trombose venosa e/ou arterial surge no contexto da TIH, a entidade é referida como "trombocitopenia e trombose induzidas por heparina" (TTIH). Estudos recentes (Rauova, 2005) sugeriram que a HNF estrutura tetrâmeros de PF4 em complexos ultragrandes (CUGs), que são particularmente antigênicos. Se ocorrer ligação de múltiplas moléculas de IgG ao CUG, as regiões Fc desses anticorpos podem, então, ser orientadas de modo a favorecer sua ligação aos receptores plaquetários FcRIIA. Como consequência dessa ligação, ocorre transdução de sinal e subsequente ativação plaquetária. As manifestações dessa ativação plaquetária incluem secreção de material granular e liberação de micropartículas plaquetárias, cujas fosfatidilserinas voltadas para o meio externo podem potencialmente promover a geração de trombina e, assim, intensificar a coagulação. Anticorpos dirigidos contra outras quimiocinas que compartilharam suas estruturas com o PF4 (a família de quimiocinas CXC) – incluindo a interleucina (IL)-8, a proteína induzível pelo interferon-8 (IL-10), a proteína básica plaquetária e seu produto proteolítico β-tromboglobulina, além da proteína ativadora de neutrófilos 2 – também podem causar TIH (Greinacher, 1994; Amiral, 1996). Anticorpos associados à TIH podem igualmente fazer com que as células endoteliais e monócitos ativem a expressão do fator tecidual (Fig. 41.3). A TIH é mais frequente diante da exposição à heparina bovina do que à heparina suína. Na apresentação costumeira, a contagem plaquetária sofre uma queda 5 a 10 dias após a exposição à heparina. A concentração de plaquetas pode se tornar inferior a 150.000 plaquetas/μ1 ou cair a níveis inferiores a 50% do pico da contagem plaquetária ou da contagem anterior ao início da administração de heparina. Quando isso ocorre, o tratamento com heparina deve ser totalmente descontinuado (incluindo os jatos de heparina dos cateteres). Na maioria dos casos, a contagem plaquetária diminui em 4 a 5 dias contados a partir do início da terapia, porém há certos casos em que a trombocitopenia pode ocorrer em 2 a 3 dias ou persistir mesmo após a descontinuação da administração de heparina, quando os níveis de anticorpos ainda estão altos. Cerca de 1/3 dos pacientes trombocitopênicos com anticorpos TIH-associados de fato desenvolvem tromboses (Fig. 41.4). Tromboses venosas são mais comuns que as arteriais, com envolvimento mais frequente dos membros inferiores. A formação de micropartículas plaquetárias que apresentam exposição de fosfatidilserina na superfície externa provavelmente acarreta produção de trombina e tromboses venosas subsequentes (Warkentin, 2004). Os pacientes podem apresentar áreas de necrose cutânea no sítio das injeções

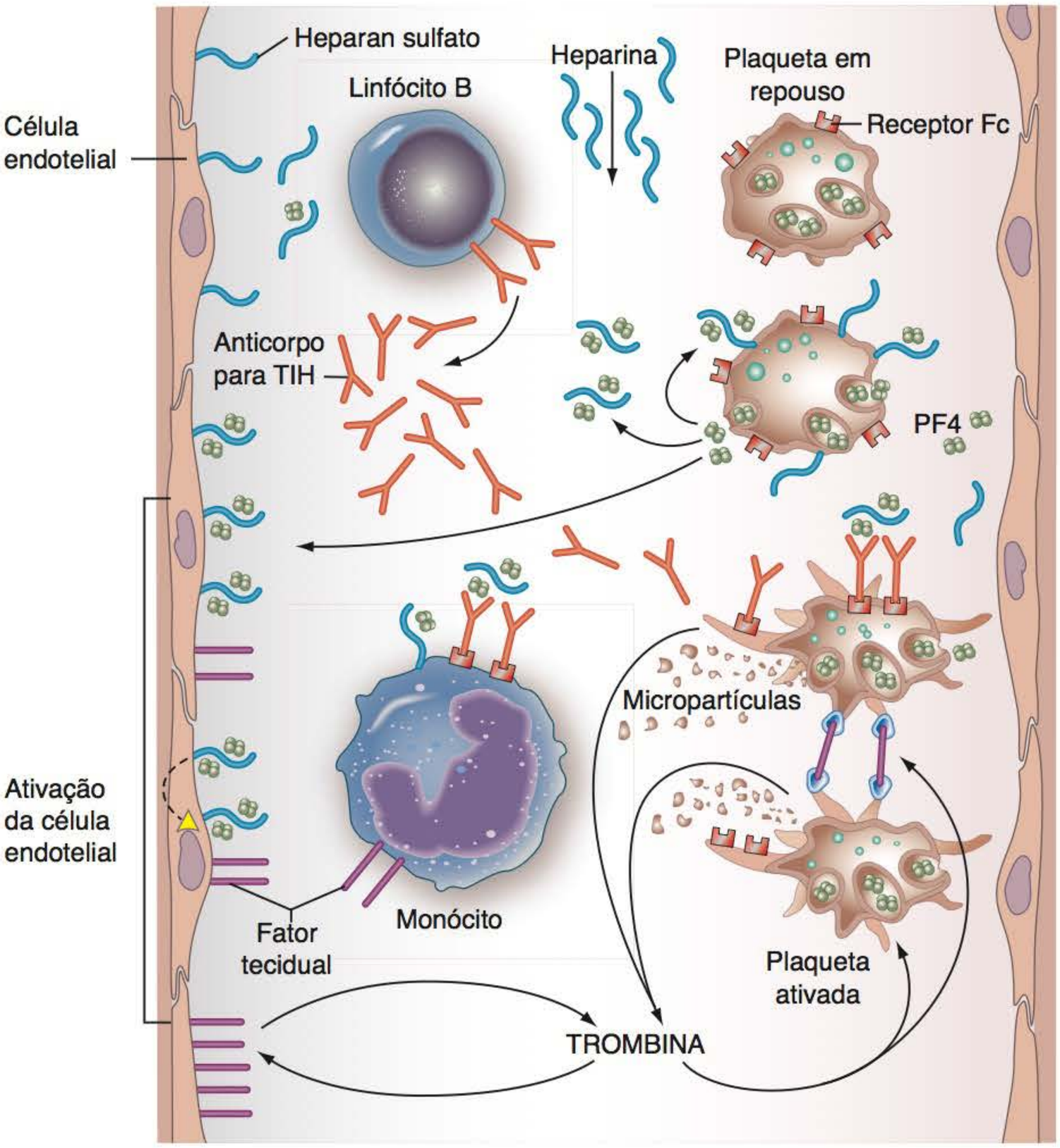


Figura 41.3 Patogênese da trombocitopenia induzida por heparina – um papel central para a geração de trombina. Anticorpos IgG antiTIH se ligam a vários epítopos idênticos no mesmo complexo antigênico, formando imunocomplexos que se tornam localizados na superfície plaquetária. Os imunocomplexos de IgG podem fazer ligação cruzada com os receptores FcγRIIa existentes nas plaquetas, resultando na ativação plaquetária dependente de FcγRIIa. O complexo GP IIb/IIIa é desnecessário à ativação plaquetária. As plaquetas ativadas desencadeiam a cascata de eventos que acaba por levar à ativação das vias de coagulação, com consequente geração de trombina. As plaquetas ativadas liberam proteínas contidas nos grânulos α, entre as quais PF4, levando à formação de complexos heparina-PF4 mais multimoleculares, montando um círculo vicioso e desencadeando ainda mais a ativação plaquetária. As plaquetas ativadas se ligam ao fibrinogênio, recrutam outras plaquetas e começam a formar um coágulo primário. Durante a alteração de formato, há liberação de micropartículas pró-coagulantes derivadas de plaquetas, fornecendo uma superfície fosfolipídica para amplificar a geração de trombina. O PF4 liberado também se liga ao heparan sulfato existente na célula endotelial, dando origem a complexos antigênicos locais aos quais se ligam os anticorpos para TIH. A expressão de fator tecidual em monócitos e células endoteliais ativadas intensifica ainda mais a produção de trombina. (Modificada com permissão de Warkentin TE, Greinacher A: Laboratory testing for heparin-induced-thrombocytopenia. *In*: Warkentin TE, Greinacher A (eds): Induced Thrombocytopenia, 2.ed., New York, Marcel Deller, 2001, pp. 231-69.)

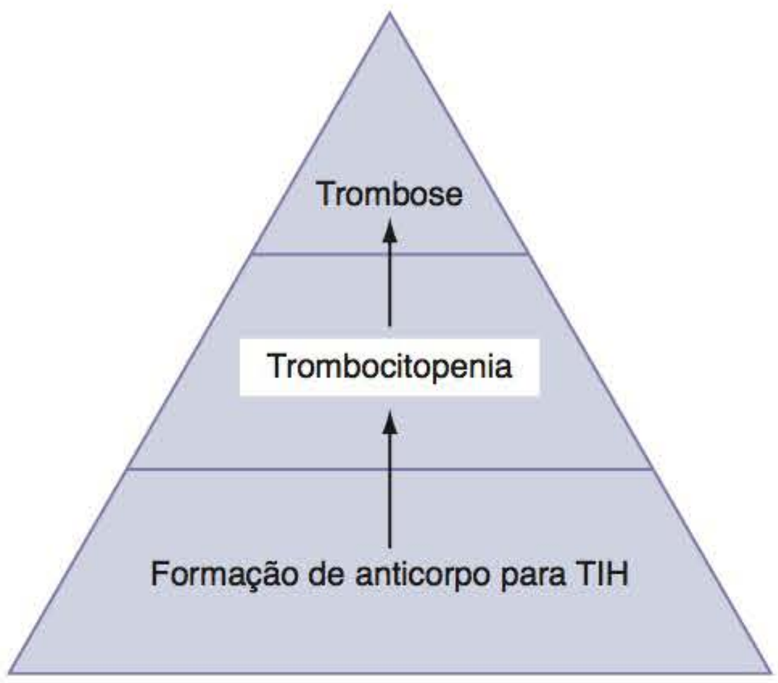


Figura 41.4 Modelo *iceberg* de trombocitopenia induzida por heparina. O desenvolvimento de uma trombocitopenia real ocorre apenas em um subgrupo de indivíduos produtores de anticorpos para TIH, sendo que somente um subconjunto desses indivíduos com trombocitopenia realmente desenvolve trombose. Repare como a trombocitopenia é amplamente definida, abrangendo pacientes que apresentam uma queda relativamente significativa da contagem plaquetária, mesmo quando o nadir de plaquetas é >150 × 10^9/L. (Modificada com permissão de Warkentin TE, Greinacher A: Laboratory testing for heparin-induced-thrombocytopenia. *In*: Warkentin TE, Greinacher A (eds): Induced Thrombocytopenia, 2.ed., New York, Marcel Deller, 2001, pp. 231-69.)

de heparina, bem como reações inflamatórias sistêmicas após um bolo de heparina, podendo exibir evidências de resistência à heparina. É necessário excluir outras causas possíveis de trombocitopenia. Quando a heparina é descontinuada, normalmente a trombocitopenia diminui em 9 a 10 dias. Entretanto, o paciente pode apresentar risco de desenvolvimento de trombose por várias semanas após a suspensão do tratamento com heparina.

Um diagnóstico presuntivo de TIH muitas vezes é feito apoiado em bases clínicas, principalmente nos casos em que o curso temporal e a extensão da queda da contagem plaquetária se encaixam de forma convincente à terapia com heparina prescrita ao paciente. Em tais casos, as decisões acerca do tratamento podem ser tomadas independentemente de os resultados dos testes laboratoriais também apontarem nessa direção. Nas situações em que um diagnóstico de TIH parece ser mais equivocado, o teste laboratorial para detecção dessa condição pode exercer papel mais significativo no processo de tomada de decisão clínica subsequente. Um teste para TIH ideal deve apresentar sensibilidade e especificidade perfeitas, além de poder ser realizado rapidamente e de forma custo efetiva. A maioria dos laboratórios atualmente emprega uma estratégia de testes em que o teste inicial (ou único) é prontamente realizado por imunoensaio de ELISA-PF4, com alta sensibilidade e especificidade um pouco menor. A execução de testes funcionais é tipicamente bem mais trabalhosa, contudo, esses testes proporcionam a vantagem de uma alta especificidade. Foi relatado que uma combinação de testes imunológicos e funcionais forneceu valores preditivos negativos e positivos significativamente elevados (Francis, 2004b). Um aspecto crítico relacionado ao projeto dos testes funcionais para TIH é a escolha do alvo sobre o qual atuarão os anticorpos presentes no sangue do paciente. Os testes antigos empregavam plasma rico em plaquetas proveniente de doadores normais. Todavia, segundo uma análise consideravelmente detalhada (Warkentin, 2001), a lavagem dessas plaquetas-alvo para a remoção do plasma que as acompanha pode melhorar bastante o desempenho do teste. Na América do Norte,

o padrão-ouro dos testes funcionais para TIH é o ensaio da liberação de serotonina (ELS). No ELS, as plaquetas lavadas que captaram serotonina exógena são desafiadas com o plasma do paciente na presença de concentrações ótimas de heparina, e a quantidade de serotonina liberada é considerada o ponto terminal. Esse teste pode ser realizado empregando-se serotonina radiomarcada e medindo-se a radioatividade no produto de liberação plaquetária, ou pelo emprego de HPLC ou por outros métodos analíticos para quantificar a liberação de serotonina não radioativa. Notavelmente, inúmeros laboratórios europeus obtiveram resultados comparáveis ao utilizarem a agregação em micropoços como ponto terminal funcional, com plaquetas lavadas de forma semelhante (Warkentin, 2001). Outro ponto final explorado é a formação de micropartículas plaquetárias, detectáveis por métodos de citometria de fluxo. Qualquer um desses ensaios envolve o ajuste de uma série de aspectos técnicos, entre os quais a seleção dos doadores de plaqueta e se esses doadores devem ou não ser testados quanto aos polimorfismos em FcRIIA. O bloqueio com anticorpos monoclonais dirigidos contra o receptor plaquetário FcRIIA e/ou a inibição das respostas funcionais pela adição de heparina em altas concentrações são medidas empregadas por alguns grupos que tentam aumentar a especificidade do teste, ainda que a utilidade dessas medidas continue sendo objeto de discussão (Warkentin, 2001). Por fim, nas circunstâncias em que o epítopo-alvo é atípico (i. e., epítopos não previstos junto ao PF4), ao mesmo tempo que os imunoensaios altamente específicos podem falhar em detectar anticorpos associados à TIH, não seria de se esperar que essa atipicidade influenciasse os ensaios funcionais.

Uma potencial armadilha na interpretação do teste para TIH, em particular quando são realizados imunoensaios, é a identificação de anticorpos imunorreativos na ausência de achados clínicos envolvendo uma TIH verdadeira. Provavelmente, na melhor das hipóteses, esses anticorpos representam uma forma subclínica de TIH ou, na pior hipótese, um resultado biológico falso-positivo equivocado (análogo ao resultado falso-positivo no teste para detecção de VDRL, no caso dos anticoagulantes lúpicos). O grau de adequação das condições clínicas (mais tipicamente as contagens plaquetárias em queda, que apresentam relação temporal razoável em termos de administração de heparina), dessa forma, possui importância considerável quando se avalia a conveniência de realizar ou não esse tipo de teste. No entanto, o laboratório às vezes é convocado a realizar o teste de detecção de TIH para indivíduos assintomáticos que já apresentaram resultado positivo para essa condição no passado. Embora tenha sido demonstrado que a maioria dos anticorpos associados à TIH não reaparece de forma anamnésica quando o paciente volta a ser desafiado com heparina decorridos mais de 6 meses da perda de anticorpos detectáveis, o monitoramento desses pacientes novamente desafiados é fundamental. No evento em que uma resposta anamnésica se desenvolve, a re-emergência dos anticorpos pode ser bastante dramática, requerendo no mínimo uma rápida detecção das contagens plaquetárias em queda, quando não a realização de testes mais específicos para TIH.

Monitoramento de anticoagulação com teste rápido

Existem vários tipos de monitoramento por teste rápido (TR). O ACT é utilizado com frequência para guiar a terapia com heparina durante cirurgias cardíacas e cateterizações. Os instrumentos de TR costumam utilizar pérolas de vidro ou caulim como ativadores. Os níveis basais devem ser superiores a 300 s, a fim de prevenir a formação de microtrombos durante a realização de cirurgias de desvio cardíaco. O ACT pode ser influenciado pela quantidade e pela qualidade de plaquetas, temperatura, anticoagulantes lúpicos, níveis de fatores de coagulação ou hemodiluição. A aprotinina, uma antiprotease que ajuda a prevenir perdas sanguíneas maiores em cirurgias cardíacas, prolonga o ACT nos ensaios à base de caulim, conduzindo à subestimação da heparina nos ensaios à base de celite.

Foram inúmeros os novos progressos na área da tecnologia de monitores de TR para terapia anticoagulante oral. Tecnologias mecânicas que utilizam movimentação magnética de limalha de ferro, detectores de fluxo de movimento, substratos fluorescentes cliváveis de trombina, detectores eletroquímicos de alterações de impedância, além de tecnologias de dispersão de luz *laser* foram empregadas para detectar a formação de coágulos e transformar os dados obtidos em PT-INR reportável. Cada tipo de medida TR-PT deve ser caracterizado para ser utilizado com pacientes de maneira específica (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). Com frequência, comparações de resultados obtidos com diferentes instrumentos TR-PT e de base laboratorial são incompatíveis (Nutescu, 2004). Um TR INR fora dos limites deve ser novamente testado no laboratório clínico (Sunderji, 2005).

Inibidores de trombina diretos

A hirudina originalmente isolada a partir das glândulas salivares de sanguessugas é disponibilizada sob a forma de proteína recombinante (refludan, lepirudin). Ela forma um complexo essencialmente irreversível com a trombina. A lepirudin tem sido utilizada no tratamento de pacientes com TIH. Com uma meia-vida de 90 a 120 minutos, a lepirudin é depurada pelos rins. Sua atividade anticoagulante foi monitorada por PTT, com uma faixa-alvo de 1,5 a 2,5 vezes o valor basal de PTT (Call, 2004). Entretanto, nos casos em que o paciente apresenta valores basais de PTT anormais (p. ex., na presença de anticoagulante lúpico), o monitoramento por PTT pode não ser confiável. Uma alternativa ao monitoramento por PTT dos IDTs é o tempo de coagulação com ecarina (ECT, *ecarin clotting time*), que emprega o veneno de *Echis carinatus*. A enzima ativa desse veneno é uma metaloproteinase que converte a protrombina em meizotrombina – uma reação passível de bloqueio por IDTs. Uma curva de calibração para ECT pode ser criada pelo enriquecimento do plasma com IDTs *in vitro* (Nowak, 2001; Kolde, 2004). O IDT pode inibir a proporção PT/INR. O monitoramento anticoagulante durante a ponte de transição entre a administração de IDT e terapia com antagonista de vitamina K é realizado empregando-se um ensaio cromogênico para fator Xa ou pela descontinuação do IDT por várias horas, seguida da quantificação do INR do paciente vários dias após o término da terapia com antagonista de vitamina K (Hoppensteadt, 1997; Tobu, 2004; Walenga, 2004). Um IDT relacionado – bivalirudin – é uma molécula de ação relativamente curta, cujo uso foi aprovado para pacientes submetidos à angioplastia coronariana (Merry, 2004).

O argatroban, um IDT sintético derivado da L-arginina, também teve o uso aprovado para tratamento da TIH. Foi sugerida uma ampla janela de 1,5 a 3 vezes o valor basal de PTT para faixa-alvo terapêutica do argatroban (Call, 2004). Metodologias de monitoramento alternativas podem ajudar a estreitar essa faixa. O argatroban é metabolizado no fígado e pode ser utilizado para pacientes com função renal comprometida.

O ximelagatran é um dipeptídeo pró-fármaco que pode ser tomado via oral. Após a absorção a partir do intestino delgado, ele é convertido no IDT ativo melagatran. A terapia inicial pode ser iniciada pela administração endovenosa do melagatran, seguida do ximelagatran oral. A eficácia do índice de segurança do ximelagatran é comparável à da warfarina. Poucos fármacos interferem na ação do melagatran. Embora o monitoramento laboratorial tipicamente seja dispensável (Gustafsson, 2001; Francis, 2003; Kessler, 2004), é possível realizá-lo similarmente ao modo como se faz para os demais IDTs (Fenyvesi, 2002). Ainda que não seja o teste ideal para monitoramento da atividade do melagatran, o prolongamento do PTT tem sido utilizado em situações emergenciais para monitorar os efeitos desse IDT (Carlsson, 2005). Cerca de 10% dos pacientes tratados com melagatran apresentam elevação dos níveis de enzimas hepáticas. Por esse motivo, recomenda-se o monitoramento da alanina aminotransferase em pacientes tratados com esse fármaco. Por outro lado, o uso do ximelagatran não foi aprovado nos Estados Unidos.

É evidente que os IDTs têm exercido um papel cada vez maior na anticoagulação. No momento, seu uso primário se destina ao tratamento de pacientes com TIH. Futuramente, contudo, é previsto que essas substâncias sejam utilizadas para uma gama maior de condições clínicas e, em particular, no tratamento de pacientes em que é comprovadamente difícil estabilizar a intensidade do processo de anticoagulação apenas com o uso dos agentes tradicionais.

Novos anticoagulantes

Até recentemente, a escolha dos reagentes promotores de anticoagulação de longa duração limitava-se sobretudo à warfarina. Uma variedade de novos anticoagulantes está sendo desenvolvida e testada para inibir as diversas etapas das cascatas de coagulação (Mammen,

2004; Weitz, 2005; Hirsh, 2005). É importante que o laboratorista acompanhe a introdução de novos agentes, suas respectivas exigências em termos de monitoramento laboratorial e os métodos ideais para realização desse monitoramento. Os fármacos em desenvolvimento atualmente, ou em fase de aprovação do uso, estão listados na Tabela 41.1 e são ilustrados na Figura 41.5. Entre estes, estão:

- inibidores de fator tecidual/VII. Uma forma recombinante de inibidor da via do fator tecidual está sendo testada: o polipeptídeo NAPc2, que se liga ao fator Xa e inibe FIIa;
- inibidores indiretos e diretos de fator Xa. Os inibidores indiretos requerem a ligação à antitrombina. Os inibidores diretos de Xa se ligam aos sítios ativos desse fator. O fondaparinux é um inibidor indireto de Xa que pode ser administrado diariamente, via subcutânea. Esse agente não forma complexos com PF4 e é improvável que cause TIH. A protamina não reverte seus efeitos. O idaparinux é um inibidor indireto do fator Xa que apresenta meia-vida longa. Pode ser administrado via subcutânea, semanalmente. Existem agentes antifator Xa (p. ex., DPC906) administráveis via oral que ainda estão sendo avaliados;
- a proteína C ativada recombinante, a proteína C natural e a trombomodulina recombinante apresentam graus variáveis de atividade anticoagulante. Além disso, proteína C ativada pode ser empregada no tratamento da sepse (Griffin, 2002; Liaw, 2004).

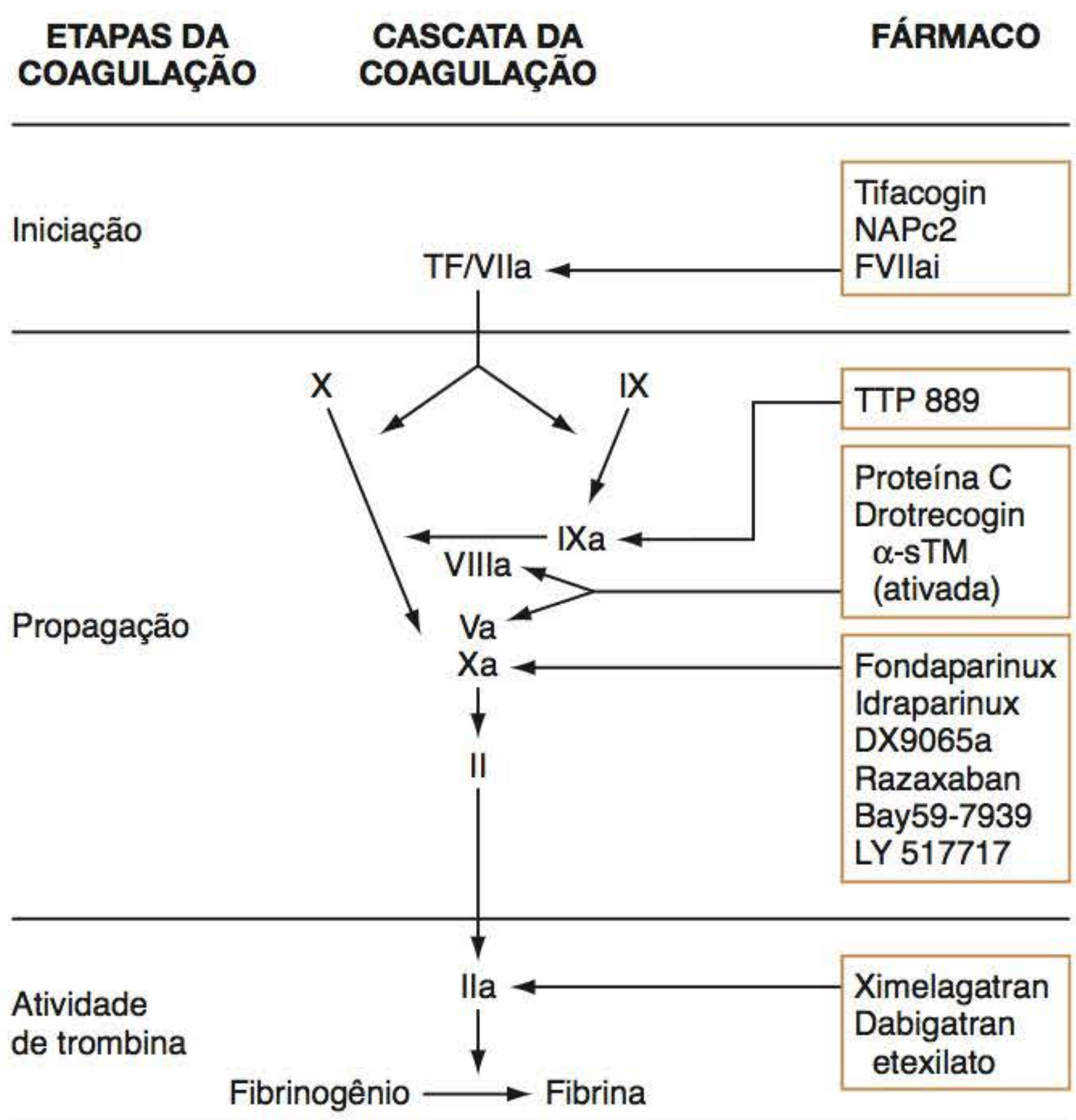


Figura 41.5 Novos anticoagulantes e respectivos alvos na via da coagulação. (Redesenhado de Br J Pharmacol. 2005 Feb 14; [E-pub. Antes da impressão] com permissão.)

Terapia antiplaquetária

Diversas classes de compostos estão sendo empregadas para reduzir a funcionalidade plaquetária. Entre esses compostos, estão a aspirina, outros inibidores de ciclo-oxigenases, os antagonistas do receptor de ADP e os antagonistas do receptor de glicoproteína (GP) IIb/IIIa. Contrastando com os anticoagulantes orais ou com a heparina, a terapia antiplaquetária tradicionalmente não é monitorada de perto pelo laboratório. Notavelmente, contudo, o laboratório está começando a exercer um papel maior. As questões que potencialmente podem ser respondidas por testes laboratoriais são: 1) se as plaquetas de um paciente são ou não resistentes à inibição por um dado agente; 2) que dose de agente é necessária para obter a intensidade de inibição desejada; 3) após o término da terapia, em que momento a função plaquetária retorna a um nível adequado, de modo a ser útil diante de desafios hemostáticos significativos (p. ex., cirurgia); 4) se a trombocitopenia observada após a terapia antiplaquetária pode ser razoavelmente atribuída à própria terapia em si.

Certamente, a aspirina é um agente que prevaleceu na terapêutica por longo período. Como é bem sabido, a aspirina acetila a ciclo-oxigenase de modo irreversível. No caso das plaquetas, desprovidas de núcleo, essa ação efetivamente significa que somente as plaquetas recém-liberadas dos megacariócitos, ao caírem na circulação, conseguem se recuperar do efeito inibitório da aspirina. Enquanto as plaquetas humanas circulam no sangue em média por 10 dias, já existe uma normalização substancial da responsividade funcional plaquetária 5 a 7 dias após a conclusão da terapia com aspirina. Esse fenômeno pode ser em virtude da capacidade do tromboxano A_2 – o produto ativo da via da ciclo-oxigenase plaquetária em plaquetas não tratadas com aspirina – de estimular as plaquetas mais próximas, cujas ciclo-oxigenases tenham sido acetiladas pela aspirina. Todavia, nos últimos anos, a atenção tem se voltado para as variações individuais apresentadas pelas respostas de diferentes pacientes à ação inibitória da aspirina (Mason, 2004; Sanderson, 2005). Considerando que a relativa resistência aos efeitos inibitórios da aspirina pode implicar a necessidade de um tratamento antiplaquetário adicional ou alternativo sob determinadas condições clínicas, o laboratório pode ser útil no sentido de quantificar essa resistência. Atualmente, duas abordagens principais são empregadas para avaliar a resistência plaquetária à aspirina. Como as plaquetas constituem o principal tipo celular a produzir tromboxano, ensaios para detecção dessa substância fornecem uma medida da atividade da ciclo-oxigenase plaquetária. O tromboxano A_2 é convertido em tromboxano B_2 e, consequentemente, na forma mais estável 11-desidrotromboxano B_2. Assim, foi desenvolvido um ensaio para detectar esse último metabólito em amostra de plasma, como forma de medida indireta da atividade da ciclo-oxigenase plaquetária (Catalla, 1986). Para essa mesma finalidade, subsequentemente também são empregados ensaios para detecção de 11-desidrotromboxano B_2 urinário (Eikelboom, 2002). Uma abordagem alternativa, que avalia a funcionalidade plaquetária real de forma mais direta, consiste na quantificação da agregação plaquetária após a estimulação das plaquetas *in vitro* por um agonista fortemente dependente de uma via de ciclo-oxigenase intacta. O ácido araquidônico, ou compostos correlatos, são empregados com frequência como agonistas nesses estudos. Para a validação desses ensaios funcionais (desde que sejam capazes de identificar a resistência à aspirina), é importante realizar uma padronização bastante firme do procedimento adotado no teste. Embora essa padronização com certeza seja realizada pelos agregômetros plaquetários com a utilização de amostras de plasma rico em plaquetas (Cap. 39), estão sendo desenvolvidos novos métodos que fornecem informações comparáveis diretamente a partir de amostras de sangue total anticoagulado. Por exemplo, estudos ópticos sobre agregação plaquetária podem ser realizados com amostras de sangue total do paciente, às quais tenham sido adicionadas pérolas plásticas recobertas com fibrinogênio e impregnadas com corante infravermelho (i. e., um corante que absorve luz na região de infravermelho do espectro eletromagnético). Após a adição de ácido araquidônico, as pérolas cobertas com fibrinogênio coagregam-se com as plaquetas, presumivelmente em razão da ligação do fibrinogênio às formas de GP IIb/IIIa ativas (em termos de conformação) presentes nas plaquetas estimuladas. Enquanto a absorbância eritrocitária no comprimento de onda da luz visível inviabilizou previamente a agregometria óptica de amostras de sangue total, a introdução das técnicas que utilizam infravermelho possibilitou quantificar rapidamente a agregação plaquetária (como aumento da transmitância da luz infravermelha) e a intensidade de sua inibição pela aspirina ou outros agentes antiplaqueta (Smith, 1999; Wang, 2003). Estudos sobre agregação no sangue ou no plasma rico em plaquetas também se mostraram úteis em cenários clínicos definidos, como a angioplastia coronariana transluminal percutânea (PTCA, *percutaneous transluminal coronary angioplasty*) para avaliação do grau de reatividade plaquetária residual subsequente à inibição das plaquetas por abciximab, eptifibatide e outros antagonistas do complexo plaquetário GP IIb/IIIa (Cap. 39) (Hezard, 2000; Matzdorff, 2001). Dessa mesma forma, é possível avaliar a presença de receptores purinérgicos ADP na superfície das plaquetas após o tratamento com ticlopidina ou clopidogrel.

Além da agregometria, outros métodos podem ser empregados para detectar a ativação plaquetária exercida por agonistas e, por conseguinte, também a inibição dessa ativação com terapias antiplaquetárias. A citometria de fluxo pode ser empregada com essa finalidade, para detecção de marcadores da ativação plaquetária. A translocação da P-seletina a partir dos grânulos α intracitoplasmáticos, na plaqueta em repouso, para a membrana extracelular, após estimulação plaquetária suficiente, fornece um desses marcadores. Nesse caso, o número relativamente pequeno de moléculas de P-seletina detectáveis, mesmo quando as plaquetas são totalmente ativadas, limita o intervalo dinâmico desse marcador. Anticorpos sensíveis à alteração conformacional da molécula GP IIb/IIIa associada à ativação plaquetária potencialmente oferecem um maior intervalo dinâmico de sinal, que vai desde as plaquetas completamente inativadas até àquelas em estado de ativação total. Abordagens utilizando citometria de fluxo também foram empregadas para monitorar a funcionalidade residual do complexo GP IIb/IIIa após o tratamento de pacientes com inibidores dessa molécula (Hezard, 2000; Matzdorff, 2001), bem como para quantificar micropartículas plaquetárias como indicador de ativação plaquetária (Craft, 2004).

Nos últimos anos, tem havido interesse crescente na possibilidade de o teste diagnóstico molecular dos polimorfismos plaquetários ser útil para a individualização da terapia antiplaquetária aplicada a cada paciente. Até o momento, têm sido mais enfatizadas as principais glicoproteínas da membrana plaquetária, embora potencialmente seja possível comprovar que outras moléculas existentes nas plaquetas apresentam significativo valor preditivo em relação a diversos agentes terapêuticos. Provavelmente, o polimorfismo mais promissor nesse sentido é o polimorfismo de aminoácido único PLA^1/PLA^2, que ocorre junto ao complexo receptor GP IIb/IIIa. A presença do alelo PLA^2, expresso tanto em homozigose quanto em heterozigose, parece ser capaz de reduzir a dose necessária para obtenção de um grau de inibição plaquetária comparável àquele promovido por vários agentes antiplaqueta, entre os quais a aspirina e o antagonista de GP IIb/IIIa abciximab (Michelson, 2000).

Com o uso rotineiro dos antagonistas de GP IIb/IIIa na PTCA e em outros procedimentos invasivos, tem se reconhecido cada vez mais que a trombocitopenia pode complicar a administração desse fármaco (Abrams, 2004). Em alguns casos, essa queda na contagem de plaquetas parece ser devida à ocorrência de uma interação imediata entre o fármaco e as plaquetas, possivelmente causada por anticorpos pré-formados fármaco-dependentes (Aster, 2004). Em outros casos, o curso temporal da trombocitopenia sugere o desenvolvimento de anticorpos contra o próprio fármaco ou dirigidos a um neoepítopo formado pela ligação do fármaco ao seu alvo plaquetário (Curtis, 2002, 2004; Nurden, 2004). Embora seja difícil estabelecer essa etiologia fármaco-dependente utilizando métodos laboratoriais, podendo às vezes comprovar que se trata de algo simplesmente indefinível, as metodologias empregadas na atualidade para avaliar essas trombocitopenias adquiridas incluem citometria de fluxo, imobilização de antígenos plaquetários com anticorpo monoclonal específico (MAIPA, *monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*) e técnicas correlatas (Cap. 39).

Apêndice: diretrizes pré-analíticas do Clinical and Laboratory Standards Institute

- O sangue deve ser coletado diretamente no tubo contendo anticoagulante. O sangue pode ser extraído com auxílio de um dispositivo de acesso vascular, desde que este seja lavado com jatos de salina e seja descartado o equivalente a seis volumes de espaço morto do dispositivo.
- Em uma extração direta, o tempo de protrombina (PT) e o tempo parcial de tromboplastina (PTT) não são afetados se o primeiro tubo for testado. Recomenda-se evitar a coleta de sangue utilizando-se linhas previamente tratadas com jatos de heparina.
- O sangue deve ser transferido em 1 minuto para um tubo contendo anticoagulante bem homogeneizado, invertendo-se o tubo pelo menos quatro vezes. Não agitar o tubo vigorosamente.
- Como anticoagulante, deve ser utilizado citrato de trissódio a 3,2%. Adotar a proporção de 9 partes de sangue para 1 parte de citrato.
- Amostras inadequadamente preenchidas ou coaguladas devem ser descartadas.
- A amostra deve ser centrifugada e conter baixa concentração de plaquetas (definida como sendo inferior a 10×10^9/L.
- Amostras hemolisadas são descartadas.
- Amostras ictéricas ou lipêmicas devem ser analisadas empregando-se um método mecânico para detecção de coagulação.

Armazenamento das amostras

- As determinações de PT podem ser mantidas a 18-24°C, seja em plasma separado ou em células centrifugadas, e testadas dentro de 24 horas. A ativação a frio do fator VII pode ocorrer a 2-4°C.
- Amostras de rotina heparinizadas podem ser mantidas, centrifugadas ou não, em um tubo fechado e com as células a 18-24°C, sendo testadas dentro de um período de 24 horas. Amostras tratadas com heparina não fracionada (HNF) devem ser centrifugadas até 1 hora após a coleta, sendo que o plasma deve ser testado dentro de um período de 4 horas.
- Caso o teste não seja realizado dentro de 24 horas para avaliação do PT, ou dentro de 4 horas para avaliação do PTT, o plasma deve ser removido e congelado a -20°C para ser testado em até 2 semanas, ou armazenado a -70°C para ser testado em até 4 semanas. Essas amostras congeladas devem ser rapidamente descongeladas por meio de uma suave homogeneização a 37°C, para serem ensaiadas imediatamente. Elas podem ser mantidas a 4°C e ensaiadas dentro de 4 horas.

Controle de qualidade

- O programa de controle de qualidade deve contar um grupo de pares para a realização de comparações. O laboratório deve participar de uma pesquisa de proficiência. As amostras destinadas a tal pesquisa devem ser analisadas do mesmo modo que as amostras de pacientes.

Referências bibliográficas

Abrams CS, Cines DB: Thrombocytopenia after treatment with platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. Curr Hematol Rep 2004; 3:143–147.

Adcock DM, Johnston M: Evaluation of frozen plasma calibrants for enhanced standardization of the international normalized ratio (INR): a multi-center study. Thromb Haemost 2002; 87: 74–79.

Adcock DM, Koftan C, Crisan D, et al: Effect of plemorphisms of the cytochrome P450 CYP2C9 gene on warfarin anticoagulation. Arch Pathol Lab Med 2004; 128:1360–1363.

Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, et al: Presence of interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. Blood 1996; 88: 410–416.

Anderson JA, Saenko EL: Heparin resistance. Br J Anaesth 2002; 88:467–469.

Ansell J, Hirsh J, Poller L, et al: The pharmacology and management of the vitamin K antagonists. Chest 2004; 126: 204S–233S.

Excelente revisão abrangente sobre a terapia anticoagulante.

Aster RH, Curtis BR, Bougie DW: Thrombocytopenia resulting from sensitivity to GPIIb-IIIa inhibitors. Semin Thromb Hemost 2004; 30:569–577.

Revisão importante sobre trombocitopenia recentemente identificada, secundária à terapia antiplaquetária.

Bates SM, Greer IA, Hirsh J, et al: Use of antithrombotic agents during pregnancy. Chest 2004; 126: 627S–644S.

Bates SM, Weitz JI: New anticoagulants: beyond heparin, low-molecular-weight heparin and warfarin. Br J Pharmacol 2005; 144:1017–1028.

Revisão atual sobre os agentes antitrombóticos mais novos.

Bharadwaj J, Jayaraman C, Shrivastava R: Heparin resistance. Lab Hematol 2003; 9: 125–131.

Boneu B, de MP: How and when to monitor a patient treated with low molecular weight heparin. Semin Thromb Hemost 2001; 27:519–522.

Bongiorno RA, Nutescu EA: Generic warfarin: implications for clinical practice and perceptions of anticoagulation providers. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 619–626.

Bounameaux H, de Moerloose P: Is laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy necessary? No. J Thromb Haemost 2004; 2:551–554.

Bussey H, Francis JH, Heparin Consensus Group: Heparin overview and issues. Pharmacotherapy 2004; 24:1035–1075.

Call JT, Deliargyris EN, Sane DC: Direct thrombin inhibitors in the treatment of immune-mediated heparin-

induced thrombocytopenia. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 297–304.
Carlsson SC, Mattsson C, Eriksson UG, et al: A review of the effects of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran on coagulation assays. Thromb Res 2005; 115: 9–18.
Catella F, Healy D, Lawson JA: 11-Dehydrothromboxane B2: a quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:5861–5865.
Cowan JF, Khan MB, Vargo J, et al: An improved method for evaluation of blood coagulation in heparinized blood. Am J Clin Pathol 1981; 85: 60–64.
Craft JA, Masci PP, Roberts MS: Increased platelet-derived microparticles in the coronary circulation of percutaneous transluminal coronary angioplasty patients. Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15:475–482.
Cunningham MT, Johnson GF, Pennell BJ, et al: The reliability of manufacturer-determined, instrument-specific international sensitivity index values for calculating the international normalized ratio. Am J Clin Pathol 1994; 102:128–133.
Curtis BR, Divgi A, Garritty M: Delayed thrombocytopenia after treatment with abciximab: a distinct clinical entity associated with the immune response to the drug. J Thromb Haemost 2004; 2:985–992.
Curtis BR, Swyers J, Divgi A: Thrombocytopenia after second exposure to abciximab is caused by antibodies that recognize abciximab-coated platelets. Blood 2002; 99:2054–2059.
Edson JR, Krivit W, White JG: Kaolin partial thromboplastin time: high levels of procoagulants producing short clotting times or masking deficiencies of other procoagulants or low concentrations of anticoagulants. J Lab Clin Med 1967; 70: 463–470.
Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI: Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. Circulation 2002; 105:1650–1655.
Fenyvesi T, Jorg I, Harenberg J: Monitoring of anticoagulant effects of direct thrombin inhibitors. Semin Thromb Hemost 2002; 28:361–368.
Francis CW, Berkowitz SD, Comp PC, et al: Comparison of ximelagatran with warfarin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement. N Engl J Med 2003; 349: 1703–1712.
Francis JL: A critical evaluation of assays for detecting antibodies to the heparin–PF4 complex. Semin Thromb Hemost 2004b; 30: 359–368.
Francis JL, Groce JB III: Challenges in variation and responsiveness of unfractionated heparin. Pharmacotherapy, 2004a; 24: 108S–119.
Greinacher A, Potzsch B, Amiral J, et al: Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4–heparin complex as the major antigen. Thromb Haemost 1994; 71: 247–251.
Griffin JH, Zlokovic B, Fernandez JA: Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke. Semin Hematol 2002; 39:197–205.
Gustafsson D, Nystrom J, Carlsson S, et al: The direct thrombin inhibitor melegatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. Thromb Res 2001; 3:171–181.
Harenberg J: Is laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy necessary? Yes. J Thromb Haemostas 2004; 2: 547–550.
Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P: Use of the PFA-100 apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. Thromb Haemost 2000; 83:540–544.
Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, et al: Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation outcomes during warfarin therapy. JAMA 2002; 287: 1690–1698.
Hirsh J, Guyatt G, Albers GW, et al: The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy, evidence based guidelines. Chest 2004a; 126: 172S–178S.
Hirsh J, O'Donnell M, Weitz JI: New anticoagulants. Blood 2005; 105: 453–463.
Hirsh J, Raschke R: Heparin and low-molecular-weight heparin. Chest 2004b; 126: 188S–203S.
Hoppensteadt DA, Kahn S, Fareed J: Factor X values as a means to assess the extent of oral anticoagulation in patients receiving antithrombin drugs. Clin Chem 1997; 43: 1786–1788.
Horne MK III: Nonimmune heparin–platelet interactions: implications for the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *In* Warkentin TE, Greinacher A (eds): Induced Thrombocytopenia, 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 2001, pp 123–136.
Hull RD, Rasko GE, Brant RF, et al: Relation between the time to achieve the lower limit of the APTT therapeutic range and recurrent venous thromboembolism during heparin treatment for deep vein thrombosis. Arch Intern Med 1997; 157: 2562–2568.
Hutt ED, Kingdon HS: Use of heparinase to eliminate heparins inhibition in rowtime coagulation assays. J Lab Clin Med 1972; 79: 1027–1034.
Kessler CM: Current and future challenges of antithrombotic agents and anticoagulants: strategies for reversal of hemorrhagic complications. Semin Hematol 2004; 41: 44–50.
Kolde H: Haemostasis, 2nd ed. Basel, Pentapharm Ltd, 2004.
Lee DH, Warkentin TE: Frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *In* Warkentin TE, Greinacher A (eds): Induced Thrombocytopenia, 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 2001, pp 87–121.
Liaw PC, Esmon CT, Kahnamoui K: Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. Blood 2004; 104:3958–3964.
Linder MW, Looney S, Adams, et al: Warfarin dose adjustments based upon CYP2C9 genetic polymorphisms. J Thromb Thrombolysis 2002; 14: 227–232.
Lombardi R, Chantarangkul V, Cattaneo M, et al: Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio. Thromb Res 2003; 111: 281–284.
Mammen EF: Current development in antithrombotic therapy. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 605–607.
Martin DP, Schroeder TL, Levy ML: Vascular purpura and diseases of blood vessels. *In* Loscalzo J, Schafer AI (eds): Thrombosis and Hemorrhage, 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1998, pp 945–961.
Mason PJ, Freedman JE, Jacobs AK: Aspirin resistance: current concepts. Rev Cardiovasc Med 2004; 5:156–163.
Matzdorff AC, Kuhnel G, Kemkes-Matthes B: Comparison of GP IIB/IIIA inhibitors and their activity as measured by aggregometry, flow cytometry, single platelet counting, and the rapid platelet function analyzer. J Thromb Thrombolysis 2001; 12:129–139.
Merry AF: Bivalirudin, blood loss and graft patency in coronary artery bypass surgery.Semin Thromb Hemost 2004; 30:337–346.
Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P: Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. Circulation 2000; 101:1013–1018.
Moll S, Ortel TL: Monitoring warfarin therapy in patients with lupus anticoagulants. Ann Intern Med 1997; 127: 177–185.
National Committee for Clinical Laboratory Standards: Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays; approved guideline H21-A3, 3rd ed. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998, p. 18:20.
Excelente fonte de informação detalhada sobre as diretrizes para o teste de coagulação.
National Committee for Clinical Laboratory Standards: Point-of-care monitoring of anticoagulation therapy; approved guideline H49-A. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004, p. 24:23.
Newman RS, Fagin AR: Heparin contamination in coagulation testing and a protocol to avoid it and the risk of inappropriate FFP transfusion. Am J Clin Pathol 1995; 104: 447–449.
Nowak G: Clinical monitoring of hirudin and direct thrombin inhibitors. Semin Thromb Hemost 2001; 27: 537–541.
Ng VL, Levin J, Corash L, et al: Failure of the International Normalized Ratio to generate consistent results within a local medical community. Am J Clin Path 1993; 99:689–694.
Nugent MA: Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:10301–10303.
Nurden P, Clofent-Sanchez G, Jais C: Delayed immunologic thrombocytopenia induced by abciximab. Thromb Haemost 2004; 92:820–828.
Nutescu EA: Point of care monitors for oral anticoagulant therapy. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 697–702.
Olson JD: How to validate heparin sensitivity of the aPTT. CAP Today 2004; 18: 72–78.
Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, et al: Laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. Arch Pathol Lab Med 1998; 122: 782–798.
Pettila V, Leinonem P, Markkola A, et al: Postpartum bone mineral density in women treated for thromboprophylaxis with unfractionated heparin or LMW heparin. Thromb Haemost 2002; 87: 182–186.
Poller L: International normalized ratios (INR): the first 20 years. J Thromb Haemost 2004; 2:849–860.
Poller L, Hirsh J: Oral anticoagualants. New York, Oxford University Press, 1996.
Rauova L, Poncz M, McKenzie SE, et al: Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. Blood 2005; 105: 131–138.
Fornece hipóteses sobre os mecanismos subjacentes à TIH, no que se refere às estruturas da heparina e do PF4.
Rosborough TK, Shepherd MF: Unreliability of international normalized ratio for monitoring warfarin therapy in patients with lupus anticoagulant. Pharmacotherapy 2004; 24: 838–842.
Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, et al: Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. J Clin Invest 1980; 65: 64–73.
Sanderson S, Emery J, Baglin T: Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications. Ann Intern Med 2005; 142:370–380.
Schenk JF, Pindur G, Stephan B, et al: On the prophylactic and therapeutic use of danaparoid sodium (Orgaran) in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Clin Appl Thromb Hemost 2003; 9: 25–32.
Schulman S, Hellgren-Wangdahl M: Pregnancy, heparin and osteoporosis. Thromb Haemost 2002; 87: 180–181.
Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM: Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. Circulation 1999; 99:620–625.
Sunderji R, Gin K, Shalansky K, et al: Clinical impact of point-of-care vs laboratory measurement of anticoagulation. Am J Clin Pathol 2005; 123: 184–188.
Thompson AR, Counts RB: Removal of heparin and protamine from plasma. J Lab Clin Med 1976; 88: 922–929.
Tobu M, Iqbal O, Hoppensteadt D, et al: Anti-Xa and anti-IIa drugs alter international normalized ratio measurements: Potential problems in the monitoring of oral anticoagulants. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis 2004; 10: 301–309.
Van den Besselaar AMHP, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Reveillard LL, et al: Guidelines on preparation, certification, and use of plasmas for ISI calibration and INR determination. J Thromb Haemost 2004; 2: 1946–1953.
Van den Besselaar AMHP, Sturk A, Reijnierse GLA: Monitoring of unfractionated heparin with the activated partial thromboplastin time: determination of therapeutic ranges. Thromb Res 2002; 107: 235–240.
Van der Velde EA, Poller L: The APTT monitoring of heparin – the ISTH/ICSH collaborative study. Thromb Haemost 1995; 73: 73–81.
Walenga JM, Hoppensteadt DA: Monitoring the new an-

tithrombotic drugs. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 683–695.
Wallin R, Hutson SM: Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Trends Mol Med 2004; 10:299–302.
Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D: Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay – ASA. Am J Cardiol 2003; 92:1492–1494.
Warkentin TE: An overview of the heparin-induced thrombocytopenia syndrome. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 273–283.
Warkentin TE, Elavathel LJ, Hayward CPM, et al: The pathogenesis of venous limb gangrene associated with heparin-induced thrombocytopenia. Ann Intern Med 1997; 127: 804–812.
Warkentin TE, Greinacher A: Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. *In* Warkentin TE, Greinacher A (eds): Induced Thrombocytopenia, 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 2001, pp 231–269.
Este capítulo, assim como o próprio livro inteiro, fornece uma abordagem inusitadamente abrangente e útil ao diagnóstico da TIH.
Weitz JL, Bates SM: New anticoagulants. J Thromb Haemost 2005; 3:1843–1853.

PARTE VI

Imunologia e imunopatologia

Editado por

H. Davis Massey MD PhD, Richard A. McPherson MD

CAPÍTULO 42

Visão geral do sistema imune e distúrbios imunológicos

Richard A. McPherson MD, Davis Massey MD PhD

Células linfoides 907
- Linfócitos T 907
- Linfócitos B 908
- Células apresentadoras de antígeno 908
- Células *natural killer* 909

Células não linfoides 909
- Neutrófilos e eosinófilos 909
- Basófilos e mastócitos 909

Fatores humorais 909
- Imunoglobulinas 909
- Complemento 909
- Citocinas 909

Antígenos de histocompatibilidade 909

Mecanismos de lesão imunológica 910

Aplicações laboratoriais da avaliação imunológica 910

Referências bibliográficas 910

PONTOS-CHAVE

- O sistema imune é constituído pelos componentes celular e humoral, que defendem o corpo contra microrganismos invasores. A deficiência de fatores individuais do sistema imune pode tornar um indivíduo suscetível a diferentes infecções.
- As células linfoides do sistema imune são as células T, que atacam diretamente os antígenos estranhos, e as células B, sintetizadoras de imunoglobulinas que se combinam a tais antígenos. As células apresentadoras de antígeno são cruciais para a comunicação célula-célula que direciona as respostas imunes.
- Os mecanismos pelos quais os linfócitos se diferenciam em células T e B envolvem o rearranjo de genes codificadores do receptor de antígeno da célula T, e dos genes das imunoglobulinas, respectivamente.
- Os linfócitos presentes em amostras obtidas de pacientes são caracterizados pela detecção de proteínas de superfície – os marcadores de grupo de diferenciação (CD, *cluster of differentiation*) – que designam o subconjunto e a função.
- Os elementos celulares adicionais são os linfócitos *natural killer*, além de neutrófilos, eosinófilos e efetores da hipersensibilidade mediada pela IgE – basófilos e mastócitos.
- Além das imunoglobulinas ou anticorpos, os demais elementos humorais incluem uma série de proteínas que atuam em cascata no sistema complemento, promovendo a destruição enzimática de células estranhas e o recrutamento de infiltrados celulares mediado pela ação de citocinas.
- Os antígenos de histocompatibilidade exercem papel essencial na apresentação de antígenos às células T e também compõem a identidade imunológica de um indivíduo, a qual é importante na rejeição de órgãos transplantados.
- Lesões imunológicas podem ocorrer como resultado de uma resposta excessiva a exposições antigênicas específicas, como ocorre nas alergias ou na presença de imunocomplexos circulantes.
- As doenças autoimunes são produzidas diante da falha dos mecanismos responsáveis pela manutenção da tolerância imunológica aos antígenos próprios (autoantígenos), com consequente formação de vários anticorpos somada à ativação do sistema imune celular contra os próprios tecidos do paciente.
- As medidas laboratoriais relacionadas ao sistema imune envolvem técnicas relativamente simples para contagem de linfócitos e respectivos subgrupos, bem como para quantificar as concentrações totais de imunoglobulinas e proteínas do complemento. Métodos mais complexos, como a detecção de rearranjos genéticos, caraterização de autoanticorpos e reatividade da IgE a alérgenos, são úteis para o diagnóstico de numerosos distúrbios que afetam o sistema imune.

O sistema imune está estruturado para reconhecer, responder e destruir uma ampla variedade de organismos invasores, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, que, de outro modo, causariam infecções prejudiciais ao corpo. A descoberta dos componentes do sistema imune frequentemente sucedeu investigações acerca de infecções sérias e reações específicas produzidas pelo corpo para combater organismos patológicos. Em geral, essa função imunológica pode ser resumida como sendo uma busca por antígenos estranhos (ou não próprios), que não pertencem ao corpo, para destruí-los em seguida. Nesse processo, o sistema imune também se mantém vigilante quanto ao aparecimento de antígenos novos ou estranhos presentes em células tumorais, bem como empreende tentativas no sentido de destruí-los sem danificar os antígenos normais (ou próprios) nas células sadias. Estados doentios podem surgir como resultado de vários aspectos de uma função imunológica corrompida. Esses estados incluem reações de hipersensibilidade, doença autoimune, vários distúrbios que envolvem imunodeficiências, além de doença do enxerto *versus* hospedeiro e rejeição de transplantes de órgãos/tecidos alogênicos. A questão sobre tolerância à transplantação permanece. Essa revisão geral enfoca os componentes do sistema imune e suas funções, além de alguns distúrbios clínicos da imunidade significativos.

Células linfoides

As células linfoides do corpo são encontradas nos linfonodos, baço, superfícies mucosas e circulação sanguínea. São células derivadas das células-tronco hematopoéticas multipotentes, cuja produção se desloca progressivamente do saco vitelino embrionário para o fígado fetal e, em seguida, para a medula óssea no recém-nascido e em todas as fases da idade adulta (Weissman, 1994). As várias células linfoides são convenientemente identificadas pela presença de marcadores proteicos exclusivos presentes em suas superfícies, os quais também lhes conferem funções particulares.

Linfócitos T

Os linfócitos T sofrem diferenciação no timo. Após serem originados na medula óssea, deslocam-se do córtex para a medula tímica e, durante esse período, sofrem maturação. Esse processo envolve uma seleção, em que as células autorreativas são eliminadas enquanto as demais células retidas são aquelas capazes de reconhecer antígenos pelas interações com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *main histocompatibility complex*) (Nossal, 1994; von Boehmer, 1994). Os linfócitos T representam 60 a 70% dos linfócitos presentes no sangue e também são encontrados em áreas paracorticais dos linfonodos e junto às bainhas periarteriolares esplênicas. Durante a maturação, passam por uma programação genética em que

o gene codificador do receptor de antígenos da célula T (*TCR*) é rearranjado para produzir uma proteína-receptor de especificidade antigênica invariável, que garante não só sua sobrevida como a de todas as suas células descendentes.

A maioria (> 95%) dos linfócitos T possui receptores para antígenos, constituídos de subunidades α e β unidas por pontes dissulfeto para formar um heterodímero molecular. Esse heterodímero está localizado na membrana celular externa, associado ao complexo molecular CD3 (o CD3 é um marcador universal de células T). As subunidades α e β das proteínas TCR apresentam regiões variáveis, de ligação e constantes (a subunidade α também contém uma região de diversidade), as quais estão associadas a regiões codificadoras correspondentes no gene *TCR*. Esse gene sofre um rearranjo que resulta em alta especificidade de ligação a um dado antígeno em particular. As proteínas CD3 auxiliam a transdução de sinal que ocorre no meio intracelular quando o antígeno se liga ao TCR na superfície do linfócito (Janeway, 1994; Weiss, 1994). Um pequeno percentual dos linfócitos T apresenta TCR composto por subunidades γ e δ, que interagem de modo semelhante com o CD3. Essas células são encontradas em geral nas superfícies mucosas dos tratos gastrintestinal e respiratório. As proliferações de células T podem ser caracterizadas como neoplásicas (clonais) ou benignas (policlonais), conforme o DNA mostre respectivamente a predominância de uma única forma de rearranjo do gene *TCR* ou um espectro completo de tais rearranjos, a exemplo do que ocorre em condições normais na população de linfócitos heterogênea.

O exame dos linfócitos T por citometria de fluxo emprega uma variedade de marcadores de superfície. O CD4 é encontrado em cerca de 60% das células $CD3^+$, as quais são células T auxiliares/indutoras que regulam a função de outras células do sistema imune pela secreção de citocinas estimuladoras de diversas funções. Existem duas subpopulações distintas de células auxiliares (*helper*) $CD4^+$: Th1 (secretora de interleucina [IL]-2 e interferon [IFN]-γ) e Th2 (secretoras de IL-4 e IL-5. As células Th1 favorecem as atividades desempenhadas pelos macrófagos (p. ex., hipersensibilidade) e a produção de anticorpos com ação opsonizante. As células Th2 dirigem a síntese de outros anticorpos. O marcador CD8 é encontrado em cerca de 30% das células T (portanto, a proporção normal de células $CD4^+/CD8^+$ no sangue é tipicamente 2:1). Essas células T $CD8^+$ apresentam atividade citotóxica e supressora sobre a resposta imune.

O mecanismo de reconhecimento antigênico é diferente entre os dois subconjuntos de linfócitos T. As moléculas CD4 se ligam a moléculas do MHC de classe II expressas nas células apresentadoras de antígeno, enquanto as moléculas CD8 interagem com moléculas do MHC de classe I. Do mesmo modo, as células $CD4^+$ reconhecem somente antígenos apresentados no contexto antigênico do MHC de classe II, enquanto as células $CD8^+$ reconhecem tais antígenos somente quando apresentados no contexto antigênico do MHC de classe I.

Linfócitos B

Os linfócitos B representam cerca de 10 a 20% dos linfócitos periféricos presentes no sangue, sendo também encontrados na medula óssea, linfonodos, baço e outros tecidos linfáticos. No baço e nos linfonodos, essas células se agregam em folículos linfoides. A diferenciação dos linfócitos B ocorre na medula óssea, onde acontecem as seleções positiva e negativa, bem como em áreas periféricas. A estimulação antigênica das células B leva à formação de plasmócitos secretores de imunoglobulinas, como base da imunidade humoral. O complexo célula B-antígeno-receptor utiliza a imunoglobulina (Ig) M como componente de ligação ao antígeno. A especificidade antigênica das Igs deriva do processo de rearranjo em que há realinhamento dos genes codificadores das cadeias leve e pesada. A cadeia pesada apresenta as regiões variáveis, de diversidade, de ligação e constantes. A maturação de uma resposta baseada em anticorpos implica na troca da IgM por outro tipo de cadeia pesada (usualmente IgG), em decorrência de um novo rearranjo genético, embora o tipo de cadeia leve da célula B permaneça fixo (Corcoran, 2005).

As células B também possuem receptores de superfície para moléculas de complemento (CD21, que também atua como receptor do vírus Epstein-Barr [EBV] e, assim, torna essas células suscetíveis à infecção pelo vírus) e para a porção Fc das Igs. Há ainda CD19 e CD20, que são utilizados com frequência para identificação de células B.

Células apresentadoras de antígeno

Os macrófagos atuam como fagócitos mononucleares na inflamação, além de processarem antígenos ingeridos e apresentá-los associados a moléculas do MHC em suas membranas (Fig. 42.1). As células T não são ativadas por antígenos solúveis, de modo que é necessário apresentar o antígeno dessa forma para estimular as células T e induzir imunidade mediada por células (Germain, 1994; Trombetta, 2005). Os macrófagos também secretam citocinas (p. ex., IL-1), que modulam processos inflamatórios, além de poderem fazer diretamen-

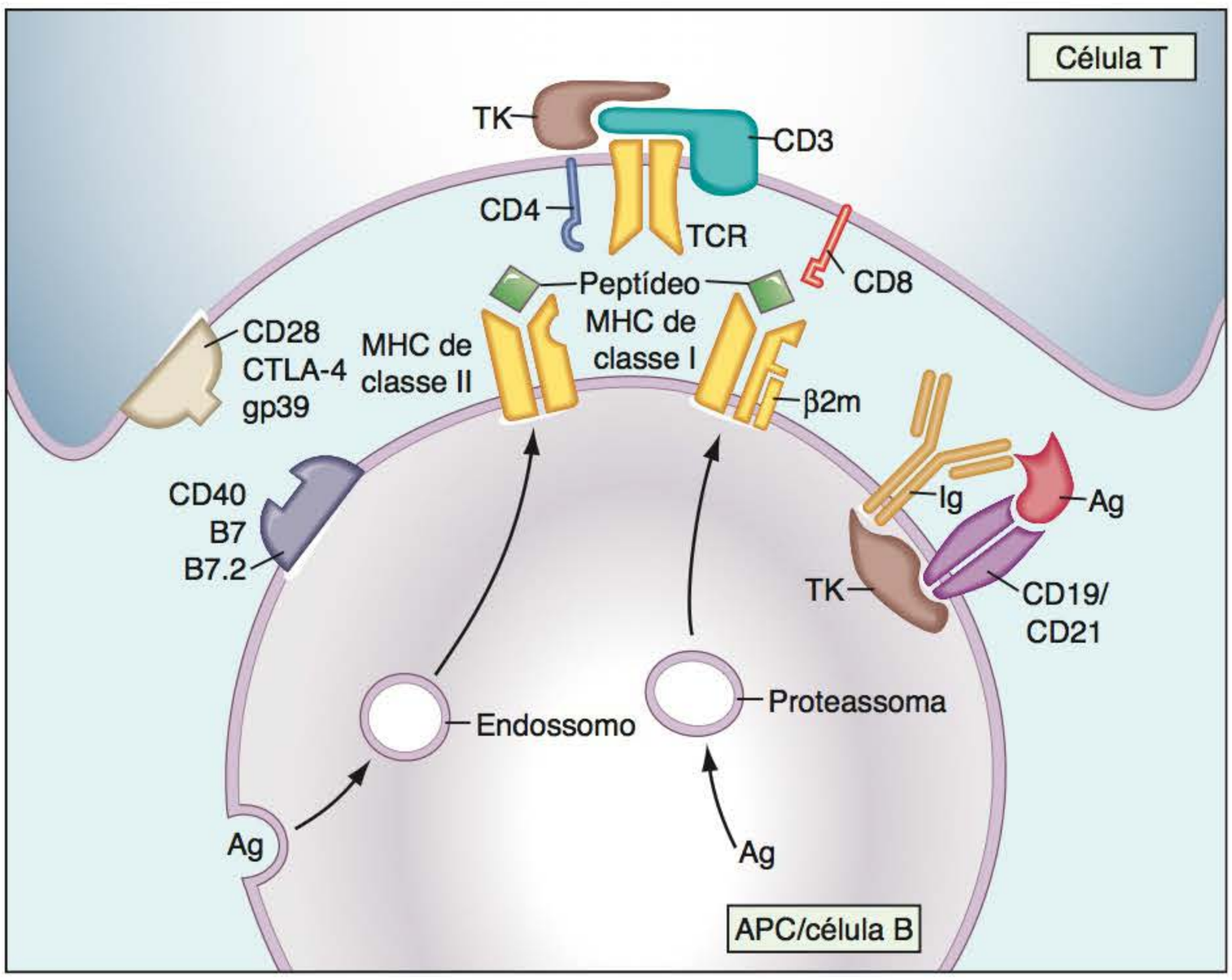


Figura 42.1 Interações celulares no sistema imune. As células apresentadoras de antígeno (APC) processam antígenos (Ag) externos ou internos e apresentam fragmentos de peptídeos antigênicos, associados a uma molécula de MHC, para as células T. Na célula T, um receptor para antígenos específico (TCR), aliado à molécula de correceptor CD4 ou CD8, reconhece o complexo antígeno-MHC. Ocorre ativação celular mediada pelo complexo CD3 e ativação de tirosinas quinases (TKs). O receptor da célula B é constituído por uma Ig ligada à membrana e complexada a proteínas associadas à membrana, bem como um correceptor CD19/21. Durante o reconhecimento do antígeno, as TKs celulares também são ativadas. A ativação coestimulatória das células T ou B é promovida pela ligação dos receptores celulares a seus respectivos ligantes (moléculas B7 ou B7.2 ligantes para coestimulação de células T via CD28 e CTLA-4; e gp39 ligante para a molécula CD40 das células B). (Redesenhado com permissão de Paul W, Seder R: Lymphocytic responses and cytokines. Cell 1994; 76:229 e Weiss A, Littman D: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 1994; 76:263.)

te a lise das células tumorais ao realizar a imunovigilância. Os macrófagos também são células efetoras de certos tipos de imunidade celular (p. ex., hipersensibilidade tardia).

As células dendríticas (encontradas nos tecidos linfoides e na região intersticial de outros órgãos) e as células de Langerhans (encontradas na epiderme) apresentam extensos prolongamentos citoplasmáticos dendríticos, os quais são ricos em moléculas do MHC de classe II. Em consequência disso, são células bastante eficazes na apresentação antigênica (embora provavelmente não sejam fagócitos), sendo consideradas de extrema importância na realização dessa tarefa em todo o sistema imune (Park, 2005).

Células *natural killer*

As células *natural killer* (NK, assassinas naturais) constituem 10 a 15% dos linfócitos presentes no sangue periférico. Não são células T nem B, e antigamente eram denominadas "células nulas". As células NK têm a função de realizar a lise de outras células na ausência de sensibilização prévia. Atacam células tumorais, células infectadas por vírus, entre outras. Em consequência, constituem a linha de defesa inicial contra a presença de células aberrantes. As células NK são caracterizadas pela presença de marcadores de superfície – CD16 e CD56 –, que são comumente utilizados para identificar essas células. O CD16 é o receptor para Fc da IgG e, assim, as células NK são capazes de fazer a lise seletivamente de células recobertas com anticorpos (citotoxicidade celular dependente de anticorpos [ADCC, *antibody-dependent cell-mediated*], que é importante em algumas reações de hipersensibilidade). As células NK também secretam citocinas, como IFN-γ. Notavelmente, essas células são reconhecíveis ao exame padrão de esfregaços de sangue corados, com linfócitos grandes granulares (Kronenberg, 2005).

Células não linfoides

Trata-se de células sem programação genética para reconhecimento de antígenos específicos ou para interagir com células linfoides na indução de uma resposta imune. Em vez disso, atuam como células efetoras nas reações imunes desencadeadas por fatores diversos.

Neutrófilos e eosinófilos

Os neutrófilos são atraídos para áreas de inflamação por agentes quimiotáticos. Em seguida, a partir de seus grânulos são liberadas substâncias tóxicas e enzimas que digerem estruturas celulares de forma indiscriminada. Neutrófilos e eosinófilos também ingerem *debris* celulares, removendo-os dos sítios teciduais.

Basófilos e mastócitos

Os basófilos (e as células correlatas presentes nos tecidos – os mastócitos) apresentam na própria superfície receptores que ligam IgE. Sua captação nas membranas de basófilos parece ser inespecífica ao antígeno reconhecido por ela. Em vez disso, essa captação é dirigida por uma ação em massa que ocorre entre a quantidade de IgE total e o número de basófilos disponíveis. Quando o antígeno (ou alérgeno) entra em contato com a IgE que o reconhece na superfície dos basófilos, estes se tornam ativados e liberam substâncias como a histamina que mediam certo grau de hipersensibilidade. Desse modo, a especificidade do basófilo é dirigida particularmente pela IgE ligada a sua superfície, a partir do sangue. Teoricamente, um basófilo pode apresentar múltiplas moléculas de IgE diferentes em sua superfície e, por esse motivo, seria capaz de reagir contra inúmeros alérgenos distintos.

Fatores humorais

Imunoglobulinas

Moléculas de anticorpos podem se ligar à superfície de células B para estimular a secreção de mais imunoglobulinas. Os anticorpos também circulam no sangue e são encontrados nas superfícies mucosas dos tratos respiratório e gastrintestinal, nas quais é provável que entrem em contato com microrganismos potencialmente patogênicos. As principais imunoglobulinas presentes no sangue são IgM, IgG e IgA. Provavelmente, esses anticorpos aparecem após a exposição a uma variedade de antígenos estranhos, podendo permanecer no corpo durante anos mediante uma secreção contínua que repõe as moléculas perdidas na depuração normal das proteínas circulantes. Nas superfícies mucosas, o tipo primário de anticorpos é a IgA, que apresenta uma forma dimérica especial resultante da secreção nesse sítio (Fagarasan, 2004) (Cap. 46). As demais imunoglobulinas são IgD (que reside na superfície das células B, na qual pode estar envolvida na transdução de sinal imune, contudo não atinge concentrações substanciais como molécula livre no sangue) e IgE (atua pela ligação à superfícies de basófilos e as estimula a liberar substâncias vasoativas na presença de alérgenos específicos).

As imunoglobulinas presentes no sangue atuam por meio da ligação aos antígenos expostos na superfície de células estranhas, bactérias, vírus, entre outros, bem como facilitando a destruição destes pelos mecanismos efetores inespecíficos, como a ativação do complemento e das células NK. O monitoramento de doenças com a utilização de testes baseados em imunoglobulinas consiste em realizar uma análise qualitativa para detecção clonal *versus* policlonal (p. ex., para diagnóstico de mieloma múltiplo), além de uma análise quantitativa. Essa análise quantitativa visa determinar as concentrações totais de IgM, IgG e IgA (para detectar possíveis deficiências seletivas ou combinadas, ou superprodução de classes de imunoglobulinas), bem como os títulos de anticorpos específicos para antígenos individuais (p. ex., iso-hemaglutininas, pneumococos, *Haemophilus*, tétano, difteria e outros microrganismos).

Complemento

Esse conjunto de proteínas interativas tem como papel promover a destruição enzimática de certos alvos (p. ex., células, bactérias) contra os quais são dirigidos pela ação de anticorpos ou por outros meios (Cap. 47). As quantificações de componentes do complemento apresentam duas utilidades principais para o diagnóstico clínico: detectar deficiências congênitas (relativamente raras) predisponentes a alguns distúrbios, como infecções ou progressão para doenças autoimunes, e detectar reduções adquiridas que reflitam a atividade real de doenças autoimunes sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (Wen, 2004).

Citocinas

Essas substâncias solúveis constituem o meio de regulação das respostas imunes celulares. São mediadores de ação de curta duração, elaborados por algumas células e difundidos àquelas em que atuam (Leonard, 2003). Muitas citocinas são pleiotrópicas, ou seja, atuam em diferentes tipos celulares. Podem atuar de forma endócrina (estimulando as células à distância), parácrina (afetando células imediatamente vizinhas) e autócrina (atuando nas mesmas células que as produzem). As ações específicas das citocinas incluem: hematopoiese por ação de fatores estimuladores de colônias (CSFs) indutores da produção de granulócitos e macrófagos; resposta imune natural (por meio da IL-1, fator de necrose tumoral [TNF]-α, interferons e IL-8); estimulação da proliferação e ativação de linfócitos (por ação da IL-2, entre outras); e ativação de células inflamatórias inespecíficas (Cap. 47). Novas citocinas continuam sendo descobertas, à medida que emergem mais detalhes relacionados à comunicação célula-célula.

O uso clínico das citocinas inclui tanto a supressão da resposta imune na transplantação alogênica de órgãos (pela ação de fármacos como a ciclosporina, que bloqueia a produção da IL-2) como a intensificação dessa resposta nas terapias contra o câncer ou infecções. Nesse último caso, o uso das citocinas ainda é principalmente experimental, embora tenha sido demonstrado que o pré-tratamento com anticorpos contra TNF-α seja capaz de prevenir reações deletérias de Jarisch-Herxheimer, produzidas pelo tratamento com antibióticos de ovelhas infectadas por *Borrelia recurrentis* (Fekade, 1996). É bastante provável que esse modelo prenuncie uma variedade de terapias novas pelas quais as respostas imunes possam ser seletivamente intensificadas ou suprimidas, de acordo com as necessidades clínicas em particular.

Antígenos de histocompatibilidade

O MHC (também denominado complexo de antígenos leucocitários humanos – HLA, *human leukocyte antigen complex*) é codificado no cromossomo 6 humano e inclui as moléculas de classe I (HLA A, B

e C), moléculas de classe II (HLA DP, DQ e DR) e moléculas de classe III interventoras de alguns componentes do complemento, TNF-α e TNF-β (Cap. 48). As funções dos antígenos de classes I e II já foram discutidas de forma resumida, no que se refere ao modo como se dá sua participação na apresentação de antígenos para as células T. Tais antígenos foram descobertos, e sua natureza altamente polimórfica foi descrita em estudos sobre tolerância imune e rejeição de órgãos alogênicos transplantados. Por conseguinte, um dos usos clínicos mais importantes da tipagem HLA é a compatibilização entre potenciais doadores de órgãos ou tecidos com receptores que necessitam de transplante. Outra aplicação clínica significativa consiste na tipagem de pacientes afetados e seus familiares, com o objetivo de estabelecer o risco que esses indivíduos apresentam de desenvolver certas doenças associadas a tipos particulares de HLA (p. ex., espondilite anquilosante com HLA B27) (Cap. 49). Ainda, outro uso da tipagem HLA é o fornecimento de plaquetas compatibilizadas para pacientes que tenham se tornado refratários a transfusões plaquetárias, em decorrência da formação de anticorpos após a exposição a produtos oriundos de múltiplos doadores (p. ex., após transfusões de suporte para realização de quimioterapia ou transplantação de células progenitoras hematopoéticas [CPrHs] [Cap. 36]).

Mecanismos de lesão imunológica

As respostas imunológicas podem causar lesão aos tecidos normais, além de destruírem os organismos invasores que podem ter desencadeado sua geração. Tais respostas são convenientemente classificadas em quatro tipos de hipersensibilidade. A de tipo I é a resposta anafilática ou de natureza alérgica, mediada pela IgE ligada à superfície de basófilos e mastócitos. Quando antígenos específicos (ou alérgenos) se ligam à IgE de superfície, os basófilos são estimulados a liberar histamina e outras substâncias vasoativas que constituem mediadores imediatos das reações alérgicas (Kemp, 2002). As estratégias clínicas para tratamento da asma e das alergias são voltadas para diferentes aspectos dessa sequência de eventos, desde a contraposição dos efeitos ou da liberação da histamina até o retorno à dessensibilização. Já foi demonstrado o uso bem-sucedido de anticorpos monoclonais humanizados recombinantes contra a IgE para tratar esses indivíduos (Milgrom, 1999). É possível que futuramente essa terapia possa se basear, em parte, em medidas da concentração de IgE no soro.

A hipersensibilidade de tipo II ocorre quando anticorpos se ligam a antígenos na superfície celular. O dano pode ocorrer como resultado da ligação e ativação do complemento (p. ex., hemólise imune), citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (p. ex., lise de células tumorais ou parasitas), ou ainda interferência humoral nas funções celulares (p. ex., autoanticorpos dirigidos contra os receptores de acetilcolina na miastenia grave).

A hipersensibilidade de tipo III resulta da formação de imunocomplexos, seja entre antígenos exógenos (p. ex., bactérias, vírus) e anticorpos, seja entre autoantígenos endógenos e anticorpos. O dano tecidual típico ocorre em órgãos ricamente irrigados por numerosos vasos sanguíneos pequenos, nos quais os imunocomplexos circulantes se depositam, ou em locais de ocorrência de antígenos naturais.

Por fim, a hipersensibilidade de tipo IV é mediada por células, sendo também chamada hipersensibilidade tardia. É dependente de células T $CD4^+$ funcionais ou da citotoxicidade das células T $CD8^+$. As reações de tipo IV constituem a base da reação imune aos vírus, fungos, protozoários, parasitas e microrganismos intracelulares, como as micobactérias. Pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), ao perderem as células T $CD4^+$, tornam-se suscetíveis a infecções por estes e outros agentes oportunistas.

Aplicações laboratoriais da avaliação imunológica

As principais áreas em que os testes imunológicos possuem aplicação significativa são doenças autoimunes, transplantação e rejeição de órgãos/tecidos, imunodeficiências e alergias.

A doença autoimune pode ser sistêmica (Cap. 51), restrita a órgãos específicos (Cap. 53) ou envolver vasculite (Cap. 52). Uma parte considerável desses testes se baseia na triagem empregando técnicas, como detecção de anticorpos antinúcleo seguida de testes confirmatórios com autoantígenos específicos (p. ex., DNA de dupla fita). Outros autoanticorpos podem ser identificados através de ensaios de imunofluorescência indireta, empregando cortes de órgãos para identificação de autoanticorpos específicos, como aqueles dirigidos contra o músculo liso, mitocôndria, células parietais e assim por diante. Os avanços tecnológicos disponibilizaram fontes purificadas de diversos autoantígenos importantes, que futuramente tornarão os ensaios para detecção de autoanticorpos mais específicos e, com certeza, mais fáceis de automatizar.

A terapia imunossupressora para rejeição de transplantes alogênicos e imunodeficiências repousa no teste de subconjuntos de linfócitos, considerando particularmente importantes as células T e as células $CD4^+$. Além disso, os estados de imunodeficiência congênita requerem análise mais detalhada dos elementos celulares e humorais do sistema imune. Essa análise usualmente começa com uma bateria de testes mais convencionais para avaliar a presença e função de linfócitos, imunoglobulinas e complemento, além de proceder (quando necessário) à realização de testes altamente esotéricos para detecção de distúrbios raros (Cap. 45 e 50).

Os distúrbios alérgicos tipicamente são avaliados por meio de testes cutâneos, quantificação da concentração sérica total de IgE e determinação das reatividades específicas da IgE no soro, utilizando alérgenos comuns encontrados em alimentos, pólen e outros fatores ambientais (Cap. 54).

Conforme forem surgindo novas descobertas acerca da função imunológica e novas terapias, é provável que os laboratórios clínicos de diagnóstico tenham a oportunidade de passar a fornecer medidas de um número bem maior de fatores e atividades, com o objetivo de estabelecer diagnósticos corretos e monitorar e ajustar tratamentos.

Referências bibliográficas

Corcoran AE: Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. Semin Immunol 2005; 17:141–154.

Fagarasan S: Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. Curr Opin Immunol 2004; 16:277–283.

Fekade D, Knox K, Hussein K, et al: Prevention of Jarisch–Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor α. N Engl J Med 1996; 335:311–315.

Germain R: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. Cell 1994; 76:287–299.

Janeway C, Bottomly K: Signals and signs for lymphocytic responses. Cell 1994; 76:275–285.

Kemp SF, Lockey RF: Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. J Allergy Clin Immunol 2002; 110:341–348.

Excelente artigo de revisão, que cobre a imunopatologia, fisiopatologia e muitos agentes causadores de anafilaxia, bem como sua supervisão clínica.

Kronenberg M: Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. Annu Rev Immunol 2005; 26:877–900.

Esta visão abrangente discute o nível atual de conhecimento sobre as células T natural killer.

Leonard WJ: Type 1 cytokines and interferons and their receptors. *In* Paul WE (ed.) Fundamental Immunology, 5th ed. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2003, p 701.

Milgrom H, Fick RB, Su JQ, et al: Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. N Engl J Med 1999; 341:1966–1973.

Nossal G: Negative selection of lymphocytes. Cell 1994; 76:229–239.

Park C, Chio YS: How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal center? Immunol 2005; 114:2–10.

Nesta revisão, a função e a interação das células dendríticas foliculares com as células B são apresentadas de forma agradável, acompanhando ilustrações interessantes.

Paul W, Seder R: Lymphocyte responses and cytokines. Cell 1994; 76:241–245.

Trombetta ES, Mellman I: Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu Rev Immunol 2005; 23:975–1028.

Esta extensiva revisão cobre em detalhes as propriedades das células apresentadoras de antígeno, bem como sua regulação, processamento e transporte de antígenos.

Von Boehmer H: Positive selection of lymphocytes. Cell 1994; 76:219–228.

Wen L, Atkinson JP, Giclas PC: Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. J Allergy Clin Immunol 2004; 113:585–593.

Este artigo apresenta uma breve descrição das três vias do complemento, uma revisão do sistema orgânico considerando o efeito das deficiências e uma abordagem de triagem diagnóstica dos estados de deficiência do complemento.

Weiss A, Littman D: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 1994; 76:263–274.

Weissman I: Developmental switches in the immune system. Cell 1994; 76:207–218.

CAPÍTULO 43

Imunoensaio e imunoquímica

Yoshihiro Ashihara PhD, Yasushi Kasahara PhD DMSc, Robert M. Nakamura MD

Imunoensaios e imunoquímica 911
- Características gerais da reação antígeno-anticorpo 911
- Características dos antígenos 911
- Características dos anticorpos 912
- Cinética da reação antígeno-anticorpo 912

Visão geral dos princípios gerais dos imunoensaios 912
- Classes de imunoensaios 912
- Conjugação química 913
- Características da fase sólida 914

Imunoensaios com precipitina e nefelométricos 915
- Fundamentos e princípios da reação com precipitina 915

Imunoensaio com partículas 915
- Princípios da aglutinação de partículas 915
- Resumo 919

Radioimunoensaio 919
- Fundamentos 919
- Princípios e métodos de ensaio 920
- Resumo 920

Immunoensaio enzimático 921
- Fundamentos e classificação 921
- Imunoensaios enzimáticos heterogêneos 922
- Imunoensaios enzimáticos homogêneos 924
- Resumo 927

Imunoensaio fluorescente 928
- Fundamentos e classificação 928
- Imunoensaio fluorescente heterogêneo 928
- Método fluoroimunométrico 928
- Ensaio imunofluorométrico de partição radial 928
- Fluoroimunoensaio de resolução temporal 928
- Imunoensaio fluorescente homogêneo 928
- Ensaio de fluorescência por polarização 928
- Imunoensaio de transferência de fluorescência por excitação 928
- Imunoensaio com proteção de fluorescência 929

Imunoensaio de quimioluminescência 929
- Fundamentos 929
- Imunoensaio quimioluminescente usando ésteres de acridínia como marcadores 930
- Imunoensaio eletroquimioluminescente 930

Instrumentos de automação e modulação dos sistemas de ensaio 930
- Sistemas de ensaio homogêneos 930
- Sistemas de imunoensaio heterogêneos 930
- Fluxo prático do imunoensaio no sistema analítico 930
- Instrumentação e pontos fundamentais para o imunoensaio heterogêneo 931
- Novos sistemas para a próxima geração (sistemas modulares) 932

Dispositivos simples para testes rápidos 932
- Fundamentos 932
- Dispositivos de ensaio de fluxo contínuo (dispositivos para ensaio de imunofiltração) 932
- Tira reagente 932
- Dispositivos imunocromatográficos 932
- Resumo 933

Imunoensaios múltiplos simultâneos 934
- Fundamentos 934
- Ensaio MicroSpot 934
- Imunoensaio com microarranjos para analitos múltiplos 935
- Imunoensaio por citometria de fluxo 935
- Ensaio de microcanais com disco compacto (CD) 935
- Resumo 935

Referências bibliográficas 936

PONTOS-CHAVE

- Os imunoensaios são empregados rotineiramente no laboratório clínico para identificar e medir antígenos e anticorpos. Os sistemas incluem ensaio de aglutinação de partículas, radioimunoensaio, imunoensaio enzimático, imunoensaio fluorescente ou quimioluminescente e imunoensaio colorimétrico.
- A sensibilidade e a precisão das diferentes classes de imunoensaio variam, bem como a facilidade de uso, a resistência a interferências, o prazo de validade e exposições arriscadas.
- Testes domésticos e instantâneos tornaram-se mais comuns e sofisticados, à medida que a miniaturização melhorou, permitindo o uso de amostras muito menores. No entanto, a sensibilidade e a especificidade precisam ser investigadas mais completamente nesses microssistemas.

Imunoensaios e imunoquímica

Características gerais da reação antígeno-anticorpo

Os ligantes biológicos baseados na afinidade entre moléculas, como enzima e substrato, hormônio e receptor, antígeno e anticorpo, desempenham um papel importante em organismos vivos. O reconhecimento de características específicas dos imunoensaios (reações entre antígeno e anticorpo) tem sido usado em ampla escala como recurso analítico, apesar da ampla gama de metodologias disponíveis em termos de exames clínicos de laboratório.

Os imunoensaios podem ser usados para a detecção de antígenos ou anticorpos. Para a detecção de antígeno, o anticorpo específico correspondente deve ser preparado como um dos reagentes. O inverso é válido para a detecção de anticorpo. A sensibilidade do imunoensaios aumentou com o desenvolvimento de novos tipos de sistema de detecção de sinal e tecnologia de fase sólida. Os imunoensaios foram otimizados para detectar menos de 0,1 pg/mL de antígeno presente no sangue. Eles podem ser aplicados para a detecção de haptenos, como pequenas moléculas; proteínas e complexos de proteínas, como macromoléculas; bem como de qualquer anticorpo a alérgenos, agentes infecciosos e antígenos autólogos.

Características dos antígenos

Antígenos podem ser definidos como qualquer substância que possa representar locais antigênicos (epítopos) para produzir anticorpos correspondentes, desde pequenas moléculas, como haptenos e hormônios, até macromoléculas, como proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e outros produtos naturais. Compostos químicos artificiais também podem ser antígenos agindo como haptenos. Os antígenos devem ter pelo menos um epítopo. Os epítopos que podem ser reconhecidos por anticorpos incluem sequências de aminoácidos de pep-

tídeos em proteínas e estruturas proteicas altamente dimensionais, como locais antigênicos.

Características dos anticorpos

Imunoglobulina (Ig), uma importante proteína plasmática, refere-se a anticorpos no contexto das funções biológicas de uma imunoglobulina específica contra antígenos. Portanto, anticorpos são produzidos em resposta à estimulação antigênica. Os anticorpos são formados por moléculas funcionais e heterogêneas que se unem aos antígenos por meio do local de ligação do antígeno. Há cinco classes (isotipos) de imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. A IgG subdivide-se ainda em quatro subclasses, enquanto a IgA e a IgM têm dois subgrupos. Todas as moléculas de anticorpo conhecidas têm uma cadeia pesada com uma cadeia leve κ ou λ. A estrutura molecular dos anticorpos é composta por regiões variáveis e regiões constantes. O domínio hipervariável (ponto de ligação do epítopo) pode ser montado para interagir com uma ampla variedade de epítopos (determinantes antigênicos). Na medicina laboratorial, podem ser distinguidas duas categorias de anticorpos: anticorpos como reagentes e anticorpos como analitos. Os analitos-anticorpos-analitos em geral são classificados pelos subtipos IgG, IgM ou IgA. Os anticorpos-reagentes são preparados a partir de antissoro obtido mediante imunização animal com antígeno purificado.

Anticorpos policlonais

Um anticorpo policlonal pode ser obtido pela imunização com um antígeno, que apresenta vários epítopos. Em outras palavras, é gerado um anticorpo específico contra cada epítopo. A avidez de um anticorpo policlonal por um complexo antigênico geralmente é mais forte que a de um único anticorpo monoclonal. Podem ser necessárias proteínas transportadoras para a imunização de moléculas muito menores, como haptenos ou hormônios.

Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (Koehler, 1975) foram desenvolvidos mediante o uso das seguintes biotecnologias: fusão celular somática, seleção do hibridoma resultante e diluição limitante para obter monoclonais. Eles são definidos como anticorpos homogêneos uniformes direcionados para epítopos específicos. Uma linhagem celular estabelecida permite a secreção de todas as imunoglobulinas reativas específicas de epítopos únicos. Os anticorpos monoclonais possibilitaram a análise de moléculas em uma base de epítopo para epítopo por causa de sua estreita especificidade. No entanto, os anticorpos monoclonais não têm a capacidade de reconhecer toda a molécula, em contraste com os anticorpos policlonais. No caso dos anticorpos monoclonais, antígenos diferentes com um epítopo comum parecem ser o mesmo antígeno. Por exemplo, o anticorpo CA 19-9 (Magnani, 1983) como um marcador tumoral pode detectar moléculas de tamanhos e formas diferentes que têm em comum epítopos carboidratos. Os anticorpos monoclonais capacitam a identificação de isoenzimas, subtipos, isotipos de proteína e alterações na conformação de moléculas, porque podem discernir diferenças mínimas nas moléculas.

Os anticorpos monoclonais podem apresentar reação cruzada com antígenos diferentes. Essa reatividade cruzada pode ser explicada pela existência provável das mesmas sequências de aminoácidos, carboidratos ou lipídeos em moléculas diferentes. A tecnologia do anticorpo monoclonal possibilitou o desenvolvimento de sistemas de imunoensaio extremamente úteis e quase ideais para testes clínicos laboratoriais.

Os métodos de produção e as aplicações dos anticorpos monoclonais foram extensamente revistos (Nakamura, 1983; Zola, 1987). As vantagens dos anticorpos monoclonais são as seguintes:

1. fornecer um reagente bem definido;
2. sua produção pode resultar em uma quantidade ilimitada de reagente homogêneo com afinidade e especificidade altamente consistentes;
3. podem ser preparados mediante imunização com um antígeno não purificado.

O uso dos anticorpos monoclonais tem certas limitações, como as seguintes:

1. reatividade insuficiente em precipitação ou aglutinação porque a formação de rede no imunocomplexo é fraca ou não ocorre quando são usados anticorpos monoclonais únicos;
2. antígenos com múltiplos epítopos heterogêneos são mais difíceis de serem caracterizados imunquimicamente com um único anticorpo monoclonal.

Produção de anticorpo por tecnologia recombinante

Skerra e Pluckthun (1988) desenvolveram um sistema de expressão para o fragmento Fv de domínios variáveis de um anticorpo específico para a fosforilcolina usando tecnologia recombinante na *Escherichia coli*. Tal tecnologia tornou possível produzir anticorpo quimérico fundido a uma enzima.

Uma tecnologia denominada exibição de fago emergiu para a produção de anticorpos (Winter, 1994). Nesse método, fragmentos de anticorpo de especificidade de ligação predeterminada são construídos a partir de um repertório de genes de uma região variável (V) do anticorpo, eliminando assim a necessidade de imunização e a tecnologia do hibridoma. Os genes V podem ser montados *in vitro*. O fago selecionado do repertório por ligação ao antígeno e a fragmentos de anticorpo é expresso na bactéria infectada. Além disso, a afinidade da ligação dos anticorpos é aprimorada por meio de mutação. Futuramente, essa tecnologia permitirá o uso de anticorpos específicos com alta avidez.

Cinética da reação antígeno-anticorpo

Certos aspectos do equilíbrio ou da lei de ação das massas na química podem ser aplicados à reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). A cinética (K) da reação reversível Ag-Ac é a seguinte (Steward, 1986):

$$\mathrm{Ag} + \mathrm{Ab} \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{AgAb},$$

onde Ag representa o antígeno livre, Ac representa os sítios de anticorpo livre, AgAc representa a concentração do complexo antígeno-anticorpo e K_1 e K_2 são as constantes de associação e dissociação, respectivamente. A velocidade de formação do complexo antígeno-anticorpo é representada da seguinte maneira:

$$d[\mathrm{AgAb}]/dt = K_1\,[\mathrm{Ag}][\mathrm{Ab}] - K_2[\mathrm{AgAb}],$$

e em equilíbrio a velocidade resultante é zero. Portanto,

$$K_1/K_2 = [\mathrm{AgAb}]/[\mathrm{Ag}][\mathrm{Ab}] = K_a$$

(constante de associação em equilíbrio ou constante de afinidade)

K_a é o parâmetro limitado a reações de um local para outro, embora antígenos e anticorpos geralmente tenham múltiplos locais de ligação na molécula. A constante de associação aparente para múltiplas reações entre antígeno e anticorpo pode ser definida como *avidez*, em vez de afinidade. O valor K_a pode ser obtido das seguintes equações e dados experimentais:

$$[\mathrm{Ab}] = [\mathrm{Ab}]_t - [\mathrm{AgAb}],$$

onde [Ab] é a concentração de anticorpo em equilíbrio e $[\mathrm{Ab}]_t$ representa a concentração total original de anticorpo.

$$K_a = L/([\mathrm{Ab}]_t - B)\,F,$$

onde F é o antígeno livre ou analito e L é o antígeno ligado ou analito.

Um gráfico de Scatchard é produzido quando a quantidade de antígeno ligado (L) é representada no eixo X e a proporção L/F é representada no eixo y. Dois parâmetros que podem ser determinados a partir do gráfico de Scatchard são a constante de dissociação ou afinidade da inclinação da linha e a concentração locais de ligação de anticorpo a partir do eixo X (Scatchard, 1949).

Visão geral dos princípios dos imunoensaios

Classes de imunoensaios

Uma breve classificação e lista de aspectos dos vários imunoensaios é fornecida na Tabela 43.1. Os imunoensaios de precipitação constituem o método mais simples pelo qual antígenos e anticorpos reagem entre si sem envolver a detecção de qualquer indicador. O complexo antígeno-anticorpo resultante em fase de gel ou líquido pode ser observado qualitativamente como um precipitado a olho nu e quantitativamente com um detector.

O imunoensaio de aglutinação de partículas (Kasahara, 1992b) usa partículas inertes como indicadores, ao contrário da precipitação direta dos complexos antígeno-anticorpo. Antígenos ou anticorpos são unidos a

Tabela 43.1 Classificação dos vários imunoensaios e suas características

	Indicadores (Grupos relatados)	Separação L/F*	Detecção do sinal	Sensibilidade
Imunoensaios de precipitação	Não necessária	Não necessária	A olho nu, turbidez, nefrometria	≈10 µg/mL[1]
Imunoensaios com partículas	Células sanguíneas, partículas artificiais (gelatina, partículas, látex etc.)	Não necessária	A olho nu, analisador padrão, espectrofotometria, contagem de partículas	≈5 ng/mL[2]
Radioimunoensaios	Radioisótopos (^{125}I, ^{3}H)	Necessária	Contagem de fótons	≈5 pg/mL
Imunoensaios enzimáticos	Enzimas	Necessária	Espectrofotometria, fluorometria, contagem de fótons	≈5 pg/mL ≈0.1 pg/mL[3] (CL-EIA)
Imunoensaios fluorescentes	Fluoróforos	Necessária	Contagem de fótons	≈5 pg/mL[4]
Contagem quimioluminescente	Compostos quimioluminescentes	Necessária	Contagem de fótons	≈5 pg/mL[4]

* A etapa de lavagem para separação de marcadores ligados em imunocomplexo dos marcadores livres. Os ensaios homogêneos incluídos não requerem separação L/F.

Fontes dos dados: (1) Ritchie, 1978; (2) Haux, 1988; (3) Isomura, 1994; (4) Sgoutas, 1989.

partículas como eritrócitos, látex ou metal sólido com o analito na amostra. Como resultado dessa reação imune, as grandes partículas mostram padrões de aglutinação significativa que podem ser vistos a olho nu. Yalow (1959) relatou o desenvolvimento de um radioimunoensaio (RIA, na sigla em inglês) usando radioisótopos como indicadores. Tal inovação permitiu a detecção quantitativa de um nível mínimo (traços) de analitos e contribuiu para o avanço da pesquisa básica e da medicina clínica. A insulina, por exemplo, foi quantificada pelo RIA, que, subsequentemente, substituiu o bioensaio para insulina. O RIA pode ser formatado em um procedimento de fase sólida para separação fácil de indicadores ligados e livres. Desde o desenvolvimento dos RIAs, a pesquisa de indicadores alternativos para radioisótopos perigosos se intensificou, com o auxílio do desenvolvimento de imunoensaios não isotópicos que usam enzimas, indicadores fluorescentes e outros grupos de substâncias.

O imunoensaio enzimático (EIA, na sigla em inglês), que utiliza enzimas como indicadores, foi desenvolvido no início da década de 1970 (Engvall, 1971; Van Weeman, 1971) e rapidamente adquiriu grande popularidade. As enzimas podem amplificar sinais, dependendo da renovação (*turnover*) da atividade catalítica da enzima. Os esforços para melhorar substratos e aumentar a sensibilidade levaram à introdução de compostos cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes. Dependendo do substrato escolhido, o método de ensaio pode ser definido como um imunoensaio enzimático fluorescente ou um imunoensaio enzimático quimioluminiscente (Thorpe, 1984).

Os imunoensaios fluorescentes (IEF) usam fluoróforos como marcadores. Os fluoróforos requerem energia luminosa de comprimento de onda ideal para sua excitação, de modo a produzirem emissão luminosa detectável. É provável que a sensibilidade do IEF diminua por causa da fluorescência de fundo inespecífica presente em amostras biológicas. Os fluoróforos que têm um tempo de emissão de fluorescência demorado de 100 ns (nanossegundos) são adequados para aplicação no IEF de resolução temporal. A introdução de uma nova classe de compostos fluorescentes resultou em aprimoramentos do IEF, como a eliminação de ruído de fundo. Foi introduzida uma instrumentação sofisticada que pode detectar baixas concentrações (10 a 15M) de analitos usando-se IEFs.

Os imunoensaios de quimioluminescência usam compostos quimioluminescentes como indicadores. Tais compostos incluem moléculas sintetizadas quimicamente e produtos naturais, como a aquorina. Ao contrário dos fluoróforos, os compostos mais quimioluminescentes requerem energia química em vez de luminosa para gerar emissão luminosa. A reação de redução-oxidação é um processo comum a todos os ensaios quimioluminescentes. Não se espera ampliação do sinal pelos indicadores quimioluminescentes, pois as moléculas quimioluminiscentes geram apenas um fóton por decomposição molecular. Comprovou-se que uma série de compostos novos e inovadores para eletroquimioluminescência tem aplicação nos imunoensaios. Um quelato metálico com compostos tribifenis emite luz por meio de uma reação contínua de redução-oxidação na superfície de eletrodos (Blackburn, 1991).

Nos vários tipos de ensaio mencionados antes, os principais fatores que afetam a sensibilidade são a constante de associação (afinidade ou avidez) do reagente, a intensidade do sinal dos indicadores e a proporção do ruído do sinal com relação à detecção do sinal reduzido pelo fundo dos próprios sinais ou por uma reação específica.

Isótopos de iodo 125 (^{125}I) requerem cerca de sete milhões de moléculas para gerar um fóton por segundo, com base no cálculo da meia-vida dos radioisótopos (Bounaud, 1987). Substratos quimioluminescentes para enzimas podem aumentar os eventos por uma ordem de magnitude seis vezes maior do que a do iodo 125. Isso é atribuível à capacidade de amplificação catalítica das enzimas.

Conjugação química

Dependendo do ensaio escolhido, o método de conjugação que acopla uma molécula a outras, como enzimas (ou cofatores) a antígenos (ou anticorpos) ou antígenos (ou anticorpos) à fase sólida, pode variar. A reação de acoplamento aplicada deve ser realizada em condições que evitem a redução de quaisquer atividades biológicas da proteína. No método do glutaraldeído (Avrameas, 1978), usa-se glutaraldeído, com dois (ou possivelmente mais) grupos aldeído como reagente do acoplamento, para a conjugação dos grupos amino da proteína. Esse método baseia-se em reações mistas, incluindo condensação do aldol em pH alto (a pKa do resíduo NH é de 8,6 a 10,8). Nesse método, mostrado na Figura 43.1, o conjugado resultante tem formas diferentes por causa da existência de múltiplos locais ativos para acoplamento. O método da oxidação do periodato (Nakane, 1966) para a conjugação de anticorpos usa peroxidase da raiz-forte, que contém carboidratos em suas moléculas. Os métodos mencionados anteriormente não são apropriados para a regulação de reações em locais específicos, como quando a estereoespecificidade da configuração dos conjugados é necessária.

Conforme ilustrado na Figura 43.2, foram desenvolvidos métodos de acoplamento mais modernos (Kato, 1975; Kitagawa, 1978) usando um reagente de acoplamento sofisticado, o éster m-maleimidobenzil-*N*-hidroxissuccinimida (MBS), um reagente bivalente que consiste em um éster ativado e uma maleimida, que podem reagir, respectivamente, com um grupo NH_2 e um grupo SH. O grupo carboxi também pode ser usado como local específico para conjugação com resíduos de a ou e-NH_2 de proteínas usando N-hidroxissuccinimida (NHS) como reagente de acoplamento. O reagente de acoplamento NHS estende-se à proteína conjugada ou ao grupo carboxila introduzido na fase sólida.

Características da fase sólida

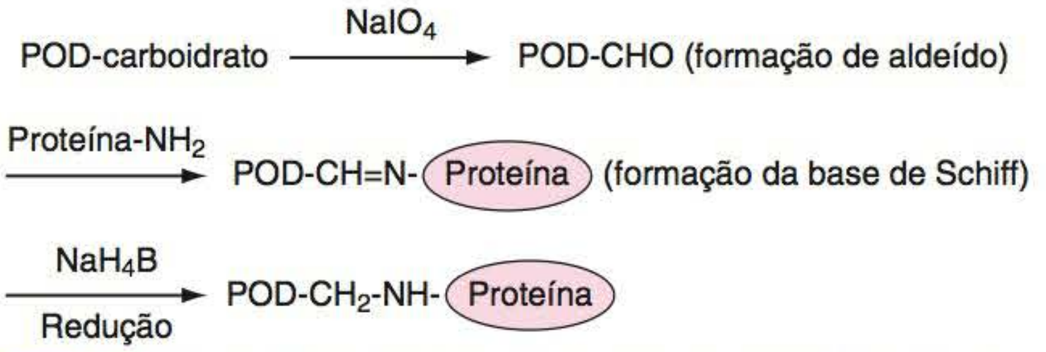


Figura 43.1 Esquema do acoplamento para conjugação de proteína com peroxidase da raiz forte (POD) baseado no método Nakane.

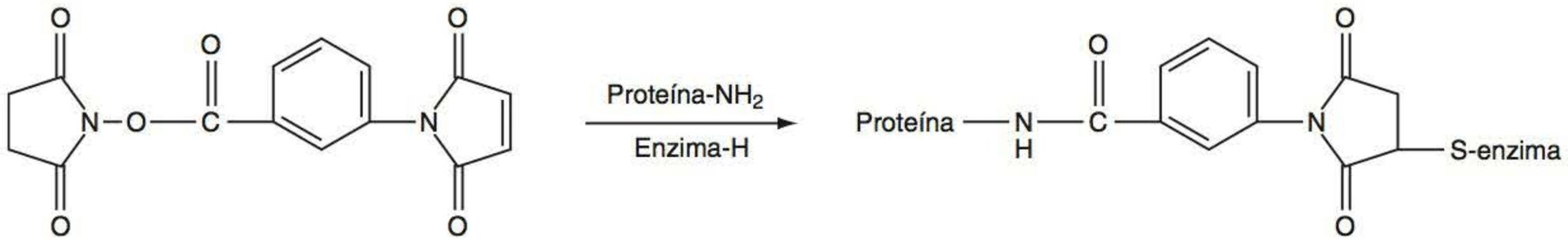


Figura 43.2 Preparação do conjugado enzima-proteína usando reagente heterobifuncional de acoplamento.

Todos os imunoensaios heterogêneos que usam conjugado como indicadores, inclusive radioisótopos, requerem pelo menos uma etapa de separação para distinguir o imunocomplexo que reage (ligado) do antígeno que não reage (livre). A imobilização de antígenos ou anticorpos da fase sólida é feita por ligação covalente ou adsorção física por meio de interações não covalentes. Partículas de gel de agarose, poliacrilamida e contas de plástico, ou placas para titulação compostas de polistireno, têm sido usadas como a fase sólida, bem como partículas cobertas com óxido de ferro, que podem ser separadas por um campo magnético.

Usa-se comumente a parede interna de um tubo ou microtitulador como uma fase sólida. Com essas fases sólidas relativamente grandes, pode ser preciso agitar a mistura para reação, para encurtar o tempo necessário para que ocorra a reação imune. É provável que se observe o fenômeno pró-zona ou efeito de gancho causado por altas concentrações do analito no imunoensaio de uma etapa, quando são utilizadas quantidades limitadas de anticorpo da fase sólida ou anticorpo marcado. Placas de microtitulação ou tiras causam um "efeito marginal", que pode ser explicado pela cinética diferente da reação imune ou atividade enzimática com variações na temperatura. Pode haver uma diferença na temperatura entre os vãos localizados na borda da placa de microtitulação e o centro da placa. Pode-se observar uma diferença de cerca de 2°C com um termômetro infravermelho colocado entre a borda e o centro dos vãos à temperatura ambiente. O tamanho e a forma da fase sólida são os fatores críticos que afetam a cinética da reação imune e a capacidade de capturar o anticorpo ou antígeno da fase sólida. Pequenas partículas magnéticas esféricas ou de látex com 3.000 Å de diâmetro proporcionam uma área de superfície total maior para imunoabsorção do que em geral se consegue com outras fases sólidas. A área de superfície total maior ajuda a encurtar o tempo da reação imunológica (Nishizono, 1991).

As partículas usadas para o ensaio de aglutinação de partículas estão relacionadas na Tabela 43.2. O fenômeno da aglutinação de partículas (aglutinação direta) causado por uma reação imune foi observado pela primeira vez em testes para detectar antígeno após incubação com soro de paciente infectado. A aglutinação de eritrócitos após incubação com soro levou à descoberta dos tipos sanguíneos ABO. Os imunoensaios com partículas baseiam-se no princípio da aglutinação e usam o reagente de um anticorpo ou antígeno aderido à partícula inerte como um indicador, ao contrário da precipitação direta de um imunocomplexo antígeno-anticorpo. Como um indicador, a partícula pode aumentar significativamente a sensibilidade do imunoensaio, seja a aglutinação restante detectada a olho nu ou com instrumentos espectrofotométricos para quantificação.

Eritrócitos, partículas de gelatina, lipossomos, metais sólidos e vários tipos de partículas de látex, inclusive látex modificado com óxido de ferro ou corantes, são todos fases sólidas disponíveis. O diâmetro das partículas usadas para reações de aglutinação varia de 7 a 0,01 μm. Nenhuma teoria pode explicar a cinética da aglutinação (Kasahara, 1992a), por causa dessa ampla variedade de tamanho de partículas usadas como indicadores. No caso de partículas com mais de 3 a 5 μm de diâmetro, não se observa movimento browniano de partículas dispersadas agindo de acordo com o coeficiente de difusão à temperatura ambiente. Contudo, pode-se aplicar a teoria da energia potencial de interação entre partículas, ou a teoria da reação de coagulação coloidal, a partículas pequenas, como as micropartículas de látex. Estima-se que o anticorpo IgM, sendo multivalente, seja 750 vezes mais eficiente que o anticorpo bivalente IgG em uma reação de aglutinação. A distância entre partículas em floculação deve ser menor ou igual a 120 Å, por causa do comprimento molecular do anticorpo. E suma, os fatores importantes a serem considerados em uma imunorreação de fase sólida são as propriedades da superfície da partícula, como a carga e a hidrofobicidade, e a estabilidade de dispersão.

Tabela 43.2 Partículas usadas como indicadores para imunoensaio de aglutinação de partículas

	Método de ensaio	Material fornecido
Eritrócitos humanos	Hemaglutinação direta (Landsteiner)	Sangue ABO
	Hemaglutinação do anticorpo eritrocitário: título em placa/lâmina	Anticorpo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)
Eritrócitos de aves	Hemaglutinação direta	Anticorpo para o vírus *influenza* humana
Eritrócitos de animal fixo	Hemaglutinação passiva: título em placa	Anticorpo para o *T. pallidum*
	Hemaglutinação passiva reversa: título em placa	Antígeno de superfície para o vírus da hepatite B
Látex	Aglutinação passiva reversa: lâmina	Gonadotropina coriônica
	Aglutinação passiva reversa: turbidimetria	Imunoglobulina E
	Aglutinação passiva reversa	Ferritina
Látex (cor)	Imunocromatografia	Gonadotropina coriônica humana (hCG)
Microcápsula	Aglutinação passiva: título em placa	Anticorpo para o *T. pallidum*
Partícula de gelatina	Aglutinação passiva: título em placa	HIV, anticorpo para o *T. pallidum*
	Aglutinação passiva reversa: CCD em câmera	Hemoglobina humana (hHb)
Partícula de polipeptídeo	Aglutinação passiva e reversa	Anticorpo para o *T. pallidum*, HBs
Partícula de silicato	Aglutinação passiva: título em placa /CCD em câmera	Anticorpo para o *T. pallidum*
Partícula de ouro	Aglutinação passiva reversa acentuada pela fotometria	Estrogênio total
Metais sólidos	Aglutinação reversa	hCG, hHb

Fonte: com permissão de Kasahara Y: Principles and applications of particle immunoassay. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992, pp127–147.

Imunoensaios com precipitina e nefelométricos

Fundamentos e princípios da reação com precipitina

O precipitado que se forma quando grandes complexos de antígeno e anticorpo combinam-se para formar um entrelaçado insolúvel tem tido uso amplo para identificar e quantificar reações com imunoprecipitina. Os modos de aplicação das técnicas com precipitina têm as vantagens de sensibilidade, especificidade e simplicidade. A limitação em termos de sensibilidade desses ensaios é uma consideração importante. Mesmo nas melhores condições favoráveis à sensibilidade proporcionadas pelas técnicas mais modernas de dispersão luminosa, o limite inferior de sensibilidade dos ensaios com imunoprecipitina continuam na faixa de 0,1 a 0,5 mg/dL, que parece suficiente o bastante para a quantificação de muitas das principais proteínas séricas. A reação com precipitina forma a base de muitas técnicas imunoquímicas quantitativas e qualitativas usadas hoje no laboratório clínico (Kabat, 1961).

Os fatores que afetam a reação com precipitina foram extensamente investigados por Heidelberg em 1935, que descobriu que as proporções relativas dos reagentes, as condições de temperatura, o pH e a força iônica do meio, bem como as características de avidez e afinidade do anticorpo, eram igualmente importantes para a formação do precipitado imune. Quanto ao padrão da formação de precipitina, pode-se notar que há um ponto em que a precipitação é máxima ou ótima, sendo designado *ponto de equivalência*. O acréscimo contínuo de antígeno assim que esse ponto é alcançado produz um efeito solubilizante sobre o precipitado. A variação dinâmica adequada para a determinação de analitos deve ser até a zona de equivalência. A otimização da concentração de anticorpo como um reagente é necessária, além da otimização das soluções tamponantes. Os métodos típicos de reação de precipitação são os seguintes:

1. Métodos de ensaio precipitante qualitativos
   Imunodifusão simples (Williams, 1970)
   Imunodifusão dupla (Garvey, 1977)
   Imunodifusão dupla em duas dimensões (Williams, 1970)
   Reação de eletroimunodifusão (Ritzmann, 1975)
   Imunoeletroforese (Rose, 1973)
2. Métodos de ensaio precipitante semiquantitativos
   Imunodifusão radial simples (Fahey, 1965; Mancini, 1965)
   Eletroimunodifusão em uma dimensão (Axelsen, 1975) (eletroforese "em rocha")
3. Imunoensaios nefelométricos
   Foram desenvolvidas várias técnicas de análise com imunoprecipitina, em que se usam dispositivos de dispersão luminosa (Ritchie, 1978). A ocorrência de formação de imunocomplexo foi relatada de acordo com a quantidade de tal dispersão luminosa e usada como base para a quantificação de antígeno. Instrumentos sofisticados foram projetados para medir rapidamente a dispersão luminosa. Em geral, as medidas de dispersão luminosa são conhecidas como *turbidimetria* ou *nefelometria*.

Imunoensaio com partículas

Princípios da aglutinação de partículas

A reação de aglutinação pode ser usada para detectar anticorpos em amostras com antígenos específicos aderidos a uma partícula (aglutinação passiva ou direta) (Fig. 43.3*B*). A aglutinação inversa utilizando um anticorpo correspondente aderido a partículas pode ser empregada para detectar antígenos solúveis na amostra (Fig. 43.3*A*). Um local de ligação de uma única unidade hapteno (para fármacos, hormônios ou partículas pequenas) não forma uma estrutura de ligação cruzada e, assim, não pode aglutinar-se a menos que seja imobilizada na fase sólida. Como mostrado na Figura 43.4*A* e *B*, quando uma partícula ou transportador imobilizado com um hapteno é usado como reagente, ocorre uma reação de inibição da aglutinação que se segue à detecção do hapteno. Esse ensaio baseia-se em um princípio do tipo competitivo em que a aglutinação de partículas de hapteno com uma quantidade limitada de anticorpos, sejam livres ou aderidos a partículas, é inibida pelo hapteno livre presente na amostra. Além disso, partículas marcadas podem reagir com reagentes fixados na fase sólida da membrana. Após imunorreação, as partículas dentro do imunocomplexo podem ser desenvolvidas para mostrar cor em parte da membrana. Esse tipo de ensaio tornou-se popular como um recurso simples para a detecção qualitativa de gonadotropina coriônica humana (hCG, na sigla em inglês) e outros analitos.

Hemaglutinação

Os testes de hemaglutinação (Boyden, 1951) são simples de fazer e não requerem equipamento especial. Por essa razão, tanto países avançados como em desenvolvimento adotaram uma variedade de testes de hemaglutinação. Um teste de hemaglutinação popular em

Figura 43.3 Princípios de imunoensaio por aglutinação passiva de partículas para a detecção de antígeno com múltiplos epítopos (*A*) ou anticorpos (*B*). (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

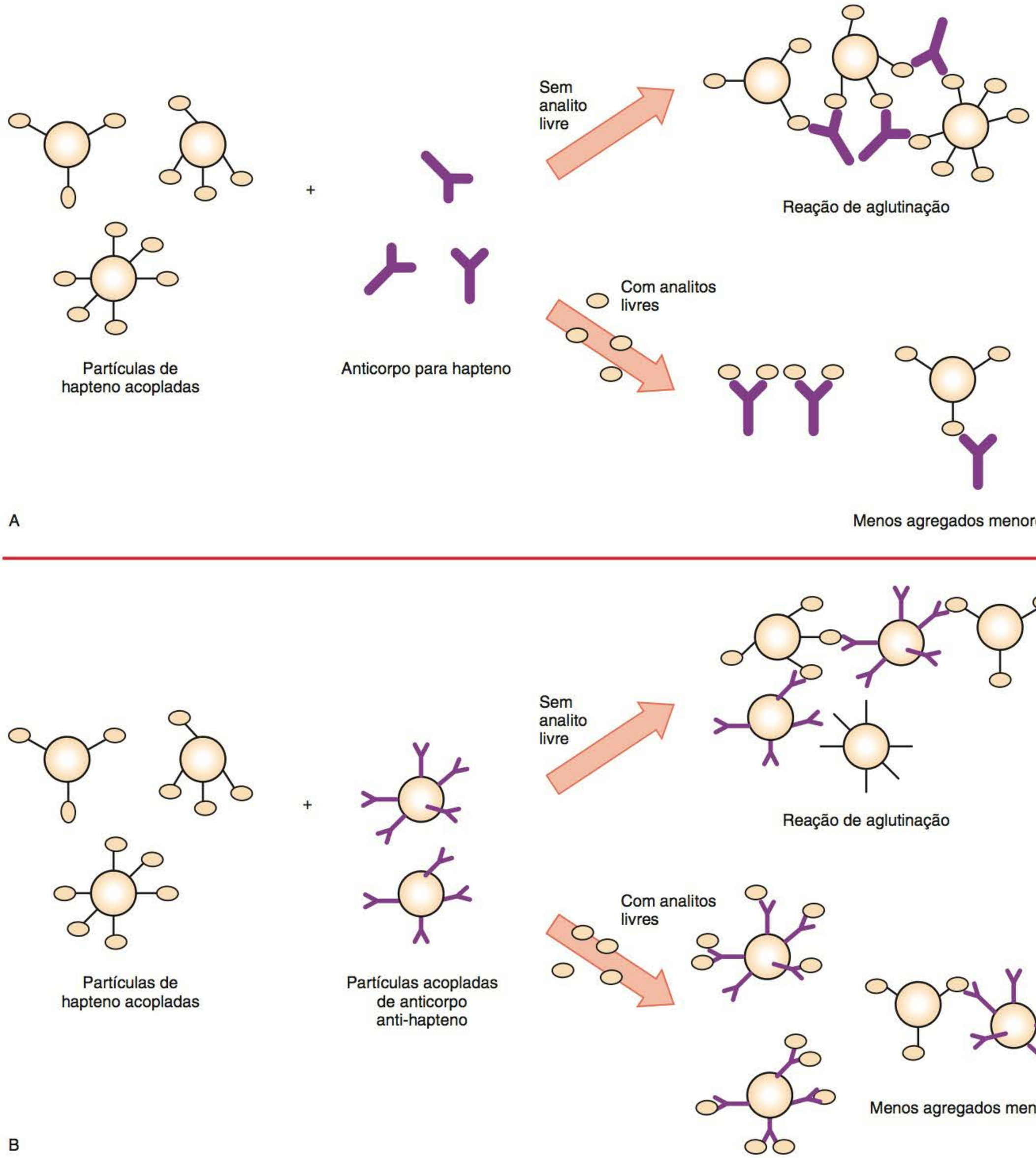


Figura 43.4 Princípios de imunoensaio por inibição de partículas para a detecção de antígeno com epítopo simples (hapteno), usando partículas de antígeno com anticorpo livre (A) ou fixado (B). (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

todo o mundo é usado para a detecção do anticorpo do *Treponema pallidum*, comercializado como Serodia-TP, por Fujirebio, Inc. (Tóquio, Japão). Nos EUA, o teste de hemaglutinação para o *Treponema pallidum* foi aprovado em 1981 pelos Centers for Disease Control (CDC). Ele também foi recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por causa de sua superiorioridade com relação a outros testes em termos de especificidade e sensibilidade (Kasahara, 1992b).

No teste de aglutinação para o *Treponema pallidum*, o reagente consiste em hemácias de carneiro sensibilizadas e não sensibilizadas e uma solução diluente de soro para a reconstituição de células liofilizadas sensibilizadas como um controle positivo. Podem ser feitos tanto testes qualitativos como semiquantitativos usando-se o seguinte protocolo para diluição do soro, empregando uma placa de titulação como recipiente para a reação como segue: com uma pipeta gotejadora de 25 μL, colocam-se 4 gotas (100 μL) de diluente do soro na placa 1 (Fig. 43.5) e uma gota nas placas 2 a 4 para os ensaios qualitativos (as placas 2 a 8 são usadas para o ensaio quantitativo). Os padrões de aglutinação resultante são mostrados na Figura 43.6. Padrões negativos, indicando que a imunorreação não ocorreu, mostram floculação condensada de partículas com uma estrutura entrecruzada no fundo da placa de microtitulação. Já os padrões positivos, indicativos de que a imunorreação ocorreu, mostram um padrão de aglutinação expandido

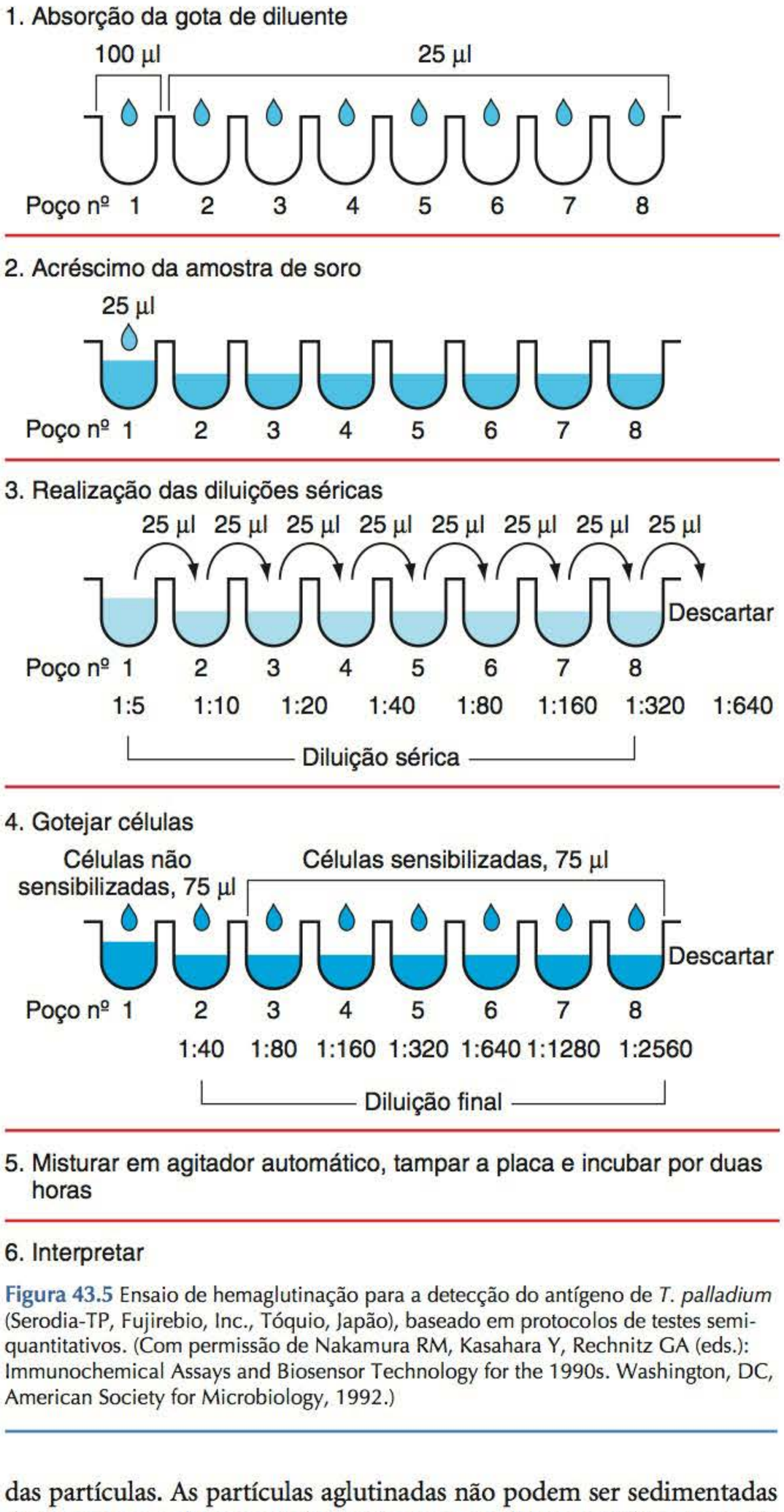


Figura 43.5 Ensaio de hemaglutinação para a detecção do antígeno de *T. palladium* (Serodia-TP, Fujirebio, Inc., Tóquio, Japão), baseado em protocolos de testes semiquantitativos. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

das partículas. As partículas aglutinadas não podem ser sedimentadas depois para se obter a condensação como padrões negativos, pois sua forma global é perdida durante a contagem das partículas aglutinadas. Na primeira e na segunda fileiras, foram usados soro e células não sensibilizadas (controle negativo), respectivamente. As amostras 1 e 2 mostram resultados negativos. As amostras 3 a 8 mostram resultados negativos ou positivos, dependendo da diluição da amostra. Observa-se resultado positivo nas amostras 7 e 8 até 1:2.560 (fileiras 3 a 8).

Kits para hemaglutinação já estão disponíveis para a detecção de anticorpos para o vírus da hepatite B (HBV), o da hepatite do tipo C (HCV), o da imunodeficiência humana (HIV-1/2), tireoglobulina, microssomo tireóideo e outras substâncias. Os testes de hemaglutinação reversa são usados para a detecção do antígeno de superfície para o HBV, a-fetoproteína (AFP), hemoglobina humana em amostras armazenadas e assim por diante. A sensibilidade dos testes de hemaglutinação é de aproximadamente 50 ng/mL para detecção de antígeno (analito). Kemp (1988) desenvolveu um ensaio de hemaglutinação que usa um anticorpo monoclonal específico de camundongo para o antígeno de superfície de eritrócitos humanos. O anticorpo pode reconhecer um epítopo comum para diferentes tipos de eritrócitos ou células anormais, como aquelas encontradas na anemia falciforme. Conforme mostrado esquematicamente na Figura 43.7, os eritrócitos nas amostras são usados como partículas da fase sólida e a aglutinação resultante pode ser observada a olho nu. Anticorpos bivalentes são conjugados quimicamente, de modo que um anticorpo reage de maneira específica com os epítopos de superfície do eritrócito, e o outro é específico para o analito ou antígeno-alvo O ensaio é aplicado para a detecção do anticorpo contra o HIV, bem como para a detecção de vários antígenos. Ao contrário dos formatos convencionais de aglutinação, esse não requer a separação de plasma ou soro. Esse ensaio é simples e poupa tempo, além de ter vantagens em termos de segurança, porque elimina a necessidade de separar o soro de amostras com risco de serem positivas para o HIV ou o HBV.

Aglutinação de partículas de gelatina

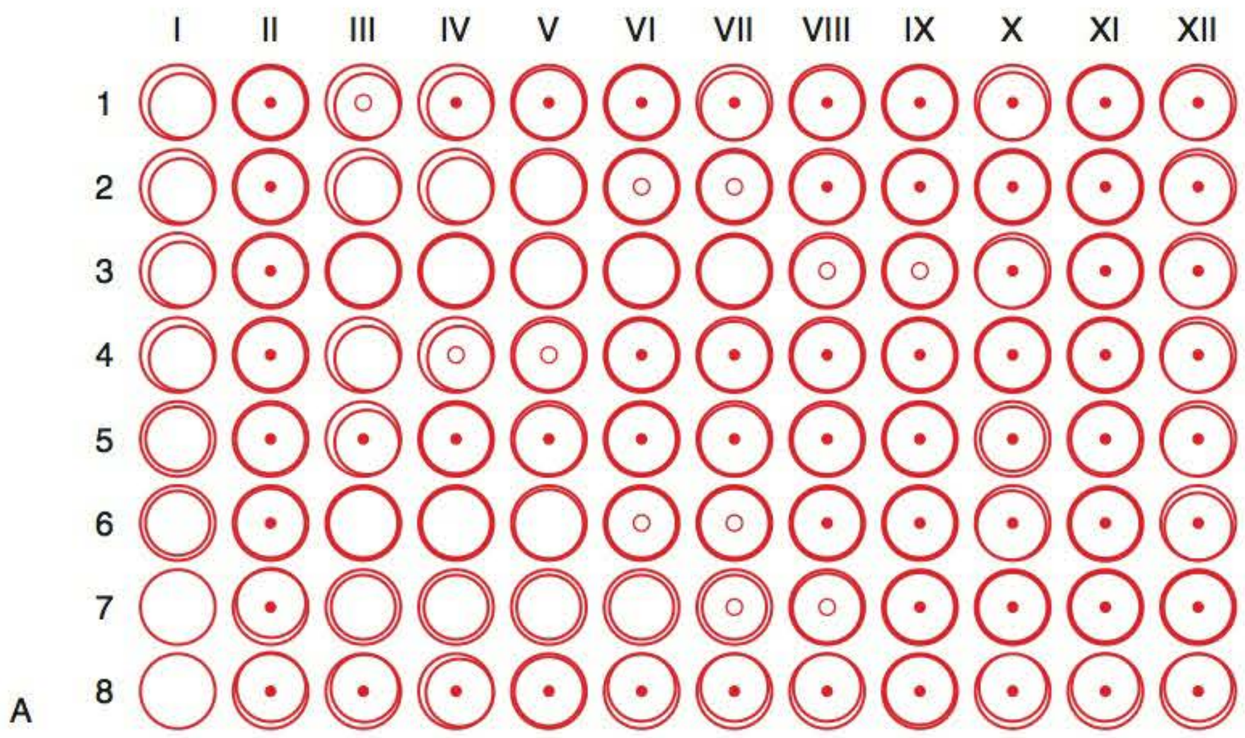
O desenvolvimento de uma partícula de gelatina especial com superfície altamente hidrofílica capaz de impedir a ligação inespecífica de materiais presentes em uma amostra foi uma alternativa para os eritrócitos (Ikeda, 1984). A partícula é feita por separação de fase e ligação cruzada tridimensional a 40°C e pH ótimo. A partícula resultante é fixada com formaldeído ou glutaraldeído, e seu diâmetro é de cerca de 3 µm. As propriedades físicas das partículas de gelatina, em comparação com as dos eritrócitos, são expostas na Figura 43.8. Uma partícula de gelatina não tem antigenicidade e, portanto, não tem problemas associados a anticorpos heterofílicos quando eritrócitos são usados como partículas. Esse tipo de partícula artificial requer muito menos diluição sérica para evitar ligação inespecífica e garante uma detecção mais sensível que com eritrócitos. Outras partículas sintéticas (Hirayama, 1991) feitas de um bloco de copolímero composto de ácido L-glutâmico e derivados foi desenvolvida por Hirayama (1991) como alternativas para as partículas de gel. Essas partículas sintéticas podem ser coradas com qualquer corante porque as próprias partículas são incolores, como as de gelatina. O teste de aglutinação em partícula de gelatina foi aplicado inicialmente para a detecção de anticorpos para o vírus linfotrópico humano de células T do tipo I (HTLV-1), o primeiro retrovírus humano descoberto. O teste de aglutinação (Ikeda, 1984) logo tornou-se particularmente popular para a triagem sanguínea de HIV, HBV e HCV, por suas sensibilidade e especificidade elevadas, mais o fato de não ser necessário controle estrito da temperatura para sua realização. A aglutinação de partícula de gelatina pode substituir qualquer ensaio baseado na hemaglutinação, com exceção dos que utilizam eritrócitos nas amostras como partículas.

Aglutinação do látex

A aglutinação em látex (Galvin, 1984), usando partículas de látex, era usada para a detecção de vários analitos, como hCG para testes qualitativos de gravidez, e a detecção quantitativa de outras proteínas plasmáticas, com ou sem instrumentação. O formato desse ensaio qualitativo é simples. Por exemplo, basta misturar algumas gotas de látex marcadas com reagente e a amostra com um bastão em uma lâmina negra. Depois de 2 a 3 minutos, a inversão da fase da aglutinação resultante da imunorreação pode ser observada a olho nu. A aglutinação em látex foi adaptada para ensaios quantitativos usando-se métodos de detecção de luz baseados na turbimetria (absorção de luz) ou na nefelometria (dispersão da luz). Com essas técnicas, a aglutinação no látex consegue maior sensibilidade de subnanogramas por mililitro, enquanto a sensibilidade do ensaio que mede a precipitação intacta do complexo antígeno-anticorpo é inferior a 0,5 µg/mL.

Ensaio turbidimétrico com látex

A adsorção de luz (perda de luz por dispersão sobre a superfície de uma partícula) é proporcional ao diâmetro da partícula e depende do comprimento da onda luminosa utilizada. A maioria dos reagentes de látex disponíveis no comércio usa látex com diâmetro inferior a 1 µm e é aplicada em analisadores químicos automatizados que empregam princípios de estimativa fotométrica. Para melhorar ainda mais a sensibilidade, foram feitas tentativas de aprimorar os reagentes e a instrumentação, bem como otimizar o tamanho da partícula, a seleção do comprimento de onda apropriado e a melhoria do *software* para integração dos dados. Há novos sistemas automatizados que usam partículas de látex e podem realizar cerca de 200 testes por hora com sensibilidade de subnanograma por mililitro.



Fluxo nº	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
Tipos de células acrescentadas	Células não sensibilizadas		Células sensibilizadas										Resultado
Diluição final da amostra de soro		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	Meio de controle	Título
Amostra de soro													
Nº 1	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	Inconclusivo
Nº 2	–	–	++	++	+	+	–	–	–	–	–	–	1:640
Nº 3	–	–	++	++	++	++	++	+	–	–	–	–	1:2560
Nº 4	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	1:160
Nº 5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Negativo
Nº 6	–	–	++	++	++	+	–	–	–	–	–	–	1:640
Nº 7	–	–	++	++	++	++	+	–	–	–	–	–	1:1280
Nº 8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Negativo

* Marca registrada do teste para aglutinação do anticorpo do *T. pallidum*, Fujirebio, Inc., Tóquio, Japão.

Figura 43.6 Padrões de hemaglutinação para a detecção do anticorpo anti-*T. pallidum* (A) e interpretação como positiva ou negativa na diluição sérica final. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

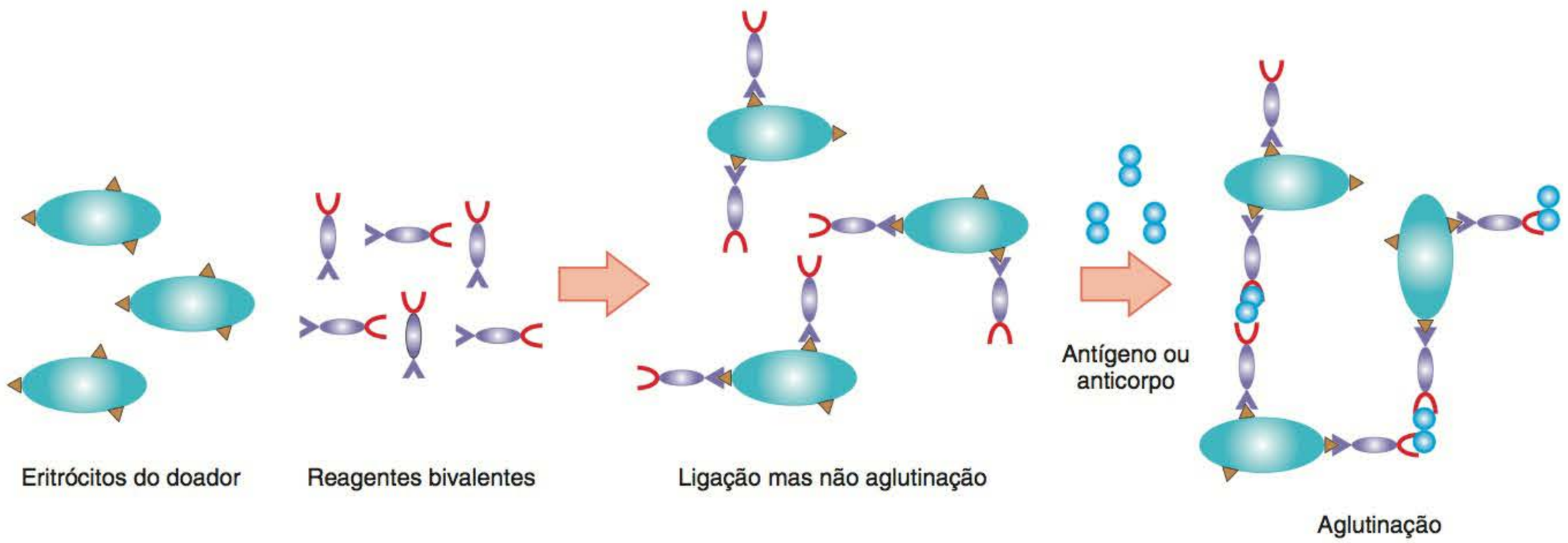
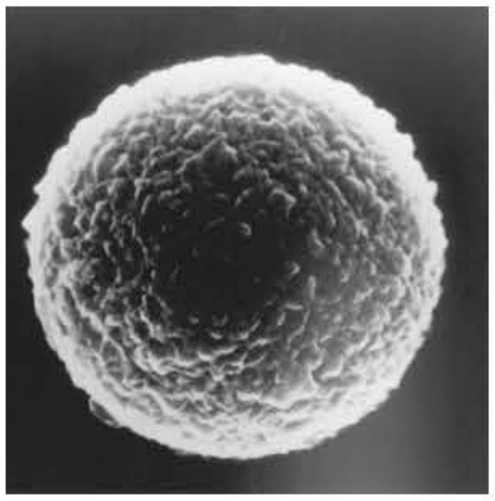


Figura 43.7 Apresentação esquemática de um ensaio baseado na aglutinação de eritrócitos autólogos, usando eritrócitos na amostra como partículas. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)



Propriedades físicas	Carreador	
	Partículas de gelatina	Eritrócitos de carneiro
Diâmetro, µm	2 a 6	6
Densidade	1,05 a 1,10	1,10
Mobilidade eletroforética, µm/s/V/cm	–0,75 a –1,85	–1,15

Figura 43.8 Eletromicrografia (25.000 ×) e propriedades físicas das partículas de gelatina em comparação com eritrócitos de carneiro. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992. pp 139.)

Imunoensaio de contagem de partículas

O imunoensaio por contagem de partículas (Masson, 1986) usa a contagem óptica de células para avaliar a diminuição do número de partículas não aglutinadas após uma imunorreação. No formato de imunoensaio por contagem de partículas, pode-se medir a velocidade do ensaio, ou seja, a taxa de queda no número de partículas não aglutinadas, ou o ponto terminal da reação no ensaio. É possível usar o ponto terminal do ensaio para obter uma sensibilidade no nível de nanograma por mililitro, mas é necessário um tempo maior de incubação para uma reação imunológica com ponto terminal.

Outros imunoensaios com partículas

Foram desenvolvidos imunoensaios de dispersão quase elásticos que utilizam uma estimativa da alteração na resposta à distribuição do tamanho da partícula (Yarmush, 1987). Tal técnica usa um feixe de *laser* para medir a redução no coeficiente médio de difusão de partículas como resultado da imunorreação. Outros métodos medem a alteração na anisotropia angular da luz dispersa com o aumento do tamanho médio da partícula. Partículas com diâmetros quase iguais ao tamanho de um comprimento de onda conseguem uma variação angular dependente do tamanho da luz dispersa.

Resumo

Os testes de hemaglutinação indireta e aglutinação de partícula de gelatina que usam placas de microtitulação tornaram-se procedimentos populares para a determinação qualitativa e semiquantitativa de vários analitos. Esses testes não requerem instrumentação adicional ou controle estrito da temperatura. O mais importante é que garantem uma sensibilidade igual ou maior que a dos imunoensaios enzimáticos convencionais, quando aplicados à detecção de anticorpo de agentes infecciosos. O látex como uma fase sólida tem grandes vantagens cinéticas, como um tempo mais curto de imunorreação. Por essa razão, foi possível adaptá-lo para uso nos instrumentos existentes ou sofisticados aplicando-se diferentes princípios, o que resulta em um ensaio com sensibilidade de cerca de três ordens de magnitude maior do que a dos ensaios de imunoprecipitação tidos como o padrão. O látex é suscetível à interferência de fatores desconhecidos presentes nas amostras. Para eliminar esse problema, têm sido usados vários absorventes tanto no reagente como no meio de incubação. A grande vantagem do imunoensaio com partícula é sua simplicidade, porque não requer a separação de reagentes livres e ligados.

Radioimunoensaio

Fundamentos

Desde que a tecnologia do radioimunoensaio (RIA), usando radioisótopos como indicadores, foi desenvolvida primeiramente por Yalow e Berson (1959), ela melhorou muito em termos de sensibilidade e precisão. Foram feitas inúmeras variações no método no laboratório clínico. Existem duas técnicas principais de RIA, os formatos heterogêneos competitivo e não competitivo, que requerem etapas de lavagem para separar indicadores (conjugados) ligados e livres. O ensaio competitivo segue a lei de ação das massas, que especifica a reação entre analitos e proteínas de ligação, receptores e anticorpos. O fator fundamental para a otimização do ensaio é a afinidade de ligação do anticorpo. O gráfico de Scatchard que mostra a proporção de anticorpo ligado e livre para a concentração do analito é comumente usado para avaliar o desempenho do anticorpo. A Figura 43.9 mostra o gráfico de Scatchard para a determinação da ciclosporina. Como descrito na Cinética da reação antígeno-anticorpo, parte-se da seguinte equação:

$$L/F = K_a([Ab]_t - B),$$

o eixo y é a proporção L/F, que é proporcional à concentração de anticorpo ([Ac]) livre a partir de [Ac]t – L, igual à concentração de antígeno ([Ag]) livre. Portanto, *K*a representa a inclinação do gráfico. Nessa figura, a constante de afinidade K_a é de $8{,}1 \times 10^9$ L/M para o anticorpo específico da ciclosporina. Emissões radioativas, como de raios gama de indicadores iodo-125, podem ser medidas em termos de contagens por minuto (CPM), usando-se um contador de cintilação gama. Os radioisótopos típicos usados como indicadores e suas propriedades são mostrados na Tabela 43.3. A escolha do indicador afeta consideravelmente o protocolo do ensaio. Por exemplo, o indicador mais popular, o iodo-125, requer um tempo mais curto para a contagem do sinal, mas tem duração limitada por causa de sua curta meia-vida. No entanto, o indicador trício (^{3}H) requer um tempo maior para contagem, aumentando assim o tempo total do ensaio. A maioria dos RIAs agora usa iodo-125 como indicador para acelerar o processo de conjugação e reter a atividade biológica dos reagentes. Um método

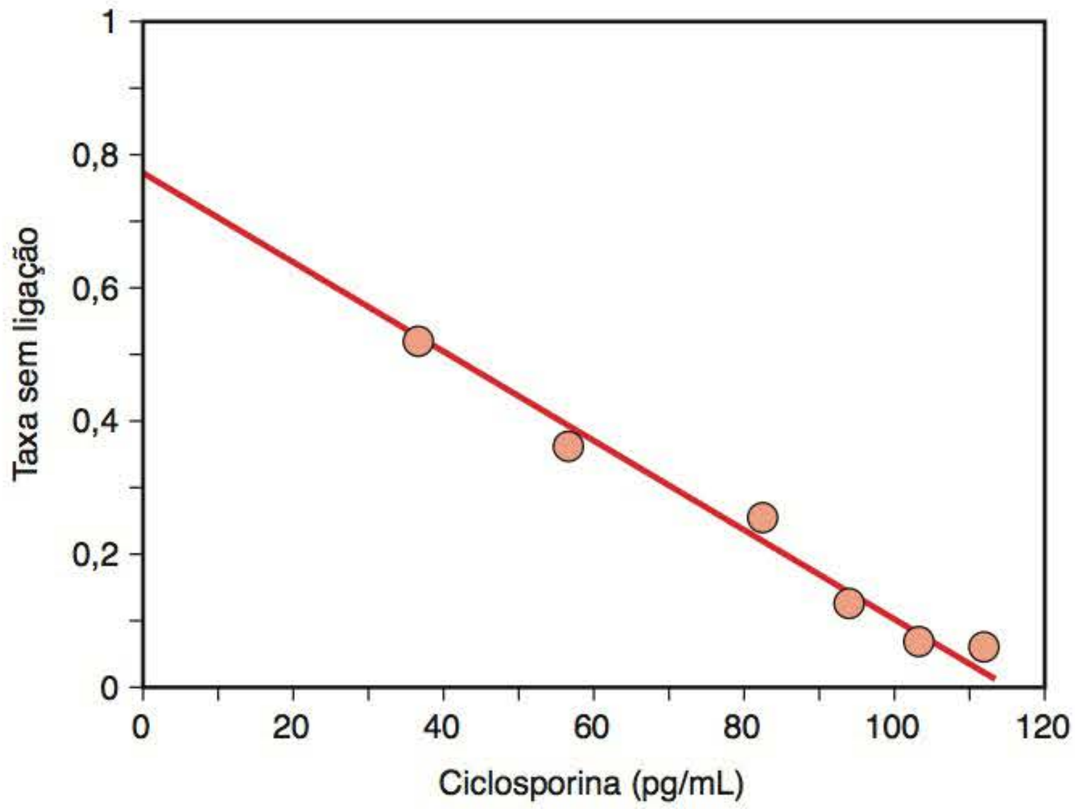


Figura 43.9 Gráfico de Scatchard das características de ligação do anticorpo com a ciclosporina ($K_a = 8{,}1 \times 10^9$ L/M).

Tabela 43.3 Propriedades dos radioisótopos usados como indicadores para radioimunoensaios

Isótopo	Meia-vida	Tipo de decaimento	Atividade específica (mCi/mmol)
Iodo-125	60 dias	γ	2.200
Iodo-131	8,1 dias	β^-, γ	16.100
Hidrogênio-3	12,3 anos	β^-	29
Carbono-14	5.760 anos	β^-	6.062
Fósforo-32	14,3 dias	β^-	9.120

de uso comum para a conjugação do iodo-125 com proteínas é o da cloramina-T (Hunter, 1962). A tirosina, em particular, tem mais reatividade com o iodato por causa de seu grupo hidroxi na paraposição do anel aromático. O sinal pode ser medido em termos de CPM como emissão de raios gama. Ao contrário das enzimas, não é provável que isótopos como indicadores com um pequeno rádio Stokes atrapalhem a atividade antigênica por causa da falta de obstáculo estérico quando os isótopos são conjugados com pequenos antígenos (haptenos).

Princípios e métodos de ensaio

Foram desenvolvidos vários métodos (excesso de antígeno) baseados na reação de ligação competitiva (Ekins, 1960) a anticorpos entre antígenos marcados e não marcados (analitos presentes na amostra) para uma ampla variedade de analitos. Um método competitivo tradicional é mostrado na Figura 43.10. Primeiro, mistura-se uma quantidade conhecida de antígeno marcado e antígeno na amostra e deixa-se que reajam de forma competitiva com uma quantidade constante de anticorpo revestida em uma fase sólida, como contas de sefarose ou a parede interna de tubos plásticos. Após a reação imune alcançar seu equilíbrio, a mistura é lavada para remoção de conjugados não tratados e antígenos, e o complexo imune aprisionado na fase sólida é separado. A etapa de lavagem é conhecida como separação L/F (ligado sobre livre). Aplicando-se o princípio competitivo, o gráfico da porcentagem de antígeno ligado contra a concentração logarítmica do analito resulta na curva padrão mostrada na Figura 43.10. O gráfico da CPM na curva padrão dá a concentração dos analitos.

Um segundo método de anticorpo é exposto na Figura 43.11. O primeiro anticorpo específico contra um antígeno particular (analito) reage de forma competitiva com o conjugado e o antígeno. Então, o imunocomplexo é capturado pelo segundo anticorpo específico para o primeiro anticorpo, na fase sólida. Quando o segundo anticorpo é revestido com uma fina fase sólida, o imunocomplexo na segunda reação pode ser separado como um precipitante das moléculas que não reagiram. Para determinação do anticorpo, o anticorpo marcado e o anticorpo na amostra reagem de forma competitiva com o antígeno (analito) fixado na fase sólida. A curva íngreme da curva padrão fornece dados mais precisos. Os métodos competitivos requerem menor quantidade de anticorpo ou antígeno (analito) do que para ensaios do tipo sanduíche descritos adiante. Recentemente, os ensaios não competitivos, originalmente demonstrados por Miles (1968), tornaram-se populares.

Os ensaios imumorradiométricos ou sanduíche (Fig. 43.12) têm uma relação alternativa entre o analito e o anticorpo. O ensaio competitivo clássico consegue uma resposta imunológica com quantidade mínima de anticorpo, e o ensaio sanduíche usa uma grande quantidade de anticorpo na fase sólida. A tecnologia do anticorpo monoclonal possibilitou a elaboração de grandes quantidades de anticorpos específicos a custos moderados, permitindo assim explorar o ensaio sanduíche, que usa um excesso estequiométrico de anticorpo e é mais sensível que o ensaio competitivo. Quando o ruído de fundo é completamente omitido, a sensibilidade final teórica do ensaio sanduíche é uma molécula de analito, possível quando a quantidade de anticorpo usada no sistema de ensaio aproxima-se do infinito. Como mostrado na Figura 43.12, o anticorpo na fase sólida primeiro captura o antígeno (analito) na amostra. Após separação L/F, o conjugado reage com o antígeno (analito) fixado na fase sólida, e o sinal pode então ser contado após a eliminação dos conjugados livres em uma etapa de lavagem. Esse ensaio requer antígenos com mais de dois sítios antigênicos. Quando são usados dois anticorpos diferentes (i. e., um anticorpo de fase sólida específico para um sítio antigênico e um anticorpo conjugado específico para o outro sítio antigênico), o protocolo do ensaio pode ser simplificado fazendo-se um sanduíche de uma etapa. Assim, o anticorpo da fase sólida pode misturar-se ao antígeno na amostra e ao conjugado simultaneamente. Não ocorre interferência porque os anticorpos da fase sólida e do conjugado são ambos capazes de reconhecer sítios antigênicos diferentes. Nesse ensaio, o sinal gerado é proporcional à concentração de analito presente na amostra, como no ensaio sanduíche em duas etapas. Esse método de ensaio pode ser aplicado à detecção de anticorpo com um formato de ensaio que emprega antígeno como a fase sólida e antígeno marcado. Para o formato em duas etapas, a sensibilidade do ensaio é alta (Rodriguez-Espinosa, 1987). Um exemplo é usar o ensaio imunorradiométrico para a determinação do hormônio peptídico estimulante da tireoide (TSH); o nível de sensibilidade do ensaio é inferior a 0,07 μU/mL de TSH, comparado ao valor de aproximadamente 0,7 μU/mL no ensaio competitivo convencional com antígeno marcado.

Resumo

Em comparação com outros imunoensaios, os RIAs são vantajosos por várias razões: (1) precisão e alta sensibilidade, (2) facilidade de conjugação do isótopo, (3) detecção do sinal sem otimização e (4) estabilidade contra interferência do ambiente do ensaio, entre outras. As desvantagens dos RIAs são a curta meia-vida dos reagentes e a necessidade de proteção contra radioatividade perigosa. Além disso, conforme discutido adiante, os RIAs não podem ser aplicados a imunoensaios homogêneos, porque os sinais de isótopos não podem modular as reações antígeno-anticorpo.

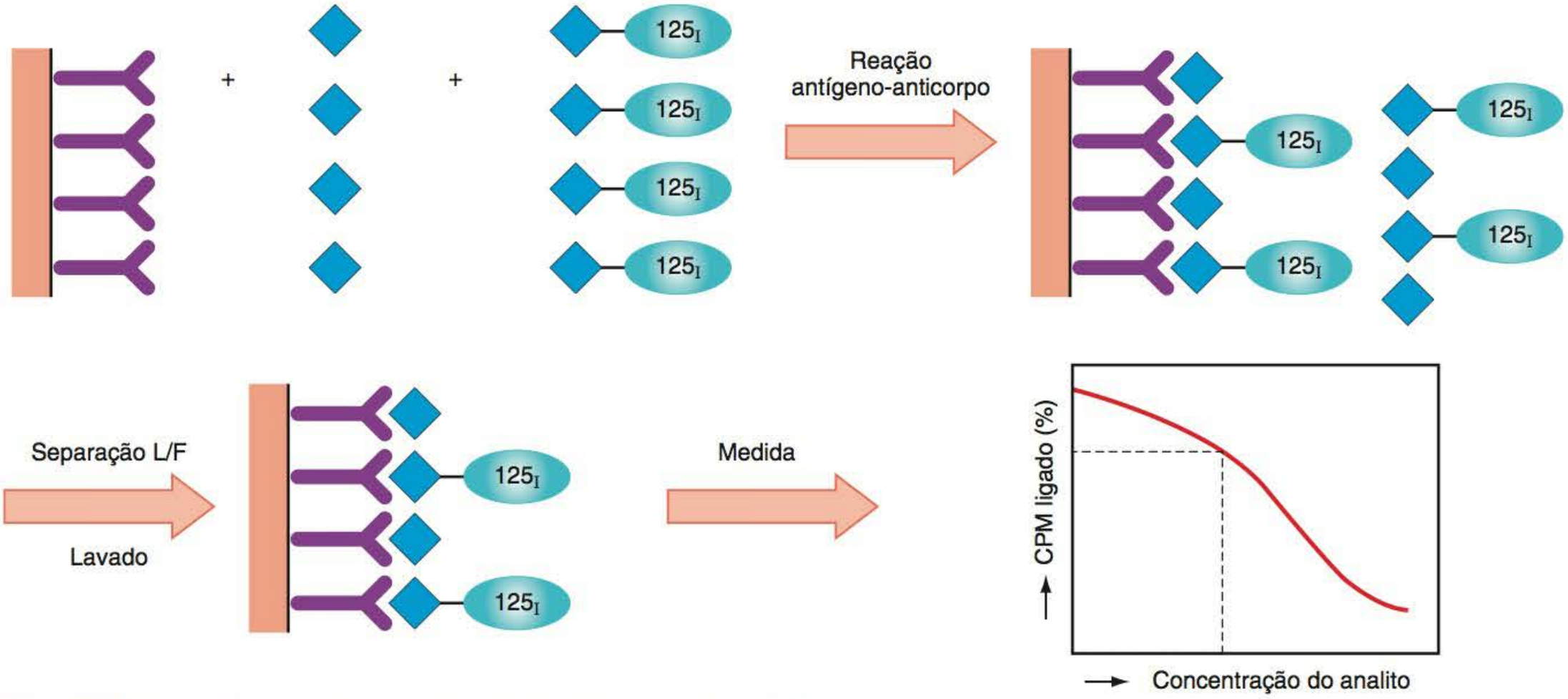


Figura 43.10 Princípio do RIA competitivo usando o primeiro anticorpo como fase sólida.

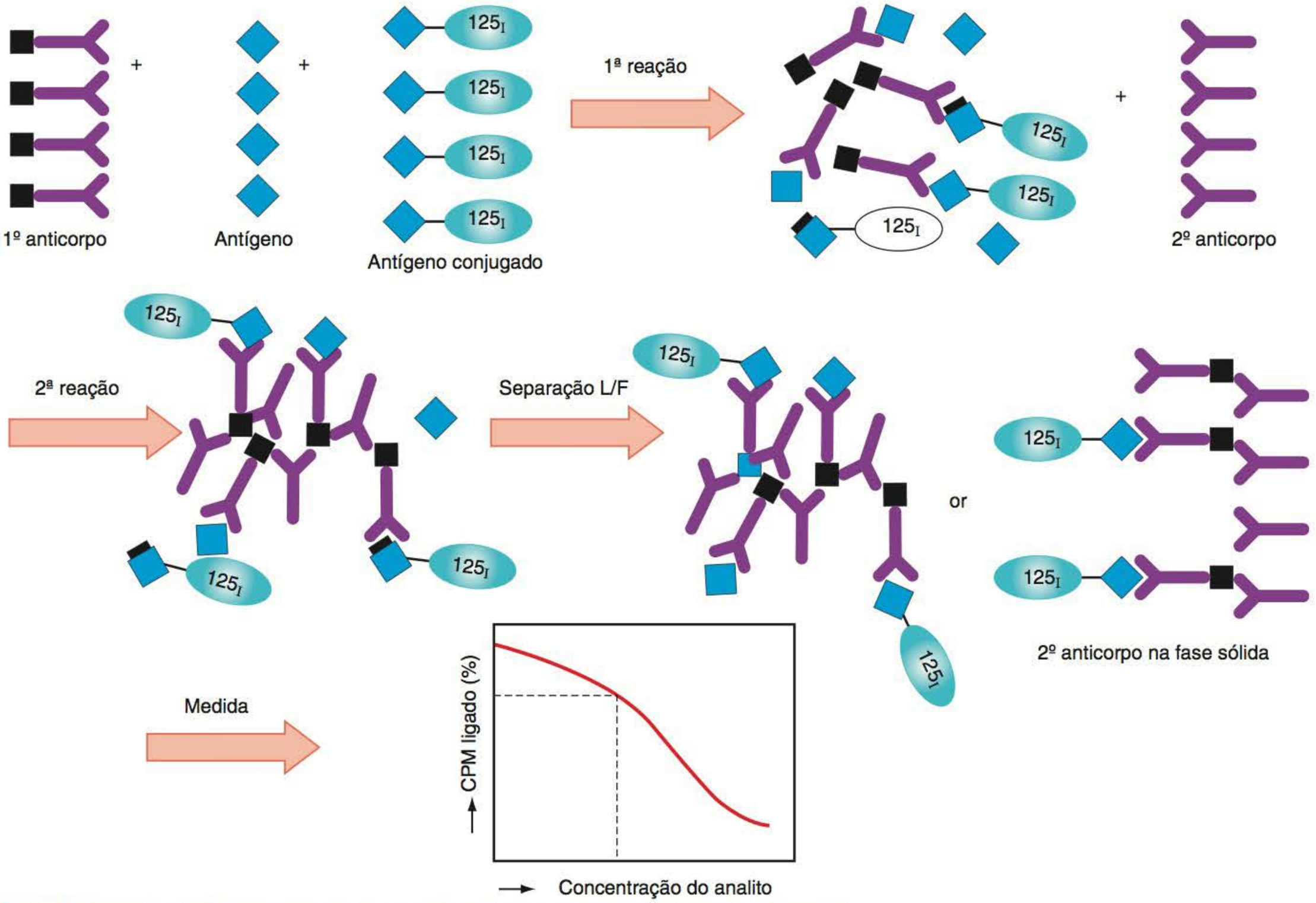


Figura 43.11 Princípio do RIA competitivo usando o segundo anticorpo para separação entre ligados e livres (L/F).

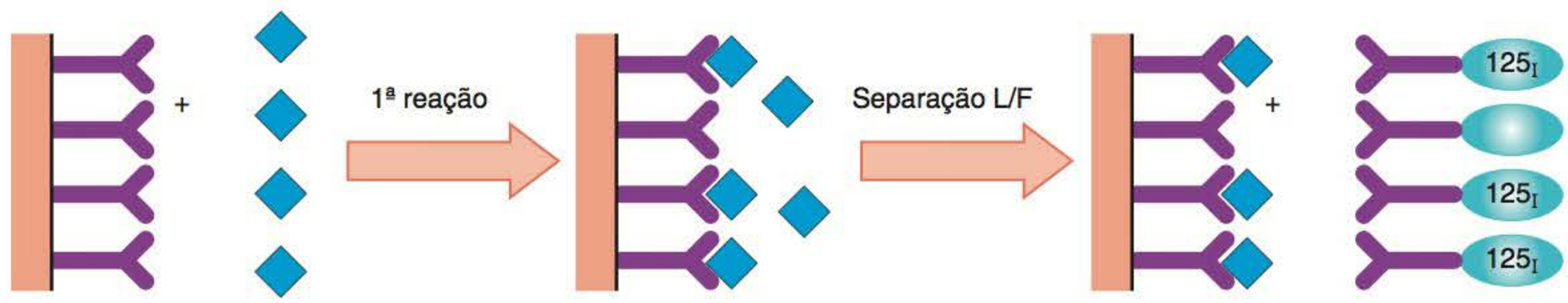


Figura 43.12 Princípio do RIA sanduíche usando fase sólida, também conhecido como ensaio imunorradiométrico. B/F = ligados/livres.

Imunoensaio enzimático

Fundamentos e classificação

Foram desenvolvidos imunoensaios quantitativos usando enzimas como indicadores como uma alternativa para os radioisótopos (Avrameas, 1971; Engvall, 1971; Van Weeman, 1971). Os de uso mais disseminado são o ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA, *enzyme-linked immunoabsorbent assay*), o EIA e a técnica de imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT, *enzyme-multiplied immunoassay technique*), registrada com o nome comercial de SYVA Co. (Dade Behring Inc., Cupertino, CA) (Rubenstein, 1972). Essencialmente, os EIAs heterogêneos são bastante semelhantes aos RIAs, exceto por serem usadas enzimas como indicadores. As enzimas tornam possível desenvolver EIAs homogêneos, eliminando as etapas de lavagem que, de outro modo, tornam-se necessárias para a separação L/F. Na Tabela 43.4 há uma comparação dos aspectos dos EIAs heterogêneos e homogêneos com os RIAs. Aprimoramentos nos EIAs forneceram

Tabela 43.4 Comparação entre o radioimunoensaio, o imunoensaio enzimático heterogêneo e o imunoensaio enzimático homogêneo

Ensaio	Etapas da reação imunológica	Etapas da reação enzimática	Etapas de detecção do sinal
Radioimunoensaio			
Amostra + (Analito ou Ac marcado)-^{125}I	Imunorreação com etapas de lavagem para separação	Não necessárias	Decaimento radioativo (raios γ)
Imunoensaio enzimático heterogêneo			
Amostra + (Analito ou Ac marcado)-enzima	Imunorreação com etapas de lavagem para separação	Reação enzimática com reagente adicional	Densidade óptica: Fluorescência Luminescência
Imunoensaio enzimático homogêneo			
Amostra + (Analito ou Ac marcado)-enzima ou cofatores	A imunorreação e/ou reação sistêmica é feita em uma solução, que inclui reagente para desenvolvimento do sinal enzimático	A imunorreação e/ou reação sistêmica é feita em uma solução, que inclui reagente para desenvolvimento do sinal enzimático	Densidade óptica: Fluorescência Luminescência

muitos formatos com graus diferentes de velocidade, sensibilidade, simplicidade e precisão. As contagens e desvantagens dos EIAs estão relacionadas na Tabela 43.5 (Nakamura, 1992a).

Imunoensaios enzimáticos heterogêneos

O princípio de ensaio dos EIAs heterogêneos é semelhante ao dos RIAs, exceto pelo fato de que a atividade enzimática, e não a radioatividade, é medida. Os EIAs requerem um processo secundário para obter sinais por meio da reação catalítica das enzimas. Como a fase sólida para a separação de conjugados ligados e livres, podem ser usados placas de microtitulação, contas de plástico, partículas magnéticas e filtros de látex, entre outros recursos. O uso de pequenas partículas magnéticas e látex encurta o tempo da imunorreação, reduzindo assim o tempo total do ensaio. O desenvolvimento de substratos para serem clivados por enzimas foi marcado pela introdução de substratos colorimétricos e fluorométricos, e por fim dos quimioluminiscentes, que aumentaram a sensibilidade do sinal. As enzimas comumente usadas nos EIAs heterogêneos são a peroxidase da raiz forte, a fosfatase alcalina, a β-galactosidase, a oxidase da glicose, urease e catalase. As enzimas mais usadas e suas características estão relacionadas na Tabela 43.6. Ensaios de sensibilidade que usam enzimas podem ser determinados pela velocidade de renovação de cada enzima e pela seleção do sinal medido em que a quimioluminiscência é o método mais sensível.

O formato do ensaio de EIAs heterogêneos, como os RIAs, pode ser dividido em competitivo e não competitivo (ver Fig. 43.13). Os ensaios competitivos (com excesso de analito) usam conjugados de antígeno com enzima (Fig. 43.13*A*), enquanto os não competitivos (com excesso de reagentes) incluem ensaios imunométricos do tipo sanduíche com dois sítios e os ensaios indiretos para medir anticorpos (Figs. 43.13*B* e *C*). Ultimamente, os ensaios imunométricos do tipo sanduíche têm ganhado popularidade como métodos de determinação de antígenos, como hormônios, marcadores tumorais, proteínas plasmáticas e agentes infecciosos. Os ensaios indiretos para medida de anticorpo (Fig. 43.13*C*) foram adotados para a detecção de anticorpos contra agentes infecciosos (p. ex., HIV, HBV, HCV) e para autoanticorpos.

Os EIAs heterogêneos (Fig. 43.13) consistem nas seguintes etapas:

1. os reagentes da fase sólida aderidos são misturados com analito, seja no ensaio de formato competitivo ou não competitivo;
2. após o acréscimo de conjugado e incubação, vêm as etapas de lavagem com uma solução tampão contendo detergente, uma ou duas etapas após a imunorreação, que deve alcançar certos resultados para se obter um ensaio estável e preciso;

Tabela 43.5 Vantagens e desvantagens do imunoensaio enzimático

A. Vantagens
1. Ensaios sensíveis podem ser desenvolvidos pela amplificação do efeito de enzimas.
2. Os reagentes são relativamente baratos e podem ter um prazo de validade longo.
3. Múltiplos ensaios simultâneos podem ser desenvolvidos.
4. Uma ampla variedade de configurações de ensaios pode ser desenvolvida.
5. O equipamento pode ser barato e encontra-se amplamente disponível.
6. Não há risco de radiação durante a marcação ou o descarte dos resíduos.
B. Desvantagens
1. A estimativa da atividade enzimática pode ser mais complexa que a da atividade de alguns tipos de radioisótopos.
2. A atividade enzimática pode ser afetada por constituintes plasmáticos.
3. Ensaios homogêneos no momento têm sensibilidade de 10^{-9} M, não sendo tão sensíveis como os radioimunoensaios.
4. Foram desenvolvidos EIAs homogêneos para grandes moléculas de proteína, mas requerem reagentes imunoquímicos complexos.

EIA, imunoensaio enzimático.

Fonte: com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y: Heterogeneous enzyme immunoassays. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992, pp 149–167.

Tabela 43.6 Características das enzimas típicas usadas como indicadores para imunoensaio enzimático

Características	Peroxidase (EC1.11.1.7)	Enzima β-Galactosidase (EC3.2. 1.23)	Fosfatase alcalina (EC3.1.3.1)
Fonte	Raiz forte	*E. coli*	Intestino bovino
Peso molecular (daltons)	40.000	530.000	100.000
Atividade específica	250 U/mg	600 U/mg	25.000 U/mg
Velocidade de renovação*	10.000	318.000	250.000
Medida da enzima	Colorimetria, fluorometria, luminometria	Colorimetria, fluorometria, luminometria	Colorimetria, fluorometria, luminometria
Estimativa altamente sensível	Luminometria	Fluorometria	Luminometria
Método para marcação enzimática	Oxidação do periodato (método Nakane)	Método da dimaleimida, reagente† com ligação cruzada	Método do glutaraldeído, reagente com ligação cruzada

* O número de moléculas de substrato produzidas por uma molécula de enzima para reação em um minuto; número de moléculas/min.

† O reagente contém grupos quimicamente reativos, como maleimida e succinimida.

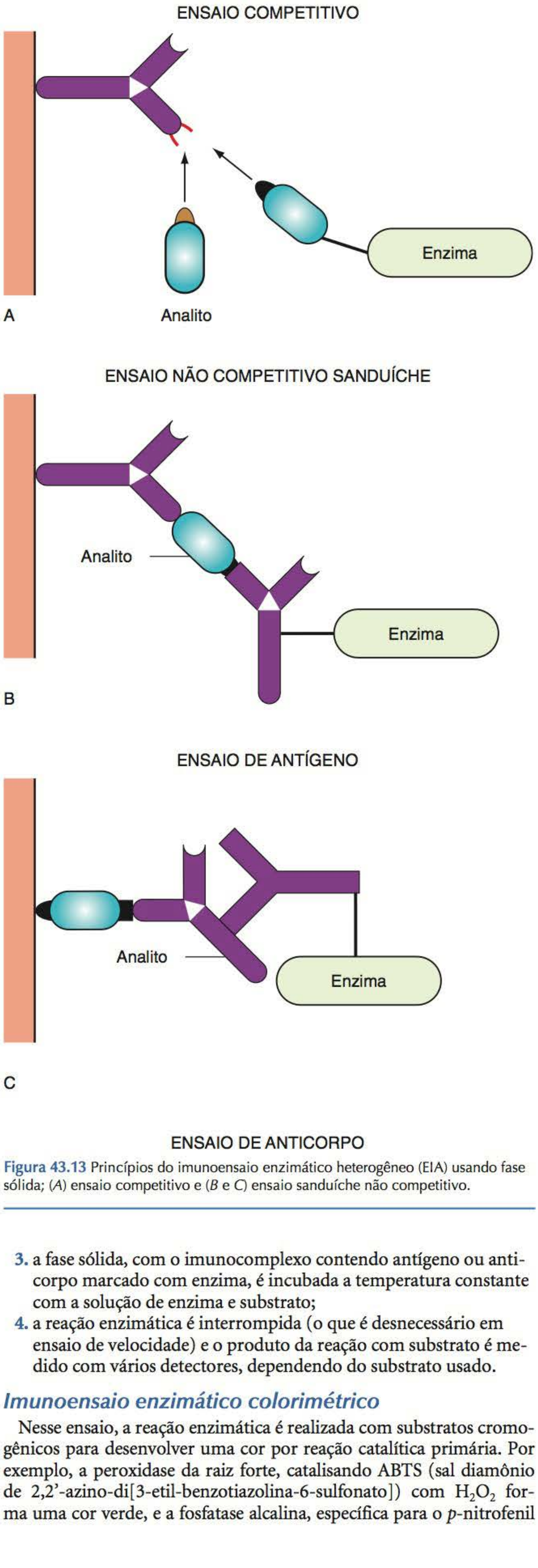


Figura 43.13 Princípios do imunoensaio enzimático heterogêneo (EIA) usando fase sólida; (*A*) ensaio competitivo e (*B* e *C*) ensaio sanduíche não competitivo.

3. a fase sólida, com o imunocomplexo contendo antígeno ou anticorpo marcado com enzima, é incubada a temperatura constante com a solução de enzima e substrato;
4. a reação enzimática é interrompida (o que é desnecessário em ensaio de velocidade) e o produto da reação com substrato é medido com vários detectores, dependendo do substrato usado.

Imunoensaio enzimático colorimétrico

Nesse ensaio, a reação enzimática é realizada com substratos cromogênicos para desenvolver uma cor por reação catalítica primária. Por exemplo, a peroxidase da raiz forte, catalisando ABTS (sal diamônio de 2,2'-azino-di[3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato]) com H_2O_2 forma uma cor verde, e a fosfatase alcalina, específica para o *p*-nitrofenil fosfato, forma uma cor amarela. Ambas as enzimas são os tipos mais comumente usados de imunoensaio colorimétrico. Usa-se um espectrofotômetro para medir a densidade óptica do cromógeno resultante. Dispõe-se de muitos instrumentos para medir a densidade óptica em tubos ou placas de microtitulação, desde um sistema totalmente automatizado que pipeta as amostras e imprime os dados, até dispositivos manuais mais simples. Quando a reação do EIA é realizada na membrana de nitrocelulose (método do *Western blotting*) ou em outras membranas, são utilizados substratos que geram corantes insolúveis. Um teste de gravidez com hCG no formato de imunoensaio é vendido sem prescrição e usa derivados da benzidina para reagir com peroxidase ou derivados do indoxil fosfato para reagir com fosfatase alcalina e gerar corantes insolúveis. O acúmulo de corante na fase sólida por meio da reação enzimática pode ser visto a olho nu. Teoricamente, a medida da densidade óptica é limitada a uma faixa entre 0 e 2. Portanto, a determinação da densidade óptica para analitos que requerem a determinação de uma ampla faixa dinâmica é problemática, mesmo quando uma quantidade excessiva de conjugado e fase sólida com suficiente capacidade de captura é usada em um ensaio do tipo sanduíche.

As tentativas de aprimorar os EIAs, a pedra fundamental dos imunoensaios não isotópicos, trouxeram à luz várias desvantagens dos RIAs, como o perigo do desgaste isotópico, a radiólise de analitos marcados e a curta meia-vida do iodo-125. Ishikawa (1989) desenvolveu uma EIA ultrassensível capaz de detectar 3 fmol de anticorpo IgG específico. Porém, para conseguir esse nível de especificidade, são necessárias várias etapas entediantes, como a transferência de imunocomplexo de uma primeira fase sólida para outra fase sólida, para reduzir os sinais de fundo.

Imunoensaio enzimático fluorescente

Os EIAs fluorescentes são idênticos a outros EIAs, exceto pelo uso de substratos fluorescentes. No EIA fluorescente, um fluoróforo é gerado por uma reação enzimática. Após excitação do fluoróforo em seu comprimento de onda luminosa ótimo, é emitida luz com um comprimento de onda característico. Instrumentos como um fluorômetro requerem tanto um fornecedor da fonte de excitação luminosa como um tubo fotomultiplicador como detector da emissão de fluorescência. Pode haver substâncias que emitam luz fluorescente na amostra. Tais substâncias podem aumentar o sinal de fundo, o que pode interferir na sensibilidade do ensaio. Assim, é preciso muita atenção com a seleção de substratos para EIAs, para evitar esses fatores de interferência. Em comparação com os EIAs colorimétricos, os ensaios fluorescentes geram uma intensidade de sinal pelo menos uma ordem de magnitude maior.

Imunoensaio enzimático quimioluminescente

Os imunoensaios enzimáticos quimioluminescentes (CL-EIA, na sigla em inglês) usam substratos quimioluminescentes que reagem com várias enzimas empregadas como indicadores. A reação enzimática quimioluminescente gera luz, similar à bioluminescência, e envolve o uso de substratos naturais como luciferina-trifosfato de adenosina (ATP). Nos últimos 20 anos, deu-se muita atenção à aplicação da quimioluminescência nos imunoensaios, tendo sido desenvolvida uma variedade de sistemas consistindo em substratos e enzimas. Os sistemas atuais que usam derivados do luminol a peroxidase, com um facilitador ou derivados do dioxetano a fosfatase alcalina, conseguem imunoensaios altamente sensíveis. Esses ensaios são instrumentos efetivos para o diagnóstico prático. A reação de oxidação enzimática de análogos do luminol é usada há muito tempo para CL-EIA. O emprego de peroxidase com H_2O_2 é um método comum, intercambiável com uma enzima de acoplamento alternativa que produz H_2O_2, como glicose oxidase ou uricase. A descoberta de facilitadores por Thorpe (1985) para quimioluminescência baseada no luminol melhorou notavelmente a sensibilidade do ensaio. Os facilitadores incluem derivados do fenol e compostos aromáticos. Por exemplo, a luminol-peroxidase com *p*-iodofenol como facilitador atinge um amostra da emissão de luz até de 2.800 vezes na reação otimizada da mistura. Esse ensaio é capaz de detectar TSH em 0,04 µU/mL usando soro como amostra. No entanto, é provável que reações oxidativas, como as do luminol, sofram interferência de múltiplos fatores que causam aumento dos sinais de fundo (ruídos) inespecíficos.

Bronstein (1989a) desenvolveu um substrato quimioluminescente para a fosfatase alcalina que difere consideravelmente de outros com-

postos, conhecido como AMPPD (dissódio 3-(4-metilespiro-[1,2-dioxetano-3,2'-triciclo-[3.3.1.1]decano]-4-il) fenil fosfato). Trata-se de um derivado do adamantil dioxetano, que não requer moléculas adicionais para a emissão de luz quimioluminescente, ao contrário do luminol, que precisa de compostos oxidativos além de moléculas de luminol. O AMPPD é uma nova molécula que é um substrato completo porque é composta do grupo adamantil como um estabilizador de toda a molécula, da ligação dioxetano como uma fonte de energia, do fosforil éter como um local de clivagem da enzima, e de um grupo fenil para quimioluminescência, todos montados dentro de uma molécula. A estrutura da molécula e o processo da reação para a geração de luz são mostrados na Figura 43.14. A clivagem da ligação fosfoéster do AMPPD pela fosfatase alcalina dispara a luminescência iniciada quimicamente pela troca de elétrons (CIEEL) ao liberar dioxetano rico em elétrons. Uma quimioluminescência com comprimento de onda máximo de 477 nm pode ser detectada em questão de minutos a horas, dependendo da concentração de substrato. O sistema de ensaio com fosfatase alcalina e AMPPD tem sensibilidade inferior a 10 a 21 mol (Bronstein, 1989b, 1991; Kricka, 1991).

O CL-EIA usa AMPPD como substrato para reagir com fosfatase alcalina, que é usada como a enzima indicadora. O CL-EIA pode ser feito em um instrumento totalmente automatizado. Esse novo substrato possibilitou o desenvolvimento de um sistema de imunoensaio enzimático quimioluminescente extremamente sensível. Partículas de ferro de 0,3 μm de diâmetro empregadas como a fase sólida encurtam o tempo da imunorreação para 30 minutos e fornecem uma área superficial maior para imunoabsorção. A relação entre o sinal quimioluminiscente e a concentração dos analitos é linear até sete ordens de variação dinâmica. A sensibilidade do CL-EIA (Nishizono, 1991) foi 10 vezes maior do que a dos RIAs convencionais quando se analisou AFP; a AFP foi detectada no nível de 30 pg/mL com um tempo de ensaio de 30 minutos. Portanto, os novos sistemas de ensaio quimioluminiscente são um aprimoramento definitivo sobre os RIAs em termos de sensibilidade, eficiência de tempo e simplicidade do procedimento, sendo cada vez mais populares no mercado.

Imunoensaios enzimáticos homogêneos

Fundamentos

Há duas opções para eliminar procedimentos de ensaio entediantes. Um é projetar instrumentos completamente automatizados para avaliar tipos heterogêneos de reagentes, e o outro é desenvolver reagentes inovadores que não requeiram as complicadas etapas de lavagem, como necessárias nos EIAs heterogêneos. Enzimas e seus cofatores são indicadores vantajosos nos EIAs homogêneos, porque a atividade enzimática pode ser modulada facilmente mudando-se os fatores no microambiente da área Ag-Ac. Não é esse o caso quando se usa decaimento de radioisótopo como o sinal. No momento, os EIAs homogêneos em geral são menos sensíveis que suas contrapartes heterogêneas. Os EIAs heterogêneos convencionais têm sensibilidade igual à dos RIAs em muitas aplicações, enquanto os EIAs homogêneos (Nakamura, 1988) continuam uma ou duas ordens de magnitude menos sensíveis que os RIAs. Os EIAs homogêneos podem requerer reagentes imunoquímicos complexos, mas os sistemas de ensaio são rápidos e simples, além de adaptáveis aos instrumentos convencionais. Há vários tipos de EIA homogêneos. Em cada um desses ensaios, a interação antígeno-anticorpo modula a atividade da enzima ou do indicador enzimático na presença do substrato. A modulação da atividade enzimática reflete o grau da reação imunoquímica. Na Tabela 43.7 há uma lista das características dos EIAs homogêneos típicos. Eles podem ser classificados como ensaios de ligação competitivos ou não competitivos. Em geral, os competitivos consistem em antígenos marcados por enzimas. Contudo, o antígeno (analito) pode estar conjugado com o substrato ou um grupo prostético da enzima em outros formatos de ensaio. Em contraste, os ensaios de ligação não competitivos usam um conjugado de anticorpo marcado com enzima. Entre os vários métodos relatados, cinco EIAs homogêneos merecem nossa atenção.

Técnica de imunoensaio multiplicado por enzima

O EMIT, o primeiro EIA homogêneo, foi desenvolvido por Rubenstein (1972). O sistema EMIT está ilustrado na Figura 43.15. No EMIT, a conjugação de enzimas a haptenos não interrompe a atividade enzimática, mas a ligação de anticorpos específicos de haptenos resulta na inibição da atividade enzimática. Haptenos livres no padrão ou

Tabela 43.7 Classificação e características dos imunoensaios enzimáticos homogêneos típicos

Nome e tipo de ensaio	Conjugado	Maneira de modulação
Competitivo		
EMIT	Antígeno com lisozima, G6PD	Obstrução estérica
SLFIA	Antígeno com substrato	Obstrução estérica
ARIS	Antígeno com grupo protético	Obstrução estérica
Imunoensaio enzimático de canal	Antígeno com G6PDH e hexocinase	Acentuado por proximidade
Imunoensaio enzimático com biotina-avidina	Antígeno com avidina	Obstrução estérica
CEDIA	Antígeno com fragmentos de	Obstrução estérica
Não competitivo		
Imunoensaio com anticorpo híbrido	Anticorpos híbridos específicos para o antígeno e para o inibidor	Obstrução estérica
Imunoensaio de ligação proximal	Anticorpo com G6PDH e hexocinase	Substrato em cascata por proximidade
EIHIA	Anticorpo com amilase	Obstrução estérica
Imunoensaio enzimático facilitado	Anticorpo com β-galactosidase e anticorpo succinil	Efeito de carga
AEST	Anticorpo com peroxidase	Estabilização

G6PD = glicose-6-fosfato desidrogenase

Negrito indica que o nome da enzima é derivado dela e a enzima é discutida em detallhe no texto.

Fonte: com permissão de Kasahara Y: Homogeneous enzyme immunoassays. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992, pp 169–182.

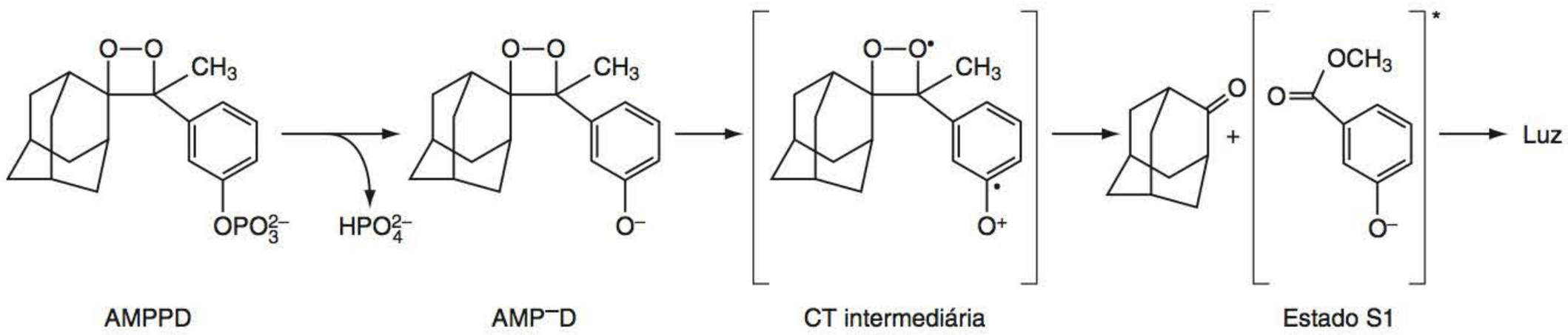


Figura 43.14 Adamantil 1,2-dioxetano fenil fosfato (AMPPD), substrato quimioluminescente para a detecção de fosfatase alcalina (ALP). A clivagem hidrolítica do fosfato pela ALP dispara a luminescência da troca de elétrons iniciada quimicamente (CIEEL) pela decomposição do AMPPD ao liberar o fenolato de dioxetano rico em elétrons (AMP-D). A transferência de carga do fenolato para o anel dioxetano tem lugar com a formação do intermediário da transferência de carga (CT) e o desdobramento subsequente do peróxido cíclico. Há liberação de energia com a emissão de luz.

na amostra liberam essa inibição ao competirem com os anticorpos. Assim, a atividade enzimática é proporcional à concentração de haptenos livres. Como regra geral, o anticorpo inibe a enzima induzindo ou impedindo as alterações conformacionais necessárias para a atividade enzimática (Rowley, 1975). A exceção ao mecanismo de inibição é o EMIT para tiroxina, em que se usa malato desidrogenase. Nesse ensaio, o conjugado malato desidrogenase com tiroxina é enzimaticamente inativo, mas torna-se ativo quando se liga ao anticorpo da tiroxina (Ullman, 1979). Acredita-se que a tiroxina conjugada inibe a enzima ao "puxar" a tiroxina do local ativo, aumentando assim a K_m "aparente" do substrato. O anticorpo reativa a enzima ao "puxar" a tiroxina do local ativo. No sistema de ensaio EMIT, descobriu-se que a malato desidrogenase e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) são mais úteis por serem menos propensas a ser afetadas pelos constituintes séricos. Esses ensaios em geral medem fármacos na concentração de miligramas por litro. Todavia, o ensaio para digoxina tem um limite de sensibilidade muito menor, na faixa de 0,8 a 2 μg/L.

Imunoensaio fluorescente com substrato marcado

O imunoensaio fluorescente com substrato marcado (IEFMS) (Burd, 1977) usa um substrato fluorescente característico, o umbeliferil β-galactosídeo, aderido ao antígeno (analito) como um conjugado. A umbeliferona é o produto fluorescente produzido quando o substrato é clivado com β-galactosidase. A enzima β-galactosidase não pode clivar o complexo substrato-antígeno quando ele reage com o anticorpo específico. O antígeno livre (analito) na solução da amostra compete com o antígeno conjugado com o substrato para formar o imunocomplexo (Fig. 43.16). A concentração de antígeno na amostra é proporcional à intensidade da fluorescência do produto fluorescente clivado. O IEFMS pode ser usado para ensaios com fármacos ou haptenos, bem como ligandos de proteínas como IgG e IgM. Uma desvantagem desse método é que as propriedades de amplificação da enzima não são utilizadas e, assim, o sistema de ensaio tem sensibilidade limitada na faixa de 10^9 a 10^{10} a concentração molar do analito.

Imunoensaio de reativação com apoenzima

O imunoensaio de reativação com apoenzima (ARIS, *apoenzyme reactivation immunoassay*) é um ensaio homogêneo desenvolvido por Morris (1981). Nesse ensaio é empregado um grupo protético que consiste no antígeno (analito) conjugado ao dinucleotídeo flavina adenina (FAD) e a apoenzima glicose oxidase. Conforme mostrado na Figura 43.17, o antígeno e uma quantidade constante de conjugado analito-FAD competem por uma quantidade limitada de anticorpo específico. Em equilíbrio, o nível de conjugado livre é proporcional à quantidade de antígeno na amostra. A apoenzima combina-se à forma livre, mas não à forma ligada do conjugado, para reativar a atividade da glicose oxidase proporcionalmente à quantidade de conjugado livre existente na mistura. A enzima ativa é gerada no procedimento e um mecanismo de amplificação também é elaborado nesse ensaio. O ARIS foi usado para avaliar a teofilina e IgG (Morris, 1981; 1985). Esse ensaio conjugado marcado com FAD é prontamente adaptado para medir proteínas de alto peso molecular (p. ex., globulina de ligação da tireoide) (Schroeder, 1985), bem como outros haptenos como a fenitoína e hormônios.

Imunoensaio enzimático homogêneo inibitório

O imunoensaio enzimático homogêneo inibitório (EIHIA, *enzyme inhibitory homogeneous immunoassay*), desenvolvido por Ashiahara (1988), consiste num anticorpo conjugado à enzima e um substrato insolúvel, sendo mais adequado para a determinação de grandes antígenos (analitos). O EIHIA pode ser transformado num ensaio homogêneo, porque o imunocomplexo do conjugado com o antígeno grande bloqueia a reação enzimática com o substrato sólido (Fig. 43.18). A α-amilase tem sido utilizada como enzima marcada para a determinação de ferritina e AFP. A imunorreação do analito com anticorpo marcado com a enzima pode alcançar um platô em 10 minutos; assim, o EIHIA baseado em um ensaio de ligação não competitivo requer um tempo menor de incubação para atingir um nível de detecção sensível. Usando esse método, a faixa de medida de ferritina no soro é de 10 a 800 ng/mL e, para a AFP, de 5 a 200 ng/mL. Usou-se dextranase como uma enzima alternativa (Nishizono, 1988). O EIHIA também foi aplicado a um formato de filme seco simples (Ashihara, 1991). O filme seco consiste em três camadas principais, cada uma contendo uma zona em desenvolvimento para reação imunológica e enzimática, uma zona de barreira e uma zona para desenvolvimento de cor. Usa-se um inibidor específico da amilase humana presente no soro para evitar fundo sérico. O ensaio para a proteína C reativa sérica é completado

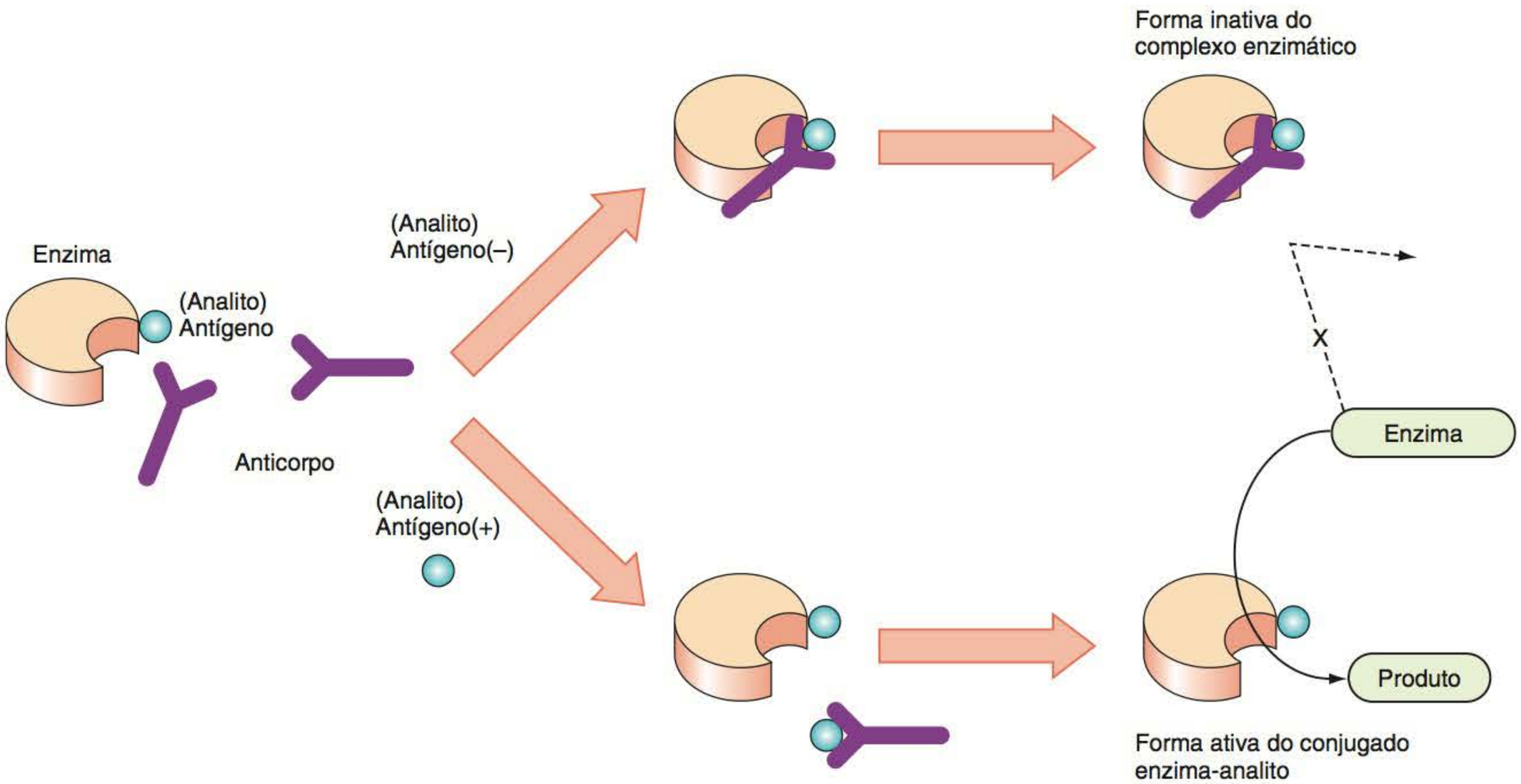


Figura 43.15 Diagrama do sistema da técnica de imunoensaio enzimático multiplicado (EMIT): a atividade de uma enzima como indicador é inibida pela ligação do anticorpo ao antígeno (analito) conjugado com a enzima. O analito em geral é um hapteno. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a lisozima em geral são usadas como enzimas. Nesse ensaio, a atividade da enzima é proporcional à concentração do analito. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

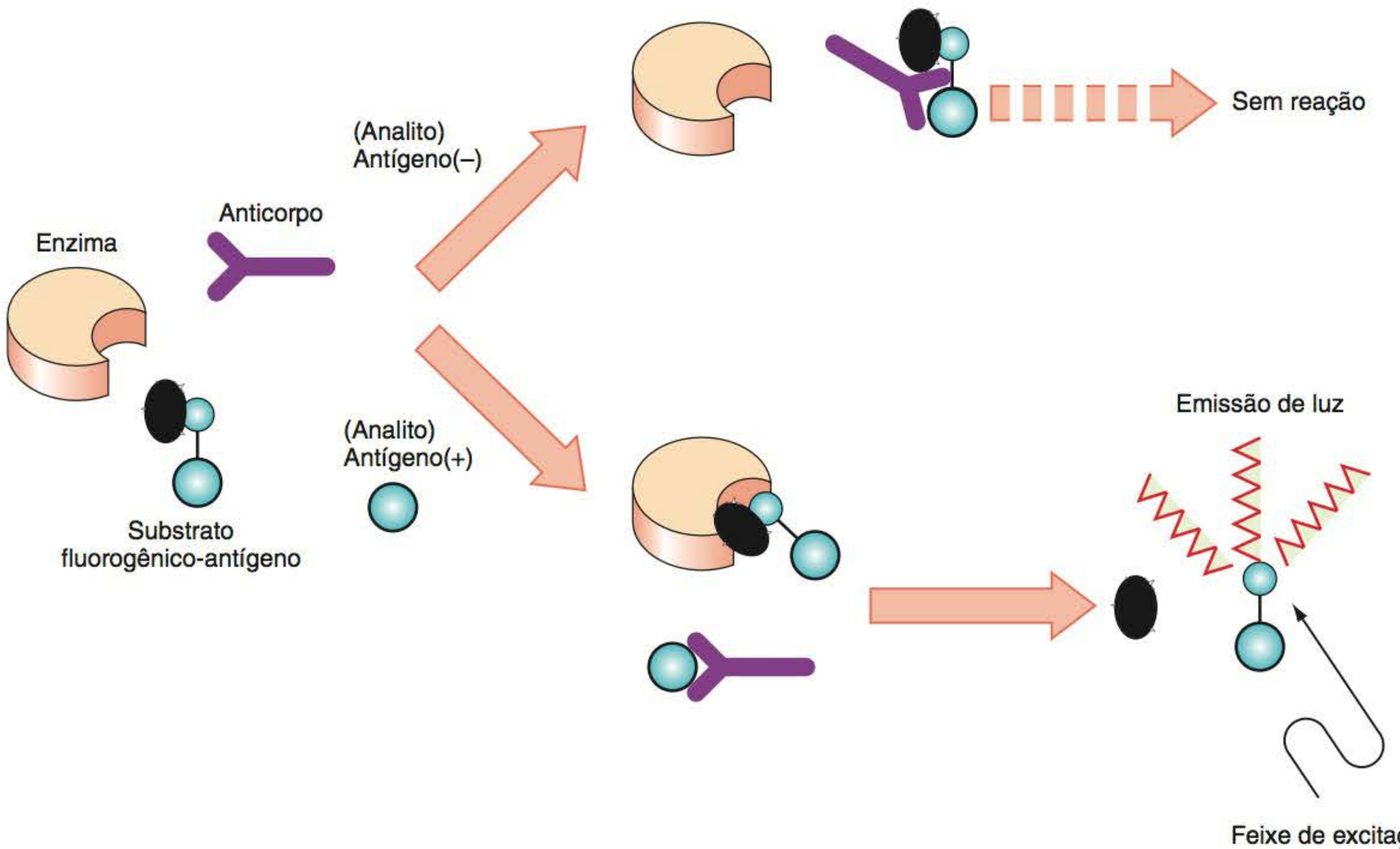


Figura 43.16 Imunoensaio fluorescente com substrato marcado (SLIEF). O substrato β-galactosilumbeliferona é conjugado com o antígeno (analito) e forma um substrato não fluorescente, que pode ser clivado pela enzima β-galactosidase para formar um produto fluorescente. Entretanto, quando se deixa o conjugado substrato–antígeno reagir com o anticorpo específico, não há clivagem do complexo de substrato com a enzima β-galactosidase. Nesse ensaio, a concentração do antígeno (analito) é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência medida. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

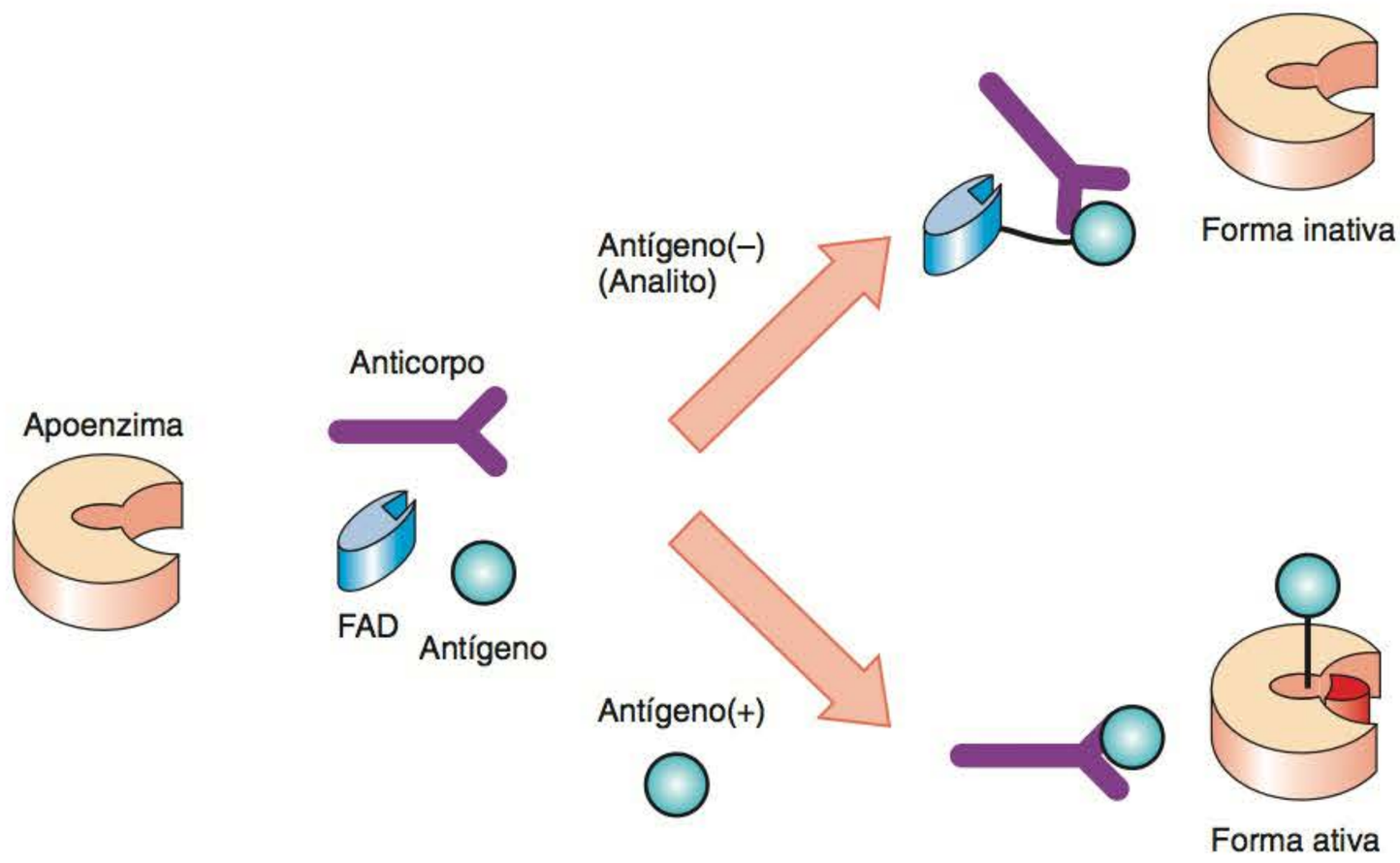


Figura 43.17 Imunoensaio por reativação de apoenzima (ARIS). Usa-se o dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) aderido ao antígeno. A apoenzima é apoglicose oxidase, que requer o cofator FAD para ter atividade. No ensaio, a concentração de antígeno (analito) é proporcional à atividade enzimática gerada. (Com permissão de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992.)

em apenas 6 minutos, simplesmente colocando-se a amostra na lâmina com instrumentação química seca. Apesar disso, a sensibilidade do sistema continua inadequada ao uso com certos analitos, como marcadores tumorais.

Imunoensaio com doador de enzima clonado

O imunoensaio com doador de enzima clonado (CEDIA, *cloned enzyme donor immunoassay*) foi obtido pela primeira vez por Henderson (1986), pela aplicação da tecnologia do DNA recombinante aos imunoensaios homogêneos,. A Microgenics Corp. (Concord, CA) conseguiu produzir a proteína beta-galactosidase por engenharia em um grande polipeptídeo (um aceptor de enzima) e num pequeno polipeptídeo (um doador de enzima). Aceptores e doadores de enzima são montados para formar tetrâmeros enzimaticamente ativos. No ensaio (Fig. 43.19), um antígeno hapteno (analito) é fixado a um doador de enzima e um anticorpo analito-específico é usado para inibir a montagem espontânea da enzima ativa. Os antígenos (analitos) presentes no soro do paciente competem pelo anticorpo com os analitos do conjugado analito-doador de enzima, modulando a quantidade de β-galactosidase ativa formada. O sinal gerado pelos substratos enzimáticos é diretamente proporcional à concentração do analito no soro do paciente. O teste para digoxina é um ensaio colorimétrico que dispensa o pré-tratamento ou pré-diluições do soro. O sistema de ensaio é adequado para uso em analisadores químicos automatizados.

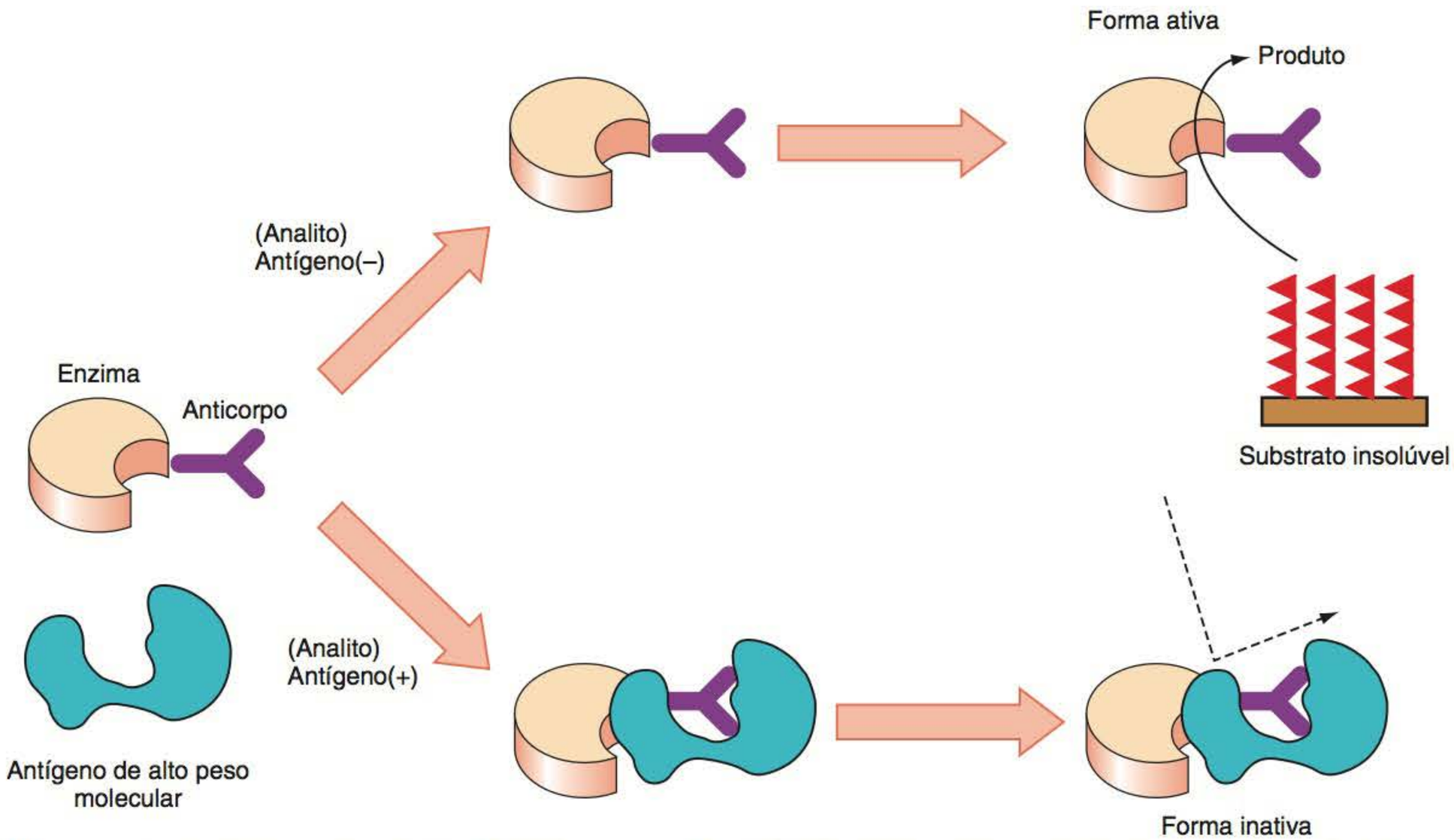


Figura 43.18 Imunoensaio enzimático homogêneo inibidor (EIHIA). A enzima α-amilase do *Bacillus subtilis* ou dextranase do *Chaetomium gracile* é conjugada ao anticorpo específico para o antígeno de alto peso molecular, o qual pode ser ferritina ou α-fetoproteína. A enzima α-amilase é inativa quando o conjugado de enzima e anticorpo reage com o anticorpo específico. A forma ativa da enzima pode reagir com o substrato amido insolúvel. A concentração de antígeno é diretamente proporcional à atividade enzimática da reação. (Redesenhada de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992s, pp 205–227.)

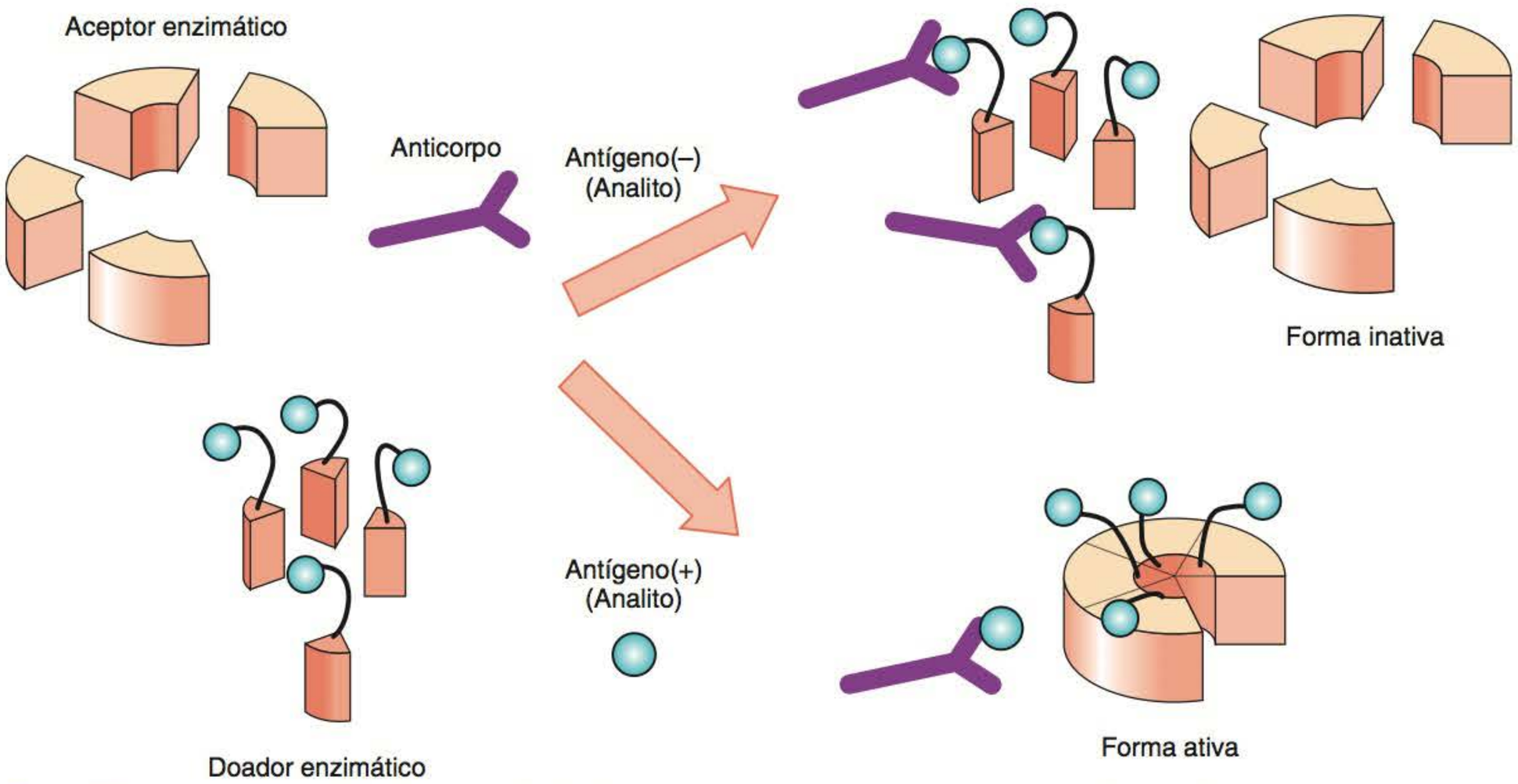


Figura 43.19 Imunoensaio com doador de enzima clonado (CEDIA). Os aceptores enzimáticos associam-se aos doadores de enzima para formar um tetrâmero ativo de β-galactosidase. O anticorpo inibe a associação do aceptor de enzima com o conjugado enzima do doador-antígeno. (Redesenhada de Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992s, pp 205–227.)

Resumo

Os EIAs podem ser aplicados a todos os sistemas antígeno-anticorpo, inclusive aos que envolvem proteínas séricas, hormônios, fármacos e outros antígenos e os anticorpos direcionados contra patógenos. Os EIAs heterogêneos que usam substratos cromogênicos podem ter sensibilidade comparável à dos RIAs, e ganharam ampla aceitação para utilização em vários imunoensaios. Os EIAs heterogêneos, que usam como fase sólida substratos sofisticados geradores de luz quimioluminescente e pequenas partículas, são sensíveis o bastante para detectar menos de 1 pg/mL de analitos. Portanto, sua sensibilidade é muito maior do que a dos RIAs. Além disso, a manipulação do ensaio é bastante simplificada pelo uso de instrumentos completamente automatizados. Em comparação com os EIAs heterogêneos, os EIAs homogêneos têm certas limitações em termos de sensibilidade, faixa dinâmica e aplicação para grandes analitos. Ainda, os altos sinais de fundo (ruídos) e o sinal relativamente baixo do ensaio são inevitáveis por causa da eliminação das etapas de lavagem para a separação dos conjugados ligados e livres. Os EIAs homogêneos são vantajosos porque baseiam-se em um formato de ensaio simples e podem ser adaptados para a instrumentação automática existente. No momento, o EIA heterogêneo com instrumentos completamente automatizados continua sendo a melhor escolha em termos de sensibilidade e simplicidade, bem como por questões de segurança, porque dispensa o uso de radioisótopos.

Imunoensaio fluorescente

Fundamentos e classificação

Coons (1941) foi quem introduziu o uso de compostos fluorescentes como indicadores imunoquímicos para detectar antígenos em cortes de tecidos. Atualmente, os ensaios de imunofluorescência em cortes de tecidos estão muito bem estabelecidos no laboratório de patologia. Nos últimos anos, foram desenvolvidos muitos procedimentos de IEF para detectar a concentração de fármacos, hormônios e uma ampla variedade de proteínas e polipeptídeos (Nakamura, 1992b). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os IEFs analíticos foram prejudicados por uma queda na sensibilidade por causa da fluorescência de fundo de amostras biológicas. Gradualmente, a sensibilidade dos métodos fluorométricos melhorou, e a detecção de analitos em concentrações de 10 a 15 M tornou-se possível. Outros avanços foram feitos por meio de melhorias na instrumentação e da introdução de substratos com mais reações imunoquímicas e enzimáticas ideais.

A seleção do indicador fluorocromo é importante. Ele deve ser estável e demonstrar alto coeficiente de extinção molar e produção quântica. Também deve emitir ondas luminosas apropriadas sem interferência nas reações do ligando com o anticorpo. Quando a maioria dos fluoróforos ou moléculas fluorescentes é irradiada com luz de comprimento de onda adequado, um elétron no estado neutro transita no estado excitado da molécula. À medida que o elétron retorna ao estado neutro, a energia física é liberada na forma de um fóton de menor energia (maior comprimento de onda) do que a luz excitante. O espectro de fluorescência revela uma emissão de comprimento de onda máximo, característica de um composto fluorescente particular. Um dos indicadores típicos, o isotiocianato de fluoresceína (FITC), tem um intervalo de tempo inferior a 1 ns entre excitação e emissão, enquanto outros compostos (i. e., o európio) exibem fluorescência tardia com um intervalo de várias centenas de nanossegundos. Os vários IEFs podem ser classificados como segue: (1) heterogêneos e homogêneos, (2) ligando ou anticorpo marcado, (3) competitivos ou não competitivos e (4) fase sólida ou não sólida. Os métodos mais comuns serão discutidos.

Imunoensaio fluorescente heterogêneo

Os procedimentos de IEF heterogêneos incluem uma etapa de lavagem para separar indicadores fluorescentes ligados dos livres. O procedimento do ensaio é similar aos dos imunoensaios enzimáticos heterogêneos e radioimunoensaios. A maioria dos ensaios disponíveis no comércio usa um sistema de antígeno ou anticorpo de fase sólida. O ensaio pode ser competitivo ou não competitivo, propriedade compartilhada pelos RIAs e EIAs.

Método fluoroimunométrico

Neste método, o analito reage com excesso de anticorpos marcados na solução. Anticorpos residuais marcados ligam-se ao excesso de antígenos ligados da fase sólida. A matriz da fase sólida é lavada e a intensidade da fluorescência tem relação inversa com a concentração do analito. Esse método é adaptável para o ensaio de haptenos e complexos de proteínas. Foram desenvolvidos procedimentos de IEF de fase sólida para o ensaio sorológico de anticorpos para a rubéola, a toxoplasmose, antígenos virais e anticorpos antinucleares. Também foram desenvolvidos métodos de IEF heterogêneos para determinação de antígeno com proteínas séricas e hormônios, incluindo imunoglobulinas, cortisol, progesterona e tiroxina. A principal vantagem dos IEFs heterogêneos é a redução significativa na interferência por substâncias naturalmente fluorescentes em amostras de pacientes, por causa da remoção física de fatores de interferência durante a etapa de separação.

Ensaio imunofluorométrico de partição radial

Nos imunoensaios de partição radial, a cromatografia radial é usada e o ensaio é feito em filtro de fibra de vidro (Giegel, 1982). O procedimento foi automatizado para o ensaio de hCG e vários outros analitos no soro (Rogers, 1986).

Fluoroimunoensaio de resolução temporal

Esta metodologia usa instrumentação especial e indicadores fluorescentes especiais para aumentar a sensibilidade do ensaio. Envolve o uso de indicadores fluorescentes que exibem fluorescência tardia com um intervalo de 100 ns ou mais entre a excitação e a emissão. Como a maioria das substâncias responsáveis pela fluorescência de fundo tem um período de decaimento curto, a medida do sinal tardio de fluorescência reduzirá significativamente os efeitos da fluorescência de fundo. Isso é conseguido com o fluorômetro de resolução temporal, um instrumento especial que produz um pulso luminoso rápido que excita o fluoróforo. A fluorescência é medida logo após a excitação. Assim, o efeito de fundo inespecífico, que em geral decai em menos de 10 ns, pode ser removido (Halonen, 1973; Soini, 1983). Os fluoróforos que exibem fluorescência tardia e têm sido usados nesses ensaios incluem (Soini, 1979) os seguintes:

1. derivados de pireno com tempo de decaimento de quase 100 ns;
2. indicadores de metal quelado raros na terra que têm um tempo de decaimento muito longo, de quase 50 a 100 μs. Incluem o európio (Eu^{3+}), o samário (Sm^{3+}) e o térbio (Tb^{3+}).

Foram desenvolvidos imunoensaios de resolução temporal para medir muitos analitos, incluindo hCG, IgG, cortisol, insulina e outros.

Imunoensaio fluorescente homogêneo

Por definição, esses imunoensaios são realizados com amostras homogêneas. Eles dispensam a separação de conjugados ligados e livres, e em geral são insensíveis à interferência de fundo nas amostras. Os IEFs homogêneos também proporcionam a vantagem de serem rápidos, mas apresentam certas desvantagens quando comparados aos ensaios heterogêneos. Os IEFs homogêneos têm uma sensibilidade aproximada de 10^{-10} mol com instrumentação padrão. Impurezas marcadas na amostra podem aumentar a interferência de fundo. Para apresentarem maior sensibilidade, os ensaios requerem antígeno ou anticorpo específico marcado relativamente puros, bem como instrumentação especial.

Ensaio de fluorescência por polarização

Uma lente polarizante ou prisma pode decompor a luz em raios em um único plano. Quando vistos em ângulos retos com um feixe de excitação de luz polarizada verticalmente, os compostos fluorescentes em soluções emitem fluorescência parcialmente polarizada. O princípio da polarização fluorescente foi aplicado pela primeira vez a procedimentos de imunoensaio por Dandliker (1970, 1973). A luz polarizada transmitida através da amostra pode excitar o indicador fluorescente, independentemente da ligação ao anticorpo. Entretanto, como mostrado na Figura 43.20, o movimento térmico aleatório faz com que pequenas moléculas marcadas com um hapteno caiam livremente na solução, perdendo sua orientação polarizada. Quando o antígeno marcado está ligado a um anticorpo com massa molecular de mais de 160 kDa, o movimento molecular é lentificado o bastante para aumentar o sinal polarizado.

Estudos que usaram anticorpo ou fragmentos de anticorpo marcados não mostraram alteração na polarização após mistura do antígeno com o anticorpo marcado, mesmo que a imunorreação tenha ocorrido. Esse método é mais útil para a estimativa de pequenos antígenos e haptenos (Jolley, 1981). Os Laboratórios Abott adaptaram essa abordagem para o ensaio de muitos fármacos e drogas ilícitas no TDx (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). Eles desenvolveram uma próxima geração de analisador, o IMx, para medir moléculas com grandes massas, como os marcadores tumorais, hormônios e antígenos ou anticorpos relacionados com infecção (Fiore, 1988). Eles combinaram dois princípios de ensaio, a polarização por fluorescência e o imunoensaio enzimático com micropartícula (MEIA, na sigla em inglês). A demanda por capacidades de acesso aleatórias levou o Abbott a desenvolver um analisador completamente automatizado de acesso aleatório altamente potente, denominado AxSYM. Tal sistema é amplamente usado em laboratórios clínicos (Smith, 1993).

Imunoensaio de transferência de fluorescência por excitação

O método da transferência de excitação flourescente (FETI, *fluorescence excitation transfer*) (Ullman, 1976) usa dois indicadores, a fluo-

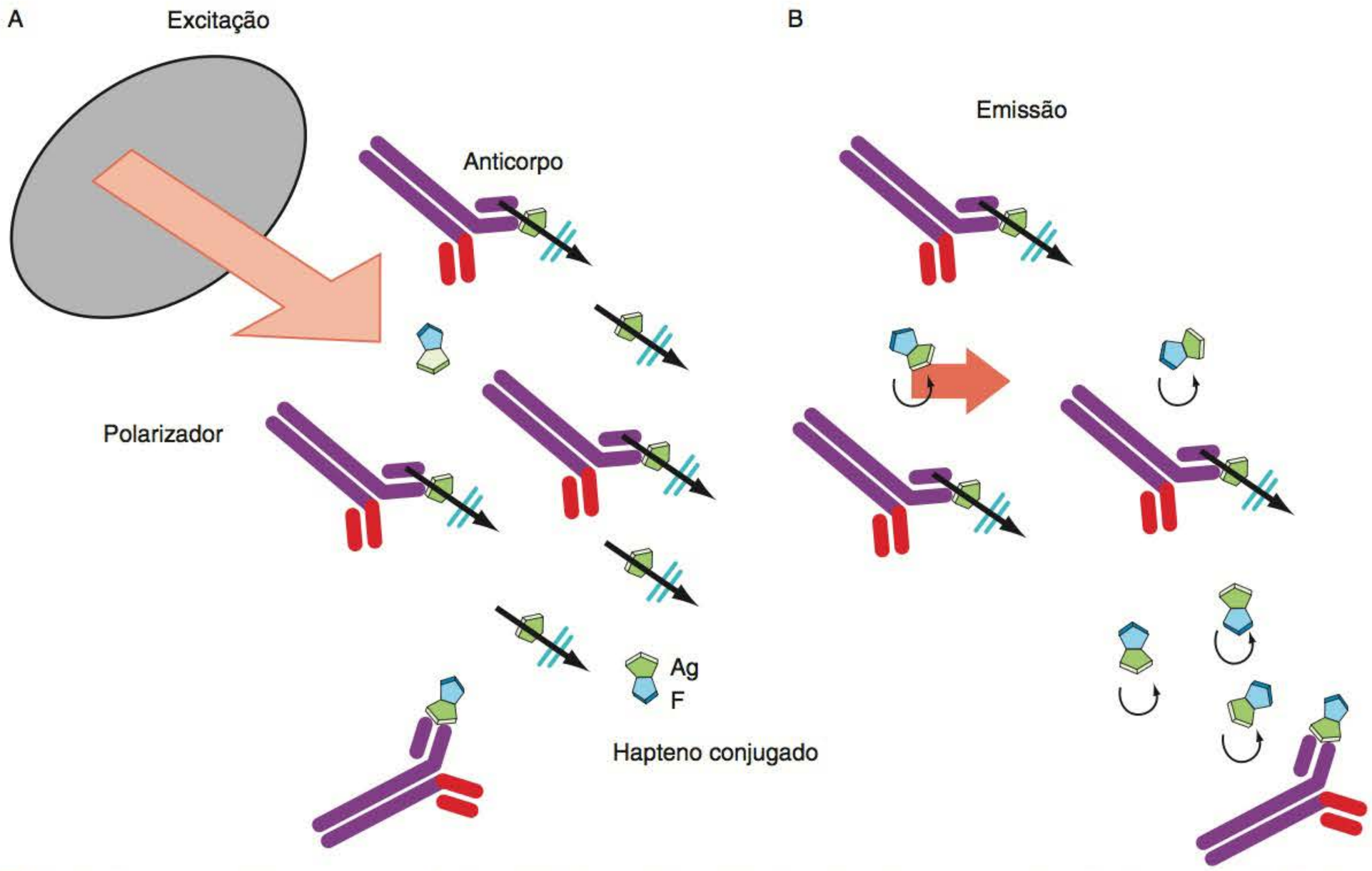


Figura 43.20 Princípio do imunoensaio fluorescente por polarização (FPIA). *A*, um feixe polarizado pode excitar um conjugado não ligado e o conjugado ligado a anticorpo (Ac), saindo no mesmo ângulo do feixe irradiado. O conjugado consiste no hapteno (H) com uma molécula fluorescente (F). *B*, orientação das moléculas no momento da emissão fluorescente. Pequenos conjugados de hapteno livres do anticorpo podem mudar rapidamente sua orientação e não emitir fluorescência. Contudo, o conjugado ligado ao anticorpo ainda permanece no mesmo ângulo, por causa de seu movimento muito lento, e emite fluorescência.

resceína como o indicador doador fluorescente e a rodamina como o aceptor ou extintor. O isotiocianato de fluoresceína (FITC) tem uma emissão máxima de 525 nm e a tetraetilrodamina tem um pico de absorção forte a 525 nm. Portanto, quando o antígeno marcado com FITC e o anticorpo marcado com rodamina se ligam, há uma extinção da fluorescência FITC. Esse fenômeno envolve uma transferência de energia de um corante fluorescente excitado eletronicamente para um corante aceptor. A velocidade da transferência de energia é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre as moléculas do doador e do aceptor. Para a redução adequada da fluorescência com extinção, a distância entre doador-aceptor e os indicadores deve ser de cerca de 50 a 70 Å. Esse método é útil para o ensaio de antígeno com determinantes antigênicos multivalentes. Partes separadas de anticorpo específico são marcadas com fluoresceína e rodamina. A mistura de fluoresceína com marcação diferente identifica o anticorpo, e o anticorpo marcado com rodamina reduz a intensidade do indicador fluoresceína ao ajustar a proporção e a quantidade de doador e aceptor, de maneira que eles podem reagir em estreita proximidade para permitir a transferência de energia. Tais problemas foram superados com o uso de novos compostos fluorescentes. Houve alguma melhora no método FETI com o uso de um marcador fluorescente, como o criptato de transbipiridina európio (III) [Eu^{3+}] como doador e um fluoróforo, como a aloficocianina, como aceptor (Alpha, 1987; Mathis, 1995). Esses compostos transitórios revelam um grande desvio Stokes em que o európio excitado a 337 nm transfere energia através de uma molécula aceptora a uma excitação de 620 nm e eventualmente emite luz fluorescente a 665 nm no modo de resolução temporal. Mathis (1993) desenvolveu a transferência de energia de ressonância (FRET, na sigla em inglês) usando um metal quelado raro criptato e a aplicou à detecção de AFP e antígeno carcinoembrionário (CEA) no soro. O CIS Bio International (Cedox, França) desenvolveu um sistema de imunoensaio homogêneo automatizado, o KRYPTOR, para a detecção de marcadores cancerosos como CEA, o CA 19-9, o CA 125 e a AFP, usando a emissão amplificada de criptato de resolução temporal (TRACE). A sensibilidade para a AFP foi de 0,25 ng/mL por 9 minutos de incubação.

Imunoensaio com proteção de fluorescência

Neste ensaio (Nargessi, 1979), o antígeno proteico é marcado com fluoresceína e, então, reage com um anticorpo específico para o antígeno. O anticorpo específico para o antígeno irá inibir estericamente a reação de um segundo anticorpo específico para a fluoresceína, que funciona para extinguir a fluorescência da fluoresceína quando se liga ao fluoróforo. A capacidade específica do anticorpo antifluoresceína de interagir com a fluoresceína acoplada à superfície do antígeno diminui. O procedimento pode ser usado para avaliar a concentração do anticorpo ou do antígeno (analito) em um sistema homogêneo.

Imunoensaio de quimioluminescência

Fundamentos

Os imunoensaios quimioluminescentes são moléculas geradas por quimioluminescência como indicadores, conforme os derivados do luminol, ésteres de acridínio ou do oxalato de nitrofenil e rutênio tri-bipridil ($Ru[bpy]_3^{2+}$) com tipropilamina (TPA) para eletroquimioluminescência. Basicamente, o método de ensaio não difere daquele dos imunoensaios heterogêneos, RIAs e IEFs. A geração de luz dos derivados do luminol requer OH^-/H_2O_2 como um disparador químico ou H_2O_2 com peroxidase como disparadores quimioluminescentes facilitados. Os ésteres de acridínio disparados quimicamente com OH^-/H_2O_2 exibem uma quimioluminescência relativamente alta para a emissão de luz, em comparação com o luminol. Outras moléculas quimioluminescentes incluem a aquorina, um composto natural (Actor, 1998). Indicadores de compostos quimioluminescentes produzem luz quimicamente na superfície de eletrodos e podem ser aplicados a formatos de ensaios homogêneos. Tanto os CLIAs usando ésteres de acridínio como os eletro-CLIAS são aplicáveis para testes diagnósticos práticos e suas características são descritas subsequentemente.

Imunoensaio quimioluminescente usando ésteres de acridina como marcadores

Neste método (Weeks, 1983), os ésteres de acridina (Fig. 43.21) são conjugados diretamente com moléculas de proteína. Os ésteres de acridínio podem reagir de forma oxidativa com H_2O_2 em condições alcalinas, produzindo intermediários de alta energia que decompõem o fragmento excitado, gerando luz. A emissão de luz de ésteres de acridínio é extremamente rápida, 5 a 10 segundos após o início da reação de oxidação. A quimioluminescência do tipo *flash*, como esse processo é conhecido, tem um espectro muito mais íngreme de emissão de luz para o tempo de reação que a quimioluminescência do tipo brilhante desencadeada por enzimas. A sensibilidade desse ensaio é maior que a do RIA, e o teste leva menos tempo. A solubilidade dos ésteres de acridínio e a estabilidade de conjugados com proteínas em estoque melhoraram após modificação da molécula e conjugação química. É provável que essa tecnologia traga aprimoramentos para o ensaio com haptenos, como hormônios.

Imunoensaio eletroquimioluminescente

O ECLIA usa compostos eletroquímicos como indicadores que geram luz eletroquimicamente, ligados com uma reação cíclica da reação de redução oxidativa. Com a otimização de soluções para reações, a seleção do método de conjugação apropriado e o desenvolvimento de compostos adequados, como o $Ru(bpy)_3^{2+}$ e o TPA, passou a ser possível aplicar a tecnologia quimioluminescente aos imunoensaios (Blackburn, 1991). O $Ru(bpy)_3^{2+}$ tem um sítio de reação para a conjugação de analitos usando um reagente de ativação como o NHS. O $Ru(bpy)_3^{2+}$, conjugado assim com anticorpos, pode ser aplicado a ensaios do tipo sanduíche para grandes moléculas. O conjugado gera luz na superfície de eletrodos de ouro. O $Ru(bpy)_3^{2+}$ na fase sólida e o TPA são oxidados na superfície de eletrodos para formar $Ru(bpy)_3^{3+}$ e TPA^+, respectivamente. O TPA^+ perde elétrons espontaneamente. O $Ru(bpy)_3^{3+}$ pode gerar emissão de luz a 620 nm quando retorna a $Ru(bpy)_3^{2+}$, como um estado neutro pela redução com TPA. A eficiência da geração de luz (rendimento quântico) depende da proximidade entre o eletrodo e o conjugado, e assim da mobilidade do conjugado. Conjugados livres podem gerar mais luz que conjugados fixos em uma fase sólida como resultado da imunorreação. Isso facilita o acesso ao formato de ensaio homogêneo, mas o ruído de fundo relativamente alto interfere na sensibilidade do ensaio, como em outros ensaios homogêneos. O protocolo do ensaio para a determinação de analitos é o seguinte: micropartículas magnéticas revestidas com anticorpo como a fase sólida e a amostra são misturadas para imunorreação. Após lavagem para separação magnética dos conjugados ligados e livres de acordo com o formato do ensaio, a suspensão da fase sólida é introduzida no detector com o eletrodo para medir a quimioluminescência. O limite de detecção relatado do ECLIA foi de 0,2 a 0,4ng/mL para o CEA e de 0,4 ng/mL para a AFP. Esse ensaio não requer instrumentos complicados. Outra vantagem é levar menos tempo para a detecção do sinal que os IEFs e outros CLIAs.

Instrumentos de automação e modulação dos sistemas de ensaio

Sistemas de ensaio homogêneos

Embora muitos imunoensaios homogêneos tenham sido desenvolvidos para protocolos manuais, conforme descrito neste capítulo, a maioria deles ainda não foi automatizada. No caso do método EMIT, analisadores químicos genéricos completamente automatizados podem ser adaptados para uso (Boyd, 1985). Dispõe-se de alguns instrumentos para imunoensaios fluorescentes homogêneos, mas tais sistemas não são intercambiáveis entre si. O sistema CIS Bio KRYPTOR foi desenvolvido com aspectos especiais, incluindo o uso de detector de fluorescência de resolução temporal, e usa um método de dois comprimentos de onda para correção padrão interna da intensidade da fluorescência a 620 nm e 665 nm, o que possibilita aumentar a sensibilidade do limite de detecção.

Sistemas de imunoensaio heterogêneos

Until Até o início da década de 1980, a maioria dos imunoensaios heterogêneos marcados era feita manualmente. Então, Boehringer-Mannheim (que se fundiu com o Roche Diagnostics em 1998) desenvolveu um analisador de acesso aleatório totalmente automatizado, o ES-600, baseado nos imunoensaios enzimáticos colorimétricos que usam a peroxidase da raiz forte como enzima (Wu, 1987). Do final da década de 1980 em diante, muitas empresas se empenharam em desenvolver sistemas de imunoensaios enzimáticos completamente automatizados, que eram de alto processamento, sensíveis e aleatoriamente acessíveis. Antígenos associados ao início de doenças infecciosas, citocinas e fatores de crescimento como a calcitonina existem em concentrações extremamente baixas no soro, requerendo assim um método de detecção altamente sensível para medição desses analitos (Nishizono, 1991; Isomura, 1994, 1999). Entre os muitos métodos, os imunoensaios quimioluminescentes e suas enzimas são os sistemas de ensaio mais sensíveis, capazes de detectar analitos presentes em concentrações muito baixas.

Instrumentos completamente automatizados disponíveis no momento também são capazes de usar imunoensaios enzimáticos fluorescentes. Tais sistemas de ensaio são classificados em vários grupos, com base na geração e na detecção de sinais e no tipo de fase sólida. Quanto à detecção de sinal, o AIA1200, 600 (Tosoh, Tóquio, Japão) e o AxSYM (Abbott, Abbott Park, IL) empregam um método fluorescente de imunoensaio enzimático que usa fosfatase alcalina e um substrato específico, o 4-metilumbeliferil fosfato. Existem três tipos de sistemas disponíveis para os imunoensaios enzimáticos quimioluminescentes. O Lumipulse (Fujirebio, Tóquio, Japão), o Access (Sanofi Diagnostics Pasteur, Caska, MN) e o IMMULITE (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA) têm usado um substrato quimioluminescente estável, o fenilfosforiladamantiloxetano, para fosfatase alcalina (Babson, 1991; Nishizono, 1991; Patterson, 1994). O éster de acridínio como um indicador quimioluminescente foi aplicado no ACS 180 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY). No ELECSYS 2010 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), usa-se $Ru(bpy)_3^{2+}$ como um indicador eletroquimioluminescente (Erler, 1998).

Fluxo prático do imunoensaio no sistema analítico

O mercado demanda que a instrumentação seja capaz de fazer um grande número de testes com capacidade de acesso aleatória. Para satisfazer essas demandas, é necessário melhorar os reagentes e evitar perda de tempo ao fazer imunoensaios heterogêneos. Para simplificar o sistema de aplicação em um ensaio totalmente automatizado, foram projetados cartuchos individuais de reagentes pré-acondicionados ou já em cubetas. Um sistema genérico para imunoensaios heterogêneos marcados está ilustrado de forma esquemática na Figura 43.22. O

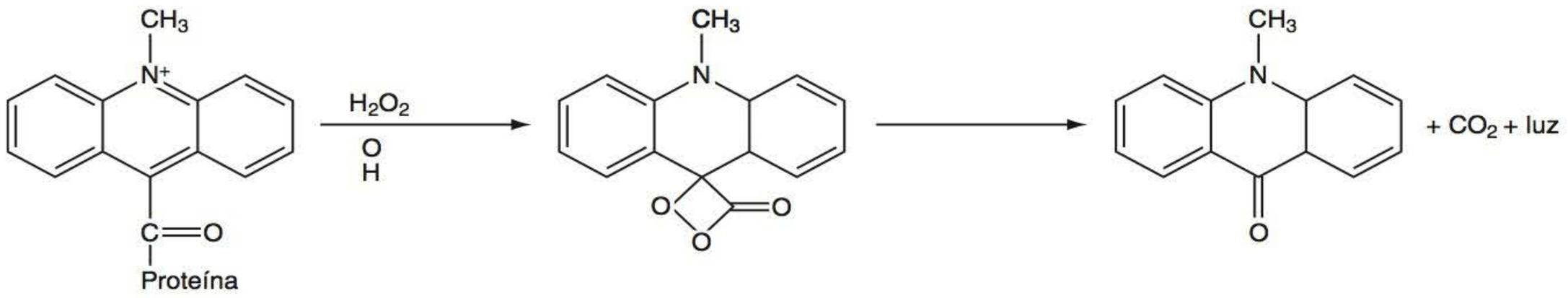


Figura 43.21 Mecanismo do imunoensaio quimioluminescente com éster de acridínio baseado na decomposição oxidativa. L/F = ligados/livres.

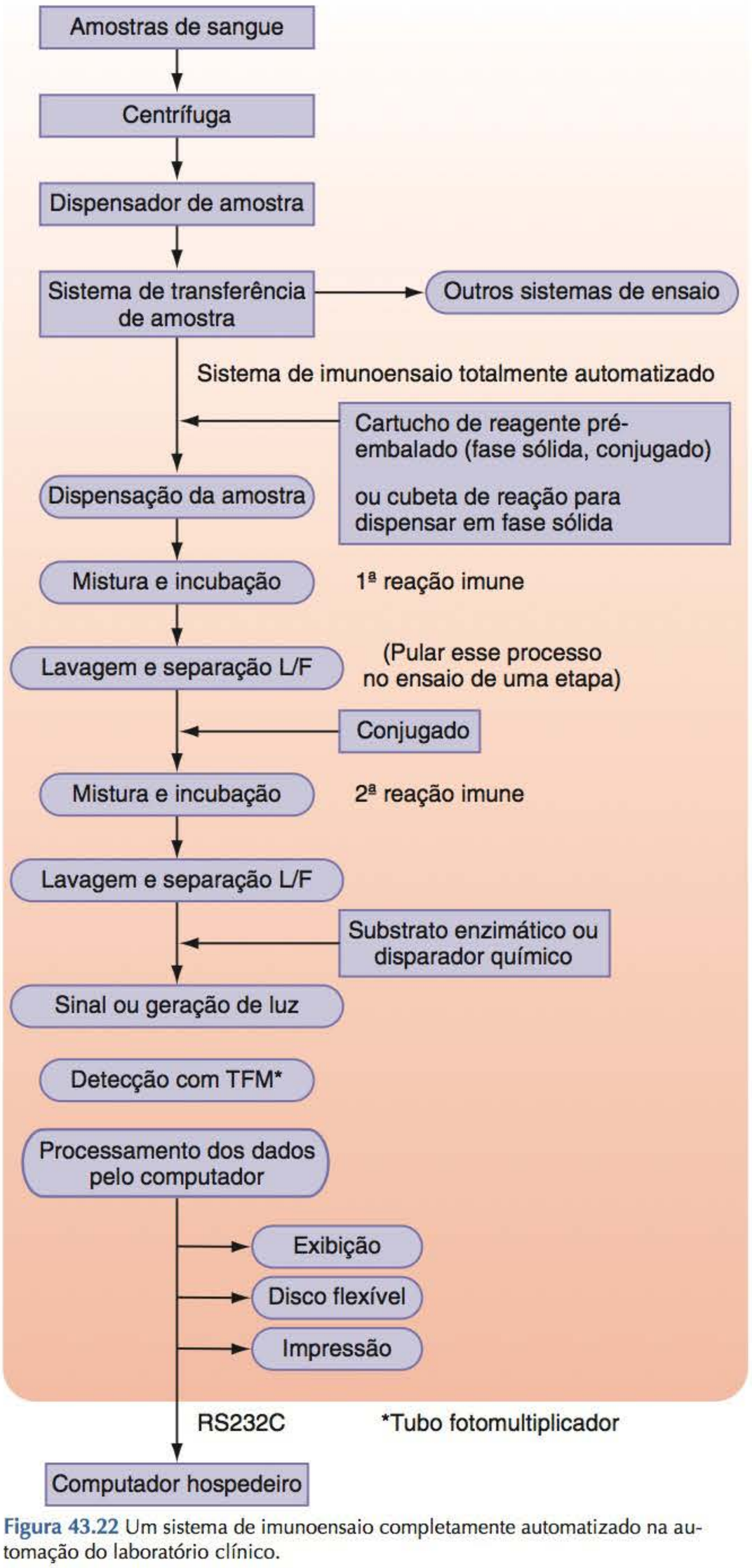


Figura 43.22 Um sistema de imunoensaio completamente automatizado na automação do laboratório clínico.

operador seleciona os itens desejados do teste por meio do programa de computador e carrega os cartuchos de reagente ou frascos para cada teste. Para um analito particular, os cartuchos e a cubeta de reação são alimentados automaticamente no instrumento. As amostras são transportadas para a posição apropriada para serem dispensadas. O ensaio é projetado para usar bandejas ou carrosséis de área que automatizam as etapas de mistura e separação que dependem do desempenho por meio da primeira e da segunda imunorreações e a reação da geração do sinal. Todas as etapas do ensaio são executadas em sequência na linha da reação e os sinais gerados são medidos pelo detector. Os resultados dos testes são impressos em 20 a 40 minutos e enviados automaticamente *on line* para o computador hospedeiro. O sistema pode tratar cerca de 60 a 200 testes por hora, processando de 10 a 20 analitos em cada amostra pelo acesso aleatório.

Instrumentação e pontos fundamentais para o imunoensaio heterogêneo

Embora o princípio do ensaio seja bastante semelhante em muitos instrumentos, pode haver grandes diferenças nos instrumentos quanto ao formato da amostra, controle do aquecimento, à separação L/F, ao transporte, fluxo de detritos e assim por diante. Portanto, deve-se prestar atenção à maneira como o instrumento funciona após implementação.

Cubeta de reação

Em um sistema de imunoensaio, é muito importante projetar com cuidado os aspectos da cubeta para obter datos reproduzíveis. Os fabricantes empregam essas cubetas para que os reagentes possam ser manipulados com rapidez e se tenha acesso aleatório. Uma cubeta do tipo "tudo em uma" que contém os reagentes e a célula da reação foi introduzida no sistema Lumipulse. O sistema Immulite usa uma única célula de reação para a separação L/F. O AxSYM (Abbott Laboratories) usa outro vaso de reação única consistindo em reagente, incubação e frascos de amostras dentro de uma cubeta. O programa combina o conteúdo desse ensaio em uma matriz celular. O último pode ser empregado para capturar a fase sólida em látex, seguindo-se a separação de L/F e a segunda imunorreação de anticorpo marcado, e a fase sólida.

Amostragem e tipo de distribuição de líquido

Em geral, a liberação de líquido é selecionada a partir de dois tipos diferentes, um *chip* descartável ou um bocal de sonda fixa. A contaminação cruzada de amostras deve ser evitada em todos os sistemas de ensaio. O *chip* descartável pode evitar completamente a contaminação cruzada. No caso do sistema de sonda fixa, mesmo que a amostra original seja dividida em várias alíquotas pequenas, ainda ocorre contaminação cruzada. Portanto, o sistema de *chip* descartável é a melhor maneira de evitar contaminação cruzada e também minimizar detritos perigosos biologicamente. Já o custo do uso dos *chips* no ensaio é maior que o do uso da sonda. Os efeitos ambientais do *chip* descartável também precisam ser considerados.

Transporte

O transporte de uma concentração extremamente alta de analito em uma amostra para a próxima amostra às vezes cria julgamentos errôneos no diagnóstico clínico. Um tubo de amostra de plástico descartável é o meio mais simples de evitar esse problema. Já a sonda de bico fixo tem várias vantagens em termos de custo, como dito anteriormente. Portanto, a maioria das tecnologias voltadas para a engenharia de amostragem tem focalizado a minimização do transporte das amostras por meio das etapas de lavagem e manutenção da extremidade. Agora, várias extremidades de sonda fixa possibilitaram limitar o transporte para menos que a ordem de 10^{-7}. Mesmo com tal transporte baixo, algumas amostras ainda criam problemas (p. ex., uma amostra fortemente positiva do antígeno de superfície da hepatite B [HBsAg] seguida por uma negativa). Nesse caso, pode-se usar um sistema de *software* para verificar o resultado subsequente testando-se automaticamente de novo os valores positivos a intervalos semanais após resultados fortemente positivos.

Sistemas de separação de moléculas ligadas/fixas (L/F) e de lavagem

Em um imunoensaio heterogêneo, o conjugado ligado tem de ser separado do indicador livre. Essa separação L/F depende das características da fase sólida. Os sistemas IMx e AxSYM usam micropartículas de látex como a fase sólida para separação de partículas da fase sólida da fase líquida. A Diagnostics Product Corp., Los Angeles, CA, desenvolveu um sistema celular único para separação L/F, em que a solução da reação gira do interior da célula para o exterior enquanto a fase ligada fica em uma conta de fase sólida (conta de 1/4 de polegada). Uma vantagem desses formatos é evitar a contaminação cruzada ou o transporte de uma mistura de reação para a próxima, e não ser necessário o processo de lavagem de excessos. Todos os outros sistemas usam partículas magnéticas e contas magnéticas, com as quais a separação fácil e rápida pode ser conseguida aplicando-se um campo magnético.

Novos sistemas para a próxima geração (sistemas modulares)

A Tabela 43.8 compara vários dos sistemas de imunoensaio comerciais de alto processamento introduzidos nos últimos anos, mostrando as especificações instrumentais de cada analisador. Ao reduzir o tempo de incubação e o da reação, é possível obter um resultado rápido entre 10 a 25 minutos. Assim, um aparelho de alto processamento que faz de 120 a 200 testes por hora é viável. Além disso, vários fabricantes demonstraram um novo conceito de sistema que alinha os diferentes sistemas analíticos necessários em um laboratório clínico. Muitos laboratórios clínicos introduziram uma linha de transporte automatizada de amostra, conectada a diferentes instrumentos analíticos controlados independentemente. No entanto, alguns analisadores não são adequados para essa abordagem, porque a velocidade do instrumento ou o ciclo temporal não pode ser harmonizado facilmente com o outro *software* ou *hardware*. Para resolver esses problemas, o Architect (Abbott Laboratories) é um exemplo de um novo conceito de máquina em que um sistema computadorizado pode controlar vários analisadores de imunoensaio conectados a um analisador químico. A Bayer Diagnostics (Tarrytown, NY) também introduziu o ADVIA IMS, baseado em um conceito semelhante, que pode realizar testes químicos clínicos e imunoensaios em uma única plataforma. Várias outras combinações ainda em desenvolvimento baseiam-se nesse conceito, que possibilitou simplificar o laboratório clínico e diminuir o custo total.

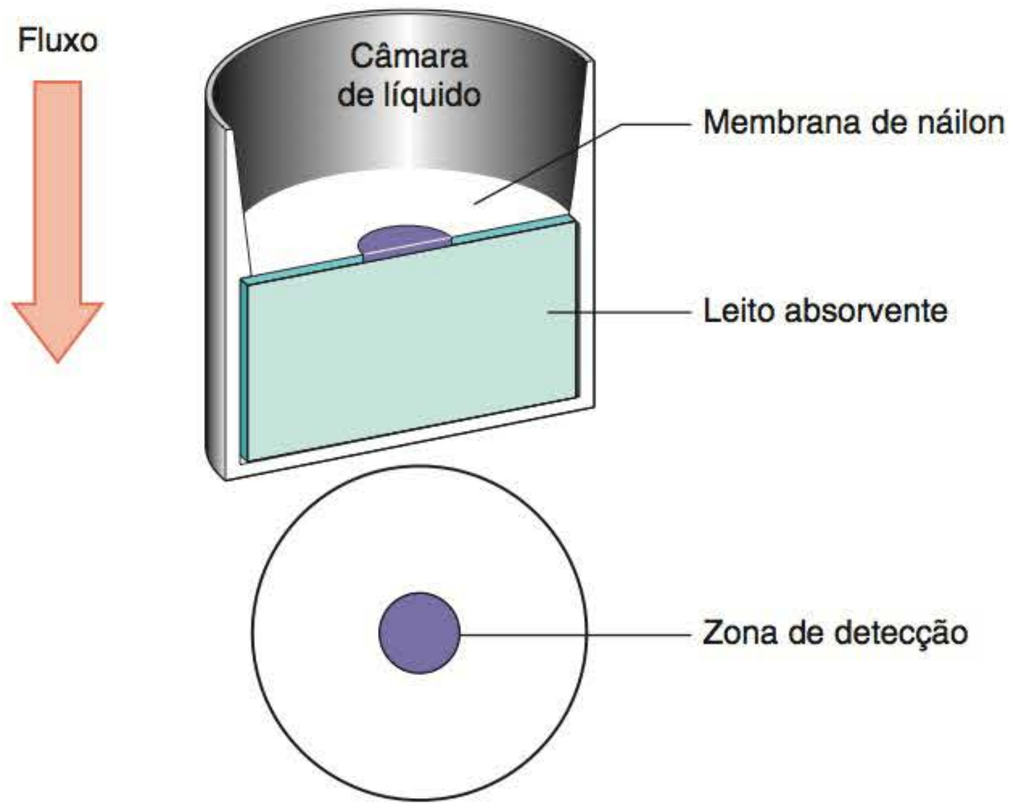


Figura 43.23 Imunoensaio de fluxo. Corte transversal do Hybritech ICON e vista do alto do dispositivo. Os anticorpos capturados são imobilizados no centro de uma membrana de náilon sobre a qual se coloca um bloco absorvente para absorver o líquido da amostra que não reagiu, conjugado marcado e tampão de lavagem. O ensaio pode ser feito sequencialmente, similar ao imunoensaio enzimático em duas etapas.

Dispositivos simples para testes rápidos

Fundamentos

Uma forte demanda por um teste caseiro (p. ex., hCG para o diagnóstico de gravidez) simplificou o formato do imunoensaio: o teste deve ser simples, rápido e reprodutível. Com esses objetivos em mente, muitos testes com hCG foram desenvolvidos e resultaram no formato de teste de primeira geração com um imunoensaio enzimático de fluxo.

Dispositivos de ensaio de fluxo contínuo (dispositivos para ensaio de imunofiltração)

A Figura 43.23 ilustra de forma esquemática o dispositivo típico do tipo fluxo, o ICON hCG (Hybritech Incorporated, San Diego, CA), que consiste em uma membrana porosa com anticorpo anti-hCG imobilizado e um bloco absorvente abaixo da membrana (Valkirs, 1985). O princípio do ensaio e o procedimento são descritos a seguir. Várias gotas da amostra de urina são aplicadas na membrana. A urina é absorvida no bloco e então goteja-se um tampão de lavagem, seguido por uma solução de anticorpo anti-hCG marcada com fosfatase alcalina.

Tira reagente

Também foi desenvolvido um formato de tira reagente para reduzir o custo com material, em comparação com formato de fluxo. A tira de teste contém uma área pontilhada com anticorpo na sua extremidade. O ensaio pode ser feito da seguinte maneira:

1. a tira é mergulhada em um recipiente que contém a amostra;
2. em seguida, a tira é lavada em outro recipiente;

Tabela 43.8 Nova geração de sistemas de imunoensaios heterogêneos

	AIA-21 Tosoh	ACS:Centaur Bayer Diagnostics	ARCHITECT Abbott	ADVIA IMS Bayer Diagnostics
Embalagem do reagente	Congelada seca em porção	Pacote com reagente (solução)	Frasco de solução	Conta seca em cubeta de reação
Reação em cubeta	Frasco de reagente	Cubeta descartável	Cubeta descartável	Recipiente reagente
Princípio da reação	Enzimático fluorescente	Imunoensaio quimioluminescente	Imunoensaio quimioluminescente	Imunoensaio quimioluminescente
Substância marcada	Fosfatase alcalina	Éster de acridínio	Éster de acridínio	Fosfatase alcalina?
Substrato enzimático	4-metilumbeliferil	Nenhum	Nenhum	Fosfato de dioxetano?
Detector de sinal	Fluorescência	Quimioluminescência	Quimioluminescência	Quimioluminescência
Formato do ensaio	S-1, S-2, competitivo	S-1, S-2, competitivo	S-1, S-2, competitivo	S-1, S-2, competitivo
Pré-tratamento	Sim	Sim	Sim	?
Fluxo da reação	Plataforma	Plataforma	Plataforma	Plataforma
Ciclo temporal (s)	30	15	18	36
Tempo de reação (min)	10 ou 40	7,5–36	29	20
Temperatura da reação	37°C	37°C	37°C	37°C
Número máximo de analitos	20	30	25	36
Processamento (teste/h)	120	240	200	100
Fase sólida	Conta magnética	Partícula magnética	Partícula magnética	Partícula magnética
Tempo para o primeiro resultado (min)	50	8–40	30?	?
Separação L/F	Campo magnético	Campo magnético	Campo magnético	Campo magnético
Método de amostragem	Pipeta com sonda	Chip descartável	Sonda fixa	Pipeta com sonda (tecnologia de óleo)
Autodiluição da amostra	Sim	Sim	Sim	Sim

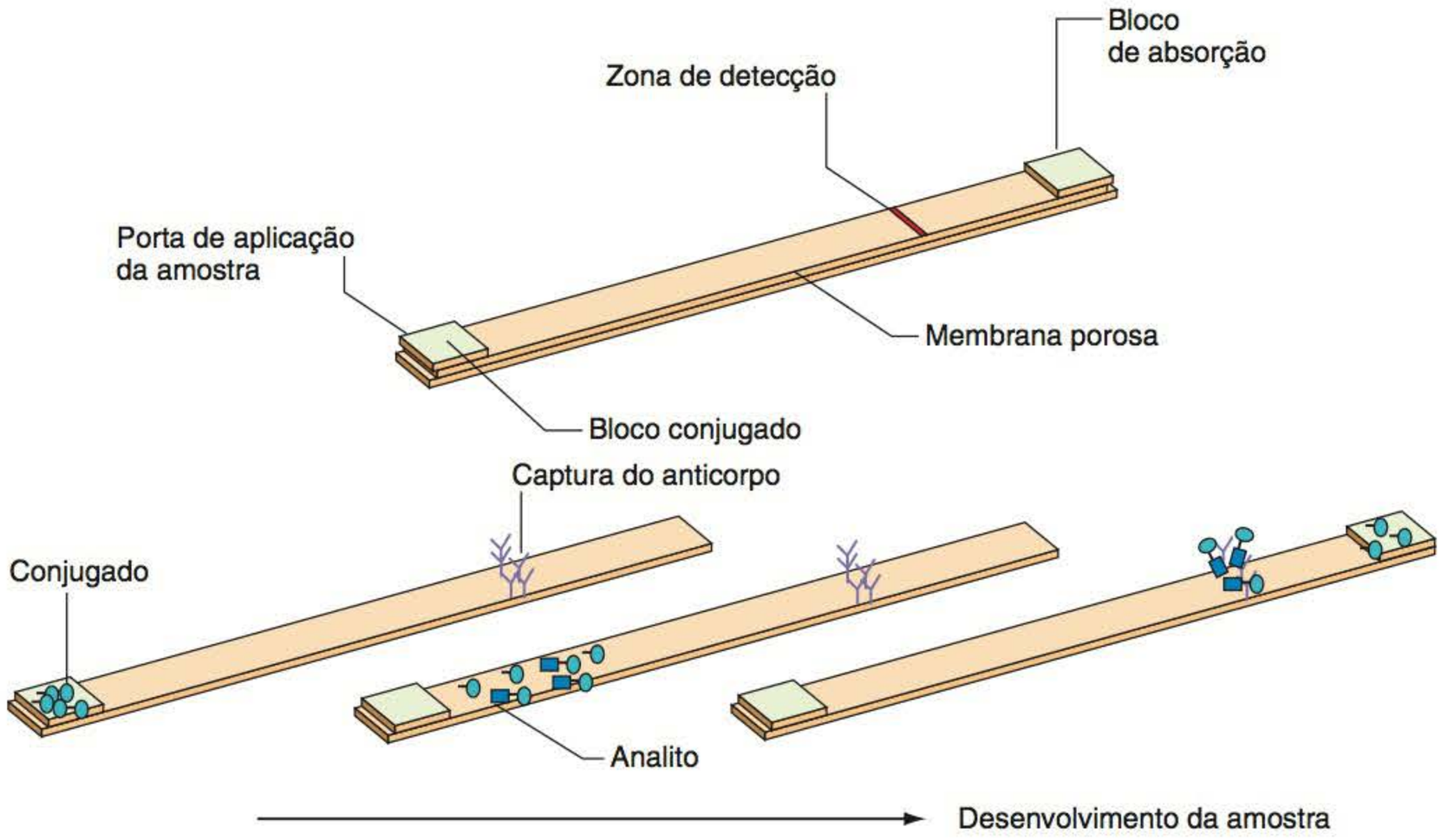


Figura 43.24 Tira de teste imunocromatográfico típica para ser usada na amostra. Os fluxos do ensaio estão ilustrados na parte inferior da figura. Na forma geral, a extremidade proximal do fluxo lateral serve como a parte de carga, consistindo em um bloco que contém anticorpo ou antígeno marcado com látex colorido ou ouro coloidal. O analito na amostra forma um complexo com o conjugado e migra para a zona de detecção, imobilizando assim o anticorpo capturado para formar uma linha colorida positiva. Quantidades excessivas do conjugado e da amostra migram para a extremidade distal da tira.

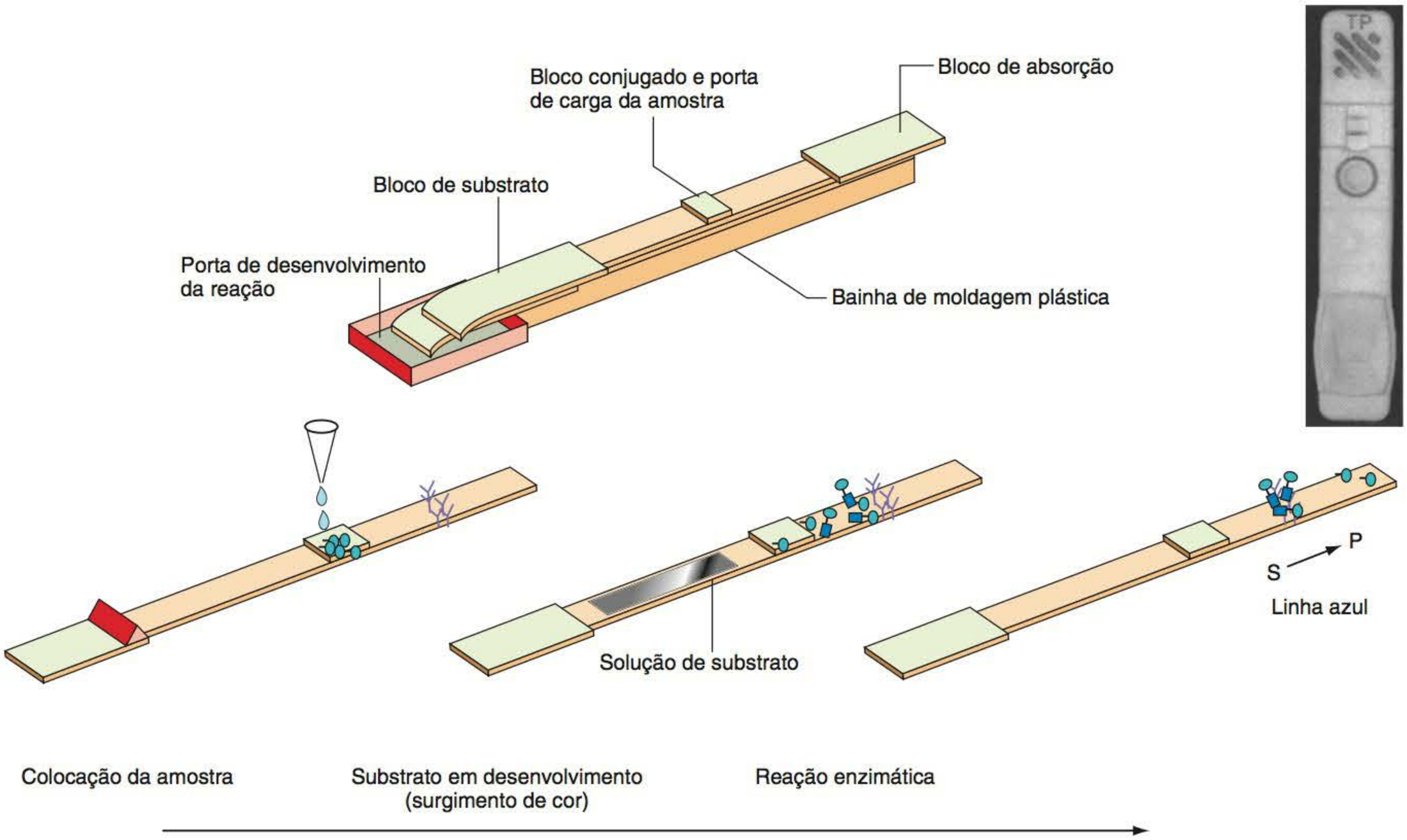


Figura 43.25 Dispositivo imunocromatográfico usando EIA. Um método de amplificação sensível é aplicado para imunocromatografia usando uma enzima. A amostra é aplicada à parte de carga da amostra no centro da tira. Nesse método, emprega-se uma solução de desenvolvimento como a fase móvel, que pode servir como um tampão de lavagem. A ilustração à direita da figura mostra o molde de plástico doméstico e os resultados do ensaio para o anticorpo do TP.

3. a tira é então mergulhada na solução indicadora;
4. por fim, ela é mergulhada em um formador de cor, se necessário.

Dispositivos imunocromatográficos

Para eliminar as etapas de acréscimo de reagente desses dois formatos, conseguiu-se outro aprimoramento por meio de técnicas imunocromatográficas, que levaram a um imunoensaio simples e rápido. A imunocromatografia consiste em separação L/F e geração simultânea de sinal por fluxo lateral sobre materiais porosos, como uma membrana de nitrocelulose ou folha de fibra de vidro. Pela ação capilar da membrana, o analito na amostra pode migrar da extremidade proximal para a distal, onde há um bloco absorvente para manter uma velocidade de fluxo capilar constante. A zona de carga da amostra, a de marcação e a de detecção ficam entre as duas extremidades. O método imunocromatográfico é classificado em vários formatos. A Figura 43.24 mostra os formatos imunocromatográficos típicos. A extremidade proximal é empregada como a porta de carga da amostra conectado a um bloco que contém antígeno ou anticorpo marcado e sob a qual há uma membrana de nitrocelulose em contato com o bloco, servindo como uma zona de detecção mista. A extremidade distal da membrana

Tabela 43.9 Especificações dos dispositivos para imunoensaio simples e rápido

Princípio do ensaio	Nome do kit	Amostra	Volume (μL) da amostra	Fase móvel	Tempo de reação (min)	Sensibilidade (analito)	Amostras domésticas	Fabricante
Formato imunocromatográfico								
Uma etapa ("tudo em um")	Helisal One Step (*Helicobacter pylori*)	Sangue	50	Plasma	5	Igual ao ELISA	MP	Cortics Diagnostics Ltd
	Biocard Troponin I test	Soro	150–200	Soro	15	0,1 ng/mL	MP	AniBiotech OY
	Clear View hCG II	Urina	?	Urina	5	25 mIU/mL	MP	Unipath Ltd
	Quick Vue one step hCG	Urina	3 gotas (75?)	Urina	3	25 mIU/mL	MP	Quidel
	CARD-I-KIT Troponin I	Soro	4 gotas (100?)	Soro	5–10	0,1 ng/mL	MP	AboaTech Ltd
	TROPT Troponin T	Sangue	150	Plasma	5–15	0,1 ng/mL	MP	Roche Diagnostics*
	Determine HbsAg	Sangue/soro	50	Plasma/soro	15	1 ng/mL?	TR	Abbott
	BioSign Tumor	Sangue/soro	50	Fomentador	5–10	–	MP	Princeton BioMeditech Corporation
	HBs Insta Test	Sangue/soro	200	Plasma/soro	15–20	0,5 ng/mL	MP	Morningstar Diagnostics
	EASY-SURE HbsAg Test	Soro	100–150	Soro	5–20	1 ng/mL	TC	West Wind Plus, Inc.
	PSA Rapid Screen Test	Sangue	1 hangig drops	Fomentador	≈15	>4 ng/mL	MP	Craig Medical Distribution, Inc.
	Triage Cardiac (Myoglobin CK-MB Troponin-I)	Sangue	?	Plasma	15	?	MP	Biosite Diagnostics†
	AMRAD ICT Hepatitis B	Sangue/soro	?	Sangue/soro	5–15	2 ng/mL	CC	Amrad Corporation Ltd
	Espline HbsAg	Plasma/soro	25	Fomentador	15	0,5 ng/mL	MP	Fujirebio, Inc.
	TestPack PLUS hCG	Soro/urina	25	Soro/urina	5	50 mIU/mL	MP	Abbott
Duas etapas	EASY-SURE HIV1/2 Test	Plasma/soro	40	Fomentador	10	–	CC	West Wind Plus, Inc.
Métodos imunocromatográficos em tira reagente								
	AimStickPBD	Urina	Volume de imersão	Urina	3	200 mIU/mL		Orgenics
	Dainascreen HbsAg	Plasma/soro	25	Plasma/soro + solução conjugada	15	3.1 ng/mL	TR	Dainabot
Formato de fluxo								
	ICON-II hCG	Soro						
	NycoCard CRP	Total Sangue/plasma	50	Tampão etc.	2	10 μg/mL	TC	Nyco Diagnostics
	Chagas double spot test	Soro/plasma	1 gota	Tampão etc.	10	?	MP	Morningstar Diagnostics
Combinação de imunocromatografia e fluxo								
	DoubleCheck HbsAg	Soro/plasma	?	Tampão etc.	15	2 ng/mL	MP	Orgenics

CC = cartão de caso; MP = molde em plástico doméstico; TC = teste com cartão; TR = tira reagente.

* Towt, 1995. † Bruni, 1999.

está aderida ao bloco absorvente como uma fonte de força capilar. A amostra, carregada por meio de um gotejador, reconstitui o anticorpo ou antígeno conjugado marcado com ouro coloidal ou látex colorido, que forma um imunocomplexo com o analito a ser detectado, e o complexo migra para a zona de detecção. O anticorpo ou antígeno imobilizado na zona de detecção pode capturar o complexo e formar uma linha vermelha ou azul positiva. O excesso de substância marcada migra para o bloco aborvente. A fase móvel para migração da amostra é a própria amostra. Amostras com cores fortes pela presença de uma alta concentração de bilirrubina ou hemoglobina, portanto, podem interferir na leitura dos resultados a olho nu. Nesse formato, o sinal a ser lido é produzido diretamente na zona de detecção como uma zona concentrada de partículas coloridas.

Yamauchi et al. (1997) estabeleceram uma nova plataforma de formato em que o EIA pode ser realizado automaticamente, inclusive com um procedimento de lavagem. O mecanismo está ilustrado de forma esquemática na Figura 43.25. Nesse formato, o posicionamento de cada uma das zonas é completamente diferente daquele de outros formatos imunocromatográficos mencionados anteriormente. A extremidade proximal tem um formador de solução, que possibilita a execução espontânea do processo de lavagem com força capilar. A amostra é aplicada em um bloco na parte central do dispositivo que contém o conjugado marcado na forma seca. A extremidade distal fica conectada ao bloco absorvente. São colocadas duas gotas da amostra no bloco para reagirem com o conjugado após a reconstituição do conjugado seco. A mistura da reação contendo o imunocomplexo formado entre o analito e o anticorpo marcado pode então espalhar-se para ambas as extremidades. Assim que o reservatório da formação da solução se rompe, o substrato seco é reconstituído, tornando-se o substrato enzimático solúvel na zona de detecção. Nesse momento, o fluxo líquido segue na direção da extremidade distal. Componentes séricos e o excesso de conjugado que não reagiu podem ser eliminados para o absorvente. Se a amostra contiver analito, então o anticorpo imobilizado irá capturar o complexo na zona de detecção, formando uma linha colorida. Esse método tem algumas vantagens, diferindo de outros dispositivos imunocromatográficos desenvolvidos por amostra. Em tais dispositivos, o soro hemolítico ou lipêmico pode interferir na avaliação do resultado do ensaio a olho nu por causa da cor forte do fundo. No entanto, o primeiro tipo de dispositivo com um reservatório conectado pode não sofrer tal interferência desses componentes coloridos. Esse dispositivo

foi útil para detectar HBsAg, anticorpo anti-HBs (Yamauchi, 1997) e o anticorpo contra o *T. pallidum* (Hasegawa, 1995). A maioria dos componentes, como a membrana, o bloco absorvente e o compartimento da amostra, é feita a partir de moldes de plástico.

Resumo

Na Tabela 43.9 há um resumo dos dispositivos para imunoensaios rápidos e simples. Tais dispositivos podem ser classificados em três tipos principais – de fluxo, tiras reagentes e imunocromatográficos – e formados combinados desses três tipos. A maioria dos dispositivos imunocromatográficos emprega conjugado marcado diretamente, metal coloidal ou látex colorido. Esses tipos de formatos na verdade são bem adequados para a migração direta do imunocomplexo, junto à migração da solução da amostra. Entretanto, muitos desses dispositivos requerem um grande volume de amostra, de 100 a 200 μL. Por outro lado, apesar de o formador ser necessário, o tipo de dispositivo EIA permite que a prova seja realizada com uma menor quantidade de amostra, 25 mL. A grande quantidade atual de testes rápidos e fáceis de fazer baseia-se em dispositivos que utilizam a imunocromatografia, e qualquer pessoa habilidosa, como um usuário leigo em casa ou uma enfermeira, pode realizá-los corretamente de acordo com as instruções do fabricante, ao contrário dos testes que utilizam dispositivos de imunoensaio (Kasahara, 1997).

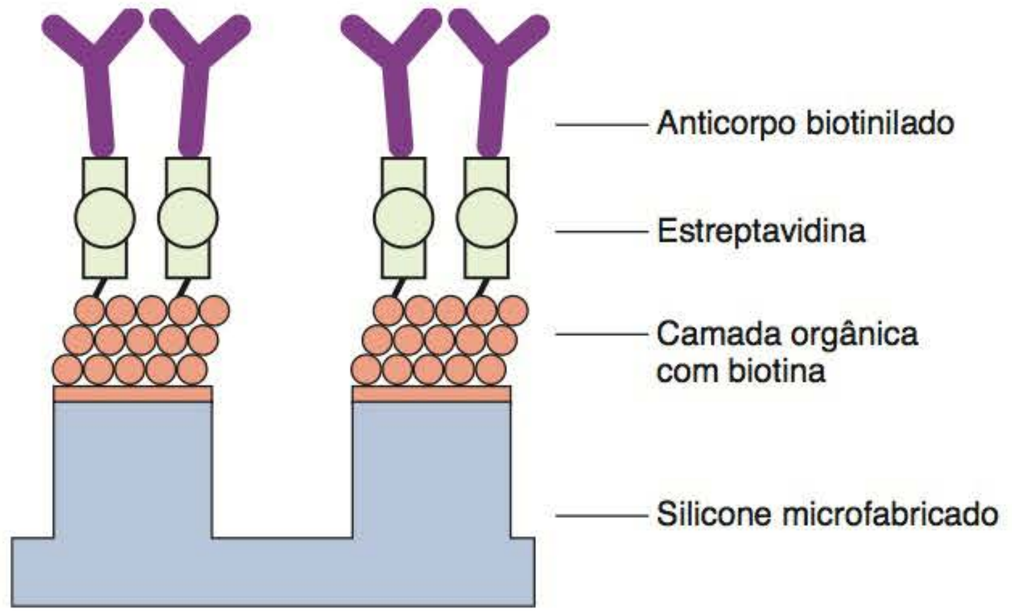


Figura 43.26 Biochip de proteína usando IEF. O imunoensaio fluorescente sanduíche é aplicado para a detecção múltipla usando silicone microfabricado como substrato sólido. A superfície de mais de 1.000 pilares é coberta com uma camada de polímero orgânico contendo biotina. A estreptavidina ligada à biotina liga-se ao anticorpo biotinilado específico para analito e pode reagir com o antígeno na amostra. O dispositivo de silicone em que se enfileiram diferentes anticorpos específicos de diferentes antígenos é colocado em um dispositivo de plástico moldado.

Imunoensaios múltiplos simultâneos

Fundamentos

Os avanços recentes no imunoensaio levaram ao desenvolvimento de novos conceitos na tecnologia que permitem a detecção múltipla simultânea como forma de reduzir o custo com reagentes. Isso significa que qualquer um de 5 a 100 analitos pode ser detectado simultaneamente em uma única amostra. Essas tecnologias são classificadas em duas amplas categorias em termos do tipo de fase sólida usada. A primeira, a tecnologia do microsseccionamento, está adaptada para imunoensaios que usam um microchip como a fase sólida, e a segunda usa micropartículas como a fase sólida. Na segunda, duas tecnologias têm sido aplicadas ao reconhecimento de parâmetros individuais de um analito em ensaio. Uma é o reconhecimento direto da fase sólida usando látex fluoromarcado, e a outra envolve o uso de partículas de tamanhos diferentes. No último caso, ao reconhecimento limitado é possível porque a resolução é dependente do tamanho da partícula. Tecnologias miniaturizadas como essas são consideradas altamente vantajosas para minimizar o custo dos reagentes, poupar energia e proteger o ambiente, por causa da pequena massa de reagente e dos pequenos volumes de amostra que requerem.

Ensaio MicroSpot

A superfície sólida do *microchip* é fracionada em pequenas áreas usando-se tecnologia de micropontilhado. São produzidos 100 a 200 sítios de reação em uma área de 3 mm de diâmetro de uma placa plana de polistireno (Ekins, 1998). Em cada sítio, uma área pontilhada de 80 μm de diâmetro recebe um volume de menos de 1 nL da solução com tinta injetada automaticamente. Nesse método, foi aplicada a teoria ambiental de Ekins e a sensibilidade e o limite de detecção dependem da ocupação do anticorpo, mas não da área de superfície na fase sólida. Foi encontrado um limite de detecção para o TSH de 0,01 mUI/L em um ensaio de 18 horas usando esse método de ensaio ambiental com analito. Portanto, é evidente que se pode conseguir um ensaio altamente sensível, mesmo na área micropontilhada. O laboratório Boehringer Mannheim, que depois se fundiu com o Roche Diagnostics, aplicou uma fase sólida coberta com avidina uniformemente à área de superfície e então anticorpo ou antígeno ligado a biotina em que injetara tinta na mancha. Múltiplos parâmetros, incluindo anticorpo contra o HIV, HBsAg, antígenos anti-hepatite C e rubéola, puderam ser detectados simultaneamente em um *microchip* feito de polistireno. O formato do ensaio é o de um imunoensaio fluorescente em três etapas. Por fim, um *scanner* a *laser* confocal detecta o sinal fluorescente no *chip*. Esse ensaio com chip também está disponível para a aplicação na detecção de DNA.

Imunoensaio com microarranjos para analitos múltiplos

Silzel et al. desenvolveram um ensaio para massa de analito que mede a massa total do analito em uma amostra (Silzel, 1998). Portanto, o conceito básico desse método é diferente daquele do ensaio ambiental, que mede a concentração do analito. Um filme de polistireno foi empregado como a fase sólida. Injetou-se uma gota de tinta de 80 pL sobre o filme e o DBCY5 foi adotado como indicador por causa do longo desvio Stokes da excitação de comprimento de onda de 670 nm para a emissão de onda de 710 nm, com emissão perto da fluorescência infravermelha. O aparelho de detecção usado nesse método consiste em um microscópio acoplado a uma câmara resfriada por sistema Pelitier e com bateria e um *laser* diodo GaA-1As. Nesse formato, 105 moléculas de DBCY5 por 80 pL de área podem ser detectadas em soluções calibradas. Usou-se a subclasse IgG no presente sistema para a detecção de múltiplos parâmetros. Quatro parâmetros, IgG1, 2, 3 e 4, foram detectados e mostrou-se que a sensibilidade é comparável à do ELISA, embora uma quantidade muito menor de anticorpo (100 vezes menos) seja suficiente para cobrir a área de superfície, se comparada a uma placa de ELISA.

Chips de proteína microfabricados com sítios pontilhados altamente densos contendo 1.250 sítios de reação por 1 × 2 cm foram desenvolvidos por Zyomyx (Hayward, CA). O *chip* de proteína é composto por um substrato baseado em silicone como uma fase sólida e seis fileiras com 5 × 50 arranjos/fileira (Peluso, 2003). Isomura et al. empregaram o chip e aplicaram um imunoensaio fluorescente simultâneo para algumas proteínas-alvo, isto é, AFP, interleucina (IL)-6, Erk-2, c-Jun, Grb2, c-Src e H-Ras (Isomura, 2003). Como mostrado na Figura 43.26, os sítios de reação são microfabricados como uma estrutura em pilar e então cobertos com óxido de titânio. A superfície é coberta com polímero de poli L-lisina ligado com polietilenoglicol-biotina. Após ligação da estreptavidina à biotina, a estreptavidina sólida pode ligar-se a anticorpos biotinilados. O ensaio pode ser feito em um dispositivo de fluxo. O limite de detecção encontrado para a IL-6 foi de 5 a 50.000 ng/L em 3 horas de ensaio, usando esse método de ensaio com *biochip* de proteína.

Imunoensaio por citometria de fluxo

O Luminex (Austin, TX) desenvolveu um imunoensaio fluorescente multiparâmetro simultâneo usando a tecnologia da citometria de fluxo, em que dois tipos de fluoróforo para reconhecimento do analito servem para marcar partículas de látex usadas como a fase sólida (Fulton, 1997; Oliver, 1998). Dois tipos diferentes de fluo-

róforo e intensidade de fluorescência assinalam o mapeamento do analito de cada partícula. Em princípio, mais de 60 analitos podem ser detectados simultaneamente. O procedimento do ensaio é descrito a seguir. A amostra é misturada com anticorpo marcado com R-ficoeritrina e um segundo anticorpo imobilizado no látex como a fase sólida. A mistura é incubada por 10 a 30 minutos e então injetada no sistema de fluxo. São separadas 1.000 partículas, como na citometria de fluxo, e tanto o sinal de fluorescência acentuada da R-ficoeritrina excitada como o resultado da marcação e dois sinais de fluorescência sobre a partícula são detectados simultaneamente por um *scanner* a *laser*. Carson et al. aplicaram essa abordagem para a detecção simultânea de 15 citocinas como IL-1, IL-2, IL-4 e IL-6 (Carson, 1999). A detecção simultânea foi menos sensível que o ensaio de citocinas individuais. Contudo, ainda assim é um ensaio sensível, em comparação com o ELISA convencional, e a sensibilidade foi de 100 pg/mL para a IL-2, 10 pg/mL para a IL-4, 100 pg/mL para o fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM--CSF) e 200 pg/mL para o interferon-r.

Ensaio de microcanais com disco compacto (CD)

Gyros AB (Uppsala, Suécia) desenvolveu um imunoensaio fluorescente microfluídico simultâneo usando um disco compacto como tecnologia de microlaboratório, em que o fluxo microfluídico pode ser obtido por força centrífuga (Poulsen, 2004). No CD, podem ser feitos 104 ensaios simultaneamente por imunoensaio em coluna fluorescente. A fase sólida consiste em micropartículas de plástico que se ligam à estreptavidina. A ligação do anticorpo específico à biotina aplica-se à coluna. Podem ser medidos automaticamente 100 nL de amostra pela separação da válvula de quebra hidrofóbica cuja parede foi coberta com polímero hidrofóbico. A valva pode ser aberta por força centrífuga e vários tipos de ajustes de quebra no canal do CD possibilitam a realização de um ensaio rápido e simples por meio da alteração da rpm para controlar as reações. Esse ensaio foi aplicado à detecção da IgG humana. A sensibilidade é de 1 ng/mL.

Resumo

Avanços tecnológicos notáveis nos ensaios simultâneos foram alcançados na década atual. Todavia, uma das coisas que ainda falta conseguir é a miniaturização do ensaio em todos os seus aspectos. Por exemplo, dificuldades mecânicas ou psicoquímicas na manipulação de microvolumes de líquido e a evaporação da amostra durante a manipulação continuam inevitáveis. Antes de serem introduzidos com sucesso na rotina dos laboratórios clínicos, a tecnologia dos dispositivos e o projeto do ensaio ambiental no laboratório precisam ser aprimorados.

Do ponto de vista da aplicação clínica, ensaios múltiplos simultâneos podem não parecer tão atraentes como se esperava. Em alguns casos, a sensibilidade e a especificidade dessa técnica precisa ser avaliada com mais cuidado. No entanto, ensaios múltiplos simultâneos baseados na tecnologia da miniaturização devem ser o objetivo final dos laboratórios diagnósticos, dadas as vantagens que oferecem em termos de contenção de custo e redução da carga sobre os pacientes de flebotomia, além da utilidade clínica.

Referências bibliográficas

Actor JK, Kuffner T, Dezzutti CS, et al: A flash-type bioluminescent immunoassay that is more sensitive than radioimaging: quantitative detection of cytokine cDNA in activated and resting human cells. J Immunol Methods 1998; 211:65–77.

Alpha B, Lehn JM, Mathis G: Energy transfer luminescence of Eu(III) and Tb(III) cryptases of macrobicyclic polypyridine ligands. Angew Chem Int Ed Engl 1987; 26:266–267.

Ashihara Y, Hiraoka T, Makino Y, et al: Immunoassay for determining low- and high-Mr antigens with a dry multilayer film. Clin Chem 1991; 37:1525–1526.

Ashihara Y, Nishizono I, Miyagawa E, et al: Homogeneous enzyme immunoassay for high molecular weight antigen (I). J Clin Lab Anal 1988; 2:138–142.

Avrameas S, Guilbert B: Dosage enzymoimmunologique de proteines a l'aide d'immunoabsorbants et d'antigenes marques aux enzymes. CR Acad Sci 1971; 273:205–2707.

Avrameas S. Ternynck T, Guesdon JL: Coupling of enzymes to antibodies and antigens. Scand J Immunol 1978; 7 (Suppl):7–23.

Axelsen NH (ed.): Quantitative immunoele ctrophoresis: new developments and applications. Scand J Immunol 1975; Suppl. 2: 1–230.

Babson AL, Olson DR, Palmieri T, et al: The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. Clin Chem 1991; 37: 1521–1522.

Blackburn GF, Shah HP, Kenten JH et al: Electrochemiluminescence detection for development of immunoassay and DNA probe assays for clinical diagnostics. Clin Chem 1991; 37:1534–1539.

Bounaud MP, Bounara JY, Bouin-Pineau MH, et al: Chemiluminescence immunoassay of thyrotropin with acridinium-ester-labeled antibody evaluated and compared with two other immunoassays. Clin Chem 1987; 33:2096–2100.

Boyd JC, Savory MG, Margrey M, et al: Adaptation of EMIT drug assays to a random-access automated clinical analyzer. Ann Clin Lab Sci 1985; 15: 39–44.

Boyden SV: The absorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J Exp Med 1951; 93:107–120.

Bronstein I, Edwards B, Voyta JC: 1,2-dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. J Biolumin Chemilumin 1989a 4:99–111.

Bronstein I, Juo RR, Voyta JC: Novel chemiluminescent adamantyl 1, 2 dioxetane enzyme substrate. *In* Stanley P, Kricka LJ (eds): Bioluminescence and Chemiluminescence. Chichester, UK, John Wiley & Sons, 1991, pp 74–82.

Bronstein I, Voyta J, Thorpe G, et al: Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase applied in an ultra-sensitive enzyme immunoassay of thyrotropin. Clin Chem 1989b; 35:144l–1446.

Bruni J, McPherson P, Buechler K: A STAT cardiac marker system for detecting acute heart attacks. Am Clin Lab 1999; 18: 14–16.

Burd JF, Wong RC, Feeney JE, et al: Homogeneous reactant-labeled fluorescent immunoassay for therapeutic drugs exemplified by gentamicin determination in human serum. Clin Chem 1977; 23: 1402–1408.

Coons AH, Creech JH, Jones RN: Immunologic properties of an antibody containing a fluorescent group. Prop Soc Exp Biol Med 1941; 47:200.

Dandliker WB, de Saussure, VA: Fluorescence polarization in immunochemistry. Immunochemistry 1970;7:799–828.

Dandliker WB, Kelly RJ, Dandliker J, et al: Fluorescence polarization immunoassay. Theory and experimental method. Immunochemistry 1973; 10:219–227.

Ekins R: Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. Clin Chem 1998; 44: 2015–2030.

Um novo imunoensaio sensível em formato de microfileira miniaturizado é descrito nesse artigo. Tal método pode ser aplicado a imunoensaios e para análise de DNA/RNA, e pode ainda revolucionar os campos diagnóstico e farmacêutico, como fizeram o chip de DNA e o chip de proteína.

Ekins RP: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. Clin Chem Acta 1960; 5:453.

Engvall E, Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8:871–874.

Erler K: Elecsys immunoassay systems using electrochemiluminescence detection. Wien Klin Wochenschr Suppl 1998;3:5–10.

Fahey JL, McKelvey EM: Quantification determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J Immunol 1965; 94:84–90.

Fiore M, Mitchell J, Doan T, et al: The Abbott IMx automated benchtop immunochemistry analyzer system. Clin Chem 1988; 34:1726–1732.

Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. Clin Chem 1997;43(9):1749–1756.

Galvin JP: Particle enhanced immunoassays – a review, diagnostic immunology. *In* Rippey JH, Nakamura RM (eds): Technology Assessment. Skokie, IL, College of American Pathologists, 1984, pp 18–30.

Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH: Methods in lmmunology, 3rd ed. Reading, MA, WA Benjamin, 1977, pp 273–327.

Giegel JL, Brotherton MM, Cronen P, et al: Radial partition immunoassay. Clin Chem 1982;28:1894–1898.

Halonen P, Meurman O, Lovgren T, et al: Detection of viral antigens by time resolved fluoroimmunoassay. *In* Bachman PA (ed): Current Topics in Microbiology and Immunology. New York, Springer-Verlag, 1973, pp 133–146.

Hasegawa A, Andoh A, Ashihara Y: Simple and rapid detection of antibodies to HIV-1/2 using immunochromatography (Abstract). IUVDT World STD/AIDS Cogress 1995, p 145.

Haux P, Dybois H, McGovern M, et al: Evaluation of the TIna-quant® ferritin assay on the Boehringer Mannheim/Hitachi 704 system. Clin Chem 1988; 34:1174 (Abstract).

Heidelberg M, Kendall FE: The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. J Exp Med 1935; 61: 563–591.

Henderson DR, Freidman SB, Harris JD, et al: CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clin Chem 1986; 32: 1637–1641.

Hirayama C, Ihara H, Shibata M, et al: Polypeptide artificial carrier particles for use in passive agglutination immunoassay. Polymer J 1991; 23:161.

Hunter WH, Greenwood FC: Preparation of iodine-131--labeled human growth hormone of high specific activity. Nature 1962; 194:495–496.

Ikeda M: New agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. Gann 1984; 75:845–848.

Ishikawa E, Kohono T: Development and application of sensitive enzyme immunoassay for antibodies. J Clin Lab Anal 1989; 3:252.

Isomura M, Honda N, Kawada A, et al: Development of a highly sensitive enzyme immunoassay for human calcitonin using solid phase coupled with multiple antibodies. Ann Clin Biochem 1999; 36: 629–635.

Isomura M, Okamura C, et al: Microfabricated protein biochip for multiple fluorescent sandwich immunoassay. Clin Chem 2003; 49(S6): A13

Isomura M, Ueno M, Shimada K, et al: Highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay with gelatin--coated ferrite solid phase. Clin Chem 1994; 40:1830.

Jolley ME: Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma. J Anal Toxicol 1981; 5:236–240.

Kabat EA: Kabat and Meyer's Experimental lmmunochemistry, 2nd ed. Springfield, IL, Charles C Thomas, 1961.

Kasahara Y: Homogeneous enzyme immunoassays. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992a, pp 169–182.

Nesse artigo, Kasahara descreve a progressão histórica do desenvolvimento do imunoensaio, e revê os imunoensaios enzimáticos homogêneos, visando aos testes de sensibilidade e à simplificação do procedimento, bem como sua aplicabilidade aos pequenos haptenos e às grandes proteínas.

Kasahara Y: Principles and applications of particle immunoassay. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992b, pp 127–147.

Kasahara Y, Ashihara Y: Simple devices and their possible application in clinical laboratory downsizing. Clin Chim Acta 1997; 267: 87–102

Os ensaios imunocromatográficos são recursos poderosos para testes imediatos e feitos pelo próprio paciente. Esse artigo descreve os ensaios imunocromatográficos em um formato simples de imunoensaio para testes rápidos e feitos pelo próprio paciente, e discute a diminuição e automação no laboratório com referência específica à situação no Japão.

Kato K, Hamaguchi Y, Fukui H, et al: Enzyme-linked immunoassay, a simple method for synthesis of the rabbit antibody-β-D-galactosidase complex and its general applicability. J Biochem 1975; 78:423–425.

Kemp BE, Rylatt DB, Bundesen PG, et al: Autologous red cell agglutination assay for HIV-I antibodies: simplified test with whole blood. Science 1988;241:1352–1354.

Kitagawa T, Fujitake T, Taniyama H, et al: Enzyme immunoassay of viomycin, new cross-linking reagent for enzyme-labelling and a preparation method for antiserum of viomycin. J Biochem 1978; 83:1493–1501.

Koehler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256–495.

Kricka LJ: Chemiluminescent and bioluminescent techniques. Clin Chem 1991; 37:1472–1481.

Nesse artigo, Kricka descreve as características e os mecanismos da emissão de luz da maioria das moléculas quimioluminescentes e bioluminescentes empregadas na detecção de sinais em imunoensaios e na detecção do ácido nucleico. Uma excelente revisão.

Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H: Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19–9 in the sera of patients as a mucin. Cancer Res 1983; 43: 5489–5492.

Mancini G, Carbonara AO, Hereman JF: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 1965; 2:235.

Masson PL, Holy HW: Immunoassay by particle counting. *In* Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 3rd ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1986, 43–48.

Mathis G: Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. Clin Chem 1995;41:1391–1397.

Mathis G: Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. Clin Chem 1993;39:1953–1959.

Miles LEM, Hales CM: Labelled antibodies and immunological assay systems. Nature 1968; 219: 186–189.

Morris DL: Effect of antibodies to glucose oxidase in the apoenzyme reactivation immunoassay system. Anal Biochem 1985; 151: 235–41.

Morris DL, Ellis PB, Carrico FJ, et al: Flavin adenine dinucleotide as label in homogeneous colorimetric immunoassays. Anal Chem 198l; 53:658–665.

Nakane PK, Pierce GB:Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for localization of antigens. J Histochem Cytochem 1966;14:929–931

Nakamura RM, Monoclonal antibodies: Methods and clinical applications. Clin Physio Biochem 1983; 1: 160–72.

Nakamura RM: Fluorescence immunoassays. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992a, pp 205–227

Nakamura RM, Kasahara Y: Heterogeneous enzyme immunoassays. *In* Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds): Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992b, pp 149–167.

Nessa referência, são discutidos os princípios e o desempenho dos ensaios, e a aplicação prática dos imunoensaios enzimáticos heterogêneos é descrita. Essa revisão ajudará o leitor em geral a entender os imunoensaios não isotópicos e o pesquisador a desenvolver imunoensaios enzimáticos.

Nakamura RM, Robbins BA: Current status of homogeneous enzyme immunoassays. J Clin Lab Anal 1988; 2: 51.

Nargessi RD, Landon J, Smith DS: Use of antibodies against the label in non-separation non-isotopic immunoassay; 'indirect quenching' fluoroimmunoassay of protein. J Immunol Methods 1979; 26: 307–313.

Nishizono I, Ashihara Y, Tsuchiya H, et al: Homogeneous enzyme immunoassay for high molecular weight antigens (II). J Clin Lab Anal 1988; 2: 143–147.

Nishizono I, Iida S, Suzuki N, et al: Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring tumor markers. Clin Chem 1991; 37: 1639–1644.

Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ: Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. Clin Chem 1998; 44: 2057–2060.

Patterson W, Werness P, Payne WJ, et al: Random and continuous-access immunoassays with chemiluminescent detection by Access automated analyzer. Clin Chem 1994; 40: 2042–2045.

Peluso P, Wilson D, Do D, et al: Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. Anal Biochem 2003; 312: 113–124.

Poulsen E, Sandegren F. CD microlaboratories – a fully automated solution for fast and flexible IgG quantification in biopharmaceutical process development. IBC Antibody Therapeutics, Nov 30–Dec 2, 2004. Available on line at: www.gyros.com/technology/tech_presentations.html.

Ritchie R: Automated immunoanalysis. New York, Marcel Decker, 1978.

Ritzmann SE, Daniels JC (eds): Serum protein abnormalities – diagnostic and clinical aspects. Boston, Little, Brown & Co., 1975.

Rodriguez-Espinosa J, Mora-Brugues J, Ordonez-Llanos J, et al: Technical and clinical performances of six sensitive immunoradiomeric assays of thyrotropin in serum. Clin Chem 1987; 33:1439–1445.

Rogers LC, Kahn SE, Oeser TH, et al: The stratus immunofluorometric assay system evaluated for quantifying human chorionic gonadotropin in serum. Clin Chem 1986; 32: 1402.

Rose NR, Bigazzi PE (eds): Methods in Immunodiagnosis. New York, John Wiley & Sons, 1973, pp 1–30.

Rowley GL, Rubenstein JE, Huisjen J et al: Mechanism by which antibodies inhibit hapten-malate dehydrogenase conjugates. J Biol Chem 1975; 250:3759–3766.

Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF: Homogeneous enzyme immunoassay. A new immunological technique. Biochim Biophys Res Commun 1972; 47:846–851.

Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 1949; 51:660–672.

Schroeder HR, Dean CL, Johnson PK, et al: Coupling aminohexyl-FAD to proteins with dimethyladipimidate. Clin Chem 1985; 31: 1432–1437.

Sgoutas DS, Barton EG, Hammarstrom M, et al: Four sensitive thyrotropin assays critically evaluated and compared. Clin Chem 1989; 25:1785–1789.

Silzel JW, Cercek B, Dodson C, et al: Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection. Clin Chem 1998; 44:2036–2203.

Skerra A, Pluckthun A: Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli.* Science 1988; 240: 1038–1041.

Smith J, Osikowicz G: Abbott AxSYM random and continuous access immunoassay system for improved workflow in the clinical laboratory. Clin Chem 1993; 39: 2063–2069.

Soini E, Hemmila I: Fluoroimmunoassay: Present status and key problems. Clin Chem 1979; 25:353–361.

Soini E, Kojola H: Time resolved fluorometer for lanthanide chelates: a new generation of non isotopic immunoassays. Clin Chem 1983; 29:65–68.

Steward MW: Overview: introduction to methods used to study the affinity and kinetics of antibody–antigen reactions. *In* Weir M (ed): Handbook of Experimental lmmunology, vol I: Immunochemistry, 4th ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1986, p 25.

Thorpe GH, Haggart R, Kricka LJ, Whitehead TP: Enhanced luminescent enzyme immunoassays for rubella antibody, immunoglobulin E and digoxin. Biochem Biophys Res Commun 1984; 119: 481–487.

Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP: Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. Clin Chem 1985; 31:1335–1341.

Towt J, Tsai SC, Hernandez MR, et al: ONTRAK TESTCUP: a novel, on-site, multi-analyte screen for the detection of abused drugs. J Anal Toxicol 1995; 19: 504–510.

Ullman EF, Schwartzberg M, Rubenstein KD: Fluorescent excitation transfer assay: A general method for determination of antigen. J Biol Chem 1976; 251: 4172–4178.

Ullman EF, Yoshida RA, Blakemore J, et al: Mechanism of inhibition of malate dehydrogenase by thyroxine derivatives and reactivation by antibodies: homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine. Biochim Biophys Acta 1979 567:66–74.

Valkirs GE, Barton R. ImmunoConcentration™: a new format for solid-phase immunoassays. Clin Chem 1985; 31:1427–1431.

Van Weeman BD, Schuurs AHWM: Immunoassay using antigen enzyme conjugates. FEBS Lett 1971; 15:232..

Weeks I, Beheshti I, McCapra, et al: Acridinium esters as high specific activity labels in an immunoassay. Clin Chem 1983; 29:1474–1479.

Williams CA, Chase MW (eds): Methods in Immunology and Immunochemistry, vol III. New York, Academic Press, 1970.

Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE: Hoogenboom HR: Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol 1994; 12:433–455.

Wu AH, Wong SS, Waldron C, et al: Automated quantification of choriogonadotropin: analytical correlation between serum and urine with creatinine correction. Clin Chem 1987; 33:1424–1426.

Yalow RS, Berson SA: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 1959; 184:1648–1649.

Yamauchi S, Fujiwara Y, Hasegawa A, et al: Simple devices for sensitive and rapid detection of HBs-Ag and HBs-Ab by immunochromatography using enzyme (Abstract). Clin Chem, 1997; 43:S242.

Yarmush DM, Morel G, Yarmush ML: A new technique for mapping epitope specificities of monoclonal antibodies using quasi-elastic light scattering spectroscopy. J Biochem Biophys Methods 1987; 14: 279–289.

Zola H: Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1987.

CAPÍTULO 44

Avaliação laboratorial do sistema imune celular

Roger S. Riley MD PhD, Jonathan Ben-Ezra MD

Critérios clínicos para avaliação da imunidade celular: implicações para a interpretação 939
- Decisão de realizar o teste 939
- Imunodeficiência primária *versus* secundária 939
- Significado clínico dos testes para imunodeficiência 939
- Efeito da idade sobre a resposta imune 940
- Desnutrição e resposta imune 940
- Câncer 941

Abordagem metodológica do teste imunológico celular 941
- Etapas do estudo: triagem 941
- Etapas do estudo: confirmação 942
- Etapas do estudo: estudos imunológicos analíticos 942

Proliferação de linfócitos como método de avaliação da imunidade celular *in vitro* 944
- Imunologia celular 944
- Metodologia: medição da ativação e proliferação linfocitárias na avaliação da imunodeficiência celular 945

Função do granulócito na imunidade mediada por células 946

Metodologia: citometria de fluxo e de imagem 946
- Hardware e outras ferramentas 947

Gating e análise 949
- Imunofenotipagem: aplicação na rotina e para amostras leucêmicas 949
- Análise de DNA 950
- Citometria de fluxo quantitativa: medidas da intensidade de fluorescência 951

Controle e garantia de qualidade no laboratório celular 952

Referências bibliográficas 952

PONTOS-CHAVE

- Os testes de imunidade humoral avaliam a produção de anticorpos específicos em respostas a infecções passadas ou recentes, enquanto os ensaios imunológicos celulares medem as respostas imunes atuais.
- O sistema imune sofre alterações de acordo com a idade e o estado nutricional. Assim, as diferenças de resposta apresentadas pelos indivíduos no teste imunológico podem estar associadas à imaturidade, imunossenescência ou desnutrição, e devem ser consideradas na avaliação dos resultados de testes específicos.
- A imunodeficiência primária pode estar associada a uma incidência aumentada de malignidade. Malignidades, quimioterapia e radioterapia podem suprimir significativamente a resposta imune e alterar os resultados dos ensaios de imunidade celular.
- A avaliação da resposta imune celular é realizada em uma sequência de etapas ordenadas, que pode incluir testes *in vitro* e *in vivo* para identificação das áreas afetadas pela imunodeficiência.
- A medida da ativação linfocitária pode ser obtida *in vitro* por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais ativação-específicos marcados com fluorescência e corantes vitais. A utilidade dessa abordagem aumentou significativamente com o desenvolvimento de fluorocromos que apresentam diferentes espectros de excitação.

A compreensão do sistema imune foi bastante ampliada pela detecção de anormalidades discretas em pacientes com suspeita de imunodeficiência. Tais avanços foram trazidos por estudos sobre a diferenciação e função celular imune normais, deleção genética experimental e análises detalhadas das síndromes de imunodeficiência humana. Novas abordagens experimentais têm ajudado a elucidar os mecanismos e a base funcional da desregulação imune em pacientes que apresentam mutações genéticas primárias (congênitas) envolvendo o sistema imune ou infecções congênitas secundárias (adquiridas). Como as imunodeficiências geralmente não podem ser distinguidas pela apresentação clínica de infecções, as informações genéticas estão se tornando um componente cada vez mais importante do teste e da interpretação diagnóstica. A missão do laboratório de imunologia clínica consiste em traduzir novas pesquisas de vanguarda em testes altamente padronizados e de relevância clínica para pacientes individuais.

Os estudos sobre o sistema imune celular humano estão concentrados em três áreas principais: (1) imunodeficiência primária, que revela o impacto dos defeitos imunes congênitos sobre a defesa do hospedeiro; (2) doenças autoimunes, em que é evidente o efeito de uma atividade imune excessiva ou inadequada; e (3) imunodeficiência adquirida, na qual a infecção causa danos diretos ao sistema imune, como ocorre na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Além disso, os defeitos de imunidade celular associados a doenças com características de disfunção imune, como a infecção crônica, o câncer, a desnutrição ou a lesão traumática, fornecem uma noção crucial sobre a defesa imunomediada do hospedeiro.

O conceito geral de "imunidade" muitas vezes é equiparado ao de imunidade humoral: presença de anticorpos potencialmente protetores contra um agente infeccioso introduzido no corpo por infecção natural ou imunização. Como a imunologia – considerando o modo como é praticada atualmente no laboratório clínico – é uma ciência relativamente nova (Silverstein, 1979; Moulin, 1989; Good, 2002), foi necessário haver a epidemia de HIV para que fosse demonstrado o verdadeiro impacto dessa poderosa e mutável arma do sistema imune. Em contraste com a imunidade humoral, a função celular imune é fundamentalmente complexa e difícil de quantificar. Os testes básicos para imunidade humoral medem a produção de anticorpos específicos de uma resposta anterior a um vírus ou microrganismo específico. Os ensaios de imunidade celular, em contrapartida, medem as respostas atuais.

Como a maioria dos linfócitos do sangue periférico é constituída de células em repouso, a reação celular imune deve ser recriada ou produzida na hora, no sistema de teste. Esse sistema, por sua vez, precisa ser capaz de desencadear essa resposta, bem como de sustentar a reação pelo fornecimento de todos os elementos necessários que são disponibilizados *in vivo*, além de contar com um ponto terminal quantificável. O campo da imunologia celular sofreu grandes mudanças ao longo da década de 1980, pelo impacto exercido pelos principais esforços de pesquisa, entre os quais o uso de anticorpos monoclonais para identificação de células, o desenvolvimento das capacidades analítica e de separação da citometria de fluxo, a descoberta da regulação da resposta imune mediada por citocinas, o nascimento da imunologia molecular e, acima de tudo, a enorme necessidade de compreender e controlar a emergente epidemia de HIV (Herzenberg, 2004). O aparecimento do HIV deu-se praticamente em paralelo com o potencial de identificar células T $CD4^+$. As primeiras análises de deficiência celular imune funcional na síndrome da imunodeficiência adquirida

(AIDS) inicialmente basearam-se na análise da resposta linfoproliferativa (Masur, 1981; Siegal, 1981) e, desde então, evoluíram para uma gama de abordagens funcionais (Perfetto, 1997; Rosenberg, 1997; Zhou, 1998).

Este capítulo apresenta testes de imunologia celular atualmente em uso, à luz das futuras tendências. A avaliação imunológica celular está se distanciando dos ensaios isolados e dos números fixos de pontos terminais e seguindo em direção a uma análise integrada da função celular nos vários níveis que refletem as interações celulares como processos dinâmicos.

Critérios clínicos para avaliação da imunidade celular: implicações para a interpretação

Decisão de realizar o teste

Embora teoricamente a interpretação dos testes imunológicos se desenvolva a partir de uma abordagem diferencial cuidadosa em relação à triagem, em termos práticos, a resposta imune de um paciente é estudada no contexto da apresentação clínica em andamento. Entretanto, os testes imunológicos podem ser caros e demorados, de modo que a escolha do teste com frequência depende da suspeita clínica. Como existem poucos (se algum) testes de avaliação da imunidade celular que sejam total e especificamente diagnósticos, a interpretação deve ser abordada com cautela. A responsabilidade do laboratório de imunologia clínica consiste em estabelecer uma gama de testes que seja suficiente para realizar avaliações judiciosas, com vistas a determinar a natureza e a extensão de alterações imunes, bem como considerar uma variedade de potenciais causas ao fornecer a interpretação.

A decisão de testar a resposta imune de um paciente usualmente advém de uma das razões descritas na Tabela 44.1. Suscetibilidade aumentada ou inexplicável a infecções, aumento da severidade de infecções comuns ou reação incomum à imunização constituem motivos que justificam uma avaliação imunológica. As infecções incomuns, em especial aquelas causadas por agentes oportunistas, ou as infecções severas irresponsivas ao tratamento, além de certos estados alérgicos ou atópicos, também podem motivar a realização de testes imunológicos. Nos últimos anos, o potencial de infecção pelo HIV substituiu a possível imunodeficiência primária como principal diagnóstico presuntivo. Todavia, como se discute subsequentemente, esse fato pode levar ao subdiagnóstico da doença da imunodeficiência primária.

Alterações imunológicas podem acompanhar inúmeras entidades clínicas, entre as quais malignidades; doenças hematológicas, como anemia de Fanconi, hemofilia, trombocitopenia imune; distúrbios linfoproliferativos, como histiocitose; e hemoglobinopatias, como anemia falciforme e talassemia; bem como uma ampla gama de anomalias cromossômicas, incluindo síndrome de DiGeorge, síndrome de Down, síndrome de Bloom, disceratose congênita de Williams, epidermólise bolhosa e síndrome de Duncan (distúrbio linfoproliferativo ligado ao X). As doenças autoimunes, como doenças reumáticas, doença mista do tecido conjuntivo, diabetes de tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla e miastenia grave, podem estar associadas a alterações imunocelulares, e serão discutidas em outra seção deste livro.

Imunodeficiência primária *versus* secundária

As principais características da imunodeficiência primária – ou imunodeficiência adquirida suspeita decorrente da infecção pelo HIV – devem ser distinguidas das alterações imunológicas associadas a outras condições clínicas. Além disso, uma lesão traumática, como aquelas resultantes de queimadura ou acidente com significativa perda de sangue ou dano a órgãos, muitas vezes produz um período de vulnerabilidade a infecções. Ademais, outras condições, como uma pré-malignidade subjacente ou doenças infecciosas ainda não diagnosticadas, podem produzir alterações imunes que poderiam parecer fenotipicamente idênticas a uma imunodeficiência primária.

Embora a infecção por HIV possa ser prontamente diagnosticada por meio de testes diretos, o laboratório de imunologia clínica às vezes

Tabela 44.1 Apresentação de uma possível imunodeficiência

Infecções bacterianas frequentes
Reação sistêmica severa e incomum a vírus
Desenvolvimento de infecção diante de organismos pouco comuns, como fungos ou protozoários
Reação sistêmica subsequente à vacinação com vírus vivo
História familiar de infecções recorrentes
Exposição ao vírus da imunodeficiência humana

serve de campo de experimentação antes da abordagem do paciente, ou de tutor para o consentimento informado para realização do teste de detecção do HIV. Essa atuação se baseia na observação de que, entre os indivíduos adultos HIV positivos, uma proporção $CD4^+/CD8^+$ invertida é praticamente sempre encontrada. Assim, como resultado da atual AIDS epidêmica, a proporção $CD4^+/CD8^+$ invertida passou a ser identificada como marcador da infecção pelo HIV. Entretanto, existem inúmeras doenças que envolvem o sistema imune além da infecção pelo HIV que são capazes de produzir a proporção $CD4^+/CD8^+$ invertida ou números muitos baixos de células $CD4^+$. Tais doenças incluem (sem se limitar a) síndrome de DiGeorge, timoma benigno, início da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), doença de Kawasaki, desnutrição proteico-calórica e malignidades. Alguns exemplos de proporção $CD4^+/CD8^+$ invertida não relacionada a infecção pelo HIV e contagem reduzida de células $CD4^+$ são mostrados na Tab. 44.2. O bebê apresentado no Caso 3 (Tab. 44.2) desenvolveu múltiplos abscessos sépticos no trato gastrintestinal e foi considerado possuidor de distúrbio de imunodeficiência primária. Entretanto, essa avaliação foi realizada após um episódio de quase afogamento em uma banheira em que, posteriormente, foram encontrados traços de limpador de ralos. O dano cáustico ao trato gastrintestinal produziu as múltiplas lesões incomuns e o desequilíbrio no subconjunto de linfócitos T periféricos. Esse desequilíbrio, e não o dano ao trato gastrintestinal, foi resolvido rapidamente. Esse caso também ilustra a necessidade de realizar testes confirmatórios tão logo o paciente esteja estável.

Os distúrbios de imunodeficiência primária quase sempre se apresentam no contexto de infecção ou alterações hematológicas. A avaliação laboratorial desses distúrbios requer uma abordagem em etapas, com o intuito de minimizar a coleta de sangue e para escolher de forma lógica um dos testes disponíveis para fins de diagnóstico diferencial. Alguns diagnósticos presuntivos podem parecer suspeitos com demasiada frequência. Um exemplo é a síndrome de Wiskott-Aldrich, embora esse diagnóstico não necessariamente deva ser excluído em casos de trombocitopenia inexplicável. Contudo, a síndrome de Wiskott-Aldrich pode passar despercebida se a resposta a mitógenos for testada isoladamente, em vez de a resposta aos antígenos também ser avaliada. Nesse caso, o defeito imune pode se tornar mais acentuado com o passar do tempo, e haverá necessidade de realizar testes de acompanhamento.

Significado clínico dos testes para imunodeficiência

Um aspecto frequentemente confrontado pelo diretor do laboratório de imunologia celular é o de como avaliar o potencial significado clínico de uma resposta imune comprometida *in vitro*. Estudos sobre distúrbios, até mesmo relativamente bem definidos, mostraram que pode haver diferenças bastante significativas em termos de impacto clínico. Entretanto, o uso das estratégias de teste mais modernas pode ser útil na subclassificação de pacientes de acordo com o nível e extensão do defeito.

Por exemplo, a síndrome de DiGeorge (DiGeorge, 1974) é classicamente uma tríade que envolve aplasia tímica, aplasia paratireoide e defeitos conotruncais. Pacientes com a síndrome apresentam diferenças marcantes quanto ao grau de severidade de infecções, apesar dos achados relativamente similares de números reduzidos de linfócitos T maduros e uma fraca resposta a mitógenos. Inicialmente, havia um

Tabela 44.2 Proporção $CD4^+/CD8^+$ invertida e baixos níveis de $CD4^+$ na imunodeficiência não associada ao HIV

Estudo de caso	Idade	Subgrupos de linfócitos			Nº abs	Diagnóstico
		% $CD3^+$	% $CD4^+$	% $CD8^+$		
1. Inicial	3 anos	56	26	29	209	Deficiência idiopática de CD4
2. Inicial	6 anos	73	18	24	330	Disceratose
3. Inicial	3 meses	29	15	10	762	Imunodeficiência R/O congênita
1 semana	–	43	25	15	2846	Trauma gastrintestinal cáustico
4. Inicial	6 anos	89	62	32	874	Aplasia de hemácias
3 anos	–	93	36	57	272	–
5. Inicial	3 meses	83	51	31	2734	Síndrome de Noonan
5 meses	–	76	18	48	96	–
6. Inicial	4 meses	36	25	7	304	Síndrome de Williams
1 ano	–	51	42	12	2794	–
7. Inicial	1 semana	0	0	24	0	Síndrome de DiGeorge
8. Inicial	12 anos	64	20	33	ND	Talassemia
9. Inicial	8 anos	65	26	47	ND	Neutropenia imune
10. Inicial	50 anos	74	18	51	ND	Melanoma uveal
1 dia	–	72	45	35	ND	Pós-hipertermia

Nº abs. = número absoluto de linfócitos T $CD4^+$.

alto índice de fatalidade associado a essa síndrome. O aprimoramento dos métodos cirúrgicos e anestésicos provocou uma redução significativa da incidência de infecções severas, embora alguns bebês ainda desenvolvam infecções incuráveis que acabam sendo fatais (Bastian, 1989). Recentemente, tornou-se possível utilizar uma análise fenotípica de linfócitos mais exata para determinar o grau de severidade do defeito imune e prever o resultado clínico com maior acurácia. Ao empregar um teste longitudinal no decorrer de vários meses e adotar uma abordagem multiparamétrica, já parece ser possível prever o grau de severidade a partir de números consistentemente diminuídos de células T $CD4^+$, proporção $CD4^+/CD8^+$ invertida e produção reduzida de linfocina interleucina (IL)-2 (Cunningham-Rundles, 1994). A investigação acerca do significado de deleções monossômicas do cromossomo 22q11.2, que constituem a principal causa da síndrome de DiGeorge, síndrome velocardiofacial e síndrome da anomalia facial conotruncal, ilustra a importância das novas informações genéticas. Apenas a síndrome de DiGeorge foi originalmente descrita como distúrbio de imunodeficiência. Novos estudos voltados para a frequência da imunodeficiência em outras síndromes clínicas associadas à microdeleção no cromossomo 22q11.2 demonstraram que mais de 75% dos pacientes apresentavam evidências de imunocomprometimento (Sullivan, 1998). A severidade da imunodeficiência não apresentou correlação com qualquer aspecto fenotípico em particular.

A função da célula T pode ser tão ou até mais importante na infecção pelo HIV que a perda ou a taxa de perda de células T $CD4^+$. Em algumas doenças vírus-associadas, existe uma considerável incerteza no que diz respeito à proximidade da associação existente entre o déficit imune detectado *ex vivo* e a função imune *in vivo* (Landay, 1991; Lloyd, 1992). Enquanto os estudos atualmente sugerem que a resposta ortostática alterada (Rowe, 1999) pode explicar algumas formas de síndrome de fadiga crônica, ou que os níveis plasmáticos aumentados de fator de necrose tumoral α (TNF-α) podem servir de marcador da doença (Moss, 1999), ainda falta uma compreensão clara da causa e efeito.

Efeito da idade sobre a resposta imune

Estudos recentes demonstraram que as mudanças sofridas pelo sistema imune fazem parte de um processo de envelhecimento (Burns, 2004). Embora exista considerável variação em torno disso, e uma parte significativa das variações seja consequência de um estado nutricional alterado (Mazari, 1998; Lesourd, 2004), é essencial que o laboratório clínico forneça valores laboratoriais relevantes para controles agrupados de acordo com a idade.

O estudo de pacientes pediátricos mostra aspectos particulares referentes ao diagnóstico laboratorial das imunodeficiências. O desenvolvimento do sistema imune ainda é incompleto ao nascimento, e as crianças ainda não foram expostas a uma ampla variedade de agentes ambientais anormais, podendo apresentar vulnerabilidade a infecções (Zola, 1996). A exposição viral congênita ou a prematuridade isolada podem estar associadas a anomalias imunológicas. As diferenças fundamentais de resposta imune pediátrica incluem acentuada linfocitose ao nascimento, elevação do número de células B, aumento da proporção $CD4^+/CD8^+$, menor concentração de células *natural killer* (NK) e expansões oligoclonais de células T (Yabuhara, 1990; Fletcher, 1992; Cunningham-Rundles, 1993; Weddenburn, 2001). Tais diferenças se refletem em diferenças marcantes na faixa normal de subgrupos de linfócitos e devem ser consideradas na avaliação dos resultados (Denny, 1992; Bonilla, 1997). Ainda, existem diferenças acentuadas de resposta a diversos agentes ativadores, em comparação aos indivíduos adultos. A resposta neonatal de bebês prematuros a certos ativadores microbianos pode ser mais intensa que a resposta de indivíduos adultos ou de bebês nascidos a termo, por causa das rápidas alterações ocorridas na regulação imunológica (Veber, 1991; Cunningham-Rundles, 2000), ou em decorrência de diferenças fundamentais de programação perinatal (Prescott, 1998). O sistema imune de indivíduos idosos também está alterado em relação ao de indivíduos jovens. Em particular, alterações cumulativas que afetam as subpopulações de células B e T, alteração da sinalização celular e da produção de citocinas, além de outras modificações podem contribuir para a maior incidência de doenças autoimunes e cânceres nesse grupo (Ginaldi, 2000; Fulop, 2003; Hakim, 2004). A deterioração das respostas imunológicas que ocorre com o avanço da idade é denominada "imunossenescência" (Malaguarnera, 2001).

Desnutrição e resposta imune

Apesar de, em geral, se acreditar que a desnutrição é uma condição relativamente rara em países desenvolvidos, evidências crescentes sugerem que se trata de uma ocorrência bastante comum, em especial entre indivíduos de certas faixas etárias (Pennington, 1996). A desnutrição está associada à imunodeficiência e torna o indivíduo significativamente vulnerável a infecções (Cunningham-Rundles, 1996; Keusch, 2003). Exemplificando, a deficiência de zinco pode se manifestar por meio de uma profunda imunodeficiência que, por sua vez, pode estar relacionada à falta primária de captação de zinco no trato gastrintestinal em decorrência de acrodermatite enteropática, ou a um suprimento inadequado de zinco proveniente da dieta (Prasad, 1963; Moynahan, 1974). Indivíduos que apresentam hipogamaglobulinemia e má absorção associada afetando os níveis de zinco podem exibir uma fraca resposta proliferativa *in vitro*, sendo que as infecções são resolvidas mediante reposição de zinco (Cunningham-Rundles, 1981). Esse cenário está associado ao fato de o zinco ser necessário à atividade biológica do

hormônio tímico. Este, por sua vez, é necessário à produção e à funcionalidade das células T maduras, bem como para a ativação das células T (Cunningham-Rundles, 1998). Há evidências crescentes de que o desequilíbrio de micronutrientes altera a resposta imune, promovendo efeitos específicos sobre a mesma (Amati, 2003). Em diversas condições clínicas, a desnutrição pode representar um fator agravante. A interação entre as infecções e o metabolismo alterado secundariamente à resposta de fase aguda é capaz de provocar deslocamentos temporais envolvendo oligoelementos, que conduzem a uma supressão passageira da resposta imune. O estresse físico pode exercer efeito semelhante e aumentar a vulnerabilidade a infecções no contexto da imunossupressão (Cunningham-Rundles, 1999). Trata-se de um processo de 2 vias. A falha de crescimento pode ser o primeiro sinal de infecção por HIV apresentado por uma criança HIV^+ (Peters, 1998). Por esses e outros motivos, as avaliações imunológicas devem ser um processo contínuo no contexto do tratamento continuado ou de outros testes.

Câncer

A imunodeficiência primária está associada a uma incidência aumentada de câncer (Cunningham-Rundles, 1987), e está cada vez mais claro que tumores se desenvolvem em associação à infecção pelo HIV (Krown, 1996; Aoki, 2004).

No paciente com câncer, uma imunodeficiência generalizada ou uma redução das respostas a desafios antigênicos podem aparecer associadas ao desenvolvimento da malignidade primária, ocorrer durante as metástases ou ser causadas por efeitos colaterais da intervenção terapêutica. Uma resposta imune reduzida a agentes ativadores inespecíficos estudada *ex vivo* em ensaios de proliferação apresenta correlação com o estágio da doença e tem valor prognóstico para a sobrevida do paciente (Heimdal, 1999). A inversão da proporção $CD4^+/CD8^+$ e uma atividade celular supressora aumentada são frequentemente observadas em pacientes com câncer não tratados, sendo que alterações envolvendo a produção de citocinas também foram detectadas (Livingston, 1987; Smyth, 2004). Estudos experimentais demonstraram que, embora os tumores possam ser surpreendentemente imunogênicos, direcionam a resposta imune no sentido de uma resposta não protetora.

O desenvolvimento de novas abordagens imunoterápicas tem crescido, sugerindo que a resposta a antígenos tumor-específicos será utilizada mais intensamente no futuro (Schultes, 2004; Steinman, 2004; Waller, 2004). Os ensaios de avaliação da resposta imune também podem ser utilizados para acompanhar e avaliar a resposta a tratamentos, como administração de IL-2 (Lissoni, 1999) e vacinas contra câncer (Yannelli, 2004). Em muitos pacientes, a quimioterapia acarreta uma supressão passageira da resposta imune, que é resolvida em pouco tempo. A radioterapia, por outro lado, produz efeitos mais duradouros (Katz, 1993). A avaliação da resposta imune do paciente com câncer requer o uso altamente selecionado e discriminado de testes e ativadores, que reflitam processos relevantes, bem como a especificidade da resposta.

Abordagem metodológica do teste imunológico celular

Os estudos envolvendo seres humanos têm sido baseados na observação das células imunológicas do sangue periférico, uma vez que o compartimento periférico é mais acessível e prontamente mensurável. Contudo, essa abordagem pode não refletir os eventos que ocorrem ao nível regional. O conhecimento das diferenças existentes entre as respostas imunes sistêmica e de mucosa pode, enfim, explicar uma grande parte dos paradoxos que atualmente surgem quando a resposta imune medida *in vitro* ou *ex vivo* é comparada à defesa do hospedeiro *in vivo* (Xu-Amano, 1993). A função imunológica celular sistêmica parece ser regulada por padrões de citocinas ("rede de citocinas") funcionalmente distintos, de modo que, diante da produção de citocinas do tipo T auxiliar 1 (Th1, *T helper 1*), IL-2 e interferon (IFN)-γ, a defesa imunológica celular do hospedeiro seja favorecida. Quando as citocinas do tipo T auxiliar 2 (Th2, *T helper 2*), IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, são produzidas, há indução da resposta de linfócitos B (Balkwill, 1989; Yamamura, 1991).

Em contraste com a imunidade sistêmica, a atividade primária da resposta imune de mucosas consiste em proteger a mucosa bloqueando a entrada de micróbios, toxinas e antígenos por meio da secreção e do transporte de imunoglobulina (Ig)A no lúmen intestinal. Esse processo é mediado por um tipo especial de linfócitos T de memória, que apresenta reduzida capacidade proliferativa para auxiliar as células B (Tlaskalova-Hogenova, 2002; Cheroutre, 2004; Eckmann, 2004; Yuan, 2004). Os linfócitos T, tanto da lâmina própria como intraepiteliais, desenvolvem uma relativa independência do timo e atuam de modo diferente das células T do sangue periférico, utilizando a via de transdução de sinal do CD2, em vez da via do receptor de células T/CD3.

Atualmente, os testes de imunidade de mucosa em geral não são realizados no laboratório de imunologia clínica e, com raras exceções, as células imunes estudadas são oriundas do compartimento do sangue periférico. Por esse motivo, o uso de testes cutâneos *in vivo* e o exame da resposta imune humoral a vacinas previamente administradas são úteis ao imunologista que estuda a imunidade celular, pois constituem formas alternativas de avaliação. Em todos os casos, a adoção de uma abordagem por etapas e a repetição dos testes são medidas altamente informativas.

Etapas do estudo: triagem

A avaliação da função imune de um paciente com suspeita de imunodeficiência normalmente é realizada em etapas. A primeira consiste em uma análise por triagem das possíveis áreas de deficiência, que está destacada na Tabela 44.3. Esses estudos de triagem devem ser acompanhados de uma análise adequada de citometria de fluxo das subpopulações linfocitárias. No caso de crianças, essa análise deve incluir o uso de um marcador de células B para avaliar possíveis alterações nessas células, as quais podem ocorrer de forma transiente em recém-nascidos e serem refletidas em populações de célula T baixas. O uso de um marcador de células NK também é fortemente recomendado para crianças com mais de 3 meses de idade, uma vez que os níveis dessas células podem estar reduzidos ou ausentes ao nascimento (Zola, 1983).

Considerando que, com frequência, existe uma limitação quanto à quantidade de sangue passível de extração para uso em tais estudos, é essencial que a primeira avaliação inclua estudos paralelos, entre os quais uma contagem total de células sanguíneas (CCS), utilizando a mesma amostra de sangue. É fundamental realizar uma contagem diferencial de leucócitos .

A etapa de triagem deve incluir uma abordagem em forma de painel, para avaliar respostas proliferativas a mitógenos e antígenos. A resposta proliferativa de linfócitos a uma gama de agentes ativadores continua sendo uma das ferramentas mais sensíveis de avaliação da função normal. Quando a avaliação dessa resposta inclui um ativador de células T e B apropriado, pode ser útil para definir as áreas com deficiência. Embora isso nem sempre seja feito, o uso de múltiplas concentrações de cada ativador é fortemente recomendado.

Além disso, o tipo de tubo escolhido para coletar as amostras de sangue é igualmente importante. O uso de tubos que contêm lítio-heparina ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) não é recomendado para a realização de estudos funcionais linfocitários. Devem ser utilizados tubos que contêm heparina sódica (isenta de conservantes) ou ácido citrato-dextrose (ACD). O sangue coletado em tubos heparinizados também pode ser utilizado para análises de citometria de fluxo, embora o tempo de preparo e de análise da amostra seja crítico (Standards, 1992; Nicholson, 1993b).

Tabela 44.3 Estudos básicos de varredura imunológica

Contagem/diferencial de células sanguíneas completa(o)
Análise de subpopulações de linfócitos (números e percentuais de células T e B) por citometria de fluxo
Ativação linfocitária *in vitro* com mitógenos e ativadores microbianos
Imunoglobulinas séricas, incluindo subclasses de imunoglobulinas, se houver evidência de infecções clínicas por bactérias encapsuladas. Em alguns casos, os níveis de imunoglobulinas permanecem normais, porém há produção de anticorpos heterógenos não ligadores. Portanto, há necessidade de realizar estudos

A questão sobre quando o sangue deve ser coletado merece consideração. De forma geral, a maioria dos dados é obtida mediante a coleta de sangue pela manhã, sendo que os efeitos circadianos podem influenciar os resultados. Quando é impossível proceder dessa forma, é útil continuar a manter a uniformidade do período de coleta para o paciente individual. Isso se torna mais crítico quando se determina os números absolutos de subgrupos de linfócitos T no monitoramento da doença causada por HIV, ou como parte de uma triagem clínica (Malone, 1990).

Estudos funcionais devem ser realizados, sempre que possível, utilizando amostras de sangue fresco tratadas com anticoagulante (ou sangue armazenado à temperatura ambiente, no escuro, durante 24 horas), antes do isolamento das células mononucleares. Quando o sangue é enviado por transporte aéreo ou encaminhado a um laboratório distante, é extremamente importante incluir paralelamente uma amostra controle de um indivíduo sadio, para servir de padrão interno do processo de transporte.

Etapas do estudo: confirmação

Aspectos gerais

Uma vez que a triagem individual for concluída e as evidências de potenciais lacunas forem detectadas, esses testes devem ser confirmados mediante a repetição dos testes referentes aos aspectos analisados na primeira série. Minimamente, um teste positivo e outro negativo (faixa normal e faixa anormal) devem ser realizados. Testes adicionais às vezes podem ser incluídos no painel que, por sua vez, já fornece a fase inicial dos estudos analíticos.

É importante executar os devidos preparativos para a coleta de sangue no momento em que o paciente apresentar o estado mais clinicamente estável. Recomenda-se realizar estudos basais duplos antes da intervenção, sendo que tais estudos podem abranger a fase de confirmação. Em alguns casos de aparente imunodeficiência, pode estar havendo um sequestro de células imunológicas que se reflete em baixos percentuais de linfócitos T no compartimento periférico, como ilustra o Caso 3 da Tabela 44.2. A etapa de confirmação também deve incluir uma cuidadosa reavaliação da história médica e familiar do paciente. A Tabela 44.4 mostra os estudos que podem ser empregados nessa etapa.

Presença do timo

A radiografia para observação da sombra tímica pode ser inadequada, uma vez que o timo é altamente propenso à depleção por estresse (Haynes, 1998). Apesar da dificuldade para determinar com acurácia o tamanho real do timo, sua avaliação por imagem de ressonância magnética (RM) parece apresentar correlação com o número de linfócitos T $CD4^+$ na infecção pelo HIV (Vigano, 1999). Estudos recentes sugeriram que o timo humano pode ser considerado um órgão quimérico, constituído de tecidos linfoides centrais e periféricos. Hayes (1998) postulou que a atrofia epitelial tímica pode, em parte, derivar de citocinas ou outros fatores produzidos pelas células imunológicas periféricas encontradas junto ao espaço perivascular tímico. Como descrito adiante, na seção sobre avaliação de subgrupos de linfócitos T por citometria de fluxo, a expressão dos antígenos de maturação normais adquiridos ao longo do desenvolvimento tímico deve ser suficiente para identificar a presença de um timo funcional.

Teste cutâneo

O uso de um painel de teste cutâneo pode ser importante nessa fase. Essa abordagem de avaliação da imunidade celular originalmente serviu de ponto de partida para o desenvolvimento de testes funcionais de imunologia celular. Ela mede a hipersensibilidade do tipo tardio diretamente *in vivo*. A experiência obtida com o teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio mostrou que há uma boa correlação geral entre a falta de reatividade – denominada anergia – e a imunodeficiência (Deodhar, 1983; Maas, 1998). Contudo, esse teste não é útil como ferramenta analítica para descobrir a causa da falta de resposta. O teste cutâneo não é muito quantificável. O uso do teste cutâneo com derivado proteico purificado (PPD, *purified protein derivative*) para avaliar a possível presença de *Mycobacterium tuberculosis* constitui exceção, embora indivíduos anérgicos sejam irresponsivos e, além disso, sejam

Tabela 44.4 Estudos analíticos confirmatórios e de primeira etapa

Radiografia para sombra tímica
Teste cutâneo
Atividade de célula *natural killer* (crianças com idade > 6 meses)
Produção de citocinas em reposta à ativação por T auxiliar 1, T auxiliar 2 (IL-2, IFN-γ, IL-4 e assim por diante)
Reação em cultura mista de linfócitos, com o paciente sendo tanto estimulador quanto respondedor
Resposta à imunização
Teste para detecção de anticorpos específicos apropriados à idade
Resposta de anticorpos contra a iso-hemaglutinina (substâncias antigrupos sanguíneos A e B) que ocorre naturalmente, caso o tipo sanguíneo do paciente seja A, B ou O
Teste para adenosina deaminase e deficiência de enzima fosforilase de nucleosídeo purina

Tabela 44.5 Causas de anergia no teste cutâneo

Falta de história antigênica apropriada, quando o painel não inclui ativadores ubíquos
Imunodeficiência primária
Infecções virais
Desnutrição
Doenças granulomatosas
Neoplasia

obtidos resultados falso-positivos de indivíduos vacinados contra o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Huebner, 1993).

As razões que explicam a falta de resposta no teste cutâneo são mostradas na Tabela 44.5. Foram realizados alguns estudos baseados no teste cutâneo de imunização *de novo* utilizando dinitrofluorobenzeno. Embora tenha sido extensivamente utilizada no passado, essa abordagem deixou de ser considerada útil em razão das ambiguidades relacionadas ao mecanismo de reação subjacente. A introdução do teste de "janela cutânea" pode fornecer definitivamente uma medida mais quantitativa e informativa da resposta imune *in vivo*, pois a reação pode ser empregada para testar a resposta a um tumor autólogo (Black, 1988). Entretanto, considerando algumas reservas, a importância do teste cutâneo como forma de demonstração convincente de que os defeitos imunológicos observados *in vitro* podem ter significado prognóstico *in vivo* não deve ser subestimado.

Etapas do estudo: estudos imunológicos analíticos

Os estudos analíticos são destacados de forma geral na Tabela 44.6. Embora a descrição completa dessas abordagens esteja fora do escopo da presente discussão, em termos gerais esses estudos objetivam

Tabela 44.6 Estudos analíticos e imunorregulatórios

Desenvolvimento de antígenos de ativação durante a resposta à estimulação, como antígeno Tac, receptor da transferrina, regulação positiva do MHC de classe II nas células T, receptores solúveis, entre outros
Resposta de ativação inicial (p. ex., canais de cálcio)
Imunorregulação
Resposta a IL-1, IL-2, interferons
Desenvolvimento de funções efetoras
Síntese de imunoglobulinas *in vitro*
Atividade de célula T citotóxica
Análise de fator/célula supressora
Ativação genética, análise do ciclo celular
Resposta à imunização: imunização *de novo*

definir o mecanismo subjacente do defeito imunológico e são realizados por meio de uma série de etapas. Apesar de haver diferentes formas pelas quais é possível atingir essa meta, uma boa opção consiste em avaliar o nível de defeito geral seguindo o plano geral de avaliar os tipos celulares presentes e as proporções relativas de cada um à luz das áreas que apresentam diminuição da função geral e, então, realizar estudos de avaliação da função efetora.

Função imune diferencial

Existem 2 tipos principais de células imunes (Silverstein, 2003; Janeway, 2005): linfócitos T (células T) e linfócitos B (células B). Os linfócitos T são definidos pela expressão do receptor de linfócitos T, que se liga aos antígenos e ao CD3, um determinante de superfície associado ao receptor de célula T que é essencial à ativação. Os linfócitos T possuem receptores diferentes e clonalmente variáveis para uma ampla gama de antígenos, requerem maturação tímica para exercerem sua função normal e mediam a imunidade celular. Os linfócitos B são identificados por uma imunoglobulina de superfície (detectada por anticorpos monoclonais, como CD19 ou CD20) e, mediante ativação apropriada, evoluem para plasmócitos secretores de anticorpos específicos, mediando a imunidade humoral. A perda do timo normal leva ao comprometimento da função dos linfócitos T e afeta a ativação T-dependente dos linfócitos B. Uma falha ao nível da medula óssea pode afetar as respostas imunes mediadas tanto por linfócitos T como por linfócitos B, apesar do envolvimento de ligações específicas. Isso é descrito em maiores detalhes adiante, na seção "Proliferação de linfócitos como método de avaliação da imunidade celular *in vitro*".

A distinção existente entre resposta imune específica e inespecífica constitui uma necessidade fundamental da resposta imune, uma vez que o sistema deve ser capaz de distinguir entre o próprio e o estranho (não próprio) (LeGuern, 2003; Smith, 2004). De uma forma geral, essa distinção é feita pela incorporação do sistema de complexos moleculares de autoantígenos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility complex*) à fase de reconhecimento antigênico. O antígeno deve ser processado e apresentado no contexto do MHC próprio para ser reconhecido e induzir não só a resposta imune como também o desenvolvimento da memória imunológica. A função de processamento antigênico é realizada pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), das quais a melhor estudada é o monócito. Essa resposta desencadeia a ativação e a proliferação de linfócitos, podendo incluir a produção de células efetoras e desencadear a produção de anticorpos pelos linfócitos B. Esse tipo de imunidade, muitas vezes denominado imunidade adaptativa, permanece retido como "memória" e é tipicamente evocado após a imunização ou infecções naturais (Owen, 1993; Sprent, 2002). A falta de expressão do antígeno de MHC de classe II pode ser detectada em linfócitos por citometria de fluxo empregando anticorpos monoclonais dirigidos contra as moléculas de HLA-DR ou HLA-DQ e é a marca registrada da deficiência de MHC de classe II (Tab. 44.7).

Um segundo tipo fundamental de imunidade pode ser descrito como imunidade inata. Ela não possui memória e não evolui mediante contatos repetidos (Janeway, 2002). Esse tipo de imunidade é mediado por células fagocíticas, algumas das quais também são capazes de processar e apresentar antígenos (p. ex., monócitos e células NK). Diferente dos fagócitos, as células NK não estão funcionalmente desenvolvidas ao nascimento, provavelmente porque o IFN-γ – uma citocina-chave necessária ao desenvolvimento e à maturação desse sistema – também está negativamente modulado ao nascimento.

Essa terceira arma é representada pela célula NK, que não é uma célula B nem exatamente uma célula similar à célula T, por não possuir a imunoglobulina de superfície nem o receptor de célula T rearranjado (Yokoyama, 2004; Hamerman, 2005). Essa célula, antigamente chamada "célula K", "célula nula" ou "terceira população", tem se esquivado da classificação convencional estabelecida pelas análises de linhagem celular. Atualmente, o CD56 é considerado o marcador mais definitivo da célula NK (Trinchieri, 1995). As células NK são conhecidas principalmente por serem capazes de destruir de maneira inespecífica (natural) células infectadas por vírus e bactérias, e por prevenirem metástases de células tumorais. Entretanto, as células NK também regulam as funções das células T e B, bem como a hematopoiese. Essas funções das células NK provavelmente dependem de sua capacidade de produzir linfocinas, em particular IFN-γ. As células NK são importantes para a ativação independente de antígeno dos fagócitos no início das infecções e por favorecerem o desenvolvimento de células Th1 antígeno-específicas. O sistema NK é constitutivamente ativo e não requer condicionamento com antígeno para destruir. Quando munidas com anticorpos específicos, no entanto, essas células podem causar destruição de maneira específica. A avaliação funcional dessa população celular pode ser prontamente conseguida por meio de um ensaio rápido de liberação de cromo (conhecido como ensaio de citotoxicidade NK utilizando K-562s como alvo) ou por citometria de fluxo (Hermans, 2004). Futuramente, serão realizados estudos para descobrir como as células NK conectam as imunidades inata e adaptativa (Peritt, 1998).

Tabela 44.7 Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos

Painel básico do sangue periférico (sangue total, hemácias lisadas*)
CD45/CD14
Controles do isótipo de imunoglobulinas murinas
CD3/CD19
CD3/CD4
CD3/CD8
$CD3^-$/CD56 e 16
Células mononucleares ativadas, painel de ativação†
CD45/CD14
Controles do isótipo de imunoglobulinas murinas
CD3/CD25 (IL-2R)
CD3/HLA-DR

* Diante de níveis baixos de CD3, repetir e acrescentar CD2. Também podem ser adicionados anticorpos monoclonais contra o receptor da célula T pareados com CD3. Os marcadores de monócitos também podem ser avaliados. Nesse caso, devem ser utilizados 3 ou 4 cores de reagentes e *gating* de CD45.

† Após 2 dias de cultura, remover as células e lavá-las antes de proceder à varredura com os anticorpos monoclonais listados; analisar as células controle sem ativador e, em seguida, analisar as células ativadas. Os ativadores podem ser mitógenos, IL-2 e/ou interferon-γ.

Desenvolvimento da resposta imune

Se foi determinado que as populações celulares permanecem essencialmente intactas na ausência de ativação, a questão da falha intrínseca pode ser estudada utilizando-se inúmeras abordagens distintas. Uma delas é a análise expandida de marcador de superfície de linfócito, incluindo determinantes estruturais do receptor de antígeno da célula T (TCR) e antígenos de ativação, como CD25, CD38 e HLA-DR (Tab. 44.7). A ausência da regulação positiva do MHC de classe II em resposta ao IFN-γ constitui um exemplo. Embora as populações celulares possam expressar um antígeno de diferenciação normal de referência, também podem coexpressar outros antígenos de maneira inadequada, e isso pode ser a chave de uma anormalidade funcional. Exemplificando, células T $CD8^+$ que coexpressam CD38 são funcionalmente distintas das células CD8 que não expressam esse marcador, as quais se encontram expandidas na doença causada pelo HIV (Giorgi, 1989). A ausência de expressão de certas moléculas, como CD28, também constitui importante indicador. Em algumas síndromes de imunodeficiência primária, a regulação positiva do receptor da IL-2 em reposta à IL-2 pode ser anormal. Os receptores talvez não sejam translocados normalmente ou podem ser liberados de forma precoce (Cunningham-Rundles, 1990).

O desenvolvimento da resposta imune pode apresentar cinética anormal, em decorrência de um recrutamento secundário tardio durante a fase de amplificação. Esse aspecto deve ser testado por meio de estudos de curso temporal. Em alguns casos, a produção de citocinas pode estar ausente ou as citocinas apresentam alteração funcional. As funções efetoras podem ter sido perdidas ou estarem comprometidas. A avaliação desses aspectos pode requerer uma abordagem detalhada. Tentativas de restaurar a resposta pela adição de citocinas podem ser úteis, embora esse procedimento possa contornar a lesão por meio de uma compensação em vez de corrigir a deficiência real. Novas estratégias podem utilizar sangue total no lugar de células mononucleares isoladas (Bocchieri, 1995). Esse sistema reflete com excelência a resposta imune *ex vivo*, uma vez que as verdadeiras

relações existentes entre as células permanecem inalteradas. Além disso, esse sistema pode ser utilizado para medir a produção de citocinas (Petrovsky, 1995; Suni, 1998).

Recomenda-se ao laboratório de imunologia celular selecionar estudos analíticos básicos, normalmente realizados com base na rotina, para utilizar como referência para comparações. O estabelecimento das faixas de normalidade a serem consideradas pelo laboratório, bem como a manutenção de um controle de qualidade, especialmente para certos elementos variáveis, é essencial para garantir a acurácia e a sensibilidade desses testes.

Proliferação de linfócitos como método de avaliação da imunidade celular *in vitro*

Imunologia celular

Ativação e proliferação de linfócitos

Embora o sistema imune esteja classicamente dividido em componentes humoral e celular, essa separação de nenhum modo é absoluta, pois existe considerável interdependência entre as células T e B.

O parâmetro de função imunocelular mais comumente avaliado é a proliferação linfocitária (Perfetto, 2002). A medida da ativação/proliferação de linfócitos evoluiu substancialmente a partir do final da década de 1950 e início dos anos 1960, quando a divisão celular foi determinada por meio da contagem do número de linfócitos transformados em plasmócitos. Esse último método foi substituído em grande parte pela quantificação da incorporação de precursores de ácidos nucleicos radiomarcados (timidina tritiada) em moléculas de DNA recém-sintetizadas. Embora esse "ensaio em massa" continue sendo o procedimento laboratorial utilizado com mais frequência para determinar a proliferação celular, novos reagentes e procedimentos foram disponibilizados recentemente para avaliação da ativação e da proliferação linfocitária. Esses incluem marcadores celulares de superfície comercialmente disponíveis, meios que permitem determinar os percentuais de células em fases específicas do ciclo celular, quantificação de citocinas/receptores de citocinas associados e secretados por células, e formas de avaliar o número de divisões celulares em linfócitos marcados com "corantes de rastreamento". Na presente seção, é feita uma revisão dos eventos moleculares envolvidos na ativação e na proliferação de linfócitos T, bem como de alguns dos novos métodos desenvolvidos para avaliar as funções do sistema imune celular.

Desvendando as vias bioquímicas da ativação linfocitária

Após a interação específica mitógeno/MHC ou antígeno/MHC com os receptores linfocitários apropriados, são iniciados vários processos celulares, entre os quais alterações no transporte de membrana, rearranjo do sistema de citoesqueleto (polarização dos linfócitos em torno da APC) e ativação de diversas vias de sinalização (Harding, 2005). Tais alterações conduzem, por fim, à diferenciação da célula T, secreção de citocinas, proliferação, anergia ou apoptose. Investigações em andamento revelam o complexo molecular e as vias bioquímicas que direcionam as células T ativadas ao longo dessas vias. Anomalias específicas são constantemente descobertas e constituem a base de numerosas doenças que envolvem imunodeficiências primárias. Infelizmente, as anormalidades encontradas no ensaio de proliferação em massa indicam apenas a ocorrência limitada ou a ausência de divisão celular, não fornecendo informações sobre a anomalia subjacente à ativação linfocitária. Há necessidade de ensaios mais sofisticados que permitam investigar as anomalias subjacentes de células T.

Ativação de linfócitos T induzida por antígenos

A ativação de linfócitos T induzida por complexos antígeno/MHC envolve uma série de eventos complicados e definidos, que são ligeiramente diferentes para a ativação de uma célula T naive e de uma célula T de memória. O antígeno é processado por células B ou monócitos, resultando na montagem de peptídeos imunogênicos associados a produtos de classe I ou II dos genes do MHC (van der Merwe, 2003). O complexo peptídeo/MHC é apresentado às células T que possuem TCR apropriado. Além disso, a APC expressa uma série de moléculas de adesão e coestimulatórias que interagem com os respectivos ligantes/contrarreceptores apropriados na superfície da célula T. A ligação do TCR isoladamente é insuficiente para promover a ativação da célula T. Esse fato levou ao desenvolvimento do "modelo de dois sinais" para a ativação das células T (Bretscher, 1992, 1994). O primeiro sinal transmitido pela via TCR/CD4/CD8 modula a transição da célula T a partir dos estágios iniciais de ativação (i. e., G_0 a G_1). O segundo sinal é transmitido através das vias coestimulatórias, principalmente CD28 e, em menor grau, LFA-3, CD2, CD5 e CD7, levando à indução dos genes de IL-2 e outras citocinas necessárias à proliferação e à diferenciação das células T em células efetoras.

Reconhecimento, ativação e transdução de sinal na célula T

O complexo TCR é constituído por uma estrutura heterodimérica de reconhecimento de antígenos (i. e., TCR) e por um complexo transdutor não convalentemente ligado, denominado CD3 (Malissen, 2003). O TCR não pode ser expresso na superfície celular sem o CD3 (Weiss, 1991) e é destituído de capacidades próprias de sinalização. A estrutura de reconhecimento do antígeno é composta de cadeias γ e δ estruturalmente divergentes (ou, com menor frequência, por cadeias γ e δ), enquanto o complexo transdutor CD3 é composto por 4 cadeias polipeptídicas invariáveis: α, β, ε e um dímero de cadeia ζ. Cada proteína CD3 contém um *motif* denominado *motif* imunológico de ativação da tirosina (ITAM, *immune tyrosine activation motif*), que se liga aos domínios SH2 das proteínas quinase da tirosina. A cadeia ζ (encontrada sob a forma de ζ homodímero, uma cadeia ζ com η ou cadeia ζ com Fc ε RI γ) contém 3 ITAMs e é o componente mais significativo do complexo TCR envolvido na transdução de sinal desse receptor (Weiss, 1994; Alarcon, 2003). Originalmente descritos por Reth, esses *motifs* exercem papel essencial nos eventos iniciais subsequentes à ativação da célula T (Reth, 1989; Irving, 1991). As moléculas CD4 e CD8 existentes na superfície das células T também se encontram não convalentemente ligadas ao complexo TCR. Essas moléculas se ligam às moléculas de HLA de classes I e II, respectivamente, na APC, e também estão envolvidas na transdução de sinais de ativação. O antígeno processado é apresentado às células T no contexto dos antígenos do MHC. Em geral, as células T $CD4^+$ respondem aos antígenos exogenamente processados e apresentados no contexto do MHC de classe II, enquanto as células T $CD8^+$ respondem aos antígenos endogenamente processados e apresentados no contexto do MHC de classe I. CD4 e CD8 também estão associadas às tirosina quinases envolvidas nos eventos iniciais subsequentes à ativação da célula T. Além dessas interações e das interações que envolvem moléculas coestimulatórias, há um outro grupo de moléculas, as moléculas de adesão, presentes tanto nas APCs como nas células T responsivas, que se ligam umas às outras e servem para intensificar a avidez das interações.

As moléculas coestimulatórias identificadas nas APCs incluem B7 (CD80) (Linsley, 1991a), B7.2 (Azuma, 1993), antígeno estável ao calor (HSA, *heat stable antigen*) (Liu, 1992), entre outras (Wingren, 1995; Foletta, 1998). Nas células T, a CD28 é a principal molécula coestimulatória e se liga ao B7; a CTLA-4, por outro lado, se liga tanto à B7 como à B7.2 e está envolvida na modulação negativa da ativação das células T (Linsley, 1991b). Nas células T, ainda não foi identificado um receptor para HSA. A apresentação de antígenos na presença de reagentes que bloqueiam as moléculas coestimulatórias produz uma resposta anérgica (tolerância) na exposição subsequente ao mesmo antígeno específico, embora não afete as respostas a outros antígenos (Tan, 1993). A capacidade de transformar tumores transplantáveis não imunogênicos em tumores imunogênicos transfectando-os com o gene B7 (Chen, 1992; Baskar, 1993; Townsend, 1993; Janeway, 1994) sugere que as moléculas coestimulatórias exercem papel importante na ativação das células T *in vivo*.

Transdução de sinal após a estimulação antígeno-específica

A apresentação de antígeno às células T induz agregação de complexos TCR-CD3 e ativação de proteínas tirosina quinases (PTKs). O próprio TCR possui uma cauda citoplasmática sem atividade transdutora conhecida. Está associado às cadeias ζ do complexo CD3, que contém

os *motifs* ITAM, e parece coprecipitar a atividade da PTK. Duas classes bem conhecidas de famílias de PTK citoplasmáticas estão envolvidas nos eventos bem iniciais subsequentes à agregação do TCR, Src e Syk/ZAP-70. As cascatas de sinalização que descem a partir do complexo TCR-CD3 e da via coestimulatória do CD28 são bem conhecidas (Foletta, 1998; Samelson, 2002). A ativação das tirosina quinases associadas ao TCR – ZAP-70, $p59^{fyn}$ e $p56^{lck}$ – conduz à ativação de 3 vias: $p21^{ras}$, cálcio/calcineurina e proteína quinase C (PKC). A ativação de $p21^{ras}$ ativa as proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) que, por sua vez, fosforilam diversos fatores de transcrição e, assim, regulam a expressão genética. A ativação das PTKs também ativa a fosfolipase C, a qual hidrolisa fosfatidil inositol e promove a geração dos mensageiros secundários diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG ativa a PKC, enquanto o IP_3 promove um aumento rápido e sustentado da concentração citoplasmática de cálcio. O aumento dos níveis de cálcio livre ativa a fosfatase dependente de calmodulina: calcineurina. Esses eventos também conduzem à indução de proteínas ligadoras de DNA e à transcrição de numerosos genes, entre os quais o gene IL-2 e o receptor da IL-2, ambos necessários à proliferação das células T.

A compreensão das vias que levam à ativação da célula T permitiu a descoberta de defeitos moleculares associados a diversas doenças de imunodeficiência adquiridas, e pode finalmente fornecer estratégias terapêuticas para correção dessas deficiências (Rosen, 2000). Por exemplo, foram descritas mutações envolvendo a PTK ZAP-70, as quais estão associadas à forma autossômica da síndrome da imunodeficiência severa combinada (SCID, *severe combinated immunodeficiency*) humana (Elder, 1998). Mutações na cadeia γ comum aos receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 provocam anormalidades de transdução e estão associadas à forma de SCID ligada ao X (Noguchi, 1993). Notavelmente, outra forma de SCID herdada de forma autossômica está associada a mutações envolvendo gene da proteína tirosina Jak3, pertencente à família Janus, que é a única molécula sinalizadora associada à cadeia γ comum (Pesu, 2005). Enquanto são descobertas mais e mais anomalias subjacentes causadoras de imunodeficiência de células T, entre as quais ao menos 10 defeitos moleculares distintos apenas para SCID isoladamente (Fischer, 2005), foi proposto que os distúrbios deveriam ser classificados por meio de um sistema abrangente e capaz de identificá-los de acordo com as anomalias de diferenciação, maturação e função (Gelfand, 1993). Tais designações passariam a enfocar o verdadeiro defeito fisiológico ou bioquímico e, ao final, poderiam fornecer novas opções terapêuticas, entre as quais a terapia genética (Buckley, 2004; Conley, 2005).

Respostas da célula T

Recentemente, a designação das respostas de células T de produção de citocinas de tipo I *versus* de tipo II tem sido preferida para as respostas de células T que conduzem, respectivamente, a padrões de secreção de citocinas com envolvimento conhecido na imunidade celular *versus* padrões de secreção de citocinas observados na imunidade humoral. As respostas de tipo I são caracterizadas pela secreção de citocinas que sabidamente intensificam a inflamação (pró-inflamatórias), além de induzirem à ativação e à proliferação de células T e monócitos. Tais citocinas são IL-2, IFN-γ e IL-12. As respostas de tipo II são caracterizadas pela secreção de citocinas supressoras da inflamação (anti-inflamatórias), que estimulam as células B a se dividir e diferenciar em células secretoras de imunoglobulinas (i. e., IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Há evidências que sugerem que a secreção de citocinas de tipo I regula a secreção das citocinas de tipo II, e vice-versa (Paul, 1993). Por exemplo, na presença de IL-4 tanto *in vivo* (Chatelain, 1992) como *in vitro* (Seder, 1992, 1993), as células T não se desenvolvem em células secretoras de IFN-γ (i. e., esse ambiente favorece o desenvolvimento de uma resposta imune humoral). Foi sugerido que quantidades relativas de IL-4 e IL-12 presentes durante a estimulação de células T *naive* podem desviar a resposta para um tipo ou outro (Paul, 1994).

Vários fatores estão envolvidos na regulação do tipo de resposta da célula T produzido após a estimulação antigênica. Além do ambiente constituído pelas citocinas, há evidências que sugerem que a dose de antígeno influencia o tipo de resposta (Bretscher, 1992; Madrenas, 1995). A resposta predominante que se desenvolve após a ativação da célula T gera implicações clínicas significativas. Foi postulado que o desenvolvimento de uma resposta de tipo I contra a infecção pelo HIV pode conduzir à imunidade protetora (Clerici, 1994). Está claro que uma resposta de tipo II não é protetora, pois a maioria dos indivíduos infectados apresentam soroconversão e, eventualmente, sucumbem diante de uma profunda imunossupressão. Clerici e Shearer argumentam que a exposição a baixas doses de HIV-1 pode induzir uma imunidade celular de tipo I protetora (Clerici 1993, 1994). Os resultados obtidos por esses pesquisadores indicaram que, em indivíduos soronegativos HIV-1 e PCR-negativos associados a alto risco (homens homossexuais, usuários de drogas injetáveis e bebês nascidos de mães HIV-1 positivas), 39 a 75% das células mononucleares do sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) secretaram IL-2 em resposta à proteína env *in vitro*. Esses cientistas propuseram que os indivíduos soronegativos de alto risco haviam desenvolvido imunidade celular protetora como resultado de uma infecção ou imunização com doses baixas.

Metodologia: medição da ativação e proliferação linfocitárias na avaliação da imunodeficiência celular

Defeitos de desenvolvimento, anomalias genéticas herdadas e infecções adquiridas causam estados de profunda imunodeficiência. Além disso, queimaduras severas, traumatismos e intervenções terapêuticas também provocam imunodeficiência. Ensaios em massa podem ser úteis para determinar se um indivíduo apresenta ou não resposta proliferativa de células T diminuída. No entanto, embora tais ensaios tenham sido disponibilizados há algum tempo, seu uso atualmente é limitado em razão da fraca reprodutibilidade e do escasso fornecimento de informações. Os avanços tecnológicos recentes possibilitaram a produção de uma variedade de reagentes que podem ser empregados para avaliar múltiplas atividades ao longo da via de ativação das células T. Esses reagentes incluem anticorpos monoclonais específicos para marcadores de ativação de células T, reagentes e sistemas utilizados na detecção de citocinas intracelulares e corantes de rastreamento e precursores de DNA não radioativos, desenvolvidos para avaliar a proliferação linfocitária.

Procedimentos adotados para avaliação da ativação e proliferação de células T

O procedimento *in vivo* mais comumente utilizado para avaliar a imunidade celular é o teste cutâneo simples. Um resultado positivo de teste cutâneo para detecção de resposta de hipersensibilidade tardia implica na existência de uma imunidade celular intacta, bem como em uma quimiotaxia de monócitos igualmente intacta (Borut, 1980; Ananworanich, 2002). Embora a execução do teste cutâneo seja fácil, resultados negativos são de difícil interpretação, especialmente no caso de crianças, pois o teste cutâneo não é tão sensível quanto os ensaios de estimulação linfocitária realizados *in vitro* (Borut, 1980). Outras correlações *in vivo* da imunidade celular incluem a sensibilidade por contato, a formação de granuloma e a rejeição de aloenxerto.

Os linfócitos são singulares em termos de expressão de receptores de superfície capazes de identificar praticamente qualquer molécula de substância estranha (antígeno). A diversidade estrutural apresentada por esses receptores é criada pelo rearranjo diferencial dos genes codificadores do TCR. Em geral, existe apenas um número limitado de linfócitos circulantes capazes de reconhecer qualquer antígeno. *In vivo*, quando um linfócito reconhece um antígeno estranho, ocorre uma rápida proliferação celular clonal para gerar um grande número de células tanto efetoras quanto de memória.

Os métodos utilizados no passado para avaliar a proliferação linfocitária envolviam contagem manual do número real de células antes e após a estimulação. Infelizmente, tais procedimentos eram demorados e repletos de problemas técnicos. No decorrer dos últimos anos, foram desenvolvidos novos métodos para medir diferentes eventos celulares que sabidamente ocorrem ao longo da via de divisão celular. É preciso enfatizar que os métodos utilizados para medir os eventos iniciais da ativação de linfócitos T podem ou não apresentar correlação com a divisão celular.

Ensaio de incorporação de timidina tritiada ^{3}H (ensaio TdR)

A maioria dos laboratórios avalia a capacidade proliferativa dos linfócitos medindo a taxa de incorporação de nucleosídeos de DNA radiomarcados (timidina tritiada) em um pulso de 4 a 24 horas, após a incubação prolongada de culturas de PBMCs com mitógenos (3–4 dias) ou antígenos (5–10 dias) (Maluish, 1986). De uma forma geral, somente um número limitado de células T responde a qualquer antígeno *in vitro*. Portanto, é necessário manter as células em cultura por 5 a 10 dias para que seja possível detectar alguma resposta. Os mitógenos, por outro lado, induzirão uma proliferação rápida em até 100% das células T. Por isso, é possível detectar a proliferação em 3 a 4 dias e, assim, conta-se com uma ferramenta de triagem bastante efetiva. A transformação dos linfócitos *in vitro* em resposta a mitógenos foi relatada pela primeira vez por Nowell (1960). Os mitógenos em geral são considerados os estímulos mais poderosos, uma vez que conseguem ativar a maior proporção de linfócitos em relação aos aloantígenos e, então, antígenos.

Citometria de fluxo na avaliação da ativação e proliferação de linfócitos

Os ensaios em massa, além dos problemas técnicos inerentes que apresentam, não fornecem informação sobre subconjuntos celulares específicos que apresentam resposta. A citometria de fluxo, com seu inerente potencial multiparamétrico, transformou-se no instrumento analítico de escolha da imunologia celular. Uma revisão abrangente sobre citometria de fluxo e os métodos empregados para avaliar a ativação e a proliferação linfocitária são disponibilizados nas referências de Maluish (1986) e Perfetto (2002).

Outro método baseado em citometria de fluxo que passou a ser bastante utilizado nos laboratórios clínicos é a quantificação de linfócitos durante as várias fases do ciclo celular. Em geral, as análises do ciclo celular são realizadas medindo-se o nível de intensidade da fluorescência emitida por corantes para DNA. O corante mais comumente utilizado é o iodeto de propídio, que se intercala no DNA de forma estequiométrica (i. e., a quantidade ou intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA existente na célula). Empregando um complicado modelo matemático, é possível medir o percentual de células com um conteúdo de DNA equivalente a 2c e 4c, que está correlacionado ao percentual de células na fase "S" do ciclo celular. Os linfócitos do sangue periférico geralmente estão na fase de repouso do ciclo celular, sendo que menos de 5% estão na fase "S".

Alguns laboratórios substituíram os ensaios de incorporação de timidina tritiada por uma combinação dos ensaios de indução de marcador de superfície celular e quantificação do percentual de células em várias fases do ciclo celular após a ativação (Cost, 1993).

Recentemente, foram desenvolvidos corantes que se integram de forma estável ao interior das membranas de linfócitos vivos. Após a lavagem para remoção do excesso de corante, os linfócitos são estimulados a se dividir. A cada divisão sucessiva, a quantidade de corante por célula é reduzida à metade. A fluorescência emitida a partir das células após a cultura pode ser modelada, e o número de divisões celulares, estimado. Essa metodologia foi padronizada recentemente em um *kit*, que inclui um *software* para realização das análises e o corante de rastreamento (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Em uma avaliação de 14 dos corantes mais comumente utilizados, 2 deles – PKH26 e éster de succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CSFE) – foram considerados mais apropriados por sua capacidade de quantificar a proliferação de linfócitos (Parish, 1999). Esse ensaio fornece a avaliação mais acurada da resposta de proliferação celular em sistemas de cultura *in vitro*, proporcionando uma vantagem substancial em relação aos ensaios em massa padrão, no sentido de permitir a quantificação de subgrupos de linfócitos específicos. Os índices de CSFE parecem apresentar correlação mais próxima com os ensaios TdR do que a quantificação de células $CD69^{+}$ (Angulo, 1998). A medida da proliferação linfocitária que emprega os corantes de rastreamento PKH26 e CSFE foi desenvolvida, otimizada e testada quanto à utilidade em aplicações clínicas (Allsopp, 1998; Angulo, 1998).

A recentemente desenvolvida habilidade de medir a produção de citocinas célula-associadas ao nível unicelular apresenta significativo potencial como ferramenta clínica de avaliação da resposta imune celular. As células são estimuladas por 4 a 6 horas em presença de reagentes bloqueadores do transporte de membrana (brefeldina A ou monensina), com o intuito de prevenir a secreção das citocinas. Em seguida, as células são marcadas com anticorpos monoclonais subgrupo-específicos, fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos monoclonais marcados com fluorescência e específicos para a citocina de interesse (Jung, 1993; Prussin, 1995). O ensaio foi desenvolvido na presença de anticorpos coestimulatórios para detecção sensível de respostas a antígenos em culturas de sangue total, após intervalos de incubação relativamente breves (Suni, 1998). Atenção especial tem sido dada ao desenvolvimento de anticorpos que reconhecem formas nascentes de citocinas (junto ao complexo de Golgi), bem como à otimização do tempo de cultura para detecção da resposta máxima de produção de citocinas (Mascher, 1999). Estudos clínicos começaram a demonstrar a potencial utilidade dessa técnica. Exemplificando, pacientes que sofreram queimaduras bastante graves e desenvolveram um desvio da resposta imune na direção da produção de citocinas Th2 poderiam apresentar um risco aumentado de desenvolver síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (Zedler, 1999). A técnica seria bastante vantajosa, uma vez que atualmente não há nenhum teste capaz de indicar quais pacientes sofrerão essa complicação potencialmente fatal. Diversos estudos estão sendo conduzidos atualmente para avaliar a utilidade clínica dessa nova e promissora tecnologia. Foi relatada a expansão dessa técnica para incorporar a habilidade de medir simultaneamente a proliferação e a síntese de citocinas específicas ao nível unicelular, no entanto ainda falta realizar a avaliação no cenário clínico (Mehta, 1997).

Obviamente, novos ensaios estão sendo desenvolvidos para medir diferentes eventos envolvidos na ativação da célula T. Existem métodos e reagentes disponíveis para quantificar os eventos mais iniciais de fosforilação/desfosforilação, passando pela transdução de sinal, pela transcrição genética e chegando à divisão celular. Como esses métodos são adaptados para uso na rotina clínica, poderemos contar com um autêntico arsenal de métodos para avaliar uma grande parte dos processos envolvidos na ativação e proliferação linfocitárias. Embora uma parte significativa dessas novas tecnologias ainda esteja sob domínio de laboratórios de pesquisa, os métodos disponíveis estão sendo constantemente simplificados e adaptados para uso e avaliação nos laboratórios clínicos.

Função do granulócito na imunidade mediada por células

Tanto os monócitos quanto os granulócitos derivam de um precursor parental comum. Os granulócitos são extremamente importantes na resposta inflamatória inicial, e as anormalidades que envolvem suas funções provocam deficiências profundas na imunidade celular. Tais anormalidades ocorrem em qualquer ponto ao longo de uma série de processos necessários ao desempenho da função do granulócito, incluindo dificuldades para sair da vasculatura (diapedese), perturbações que afetam a movimentação em torno do agente agressor (quimiotaxia, quimiocinese), problemas para englobar o agente agressor (fagocitose) e para promover sua destruição via geração de radicais tóxicos de oxigênio.

Metodologia: citometria de fluxo e de imagem

Desde seu desenvolvimento, há 2 décadas, a análise a *laser* de células isoladas (citometria de fluxo e imagem) tornou-se uma ferramenta essencial para a pesquisa médica laboratorial e padrão da prática laboratorial clínica no estudo da resposta imune celular (Goetzman, 1993; Lamb, 2002; Herzenberg, 2004; Shapiro, 2004). As medidas de imunocompetência e a imunomodulação de marcadores de superfície e receptores específicos, a caracterização de linhagens por imunofenotipagem de linfomas e leucemias, a definição de malignidade utilizando sondas cromossômicas específicas e o estudo da heterogeneidade tumoral através de medidas multiparamétricas de DNA são análises comumente realizadas em diversos laboratórios, conforme detalham vários autores (Good, 2002; Goolsby, 2004; Herzenberg, 2004). A classificação dos tipos celulares por esses meios possibilita definir a

função biológica e efetora ao nível molecular, bem como estabelecer a relação existente entre essas medidas e o processo e a definição da doença. Essas, contudo, são apenas algumas das possíveis aplicações que utilizam tecnologias baseadas em *laser*.

Existem 2 tecnologias principais em uso. A primeira delas é caracterizada como fluxo, no qual as partículas contadas e suas propriedades físicas e químicas são medidas ao passarem por uma corrente de líquido em suspensão monocelular (Keren, 1989; Givan, 2004; Stewart, 2004). Na outra tecnologia, conhecida como análise estática, as partículas permanecem estacionárias e o estágio ou *laser* é que se move, como na análise de imagens (Martin-Reay, 1994). A tecnologia da análise de imagens tem imprimido sua marca lentamente nos laboratórios, na avaliação de citospins ou de preparações de toque, preparações cromossômicas e cortes de tecidos para certas aplicações, como hibridização de DNA ou hibridização in situ com fluorescência (FISH, *fluorescence in situ hybridization*). Os avanços ocorridos nos últimos anos em termos de disponibilização de sondas fluorescentes para uso na FISH e tingimento cromossômico farão dessas análises ferramentas mais relevantes e úteis para o laboratório clínico (Weinberg, 1993; Stewart, 2002). Assim como em muitas técnicas, dentre as quais a análise do ciclo celular ao nível do DNA, cada um dos novos marcadores e técnicas deve ser definido, avaliado e correlacionado com os resultados apresentados pelo paciente antes de estabelecer qualquer decisão sobre a existência ou não de utilidade clínica absoluta. Já foi introduzido o desenvolvimento de instrumentos que combinam os pontos fortes da citometria de fluxo às vantagens estáticas da análise de imagens. Tais instrumentos, conhecidos como citômetros de escaneamento a *laser*, geram as medidas tradicionais de citometria de fluxo de dispersão frontal, dispersão lateral e fluorescência de células em suspensão ou fixadas em lâmina de vidro. A experiência adquirida com esses sistemas determinará se tal abordagem proporciona as vantagens de medidas que não se pode obter com as configurações dos sistemas de citometria de fluxo e imagem atualmente em uso (Martin-Reay, 1994).

A combinação dos avanços ocorridos nas áreas de processamento de pulsos eletrônicos, óptica e armazenamento de dados, aliada aos progressos alcançados na tecnologia da computação e *software*, permitiu que a tecnologia da citometria de fluxo passasse a integrar a rotina laboratorial. Além disso, a ampla disponibilidade de anticorpos monoclonais agrupados em laboratório – que atualmente já somam 339 (Zola, 2002) – e marcados com múltiplas cores, conjugados diretamente e em formatos pré-misturados tem viabilizado a detecção simultânea de múltiplos antígenos de superfície, bem como de constituintes citoplasmáticos e nucleares. A habilidade de realizar análises multiparamétricas é o ponto mais forte da citometria de fluxo. A quantificação de marcadores tanto fenotípicos como intracelulares atualmente faz parte da rotina de diversos laboratórios. Os principais fabricantes transformaram a arte da citometria de fluxo em uma medida laboratorial rotineira – uma ciência "caixa-preta" –, em grande parte para a consternação de muitos (Chapman, 2000). Conforme descrito, esse fenômeno da abordagem de caixa-preta resultou principalmente do uso da citometria de fluxo para fenotipagem de subgrupos de células T no monitoramento de pacientes infectados pelo HIV (Shapiro, 1993; Mandy, 2004) (Fig. 44.1). Antes do início da epidemia da infecção pelo HIV, o uso da citometria de fluxo no laboratório se destinava primariamente à caracterização de leucemias e outras malignidades hematológicas, bem como à análise de DNA tumoral para fase de síntese (S) e determinação do índice de DNA (ID). Embora a tecnologia da citometria de fluxo possa ser principalmente caixa-preta, a epidemia causada pelo HIV levou o poder do citômetro de fluxo a um número bem maior de instituições e laboratórios. Com isso, essa tecnologia pode ser integrada a diversos diagnósticos e se transformou em um adjunto importante do tratamento de inúmeros pacientes. Apesar da simplicidade, diversos aspectos relacionados a regulação pela FDA, teste de proficiência, supervisão de dados e reprodutibilidade ainda precisam ser definidos. Isso é particularmente válido para a área de análise de DNA. Vai além do escopo do presente capítulo descrever todas as nuances dos citômetros de fluxo e de imagem. Os citômetros atualmente disponíveis são capazes de realizar imunofenotipagem de rotina, entre outros ensaios, de forma apropriada. A maioria dos problemas laboratoriais reside na indisponibilidade de calibradores e reagentes para controle de qualidade padrão, bem como na falta de métodos confiáveis e rápidos de transferência de dados e armazenamento que sejam compatíveis com os sistemas de informação utilizados nos laboratórios. Para os clínicos, o mais importante é a compreensão da tecnologia, os pontos fortes e armadilhas em termos de controle e garantia de qualidade, preparo das amostras e interpretação de dados.

Hardware e outras ferramentas

Fonte luminosa e processamento de sinal

O citômetro de fluxo clínico moderno raramente é utilizado para separação de células (i. e., *cell sorting*), e essa propriedade continua sendo explorada pelos instrumentos de pesquisa utilizados em laboratórios altamente especializados. A maioria dos citômetros de fluxo clínicos multifacetados emprega um único *laser* de íons de argônio com resfriamento de ar, contendo no mínimo 4 tubos fotomultiplicadores para realizar análises imunofenotípicas com 3 ou 4 cores (Shapiro, 1993; Chapman, 2000; Snow, 2004). Os laboratórios de pesquisa interessados em realizar análises com 5 ou mais cores, utilizando sondas de Hoescht estimuladas por luz ultravioleta, empregam *lasers* de 5 W, que são maiores e possuem refrigeramento à água, combinados aos *lasers* com ar resfriado. Todavia, os novos sistemas instrumentais dotados de modernos *lasers* estão eliminando a necessidade de utilizar *lasers* com água resfriada. No momento, os fabricantes que comercializam citômetros de fluxo são a Becton Dickinson & Co. (San Jose, CA), Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA) e Partec GmbH (Munster, Alemanha). O *software* analítico é fornecido pelos fabricantes dos instrumentos, bem como por diversas empresas independentes de *software*, como a Tree Star, Inc. (Ashland, OR) e a Verify *Software* (Topsham, ME).

A célula de fluxo

Existem 2 tipos comuns de célula de fluxo atualmente utilizados pelos laboratórios clínicos. No entanto, como a maioria dos instrumentos clínicos é utilizada para quantificação de células $CD4^+$ no monitoramento da doença causada pelo HIV, a maior parte dos sistemas clínicos emprega um sistema fechado como forma de prevenção ao risco biológico (Bogh, 1993; Chapman, 2000; McCoy, 2002). O primeiro tipo, conhecido como célula de fluxo de jato-no-ar ou de corrente-no-ar, permite que o ponto de medida óptica fique posicionado diretamente sobre o fluxo de amostra. Esse tipo de célula de fluxo minimiza a distância existente entre a câmara de fluxo e a extremidade do injetor de amostra, reduzindo o transporte e o tempo de lavagem necessário entre as amostras. Comparada a um sistema fechado, essa câmara proporciona uma maior variabilidade de velocidade de fluxo de amostra. Existem outras vantagens decorrentes do uso de pontas de célula de fluxo de jato-no-ar que são importantes na separação de células e não foram consideradas aqui. No sistema fechado, por vezes referido como célula de fluxo com ponta de quartzo, a extremidade focal está localizada junto à câmara. As desvantagens associadas ao uso desses sistemas de quartzo são a espessura do quartzo e, em consequência, a difração do feixe de *laser* ou a dispersão do sinal. Somando-se a isso, a seção transversal relativamente ampla (200 μm^2) dificulta o controle da velocidade de fluxo. O sucesso dessas células de fluxo de quartzo no sistema clínico depende da iluminação e da coleção óptica. Os principais fabricantes introduziram diversos aprimoramentos nesses sistemas, visando proporcionar segurança e sensibilidade máxima com o uso de sistemas a *laser* de baixo consumo energético (Bogh, 1993).

Todos os termos empregados na definição dos sistemas de citometria de fluxo são confusos. Tais termos incluem velocidade de fluxo, pressão da lâmina, tamanho do núcleo, velocidade resultante da partícula, coeficientes de variação (CV) resultantes e assim por diante. O fator mais importante a ser compreendido pelo funcionário de um laboratório é que, na análise de DNA, as células são analisadas a uma baixa velocidade de fluxo para aumentar o tempo de permanência da partícula no feixe e, assim, obter maior sensibilidade e melhores CVs. Na imunofenotipagem, a sensibilidade geralmente não constitui uma preocupação, e a velocidade de fluxo da partícula pode ser aumentada. A maioria dos sistemas clínicos concordam em acomodar a aplicação mais comum da análise imunofenotípica (Baugmgarth, 2000). Os citômetros de fluxo utilizados em pesquisa apresentam bem mais

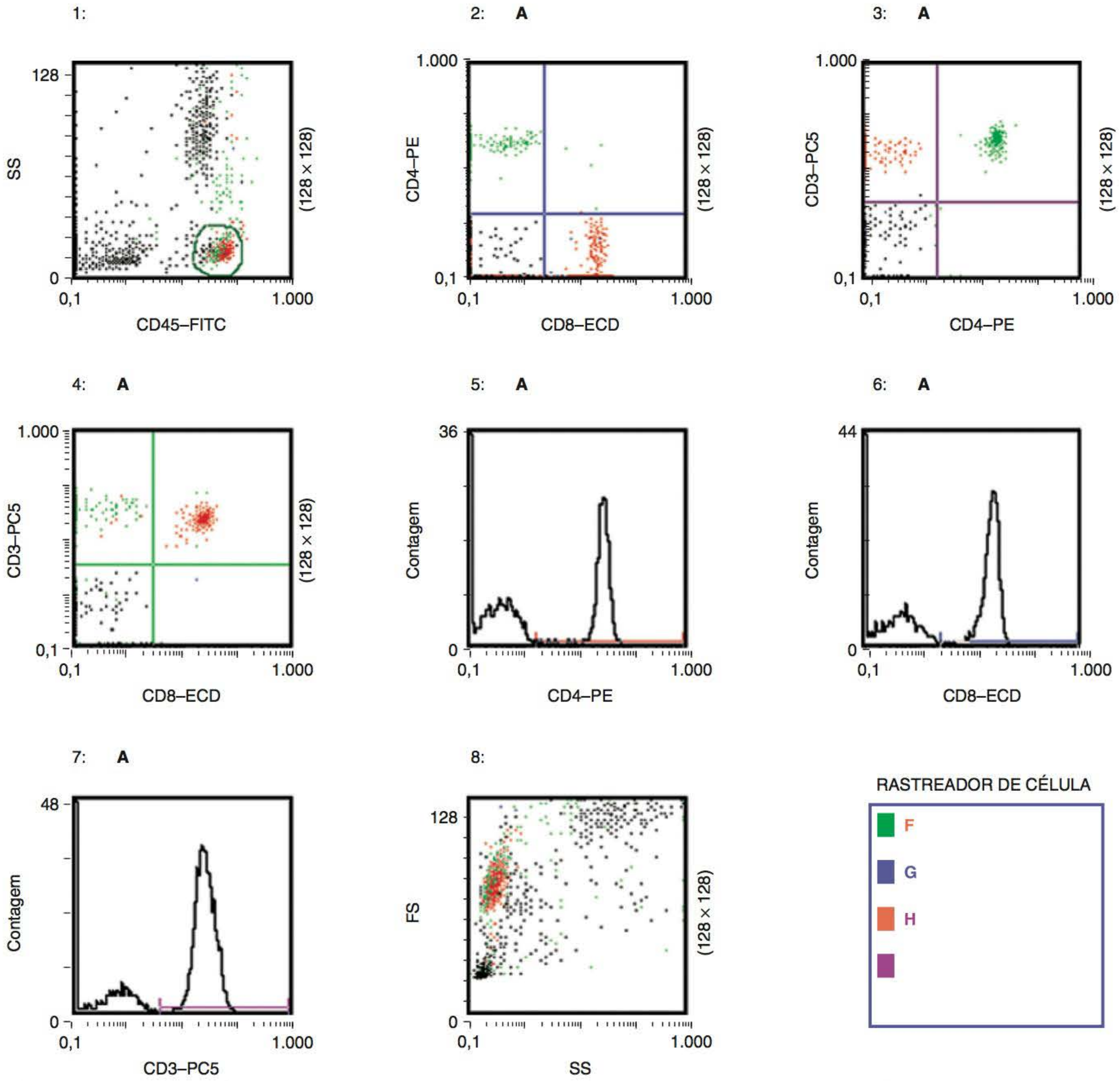


Figura 44.1 Uso de citometria de fluxo de 4 cores para avaliação do desempenho da enumeração de subgrupo de linfócitos no sangue periférico. O histograma 1 mostra o uso da intensidade de fluorescência de CD45 (CD45-FITC) *versus* dispersão lateral (SS) como estratégia de *gating* para discriminar os linfócitos (área da janela) das demais células do sangue periférico. Os histogramas 2, 3 e 4 são histogramas de parâmetros duplos da população de linfócitos contida na janela, em que foi utilizado um *backgating* para diferenciar os linfócitos $CD4^+$ com a cor verde e os linfócitos $CD8^+$ em vermelho. Os histogramas 5, 6 e 7 são histogramas de parâmetro único, nos quais as populações de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ ou $CD3^+$ são diferenciadas das células negativas correspondentes por meio de uma barra colorida. O histograma 8 consiste em uma exibição de parâmetros duplos de SS *versus* dispersão de ângulo frontal (FS). Nos histogramas 1 e 8, observe a presença de células $CD4^+$ ou $CD8^+$ fora da janela de linfócitos. Os anticorpos monoclonais foram diretamente conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), corante energia-acoplado (ECD, *energy coupled dye*) ou tandem PE-Cy5 (PC5).

flexibilidade e controle por parte do operador para regular a velocidade de fluxo da amostra, a pressão diferencial e o tempo.

Cores e mais cores: aplicações dos fluorocromos

A maioria dos laboratórios ainda usa os fluorocromos mais comuns: isotiocianato de fluoresceína (FITC; emissão a 530 nm) e ficoeritrina (PE; emissão a 575 nm), para imunofenotipagem, e iodeto de propídio (PI; emissão a 625 nm), na quantificação de DNA (McCoy, 2002). FITC e PE são diretamente conjugados ao anticorpo de interesse e adicionados simultaneamente à amostra do paciente. O uso de um anticorpo secundário, como IgG de cabra anticamundongo (GAM, *goat anti-mouse*) marcado com fluoresceína, tornou-se desnecessário como fonte extra de sensibilidade e, com isso, foi possível minimizar a fluorescência de fundo. Os anticorpos de uso clínico empregados nos estudos sobre HIV são, em sua maioria, pré-diluídos para uso em tecnologias de sangue total. O PI pode ser utilizado concomitantemente com preparações de superfície celular na análise multiparamétrica de DNA, embora para isso seja necessário preservar a membrana celular (Clevenger, 1993).

Novos corantes disponibilizados para uso em laboratório clínico permitem a realização de quantificações simultâneas que empregam 4 cores diferentes, com anticorpos monoclonais diretamente marcados e excitados com *laser* a 488 nm. Essa disponibilidade está revolucionando o

atual desempenho da citometria de fluxo na prática laboratorial. Tais corantes, com emissão no vermelho e vermelho extremo, incluem os tandens PE Texas Red (emissão a 625 nm), PE-Cy-5 (emissão a 675 nm) e aloficocianina (emissão a 675 nm), apenas para citar alguns exemplos. Os primeiros tandens eram problemáticos, porque o excesso de PE livre em solução produzia excesso de fluorescência de fundo. Estão surgindo novas tecnologias para a síntese desses corantes, resolvendo a maior parte das questões técnicas, e novos corantes adicionais são constantemente disponibilizados para uso no laboratório clínico (Clevenger, 1993a). Com a disponibilização de corantes vermelhos e vermelhos extremos, tornou-se possível realizar uma análise de subgrupo de HIV utilizando um único tubo e com maior segurança (Nicholson, 1993). Um único tubo contendo 1 μl de sangue total é corado simultaneamente com CD45 PE-Cy-5, CD3 PE-Texas Red, CD8 FITC e CD4 PE. Com o novo processamento de sinal digitalizado, a compensação pode ser facilmente realizada (ver adiante), enquanto a análise é executada empregando CD45 como agente de *gating* com dispersão lateral (SSC, *side scatter*), sendo analisados CD3, CD4 e CD8 ao mesmo tempo.

Outro fenômeno interessante é que esses corantes novos têm possibilitado o uso da fluorescência como agente desencadeador, substituindo o parâmetro usual de dispersão de luz frontal. Isso se torna possível porque os espectros do corante vermelho extremo não são encontrados nos componentes da maioria das células, ou não apresentam competição de autofluorescência na natureza, como ocorre com o FITC. Além disso, podem ser excitados por comprimentos de onda que minimizam a autofluorescência emitida por componentes celulares, entre os quais a riboflavina. Portanto, na análise de um evento raro (células que correspondem a menos de 0,1% da população total) que utiliza agente desencadeador fluorescente, um grande número de células pode ser avaliado com bastante rapidez. Esse método também é empregado para identificar leucócitos em sangue liberado, utilizando fluorescência como agente desencadeador. Utiliza-se um corante que marca o núcleo ou o citoplasma do leucócito mas não marca eritrócitos.

A utilização de fluorescência multicolorida fez que o conceito de análise multiparamétrica se tornasse uma realidade na maioria dos laboratórios. Os parâmetros múltiplos permitem avaliar:

1. diferentes subgrupos funcionais de uma população celular, em particular utilizando sondas fluorescentes intracelulares;
2. o uso de várias cores para identificar pequenos grupos de eventos que, de outro modo, não seriam identificáveis (como na doença residual mínima [DRM]);
3. o estado de ativação celular em um determinado estágio de uma doença (p. ex., HLA-DR e CD38 em células CD4 e CD8 no estadiamento da infecção pelo HIV, utilizando uma abordagem do tipo *anchor gate* [janela eletrônica de âncora];
4. a expressão na superfície celular e ID ou de fase S de uma população celular em particular, como na definição da expressão de CD19 na fase S em casos de leucemia aguda.

Obviamente, as combinações possíveis são quase infinitas, e o aumento de sua sofisticação com o uso de corantes específicos e sondas de DNA/RNA encontra-se disponível. A seguir, algumas dessas abordagens e técnicas são discutidas.

Gating e análise

Imunofenotipagem: aplicação na rotina e para amostras leucêmicas

A análise de populações celulares por citometria de fluxo emprega uma combinação de parâmetros que, quando aplicada, define uma população celular específica. A citometria de fluxo utiliza parâmetros similares àqueles que vêm sendo empregados na hematologia há muitos anos, como tamanho (dispersão frontal da luz), granularidade citoplasmática (dispersão lateral) e afinidades por corantes específicos, combinando-os às ferramentas imunológicas já mencionadas. Essas incluem múltiplos corantes fluorescentes ligados a anticorpos ou sondas, medidas de DNA, como aquelas que empregam PI ou 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e outros marcadores nucleares. O principal aspecto consiste na detecção simultânea desses parâmetros pelos sistemas analíticos atuais. Durante muitos anos, o citômetro de fluxo utilizado no laboratório clínico utilizava somente três medidas simultâneas. A coloração das populações celulares era limitada pela indisponibilidade de anticorpos monoclonais diretamente conjugados, levando à necessidade do uso de um reagente GAM secundário ou de anticorpos marcados com biotina. A definição de populações positivas e negativas, nos casos em que havia alta interferência de fundo, requeria a subtração de um algoritmo de canal-por-canal para distinguir entre positivo e negativo (Bagwell, 1993). Nos casos em que a população de células apresentava um limite definido entre positivo e negativo, posicionava-se um cursor de modo a estabelecer que não mais que 2% dos eventos considerados negativos caíssem à direita do cursor, definindo os eventos positivos com auxílio de um controle isotípico emparelhado. Embora essa abordagem parecesse razoável naquela época (Lewis, 1993) e funcionasse bem para grupos de células luminosas, acabou se tornando bastante embaraçosa para a identificação de células leucêmicas ou análises de marcadores de ativação celular. As células leucêmicas eram particularmente problemáticas, uma vez que cada tipo de leucemia possui uma intensidade de fluorescência relativa característica, e os controles isotípicos podem ter pouca relevância. Aplicar regras rígidas e rápidas para os ajustes do cursor resulta em subestimação dos grupos positivos. A falha dessa abordagem se torna especialmente dramática na análise da monoclonalidade por meio da expressão das cadeias leves κ e λ. Diferenças pequenas, porém significativas, são frequentemente perdidas. O uso dos controles isotípicos em certas situações tem representado um desafio em muitos aspectos, por causa das aberrações associadas ao uso dos mesmos e pelo custo adicional gerado para o laboratório. Os novos *softwares* de algoritmos contam com a capacidade de medir as intensidades e definir os grupos com base nas médias de intensidade da população, incluindo as intensidades de fluorescência relativa, bem como a quantificação MESF (*molecules of equivalent soluble fluorophores* [moléculas de fluoróforos solúveis equivalentes]) (ver adiante). Evidentemente, lembrar o que se está medindo e compreender a biologia da população de interesse é importante durante o planejamento de um protocolo de análise. Felizmente, algumas abordagens com *softwares* sofisticados e reagentes mais eficazes permitiram utilizar uma *gating* multiparamétrica para definir as populações, em vez de tentar estimar a expressão da fluorescência pelos valores mostrados pelo cursor. Numerosas investigações têm utilizado a abordagem multiparamétrica para definir grupos e outras populações de interesse (Loken, 1990; Baumgarth, 2000; Kraan, 2003; Stewart, 2004). Tais abordagens assumem diversas formas, e algumas são revisadas aqui.

Com a fluorescência multicolorida, surgiu a necessidade de analisar o número de células que expressam uma ou mais cores ao mesmo tempo dentro de uma população celular em particular, a qual é definida pelas regiões de dispersão luminosa de ângulo frontal (FALS, *forward angle light scatter*) e SSC (Loken, 1977; Loken, 1976). Quando esse método foi desenvolvido, os cientistas consideraram basicamente a matemática e a contabilidade de todas as células, bem como o número dessas células que expressavam uma ou mais cores. Posteriormente, foi desenvolvida uma abordagem binária para essa análise, conhecida como Prisma (Coulter, Hialeah, FL). Essas regiões de análise eram selecionadas por janela eletrônica e ajustadas no instrumento pelo operador. Como não podiam ser redefinidas mais tarde pelo modo de análise de lista, acabaram causando grande frustração. Essa abordagem foi modificada posteriormente de modo a possibilitar certo grau de reajuste de janela, sendo que outros fabricantes, e também os fabricantes terceirizados de *softwares*, produziram a abordagem binária de prisma baseada na pós-análise. Loken, então, definiu populações da medula óssea empregando *gating* CD45 *versus* SSC, em uma abordagem única para definição de populações heterogêneas encontradas na medula óssea (Loken, 1990; Stelzer, 1993). Além desses pesquisadores, outros (Borowitz, 1992) desenvolveram o conceito de padrões definidores de estados leucêmicos específicos. Loken, ainda, promoveu o uso da análise duplo-paramétrica de CD45 e CD14 na região dos linfócitos, considerando FALS *versus* SSC, para o sangue periférico. Diversas agências adotaram e promoveram essa abordagem para a maioria dos painéis de citometria de fluxo para a infecção pelo HIV, visando minimizar o efeito de monócitos contaminantes presentes na população linfocitária. Como apresentam receptores para CD4 na superfície, os monócitos podem interferir na contagem verdadeira

de linfócitos $CD4^+$ (Passlick, 1989). As agências promotoras desse tipo de análise foram o *Centers for Disease Control and Prevention* (1992), o *National Institute of Allergy and Infectious Disease, Division of AIDS* (NIH, DAIDS; Calvelli, 1993), o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS; Standards, 1992) e o *College of American Pathologists*. Infelizmente, ainda que essa abordagem tenha solucionado inúmeros problemas, não garantiu que cada tubo do painel apresentasse o mesmo conteúdo dos tubos de CD45 e CD14, e a requerida correção da pureza provavelmente superestimada estava conduzindo a valores incorretos de CD4. Esses aspectos foram revistos durante a conferência promovida pelo CDC um ano após a publicação das diretrizes para desempenho de contagens de CD4 na infecção pelo HIV (Stelzer, 1993). Outras análises dessa abordagem foram realizadas pelo *ACTG Flow Advisory Committee*, no programa de proficiência em CD4/CD8 da DAIDS (Kagan, 1993), e pelo *College of American Pathologists*, em seu programa de teste de proficiência (Homburger, 1993). Uma nova abordagem de *gating* foi avaliada nos painéis de infecção pelo HIV, a qual seguia a abordagem original de Loken para definição de grupos encontrados na medula óssea (Loken, 1990). O uso do CD45 como parâmetro de *gating* simplificou a análise de medula óssea, leucemias e painéis de infecção por HIV. Em *work ups* de medula óssea e leucemia, o CD45 usualmente é ajustado para ser a terceira ou quarta cor, sendo pareado com a dispersão de luz frontal ou lateral. Esse procedimento possibilita a definição de uma potencial população (maligna) de blastos. Essa população, então, é definida utilizando um painel de anticorpos monoclonais e os 3 parâmetros de cores disponíveis. No caso da análise de infecção pelo HIV utilizando o método de 1 tubo e 4 cores, o CD45 permite que seja definida uma ampla região de linfócitos (janela), por meio da separação secundária das células marcadas para CD45 em uma janela. Isso também pode ser feito sem adotar os parâmetros de dispersão de luz, conforme previamente descrito. (Essa separação também pode ser feita por meio de um painel de 2 tubos e 3 cores.) Entre os produtos modernos de reagentes analíticos (Becton-Dickinson e Beckman Coulter), estão as pérolas pré-contadas em tubo contendo anticorpos monoclonais, que permitem realizar contagens absolutas de linfócitos (conhecidas como diferenciais de fluxo). Tais contagens são realizadas ao mesmo tempo que a enumeração do subgrupo de linfócitos. Esse procedimento elimina a necessidade de utilizar um contador hematológico para fazer enumerações de células T, além de evitar problemas relacionados à deterioração de leucócitos decorrente de transporte e ao desempenho de um diferencial acurado para obter números de células T igualmente acurados. Esses métodos acabam de ser incorporados ao trabalho de triagem para infecções por HIV do ACTG e outros laboratórios.

Outra estratégia de *gating* consiste no uso de uma definição de 2 ou 3 cores para um subgrupo particular de interesse. Essa abordagem, que na atualidade comumente é referida como *anchor gate*, adota propriedades particulares exibidas por algumas células para investigar outro conjunto de parâmetros. Quando aplicada especificamente aos linfócitos T, é referida como "janela T" (Mandy, 1992). O uso de uma *anchor gate* (Paxton, 1995) é especialmente útil quando se considera marcadores de ativação, como no caso dos subgrupos CD3/CD8 de HIV que expressam CD38 e HLA-DR, ou quando se considera a expressão de CD45a e CD45Ro em contraposição à expressão de CD3/CD4 ou CD3/CD8. Uma das vantagens desse método é ser intuitivo, além do fato de cada cor servir como meio de checagem de controle de qualidade para outro conjunto. Além disso, há a opção de definir a expressão de marcadores biologicamente relevantes em relação a populações com importância funcional ou biológica. Essa abordagem presta-se bem à fluorescência quantitativa (ver os histogramas 2 e 3, respectivamente). Apesar de o conceito de fluorescência quantitativa ser antigo, as técnicas utilizadas para medir os equivalentes de fluorescência ou limiares de fluorescência, ou ainda outras designações similares, são novas. As medidas quantitativas fluorescentes são descritas após a discussão sobre *gating* e análise de DNA.

Outra abordagem de obtenção de *gate anchor* é utilizada na coleta de CD34, que emprega coloração de CD34 e CD45, com ou sem AAD, como forma de avaliação da viabilidade na identificação e enumeração de células progenitoras CD34. Esses métodos também podem utilizar pérolas para determinar o número de células recuperadas. Trata-se de métodos bastante úteis para os protocolos de transplantação de medula óssea, nos quais as células progenitoras são coletadas a partir do sangue de cordão umbilical, da medula óssea ou do sangue periférico (p. ex., *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*) e reinfundidas. Essa abordagem tornou-se padrão na maioria dos laboratórios que realizam transplantes. Um sistema comercial denominado ProCount (Becton-Dickinson) emprega uma abordagem e reagentes similares para automatizar o processo. A análise do complexo imunofenotípico utilizando 5 ou mais anticorpos monoclonais tem se tornado mais comum nos laboratórios clínicos e de pesquisa para detecção de subpopulações minoritárias de linfócitos clinicamente relevantes em pacientes com doenças autoimunes e imunodeficiência. Essa análise também tem sido empregada na detecção de pequenas subpopulações imunologicamente aberrantes, para detecção de DRM em pacientes com malignidades hematológicas. Nesse sentido, a análise de citometria de fluxo empregando 17 cores fluorescentes foi recentemente relatada (Perfetto, 2004).

Análise de DNA

Aspectos gerais

Em termos conceituais, o desempenho da análise de DNA deveria ser menos complexo que a análise de imunofenotipagem. No entanto, a revisão dos dados publicados e suas capacidades prognósticas, bem como o desempenho dos laboratórios nos testes de proficiência, indicam o contrário (Nicholson, 1993b; Coon, 1994; Tirindelli, 1997). Como a publicação de vários milhares de relatos na década de 1980 e início dos anos 1990 rendeu achados conflituosos a respeito do significado diagnóstico e prognóstico da ploidia e da atividade na fase S de diversos tumores humanos, foi realizada uma conferência de consenso sobre DNA, cujos anais foram publicados na revista *Cytometry* (Shankey, 1993). Essa publicação foi uma revisão histórica sobre os principais tipos de tumor (em amostras frescas, congeladas e parafinizadas), o valor clínico do desempenho da ploidia determinado por ID e o valor da fase S. Esses parâmetros foram analisados em termos de efetividade como marcadores prognósticos. A conferência do *American College of Pathologists*, realizada em 1994, também foi voltada para os marcadores prévios e alguns potenciais substitutos tumorais adicionais. Em cada caso, o ID e a fase S foram menos preditivos como marcadores prognósticos do que o esperado. Esse resultado foi atribuído, em grande parte, à variabilidade do desempenho técnico e da análise realizada nesses ensaios (ambos, instrumentos e preparação das amostras), bem como ao risco inerente de heterogeneidade tumoral e, portanto, à amostragem apropriada do tumor. Recomendações específicas foram feitas para cada tipo de tumor em relação às medidas adequadas de controle de qualidade que deveriam ser realizadas, bem como à devida desconvolução dos histogramas. Desde então, a utilização rotineira da análise de DNA no laboratório clínico declinou consideravelmente. Por causa do alto grau de variabilidade e da falta de significado prognóstico, foi sugerido que algumas medidas clínicas de DNA deveriam ser realizadas somente por laboratórios especializados ou, do contrário, totalmente eliminadas (ASCO, 1996). Até o momento, a FDA ainda não eliminou nenhum método e considera essa análise um teste experimental. Entretanto, vários grupos realizaram incursões significativas no sentido de resolver certos aspectos analíticos (Shankey, 2002). O futuro dessa técnica na medicina clínica é retomado mais adiante neste capítulo.

Preparação da amostra

Os métodos de preparação de DNA são razoavelmente simples e econômicos em termos de execução. Existem numerosas referências sobre os métodos originais, bem como diversas modificações. Os métodos mais comuns são aqueles utilizados para amostras frescas e congeladas de tecidos, desenvolvidos por Krishan, Vindelov, Crissman, Steinkamp et al. (Rabinovitch, 1993; Vindelov, 1994), bem como aqueles utilizados para blocos parafinizados contendo preparações de Hedley (Hedley, 1983). Em cada caso, sejam as células enucleadas, seja a membrana celular preservada, o corante nuclear PI é o mais comumente utilizado na maioria dos laboratórios clínicos, tendo sido descrito anteriormente. A coloração com PI é simples, na medida em que sejam observados os tempos, a saturação e a remoção dos parâmetros de RNA. As medidas das anormalidades cariotípicas grosseiras são obtidas mediante a

comparação do pico (intensidade de fluorescência, captação de PI) do tumor *versus* um calibrador diploide. Os fatores que afetam essa medida incluem o CV dos picos do calibrador e do tumor suspeito, a proporção G_2/G_1 ou a linearidade do instrumento, a linearidade medida pelo *software* de desconvolução e o percentual de tumor presente na amostra (amostragem) (Shankey, 2002). É comum encontrar laboratórios que relatam resultados de diploidia tumoral em amostras que não contêm "nenhum" tumor. Tumores que apresentam valores quase diploides exigem regras rigorosas de interpretação, como no caso da definição de tetraploidia. Mais problemas são encontrados na definição de agregados, pares, debris, tratamento de núcleos fatiados e cortados e população de fase S. O acrônimo descritivo e semiquantitativo BAD é utilizado pelas análises de software no modelamento dos efeitos de *backgrounds*, agregados e pares (Rabinovitch, 1993, 1994). O impacto desse parâmetro sobre a análise é controverso.

As medidas de fase S e ID resultantes, que utilizam um modo de análise de parâmetro único (somente PI), estão sujeitas a esses algoritmos de desconvolução e, em consequência, aumentam a variabilidade interlaboratorial (Coon, 1994). Esses algoritmos de desconvolução para DNA foram extensivamente estudados (Wheeless, 1991; Shankey, 1993; Rabinovitch, 1993, 1994; Coon, 1994), contudo numerosos modelos utilizados para fins analíticos ainda precisam ser avaliados. O documento de consenso de DNA faz recomendações específicas aplicáveis a certos tipos de tumor e sugere que os laboratórios façam suas análises de forma consoante. Todavia, mesmo com essas diretrizes, ainda persiste um certo nível de ambiguidade na interpretação e no desempenho para o laboratório clínico, que contribui para a discordância dos resultados em estudos comparativos e, também, nos testes de proficiência (Coon, 1998, 1994; Wheeless, 1991). A dificuldade para chegar a um consenso torna a interpretação dos resultados mais difícil para os laboratórios inexperientes, bem como para os clínicos que tentam comparar seus resultados laboratoriais aos dados constantes na literatura recente, no contexto do tratamento de seus pacientes. Isso é especialmente válido para a classificação dos valores de fase S. As medidas de fase S estão sujeitas aos efeitos do modelamento de agregados e debris, conforme descrito por Rabinovitch et al. (Coon, 1988; Bagwell, 1993; Rabinovitch, 1993, 1994; Shankey, 1993). Além disso, é crítico que sejam constantes as decisões tomadas com relação ao modelo matemático a ser utilizado para um tumor em particular, e que o modo de lista de dados seja retido sem modelamento, caso haja necessidade de realizar mais análises.

Outras abordagens utilizando sondas de DNA e RNA, como derivados de timidina, bromodeoxiuridina (BrdU) e laranja acridina (RNA), são empregadas para melhorar a qualidade dos modelos na estimação das propriedades proliferativas e cinéticas de um tumor específico. É importante lembrar que as medidas de proliferação são diferentes das medidas de quantificação de fase S, as quais constituem um modelo estático ou uma imagem no tempo de todas as células que são analisadas. A integração da área para um número de células entre 2c e 4c em um histograma de DNA é incapaz de fornecer qualquer informação relacionada às células "presas" em S_0 (células que de fato interrompem a síntese de DNA), ou de medir o número de células normais infiltrantes que também deveriam estar proliferando. O valor de fase S muitas vezes pode ser maior que a real capacidade proliferativa, por causa dos artefatos produzidos pela heterogeneidade tumoral. O histograma de parâmetro único produz resultados razoáveis ao lidar com populações celulares assíncronas e relativamente homogêneas. A identificação de pulsos é mais comumente utilizada em condições acadêmicas mais amplas e tem uso mais frequente na medição da efetividade da radiação e da quimioterapia, por meio da obtenção de medidas verdadeiras da proporção celular G_0/G_1, bem como dos compartimentos G_2 + M, cuja obtenção é impossível pelo uso de medidas de parâmetro único de fase S.

Outras abordagens que utilizam sondas nucleares e citoplasmáticas, além de marcadores de superfície, podem ser empregadas para separar uma população de interesse a partir de uma mistura de tipos celulares. Esse tipo de análise multiparamétrica é especialmente útil na medida de fase S em casos de malignidade hematológica. Populações de blastos específicas podem ser identificadas por fluorescência com FITC e FALS, e aqueles eventos são analisados com PI quanto ao conteúdo de DNA e à fase S. Os métodos de coloração são alterados para preservar as propriedades da superfície celular ou as propriedades nucleares (Clevenger, 1993; Ramaekers, 1993; Bauer, 1994; Carothers, 1994). Esses métodos geralmente envolvem corar o marcador superfície de interesse (p. ex., KI-67, ciclina B1, citoqueratina, CD10) utilizando anticorpo monoclonal, fixar em álcool (ou reativo comercial para fixação e permeabilização) e, em seguida, tratar com detergente para permitir a penetração do PI ou outro corante nuclear. Os métodos de coloração são seletivamente modificados para preservar as propriedades da membrana e do núcleo que sejam específicas para as sondas de interesse (Bauer, 1994).

Estudos de DNA de interesse

Houve uma explosão de relatos sobre apoptose (i. e., morte celular programada) na literatura, bem como sobre a relevância desse processo aos parâmetros de DNA tradicionais e outras considerações fenotípicas. Foge ao escopo deste capítulo tratar desse tópico. Embora inúmeros estudos estejam sendo conduzidos, as medidas de apoptose ainda não integram os procedimentos de rotina do laboratório clínico.

Conforme já mencionado, a análise laboratorial de DNA tem, nos últimos anos, sido minuciosamente estudada e, em algumas regiões, tais estudos deixaram de ser reembolsados. Vários investigadores da área contestaram a expulsão indiscriminada desse teste do laboratório, por considerá-lo bastante útil para certos tumores. Um conjunto retrospectivo de casos de câncer de mama foi reexaminado por Bagwell *et al.* (2004), em uma tentativa de desenvolver um modelo prognóstico unificado para pacientes nodo-negativas para câncer de mama. Espera-se que esses estudos, entre outros, façam reviver aquilo que poderia ser uma ferramenta prognóstica e diagnóstica útil, cuja complexidade talvez tenha sido previamente subestimada.

Citometria de fluxo quantitativa: medidas da intensidade de fluorescência

A definição dos tipos celulares em termos imunológicos (p. ex., células efetoras) implica na propriedade dessas células de regular, positiva ou negativamente, funções moleculares específicas por meio de receptores de superfície. Conhecidas como fenótipos imunológicos (Poncelet, 1993), essas células devem apresentar outras propriedades que definam seus papéis biológicos nos processos de maturação e doença. Um dos fenômenos observados é a expressão diferencial de antígenos de superfície celular (CD), tanto em termos relativos como em termos quantitativos absolutos. Antes da disponibilidade das medidas absolutas, termos descritivos – como luminoso ou escuro, bimodal, e assim por diante – eram empregados na literatura para descrever o fenômeno visual das diferenças de densidade antigênica. Embora sejam termos apenas descritivos, é difícil defini-los e padronizá-los entre os laboratórios e os pacientes. Esses termos também carecem de precisão para definir eventos e não podem ser objetivamente utilizados para monitorar o tratamento do paciente nem definir denominações (tipo celular) através de medidas de expressão de CD e sua sobreposição de expressão. Evidências sugerem que as diferenças quantitativas de expressão antigênica na leucemia linfocítica crônica e em outras leucemias podem ser importantes na determinação do prognóstico (Poncelet, 1985). Essas medidas também são utilizadas na definição de DMR e na investigação de um efeito ou uma ativação viral na doença causada pelo HIV (Poncelet, 1991). O percentual referente à presença de uma célula específica muitas vezes não representa o quadro clínico verdadeiro. Isso é particularmente válido para os casos leucopênicos e quando a população de blastos constitui um percentual relativamente pequeno da totalidade das células presentes.

A citometria de fluxo quantitativa (CMFQ) é definida como a quantificação da intensidade fluorescente (ITF), conforme determinada pela capacidade de ligação a anticorpos de um determinado conjugado de anticorpo-fluorocromo, sendo uma medida indireta da quantidade de antígenos de superfície celular por célula individual (Stelzer, 1997; Marti, 2003). Alguns investigadores (Poncelet, 1985, 1986; Vogt, 1991, 1994) descreveram o uso de pérolas de poliestireno ou linhagens celulares recobertas com quantidades saturantes de anticorpo para determinação do número absoluto de receptores ou sítios antigênicos em cada célula, também referidas como densidade de antígeno (Poncelet, 1993). Foram definidas unidades ABC como uma medida relativa da capacidade de ligação a anticorpos. Esse método não necessariamente

deve corresponder às proporções fluoresceína/proteína (F/P), uma vez que tanto as células como os padrões estão sendo corados com o mesmo anticorpo. O uso de medidas da intensidade de fluorescência deve fornecer ao usuário uma forma de evitar essa situação. É possível obter mais informações acessando o documento de consenso dos Estados Unidos/Canadá (*US Canadian*, 1997) e revendo os parâmetros requeridos para padronização (Stelzer, 1997).

Embora ainda estejam em fase inicial de desenvolvimento, os fenótipos quantitativos ajudarão a definir *softwares* para análise de grupos para fins de quantificação e identificação celular, estabelecendo a intensidade média da fluorescência de canal como forma de separar células que possuem diferentes fenótipos funcionais.

Controle e garantia de qualidade no laboratório celular

Ao longo deste capítulo, tentamos destacar as áreas em que os clínicos, assim como os laboratórios, devem prestar atenção especial no que se refere aos métodos utilizados e interpretações feitas na avaliação da resposta celular. Os parâmetros de garantia e controle da qualidade ainda precisam ser melhor definidos nessa área laboratorial, em que existem poucos padrões absolutos, comparando-se às medidas de analitos químicos e às medidas humorais de anticorpos. O sucesso do laboratório celular reside na forma como ele aborda o problema e avalia longitudinalmente a condição que está sendo diagnosticada. Foi nitidamente evidenciado que os estudos basais precisam ser repetidos caso a avaliação original seja realizada em momentos de estresse imunológico.

Os parâmetros básicos das variações diurnas no subgrupos de linfócitos são óbvios, contudo são frequentemente esquecidos ou subestimados. Malone (1990) destaca que as contagens absolutas apresentam uma variabilidade de medidas de CD4 igual a 50%, em decorrência de outros aspectos técnicos. Os fatores que afetam a avaliação longitudinal do CD4 nas contagens absolutas realizadas em triagens clínicas foram revisados por Fei (1993). Fahey et al. (1990) também revisaram o valor prognóstico de ensaios humorais e celulares na infecção pelo HIV. Em outros ensaios celulares clínicos, a variabilidade inerente ao ensaio ocorreu em razão da falta de formatos e métodos padrão, bem como de reativos. Além disso, a calibração e a sensibilidade dos instrumentos utilizados não foram devidamente monitoradas. Ensaios com linfócitos T citotóxicos são particularmente difíceis de padronizar. Ensaios históricos, como o de proliferação com mitógenos, são igualmente repletos de variabilidade interlaboratórios. Sendo assim, os laboratórios que oferecem testes imunológicos devem possuir uma extensa base de dados que possam utilizar para interpretar resultados de pacientes individuais. Os laboratórios celulares devem estabelecer faixas normais para seus ensaios, atentando para o fato de que as faixas para adultos normais não se aplicam aos ensaios pediátricos. Esse aspecto é particularmente problemático, pois é difícil determinar as faixas pediátricas normais, por causa da falta de disponibilidade de indivíduos no primeiro ano de vida, e a interpretação dos resultados laboratoriais depende desses valores normais. Recomenda-se comparar cuidadosamente os dados entre laboratórios.

Havendo disponibilidade, um laboratório de imunologia celular deve usar os padrões de que dispõe na verificação do desempenho da citometria de fluxo e na análise de DNA, bem como atentar para as regulamentações estaduais e federais referentes ao laboratório, incluindo o *Human Health and Services Clinical Laboratory Improvement Act*, de 1988. Além disso, deve participar de testes de proficiência, sempre que houver disponibilidade, além de se envolver em seminários de educação continuada, incluindo avaliações de competência para todos os funcionários envolvidos nos testes. Todos os ensaios realizados no laboratório devem incluir um controle normal e, quando possível, controles internos de processo, a fim de estabelecer a validade do ensaio. Amostras transportadas devem ser cuidadosamente monitoradas quanto à exposição ao calor e ao frio, bem como em relação ao tempo decorrido desde a obtenção junto ao paciente. Uma história clínica deve ser acompanhada de amostras para realização de estudos particulares que estejam sendo conduzidos, de modo que o diretor do laboratório possa adotar a abordagem correta para o teste.

Foi publicado um documento de consenso que contém recomendações sobre a análise imunofenotípica de neoplasia hematológica por citometria de fluxo (Braylan, 1997). Esse documento foi meticulosamente desenvolvido por fornecedores da comunidade médica preocupados em atender às exigências dos procedimentos laboratoriais, selecionar anticorpos para identificação de neoplasmas, analisar e interpretar dados, transmitir informação médica e indicar referências na ausência de *kits* padronizados e outros dispositivos. A FDA colocou em vigor a *Analyte Specific Regulation* (ASR) (Analyte Specific Regulation, 21 de novembro de 1997), que transfere reagentes com *status* de uso em pesquisa, como os anticorpos monoclonais, para a denominação ASR. Essa regra não permite que os fabricantes digam aos usuários de laboratório como utilizar seus reagentes. Eles não podem especificar a finalidade do uso. A regra ASR não se aplica aos reagentes estáveis e bem definidos, que são produzidos segundo as boas práticas de fabricação. Todos os laboratórios que utilizam tais reagentes em "testes caseiros" devem realizar seus próprios estudos de triagem clínica e validação, além de terem que incluir um item de retratação no relatório final. O documento de consenso permite ao laboratório executar seus ensaios de forma consistente, e possibilita que a significância clínica seja definida mediante a um grande número de laboratórios e instituições. O documento não é considerado um padrão, porém é condizente com os demais padrões da NCCLS já publicados e atualmente em uso.

O laboratório celular se depara com a tarefa mais difícil, que é a interpretação, uma vez que os dados não são facilmente padronizados. Além disso, a garantia da qualidade da amostra e da avaliação realizada depende da documentação cuidadosa dos parâmetros biológicos e lógicos capazes de influenciar os resultados. O futuro dos testes utilizados na avaliação do componente celular da resposta imune reside no desenvolvimento de novos métodos que possam servir para a obtenção de melhores padronizações.

Referências bibliográficas

Alarcon B, Gil D, Delgado P, et al: Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. Immunol Rev 2003; 191:38–46.

Allsopp CE, Nicholls SJ, Langhorne J: A flow cytometric method to assess antigen-specific proliferative responses of different subpopulations of fresh and cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. J Immunol Methods 1998; 214:175–186.

Os autores deste artigo descrevem uma abordagem útil para analisar respostas linfoproliferativas a antígenos. Essa abordagem emprega um corante estável ligado à membrana combinado a marcações de superfície com anticorpo monoclonal para identificar subpopulações sem necessidade de pré-seleção.

Amati L, Cirimele D, Pugliese V, et al: Nutrition and immunity: laboratory and clinical aspects. Curr Pharm Des 2003; 9:1924–1931.

Analyte Specific Regulation MD: Classification/reclassification; restricted devices; analyste specific reagents. Federal Regulation: 66243–62260, November 21, 1997.

Ananworanich J, Shearer WT: Delayed-type hypersensitivity skin testing. In Rose NR, Hamilton RG, Detrick B (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th ed. Washington, DC, ASM Press, 2002, pp 212–219.

Angulo R, Fulcher DA: Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. Cytometry 1998; 34:143–151.

Aoki Y, Tosato G: Neoplastic conditions in the context of HIV-1 infection. Curr HIV Res 2004; 2:343–349.

ASCO: Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted May 17, 1996, by American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 1996; 14:2843–2877.

Azuma M, Ito D, Yagita H, et al: B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. Nature 1993; 366:76–79.

Bagwell CB: Theoretical aspects of flow cytometry data analysis. In Bauer D, Duque RE, Shankey TV (eds): Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993, pp 41–61.

Bagwell CB: DNA histogram analysis for node-negative breast cancer. Cytometry A 2004; 58:76–78.

Balkwill FR, Burke F: The cytokine network. Immunol Today 1989; 10:299–304.

Baskar S, Ostrand-Rosenberg S, Nabavi N, et al: Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:5687–5690.

Bastian J, Law S, Vogler L, et al: Prediction of persistent immunodeficiency in the DiGeorge anomaly. J Pediatr 1989; 115:391–396.

Bauer KD, Jacobberger JW: Analysis of intracellular proteins. Methods Cell Biol 1994; 41:351–376.

Baumgarth N, Roederer M: A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J Immunol Methods 2000; 243:77–97.

Este artigo descreve a citometria de fluxo multicolorida básica, os problemas a serem esperados e os artefatos frequentemente encontrados, além de fornecer sugestões de como lidar com eles.

Black MM, Zachrau RE, Hankey BF, et al: Skin window reactivity to autologous breast cancer. An index of prognostically significant cell-mediated immunity. Cancer 1988; 62:72–83.

Bocchieri MH, Talle MA, Maltese LM, et al: Whole blood culture for measuring mitogen induced T cell proliferation provides superior correlations with disease state and T cell phenotype in asymptomatic HIV-infected subjects. J Immunol Methods 1995; 181:233–243.

Bogh LD, Duling TA: Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. Clin Lab Sci 1993; 6:167–173.

Bonilla FA, Oettgen HC: Normal ranges for lymphocyte subsets in children. J Pediatr 1997; 130:347–349.

Borowitz MJ: Acute lymphoblastic leukemia. In Knowles DM (ed): Neoplastic Hematopathology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1992, pp 1295–1314.

Borut TC, Ank BJ, Gard SE, et al: Tetanus toxoid skin test in children: correlation with in vitro lymphocyte stimulation and monocyte chemotaxis. J Pediatr 1980; 97:567–573.

Braylan RC, Atwater SK, Diamond L, et al: US–Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data reporting. Cytometry 1997; 30:245–248.

Bretscher P: The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. Immunol Today 1992; 13:74–76.

Bretscher P: Living with the ups and downs of the two signal model. Immunol Cell Biol 2004; 82:141–148.

Buckley RH: Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. Annu Rev Immunol 2004; 22:625–655.

Burns EA: Effects of aging on immune function. J Nutr Health Aging 2004; 8:9–18.

Calvelli T, Denny TN, Paxton H, et al: Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. Cytometry 1993; 14:702–715.

Carothers AD: Counting, measuring, and mapping in FISH-labelled cells: sample size considerations and implications for automation. Cytometry 1994; 16:298–304.

Centers for Disease Control C: Guidelines for the performance of $CD4^+$ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1992; 41:1–17.

Chapman GV: Instrumentation for flow cytometry. J Immunol Methods 2000; 243:3–12.

Chatelain R, Varkila K, Coffman RL: IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. J Immunol 1992; 148:1182–1187.

Chen L, Ashe S, Brady WA, et al: Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. Cell 1992; 71:1093–1102.

Cheroutre H: Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. Annu Rev Immunol 2004; 22:217–246.

Clerici M, Shearer GM: A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. Immunol Today 1993; 14:107–111.

Clerici M, Shearer GM: The Th1–Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. Immunol Today 1994; 15:575–581.

Clevenger CV, Shankey TV: Cytochemistry II: Immunofluorescence measurement of intracellular antigens. In Bauer KD, Shankey TV (eds): Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications. Baltimore, Williams & Wilkins, 1993, pp 157–175.

Conley ME: Molecular basis of immunodeficiency. Immunol Rev 2005; 203:5–9.

Coon JS, Deitch AD, de Vere White RW, et al: Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. The National Cancer Institute's Flow Cytometry Network Experience. Cancer 1988; 61:126–130.

Coon JS, Paxton H, Lucy L, et al: Interlaboratory variation in DNA flow cytometry. Results of the College of American Pathologists' Survey. Arch Pathol Lab Med 1994; 118:681–685.

Cost KM, Fineman D, Steger S: A flow cytometry-based screening assay for lymphocyte proliferation. Clin Immunol Newslett 1993; 13:82–85.

Cunningham-Rundles S: Issues in assessment of human immune function. In Military Strategies for Sustainment of Nutrition and Immune Function in the Field. Washington, DC, Institute of Medicine National Academy Press, 1999, pp 235–248.

Cunningham-Rundles S, Cervia JS: Malnutrition and host defense. In Walker WA, Watkins JB (eds): Pediatrics: Basic Science and Clinical Application, 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 1996, pp 295–307.

Cunningham-Rundles S, Chen C, Bussel JB, et al: Human immune development: implications for congenital HIV infection. Ann NY Acad Sci 1993; 693:20–34.

Cunningham-Rundles C, Cunningham-Rundles S, Iwata T, et al: Zinc deficiency, depressed thymic hormones, and T lymphocyte dysfunction in patients with hypogammaglobulinemia. Clin Immunol Immunopathol 1981; 21:387–396.

Cunningham-Rundles S, Harbison M, Guirguis S, et al: New perspectives on use of thymic factors in immune deficiency. Ann NY Acad Sci 1994; 730:71–83.

Cunningham-Rundles S, Lin DH: Nutrition and the immune system of the gut. Nutrition 1998; 14:573–579.

Cunningham-Rundles S, Nessin M: Bacterial infections in the immunologically compromised host. In Nataro JP, Blaser MJ, Cunningham-Rundles S (eds): Persistent Bacterial Infections. Washington, DC, American Society of Microbiology Press, 2000, pp 145–164.

Cunningham-Rundles C, Siegal FP, Cunningham-Rundles S, et al: Incidence of cancer in 98 patients with common varied immunodeficiency. J Clin Immunol 1987; 7:294–299.

Cunningham-Rundles S, Yeger-Arbitman R, Nachman SA, et al: New variant of MHC class II deficiency with interleukin-2 abnormality. Clin Immunol Immunopathol 1990; 56:116–123.

Denny T, Yogev R, Gelman R, et al: Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. JAMA 1992; 267:1484–1488.

Deodhar SD: Basics in practical applications and standardization of techniques of cellular immunology. Lab Res Methods Biol Med 1983; 8:71–78.

DiGeorge AM: Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: Concurrence with congenital hypothyroidism. In Bergsma D (ed.): Birth Defects Immunologic Deficiency Disease in Man. White Plains, NY, The National Foundation–March of Dimes, 1974, vol 4(1), p 116.

Eckmann L: Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. Curr Opin Gastroenterol 2004; 20:82–88.

Elder ME: ZAP-70 and defects of T-cell receptor signaling. Semin Hematol 1998; 35:310–320.

Fahey JL, Taylor JM, Detels R, et al: The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. N Engl J Med 1990; 322:166–172.

Fei DT, Paxton H, Chen AB: Difficulties in precise quantitation of $CD4^+$ T lymphocytes for clinical trials: a review. Biologicals 1993; 21:221–231.

Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al: Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. Immunol Rev 2005; 203:98–109.

Fletcher MA, Mosley JW, Hassett J, et al: Effect of age on human immunodeficiency virus type 1-induced changes in lymphocyte populations among persons with congenital clotting disorders. Transfusion Safety Study Group. Blood 1992; 80:831–840.

Foletta VC, Segal DH, Cohen DR: Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. J Leukocyte Biol 1998; 63:139–152.

Fulop T, Jr, Larbi A, Dupuis G, et al: Ageing, autoimmunity and arthritis: perturbations of TCR signal transduction pathways with ageing – a biochemical paradigm for the ageing immune system. Arthritis Res Ther 2003; 5:290–302.

Gelfand EW: Abnormalities of signal transduction and T cell immunodeficiency. In Gupta S, Griscelli C (eds): New Concepts in Immunodeficiency Disease. New York, John Wiley & Sons, 1993, pp 231–248.

Ginaldi L, De Martinis M, Modesti M, et al: Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. Gerontology 2000; 46:242–248.

Giorgi JV, Detels R: T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. Clin Immunol Immunopathol 1989; 52:10–18.

Givan AL: Flow cytometry: an introduction. Methods Mol Biol 2004; 263:1–32.

Este artigo de revisão fornece uma introdução abrangente sobre citometria de fluxo e é de fácil leitura.

Goetzman EA: Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnostics. Clin Lab Sci 1993; 6:177–182.

Good RA: Cellular immunology in a historical perspective. Immunol Rev 2002; 185:136–158.

Goolsby CL, Paniagua M, Marszalek L: Clinical flow cytometry: a transition in utilization. Cancer Treat Res 2004; 121:239–257.

Hakim FT, Flomerfelt FA, Boyiadzis M, et al: Aging, immunity and cancer. Curr Opin Immunol 2004; 16:151–156.

Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL: NK cells in innate immunity. Curr Opin Immunol 2005; 17:29–35.

Harding CV, Neefjes J: Antigen processing and recognition. Curr Opin Immunol 2005; 17:55–57.

Haynes BF, Hale LP: The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. Immunol Res 1998; 18:61–78.

Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 1983; 31:1333–1335.

Heimdal JH, Aarstad HJ, Klementsen B, et al: Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) responsiveness in patients with head and neck cancer in relation to tumour stage and prognosis. Acta Otolaryngol 1999; 119:281–284.

Hermans IF, Silk JD, Yang J, et al: The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. J Immunol Methods 2004; 285:25–40.

Herzenberg LA: Genetics, FACS, immunology, and redox: a tale of two lives intertwined. Annu Rev Immunol 2004; 22:1–31.

Homburger HA, Rosenstock W, Paxton H, et al: Assessment of interlaboratory variability of immunophenotyping. Results of the College of American Pathologists Flow Cytometry Survey. Ann NY Acad Sci 1993; 677:43–49.

Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr: The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17:968–975.

Irving BA, Weiss A: The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. Cell 1991; 64:891–901.

Janeway CA, Jr, Bottomly K: Signals and signs for lymphocyte responses. Cell 1994; 76:275–285.

Janeway CA, Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20:197–216.

Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, et al: Immunobiology, 6th ed. New York, Garland Publishing, 2005.

Jung T, Schauer U, Heusser C, et al: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol Methods 1993; 159:197–207.

Kagan J, Gelman R, Waxdal M, et al: NIAID Division of AIDS flow cytometry quality assessment program. Ann NY Acad Sci 1993; 677:50–52.

Katz P, Fauci AS: Immunosuppressives and immunoadjuvants. In Samter M, Talmage DW, Frank MM (eds): Immunological Diseases, 4th ed. Boston, Little, Brown & Co., 1993, pp 675–698.

Keren DF: Surface marker assays in immunodeficiency diseases. In Keren DF (ed.): Flow Cytometry in Clinical Diagnosis. Chicago, ASCP Press, 1989, pp 213–247.

Keusch GT: The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. J Nutr 2003; 133:336S–340S.

Kraan J, Gratama JW, Keeney M, et al: Setting up and

calibration of a flow cytometer for multicolor immunophenotyping. J Biol Regul Homeost Agents 2003; 17:223–233.
Krown SE: AIDS-associated malignancies. Cancer Chemother Biol Response Modif 1996; 16:441–461.
Lamb LS, Jr: Hematopoietic cellular therapy: implications for the flow cytometry laboratory. Hematol Oncol Clin North Am 2002; 16:455–476.
Landay AL, Jessop C, Lennette ET, et al: Chronic fatigue syndrome: clinical condition associated with immune activation. Lancet 1991; 338:707–712.
LeGuern C: Regulation of T-cell functions by MHC class II self-presentation. TRENDS Immunol 2003; 24:633–638.
Lesourd B: Nutrition: a major factor influencing immunity in the elderly. J Nutr Health Aging 2004; 8:28–37.
Lewis DE: Cytochemistry I: Cell surface immunofluorescence. In Bauer KD, Duque RE, Shankey TV (eds): Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications. Baltimore, Williams & Wilkins, 1993, pp 143–156.
Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, et al: Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. J Exp Med 1991a; 173:721–730.
Linsley PS, Brady W, Urnes M, et al: CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. J Exp Med 1991b; 174:561–569.
Lissoni P, Brivio F, Viviani S, et al: Which immunological parameters are clinically essential to monitor IL-2 cancer immunotherapy? J Biol Regul Homeost Agents 1999; 13:110–114.
Liu Y, Jones B, Aruffo A, et al: Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. J Exp Med 1992; 175:437–445.
Livingston PO, Cunningham-Rundles S, Marfleet G, et al: Inhibition of suppressor-cell activity by cyclophosphamide in patients with malignant melanoma. J Biol Response Mod 1987; 6:392–403.
Lloyd A, Hickie I, Hickie C, et al: Cell-mediated immunity in patients with chronic fatigue syndrome, healthy control subjects and patients with major depression. Clin Exp Immunol 1992; 87:76–79.
Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, et al: Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 1990; 11:453–459.
Loken MR, Parks DR, Herzenberg LA: Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. J Histochem Cytochem 1977; 25:899–907.
Loken MR, Sweet RG, Herzenberg LA: Cell discrimination by multiangle light scattering. J Histochem Cytochem 1976; 24:284–291.
Maas JJ, Roos MT, Keet IP, et al: In vivo delayed-type hypersensitivity skin test anergy in human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with T cell nonresponsiveness in vitro. J Infect Dis 1998; 178:1024–1029.
McCoy JP, Jr: Basic principles of flow cytometry. Hematol Oncol Clin North Am 2002; 16:229–243.
Madrenas J, Wange RL, Wang JL, et al: Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. Science 1995; 267:515–518.
Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, et al: Immunosenescence: a review. Arch Gerontol Geriatr 2001; 32:1–14.
Esta revisão fornece um bom resumo das modificações associadas a idade que ocorrem em ambos os braços do sistema imune.
Malissen B: An evolutionary and structural perspective on T cell antigen receptor function. Immunol Rev 2003; 191:7–27.
Malone JL, Simms TE, Gray GC, et al: Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. J Acquir Immune Defic Syndr 1990; 3:144–151.
Maluish AE, Strong DM: Lymphocyte proliferation. In Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1986, pp 274–281.
Mandy FF: Twenty-five years of clinical flow cytometry: AIDS accelerated global instrument distribution. Cytometry A 2004; 58:55–56.
Mandy FF, Bergeron M, Recktenwald D, et al: A simultaneous three-color T cell subsets analysis with single laser flow cytometers using T cell gating protocol. Comparison with conventional two-color immunophenotyping method. J Immunol Methods 1992; 156:151–162.
Marti GE, Vogt RF, Jr, Stetler-Stevenson M: Clinical quantitative flow cytometry: 'Identifying the optimal methods for clinical quantitative flow cytometry'. Cytometry B Clin Cytom 2003; 55:59.
Martin-Reay DG, Kamentsky LA, Weinberg DS, et al: Evaluation of a new slide-based laser scanning cytometer for DNA analysis of tumors. Comparison with flow cytometry and image analysis. Am J Clin Pathol 1994; 102:432–438.
Mascher B, Schlenke P, Seyfarth M: Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. J Immunol Methods 1999; 223:115–121.
Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al: An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med 1981; 305:1431–1438.
Mazari L, Lesourd BM: Nutritional influences on immune response in healthy aged persons. Mech Ageing Dev 1998; 104:25–40.
Mehta BA, Maino VC: Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated $CD4^+$ T lymphocytes by flow cytometry. J Immunol Methods 1997; 208:49–59.
Moss RB, Mercandetti A, Vojdani A: TNF-alpha and chronic fatigue syndrome. J Clin Immunol 1999; 19:314–316.
Moulin AM: Immunology old and new: the beginning and the end. In Paulin MH (ed.): Essays on the History of Immunology. Toronto, Wall & Thompson, 1989, pp 292–298.
Moynahan EJ: Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc-deficiency disorder (Letter). Lancet 1974; 2:399–400.
Nicholson JK, Jones BM, Hubbard M: CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. Cytometry 1993a; 14:685–689.
Nicholson JKA, Green TA: Collaborating laboratories: selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. J Immunol Methods 1993b; 165:31–35.
Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al: Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. Cell 1993; 73:147–157.
Nowell PC: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res 1960; 20:462–466.
Owen MJ, Jenkinson E: Ontogeny of the immune response. In Lachman PJ, Peters DK, Rosen FS (eds): Clinical Aspects of Immunology. Oxford, Blackwell Scientific, 1993, pp 3–12.
Parish CR: Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. Immunol Cell Biol 1999; 77:499–508.
Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood 1989;74:2527–2534.
Paul WE: Fundamental Immunology. New York, Bauer Press, 1993.
Paul WE, Seder RA: Lymphocyte responses and cytokines. Cell 1994; 76:241–251.
Paxton H, Pins M, Denton G, et al: Comparison of CD4 cell count by a simple enzyme-linked immunosorbent assay using the TRAx CD4 test kit and by flow cytometry and hematology. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2:104–114.
Pennington JA: Intakes of minerals from diets and foods: is there a need for concern? J Nutr 1996; 126:2304S–2308S.
Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M: Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat Rev Immunol 2004; 4:648–655.
O artigo descreve um tipo poderoso de citometria de fluxo que é capaz de analisar ao mesmo tempo vários parâmetros físicos e 17 cores fluorescentes distintas.
Perfetto SP, Currier J, Birx DL: T-lymphocyte activation and cell signaling. In Rose NR, Hamilton RG, Detrick B (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th ed. Washington, DC: ASM Press, 2002, pp 224–237.
Perfetto SP, Hickey TE, Blair PJ, et al: Measurement of CD69 induction in the assessment of immune function in asymptomatic HIV-infected individuals. Cytometry 1997; 30:1–9.
Peritt D, Robertson S, Gri G, et al: Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. J Immunol 1998; 161:5821–5824.
Pesu M, Candotti F, Husa M, et al: Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. Immunol Rev 2005; 203:127–142.
Peters VB, Rosh JR, Mugrditchian L, et al: Growth failure as the first expression of malnutrition in children with human immunodeficiency virus infection. Mt Sinai J Med 1998; 65:1–4.
Petrovsky N, Harrison LC: Cytokine-based human whole blood assay for the detection of antigen-reactive T cells. J Immunol Methods 1995; 186:37–46.
Poncelet P, Carayon P: Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. J Immunol Methods 1985; 85:65–74.
Poncelet P, George F, Lavabre-Bertrand T: Immunological detection of membrane bound antigens and receptors. Cells Tissues Methods Immunol Anal 1993; 3:389–417.
Poncelet P, Lavabre-Bertrand T, Caryon P: Quantitative phenotypes of B chronic lymphocytic leukemia B cells established with monoclonals antibodies from the B cell protocol. In Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, et al (eds): Leukocyte Typing II. New York, Springer-Verlag, 1986, vol 2, pp 229–343.
Poncelet P, Poinas G, Corbeau P, et al: Surface CD4 density remains constant on lymphocytes of HIV-infected patients in the progression of disease. Res Immunol 1991; 142:291–298.
Prasad AS, Miale A, Jr, Farid Z, et al: Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. J Lab Clin Med 1963; 61:537–549.
Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, et al: Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. J Immunol 1998; 160:4730–4737.
Prussin C, Metcalfe DD: Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J Immunol Methods 1995; 188:117–128.
Rabinovitch PS: Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. In Bauer KD, Duque RE, Shankey TV (eds): Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications. Baltimore, Williams & Wilkins, 1993, pp 143–156.
Rabinovitch PS: DNA content histogram and cell-cycle analysis. Methods Cell Biol 1994; 41:263–296.
Ramaekers FC, Hopman AH: Detection of genetic aberrations in bladder cancer using in situ hybridization. Ann N Y Acad Sci 1993; 677:199–213.
Reth M: Antigen receptor tail clue. Nature 1989; 338:383–384.
Rosen FS: A brief history of immunodeficiency disease. Immunol Rev 2000; 178:8–12.
Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al: Vigorous HIV-1-specific $CD4^+$ T cell responses associated with control of viremia. Science 1997; 278:1447–1450.
Rowe PC, Barron DF, Calkins H, et al: Orthostatic intolerance and chronic fatigue syndrome associated with Ehlers–Danlos syndrome. J Pediatr 1999; 135:494–499.
Samelson LE: Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. Annu Rev Immunol 2002; 20:371–394.
Schultes BC, Nicodemus CF: Using antibodies in tumour immunotherapy. Expert Opin Biol Ther 2004; 4:1265–1284.
Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, et al: Interleukin 12 acts directly on $CD4^+$ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:10188–10192.
Seder RA, Paul WE, Davis MM, et al: The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of $CD4^+$ T cells

from T cell receptor transgenic mice. J Exp Med 1992; 176:1091–1098.
Shankey TV, Rabinovitch PS: DNA content flow cytometry. In Rose NR, Hamilton RG, Detrick B (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th ed. Washington, DC, ASM Press, 2002, pp 171–184.
Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, et al: Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. International Society for Analytical Cytology. Cytometry 1993; 14:472–477.
Shapiro HM: Trends and developments in flow cytometry instrumentation. Ann NY Acad Sci 1993; 677:155–166.
Shapiro HM: The evolution of cytometers. Cytometry A 2004; 58:13–20.
Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, et al: Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. N Engl J Med 1981; 305:1439–1444.
Silverstein AM: History of immunology. Cellular versus humoral immunity: determinants and consequences of an epic 19th century battle. Cell Immunol 1979; 48:208–221.
Silverstein AM: Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute. Nat Immunol 2003; 4:425–428.
Smith KA: The quantal theory of how the immune system discriminates between 'self and non-self'. Med Immunol 2004; 3:1–22.
Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, et al: Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. Immunol Rev 2004; 202:275–293.
Snow C: Flow cytometer electronics. Cytometry A 2004; 57:63–69.
Sprent J, Surh CD: T cell memory. Annu Rev Immunol 2002; 20:551–579.
Standards NCCL: Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes. NCCLS Document H42-T. Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.
Steinman RM, Mellman I: Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. Science 2004; 305:197–200.
Stelzer GT, Marti G, Hurley A, et al: US–Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. Cytometry 1997; 30:214–230.
Stelzer GT, Shults KE, Loken MR: CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. Ann NY Acad Sci 1993; 677:265–280.
Stewart CC, Goolsby C, Shackney SE: Emerging technology and future developments in flow cytometry. Hematol Oncol Clin North Am 2002; 16:477–495, vii–viii.
Stewart CC, Stewart SJ: Multiparameter data acquisition and analysis of leukocytes. Methods Mol Biol 2004; 263:45–66.
Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, et al: Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes. Clin Immunol Immunopathol 1998; 86:141–146.
Suni MA, Picker LJ, Maino VC: Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. J Immunol Methods 1998; 212:89–98.
Tan P, Anasetti C, Hansen JA, et al: Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. J Exp Med 1993; 177:165–173.
Tirindelli Danesi D, Spano M, Altavista P, et al: Quality control study of the Italian Group of Cytometry on flow cytometry DNA content measurements: II. Factors affecting inter- and intralaboratory variability. Cytometry 1997; 30:85–97.
Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Lodinova-Zadnikova R, et al: Mucosal immunity: its role in defense and allergy. Int Arch Allergy Immunol 2002; 128:77–89.
Townsend SE, Allison JP: Tumor rejection after direct costimulation of $CD8^+$ T cells by B7-transfected melanoma cells. Science 1993; 259:368–370.
Trinchieri G: Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. Semin Immunol 1995; 7:83–88.
Van der Merwe PA, Davis SJ: Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. Annu Rev Immunol 2003; 21:659–684.
Veber MB, Cunningham-Rundles S, Schulman M, et al: Acute shift in immune response to microbial activators in very-low-birth-weight infants. Clin Exp Immunol 1991; 83:391–395.
Vigano A, Vella S, Principi N, et al: Thymus volume correlates with the progression of vertical HIV infection. AIDS 1999; 13:F29–34.
Vindelov LL, Christensen IJ: Detergent and proteolytic enzyme-based techniques for nuclear isolation and DNA content analysis. Methods Cell Biol 1994; 41:219–229.
Vogt RF, Jr, Cross GD, Phillips DL, et al: Interlaboratory study of cellular fluorescence intensity measurements with fluorescein-labeled microbead standards. Cytometry 1991; 12:525–536.
Vogt RF, Marti G, Schwartz A: Quantitative calibration of fluorescence intensity for clinical and research applications of immunophenotyping by flow cytometry. In Tyler H (ed.): Reviews in Biotechnology and Bioengineering. Norwood, N,: Ablex, 1994, vol 1.
Waller EK: Cellular immunotherapy and cancer. Semin Oncol 2004; 31:87–90.
Wedderburn LR, Patel A, Varsani H, et al: The developing human immune system: T-cell receptor repertoire of children and young adults shows a wide discrepancy in the frequency of persistent oligoclonal T-cell expansions. Immunology 2001; 102:301–309.
Weinberg DS: Relative applicability of image analysis and flow cytometry in clinical medicine. In Bauer KD, Duque RE, Shankey TV (eds): Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications. Baltimore, Williams & Wilkins, 1993, pp 359–371.
Weiss A: Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. Annu Rev Genet 1991; 25:487–510.
Weiss A, Littman DR: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 1994; 76:263–274.
Wheeless LL, Coon JS, Cox C, et al: Precision of DNA flow cytometry in inter-institutional analyses. Cytometry 1991; 12:405–412.
Wingren AG, Parra E, Varga M, et al: T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. Crit Rev Immunol 1995; 15:235–253.
Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, et al: Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. J Exp Med 1993; 178:1309–1320.
Yabuhara A, Kawai H, Komiyama A: Development of natural killer cytotoxicity during childhood: marked increases in number of natural killer cells with adequate cytotoxic abilities during infancy to early childhood. Pediatr Res 1990; 28:316–322.
Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science 1991; 254:277–279.
Yannelli JR, Wroblewski JM: On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. Vaccine 2004; 23:97–113.
Yokoyama WM, Kim S, French AR: The dynamic life of natural killer cells. Annu Rev Immunol 2004; 22:405–429.
Yuan Q, Walker WA: Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38:463–473.
Zedler S, Bone RC, Baue AE, et al: T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. Crit Care Med 1999; 27:66–72.
Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, et al: Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. J Immunol 1998; 160:4018–4025.
Zola H: The 8th Human Leucocyte Differentiation Antigens Workshop: potential new CD molecules. J Biol Regul Homeost Agents 2002; 16:119–124.
Zola H, Fusco M, Weedon H, et al: Reduced expression of the interleukin-2-receptor gamma chain on cord blood lymphocytes: relationship to functional immaturity of the neonatal immune response. Immunology 1996; 87:86–91.
Zola H, Moore HA, Bradley J, et al: Lymphocyte sub-populations in human cord blood: analysis with monoclonal antibodies. J Reprod Immunol 1983; 5:311–317.

CAPÍTULO 45

Avaliação laboratorial da função de imunoglobulinas e da imunidade humoral

Richard A. McPherson MD, H. Davis Massey MD PhD

Propriedades estruturais dos anticorpos 956
Moléculas de anticorpo 956
Interação antígeno-anticorpo 958
Bases genéticas da diversidade de anticorpos 958
Propriedades gerais das imunoglobulinas 960
Imunoglobulina M 960
Imunoglobulina G 961
Imunoglobulina A 962
Imunoglobulina D 963
Imunoglobulina E 963
Resumo 963
Importância clínica das imunoglobulinas 963
Patogênese da doença 963
Diagnóstico da doença 965
Imunoeletroforese 966
Imunofixação 966
Teste da crioglobulina 966
Bandas de imunoglobulina oligoclonal no líquido cerebrospinal 968
Prevenção e terapia de doenças 969
Referências bibliográficas 970

PONTOS-CHAVE

- Existem cinco classes diferentes de anticorpos: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. Cada uma dessas classes possui uma cadeia pesada distinta.
- Existem dois tipos diferentes de cadeia leve: κ e λ.
- Antígenos reagem com anticorpos no nível da porção Fab, que contém regiões variáveis de ambas as cadeias leve e pesada.
- A região Fc localizada nas cadeias pesadas determina quais proteínas irão se ligar ao anticorpo (p. ex., complemento).
- A IgG é a classe prevalente no sangue e nos líquidos teciduais. A IgM é encontrada principalmente no sangue. A IgA secretória está presente sobretudo nas superfícies epiteliais. A IgD liga-se principalmente às células B. A IgE está amplamente ligada aos basófilos e mastócitos.
- Aumentos policlonais de imunoglobulinas (Igs) fazem parte da resposta imune e podem ser detectados nas doenças crônicas.
- Aumentos monoclonais de Igs sugerem discrasia de plasmócitos.
- O diagnóstico de distúrbios que envolvem as Igs é favorecido pela quantificação delas, além das medidas qualitativas de sua clonalidade por imunoeletroforese ou imunofixação eletroforética.
- As crioglobulinas podem surgir como um excesso de Igs monoclonais (tipo I) e provocar hiperviscosidade; ou sob a forma de um autoanticorpo IgM anti-IgG (tipos II e III) com formação de imunocomplexos circulantes e causar vasculite.
- A presença de bandas oligoclonais de Igs no líquido cerebrospinal (LCE) sugere a existência de um distúrbio autoimune, como a doença desmielinizante ou infecção.

Os anticorpos são as moléculas efetoras da imunidade humoral (mediada por células B). São Igs que reagem especificamente e se ligam aos antígenos estimuladores de sua produção. Em termos de massa, as Igs correspondem a cerca de 20% das proteínas plasmáticas em indivíduos sadios. A atividade do anticorpo está associada às proteínas que apresentam migração eletroforética mais lenta, as γ-globulinas. O presente capítulo discute as propriedades gerais estruturais e funcionais das Igs, sua avaliação laboratorial e respectiva importância clínica.

Propriedades estruturais dos anticorpos

Moléculas de anticorpo

A estrutura molecular dos anticorpos é bem conhecida (Padlan, 1991; Poljak, 1991; Tedford, 1991). Uma molécula de Ig é uma glicoproteína com formato em "Y". Ela possui dois sítios idênticos de ligação ao antígeno nas extremidades do "Y" (região Fab), além de sítios de ligação para componentes do complemento e/ou vários receptores de superfície celular na cauda do "Y" (região Fc). Cada molécula de Ig é composta de duas cadeias pesadas (H, *heavy*) idênticas e duas cadeias leves (L, *light*) também idênticas. Essas cadeias polipeptídicas se mantêm unidas por meio de interações não covalentes que são estabilizadas por ligações dissulfeto. Partes de ambas as cadeias, H e L, formam os sítios de ligação ao antígeno. Cada cadeia L e H de uma Ig consiste de uma região variável ligada a uma região constante. A região variável é constituída por cerca de 110 resíduos de aminoácidos na extremidade aminoterminal (as extremidades do "Y"), que formam o sítio de ligação antigênica. A região constante na cadeia H é 3 a 4 vezes maior do que a região constante na cadeia L. Cada cadeia é composta por domínios repetidos, similarmente pregueados: uma cadeia L possui 1 domínio de região variável (V_L) e 1 domínio de região constante (C_L); uma cadeia H possui 1 domínio de região variável (V_H) e 3 a 4 domínios de região constante (C_H) (Fig. 45.1). A variação da sequência de aminoácidos nas regiões variáveis de ambas as cadeias, L e H, é confinada na maioria das vezes a 3 regiões hipervariáveis que se unem na extremidade aminoterminal da molécula para formar o sítio de ligação ao antígeno. Cada sítio de ligação ao antígeno é grande apenas o suficiente para ligar um determinante antigênico com tamanho equivalente a 5 a 6 resíduos de açúcar.

Existem 5 isótipos diferentes de cadeia pesada (γ, α, μ, δ, ε) e 2 isótipos distintos de cadeia leve (κ e λ), além de alguns subtipos de isótipos. Exemplificando, o isótipo γ tem como subtipos γ_1, γ_2, γ_3 e γ_4. Os isótipos são resultado de variações que envolvem as regiões constantes das cadeias pesada e leve. Essas designações isotípicas constituem a base da nomenclatura dos anticorpos. Como a cadeia pesada isolada determina as funções efetoras, as Igs são convenientemente referidas de acordo com o isótipo de suas cadeias pesadas (classe), utilizando-se uma terminologia escrita em inglês (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE).

Os anticorpos possuem dois sítios de ligação antigênica idênticos. Um sítio de ligação ao antígeno é constituído de aminoácidos oriundos de uma classe de cadeia H e de uma classe de cadeia L. Assim, as moléculas das quatro cadeias do monômero Y (ver Fig. 45.1) possuem dois sítios idênticos de combinação ao antígeno e são ditas *bivalentes*. Tais moléculas de anticorpos podem fazer ligação cruzada com moléculas de antígeno em uma ampla treliça, se cada uma das moléculas de antígeno tiver 3 ou mais determinantes antigênicos. Ao atingir certo tamanho, essa treliça precipita em solução (Davies, 1983). Essa ligação cruzada é fisiologicamente importante, pois intensifica o englobamento do antígeno, como ocorre com as bactérias e os leucócitos fagocíticos. Também está na ativação do sistema complemento. Além disso,

a ligação cruzada pode ser requerida para desencadear a resposta das células produtoras de anticorpos (linfócitos B) ao antígeno. A eficiência da ligação ao antígeno e das reações cruzadas com anticorpos é bastante intensificada por uma região de dobradiça flexível, na qual os braços do "Y" se unem à cauda, possibilitando que a distância existente entre os dois sítios de ligação antigênica seja variável.

A multivalência afeta a avidez com que o anticorpo se liga a certos tipos de antígeno. Um antígeno particulado (como uma bactéria ou vírus) apresenta determinantes antigênicos repetidos em sua superfície. Uma molécula de anticorpo pode interagir com uma única partícula, de tal modo que seus dois sítios de ligação ao antígeno se liguem aos determinantes antigênicos presentes nessa partícula, em vez de aos determinantes antigênicos de duas partículas adjacentes. Quando esse tipo de ligação ocorre, a energia efetiva da interação ou avidez é consideravelmente maior do que aquela associada às ligações monovalentes que envolvem duas partículas. Foi demonstrado que esse mecanismo é importante, em termos fisiológicos, para a neutralização de vírus por anticorpos com afinidade de ligação relativamente baixa.

O efeito protetor das Igs não se deve simplesmente à capacidade de ligação ao antígeno. As Igs participam de uma variedade de atividades biológicas mediadas pela cauda do "Y" – a região Fc da molécula. Essa parte da molécula de anticorpo determina o destino do antígeno depois que ocorre a ligação. As Igs que apresentam a mesma capacidade de ligação ao antígeno podem ter diversas regiões Fc distintas e, assim, apresentar propriedades funcionais diferentes, como ativação do sistema complemento e fixação aos receptores para Fc existentes em macrófagos, auxiliando na fagocitose de antígenos por essas células.

Em razão da localização exposta e da estrutura em pregas frouxas, a *região da dobradiça* é prontamente atacada por diversas enzimas proteolíticas. Como sugere o próprio nome, a região da dobradiça confere certa flexibilidade à molécula, que lhe permite assumir a forma estrutural em "Y". Isso possibilita que o anticorpo se fixe a uma única partícula (p. ex., bactéria) por meio de seus sítios de ligação antigênica ou, alternativamente, seja totalmente distendido para unir-se a duas partículas. As propriedades exclusivamente conferidas pela região da dobradiça presente nas moléculas de Ig estão relacionadas ao seu rico conteúdo de resíduos de prolina e aminoácidos hidrofílicos. As ligações dissulfeto entre cadeias H das moléculas de IgG, IgA e IgD estão localizadas na região da dobradiça (Fig. 45.1).

As enzimas proteolíticas papaína e pepsina clivam moléculas de anticorpo em fragmentos característicos distintos que conduzem à compreensão acerca da relação estrutura-função da proteína. A clivagem por ação da papaína produz dois fragmentos Fab separados e idênticos (fragmentos de ligação ao antígeno – *antigen-biding*), cada um com um sítio de ligação antigênica. Essa clivagem também resulta na formação de um fragmento Fc (assim denominado por sofrer imediata cristalização em primatas não humanos). Por outro lado, a clivagem promovida pela pepsina gera um fragmento $F(ab')_2$, que recebeu essa denominação por consistir de dois fragmentos F(ab') ligados covalentemente (cada um deles discretamente maior do que um fragmento Fab). O restante da molécula é quebrado em fragmentos menores de tamanhos variados (Fig. 45.1). Por serem bivalentes, os fragmentos $F(ab')_2$ retêm a capacidade de fazer reações cruzadas com antígenos e formar precipitados. O mesmo não ocorre com os univalentes fragmentos Fab. Nenhum desses fragmentos (subunidades de anticorpos) possui outras propriedades biológicas apresentadas pelas moléculas de anticorpo intactas, pois são destituídos da cauda (região Fc) que media tais propriedades. Entretanto, a porção Fab monovalente constitui a forma monoespecífica de pós-imunização do anticorpo de ovinos purificada por afinidade, que é utilizada na terapia de certos pacientes, como na remoção de

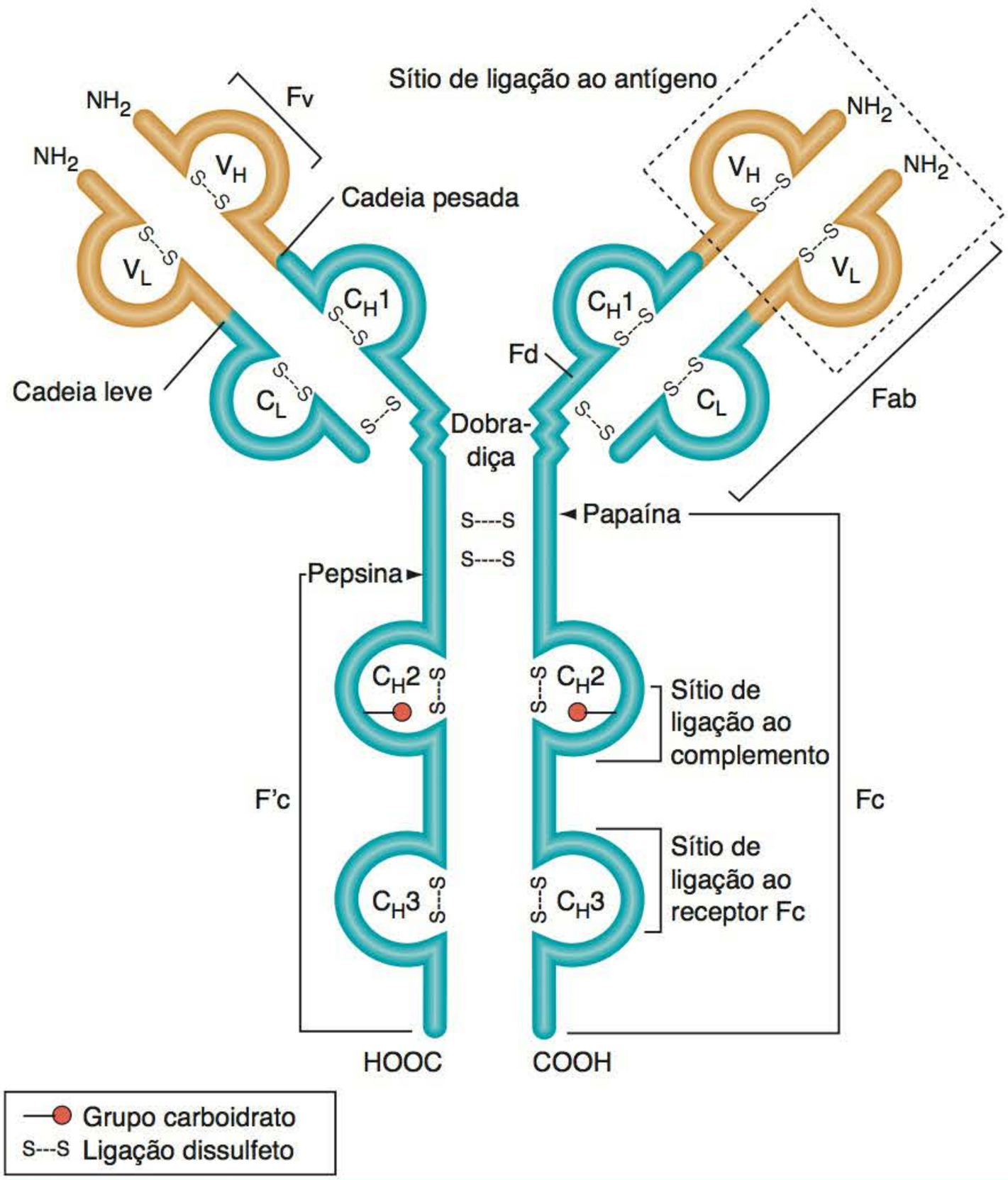


Figura 45.1 Representação esquemática da molécula de imunoglobulina G. A ilustração mostra as posições relativas das ligações dissulfeto *intercadeias* e *intracadeias* que formam as regiões de alça. Cada uma das alças delineia o domínio das cadeias leve e pesada, identificadas de acordo. Também são indicados os prováveis sítios de clivagem enzimática na região da "dobradiça", em que atuam a papaína ou a pepsina. Os fragmentos produzidos pela papaína são denominados Fab e Fc. Os fragmentos gerados pela pepsina são Fc' e Fab'2 (2 fragmentos Fab ligados por pontes dissulfeto). A digestão de Fab pela pepsina sob condições adequadas gera o fragmento F_V (V_H e V_L não covalentemente associado). A parte da cadeia pesada que contribui para o fragmento Fab é designada Fd.

níveis tóxicos de digoxina (Digibind) ou na neutralização do veneno de cobras crotalídeas (CroFab).

Cada clone de células B produz moléculas de anticorpo com um único sítio de ligação antigênica. Inicialmente, as moléculas são inseridas na membrana plasmática, na qual atuam como receptores de superfície para antígenos. Quando um antígeno se liga aos anticorpos de membrana, as células B são ativadas e se multiplicam, diferenciam-se em plasmócitos e sintetizam grandes quantidades de anticorpos solúveis que contêm o mesmo sítio de ligação antigênica. Esses anticorpos solúveis são secretados no sangue. Os anticorpos humorais defendem seres humanos e animais contra infecções, inativando vírus e toxinas bacterianas via seus domínios V_H/V_L, bem como recrutando o complemento e diversas células para destruir e ingerir microrganismos invasores via seus domínios C_L localizados na região Fc da molécula. As propriedades biológicas dos vários domínios de Igs são resumidas na Tabela 45.1.

Tabela 45.1 Propriedades biológicas dos domínios de imunoglobulina

Domínio	Função conhecida ou provável
C_H3	1. Reações citofílicas que envolvem: (a) macrófagos e monócitos; (b) mastócitos heterólogos; (c) células *killer* (K) citotóxicas; (d) células B. 2. Montagem não covalente de cadeias pesadas e leves
C_H2	1. Ligação do complemento (C1q) 2. Controle da taxa metabólica
C_H1/C_L	1. Montagem não covalente das cadeias pesada e leve 2. Montagem covalente das cadeias pesada e leve 3. Espaçadores entre as interações interdomínios, que envolvem as funções de ligação antigênica e efetora
V_H/V_L	1. Ligação ao antígeno 2. Ligação não covalente das cadeias pesada e leve

Fonte: com permissão de Dorrington KJ, Painter RH: Biological activities of the constant region of immunoglobulin G. *In* Mandel TE, et al (eds): Progress in Immunology III. Canberra, Australian Academy of Science, 1977.

Interação antígeno-anticorpo

A ligação de um antígeno ao anticorpo é reversível. A afinidade e o número de sítios de ligação contribuem para a força da interação antígeno-anticorpo. Essa ligação reversível resulta da existência de numerosas forças não covalentes relativamente fracas, entre as quais ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações iônicas. Essas forças fracas são efetivas apenas quando a molécula de antígeno está perto o bastante para permitir que alguns de seus átomos se ajustem aos recessos (regiões) complementares existentes na superfície do anticorpo. As regiões complementares de uma unidade constituída por 4 cadeias são seus 2 sítios idênticos de ligação antigênica, enquanto a região correspondente no antígeno é um determinante antigênico. A maioria das macromoléculas antigênicas possui diversos determinantes antigênicos. Se 2 ou mais desses determinantes forem idênticos, o antígeno é classificado como multivalente.

A *afinidade* de uma molécula de anticorpo reflete a estreiteza do ajuste de um determinante antigênico a um único sítio de ligação antigênica e é independente do número de sítios antigênicos. Contudo, a *avidez* total de um anticorpo por um antígeno multivalente, como um polímero com subunidades repetitivas, é definida como a força total de todos os seus sítios de ligação juntos. Uma molécula de IgG típica se liga a um antígeno multivalente com uma força no mínimo 10.000 vezes maior quando ambos os sítios de ligação antigênica da molécula estão engajados, em comparação à força de ligação com envolvimento de apenas um dos sítios.

Pelo mesmo motivo, se a afinidade dos sítios de ligação em uma molécula de IgG e em outra molécula de IgM é igual, a IgM (por ser um pentâmero e, como tal, possuir 10 sítios de ligação) apresentará atividade consideravelmente maior para um antígeno multivalente do que a IgG (com apenas dois sítios de ligação). Essa diferença de avidez é importante, considerando-se que os anticorpos produzidos no início da resposta imune geralmente apresentam afinidades bem menores do que aqueles produzidos mais tarde. O aumento da afinidade média dos anticorpos produzidos que ocorre com o passar do tempo, após a imunização, é denominado *maturação da afinidade*. Esse processo ocorre porque a resposta de anticorpos a um antígeno é heterogênea – ou seja, anticorpos com diferentes sítios de combinação antigênica são eliciados contra o antígeno pelos clones de linfócitos B responsivos. Em razão da alta avidez total que possui, a IgM (principal classe de Ig produzida no início das respostas imunes) pode atuar mesmo quando seus sítios de ligação apresentam baixa afinidade.

O tamanho do complexo antígeno-anticorpo é determinado pela valência do antígeno e pelas concentrações relativas de antígeno e anticorpo. A reação de precipitação antígeno-anticorpo baseia-se na ligação cruzada de antígenos multivalentes com anticorpos bivalentes. Se apenas um tipo de anticorpo (uma resposta monoclonal) estiver presente, não poderá haver ligação cruzada com moléculas que apresentem apenas um único determinante antigênico. Se um antígeno for bivalente, poderá formar pequenos complexos cíclicos ou cadeias lineares com os anticorpos, enquanto um antígeno que contém 3 ou mais determinantes antigênicos é capaz de formar treliças tridimensionais maiores que precipitam prontamente. No entanto, a maioria dos antissoros eliciados contra um antígeno contém uma variedade de anticorpos diferentes (uma resposta policlonal), que reagem com determinantes distintos do antígeno e podem cooperar na ligação cruzada com ele. Ao contrário, anticorpos homogêneos (monoclonais) podem precipitar somente as moléculas que possuem determinantes antigênicos idênticos repetidos.

Dadas as condições de valência que permitem a formação de amplos agregados, o tamanho dos complexos antígeno-anticorpo formados depende essencialmente das concentrações molares relativas dos dois reagentes. Havendo um excesso de antígeno ou de anticorpo, é improvável que ocorra formação de complexos grandes (Fig. 45.2). Essa propriedade é essencial à compreensão das reações aparentemente paradoxais observadas em alguns imunoensaios dependentes da formação do complexo antígeno-anticorpo. Por exemplo, um vasto excesso de antígeno pode saturar completamente todos os sítios de ligação no anticorpo e, assim, produzir um sinal negativo (i. e., ausência de aglutinação etc.). Esse fenômeno, às vezes, é referido como "efeito prozona". O efeito prozona continua sendo um problema potencial para os sistemas de ensaio modernos, a exemplo do teste para sífilis, em que títulos extremamente altos de anticorpos podem não ser detectados se a amostra não for diluída antes de ser testada (Smith, 2004), até mesmo quando a análise é feita por imunofixação eletroforética (ver adiante, Fig. 45.6*E*).

O tamanho e a composição dos complexos antígeno-anticorpo são fatores importantes não só por influenciarem as reações de precipitação *in vitro,* mas também por serem cruciais na determinação do destino dos complexos dentro do corpo. Os complexos formados em equivalência ou excesso de anticorpos possuem múltiplas regiões Fc salientes e, assim, ligam-se fortemente aos receptores Fc existentes em macrófagos. Estes, por sua vez, os ingerem e degradam. Pequenos complexos, formados diante do excesso de antígenos, possuem apenas uma região Fc por complexo. Desse modo, ligam-se precariamente aos receptores Fc macrofágicos e são menos eficientemente destruídos. Em vez disso, podem se depositar em vasos sanguíneos localizados na pele, rins, articulações e cérebro, nos quais ativam o sistema complemento, provocando inflamação e destruição tecidual.

Embora os complexos antígeno-anticorpo tenham uma aparência rígida de "chave e fechadura", os anticorpos são entidades dinâmicas e apresentam flutuações estruturais (Karplus, 1983; Wilson, 1991). A ligação pode requerer até mesmo alterações estruturais conformacionais. Esses ajustem incluem desvios de cadeia lateral de até 20 a 30 nm, rotações de anel aromático, alterações conformacionais e até pequenas rotações entre os domínios V_H e V_L (Bhat, 1990; Standfield, 1990; Herron, 1991).

Bases genéticas da diversidade de anticorpos

Estima-se que um indivíduo seja capaz de produzir até 10^6 a 10^9 moléculas diferentes de anticorpo. Mecanismos genéticos especiais

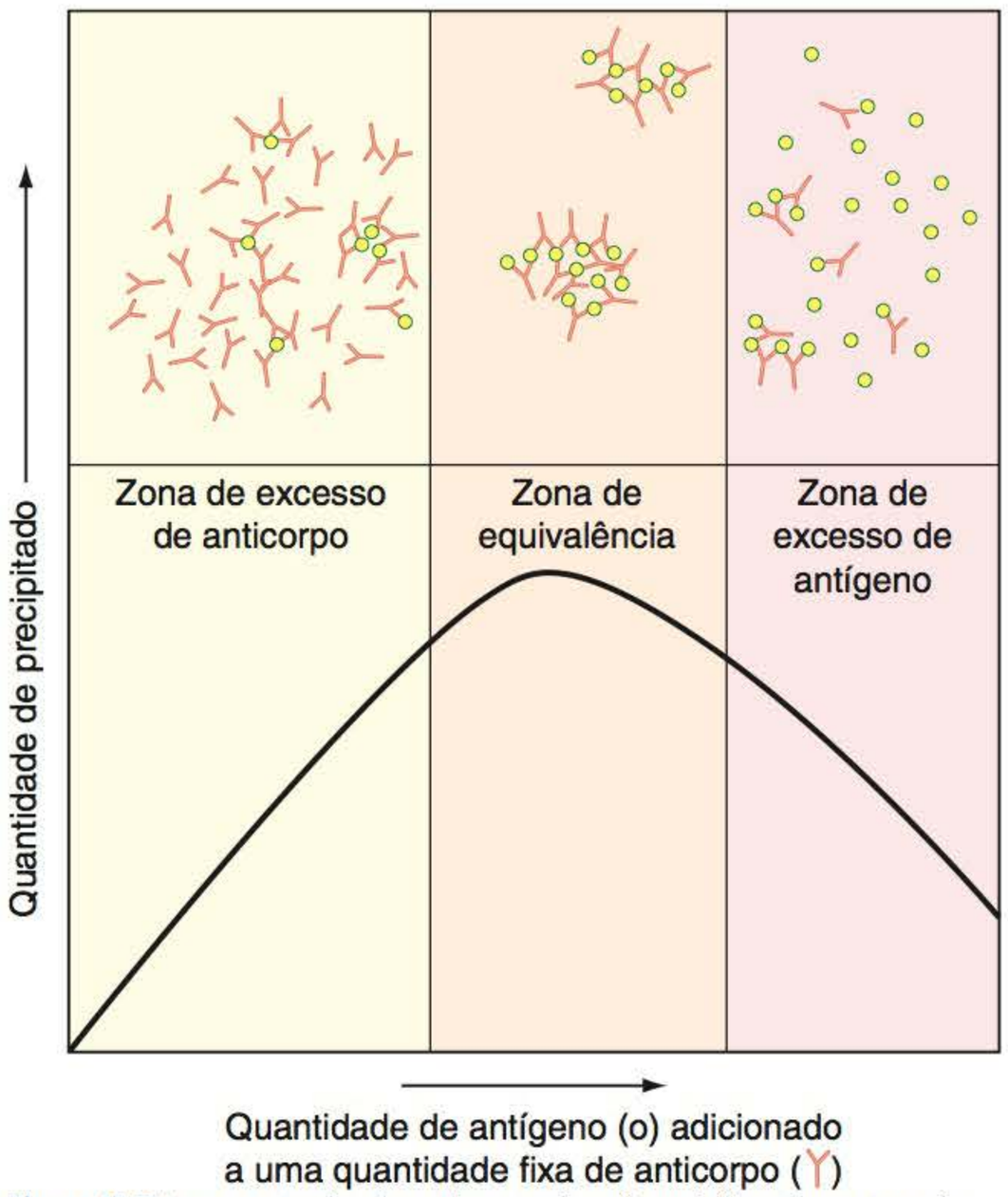


Figura 45.2 As concentrações de anticorpo e de antígeno influenciam o tamanho dos complexos antígeno-anticorpo formados. Complexos maiores se formam quando ambas as moléculas estão presentes em concentrações molares aproximadamente iguais (zona de equivalência); já os complexos menores são formados quando o antígeno está presente em grande excesso. Note que os complexos pequenos formados diante do excesso de antígeno apresentam poucas moléculas de anticorpo por complexo. Por esse motivo, tais complexos são eliminados do líquido extracelular de maneira ineficaz pelos macrófagos.

evoluíram para produzir o enorme número de moléculas de Ig desenvolvido em resposta à estimulação antigênica, dispensando a necessidade de envolvimento de genes em excesso (Max, 2003).

As moléculas Ig são produzidas por três grupos de genes separados, que codificam das cadeias κ, λ e H, respectivamente. Os grupos de genes codificadores das cadeias leve e pesada residem em cromossomos distintos. Em cada grupo, segmentos genéticos separados que codificam diferentes partes das regiões variáveis das cadeias leve e pesada podem ser unidos por eventos recombinantes sítio-específicos durante a diferenciação das células B. Os grupos de genes codificadores da cadeia leve contêm um ou mais genes para a região constante (C), bem como conjuntos de segmentos genéticos para as regiões variável (V) e de ligação (J, *joining*). O grupo de genes codificadores da cadeia H contém um conjunto de genes C e um conjunto de genes V, além dos segmentos genéticos para diversidade (D) e J. Para formar uma molécula de anticorpo, um segmento genético V_L é recombinado a outro segmento genético J_L, formando um gene V codificador da cadeia leve. Do mesmo modo, um segmento genético V_H é recombinado com segmentos genéticos D e J_H para produzir o gene V, codificador da cadeia pesada (Fig. 45.3). Cada um dos segmentos genéticos montados, então, é cotranscrito com a sequência da região constante apropriada para produzir uma molécula de mRNA codificadora da cadeia polipeptídica completa. Por meio da combinação diversificada de segmentos genéticos herdados que codificam as regiões V_H e V_L, os vertebrados conseguem produzir milhares de cadeias leves e cadeias pesadas diferentes. Essas cadeias podem se associar e dar origem a milhões de moléculas de anticorpo distintas.

O repertório basal de moléculas de anticorpo pode ser ainda mais expandido por meio da hipermutação somática, que parece ser ativada pela exposição ao antígeno. Dessa forma, o papel seletivo do antígeno diante de uma mutação somática parece conduzir a um ajuste fino da resposta imune e a uma diversidade virtualmente ilimitada de moléculas de anticorpo. Mutações somáticas pontuais em genes codificadores de Igs ocorrem nas células B (e não nas células germinativas) ao longo da vida de um animal ou de um indivíduo (Tonegawa, 1983). As hipermutações somáticas são em grande parte restritas aos genes da região variável das cadeias H e L, bem como aos íntrons imediatamente adjacentes. Estima-se que ocorra aproximadamente uma mutação na região V da cadeia H ou da cadeia L em cada célula individual, a cada divisão celular. Isso não só amplia a diversidade de anticorpos como também provoca uma mudança da afinidade com que o anticorpo se liga ao respectivo ligante. As células B emergentes contam com a vantagem de se ligar mais avidamente aos antígenos, em contraste com as células B, que se ligam aos antígenos com menor avidez. À medida que a concentração de antígenos diminui, as células B cujos receptores são mais ávidos passam a

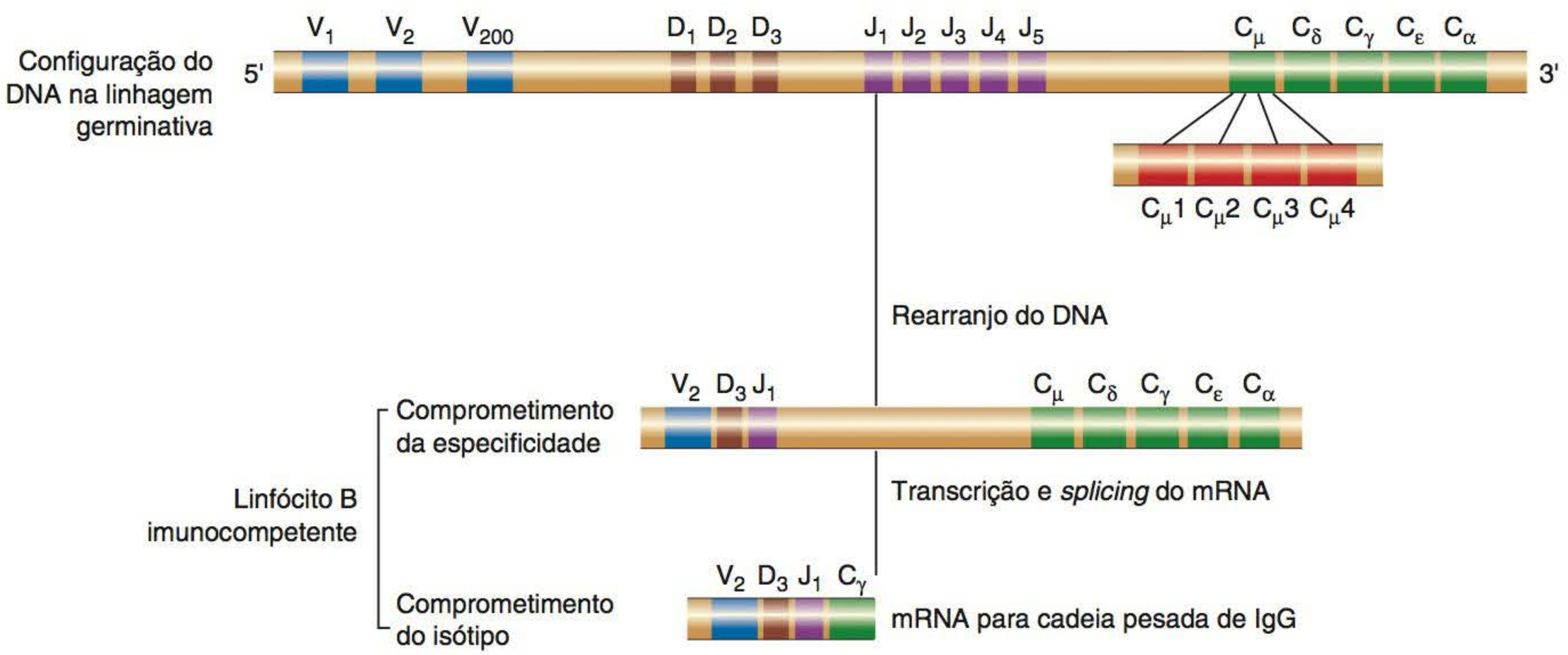


Figura 45.3 Organização e rearranjo dos genes codificadores (éxon) da cadeia pesada de Ig no cromossomo 12 murino. Cada gene V_H também possui uma sequência líder (não mostrada). Os genes da região constante são identificados pelo isótipo da cadeia pesada, sendo que há mais de um gene codificador dos isótipos C_γ e C_α. Diferentemente dos genes que codificam C_γ e C_α, os genes de C_H são compostos por múltiplos éxons, como mostra a ilustração do gene C_μ (domínios $C_{\mu1}$–$C_{\mu4}$). Os sítios de troca estão localizados na extremidade 5′ de cada gene C_H (não mostrados). A linha sólida representa as sequências de intervenção (íntrons) existentes entre os genes ou segmentos genéticos. Cada cadeia pesada é codificada por 4 segmentos genéticos distintos (V, D, J e C). (Redesenhado com permissão de Marcu, KB: Immunoglobulin heavy-chain constant region genes. Cell 1982; 29:719. Copyright © by Cell Press.)

dominar a população de células responsivas. Como resultado, os anticorpos produzidos em resposta a um novo desafio apresentam maior afinidade do que os anticorpos produzidos na resposta inicial. Assim, esse processo de hipermutação somática pode fazer com que os indivíduos já imunizados passem a apresentar anticorpos de alta afinidade e consideravelmente mais efetivos com base no peso.

Todas as células B inicialmente produzem anticorpos IgM. Algumas dessas células mudam posteriormente e passam a produzir anticorpos de outras classes (isótipos: IgG, IgA etc.) que possuem o mesmo sítio de ligação antigênica (idiotipo) dos anticorpos IgM originais (*exclusão alélica*) (Tab. 45.2). Essa troca de classes combinada à exclusão alélica permite que os mesmos sítios de ligação antigênica (mesmas V_H e cadeia leve) sejam distribuídos entre anticorpos com muitas propriedades biológicas distintas (funções efetoras secundárias) (Corcoran, 2005).

Assim, o mecanismo de organização genética possibilita a montagem de moléculas de Ig com especificidades diversas. A diversidade dos anticorpos depende da presença de múltiplos segmentos genéticos, de seu arranjo em diferentes sequências, da combinação de diferentes cadeias leves e pesadas na montagem das moléculas de Ig e da ocorrência de mutações somáticas.

Tabela 45.2 Resumo das variantes imunoglobulínicas

Tipo de variação	Distribuição	Variante	Localização	Exemplos
Isotípica	Todas as variantes estão presentes no soro do indivíduo normal	Classes	C_H	IgM, IgE
		Subclasses	C_H	IgA1, IgA2
		Tipos	C_L	κ, λ
		Subtipos	C_L	λOz^+, λOz^-
		Subgrupos	V_L, V_H	$V_{\kappa I}$, $V_{\kappa II}$, V_{HI}, V_{HII}
Alotípica	Formas alélicas que não estão presentes em todos os indivíduos	Alótipos	Principalmente, C_H/C_L Ocasionalmente, V_H/V_L	Grupo Gm (cadeia γ humana; p. ex., IgG1, G1m3, G1m17) b_4, b_5, b_6, b_9 (cadeia leve de coelho)
Idiotípica	Individualidade antigênica específica para cada molécula de Ig	Idiotipos	V_H/V_L	Determinante identificado por anticorpo específico para uma Ig individual

Fonte: modificado com permissão de Sell S: *Immunology, Immunopathology, and Immunity*, 4th ed. New York, Elsevier, 1987.

Propriedades gerais das imunoglobulinas

As várias classes de Igs humanas e suas propriedades (Spiegelberg, 1974; Kolar, 2003) estão resumidas nas Tabelas 45.3 e 45.4.

Imunoglobulina M

Essa glicoproteína constitui a principal classe de anticorpos secretados no sangue durante os estágios iniciais de uma resposta *primária* de anticorpos. Normalmente, a forma secretada da IgM é um pentâmero composto por 5 unidades de 4 cadeias, uma macroglobulina com taxa de sedimentação igual a 19S e peso molecular de 900 kDa. Todavia, nas doenças autoimunes humanas, como o lúpus eritematoso sistêmico (SLE, *systemic lupus erythematosus*), a forma monomérica de 7S pode ser detectada em quantidades perceptíveis no soro. A deficiência seletiva de IgM é um distúrbio raro associado à ausência de IgM, mas os níveis das demais classes de Ig permanecem normais. A causa desse distúrbio é desconhecida.

Como a IgM pentamérica possui ao todo 10 sítios de ligação antigênica, é mais eficaz que as moléculas de IgM monomérica 7S e de IgG, em termos de ligação cruzada com o antígeno e ativação do sistema complemento mediante ligação antigênica. Dessa forma, a alta eficácia de ligação e ativação do complemento aliada ao aparecimento no início do curso da infecção fazem da IgM um agente poderoso para o combate às invasões microbianas.

Cada pentâmero de IgM contém uma cópia de outra cadeia polipeptídica, denominada *cadeia J (joining)*, cujo peso molecular vale 15 kDa. Esse polipeptídeo acessório é produzido por células secretoras de IgM. Trata-se de uma glicoproteína acídica com elevado conteúdo de resíduos de cisteína que, em consequência, está conectada por ligações dissulfeto entre duas regiões Fc monoméricas de IgM adjacentes na extremidade carboxiterminal. É provável que a oligomerização seja iniciada nesse sítio.

A IgM também é a primeira classe de anticorpos a ser produzida pelas células B em desenvolvimento. As precursores imediatas das células B, denominadas células pré-B, produzem cadeias μ, porém não sintetizam cadeias leves, que se acumulam dentro das células. As células pré-B passam a sintetizar cadeias leves apenas posteriormente,

Tabela 45.3 Propriedades físicas das imunoglobulinas humanas

Designação da WHO	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Cadeias pesadas	μ	γ	α	δ	ε
Subclasses de cadeias pesadas	μ_1, μ_2	γ_1, γ_2, γ_3, γ_4	α_1, α_2	–	–
Cadeias leves	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ
Fórmula molecular	IgM(κ) $(2\mu 2\kappa)_5$ IgM(λ) $(2\mu 2\lambda)_5$	IgG(κ) $2\gamma 2\kappa$ IgG(λ) $2\gamma 2\lambda$	IgA(κ) $(2\alpha 2\kappa)_{1-3}$ IgA(λ) $(1\alpha 2\lambda)_{1-3}$ IgA(κ) $(2\alpha 2\kappa)_2S^\dagger$ IgA(λ) $(2\alpha 2\lambda)_2S$	IgD(κ) $2\delta 2\kappa$ IgD(λ) $2\delta 2\lambda$	IgE(κ) $2\varepsilon 3\kappa$ IgE(λ) $2\varepsilon 2\lambda$
Número de unidades de quatro cadeias por molécula	5	1	1–3	1	1
Peso molecular da cadeia pesada (kDa)	70	50–60	55	62	70
Peso molecular da cadeia leve (kDa)	23	23	23	23	23
Coeficiente de sedimentação (S_{20W})	18,0–19,0	6,7–7,0	6,6–14,0	6,9–7,0	7,9–8,0
Peso molecular (kDa)	900	143–160	159–447	177–185	187–200
Mobilidade eletroforética	γ^1–β^1	γ^2–α^1	γ^2–β^2	γ^1	γ^1
Conteúdo de carboidrato (%)	7–14	2,2–3,5	7,5–9,0	12–13	11–12
Alótipos de cadeia pesada	–	Gm	Am	–	–
Alótipos de cadeia leve	Km(κ)*	Km(κ)*	Km(κ)*	Km(κ)*	Km(κ)
Valência para ligação antigênica	5(10)	2	2,4 (? formas poliméricas)	2	2
Número de domínios nas cadeias pesadas	5	4	4	4	5

* Anteriormente designado marcador Inv.

† O dímero presente nas secreções externas carrega o componente -S.

Tabela 45.4 Propriedades das imunoglobulinas humanas

	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
A. Fisiológicas					
Concentração sérica no adulto normal (mg/mL)	1,2–4,0	8,0–16,0	0,4–2,2	0,03	17–450 ng/mL
Unidades internacionais/mL	69–322	92–207	54–268	–	<100
Porcentual de imunoglobulina total	13	80	6	1	0,002
Distribuição intravascular (%)	41	48	76	75	51
Taxa sintética (mg/kg/dia)	2,2	35	24	0,4	0,003
Taxa catabólica no soro (% ao dia ou meia-vida em dias)	10,6 (5–6)	6 (18–23)	24 (5–6,5)	37 (2,8)	90
B. Biológicas					
Capacidade de aglutinação	+4	±	+2	–	–
Capacidade de fixação do complemento pela via clássica	+4	+	–	–	–
Hipersensibilidade anafilática homóloga	–	–	–	–	+4
Anafilaxia heteróloga em cobaia	–	+	–	–	–
Fixação a mastócitos e basófilos homólogos	–	±	–	–	+4
Ligação citofílica a macrófagos	–	+	±	–	–
Transporte placentário para o feto	–	+	–	–	–
Atividade de ligação ao fator reumatoide	–	+	–	–	–
Presente em secreções externas	±	+	+4	–	+2

Outras propriedades características:

IgM – Produzida no início da resposta imune; primeira defesa efetiva contra a bacteremia

IgG – Combate microrganismos e suas toxinas nos líquidos extravasculares

IgA – Defende as superfícies corporais externas

IgD – Presente na superfície de linfócitos, em células imunocompetentes; é importante para a ativação e/ou imunorregulação das células B

quando estas são combinadas às cadeias μ para formar moléculas de IgM monoméricas. O componente constituído por duas cadeias μ e as duas cadeias leves é inserido na membrana plasmática, na qual atua como receptor para antígenos. Nessa etapa, as células já se tornaram linfócitos B e são capazes de responder ao antígeno.

Talvez por causa do seu tamanho grande, a IgM pentamérica secretada não é encontrada em concentrações significativas em nenhum espaço tecidual. Essa molécula fica confinada à circulação sanguínea e não atravessa a placenta. A IgM constitui o componente minoritário das Igs secretórias presentes nas superfícies mucosas e no leite materno.

A IgM é filogeneticamente a mais primitiva das Igs, sendo que os genes mais variáveis da cadeia μ parecem ter evoluído e se transformado em genes codificadores de cadeia pesada para outras classes de Igs. As Tabelas 45.3 e 45.4 mostram outras propriedades físicas e biológicas da IgM, bem como de outras classes de Igs.

Imunoglobulina G

A IgG é o isótipo de Ig mais estudado tanto no nível estrutural como no nível funcional (Burton, 1985). Os anticorpos dessa classe constituem as principais Igs existentes no sangue. São copiosamente produzidos durante as respostas imunes *secundárias*. A região Fc das moléculas de IgG liga-se a receptores específicos localizados nas células fagocíticas, como macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, aumentando assim a eficiência com que tais células ingerem e destroem os microrganismos infecciosos que foram recobertos com anticorpos IgG em resposta à infecção. Esses receptores nos anticorpos ligados às células-alvo guiam os linfócitos *natural killer* (NK) para destruírem tais células, em um processo conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CCDA). A função da IgG mais bem conhecida é a ativação da cascata do complemento pela via clássica. A região Fc da IgG pode se ligar e ativar o primeiro componente do sistema complemento, que desencadeia um ataque bioquímico para destruir os microrganismos. Ao menos duas moléculas de IgG são necessárias para ativar o complemento, em comparação à molécula única de IgM com suas cinco regiões Fc.

As moléculas de IgG são os únicos anticorpos transmitidos da mãe para o feto. As células da placenta que entram em contato com o sangue materno possuem receptores para região Fc das moléculas de IgG e mediam a passagem desse anticorpo para o feto. Os anticorpos são primeiramente ingeridos em um processo endocítico mediado por receptor e, em seguida, transportados ao longo da célula e liberados por exocitose no sangue fetal. Outras classes de anticorpos não se ligam a esses receptores e, assim, não conseguem atravessar a placenta. A habilidade da IgG de transpor a barreira placentária proporciona a primeira linha de defesa contra a infecção durante as primeiras semanas de vida do bebê. Normalmente, o feto humano começa a receber quantidades significativas de IgG materna por via transplacentária em torno da 12ª semana de gestação. A quantidade de IgG transferida para o feto aumenta de maneira gradual, até que, ao nascimento, o cordão umbilical contém uma concentração de IgG comparável à concentração desse anticorpo no soro materno. Exceto na presença de qualquer tipo de distúrbio imunológico, os níveis de IgG de um indivíduo adulto são alcançados ao redor do 7º ano de vida e permanecem relativamente constantes a partir de então.

Os anticorpos IgG apresentam um alto coeficiente de difusão, que possibilita uma difusão mais imediata dessas moléculas para o interior dos espaços corporais extravasculares, em comparação à difusão das demais classes de Ig. Nesses espaços, a IgG é a Ig predominante e tem como função neutralizar as toxinas bacterianas, além de se ligar aos microrganismos para intensificar sua fagocitose. Além disso, somente a IgG é capaz de recobrir as células-alvo (p. ex., células tumorais) e sensibilizá-las para a destruição via CCDA. As células NK que executam a CCDA também possuem receptores para Fc de IgG.

Existem quatro subclasses de IgG humana (1–4). Elas refletem a existência de quatro cadeias H antigenicamente distintas (γ1–γ4) que, embora semelhantes, diferem em termos de sequência de aminoácidos e propriedades gerais. Por exemplo, a IgG1 é a subclasse dominante em indivíduos adultos. A IgG3 é a molécula de ligação ao complemento mais efetiva, seguida da IgG1 e da IgG2. A IgG4 na maioria das vezes falha completamente em se ligar ao complemento pela via clássica. Todas as subclasses de IgG, exceto a IgG2, são comprovadamente capazes de atravessar a placenta. Um resumo das propriedades físicas e biológicas da IgG é fornecido nas Tabelas 45.3 e 45.4, enquanto a Tabela 45.5 lista as propriedades das subclasses.

Tabela 45.5 Propriedades dos subgrupos de imunoglobulina G humana

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
A. Fisiológicas				
Porcentual de distribuição da IgG sérica normal total	66 ± 8	23 ± 8	7,3 ± 3,8	4,2 ± 2,6
Taxa sintética no soro (mg/kg/dia)	25	?	3,4	?
Fração da taxa catabólica (% ao dia) (meia-vida em dias)	8 (23)	6,9 (23)	16,8 (7)	6,9 (23)
Proporção κ/λ	1,4–2,4	1,0–1,1	1,1–1,3	5,0–7,0
Marcadores alotípicos (tipos Gm)	a, z, f, x	n	bo, bi, bz g, st, etc.	?
B. Biológicas				
Capacidade de fixação do complemento pela via clássica	+2	±	+3	–
Capacidade de ligação à pele heteróloga	+	–	+	+
Transporte placentário para o feto	+	±	+	+
Receptor de macrófago	+	–	+	–
Reação com proteína A	+	+	–	+
Atividades de anticorpo dominante:				
Antitoxoide tetânico	+2	+	+	±
Antitoxoide diftérico	+2	+	+	±
Antitireoglobulina	+2	+	+	±
Anti-DNA	+2	+2	±	±
Anti-Rh	+2	–	–	±
Anti-fator VIII	–	–	–	+
Antidextrana	–	+	–	–
Antilevano	–	+	–	–
Antiácido teicoico	–	+	–	–
Número de pontes dissulfeto intercadeias pesadas na região da dobradiça	2	4	5	2
Posição das pontes dissulfeto de cadeias leve-pesada na cadeia pesada	N214	N131	N131	N131

Imunoglobulina A

Os anticorpos dessa classe constituem a principal classe de anticorpos presentes nas secreções (leite, saliva, lágrimas e secreções dos tratos respiratório e intestinal). São encontrados sob a forma de monômero com quatro cadeias (como a IgG) ou como dímeros compostos por duas dessas unidades monoméricas. As moléculas de IgA presentes nas secreções são diméricas e estão associadas a uma única cadeia J, que é semelhante à cadeia associada à IgM pentamérica, e também a uma cadeia glicopeptídica chamada *componente secretor* (CS), de 70 kDa. Os dímeros de IgA captam o CS na superfície das células epiteliais que revestem o intestino, os brônquios ou os ductos lactíferos, salivares ou lacrimais. O CS é sintetizado pelas células epiteliais e inicialmente exposto na superfície não luminal (externa) dessas células, em que atua como receptor para ligação da IgA dimérica. Os complexos IgA dimérica-receptor resultantes são ingeridos por endocitose mediada pelo receptor e transferidos ao longo do citoplasma da célula epitelial no interior de uma vesícula membranosa. Esta se funde à membrana plasmática na lateral luminal da célula epitelial. A porção extramembrana do receptor de IgA, então, é enzimaticamente clivada e liberada no lúmen, como parte da molécula de IgA secretora ($[\alpha_2,L_2]_2$-Jα). A região aminoterminal do receptor do dímero de IgA que permanece fixa ao dímero de IgA constitui o CS (Fig. 45.4). Portanto, a molécula dimérica de IgA secretora integralmente montada constitui o produto sintético de dois tipos celulares distintos – plasmócitos e células epiteliais. Além desse papel de transporte, o CS também protege as moléculas diméricas de IgA contra a digestão por enzimas proteolíticas presentes nas secreções.

Nos seres humanos, é possível classificar os anticorpos IgA em duas subclasses – IgA1 e IgA2 –, com base nas diferenças de estrutura antigênica e variação do arranjo das pontes dissulfeto intercadeias. Enquanto a IgA2 é um componente minoritário da IgA sérica, essa subclasse é a forma dominante nas secreções. Além disso, os níveis de IgA secretora atingem os níveis observados em indivíduos adultos antes da IgA sérica. O sistema da IgA no trato intestinal humano, por exemplo, pode estar totalmente desenvolvido aos 2 anos de idade, enquanto os níveis de IgA sérica normalmente atingem os níveis observados em adultos somente após os 12 anos.

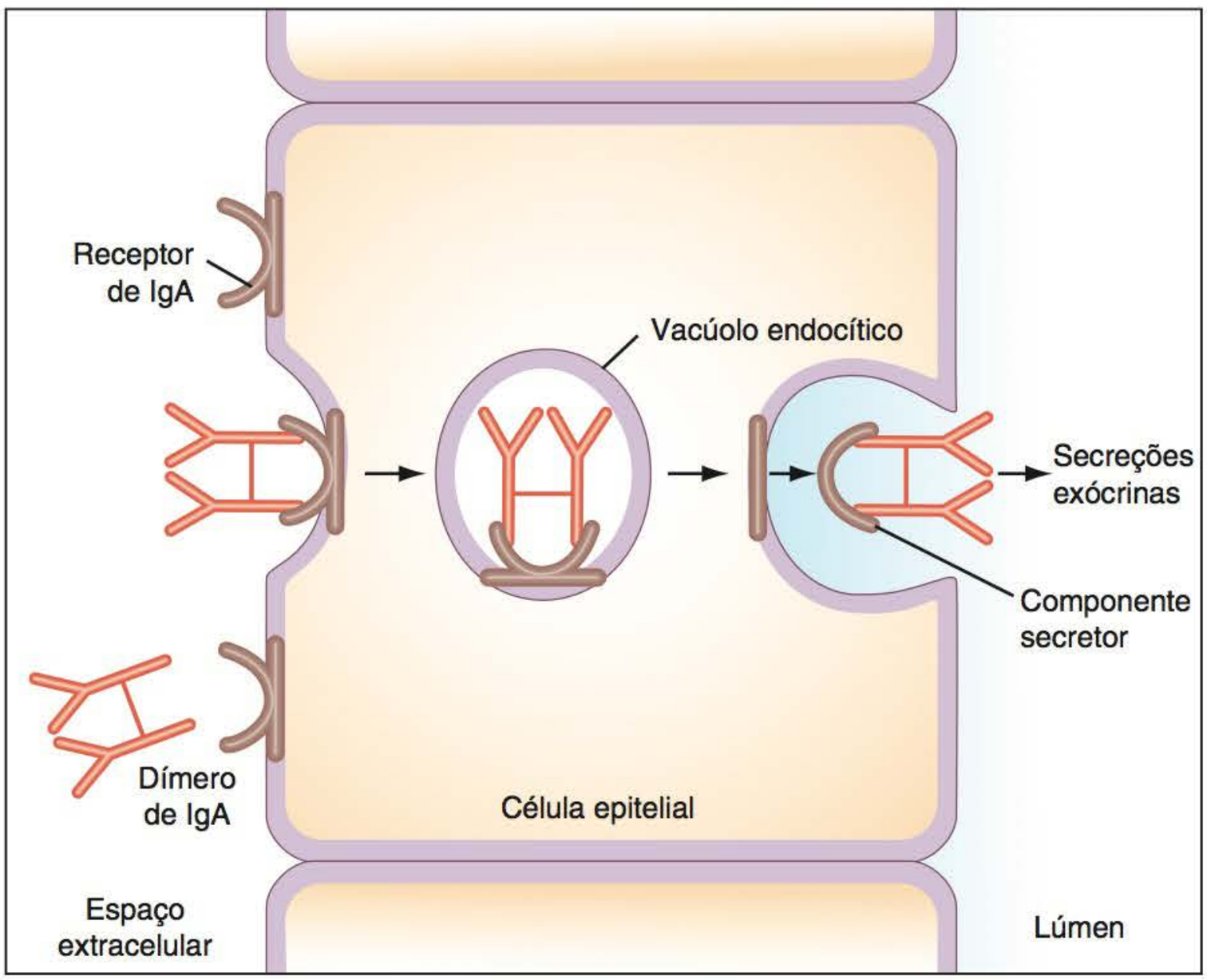


Figura 45.4 Mecanismo pelo qual o componente secretor medeia o transporte de uma molécula de IgA dimérica através da célula epitelial. O complexo inteiro é transportado a partir do líquido extracelular para dentro do lúmen do tubo epitelial. O componente secretor é sintetizado pela célula epitelial sob a forma de glicoproteína transmembrana, e atua na superfície basolateral da célula como receptor para ligação do dímero de IgA. O complexo receptor-IgA, contido em uma vesícula endocítica, entra na célula e a atravessa. A vesícula é exocitada na superfície apical. A clivagem do receptor solta o dímero de IgA e este é liberado na superfície externa (lateral do lúmen). A porção do receptor que continua presa ao dímero de IgA é chamada componente secretor. Esse mecanismo de transporte é responsável pela deposição da IgA nas diversas secreções exócrinas (p. ex., saliva, leite, bile, lágrimas e suor), bem como na camada mucosa que protege o revestimento interno das vias nasofaríngeas, intestinais e do trato geniturinário.

Por ser encontrada próximo às membranas externas, a IgA secretora constitui a primeira linha de defesa contra microrganismos existentes no meio ambiente externo. Foi postulado que a IgA inibe a aderência de microrganismos à superfície das células das mucosas, prevenindo sua entrada nos tecidos corporais. Nesse sentido, uma importante propriedade da IgA secretora é sua multivalência, que está associada à intensa avidez da ligação aos antígenos. Essa propriedade pode ser especialmente relevante na neutralização dos vírus. A atividade antiviral dos anticorpos IgA foi demonstrada em indivíduos que receberam vacinas contra a poliomielite. A IgA secretora também pode se combinar a certos antígenos alimentares, impedindo a sua absorção pela corrente sanguínea e, assim, reduzindo a incidência de reações alérgicas. Exemplificando, as imunodeficiências de IgA podem conduzir a um aumento dos níveis e da incidência de anticorpos humorais dirigidos contra antígenos derivados de alimentos e organismos intestinais.

A IgA possui as seguintes propriedades efetivas: capacidade de fixar o complemento através da via alternativa; atuar como opsonina para fagocitose ao se ligar a receptores de Fc específicos em macrófagos; e capacidade de induzir a degranulação de eosinófilos mediada por receptores específicos, que têm implicado a IgA nas respostas antiparasitárias. As Tabelas 45.3 e 45.4 listam as propriedades físicas e biológicas da IgA.

Imunoglobulina D

Embora seja um componente minoritário do soro, a IgD é uma das principais Igs de membrana encontradas na superfície de uma alta proporção de linfócitos B, especialmente em recém-nascidos. No curso de sua diferenciação, as células B sintetizam e expressam moléculas de IgD, bem como moléculas de IgM. Apesar de essa expressão aparentemente ser oposta à regra "uma célula e uma Ig", os sítios de ligação antigênica (idiotipo) e as cadeias leves desses dois tipos de moléculas são idênticos. A única diferença está nas regiões C_H. A IgD ligada à membrana pode atuar como um dos receptores por meio dos quais a célula B se liga aos antígenos e é estimulada a proliferar clonalmente. Existem evidências sugerindo que as células B portadoras de IgM podem responder a certos antígenos T-independentes e que a aquisição de IgD é necessária para as células B (portadoras de IgM e IgD) responderem às células T, cuja ajuda é essencial à responsividade aos antígenos T-dependentes.

Além disso, se as moléculas de IgD forem seletivamente removidas das células B portadoras de IgM e de IgD – aproveitando a vantagem da maior sensibilidade da cadeia δ à ação da papaína –, tais células se tornam suscetíveis ao desenvolvimento de tolerância. O papel exato da IgD de superfície em uma resposta imune permanece desconhecido, contudo, em geral persiste um ponto de vista de que essa molécula liga, desliga ou modula (controla) os processos de divisão e diferenciação da célula B.

A IgD usualmente é detectada no soro aos 6 meses de idade, e sua concentração se mantém sempre muito baixa por toda a vida do indivíduo. Nos estados patológicos, todavia, a concentração de IgD pode variar consideravelmente. Nas infecções crônicas, os níveis séricos de IgD aumentam, assim como os níveis das demais Igs. Até o momento, não foi estabelecida nenhuma associação entre o aumento específico de IgD e uma doença em particular. Pacientes alérgicos e aqueles com doença autoimune não apresentam concentração anormal de IgD. Esse anticorpo usualmente está ausente em indivíduos com hipogamaglobulinemia.

Até o presente, ainda não foi atribuído nenhum papel biológico específico à IgD como anticorpo humoral. Sua atividade contra numerosos antígenos foi demonstrada ocasionalmente. A IgD de superfície, que possui proteínas semelhantes àquelas da IgM de superfície, é um marcador de células B maduras, e seu papel como receptor em geral é reconhecido, embora a natureza e a finalidade do sinal que transmite permaneçam controversos (Carsetti, 1993; Roes, 1993). A IgD não liga complemento, não cruza a placenta e não se liga às células via região Fc. Sua forma secretada, assim como a forma secretora das demais Igs, não possui o peptídeo transmembrana carboxiterminal responsável pela ancoragem na superfície da célula B. As Tabelas 45.3 e 45.4 listam propriedades extras da IgD.

Imunoglobulina E

Das várias classes de Igs, a IgE é a que está presente em menor concentração no soro (Tab. 45.4). Essa Ig tem a capacidade de se fixar à pele humana (anticorpo homocitotrófico) e iniciar aspectos da reação alérgica (anticorpo reagínico). A atividade biológica da IgE é atribuída a sua propriedade de ligar-se via região Fc aos basófilos e a seus equivalentes teciduais, os mastócitos. A IgE também pode ser importante para a resposta imune humoral na doença parasitária, pois frequentemente é encontrada em níveis elevados no soro de pacientes com infecção helmíntica. A IgE pode atuar propiciando a entrada de células brancas sanguíneas (CBS), anticorpos e componentes do complemento nos sítios de inflamação, levando a uma reação de hipersensibilidade imediata. Os anticorpos IgE exemplificam notavelmente a natureza *bifuncional* das moléculas de anticorpo. A porção Fc da molécula se liga às células-alvo, enquanto a porção Fab se liga aos alérgenos (ver no Cap. 54 a descrição do papel da IgE nas doenças alérgicas e ensaios correlatos).

Assim como a IgA, a IgE é produzida principalmente nos revestimentos dos tratos respiratório e intestinal, sendo parte integrante do sistema secretor de anticorpos externo. Uma deficiência de IgE foi associada de maneira inconsistente à deficiência de IgA em indivíduos com comprometimento imunológico que apresentavam uma indevida suscetibilidade a infecções. A IgE não atravessa a placenta e os complexos IgE-antígeno não fixam complemento pela via clássica (Tab. 45.4).

Resumo

Nos seres humanos, existem cinco classes diferentes de anticorpos (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE), quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e duas subclasses de IgA (IgA1 e IgA2). Cada um desses isótipos de anticorpo possui uma cadeia H distinta (μ, γ, α, δ, ε, γ_1, γ_2, γ_3, γ_4; e α_1, α_2, respectivamente). As cadeias H contêm a região Fc do anticorpo, que determina quais proteínas se ligarão ao anticorpo e, portanto, quais são as propriedades biológicas da classe e da subclasse. Qualquer tipo de cadeia L (κ ou λ) pode ser associado a qualquer classe de cadeia H.

As diferenças estruturais existentes entre as cinco classes de Igs correspondem às diferenças funcionais existentes entre seus sítios de produção e ação, níveis relativos de produção nas respostas imunes primária e secundária, e papéis que exercem como efetores fisiológicos. Por exemplo, a IgG é prevalente tanto no sangue como nos líquidos teciduais, enquanto a IgM permanece confinada principalmente no sangue, e a IgA secretora é encontrada sobretudo nas superfícies epiteliais. A IgD e a IgE estão principalmente ligadas às células: a IgD se liga às células B, enquanto a IgE se liga aos basófilos e mastócitos.

Importância clínica das imunoglobulinas

As Igs exercem papéis importantes na patogênese, diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças.

Patogênese da doença

A hiperimunoglobulinemia monoclonal constitui um aspecto proeminente do mieloma múltiplo e da macroglobulinemia de Waldenström. Anticorpos que atacam antígenos nativos podem causar doenças autoimunes, como discutido nos Capítulos 50 e 52. A hipo- ou agamaglobulinemia muitas vezes é a principal característica de alguns distúrbios imunodeficitários (ver Cap. 49). A hipergamaglobulinemia policlonal pode resultar de uma inflamação crônica ou de outros distúrbios, como cirrose hepática decorrente do excesso de estimulação de células pan-B.

Hiperimunoglobulinemia

Níveis séricos de imunoglobulina

Uma interpretação válida dos níveis séricos de Igs requer o reconhecimento das variações biológicas existentes no decorrer da vida de um indivíduo. De todas essas variáveis, as mais importantes são idade, sexo e raça. Em recém-nascidos, os níveis de Igs circulantes são bem mais baixos do que aqueles observados em outras idades, uma vez que essencialmente todas as Igs detectadas nessa fase da vida foram transferidas de forma passiva da mãe para o feto ainda no útero. Os níveis de Igs aumentam durante a infância e atingem concentrações mais estáveis no indivíduo adulto maduro. A faixa normal das concentrações de IgG, IgA e IgM em qualquer idade pode apresentar uma

variação de até 10 vezes entre os limites mínimo e máximo dos intervalos de referência. Um estudo bastante amplo das concentrações de Ig em uma população do norte da Nova Inglaterra (99% caucasianos), em que 115.017 amostras de soro foram analisadas, demonstrou a esperada elevação dos níveis de IgA desde a infância, seguida da estabilização um pouco maior após a adolescência e de um novo aumento mais discreto em indivíduos mais velhos, bem como os níveis praticamente estáveis de IgG e uma leve redução dos níveis de IgM (Ritchie, 1998). Homens e mulheres diferiram pouco quanto aos níveis médios de IgA e IgG, embora os homens tenham exibido níveis de IgM menores em todas as faixas etárias, exceto aqueles bastante jovens. Esse estudo poderia ser considerado definitivo no que se refere à idade e ao sexo em termos de número absoluto de indivíduos, embora a população não apresentasse diversidade racial.

Um grupo menor (contudo ainda razoavelmente grande) de indivíduos sadios e brancos (n = 3.213) oriundos de uma única comunidade (Tecumseh, MI) demonstrou que as concentrações médias de IgG e IgA aumentaram com a idade e diferiram de maneira discreta, porém significativa, entre os sexos. As mulheres apresentaram níveis séricos mais altos de IgG e níveis mais baixos de IgA. Embora as diferenças associadas ao sexo em termos de IgG e IgA tenham sido estatisticamente significativas, seu significado biológico não era aparente. Nesses indivíduos, os níveis de IgM permaneceram relativamente constantes nas diferentes faixas etárias. Todavia, as mulheres apresentaram níveis médios de IgM mais altos (1,06 mg/mL) do que os homens (0,77 mg/mL) (Cassidy, 1974).

Vários estudos relataram que os níveis de Igs são mais altos em indivíduos com pele pigmentada. Um estudo conduzido em uma população sadia birracial em Evans County, no estado americano da Georgia, demonstrou que os negros apresentavam níveis mais altos de três Igs principais (IgM, IgG e IgA), em comparação aos brancos (Lichtman, 1967). A diferença mais proeminente foi constatada nos níveis de IgG. Nesse estudo, não foram observadas diferenças urbano-rurais associadas aos níveis de Igs. Em Rochester, Nova York, indivíduos brancos apresentaram níveis séricos de IgM e IgG similares àqueles detectados nos habitantes da zona rural da Georgia, também brancos. Um estudo trirracial realizado em Durban, Natal, África do Sul, constatou que homens adultos bantu apresentaram níveis séricos significativamente mais altos de IgM (32% a mais), IgG (40% a mais) e IgA (32% a mais) quando comparados aos homens adultos brancos que viviam na mesma comunidade, tinham a mesma idade e o mesmo grupo sanguíneo ABO. Indivíduos adultos asiáticos saudáveis, do sexo masculino, apresentaram cerca de 20% mais IgG, 23% mais IgA e 7% mais IgM do que indivíduos adultos brancos compatíveis. Outro estudo realizado na área metropolitana de Washington, DC, revelou que a população negra apresenta níveis significativamente mais altos de IgG do que a população branca, porém, negros e brancos apresentam níveis similares de IgA e IgM (Tollerud, 1995). Os grupos controle utilizados nesses estudos foram pareados de acordo com a idade, sexo e raça, bem como em relação a diversos fatores ambientais. Elevações dos níveis de γ-globulinas com frequência foram notadas primeiramente após a realização de eletroforese de proteínas séricas, quantificação de proteínas totais ou determinação das frações de albumina e γ-globulinas.

Os aumentos de Igs são referidos como mono ou policlonais. As Igs monoclonais provenientes de qualquer indivíduo são estruturalmente idênticas e acredita-se que resultem da expansão clonal de uma única célula linfoide produtora de Igs. Portanto, essas Igs monoclonais são todas específicas para um antígeno em particular. As Igs policlonais de um mesmo indivíduo são estruturalmente distintas entre si no que se refere a um ou mais aspectos importantes – classe (como IgG, IgA ou IgM policlonais), cadeia leve ou especificidade antigênica. As Igs policlonais surgem a partir da expansão de várias ou muitas células linfoides diferentes, todas produtoras de Igs.

Imunoglobulinas policlonais

Os aumentos policlonais de Igs foram associados a diversos estados patológicos (Tab. 45.6) (Cushman, 1973; Buckley, 1977). A eletroforese de proteínas séricas muitas vezes é suficiente para estabelecer essa condição. A realização de imunoeletroforese, imunofixação e determinação de Igs individuais ou de cadeias leves de Igs pode ser útil para fins de confirmação de uma distribuição policlonal ou da concentração aumentada de uma ou mais classes de Igs. Elevações dos níveis séricos de Igs podem resultar da diminuição do catabolismo ou do aumento da síntese. Os mecanismos de controle desses eventos ainda são pouco compreendidos. As implicações dos níveis elevados de Igs são desconhecidas. A maior parte dessas proteínas aparentemente não é dirigida contra um único determinante antigênico definível e específico nem contra um conjunto de determinantes antigênicos específicos. Também é preciso notar que a maioria dos autoanticorpos é policlonal e não monoclonal. Em geral, considera-se que as elevações policlonais persistentes dos níveis de γ-globulinas estão relacionadas à estimulação antigênica de natureza crônica ou a uma perda da regulação da Ig.

Imunoglobulinas monoclonais

As Igs monoclonais ou fragmentos de Igs foram associados a diversas condições patológicas (Tab. 45.7) (Wells, 1974; Benbassat, 1976; Atkinson, 1977; Schaefer, 1978; Kelly, 1985). Essas Igs também são referidas como Igs de heterogeneidade restrita.

Tabela 45.6 Hiperimunoglobulinemias policlonais: alguns estados patológicos associados

Condição	Classes de imunoglobulina
Imunodeficiências	
Hiperimunoglobulina E e infecções recorrentes	IgE
Síndrome de Wiskott-Aldrich	IgA, IgE
"Disgamaglobulinemia de tipo I"	IgM
Hiperimunoglobulina A e infecções recorrentes	IgA
Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)	Todas as classes
Infecções	
Infecções congênitas (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus)	IgM
Mononucleose infecciosa	IgM ou todas
Tripanossomíase	IgM ou todas
Parasitismo intestinal	Todas as classes
Diversas infecções helmínticas	IgE
Larva migrans visceral	Todas as classes
Doença granulomatosa crônica da infância	Todas as classes
Lepra	Todas as classes
Infecções crônicas em geral	Todas as classes, com preferência pela IgG
Doenças hepáticas	
Hepatite crônica ativa	Predominância de IgG
Hepatite aguda	Predominância de IgG
Cirrose biliar	Predominância de IgM
Hepatite lupoide	Todas as classes
Distúrbios pulmonares	
Síndrome da hipersensibilidade pulmonar	Todas as classes
Sarcoidose	Todas as classes
Beriliose	Todas as classes
Doenças "autoimunes"	
Lúpus eritematoso sistêmico	Todas as classes
Artrite reumatoide	IgA ou todas
Numerosos estados "autoimunes", como tireoidite	Todas as classes
Escleroderma	Todas as classes
Doença da aglutinina fria	IgM
Púrpura anafilactoide	IgA
Diversos	
Síndrome de Down	Todas as classes
Amiloidose	Todas as classes
Vício em narcóticos	IgM
Doença tubular renal	Todas as classes

Em estudos realizados em população não selecionada, estima-se que a incidência das Igs monoclonais (componentes M) seja de 0,9% (Bachman, 1965; Axelsson, 1968; Cohen, 1985). Obviamente, um porcentual bem mais alto de resultados positivos é encontrado em laboratórios clínicos, nos quais os soros a serem testados são previamente escolhidos. O mieloma múltiplo, a macroglobulinemia de Waldenström e os neoplasmas de células B são algumas das doenças associadas a níveis elevados de Igs monoclonais. Antigamente, acreditava-se que as gamopatias monoclonais eram de ocorrência rara em casos de leucemia linfocítica crônica ou linfoma linfocítico bem diferenciado. Atualmente, por meio da combinação de eletroforese de alta resolução e imunofixação, já foi demonstrado que a maioria das amostras obtidas desses pacientes apresenta gamopatia monoclonal (Keren, 1988). As gamopatias monoclonais também foram demonstradas em pacientes com linfoma de Burkitt e leucemia linfocítica aguda de células B.

Embora as especificidades de combinação antigênica das gamopatias monoclonais em geral sejam desconhecidas, sabe-se que algumas resultam em neuropatias paraproteinêmicas. Essa síndrome clínica geralmente resulta da interação de uma paraproteína IgM com uma glicoproteína associada à mielina (MAG, *myelin-associated glycoprotein*), gangliosídeos (p. ex., GM_1 na neuropatia motora; GD_{1b} na neuropatia sensorial) ou outros glicoesfingolipídeos (Ropper, 1998).

O termo "gamopatia monoclonal de importância indeterminada" (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*) foi eleito por Kyle para classificar os indivíduos nos quais era demonstrada a presença de um componente monoclonal no soro concomitantemente à falta de outros achados essenciais ao diagnóstico de uma condição maligna (Kyle, 1982). Até 3% dos indivíduos com mais de 70 anos idade apresenta MGUS (Kyle, 2003). Indivíduos com MGUS podem ter na medula óssea até 10% do total de plasmócitos. Esse porcentual é consideravelmente inferior aos níveis detectados na plasmacitose de medula óssea associada ao mieloma múltiplo. Cerca de 20% dos indivíduos com MGUS irão desenvolver um distúrbio linfoproliferativo de células B maligno, mais comumente um mieloma múltiplo, em um período de 10 anos. Alguns dos outros casos evoluem para leucemia linfocítica crônica, amiloidose, linfoma linfocítico bem diferenciado e outras doenças proliferativas de células B. Indivíduos com MGUS apresentam níveis de componente M que variam de 300 mg/dL a mais de 3.000 mg/dL e usualmente não eliminam a proteína de Bence Jones na urina. Recomenda-se que tais pacientes sejam monitorados com eletroforese de proteínas séricas a cada 6 a 12 meses, a fim de determinar se o processo está avançando ou regredindo.

O risco de progressão da MGUS é de aproximadamente 1% ao ano, mesmo após 25 anos de condição estável (Kyle, 2003). Um estudo de seguimento de MGUS realizado na Nova Zelândia, que durou 31 anos, mostrou a progressão para malignidade hematológica em 64% dos 11 pacientes originalmente detectados em uma triagem de 2.192 indivíduos conduzida em uma cidade do país, no ano de 1967 (Colls, 1999).

Um aspecto especial a ser considerado são os casos de MGUS observados em pacientes submetidos ao transplante de órgãos e tratados com fármacos imunossupressores, que alteram funções dos linfócitos T, como a modulação da responsividade da célula B. Essas gamopatias monoclonais são temporárias em até 75% dos casos (Radl, 1985). Podem ocorrer como formas mono ou oligoclonais (Stanko, 1989), bem como coincidir com infecções por citomegalovírus ou vírus Epstein-Barr (Drouet, 1999). A progressão da condição provavelmente é estimulada por níveis circulantes elevados de interleucina-6 (Nickerson, 1994).

Crioglobulinas

As Igs que precipitam sob condições de armazenamento refrigerado (4°C) são denominadas crioglobulinas. As crioglobulinas de tipo I consistem de uma Ig monoclonal única que precipita no frio sem se ligar a outras proteínas. Esse tipo de molécula é tipicamente uma IgM encontrada na macroglobulinemia de Waldenström e produz uma síndrome de hiperviscosidade decorrente da consistência espessa do sangue circulante, a qual pode ser exacerbada pela temperatura de um ambiente frio onde o paciente eventualmente possa estar.

As crioglobulinas de tipo II são nitidamente diferentes das crioglobulinas de tipo I. No tipo II, a anomalia é um autoanticorpo monoclonal da classe IgM que ataca a região Fc da IgG policlonal normal (Cacoub, 2002). Esse autoanticorpo equivale ao fator reumatoide, sendo ainda referido como crioglobulina mista que contém IgM e IgG. Por motivos desconhecidos, é comumente encontrado na artrite reumatoide e também na hepatite C crônica viral. A presença de IgM anti-IgG leva à formação de imunocomplexos circulantes (ICCs) com a IgG normalmente presente no sangue. Os ICCs, então, se depositam em pequenos vasos sanguíneos causando vasculite, glomerulonefrite, artrite etc.

As crioglobulinas de tipo III foram descritas como uma variante do tipo II, em que o autoanticorpo IgM dirigido contra a IgG é policlonal. O tipo III pode ser encontrado em infecções crônicas e estados inflamatórios. No passado, grande parte desses casos pode ter sido confundida com o tipo II, pois eram adotadas metodologias que não permitiam a realização de uma tipagem sensível das cadeias leves em uma banda minoritária de IgM na presença de quantidades significativas de IgG, dada a possibilidade de ambos os tipos de cadeia leve aparecerem no crioprecipitado.

Tabela 45.7 Condições selecionadas associadas a imunoglobulinas monoclonais

Mieloma múltiplo
Macroglobulinemia de Waldenström
Leucemia linfocítica crônica
Outras leucemias
Linfomas
Gamopatia monoclonal "benigna"
Síndrome do vazamento capilar sistêmico
Amiloidose
Doença hepática crônica, como hepatite crônica e cirrose biliar primária
Doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, síndrome de Sjögren
Doença de Gaucher
Malignidades diversas
Esferocitose hereditária
Infecção por HIV, incluindo a AIDS

Diagnóstico da doença

A avaliação laboratorial dos níveis e funções das Igs pode ser útil ao diagnóstico e à supervisão das doenças. O uso de testes de fixação de complemento, ensaios de hemaglutinação e outras técnicas imunológicas permite detectar aumentos/alterações de título de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos, como aqueles presentes em microrganismos.

As solicitações de exame sorológico para detecção da presença de proteínas monoclonais usualmente são feitas por um médico, que reconhece no paciente os sintomas e sinais clínicos do distúrbio, ou em decorrência do resultado de um exame laboratorial de eletroforese de proteínas séricas sugestivo da presença de uma proteína monoclonal. Com frequência, o médico passa a suspeitar de uma discrasia de plasmócitos ao se deparar com achados de anemia (que envolvem uma ou mais citopenias), níveis elevados de proteínas séricas totais (com elevação da globulinas) e proteinúria. Outros achados incluem hiperuricemia, hipercalcemia, fosfatase alcalina elevada, dor óssea ou lesões ósseas líticas ao exame de raio X. Se de fato um componente M for detectado na eletroforese de proteínas séricas, a quantificação de Igs por imunodifusão radial, nefelometria ou outra técnica conveniente é capaz de identificar a Ig específica envolvida, caso tenha havido aumento dos níveis de apenas uma das três classes principais de Ig. Obviamente, esse achado não determina a cadeia leve de uma Ig monoclonal nem detecta mielomas de cadeia leve. As gamopatias biclonais podem causar confusão.

A quantificação de Igs é útil para o monitoramento do curso e tratamento da doença, podendo ter utilidade na distinção das condições benigna e maligna. Níveis de IgG monoclonal de 2 g/100 mL ou níveis de IgA ≥ 1 g/100 mL (Isobe, 1971) sugerem a existência de uma condição maligna. Em diversas imunocitopatias malignas, a concentração de Igs não monoclonais é reduzida. Assim, a deficiência de Igs policlonais é sugestiva de malignidade. Paradoxalmente, o paciente com imunocitopatia maligna é imunodeficiente, mesmo que possua

quantidade significativa de uma Ig "sem sentido" produzida por um clone de células linfoides precariamente controlado.

Imunoeletroforese

A imunoeletroforese (IE) e a imunofixação eletroforética (IFE) são técnicas úteis para a detecção de proteínas monoclonais específicas. Assim, a IE pode ser diagnóstica no caso de pacientes que apresentam sinais e sintomas suspeitos ou especialmente achados hematológicos no sangue periférico, na medula óssea ou nos linfonodos. Se a eletroforese de proteínas séricas precede ou não a IE ou a IFE é uma questão que depende da relativa disponibilidade dessas técnicas, bem como do grau de sofisticação de cada uma no laboratório. Por exemplo, a eletroforese de proteínas séricas em gel de agarose detecta a maioria dos componentes M. Contudo, a eletroforese em papel ou acetato de celulose não é tão sensível. Outra forma de selecionar soro para IE ou IFE consiste em revisar as determinações feitas por eletroforese de proteínas séricas.

Em uma abordagem alternativa sugerida por Keren et al. (1988), os valores séricos e a proporção κ/λ são determinados de forma conjunta por eletroforese de alta resolução. A imunofixação sérica é realizada quando a eletroforese indica a ausência de qualquer anormalidade, hipergamaglobulinemia policlonal ou hipogamaglobulinemia, e a proporção κ/λ está fora dos limites de referência. A imunofixação sérica também é recomendada nos casos em que essa proporção é "normal", porém, é encontrada uma banda incomum na eletroforese.

A IE é um procedimento sensível e relativamente simples, utilizado para detectar componentes M e componentes de suas cadeias pesada e leve. A IE possibilita a semiquantificação da concentração de Igs. O soro dos pacientes pode ser comparado ao soro "normal" ou a um grupo "normal". Exemplificando, a partir de uma amostra de 100 a 200 mL de sangue obtidos de indivíduos sadios, alíquotas de 1 mL são submetidas ao congelamento rápido com gelo seco e acetona, e armazenadas a –70°C. O soro controle não utilizado não é congelado novamente, sendo descartado após um período de retenção de 3 dias a 4 °C.

Os tipos de antissoro recomendados são: antissoro humano total; anti-IgG (cadeias γ); anti-IgM (μ); anti-IgA (α), anti-κ e anti-λ (Fig. 45.5). É importante ter em mente que nem todos os antissoros são parecidos em termos de força e especificidade, e é possível que o componente M não seja detectado com um dos antissoros, ainda que seja identificado com um segundo soro. Assim, cada lote de antissoro deve ser comparado quanto ao título utilizando técnicas como difusão em gel contra o soro controle, ou especificidade contra um soro humano total por meio de IE. A interpretação de um resultado de IE pode requerer um grau considerável de experiência, contudo, em geral consiste na busca de uma ruptura de uma linha normalmente suave – ou seja, de um encurvamento, espessamento ou alteração da mobilidade. A Figura 45.5 mostra exemplos de IE. Embora seja uma técnica útil, a IE também apresenta limitações. É capaz de identificar a presença das cadeias pesada e leve, mas não garante que a molécula de Ig identificada seja composta de fato por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves.

É igualmente possível (embora pouco comum) que as Igs estejam presentes em quantidades inferiores aos níveis de detecção do sistema utilizado. O menor nível de detecção pode ser estimado diluindo-se uma Ig monoclonal conhecida para, em seguida, testá-la por IE. Como as proteínas monoclonais de IgM, IgA, IgD e IgE podem estar presentes em quantidades relativamente pequenas, comparadas à concentração de IgG, a porção da cadeia leve da Ig não IgG talvez não seja detectada por IE. A incapacidade de detectar cadeias leves de Igs presentes em menor concentração diante de uma concentração maior de IgG é referida como "efeito guarda-chuva" (*umbrella effect*). Portanto, pode ser necessário adotar outros procedimentos para excluir a doença de Franklin ou a doença da cadeia pesada. É possível que as concentrações do soro testado e do anticorpo utilizado estejam inadequadas, de modo a impossibilitar a detecção do componente M. Por fim, é possível que o antissoro utilizado não detecte os determinantes disponíveis em um componente M em particular. Havendo um alto índice de suspeita, pode ser útil empregar um segundo antissoro proveniente de outra fonte.

Imunofixação

A IFE virtualmente substituiu a IE no laboratório clínico, graças à sua velocidade, sensibilidade e facilidade de interpretação. Ambos os procedimentos apresentam sensibilidade comparável. A IFE também proporciona a vantagem de uma leitura mais rápida, pois dispensa a difusão em gel. Amostras repetidas de soro de pacientes são submetidas à eletroforese em gel de alta resolução antes da aplicação do antissoro diretamente às proteínas séricas isoladas. O gel é lavado e os conjugados proteína-anticorpo são corados e lidos diretamente (Fig. 45.6). Uma tira é tratada com um reagente precipitante que fixa todas as proteínas em um mesmo padrão, como na eletroforese de proteínas séricas. A manutenção de todas as proteínas séricas em um registro com Igs imunofixadas facilita ainda mais a confirmação e identificação das paraproteínas monoclonais.

Ocasionalmente, a concentração de proteína monoclonal no soro de um paciente é tão alta que excede a capacidade dos anticorpos reativos de formar complexos precipitantes por IFE. Esse fenômeno corresponde à zona de excesso de antígenos ilustrada na Figura 45.2. O resultado é um halo de complexos precipitados (no qual as concentrações são mais próximas da equivalência) que contém uma zona central clara de excesso de antígenos (Fig. 45.6E). Embora esse resultado pareça atípico, é de simples interpretação e pode ser confirmado pela repetição da IFE empregando-se uma diluição maior do soro do paciente (Keren, 1999).

Qualquer técnica pode ser aplicada a outros líquidos corporais, mais comumente à urina. As cadeias leves de anticorpos monoclonais presentes na urina (proteína de Bence Jones) podem ser detectadas em mais da metade dos pacientes com mieloma múltiplo (Isobe, 1971; Wells, 1974). Cadeias leves policlonais podem ser detectadas em pacientes com outros distúrbios, geralmente como parte de moléculas de Ig completas. A detecção da proteína de Bence Jones por aquecimento é abordada no Capítulo 27. As técnicas de IE/IFE que utilizam amostras de urina são mais específicas e mais sensíveis do que o ensaio antigo para detecção dessa proteína. IE/IFE podem ser realizadas com amostras de urina que contenham concentração de proteína suficiente, ou subsequentemente à concentração das amostras por liofilização ou por membranas seletivas (Minicon, Amicon).

As Igs presentes em concentrações bastante altas podem aumentar de forma significativa a viscosidade do sangue e acarretar problemas de perfusão de órgãos. A viscosidade do soro foi determinada para avaliar esse efeito, contudo, esse tipo de determinação é pouco utilizado atualmente, uma vez que existem outros métodos para quantificação de Igs, como a nefelometria, que são amplamente empregados. Além disso, a viscosidade sérica por si só é um indicador fraco do grau de viscosidade do sangue total na presença dos elementos celulares, que de fato constitui o principal fator de importância clínica do paciente.

Teste da crioglobulina

O teste para crioglobulinas no soro começa com um período de incubação à baixa temperatura (4°C), para detecção de turvação ou precipitação após um período de 24 ou 72 horas. Essa amostra é comparada a uma alíquota do soro do paciente mantida a 37°C como controle, quanto à presença de substâncias precipitantes não relacionadas ao fenômeno observado a frio. Qualquer crioprecipitado formado é sedimentado por centrifugação, lavado brevemente com salina fria para remoção de outras proteínas séricas e, então, rediluído (e dissociado) em salina morna para análise por eletroforese e imunofixação com o objetivo de identificar componentes de Igs eventualmente presentes (i. e., cadeias pesada e leve).

As crioglobulinas de tipo I tipicamente formam um grande volume de crioprecipitado (p. ex., até 10% ou mesmo 20% do volume sérico – às vezes, referido como "criócrito"). Na IFE, as crioglobulinas exibem uma única cadeia pesada e um único tipo de cadeia leve, frequentemente uma IgM monoclonal. O soro total, usualmente sem tratamento de crioprecipitação, costuma apresentar uma quantidade significativa da mesma banda monoclonal. A concentração da banda deve diminuir após a realização de uma troca de plasma bem-sucedida.

As crioglobulinas de tipo II tipicamente mostram apenas uma pequena quantidade de crioprecipitado, que é inferior a 1% do volume sérico. Por esse motivo, a quantificação do porcentual de criócrito não é considerada válida, em termos analíticos, para a realização de determinações seriadas com finalidade de monitorar o progresso apresentado pelo paciente. A IFE revela a presença de uma banda de IgM monoclonal

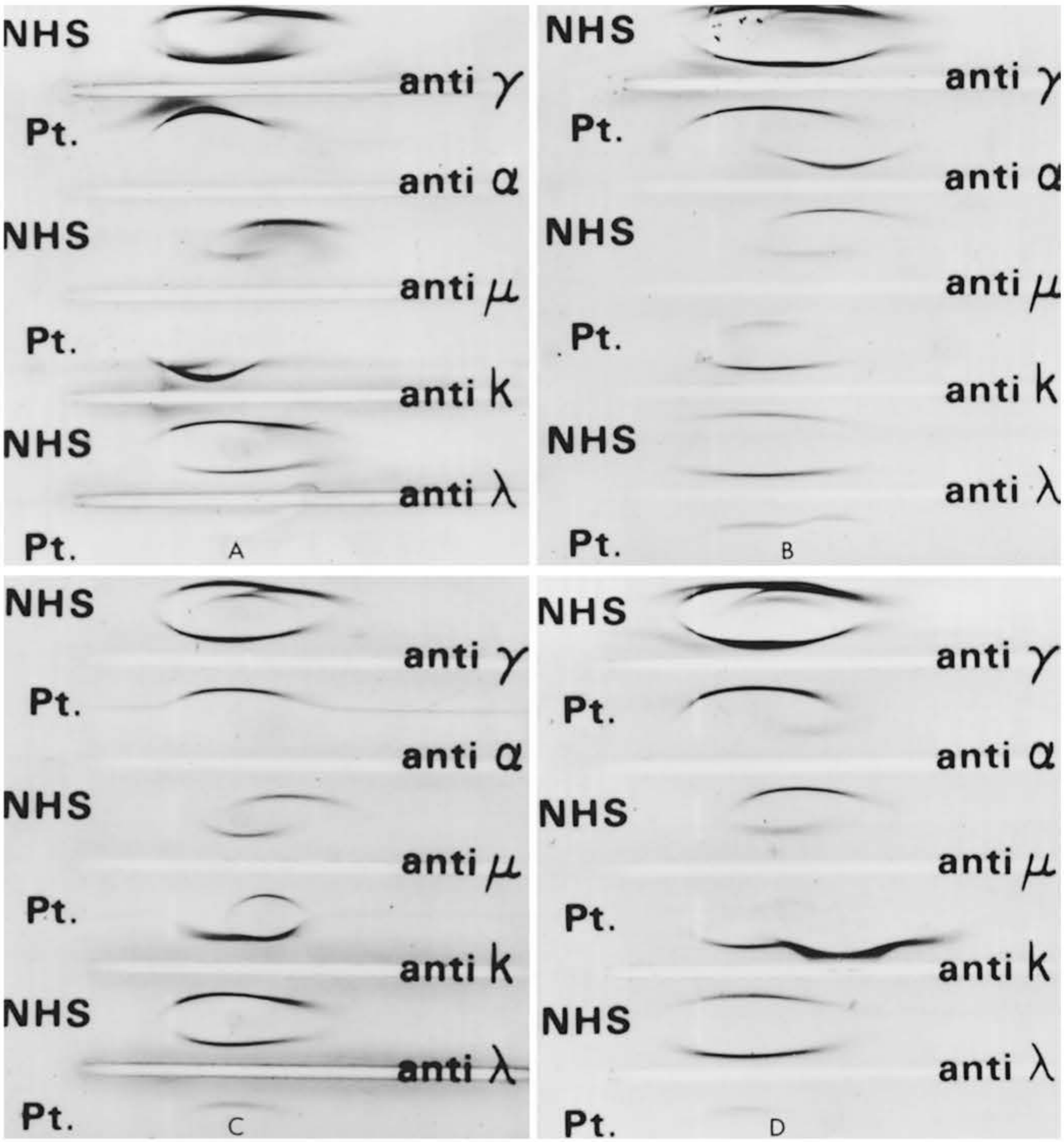


Figura 45.5 Imunoglobulinas monoclonais demonstradas por imunoeletroforese do soro. Alíquotas de soro de paciente e um grupo de soros humanos normais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,6 (Poly-E-Film, Pfizer). As proteínas separadas permaneceram reagindo de um dia a outro com o antissoro para (1) soro humano total; (2) uma combinação de IgG, IgA e IgM; cadeias (3) γ, (4) α; (5) μ; (6) κ, e (7) λ, respectivamente. As membranas foram lavadas e coradas com negro de amido B. *A*, componente M de IgGκ. *B*, componente M de IgAλ. *C*, componente M de IgMGκ. *D*, componente M da cadeia leve κ. *E*, componente M da cadeia pesada λ.

acrescida de uma outra banda de IgG (Fig. 45.6F). Esse padrão é observado com frequência por estar associado à hepatite C crônica.

Os achados de IFE para crioglobulinas de tipo III são semelhantes aos achados obtidos para crioglobulinas de tipo II, com uma quantidade relativamente pequena de crioprecipitado demonstrando a presença tanto de IgM como de IgG policlonal.

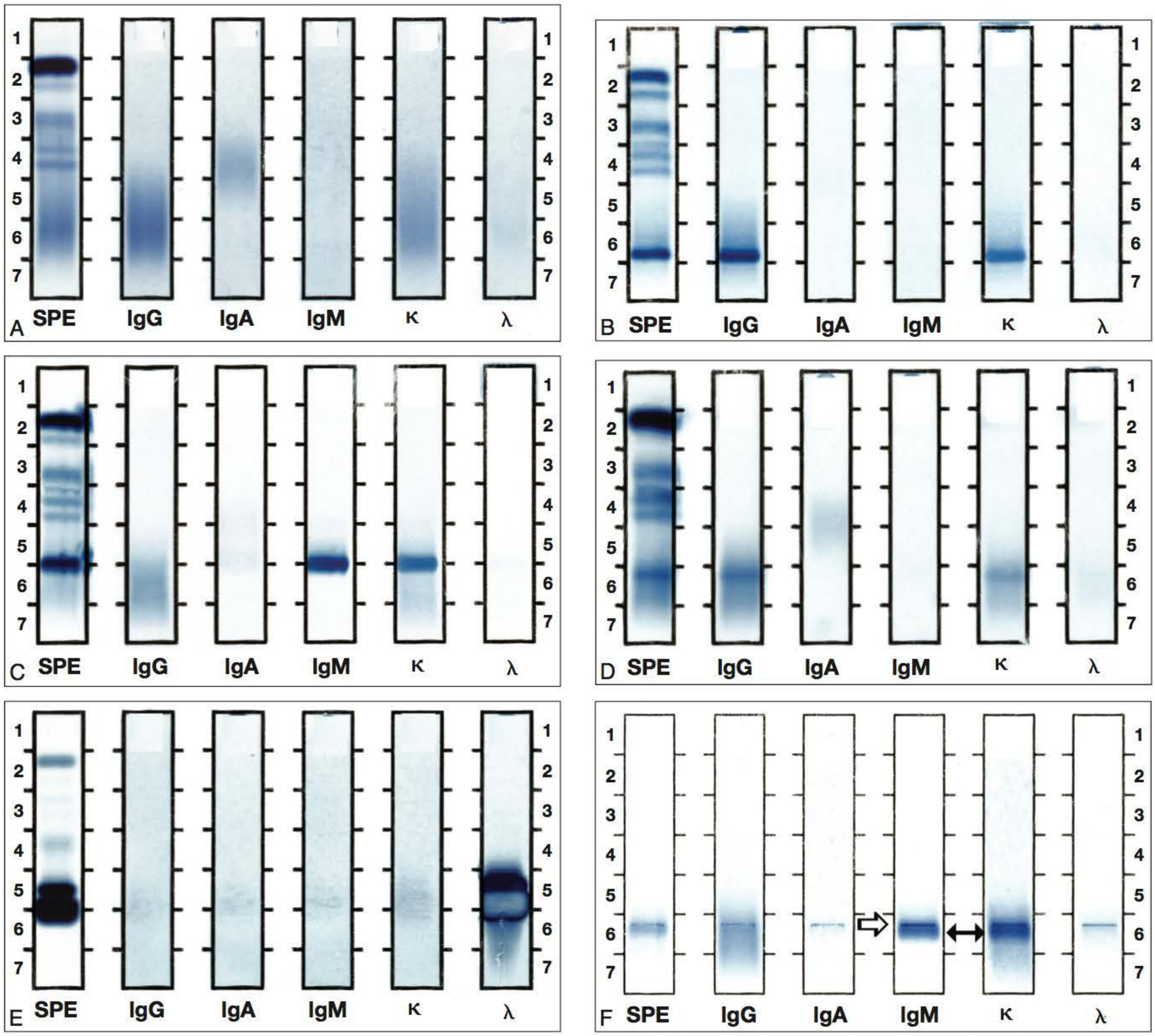


Figura 45.6 Imunoglobulinas monoclonais demonstradas por imunofixação do soro. Amostras em duplicata de soro de paciente foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a pH 8,6. As proteínas separadas reagiram com o antissoro monoespecífico, e os géis foram lavados, fixados e corados. *A*, padrão policlonal normal de imunoglobulinas. *B*, imunoglobulina monoclonal IgGκ (proteína M) no soro, com perda da maioria das imunoglobulinas policlonais normais. *C*, imunoglobulina monoclonal IgMκ no soro. *D*, banda menor de imunoglobulina IgGκ no soro, com aparecimento de imunoglobulinas normais, possivelmente MGUS. *E*, duas bandas de cadeias leves λ na urina. A banda mais inferior mostra o excesso de antígeno com clareamento artificial na região central, circundado por um anel de proteínas imunofixadas. A banda menor localizada acima às vezes resulta da dimerização de cadeias leves livres por meio das ligações dissulfeto. *F*, crioglobulina mista de tipo II precipitada a partir de soro que contém IgMκ monoclonal (seta sólida) e IgG policlonal. Algumas crioglobulinas não dissolvidas (seta clara) permaneceram no ponto de aplicação da amostra em cada tira. A ou anti-IgA = amostra que reagiu com anti-IgA; G ou IgG = amostra que reagiu com anti-IgG; K ou anti-κ = amostra que reagiu com anti-κ; λ ou anti-λ = amostra que reagiu com anti-λ; M ou anti-IgM = amostra que reagiu com anti-IgM; SP ou SPE = amostra que não foi lavada nem reagiu com antissoro (eletroforese do soro).

Bandas de imunoglobulina oligoclonal no líquido cerebrospinal

A avaliação da síntese intratecal de Igs é auxiliada pela eletroforese de alta resolução das proteínas do líquido cerebrospinal (LCE), que se espalham pela região γ exibindo bandas individuais de diferentes clones de Igs. A interpretação da eletroforese de proteínas do LCE requer a realização simultânea de uma análise eletroforética do soro do paciente, com o intuito de garantir que os achados encontrados no LCE sejam exclusivos, em vez de mera transferência passiva de Igs clonais oriundas do sangue. Como marcadores da síntese de Igs no sistema nervoso central (SNC), a detecção de bandas oligoclonais sugere a possibilidade de um processo autoimune em andamento, como a doença desmielinizante. Outra possibilidade é a existência de uma resposta imune a uma infecção do SNC, de modo que a interpretação da presença de bandas oligoclonais no LCE deve ser feita no contexto de outros achados diagnósticos, como contagens celulares, sorologias virais, culturas bacterianas, teste para sífilis, testes de amplificação de ácido nucleico para detecção de vírus etc.

O padrão eletroforético de proteínas do LCE e do soro de um paciente com esclerose múltipla é mostrado na Figura 45.7A. Nesse exemplo, o LCE foi concentrado e o soro, diluído para obtenção de quantidades comparáveis de proteínas coráveis em cada aplicação. O LCE apresenta uma concentração relativamente alta de pré-albumina, em comparação ao observado no soro. A albumina constitui a banda predominante na análise de ambos os líquidos. A outra banda significativa presente no LCE é a da transferrina, pois o pequeno tamanho de sua molécula permite sua ultrafiltração do sangue para o LCE. As proteínas séricas de maior peso molecular (α_2 + β-lipoproteína) estão ausentes no LCE. A molécula C3 é igualmente identificável no LCE, além de uma banda de asialotransferrina na região β-2. Após o reconhecimento de todas essas proteínas referenciais do LCE, as bandas

oligoclonais devem ser avaliadas na região γ, que normalmente apresenta somente uma pequena quantidade de Igs policlonais. As bandas oligoclonais observadas na Figura 45.7A são discretas e estão nitidamente separadas uma da outra.

O exame do soro e do LCE às vezes mostra a presença de uma banda clonal de Ig em ambos (Fig. 45.7B). Contudo, esse achado não é indicativo de síntese intratecal, como também não o é um resultado positivo para bandas oligoclonais. É provável que represente uma proliferação clonal de plasmócitos no corpo, com movimentação passiva de anticorpos monoclonais do sangue para o LCE.

Outra distorção do padrão eletroforético é observada diante da liberação de hemoglobina no LCE, que resulta no aparecimento de uma banda significativa na região β, próxima à banda da transferrina (Fig. 45.7C). Essa banda de hemoglobina não deve ser confundida com a presença de uma Ig clonal no LCE. A confirmação de que essa banda é de hemoglobina depende do exame visual do LCE para detecção de sangue ou hemólise (cor vermelha). Uma banda de hemoglobina vermelha também pode ser vista na região β antes da coloração do gel eletroforético.

Prevenção e terapia de doenças

A imunização passiva consiste na administração de anticorpos préformados, obtidos de outro indivíduo da mesma espécie (γ-globulinas homólogas) ou de espécie diferente (γ-globulinas heterólogas). Essa transferência confere proteção imediata contra infecções. A imunidade assim obtida tem curta duração e diminui conforme os anticorpos vão sendo utilizados e catabolizados. A proteção passiva na vida neonatal baseia-se na transferência de anticorpos maternos através da placenta ou do colostro (Pennington, 1991).

As γ-globulinas humanas agrupadas são úteis para conferir proteção temporária contra diversas infecções virais e bacterianas (Berkman, 1990; Hammarström, 1990; Desai, 1991). Dependendo da dose empregada e do tempo de administração, é possível modificar a doença transformando-a em uma forma branda ou prevenindo-a totalmente. O efeito é mais completo e previsível se uma das preparações hiperimunes for feita a partir do plasma de indivíduos que estejam convalescendo com a doença em questão ou que tenham sido imunizados contra ela. Tais preparações contêm maior concentração de anticorpos específicos. Também é possível produzir anticorpos em animais, como cavalos, tendo sido uma técnica amplamente empregada no passado. No entanto, a sensibilização prévia a proteínas estranhas pode causar reações clínicas, como anafilaxia, doença do soro, pirexia e reações de Arthus locais.

Os anticorpos monoclonais revolucionaram diversas áreas da medicina, incluindo pesquisa, diagnóstico e terapia. Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais murinos, humanos e humanizados (Lefrano, 1990; Morrison, 1992; Mountain, 1992; Ward, 1992; Shin, 1993). Muitos anticorpos monoclonais, por vezes substituindo antissoros policlonais, são empregados para fins diagnósticos (ver Cap. 43). Talvez, as aplicações terapêuticas mais importantes dos anticorpos

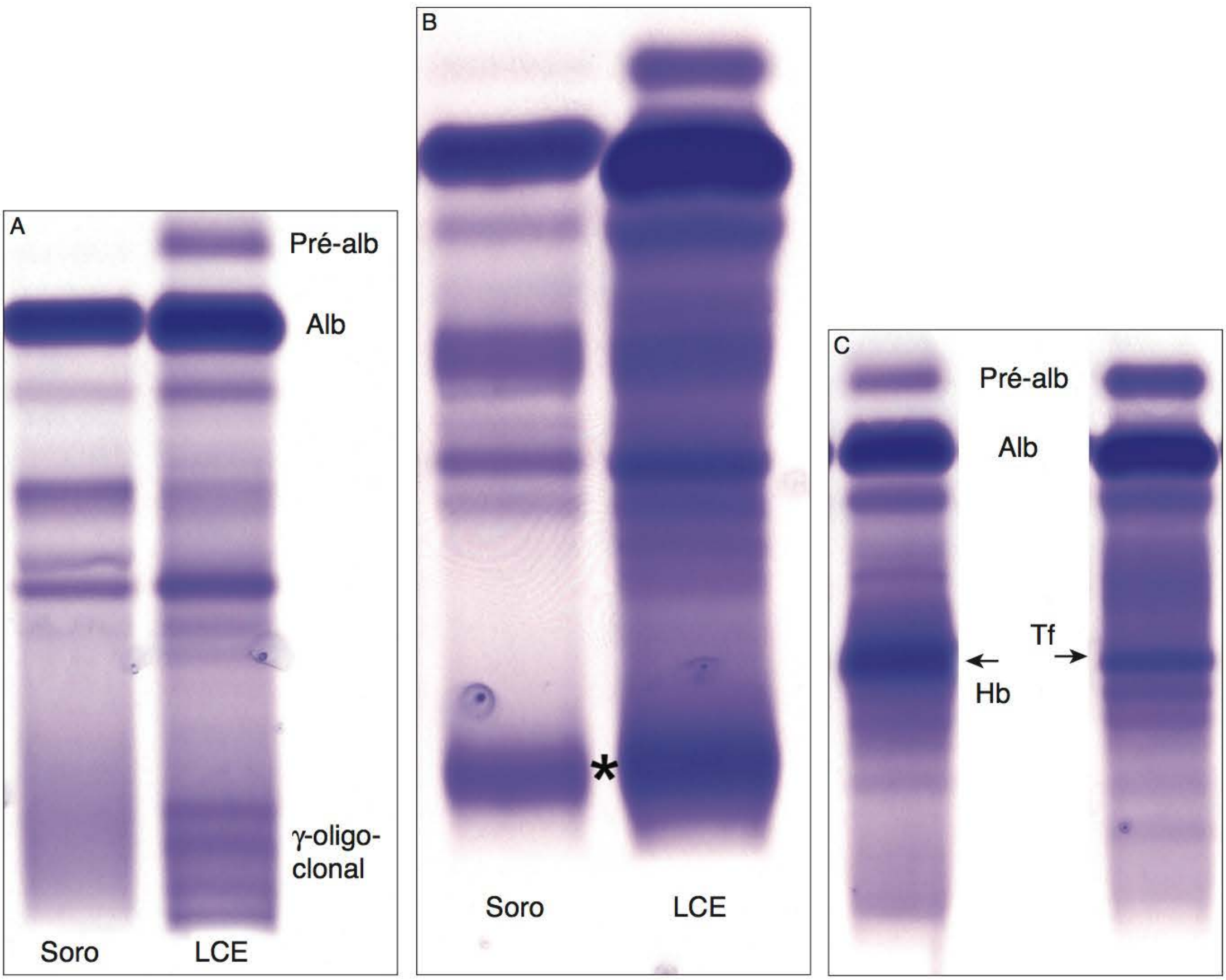


Figura 45.7 Padrões eletroforéticos de proteínas presentes no soro e no líquido cerebrospinal (LCE). *A*, soro e LCE obtidos do mesmo paciente que mostram bandas oligoclonais positivas na região γ do LCE mas não no soro. *B*, banda de imunoglobulina monoclonal em ambas as amostras (soro e LCE), interpretada como negativa para bandas oligoclonais no LCE. *C*, artefato de hemoglobina (Hb) no LCE (tira à esquerda) adjacente à posição da transferrina (Tf) (tira à direita).

monoclonais sejam nas áreas de transplantação e oncologia (Stevenson, 1990; Vitetta, 1993; Neame, 1994). Um anticorpo monoclonal murino chamado OKT3, que ataca o receptor CD3 dos linfócitos, é utilizado com frequência na terapia antirrejeição para bloquear a atividade de linfócitos T citotóxicos em receptores de transplante renal (Ortho Multicenter Transplant Study Group, 1985). Numerosas aplicações clínicas potenciais dos anticorpos monoclonais estão sendo avaliadas. Um exemplo recente é o uso de um anticorpo monoclonal dirigido contra o fator de necrose tumoral-α (TNF-α), com o intuito de prevenir a ocorrência de reações de Jarisch-Herxheimer, que são produzidas no tratamento antibiótico da infecção de ovelhas por *Borrelia* (Fekade, 1996). Anticorpos monoclonais anticitocina e antimolécula de adesão neutrofílica podem ser eficazes no tratamento de condições associadas a inflamação aguda e liberação de citocinas, tais como aspiração ácida, lesão por isquemia ou reperfusão (infarto do miocárdio, choque hemorrágico, reparo de aneurisma aórtico). Anticorpos que inibem a adesão de neutrófilos podem ser efetivos para asma, fibrose pulmonar, meningite e malária cerebral. Atualmente, é razoável esperar que inúmeras aplicações terapêuticas serão disponibilizadas futuramente, com os anticorpos monoclonais sendo projetados para modular as ações de um ou mais mediadores inflamatórios de ocorrência natural, infecções ou proliferações malignas.

Referências bibliográficas

Atkinson JP, Waldmann TA, Stein SF, et al: Systemic capillary leak syndrome and monoclonal IgG gammopathy. Medicine 1977; 56:225.

Axelsson N, Hellen J: Frequency of M components in 6995 sera from an adult population. Br J Haematol 1968; 15:417.

Bachman R: The diagnostic significance of the serum concentration of pathological proteins. Acta Med Scand 1965; 178:801.

Benbassat J, Fluman N, Zlotnick A: Monoclonal immunoglobulin disorders: a report of 154 cases. Am J Med Sci 1976; 27:325.

Berkman SA, Lee ML, Gale RP: Clinical uses of intravenous immunoglobulins. Ann Intern Med 1990; 112:278.

Bhat TN, Bentley GA, Fischmann TO, et al: Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of antibody D1.3 upon antigen binding. Nature 1990; 347:483.

Buckley RH: *In* Altman PL, Katz DD (eds): Human Health and Disease. Bethesda, MD, FASEB, 1977.

Burton DR: Immunoglobulin G: functional sites. Mol Immunol 1985; 22:161.

Cacoub P, Costedoat-Chalumeau N, Lidove O, Alric L: Cryoglobulinemia vasculitis. Curr Opin Rheumatol 2002;14:29–35.

Esta revisão apresenta informações atualizadas sobre achados clínicos em crioglobulinas com ênfase em pacientes com hepatite C.

Carsetti R, Kohler G, Lamers MC: A role for immunoglobulin D: Interference with tolerance induction. Eur J Immunol 1993; 23:168.

Cassidy JT, Nordby GL, Dodge HJ: Biologic variation of human serum immunoglobulin concentrations: sex-age specific effects. J Chronic Dis 1974; 27:507.

Cohen HJ: Multiple myeloma in the elderly. Clin Geriatr Med 1985; 1:827.

Colls BM: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) – 31 year follow up of a community study. Aust NZ J Med 1999;29:500–504.

Esta série clínica demonstrou a significância a longo prazo de GMSI.

Corcoran AE: Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. Semin Immunol 2005; 17:141–154.

Cushman P, Grieco MH: Hyperimmunoglobulinemia associated with narcotic addiction. Am J Med 1973; 54:320.

Davies DR, Metzer H: Structural basis of antibody function. Ann Rev Immunol 1983; 1:87.

Desai RG: Recent advances in intravenous immunoglobulin therapy. Concluding remarks. Current trends and future directions. Cancer 1991; 68:1460.

Drouet E, Chapuis-Cellier C, Bosshard S, et al: Oligomonoclonal immunoglobulins frequently develop during concurrent cytomegalovirus (CMV) and Epstein–Barr virus (EBV) infections in patients after renal transplantation. Clin Exp Immunol 1999; 118:465.

Fekade D, Knox K, Hussein K, et al: Prevention of Jarisch–Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor α. N Engl J Med 1996; 335:311.

Este é um estudo clínico inicial que mostrou como reações inflamatórias podem ser moduladas por anticorpos terapêuticos.

Hammarström L, Smith CI: New and old aspects of immunoglobulin application. The use of intravenous IgG as prophylaxis and for treatment of infections. Infection 1990; 18:314.

Herron JN, He XM, Ballard DW: An antibody to single-stranded DNA: Comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide–Fab complex. Proteins 1991; 11:159.

Isobe T, Osserman EF: Pathologic conditions associated with plasma cell dyscrasias: a study of 806 cases. Ann NY Acad Sci 1971; 190:507.

Karplus M, McCammon JA: Dynamics of proteins: elements and function. Annu Rev Biochem 1983; 53:263.

Kelly RH, Tardy TJ, Shah PM: Benign monoclonal gammopathy: a reassessment of the problem. Immunol Invest 1985; 14:193.

Keren DF: Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:126.

Esta revisão de procedimentos de laboratório fornece hipóteses para medidas modernas de gamopatias monoclonais.

Keren DF, Warren JS, Lowe JB: Strategy to diagnose monoclonal gammopathies in serum: High-resolution electrophoresis, immunofixation and kappa/lambda quantification. Clin Chem 1988; 34:2196.

Kolar G, Capra JD: Immunoglobulins: structure and function. *In* Paul WE (ed): Fundamental Immunology. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2003, p 47.

Kyle RA: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): a review. Clin Haematol 1982; 11:123.

Kyle RA, Rajkumar SV: Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review. Immunol Rev 2003;194:112–139.

Esta é uma avaliação atualizada e abrangente dos pacientes com GMSI.

Lefrano G, Lefrano MP: Antibody engineering and perspectives in therapy. Biochemie 1990; 72:639.

Lichtman MA, Vaughan JH, Hames CG: The distribution of serum immunoglobulins, anti-γ-G globulins and antinuclear antibodies in White and Negro subjects in Evans County, Georgia. Arthritis Rheum 1967; 10:204.

Max EE: Immunoglobulins: Molecular genetics. *In* Paul WE (ed): Fundamental Immunology. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2003, p 107.

Morrison SL: In vitro antibodies: strategies for production and application. Annu Rev Immunol 1992; 10:239.

Mountain A, Adair JR: Engineering antibodies for therapy. Biotechnol Genet Eng Rev 1992; 10:1.

Neame PB, Soamboonsrup P, Quigley JG, et al: The use of monoclonal antibodies and immune markers in the diagnosis, prognosis, and therapy of acute leukemia. Transfusion Med Rev 1994; 8:59.

Nickerson PW, Rush DN, Jeffery JR, et al: High serum levels of interleukin-6 in renal transplant recipients with monoclonal gammopathies. Transplantation 1994; 58:382.

Ortho Multicenter Transplant Study Group: A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. N Engl J Med 1985; 313:337.

Padlan EA: Anatomy of the antibody molecule. Mol Immunol 1991; 31:169.

Pennington JE: Immunoglobulin therapy in infectious disease. Cleveland J Med 1991; 58:309.

Poljak RJ: Structure of antibodies and their complexes with antigens. Mol Immunol 1991; 28:1341.

Radl J, Valentijn RM, Haaijman JJ, Paul LC: Monoclonal gammopathies in patients undergoing immunosuppressive treatment after renal transplantation. Clin Immunol Immunopathol 1985; 37:98.

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, et al: Reference distributions for immunoglobulins A, G, and M: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal 1998;12:363–370.

Este artigo apresenta intervalos de referência para imunoglobulinas por idade e sexo em uma população grande.

Roes J, Rajewski K: Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B-cells. J Exp Med 1993; 177:45.

Ropper AH, Gorson KC: Neuropathies associated with paraproteinemia. N Engl J Med 1998; 338:1601.

Schaefer AI, Miller JB, Lester EP, et al: Monoclonal gammopathy in hereditary spherocytosis: a possible pathogenetic relation. Ann Intern Med 1978; 88:45.

Shin SU, Wright A, Morrison SL: Hybrid antibodies. Int Rev Immunol 1993; 10:177.

Smith GS, Holman RP: The prozone phenomenon with syphilis and HIV-1 co-infection. South Med J 2004;97:379–382.

Este relato de caso recente reforça a necessidade contínua de vigilância em testes baseados em antígeno-anticorpo, de modo a evitar a falta de valores elevados de anticorpos imunes devido ao efeito prozona.

Spielgelberg HL: Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. Adv Immunol 1974; 19:259.

Standfield RL, Fieser TM, Lerner RA, et al: Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. Science 1990; 248:712.

Stanko CK, Jeffery JR, Rush DN: Monoclonal and multiclonal gammopathies after renal transplantation. Transplant Proc 1989; 21:3330.

Stevenson FK, George AJ, Glennie MJ: Anti-idiotypic therapy of leukemias and lymphomas. Chem Immunol 1990; 48:126.

Tedford MC, Stimson WH: Molecular recognition in antibodies and its application. Experientia 1991; 47:1129.

Tollerud DJ, Brown LM, Blattner WA, et al: Racial differences in serum immunoglobulin levels: Relationship to cigarette smoking, T-cell subsets, and soluble interleukin-2 receptors. J Clin Lab Anal 1995; 9:37.

Tonegawa S: Somatic generation of antibody-diversity. Nature 1983; 302:575.

Vitetta ES, Thorpe PE, Uhr JW: Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles? Trends Pharmacol Sci 1993; 14:148.

Ward ES: Antibody engineering: The use of *Escherichia coli* as an expression host. FASEB J 1992; 6:2122.

Wells JV, Fudenberg HH: Paraproteinemias. DM 1:45, 1974.

Wilson IA, Stanfield RL, Rini JM, et al: Structural aspects of antibodies and antibody–antigen complexes. Ciba Foundation Symposium 1991; 159:13.

CAPÍTULO 46

Mediadores de inflamação: complemento, citocinas e moléculas de adesão

H. Davis Massey MD PhD, Richard A. McPherson MD

Estrutura e função do sistema complemento 972
- Nomenclatura 972
- C3: molécula central das vias de ativação do complemento 973
- A via clássica 974
- A via alternativa 974
- A via da lectina ligadora de manana 974
- Componentes terminais do complemento 975
- Anafilatoxinas 975
- Regulação da ativação do complemento 976
- Receptores de complemento 976
- Biossíntese do complemento 977
- Genética do complemento 977
- Complemento e imunidade adquirida 978

Deficiências genéticas de complemento 978

Avaliação da atividade do complemento na doença 978

O complemento em estados patológicos 979
- Doenças reumáticas 979
- Angioedema hereditário 980
- Doenças infecciosas 980
- Doenças renais 980
- Doenças dermatológicas 980
- Doenças hematológicas 981
- Doenças neurológicas 981
- Doenças cardiovasculares 981
- Biocompatibilidade 981
- Transplante de órgãos 981

Inibidores do complemento clinicamente úteis 982

Ensaios para complemento 982
- Princípios gerais 982
- Avaliação funcional da via clássica 983
- Avaliação funcional da via alternativa 984
- Ensaio funcional do inibidor de C1 984
- Níveis de complemento por ensaios antigênicos 984

Cininas e o sistema gerador de cinina 984

Citocinas 984
- Interleucina 1 985
- Interleucina 2 985
- Interleucina 3 986
- Interleucina 4 986
- Interleucina 5 986
- Interleucina 6 986
- Interleucina 7 987
- Interleucina 8 e as quimiocinas 987
- Interleucina 9 988
- Interleucina 10 988
- Interleucina 11 988
- Interleucina 12 989
- Interleucina 13 989
- Interleucina 14 989
- Interleucina 15 989
- Interleucina 16 990
- Interleucina 17 990
- Interleucina 18 990
- Interleucina 19 990
- Interleucina 20 990
- Interleucina 21 991
- Interleucina 22 991
- Interleucina 23 991
- Interleucina 24 991
- Interleucina 25 991
- Interleucina 26 991
- Interleucina 27 991
- Fator β transformador do crescimento 991
- Fator de necrose tumoral 992
- Interferon-γ 992

Moléculas de adesão celular 992
- Integrinas 992
- Selectinas 993

Extravasamento de leucócitos 993

Perspectivas 993

Referências bibliográficas 994

PONTOS-CHAVE

- O sistema complemento é um grupo de proteínas circulantes que promovem inflamação e defesa do hospedeiro.
- O dano tecidual desregulado é uma complicação possível da ativação do complemento, e há uma grande variedade de proteínas circulantes, bem como proteínas teciduais ligadas à membrana que funcionam regulando a atividade do complemento.
- O componente C3 do complemento é o ponto de convergência central para todas as vias de ativação do complemento.
- Para rastrear a atividade de uma doença, frequentemente é necessário medir os níveis séricos de complemento, mas é importante reconhecer que as estimativas do complemento sérico são instantâneos de um processo dinâmico que envolve taxas variáveis de consumo e produção de complemento.
- Há métodos que permitem a determinação acurada dos níveis séricos dos componentes do complemento.
- Ensaios funcionais para o complemento são recursos sensíveis e precisos para se obter informação sobre a atividade de um componente do complemento.
- O ensaio funcional mais simples da via clássica (CH_{50}) mede a atividade hemolítica total do complemento.
- Citocinas são proteínas solúveis liberadas por células a curtas distâncias para facilitar a comunicação entre células, ajudar na suprarregulação ou infrarregulação da resposta imune e orquestrar atividades inflamatórias e reparadoras associadas.
- Moléculas de adesão são glicoproteínas complexas que se ligam a tecidos vivos e medeiam a migração celular durante a embriogênese, a cicatrização de feridas e a resposta inflamatória.

Estrutura e função do sistema complemento

O termo "complemento" refere-se a um grupo de glicoproteínas circulantes que funciona para promover a inflamação e exercer um papel importante na defesa do hospedeiro. O dano tecidual desregulado é uma complicação possível da ativação do complemento, havendo uma grande variedade de glicoproteínas circulantes e proteínas teciduais ligadas à membrana celular que funcionam regulando a atividade do complemento e infrarregulando o ataque a ele. A existência desse sistema de proteínas foi deduzida no final do século XIX, quando ficou claro que o soro fresco tinha a capacidade de causar a lise de bactérias Gram-negativas e vibriões do cólera na presença de anticorpo específico. À medida que as técnicas de purificação e identificação ficaram mais sofisticadas com o passar dos anos, reconheceu-se que o complemento é um sistema muito complexo em que interagem muitas proteínas.

Em geral, o sistema funciona identificando células estranhas e microrganismos e destruindo-os. Isso ocorre por lise direta, opsonização (o processo de revestimento com complementos peptídicos específicos reconhecidos por receptores específicos nos fagócitos para ajudar em sua ingestão), ou causando inflamação com a atração de células fagocíticas. Também ficou claro que o complemento desempenha um papel na facilitação da resposta imune.

O sistema complemento de proteínas é mais antigo em termos filogenéticos que o da imunidade adquirida (anticorpo) e está presente em organismos mais primitivos. Presumivelmente, ele proporciona um nível de imunidade natural e defesa do hospedeiro, mesmo na ausência de anticorpo, fazendo isso pela via da lectina ligadora de manana (MBL, *mannan-binding lectin*) e pela via alternativa do complemento, ambas discutidas adiante. O anticorpo proporciona um nível de especificidade e eficiência maiores na defesa mediada pelo hospedeiro. Uma história detalhada da descoberta do complemento e das diversas vias do complemento é apresentada em outro texto (Frank, 1998).

Nomenclatura

Há três vias principais de ativação do complemento no soro humano: a clássica, a alternativa e a MBL (ou MBLectina). A Figura 46.1 ilustra a sequência da reação de cada via. A Tabela 46.1 fornece informação específica sobre cada proteína plasmática do complemento. A nomenclatura das proteínas do sistema complemento em geral segue duas convenções (Organização Mundial da Saúde, 1968; IUIS-WHO, 1981). Por motivos históricos, as 9 proteínas da via clássica são designadas pela letra C maiúscula, seguida pelo número que as relaciona com sua ordem de aparecimento na sequência de área. Uma exceção notável é a C4, que age antes da C2. As moléculas que fazem parte do complexo C1 são denominadas C1q, C1r e C1s. As proteínas que reagem exclusivamente na via alternativa são denominadas fatores e designadas por uma letra maiúscula (p. ex., fator B, fator D). Além disso, fragmentos de proteínas do complemento restantes da clivagem proteolítica são designados por uma letra minúscula (p. ex., C4a,

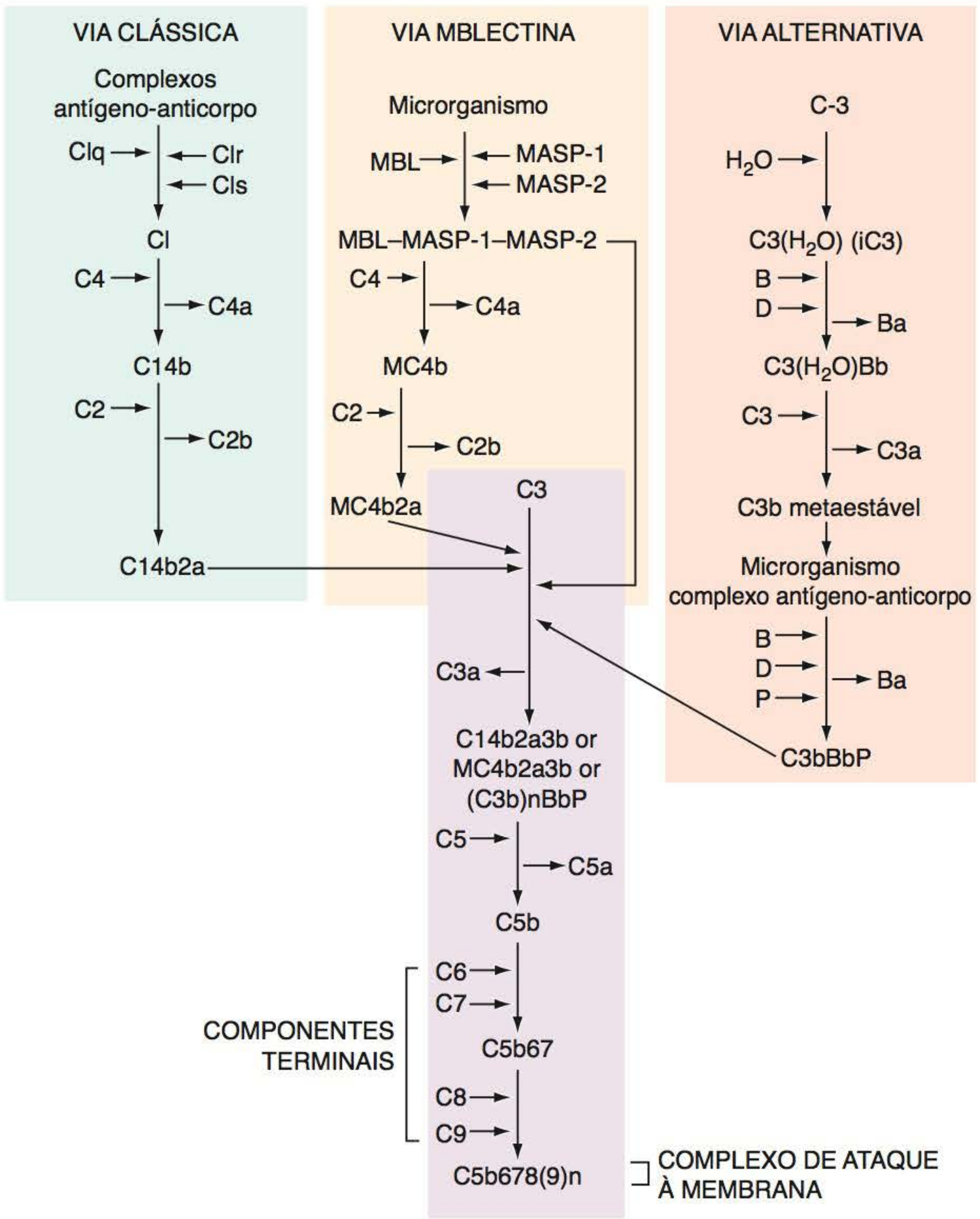


Figura 46.1 Os componentes das vias clássica, MBLectina e alternativa convergem para formar uma convertase que cliva C3. Na via clássica, complexos antígeno-anticorpo ligam-se sequencialmente e ativam C1, C4 e C2. Na via da MBLectina, a interação da MBL com um carboidrato na superfície de um microrganismo leva à formação de um complexo enzimático (MBL–MASP-1–MASP-2, denominado M na figura) que liga e ativa C4 e C2. Na via alternativa, C3 sofre hidrólise de sua ligação tioéster, o que induz uma alteração na conformação. Em seguida, liga-se ao fator B (B), o qual é clivado pelo fator D (D) para formar uma convertase que é estabilizada pela properdina (P). C3b, o produto da clivagem de C3, também tem uma ligação tioéster clivada e é capaz de ativar a via alternativa. A C3b convertase de todas as vias continua sequencialmente ligando o componente de ação tardia até a sequência de ativação estar completa.

Tabela 46.1 Proteínas do complemento no plasma humano

Proteína	Peso molecular (kDa)	Localização cromossômica	Concentração (μg/mL)
Comum a todas as vias			
C3	185	19p13.3–p13,2	1,200–1,300
Via clássica			
C1q	460	1p34.1–36,3	150
C1r	85	12p13	50
C1s	85	12p13	50
C4	205	6p21.3	300–600
C2	102	6p21.3	20
Via alternativa			
Fator B	93	6p21.3	200
Fator D	24	Desconhecida	2
Properdina	55 (monômero)	Xp11,4–p11,2	25
Via MBLectina			
MBL	200–400	10q11,2–q21	0.002–10
MASP-1	93	3q27–28	1,5–13
MASP-2	76	1p36,3–36,2	Desconhecida
Complexo de ataque à membrana			
C5	190	9q33	80
C6	110	5p13	45
C7	100	5p13	90
C8	150	1p32 (cadeias α, β), 9q22,3–q32 (cadeia γ)	55
C9	70	5p13	60
Proteínas de controle			
C1inh	105	11q11–q13,1	240
C4bp	550	1q32	250
Fator I	88	4q25	35
Fator H	150	1q32	300–450
Proteína S	84	17q11	500
Clusterina	70	Desconhecida	50
Fator J	20	Desconhecida	≈5,4

C4b), em que o "a" representa o menor fragmento e "b" representa o fragmento maior. A exceção a essa regra é C2, pois C2a é o fragmento maior e C2b é o menor. Outros fragmentos de degradação do fragmento maior do complemento de um componente são designados por letras minúsculas (p. ex., C3c, C3d). Os componentes que perderam a atividade (i. e., são inativos) em geral são designados por uma letra minúscula antes (p. ex., iC3b, iC4b). As cadeias de polipeptídeos de uma proteína complemento nativa são designadas por letras gregas minúsculas (α, β, γ), exceto C1q, cujas cadeias são denominadas A, B e C. Os complexos de componentes únicos ou múltiplos que têm atividade enzimática são designados por uma barra sobre o(s) componente(s). As proteínas da via MBLectina são designadas por abreviaturas dos nomes das proteínas (p. ex., MBL, para lectina ligadora de manana; MASP, para serina protease associada à MBL). As proteínas reguladoras são designadas por uma palavra ou letra descritiva (p. ex., proteína de ligação a C4, fator H). As proteínas reguladoras ligadas à membrana são designadas pela sigla CD seguida de um número e expressões descritivas (p. ex., CD46 para a proteína cofator de membrana) e os receptores de complemento são designados por números após o prefixo CR (receptores de complemento 1 a 4). Os outros receptores de complemento são designados pelo símbolo do componente seguido pela letra maiúscula R.

C3: molécula central das vias de ativação do complemento

A proteína conhecida como C3 é o ponto de convergência central para três vias de ativação de complemento (a MBLectina, a alternativa e a clássica), todas prosseguindo para a lise, fagocitose ou regulação da resposta inflamatória mais adiante na cascata.

A C3 é uma molécula de duas cadeias sintetizada em muitas células, particularmente hepatócitos, formada a partir de uma molécula de cadeia única, a pró-C3, e liberada na circulação, onde se liga a superfícies-alvo estranhas. As cadeias α e β são estabilizadas por pontes dissulfídicas intracadeias; uma ponte dissulfídica intracadeia estabiliza a interação entre a cadeia α e a β (Fig. 46.2). A cadeia α contém um tioléster que confere uma estrutura estável à molécula. Embora esteja no centro hidrofóbico de C3, o tioléster pode ser clivado por hidrólise gradual à medida que a água penetra na molécula, ativando a via alternativa do complemento. A C3 também pode ser clivada rapidamente pela ação da C3 convertase, liberando o fragmento C3a de 9 kDa da terminação amino da cadeia α, do C3b maior. O C3b irá cobrir as proteínas-alvo, assinalando-as assim para serem destruídas, enquanto o C3a no papel de anafilatoxina ativa células vizinhas para liberarem mediadores da inflamação (Wen, 2004). Cada trajeto resulta em alteração conformacional acentuada de C3 (agora denominada C3b), o que permite que ela interaja com células que expressam receptores para C3b, em particular CR1 (receptor C3b/C4b, CD35). (A C3 nativa não interage com receptores C3b.)

A ativação de C3 e a conversão para C3b (com a clivagem do tioléster) leva à ligação covalente de C3b à superfície de um alvo, como um microrganismo, que fica revestido com C3b capaz de interagir com células que expressam receptores de C3b, incluindo todos os fagócitos, linfócitos B e um subconjunto de linfócitos T. É a C3b que continua a cascata do complemento, levando à lise.

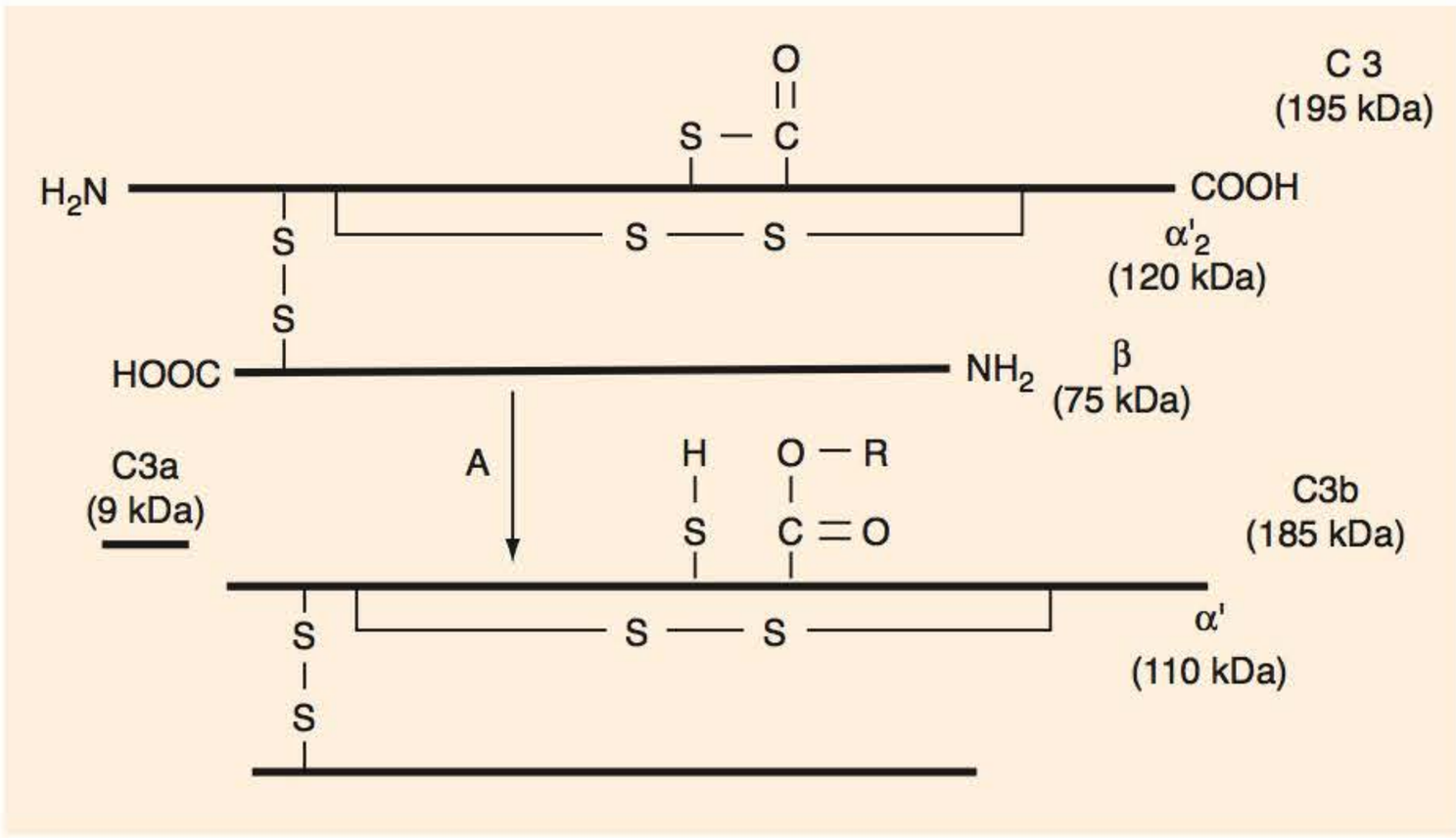


Figura 46.2 Clivagem de C3 pela C3 convertase: o peso molecular aproximado de cada cadeia ou fragmento é fornecido em quilodáltons (a C3 convertase está representada por A).

A via clássica

A via clássica da ativação do complemento, descrita por volta de 1900, foi a primeira a ser estudada, e por essa razão é denominada "clássica". Em termos evolutivos, é a mais recente das três vias descritas, sendo responsável pela ativação do complemento na maioria das células sensibilizadas com anticorpo. Os detalhes sobre essa via estão publicados em outro texto (Fries, 1987; Volanakis, 1998). São 9 proteínas numeradas que compreendem a via clássica. Em geral, a ativação da via clássica requer interação entre um antígeno e um anticorpo "complementar" ligado à C1. Em humanos, apenas a imunoglobulina (Ig)M e a IgG são efetivas na ativação da via clássica, exceto a IgG4, que é incapaz de ativar complemento. É interessante notar que várias moléculas, que não imunoglobulinas, têm a capacidade de ativar a via clássica do complemento via interação direta com C1q. Elas incluem a proteína C reativa, o componente sérico amiloide P, β-amiloide, algumas bactérias Gram-negativas, certos vírus, micoplasmas, protozoários e componentes intracelulares como o DNA, membranas mitocondriais e filamentos do citoesqueleto (Gewurz, 1993). É interessante também observar que células apoptóticas ligam-se à C1q (Korb, 1997) e têm a capacidade de ativar a via clássica, o que pode ter importância crítica na eliminação de células apoptóticas da circulação. Doenças priônicas como a encefalopatia espongiforme transmissível podem usar os componentes do sistema complemento como C3 e C1q para facilitar a localização dentro das células-alvo (Mabbott, 2004).

Após ligação da imunoglobulina a um alvo, a C1 liga-se à imunoglobulina e torna-se ativada. A C1 é uma macromolécula de 740 kDa que compreende uma única molécula de C1q em complexo com C1r e duas cadeias C1s mantidas juntas na presença de íons de cálcio. Uma vez ligada à imunoglobulina, a C1q adota uma alteração conformacional que leva à autoativação das duas cadeias C1r. A $C1s_2$ ativada cliva o próximo componente da cascata, C4. O fragmento maior, C4b, adere ao ativador de superfície, enquanto o fragmento menor, C4a, é liberado na fase líquida. C4a é uma anafilatoxina descrita em uma seção subsequente deste capítulo. A maior parte da C4b gerada é hidrolisada e permanece na fase líquida. Apesar disso, parte das moléculas de C4b liga-se ao ativador de superfície como um aglomerado em torno do local do complexo antígeno-anticorpo-C1. Assim, um único local anticorpo-antígeno-C1 pode levar à deposição de muitas moléculas de C4b.

Na presença de íons de magnésio, a C4b age como um local para a ligação e a clivagem subsequente de C2. A $C1s_2$, em associação à C4b, cliva C2 em dois fragmentos. O fragmento maior, C2a, permanece ligado a C4b, enquanto o menor, C2b, é liberado na fase líquida. Esse complexo molecular, C4b2a, é instável e tem uma meia-vida relativamente curta por causa do decaimento que resulta da tendência de C2a a separar-se do complexo em uma forma inativa. O complexo C4b2a é a via clássica da C3 convertase necessária para a ligação e a clivagem de C3 (Fig. 46.2). É C2a, como parte desse complexo, que cliva enzimaticamente C3 na próxima etapa da cascata de ativação e cliva C5 em uma etapa posterior. C2a cliva C3 em um fragmento maior, C3b, que se liga ao ativador de superfície e a um fragmento menor, C3a, que é liberado na fase líquida, onde serve como uma anafilatoxina. O complexo C4b2a3b recém-gerado é a C5 convertase da via clássica que desencadeia a deposição de componentes terminais do complemento na superfície-alvo.

A IgM e a IgG diferem em sua capacidade de ativar a via clássica do complemento. Parece que uma única molécula da maioria dos anticorpos IgM ligada por múltiplos locais de anticorpo a um antígeno pode ligar-se a uma molécula de C1 e disparar uma sequência completa de ativação do complemento. A IgM, com seus cinco locais de ligação de antígeno, adota uma conformação funcionalmente ativa em uma superfície antigênica que permite múltiplas interações com antígenos.

Em contraposição, a ligação de C1 a IgG requer duas moléculas de IgG lado a lado na maioria dos estudos experimentais (Borsos, 1965). Como os anticorpos IgG ligam-se a uma superfície-alvo de maneira aleatória e os antígenos não podem ser distribuídos uniformemente em um organismo-alvo, pode ser necessária a inserção de centenas ou milhares de anticorpos IgG para gerar um local de ligação de C1. Também se demonstrou que a via clássica da ativação por complexos IgG-antígeno facilita a via alternativa (ver próxima seção) na superfície ativadora (Moore, 1981).

A capacidade da imunoglobulina agregada de ligar-se a C1q forneceu a base para inúmeros testes destinados a detectar a presença de imunocomplexos solúveis em amostras de sangue de pacientes. Acrescenta-se C1q radiomarcada a uma amostra de soro ou plasma, e usa-se uma técnica (p. ex., precipitação em polietilenoglicol) para separar C1q livre da ligada a componentes proteicos do soro. A ligação de C1q sugere a presença de complexos de imunoglobulinas na amostra de soro ou plasma (Zubler, 1976). Imunocomplexos solúveis também podem ser medidos pela identificação de imunocomplexos ligados a C1q ou C3, usando-se as técnicas do ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Stanilova, 2001). É possível detectar a presença de C1q em amostras de tecido pela visualização direta com anticorpos anti-C1q marcados por imunofluorescência para identificar imunocomplexos em amostras de biópsia.

A via alternativa

A presença de uma segunda via de ativação do complemento foi proposta pela primeira vez por Pillemer (1954), mas somente aceita pela comunidade científica quase duas décadas depois. Essa via de ativação do complemento parece ser importante na defesa inicial contra microrganismos patogênicos (Pangburn, 1984). Embora anticorpos possam ativar esse sistema, não há necessidade de anticorpo nem de lectina para a ativação. A iniciação da via alternativa sobre uma superfície aceptora começa com a deposição de C3 ativa sobre uma superfície que não tem reguladores de complemento nela, gerando fragmentos C3b e permitindo que o processo continue como uma alça de amplificação sem adesão fraca (Wen, 2004). Isso depende da capacidade do grupo carbonil do grupo tioléster exposto de C3b interagir com um grupo amido ou hidroxila de uma proteína ou carboidrato presente na superfície de um alvo (Law, 1979). No soro, a C3 é hidrolisada a uma taxa de 0,2 a 0,4% de compartimento plasmático por hora (Pangburn, 1981). A C3 com um tioléster hidrolisado sofre uma alteração em sua conformação que lhe permite interagir com proteínas que não interagem com a C3 nativa e se denomina $C3(H_2O)$ (também denominada iC3). A $C3(H_2O)$ tem então a capacidade de interagir com o fator B na presença de íons de magnésio. O fator B, após ligação com a $C3(H_2O)$, pode interagir com o fator D e é clivado para gerar a chamada C3 convertase $(H_2O)Bb$ e liberar um pequeno fragmento, Ba. Essa clivagem é mediada pelo fator D, uma serina protease que adota uma conformação ativa após reconhecimento de seu substrato e retorna à conformação inativa assim que ocorre a clivagem proteolítica (Volanakis, 1996).

A C3 convertase de iniciação cliva a C3 para gerar C3b metaestável a uma taxa continuamente lenta na circulação. A C3b metaestável pode ligar-se de forma covalente ao ativador de superfície e então, como $C3(H_2O)$, liga-se ao fator B. Como na iniciação da C3 convertase, o fator D então cliva o fator B para gerar a C3 convertase ligada à célula, C3bBb. Esse complexo decai rapidamente, mas é estabilizado pela ligação à properdina, que prolonga a meia-vida da C3 convertase de 1 para 18 minutos (Fearon, 1975). Essa C3 convertase estabilizada cliva rapidamente ainda mais C3, que pode ligar-se ao ativador de superfície, e por isso é conhecida como C3 convertase de amplificação da via alternativa. A amplificação da deposição de C3b no ativador de superfície leva à formação de uma C5 convertase ($C3b_2BbP$) (Kinoshita, 1988), que tem a habilidade de disparar a ativação dos componentes terminais do sistema complemento.

A via da lectina ligadora de manana

Foi descrita recentemente uma terceira via de ativação do complemento que utiliza a proteína sérica MBL (também conhecida como lectina ligadora de manose ou proteína ligadora de manose) e está presente no soro na quantidade aproximada de 1,5 μg/mL. A MBL é formada no fígado e encontrada em todos os mamíferos e aves, pertencendo a uma família de moléculas denominadas colectinas (Epstein, 1996; Turner, 1996), que inclui ainda as proteínas surfactantes pulmonares A e D (SP-A, SP-D), a conglutinina bovina e a CL-43 bovina (Epstein, 1996). A MBL é estruturalmente relacionada com a C1q e reconhece certos carboidratos "patogênicos" que se expressam na superfície de microrganismos, mas não reconhece carboidratos como a galactose e o ácido siálico, os açúcares terminais, os quais se expressam nas glicoproteínas de mamíferos (Epstein, 1996). Isso permite que a MBL discrimine entre

própria e não própria. Há relatos de que a MBL reage com uma ampla gama de bactérias acapsulares Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, leveduras, micobactérias, parasitas e protozoários (Epstein, 1996). Ao reconhecer seu ligante carboidrato, a MBL adquire uma alteração conformacional que leva à ativação de duas serina proteases associadas à MBL, a MASP-1 e a MASP-2 (Thiel, 1997), sendo que ambas compartilham homologia estrutural com a C1r e a C1s, o que sugere similaridade com o complexo C1 ($C1qr_2s_2$). Após ativação, a MASP-2 cliva C4 para gerar a C3 convertase da via clássica C4b2a (Vorup-Jensen, 1998). A MASP-1 tem capacidade de clivar C3 (Matsushita, 1998), sugerindo que possa disparar diretamente a ativação da via alternativa (Schweinle, 1989). Após a geração da C3 convertase da via clássica C4b2a pelo complexo MBL-MASP-1-MASP-2, a ativação do complemento prossegue como na via clássica, com o possível recrutamento também da via alternativa (Suankratay, 1998). Complexos anticorpo-antígeno específicos também podem disparar a via MBLectina. Demonstrou-se que uma fração de moléculas IgG que não têm resíduos de galactose terminais (denominados IgG-G0), conforme se observa no plasma de pacientes com condições patológicas como a artrite reumatoide, tem a capacidade de interagir com a MBL e ativar a via clássica (Malhotra, 1995). A MBL parece ter um papel na eliminação de organismos-alvo por fagócitos via interação com um receptor específico presente nessas células (Hansen, 1998; Tenner, 1995), bem como modular as respostas inflamatórias e alérgicas, afetar a depuração de células apoptóticas e modular o sistema imune adaptativo (van de Wetering, 2004). A regulação da via MBLectina parece ser mediada pelo inibidor de C1 (Matsushita, 1996) e pela α_2-macroglobulina (Terai, 1995).

Componentes terminais do complemento

Todas as três vias de ativação do complemento convergem para a ativação de C3 e a montagem do complexo de ataque à membrana (CAM), formado pelos componentes C5 a C9. Após a formação das convertases de C5 das vias clássica, MBLectina (C4b2a3b) e alternativa (C3b2Bb), C5 é clivado. O fragmento maior (C5b) pode associar-se à membrana celular e interagir com C6. A próxima etapa envolve a interação do complexo C5b-6 com a fase líquida C7, formando um complexo trimérico com propriedades anfifílicas (com alta afinidade com os constituintes lipídicos da membrana celular) (Podack, 1979). C5b-7 insere-se na dupla camada lipídica da membrana celular, mas isso não é suficiente para que ocorra lise celular. C8 associa-se a esse complexo trimolecular via uma interação com C5b exposto. O complexo C5b-8 também penetra na dupla camada lipídica, formando um pequeno poro transmembrana, e causa lise lenta de eritrócitos (Ramm, 1982). No entanto, é necessária a inserção de múltiplas cópias de C9 através da dupla camada lipídica via uma interação inicial com a cadeia α de C8, para que haja atividade citolítica completa do CAM (Plumb, 1998). Acredita-se que o complexo C5b-8 sirva como um iniciador da polimerização de C9 dentro da membrana celular. À microscopia eletrônica, o CAM tem uma estrutura cilíndrica oca, formada pela montagem de seus componentes na presença de excesso de C9 (Podack, 1984). O mecanismo pelo qual o CAM rompe a membrana celular ainda é motivo de controvérsia e pode ser que inclua a distorção da dupla camada lipídica para formar "lagos" (Esser, 1991) ou, mais provavelmente, a formação de um poro transmembrana com um centro hidrofílico pelo qual os íons podem passar livremente (Bhakdi, 1991). A formação do CAM induz a lise de certas bactérias e vírus, bem como de eritrócitos heterólogos. A maioria das células nucleadas resiste à citotoxicidade induzida pelo CAM. Tal proteção, em especial contra o ataque de proteínas do próprio complemento, é mediada por moléculas reguladoras associadas à membrana, que impedem a formação do CAM (ver adiante, em "Regulação da ativação do complemento"), bem como pela dispersão de proteínas ativadas de complemento por causa da formação de bolhas na superfície celular. Pode ocorrer lise de células nucleadas mediada pelo CAM, mas isso requer que o CAM sofra vários danos para ter efeito (Koski, 1983). Foi proposto que a deposição de quantidades sublíticas do CAM poderia proteger a célula contra ataque subsequente do complemento (Reiter, 1992). As células nucleadas são protegidas dos efeitos do CAM em parte por causa de sua eliminação ativa da superfície celular pelo reparo da membrana ligado à renovação de lipídeos (Mold, 1998). A formação do CAM tem um efeito estimulante sobre vários tipos de células nucleadas. Entre outros, esses efeitos incluem a produção de radicais reativos de oxigênio a partir de neutrófilos e macrófagos, liberação de eicosanoides de células fagocíticas, indução de atividade pró-coagulante em plaquetas e células endoteliais, atividade pró-inflamatória em células endoteliais e da musculatura lisa, proliferação de células musculares lisas e disparo das vias transdutoras de sinal (Niculescu, 1993, 1999; Benzaquen, 1994; Sims, 1995; Kilgore, 1996; Tedesco, 1997; Mold, 1998).

Anafilatoxinas

A ativação do complemento pelas vias clássica, alternativa ou da MBLectina leva à geração de fragmentos de proteínas de complemento que têm papéis importantes nas várias funções biológicas, inclusive opsonização, fagocitose, imunomodulação e geração de reações inflamatórias.

A ativação do complemento leva à clivagem proteolítica de muitas proteínas de complemento, com subsequente liberação de pequenos fragmentos na fase líquida, que podem ter efeitos biológicos. Três desses fragmentos liberados são denominados anafilatoxinas. São eles: o C4a, o C3a e o C5a. As características estruturais e funcionais dessas moléculas são descritas em uma excelente revisão do assunto (Ember, 1998). O C3a é um fragmento peptídico de 9 kDa liberado durante a clivagem proteolítica seletiva da cadeia C3α pelo C2a (como um componente da convertase) na ativação das vias clássica e da MBLectina. Também é liberado por clivagem proteolítica de C3 pelo peptídeo Bb enzimaticamente ativo, um componente da C3 convertase da via alternativa. O C4a é um peptídeo de 8,7 kDa liberado mediante clivagem de C4 por $C1s_2$. O C5a é um peptídeo de 11 kDa liberado da cadeia α de C5 mediante clivagem induzida por C2a na C5 convertase das vias clássica e da MBLectina, ou Bb na C5 convertase da via alternativa (e talvez na MBLectina). Em geral, as anafilatoxinas são definidas por seus efeitos biológicos sobre as células musculares lisas, mastócitos, pequenos vasos sanguíneos e leucócitos do sangue periférico. Os efeitos específicos mediados por esses peptídeos incluem desgranulação de mastócitos e basófilos, com liberação subsequente de vários mediadores como a histamina e a serotonina. Além disso, induzem a agregação de neutrófilos humanos, a contração da musculatura lisa, aumentam a permeabilidade vascular e a indução da liberação de tromboxano de macrófagos de cobaias e estimulam a liberação de muco pelas células globosas (Marom, 1985). Um efeito especialmente importante das anafilatoxinas sobre os basófilos é causar vasodilatação via liberação de histamina, ocasionando um aumento do fluxo sanguíneo para os locais de inflamação.

A função do C4a em geral é semelhante à do C3a. Contudo, o C4a é muito menos efetivo em seus efeitos biológicos em uma base molar. O C5a é sem dúvida a anafilatoxina humana mais potente; seu efeito é 200 vezes maior do que o do C3a e 3.000 vezes maior do que o do C4a ao causar contração do músculo liso do íleo de cobaia. Contudo, é preciso notar que a relativa efetividade desses peptídeos é tecido e espécie-específica. Sugeriu-se que o C3a seja efetivo seletivamente na localização de eosinófilos para locais alérgicos, enquanto o C5a teria um efeito sobre muitos outros tipos celulares (DiScipio, 1999).

Além de seu papel como anafilatoxina, o C5a tem muitas propriedades biológicas importantes. Sua ligação a neutrófilos causa um aumento na adesão, na agregação e na indução de uma resposta oxidativa, bem como a liberação de enzimas lisossômicas. Além disso, o C5a é fortemente quimiotático para monócitos e neutrófilos, induzindo a migração das células na direção da fonte de ativação do complemento. Assim, uma reação inflamatória local que ative o complemento pode, portanto, induzir o aumento do fluxo sanguíneo para o tecido e a aderência de neutrófilos ao endotélio local ativado, bem como direcionar a migração de fagócitos para os locais inflamatórios com um gradiente quimiotático. Neutrófilos agregados pelo C5a podem formar êmbolos que seguem para o pulmão, causando alterações na troca pulmonar de gases e até mesmo a morte. Acredita-se que o C5a medeia muito da inflamação nos pulmões causada pela formação de imunocomplexo (Ward, 1997). Em um modelo experimental de sepse em rato, demonstrou-se que o C5a pode bloquear as funções bactericidas dos neutrófilos, quando produzidos em excesso, sugerindo um papel para a ativação de complemento nas altas taxas de mortalidade observadas na sepse (Czermak, 1999).

Os efeitos biológicos das anafilatoxinas são mediados via receptores específicos nas superfícies celulares, descritos na seção sobre receptores de complemento.

Regulação da ativação do complemento

A ativação do complemento, embora crucial para a defesa do hospedeiro, pode acarretar dano tecidual profundo. Portanto, os organismos têm mecanismos de controle interno para: (1) limitar a disseminação excessiva da inflamação, (2) evitar ativação excessiva e (3) proteger as células do hospedeiro contra lesão inadvertida. Um sistema regulador potente, consistindo em proteínas da fase líquida e associadas à membrana, evoluiu para controlar a ativação do complemento em quase todas as etapas da cascata de ativação (Tab. 46.2).

Reguladores da fase líquida

O controle do primeiro componente da via clássica (C1) é mediado pelo inibidor de C1 (C1-Inh), que bloqueia a autoativação de C1, sua ativação na fase líquida e com ativadores fracos da via clássica, mas não na maioria dos imunocomplexos (Doekes, 1983). Acredita-se que o C1-Inh tem capacidade de deslocar todo o complexo $C1qr_2s_2$ das imunoglobulinas com baixa afinidade de ligação pelo C1q (Chen, 1998) e alvos sensibilizados com baixas doses de IgG humana (Chen, 1998). *In vitro*, o C1-Inh inativa as proteases serinas associadas à lectina ligadora de manana (MASP) (Matsushita, 1996). A atividade do C4b é regulada pelo fator I (antigamente conhecido como inativador C3b/C4b) (Fries, 1987). O fator I cliva a cadeia α do C4b para gerar dois fragmentos, C4c e C4d, permanecendo o último ligado à célula. Para proteólise, é necessário um cofator, a proteína ligadora de C4 (C4BP), uma proteína de 570 kDa que também pode ligar-se a partículas ligadas e C4b da fase líquida e deslocar o C2a da C3 convertase da C4b2a da via clássica (Gigli, 1979). Por seu papel crucial na ativação das três vias do complemento, C3 está sob rígido controle. C3b e $C3(H_2O)$ da fase líquida são rapidamente inativados pelo fator I, que cliva três ligações peptídicas na cadeia α de C3b (Davis, 1982), gerando assim uma forma inativa da molécula, iC3b, que é incapaz de aproveitar C5 ou o fator B. Essa clivagem medida pelo fator I requer o fator H como cofator. O fator H é uma proteína de 150 kDa que se liga ao C3b e tem a atividade de decaimento acelerada na direção da C3 convertase da via alternativa, além de sua atividade como cofator para a clivagem de C3b mediada pelo fator I. Além de regular o C3b na fase líquida, o fator H liga-se ao C3b ligado à célula e dispara a clivagem pelo fator I, limitando assim a ativação da via clássica (Ollert, 1995). Assim que é clivado em iC3b, que permanece ligado à superfície-alvo, C3b pode interagir com o receptor de complemento do tipo 3 (CR3) presente nas células fagocíticas e promover a fagocitose.

Existem vários inibidores da fase líquida nos componentes terminais do complemento que impedem a inserção do complexo de ataque à membrana nas membranas celulares. A proteína S, também chamada vitronectina, liga-se ao complexo C5b-7, o que impede sua inserção na membrana celular (Podack, 1977) e inibe a polimerização de C9 (Johnson, 1994). A proteína S liga-se a C5b e C8 dentro do complexo sC5b-9 e também ao receptor C1q (Lim, 1996). Embora o papel exato da proteína S na regulação da ativação do complemento seja incerto, Peake et al. mostraram que ela forma um complexo com sC5b-9 quando o complemento é ativado em coelhos, e esse complexo ainda tem a capacidade de bloquear a lise mediada por C9 de eritrócitos de carneiro sensibilizados que contenham os componentes 1 a 7 do complemento (Peake, 1996). A clusterina (também conhecida como Sp-40 ou apolipoproteína J) é outro inibidor da fase líquida dos componentes terminais do complemento. Como a vitronectina, a clusterina impede a inserção do complexo C5b-7 na membrana celular (Choi, 1989) e regula o complexo de ataque à membrana nos níveis de C5b-7 e C9 (Berge, 1997).

Proteínas reguladoras associadas à célula

A regulação da ativação do complemento precisa ocorrer na superfície das células do hospedeiro para limitar a lesão inadvertida a tais células. Muitas dessas proteínas reguladoras também agem como receptores de complemento. Uma dessas proteínas é o receptor de complemento do tipo 1 (CR1), que se liga a C4b e a C3b ativados e serve como cofator para as clivagens mediadas pelo fator I (ver mais detalhes na seção a seguir). O controle de C4b e de C3b depositados na membrana celular também é conseguido pela proteína cofator de membrana (MCP, CD46), expressa em quase todas as células, com a notável exceção dos eritrócitos, e serve como cofator para a clivagem de C4b e C3b em C4c e C4d, e iC3b, respectivamente, mediada pelo fator I (Seya, 1986, 1989).

Tabela 46.2 Proteínas reguladoras do complemento

Proteína	Peso molecular (kDa)	Alvo	Mecanismo de ação
Fases líquidas			
Inibidor de C1	105	C1	Dissocia o complexo C1 ao ligar C1r e C1s
Fator H	150	C3b	Cofator para inativação de C3b pelo fator I
Proteína ligadora de C4	550	C4	Cofator para inativação de C4b pelo fator I
Proteína S (vitronectina)	84	C5b-7	Inibe a inserção de CAM nas membranas celulares
Clusterina	70	C5b-7	Inibe a inserção de CAM nas membranas celulares
Fator J	20	C1, C3, B	Inibe a formação do complexo C1, inibe a clivagem de C3 por Bb
Associada à célula			
CR1	190*	C3b, C4b	Dissociação das convertases de C3/C5, cofator para a inativação de C3b e C4b pelo fator I
DAF (CD55)	70	C3bBb, C4b2a	Dissociação das convertases de C3/C5
MCP (CD46)	45–70	C3b (C4b)	Cofator para a inativação de C3b pelo fator I
CD59 (protectina)	18-20	C8, C9	Inibição da formação do CAM
HRF	65	C8, C9	Inibição da formação do CAM

* Isoforma de CR1 mais comum.

CR1 = receptor de complemento do tipo 1; DAF = fator acelerador do decaimento; HRF = fator de restrição homólogo; MCP = cofator proteína da membrana.

Outra proteína associada à membrana celular que controla a ativação do complemento no nível de C3 e C5 convertase é o fator acelerador do decaimento (DAF, CD55). O DAF expressa-se em todas as células circulantes, endoteliais e numerosas epiteliais (Morgan, 1994b) e acelera o decaimento de C3 e C5 convertase das vias clássica e alternativa.

O controle regulador de componentes terminais do complemento do complexo de ataque à membrana é conseguido pelo fator de restrição homólogo (HRF) ou proteína de ligação a C8 e pelo CD59 (também conhecido como protectina, HRF-20, inibidor da lise reativa da membrana e P-18). O HRF expressa-se em eritrócitos, plaquetas, linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos e monócitos (Morgan, 1994b), em que se liga a C8 e inibe a polimerização de C9 (Morgan, 1994b). A segunda proteína reguladora, CD59, é encontrada em todas as células circulantes, endoteliais, epiteliais, espermatozoides, podócitos glomerulares (Morgan, 1994b) e algumas células do sistema nervoso central (Morgan, 1996). A CD59 liga-se à cadeia β de C8 e ao domínio b de C9 (Chang, 1994), inibindo a formação de CAM nas células do hospedeiro. Por sua ligação glicosil fosfatidilinositol às membranas celulares, DAF, HRF e CD59 estão ausentes das células de pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) (Volanakis, 1988).

Receptores de complemento

Os receptores que se ligam a componentes ativados do complemento foram descritos em vários tipos celulares. Eles controlam os efeitos

biológicos de peptídeos na ativação do complemento e estão associados ainda a várias outras funções celulares (Tab. 46.3). Os receptores de complemento mais bem estudados são os que se ligam aos fragmentos da degradação de C3.

O receptor de complemento do tipo 1 (CR1, CD35, C3b/C4b) é uma glicoproteína de cadeia única que se expressa em eritrócitos, fagócitos mononucleares, eosinófilos, linfócitos B, um subconjunto de linfócitos T, podócitos glomerulares, células dendríticas foliculares (Ahearn, 1998) e astrócitos (Morgan, 1996). Ele se liga tanto a C3b quanto a C4b, em menor extensão a iC3b e também a C1q (Klickstein, 1997). O CR1 serve como cofator para a clivagem de C3b, iC3b e C4b e tem a atividade de acelerar o decaimento das convertases de C3 e C5 das vias clássica e alternativa. Um dos principais papéis fisiológicos do CR1 está relacionado com a fagocitose de partículas cobertas por complemento (partículas opsonizadas). Acredita-se que o CR1 do eritrócito tem um papel principal no sequestro de complexos imunes que contêm C3b e iC3b, removendo-os do plasma e facilitando sua transferência para locais de degradação no fígado e no baço (Birmingham, 1995). A expressão diminuída do CR1 eritrocitário pode estar associada à maior suscetibilidade a formas crônicas de infecção (Teixeira, 2001).

Um receptor para o fragmento C3d de C3 é encontrado nas células B humanas, linhagens de células B, células dendríticas foliculares, algumas células T periféricas, algumas linhagens de células T, timócitos (Ahearn, 1998) e astrócitos (Morgan, 1996), sendo denominado CR2 (CD21). O CR2 tem a capacidade de atuar como cofator para a clivagem de iC3b ligado a alvos mediada pelo fator I (Mitomo, 1987) e é o receptor para o vírus de Epstein-Barr nas células B, causador da mononucleose infecciosa (Fingeroth, 1984). Acredita-se que a principal função do CR2 seja a regulação das respostas imunes da célula B ao antígeno (Carroll, 1998b).

Um terceiro receptor de complemento, CR3 (também conhecido como Mac-1, CD11b/CD18), é um membro da família da integrina leucocitária β_2 de moléculas de adesão. O CR3 expressa-se em fagócitos mononucleares, granulócitos, células destruidoras naturais (NK, de *natural killer*) (Ahearn, 1998) e células microgliais (Morgan, 1996), ligando-se a iC3b, a C3b e a C3d (Brown, 1991). Nos fagócitos, o CR3 dispara o processo fagocítico de maneira paralela ao CR1. Outro papel importante do CR3 consiste na adesão de monócitos e neutrófilos a células endoteliais via interação com seu ligante, a molécula de adesão intracelular do tipo 1 (ICAM-1). Isso permite o acúmulo de fagócitos nos locais de lesão tecidual, onde as células endoteliais ficam ativadas. O CR3 pode atuar como receptor para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1 e a infecção por *Neisseria gonorrhoeae* das células dendríticas foliculares e epiteliais cervicais, respectivamente (Edwards, 2001; Batjay, 2004).

O receptor de complemento do tipo 4 (CR4, CD11c/CD18) é uma glicoproteína que compartilha características com o CR3. Também é um membro da família integrina de moléculas de adesão e se expressa em células mieloides, dendríticas, NK, B ativadas, algumas células T ativadas, plaquetas (Ahearn, 1998) e células microgliais (Morgan, 1996). O CR4 liga-se a iC3b e, em menor extensão, a C3b (Brown, 1991). O papel exato do CR4 em termos de ativação do complemento é desconhecido, mas, como essa glicoproteína é uma molécula de adesão, pode servir para "ajudar" na adesão de neutrófilos ao endotélio durante processos inflamatórios (Sengeløv, 1995).

Um receptor para a anafilatoxina C5a (C5aR) expressa-se em neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos, plaquetas, mastócitos, células do parênquima hepático, da musculatura lisa vascular, endoteliais vasculares do pulmão e do umbigo, epiteliais dos brônquios e alvéolos, astrócitos, células microgliais (Ember, 1998) e células T humanas (Nataf, 1999). O C5a ligado ao C5aR induz uma variedade de ações, inclusive quimiotaxia de células inflamatórias, desgranulação de mastócitos, produção de radicais de oxigênio, promoção da adesão celular, produção de leucotrienos e prostaglandinas em neutrófilos e eosinófilos, além da indução de proteínas da fase aguda, citocinas e anticorpos (Ember, 1998).

Tabela 46.3 Receptores celulares para fragmentos de proteínas do complemento

Receptor	Peso molecular (kDa)	Ligante	Papel fisiológico
CR1	190 (isoforma mais comum)	C3b, C4b, iC3b	Fagocitose, depuração do imunocomplexo
CR2	140	C3d, C3dg, iC3b	Ativação da célula B
CR3	165 (cadeia α) 95 (cadeia β)	iC3b, C3d, C3b	Fagocitose, adesão celular
CR4	150 (cadeia α) 95 (cadeia β)	iC3b, C3b	Adesão celular
C1qRp*	126	C1q, MBL, SP-A	Fagocitose
C3aR	48	C3a	Quimiotaxia, desgranulação de mastócitos do tipo seroso, aumento da permeabilidade vascular
C5aR	43	C5a, C5a desArg	Quimiotaxia, desgranulação de mastócitos do tipo seroso, adesão celular, aumento da permeabilidade vascular

* Outros receptores de C1q também foram descritos.

CR1 = receptor de complemento do tipo 1; C1qRp = receptor para a região de colágeno de C1q; CR2 = receptor de complemento do tipo 2; CR3 = receptor de complemento do tipo 3; C3aR = receptor de C3a; CR4 = receptor de complemento do tipo 4; C5a desArg = ausência do resíduo de arginina terminal em C5a após inativação pela carboxipeptidase-N; C5aR = receptor de C5a; MBL = lectina ligadora de manana; SP-A = proteína A surfactante.

Biossíntese do complemento

Estima-se que cerca de 90% dos componentes plasmáticos do complemento sejam sintetizados no fígado e constituam proteínas da fase aguda (i. e., sua síntese pelo fígado aumenta durante as reações inflamatórias para elevar os níveis plasmáticos). O hepatócito produz a maioria dos componentes do complemento, com exceção de C1q, fator D, properdina e C7 (Morgan, 1997a). O C1q parece ser sintetizado por células epiteliais, monócitos/macrófagos e fibroblastos. A principal fonte de fator D é o adipócito. A properdina é sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos, com alguma síntese que ocorre em linfócitos e granulócitos. A maioria do C7 plasmático parece originar-se de monócitos e macrófagos, embora se tenha demonstrado que os neutrófilos armazenam C7. Monócitos, macrófagos, células dos tecidos sinoviais e astrócitos têm a capacidade de sintetizar todos os componentes das vias clássica e alternativa. Isso pode ter implicações importantes na inflamação de um tecido específico, onde um mecanismo de defesa localizado precisa estar presente para eliminar partículas estranhas eficientemente. A produção de componentes do complemento em geral sintetizados pelos hepatócitos ou por células extra-hepáticas costuma requerer estímulos gerados em reações inflamatórias como interleucina-1α, interleucina-6 ou interferon-γ. Uma boa descrição da regulação da síntese de proteína de complemento por várias células é encontrada em outro texto (Colten, 1998).

Genética do complemento

A maioria dos componentes do complemento é hereditária autossômica dominante. Os genes que codificam as proteínas do complemento, receptores e moléculas reguladoras foram clonados e denominados de acordo com a localização cromossômica (Tab. 46.1). É interessante o fato de que há uma ligação para inúmeros genes que codificam moléculas relacionadas com complemento. Tais grupos de ligação incluem os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe III (C2, fator B e C4), genes para os reguladores da ativação do complemento (proteína de ligação ao C4, CR1, CR2, DAF, MCP e fator H), e genes codificadores de proteínas do complexo de ataque à membrana (C6, C7 e C9) (Schneider, 1999). As moléculas dentro de cada um desses três grupos compartilham homologia estrutural, sugerindo que as proteínas de complemento podem ter surgido da duplicação gênica de um número limitado de genes ancestrais. Quase todas as proteínas relacionadas com complemento exibem polimorfismo (i. e., existem múltiplos alelos com frequência variável em humanos). O componente do complemento mais polimórfico é C4, com mais de 35 alelos identificados

(Schneider, 1997). Mutações pontuais, inserções ou deleções de ácidos nucleicos em geral estão associadas a deficiências de proteínas de complemento (Schneider, 1997). O polimorfismo de proteínas de complemento é avaliado tanto por análise fenotípica quanto genotípica. Os detalhes desses métodos não serão discutidos neste capítulo, recomendando-se ao leitor consultar o Capítulo 48 e outros textos sobre o assunto (Schneider, 1997; Mauff, 1996).

Complemento e imunidade adquirida

Cada vez fica mais claro que o sistema complemento tem um papel importante no estabelecimento das respostas de imunidade adquirida (Carroll, 2004). Respostas de anticorpo deprimidas à estimulação por antígeno foram observadas em animais com depleção transitória de C3 (Pepys, 1974), animais com deficiências genéticas de C2, C4 ou C3 (Ochs, 1983; Böttger, 1985; O'Neil, 1988) e em pacientes com deficiência genética de C2, C4, C3 ou CR3 (Ochs, 1986). O desenvolvimento recente de camundongos *knockout* sem C4, C3 ou receptores de complemento dos tipos 1 e 2 permitiu compreender melhor o papel das respostas de anticorpo a antígeno. Tal efeito foi revisto recentemente (Carroll, 1998a, 1998b; Fearon, 1998).

O complemento pode influenciar a resposta de anticorpo a um antígeno de várias maneiras. O CR2 está presente na superfície de células B em associação a CD19 e TAPA-1. Quando há ligação simultânea do receptor de célula B ao antígeno e CR2 (como ocorreria quando o antígeno está em complexo com C3d), o limiar para ativação da célula B cai de maneira acentuada. O complemento também ajuda na captura dos complexos imunes por células dendríticas foliculares no baço, o que facilita a formação de centros germinativos onde as células B adquirem memória do fenótipo. A ausência de um dos primeiros componentes da via clássica da ativação de complemento ou de CR1 e/ou de CR2 pode resultar em respostas imunes muito comprometidas ao antígeno e, em alguns casos, na impossibilidade de montar uma resposta secundária de anticorpo. O complemento pode ainda desempenhar um papel na geração de células B positivas para CD5, o que origina anticorpos "naturais" (Carroll, 1998a). A própria ativação da célula B em resposta a um desafio antigênico também parece depender, em alguns casos, do anticorpo "natural" e da ativação de complemento (Boes, 1998; Lutz, 1999). É interessante notar que o complemento parece importante na manutenção da tolerância da célula B a autoantígenos. Isso parece depender do componente C4 do complemento, bem como de CR1 e CR2 (Prodeus, 1998). Por fim, o complemento (especialmente C3) ajuda na geração de uma resposta imune adquirida a antígeno via células apresentadoras de antígeno (APCs). A presença de produtos da clivagem de C3 sobre o antígeno facilita a captação do antígeno pelas APCs (células B e outras APCs profissionais que expressam CR1 e/ou CR2), aumentando assim a eficiência da apresentação de antígeno às células T, com subsequentes respostas mediadas por célula T (Boackle, 1998; Kerekes, 1998).

Deficiências genéticas de complemento

Deficiências de complemento controladas geneticamente são muito raras, mas interessam porque nos permitem determinar o papel dos componentes do complemento em vários fenômenos biológicos e doenças. Em geral, a ausência de um componente de complemento segue os princípios da genética mendeliana e costuma ser transmitida como um traço autossômico recessivo. Pacientes heterozigotos tendem a ter metade dos níveis normais de complemento ou menos, e os homozigotos (com deficiência) têm pouca ou nenhuma atividade detectável do componente do complemento. As deficiências são conhecidas por cada proteína ligada à ativação do complemento (Tab. 46.4). A incidência estimada de deficiência completa de complemento é de 0,03% da população geral (Wen, 2004), porém, com a descoberta da via MBL da ativação de complemento, veio o achado surpreendente de que a deficiência de MBL sérica é razoavelmente comum. Estima-se que aproximadamente 5% da população tenham uma das três mutações genéticas reconhecidas que levam à deficiência de MBL (Sumiya, 1997). Há relato de uma correlação entre a deficiência de MBL e infecções do trato respiratório superior, especialmente entre os 6 e 18 meses de idade, demonstrando a importância da via MBLectina no início da infância (Turner, 1996). Um estudo recente sugeriu que genes variantes de MBL poderiam estar associados até a um terço das infecções meningocócicas em crianças (Hibberd, 1999). Há relatos de que infusões de MBL purificada corrigem o defeito e a suscetibilidade às infecções em crianças com deficiências de MBL (Valdimarsson, 1998). Além disso, há uma sugestão de que a deficiência de MBL acarreta doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Turner, 1996) e é um fator de risco para abortos recorrentes (Christiansen, 1999).

Outro aspecto da deficiência de complemento, em especial nos primeiros componentes da via clássica (C1, C4, C2), é uma associação a doenças autoimunes como o LES. Como o complemento é importante na depuração de imunocomplexos da circulação, pode ser que a deficiência de um componente inicial do complemento resulte na manipulação imprópria dos imunocomplexos, com seu acúmulo nos tecidos, como nos rins. A deficiência do inibidor de C1 causa angioedema hereditário, doença que se caracteriza por episódios recorrentes de edema subcutâneo e submucoso. Tal deficiência pode ser hereditária ou adquirida após o desenvolvimento de autoanticorpos contra o inibidor de C1. E recentemente foi descrita uma deficiência do fator H decorrente de uma nova mutação genética homozigota no fator H em uma criança com 8 meses de idade, que estava associada a microangiopatia trombótica e, por fim, a insuficiência renal (síndrome hemolítico-urêmica atípica) (Licht, 2005).

Avaliação da atividade do complemento na doença

O complemento promove inflamação ou dano tecidual durante a resposta imune e desempenha um papel importante na patogênese de algumas doenças. Na última situação, ele costuma ser ativado por um anticorpo anormal (autoanticorpo), um imunocomplexo ou material estranho. Para rastrear a atividade da doença nesses casos, costuma ser necessário medir os níveis séricos de complemento, como no caso do LES, em que C3 ou C4 séricos diminuídos têm correlação com atividade patológica. Em tais circunstâncias, frequentemente são empregadas técnicas nefelométricas (ver adiante em "Ensaios para Complemento").

É importante reconhecer que as estimativas séricas de complemento dão apenas uma ideia de um processo dinâmico que envolve taxas variáveis de consumo e produção de complemento. Muitas das proteínas de complemento comportam-se como reagentes de fase aguda, e seus níveis séricos aumentam extremamente em alguns estados inflamatórios, ao passo que caem de forma acentuada com o catabolismo em outras condições, como estados autoimunes. Dependendo da taxa de produção e consumo de complemento, um nível sérico normal pode estar associado a dano tecidual da mesma forma que um nível sérico diminuído. Por exemplo, pacientes com cirrose biliar têm aumento da taxa catabólica de C3, tendo-se sugerido que o C3 pode ter um papel no desenvolvimento dessa doença. Apesar disso, o nível de C3 no soro de pacientes com cirrose biliar quase sempre está elevado. Nesse caso, o aumento da síntese obscurece o do catabolismo. Também é preciso reconhecer que a função do complemento nos vários compartimentos corporais pode diferir. Os níveis séricos de complemento em pacientes com artrite reumatoide soropositiva podem estar normais ou elevados, mas no compartimento articular, onde o dano é maior, os níveis de complemento no líquido articular podem estar gravemente reduzidos.

Vários pesquisadores tentaram identificar qual via de ativação do complemento predomina na mediação do dano tecidual ou na queda dos níveis de complemento e uma doença ou outra, estabelecendo o "perfil do complemento". A abordagem mais simples desse problema examina os níveis de complemento e admite que é mais provável ocorrerem níveis baixos de um determinado componente de uma das vias da ativação do complemento quando a via está ativada. Portanto, se um paciente tem níveis baixos de C3 e C4 e níveis normais do fator B, é provável que a via clássica esteja envolvida. Se um paciente tem níveis baixos de C3, fator B e properdina, e níveis normais de C4, é mais provável a ativação da via alternativa. Dessa forma, a determinação dos níveis de um número limitado de componentes pode fornecer muita informação.

Um avanço importante nessa área é o uso do ELISA para detectar complexos estáveis formados no soro durante a ativação do comple-

Tabela 46.4 Deficiências hereditárias de complemento e proteínas relacionadas com o complemento

Proteína	Padrão de herança	Principais correlações clínicas*
Comum a todas as vias		
C3	Autossômico recessivo	Infecções piogênicas recorrentes, glomerulonefrite
Via clássica		
C1q	Autossômico recessivo	Glomerulonefrite, LES
C1r	Autossômico recessivo	Glomerulonefrite, LES
C1s	Autossômico recessivo	Glomerulonefrite, LES
C4†	Autossômico recessivo	LES
C2†	Autossômico recessivo	LES, LED, artrite reumatoide juvenil, glomerulonefrite
Via alternativa		
Fator B	Autossômico recessivo	Infecção por *Neisseria meningitidis*
Fator D	Autossômico recessivo	Infecções piogênicas recorrentes
Properdina	Ligado ao X	Infecções piogênicas recorrentes, meningococcemia fulminante
Via MBLectina		
MBL	Autossômico dominante	Infecções recorrentes
Complexo de ataque à membrana		
C5	Autossômico recessivo	Infecções recorrentes disseminadas por *Neisseria*, LES
C6	Autossômico recessivo	Infecções recorrentes disseminadas por *Neisseria*
C7	Autossômico recessivo	Infecções recorrentes disseminadas por *Neisseria*, doença de Raynaud
C8 (cadeias β ou α–γ)	Autossômico recessivo	Infecções recorrentes disseminadas por *Neisseria*
C9	Autossômico recessivo	Nenhuma
Proteínas de controle da fase líquida		
C1inh	Autossômico dominante ou adquirido	Angioedema hereditário, doenças autoimunes‡
C4bp	Autossômico recessivo	Angioedema, síndrome semelhante à de Behçet
Fator I	Autossômico recessivo	Infecções piogênicas recorrentes
Fator H	Autossômico recessivo	Infecções piogênicas recorrentes, glomerulonefrite
Proteínas ligadas à célula		
CR1	Autossômico recessivo§	Associação entre baixa expressão eritrocitária e LES
CR3	Autossômico recessivo	Infecções piogênicas recorrentes, leucocitose
DAF/CD59/HRF	Adquirido	Hemoglobinúria noturna paroxística

* Notar que algumas pessoas com deficiências de complemento, especialmente C2 e componentes do complexo de ataque à membrana, estão clinicamente bem. Um número substancial de pacientes com defeitos em C5-C9 tem doença autoimune. As deficiências de C1-C9 estão associadas a CH_{50} de 0. As deficiências de C1, C4 e C2 estão associadas ao LES, e os pacientes em geral têm preparados negativos para o LE. As deficiências de C3-C9 estão associadas a atividade bactericida sérica ausente ou baixa. A deficiência de C3 ou C5 está associada à atividade quimiotática sérica ausente ou diminuída e pode estar associada à ausência de resposta leucocitária à infecção.

† A deficiência em cada gene de *C4* (*C4A* e *C4B*) é conhecida como 'q0', para quantidade zero. Tal deficiência é designada C4Aq0 ou C4Bq0. Os pacientes com tais deficiências apresentam uma incidência acima do normal de doenças autoimunes. Indivíduos com deficiência heterozigota de C2 também apresentam maior incidência de doenças autoimunes.

‡ Aproximadamente 85% dos casos envolvem alelos silenciosos, e 15% alelos que codificam a variante adquirida da proteína inibidora disfuncional C1. No angioedema hereditário, o nível de C1 é normal ou está reduzido, o de C3 é sempre normal, e o de C4 está reduzido. Na doença adquirida, os níveis de C1 e C4 estão reduzidos, o do inibidor antigênico C1 em geral é normal ou alto, e o do inibidor funcional C1 é muito baixo.

§ A homozigosidade para uma expressão numérica baixa (não ausente) de CR1 nos eritrócitos é detectável *in vitro* e pode estar associada ao LES. Um defeito adquirido no número de CR1 também pode ser operacional.

Níveis baixos, mas não ausentes, de CR3 leucocitário são detectáveis em ambos os genitores da maioria das crianças com deficiência de CR3.

LED = lúpus eritematoso disseminado; MBL = lectina ligadora de manana; LES = lúpus eritematoso sistêmico.

mento. Esses ensaios são altamente sensíveis e podem demonstrar rapidamente que a via do complemento está ativada em várias doenças (Morgan, 1994a).

À ativação, muitas proteínas do complemento expressam novos antígenos (neoantígenos) que não são revelados na proteína plasmática nativa. O neoantígeno presente no CAM, mas não nos componentes terminais nativos, talvez seja o mais interessante. Existe anticorpo para esse neoantígeno e ele tem sido usado para se estudar o nível de neoantígeno por imunofluorescência, bem como pelo ELISA (Falk, 1983; Sanders, 1985). O nível do neoantígeno está elevado no sangue e no líquido espinhal em muitos pacientes com ativação do complemento em andamento (Sanders, 1986). Além disso, está presente nos tecidos, em locais de deposição terminal do complexo. Por exemplo, está no tecido da lesão nos glomérulos de pacientes com glomerulonefrite (Falk, 1983) e na pele lesada em locais de LES ativo (Biesecker, 1982). Ao contrário do C3 depositado na pele normal de pacientes com LES e um teste positivo de faixa para lúpus, o neoantígeno do CAM só é encontrado nas lesões.

O complemento em estados patológicos

Doenças reumáticas

A deficiência de um componente inicial do complemento (C1, C4 ou C2) em geral está associada a doença autoimune (Wen, 2004). A doença reumatológica que foi avaliada de maneira mais extensa em termos de contribuição do complemento para a atividade patológica é o LES (Agnello, 1986; Atkinson, 1986; Liu, 2004). A incidência de uma deficiência de componentes do complemento C1q, C4 e C2 é de 90%, 75% e 15%, respectivamente, naqueles com LES (Pickering, 2000); a incidência de LES também aumenta naqueles com deficiência de MBL (Kilpatrick, 2002). Grandes quantidades de imunocomplexos são formadas nessa doença, tanto circulantes quanto ligados a tecidos. Esses imunocomplexos ativam o complemento, e os produtos da ativação do complemento contribuem para a inflamação em andamento. Os níveis de C3 e C4 em geral estão reduzidos no LES e, na maioria dos casos, são encontrados níveis baixos em pacientes com doença ativa. Alguns

sugerem que um nível baixo de C4 seja o melhor indicador de doença ativa em andamento. Entretanto, há pacientes com doença ativa que exibem níveis normais de C4. De acordo com outros, o nível de sC5b-9 circulante ou neoantígeno do CAM poderia atuar como um melhor indicador de doença ativa (Gawryl, 1988). Conforme discutido antes, o complemento parece desempenhar um papel essencial na depuração de imunocomplexos da circulação, em particular aqueles que contêm isótipos de IgM ou IgG ativados por complemento. A deposição de C3b no imunocomplexo resulta da ativação do complemento, que permite a interação com células que possuem um receptor C3b (CR1). Após ligação com eritrócitos via CR1, os imunocomplexos ficam impedidos de difundir-se do plasma para os tecidos, onde poderiam causar dano. Os eritrócitos que trazem imunocomplexos circulam em direção ao fígado, onde os imunocomplexos são removidos por um processo que não encurta a meia-vida do eritrócito (Cornacoff, 1983; Birmingham, 1995). Nas doenças em que o complemento é ativado e esses produtos imunologicamente ativos são formados na circulação, o número de CR1 por eritrócito é diminuído. Pode ser que isso resulte da remoção de algum CR1 após a remoção do imunocomplexo do eritrócito no fígado (Ross, 1985). Além do LES, há relatos de que os eritrócitos de pacientes com doença crônica da aglutinina fria, HPN, anemia hemolítica autoimune, síndrome de Sjögren e pneumonia por micoplasma têm pouco CR1, sugerindo que os depósitos imunes foram removidos dos eritrócitos nessas doenças (Ross, 1985; Atkinson, 1986).

As proteínas do complemento agem como reagentes da fase aguda, e seus níveis podem não estar reduzidos mesmo nas situações em que ocorre ativação do complemento. São encontrados níveis séricos normais ou elevados de complemento na artrite reumatoide juvenil, na artrite palindrômica, na pseudogota, na gota, na síndrome de Reiter e na artrite gonocócica. Ao mesmo tempo, mostrou-se que os níveis de complemento são reduzidos no líquido articular em várias outras condições rematológicas, inclusive a artrite reumatoide. Acredita-se que a atividade hemolítica total reduzida do complemento (CH_{50}; ver adiante em "Ensaios para complemento") e a presença de produtos de clivagem de C3 e fator B representem a ativação intra-articular no líquido sinovial da maioria dos pacientes com artrite reumatoide, LES, pseudogota, gota, síndrome de Reiter e artrite gonocócica. Não ocorre o mesmo com o líquido obtido de pacientes com artrite degenerativa.

Angioedema hereditário

O angioedema hereditário é uma condição potencialmente fatal, assinalada por edema submucoso e subcutâneo, não pruriginoso e não eritematoso, que em geral resolve-se em 48 a 72 horas, mas, apesar disso, pode ser fatal quando acomete a mucosa da laringe. A causa do angioedema hereditário é uma deficiência heterozigota de C1-Inh. Como o C1-Inh regula vários componentes das vias de coagulação, complemento e geração de cininas, é difícil determinar a via realmente envolvida na gênese dos episódios de angioedema hereditário. Foram identificados vários tipos de angioedema hereditário, incluindo o tipo I, em que os pacientes têm um nível reduzido (30% ou menos) de C1-Inh funcional ou antigênico, e um tipo II em que, embora presente em níveis normais, a atividade da proteína C1-Inh está reduzida ou ausente (Wen, 2004).

Doenças infecciosas

Conforme mencionado antes e evidenciado por achados clínicos em pacientes com deficiências de complemento controladas geneticamente, o sistema complemento desempenha um papel crucial na defesa contra microrganismos. Pacientes com septicemia por Gram-negativos e infecções piogênicas em geral têm deficiência de C3, opsonina primária ou componentes da via alternativa. O complemento poderia estar envolvido no dano tecidual associado à infecção crônica. Sabe-se que os pacientes com hepatite infecciosa HbsAg-positiva apresentam uma queda precoce no C3 sérico, que depois retorna ao normal. Pode ser que isso esteja associado a sinais de doença por imunocomplexo (i. e., artralgia). De maneira semelhante, o complemento parece ter um papel importante em muitas infecções parasitárias, inclusive a leishmaniose, a tripanossomíase, a giardíase e a malária. Nos pacientes com infecções recorrentes por *N. gonorrhoeae* ou *Neisseria meningitidis*, pode-se suspeitar de uma deficiência de CAM ou properdina. Uma discussão abrangente das interações entre o sistema complemento e parasitas, bactérias e vírus pode ser encontrada em revisões excelentes (Frank, 1988; Fishelson, 1994; Moffitt, 1994; Kozel, 1996; Cooper 1998). Todavia, é importante reconhecer que os níveis séricos de complemento em geral não são um índice confiável de atividade patológica nessas condições.

Estudou-se o papel do complemento na síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), uma ocorrência comum em pacientes com traumatismo ou sepse graves. Há evidência de ativação maciça de complemento nesses pacientes, sugerindo que bactérias e produtos bacterianos ativam o complemento (Hammerschmidt, 1980). Tanto a via clássica quanto a alternativa parecem ser ativadas (Langlois, 1988). Fatores inflamatórios como o fator ativador de neutrófilos e o C5a são formados. Há evidência de que os neutrófilos infiltram o pulmão, e acredita-se que os produtos oxidativos dos neutrófilos sejam responsáveis por grande parte do dano pulmonar que ocorre. Evidências recentes identificaram um possível papel para o complemento, por meio de seus receptores, na infecção de células dendríticas foliculares pelo HIV (Doepper, 2002; Stoiber, 2005). Um papel semelhante para o CAM foi postulado nas doenças priônicas (ver adiante em "Doenças neurológicas").

Doenças renais

O complemento parece ter importância fundamental no dano glomerular em muitas glomerulonefrites (West, 1998). Isso em geral é demonstrado pela deposição de C3 ou outros componentes, dentro da membrana basal glomerular ou perto dela. Além disso, o CAM foi reconhecido nos glomérulos lesados em pacientes com glomerulonefrite e LES. Mostrou-se que pacientes com doença do soro devida a imunocomplexos na circulação têm lesão glomerular. À análise sérica, esses pacientes apresentam ativação da via clássica ou da alternativa, ou ambas. Tradicionalmente, acreditava-se que os complexos eram depositados nos glomérulos à medida que filtravam o plasma que continha imunocomplexos. Uma vez depositados, esses complexos ativam o complemento. Um ponto de vista alternativo é que os anticorpos contra estruturas glomerulares formam imunocomplexos no rim, que então ativam o complemento, causando dano local (Daha, 1979). Embora os anticorpos contra estruturas da membrana basal glomerular sem dúvida tenham importância na síndrome de Goodpasture, seu papel geral na glomerulonefrite é mais questionável. O papel na doença intersticial e tubular é menos claro, porém há quem acredite que o complemento também funcione nesses distúrbios. É interessante notar que, especialmente em alguns pacientes com uma forma rara de glomerulonefrite (membranoproliferativa, tipo II), com níveis muito baixos de C3, uma proteína denominada fator nefrítico C3 (C3NeF ou NF_a) estabiliza a C3 convertase da via alternativa. Esse fator é um autoanticorpo direcionado contra Bb que estende mais de 10 vezes a meia-vida da C3 convertase da via alternativa (Daha, 1979, 1976). A C3NeF parece proteger a C3 convertase da via alternativa contra a dissociação do decaimento pelo fator H (Fearon, 1980). Acredita-se que a C3NeF seja responsável pelos níveis muito baixos de C3 presentes nesses pacientes, mas não que tenha um papel central no desenvolvimento da nefrite. Os componentes C4, C3 e C1q são pesquisados rotineiramente nos glomérulos de biópsias renais por meio da microscopia por fluorescência, como parte da avaliação de doença glomerular.

Doenças dermatológicas

Acredita-se que o complemento desempenhe um papel no dano tecidual em andamento em uma variedade de doenças dermatológicas, que incluem o penfigoide bolhoso, o penfigoide gestacional, o penfigoide cicatricial, a epidermólise bolhosa adquirida, a dermatite herpetiforme e o pênfigo vulgar (Yancey, 1998). É preciso notar que os níveis séricos de complemento em geral estão normais ou elevados nesses estados inflamatórios, e a importância do complemento em tais condições é sugerida por análise por imunofluorescência de biópsias teciduais e estudos com o líquido da bolha. Gammon et al. (1984) desenvolveram um modelo *in vitro* útil para o estudo de distúrbios cutâneos mediados por anticorpo antimembrana basal. Esses autores mostraram de forma conclusiva que o C5a é um elemento importante na patogênese do penfigoide bolhoso e da epidermólise bolhosa adquirida. O C5a age como um fator de atração química necessário para o influxo de neutrófilos para os locais de dano tecidual subsequente nessas doenças.

Doenças hematológicas

Em muitos tipos de anemia hemolítica autoimune, o complemento desempenha um papel importante na opsonização de eritrócitos, levando à sua depuração por células do sistema reticuloendotelial. No entanto, mesmo nos casos em que o complemento está nitidamente envolvido, seus níveis séricos em geral são normais. O complemento é particularmente importante na depuração de células cobertas com autoanticorpos IgM reativos ao frio com especificidade anti-I. Esses autoanticorpos (aglutininas frias) estão associados a distúrbios linfoproliferativos após infecções ou podem ser achados isolados, especialmente em idosos. Em geral, as aglutininas frias ligam-se otimamente a eritrócitos a temperaturas subfisiológicas encontradas em algumas áreas do corpo, como a ponta do nariz, os dedos e as orelhas. Em geral, elas medeiam a lise celular quando os eritrócitos circulantes retornam às temperaturas centrais do corpo. Nem todas as aglutininas frias são anticorpos IgM. A síndrome da hemoglobinúria paroxística fria (HPF), por exemplo, resulta dos anticorpos IgG Donath-Landsteiner reativos ao frio, que se ligam às células a temperaturas abaixo de 37°C, mas medeiam a lise após aquecimento. Embora o anticorpo seja diferente, os efeitos fisiopatológicos são similares.

Outros autoanticorpos que ativam o complemento ligam-se mais eficientemente a temperaturas aquecidas. Em geral, esses anticorpos reativos ao aquecimento são do isótipo IgG. Em alguns casos, esses anticorpos podem estar associados a malignidades linfoproliferativas e infecções virais. A maioria dos anticorpos IgG reativos ao aquecimento encontrados na anemia hemolítica autoimune tem especificidade Rh e é má ativadora de complemento, ao contrário das aglutininas frias e anticorpos anti-A e anti-B do grupo sanguíneo. Entretanto, alguns anticorpos, como os Tja, ativam bem o complemento e causam lise.

Em uma anemia hemolítica adquirida rara, denominada hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), os pacientes apresentam episódios recorrentes de hemólise intravascular. Acredita-se que a lise de eritrócitos nesses pacientes ocorra pela via alternativa (Rosse, 1998; Jarva, 1999), embora os níveis séricos de complemento sempre sejam normais e o teste direto da antiglobulina seja sempre negativo. O defeito na HPN é uma falta de proteínas ligadas ao glicosil fosfatidilinositol na superfície das células do paciente, resultante de mutações no gene do glicano A fosfatidilinositol (*pig-A*). Entre outras proteínas ligadas por meio dessa âncora na membrana celular estão a DAF e a CD59, duas moléculas que controlam a ativação de complemento no nível da C3 convertase, C8 e C9, respectivamente (ver antes em "Regulação da ativação do complemento"). Acredita-se que a lise de eritrócitos em pacientes com HPN deva-se à ativação descontrolada do complemento na superfície dessas células. Há relato recente de que, embora a ausência tanto de DAF quanto de CD59 da superfície dos eritrócitos de pacientes com HPN seja responsável pela maior sensibilidade à lise mediada pelo complemento, a deficiência de CD59 leva à maior sensibilidade à lise celular do que a deficiência de DAF (Shichishima, 1999).

Recentemente, a capacidade de modular a atividade do complemento e tirar vantagem da ativação da via clássica foi conseguida com o uso de um anticorpo específico designado para o marcador de célula B CD20. O anticorpo monoclonal CDB8 é comercializado como rituximab e é um anticorpo quimérico (de camundongo e humano ao mesmo tempo) que ativa a destruição mediada pelo complemento de células que têm CD20 mediante a ligação com C1q. As terapias desse tipo podem ser promissoras no tocante a tratar neoplasias linfoides e processos autoimunes sistêmicos (Reff, 1994).

Doenças neurológicas

O papel do sistema complemento nas doenças do sistema nervoso ficou evidente nos últimos anos. Isso é um tanto surpreendente, porque a barreira hematoencefálica bloqueia efetivamente a penetração do complemento no líquido espinal. A ativação do complemento foi demonstrada em doenças como a miastenia grave, a esclerose múltipla, o lúpus cerebral, a síndrome de Guillain-Barré e a doença de Alzheimer (Morgan, 1994a, 1997b; Shin, 1998). A deposição de proteínas do complemento foi demonstrada no tecido doente e a ativação do complemento, no líquido cerebrospinal (LCE) de pacientes com a maioria dessas doenças. Presumivelmente, a inflamação causa uma ruptura na barreira hematoencefálica com penetração local de proteínas do complemento, que são sintetizadas por algumas células. Há evidência de que a ativação do complemento poderia estar envolvida no dano à mielina, ocasionando assim doenças do sistema nervoso central e periférico. Também se mostrou que o complemento está envolvido na doença de Alzheimer e na doença de Pick. Na primeira, um peptídeo derivado de amiloide e denominado β-A4 liga-se ao C1q e ativa o complemento em placas senis do cérebro doente. É interessante ter sido demonstrado *in vitro* que o tipo de célula glial mais abundante, o astrócito, sintetiza todas as proteínas do complemento em condições inflamatórias (Morgan, 1996). Além disso, os astrócitos extracelulares microgliais expressam receptores do complemento *in vitro* (Morgan, 1997a). Portanto, apesar da barreira hematoencefálica, o cérebro tem a capacidade de montar uma reação inflamatória potente, dependente do complemento, como mecanismo de defesa. Os componentes do complemento podem ter um papel facilitador na neuropatologia das doenças priônicas. A perda neuronal associada à encefalite espongiforme transmissível pode estar relacionada com a formação de CAM nas superfícies neuronais e com a presença de C3b e C1q extracelulares nos depósitos de proteína priônica associados à doença (Kovacs, 2004).

Doenças cardiovasculares

O envolvimento do sistema complemento na lesão miocárdica por isquemia ou reperfusão é bem-aceito. Isso foi revisto recentemente (Lucchesi, 1997a). O mecanismo pelo qual o complemento contribui para o infarto agudo do miocárdio em pacientes ainda não está esclarecido. Apesar disso, a deposição de componentes das vias clássica e alternativa foi demonstrada no miocárdio acometido com C5b-9. A produção de anafilatoxinas que acompanham a ativação do complemento parece ser responsável pela reação inflamatória local. A melhor demonstração de um efeito do complemento, especialmente em seus componentes terminais (C5b-9), veio de um modelo animal de oclusão da artéria coronária (Kilgore, 1998). Coelhos com deficiência de C6 controlada geneticamente apresentaram uma redução significativa na dimensão do infarto, em comparação com coelhos normais. Além disso, a infiltração de neutrófilos também apresentou redução significativa nos coelhos com deficiência de C6, sugerindo o papel crucial dos componentes terminais do complemento na geração de inflamação local.

O complemento também parece desempenhar um papel no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Torzewski, 1997). Mais uma vez, o mecanismo exato pelo qual o complemento contribui para o desenvolvimento de lesões não está esclarecido. Contudo, a deposição dos componentes terminais do complemento (C5b-9) foi demonstrada no espessamento da íntima e em placas fibrosas. A ativação do sistema complemento está associada a estágios pré-lesionais e progressão das lesões ateroscleróticas (Niculescu, 1987; Seifert, 1989). Demonstrou-se que coelhos com deficiência de C6 são menos suscetíveis que os normais a lesões ateroscleróticas induzidas pelo colesterol (Schmiedt, 1998).

Biocompatibilidade

Muitos dos biomateriais que são implantados no corpo ativam o complemento, em particular a via alternativa (Mollnes, 1997). Em contato com o sangue ou líquidos teciduais, esses materiais podem ativar o complemento e ocasionar inflamação local ou dano tecidual. Os materiais precisam ser testados quanto à sua atividade de ativação do complemento antes de serem usados em ampla escala.

Transplante de órgãos

O sucesso do transplante de órgãos criou um grande problema: a pequena quantidade de órgãos humanos para satisfazer as demandas de um número cada vez maior de pacientes que aguardam tal procedimento cirúrgico. Portanto, o uso de doadores animais como suínos é proposto por muitos especialistas na área como alternativa lógica para órgãos humanos. Entretanto, os órgãos suínos vascularizados são suscetíveis a uma reação de rejeição intensa, denominada rejeição hiperaguda, quando implantados em primatas não humanos ou humanos (Dalmasso, 1992; Platt, 1998). Essa reação é mediada pela ligação de anticorpo a células endoteliais vasculares e pela ativação de

complemento. Mostrou-se que a ativação de complemento é crucial na lesão tecidual na rejeição hiperaguda de xenoenxertos. A ativação de complemento nas células endoteliais xenogênicas leva à sua ativação (i. e., as células endoteliais adotam um fenótipo pró-coagulante), que leva a trombose intravascular e intersticial e hemorragia. Tal reação intensa deve-se à incapacidade de as moléculas reguladoras do complemento associadas às células de suínos como a DAF, MCP e CD59 controlarem a ativação do complemento humano. Portanto, o sucesso dessa intervenção terapêutica promissora baseia-se no controle adequado da ativação do complemento. O papel do complemento na rejeição de órgãos humanos (aloenxertos) é menos bem-aceito, porém é provável que a ativação de complemento contribua, até certo ponto, para episódios de rejeição aguda e crônica (Baldwin, 1995). Ao lado disso, a identificação de C4d nos capilares peritubulares de biópsias de transplante renal por microscopia por imunofluorescência provou ser útil no reconhecimento da rejeição humoral (Fig. 46.3) (Onitsuka, 1999).

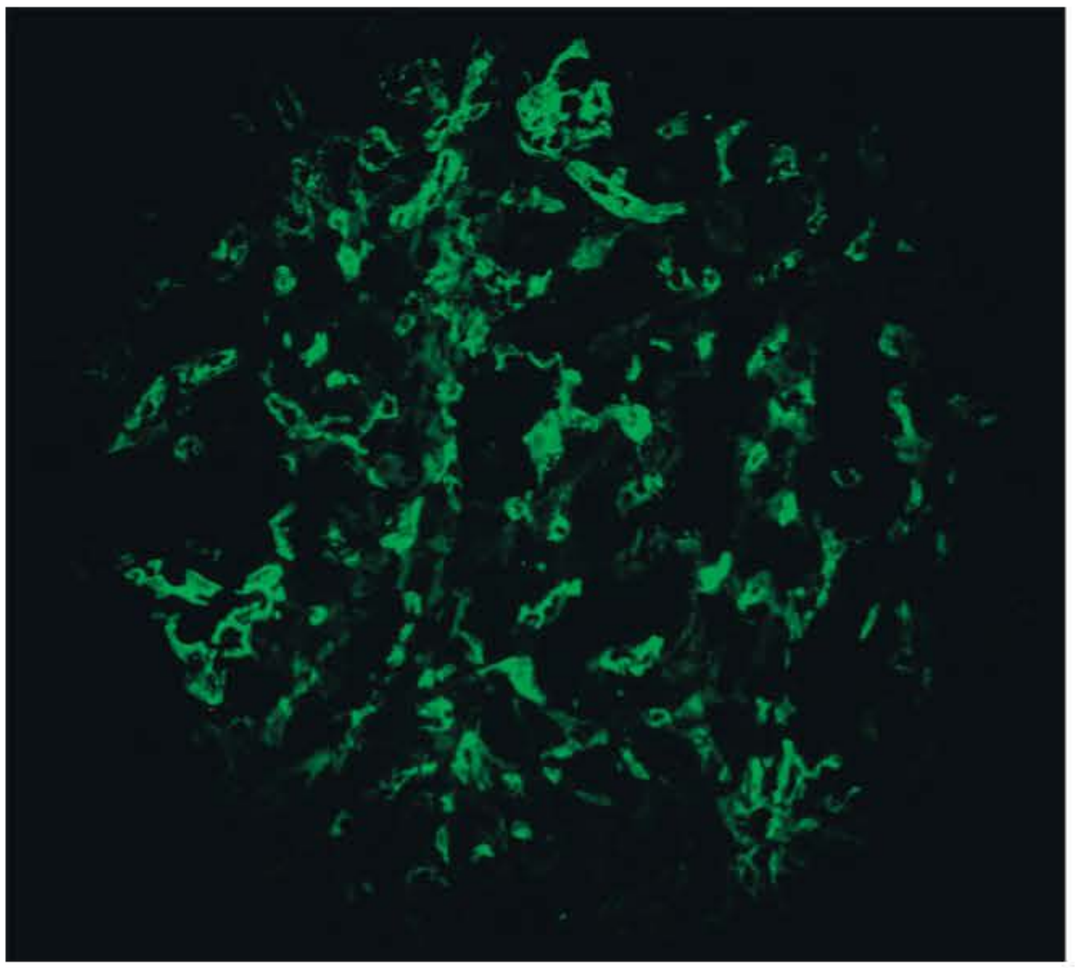


Figura 46.3 Anticorpo marcado por fluorescência para coloração de fragmentos do complemento C4d de capilares peritubulares em uma biópsia de rim transplantado. No contexto pós-transplante inicial, esse padrão de coloração é um marcador de rejeição humoral (40×, isotiocianato de fluoresceína).

Inibidores do complemento clinicamente úteis

Sem dúvida, a ativação do complemento contribui para o dano tecidual observado em uma variedade de doenças humanas. Portanto, o uso de agentes que bloqueiam a ativação do complemento deve ser útil em limitar o dano tecidual. Infelizmente, tais agentes não estão disponíveis para uso clínico disseminado. A pesquisa visa a desenvolver inibidores do complemento que provem ser eficientes e seguros. Como o complemento é crucial no controle da infecção, um inibidor do complemento adequado não deve interferir na função desse complemento. Além disso, o C3a e o C5a são conhecidos por serem provocadores de reações inflamatórias. Portanto, um inibidor desejável deveria agir no nível das convertases de C3 das vias clássica e alternativa, para evitar a produção dessas anafilatoxinas. Recentemente, foram produzidos muitos inibidores, e outros estão sendo desenvolvidos. Para uma descrição mais completa dos inibidores do sistema complemento, o leitor deve consultar as revisões do assunto (Makrides, 1998; Wagner, 1998).

Conforme discutido antes, o CR1 é um regulador potente das vias clássica e alternativa do complemento. Ele acelera o decaimento das convertases de C3 e C5 de ambas as vias e serve como cofator para a clivagem de C4b, C3b e iC3b mediada pelo fator I. Logo, essa molécula representa um excelente candidato à inibição terapêutica do sistema complemento nos estados mórbidos. Uma forma recombinante solúvel de CR1, denominada sCR1, foi produzida e mostrou reter todas as propriedades da proteína nativa ligada à membrana. Em uma variedade de modelos animais de doença humana em que se sabe que a ativação do complemento desempenha um papel, o uso de sCR1 melhorou de forma significativa o processo patológico. Entre outros, inclui o xenotransplante em macacos do gênero *Cynomolgus* (Pruitt, 1994), alveolite em um modelo de reação de Arthus pulmonar (Mulligan, 1992), lesão do tecido miocárdico por isquemia/reperfusão (Weisman, 1990), desmielinização em um modelo experimental de encefalomielite alérgica em ratos (Piddlesden, 1994) e glomerulonefrite (Couser, 1995). O sCR1 agora entrou na fase I de ensaios clínicos em pacientes com infartos do miocárdio e pacientes com SARA induzida por queimaduras.

Outro inibidor do complemento é um anticorpo humanizado de cadeia única para o C5 humano. A vantagem de tal anticorpo é que ele permite o bloqueio da ativação do complemento sem liberação de C5a e deposição de C5b-9, conhecidos por promoverem lesão tecidual potente devida à inflamação e à ativação celular. Mostrou-se em modelos animais que o anticorpo monoclonal para C5 interfere na rejeição hiperaguda em sistemas de perfusão de órgãos suínos *in vitro* (Kroshus, 1995), para evitar o início de artrite em um modelo de camundongo com artrite induzida por colágeno (Wang, 1995), para reduzir a glomerulonefrite em um modelo de LES em camundongo (Wang, 1996) e a dimensão do infarto em um modelo de lesão miocárdica por isquemia/reperfusão em rato (Vakeva, 1999). Mostrou-se que o anticorpo anti-C5 humanizado é um inibidor potente do sistema complemento *in vitro* (Evans, 1995). Os resultados de ensaios clínicos sugerem que esse anticorpo pode reduzir significativamente o dano ao miocárdio em pacientes submetidos a cirurgia de derivação cardiopulmonar (Rollins, 1998).

Preparações de IgG humana para uso intravenoso (IGIV) estão sendo usadas em inúmeras doenças autoimunes e inflamatórias como a púrpura trombocitopênica idiopática, a doença de Kawasaki, a síndrome de Guillain-Barré e a miastenia grave (Dwyer, 1992). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual a IGIV exerce seus efeitos benéficos não está esclarecido e pode incluir bloqueio de anticorpos por meio de interações entre o idiotipo e o anti-idiotipo, bloqueio de receptores Fc de IgG nas células fagocíticas, modulação das funções de células T e B e seleção de repertórios imunes. Todavia, é evidente que a IGIV tem um efeito sobre o sistema complemento (Frank, 1992). Demonstrou-se que a IGIV interfere na reação de choque de Forssman dependente da via clássica em cobaias (Basta, 1989) e prolonga a sobrevivência do xenoenxerto cardíaco de suíno em primatas não humanos (Magee, 1995). Além disso, o tratamento de pacientes com dermatomiosite com alta dose de IGIV inibiu a deposição de C3b e C5b-9 no endomísio de capilares normalmente observada nesses pacientes (Basta, 1994). A IGIV inibe a ativação do complemento por meio de sua porção Fc. O mecanismo exato pelo qual a IGIV bloqueia a ativação do complemento nas superfícies-alvo ainda não está completamente entendido. Relatos mostram que a IGIV poderia prevenir o dano tecidual mediado pelo complemento, interagindo diretamente com C1 ou impedindo a ligação de C4 à célula-alvo (Mollnes, 1995; Miletic, 1996).

Conforme mencionado antes, o C1-Inh está ausente ou reduzido no soro daqueles com angioedema hereditário e foi administrado como concentrado durante crises agudas. Como o inibidor de C1 em geral também está reduzido nos estados inflamatórios graves generalizados, mostrou-se que concentrados de C1-Inh têm utilidade clínica promissora em condições que incluem choque séptico, lesão por reperfusão, rejeição hiperaguda a transplante e HPN (Kirschfink, 2001; Davis, 2004).

Ensaios para complemento

Princípios gerais

Dispõe-se de métodos que permitem a determinação acurada dos níveis de cada um dos componentes das vias clássica, alternativa e da MBLectina, bem como de várias enzimas e reguladores do sistema complemento. No entanto, muitos desses ensaios não estão disponíveis nos laboratórios clínicos comuns, estando restritos aos laboratórios de pesquisa. Vamos dar atenção às técnicas que não requerem um laboratório especializado na pesquisa com complemento para realizá-las. O leitor deve consultar outras publicações quanto a detalhes relativos aos métodos que requerem técnicas mais especializadas (Whaley, 1985; Harrison, 1986; Dodds, 1997; Giclas, 1997; Würzner,

1997). Os ensaios para complemento podem ser divididos em dois tipos: os que medem as proteínas do complemento como antígenos em líquidos biológicos e os que medem a atividade funcional de determinado componente. Ambos os tipos de técnica têm vantagens e desvantagens. Os métodos para análise antigênica (imunoquímicos) em geral são mais simples de realizar. Esses ensaios antigênicos são altamente específicos, requerem menos reagentes especializados, são mais baratos e consideravelmente menos demorados. Há no comércio anticorpos para as proteínas do complemento humano e proteínas do complemento humano purificadas. O *Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents* (2004) é um guia útil de reagentes para complemento disponíveis no comércio. Nesses ensaios, pode-se usar soro ou plasma, e os métodos comumente disponíveis de congelamento (–20°C) são suficientes. Por essas razões, os ensaios antigênicos são facilmente adaptáveis a um laboratório clínico. Já os ensaios antigênicos não fornecem informação sobre a atividade de um componente porque podem detectar tanto produtos de degradação quanto componentes ativos funcionais. A presença no soro de pequenos fragmentos de proteína com atividade antigênica pode confundir os resultados. Alguns ensaios antigênicos usam a imunodifusão radial. Em tais ensaios, um fragmento de proteína pode difundir-se mais rapidamente que a molécula original, o que pode resultar em níveis falsamente altos. Como exemplo, os ensaios antigênicos mais comumente empregados para C3 medem seu principal produto de degradação, C3c, por imunodifusão radial. Para obter estimativas acuradas de C3c, a amostra deve ser descongelada a 37°C durante dias para que haja conversão completa de C3 em C3c. Na verdade, isso em geral não é feito e, portanto, representa uma fonte de erro, embora pequeno e sem ter consequência clínica. Geralmente, os ensaios antigênicos não são sensíveis como ensaios funcionais e podem não detectar níveis baixos de um componente presente em certos líquidos corporais. Até certo ponto, a sensibilidade dos ensaios antigênicos depende da força do anticorpo empregado e, com os ensaios habituais, é possível medir um antígeno proteico em apenas 10 μg/mL.

Dispõe-se de kits que usam a inibição da ligação de substrato radiomarcado para detectar vários peptídeos do complemento. Tais kits estão disponíveis para medir C3a, C4a e C5a. A utilidade dessas estimativas ainda é discutível. Há um relato detalhado sobre os procedimentos para medir a atividade lítica funcional e os níveis antigênicos de cada um dos componentes da via alternativa (Minta, 1983). Ensaios para medir a atividade funcional dos fatores proteicos de controle H e I no soro humano também foram relatados, mas requerem reagentes especializados que podem não estar à venda no comércio (Gaither, 1979). Foram desenvolvidos ensaios ELISA para medir a quebra de produtos das proteínas do complemento ou complexos formados após a ativação do complemento. Existem kits comerciais (Quidel, San Diego, CA) que medem o desdobramento dos produtos de proteínas do complemento à medida que são gerados após a ativação do complemento usando anticorpos monoclonais. A ativação do complemento na via clássica pode ser medida pelo acompanhamento dos níveis séricos de C4d *versus* os de C4. A estimativa de complexos C1r-C1s-C1-Inh pelo ELISA também fornece uma medida da ativação do complemento pela via clássica. A ativação da via alternativa pode ser medida pelo ELISA de acordo com os níveis de Bb, ou C3bBbP ou complexos C3bP na circulação (Mayes, 1984). Foram relatados valores séricos tão baixos como de 10 a 20 ng/mL de C3bP. Esse ensaio também pode ser usado para medir complexos de ativação ligados à superfície. A ativação por qualquer via pode ser monitorada medindo-se os níveis de iC3b, ou sC5b-9, a forma solúvel do complexo de ataque à membrana. Recentemente, foi desenvolvido um teste ELISA para a estimativa da atividade do complexo MBL em soro ou plasma, que elimina a interferência de componentes da via clássica (Petersen, 2001; Kuipers, 2002). Além disso, há kits para ELISA que medem a geração de anafilatoxinas no soro ou no plasma. Como o C3a e o C5a são convertidos rapidamente em seus fragmentos inativos desArg pela carboxipeptidase N no soro, esses ensaios utilizam anticorpos monoclonais específicos para C3a-desArg e C5a-desArg. Devido à sua alta sensibilidade, esses ensaios ELISA constituem um recurso excelente para avaliar a ativação do complemento em líquidos biológicos na via clássica ou na alternativa. Apesar disso, esses kits em geral são caros e requerem que o usuário estabeleça uma curva de diluição-padrão. Portanto, só é possível trabalhar com um número limitado de amostras em um único kit.

Avaliação funcional da via clássica

Os ensaios para complemento funcional são recursos sensíveis e precisos para se obter informação sobre a atividade de um componente do complemento. Alguns desses métodos podem ser usados para quantificar a atividade no nível molecular, enquanto outros servem para expressar a função do complemento em unidades arbitrárias. Há reagentes comerciais para titular cada componente da via clássica ou da alternativa. Ensaios que medem a atividade hemolítica total em uma amostra (CH_{50}) ou a atividade funcional de componentes isolados do complemento em geral usam eritrócitos de carneiro como alvos da lise mediada por complemento. Os eritrócitos de carneiro são mais sensíveis à lise mediada por autoanticorpo ou complemento que os de outras espécies. A ativação da via alternativa do complemento (AH_{50}) é medida facilmente com o uso de eritrócitos de coelho. Essas células são particularmente sensíveis à lise independente de anticorpo mediada pelo soro humano. Além disso, foi desenvolvido um ensaio hemolítico funcional com eritrócitos de galinha para avaliar os níveis funcionais de ligação da manose no soro, que os autores alegam ser útil para testes em larga escala com amostras de pacientes (Petersen, 2001; Kuipers, 2002). Um resumo útil do significado clínico dos testes com CH_{50} e AH_{50} é fornecido na Tabela 46.5.

O ensaio funcional mais simples da via clássica mede o complemento hemolítico total. A ausência de qualquer um dos 9 componentes, como ocorre em pacientes com deficiência genética homozigota, em geral resulta em um título hemolítico total (CH_{50}) de zero. Contudo, um valor normal não exclui a possibilidade de níveis reduzidos de componentes individuais nos indivíduos testados. Quando a história e os sintomas do paciente sugerem uma possível deficiência, podem ser necessárias titulações hemolíticas ou antigênicas de componentes individuais. Em geral, um título de CH_{50} será uma estimativa funcional adequada da atividade do complemento. No ensaio para CH_{50}, anticorpos à venda no comércio para eritrócitos de carneiro reagem com antígeno nas superfícies de tais células, formando imunocomplexos. O soro testado do paciente é então acrescentado à mistura como fonte de complemento da via clássica. O complemento no soro testado irá ligar-se ao imunocomplexo formado previamente nos eritrócitos de carneiro, levando à ativação da via clássica do complemento e à lise de eritrócitos. Ao titular o acréscimo de soro do paciente para teste, é possível calcular a atividade de complemento presente na amostra do paciente, bem como expressar a atividade como a recíproca da diluição que causa lise de 50% dos eritrócitos no ensaio (o CH_{50}). O título de complemento é expresso em unidades CH_{50} (a recíproca da diluição da fonte de complemento que resulta na lise de 50% dos eritrócitos de carneiro sensibilizados).

Diluições seriadas da amostra são preparadas e acrescentadas aos EA. Nesse caso, o ponto final de 50% é determinado pela transformação Von Krogh dos dados. Essa fórmula derivada empiricamente converte a curva de dose e resposta em forma de S numa função linear. Os valores de Y/1-Y são calculados, sendo Y a fração de eritrócitos lisados em uma diluição de teste. É feito um gráfico em que o logaritmo do volume relativo de complemento é colocado contra o log dos valores de Y/1-Y. Em geral, obtém-se uma linha reta, e o título é calculado determinando-se o volume relativo de complemento em que Y/1-Y = 1 (ou lise de 50%). Tal valor é dividido na recíproca da diluição sérica original (1:60 para soro humano), para se calcular a concentração

Tabela 46.5 Interpretação do CH_{50} e do AH_{50}

1 Resultado do teste	2 Interpretação
CH_{50} muito baixo ou 0 (AH_{50} normal)	Ausência de C1q, C1r, C1s, C2 ou C4
AH_{50} muito baixo ou 0 (CH_{50} normal)	Ausência de properdina ou (muito raramente) fator B ou fator D
CH_{50} e AH_{50} muito baixos ou 0	Ausência de C3, C5, C6, C7, C8 ou C9
Componentes tardios baixos (especialmente C3) CH_{50} e AH_{50} baixos	Ausência de fator H ou fator I

Fonte: adaptado de Wen BS, Atkinson J, Giclas PC: Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. J Allergy Clin Immunol 2004;113:585-593.

sérica de complemento que lisa 50% das células. O título de complemento representa o número de 50% de unidades hemolíticas presentes em 1,0 mL de soro não diluído (Mayer, 1961; Rapp, 1970).

Os laboratórios clínicos podem usar uma das duas variações disponíveis desse teste clássico para realizar o ensaio CH_{50}. Uma baseia-se na lise de lipossomos, liberando um marcador enzimático, e a outra é um ELISA que detecta o neoantígeno C9 final formado com a ativação completa da via clássica.

Avaliação funcional da via alternativa

Nesse ensaio, dilui-se soro humano (em geral diluído primeiro a 1:5) de forma seriada, sendo ele acrescentado a eritrócitos de coelho que não estejam sensibilizados com anticorpo específico, em um tampão que contém íons de magnésio e ácido tetracético de etilenoglicol (EGTA) para quelar íons de cálcio (estes últimos são necessários para ativação da via clássica, não da alternativa) (Pangburn, 1988). O título da via alternativa é designado AH_{50} e representa a diluição final de soro humano no ensaio que lisa 50% dos eritrócitos de coelho. Para determinar a AH_{50}, faz-se um gráfico semelhante ao descrito para a titulação do complemento hemolítico total. Às vezes, o soro humano pode ter anticorpo "natural" para um carboidrato amplamente expresso nas células de outras espécies que não a humana e primatas não humanos. Uma alta concentração de soro misturada com eritrócitos de coelho pode induzir aglutinação, que pode ser enganosa ao se interpretar um TITER de AH_{50} (Tomlinson, 1997). Portanto, pode ser válido absorver o soro com eritrócitos de coelho lavados e compactados em gelo por 15 a 30 minutos, para se remover uma certa proporção de anticorpos naturais, reduzindo-se assim a aglutinação no ensaio.

Ensaio funcional do inibidor de C1

Foram desenvolvidos ensaios para avaliação da função de C1-Inh. Um de uso comum baseia-se no ELISA e mede a formação de um complexo entre C1s biotinilado e C1-Inh em uma fase sólida coberta com avidina. Em um segundo teste, usa-se obstrução estérica criada pela ligação do inibidor ao C1r, impedindo-se a ligação subsequente do anticorpo ao C1r. Durante a imunodifusão radial de C1r, a quantidade de C1r não ligado, e portanto ativo, aumenta à medida que a de C1-Inh presente diminui.

Níveis de complemento por ensaios antigênicos

Para esses ensaios, a amostra (soro ou plasma) é congelada (a –20°C ou menos). A contaminação bacteriana pode causar desnaturação ou fragmentação de proteína, embora o resfriamento e o aquecimento em geral não tenham efeito adverso sobre os níveis antigênicos. Para certos ensaios com complemento, a amostra é diluída em solução fisiológica para se conseguir a faixa de concentração correta para uma estimativa acurada.

As análises antigênicas de proteínas do complemento usam várias técnicas imunes de precipitina. A imunodifusão radial única feita pelo método de Fahey ou Mancini é de uso comum para calcular quantidades de uma proteína específica. Em ambos os métodos, o antígeno é acrescentado a poças em um gel que contém anticorpo, formando-se anéis de precipitação. O método Fahey emprega anticorpo que não está em excesso. Portanto, o tempo de difusão para a leitura dos resultados é crítico. Os pontos terminais de difusão não são alcançados e podem levar a estimativas inexatas dos níveis antigênicos de complemento. O método de Mancini usa excesso de anticorpo no gel e é mais sensível e acurado. A maioria das empresas comerciais que preparam placas de imunodifusão usa o método de Mancini. Dispõe-se de kits de imunodifusão radial para todos os componentes das vias clássica e alternativa. Tais kits consistem em placas cobertas com uma camada fina de 2% de agarose que contém anticorpo monoespecífico. A proteína do soro-padrão (um conjunto estabilizado de soro humano normal) é fornecida, em geral em soluções pré-diluídas. Cada solução pode conter uma quantidade específica da proteína particular que está sendo medida para se fazer uma curva de referência.

Métodos nefelométricos também são empregados para medir os níveis de componentes de complemento e, em algumas situações, podem ser comparáveis aos obtidos com a imunodifusão radial (Bossuyt, 2002), sendo usados comumente em laboratórios de hospitais para medir o C3 e o C4 séricos.

Cininas e o sistema gerador de cinina

O sistema gerador de cinina é outra via de resposta inflamatória presente no plasma, que controla a geração de peptídeos importantes na resposta inflamatória e será descrito brevemente aqui. Para mais detalhes, o leitor deve consultar revisões recentes sobre o assunto (Sharma, 1990; Kozin, 1992; Margolius, 1995; Vio, 1998). O peptídeo biologicamente ativo mais importante gerado pelo sistema parece ser a bradicinina, um nonapeptídeo potente com atividade em muitos sistemas biológicos, ativo no aumento da permeabilidade vascular, na vasodilatação, na hipotensão, na indução de dor, na contração de muitos tipos de células de músculo liso e na ativação do sistema da fosfolipase A_2 com ativação do metabolismo celular do ácido araquidônico. Embora em muitos aspectos similar ao sistema complemento, o sistema plasmático gerador de cinina é mais simples por ser composto por apenas quatro proteínas plasmáticas. As principais proteínas desse sistema, conforme entendido atualmente, são o fator de Hageman, o fator XI da coagulação, a pré-calicreína e o cininogênio de alto peso molecular.

Ao interagir com superfícies de carga negativa, como as fornecidas em experimentos por vidro ou naturalmente por muitos materiais biologicamente ativos como o lipídeo A da endotoxina bacteriana Gram-negativa, o fator de Hageman é clivado e ativado. Enzimas proteolíticas, incluive a calicreína, também podem clivar e ativar o fator de Hageman que, clivado (αHFa), tem atividade proteolítica e, assim, ativa e cliva outras moléculas do fator de Hageman para gerar mais αHFa.

O αHFa ativa o fator XI em fator XIa, resultando na ativação da cascata intrínseca da coagulação. O αHFa também cliva a pré-calicreína de cadeia única em uma molécula de duas cadeias, a calicreína, com as cadeias ligadas por pontes dissulfídicas. A pré-calicreína clivada tem atividade proteolítica enzimática localizada na cadeia de baixo peso molecular. A calicreína ativada cliva o cininogênio de alto peso molecular em vários locais, liberando bradicinina.

A bradicinina tem meia-vida curta porque é clivada rapidamente pela cininase e pela enzima conversora de angiotensina no pulmão, formando peptídeos de baixo peso molecular sem atividade biológica.

Postulou-se que a bradicinina desempenhe um papel em uma variedade de doenças. A bradicinina livre e a lisil-bradicinina foram encontradas no líquido nasal de casos de rinite. Também foi sugerido um papel para a bradicinina em doenças que variam da asma ao angioedema hereditário, bem como outros tipos de distúrbios edematosos, incluindo a inflamação. É evidente que o papel exato do sistema gerador de cininas na doença ainda precisa ser esclarecido. Entretanto, a bradicinina e seus derivados sem dúvida são importantes para o inchaço e a dor associada à inflamação.

Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis liberadas por células capazes de permitir a comunicação entre células a curtas distâncias. Esses mediadores são liberados para ajudar na supra ou na infrarregulação da resposta imune e orquestrar atividades inflamatórias e reparadoras associadas. A secreção e a ligação de citocina é o equivalente celular da conexão com a internet. O meio prevalente de citocinas dentro de uma região de um organismo cria uma rede de comunicação entre as células. Os sinais da citocina são recebidos na superfície celular não só como simples mensagens, mas também em combinações sutis complexas, sinérgicas e antagônicas, que coordenam processos que incluem a estimulação da hematopoese, a orquestração da migração direcionada de leucócitos (quimiocinese), a ativação de várias células inflamatórias, a estimulação do desenvolvimento e da maturação de linfócitos e processos relacionados com a resposta imune. Para responder a mensagens específicas de citocinas, as células exibem milhares de receptores de superfície, dispostos como se fossem muitas antenas. Usando esses receptores, as células processam e respondem a combinações de citocinas solúveis e ligadas a substrato de maneira dependente da densidade de receptores na superfície e do estado de ativação.

O termo "citocina" refere-se a produtos solúveis de "células" no sentido genérico. Muitos tipos celulares são capazes de produzir

citocinas, mas na maior parte são a célula T e macrófagos os virtuais fabricantes de citocinas, razão pela qual muitas citocinas familiares são conhecidas como interleucinas (ILs). As ações biológicas de determinada citocina podem sobrepor-se às de outras (Tab. 46.6) e em geral são dependentes tanto da circunstância em que são secretadas quanto do tipo de célula que responde. Além disso, determinada citocina pode ser produzida e liberada por vários tipos celulares diferentes, inclusive células linfoides, do estroma (como fibroblastos, osteócitos e células endoteliais) e epiteliais. A influência dessas proteínas solúveis pode estender-se por uma ampla faixa (em termos sistêmicos) quando liberadas na circulação (efeito endócrino), como o pirogênio IL-1, ou sua ação pode ser apenas local, tendo efeito sobre a célula liberadora (efeito autócrino) ou células vizinhas. A IL-2 liberada por células T tem um efeito proliferativo autócrino por meio do receptor de IL-2 (CD_{25}). No timo, citocinas como a IL-7 liberada pelas células epiteliais do órgão afetam a maturação de timócitos de maneira parácrina. A maioria das citocinas liga-se a receptores de alta afinidade que traduzem o sinal para o núcleo da célula por vias sinalizadoras JAK/STAT, embora outras vias, como MAPK, cAMP e PI3-quinase, também sejam usadas. Graças aos profundos efeitos biológicos dessas proteínas potentes, estão em andamento tentativas de produzir citocinas em massa e administrá-las. A detecção em laboratório clínico e a estimativa de seus níveis podem vir a ser lugar-comum.

Bioensaios às vezes são o "padrão-ouro" para detectar atividade de citocina, mas em geral levam tempo e são inviáveis em um laboratório hospitalar. Kits de ELISA para muitas das citocinas descritas no texto estão disponíveis em ampla escala. Técnicas moleculares (reação em cadeia da polimerase, hibridização *in situ*) são empregadas em laboratórios mais sofisticados para identificar a presença de citocinas com grande sensibilidade e localizar mais precisamente um tipo celular determinado.

Tabela 46.6 Classes funcionais de citocinas

Área de atividade	Citocina	Ação
Imunidade inata	IL-1, TNF, IL-6, IL-12, IFNγ	Protege contra infecção viral, recruta leucócitos, estimula a resposta inflamatória aguda
Crescimento, diferenciação e ativação de linfócitos	IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, TGFβ	Células NK, B e T e fatores do crescimento, infrarregula a resposta imune
Ativação de célula inflamatória	IFNγ, IL-5, TNF, TNFβ	Induz inflamação aguda, ativa macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e células endoteliais
Quimiocinese	Membros da superfamília da IL-8	Liberados de células T e outras células como sinais de "correção de rumo" para células B e T
Hematopoese	Fatores estimulantes de colônia (CSF-GM, CSF-G), fator de crescimento da célula-tronco	Estimulam células progenitoras e células-tronco

Quando agrupadas de acordo com a atividade principal, muitas citocinas compartilham atividades similares e aparentemente superpostas.

Interleucina 1

A família da IL-1 contém três proteínas: IL-1α e IL-1β (os dois componentes agonistas) e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), um antagonista do receptor específico de ocorrência natural (Dinarello, 1998). Foram descritos dois receptores da IL-1: um do tipo I (IL-1RI) com 80 kDa, que se expressa amplamente e traduz o sinal quando ligado a IL-1α ou IL-1β, e um mais restrito (a neutrófilos, monócitos e células B) do tipo II com 67 kDa (IL-1RII), que não traduz sinal intracelular, mesmo quando ligado a seu ligante preferido, IL-1β, e é portanto descrito como receptor "chamariz", atraindo moléculas de IL-1β. Uma vez ligada ao ligante, a IL-1RI associa-se a uma proteína acessória (IL-1RAcP). Em conjunto, sinalizam o núcleo através de várias vias de proteínas quinase associadas a macrotúbulos (MAP) que ativam fatores de transcrição nucleares, inclusive NF-κB, entre outros (O'Neill, 1996). A molécula antagonista IL-1RA é capaz de ligar-se à IL-1RI e à IL-1RII, mas não dispara o sinal intracelular de transdução.

Como reguladora primária das respostas imunes e inflamatórias, a IL-1 exibe uma miríade de efeitos biológicos (Rosenwasser, 1998). Ela otimiza a ativação da célula T auxiliar (Th, de *T helper*) mediada pelo complexo antígeno de histocompatibilidade principal/receptor de célula T (MHC/TCR) e facilita a atividade das citocinas derivadas da célula T, como a IL-2, mediante a suprarregulação do receptor da IL-2. A IL-1 estimula a proliferação da célula progenitora hematopoética (HPC) em sinergia com fatores estimulantes de colônia e, quando administrada sozinha, mobiliza uma neutrofilia derivada da medula óssea. Evidências indicam um papel da IL-1 na promoção do crescimento e da proliferação de algumas linhagens de células leucêmicas, mas ela é diretamente citotóxica para algumas células infectadas por vírus e algumas células tumorais.

A capacidade da IL-1 de estimular o metabolismo do ácido araquidônico e induzir a produção e a liberação de outras citocinas é responsável por grande parte de sua atividade pró-inflamatória. Nos locais de inflamação, a IL-1 causa suprarregulação de receptores da molécula de adesão no endotélio vascular e estimula a produção de quimiocina, levando ao acúmulo local de leucócitos. A IL-1 é responsável ainda pela produção de reagentes da fase aguda pelo fígado (p. ex., complemento, peptídeo C reativo), à custa de proteínas nele existentes, como a albumina. Para compensar o custo em termos de aminoácido dessa síntese maciça de novos peptídeos, a IL-1 promove ruptura muscular, o que explica a mialgia que acompanha algumas doenças. A IL-1 contribui para a dilatação vascular e a hipotensão no choque séptico, por meio da indução de óxido nítrico (ON) dentro das células endoteliais, e pode ainda ser uma mediadora significativa do choque cardiogênico.

No sistema nervoso central (SNC), a IL-1 promove febre, anorexia, sono de onda lenta e letargia, bem como a liberação de corticosteroides pelo hipotálamo. Dentro dos espaços articulares, a IL-1 promove a proliferação de células sinoviais, a deposição de colágeno e a reabsorção de cartilagem e osso, ações que têm implicações em condições inflamatórias como a artrite reumatoide.

Quando administrada a humanos em doses baixas, a IL-1 causa profundas reações febris e hipotensivas, semelhantes às induzidas por doses baixas de endotoxina. Há um aumento discreto acompanhante na hematopoese, que pode diminuir o nadir e encurtar o período de supressão da medula óssea naqueles que estejam recebendo quimioterapia supressora da medula óssea (Iizumi, 1991). No entanto, o efeito benéfico da administração de IL-1 é limitado por causa de sua profunda toxicidade.

A monitoração dos níveis de IL-1 ou IL-1RA no soro e em outros líquidos corporais pode ser útil no diagnóstico e na monitoração da atividade de doenças. Além disso, os níveis urinários de IL-1β são elevados em pacientes com glomerulonefrite por imunocomplexo e podem atuar como um meio não invasivo útil de fazer o acompanhamento da atividade da doença (Hrvacevic, 2001). Quando medida no contexto clínico apropriado, que inclui dor torácica, observou-se que a elevação significativa da IL-1RA ocorre antes da elevação de marcadores de necrose miocárdica, como a troponina I, e pode ser um marcador precoce de infarto do miocárdio iminente (Patti, 2004). Crianças com histiocitose da célula de Langerhans têm níveis séricos elevados de IL-1RA que diminuem após quimioterapia bem-sucedida, sendo um meio potencialmente sensível de rastrear a atividade da doença após o tratamento (Rosso, 2003).

Interleucina 2

A IL-2 é uma glicoproteína de 15,5 kDa com 133 aminoácidos, um dos quatro membros do feixe α-helical da família de citocinas (Bazan, 1990). O receptor para a IL-2 (IL-2R) é um complexo da membrana tripartite que existe em três formas celulares: um complexo de alta afinidade de subunidades α, β e γ, um complexo de afinidade intermediária de subunidades β e γ, e um receptor de baixa afinidade feito apenas de IL-2Ra. Apenas o IL-2Raβγ e o IL-2Rβγ são capazes de traduzir o sinal após a ligação do ligante. Nas células T e destruidoras naturais (NK), a IL-2 ativa vias intracelulares, inclusive JAK/STAT. Os genes-alvo das vias de sinalização ativadas pela IL-2 incluem *bcl-2*, *c-myc*,

c-jun e *c-fos* (Gomez, 1998). Como compartilham subunidades das cadeias β e γ do receptor, as atividades biológicas da IL-2 e da IL-15 se sobrepõem. Ambas as citocinas estimulam a proliferação *in vitro* de células T CD4/CD8$^+$ ativadas, subconjuntos de células T γ/δ e células NK (Burton, 1994), ao mesmo tempo em que promovem a função citolítica de linfócitos T citotóxicos e células destruidoras ativadas por linfocina (LAK) (Burton, 1994; Grabstein, 1994). Além disso, ambas as citocinas podem induzir a proliferação de células B estimuladas e a síntese de IgM. A IL-2 também é quimiotática para células T (Armitage, 1995; Wilkinson, 1995). *In vivo*, a IL-2 pode ter um papel indispensável na manutenção da autotolerância, pois animais com deficiência de IL-2 desenvolvem imunodeficiência e condições autoimunes como anemia hemolítica e doença intestinal inflamatória (Willerford, 1995). Camundongos sem IL-2Rβ desenvolvem espontaneamente ativação da célula T e diferenciação de plasmócitos a partir de células B, com níveis séricos aumentados de IgG e IgE (Suzuki, 1995; Wang, 1996). Isso sugere que a IL-2 pode facilitar a indução de alergia ou apoptose na morte da célula T induzida pela ativação.

A estimativa dos níveis da IL-2 em pacientes com doença maligna pode proporcionar informação prognóstica útil. O nível de secreção da IL-2 em culturas de sangue total de pacientes com carcinoma pulmonar de células pequenas no momento do diagnóstico é mais baixo nos pacientes com a sobrevivência reduzida após quimioterapia (Fischer, 2000). A terapia anticitocina com anticorpo monoclonal direcionado contra a IL-2R (daclizumabe e basiliximabe) foi empregada com algum sucesso na prevenção da rejeição no transplante renal (Jacobsohn, 2002, 2004).

Interleucina 3

A atividade da IL-3 foi detectada pela primeira vez em culturas de linfócitos esplênicos de camundongos *nude*, em que é induzida pela enzima 20-α-hidroxisteroide desidrogenase (Ihle, 1981). É uma proteína de 26 kDa que se expressa em uma população restrita de células, inclusive as células T ativadas, células NK, mastócitos e alguns megacariócitos (Blalock, 1999). A síntese ótima da IL-3 requer a ativação da célula T via o complexo TCR/CD3. Isso inicia as vias intracelulares que levam à ativação de NF-κB, que entra no núcleo para transativar a expressão do gene de IL-3 (Link, 1992; Park, 1993). O receptor da IL-3 é um membro da família de genes receptores de citocina e tem uma cadeia α específica do ligante associada de forma não covalente a uma cadeia β transdutora de sinal. As células-alvo da IL-3 incluem precursores de células T e B *in vitro*. A administração *in vivo* da IL-3 em doses farmacológicas produz aumento de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em camundongos (Metcalf, 1986). Há indícios de um papel para a IL-3 na hipersensibilidade por contato, pois camundongos com deficiência de IL-3 exibem hipersensibilidade específica de hapteno pouco desenvolvida (Mach, 1998). Além disso, evidências apontam um papel para a IL-3 no desenvolvimento normal do SNC (Chiang, 1996).

Interleucina 4

A IL-4 realiza funções importantes na regulação da produção de anticorpo, na hematopoese, na inflamação e no desenvolvimento das respostas das células T efetoras. É uma proteína complexa com muitas pontes dissulfídicas intramoleculares e locais de glicosilação cujo gene foi mapeado no cromossomo 5. A produção da IL-4 é altamente regulada e está restrita a um subconjunto de células T ativadas, mastócitos, basófilos e eosinófilos (Paul, 1991). Os efeitos biológicos da IL-4 são mediados pela alta afinidade dos receptores da IL-4 (IL-4R) compostos de uma cadeia α específica do ligante e uma cadeia γ transdutora de sinal compartilhada por várias outras citocinas, inclusive as interleucinas 2, 7, 9, 13, 15 e 21. A IL-4 ativa células B e promove sua diferenciação, refletindo o fato de que foi descrita primeiro em sobrenadantes de culturas de células T e fator de crescimento da célula B titulado. Além de induzir a expressão de CD23 e moléculas de MHC nas células B, regula a apoptose de células B e o desvio de isótipo, em particular IgG1 e IgE (Brown, 1997). No âmbito da hematopoese, a IL-4 estimula a formação de colônia por precursores eritroides, megacariócitos, mastócitos e granulócitos/monócitos, ao mesmo tempo em que promove o desenvolvimento de subconjuntos CD4$^+$ Th (Sillaber, 1991; Erard, 1993).

Na resposta inflamatória, a IL-4 induz a proliferação de células endoteliais e causa suprarregulação de moléculas de adesão à célula endotelial, permitindo maior adesão de leucócitos às superfícies dos vasos, antes que migrem para pontos de inflamação localizada. Além disso, a IL-4 é quimiotática para eosinófilos e promove citotoxicidade em monócitos e células T (Tepper, 1989; Crawford, 1993). Níveis elevados de IL-4 são encontrados em doenças alérgicas como a dermatite atópica e a febre do feno (Tepper, 1989). Níveis elevados de IL-4 nas lágrimas e no sangue de pacientes atópicos conforme determinados pelo ELISA sugerem um papel da IL-4 na doença alérgica e podem atuar como marcadores da gravidade da doença (Paranos, 1998; Fujishima, 1995). A IL-4 também confere certa proteção contra alguns parasitas intracelulares e diminui as respostas autoimunes danosas ao inibir respostas prolongadas da célula T (Finkelman, 1986; Rapoport, 1993). A IL-4 também participa da imunidade tumoral promovendo atividade de células NK efetoras e tumoricida de macrófagos (Bosco, 1990). Ao mesmo tempo, a IL-4 está implicada no crescimento de leucemias de células T humanas *in vitro*. Por estar associada a um desvio de células CD8$^+$ efetoras para células não citotóxicas, a IL-4 pode desempenhar um papel na progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Erard, 1993).

Interleucina 5

A IL-5 é um homodímero de 45 kDa e 134 aminoácidos ligados por pontes dissulfídicas, que desempenha uma papel fundamental na maturação, na ativação e na sobrevida de eosinófilos, bem como no desenvolvimento de doenças atópicas e na eosinofilia. O gene da IL-5 reside no cromossomo 5, em um aglomerado de genes que codificam IL-3, IL-4 e o fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). O receptor para a IL-5 (IL-5R) consiste em uma cadeia α específica do ligante e uma cadeia β transdutora de sinal comum aos receptores para a IL-3 e GM-CSF (Tavernier, 1991). Os domínios intracitoplasmáticos das subunidades α e β contêm regiões envolvidas na ligação de JAK-2 e JAK-1, respectivamente, necessárias para a transdução do sinal. A IL-5 é produzida por células Th2, mastócitos, células NK, células B, eosinófilos, células malignas e algumas células transformadas por vírus. Ela promove a diferenciação, a migração, a atividade, a desgranulação e a sobrevivência de eosinófilos. A IL-5 é responsável por induzir o acúmulo, a ativação e a desgranulação de eosinófilos após desafio antigênico, possivelmente por sua atividade quimiotática discreta, sua capacidade de facilitar a suprarregulação de certas moléculas de adesão presentes nos eosinófilos, como CD11b, e pela promoção da liberação de grânulos induzida pela IgG (Wang, 1989; Fujisawa, 1990; Walsh, 1991).

O papel da IL-5 na doença humana pode incluir a promoção do dano à membrana basal visto no penfigoide bolhoso, promovendo a infiltração de eosinófilos em locais de infestação parasitária e a produção de anticorpos receptores de antitireotropina na doença de Graves. Além disso, a eosinofilia local da doença de Hodgkin pode estar associada à capacidade da célula de Reed-Sternberg liberar IL-5. Nas respostas alérgicas, a liberação de IL-5 pelos mastócitos teciduais pode servir para promover o acúmulo de eosinófilos nos tecidos (Lalani, 1999). Entre as doenças infecciosas, níveis séricos diminuídos de IL-5 parecem ter boa correlação com a progressão da doença pelo HIV-1 como preditor de imunodeficiência em crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV-1 (Resino, 2001).

Atualmente, o ELISA é empregado para a estimativa *in vitro* de IL-5, e as técnicas de imunofluorescência permitem a localização de IL-5 em células específicas, enquanto a hibridização *in situ* permite a localização exata da IL-5 dentro de células individuais.

Interleucina 6

A IL-6 foi identificada inicialmente nos sobrenadantes de culturas de células T auxiliares como um agente capaz de induzir a proliferação de células B e sua secreção de imunoglobulina. Contudo, suas ações estendem-se a muitas células-alvo, sendo ela agora reconhecida como uma citocina imune, hematopoética e pró-inflamatória importante (Hirano, 1998). A IL-6 é secretada como um peptídeo de 184 aminoácidos e cerca de 21 kDa, dependendo da extensão da glicosilação. O gene que codifica a IL-6 foi mapeado no cromossomo 7 (Hirano,

1986). O complexo receptor para a IL-6 (IL-6R) (Hirano, 1998) é membro da superfamília de receptores de citocinas, composto por uma cadeia α de ligação específica do ligante de 80 kDa (IL-6Rα) e uma cadeia β sinalizadora associada de forma não covalente, gp130. A subunidade β é compartilhada por outros receptores, inclusive aqueles para a IL-11 e GM-CSF. Isso pode ser responsável pela redundância funcional observada nessas atividades das citocinas. O complexo combinado IL-6R forma um receptor de alta afinidade para a IL-6, permitindo a transdução do sinal pelas vias JAK/STAT.

Uma variedade de células produz IL-6, inclusive as células T e B, monócitos e macrófagos, fibroblastos, ceratinócitos, sinoviócitos, condrócitos e células endoteliais. A IL-6 age sobre células T, hepatócitos, progenitores hematopoéticos e células neuronais. É um fator de crescimento poderoso para linhagens celulares do mieloma humano e do plasmacitoma, tendo uma ação autócrina e parácrina em mielomas humanos transplantados para camundongos. Nos hepatócitos, a IL-6 estimula a produção de vários reagentes da fase aguda e, em camundongos *knockout* para IL-6, a liberação de reagentes da fase aguda e Ig é grandemente reduzida. Nas células hematopoéticas, a IL-6 causa proliferação e diferenciação de células T, facilita a formação de colônia de progenitores hematopoéticos multipotenciais e induz a maturação de megacariócitos. Ela estimula a formação de osteoclastos e a proliferação das células de músculo liso vascular e induz a produção de fator de crescimento derivado de plaquetas. No SNC, a IL-6 mantém a sobrevivência de neurônios colinérgicos, enquanto no sistema reprodutivo induz a secreção de gonadotrofina coriônica a partir de trofoblastos.

Foram observadas anormalidades na produção de IL-6 entre pacientes com artrite reumatoide e uma correlação significativa entre as concentrações de IL-6 e IgG no líquido sinovial em pacientes com essa doença (Hirano, 1988; Hermann, 1989). Em modelos animais, a administração de IL-6 parece ter um papel no desenvolvimento da glomerulonefrite membranoproliferativa grave e acelerada, lembrando alterações similares encontradas em pacientes com LES (Ryffel, 1994). Estudos com camundongos transgênicos sugerem um papel para a IL-6 no desenvolvimento de diabetes do tipo 1 e na geração de plasmacitomas monoclonais malignos (Suematsu, 1989; Hirano, 1991).

Evidências clínicas sugerem que a determinação dos níveis séricos de IL-6 em neonatos (Kuster, 1998) e pacientes sob quimioterapia para câncer (de Bont, 1999) pode ajudar a identificar os neonatos em risco iminente de sepse e aqueles com câncer cujos episódios febris devem-se mais à quimioterapia que à sepse. Os níveis de IL-6 no condensado respiratório de pacientes com carcinoma pulmonar de células pequenas medidos pelo ELISA estão aumentados acima daqueles de controle. A detecção precoce de aumento da IL-6 por esse meio não invasivo em populações de risco pode antecipar a detecção da doença e permitir a monitoração pós-terapia de doença recorrente (Carpagnano, 2002).

Interleucina 7

A IL-7 foi identificada pela primeira vez como uma glicoproteína murina de 25 kDa que mostrou efeitos proliferativos *in vitro* em células pré-B (Namen, 1988). Embora descrita inicialmente como fator de crescimento da célula B, subsequentemente descobriu-se que a IL-7 era crítica para a linfopoese de células T e B, bem como um mobilizador de células progenitoras mieloides (Grzegorzewski, 1994). A citocina ativa é produzida por ceratinócitos epidérmicos e células estromáticas da medula óssea e do timo. O receptor da IL-7 (IL-7R) é um membro da superfamília de receptores de hematopoetina, compartilhando uma cadeia γ em comum com receptores para as interleucinas 2, 4, 7, 9, 13 e 21, o que explica em parte os efeitos superpostos e redundantes que essas citocinas têm sobre as populações de células T.

Camundongos transgênicos para a IL-7 desenvolvem números elevados de células B e T e suas progenitoras. Anticorpos neutralizantes para a IL-7R administrados a camundongos resultaram em grande diminuição do número de timócitos e células da linhagem B na medula óssea, com números reduzidos de células B e T no baço e nos linfonodos (Peschon, 1994). Camundongos *knockout* para IL-7 e IL-7R apresentam grandes reduções das mesmas populações celulares. Devido à sua função hematopoética importante, a IL-7 acelera a reconstituição de células T e B em camundongos que tenham recebido irradiação letal, com efeito mínimo sobre o compartimento mieloide. A IL-7 estimula o crescimento e aumenta a atividade citotóxica entre células T maduras e citotóxicas, respectivamente. *In vitro*, as células T isoladas da lâmina própria intestinal proliferam em resposta à IL-7 exógena e mostram maior capacidade de responder ao anticorpo anti-CD3 e à IL-2, sugerindo um papel para essa citocina no tocante a acentuar as respostas imunes mediadas por célula (Watanabe, 1995). Foram sugeridos papéis clínicos da IL-7 que variam do aumento dos compartimentos de células T de pacientes com AIDS ao tratamento de cânceres por meio de sua atividade facilitadora de LAK.

Interleucina 8 e as quimiocinas

A IL-8, um membro da superfamília das quimiocinas, é responsável pelo acúmulo de neutrófilos em locais de inflamação (Hoch, 1996) e induz translocação de cálcio, quimiotaxia, alteração da forma, polimerização de actina e possivelmente também explosão da atividade respiratória dentro dessas células. Também é quimiotática para basófilos e um subconjunto de células T CD4/CD8$^+$. Vários tipos celulares produzem o pequeno peptídeo IL-8, inclusive células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células T.

A IL-8 é liberada em resposta a vários estímulos, como lipopolissacarídeo e leucotrienos e, embora possa existir como homodímero ligado de forma não covalente, tem maior atividade quimiotática como monômero (Paolini, 1994). Dois receptores, ambos membros da superfamília de receptores do domínio sete transmembrana, medeiam o efeito biológico da IL-8: o receptor A de IL-8 (IL-8RA) e o receptor B de IL-8 (IL-8RB). Aparentemente, o IL-8RA tem afinidade e especificidade maiores em relação ao ligante, enquanto o IL-8RB demonstra afinidade e especificidade menores, sendo capaz de ligar-se a outras proteínas quimioatraentes relacionadas com a IL-8. A injeção intradérmica de IL-8 causa infiltração intensa e imediata de neutrófilos em torno de vênulas, com um exsudato plasmático local. Todavia, para alcançar áreas de inflamação, os leucócitos primeiro precisam atravessar o endotélio local. Isso em parte é facilitado pela IL-8, que altera a expressão da integrina do neutrófilo ao ativar CD11b/CD18 para sua conformação de alta afinidade e dispara o derramamento de L-lectina. A IL-8 forma parte do gradiente quimiotático positivamente regulado e ligado à superfície das células endoteliais localizadas nas proximidades da inflamação, que é seguido pelos leucócitos ativados. Como proteína solúvel, a IL-8 forma um gradiente quimiotático dentro dos tecidos, orientando os leucócitos extravasados para os locais de inflamação. A IL-8 também pode ser armazenada nos corpúsculos de Weibel-Palade, onde está disponível para liberação imediata independentemente da síntese (Rot, 1996). É interessante que, embora ela aja predominantemente como fator quimiotático, níveis aumentados de IL-8 dentro do sistema circulatório estão associados a menor acúmulo de neutrófilos nos locais de inflamação, apesar de que se observa uma neutrofilia sistêmica (Hechtman, 1991), o que também sugere uma função anti-inflamatória para a IL-8.

Desde a identificação da IL-8 como a primeira quimiocina em 1987, a superfamília das quimiocinas aumentou. Elas agem como fatores quimiotáticos ao ativarem integrinas leucocitárias, em particular LFA-1, CAM-1 e VLA-4, para ligar-se à célula endotelial ICAM-1 e VCAM-1. Também são críticas para a hematopoese, a angiogênese, a ativação de células T e NK, a patogênese do HIV e no desenvolvimento do SNC. No momento, a superfamília é dividida em quatro famílias com base nas posições da primeira e da segunda de quatro cisteínas na sequência de aminoácidos. A família CXC (família α) tem um aminoácido que separa as duas primeiras cisteínas; a família CC (família β) não tem aminoácido interveniente; na família C (família γ), os membros perderam as cisteínas um e três; e a família CX3C de quimiocinas (família δ) tem três aminoácidos intervenientes. A família CXC é ainda subdividida em membros que têm um *motif* glutamato-leucina-arginina (E-L-R) em sua sequência terminal amino e possui atividade angiogênica e quimiotática sobre neutrófilos. Os membros sem o *motif* E-L-R em geral são fatores quimiotáticos de linfócitos e não têm atividade angiogênica. A família CC de quimiocinas é a maior e contém membros quimiotáticos para monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células NK. Seus membros também podem regular a hematopoese dentro da cavidade medular e induzem a desgranulação de mastócitos e eosinófilos. A linfotactina é o único membro da família C das quimiocinas. Sua mais alta expressão é no timo, onde pode servir para recrutar precursores imaturos da célula T da medula óssea. Outras funções dessa quimiocina ainda não foram definidas. A família da quimiocina CX3C também tem

mais um membro no presente, a fractalcina (neurotactina). Ancorada às superfícies celulares por uma haste semelhante à mucina, a parte extracelular pode ser liberada das superfícies celulares para agir como fator quimiotático para monócitos, células T e NK *in vitro*. Um papel da fractalcina no processo inflamatório é sugerido por sua suprarregulação no endotélio do SNC de camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE), na presença do fator de necrose tumoral (TNF). Como a fractalcina também se expressa dentro do cérebro normal, pode ser que desempenhe um papel não patológico nesse local.

As quimiocinas podem promover a progressão da doença. Estudos esclareceram o papel da IL-8 em vários estados inflamatórios, desde a artrite crônica até a sepse. Alguns sugeriram a medição dos níveis de IL-8 na urina como meio de monitorar a gravidade da doença glomerular (Wada, 1994). Na sepse, a IL-8 é central para o acúmulo de neutrófilos em vários órgãos e a progressão para o estágio terminal da doença. Outras quimiocinas, inclusive a RANTES (regulada à ativação, célula T normal expressa e secretada), a GROα e a MIP-1α, são ativas no choque séptico e podem fornecer alvos para intervenção terapêutica. Nas respostas granulomatosas, a presença de MIP-1α correlaciona-se com a formação de granuloma. De maneira semelhante, na EAE, o modelo animal para a esclerose múltipla, a progressão e a recidiva da doença são afetadas de forma positiva pela administração de anticorpos neutralizantes para a MIP-1α e a MCP-1. A estimativa da IL-8 junto à proteína C reativa em neonatos permitiu a detecção sensível e a identificação de casos de sepse neonatal verdadeira e menor necessidade de administração de antibiótico (Franz, 2001, 2004).

Interleucina 9

A proteína IL-9 humana contém 144 aminoácidos, e seu gene foi mapeado no cromossomo 5, onde genes para outros fatores de crescimento e receptores de fator de crescimento (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF e CSF-1R) formam um aglomerado. O cDNA para o receptor de IL-9 (IL-9R) codifica um ligante específico de 522 aminoácidos, membro da cadeia α da superfamília de receptores hematopoéticos, que se associa a uma cadeia γ transdutora de sinal compartilhada com as interleucinas 2, 4, 7, 13, 15 e 21. O fato de que uma subunidade receptora comum é empregada por essas citocinas pode explicar algumas das redundâncias de atividade observadas entre elas. Após a ligação da IL-9, a cadeia γ transmite sinal pelas vias JAK/STAT (Yin, 1995).

A IL-9 funciona durante a resposta imune e tem atividade de fator de crescimento e apoptótica nas linhagens de células transformadas. Em humanos, a expressão da IL-9 aparentemente é limitada a subconjuntos de células T $CD4^+$ CD45 positivas para RO (células T de memória) e a células T CD45-RA^+ na presença de IL-4 e IL-10 (Houssiau, 1995). Células T recém-isoladas em culturas de longa duração acabam respondendo à atividade da IL-9 promotora do crescimento e, em culturas murinas de células T, acabam sofrendo transformação tumoral (Uyttenhove, 1988). É interessante o fato de que 5 a 10% dos camundongos transgênicos que apresentam superprodução espontânea de IL-9 desenvolvem linfomas linfoblásticos (Renauld, 1994), e a IL-9 é produzida nas células tumorais do linfoma de Hodgkin e do linfoma anaplásico (Merz, 1991). O último aumenta a possibilidade de uma alça autócrina de IL-9 (Demoulin, 1998). Recentemente, mostrou-se que os níveis séricos de IL-9 medidos por uma nova técnica ELISA são elevados, especialmente na esclerose nodular do linfoma de Hodgkin (Fischer, 2003). Dentro do sistema hematopoético, a IL-9 e a eritropoetina parecem manter a maturação de progenitores eritroides *in vitro* e podem promover o crescimento de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) a partir de progenitores $CD34^+$. A IL-9 exerce atividade promotora do crescimento sobre linhagens de mastócitos e também pode regular a diferenciação de mastócitos (Eklund, 1993). Sugeriu-se que a IL-9 induz a resistência a parasitas *in vivo* dependente de mastócitos e, com a IL-4, facilita a produção de IgE e IgG (Louahed, 1995). Um papel para a IL-9 no SNC é sugerido por sua capacidade de manter a extensão aumentada de neurito e promover excitabilidade entre culturas de linhagens de células progenitoras imortalizadas do hipocampo de camundongo (Mehler, 1993).

Estudos em animais sugerem um papel para a IL-9 no desenvolvimento da asma e da hiperreatividade brônquica (Soussi-Gounni, 2001), e ela pode ainda estimular a hiperplasia de células globosas do epitélio respiratório, promovendo assim a produção excessiva de muco (Vermeer, 2003). As terapias que visam ao bloqueio da IL-9 podem acabar mostrando-se valiosas para controlar o remodelamento indesejável associado à doença reativa das vias respiratórias.

Interleucina 10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória potente que foi mapeada no cromossomo 1 (Fiorentino, 1989). É uma proteína de 160 aminoácidos com massa molecular de 18,5 kDa (Kim, 1992). O receptor de IL-10 (IL-10R) expressa-se principalmente nas células hematopoéticas e liga moléculas de IL-10 dimerizadas (Tan, 1995). A transdução do sinal da IL-10 é mediada pela via JAK/STAT (Lalani, 1997). Embora muitos tipos celulares, inclusive células Th2, $CD4^+$ e $CD8^+$, monócitos e macrófagos, mastócitos, ceratinócitos, eosinófilos, células epiteliais e várias células tumorais, sejam capazes de produzir IL-10, é o monócito que produz o volume de IL-10 na maioria das condições inflamatórias (Lalani, 1997). Como pode ser produzida de forma autócrina e regula sua própria produção mediante uma alça de retroalimentação (*feedback*) negativa, a IL-10 regula a resposta inflamatória de dentro do foco inflamatório, conforme a necessidade (Tan, 1995). A IL-10 age inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-6, IL-8, TNF, G-CSF, GM-CSF e quimiocinas, inclusive IL-8 e MIP-1α, ao suprimir a transcrição de seus genes correspondentes (Goldman, 1997). A IL-10 também suprime a liberação de radicais livres de oxigênio e inibe a atividade microbicida dependente de óxido nítrico dentro de macrófagos (Fleming, 1996).

Em condições alérgicas como a asma, a produção de IL-5 é um evento iniciador crucial. *In vitro*, a IL-10 impede a produção de IL-5 em células Th0, Th2 e T em repouso e infrarregula a expressão do MHC da classe II entre APCs. Também inibe a expressão de MIP-1α em neutrófilos humanos, monócitos e macrófagos, inibe a produção de fatores quimiotáticos ativos em locais de inflamação crônica e pode inativar diretamente a função de eosinófilos humanos e acelerar a morte dos últimos. Esses achados sugerem o potencial da IL-10 para limitar a inflamação crônica das vias respiratórias (Pretolani, 1999).

A IL-10 pode participar da indução e da perpetuação do LES, e a atividade da doença correlaciona-se com seus títulos (Houssiau, 1995). Está implicada em outras doenças autoimunes, inclusive a miastenia grave, a doença de Graves, a síndrome de Sjögren, a polimiosite, a psoríase, a esclerose sistêmica, o pênfigo vulgar, o penfigoide bolhoso e a doença de Kawasaki (Lalani, 1997). Além disso, a detecção de IL-10 elevada pelo ELISA em pacientes com carcinoma pulmonar de células pequenas e adenocarcinomas do cólon pode ser um preditor útil de progressão da doença não detectável clinicamente (De Vita, 1999, 2000), e, em pacientes febris com câncer, sua detecção pode ser útil para identificar os casos devidos a infecção, em vez de febre relacionada com neoplasias, permitindo que a terapia apropriada seja iniciada (Kallio, 2001).

Interleucina 11

A IL-11 é uma citocina de 23 kDa com numerosos efeitos sobre muitos tecidos, inclusive a medula óssea, o cérebro, o intestino e os testículos. O gene que a codifica está mapeado no cromossomo 19, e sua estrutura tridimensional provavelmente contém quatro *motifs* α-helicoidais (Czupryn, 1995). O receptor de IL-11 (IL-11R) é formado a partir da associação não covalente de um ligante específico da cadeia α e uma cadeia β transdutora de sinal, gp130. O complexo IL-6R também usa a subunidade gp130 como cadeia sinalizante, sendo responsável por parte da sobreposição na ação dessas citocinas (Cherel, 1996). Quando associado ao IL-11Rβ (gp130), a afinidade da ligação pela IL-11 é alta, e um sinal biológico é gerado pela formação de homodímeros de gp130. Acredita-se que estes ativem as vias de transdução, incluindo quinases JAK, quinases MAPK, proteínas quinase ribossômicas S6 e quinases da família Src (Fuhrer, 1996). O mRNA da IL-11 foi detectado em muitos tecidos estimulados, inclusive fibroblastos, células epiteliais, condrócitos, sinoviócitos, osteoblastos e células do glioblastoma.

Evidências indicam que a IL-11 é uma citocina pró-inflamatória potente (Redlich, 1996; Trepicchio, 1998). Seus efeitos hematopoéticos (Du, 1995) incluem um papel na megacariocitopoese e na estimulação da eritropoese, na proliferação e na diferenciação de macrófagos

e na produção de imunoglobulina pela célula B. Além disso, ela regula a diferenciação e a maturação das células mieloides progenitoras em combinação com o fator da célula-tronco e pode ter um papel na linfopoese. Em pacientes sob quimioterapia, o tratamento com IL-11 melhora a recuperação da hematopoese e a função imune, além de reduzir a morbidade da quimioterapia supressora da medula óssea.

A IL-11 também tem efeitos não hematopoéticos extensos (Du, 1995). Pode funcionar na inflamação pulmonar e é produzida por células epiteliais alveolares e pulmonares estimuladas em grandes quantidades. Os vírus respiratórios são fortes estimuladores da síntese de IL-11 no pulmão, e a IL-11 é detectada nas secreções nasais de crianças com infecções do trato respiratório superior (Einarsson, 1996). A IL-11 também pode estar envolvida no controle do crescimento de células epiteliais gastrintestinais, tendo-se demonstrado que ela inibe de forma reversível a proliferação de linhagens de célula-tronco nas criptas intestinais *in vitro*. Pode ser capaz ainda de conferir proteção ao epitélio da mucosa gastrintestinal após radiação e quimioterapia (Keith, 1994).

Outras atividades da IL-11 incluem o desenvolvimento de osteoclastos *in vitro*, um papel na sobrevida de neurônios sensoriais e motores, estimulação da liberação de reagentes da fase aguda *in vitro* e *in vivo*, além da regulação do metabolismo da matriz extracelular (MEC). Na biologia tumoral, a IL-11 age de forma sinérgica com outras citocinas para promover o crescimento de linhagens celulares da leucemia humana e estimula a formação de colônias de blastos leucêmicos (Hu, 1993; Lemoli, 1995). Foi detectado um efeito trombocitopoético benéfico em pacientes com a doença de Crohn que receberam IL-11 recombinante (Sands, 1999).

Interleucina 12

A IL-12 é uma citocina heterodimérica de 70 kDa, codificada por dois genes separados (Trinchieri, 1994). O receptor de IL-12 (IL-12R) é um membro da superfamília de receptores de hematopoetina e tem homologia significativa com gp130 e o G-CSF e os receptores do fator inibidor da leucemia. A IL-12 promove a diferenciação de células humanas semelhantes à Th1, preparando-as para o aumento da produção de interferon γ (IFN-γ), e aumenta as capacidades citolíticas das células NK e T (Heufler, 1996). É produzida principalmente por monócitos e macrófagos, células dendríticas (APCs profissionais) e, em menor extensão, por neutrófilos e ceratinócitos. Sua produção é infrarregulada pela IL-10 e pelo TGF-β, e sua síntese aumenta por influência do IFN-γ. A síntese de IL-12 é induzida rapidamente em células fagocíticas por certas cepas bacterianas e por patógenos intracelulares, inclusive protozoários e fungos e, em menor extensão, por vírus.

A IL-12 desempenha um papel vital como citocina pró-inflamatória. Em modelos de choque séptico que envolvem injeções intraperitoneais de endotoxina em camundongos, descobriu-se que a IL-12 promove a superprodução de IFN-γ, que, por meio de uma alça de retroalimentação positiva, induz a liberação de mais IL-12 ainda. Por fim, a superprodução de IFN-γ causa a morte do animal. O papel importante da IL-12 nessa série de eventos é ressaltado pela observação de que a injeção de anticorpos anti-IL-12 neutralizantes em camundongos salva cerca de 90% deles da morte (Trinchieri, 1994). Evidências sugerem que a IL-10 inibe a produção de IL-12 por fagócitos e que a própria IL-12 pode estimular a produção de IL-10, servindo assim como regulador negativo de sua própria produção (Meyaard, 1996). A evidência em animais de experimentação sugere um papel exacerbante para a IL-12 em certas doenças autoimunes, inclusive o diabetes autoimune, a artrite, o modelo animal de esclerose múltipla (EAE) e a colite (Trinchieri, 1997). Mas, em condições alérgicas, a IL-12 desempenha o papel de amenizá-las, graças à sua capacidade de infrarregular a produção de IL-4, IL-5 e IgE. O efeito é marcante na resposta excessiva da via respiratória à indução antigênica em modelos de camundongo (Gavett, 1995).

A IL-12 tem efeitos antitumorais e antimetastáticos sanguíneos em modelos de camundongo *in vivo* (Zitvogel, 1995). Contudo, observou-se toxicidade gastrintestinal, hepática e hematológica em ensaios clínicos com rIL-12 entre pacientes com carcinoma de célula renal. Devido ao seu papel na promoção de respostas de memória Th1 a vacinas, a IL-12 pode ser importante como adjuvante da vacina. Quando expressa como uma proporção com IL-10 sérica, a estimativa da IL-12 sérica pode ajudar a identificar pacientes com câncer e febres relacionadas com infecção, permitindo a antibioticoterapia apropriada e imediata (Kallio, 2001).

Interleucina 13

A IL-13 é uma proteína de 12 kDa com 132 aminoácidos, cujo gene foi mapeado no cromossomo 5 no aglomerado de genes que contém IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e GM-CSF. Acredita-se que tenha uma estrutura α-helicoidal, com quatro α-hélices e dois folhetos β dobrados. O receptor da IL-13 (IL-13R) expressa-se nas células B, em monócitos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, ceratinócitos e certas células tumorais. Aparentemente, não se expressa nos linfócitos T humanos. A IL-3 e a IL-4 compartilham um componente receptor comum, gp140, que serve como receptor de baixa afinidade (IL-13Ra) para a IL-13 e receptor do tipo II (IL-4Ra) para IL-4. Portanto, não surpreende o fato de que a IL-13 elicia muitas das ações biológicas da IL-4. Quando unidos ao ligante, o IL-13R e o IL-4R fazem a transdução do sinal pelas vias JAK/STAT (Burd, 1995; Keegan, 1996). A IL-13 é liberada dos subconjuntos Th0, Th1 e Th2 de clones de células T CD4/CD8$^+$ em resposta à estimulação do antígeno específico ou à ativação policlonal, bem como de mastócitos, basófilos e eosinófilos após estimulação por meio de seus receptores de alta afinidade para IgE (CD23) (Keegan, 1996). É em sua maior parte uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1α e IL-1β, IL-12 e IFN-γ por monócitos ativados por lipopolissacarídeos. A IL-13 é capaz de induzir a secreção de IgE de células B humanas cultivadas e aumentar a expressão da molécula de adesão pró-inflamatória VCAM-1 nas células endoteliais. Tal fato e a observação de que a síntese de IL-13 aumenta em condições atópicas nos pulmões de asmáticos e em pacientes com sinusite crônica, enquanto diminui em resposta à administração de corticosteroides, ressaltam a importância da IL-13 nas condições alérgicas (de Vries, 1998). Ao mesmo tempo, a IL-13 parece atenuar a resposta alérgica ao infrarregular a capacidade das células endoteliais e da musculatura lisa das vias respiratórias de liberar linfócitos T e o fator quimiotático inflamatório celular RANTES (Tony, 1994). É quimiotática para monócitos, promove a proliferação de células B ativadas e, *in vitro*, parece promover a formação de colônia de megacariócitos e facilitar a proliferação de células progenitoras da medula óssea murina. Sua infrarregulação da produção de fator tecidual e a suprarregulação da produção de trombomodulina ressaltam ainda mais sua natureza anti-inflamatória.

Interleucina 14

A IL-14 pode ter sido denominada prematuramente, mas refere-se ao fator de crescimento de células B de alto peso molecular, proteína que causa proliferação de células B e inibição da secreção de imunoglobulina (Ambrus, 1993).

Interleucina 15

A IL-15 é uma proteína de 14 a 15 kDa, identificada pela primeira vez como fator de crescimento celular nos sobrenadantes de uma linhagem de células epiteliais renais de macaco (Grabstein, 1994). Embora sua sequência de aminoácidos primária seja única, sua estrutura tridimensional lembra muito a de outros membros da família de citocinas com quatro feixes de α-hélice, que inclui a IL-2, uma citocina com atividades funcionais semelhantes. O gene que codifica a IL-15 foi mapeado no cromossomo 4, próximo do gene da IL-2 (Anderson, 1995). O receptor da IL-15 (IL-15R) é composto por três subunidades de proteína: uma cadeia IL-15Rα específica do ligante, uma cadeia β e uma cadeia γ, as duas últimas idênticas às cadeias β e γ da IL-2R. Esse arranjo é responsável pelas atividades semelhantes da IL-15 e da IL-2. A IL-15 utiliza as vias JAK/STAT durante a transdução do sinal (Johnston, 1995).

Macrófagos, fibroblastos, ceratinócitos, células epiteliais e outros tecidos secretam IL-15 mas, ao contrário da IL-2, ela não é secretada por linfócitos. Apesar disso, a distribuição tecidual da IL-15 é ampla, com transcritos de mRNA também identificados em monócitos e macrófagos, células de Langerhans, dendríticas e endoteliais. O mRNA da IL-15 parece ser estocado em compartimentos inativos de tradução que ficam disponíveis para tradução no início da resposta

inata à infecção. A produção de IL-15 por macrófagos na fase inicial de uma infecção microbiana pode servir para ativar células NK como parte da resposta à infecção (Cosman, 1995).

Como ocorre com a IL-2, mostrou-se que a IL-15 participa da coestimulação da proliferação de células T, da indução da atividade de citocinas nas células T, da proliferação de células NK e da ativação da proliferação de células B e da liberação de imunoglobulina (Kirman, 1998). Ao contrário da IL-2, a IL-15 pode aumentar anabolicamente a massa muscular esquelética e demonstrou estimular a proliferação de mastócitos *in vitro* e *in vivo*. A IL-15 é quimiotática para células T, recrutando-as para locais de inflamação, tendo-se sugerido tal papel na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide (McInnes, 1996). Outra evidência aponta um papel para a produção de IL-15 em condições inflamatórias como a colite ulcerativa, a hepatite C e a sarcoidose. Em tais condições, a IL-15 pode servir para recrutar leucócitos ativados para áreas de inflamação onde eles seriam capazes de liberar outras citocinas pró-inflamatórias e exercer efeitos citotóxicos (Kirman, 1998). Em pacientes com enterocolite por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SAMR), verificou-se que a IL-15 sérica aumenta antes do início da diarreia, mas seus níveis séricos permaneceram inalterados em infecções relacionadas com o SAMR em outros locais que não o cólon, sugerindo um papel na patogênese da enterocolite por SAMR e proporcionando um marcador sérico da gravidade da doença (Mayumi, 1999).

Interleucina 16

Inicialmente reconhecida como fator quimiotático ativo em culturas de células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas por mitógeno (Center, 1982), a IL-16 agora é reconhecida como um fator quimiotático pró-inflamatório de célula T. Linfócitos estimulados por mitógeno produzem IL-16 como uma molécula precursora que é clivada e secretada. Somente após a agregação em homotetrâmeros, a IL-16 parece ter atividade biológica (Bazan, 1996). O gene que a codifica foi mapeado no cromossomo 15. A CD4 de superfície parece atuar como receptor de superfície para a IL-16 solúvel e é absolutamente necessária para a sinalização biológica (Cruikshank, 1994). A IL-16 é liberada pelas células T após estimulação com mitógenos, antígenos, histamina e serotonina. Eosinófilos e mastócitos cultivados também podem liberar IL-16 na presença de GM-CSF e PMA ou ionóforo de cálcio, respectivamente.

A IL-16 serve como fator quimiotático para células T $CD4^+$ e outras células imunes que expressam CD4, incluindo monócitos e eosinófilos. É um fator de crescimento competente para elas e estimula a progressão do ciclo celular em células T $CD4^+$ humanas (Cruikshank, 1994). Além disso, a IL-16 promove aumento da adesão à matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) por eosinófilos e suprarregula a expressão de HLA-DR entre monócitos (Wan, 1995). O resultado *in vivo* pode ser o maior acúmulo de células T $CD4^+$ responsivas a citocinas nos locais de inflamação, que são protegidos contra a morte de células T induzida pela ativação mediada por TCR (Cruikshank, 1994).

Interleucina 17

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória de 32 kDa secretada como homodímeros ligados de forma covalente a partir de um conjunto restrito de células T humanas ativadas de memória (Yao, 1995; Fossiez, 1996). O gene que codifica essa citocina foi mapeado no cromossomo 2. A IL-17 expressa-se predominantemente por células T $CD4^+$ CD45-RO de memória em resposta a uma variedade de ativações (Fossiez, 1996). Estudos em camundongos sugerem que, em oposição à expressão restrita de IL-17, o receptor de IL-17 (IL-17R) é uma proteína nova distribuída em ampla escala, especialmente abundante no baço e nos rins. Evidências recentes implicam a via sinalizadora JAK/STAT na transdução de sinais do IL-17R (Subramaniam, 1999).

Foi sugerido um papel *in vivo* da IL-17 na proteção contra infecções bacterianas e, devido à sua capacidade de induzir a produção de altos níveis de citocinas, inclusive IL-6, IL-18 e MCP-1, ela pode servir para regular processos inflamatórios (Dalrymple, 1996). Ao contrário de seu papel protetor presumível em estados infecciosos, acredita-se que a IL-17 cause inflamação articular e promova destruição óssea e de cartilagem na inflamação autoimune, tendo sido identificada no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (Leonaviciene, 2004).

Interleucina 18

A IL-18 é uma proteína de aproximadamente 18 kDa produzida por macrófagos ativados, células de Kupffer, osteoblastos e ceratinócitos (Torigoe, 1997). A formação de IL-18 biologicamente ativa requer o processamento de um precursor de 24 kDa pela caspase 1 (ICE) nas células de Kupffer. O receptor da IL-18 (IL-18R) é idêntico à proteína relacionada com o IL-1R (IL-1Rrp) (Torigoe, 1997) e, quando ligado ao ligante, induz a ligação do DNA de NF-κB. São identificados IL-18Rs de alta e baixa afinidades, mas seus papéis na transdução de sinal não estão esclarecidos. A função primária da IL-18 parece ser a indução de IFN-γ em células Th1 ativadas e B anti-CD40 ativadas (na presença de IL-12). A IL-18 também induz a síntese de células T de GM-CSF e IL-6 e promove a citotoxicidade entre células NK, ao permitir a exocitose de perforinas e granzima A (Ushio, 1996). Os papéis fisiológicos da IL-18 podem incluir a defesa contra infecção e um papel na rejeição tumoral. Devido à supressão da produção de IgE, a IL-18 pode modificar a resposta alérgica (Yoshimoto, 1997), contudo sua produção desregulada está associada a danos ao parênquima hepático em modelos animais. A IL-18 pode ter alguma participação na patogênese da linfo-histiocitose hemofagocítica via indução de células Th1. A determinação dos níveis de IL-18 no sangue periférico dos pacientes afetados pode representar um meio de monitorar a atividade da doença latente na linfo-histiocitose hemofagocítica (Takada, 1999).

Estimativas laboratoriais seriadas da expressão gênica de IL-18 pela reação em cadeia da polimerase podem ser úteis para prever rejeição iminente a autoenxerto renal (Simon, 2004), enquanto níveis séricos elevados de IL-18 podem ajudar a identificar os pacientes com probabilidade de sucumbir ao choque pós-operatório (Emmanuilidis, 2002).

Interleucina 19

A IL-19 é um membro da família de moléculas relacionadas com a IL-10, que inclui IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 e IL-10. De início, ela foi identificada em monócitos estimulados com lipopolissacarídeo (Gallagher, 2000) e, como sua expressão seria suprarregulada pela IL-4 e infrarregulada pelo IFN-γ, seus descobridores propuseram um papel para ela na regulação do sistema Th1/Th2, mais tarde tendo demonstrado que ela pode ser capaz de infuenciar a maturação da célula T (Gallagher, 2004). Como ocorre com a maioria das citocinas descobertas recentemente, o papel fisiológico da IL-19 não está definido. No entanto, investigação recente de seu papel fisiológico sugere que pode funcionar dentro da pele e que polimorfismos de nucleotídeo único no gene da IL-19 (e da IL-20) podem influenciar a suscetibilidade à psoríase (Koks, 2004). Outros sugeriram um papel para a IL-19 na patogênese da asma, por sua suprarregulação da citocina Th2 em estudos com animais (Liao, 2004). Embora ainda não tenha sido identificado um receptor específico para a IL-19, ela parece capaz de ligar-se ao complexo receptor de IL-20 e, ao fazer isso, é capaz de iniciar a fosforilação de STAT3 (Dumoutier, 2001).

Interleucina 20

Conforme mencionado antes, a IL-20 é um membro da família da IL-10 de moléculas relacionadas. A molécula foi identificada inicialmente pelo uso de um algoritmo de bioinformática que também levou à identificação do aglomerado de genes da família da IL-10 (Blumberg, 2001). A investigação adicional com camundongos transgênicos com hiperexpressão de IL-20 sugere um papel da IL-20 na patogênese de doenças cutâneas, pois os filhotes desses camundongos desenvolvem anormalidades epidérmicas significativas. Os ceratinócitos expressam o receptor para IL-20 em suas superfícies e, após ligação com o receptor (possivelmente de maneira autócrina), a IL-20 induz a proliferação de ceratinócitos e a suprarregulação de citocinas inflamatórias, inclusive TNF (Rich, 2003) pela via de sinalização STAT3 (Blumberg, 2001). Como no caso da IL-19, polimorfismos de nucleotídeo único no gene da IL-20 podem influenciar a suscetibilidade a algumas formas de psoríase (Kingo, 2004). Outros demonstraram expressão de IL-20 em cultura de células gliais após estimulação com lipopolissacarídeo, indicando um possível papel da IL-20 na infecção (Hosoi, 2004) e na hematopoese por seu efeito como estimulante da formação de colônia por progenitores multipotenciais de $CD34^+$ (Liu, 2003).

Interleucina 21

A IL-21 é um membro da família da citocina IL-2 que inclui IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-2. Os membros dessa família compõem o tipo I da superfamília de citocinas, que compartilham uma cadeia estrutural γ comum. Produzida por células T ativadas, a IL-21 infra e suprarregula a resposta imune, dependendo do contexto sinalizador (Strengell, 2002; Mehta, 2004), ao modular a proliferação de células T e B e a atividade citotóxica e a maturação da classe NK (Parrish-Novak, 2002; Sivori, 2003). Estudos com rIL-21 em células B humanas também apontaram um papel para a IL-21 nos isótipos IgG1 e IgG3 (Pene, 2004). Um papel específico para a IL-21 na doença vem indiretamente de estudos feitos em animais, em que camundongos com níveis muito elevados de IL-21 parecem desenvolver uma condição autoimune que lembra o LES (Ozaki, 2004). Pode ser que haja um potencial terapêutico para a administração de IL-21, pois camundongos tratados com ela parecem manter a imunidade tumoral contra timoma em um modelo sinérgico de tumor (Moroz, 2004).

Interleucina 22

A IL-22 é uma citocina derivada primariamente da célula Th1, homóloga à IL-10 e outras moléculas da família da IL-10: IL-19, IL-20, IL-24 e IL-26. Ao contrário de sua homóloga IL-10, a IL-22 não parece regular as atividades imunes de células B, mas provavelmente funciona como indutora de reagentes da fase aguda (Xu, 2001; Nagem, 2002). Como a expressão do mRNA do receptor da IL-22 é mais alta no pâncreas, no fígado, no intestino delgado, no cólon e nos rins, macrófagos alveolares pulmonares e pneumócitos, a IL-22 pode servir para regular a resposta imune em tais tecidos. Nesse contexto, o *Western blotting* para IL-22 nos líquidos do lavado brônquico de pacientes com a síndrome da angústia respiratória aguda e sarcoidose demonstrou níveis de IL-22 mais baixos que nos controles normais, sugerindo um papel para a IL-22 na inflamação pulmonar (Whittington, 2004).

Interleucina 23

A IL-23 é uma citocina composta, produzida por macrófagos e células dendríticas ativadas, composta pela subunidade p19 específica da IL-12 e pela subunidade p40 da IL-12, que, juntas, formam uma citocina funcional única, capaz de induzir respostas imunes de longa duração a Th1 e linfócitos T citotóxicos, além de ela poder desempenhar um papel importante na estimulação autócrina de células apresentadoras de antígeno, no momento da resposta imune inicial ao antígeno (Puccetti, 2002). Como consequência, a IL-23 pode vir a ser útil como adjuvante forte para criar vacinas de célula T com antígeno específico duradouro contra substâncias pouco antigênicas como DNA viral (Ha, 2004). É questionável se a IL-23 ajuda no recrutamento e na ativação de células inflamatórias que induzem inflamação crônica e formação de granuloma como resposta a infecção (Langrish, 2004) e proporciona atividade antitumoral mediante sua modulação de subconjuntos específicos de células T (Lo, 2003). Estudos com camundongos sugerem que a IL-23 pode exacerbar a inflamação associada à artrite autoimune (Murphy, 2003).

Interleucina 24

A IL-24 é uma citocina imunossupressora potente, descoberta em células de melanoma humano, e homóloga das moléculas da família da IL-10. É produzida por células mononucleares do sangue periférico ativadas e macrófagos, induz a secreção de citocina do tipo Th1 de células mononucleares do sangue periférico (Caudell, 2002) e liga-se a seu receptor localizado nos ceratinócitos. Identificada pela primeira vez como fator de diferenciação de melanócitos (MDA-7), quando liberada por um vetor adenoviral, a IL-24 é capaz de induzir apoptose de células malignas, inclusive as de melanoma, sem danificar as células estromáticas de sustentação (Sarkar, 2002) e, em contato com agentes geradores de radicais livres como o trióxido de arsênico, pode vir a ser útil no tratamento do carcinoma de células renais (Yacoub, 2003). A IL-24 também pode ter efeitos antiangiogênicos, pois *in vivo* inibe a angiogênese em torno de tumores pulmonares humanos implantados em camundongos (Ramesh, 2003). A IL-24 pode ainda sustentar o tumor nos estágios iniciais de algumas neoplasias epiteliais que induzem sua produção e tem a vantagem de seus efeitos autócrinos sobre o crescimento (Shinohara, 2004).

Interleucina 25

A IL-25 é um membro da família da citocina IL-17 e um mediador importante da produção de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina. É produzida por células Th2 ativadas e mastócitos, podendo ser uma ligação importante no desenvolvimento e na amplificação de respostas alérgicas e patológicas (Fort, 2001). Camundongos aos quais se administrou por via intranasal adenovírus que expressava IL-25 desenvolveram hiperplasia de células epiteliais, aumento da secreção de muco e hiperreatividade das vias respiratórias, além da produção de IL-4, IL-5, IL-13 e mRNA da eotaxina no pulmão, com eosinofilia em amostras de lavado broncoalveolar e tecidos pulmonares. Além disso, após infecção fúngica intestinal e pulmonar, a expressão do mRNA da IL-25 aumentou nesse modelo (Hurst, 2002).

Interleucina 26

A IL-26 é o membro mais recente da família de moléculas da IL-10 e produzida principalmente por células T de memória, tendo sido identificada pela primeira vez como uma secreção de células T transformadas pelo herpes-vírus saimiri, e que parece ser capaz de induzir a secreção de IL-8 e IL-10, bem como expressar CD54 na superfície de ceratinócitos e células do carcinoma de cólon. Ao afetar as superfícies epiteliais e mucosas, a IL-26 pode modular respostas imunes mucosas e cutâneas (Hor, 2004).

Interleucina 27

Sendo o produto heterodimérico de células apresentadoras de antígeno ativadas, a IL-27 funciona cedo na resposta imune, estimulando a proliferação rápida de células T Th1 $CD4^+$ nativas, tanto por meio de sua própria ação como sinergicamente com a IL-12, ao estimular a produção de IFN-γ (Pflanz, 2002). Assim, pode ajudar a proporcionar resistência contra infecções intracelulares, como as causadas por *Leishmania* e *Toxoplasma* spp. (Hunter, 2004). Nas células B, a IL-27 pode induzir o desvio da classe IgG2A e eventualmente ter utilidade terapêutica no tratamento de doenças alérgicas, mediante a indução do desvio da classe IgG2a, bem como regulando a diferenciação de Th1 (Yoshimoto, 2004).

Fator β transformador do crescimento

O TGF-β é uma citocina de 25 kDa com três isoformas: TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3 (McCartney-Francis, 1998). Peptídeos bioativos associados aos componentes ou transportadores ECM como a α_2-macroglobulina, a albumina ou a IgG, facilitam a captação e o catabolismo de TGF-β. O TGF-β é importante para o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação de células epiteliais, além de desempenhar um papel na carcinogênese, na inflamação, na reparação e na angiogênese. Seu sinal biológico é transduzido para o núcleo via proteínas Smad (membros da família relacionada com MAD) (Lopez-Casillas, 1993; Derynck, 1996). O TGF-β é produzido por toda a linhagem leucocitária dos linfócitos aos macrófagos e células dendríticas e age tanto de forma autócrina como parácrina. Em camundongos *knockout* para TGF-β, 50 a 60% dos embriões demonstram falha na angiogênese e na hematopoese, além de aborto espontâneo, enquanto, em camundongos transgênicos com hiperexpressão de TGF-β, a consequência é hipoplasia pulmonar e falha na diferenciação do epitélio respiratório, causando morte perinatal. O TGF-β serve como fator de proliferação e inibidor do crescimento. Ele inibe o crescimento da maioria dos tipos de células epiteliais e leucócitos. Em camundongos, a hiper ou subexpressão de TGF-β causa hipo ou hiperproliferação (carcinoma) de células epiteliais (Norgaard, 1995). Em humanos, a agressividade das linhagens celulares do melanoma e do carcinoma do cólon aumenta com a perda crescente da capacidade de resposta ao TGF-β. O TGF-β também pode atuar como supressor tumoral, pois anticorpos contra o TGF-β aumentam a capacidade de formação tumoral das células do carcinoma de cólon *in vitro*. O TGF-β suprime a resposta inflamatória e promove a cura pela inibição da proliferação de células T e B, inibindo a função das células NK, induzindo antagonistas de

citocina, infrarregulando a expressão da integrina e inibindo a liberação de IgG. Durante a cicatrização de feridas, o TGF-β promove a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno. Todavia, a superprodução de TGF-β não apenas suprime a resposta inflamatória, como também prolonga o tempo de cicatrização, acarretando fibrose exuberante e excessiva (Wahl, 1994). A terapia defendida por bloquear o efeito fibrogênico do TGF-β foi estudada em receptores de órgãos transplantados, nos quais os agentes imunossupressores induziram isquemia e fibrose associada, bem como naqueles com a doença do tecido conjuntivo esclerodermia. Em tais condições, o anticorpo anti-TGF-β foi usado com algum sucesso para amenizar a fibrose intersticial progressiva (Sule, 2003; Khanna, 2004).

Fator de necrose tumoral

O TNF (antigamente TNF-α) é uma citocina pró-inflamatória de 17 kDa (Beutler, 1985). Seu nome deriva de sua capacidade de destruir células tumorais e induzir necrose hemorrágica em tumores transplantados em camundongos. A maioria dos efeitos do TNF é mediada por dois receptores da superfície celular com alta afinidade: TNFR-I (CD120a, 55 kDa) e TNFR-II (CD120b, 75 kDa) (Hohmann, 1989). Esses receptores medeiam os sinais para proliferação celular e morte celular programada (apoptose). O TNFR-I tem dentro de seu domínio intracelular um *motif* conhecido como o "domínio da morte", que é necessário para a transdução do sinal apoptótico. Principalmente macrófagos e monócitos produzem TNF, mas outras células, inclusive linfócitos, mastócitos, neutrófilos, cratinócitos, astrócitos, células microgliais, musculares lisas e tumorais, também o fazem. O TNF pode agir localmente de forma parácrina, mas também age em locais distantes, à maneira de hormônios endócrinos. Os efeitos biológicos do TNF são numerosos (Kollias, 1999) e incluem um efeito citotóxico direto, modulação e diferenciação do crescimento celular e um papel em condições inflamatórias crônicas e infecção. Além disso, o TNF é responsável pela síndrome de consunção da malignidade e das principais infecções parasitárias. Mediante a estimulação de neutrófilos, o TNF aumenta a fagocitose, a desgranulação e a atividade de explosão respiratória. Outros efeitos pró-inflamatórios incluem o aumento da formação do fator ativador de plaquetas nos neutrófilos, estimulando a secreção de ácido araquidônico, facilitando a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo e aumentando a aderência de neutrófilos ao endotélio ativado pelo TNF via suprarregulação de selectina E. Modelos animais implicam o TNF na artrite reumatoide e na doença intestinal inflamatória, em que o TNF exerce um efeito pró-inflamatório devido à ativação de células endoteliais e à indução de quimiocinas quimiotáticas para neutrófilos. Além disso, foi proposto um papel do TNF nas doenças inflamatórias desmielinizantes do SNC, com base em vários estudos sobre a esclerose múltipla em humanos (Kollias, 1999). A administração terapêutica de anticorpo monoclonal anti-TNF (infliximabe) ou proteínas da fusão do anticorpo com o receptor (etanercepte) para o tratamento da artrite reumatoide e da doença de Crohn e, potencialmente, para a doença do enxerto *versus* hospedeiro, no momento, encontra-se sob investigação e parece promissora (Furst, 2003).

Interferon-γ

O IFN-γ (Samuel, 1991) é uma proteína homodimérica de 40 a 70 kDa e 143 aminoácidos, mapeada no cromossomo 12. As células T e NK são as únicas fontes conhecidas de IFN. As células T o produzem em resposta à estimulação por antígeno ou mitógeno, e as células NK o fazem em resposta à IL-2 ou a anticorpos anti-CD16, ou na presença de macrófagos ativados (Carson, 1995). *In vitro*, o IFN-γ é um forte estimulador de macrófagos e acentua muito sua atividade tumoricida. Ele causa suprarregulação de moléculas do MHC sobre muitos tipos celulares, inclusive APCs. Além disso, regula a produção de anticorpos pelas células B (Snapper, 1987) e estimula as células Th1. Em resposta à infecção, o IFN-γ induz macrófagos a matar microrganismos intracelulares pela produção de metabólitos oxidativos e proteases. Em termos clínicos, o IFN-γ foi usado para melhorar a capacidade bactericida de fagócitos nas doenças granulomatosas crônicas (Bolinger, 1992).

Moléculas de adesão celular

A "cola" que liga tecidos vivos em organismos multicelulares complexos em parte é composta por moléculas de adesão descritas subsequentemente. Essas glicoproteínas complexas permitem a migração celular durante a embriogênese e a cicatrização de feridas, determinam o trânsito de leucócitos e o retorno crítico na linfopoese e na resposta imune. As moléculas de adesão são divididas convencionalmente em cinco grupos com base na homologia estrutural: caderinas, mucinas, integrinas, selectinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas. Mucinas são proteínas fortemente glicosiladas que interagem principalmente com selectinas. Os membros da superfamília das imunoglobulinas têm domínios semelhantes aos das imunoglobulinas e interagem com integrinas, selectinas e entre si. As integrinas e as selectinas são discutidas a seguir.

Integrinas

A família de moléculas de adesão das integrinas (Gonzalez-Amaro, 1999) fornece uma ligação física crítica entre esses elementos externos à célula (outras células e o ECM) e aqueles dentro da célula (o citoesqueleto, as moléculas intracitosólicas e o núcleo). Cada membro da família das integrinas é composto por um heterodímero de subunidades α e β ligadas de forma não covalente (Tab. 46.7). As principais integrinas são divididas em quatro subfamílias, diferindo nos padrões de expressão e especificidade do ligante. As integrinas α_1, também conhecidas como antígenos de ativação muito tardia (VLAs), são criadas a partir da associação de uma subunidade da cadeia β_2 (CD29) com qualquer das subunidades da cadeia α (CD49a-CD49h). Elas expressam-se em todas as células que requerem ancoramento firme ao ECM e nos leucócitos circulantes, plaquetas e algumas células tumorais. As integrinas β_2, que tendem a se expressar principalmente em leucócitos e células mieloides, resultam da associação da subunidade da cadeia β_2 (CD18) a qualquer das várias subunidades α. Quando combinada com a subunidade α_L, forma-se a integrina β_2 LFA-1 (CD11a/CD18). A LFA-1 tem um papel crucial na adesão de leucócitos ao endotélio vascular durante a migração transendotelial. A subunidade da cadeia β_2, em associação à subunidade α_M (CD11b), forma CAM-1 (CD11b/CD18), uma integrina expressa nas células mieloides e nos fagócitos mononucleares. As subunidades α da integrina são proteínas de membrana com 120 a 180 kDa e domínios intracitoplasmáticos, um longo fragmento extracelular com sete domínios homólogos e vários *motifs* ligados a íons metálicos (MIDAS, *metal ion-dependent adhesion sites*) que, acredita-se, funcionem na conversão da integrina de uma conformação inativa para uma ativa. As subunidades α e β unem-se ao ligante, mas em geral acredita-se que a subunidade α tenha especificidade pelo ligante.

Tabela 46.7 Principais integrinas e seus ligantes

Integrina	Nome	Ligante
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1, CD49a/CD29	Colágeno, LMN
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2, CD49b/CD29	Colágeno, LMN
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3, CD49b/CD29	Colágeno, LMN, FBN
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4, CD49d/CD29	VCAM-1, FBN
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5, CD49e/CD29	FBN
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6, CD49f/CD29	LMN
$\alpha_7\beta_1$	CD49g/CD29	LMN
$\alpha_8\beta_1$	CD49h/CD29	FBN
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, -2, -3
$\alpha_M\beta_2$	Mac-1, CD11b/CD18	ICAM-1, iC3b
$\alpha_X\beta_2$	p150, 95, CD11cCD18	FBGN, iC3b
$\alpha_D\beta_2$	–	ICAM-3, VCAM-1
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GP IIb/IIIa, CD41/CD61	FBGN, vWF, FBN, VN
$\alpha_V\beta_3$	CD51/CD61	VN, FBGN
$\alpha_4\beta_3$	CD49d/-	MadCAM-1, FBN, ICAM-1
$\alpha_E\beta_7$	–	E-caderina

FBGN = fibrinogênio; FBN = fibronectina; ICAM = molécula de adesão intercelular; LFA = antígeno linfocitário funcional; LMN = laminina; VCAM = molécula de adesão da célula vascular; VN = vitronectina; vWF = fator de Von Willebrand.

As caudas intracitoplasmáticas das subunidades α e β de integrinas associam-se a componentes do citoesqueleto para transduzir os sinais intracitoplasmáticos. No processo de transdução do sinal, as integrinas associam-se e interagem com outras proteínas associadas à membrana celular, componentes do citoesqueleto e componentes citoplasmáticos não do citoesqueleto. A proteína associada à integrina (IAP ou IAP 50) designada CD47, membro da superfamília das imunoglobulinas, é uma de tais proteínas associadas à membrana que, principalmente pela associação a integrinas β_3, podem funcionar como transdutoras de sinal. Outras proteínas associadas à membrana envolvidas na sinalização da integrina incluem a caveolina 1 e CD9, que estão envolvidas na formação de cavéolas na membrana celular e na agregação de plaquetas, respectivamente. Moléculas citosólicas, incluindo-se a apoproteína associada ao domínio citoplasmático (ICAP-1), ajudam a orquestrar a atividade complexa da migração celular mediada pela integrina β1.

Talvez as associações intracitoplasmáticas mais bem estudadas das moléculas de integrina sejam aquelas com as proteínas associadas ao citoesqueleto: α-actinina, talina, filamina, vinculina, tensina e paxilina. Essas proteínas do citoesqueleto, mediante sua associação às subunidades β_1, β_2 e β_3 da integrina, formam pontes entre a integrina e o citoesqueleto e direcionam a migração celular, a fagocitose, a formação de fibras de estresse nos locais de contato focais e a transdução de sinal intracelular, bem como a ligação de proteínas separadas do citoesqueleto.

O padrão de distribuição das integrinas é amplo, em especial entre aquelas integrinas (sobretudo β_1) envolvidas no ancoramento das células a componentes do ECM geral, como o colágeno e a laminina. No caso das integrinas que medeiam a inserção a componentes distribuídos menos amplamente, a distribuição tecidual é mais restrita.

Selectinas

A família das selectinas (Gonzalez-Amaro, 1999) contém três proteínas homólogas. A L-selectina (CD62L) expressa-se na maioria dos leucócitos, em especial linfócitos, e acredita-se que desempenhe um papel importante na memória nativa e própria dos linfócitos ou no transporte para linfonodos através de vênulas endoteliais altas (HEV). A L-selectina também impede que os neutrófilos ativem células endoteliais nas regiões de inflamação. Seus ligantes incluem Glycam (molécula de adesão celular que transporta glicano)-1, MadCAM(molécula adressina de adesão celular à mucosa)1 e CD34. A P-selectina (CD62P) é armazenada nos grânulos α e corpúsculos de Weibel-Palade de plaquetas e células endoteliais, respectivamente, e se expressa na superfície celular após ativação da célula. Uma vez na superfície celular, a P-selectina liga-se a neutrófilos, linfócitos e monócitos via seus ligantes, Lewis X e grupos do complexo de carboidrato do tipo A da família Lewis. A selectina E (CD62E) é encontrada apenas na superfície de células endoteliais e reconhece ligantes semelhantes aos reconhecidos pela P-selectina. Ela tem um papel no reconhecimento do efetor que corrige o rumo das células T de memória na medida em que localizam os pontos de inflamação. As selectinas interagem com metades carboidrato como a sialyl-Lewis X e a sialyl-Lewis A e possivelmente outros ligantes, inclusive integrinas e glicolipídeos. A extensão completa dos ligantes fisiológicos de selectina não foi determinada, mas espera-se que a lista venha a incluir moléculas que se expressam em leucócitos e no endotélio, já que as selectinas são importantes para as interações entre leucócitos e entre eles e o endotélio.

O papel das selectinas é duplo: mediar a interação entre células e contribuir para a ativação celular pela sinalização intracitoplasmática. Como ocorre com as integrinas, as selectinas são críticas para a adesão fraca inicial e a rolagem de leucócitos ao longo do endotélio ativado antes do extravasamento. Após a ligação de uma forma solúvel da glicoproteína semelhante à mucina GlyCAM-1 (um produto endotelial venular alto), a L-selectina é capaz de mediar a ativação de integrinas β_1 e sua adesão à fibronectina. As selectinas E e P também podem atuar como moléculas receptoras e transdutoras de sinal, pois um aumento no Ca^{2+} livre dentro dos leucócitos aderidos às células endoteliais está ligado a essas moléculas de selectina (Huang, 1993).

Extravasamento de leucócitos

A expressão de moléculas de integrina depende da ativação celular e pode ser supra ou infrarregulada na resposta a estímulos específicos do ambiente externo, inclusive a estimulação de citocina local ou interação imune. A interação da integrina leucocitária com células endoteliais é crítica para a evolução das respostas inflamatórias e imunes. Além disso, o retorno das células linfoides para seus locais de residência e a disseminação intravascular de metástases envolvem interações endoteliais similares mediadas por integrinas de superfície e outro conjunto de moléculas de adesão celular, as selectinas e seus ligantes.

O extravasamento de leucócitos ocorre durante o retorno celular, como na passagem de células T γ/δ para placas de Peyer e como parte da resposta inflamatória. Ambos os processos envolvem etapas similares, usando moléculas de adesão diferentes. Na inflamação, o processo começa com a liberação local de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IFN-γ, que ativam o endotélio local para aumentar a expressão de superfície das moléculas de adesão, incluindo membros da superfamília das imunoglobulinas, VCAM-1 e ICAM-1. Além disso, as células endoteliais liberam agentes quimiotáticos que incluem IL-8, formando um gradiente quimiotático, ligado à superficie, e outro solúvel, que é reconhecível para as células inflamatórias em transmigração e as concentra no foco inflamatório.

Esse processo para os leucócitos (Fig. 46.4) envolve: (1) obstrução à passagem dos leucócitos para a superfície endotelial principalmente por selectinas endoteliais (E e P) e seu ligante leucocitário, a glicoproteína modificada sialyl-Lewis X e (2) rolamento de leucócitos, em que, por meio da expressão de superfície sequencial rápida de leucócitos, sobretudo VLA-4 e integrina $\alpha_4\beta_7$, a força de cisalhamento fornecida pelos rolos de leucócitos na corrente sanguínea ao longo da superfície endotelial traz assim essas integrinas para contato com seus ligantes endoteliais, VCAM-1 e MAdCAM-1, respectivamente. No caso dos neutrófilos, o rolamento é mediado apenas por selectinas. À medida que eles rolam, a adesão de moléculas a leucócitos dispara eventos bioquímicos que levam à (3) ativação leucocitária e à conversão de suas integrinas a um estado ativado de maior avidez. Isso leva ao aumento da adesão do leucócito à célula endotelial e eventualmente à (4) cessação do rolamento de leucócitos e à (5) transmigração de leucócitos do endotélio com a assistência da adesão homotípica da molécula CD31 expressa em leucócitos e no endotélio, acompanhando um gradiente quimiotático. Ainda é discutível se os leucócitos passam diretamente através de células endoteliais individuais ou meramente entre células endoteliais adjacentes. A retração de células endoteliais no início da resposta inflamatória parece facilitar a movimentação entre elas. Após atravessar o endotélio, a migração celular mediada por integrina por meio da matriz extracelular ao longo de um gradiente quimiotático completa o trajeto leucocitário para um foco de inflamação.

Os estados de deficiência de integrinas β_2 (deficiência de adesão leucocitária do tipo I) e defeitos congênitos na expressão de selectinas e seus ligantes demonstram o papel indispensável desses receptores na produção da resposta inflamatória e no transporte de leucócitos. Nesses pacientes, os neutrófilos são incapazes de sair da corrente sanguínea e migrar para locais de inflamação ou infecção, criando de fato um estado de supressão imune com maior suscetibilidade a infecção bacteriana e uma neutrofilia periférica paradoxal (Bullard, 1996). Os eventos que circundam o choque séptico, a trombose, a lesão por reperfusão e as metástases também requerem atividade de integrina e selectina. Esse conhecimento conduziu ao uso terapêutico dos anticorpos monoclonais, ligantes de moléculas de adesão solúveis e outras intervenções, como os oligonucleotídeos anti-sentido (*antisense*), para superação das doenças mediadas por moléculas de adesão (Buckley, 1996; Gonzalez-Amaro, 1998).

Perspectivas

O complemento, as citocinas e as moléculas de adesão desempenham todos um papel nos estados patológicos. Reconhecendo isso, as terapias têm sido designadas para disparar diretamente ou bloquear várias citocinas e componentes do complemento como parte do tratamento da doença. A introdução recente de anticorpos monoclonais quiméricos destinados a bloquear ou disparar com vantagem esses componentes (i. e., rituximab, daclizumabe, infliximabe, etanercepte e outros) marca o início do que pode vir a ser um meio rotineiro de tratar ou amenizar a doença. A detecção e a estimativa no laboratório clínico de proteínas nativas e o agente terapêutico administrado clinicamente cada vez mais deverão tornar-se lugares-comuns.

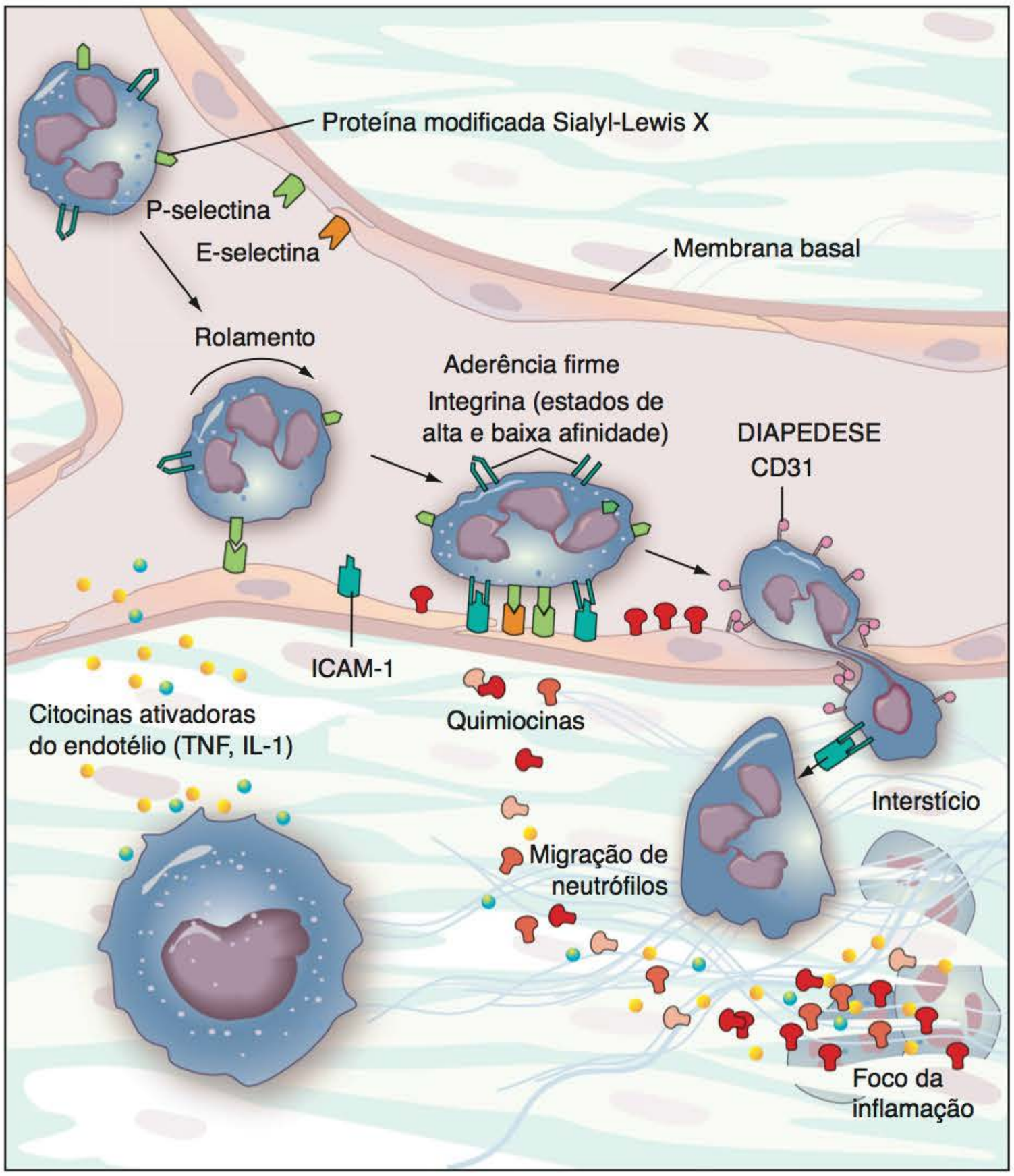


Figura 46.4 Moléculas de adesão nas superfícies de leucócitos e células endoteliais ativadas orientam o movimento dos leucócitos da corrente sanguínea para os focos de inflamação tecidual. A direção é fornecida por um gradiente quimiotático. ICAM = molécula de adesão intracelular; IL = interleucina; TNF = fator de necrose tumoral.

Referências bibliográficas

Agnello V: Lupus diseases associated with hereditary and acquired deficiencies of complement. Springer Semin Immunopathol 1986; 9:161.

Ahearn JM, Rosengard AM: Complement receptors. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease, New York, Marcel Dekker, 1998, p 167.

Ambrus JL, Jr, Pippin J, Joseph A, et al: Identification of a cDNA for a human high-molecular-weight B-cell growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 6330–6334.

Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, et al: Chromosomal assignment and genomic structure of Il15. Genomics 1995; 25:701–706.

Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, et al: IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. J Immunol 1995; 154:483–490.

Atkinson JP: Complement activation and complement receptors in systemic lupus erythematosus. Springer Semin Immunopathol 1986; 9:179.

Baldwin WM, Pruitt SK, Brauer RB, et al: Complement in organ transplantation. Transplantation 1995; 59:797.

Basta M, Dalakas MC: High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. J Clin Invest 1994; 94:1729.

Basta M, Kirshbom P, Frank MM, et al: Mechanism of therapeutic effect of high-dose intravenous immunoglobulin. Attenuation of acute, complement-dependent immune damage in a guinea pig model. J Clin Invest 1989; 84:1974.

Batjay Z, Speth C, Erdei A, Dierich MP: Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). J Immunol 2004; 173:4775–4778.

Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin JA: Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. J Exp Med 1994; 179:985.

Berge V, Johnson E, Hogasen K: Clusterin and the terminal complement pathway synthesised by human umbilical vein endothelial cells are closely linked when on co-cultured agarose beads. APMIS 1997; 105:17.

Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature 1985; 316:552–554.

Bhakdi S, Tranum Jensen J: Complement lysis: a hole is a hole. Immunol Today 1991; 12:318.

Biesecker G, Lavin L, Ziskind M, et al: Cutaneous localization of the membrane attack complex in discoid and systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 1982; 306:264.

Birmingham DJ: Erythrocyte complement receptors: Crit Rev Immunol 1995; 15:133.

Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, et al: Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. Leukemia 1999; 13:1109–1166.

Blumberg H, Conklin D, Xu WF, et al: Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. Cell 2001; 104:9–19.

Boackle SA, Morris MA, Holers VM, et al: Complement opsonization is required for presentation of immune complexes by resting peripheral blood B cells. J Immunol 1998; 161:6537.

Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, et al: A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. J Exp Med 1998; 188:2381.

Bolinger AM, Taeubel MA: Recombinant interferon gamma for treatment of chronic granulomatous disease and other disorders. Clin Pharmacol 1992; 11:834–850.

Borsos T, Rapp HJ: Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. Science 1965; 150:505.

Bosco M, Giovarelli M, Forni M, et al: Low doses of IL-4 injected perilymphatically in tumor-bearing mice inhibit the growth of poorly and apparently nonimmunogenic tumors and induce a tumor-specific immune memory. J Immunol 1990; 145:3136–3143.

Bossuyt X, Sneyers L, Marien G, Vranken G: Novel nephelometric assay for measurement of complement 3d. Ann Clin Biochem 2002; 39:34–38.

Böttger EC, Hoffman T, Hadding U, et al: Influence of genetically inherited complement deficiencies on humoral immune response in guinea pigs. J Immunol 1985; 135:4100.

Brown EJ: Complement receptors and phagocytosis. Curr Opin Immunol 1991; 3:76.

Brown MA, Hural J: Functions of IL-4 and control of its expression. Crit Rev Immunol 1997; 17:1–32.

Buckley TL, Bloemen PG, Henricks PA, et al: LFA-1 and ICAM-1 are crucial for the induction of hyperreactivity in the mouse airways. Ann NY Acad Sci 1996; 796:149–161.

Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, et al: Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. J Exp Med 1996; 183:2329–2336.

Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC: Activated mast cells produce interleukin 13. J Exp Med 1995; 181:1373–1380.

Burton JD, Bamford RN, Peters C, et al: A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:4935–4939.

Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, et al: Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer. Int J Biol Markers 2002; 17:141–145.

Carroll MC: The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. Annu Rev Immunol 1998a; 16:545.

Carroll MC: The complement system in regulation of adaptive immunity. Nat Immunol 2004; 5:981–986.

Este artigo descreve a interação intrincada entre os produtos de ativação do complemento e as respostas de células T e B e a natureza da ligação entre as respostas imunes inatas e adaptativas.

Carroll MC, Prodeus AP: Linkages of innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol 1998b; 10:36.

Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, et al: Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. J Clin Invest 1995; 96:2578–2582.

Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, et al: The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. J Immunol 2002; 168:6041–6046.

Center DM, Cruikshank W: Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. Immunol 1982; 128:2563–2568.

Chen C-H, Lam CK, Boackle RJ: C1 inhibitor removes the entire $C1qr_2s_2$ complex from anti-C1Q monoclonal antibodies with low binding affinities. Immunology 1998; 95:648.

Cherel M, Sorel M, Apiou F, et al: The human interleukin-11 receptor alpha gene (IL11RA): genomic organization and chromosome mapping. Genomics 1996; 32:49–53.

Chiang CS, Powell HC, Gold LH, et al: Macrophage/microglial-mediated primary demyelination and motor disease induced by the central nervous system production of interleukin-3 in transgenic mice. J Clin Invest 1996; 97:1512–1524.

Choi N-H, Mazda T, Tomita M: A serum protein, SP-40,40, modulates the formation of the membrane attack complex of complement on erythrocytes. Mol Immunol 1989; 26:835.

Christiansen OB, Kilpatrick DC, Souter V, et al: Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage. Scand J Immunol 1999; 49:193.

Colten HR, Garnier G: Regulation of complement protein gene expression. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease, New York, Marcel Dekker, 1998, p 217.

Cooper NR: Complement and viruses. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 393.

Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, et al: Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. J Clin Invest 1983; 71:236.

Cosman D, Kumaki S, Ahdieh M, et al: Interleukin-15 and its receptor. Ciba Foundation Symposium 1995; 195:221–229.

Couser WG, Johnson RJ, Young BA, et al: The effects of soluble complement receptor type 1 on complement-mediated experimental glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 1995; 5:1888.

Crawford DH, Catovsky D: In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. Immunology 1993; 80:40–44.

Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, et al: Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:5109–5113.

Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, et al: Protective effects of C5a blockade in sepsis. Nat Med 1999; 5:788.

Czupryn MJ, McCoy JM, Scoble HA: Structure–function relationships in human interleukin-11. Identification of regions involved in activity by chemical modification and site-directed mutagenesis. J Biol Chem 1995; 270:978–985.

Daha MR, Fearon DT, Austen KF: C3 nephritic factor (C3NeF): stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase. J Immunol 1976; 116:1.

Daha MR, van Es LA: Further evidence for the antibody nature of C3 nephritic factor (C3NeF). J Immunol 1979; 123:755.

Dalmasso AP: The complement system in xenotransplantation. Immunopharmacology 1992; 24:149.

Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, et al: Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic Escherichia coli infection. Infect Immun 1996; 64:3231–3235.

Davis AE, III: Biological effects of C1 inhibitor. Drug News Perspect 2004; 17:439–446.

Davis AE III, Harrison RA: Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. Biochemistry 1982; 21:5745.

De Bont ES, Vellenga E, Swaanenburg JC, et al: Plasma IL-8 and IL-6 levels can be used to define a group with low risk of septicaemia among cancer patients with fever and neutropenia. Br J Haematol 1999; 107:375–380.

De Vita F, Orditura M, Galizia G, et al: Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. Cancer 1999; 86:1936–1943.

De Vita F, Orditura M, Galizia G, et al: Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. Chest 2000; 117:365–373.

De Vries JE: The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. J Allergy Clin Immunol 1998; 102:165–169.

Demoulin JB, Renauld JC: Interleukin-9 and its receptor: an overview of structure and function. Int Rev Immunol 1998; 16:245–364.

Derynck R, Zhang Y: Intracellular signaling: the mad way to do it. Curr Biol 1996; 63:1226–1229.

DiScipio RG, Daffern PN, Jagels MA, et al: A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion and rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. J Immunol 1999; 162:1127.

Dodds AW, Sim RB (eds): Complement. A practical approach. Oxford, IRL Press, 1997.

Doekes G, Es LA, Daha MR: C1 inactivator: its efficiency as a regulator of classical complement pathway activation on soluble IgG aggregates. Immunology 1983; 49:215.

Doepper S, Kacani L, Falkensammer B, et al: Complement receptors in HIV infection. Curr Mol Med 2002; 2:703–711.

Du X, Williams DA: Update on development of interleukin-11. Curr Opin Hematol 1995; 2:182–188.

Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, et al: Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J Immunol 2001; 167:3545–3549.

Dwyer JM: Manipulating the immune system with immune globulin. N Engl J Med 1992; 326:107.

Edwards JL, Brown EJ, Ault KA, Apicella MA: The role of complement receptor 3 (CR3) in Neisseria gonorrhoeae infection of human cervical epithelia. Cell Microbiol 2001; 3:611–622.

Einarsson O, Geba GP, Zhu Z, et al: Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. J Clin Invest 1996; 97:915–924.

Eklund KK, Ghildyal N, Austen KF, Stevens RL: Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. J Immunol 1993; 151:4266–4273.

Ember JA, Engels MA, Hugli TE: Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 241.

Emmanuilidis K, Weighardt H, Matevossian E, et al: Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome. Shock 2002; 18:301–305.

Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, et al: The collectins in innate immunity. Curr Opin Immunol 1996; 8:29.

Erard F, Wild MT, Garcia-Sanz JA, Le Gros G: Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8–CD4 cells that make TH2 cytokines and help B cells. Science 1993; 260:1802–1805.

Esser AF: Big Mac attack: complement proteins cause leaky patches. Immunol Today 1991; 12:316.

Evans MJ, Rollins SA, Wolff DW, et al: In vitro and in vivo inhibition of complement activity by a single-chain Fv fragment recognizing human C5. Mol Immunol 1995; 32:1183.

Falk RJ, Dalmasso AP, Kim Y, et al: Neoantigen of the polymerized ninth component of complement: characterization of a monoclonal antibody and immunohistochemical localization in renal disease. J Clin Invest 1983; 72:560.

Fearon DT: The alternative pathway of complement: a system for host resistance to microbial infection. N Engl J Med 1980; 303:259.

Fearon DT: The complement system and adaptive immunity. Semin Immunol 1998; 10:355.

Fearon DT, Austen KF: Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. J Exp Med 1975; 142:856.

Fingeroth JD, Weiss JJ, Tedder TF, et al: Epstein Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:4510.

Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, et al: Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:9675–9678.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med 1989; 170:2081–2095.

Fischer JR, Schindel M, Bulzebruck H, et al: Long-term survival in small cell lung cancer patients is correlated with high interleukin-2 secretion at diagnosis. J Cancer Res Clin Oncol 2000; 126:730–733.

Fischer M, Bijman M, Molin D, et al: Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. Leukemia 2003; 17:2513–2516.

Fishelson Z: Complement-related proteins in pathogenic organisms. Springer Semin Immunopathol 1994; 15:345.

Fleming SD, Campbell PA: Macrophages have cell surface IL-10 that regulates macrophage bactericidal activity. J Immunol 1996; 156:1143–1150.

Fort MM, Cheung J, Yen D, et al: IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity 2001; 15:985–995.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al: T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J Exp Med 1996; 183:2593–2603.

Frank MM: Introduction and historical notes. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 1.

Frank MM, Basta M, Fries LF: The effects of intravenous immune globulin on complement-dependent immune damage of cells and tissues. Clin Immunol Immunopathol 1992; 62:S82.

Frank MM, Fries LF: The role of complement in defence against bacterial disease. Baillière's Clin Immunol Allergy 1988; 2:335.

Franz AR, Bauer K, Schalk A, et al: Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial. Pediatrics 2004; 114:1–8.

Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F: Interleukin-8: a valuable tool to restrict antibiotic therapy in newborn infants. Acta Paediatr 2001; 90:1025–1032.

Fries LF, Frank MM: Molecular mechanisms of complement action. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW (eds): The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia, WB Saunders, 1987, p 450.

Fuhrer DK, Yang YC: Activation of Src-family protein tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 mouse preadipocytes by interleukin-11. Exp Hematol 1996; 24:195–203.

Fujisawa T, Abu-Ghazaleh R, Kita H, et al: Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. J Immunol 1990; 144:642–646.

Fujishima H, Takeuchi T, Shinozaki N, et al: Measurement of IL-4 in tears of patients with seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. Clin Exp Immunol 1995; 102:395–398.

Furst DE, Schiff MH, Fleischmann RM, et al: Adalimumab, a fully human anti tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis). J Rheumatol 2003; 30:2563–2571.

Gaither TA, Hammer CH, Frank MM: Studies of the molecular mechanisms of C3b inactivation and a simplified assay of 1H and the C3b inactivator (C3bINA). J Immunol 1979; 123:1195.

Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, et al: Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). Genes Immun 2000; 1:442–450.

Gallagher G, Eskdale J, Jordan W, et al: Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. Int Immunopharmacol 2004; 4:615–626.

Gammon WR, Inman AO, Wheeler CE Jr: Differences in complement-dependent chemotactic activity generated by bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita immune complexes: demonstration by leukocytic attachment and organ culture methods. J Invest Dermatol 1984; 83:57.

Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X, et al: Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. J Exp Med 1995; 182:1527–1536.

Gawryl MS, Chudwin DS, Langlois PF, Lint TF: The terminal complement complex, C5b-9, a marker of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1988; 31:188.

Gewurz H, Jiang H, Ying S-C, et al: Nonimmune activation of the classical complement pathway. Behring Inst Mitt 1993; 93:138.

Giclas PC (ed.): Complement, immune complexes, and cryoglobulin. In Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, et al (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th ed. Washington, DC, ASM Press, 1997, p 179.

Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V: Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4b-binding protein and C3b inactivator. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:6596.

Goldman M, Velu T, Petrolani M: Interleukin-10. Actions and therapeutic potentials. Biodrugs 1997; 7:6–14.

Gomez J, Gonzalez A, Martinez A: Rebollo A: IL-2-induced cellular events. Crit Rev Immunol 1998; 18:185–220.

Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F: Adhesion molecules in inflammatory diseases. Drugs 1998; 56:977–988.

Este artigo fornece uma revisão excelente e profunda do processo de diapedese de leucócitos. O bloqueio farmacológico terapêutico desse processo é discutido.

Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F: Cell adhesion molecules: selectins and integrins. Crit Rev Immunol 1999; 19:389–429.

Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al: Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science 1994; 264:965–968.

Grzegorzewski K, Komschlies KL, Mori M, et al: Administration of recombinant human interleukin-7 to mice induces the exportation of myeloid progenitor cells from the bone marrow to peripheral sites. Blood 1994; 83:377–385.

Ha SJ, Kim DJ, Baek KH, et al: IL-23 induces stronger sustained CTL and Th1 immune responses than IL-12 in hepatitis C virus envelope protein 2 DNA immunization. J Immunol 2004; 172:525–531.

Hammerschmidt D, Weaver L, Hudson L, et al: Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome. Lancet 1980; 1:947.

Hansen S, Holmskov U: Structural aspects of collectins and receptors for collectins. Immunobiology 1998; 199:165.

Harrison RA, Lachman PJ: Complement technology. In Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C (eds): Handbook of Experimental Immunology, 4th ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1986, p 39.1.

Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, et al: Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. J Immunol 1991; 147:883–892.

Hermann E, Fleischer B, Mayet WJ, et al: Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis. Clin Exp Rheumatol 1989; 7:411–414.

Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al: Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. Eur J Immunol 1996; 26:659–668.

Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, et al: Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Lancet 1999; 353:1049.

Hirano T: Interleukin 6 (IL-6) and its receptor: their role in plasma cell neoplasias. Int J Cell Cloning 1991; 9:166–184.

Hirano T: Interleukin 6 and its receptor: ten years later. Int Rev Immunol 1998; 16:249–284.

Hirano T, Matsuda T, Turner M, et al: Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. Eur J Immunol 1988; 18:1797–1801.

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature 1986; 324:73–76.

Hoch RC, Schraufstatter IU, Cochrane CG: In vivo, in vitro and molecular aspects of IL-8 and the IL-8 receptors. Lab Clin Med 1996; 128:134–145.

Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon AP: Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). J Biol Chem 1989; 264:14927–14934.

Hor S, Pirzer H, Dumoutier L, et al: The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. J Biol Chem 2004; 279:33343–33351.

Hosoi T, Wada S, Suzuki S, et al: Bacterial endotoxin induces IL-20 expression in the glial cells. Brain Res Mol Brain Res 2004; 130:23–29.

Houssiau FA, Schandene L, Stevens M, et al: A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells. Involvement of IL-2, IL-4, and IL-10. J Immunol 1995; 154:2624–2630.

Hrvacevic R, Dimitrijevic D, Spasic P, et al: [Interleukin-1 beta in patients with primary immunocomplex glomerulonephritis]. Vojnosanit Pregl 2001; 58:33–38.

Hu JP, Cesano A, Santoli D, et al: Effects of interleukin-11 on the proliferation and cell cycle status of myeloid leukemic cells. Blood 1993; 81:1586–1592.

Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, et al: Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. J Cell Biol 1993; 120:1371–1380.

Hunter CA, Villarino A, Artis D, Scott P: The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. Immunol Rev 2004; 202:106–114.

Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, et al: New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. J Immunol 2002; 169:443–453.

Ihle JN, Lee JC, Rebar L: T cell recognition of Moloney leukemia virus proteins. III. T cell proliferative responses against gp70 are associated with the production of a lymphokine inducing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes. J Immunol 1981; 127:2565–2570.

Iizumi T, Sato S, Iiyama T, et al: Recombinant human interleukin-1 beta analogue as a regulator of hematopoiesis in patients receiving chemotherapy for urogenital cancers. Cancer 1991; 68:1520–1523.

IUIS-WHO Nomenclature Committee: nomenclature of the alternative activating pathway of complement. J Immunol 1981; 127:1261.

Jacobsohn DA, Vogelsang GB: Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD. Drugs 2002; 62:879–889.

Embora direcionado especificamente para GVHD, este artigo fornece informação sobre o bloqueio farmacológico e a regulação da resposta a citocinas.

Jacobsohn DA, Vogelsang GB: Anti-cytokine therapy for the treatment of graft-versus-host disease. Curr Pharm Des 2004; 10:1195–1205.

Jarva H, Meri S: Paroxysmal nocturnal haemoglobimuria: the disease and a hypothesis for a new treatment. Scand J Immunol 1999; 49:119.

Johnson E, Berge V, Hogasen K: Formation of the terminal complex on agarose beads: further evidence that vitronectin (complement S-protein) inhibits C9 polymerization. Scand J Immunol 1994; 39:281.

Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, et al: Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:8705–8709.

Kallio R, Surcel HM, Bloigu A, Syrjala H: Balance between interleukin-10 and interleukin-12 in adult cancer patients with or without infections. Eur J Cancer 2001; 37:857–861.

Keegan AD, Ryan JJ, Paul WE: IL-4 regulates growth and differentiation by distinct mechanisms. Immunologist 1996; 4:194–198.

Keith JCJ, Albert L, Sonis ST, et al: IL-11, a pleiotropic cytokine: exciting new effects of IL-11 on gastrointestinal mucosal biology. Stem Cells 1994; 12:79–84.

Kerekes K, Prechl J, Bajtay Z, et al: A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. Int Immunol 1998; 10:1923.

Khanna AK, Plummer MS, Hilton G, et al: Anti-transforming growth factor antibody at low but not high doses limits cyclosporine-mediated nephrotoxicity without altering rat cardiac allograft survival: potential of therapeutic applications. Circulation 2004; 110:3822–3829.

Kilgore KS, Flory CM, Miller BF, et al: The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. Am J Pathol 1996; 149:953.

Kilgore KS, Park JL, Tanhehco EJ, et al: Attenuation of interleukin-8 expression in C6-deficient rabbits after myocardial ischemia/reperfusion. J Mol Cell Cardiol 1998; 30:75.

Kilpatrick DC: Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. Biochim Biophys Acta 2002; 1572:401–413.

Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, et al: Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. J Immunol 1992; 148:3618–3623.

Kingo K, Koks S, Nikopensius T, et al: Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. Genes Immun 2004; 5:117–121.

Kinoshita T, Takata Y, Kozono H, et al: C5 convertase of the alternative complement pathway: Covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. J Immunol 1988; 141:3895.

Kirman I, Vainer B, Nielsen OH: Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. Inflamm Res 1998; 47:285–289.

Kirschfink M, Mollnes TE: C1-inhibitor: an anti-inflammatory reagent with therapeutic potential. Expert Opin Pharmacother 2001; 2:1073–1083.

Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, et al: Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. Immunity 1997; 7:345.

Koks S, Kingo K, Ratsep R, et al: Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. Genes Immun 2004; 5:662–667.
Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D: The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. Ann Rheum Dis 1999; 58(Suppl 1):132–139.
Korb LC, Ahearn JM: C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes. J Immunol 1997; 158:4525.
Koski CL, Ramm LE, Hammer CH, et al: Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:3816.
Kovacs GG, Gasque P, Strobel T, et al: Complement activation in human prion disease. Neurobiol Dis 2004; 15:21–28.
Kozel TR: Activation of the complement system by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 1996; 9:34.
Kozin F, Cochrane CH: The contact activation system of plasma: biochemistry and pathophysiology. In Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (eds): Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 2nd ed. New York, Raven Press, 1992, p 103.
Kroshus TJ, Rollins SA, Dalmasso AP, et al: Inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. Transplantation 1995; 60:1194.
Kuipers S, Aerts PC, Sjoholm AG, et al: A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin levels in human serum. J Immunol Methods 2002; 268:149–157.
Kuster H, Weiss M, Willeitner AE, et al: Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. Lancet 1998; 352:1271–1277.
Lalani I, Bhol K, Ahmed AR: Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. Ann Allergy Asthma Immunol 1997; 79:469–483.
Lalani T, Simmons RK, Ahmed AR: Biology of IL-5 in health and disease. Ann Allergy Asthma Immunol 1999; 82:317–332.
Langlois PF, Gawryl MS: Complement activation occurs through both classical and alternative pathways prior to onset and resolution of adult respiratory distress syndrome. Clin Immunol Immunopathol 1988; 47:152.
Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, et al: IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. Immunol Rev 2004; 202:96–105.
Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP: Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. J Immunol 1979; 123:1388.
Lemoli RM, Fogli M, Fortuna A, et al: Interleukin-11 (IL-11) acts as a synergistic factor for the proliferation of human myeloid leukaemic cells. Br J Haematol 1995; 91:319–326.
Leonaviciene L, Bradunaite R, Astrauskas V: [Proinflammatory cytokine interleukin-17 and its role in pathogenesis of rheumatoid arthritis]. Medicina (Kaunas) 2004; 40:419–422.
Liao SC, Cheng YC, Wang YC, et al: IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. J Immunol 2004; 173:6712–6718.
Licht C, Weyersberg A, Heinen S, et al: Successful plasma therapy for atypical hemolytic uremic syndrome caused by factor H deficiency owing to a novel mutation in the complement cofactor protein domain 15. Am J Kidney Dis 2005; 45:415–421.
Lim BL, Reid KBM, Ghebrehiwet B, et al: The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. J Biol Chem 1996; 271:26739.
Link E, Kerr LD, Schreck R, et al: Purified I kappa B-beta is inactivated upon dephosphorylation. J Biol Chem 1992; 267:239–246.
Liu L, Ding C, Zeng W, et al: Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20. Blood 2003; 102:3206–3209.
Liu CC, Manzi S, Danchenko N, Ahearn JM: New advances in measurement of complement activation: lessons of systemic lupus erythematosus. Curr Rheumatol Rep 2004; 6:375–381.
Lo CH, Lee SC, Wu PY, et al: Antitumor and antimetastatic activity of IL-23. J Immunol 2003; 171:600–607.
Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J: Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. Cell 1993; 73:1435–1444.
Louahed J, Kermouni A, Van Snick J, Renauld JC: IL-9 induces expression of granzymes and high-affinity IgE receptor in murine T helper clones. J Immunol 1995; 154:5061–5070.
Lucchesi BR, Kilgore KS: Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury. Immunopharmacology 1997; 38:27.
Lutz HU: How pre-existing, germline-derived antibodies and complement may help induce a primary immune response to nonself. Scand J Immunol 1999; 49:224.
Mabbott NA: The complement system in prion diseases. Curr Opin Immunol 2004; 16:587–593.
McCartney-Francis NL, Frazier-Jessen M, Wahl SM: TGF-beta: aA balancing act. Int Rev Immunol 1998; 16:553–580.
Mach N, Lantz CS, Galli SJ, et al: Involvement of interleukin-3 in delayed-type hypersensitivity. Blood 1998; 91:778–783.
McInnes IB, al Mughales J, Field M, et al: The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med 1996; 2:175–182.
Magee JC, Collins BH, Harland RC, et al: Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation. J Clin Invest 1995; 96:2404.
Makrides SC: Therapeutic inhibition of the complement system. Pharmacol Rev 1998; 50:59.
Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, et al: Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via tha mannose-binding protein. Nat Med 1995; 1:237.
Margolius HS: Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. Hypertension 1995; 26:221.
Marom Z, Shelhammer J, Berger M, et al: Anaphylatoxin C3a enhances mucous glycoprotein release from human airways in vitro. J Exp Med 1985; 161:657.
Matsushita M, Endo Y, Fujita T: MASP1 (MBL-associated serine protease 1). Immunobiology 1998; 199:340.
Matsushita M, Fujita T: Inhibition of mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) by C1 inhibitor (C1 INH). Mol Immunol 1996; 33:44.
Mauff G, Würzner R: Complement genetics. In Herzenberg LA, Weir DM, Blackwell C (eds): Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th ed, vol 2. Malden, MA, Blackwell Science, 1996, p 77.1.
Mayer MM: Complement and complement fixation. In Kabat EA, Mayer MM (eds): Experimental Immunochemistry, 2nd ed. Springfield, IL, Charles C Thomas, 1961, p 133.
Mayes JT, Schreiber RD, Cooper NR: Development and application of an enzyme-linked immunoabsorbent assay for the quantification of alternative complement pathway activation in human serum. J Clin Invest 1984; 73:160.
Mayumi T, Takezawa J, Takahashi H, et al: IL-15 is elevated in the patients of postoperative enterocolitis. Cytokine 1999; 11:888–893.
Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, et al: Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. Nature 1993; 362:62–65.
Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ: Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. Immunol Rev 2004; 202:84–95.
Merz H, Houssiau FA, Orscheschek K, et al: Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. Blood 1991; 78:1311–1317.
Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, et al: Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. Blood 1986; 68:46–57.
Meyaard L, Hovenkamp E, Otto SA, Miedema F: IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. J Immunol 1996; 156:2776–2782.
Miletic VD, Hester CG, Frank MM: Regulation of complement activity by immunoglobulin. I. Effect of immunoglobulin isotype on C4 uptake on antibody-sensitized sheep erythrocytes and solid phase immune complexes. J Immunol 1996; 156:749.
Minta JO, Gee AP: Purification and quantitation of the components of the alternative pathway. Methods Enzymol 1983; 93:375–408.
Mitomo K, Fujita T, Iida K: Functional and antigenic properties of complement receptor type 2, CR2. J Exp Med 1987; 165:1424.
Moffitt MC, Frank MM: Complement resistance in microbes. Springer Semin Immunopathol 1994; 15:327.
Mold C: Cellular responses to the membrane attack complex. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 309.
Mollnes TE: Biocompatibility: complement as mediator of tissue damage and as indicator of incompatibility. Exp Clin Immunogenet 1997; 14:24.
Mollnes TE, Høgasen K, Hoass BF, et al: Inhibition of complement-mediated red cell lysis by immunoglobulins is dependent on the Ig isotype and its C1 binding properties. Scand J Immunol 1995; 41:449.
Moore FD, Fearon DT, Austen KF: IgG on mouse erythrocytes augments activation of the human alternative complement pathway by enhancing deposition of C3b. J Immunol 1981; 126:1805.
Morgan BP: Clinical complementology: recent progress and future trends. Eur J Clin Invest 1994a; 24:219.
Morgan BP, Gasque P: Expression of complement in the brain: role in health and disease. Immunol Today 1996; 17:461.
Morgan BP, Gasque P: Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? Clin Exp Immunol 1997a; 107:1.
Morgan BP, Gasque P, Singhrao S, et al: The role of complement in disorders of the nervous system. Immunopharmacology 1997b; 38:43.
Morgan BP, Meri S: Membrane proteins that protect against complement lysis. Springer Semin Immunopathol 1994b; 15:369.
Moroz A, Eppolito C, Li Q, et al: IL-21 enhances and sustains $CD8^+$ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. J Immunol 2004; 173:900–909.
Mulligan MS, Yeh CG, Rudolph AR, et al: Protective effects of soluble CR1 in complement- and neutrophil-mediated tissue injury. J Immunol 1992; 148:1479.
Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al: Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J Exp Med 2003; 198:1951–1957.
Nagem RA, Colau D, Dumoutier L, et al: Crystal structure of recombinant human interleukin-22. Structure (Camb) 2002; 10:1051–1062.
Namen AE, Schmierer AE, March CJ, et al: B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. J Exp Med 1988; 167:988–1002.
Nataf S, Davoust N, Ames RS, et al: Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. J Immunol 1999; 162:4018.
Niculescu F, Badea T, Rus H: Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells. Role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Atherosclerosis 1999; 142:47.
Niculescu F, Rus H, Shin S, et al: Generation of diacylglycerol and ceramide during homologous complement activation. J Immunol 1993; 150:214.
Niculescu F, Rus HG, Vlaicu R: Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and apolipoprotein B in human arterial tissues with atherosclerosis. Atherosclerosis 1987; 65:1.
Norgaard P, Hougaard S, Poulson HS, Spang-Thomsen M: Transforming growth factor beta and cancer. Cancer Treat Rev 1995; 21:367–403.
Ochs HD, Wedgwood RJ, Frank MM, et al: The role of complement in the induction of antibody responses. Clin Exp Immunol 1983; 53:208.
Ochs HD, Wedgwood RJ, Heller SR, et al: Complement, membrane glycoproteins, and complement receptors: their role in regulation of the immune response. Clin Immunol Immunopathol 1986; 40:94.
Ollert MW, Davis K, Bredehorst R, et al: Classical complement pathway activation on nucleated cells. Role of

factor H in the control of deposited C3b. J Immunol 1995; 155:4955.
O'Neil KM, Ochs HD, Heller SR, et al: Role of C3 in humoral immunity. Defective antibody production in C3-deficient dogs. J Immunol 1988; 140:1939.
Onitsuka S, Yamaguchi Y, Tanabe K, et al: Peritubular capillary deposition of C4d complement fragment in ABO-incompatible renal transplantation with humoral rejection. Clin Transplant 1999; 13 Suppl 1:33–37.
Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, et al: Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. J Immunol 2004; 173:5361–5371.
Pangburn MK: Alternative pathway of complement. Methods Enzymol 1988; 162:639.
Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ: The alternative pathway of complement. Springer Semin Immunopathol 1984; 7:163.
Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ: Formation of the initial C3-convertase of the alternative pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. J Exp Med 1981; 154:856:4458.
Paolini JF, Willard D, Consler T, et al: The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. J Immunol 1994; 153:2704–2717.
Paranos S, Pravica V, Bonaci B, Stojkovic-Mostarica M: [Interleukin 4, total and allergen-specific immunoglobulin E antibodies in the blood of individuals with an atopic constitution]. Srp Arh Celok Lek 1998; 126:92–96.
Park JH, Kaushansky K, Levitt L: Transcriptional regulation of interleukin 3 (IL3) in primary human T lymphocytes. Role of AP-1- and octamer-binding proteins in control of IL3 gene expression. J Biol Chem 1993; 268:6299–6308.
Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH: Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. J Leukoc Biol 2002; 72:856–863.
Patti G, D'Ambrosio A, Mega S, et al: Early interleukin-1 receptor antagonist elevation in patients with acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2004; 43:35–38.
Paul WE: Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 1991; 77:1859–1870.
Peake PW, Sreenstein JD, Pussell BA, et al: The behaviour of human vitronectin in vivo: effects of complement activation, conformation and phosphorylation. Clin Exp Immunol 1996; 106:416.
Pene J, Gauchat JF, Lecart S, et al: Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. J Immunol 2004; 172:5154–5157.
Pepys MB: Role of complement in the induction of antibody production in vivo. J Exp Med 1974; 140:126.
Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al: Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. J Exp Med 1994; 180:1955–1960.
Petersen SV, Thiel S, Jensen L, et al: An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. J Immunol Methods 2001; 257:107–116.
Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive $CD4^+$ T cells. Immunity 2002; 16:779–790.
Pickering MC, Botto M, Taylor PR, et al: Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. Adv Immunol 2000; 76:227–324.
Piddlesden SJ, Storch MK, Hibbs M, et al: Soluble recombinant complement receptor type 1 inhibits inflammation and demyelination in antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 1994; 152:5477.
Pillemer L, Blum L, Lepow IH, et al: The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. Science 1954; 120:279.
Platt JL: New directions for organ transplantation. Nature 1998; 392:11.
Plumb ME, Sodetz JM: Proteins of the membrane attack complex. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 119.
Podack ER, Biesecker G, Müller-Eberhard HJ: Membrane attack complex of complement: generation of high affinity phospholipid binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:897.
Podack ER, Kolb WP, Müller-Eberhard HJ: The sC5b-7 complex: formation, isolation, properties and subunit composition. J Immunol 1977; 119:2024.
Podack ER, Tschopp J: Membrane attack by complement. Mol Immunol 1984; 21:589.
Pretolani M: Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. Clin Exp Allergy 1999; 29:1164–1171.
Prodeus AP, Goerg S, Shen L-M, et al: A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. Immunity 1998; 9:721.
Pruitt SK, Kirk AD, Bollinger RR, et al: The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. Transplantation 1994; 52:868.
Puccetti P, Belladonna ML, Grohmann U: Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. Crit Rev Immunol 2002; 22:373–390.
Ramesh R, Mhashilkar AM, Tanaka F, et al: Melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulates angiogenesis via the IL-22 receptor. Cancer Res 2003; 63:5105–5113.
Ramm LE, Whitlow MB, Mayer MM: Size of the transmembrane channels produced by complement proteins C5b-8. J Immunol 1982; 129:1143.
Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, et al: Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. J Exp Med 1993; 178:87–99.
Rapp HJ, Borsos T (eds): Molecular Basis of Complement Action. New York, Appleton-Century-Crofts, 1970.
Redlich CA, Gao X, Rockwell S, et al: IL-11 enhances survival and decreases TNF production after radiation-induced thoracic injury. J Immunol 1996; 157:1705–1710.
Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 1994; 83:435–445.
Reiter Y, Ciobotariu A, Fischelson Z: Sub-lytic complement attack protects tumor cells from lytic doses of antibody and complement. Eur J Immunol 1992; 22:1207.
Renauld JC, van der Lugt N, Vink A, et al: Thymic lymphomas in interleukin-9 transgenic mice. Oncogene 1994; 9:1327–1332.
Resino S, Sanchez-Ramon S, Bellon JM, et al: Impaired interleukin-5 (IL-5) production by T cells as a prognostic marker of disease progression in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children. Eur Cytokine Netw 2001; 12:253–259.
Rich BE: IL-20: a new target for the treatment of inflammatory skin disease. Expert Opin Ther Targets 2003; 7:165–174.
Rollins SA, Fitch JCK, Sherman S, et al: Anti-C5 single chain antibody therapy blocks complement and leukocyte activation and reduces tissue damage in CPB patients. Mol Immunol 1998; 35:397.
Rosenwasser LJ: Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. Allergy Clin Immunol 1998; 102:344–350.
Ross GD, Yount WJ, Walport MJ, et al: Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. J Immunol 1985; 135:2005.
Rosse WF: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and complement. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 481.
Rosso DA, Ripoli MF, Roy A, et al: Serum levels of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha are elevated in children with Langerhans cell histiocytosis. J Pediatr Hematol Oncol 2003; 25:480–483.
Rot A, Hub E, Middleton J, et al: Some aspects of IL-8 pathophysiology. III: chemokine interaction with endothelial cells. J Leukoc Biol 1996; 59:39–44.
Ryffel B, Car BD, Gunn H, et al: Interleukin-6 exacerbates glomerulonephritis in (NZB × NZW)F1 mice. Am J Pathol 1994; 144:927–937.
Samuel CE: Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. Virology 1991; 183:1–11.
Sanders ME, Koski CL, Robbins D, et al: Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain–Barré syndrome and multiple sclerosis. J Immunol 1986; 136:4456.
Sanders ME, Schmetz MA, Hammer CH, et al: Quantitation of activation of the human terminal complement pathway by ELISA. J Immunol Methods 1985; 85:245.
Sands BE, Bank S, Sninsky CA, et al: Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. Gastroenterology 1999; 117:58–64.
Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, et al: mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:10054–10059.
Schmiedt W, Kinscherf R, Deigner H-P, et al: Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18:1790.
Schneider PM, Rittner C: Complement genetics. In Dodds AW, Sim RB (eds): Complement. A Practical Approach. New York, Oxford University Press, 1997, p 165.
Schneider PM, Würzner R: Complement genetics: biological implications of polymorphism and deficiencies. Immunol Today 1999; 20:2.
Schweinle JE, Ezekowitz RAB, Tenner AJ, et al: Human mannose-binding protein activates the alternative complement pathway and enhances serum bactericidal activity on a mannose-rich isolate of Salmonella. J Clin Invest 1989; 84:1821.
Seifert, Hugo F, Hansson GK, et al: Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. Lab Invest 1989; 60:747.
Sengeløv H: Complement receptors in neutrophils. Crit Rev Immunol 1995; 15:107.
Seya T, Atkinson JP: Functional properties of membrane cofactor protein of complement. Biochem J 1989; 264:581.
Seya T, Turner JR, Atkinson JP: Purification and characterization of a membrane protein (gp45–70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. J Exp Med 1986; 163:837.
Sharma JN, Moshin SS: The role of chemical mediators in the pathogenesis of inflammation with emphasis on the kinin system. Exp Pathol 1990; 38:73.
Shichishima T, Saitoh Y, Terasawa T, et al: Complement sensitivity of erythrocytes in a patient with inherited complete deficiency of CD59 or with the Inab phenotype. Br J Haematol 1999; 104:303.
Shin ML, Rus H, Niculescu F: Complement system in central nervous system disorders. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 499.
Shinohara S, Rothstein JL: Interleukin 24 is induced by the RET/PTC3 oncoprotein and is an autocrine growth factor for epithelial cells. Oncogene 2004; 23:7571–7579.
Sillaber C, Strobl H, Bevec D, et al: IL-4 regulates c-kit protooncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. J Immunol 1991; 147:4224–4228.
Simon T, Opelz G, Wiesel M, et al: Serial peripheral blood interleukin-18 and perforin gene expression measurements for prediction of acute kidney graft rejection. Transplantation 2004; 77:1589–1595.
Sims PJ, Wiedmer T: Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. Semin Cell Biol, 1995; 6:275.
Sivori S, Cantoni C, Parolini S, et al: IL-21 induces both rapid maturation of human $CD34^+$ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. Eur J Immunol 2003; 33:3439–3447.
Snapper CM, Paul WE: Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science 1987; 236:944–947.

Soussi-Gounni A, Kontolemos M, Hamid Q: Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:575–582.

Stanilova SA, Slavov ES: Comparative study of circulating immune complexes quantity detection by three assays – CIF-ELISA, C1q-ELISA and anti-C3 ELISA. J Immunol Methods 2001; 253:13–21.

Stoiber H, Pruenster M, Ammann CG, Dierich MP: Complement-opsonized HIV: the free rider on its way to infection. Mol Immunol 2005; 42:153–160.

Strengell M, Sareneva T, Foster D, et al: IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. J Immunol 2002; 169:3600–3605.

Su HR: S-protein/vitronectin interaction with the C5b and the C8 of the complement membrane attack complex. Int Arch Allergy Immunol 1996; 110:314.

Suankratay C, Zhang X-H, Zhang Y, et al: Requirement for the alternative pathway as well as C4 and C2 in complement-dependent hemolysis via the lectin pathway. J Immunol 1998; 160:3006.

Subramaniam SV, Cooper RS, Adunyah SE: Evidence for the involvement of JAK/STAT pathway in the signaling mechanism of interleukin-17. Biochem Biophys Res Commun 1999; 262:14–19.

Sule SD, Wigley FM: Treatment of scleroderma: an update. Expert Opin Investig Drugs 2003; 12:471–482.

Sumiya M, Summerfield JA: The role of collectins in host defense. Semin Liver Dis 1997; 17:311.

Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al: Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. Science 1995; 268:1472–1476.

Takada H, Ohga S, Mizuno Y, et al: Oversecretion of IL-18 in haemophagocytic lymphohistiocytosis: a novel marker of disease activity. Br J Haematol 1999; 106:182–189.

Tan JC, Braun S, Rong H, et al: Characterization of recombinant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. J Biol Chem 1995; 270:12906–12911.

Tavernier J, Devos R, Cornelis S, et al: A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. Cell 1991; 66:1175–1184.

Tenner AJ, Robinson SL, Ezekowitz RAB: Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000Mr component of the C1q receptor. Immunity 1995; 3:485.

Tepper RI, Pattengale PK, Leder P: Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. Cell 1989; 57:503–512.

Teixeira JE, Martinez R, Camara LM, Barbosa JE: Expression of complement receptor type 1 (CR1) on erythrocytes of paracoccidiodomycosis patients. Mycopathology 2001; 152:125–133.

Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, et al: A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature 1997; 386:506.

Tomlinson S, Nussenzweig V: Human alternative complement pathway-mediated lysis of rabbit erythrocytes is enhanced by natural anti-gal α 1–3gal antibodies. J Immunol 1997; 159:5606.

Tony HP, Shen BJ, Reusch P, Sebald W: Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. Eur J Biochem 1994; 225:659–665.

Torigoe K, Ushio S, Okura T, et al: Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. J Biol Chem 1997; 272:25737–25742.

Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, et al: Processes in atherogenesis: complement activation. Atherosclerosis 1997; 132:131.

Trepicchio WL, Dorner AJ. Interleukin-11. A gp130 cytokine. Ann N Y Acad Sci 1998; 856:12–21.

Trinchieri G: Function and clinical use of interleukin-12. Curr Opin Hematol 1997; 4:59–66.

Trinchieri G: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood 1994; 84:4008–4027.

Turner MW: Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. Immunol Today 1996; 17:532.

Ushio S, Namba M, Okura T, et al: Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. J Immunol 1996; 156:4274–4279.

Uyttenhove C, Simpson RJ, Van Snick J: Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:6934–6938.

Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, et al: Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion. Role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. Circulation 1998; 97:2259.

Valdimarsson H, Stefansson M, Vikingsdottir T, et al: Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. Scand J Immunol 1998; 48:116.

Van de Wetering JK, van Golde LM, Batenburg JJ: Collectins: players of the innate immune system. Eur J Biochem 2004; 271:1229–1249.

Vermeer PD, Harson R, Einwalter LA, et al: Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 28:286–295.

Vio CP, Olavarria V, Gonzalez C, et al: Cellular and functional aspects of the renal kallikrein system in health and disease. Biol Res 1998; 31:305.

Volanakis JE: Structure, molecular genetics, and function of complement control proteins: An update. Year Immunol 1988; 3:275.

Volanakis JE: Overview of the complement system. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 9.

Volanakis JE, Narayana SV: Complement factor D, a novel serine protease. Protein Sci 1996; 5:553.

Vorup-Jensen T, Jensenius JC, Thiel S: MASP-2, the C3 convertase generating protease of the MBLectin complement activating pathway. Immunobiology 1998; 199:348.

Wada T, Yokoyama H, Tomosugi N, et al: Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. Kidney Int 1994; 46:455–460.

Wagner E, Frank MM: Development of clinically useful agents to control complement-mediated tissue damage. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 527.

Wahl SM: Transforming growth factor beta: The good, the bad, and the ugly. J Exp Med 1994; 180:1587–1590.

Walsh GM, Wardlaw AJ, Hartnell A, et al: Interleukin-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. Int Arch Allergy Appl Immunol 1991; 94:174–178.

Wan HC, Lazarovits AI, Cruikshank WW, et al: Expression of alpha 4 beta 7 integrin on eosinophils and modulation of alpha 4-integrin-mediated eosinophil adhesion via CD4. Int Arch Allergy Immunol 1995; 107:343–344.

Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, et al: Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. Eur J Immunol 1989; 19:701–705.

Wang R, Rogers AM, Rush BJ, Russell JH: Induction of sensitivity to activation-induced death in primary $CD4^+$ cells: A role for interleukin-2 in the negative regulation of responses by mature $CD4^+$ T cells. Eur J Immunol 1996; 26:2263–2270.

Wang Y, Rollins SA, Madri JA, et al: Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:8955.

Ward PA: Recruitment of inflammatory cells into lung: roles of cytokines, adhesion molecules and complement. J Lab Clin Med 1997; 129:400.

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, et al: Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. J Clin Invest 1995; 95:2945–2953.

Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, et al: Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. Science 1990; 249:146.

Wen L, Atkinson JP, Giclas PC: Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. J Allergy Clin Immunol 2004; 113:585–593.
Este artigo fornece uma abordagem clínica prática dos testes para deficiência de complemento, bem como uma visão geral do sistema complemento.

West C: Complement and glomerular disease. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 571.

Whaley K (ed): Methods in Complement for Clinical Immunologists. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1985.

Whittington HA, Armstrong L, Uppington KM, Millar AB: Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 31:220–226.

Wilkinson PC, Liew FY: Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. J Exp Med 1995; 181:1255–1259.

Willerford DM, Chen J, Ferry JA, et al: Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. Immunity 1995; 3:521–530.

World Health Organization: Nomenclature of complement. Bull WHO 1968; 39:934.

Würzner R, Mollnes TE, Morgan BP: Immunochemical assays for complement components. In Johnstone AP, Turner MW (eds): Immunochemistry 2. A Practical Approach. Oxford, Oxford University Press, 1997, p 197.

Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, et al: A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:9511–9516.

Yacoub A, Mitchell C, Brannon J, et al: MDA-7 (interleukin-24) inhibits the proliferation of renal carcinoma cells and interacts with free radicals to promote cell death and loss of reproductive capacity. Mol Cancer Ther 2003; 2:623–632.

Yancey KB, Lawley TJ: Role of complement in diseased and normal skin. In Volanakis JE, Frank MM (eds): The Human Complement System in Health and Disease. New York, Marcel Dekker, 1998, p 597.

Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al: Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. Immunity 1995a; 3:811–821.

Yin T, Keller SR, Quelle FW, et al: IL-9 induces tyrosine phosphorylation insulin receptor substrate-1 via JAK tyrosine kinases. J Biol Chem 1995; 270:20497–20502.

Yoshimoto T, Okada K, Morishima N, et al: Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. J Immunol 2004; 173:2479–2485.

Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, et al: Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:3948–3953.

Zitvogel L, Tahara H, Robbins PD, et al: Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. J Immunol 1995; 155:1393–1403.

Zubler RH, Lambert PH: The 125I-C1q binding test for the detection of soluble immune complexes. In Bloom BR, David JR (eds): In Vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity. New York, Academic Press, 1976, p 565.

CAPÍTULO 47

Antígeno leucocitário humano: o complexo principal de histocompatibilidade do homem

H. Davis Massey MD PhD, Richard A. McPherson MD

Genética do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) 1002
- Genética básica 1002
- Composição do MHC 1002
- Localização dos genes do MHC 1002
- Herança 1002
- Desequilíbrio de ligação 1002
- Variação étnica 1002

Moléculas de classe I – sub-regiões *HLA-A, HLA-B, HLA-C* 1003
- Estrutura das moléculas de classe I 1003
- Organização dos genes de classe I 1003
- Regulação da expressão dos genes de classe I 1004
- Função das moléculas de classe I 1004
- Outros genes de classe I 1005

Moléculas de classe II – sub-regiões *HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP* 1006
- Estrutura das moléculas de classe II 1006
- Organização dos genes de classe II 1006
- Desequilíbrio de ligação dos genes na região de classe II 1007
- Regulação da expressão dos genes de classe II 1007
- Função das moléculas de classe II 1007
- Outros genes de classe II 1008

Características de fragmentos antigênicos ligados por moléculas de classe I e de classe II do MHC 1008

Reconhecimento das moléculas de MHC estranhas 1008

Repetições em tandem e polimorfismos de nucleotídeo único no MHC 1008

Moléculas de histocompatibilidade menor 1008

Nomenclatura do HLA 1009
- Especificidades sorológicas e celulares 1009
- Designações de alelos com base no DNA 1009

Técnicas para identificação de polimorfismo do HLA 1010
- Tipagem de alelos de classe I e de classe II com base no DNA 1010
- Detecção sorológica de moléculas de classe I e de classe II 1012
- Detecção celular de moléculas de classe II 1012

Transplante de tecido/órgão 1013
- Base genética do transplante 1013
- Teste de histocompatibilidade 1013
- Transplante renal 1016
- Transplante de outros órgãos 1016
- Transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas 1017

Resumo 1017

Referências bibliográficas 1018

PONTOS-CHAVE

- As moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) incluem os antígenos leucocitários humanos (HLA -A, -B e -C), enquanto as moléculas de classe II do MHC compreendem os antígenos HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP; tais moléculas constituem os antígenos clássicos de "transplante".
- Além de serem estreitamente ligados, os genes do MHC segregam-se em bloco até a progênie.
- A caracterização dos alelos e das moléculas HLA é combinada com protocolos clínicos para maximizar a compatibilidade entre doador e receptor, e minimizar o impacto exercido pela resposta imune sobre o órgão transplantado. Os avanços nessa área contribuíram para o desenvolvimento do transplante como uma modalidade terapêutica bem-sucedida para a substituição de tecido enfermo.
- A compatibilidade de HLA costuma envolver a avaliação de, no mínimo, três *locus*. Os indivíduos compatíveis, em qualquer resolução, para todos os três *locus* recebem o nome de compatíveis 6/6 ou incompatíveis 0.
- Os pacientes podem ser sensibilizados às moléculas estranhas específicas do HLA por meio de transfusão, gestação ou transplantes prévios. A avaliação da compatibilidade entre o receptor e o possível doador implica o teste para essa sensibilização.
- Há vários métodos disponíveis para tipagem da molécula de HLA, incluindo abordagens de tipagem sorológica e celular, bem como tipagem à base de DNA. A tipagem à base do DNA tem vantagens significativas sobre os outros métodos.

A sobrevivência do homem depende da capacidade do sistema imunológico em reconhecer e responder a uma grande variedade de corpos estranhos (antígenos). Embora esse mecanismo de defesa seja básico para a sobrevivência em um mundo hostil repleto de microrganismos, esse mesmo sistema de defesa exerce um impacto negativo em caso de transplante de tecidos de um indivíduo para outro ou disfunção com consequente deflagração de reações autoagressivas. Os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) codificam proteínas essenciais para o reconhecimento imune: as moléculas de classe I e de classe II (Fig. 47.1). No ser humano, as moléculas de classe I incluem os antígenos HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto as moléculas de classe II compreendem os antígenos HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP. Essas moléculas representam os antígenos clássicos de transplante. Outras moléculas codificadas dentro do MHC são as de classe III (ver Cap. 48). Tais moléculas englobam os componentes do complemento ligados ao MHC (C2, C4 e Bf), a 21-hidroxilase (CYP21), a proteína de choque térmico (HSP, *heat shock protein*) 70 e o fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*).

Durante uma infecção, o microrganismo invasor pode infectar ou ser fagocitado por células e, então, degradado em fragmentos peptídicos. Dentro da célula, as moléculas de classe I ou de classe II do MHC ligam-se a fragmentos antigênicos derivados do microrganismo. Assim que os fragmentos antigênicos se ligarem às moléculas do MHC e forem translocados para a superfície celular, os receptores presentes nos linfócitos T interagem com o complexo formado por fragmento do antígeno-molécula do MHC, deflagrando respostas imunes tanto humorais como celulares (Fig. 47.2). As moléculas de superfície celular específicas das células T, CD4 e CD8 atuam de forma a reforçar essa interação celular e a transmitir sinais de ativação. Outras moléculas de superfície celular atuam de modo a aumentar a afinidade de interações celulares (p. ex., CD2 e seu ligante, CD58 [LFA-3] ou CD11a/CD18 [LFA-1] e seu ligante, CD54 [ICAM-1]) e a transmitir sinais coestimulatórios (p. ex., CD28 e seus ligantes, CD80/CD86 [B7] e CD40 e seu ligante, CD154). O polimorfismo nos genes que especificam as moléculas de classe I e as

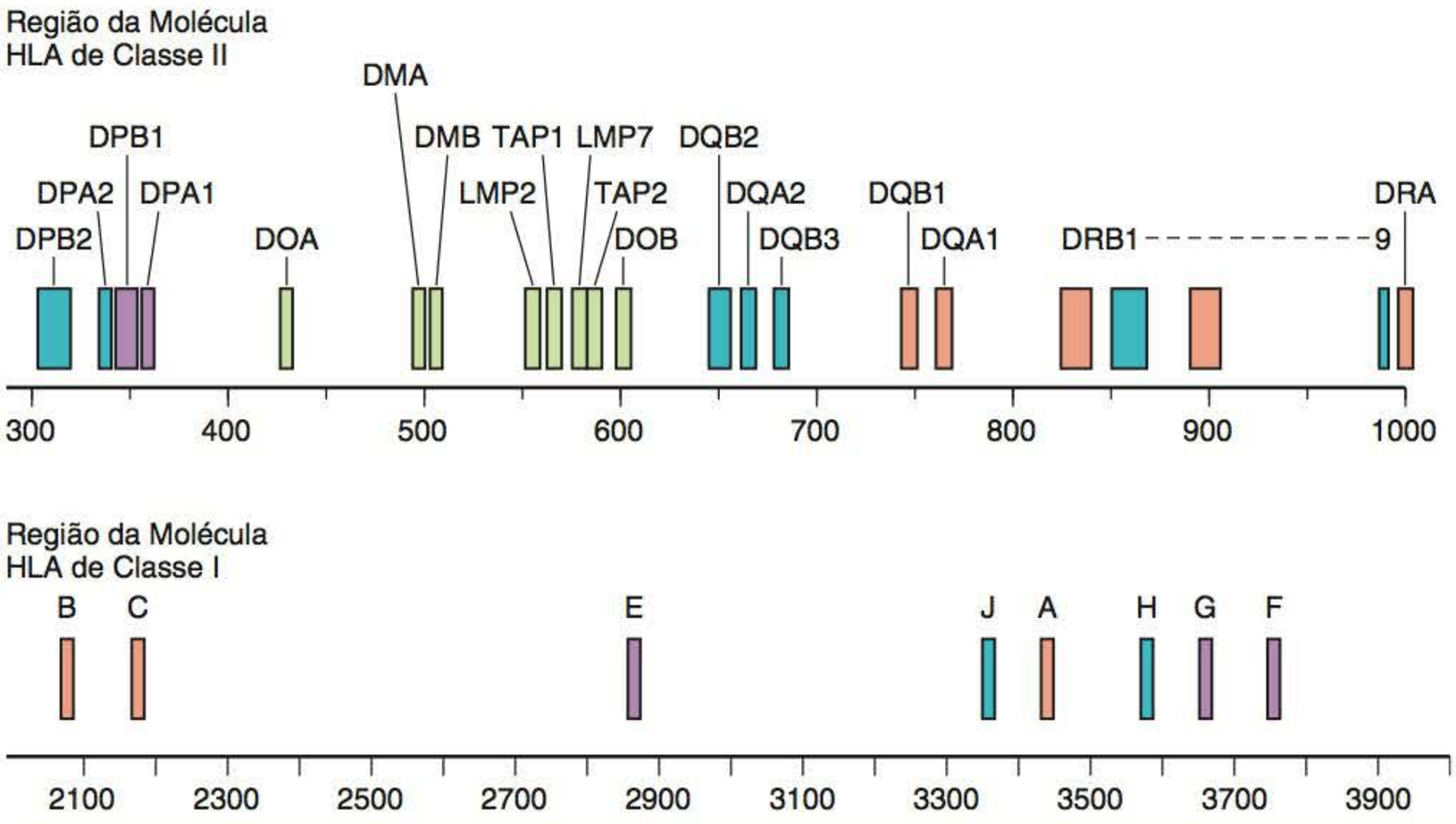


Figura 47.1 Mapa do complexo gênico do *MHC* no cromossomo 6. *HLA-DPB2* na região da molécula HLA de classe II está localizado mais próximo do centrômero. *HLA-F* é o mais telomérico. A região entre *HLA-DRA* e *HLA-B* não está ilustrada. (Com permissão de Anthony Nolan Bone Marrow Trust, www.anthonynolan.org.uk/HIG.)

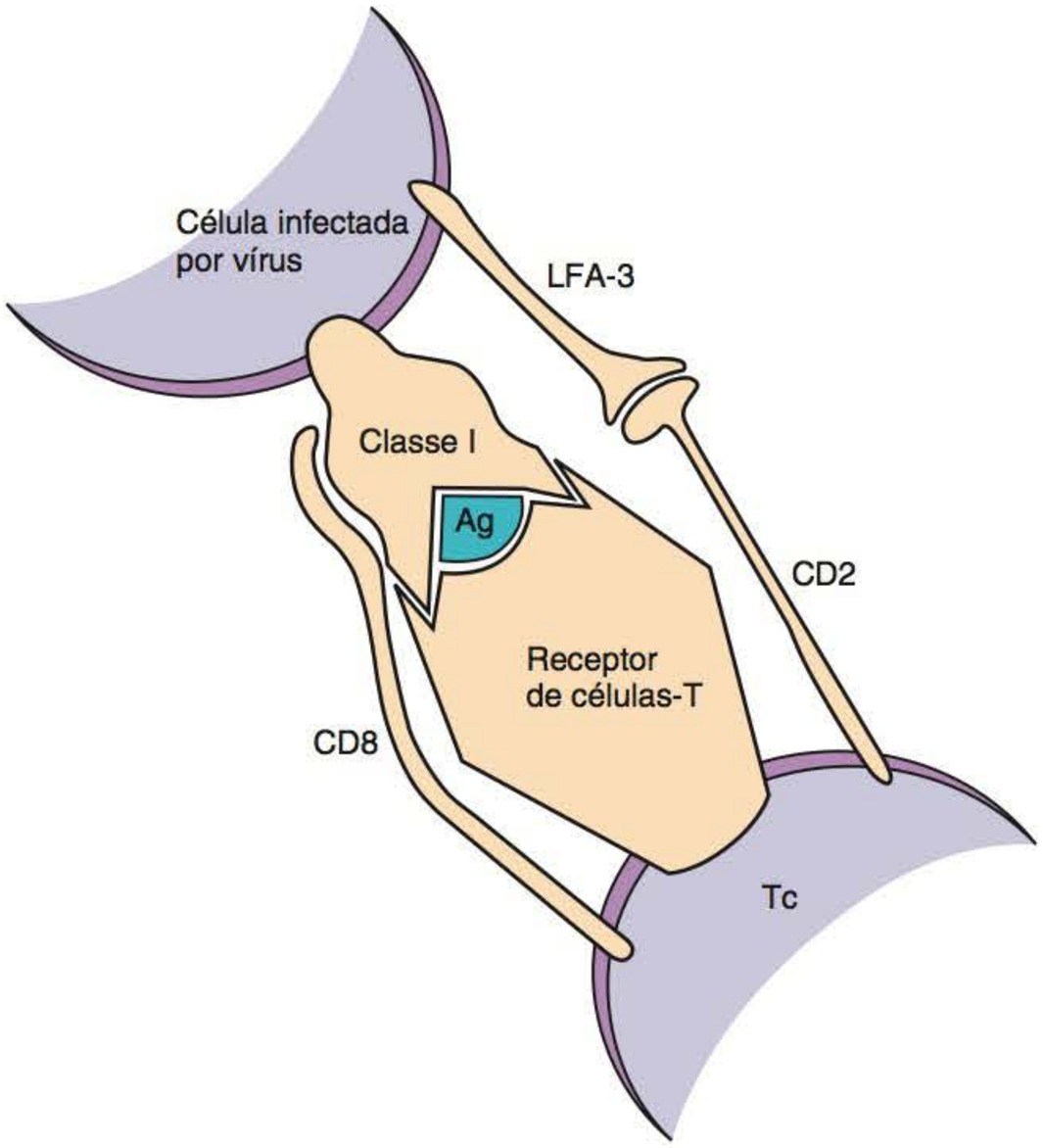


Figura 47.2 Modelo das interações moleculares envolvidas no reconhecimento antigênico.

de classe II do MHC afeta a especificidade antígeno-ligante das moléculas, resultando em diferenças nas respostas imunes entre os membros da espécie. O mesmo padrão de interações entre uma célula dotada de complexo formado por fragmento de antígeno e molécula de classe I ou classe II e um linfócito T ocorre não somente no reconhecimento de patógenos invasores, mas também no reconhecimento de moléculas estranhas de classe I e de classe II (aloantígenos) e no reconhecimento de antígenos "próprios" (autoantígenos) (ver Cap. 48).

Como as moléculas de classe I e de classe II do MHC do doador são reconhecidas pelo sistema imunológico do receptor como antígenos estranhos, é benéfico garantir que o doador e o receptor sejam histocompatíveis (compatíveis em termos de tecido, i. e., quando o tecido transplantado é aceito como *self*; HLA compatíveis). As moléculas de classe I e de classe II possuem grande diversidade alélica em uma população; por essa razão, garantir a compatibilidade entre doador e receptor é frequentemente uma tarefa difícil, que exige a colaboração entre os membros da equipe médica, o pessoal responsável pela tipagem do HLA e os coordenadores de doador de tecido (p. ex., grandes redes de compartilhamento de órgãos e registros ou bancos de doadores de células progenitoras hematopoéticas).

O presente capítulo aborda questões como genética, estrutura, função, nomenclatura e técnicas de detecção dos produtos gênicos do MHC humano, *HLA-A*, *-B* e *-C* (classe I) e *HLA-DR*, *-DQ* e *-DP* (classe II). Este capítulo também discute a importância da compatibilidade da molécula HLA para os procedimentos de transplante. Além das referências listadas no final do capítulo, a Tabela 47.1 lista endereços úteis da *web*, que fornecem tanto material de referência quanto atualizações de resultados clínicos.

Tabela 47.1 Sites sobre transplante de HLA

Endereço	Informações
www.ashi-hla.org	Sociedade Norte-americana de Histocompatibilidade e Imunogenética (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics), padrões de tipagem da molécula HLA
www.ebi.ac.uk/imgt/hla	Banco de dados de sequência da molécula HLA, ferramentas para envio de alelos e manipulação da sequência
www.anthonynolan.org.uk/hig	Informações sobre nomenclatura da molécula HLA da Organização Mundial de Saúde
www.ihwc.org or www.ihwg.org	Seminário Internacional de Histocompatibilidade (International Histocompatibility Workshop)
www.marrow.org	Programa Nacional de Doação de Medula dos Estados Unidos (National Marrow Donor Program)
www.bmdw.org	Doadores Mundiais de Medula Óssea (Bone Marrow Donors Worldwide)
www.worldmarrow.org	Associação Mundial de Doadores de Medula (World Marrow Donor Association)
www.ibmtr.org	Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea (International Bone Marrow Transplant Registry)
www.ctstransplant.org	Estudo Colaborativo de Transplante (Collaborative Transplant Study)
www.unos.org	Rede Unida de Compartilhamento de Órgãos (United Network for Organ Sharing)
www.nhgri.nih.gov	Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (National Human Genome Research Institute)

Genética do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

Genética básica

A primeira lei de Mendel, a lei da segregação, baseia-se no princípio de que traços hereditários são determinados por fatores distribuídos à progênie. Em qualquer indivíduo, esses fatores, ou genes como agora são chamados, estão presentes nos cromossomos (ver Cap. 69). Cada gene pode ter múltiplas formas (i. e., alelos). Como os seres humanos são diploides, existem dois genes para cada par de cromossomos homólogos. Na meiose, os cromossomos segregam-se (separam-se) aleatoriamente durante a formação dos gametas (óvulo ou espermatozoide), para que apenas um de cada par de cromossomos (i. e., um número haploide) seja transmitido por qualquer gameta determinado. O número diploide ou duplo de cromossomos é restaurado quando os gametas masculino e feminino se fundem para formar o zigoto. Assim, para um traço determinado por um único gene, sempre haverá quatro combinações genéticas possíveis na progênie, cada uma com igual probabilidade de ocorrência. Essas leis de segregação e o arranjo aleatório aplicam-se aos genes do sistema MHC. Abaixo, seguem as definições para os termos genéticos utilizados neste capítulo (Crow, 1976; www.nhgri.nih.gov), conforme listados na Tabela 47.1.

Gene O fator unitário de herança.

Cromossomo Portadores dos fatores unitários de herança.

Locus A posição do gene no cromossomo.

Alelo Uma forma alternativa do gene em um único *locus*.

Homozigoto Presença de alelos idênticos em um *locus*, um em cada cromossomo.

Heterozigoto Presença de alelos diferentes em um *locus*, um em cada cromossomo.

Codominância O estado em que o alelo em cada *locus* expressa seu efeito característico de forma equivalente no heterozigoto.

Genótipo A composição genética de um organismo ou indivíduo.

Fenótipo As características observáveis produzidas pelos genes.

Polimórfico Presença de dois ou mais genótipos distintos comuns mantidos em uma população.

Cromossomos homólogos Os dois membros de um par de cromossomos que possuem *locus* gênicos correspondentes, um derivado de cada progenitor.

Permuta A troca de segmentos entre cromossomos homólogos. Esse processo também recebe o nome de recombinação.

Alo (antígeno, enxerto) Refere-se às diferenças antigênicas entre indivíduos de uma única espécie.

Auto (antígeno, enxerto) Refere-se aos tecidos ou antígenos do mesmo indivíduo (i. e., *self* ["próprios"]).

Composição do MHC

O complexo de genes de histocompatibilidade principal em seres humanos está localizado no braço curto do cromossomo 6 (i. e., 6p21). Ele ocupa 3.600 kb (quilobases) e inclui 224 *locus* gênicos identificados, dos quais 128 são supostamente expressos. Estima-se que cerca de 40% dos genes expressos desempenham papel no sistema imunológico (Aguado, 1999). Os genes HLA do MHC estão localizados em seis sub-regiões: *HLA-A*, *HLA-C*, *HLA-B*, *HLA-DR*, *HLA-DQ*, e *HLA-DP* (Fig. 47.1). Cada sub-região codifica, no mínimo, uma única glicoproteína de superfície celular. Com apenas uma única exceção, os genes HLA são altamente polimórficos – ou seja, cada um dos genes HLA possui múltiplos alelos na população humana. De fato, os genes HLA são os *locus* mais polimórficos conhecidos no homem (Parham, 1995; Tab. 47.1, www.anthonynolan.org/uk/hig). Como os genes HLA especificam moléculas que desempenham um papel importante na resposta imune, acredita-se que o polimorfismo seja essencial na sobrevivência das espécies e seja mantido na população por seleção.

Localização dos genes do MHC

Os genes do MHC foram atribuídos ao braço curto do cromossomo 6 (6p) com base em estudos citogenéticos de cromossomos aberrantes (i. e., cromossomos que sofreram translocação). A ordem de mapeamento e a posição dos genes do MHC foram determinadas por análises de ligação meiótica (i. e., estudos de permuta em famílias) e técnicas de biologia molecular, incluindo clonagem de genes, sequenciamento do DNA e eletroforese em gel de campo pulsado. A última técnica detecta a presença de genes em fragmentos longos isolados do DNA. A ordem de mapeamento de genes dentro do MHC é a seguinte: *HLA-A*, *-C*, *-B*, *-DR*, *-DQ*, *-DP*, sendo o *HLA-A* distal ao centrômero (Fig. 47.1).

Herança

Os genes do MHC estão estreitamente ligados – ou seja, eles segregam-se em bloco até a progênie. O complexo de genes ligados que reside em um dos pares de cromossomos homólogos e que se separa em bloco até a progênie recebe o nome de *haplótipo*. Cada indivíduo herda dois haplótipos MHC – um de cada progenitor – e, consequentemente, possui dois alelos para cada um dos genes. Esses alelos são expressos de forma codominante. A herança dos genes do MHC segue as regras de segregação estabelecidas por Mendel. Dentro de uma família, cada criança herda um haplótipo MHC da mãe e outro do pai. Por convenção, os haplótipos paternos são designados *a* e *b*, enquanto os maternos, *c* e *d*. Dessa forma, existem quatro genótipos MHC possíveis na progênie: *ac*, *ad*, *bc* e *bd*. Como a chance de herdar um determinado haplótipo é aleatória, a probabilidade de ocorrência de qualquer um dos quatros genótipos é uma em quatro para cada acasalamento. Em uma família com 5 crianças, pelo menos 2 serão HLA-idênticas (assumindo-se a inexistência de permuta). Embora os genes MHC sejam estreitamente ligados, há relatos de famílias em que ocorreu uma permuta. Acreditava-se que a frequência de permuta entre dois genes ligados fosse uma medida da distância que separa os genes; no entanto, dados moleculares sugerem a existência de pontos "quentes" de recombinação no DNA interveniente, capazes de aumentar ou diminuir a probabilidade de recombinação durante a meiose (Uematsu, 1988).

Desequilíbrio de ligação

A observação da ocorrência de alelos em diferentes *locus* gênicos na população no mesmo haplótipo em uma frequência significativamente maior do que a esperada com base apenas na chance recebe o nome de desequilíbrio de ligação (também conhecido como *linkage disequilibrium*). A frequência esperada de dois alelos (f1, f2) corresponde ao produto da frequência gênica de cada alelo naquela população ([$f_{esperada}$ = f1 * f2]). A frequência observada é determinada a partir de estudos de famílias dentro da mesma população. O desequilíbrio de ligação é uma característica do MHC humano, estendendo-se de *HLA-A* até *HLA-DQ*. O exemplo mais bem conhecido de desequilíbrio de ligação é o haplótipo A1,Cw7,B8,DR17(3),DR52,DQ2 em caucasianos, observado em uma frequência aproximadamente quatro vezes maior do que a esperada. O significado do desequilíbrio de ligação na competência imunológica e no processo patológico está discutido no Capítulo 48.

Variação étnica

Os dados acumulados a partir do estudo de grupos da população mundial (Dausset, 1973; Imanishi, 1992; Cadavid, 1997; Bugawan, 1999) demonstram que as frequências de alelos HLA diferem significativamente entre os grupos populacionais étnicos. Os haplótipos MHC e o desequilíbrio de ligação dos alelos também diferem. Essas observações devem ser levadas em consideração ao se desenvolver registros e bancos de aloenxertos de doadores não aparentados de células progenitoras hematopoéticas, como o National Marrow Donor Program (NMDP) (Perkins, 1994). As frequências tanto dos alelos quanto dos haplótipos ditam o número de voluntários requeridos para encontrar um doador HLA-compatível não aparentado para qualquer paciente. Alguns pacientes (i. e., aqueles com tipos raros ou incomuns), no entanto, não conseguem encontrar doadores intimamente compatíveis não aparentados entre os mais de 6 milhões de voluntários listados em todos os registros mundiais de doadores (Beatty, 1995; Mori, 1997). O avanço nos métodos de enxertamento de células progenitoras obtidas de doadores HLA parcialmente incompatíveis pode permitir o transplante em pacientes, para os quais não se consegue encontrar indivíduos compatíveis (ver Cap. 37).

Moléculas de classe I – sub-regiões
HLA-A, HLA-B, HLA-C

As moléculas HLA-A e -B foram as primeiras moléculas MHC a serem descritas em seres humanos (Dausset, 1981; van Rood, 1993). Como essas moléculas foram definidas por respostas humorais contra leucócitos, tais moléculas receberam o nome de "antígenos" leucocitários humanos. Anticorpos leucocitários foram observados em seres humanos logo no início dos anos 1920, mas um estudo sistemático só começou depois dos anos 1950. Em 1952, Dausset demonstrou convincentemente a existência de anticorpos leucocitários (leucoaglutininas). Como essas leucoaglutininas não reagiam com leucócitos do produtor de anticorpos, mas sim com uma porcentagem de leucócitos de indivíduos não aparentados do grupo sanguíneo O, Dausset sugeriu que essas leucoaglutininas fossem aloanticorpos. Logo depois disso, Payne (1964) relatou a presença de leucoaglutininas com aloespecificidade em soros de pacientes que sofriam de reações transfusionais não hemolíticas febris. Em 1958, Dausset descreveu o primeiro aloantígeno HLA, denominado 'MAC' (atualmente HLA-A2 + HLA-28), demonstrando-o como geneticamente determinado.

Originalmente, acreditava-se que as especificidades leucocitárias fossem os produtos de um único *locus*. Um modelo de dois *locus*, cada um com múltiplos alelos, foi estabelecido por meio de estudos do HLA em famílias pela identificação de eventos recombinantes que separavam as duas séries alélicas. Essas duas séries alélicas foram chamadas a primeira ou LA (atualmente HLA-A) e a segunda, ou série quatro (atualmente HLA-B). Esses nomes deriva-se da descrição das séries alélicas LA1, LA2 e LA3 por Payne em 1967 e das séries alélicas 4a e 4b por van Rood em 1969. Em 1970, foi proposto um terceiro *locus* pela primeira vez; no entanto, ele não foi confirmado até 1975, quando se identificou uma família com recombinação entre HLA-B e o novo *locus*. Esse terceiro *locus* foi nomeado HLA-C após o International Histocompatibility Workshop de 1975. Dausset (1981) recebeu o prêmio Nobel de Medicina em 1980 por seu trabalho original sobre o sistema HLA humano.

Estrutura das moléculas de classe I

As moléculas clássicas de classe I, denominadas HLA-A, HLA-B e HLA-C no ser humano, são heterodímeros que consistem em polipeptídeo glicosilado transmembrana (cadeia pesada, 44 kDa) associado de forma não covalente com β_2-microglobulina (12 kDa) (Fig. 47.3) (Bjorkman, 1990). A cadeia pesada das moléculas de classe I ocupa a membrana celular, estando orientada com sua porção aminoterminal para fora da célula. A β_2-microglobulina está associada com a região extracelular da cadeia pesada, sendo necessária para expressão na superfície celular. A região extracelular da cadeia pesada de classe I é dividida em três domínios nomeados α_1, α_2 e α_3, cada um deles consistindo em cerca de 90 resíduos de aminoácidos. O domínio α_1 aminoterminal contém um sítio de glicosilação no resíduo de asparagina na posição 86. O segmento transmembrana de aproximadamente 24 aminoácidos é, sobretudo, hidrofóbico, enquanto o segmento carboxiterminal intracelular da molécula consiste principalmente em resíduos hidrofílicos com aglomerado de resíduos básicos adjacentes à superfície citoplasmática da membrana celular.

O polimorfismo das moléculas de classe I (Tab. 47.2) (Bodmer, 1997, 1999) é definido pelo uso de (1) anticorpos específicos de classe I (aloantissoros e anticorpos monoclonais) que se ligam às moléculas HLA; (2) linfócitos T citotóxicos (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*) que reconhecem e destroem em resposta à estimulação por moléculas estranhas ou alogênicas de classe I *in vitro*; (3) focalização isoelétrica de moléculas isoladas de classe I; (4) tipagem de DNA para alelos de classe I, com base na reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*); e (5) sequenciamento de nucleotídeos de alelos de classe I. A maior parte do polimorfismo de classe I origina-se de diferenças nas sequências de aminoácidos agrupados nos domínios α_1 e α_2 da cadeia pesada. O domínio α_3 é altamente preservado entre as moléculas HLA de classe I.

Quando a estrutura tridimensional da molécula de classe I foi definida pelo uso de cristalografia de raios X, surgiram perspectivas (*insights*) inovadoras quanto à estrutura da molécula HLA (Bjorkman, 1987). A estrutura da porção extracelular está ilustrada na Figura 47.4. A molécula consiste em dois pares de domínios estruturalmente similares: α_1 tem a mesma conformação terciária que α_2, enquanto α_3- e β_2-microglobulina possuem conformações terciárias semelhantes. Os domínios α_3- e β_2-microglobulina são, cada um deles, compostos de duas folhas β-pregueadas antiparalelas, uma com quatro filamentos e outra com três filamentos, ligados entre si por ponte dissulfeto. Os domínios α_3 e α_2 interagem entre si através dessas folhas β-pregueadas, e a estrutura desses domínios assemelha-se muito àquela descrita para um domínio da região constante de imunoglobulina. Os domínios α_1 e α_2 são pareados até formar uma folha β-pregueada de 8 filamentos. Essa folha é coberta por duas α-hélices, formando um sulco no topo da molécula. Esse sulco corresponde ao local de ligação de fragmentos peptídicos antigênicos pela molécula de classe I (Fig. 47.4). Os lados e o fundo do sulco são formados por cadeias laterais dos aminoácidos que compreendem as hélices e as folhas β-pregueadas. Muitos dos aminoácidos que revestem esse sulco são polimórficos, criando diferenças alelo-específicas na especificidade de ligação ao antígeno entre os diferentes produtos alélicos de classe I (Stern, 1994). Outros resíduos nas regiões helicoidais do sulco interagem com o receptor das células-T durante o reconhecimento do complexo de classe I-fragmento antigênico pelo linfócito T (ver Fig. 47.2).

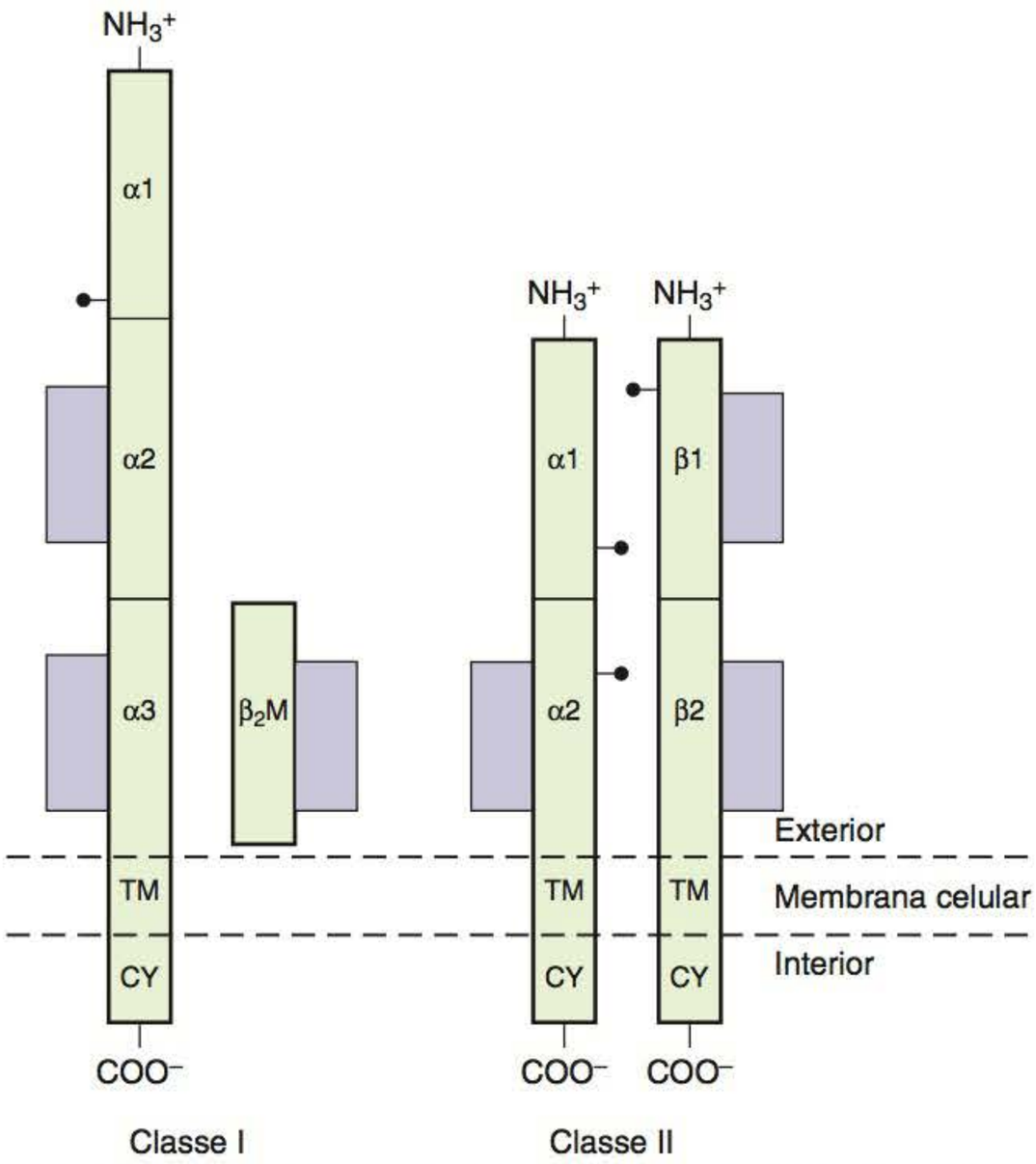


Figura 47.3 Um modelo esquemático da estrutura das moléculas HLA de classe I e de classe II.

Organização dos genes de classe I

As cadeias pesadas da molécula HLA são codificadas dentro do MHC no cromossomo 6 (Fig. 47.1) (Shiina, 1999) e altamente polimórficas, enquanto a β_2-microglobulina é codificada no cromossomo 15 e não se sabe se ela é polimórfica em seres humanos. O gene típico de classe I é codificado por oito éxons. O primeiro éxon codifica a região 5' não traduzida e um peptídeo líder hidrofóbico. Os éxons 2-4 codificam os três domínios extracelulares, enquanto o éxon 5 codifica a região transmembrana. O sexto e o sétimo éxons codificam a região citoplasmática, ao passo que o oitavo éxon codifica a região 3' não traduzida, inclusive o sítio de adição da cauda poli(A). As sequências intervenientes (denominadas íntrons) entre os éxons são transcritas em RNA, mas removidas durante o processamento e a edição do RNA mensageiro (mRNA).

Tabela 47.2 Exemplos de antígenos HLA (especificidades) definidos por tipagem sorológica e alelos HLA definidos por sequenciamento do DNA, reconhecidos pela OMS

Antígenos HLA-A	Antígenos HLA-DQ	Alelos HLA-A†	Alelos HLA-DQA1‡	Alelos HLA-DBQ1‡
A1	DQ1	A*0101–0104N	DQA1*0101-*0105	DQB1*0501-*0504
A2	DQ2	A*02011-*0230	DQA1*0201	DQB1*06011-*0615
A203	DQ3	A*03011-*0304	DQA1*03011–0303	DQB1*0201-*0203
A210	DQ4	A*1101-*1105	DQA1*0401	DQB1*03011-*0309
A3	DQ5(1)	A*2301	DQA1*05011-*0505	DQB1*0401-*0402
A9	DQ6(1)	A*2402101-*2420	DQA1*06011-*06012	
A10	DQ7(3)	A*2501-*2502		
A11	DQ8(3)	A*2601-*2612		
A19	DQ9(3)	A*2901-*2904		
A23(9)		A*3001-*3007		
A24(9)		A*31012-*3104		
A2403		A*3201-*3203		
A25(10)		A*3301-*3304		
A26(10)		A*3401-*3402		
A28		A*3601		
A29(19)		A*4301		
A30(19)		A*6601-*6603		
A31(19)		A*68011-*6809		
A32(19)		A*6901		
A33(19)		A*7401-*7403		
A34(10)		A*8001		
A36				
A43				
A66(10)				
A68(28)				
A69(28)				
A74(19)				
A80				

Cada coluna da tabela é independente. Os números entre parênteses indicam a especificidade sorológica ampla. O tipo sorológico pode ser listado sem a especificidade ampla. Por exemplo, tanto A23(9) como A23 são designações corretas.

† Os alelos *HLA-A* especificam os antígenos HLA-A. O antígeno A1 é especificado por alelos *A*0101* ou *A*0102* ou *A*0103*. O *A*0104N* é um alelo nulo ou não expresso.

‡ Os alelos *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1* especificam os antígenos HLA-DQ. O antígeno DQ5 (1) é especificado por várias combinações diferentes de *DQA1* e *DQB1*, incluindo (1) alelos *DQA1*0101* e *DQB1*0501* e (2) *DQA1*0101* e *DQB1*0502*. No passado, eram atribuídas designações sorológicas subdivididas às especificidades que pareciam identificar o antígeno especificado por algum alelo *HLA* isolado (p. ex., A2 divide-se em A203, A210; B7 divide-se em B703; B39 divide-se em B3901 e B3902). Atualmente, admite-se que outros alelos também possam codificar antígenos portadores dessas especificidades sorológicas. Além disso, o WHO Nomenclature Committee recomenda que essas subdivisões sejam suspensas.

Fonte: adaptada de www.anthonynolan.org.uk/HIG, com permissão de SGE Marsh.

Regulação da expressão dos genes de classe I

As moléculas HLA de classe I são expressas como glicoproteínas transmembrana na superfície de muitos tipos celulares. Contudo, o nível de expressão na superfície pode variar muito (Singer, 1990). O nível em repouso das moléculas de classe I é mais alto nas células linfoides; as moléculas de classe I são indetectáveis na membrana de outros tipos celulares, como neurônios, miócitos e espermatozoides. Os elementos sequenciais localizados acima dos genes de classe I se ligam a fatores reguladores que controlam a expressão das moléculas de classe I na superfície celular. Durante uma resposta imune, a expressão de genes da classe I na superfície celular pode ser suprarregulada por ligação de citocinas (p. ex., interferon-γ e TNF) a elementos reguladores a montante. Tumores e certos agentes virais (p. ex., vírus da imunodeficiência humana [HIV, *human immunodeficiency virus*]) são capazes de suprimir a expressão de classe I (Brodsky, 1999).

Função das moléculas de classe I

As moléculas HLA-A, -B e -C desempenham papéis fundamentais na resposta imune. Em primeiro lugar, na resposta imune *adaptativa*, as moléculas de classe I ligam-se a peptídeos derivados de proteínas degradadas ou sintetizadas no citosol e os expressam na superfície celular para leitura pelos receptores antigênicos presentes nos linfócitos T (ver Cap. 44). A apresentação de antígeno por moléculas de classe I faz com que as células T detectem e montem uma resposta citotóxica ao material estranho (p. ex., algum vírus ou proteínas anormais provenientes de célula maligna). No citosol, os antígenos intracelulares (inclusive autoproteínas ["proteínas próprias"] e proteínas virais ou anormais) são degradados em fragmentos peptídicos (Rock, 1999). Esses fragmentos peptídicos são transportados até o retículo endoplasmático, onde se ligam ao sulco no topo de moléculas de classe I recém-sintetizadas e, depois, são conduzidos à superfície celular (Pamer, 1998; Hansen, 1997b) (Fig. 47.2). Quatro genes, localizados na região de classe II do MHC (Figs. 47.1 e 47.5), estão envolvidos nesse processo. Dois desses genes (*LMP2* e *LMP7*) codificam componentes do complexo denominado proteossoma, uma estrutura macromolecular que degrada proteínas dentro do citosol (Tanaka, 1997). Os outros dois genes (*TAP1* e *TAP2*) codificam componentes de transportadores peptídicos que deslocam os peptídeos do citosol para o retículo endoplasmático (Momburg, 1998). Os CTLs $CD8^+$ reconhecem o peptídeo processado em conjunto com a molécula de classe I (Jorgensen, 1992). No sistema experimental utilizado para dissecar esse mecanismo, os CTLs foram gerados por estimulação *in vitro* com células autólogas infectadas por vírus. O reconhecimento e a lise da célula-alvo foram específicos para a cepa viral *priming*. O reconhecimento também foi afetado pelo polimorfismo alélico das moléculas de classe I, pois apenas as células-alvo infectadas por vírus que compartilhavam o(s) produto(s) alélico(s) adequado(s) de classe I com o respondedor (*responder*) foram lisadas (Zinkernagel, 1997a, 1997b). O último requisito recebe o nome de "restrição pelo MHC". Zinkernagel e seu colaborador Doherty receberam o prêmio Nobel de Medicina em 1996 pelo reconhecimento da importância para a imunologia do conceito de restrição pelo MHC.

Em segundo lugar, a expressão das moléculas de classe I na superfície celular exerce uma função protetora na resposta imune *inata*, evitando a lise da célula-alvo por células exterminadoras naturais (NK, *natural killer*). Ao contrário dos CTLs, as células NK não necessitam

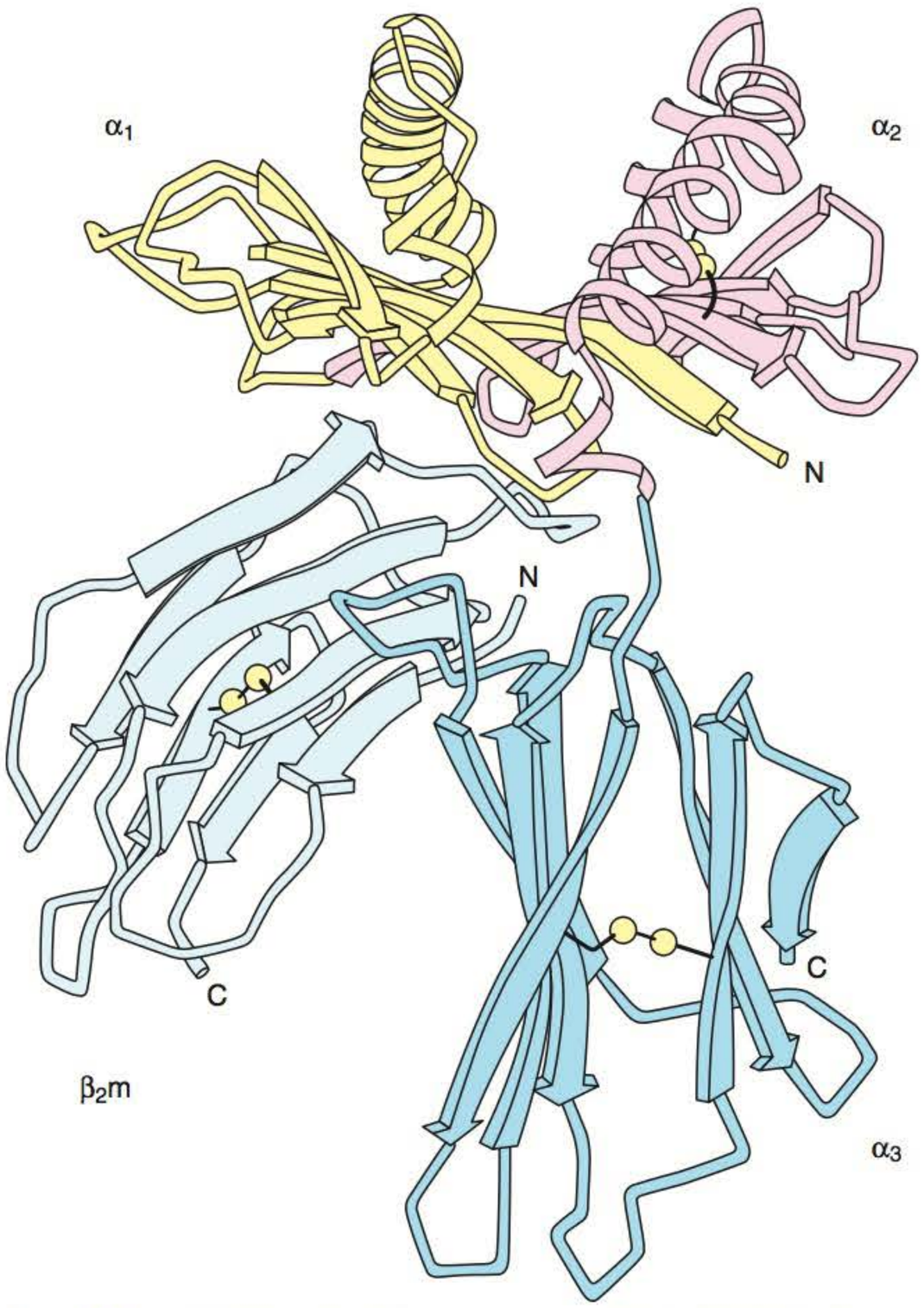


Figura 47.4 Modelo tridimensional da porção extracelular de molécula HLA de classe I. (Com permissão de Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 1987; 329:506.)

de ativação pelo reconhecimento do peptídeo ligado à molécula de classe I, mas podem promover a lise e a destruição das células-alvo que carecem da expressão de moléculas HLA clássicas de classe I na superfície celular. Por meio desse mecanismo inato, as células NK desempenham um papel importante na vigilância contra vírus e células tumorais que sub-regulam a expressão da molécula de classe I para evitar o reconhecimento pelos CTLs (Lanier, 1998; Long, 1999).

Existem dois grupos de receptores das células NK: (1) o receptor de lectina tipo C CD94/NKG2, cujos genes residem no cromossomo 12 e (2) os receptores do tipo imunoglobulina das células exterminadoras (*killer*) semelhantes a imunoglobulinas (KIRs, *killer cell immunoglobulin-like receptors*) codificados por genes no cromossomo 19. A função das células NK parece ser regulada por um equilíbrio entre os receptores de sinalização positiva que iniciam a ativação celular e os receptores inibitórios que suprimem essa ativação. Ambos os grupos de receptores reconhecem os ligantes HLA de classe I. Por exemplo, os receptores KIR2D diferenciam entre os ligantes HLA-C, com base na presença de resíduos de aminoácidos específicos nos códons 77 e 80 (i. e., asn77lys80 *vs.* ser77asn80). Outro receptor NK, o KIR3D, reconhece o polimorfismo HLA-Bw4/Bw6. Um terceiro receptor NK, o CD94/NKG2, reconhece a molécula HLA-E complexada com o peptídeo líder HLA de alguns dos produtos alélicos das moléculas HLA-A, -B, -C e -G (Brooks, 1999).

As células NK são capazes de reconhecer e lisar especificamente células alogênicas que não expressam as moléculas específicas de classe I expressas pela célula efetora (i. e., *missing self* – perda de expressão do próprio) (Valiante, 1997). Isso potencialmente pode ocorrer mesmo em pares de transplante aparentemente HLA-compatíveis, em que um membro do par é homozigoto e o outro, heterozigoto (p. ex., doador: Bw4,Bw6; receptor: Bw6). Dessa forma, as células NK Bw4-específicas do doador podem lisar as células sem Bw4 do receptor em um enxerto de células progenitoras hematopoéticas. Essa resposta pode ser unidirecional em alguns quadros. No exemplo, o doador não carece de qualquer molécula HLA presente no receptor; assim, as células NK do receptor não detectarão qualquer *missing self*. Como as células NK são relativamente radiorresistentes e compreendem uma subpopulação de aproximadamente 10 a 15% dos linfócitos sanguíneos periféricos, a resposta dessas células NK pode ser considerável; até o momento, no entanto, não se conhece a extensão do papel desempenhado pela atividade das células NK nos resultados de transplante (Ruggeri, 1999).

Outros genes de classe I

Foi identificado o equivalente a 20 genes adicionais não clássicos ou de classe Ib dentro da região de classe I do cromossomo 6p por clonagem gênica (Aguado, 1999). Muitos deles são pseudogenes; contudo, vários deles codificam e expressam mRNA e/ou moléculas semelhantes às de classe I, HLA-E, HLA-F e HLA-G. Essas moléculas podem ser mediadores-chave de respostas imunes tanto adaptativas quanto inatas (O'Callaghan, 1998). Seus genes são homólogos aos genes clássicos de classe I em termos de estrutura e os polipeptídeos codificados por esses *locus* também se associam com β_2-microglobulina. Entretanto, assim como um alto nível de polimorfismo alélico é uma indicação dos *locus HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, um baixo nível de polimorfismo dos *locus HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* é uma característica distintiva desses genes. Além disso, em comparação com moléculas clássicas de classe I, a expressão de moléculas não clássicas de classe I na superfície celular é baixa e a distribuição dessas moléculas de classe Ib em tipos celulares específicos varia.

HLA-G

HLA-G é expressa, sobretudo, em células citotrofoblásticas extravilosas na interface feto-maternal, onde supostamente essa molécula desempenha um papel na tolerância materno-fetal (Le Bouteiller, 1999). A HLA-G, como ligante de, no mínimo, três receptores NK e outros receptores inibitórios celulares, protege o tecido placentário invasor contra a ação citolítica das células NK. Embora a molécula HLA-G tenha a capacidade de se ligar e apresentar o antígeno processado (i. e., peptídeos) às células T, a diversidade de peptídeos ligados por HLA-G parece ser menor que a diversidade daqueles ligados por moléculas clássicas de classe I. A regulação da expressão de HLA-G também difere dos genes clássicos de classe I, já que o gene não contém qualquer sinal de resposta de interferon; assim, ele não é induzível por interferon. Há hipóteses de que as formas solúveis possam atuar como imunossupressores específicos durante a gravidez (Le Bouteiller, 1999). Evidências recentes apoiam essa hipótese. Os transcritos de HLA-G estão presentes em grande número em membranas extravilosas placentárias no primeiro trimestre de gestação, enquanto na gravidez a termo, os números de transcritos declinam abruptamente, em conformidade com a teoria de que a molécula HLA-G confere proteção do embrião alogênico contra a vigilância das células NK maternas (Agrawal, 2003). Essa suposta função levanta a possibilidade de que a

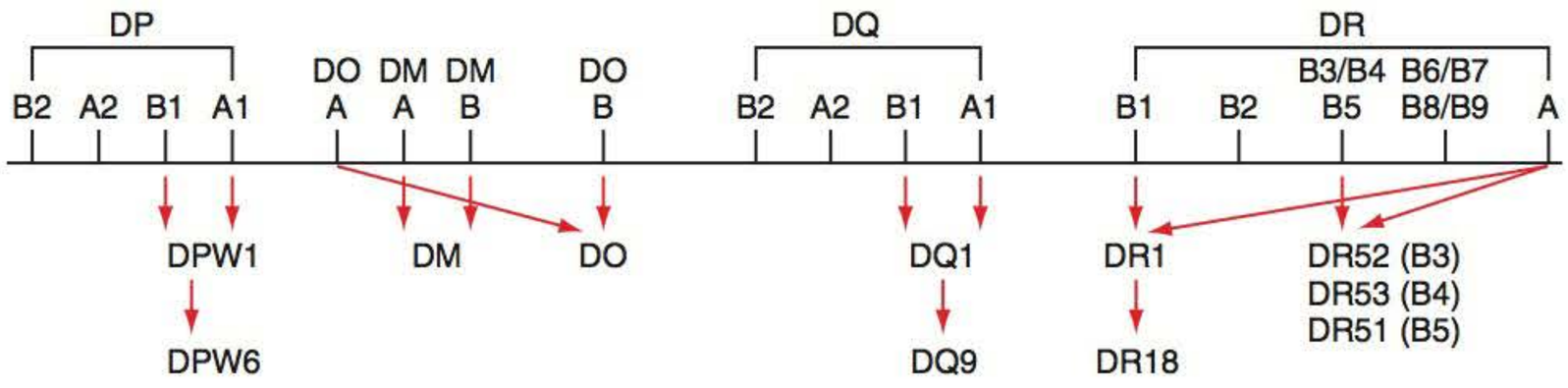


Figura 47.5 Mapa da região de classe II do MHC humano. Estão listados os produtos gênicos codificados por cada sub-região. Nem todos os genes estão incluídos.

molécula HLA-G possa desempenhar um papel na tolerância a tecidos transplantados. Nesse sentido, é interessante notar que os receptores de transplante de fígado-rim com altas concentrações de HLA-G em seus soros exibiam poucos episódios de rejeição aguda e, portanto, podem necessitar de menos terapia imunossupressora (Creput, 2003).

HLA-E

HLA-E pode desempenhar um papel na proteção de célula-alvo contra lise mediada por células NK. As moléculas HLA-E ligam-se a um conjunto de peptídeos hidrofóbicos quase idênticos derivados das sequências líderes das moléculas clássicas de classe I e das cadeias pesadas de HLA-G. A molécula HLA-E expressa esses peptídeos ligados na superfície celular para reconhecimento pelas células NK, possibilitando uma verificação quanto à integridade da via de apresentação do antígeno (Lee, 1998a, 1998b; O'Callaghan, 1998). A aplicação de enxerto de pele em um modelo de camundongo transgênico sugere que a molécula HLA-E pode ser reconhecida como um antígeno de transplante (Pacasova, 1999). Estudos recentes sugerem que as células NK do hospedeiro talvez sejam capazes de reconhecer a molécula HLA-E em células alogênicas e, possivelmente, tolerá-la, mesmo quando ligada a peptídeos do doador. Com essa descoberta, surge a possibilidade de explorar essa tolerância na tentativa de evitar a rejeição do enxerto mediada por células NK e a doença do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH) (Matsunami, 2002).

HLA-F

O papel desempenhado pela molécula HLA-F não é conhecido. O modelo computadorizado prediz que certos resíduos de aminoácidos da molécula HLA-F podem contribuir para a formação de suposto sulco de ligação peptídica, compatível com um papel desempenhado na apresentação de antígeno pela HLA-F (O'Callaghan, 1998). Até o momento, a molécula HLA-F parece ser normalmente expressa apenas na superfície de trofoblastos extravilosos que invadiram a decídua materna, mas também foi encontrada nas superfícies de linhagens celulares linfoblastoides infectadas pelo vírus de Epstein-Barr (Ishitani, 2003).

Moléculas de classe II – sub-regiões *HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP*

As moléculas de classe II em seres humanos foram reconhecidas pela primeira vez por sua capacidade de estimular células T alogênicas na cultura mista de leucócitos (MLC, *mixed leukocyte culture*). Durante o International Histocompatibility Workshop de 1975, a MLC foi utilizada para definir a série alélica de HLA-D (Thorsby, 1975). Como as MLCs necessitavam de 7 dias antes da obtenção dos resultados, foi solicitada uma rápida detecção sorológica de HLA-D. Em 1975, ficou determinado que os aloantissoros continham anticorpos reativos com moléculas estreitamente associadas com as especificidades previamente identificadas como HLA-D por técnicas celulares (Dausset, 1981). Depois do Seminário Internacional de Histocompatibilidade de 1977, essas especificidades sorológicas foram denominadas DR, para especificidades D-relacionadas, já que as moléculas HLA-D e HLA-DR eram observadas por serem associadas, mas não idênticas entre si. O teste sorológico, aliado a estudos genéticos e imunoquímicos, identificou moléculas adicionais de classe II, como DR52, DR53, DR51 e DQ. As técnicas celulares ainda identificaram outra molécula de classe II no final dos anos 1970 (Shaw, 1981). Essa molécula (atualmente denominada HLA-DP) foi descrita, em princípio, como um antígeno secundário de célula-B (SB, *secondary B-cell antigen*), pois costumava ser fraca ou indetectável em uma MLC primária e necessitava de uma estimulação de fase secundária em cultura para detecção. Subsequentemente, as sequências de codificação do DNA e as localizações desses genes dentro do MHC foram ainda mais caracterizadas, utilizando técnicas de biologia molecular (Beck, 1999).

Estrutura das moléculas de classe II

As moléculas HLA-DR, -DQ e -DP de classe II são heterodímeros, que consistem em duas glicoproteínas transmembrana associadas de forma não covalente, uma cadeia α (33-35 kDa) e outra cadeia β (26-28 kDa) (Fig. 47.3) (Gorga, 1992). Ambas as cadeias polipeptídicas ocupam a membrana celular e estão orientadas com suas porções aminoterminais na parte externa da célula. As regiões extracelulares dos polipeptídeos α e β são divididas, cada uma, em dois domínios, designados α_1 e α_2 e β_1 e β_2, mas cada domínio consiste em aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos. A cadeia α possui duas porções de carboidratos, um glicano do tipo alta-manose e outro glicano do tipo complexo, nos aminoácidos 78 e 118, respectivamente. As cadeias β possuem um único oligossacarídeo tipo complexo no aminoácido 19. Os domínios α_1 e β_1 aminoterminais das cadeias α e β contêm os resíduos polimórficos, enquanto os domínios α_2 e β_2 membrana-proximais são altamente preservados e homólogos aos domínios da região constante de imunoglobulina. Uma região de aproximadamente 12 aminoácidos de comprimento conecta o segundo domínio extracelular à região transmembrana hidrofóbica (23 aminoácidos) e um pequeno domínio intracitoplasmático (8-15 aminoácidos).

Com base na cristalografia, a molécula de classe II é semelhante em termos de estrutura à molécula de classe I (Brown, 1993) (Fig. 47.4). Na molécula de classe II, os domínios α_1 e β_1 das cadeias α e β formam uma folha β-pregueada de 8 filamentos coberta por duas α-hélices, de modo a formar o sulco de ligação ao antígeno no topo da molécula. Os domínios α_2 e β_2 formam, cada um, duas folhas β-pregueadas antiparalelas que dão suporte ao sulco no topo da molécula. Como acontece com as moléculas de classe I, muitos dos aminoácidos que revestem o sulco de ligação ao peptídeo antigênico são polimórficos, criando diferenças nas especificidades de ligação ao peptídeo para os diferentes produtos alélicos de classe II.

Assim como as moléculas de classe I, as moléculas de classe II são altamente polimórficas (Tab. 47.2) (Bodmer, 1997, 1999; Marsh, 2002). O polimorfismo da classe II é definido por (1) anticorpos específicos de classe II (aloantissoros e anticorpos monoclonais) que se ligam a moléculas de classe II; (2) células T aloproliferativas que reconhecem e se proliferam em resposta a moléculas estranhas de classe II *in vitro*; (3) eletroforese bidimensional em gel de moléculas isoladas de classe II; (4) hibridização do padrão de digestão do DNA responsável pela codificação dos genes de classe II por endonuclease de restrição, utilizando sondas *locus*-específicas (uma técnica que detecta o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição [RFLP, *restriction fragment length polymorphism*]); (5) tipagem de DNA para alelos de classe II, com base na técnica de PCR; e (6) sequenciamento de nucleotídeos de genes da classe II. A maior parte do polimorfismo de classe II origina-se de diferenças nas sequências de aminoácidos localizadas nos domínios α_1 e b_1 das duas cadeias polipeptídicas.

Organização dos genes de classe II

Em contraste às moléculas de classe I, as cadeias α e β das moléculas de classe II são codificadas dentro de um segmento de 1.100 kb da região do MHC (Figs. 47.1 e 47.5) (Beck, 1999). A região de classe II inclui três sub-regiões – DR, DQ e DP – sendo que cada uma delas codifica, pelo menos, um gene *A* (responsável pela codificação da cadeia α) e um gene *B* (responsável pela codificação da cadeia β). As comparações de sequências sugerem que tanto os genes de classe I como os de classe II surgiram por uma série sucessiva de duplicações gênicas durante a evolução desse complexo gênico. A duplicação original na região de classe II muito provavelmente deu origem aos genes *A* e *B* primordiais. Duplicações gênicas mais recentes geraram as sub-regiões *DR*, *DQ* e *DP*, contendo múltiplos genes.

Um gene *A* típico contém 5 éxons responsáveis pela codificação de: (1) região 5' não traduzida e sequência líder; (2) domínio α_1; (3) domínio α_2; (4) peptídeo de conexão, região transmembrana, cauda citoplasmática e parte da região 3' não traduzida; e (5) o restante da região 3' não traduzida, incluindo o sinal de adição da cauda poli(A). Um gene típico da cadeia β é semelhante ao gene da cadeia α, mas possui um éxon extra para a cauda citoplasmática.

Sub-região DR

A sub-região *DR* codifica uma ou duas moléculas DR, dependendo do haplótipo (Bodmer, 1997, 1999). A sub-região contém um único gene *DRA* expresso, que é semelhante em diferentes haplótipos, diferindo apenas em uma substituição conservativa de um único aminoácido encontrada no domínio citoplasmático.

O gene *DRB* mais centromérico, *DRB1* (Fig. 47.5), codifica uma cadeia β altamente polimórfica que, quando associada com a cadeia α, exibe especificidades sorológicas DR1-DR18. Essa molécula corresponde à molécula predominante de classe II na superfície celular, respondendo por bem mais da metade das moléculas totais de classe II da superfície celular. Existem múltiplos ácidos nucleicos e, consequentemente, diferenças nas sequências de aminoácidos entre os alelos *DRB1*.

O segundo gene *DRB* expresso, presente apenas em alguns haplótipos de classe II, está localizado entre o *locus DRB1* e o *locus DRA* (Fig. 47.5). Em células que expressam os alelos *DR*, *DRB1*03*, **11*, **12*, **13*, **14*, o segundo gene *DRB* recebe o nome de *DRB3* (a nomenclatura da molécula HLA está descrita a seguir). O gene *DRB3* é polimórfico, embora no momento o número de alelos identificados seja aproximadamente 10 vezes menor que o número de alelos *DRB1*. O produto *DRB3* combinado com o produto *DRA* forma a molécula DR, portadora da especificidade sorológica DR52. Em células que expressam os alelos *DRB1*04*, **07* e **09*, o segundo gene *DRB* é denominado *DRB4*. O produto *DRB4* combinado com o produto *DRA* forma a molécula, portadora da especificidade sorológica *DR53*. Por fim, em células que expressam os alelos *DRB1*15* e **16*, o segundo gene *DRB* é designado *DRB5*. Esse produto *DRB5* combinado com o produto *DRA* carreia a especificidade sorológica *DR51*. Haplótipos que expressam os alelos *DRB1*01*, **08* ou **10* não costumam carrear um segundo *locus DRB* expresso. Há exceções para essas associações. Por exemplo, foi descrito um haplótipo portador do alelo *DRB1*15* sem *locus DRB5* (Wade, 1993).

Sub-região DQ

Um grupo de genes *A* e *B*, *DQA1* e *DQB1*, codificam o heterodímero DQ portador das especificidades sorológicas DQ1-9 (Tab. 47.2 e Fig. 47.5) (Bodmer, 1997, 1999). As moléculas DQ representam aproximadamente 15 a 20% de todas as moléculas de classe II expressas na superfície celular. Como ambos os *locus* (*DQA1* e *DQB1*) são polimórficos e como os produtos proteicos podem se associar em *trans* e *cis*, os heterozigotos podem potencialmente expressar quatro moléculas DQ diferentes em suas superfícies celulares (Fig. 47.6). Outros genes *A* e *B* tipo DQ na sub-região *DQ*, como *DQA2* e *DQB2*, são muito similares aos genes *DQA1* e *DQB1*; no entanto, não é expresso nenhum produto proteico funcional.

Sub-região DP

A sub-região *DP* contém dois grupos de genes *A* e *B* (Fig. 47.5). Um grupo, *DPA1* e *DPB1*, codifica o produto proteico DP; o outro grupo é composto de pseudogenes. Ambos os genes *DPA1* e *DPB1* são altamente polimórficos (Bodmer, 1997, 1999). O nível de expressão da sub-região DP na superfície celular é muito baixo.

Desequilíbrio de ligação dos genes na região de classe II

Combinações específicas de alelos *DRB1/DRB3*, *DRB1/DRB4*, *DRB1/DRB5* e *DQA1/DQB1* são comuns. As combinações *DQA1/DQB1* encontradas podem ser controladas, em parte, pela capacidade de pareamento das cadeias α e β (Kwok, 1993). Além disso, certos alelos *DR* e *DQ* são herdados juntos com maior frequência do que a esperada, resultando em desequilíbrio de ligação em uma população. A frequência dessas combinações difere notavelmente entre diferentes grupos populacionais étnicos. Por exemplo, os haplótipos *DRB1*1101*, *DQB1*0501* (DR11[5]), *DQ5[1]* e *DRB1*0901*, *DQB1*0303* (DR9, DQ9[3]) frequentemente são encontrados em populações de herança africana direta; por outro lado, essas combinações *DR-DQ* raras vezes são encontradas em populações de herança caucasoide. A permuta entre os *locus DP* e *DR/DQ* é comum. Assim, há um desequilíbrio de ligação mínimo entre os alelos *DR/DQ* e *DP*. Foram publicadas listas dos haplótipos *DRB1/DQA1/DQB1* comuns (Begovich, 1992; Imanishi, 1992).

Regulação da expressão dos genes de classe II

As moléculas de classe II, HLA-DR, -DQ e -DP, são constitutivamente expressas nas células apresentadoras de antígeno (APCs, *antigen-presenting cells*) do sistema imune, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. As sequências de DNA

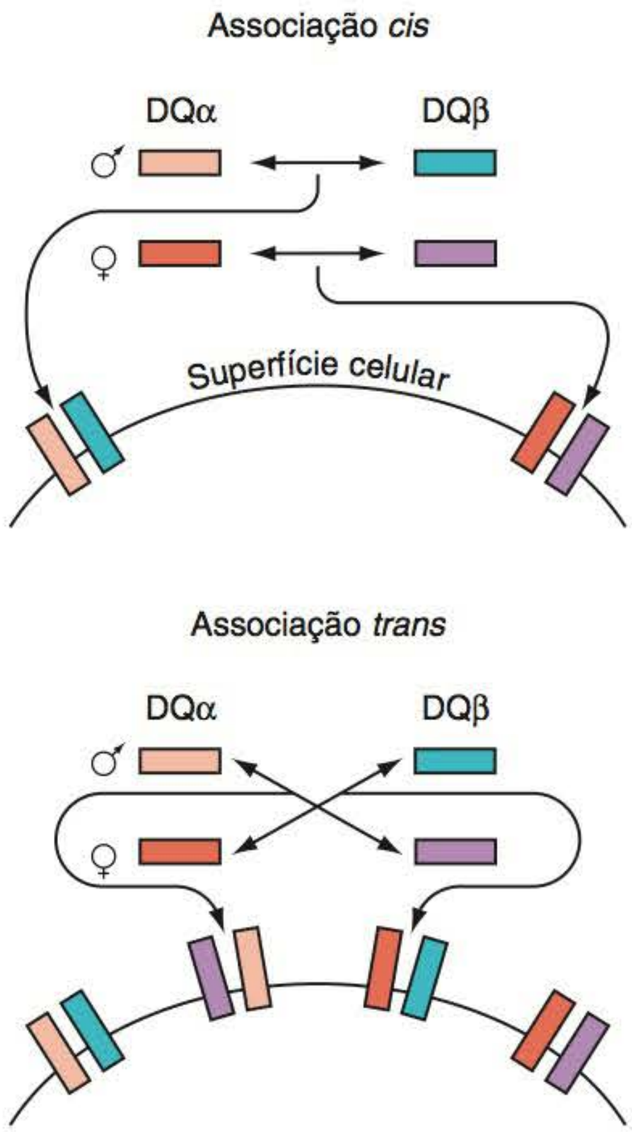


Figura 47.6 Modelo das associações *cis* e *trans* de cadeias DQα e DGβ.

encontradas a montante das sequências de codificação nos genes de classe II são críticas para expressão. A ligação de proteínas a essas regiões regula a expressão dos genes de classe II. Alterações na capacidade de proteínas de ligação ao DNA em interagir com as sequências 5' regulatórias do DNA eliminando a expressão dos genes de classe II induzem a uma imunodeficiência chamada "síndrome do linfócito nu" (Kovats, 1994; Mach, 1996). Os genes de classe II são induzíveis por interferon (IFN)-γ em muitos tipos celulares (Glimcher, 1992; Mach, 1996) e a expressão pode ser afetada por outras citocinas (Guardiola, 1993). A expressão das moléculas de classe II em APCs pode ser modulada, particularmente em células dendríticas, após depósito de antígeno e inflamação. O nível de expressão do complexo peptídeo antigênico-MHC de classe II, bem como a presença de sinal coestimulador sobre a APC madura, pode desempenhar um papel importante no transplante e nas doenças autoimunes (Nepom, 1991; Banchereau, 1998) (ver Cap. 48).

Função das moléculas de classe II

As moléculas de classe II atuam como receptores antigênicos na resposta imune (Fig. 47.2), ligando-se a fragmentos peptídicos antigênicos processados a partir de antígenos exógenos, como bactérias. Os antígenos exógenos penetram na célula através da via endocítica e são degradados em fragmentos peptídicos em endossomas tardios, onde se deparam com e se ligam a moléculas de classe II recém-agrupadas (Watts, 1997). A ligação de fragmentos peptídicos proteicos processados à molécula de classe II é facilitada por duas proteínas codificadas dentro da região de classe II do MHC, DM e DO (Fig. 47.5). A ligação peptídica é afetada por resíduos polimórficos localizados no sulco da molécula de classe II. O complexo de fragmento antigênico ligado à molécula de classe II é, então, transportado até a superfície celular para expressão e reconhecimento pelas células T circulantes.

Os receptores de antígenos dos linfócitos T $CD4^+$ interagem com o complexo formado por fragmento antigênico-MHC de classe II, deflagrando a ativação da célula (Jorgensen, 1992). No sistema experimental utilizado para dissecar esse mecanismo, os linfócitos T efetores foram estimulados *in vitro* com APCs autólogas previamente incubadas com o antígeno. Tal como foi observado para as moléculas de classe I, o reconhecimento do fragmento antigênico pela célula T efetora é influenciado pelo polimorfismo alélico do MHC. A célula T efetora é específica para o peptídeo antigênico *priming* em conjunto com o

produto alélico específico de classe II que originalmente apresentou o antígeno (restrição pelo MHC) (Rosenthal, 1973).

Cada célula T ativada pelo reconhecimento do complexo formado pelo fragmento antigênico ligado à molécula de classe II pode realizar uma ou várias funções (Paul, 1994). A célula T $CD4^+$ pode ajudar na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos ou de outros linfócitos T em células citotóxicas ou células com função supressora. Além disso, a própria célula T em si pode atuar como célula citotóxica, destruindo diretamente as células com o alvo adequado (i. e., células que expressam as moléculas de MHC de classe II complexadas com o antígeno específico) ou como célula com função supressora, provocando atenuação da resposta imune. As células T também produzem uma série de moléculas biologicamente importantes (como IFN-γ) que intensificam a resposta imune e aumentam a expressão das moléculas de MHC nas células-alvo. Ademais, as células T produzem fatores de crescimento, como interleucina (IL)-2. Esses fatores de crescimento afetam uma ampla variedade de células, desde células progenitoras hematopoéticas até linfócitos maduros.

Outros genes de classe II

Foram descritos, pelo menos, quatro outros genes de classe II, *DOA*, *DOB*, *DMA* e *DMB*, responsáveis pela expressão de produtos proteicos (Fig. 47.5). As proteínas codificadas pelos genes *DMA* e *DMB* formam o heterodímero DM, enquanto aquelas codificadas pelos genes *DOA* e *DOB* formam o heterodímero DO. Esses produtos gênicos não são detectados na superfície celular, mas sim são expressos dentro da célula, localizados em compartimentos intracelulares especializados, onde moléculas de classe II (DR, DQ, DP) recém-sintetizadas se ligam a seus peptídeos antigênicos. A molécula DM regula a ligação peptídica às moléculas HLA-DR, -DQ, -DP, atuando como chaperone e editor (Morris, 1994). Tal molécula DM favorece a apresentação de peptídeos estavelmente ligados. Já a molécula DO regula negativamente a função da DM (van Ham, 1997).

Características de fragmentos antigênicos ligados por moléculas de classe I e de classe II do MHC

A função das moléculas de classe I e de classe II como receptores de ligação a antígeno é semelhante; no entanto, os peptídeos ligados a elas possuem características diferentes (Cresswell, 1994; Engelhard, 1994). Os peptídeos derivados de proteínas sintetizadas *de novo* na célula (antígenos endógenos, como antígenos virais) associam-se com moléculas de classe I no retículo endoplasmático. Em contraste, os peptídeos derivados de antígenos solúveis e particulados capturados pela célula na via endocítica (antígenos exógenos) ligam-se a moléculas de classe II em um compartimento endossomal. Tanto as moléculas de classe I quanto as de classe II podem alternativamente se ligar a autopeptídeos (peptídeos próprios) encontrados nesses compartimentos. Os autopeptídeos originam-se da degradação normal de proteínas celulares. Alguns desses autopeptídeos são, por si só, fragmentos de moléculas de histocompatibilidade. Em geral, os autopeptídeos ligados a moléculas de MHC não deflagram os linfócitos T, pois são moléculas as quais o sistema imune do indivíduo se mostra tolerante. Esses autopeptídeos, no entanto, podem deflagrar respostas imunes que desencadeiam um processo autodestrutivo com consequente indução de autoimunidade (Nepom, 1991) (ver Caps. 50-52).

A ligação peptídica a moléculas de MHC ocorre apenas quando o fragmento de peptídeo tem comprimento adequado e contém uma sequência ou motivo específico de aminoácidos, que faz com que ele se ligue a uma ou mais moléculas de MHC expressas naquele indivíduo. Um exemplo de motivo para a ligação de peptídeo à molécula HLA codificada por *A*0201* é a presença de leucina (ou metionina ou isoleucina) no resíduo 2 do peptídeo, aminoácido hidrofílico no resíduo 3, e valina (ou leucina ou isoleucina ou alanina) no resíduo 9. Os aminoácidos que compõem o motivo são denominados resíduos "âncora" do peptídeo. Diferentes moléculas HLA, quer moléculas codificadas por diferentes alelos no mesmo *locus* (*HLA-A*0203*, **0211* ou **0301*) ou moléculas codificadas por diferentes *locus* (*B*4001* ou *DRB1*0406*) ligam-se a peptídeos com diferentes motivos. Os aminoácidos que formam o motivo peptídico se ligam à molécula de MHC em bolsas encontradas dentro do sulco de ligação ao antígeno (Stern, 1994). Os aminoácidos polimórficos das moléculas de MHC revestem esse sulco e, com isso, criam diferenças nas especificidades de ligação ao peptídeo para as diferentes moléculas de MHC.

Os peptídeos ligados às moléculas de classe I possuem 9-10 aminoácidos de comprimento. As regiões carboxiterminal e aminoterminal do peptídeo ficam embutidas no sulco de ligação às moléculas de classe I, formando um complexo peptídeo-MHC "fechado". Os peptídeos ligados às moléculas de classe II variam em termos de comprimento, desde 12 a 30 aminoácidos. Ao mesmo tempo em que se mantém a necessidade de resíduos de motivo específico agrupados na porção central do peptídeo, as porções carboxiterminal e aminoterminal do peptídeo estendem-se para fora do sulco de ligação às moléculas de classe II, formando um complexo peptídeo-MHC "aberto" (Stern, 1994).

Reconhecimento das moléculas de MHC estranhas

O alorreconhecimento envolve o reconhecimento, pelo linfócito T, de molécula de MHC estranha em célula de outro indivíduo (alogênico). Ao reconhecimento, a interação deflagra uma série de eventos, resultando na ativação da célula T e no início de resposta imune não muito diferente do reconhecimento de patógenos. Com base em dados de modelos de transplante de órgão vascularizado, foram sugeridas duas vias de alorreconhecimento (Sayegh, 1996). A via *direta* de alorreconhecimento implica a estimulação de células T do receptor pelo complexo MHC-peptídeo do doador (i. e., reconhecimento direto de moléculas de MHC estranhas intactas). A segunda via de alorreconhecimento, a via *indireta*, envolve a estimulação de células T do receptor pelas moléculas de MHC próprias que apresentam fragmentos peptídicos derivados das células do doador. A apresentação indireta ocorre quando as células de processamento antigênico do receptor ingerem material celular proveniente do tecido enxertado, degradam o material no meio intracelular e expõem o(s) peptídeo(s) alogênico(s) complexado(s) com moléculas de MHC próprias. Os peptídeos derivados de regiões polimórficas das moléculas de MHC do doador constituem os maiores candidatos à estimulação da resposta imune indireta (Suciu-Foca, 1998; Gould, 1999; Harris, 1999).

Repetições em tandem e polimorfismos de nucleotídeo único no MHC

Mais de 300 repetições curtas em tandem (STRs, *short tandem repeats*) foram identificadas dentro da região do MHC humano (Foissac, 1997). Também há múltiplos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*). Um estudo conduzido por Abbal (1997) avaliou 6 *locus* de STR dentro do MHC em uma população de indivíduos não aparentados e descobriu um forte desequilíbrio de ligação entre os haplótipos HLA-específicos e os marcadores de STR. Como esses marcadores abrangem uma região maior do MHC do que os marcadores clássicos de HLA utilizados atualmente, eles podem proporcionar uma abordagem mais abrangente para identificar indivíduos MHC-idênticos. Esses marcadores podem, por exemplo, ser utilizados para identificar um haplótipo recombinante de MHC dentro de uma família (Carrington, 1996) e aumentar a probabilidade de quaisquer genes de histocompatibilidade não identificados no MHC serem compatíveis. Foram desenvolvidos métodos moleculares precisos e reproduzíveis para identificar tanto as STRs como os SNPs (Carrington, 1998).

Moléculas de histocompatibilidade menor

Os antígenos de histocompatibilidade menor (mHags, *minor histocompatibility antigens*) são peptídeos imunogênicos que se ligam a moléculas de MHC e podem ser reconhecidos por células T até gerar DEVH indesejável; no caso de receptores leucêmicos, no entanto, tais antígenos podem produzir a condição benéfica conhecida como enxerto *versus* leucemia. Não é fácil atingir o equilíbrio adequado de DEVH aceitável e efeito suficiente de enxerto *versus* leucemia. Em

enxertos MHC-idênticos de células progenitoras, a DEVH pode ser induzida por diferenças de mHag entre o receptor e o doador (Mutis, 1999). Os mHags podem ser qualquer produto gênico polimórfico codificado fora do MHC, que difere entre doador e receptor e ainda estimula uma resposta de células T (Goulmy, 1997; Simpson, 1998). Semelhantemente a outros antígenos proteicos, a proteína polimórfica deve ser obrigatoriamente processada em fragmentos antigênicos e o(s) fragmento(s) peptídico(s) polimórfico(s) deve(m) se ligar dentro do sulco das moléculas de MHC. Em virtude da necessidade de apresentação do antígeno pelas moléculas de MHC, qualquer peptídeo polimórfico deve carrear um motivo adequado para a ligação específica do MHC. Dessa forma, nem todos os indivíduos conseguem apresentar e responder a todos os mHags, mesmo se houver uma diferença entre doador e receptor. A maior parte dos mHags é apresentada às células T $CD8^+$ pelas moléculas de MHC de classe I. As respostas das células T são desencadeadas quando o receptor dessas células reconhece os complexos formados pelos peptídeos polimórficos dos mHags ligados às moléculas de MHC expressas nas APCs.

Os mHags foram originalmente definidos por rejeição de enxerto de pele e por ensaios citotóxicos com clones de células T. Esses peptídeos polimórficos possuem ligação restrita às moléculas de MHC de classe I; por essa razão, a definição bioquímica dos componentes de peptídeo antigênico de histocompatibilidade menor foi concluída por eluição, purificação e sequenciamento do peptídeo mHag ligado a uma molécula de MHC específica (den Haan, 1995). Estudos recentes revelaram o possível significado de mHags em transplante clínico (Goulmy, 1997, 1996; Martin, 1997; Dupont, 1998). Foram demonstrados linfócitos T citotóxicos mHag-específicos em pacientes com DEVH (Mutis, 1999). A disparidade no mHag 1 (HA-1) do receptor foi associada com aumento do risco de DEVH aguda após transplante de medula, utilizando doadores irmãos genotipicamente HLA-idênticos, embora esse nem sempre seja o caso. Recentemente, foi demonstrado que a disparidade do HA-1 está associada com efeito contínuo de enxerto *versus* leucemia e supressão de células leucêmicas progenitoras em alguns pacientes (Kircher, 2004; Kloosterboer, 2004). A importância da compatibilidade em relação a outros mHags (HA-2, HA-3, HA-4, HA-5, H-Y) é menos clara. Foram desenvolvidas técnicas à base de DNA para detectar diferenças em mHags (Tseng, 1998; Wilke, 1998); tais técnicas estão sendo utilizadas em estudos para mensurar o impacto dessas disparidades sobre os resultados do transplante.

Nomenclatura do HLA

Especificidades sorológicas e celulares

A terminologia do HLA é designada pelo Comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) para Nomenclatura do Sistema HLA (Tab. 47.2) (Bodmer 1999, 1997). Em termos históricos, atribuíram-se especificidades, definidas por métodos sorológicos e celulares, às moléculas proteicas de HLA, com base nos resultados de seminários internacionais durante os quais reagentes de tipagem foram trocados entre os laboratórios participantes (site do 13th International Histocompatibility Workshop, Tab. 47.1). O 14th HLA and Immunogenetics Workshop foi convocado em novembro de 2005 em Melbourne, Austrália. As atribuições incluem o nome da molécula de HLA e uma designação numérica com base na ordem em que se determinou a especificidade definida por método sorológico. Por exemplo, HLA-A1 (ou apenas A1) foi a primeira especificidade atribuída à molécula HLA-A, enquanto HLA-A80, a mais recente. Com o passar do tempo, especificidades mais antigas definidas por sorologia foram "divididas" à medida que a definição se tornou mais diferenciada. A definição mais estreita da especificidade recebe o nome de especificidade subtípica ou privada. As especificidades compartilhadas mais amplas são chamadas especificidades supertípicas. Por exemplo, B44 e B45 são especificidades subtípicas da especificidade supertípica B12. Assim, uma célula $B44^+$ ou $B45^+$ também será positiva para B12.

Em testes sorológicos, alguns aloantissoros ligam-se a mais de um produto alélico do sistema HLA, um fenômeno conhecido como *reatividade cruzada*. Essa reatividade cruzada sorológica entre produtos alélicos dos *locus HLA-A* e *HLA-B* foi amplamente estudada e utilizada para agrupar moléculas dentro de grupos de antígenos com reatividade cruzada (CREGs, *cross-reactive antigen groups*) (Rodey, 1987). As moléculas de classe I dentro de um CREG compartilham um ou mais determinantes que não são compartilhados por moléculas em outro CREG. Um determinante antigênico (epítopo) compartilhado entre os membros de um CREG recebe o nome de *especificidade pública*. Parte da reatividade do CREG pode ser explicada pelo compartilhamento das sequências de aminoácidos entre as moléculas HLA em um CREG (Terasaki, 1992). A inclusão das especificidades do HLA dentro de um CREG não é padrão, pois diferentes grupos de anticorpos produzem padrões reacionais exclusivos; além disso, dois pesquisadores distintos com kits diferentes de reagentes podem identificar grupos de CREG levemente diferentes. Contudo, os vários agrupamentos de CREG se sobrepõem consideravelmente (Ellison, 1994).

As especificidades HLA-Bw4 e Bw6 são amplos epítopos públicos que residem na mesma molécula que as especificidades subtípicas do *locus HLA-B*, mas em um local diferente. Sendo assim, Bw4 e Bw6 constituem um sistema dialélico, mas todas as moléculas do *locus B* (e algumas do *locus A*) carreiam especificidades Bw4 ou Bw6. A região da molécula HLA portadora das especificidades Bw4/Bw6 foi identificada na hélice α_1 entre os resíduos 77 e 83 de aminoácidos (Parham, 1991).

Conforme foi descrito para as moléculas de classe I, atribuíram-se especificidades sorológicas designadas pela OMS às moléculas de classe II, a saber: HLA-DR e -DQ (Bodmer, 1999, 1997) (Tab. 47.2). Originalmente, foram definidos seis tipos de HLA-DP por técnicas celulares. As moléculas HLA-DP de classe II não são definidas de forma adequada por métodos sorológicos.

Existem 26 especificidades de HLA-D que foram identificadas por MLC. Todas as especificidades de HLA-D conservam a designação "w", já que essas especificidades são definidas em termos funcionais pela mensuração do estímulo de célula responsiva. A estimulação é gerada por diferenças nas moléculas DR expressas em uma célula estimuladora e, em menor grau, estimulação extra pelas moléculas DQ e DP.

Designações de alelos com base no DNA

A sequência de nucleotídeos foi utilizada para identificar os inúmeros alelos diferentes responsáveis pela codificação das moléculas HLA. Atualmente, uma única especificidade definida por método sorológico pode residir em dois ou mais de 25 produtos alélicos diferentes (Tab. 47.2). Cada alelo HLA é designado pelo nome do *locus* gênico, seguido por um asterisco e um número de quatro a sete dígitos, indicando o alelo. Por exemplo, *A*0201* é um alelo do gene *HLA-A*; *B*1510* é um alelo do gene *HLA-B*; *DPB1*0101* é um alelo do gene *HLA-DPB1*; e *DQA1*0601* é um alelo do gene *HLA-DQA1*.

Os dois primeiros números na designação numérica de cada alelo baseiam-se frequentemente no tipo sorológico da molécula resultante e/ou na similaridade da sequência de nucleotídeos com outros alelos no grupo. Por exemplo, a molécula HLA-A expressa pelo alelo *A*0201* possui a especificidade sorológica A2 que define o antígeno HLA-A2. Contudo, a molécula HLA-B expressa pelo alelo *B*1510* não possui a especificidade sorológica B15, mas sim B71, que define o antígeno B71. Tal alelo foi nomeado *B*1510* por causa de sua similaridade prevista na sequência de aminoácidos com antígenos B15. As células que expressam o alelo *DRB1*0103* foram sorologicamente tipadas como DR-0, DR1 ou até DR13. A sequência de nucleotídeos identificou um alelo com estrutura de DNA semelhante aos alelos dotados da especificidade sorológica DR1 (p. ex., *DRB1*0101* e **0102*), e o nome desse alelo foi estabelecido com base nessa similaridade estrutural. Quando uma especificidade sorológica exclusiva foi identificada mais tarde, o antígeno DR determinado pelo alelo *DRB1*0103* recebeu a designação sorológica DR103. O terceiro e o quarto número na designação alélica referem-se à ordem em que o alelo foi descrito. Por exemplo, *A*0201* foi o primeiro alelo A2 a ser sequenciado e *A*0203*, o terceiro.

Alguns alelos podem diferir na sequência de suas regiões codificadoras do DNA, mas a sequência prevista de seus aminoácidos não difere (o que, muitas vezes, recebe o nome de substituição silenciosa ou sinônima). Essas combinações de alelos são identificadas por uma designação de 5 dígitos. Os quatro primeiros números são compartilhados (i. e., números em comum), enquanto o quinto dígito é utilizado para distinguir as sequências exclusivas de ácidos nucleicos dos alelos (p. ex., *B*27051* e *B*27052*). Além disso, dois ou mais alelos podem ter um

nome de 7 dígitos em que os quatro primeiros dígitos são compartilhados (p. ex., *DRB4*0103101* e *DRB4*0103102*). Os dígitos 5 a 7 indicam que os dois alelos diferem apenas na parte de fora da região codificadora da proteína. No exemplo listado aqui, a diferença afeta o sítio de junção do RNA de *DRB4*0103102*, resultando em perda de expressão do alelo (Sutton, 1989). Por fim, os alelos que não são expressos como proteínas na superfície celular podem ter um *N* adicionado a seus nomes (p. ex., *A*0215N*, *DRB4*0103102N*), indicando "nulo". Como cada alelo possui uma designação numérica exclusiva, a designação *N* nem sempre vem escrita (i. e., *A*0215* e *A*0215N* representam o mesmo alelo).

Novos alelos são descritos em relatórios regulares do Comitê da OMS para Nomenclatura do Sistema HLA (Tab. 47.1, www.anthonynolan.com/HIG/nomenc.html; Bodmer, 1999), e as sequências de nucleotídeos de todos os alelos ficam armazenadas em um banco de dados computadorizado (GenBank, EMBL, IMGT/HLA databases). Atualmente, existem, por exemplo, mais de 349 alelos *HLA-A* nomeados. Novos alelos estão sendo continuamente identificados e podem ser acessados pelo *site*.

Técnicas para identificação de polimorfismo do HLA

O teste de histocompatibilidade ou a tipagem de HLA ou de tecidos é realizado em um número limitado de laboratórios por conta do uso de procedimentos e reagentes especializados. Podem ser obtidos kits disponíveis no mercado para teste de DNA e teste sorológico; entretanto, a interpretação dos resultados dos testes exige experiência e conhecimento consideráveis. Os laboratórios de histocompatibilidade costumam ser encontrados em centros médicos que possuem programas de transplante de órgãos e/ou de células progenitoras hematopoéticas. As técnicas do teste de HLA são abordadas em termos gerais nesta seção. Para obtenção de detalhes dos procedimentos, é recomendável que o leitor consulte a 4ª edição (2001) do Manual de Laboratório elaborado pela American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) (ver Tab. 47.1 em busca do *site* da ASHI). Os laboratórios de teste de HLA são credenciados pela ASHI, pela European Foundation for Immunogenetics e por outras organizações.

Tipagem de alelos de classe I e de classe II com base no DNA

Embora a tipagem sorológica e celular de antígenos HLA seja extremamente útil, há uma série de desvantagens dessas técnicas. Com o advento de métodos rápidos e confiáveis para o isolamento e a caracterização dos genes de classe I e II, bem como para a determinação das sequências de nucleotídeos dos alelos de classe I e II, tornou-se possível o uso de métodos à base de DNA para tipagem da molécula HLA. Hoje em dia, a tipagem à base de DNA de alelos HLA é uma técnica comumente utilizada em laboratórios de tipagem do HLA (Hurley, 1997a; Middleton, 1999).

Em contraste com outras modalidades de teste, a tipagem à base de DNA possui 5 vantagens significativas.

1. É *específica*. A especificidade de cada reagente de tipagem de DNA (i. e., iniciadores e sondas de oligonucleotídeos sintéticos) é claramente definida, sendo baseada em uma sequência específica e conhecida de nucleotídeos. Como os oligonucleotídeos utilizados como reagentes de tipagem de DNA são sintéticos, os reagentes não são limitados e não deve haver variação entre os lotes em termos de especificidade.
2. É *flexível*. Novos reagentes podem ser desenvolvidos à medida que novos alelos são descobertos e sequências exclusivas de nucleotídeos, identificadas. O teste pode ser realizado em vários níveis de resolução, dependendo dos requisitos de tipagem e do tempo disponível para o teste.
3. É mais *sólida* do que outras técnicas. A tipagem de DNA não requer linfócitos viáveis e não é influenciada pela saúde do paciente. Além disso, o teste à base de DNA é altamente reprodutível quando metodologias padrão, como teste de sonda de sequência específica de nucleotídeos (SSOP, *sequence specific oligonucleotide probe*), são utilizadas em conjunto com algum protocolo de teste padrão (Ng, 1996; Hurley, 2000a).
4. Pode ser utilizada para tipagem em *grande escala*. A preparação de lotes de amostras facilitada por metodologias automatizadas e computadorizadas diminui os custos e erros. Os métodos à base de DNA são particularmente aplicáveis à tipagem de HLA em grande número de voluntários para registros de doadores.
5. É capaz de *diferenciar* a diversidade das moléculas HLA pela detecção de toda extensão dessa diversidade. Os alelos das moléculas HLA podem especificar proteínas dessas moléculas, que são indistinguíveis por tipagem sorológica. Por exemplo, um indivíduo portador do alelo *DRB1*0401* teria o mesmo tipo sorológico (DR4) que outro indivíduo portador do alelo *DRB1*0412* (DR4). Assim, os alelos *DRB1*0401* e *DRB1*0412* são divisões da ampla especificidade DR4. Essas divisões são identificadas por tipagem de DNA. Não há reagentes sorológicos disponíveis específicos o suficiente para definir essa divisão. Atualmente, foram definidas mais de 30 subdivisões do DR4. Há muitos outros exemplos de divisões definidas por tipagem de DNA, que não podem ser identificadas por tipagem sorológica; alguns estão listados na Tabela 47.2.

Os problemas com tipagem sorológica são particularmente agudos ao se tipar alguns grupos populacionais. Por exemplo, populações de origem africana direta podem expressar antígenos de classe I e de classe II que, dificilmente, são identificados pelos reagentes sorológicos disponíveis atualmente (Bozon, 1997; Yu, 1997; Mytilineos, 1998). A tipagem de HLA à base de DNA aumentou sobremaneira a capacidade de definição dos tipos de HLA nessas populações.

Preparo e amplificação do DNA

Qualquer célula nucleada pode ser utilizada como fonte de DNA. Embora as hemácias não contenham núcleos, outras células sanguíneas, como linfócitos, constituem uma boa fonte de DNA. Linhagens celulares, como linfócitos B transformados pelo vírus de Epstein-Barr, também representam uma fonte satisfatória de DNA. Como células transformadas podem ser cultivadas em laboratório, elas fornecem um suprimento renovável de DNA, sendo utilizadas pela provisão de DNA de referência para controle de qualidade de procedimentos de tipagem.

O DNA costuma ser preparado a partir de uma pequena quantidade (0,2 a 1 mL) de sangue total. Muitos protocolos diferentes podem ser utilizados para isolar o DNA de células. Também existem kits comerciais disponíveis para o preparo do DNA. A sensibilidade de detecção dos tipos de HLA é bastante intensificada pela amplificação do DNA responsável pela codificação dos genes *HLA*, utilizando a técnica de PCR (Saiki, 1988). Um par de oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores) deve ser complementar às sequências que ladeiam um gene *HLA*-específico, sendo utilizados para gerar milhões de cópias desse gene para uso na reação de tipagem do HLA. Algumas reações de tipagem utilizam sequências de iniciadores compartilhadas por todos os alelos em um *locus HLA*; outros procedimentos de tipagem usam conjuntos de iniciadores compartilhados por apenas um subgrupo de alelos em um *locus*. O anelamento dos iniciadores ao DNA de amostra durante a reação de PCR usa condições reacionais que garantem a ligação dos iniciadores a sequências perfeitamente compatíveis (sequências-alvo) e não a sequências de outros *locus* ou outros alelos incompatíveis. Pelo ajuste da temperatura do componente de anelamento da reação de PCR, o laboratório de tipagem consegue controlar a especificidade da amplificação.

Priming *sequência-específico*

Um método de identificação de alelos HLA utiliza iniciadores sequência-específicos (SSPs, *sequence-specific* iniciadores) na reação de PCR (Olerup, 1992; Bunce, 1995). Esses iniciadores anelam-se ao DNA desnaturado, contendo os alelos *HLA*, de onde se derivaram as sequências dos iniciadores. Na reação subsequente de PCR, apenas esses alelos selecionados são amplificados. O DNA amplificado pelos iniciadores é identificado por eletroforese em gel ou, se o DNA for marcado com algum corante durante a amplificação, por fluorescência. Esse procedimento é útil na tipagem de pequeno número de amostras dentro de um curto período de tempo. Existem kits comerciais disponíveis.

Hibridização de sondas de oligonucleotídeos sequência-específicas

É possível utilizar a hibridização de sondas de oligonucleotídeos sequência-específicas (SSOPs, *sequence-specific oligonucleotide probes*) em

DNA amplificado para identificar os alelos (Gao, 1991; Williams, 1997; Cao, 1999). O uso de várias sondas de oligonucleotídeos diferentes para definir algum alelo *HLA*-específico ou o emprego de *priming* sequência-específica associada à hibridização com painéis de sondas costuma ser necessário. Um conjunto de oligonucleotídeos capazes de identificar cada alelo é hibridizado ao DNA desnaturado, amplificado por PCR e preso a suporte sólido. As condições de hibridização são ajustadas de modo que as sondas fiquem aneladas ao DNA desnaturado, contendo os alelos *HLA*, de onde se derivou a sequência de oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos são marcados com uma etiqueta para detecção da hibridização. Por exemplo, o oligonucleotídeo pode ser ligado a uma enzima, como fosfatase alcalina. Após a adição de algum substrato, a fosfatase alcalina promove a clivagem desse substrato, produzindo um composto colorido ou sinal luminoso (quimioluminescência). Após visualização, o padrão de hibridização pode ser lido para determinar os alelos presentes. A Figura 47.7 ilustra a abordagem, utilizando uma sonda de oligonucleotídeos ao alelo *DQB1*, *DQB1*0302*, para identificar os pacientes acometidos por diabete insulinodependente e portadores desse alelo (Todd, 1987). O método de SSOP é altamente preciso, específico e confiável (Ng, 1996; Hurley, 2000a), sendo frequentemente utilizado em casos de tipagem de muitas amostras em grandes lotes. Existem kits comerciais disponíveis que fazem uso desse método.

Em um procedimento análogo chamado o formato reverso, as sondas de oligonucleotídeos são ligadas a suporte sólido (Bugawan, 1994). O DNA das amostras a serem testadas é amplificado, utilizando iniciadores marcados com, por exemplo, biotina. O DNA amplificado, então, é hibridizado às sondas imobilizadas, que contêm sequências encontradas nos alelos presentes no DNA. Após visualização (utilizando um sistema de detecção ligado à avidina), o padrão de hibridização pode ser lido para determinar os alelos presentes. Esse procedimento é útil para tipagem de número tanto pequeno como grande de amostras. Também existem kits comerciais disponíveis que utilizam esse método.

Polimorfismo conformacional sequência-específico ou análise de heteroduplex

Embora pouco utilizado, outro método de identificação de alelos *HLA* analisa a mobilidade do DNA amplificado, quer desnaturado (polimorfismo conformacional sequência-específico [SSCP, *sequence-specific conformational polymorphism*]) ou como DNA duplex renaturado (análise heteroduplex), após eletroforese (Arguello, 1996). A mobilidade do DNA é comparada à mobilidade do DNA amplificado a partir de alelos *HLA* conhecidos para definir um alelo *HLA*. Esse procedimento é útil na tipagem de pequeno número de amostras e, particularmente, em comparações entre indivíduos, por exemplo, dentro de uma família.

Sequenciamento de ácido nucleico

Um método final de identificação de alelos *HLA* envolve a determinação direta das sequências de DNA dos alelos *HLA* portados por um indivíduo (tipagem baseada em sequência [SBT, *sequence-based typing*]). Os alelos são identificados após amplificação por PCR para separar os alelos com base nos SSPs ou como uma mistura de dois alelos. O sequenciamento é uma técnica trabalhosa e altamente complexa, mas será utilizado com frequência para determinar a compatibilidade da molécula HLA em um nível alélico entre pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoéticas e seus prospectivos doadores (Petersdorf, 1995a; Rozemuller, 1996; Scheltinga, 1997). Os esforços para desenvolver metodologias automatizadas de SBT têm gerado várias abordagens de alto desempenho potencialmente promissoras. Tais abordagens incluem não só o uso do método de desnaturação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) que, segundo relatos, proporciona uma resolução de tipagem superior àquela possivelmente alcançada por abordagens de sequenciamento à base de PCR (Etokebe, 2003), mas também a assim chamada técnica de pirossequenciamento. O pirossequenciamento é um método de sequenciamento de DNA em tempo real e não eletroforético, que utiliza a emissão de luz gerada pela catálise de luciferina por luciferase como um sinal de detecção à medida que os nucleotídeos são incorporados ao DNA-alvo. Um único sinal é criado para cada variante alélica, o que é distinguido por *software* de reconhecimento (Nordstrom, 2000). O pirosequenciamento por meio

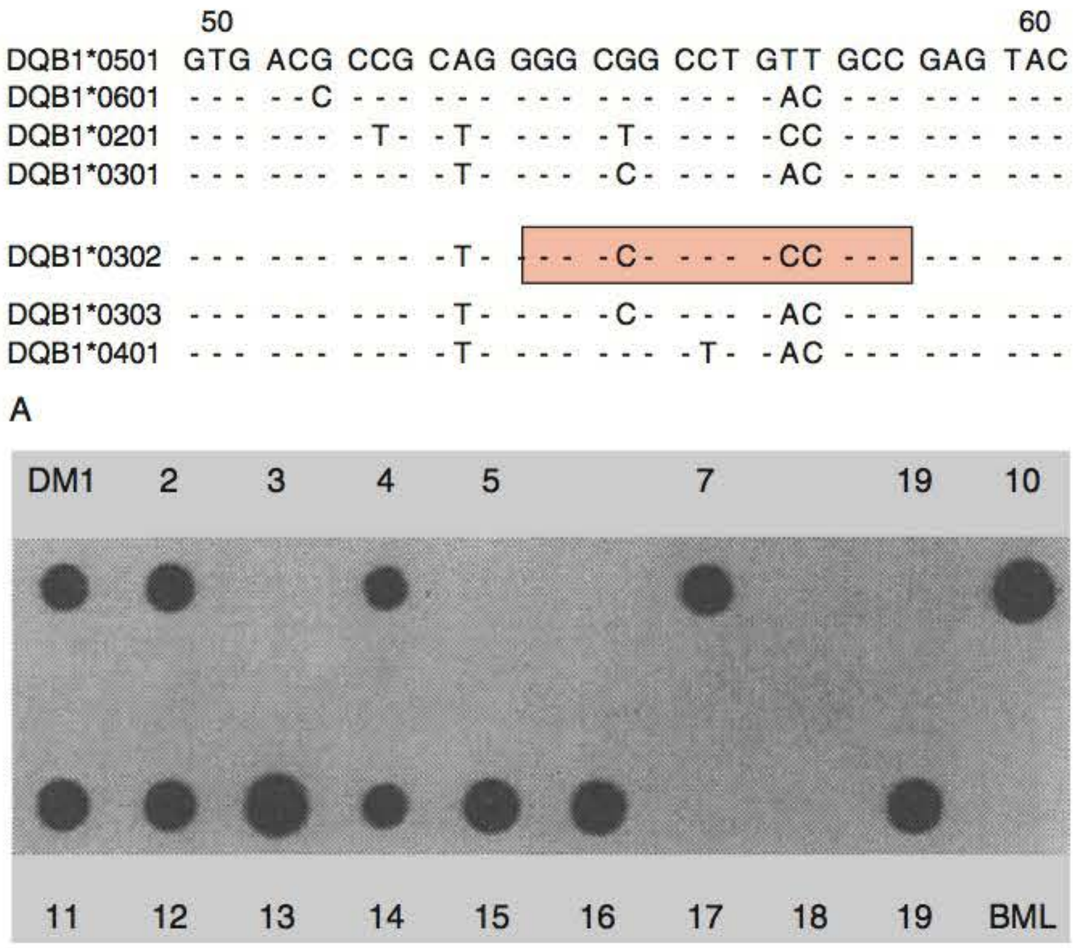


Figura 47.7 *A*, Sequências de nucleotídeos de vários alelos *DQB1*. As sequências apresentadas abrangem os códons para 50-60 aminoácidos. Os traços indicam que o nucleotídeo é idêntico à sequência de cima. O oligonucleotídeo específico para a sequência *DQB1*0302* aparece em destaque. *B*, Análise de oligonucleotídeos por hibridização *dot blot* em 17 pacientes com diabete melito insulinodependente (DM1-19) e um único controle, BML. O DNA amplificado contendo sequências *DQB1* de classe II dos pacientes foi ligado à membrana e hibridizado ao oligonucleotídeo marcado específico para a sequência *DQB1*0302* (descrita previamente). Os sinais de hibridização positiva indicam os pacientes portadores dessa sequência gênica *DBQ1* (pacientes DM1, 2, 4, 7, 10-16, 19). (Com permissão de Todd JA, Bell J, McDevitt HO: HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus, Nature 1987; 329:599.)

de sistemas de alto desempenho permite o processamento de centenas de amostras individuais diariamente. Além disso, a análise conformacional mediada por fita de referência (RSCA, *reference-strand-mediated conformation analysis*) é empregada em sistemas de alto desempenho para obter a diferenciação entre os alelos HLA, diferindo-os por até um único nucleotídeo. A tecnologia detecta diferenças entre os alelos, mensurando-se sua mobilidade dependente da conformação em géis de poliacrilamida após terem sido marcados com etiquetas fluorescentes *locus*-específicas (Arguello, 1998).

Resolução de tipagem com base no DNA

O nível de resolução (i. e., a capacidade de diferenciar os alelos) obtido por métodos de tipagem do DNA é controlado pela escolha e pelo número de iniciadores e/ou sondas utilizados no ensaio e no método de tipagem. Essa escolha pode depender do tempo disponível para a realização da tipagem, do custo da tipagem, da perícia do pessoal do laboratório e do propósito da tipagem. A tipagem para registro de doadores em grande escala costuma ser realizada sob resolução baixa a intermediária, enquanto a tipagem de possíveis doadores de células progenitoras hematopoéticas para determinado paciente será efetuada sob resolução em nível alélico.

Uma abordagem sistemática é frequentemente utilizada para identificar os alelos *HLA* por tipagem de DNA. Logo, os tipos de HLA definidos por essa tipagem à base de DNA podem ser descritos em diferentes níveis de resolução. A tipagem de DNA sob baixa resolução (ou em nível genérico ou sorológico) produz um resultado semelhante em termos de aparência e detalhes ao tipo sorológico. Por exemplo, um tipo de alelo definido por DNA, *DRB1*11* ou *DRB1*11XX*, é o equivalente aproximado do tipo sorológico DR11. O "XX" indica que o alelo ainda não foi definido. Nesse nível de resolução, não é possível determinar qual dos mais de 30 alelos *DRB1*11* é portado pelo indivíduo submetido ao teste. Embora a tipagem sorológica possa ser tão informativa quanto a tipagem sob baixa resolução, os resultados são mais confiáveis com teste à base de DNA. A tipagem de DNA em nível de resolução intermediário pode estreitar as opções, listando várias

possibilidades distintas para o tipo de indivíduo (p. ex., *DRB1*1101* ou *DRB1*1104*). Por fim, a tipagem de DNA em nível de resolução elevado (ou em nível alélico) identifica o alelo específico portado pelo indivíduo (p. ex., *DRB1*1104*). Como a identificação dos alelos *HLA* pode ser feita com base nas informações parciais de sequência, é possível que a interpretação dos resultados não detecte os alelos desconhecidos no momento da tipagem (Hurley, 1997b). Por essa razão, os laboratórios são advertidos a manter seus dados originais de tipagem (i. e., quais iniciadores e sondas foram positivos e negativos, bem como as sequências de nucleotídeos dos reagentes), para que os resultados possam ser reinterpretados conforme novos alelos são descritos.

Detecção sorológica de moléculas de classe I e de classe II

O teste de microcitotoxicidade dos linfócitos que, originalmente, foi utilizado no sistema de camundongos por Gorer e Amos e, mais tarde, modificado por Terasaki e McClelland para uso no sistema humano, vem sendo usado para tipagem de HLA desde 1960. O teste sorológico para HLA-A, -B pode ser reproduzido sob condições padronizadas e controladas; em teste de grande escala (p. ex., para registros), no entanto, as taxas de erro podem aumentar (Bozon, 1997; Yu, 1997). A reprodutibilidade para especificidades da molécula HLA-C e das moléculas de classe II determinadas por método sorológico é muito menor. A molécula HLA-DP não costuma ser definida por sorologia. O teste sorológico de microcitotoxicidade ainda é utilizado de forma relativamente ampla para especificidades de classe I (HLA-A, -B), mas foi substituído pelo teste de DNA para especificidades de HLA-C e de classe II (HLA-DR, -DQ, -DP) na maioria dos laboratórios de tipagem. O teste à base de DNA em sua maior resolução é usado para determinar o tipo de HLA de indivíduos não aparentados e de membros de família, especialmente se a segregação de HLA não puder ser diferenciada com precisão por meio da sorologia (p. ex., famílias em que os progenitores não se encontram disponíveis ou famílias em que os progenitores compartilham algum antígeno HLA). Por exemplo, uma progênie herda o DR4 de cada progenitor, pois o *antígeno* DR4 é homozigoto (DR4, DR4). Contudo, a tipagem de DNA em alta resolução pode identificar dois alelos distintos do antígeno DR4, *DRB1*0401* e *DRB1*0403* (*alelo DRB1*04* heterozigoto), fornecendo dados informativos para análise da segregação dos haplótipos.

Preparo dos linfócitos

Os linfócitos utilizados rotineiramente em ensaios de tipagem sorológica do HLA são obtidos com facilidade a partir do sangue total periférico, dispondo-o em camadas em um gradiente de Ficoll-Hypaque para separar as células sanguíneas por centrifugação de densidade. Os linfócitos do sangue periférico (PBLs, *peripheral blood lymphocytes*) separados podem ser usados para tipagem de HLA-A, -B, -C. Para testar as especificidades sorológicas de HLA-DR, -DQ, é necessário enriquecer os linfócitos B ou fazer uso de técnica fluorescente especial de duas cores para diferenciar simultaneamente entre as células B e as células T não separadas.

Ensaio de microcitotoxicidade dos linfócitos

O fenótipo HLA é determinado testando-se o preparado de linfócitos B (PBL) ou os linfócitos T (para HLA-A, -B, -C) não separados ou os linfócitos B enriquecidos (para HLA-DR, -DQ) diante de um painel de aloantissoros HLA bem-caracterizados. O ensaio consiste em um teste de duas fases. Durante a fase de sensibilização, os linfócitos são incubados com os antissoros. O soro de coelho submetido à triagem prévia e padronizado, como fonte de complemento, é adicionado em excesso e a mistura, incubada por um período adicional. Se os linfócitos forem portadores de molécula de superfície celular reconhecida por anticorpos de fixação do complemento no aloantissoro, os anticorpos ligam-se às células e, subsequentemente, as células são lisadas após a adição do complemento. O ensaio é concluído com a adição de diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo para procedimentos de detecção da fluorescência ou com eosina e formalina ou azul de tripano e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*) para métodos de visualização do corante. As reações são lidas quanto à porcentagem de lise e classificadas numericamente.

Bandejas de soros para tipagem de HLA

Os reagentes de tipagem de HLA derivam-se dos soros de indivíduos aloimunizados (mulheres multíparas, receptores de transplante, pacientes submetidos a múltiplas transfusões e imunização programada de seres humanos). Placas dotadas de múltiplos poços de aloantissoros humanos (i. e., bandejas para tipagem de HLA) estão disponíveis no mercado. Em virtude da complexidade antigênica dos antígenos HLA, é recomendável o uso de vários antissoros para definir cada especificidade. A maioria dos laboratórios utiliza bandejas de, no mínimo, dois fornecedores diferentes ou talvez faça uso de aloantissoros de origem local. Como muitos aloantissoros, na verdade, não são monoespecíficos e podem exibir certa reatividade cruzada, a reatividade de cada antissoro deve ser completamente testada e conhecida pelo indivíduo responsável pela interpretação dos resultados. Isso requer um controle de qualidade rigoroso de cada novo lote de bandejas de tipagem com células de referência bem caracterizadas. Como o título e a especificidade do anticorpo formado por algum indivíduo sensibilizado podem não permanecer constantes com o passar do tempo, os suprimentos de antissoros são limitados. Na tentativa de criar um suprimento consistente e ilimitado de reagentes, algumas empresas têm produzido anticorpos monoclonais. Esses reagentes monoclonais não estão disponíveis para todas as especificidades do antígeno HLA.

Reatividade cruzada

Os aloantissoros de HLA podem reagir com mais de um produto alélico dessa molécula. Esse fenômeno pode resultar da poliespecificidade dos antissoros e/ou de reatividade cruzada, sendo responsável pelos complexos padrões de reatividade de alguns aloantissoros. Os soros poliespecíficos contêm dois ou mais anticorpos anti-HLA-específicos, que podem ser adsorvidos até remover um único anticorpo com pouco efeito sobre a reatividade do(s) outro(s). Os antissoros reativos cruzados contêm, muito frequentemente, um único anticorpo que reage com algum determinante antigênico compartilhado entre vários produtos alélicos diferentes de HLA (i. e., CREG ou amplos determinantes, conforme discussão prévia) (Rodey, 1994). As reações cruzadas ocorrem com maior frequência entre produtos alélicos codificados pelo mesmo *locus*, mas também podem ocorrer entre aqueles codificados por diferentes *locus* (p. ex., A2 + B17).

Detecção celular de moléculas de classe II

A resposta de uma única célula na cultura tecidual aos aloantígenos na superfície de uma segunda célula recebe o nome de cultura mista de leucócitos ou reação mista de linfócitos (Hartzman, 1971). A MLC é considerada como uma medida *in vitro* de disparidade da classe II entre indivíduos que reconhecem os determinantes encontrados nas moléculas de classe II, conhecidos coletivamente como HLA-D. A resposta das células T torna-se unidirecional, evitando a replicação das células de um dos dois indivíduos por meio do tratamento dessas células com radiação ou mitomicina-C antes da adição à cultura. A MLC representa uma resposta aditiva de uma célula responsiva às diferenças nos múltiplos determinantes das moléculas HLA de classe II (DR, DQ e DP) codificadas pelos haplótipos da célula estimuladora irradiada. A resposta às moléculas DR parece predominar.

O uso da MLC em laboratórios clínicos para determinar a histocompatibilidade declinou por causa das limitações inerentes à técnica. A MLC pode ser influenciada pela saúde do paciente, pelo tipo de doença e pelo histórico de transfusão prévia (Mickelson, 1996). Por essas razões, a análise da MLC foi substituída pelos métodos mais precisos de tipagem à base de DNA. Atualmente, em alguns centros de transplante, a MLC é usada para identificar receptores de aloenxerto renal com hiporreatividade específica às moléculas HLA do doador após transplante como uma diretriz para redução gradativa da imunossupressão (Reinsmoen, 1993).

A análise de diluição limitante para definir a frequência de precursores de linfócitos citotóxicos (CTLp, *cytotoxic T lymphocytes precursors*) ou linfócitos T auxiliares (HTLp, *helper T lymphocytes precursors*) do doador é utilizada para predizer o grau de alorreconhecimento no transplante de células progenitoras hematopoéticas (Madrigal, 1997). As correlações dessas frequências com subsequentes eventos, como a extensão da DEVH, ainda são controversas.

Transplante de tecido/órgão

A sobrevida de órgão maciço e de enxertos de células progenitoras hematopoéticas a longo prazo representa um dos maiores desafios na medicina. O transplante de rim constitui a terapia de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal em estágio terminal. Os transplantes de células progenitoras hematopoéticas, coração, pulmão, fígado e pâncreas estão ganhando ampla aceitação como procedimentos terapêuticos com resultados bem-sucedidos. O principal obstáculo ao transplante de órgão maciço e de células progenitoras hematopoéticas está na rejeição imunologicamente mediada ao tecido estranho. Portanto, o êxito da aplicação de aloenxerto depende da possibilidade de frear a reação imune, o que pode ser alcançado por: (1) histocompatibilidade entre o doador e o receptor; (2) terapia imunossupressora do receptor (ver Tab. 47.3 em busca de uma lista de imunossupressores comuns e abordagens laboratoriais utilizadas para monitorizá-los) (Suthanthiran, 1996); e, (3) finalmente, obtenção de irresponsividade específica ao(s) aloantígeno(s) do doador (i. e., tolerância) (Remuzzi, 1995).

Base genética do transplante

A base genética do transplante foi determinada pela primeira vez em 1916 como resultado de experimentos de transplante de tumores em camundongos e, subsequentemente, foi estendida para transplantes de tecido normal (Snell, 1981). Foi demonstrado que enxertos de pele de cepas consanguíneas homozigotas em *locus* de histocompatibilidade (i. e., enxertos singênicos) eram bem-sucedidos, mas enxertos entre duas cepas consanguíneas diferentes (aloenxertos) eram rejeitados. Além disso, aloenxertos transplantados de cepa consanguínea do pai ou da mãe (duas cópias dos mesmos genes *MHC*; homozigotos) para híbridos (F1) da primeira geração (uma única cópia de cada um dos dois conjuntos diferentes de genes *MHC* oriundos de dois pais homozigotos) sobreviviam em todos os animais; por outro lado, enxertos transplantados de progênie híbrida F1 para o pai ou a mãe (incompatibilidade de um dos dois haplótipos) não sobreviviam. Essas observações estabeleceram as leis do transplante. Em 1948, os fatores ou genes que determinam o destino de aloenxertos receberam o nome de histocompatibilidade ou genes H. No mesmo ano, o *locus* de histocompatibilidade principal no camundongo, *H-2*, foi definido por Gorer (Snell, 1981). Existem outros antígenos de histocompatibilidade ou H, que são denominados mHags. Apesar de serem chamados antígenos de histocompatibilidade menor, a incompatibilidade desses antígenos pode gerar efeitos relevantes (Goulmy, 1997; Dupont, 1998).

Como já existiam provas convincentes em modelos animais experimentais de que as moléculas codificadas pelo MHC representam a principal barreira genética à aplicação bem-sucedida de aloenxerto, a tipagem do HLA foi utilizada em seres humanos para determinar e otimizar a compatibilidade entre o doador e o receptor do enxerto. Em princípio, a influência dos antígenos HLA sobre a sobrevida do enxerto foi investigada por meio da aplicação de enxerto de pele não vascularizada entre membros de família. Como acontecem em estudos com camundongos consanguíneos, os enxertos de pele entre irmãos HLA-idênticos sobreviviam por um tempo significativamente maior do que aqueles feitos entre irmãos, progenitores ou doadores não aparentados compatíveis para um dos dois haplótipos. Essas observações foram estendidas para transplante renal durante o final dos anos 1960 e início dos anos 1970. Os dados mais recentes do Estudo Colaborativo Internacional de Transplante (CTS, Collaborative Transplant Study) em Heidelberg e da Rede Unida de Compartilhamento de Órgãos (UNOS, United Network for Organ Sharing Registry) nos Estados Unidos (analisados na Universidade da Califórnia, Los Angeles [UCLA, University of California, Los Angeles]) confirmam o MHC como a principal barreira genética ao transplante de enxertos renais (Cecka, 1999; Opelz, 1999) (Fig. 47.8; em busca de atualizações, consultar os sites listados na Tab. 47.1). Os dados em relação a transplante de células progenitoras hematopoéticas também reafirmam o papel desempenhado pela molécula do MHC em desfechos de transplante, mensurados pela sobrevivência do paciente e pela ocorrência de DE-VH (Hansen, 1999) (Fig. 47.9).

Teste de histocompatibilidade

Compatibilidade HLA

Embora o nível de compatibilidade da molécula HLA seja um elemento importante nos resultados de transplantes, a histocompatibilidade tem significados diferentes em diferentes quadros, e as estratégias de compatibilidade variam. Os critérios diferem com variáveis que incluem o tipo de enxerto (p. ex., órgão vascularizado maciço *versus* célula progenitora hematopoética), a doença (p. ex., leucemia mielógena crônica *versus* anemia aplásica), a idade do paciente e o protocolo clínico (p. ex., sangue de medula *versus* sangue de cordão umbilical; depleção de células T da medula *versus* depleção de outras células, que não as T) (ver Cap. 37).

A compatibilidade costuma incluir a avaliação de, no mínimo, três *locus*, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR*. Indivíduos compatíveis, independentemente da resolução, para todos os três *locus* são denominados compatíveis 6/6 ou incompatíveis 0. Incompatíveis zero (um termo utilizado em transplante de órgão maciço) também podem se referir aos pares de doador/receptor, em que não há diferenças detectáveis de HLA entre doador e receptor – ou seja, em que o doador é homozigoto para os alelos em um ou mais dos *locus* (p. ex., doador homozigoto: *A*0101*; *B*0801*; *DRB1*0301*; receptor heterozigoto: *A*0101*, *A*0301*; *B*0801*, *B*0702*; *DRB1*0301*, *DRB1*1501*). Os indivíduos compatíveis para quatro de seis alelos ou antígenos recebem o nome de compatíveis 4/6. Podem surgir diferenças aparentes no nível de compatibilidade por causa da metodologia de tipagem utilizada para

Tabela 47.3 Agentes terapêuticos, mecanismo de ação e métodos de monitorização

Medicamento	Mecanismo(s) de ação	Métodos de monitorização*
Azatioprina	Antagonista de purina; interrompe a proliferação celular	Exames laboratoriais de rotina, estudos farmacocinéticos, estudos farmacodinâmicos
Glicocorticoides	Interrompe a transcrição gênica de citocinas; inibe a proliferação de células-T e a imunidade dependente de células-T	Exames laboratoriais de rotina, estudos farmacocinéticos
Ciclosporina	Inibe a expressão de proteínas reguladoras nucleares e os genes de ativação das células T	Exames laboratoriais de rotina, estudos farmacocinéticos, estudos farmacodinâmicos
FK506 (também conhecido como tacrolimo)	Inibe a expressão de proteínas reguladoras nucleares e os genes de ativação das células T	Exames laboratoriais de rotina, estudos farmacocinéticos
Micofenolato de mofetila	Inibe a biossíntese de purina, suprimindo com isso a proliferação das células T e B	Exames laboratoriais de rotina, estudos farmacocinéticos, estudos farmacodinâmicos
Sirolimo (também conhecida como rapamicina)	Inibe a síntese de DNA e proteína, interrompendo a proliferação de células T; inibe a proliferação de células B controlada por antígeno	Exames laboratoriais de rotina, estudos farmacocinéticos, estudos farmacodinâmicos

* Os exames laboratoriais de rotina incluem mensuração de ureia/creatinina sérica, hemograma completo, enzimas hepáticas etc. Os estudos farmacocinéticos envolvem a mensuração dos níveis de vale e o cálculo da área sob a curva. O estudo farmacodinâmico refere-se à mensuração do efeito biológico do medicamento em seu alvo de ação.

Fonte: adaptada de: Massey D, King A, Riley R: Renal Allograft Dysfunction in Kidney Transplant. American Society for Clinical Pathology, Clinical Chemistry Check Sample 2003; 43:19-38.

determinar os tipos de HLA (p. ex., tipagem sorológica *versus* tipagem à base do DNA). As nomenclaturas obtidas por sorologia e tipagem do DNA, embora relacionadas, podem diferir. A definição de compatível também pode variar, dependendo da resolução da tipagem. Um paciente e um doador podem parecer compatíveis em nível sorológico (p. ex., receptor: *A2*, *A26*; doador: *A2*, *A26*); no entanto, o par pode ser incompatível em nível alélico para a molécula HLA (p. ex., receptor: *A*0201*, *A*2601*; doador: *A*0205*, *A*6601*).

A compatibilidade de moléculas HLA clássicas no nível do alelo pode otimizar os resultados para todos os enxertos (tanto de órgãos vasculares quanto de células progenitoras hematopoéticas) (Petersdorf, 1998; Opelz, 1999). Contudo, em virtude do número extremamente grande de alelos HLA, é difícil a compatibilidade em nível alélico. Portanto, o nível de compatibilidade que garante um bom resultado para o maior número de pacientes de todas as populações étnicas deve ser levado em consideração.

Após transplante de células progenitoras hematopoéticas, os determinantes subtípicos ou as diferenças alélicas desencadeiam respostas importantes de células-T citotóxicas, induzindo à rejeição do enxerto e ao desenvolvimento de DEVH. De fato, estudos demonstraram que a compatibilidade em alta resolução para alelos de classe I e de classe II do doador e do receptor pode melhorar os resultados após transplante de medula de indivíduos não aparentados. Dados recentes sugerem que múltiplos alelos incompatíveis são prejudiciais aos resultados dos transplantes; no entanto, o impacto de alelos incompatíveis isolados e de *locus* específicos ainda não foi definido (Petersdorf, 1998; Sasazuki, 1998; Hansen, 1999). Apenas uma minoria de pacientes à espera de transplante receberá enxertos de doadores totalmente compatíveis em nível alélico (Hurley, 2000b). Para conferir a todos os pacientes o benefício de transplantes capazes de lhes salvar a vida, a identificação de alelos incompatíveis bem tolerados faria com que a seleção de doadores incompatíveis fosse priorizada, de acordo com o risco biológico de indivíduos HLA-incompatíveis específicos.

A compatibilidade ideal para enxertos de órgão maciço pode diferir dos requisitos de compatibilidade para transplante de células progenitoras hematopoéticas. Dados recentes sugerem que tanto os *locus* de HLA compatíveis quanto o nível de resolução do teste de HLA contribuem para os resultados do enxerto renal (Opelz, 1999). Atualmente, a UNOS facilita o compartilhamento de rins de cadáver com base nas especificidades subtípicas. Como indivíduos compatíveis subtípicos raramente são identificados, foi sugerido que as moléculas HLA de classe I sejam compatíveis para os determinantes mais amplos de CREG. O CREG pode definir os determinantes imunodominantes reconhecidos na resposta imune humoral. Rodey (1994) revelou que 80 a 90% dos aloanticorpos anti-HLA formados por receptores de rim após transplante são direcionados contra os determinantes de CREG. Os determinantes de CREG são compartilhados entre diferentes moléculas HLA de classe I e, em contraste com especificidades subtípicas, possuem distribuição semelhante entre grupos populacionais étnicos. Raras especificidades subtípicas são incluídas dentro do CREG. Como o número de CREGs é menor que o número de especificidades subtípicas, a probabilidade de indivíduo CREG-compatível é maior do que para indivíduo HLA-compatível de classe I em nível subtípico ou alélico. Por esse motivo, a distribuição de órgãos com base na compatibilidade de CREG deve resultar em uma probabilidade mais alta de enxertos compatíveis distribuídos equitativamente a receptores de todas as populações étnicas. A compatibilidade de CREG para a distribuição de rins foi caracterizada como uma opção falha em termos imunológicos, e seu efeito positivo observado em prolongar a sobrevida do enxerto e reduzir as necessidades de imunossupressores foi atribuído totalmente ao efeito de compatibilidade da molécula HLA (Egfjord, 2003). Outros citam um papel positivo para a compatibilidade de CREG em reduzir a sensibilização ao HLA entre a minoria dos receptores de transplantes renais (Crowe, 2003).

Outras estratégias concentram-se na compatibilidade de fragmentos biologicamente relevantes das moléculas de MHC (p. ex., compatibilidade de epítopos) (Suciu-Foca, 1998; Harris, 1999). Até pouco tempo, acreditava-se que o reconhecimento direto de aloantígenos era a principal via de respostas de rejeição de enxerto. Contudo, estudos sugerem que a resposta indireta desempenha um papel significativo na rejeição de enxerto, pelo menos dos enxertos de órgão maciço (Sayegh, 1996). Se a via indireta for ativada, os epítopos peptídicos gerados por degradação proteolítica da molécula HLA, e não essa molécula em si, seriam o estímulo imunogênico. Nesse caso, estratégias inovadoras podem ser traçadas para definir as incompatibilidades permitidas com base no reconhecimento dos fragmentos peptídicos. Por exemplo, pode ser uma estratégia verificar se as moléculas HLA de doador incompatível seriam detectadas como imunogênicas no receptor (i. e., se as moléculas HLA do receptor se ligariam e apresentariam esses epítopos). Teoricamente, é possível identificar sequências estranhas de peptídeos das moléculas HLA não apresentadas por moléculas HLA específicas do receptor e, assim, definir as incompatibilidades permitidas para determinadas moléculas HLA.

A complexidade inerente na interpretação dos resultados de tipagem de HLA e na seleção de doador torna crítico o envolvimento de algum especialista no teste de histocompatibilidade. Os especialistas em tipagem de HLA conhecerão os pontos fortes e fracos de cada método de tipagem, bem como a frequência de alelos e haplótipos na população – informações importantes tanto na busca como na seleção de doador adequado.

Detecção de anticorpo anti-HLA-específico no soro do receptor

Os pacientes podem ser sensibilizados a moléculas HLA estranhas específicas por meio de transfusão, gravidez ou transplantes prévios. A avaliação da compatibilidade entre o receptor e o possível doador inclui o teste para essa sensibilização. O soro do receptor é testado antes do transplante em um painel (linfócitos ou moléculas HLA solúveis imobilizadas) de perfil HLA conhecido para mensurar o painel de reatividade de anticorpos (PRA, *panel reactive antibody*). No momento do transplante, o soro do receptor é testado com os linfócitos do prospectivo (futuro) doador para identificar reatividade específica ao doador potencial na prova cruzada doador-específica. Embora as técnicas utilizadas para detectar a ligação do anticorpo possam diferir entre os laboratórios, a finalidade continua sendo a obtenção de perfil dos fatores de risco imunológicos de receptor na lista de espera, o que ajudará a equipe médica na tomada de decisões antes e depois do transplante. A ligação de anticorpo no soro *atual* do receptor aos linfócitos T do doador é uma contraindicação ao transplante renal.

Triagem sorológica (PRA)

A caracterização completa do perfil humoral em pacientes que se encontram na lista de espera de transplante ajuda na interpretação da prova cruzada doador-específica antes do transplante. Os objetivos da triagem do PRA são:

1. identificar o nível de pré-sensibilização do paciente a antígenos HLA. Um paciente com PRA acima de 60% (i. e., o soro do paciente reage às especificidades encontradas em, no mínimo, 60% do painel) tem uma probabilidade reduzida de prova cruzada doador-específica negativa e, assim, de receber um transplante de indivíduo não aparentado;
2. identificar a especificidade dos anticorpos anti-HLA para predizer o(s) antígeno(s) HLA a ser(em) evitado(s) durante a seleção de doadores;
3. identificar os pacientes com anticorpos irrelevantes (p. ex., autoanticorpos IgM), para que técnicas convenientes possam ser selecionadas a fim de evitar leituras falso-positivas no momento da prova cruzada doador-específica.

A caracterização de anticorpo anti-HLA-específico presente no soro do receptor requer a realização de teste em painel selecionado de especificidades HLA bem-definidas. Os linfócitos ou o antígeno solúvel de um número suficiente de indivíduos devem ser incluídos no painel de triagem para garantir que todos, com exceção do anticorpo mais raro direcionado contra a molécula HLA, sejam detectados. Na medida do possível, o painel de triagem deve permanecer o mesmo, para que os resultados sejam comparáveis com o passar do tempo. Os receptores de transplante renal frequentemente formam anticorpos contra os CREGs, e não contra as especificidades subtípicas (Rodey, 1994, 1997); nesse caso, as análises do painel de reatividade devem considerar a identificação do CREG, bem como das especificidades subtípicas. A identificação de especificidades do anticorpo em pacientes que estão na lista de espera de transplante ajuda na pré-seleção de doador potencial para quem o

receptor terá uma prova cruzada final negativa. Os programas computadorizados auxiliam nessa seleção (Claas, 1999; Duquesnoy, 1999).

A frequência da triagem e a seleção dos ensaios utilizados para o procedimento de triagem são decisões tomadas com base no perfil imunológico de cada receptor. O emprego reduzido de transfusões sanguíneas tem abolido a necessidade de triagem mensal de amostras séricas em todos os pacientes (site da ASHI; Tab. 47.1). A presença de anticorpos anti-HLA específicos de classe I e de classe II é detectada por teste sorológico em painel de linfócitos (p. ex., por meio de ensaios de citotoxicidade direta dependente de complemento ou citotoxicidade acentuada por antiglobulina) ou painel de moléculas HLA solúveis imobilizadas em placas (i. e., ensaio imunoabsorvente ligado à enzima [ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*]) ou em grânulos (i. e., citometria de fluxo). Os ensaios estão descritos em detalhes no manual da ASHI (2001). Uma vantagem da análise de antígenos solúveis em fase sólida é que ela pode ser planejada para detectar apenas IgG, anticorpos anti-HLA específicos de classe I.

As amostras séricas de receptores potenciais devem ser armazenadas a –70°C e protegidas do dióxido de carbono e de evaporação. As amostras séricas caracterizadas armazenadas serão utilizadas na prova cruzada doador-específica para avaliar a compatibilidade com o prospectivo (futuro) doador.

Prova cruzada doador-específica

As provas cruzadas de linfócitos avaliam a presença de anticorpos, se aplicáveis, no soro do receptor potencial que reagem com os linfócitos do doador específico. Na prova cruzada, o linfócito constitui a célula-alvo de escolha, pois expressa altos níveis de moléculas HLA, além de ser fácil de isolar. Esse teste provavelmente representa a contribuição mais importante do laboratório de tipagem tecidual (HLA) ao transplante renal clínico. A finalidade da prova cruzada é evitar a rejeição hiperaguda e detectar anticorpos que identificam fatores de risco imunológicos em pacientes que se encontram na lista de espera de transplante. A ocorrência de rejeição hiperaguda está significativamente correlacionada com uma prova cruzada positiva por citotoxicidade dependente de complemento (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) direta entre os linfócitos T do doador e o soro do receptor no momento do transplante. A reatividade do soro válido atual do receptor aos linfócitos T do doador é uma contraindicação ao transplante renal de enxerto. A detecção de anticorpos reativos do doador em amostras séricas não atuais do receptor não é uma contraindicação, mas pode representar um risco de perda do enxerto, além de rejeição hiperaguda imediata (Cardella, 1982; Geddes, 1999). Uma prova cruzada doador-específica também é utilizada para predizer falhas no enxerto de células progenitoras hematopoéticas em alguns centros de transplante (Hansen, 1997a).

Os requisitos e os métodos para a realização de prova cruzada doador-específica são relatados nos padrões da ASHI (Tab. 47.1) e no manual de procedimento dessa sociedade (2001). As técnicas aceitáveis até o momento incluem a CDC modificada de Amos, a CDC por tempo de incubação estendido, a CDC acentuada por antiglobulina e a citometria de fluxo.

Técnicas de detecção de anticorpos

Diferentes laboratórios podem utilizar diferentes combinações de ensaios para detecção de anticorpos. O nível detectado de sensibilização varia com o ensaio. A especificidade detectada de anticorpos varia com a célula-alvo.

Citotoxicidade dependente de complemento direta

A CDC direta inclui todos os ensaios que utilizam a adição de complemento para detectar a ligação direta de anticorpo aos linfócitos. A fixação de complemento pelos complexos antígeno-anticorpo na superfície celular resulta em morte da célula ou citotoxicidade. Os métodos de CDC compreendem a técnica básica (sem etapa de lavagem antes da adição do complemento), a técnica modificada de Amos (etapa de lavagem adicionada antes da adição do complemento) e as técnicas por tempo de incubação estendido. A etapa de lavagem remove o soro, que pode conter substâncias capazes de impedir a ativação do complemento. As vantagens das técnicas de CDC direta são a reprodutibilidade e a excelente correlação com a incidência de rejeição hiperaguda.

Técnicas indiretas de prova cruzada

As técnicas indiretas incluem a citotoxicidade acentuada por antiglobulina (AHG, *antiglobulin-augmented cytotoxicity*) e a citometria de fluxo. Ambas as técnicas utilizam reagente específico para imunoglobulina humana com o objetivo de aumentar a detecção de anticorpo direcionado contra a molécula HLA. As técnicas indiretas detectam a presença de anticorpos específicos para CREGs que, frequentemente, passam despercebidos nos ensaios de CDC direta. As vantagens do ensaio de citometria de fluxo envolvem a diferenciação da subclasse da imunoglobulina ligada à célula (IgG *versus* IgM) e a caracterização da célula-alvo ligada ao aloanticorpo (linfócito T *versus* linfócito B *versus* monócito).

Autoanticorpos

Não se sabe se a presença de autoanticorpos circulantes no receptor é deletéria. Assim, é recomendável a realização de autoprova cruzada, de preferência quando o paciente for inserido na lista de espera de transplante. Na presença de autoanticorpos, os soros utilizados para prova cruzada do doador devem ser submetidos à remoção de autorreatividade. Os autoanticorpos são principalmente IgM, enquanto os anticorpos anti-HLA-específicos são basicamente IgG (Barger, 1989). Inativação térmica a 63 ± 1°C ou redução com os agentes químicos ditioeritritol (DTE) ou ditiotreitol (DTT) de quaisquer anticorpos IgM potenciais são métodos utilizados para diferenciar entre os anticorpos IgM e IgG nas amostras séricas. Se a amostra sérica inativada por calor ou tratada com DTT for negativa, ainda que a amostra não tratada seja positiva, a maioria dos centros prosseguirá com o transplante. No entanto, a redução com DTT ou a inativação com calor deve ser utilizada com cuidado, pois nem todos os anticorpos anti-HLA-específicos são IgG e pelo fato de que ambos os procedimentos, se não adequadamente controlados, podem remover a atividade da IgG e da IgM.

Anticorpos das células-B

Uma prova cruzada utilizando linfócitos B do doador (prova cruzada com células B) pode ser realizada em pacientes sensibilizados em alguns centros de transplante. O resultado positivo em prova cruzada doador-específica para células B não é contraindicação ao transplante. O significado clínico não foi determinado, mas o resultado positivo do teste pode ser um fator de risco, particularmente em pacientes submetidos a transplante prévio. Os anticorpos detectados em uma prova cruzada com células B podem ser (1) anticorpos anti-HLA-DR, -DQ de classe II, (2) anticorpos anti-HLA-A, -B, -C específicos fracos (as células B apresentam uma densidade mais alta de moléculas de classe I e são mais sensíveis a ensaios dependentes do complemento do que as células T) e/ou (3) anticorpos não HLA específicos (p. ex., autoanticorpos). Para interpretar uma prova cruzada positiva para células B, pode ser necessário adsorver os soros do receptor com plaquetas antes de realizar a prova cruzada do doador. As plaquetas expressam as moléculas de classe I, mas não as de classe II. As duas técnicas mais comumente utilizadas de prova cruzada para células B são os ensaios de CDC e citometria de fluxo.

Seleção de amostras de soro do receptor para prova cruzada do doador

Em pacientes sem sensibilização detectável (i. e. , PRA de 0%), a amostra sérica mais recente disponível pode ser utilizada para a prova cruzada doador-específica. Se o paciente exibir anticorpos preexistentes ou tiver tido algum evento sensibilizante recente, é recomendável a coleta de amostra sérica atual (i. e., dentro de 48 horas do transplante). Em receptores sensibilizados, amostras representativas, incluindo a amostra sérica mais reativa ou de "pico", são testadas na maioria dos centros de transplante, pois uma amostra não atual positiva do doador pode ser considerada um fator de risco, particularmente no paciente que rejeitou um enxerto primário no início do período pós-transplante (Mahoney, 1996).

Transplante renal

A prática atual é selecionar doadores para receptores que são ABO-compatíveis, apresentam resultados negativos na prova cruzada doador-específica para células T com soros adequados do receptor e exibem a melhor compatibilidade HLA disponível. A descoberta original de que enxertos renais entre irmãos HLA-idênticos sobrevivem por

tempo significativamente maior do que enxertos transplantados entre irmãos ou combinações de progenitor-irmão HLA-incompatíveis foi consistentemente confirmada. A Figura 47.8 exibe uma análise recente da sobrevida de aloenxertos renais em um período de 5 anos, proveniente do registro do CTS internacional entre três categorias de doadores: (1) irmão HLA-idêntico, sobrevida de 84%; (2) doador vivo familiar compatível para um dos dois haplótipos, sobrevida de 73%; (3) todos mortos (cadáveres), sobrevida de 66%. O impacto da compatibilidade do sistema MHC em transplante de familiares vivos é claramente constatado, comparando-se as categorias 1 e 2. Resultados semelhantes são observados no banco de dados da UNOS (Cecka, 1999).

Embora as análises dos desfechos de enxertos de familiares vivos confirmem o papel desempenhado pelo MHC como a principal barreira genética à obtenção de resultado bem-sucedido do uso de enxerto, a demonstração e a aceitação de uma influência positiva exercida pela compatibilidade da molécula HLA sobre o resultado do enxerto para transplante cadavérico não aparentado são mais controversas. Contudo, os dados de sobrevida a longo prazo provenientes de estudos colaborativos multicêntricos são consistentes em demonstrar um efeito altamente significativo da compatibilidade da molécula HLA sobre a sobrevida do enxerto em transplante renal cadavérico (Cecka, 1999; Opelz, 1999). Além disso, dois estudos recentes monocêntricos, um da Europa (Oslo) e outro da América do Norte (Toronto), relataram uma melhora expressiva na sobrevida do enxerto como uma função de compatibilidade de HLA (Geddes, 1999; Leivestad, 1999). Um único centro pode exigir a priorização com base na compatibilidade de HLA para transplantar um número suficiente de receptores com enxertos bem-compatíveis a fim de atingir um significado estatístico na análise do desfecho. Embora os números sejam menores, uma influência altamente significativa da compatibilidade da molécula HLA foi observada sobre o resultado de enxertos renais obtidos de doadores vivos não aparentados (Opelz, 1999).

Enxertos de incompatibilidade zero (0 MM) obtidos de doadores mortos (cadáveres) sobrevivem significativamente mais e quase o mesmo tanto que enxertos adquiridos de irmãos HLA-idênticos (Fig. 47.8); dessa forma, a UNOS obriga o compartilhamento de rins 0 MM. A sobrevida do enxerto em pacientes após os primeiros transplantes renais diminui de forma gradativa, pois o número de incompatíveis aumenta de 0 MM para 6 MM (Cecka, 1999; Opelz, 1999). Contudo, para garantir o compartilhamento equitativo de órgãos a todos os receptores, inclusive aqueles com haplótipos HLA raros, novos algoritmos para priorizar receptores na lista de espera vêm sendo adotados por programas de compartilhamento de órgãos (Opelz, 1999). Os dados mais recentes sobre desfechos em relação à sobrevida tanto do enxerto quanto do paciente podem ser acessados pelo *site* do CTS (www.ctstransplant.org).

A compatibilidade do enxerto inicial não só aumenta o tempo de sobrevida para esse enxerto, mas também diminui a probabilidade de sensibilização do receptor e facilita o novo transplante. O acúmulo de

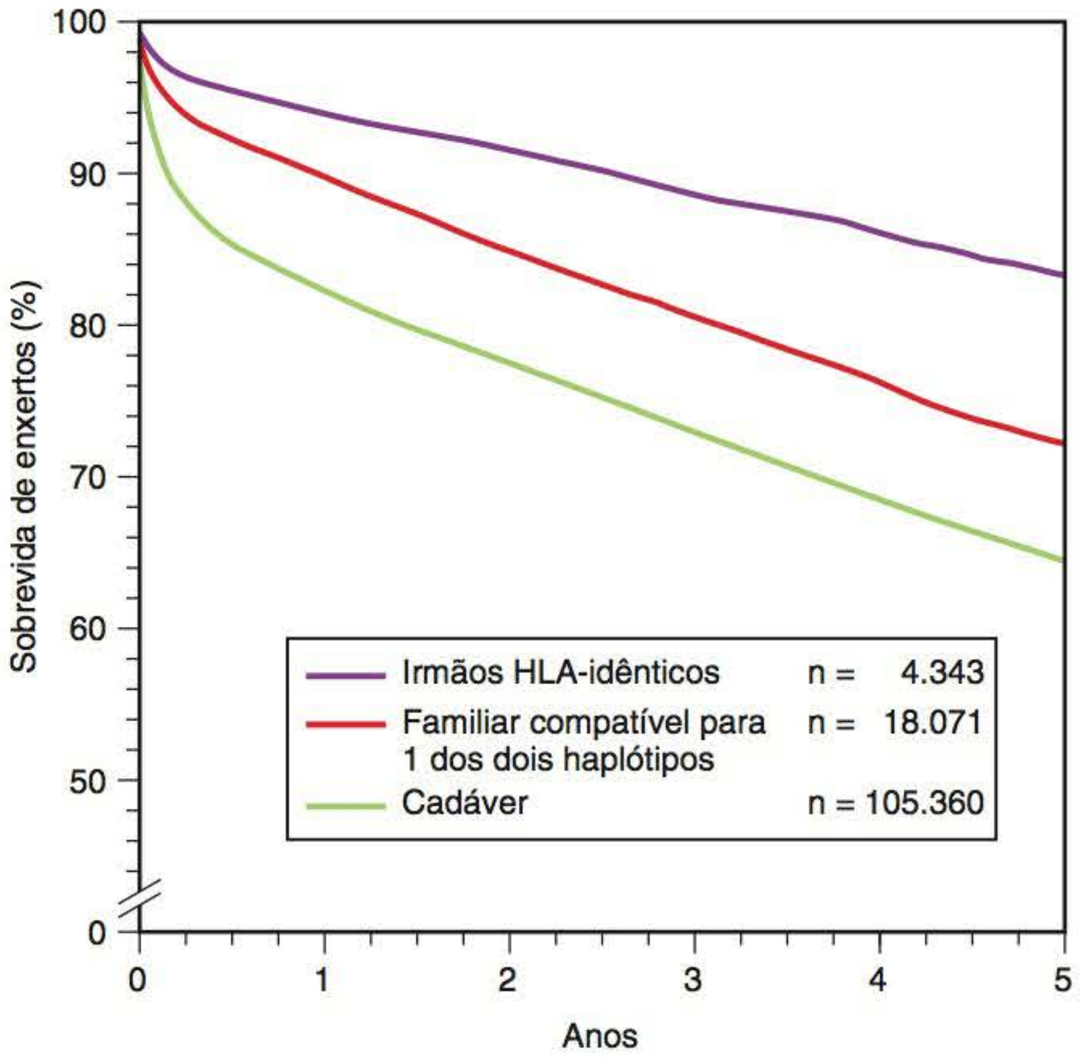


Figura 47.8 F Sobrevida de aloenxerto renal (primeiro transplante) de três categorias de histocompatibilidade em um período de 5 anos: irmãos HLA-idênticos; doadores vivos familiares compatíveis para um dos dois haplótipos; doadores mortos (cadáveres). Os enxertos provenientes de doadores irmãos HLA-idênticos (ambos com cromossomos HLA compatíveis) obtêm os melhores resultados. Estão indicados os números de transplantes estudados (regressão $p < 0{,}0001$). (Com permissão de Opelz G, Wujcak T, Dohler B, et al: HLA compatibility and organ transplant survival. Rev Immunogenet 1999; 1:334.)

pacientes altamente sensibilizados na lista de espera é um problema significativo em muitos centros médicos, pois os pacientes esperam por longos períodos de tempo e podem apresentar problemas clínicos de difícil tratamento (Sanfilippo, 1992).

Transplante de outros órgãos

A sobrevida de enxertos de coração, fígado, pulmão e pâncreas é boa, com taxa entre 58 e 67% dos primeiros enxertos em 5 anos. Os doadores não costumam ser compatíveis quanto ao tipo de HLA, mas uma prova cruzada do doador antes do transplante não é realizada com rotina. As triagens de anticorpo sérico são recomendadas para identificar o estado de sensibilização como um fator de risco imunológico para o receptor. Se possível, os receptores de enxerto e os doadores mortos (cadáveres) de enxertos vascularizados não renais devem ser

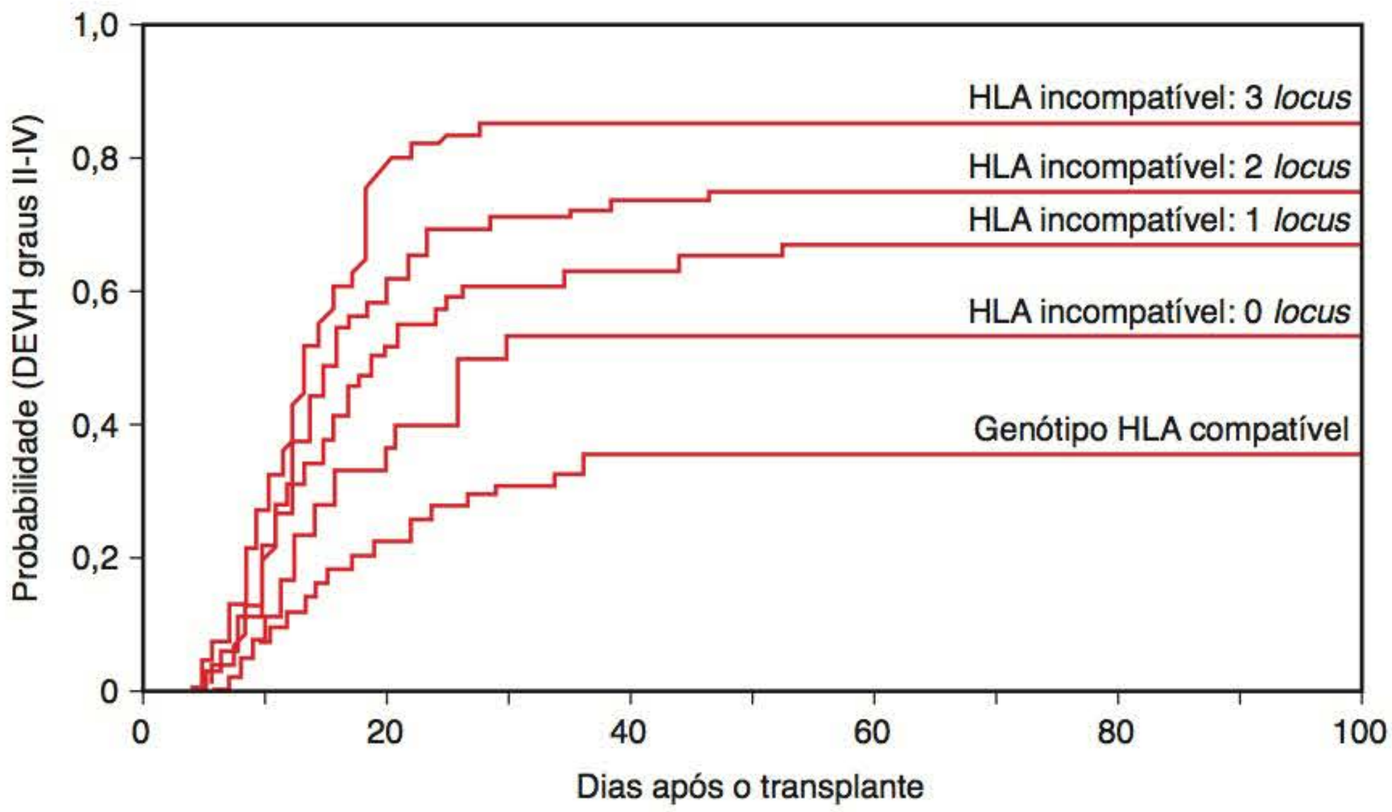


Figura 47.9 Probabilidade de doença aguda do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH) de graus II-IV em transplantes de medula de doadores irmãos HLA-idênticos (genótipo HLA compatível) e familiares haploidênticos variavelmente compatíveis para as moléculas HLA-A, -B ou DR/Dw (HLA incompatível: 3 *locus*, 2 *locus*, 1 *locus* ou 0 *locus*). A compatibilidade entre as moléculas HLA-A, -B, e -DR foi definida por sorologia, enquanto a compatibilidade para HLA-Dw foi determinada por MLC ou por tipagem dos alelos *HLA-DRB1* com sondas de oligonucleotídeos sequência-específicas. Todos os pacientes receberam medula não modificada (sem depleção de células-T) após regime condicionante que incluía irradiação corporal total. Para profilaxia da DEVH, foram administradas a ciclosporina e o metotrexato. (Com permissão de Hansen JA, Yamamoto K, Petersdorf E, et al: The role of HLA matching in hematopoietic cell transplantation. Rev Immunogenet 1999; 1:359, copyright © 1999 Munksgaard International Publishers Ltd, Copenhagen, Denmark.)

submetidos à tipagem de HLA para possibilitar análises retrospectivas. Dados recentes do CTS internacional não revelam qualquer efeito exercido pela compatibilidade da molécula HLA sobre os resultados de transplante de fígado; entretanto, os dados do CTS demonstram um impacto significativo da compatibilidade entre as moléculas de HLA-A, -B e -DR sobre os resultados dos primeiros transplantes de coração (Opelz, 1999). O período aceitável para preservação do órgão durante a fase de isquemia fria pode limitar a extensão da possível compatibilidade HLA em transplante do coração.

Transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas

O transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas é realizado em casos de processos malignos e distúrbios hematológicos, falência da medula óssea, certos distúrbios metabólicos hereditários como doenças de armazenamento lipídico e síndrome de imunodeficiência congênita. Do ponto de vista da histocompatibilidade, o melhor doador é a própria pessoa (transplante autogênico) se o processo maligno não for um que envolva a medula óssea ou se a doença não for genética, ou um gêmeo idêntico (transplante singênico). As células progenitoras de algum doador irmão HLA-idêntico constituem uma fonte frequente. Em geral, essas células do doador serão geneticamente idênticas ao paciente em toda a região do sistema MHC. O uso de doador irmão também aumenta a probabilidade de genes não HLA passíveis de afetar o sucesso do transplante e pouco definidos (i. e., genes de histocompatibilidade menor) serem compatíveis (Goulmy, 1997). Membros de família haploidênticos também podem ser escolhidos como doadores (Aversa, 1998), embora exista maior risco de DEVH grave decorrente de doadores HLA incompatíveis. Com base nos dados do International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) (Tab. 47.1; www.ibmtr.org), mais de 16.000 transplantes alogênicos de medula óssea foram realizados de 1996 a 1997; 75% utilizaram doadores aparentados.

A maioria dos pacientes (~70%) não possui um irmão HLA-compatível e pode ser considerada para transplante com células de doador HLA-compatível não aparentado. Para facilitar a busca por doador compatível, foram desenvolvidos registros internacionais de doadores não aparentados ao redor do mundo (Hansen, 1996). O NMDP nos Estados Unidos é um tipo de registro e contém mais de 3,9 milhões de doadores HLA-tipados, tornando-se o maior registro de doadores não aparentados no mundo (Perkins, 1994; ver Tab. 47.1; www.marrow.org).

Os enxertos de células progenitoras hematopoéticas estão entre os procedimentos clínicos mais difíceis por várias razões (Madrigal, 1997; Hansen, 1997a). Em primeiro lugar, no momento do transplante, os receptores encontram-se quase totalmente imunodeficientes, quer por causa de deficiência hereditária (imunodeficiência combinada grave [SCID, *severe combined immunodeficiency*]) ou por conta de condicionamento pré-transplante (quimioterapia citotóxica e irradiação). O condicionamento é necessário para eliminar as células malignas e evitar a rejeição das células progenitoras do doador pelo sistema imune do receptor, infundidas vários dias após o condicionamento. A quantidade de pré-tratamento citotóxico é alta o suficiente a ponto de eliminar os leucócitos circulantes, quase remover as plaquetas, e abolir a produção de novos eritrócitos. Com isso, o receptor torna-se profundamente suscetível a todos os tipos de infecção e, com certeza, morreria se não fosse resgatado por cuidados médicos excepcionais e pelas células progenitoras transfundidas.

O segundo risco está no potencial de ataque imunológico do receptor pelas células progenitoras alogênicas transplantadas, resultando em DEVH. Além de apresentar várias formas, essa doença pode ser fatal. Apesar das dificuldades, diversos centros de transplante têm obtido sucesso excepcional. Relatos recentes de instituições isoladas e do IBMTR sugerem sobrevida livre de leucemia de 40 a 60% em 5 anos após transplante de células progenitoras hematopoéticas não aparentadas de pacientes com leucemia mielógena crônica em fase crônica (Tab. 47.1, www.ibmtr.org) (Hansen, 1998). A sobrevida de pacientes com anemia aplásica grave transplantados com células de doadores não aparentados varia de 30 a 50% em 5 anos, dependendo da idade do paciente (ver Tab. 47.1, NMDP em www.marrow.org e www.ibmtr.org), e taxas de sobrevida de quase 90% foram relatadas em alguns centros (Deeg, 1998).

Além da medula como fonte de células progenitoras hematopoéticas, a coleta de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico mobilizado com fator de crescimento (Anderlini, 1997) ou de células progenitoras do sangue do cordão umbilical (Cairo, 1997) aumenta a disponibilidade de doadores não aparentados. Novas abordagens para imunossupressão, incluindo protocolos de condicionamento menos agressivos (p. ex., "minitransplantes") (Storb, 1999), podem ampliar a viabilidade de transplante de células progenitoras como procedimento terapêutico em pacientes atualmente excluídos pela idade ou por disfunção orgânica. O transplante de células progenitoras hematopoéticas também pode ser utilizado para gerar respostas imunes direcionadas às células malignas. A recidiva de doença após o transplante é superior em pacientes submetidos a enxerto HLA-compatível, sugerindo que certo grau de incompatibilidade possa ser benéfico para estimular uma resposta imune contra as células tumorais (Beatty, 1993). À medida que os problemas em torno desse procedimento mais difícil forem superados, o transplante de células progenitoras hematopoéticas pode se tornar um dos métodos mais amplamente utilizados para o tratamento de uma série de doenças (ver Cap. 38).

Tipagem do HLA para transplante de células progenitoras

Muitos fatores, incluindo a histocompatibilidade, influenciam os resultados do transplante de células progenitoras hematopoéticas (Madrigal, 1997). A avaliação diagnóstica pré-transplante inclui tipagem das moléculas HLA-A, -B e -DR de todos os membros familiares disponíveis mais próximos para identificar algum doador compatível aparentado e estabelecer a herança de haplótipos. A tipagem à base do DNA para genes de classe II tornou-se padrão, enquanto a tipagem à base do DNA para genes de classe I foi implementada em muitos centros. A tipagem da família estendida, a tipagem em nível alélico (i. e., em alta resolução) de *locus* HLA-específicos de classe I e de classe II, a tipagem de outros *locus* dentro do MHC (repetições curtas em tandem ou *locus* do complemento) ou o uso de outros testes (p. ex., prova cruzada; mensurações de precursores de células-T citotóxicas) para medir a compatibilidade também podem ser adequados (Hurley, 1999).

O nível de resolução necessário para tipagem da molécula HLA difere para transplante de células progenitoras hematopoéticas e transplante renal. É provável que a tipagem HLA de resolução mais alta seja necessária para equiparar doador e receptor em transplante de células progenitoras do que em transplante renal, pois o primeiro transplante mencionado envolve a transferência de todo o sistema imune ao paciente. As pesquisas atuais concentram-se na definição dos *locus* que devem ser considerados na seleção do doador, no nível de resolução que deve ser utilizado para compatibilidade, e no efeito cumulativo de múltiplos indivíduos incompatíveis. O nível de compatibilidade requerido pode variar para cada doença ou protocolo. Evidências sugerem que a compatibilidade entre doador e receptor não aparentados para os alelos *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* esteja relacionada com melhores resultados. O impacto da compatibilidade em outros *locus* HLA (p. ex., *HLA-C* e *HLA-DQ*) está sob avaliação. Incompatibilidades isoladas podem ser toleradas; no entanto, incompatibilidades múltiplas parecem exercer um impacto negativo sobre o resultado (Petersdorf, 1995b, 1998; Hansen, 1997a; Madrigal, 1997; Sasazuki, 1998). Além disso, o efeito positivo da histocompatibilidade sobre os resultados deve ser equilibrado pelo impacto positivo do transplante no início do curso da doença. Os dados obtidos do IBMTR e do NMDP revelam que a sobrevida após a realização de transplante sofra declínio à medida que a doença avança (dados obtidos nos sites listados na Tab. 47.1).

Resumo

As moléculas HLA de classe I e de classe II codificadas dentro do complexo principal de histocompatibilidade desempenham um papel significativo na especificidade e na natureza das respostas imunes. O extenso polimorfismo dessas moléculas produz a diversidade necessária para garantir a sobrevida em um ambiente de patógenos hostis e adaptativos. Infelizmente, essa capacidade do sistema imune em distinguir *self* ("antígenos próprios") e *non-self* ("antígenos não próprios") estende-se para o reconhecimento de moléculas HLA

estranhas após transplante de tecido. A definição e a caracterização de alelos e moléculas HLA são combinadas com protocolos clínicos para maximizar a compatibilidade e minimizar o impacto exercido pela resposta imune sobre o tecido estranho. Esses avanços têm contribuído para o desenvolvimento de transplante como uma modalidade terapêutica bem-sucedida na substituição de tecido enfermo.

Referências bibliográficas

Abbal M, Cambon-Thomsen A, Foissac A, et al: Microsatellites in the HLA region: potential applications in bone marrow transplantation. Transplant Proc 1997; 29:2374.

Agrawal S, Pandey MK: The potential role of HLA-G polymorphism in maternal tolerance to the developing fetus. J Hematother Stem Cell Res 2003; 12:749–756.

Aguado B, Bahram S, Beck S, et al: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature 1999; 401:921.

Esta referência não só contém a primeira sequência completa e o mapa gênico de região do MHC, mas também representa o esforço de um grupo internacional de pesquisadores e colaboradores.

American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: Laboratory Manual, 4th ed. Lenexa, KS, ASHI, 2000.

Anderlini P, Korbling M, Dale D, et al: Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. Blood 1997; 90:903.

Arguello JR, Little AM, Bohan E, et al: High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). Tissue Antigens 1998; 52:57–66.

Esta referência descreve o uso de RSCA na separação de alelos HLA-polimórficos, utilizando uma tecnologia automatizada capaz de fornecer uma rápida análise de alto desempenho do HLA, com a vantagem adicional de poupar tempo e dinheiro.

Arguello R, Avakian H, Goldman JM, et al: A novel method for simultaneous high resolution identification of HLA-A, HLA-B, and HLA-Cw alleles. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:10961.

Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. N Engl J Med 1998; 339:1186.

Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392:245.

Barger BO, Shroyer TW, Hudson SL, et al: Successful renal allografts in recipients with a positive standard, DTE negative crossmatch. Transplant Proc 1989; 21: 746.

Beatty PG, Anasetti C, Hansen JA, et al: Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: effect of mismatching for one HLA locus. Blood 1993; 81:249.

Beatty PG, Mori M, Milford E: Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. Transplant 1995; 60:778.

Beck S, Trowsdale J: Sequence organization of the Class II region of the human MHC. Immunol Rev 1999; 167:201.

Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, et al: Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA Class II region. J Immunol 1992; 148:249.

Bjorkman PJ, Parham P: Structure, function and diversity of Class I major histocompatibility complex molecules. Annu Rev Biochem 1990; 59:253.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure of the human Class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 1987; 329:506.

Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 1997; 49:297.

Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al: Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. Tissue Antigens 1999; 53:407.

Bozon MV, Delgado JC, Selvakumar A, et al: Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: Implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods. Tissue Antigens 1997; 50:387.

Brodsky FM, Lem L, Solache A, et al: Human pathogen subversion of antigen presentation. Immunol Rev 1999; 168:199.

Brooks AG, Borrego F, Posch PE, et al: Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA Class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. J Immunol 1999; 162:305.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al: Three-dimensional structure of the human Class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 1993; 364:33.

Bugawan TL, Apple R, Erlich HA: A method for typing polymorphism at the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. Tissue Antigens 1994; 44:137.

Bugawan TL, Mack SJ, Stoneking M, et al: HLA Class I allele distributions in six Pacific/Asian populations: Evidence of selection of the HLA-A locus. Tissue Antigens 1999; 53:311.

Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, et al: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 1995; 46:355.

Cadavid LF, Watkins DI: Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous populations of the Americas. Tissue Antigens 1997; 50:209.

Cairo MS, Wagner JE: Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. Blood 1997; 90:4665.

Cao K, Chopek M, Fernandez-Vina MA: High and intermediate resolution DNA typing systems for Class I HLA-A, -B, -C genes by hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). Immunogenetics 1999; 1:53.

Cardella CJ, Falk JA, Nicholson MJ, et al: Successful renal transplantation in patients with T-cell reactivity to donor. Lancet 1982; 2:1240.

Carrington M, Chadwick R, Cullen M, et al: Characterization of 12 microsatellite loci of the human MHC in a panel of reference cell lines. Immunogenetics 1998; 47:131.

Carrington M, Wade J: Selection of transplant donors based on MHC microsatellite data. Hum Immunol 1996; 50:151.

Cecka M: The UNOS scientific renal transplant registry. *In* Cecka M, Terasaki P (eds): Clinical Transplants 1998. Los Angeles, CA, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1999, p 1.

Claas FHJ, De Meester J, Witvliet MD, et al: Acceptable HLA mismatches for highly immunized patients. Rev Immunogenet 1999; 1:73.

Creput C, Le Friec G, Bahri R and et al: Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. Hum Immunol 2003; 64:1033–1038.

Cresswell P: Assembly, transport, and function of MHC Class II molecules. Annu Rev Immunol 1994; 12:259.

Crow JF: Genetics Notes, 7th ed. Minneapolis, MN, Burgess Publishing, 1976.

Crowe DO: The effect of cross-reactive epitope group matching on allocation and sensitization. Clin Transplant 2003; 17(Suppl 9):13–16.

Dausset J: The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980: The major histocompatibility complex in man. Science 1981; 213:1469.

Dausset J, Colombani J (eds): Histocompatibility Testing 1972. Copenhagen, Munksgaard, 1973.

Deeg HJ, Leisenring W, Storb R, et al: Long-term outcome after marrow transplantation for severe aplastic anemia. Blood 1998; 91:3637.

Den Haan JMM, Sherman NE, Blokland E, et al: Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. Science 1995; 268:1476.

Dupont B: Induction of a MINOR into the MAJOR league? Genomic identification of a human minor histocompatibility antigen. Tissue Antigens 1998; 52:303.

Duquesnoy RJ, Marrari M: HLAMATCHMAKER: a molecularly based donor selection strategy for highly allosensitized patients. Hum Immunol 1999; 60:S10.

Egfjord M, Jakobsen BK, Ladefoged J: No impact of cross-reactive group human leucocyte antigen class I matching on long-term kidney graft survival. Scand J Immunol 2003; 57:362–365.

Ellison MD, Bennett LE, Edwards EB, et al: Multivariate analysis of verified national data to assess the impact of HLA mismatch level on kidney graft survival. J Am Soc Nephrol 1994; 5:1003.

Engelhard VH: Structure of peptides associated with Class I and Class II molecules. Annu Rev Immunol 1994; 12:181.

Etokebe GE, Opsahl M, Tveter AK and et al: Physical separation of HLA-A alleles by denaturing high-performance liquid chromatography. Tissue Antigens 2003; 61:443–450.

Esta referência descreve a aplicação de HPLC à tarefa de identificar os alelos HLA-A polimórficos em equipamento automatizado de alto desempenho.

Foissac A, Crouau-Roy B, Faure S, et al: Microsatellites in the HLA region: an overview. Tissue Antigens 1997; 49:197.

Gao X, Moraes JR, Miller S, et al: DNA typing for Class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. V. Typing for subsets of HLA-DR1 and DR′Br′. Hum Immunol 1991; 30:147.

Geddes C, Cole E, Wade J, et al: Factors influencing long-term primary cadaveric kidney transplantation – importance of functional renal mass versus avoidance of acute rejections – the Toronto Hospital experience 1985–1997. *In* Cecka M, Terasaki P (eds): Clinical Transplants 1998. Los Angeles, CA, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1999, p 195.

Glimcher LH, Kara CJ: Sequences and factors: a guide to MHC Class-II transcription. Annu Rev Immunol 1992; 10:13.

Gorga JC: Structural analysis of Class II major histocompatibility complex proteins. Crit Rev Immunol 1992; 11:305.

Gould DS, Auchincloss H: Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. Immunol Today 1999; 20:77.

Goulmy E: Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. Immunol Rev 1997; 157:125.

Goulmy E, Schipper R, Pool J, et al: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. N Engl J Med 1996; 334:281.

Guardiola J, Maffei A: Control of MHC Class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. Crit Rev Immunol 1993; 13:247–268.

Hansen JA: Development of registries of HLA-typed volunteer marrow donors. Tissue Antigens 1996; 47:460.

Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, et al: Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1998; 338:962.

Hansen JA, Petersdorf E, Martin PJ, et al: Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors. Immunol Rev 1997a; 157:141.

Hansen JA, Yamamoto K, Petersdorf E, et al: The role of HLA matching in hematopoietic cell transplantation. Rev Immunogenet 1999; 1:81.

Hansen TH, Lee DR: Mechanism of Class I assembly with β-2 microglobulin and loading with peptide. Adv Immunol 1997b; 64:105.

Harris PE, Cortesini R, Suciu-Foca N: Indirect allorecognition in solid organ transplantation. Rev Immunogenet 1999; 1:19.

Hartzman RJ, Segall M, Bach ML, et al: Histocompatibility matching. VI. Miniaturization of the mixed leukocyte culture test: a preliminary report. Transplantation 1971; 11:268.

Hurley CK: Acquisition and use of DNA-based HLA

typing data in bone marrow registries. Tissue Antigens1997b; 49:323.
Hurley CK, Baxter-Lowe LA, Begovich AB, et al: The extent of HLA Class II allele level disparity in unrelated bone marrow transplantation: analysis of 1,259 National Marrow Donor Program donor-recipient pairs. Bone Marrow Transplant 2000b; 25:385.
Hurley CK, Maiers M, Ng J, et al: Large-scale DNA-based typing of HLA-A and HLA-B at low resolution is highly accurate, specific, and reliable. Tissue Antigens 2000a; 55:352.
Hurley CK, Tang T, Ng J, et al: HLA typing by molecular methods. *In* Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, et al (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th ed. Washington, DC, ASM Press, 1997a, p 1098.
Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, et al: A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. Hum Immunol 1999; 60:347.
Imanishi T, Akaza T, Kimura A, et al: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. *In* Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds): HLA 1991. New York, Oxford University Press, 1992, vol 1, p 1065.
Ishitani A, Sageshima N, Lee N, et al: Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. J Immunol 2003; 171:1376–1384.
Jorgensen JL, Reay PA, Ehrich EW, et al: Molecular components of T-cell recognition. Annu Rev Immunol 1992; 10:835.
Kircher B, Wolf M, Stevanovic S,et al: Hematopoietic lineage-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 in graft-versus-leukemia activity after donor lymphocyte infusion. J Immunother 2004; 27:156–160.
Kloosterboer FM, Luxemburg-Heijs SA, van Soest RA, et al: Direct cloning of leukemia-reactive T cells from patients treated with donor lymphocyte infusion shows a relative dominance of hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 specific T cells. Leukemia 2004; 18:798–808.
Kovats S, Drover S, Marshall WH, et al: Coordinate defects in human histocompatibility leukocyte antigen Class II expression and antigen presentation in bare lymphocyte syndrome. J Exp Med 1994; 179:2017.
Kwok WW, Kovats S, Thurtle P, et al: HLA-DQ allelic polymorphisms constrain patterns of Class II heterodimer formation. J Immunol 1993; 150:2263.
Lanier LL: NK cell receptors. Annu Rev Immunol 1998; 16:359.
Le Bouteiller P, Blaschitz A: The functionality of HLA-G is emerging. Immunol Rev 1999; 167:233.
Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, et al: HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA Class I signal sequences. J Immunol 1998a; 160:4951.
Lee N, Llano M, Carretero M, et al: HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. Proc Natl Acad Sci USA 1998b; 95:5199.
Leivestad T, Reisaeter AV, Brekke IB, et al: The role of HLA matching in renal transplantation: experience from one center. Rev Immunogenet 1999; 1:343.
Long EO: Regulation of immune responses through inhibitory receptors. Annu Rev Immunol 1999; 17:875.
Mach B, Steimle B, Martinez-Soria E, et al: Regulation of MHC Class II genes: lessons from a disease. Annu Rev Immunol 1996; 14:301.
Madrigal JA, Scott I, Argello R, et al: Factors influencing the outcome of bone marrow transplants using unrelated donors. Immunol Rev 1997; 157:153.
Mahoney RJ, Norman DJ, Colombe BW, et al: Identification of high- and low-risk second kidney grafts. Transplantation 1996; 61:1349.
Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, et al: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. Tissue Antigens 2002; 60:407–64.
Martin PJ: How much benefit can be expected from matching for minor antigens in allogenic marrow transplantation? Bone Marrow Transplant 1997; 20:97.
Matsunami K, Miyagawa S, Nakai R, et al: Modulation of the leader peptide sequence of the HLA-E gene up-regulates its expression and down-regulates natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis. Transplantation 2002; 73:1582–1589.
Mickelson EM, Longton G, Anasetti C, et al: Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation. Tissue Antigens 1996; 47:27.
Middleton D: History of DNA typing for human MHC. Rev Immunogenet 1999; 1:11.
Momburg F, Hammerling GJ: Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex Class I molecules. Adv Immunol 1998; 68:191.
Mori M, Beatty PG, Graves M, et al: HLA gene and haplotype frequencies in the North American population. Transplant 1997; 64:1017.
Morris P, Shaman J, Attaya M, et al: An essential role for HLA-DM in antigen presentation by Class II major histocompatibility molecules. Nature 1994; 368:551.
Mutis T, Gillespie G, Schrama E, et al: Tetrameric HLA Class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. Nat Med 1999; 5:839.
Mytilineos J, Lempert M, Scherer S, et al: Comparison of serological and DNA PCR-SSP typing results for HLA-A and HLA-B in 421 black individuals – a collaborative transplant study report. Hum Immunol 1998; 59:512.
Nepom GT, Erlich H: MHC Class-II molecules and autoimmunity. Annu Rev Immunol 1991; 9:493.
Ng J, Hurley CK, Carter C, et al: Large-scale DRB and DQB1 oligonucleotide typing for the NMDP registry: progress report from year 2. Tissue Antigens 1996; 47:21.
Nordstrom T, Ronaghi M, Forsberg L, et al: Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. Biotechnol Appl Biochem 2000; 31 (Pt 2):107–112.
Esta referência descreve a tecnologia básica do pirosequenciamento, bem como sua aplicação específica à tarefa de sequenciar e verificar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único em DNA de fita dupla.
O'Callaghan CA, Bell JI: Structure and function of the human MHC Class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. Immunol Rev 1998; 163:129.
Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. Tissue Antigens 1992; 39:225.
Opelz G, Wujciak T, Dohler B, et al: HLA compatibility and organ transplant survival. Rev Immunogenet 1999; 1:56.
Pacasova R, Martinozzi S, Bouloues HJ, et al: Cell surface expression and allogenic function of a human non-classical Class I molecule (HLA-E) in transgenic mice. J Immunol 1999; 162:5190.
Pamer E, Cresswell P: Mechanisms of MHC Class I-restricted antigen processing. Annu Rev Immunol 1998; 16:323.
Parham P, Adams EJ, Arnett KL: The origins of HLA-A, B, C polymorphism. Immunol Rev 1995; 143:141.
Parham P, Lawlor DA: Evolution of Class I major histocompatibility complex genes and molecules in humans and apes. Hum Immunol 1991; 30:119.
Paul WE, Seder RA: Lymphocyte responses and cytokines. Cell 1994; 76:241.
Payne R, Tripp M, Weigle J, et al: A new leukocyte isoantigen system in man. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1964; 29:285.
Perkins HA, Hansen JA: The US National Marrow Donor Program. Am J Pediatr Hemotol Oncol 1994; 16:30.
Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, et al: Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA Class I and II alleles in the donor and recipient. Blood 1998; 92:3515.
Petersdorf EW, Hansen JA: A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing. Tissue Antigens 1995a; 46:73.
Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al: The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. Blood 1995b; 86:1606.
Reinsmoen NL, Matas AJ: Evidence that improved late transplant outcome correlates with the development of in vitro donor antigen-specific hyporeactivity. Transplant 1993; 55:1017.
Remuzzi G, Perico N, Carpenter CB, Sayegh MH: The thymic way to transplantation tolerance. J Am Soc Nephrol 1995, 5:1639.
Rock KL, Goldberg AL: Degradation of cell proteins and the generation of MHC Class I-presented peptides. Annu Rev Immunol 1999; 17:739.
Rodey GE, Fuller TC: Public epitopes and the antigenic structure of the HLA molecules. CRC Crit Rev Immunol 1987; 7:229.
Rodey GE, Neylan JF, Whelchel JD, et al: Epitope specificity of HLA Class I alloantibodies. I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. Hum Immunol 1994; 39:272.
Rodey GE, Revels K, Fuller TC: Epitope specificity of HLA Class I alloantibodies. II. Stability of cross-reactive group antibody patterns over extended time periods. Transplantation 1997; 63:885.
Rosenthal AS, Shevach EM: Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J Exp Med 1973; 138:1194.
Rozemuller EH, Tilanus MGJ: A computerized method to predict the discriminatory properties for Class II sequencing based typing. Hum Immunol 1996; 46:27.
Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Blood 1999; 94:333.
Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239:487.
Sanfilippo FP, Vaughn WK, Pilers TH, et al: Factors affecting the waiting time of cadaveric kidney transplant candidates in the United States. JAMA 1992; 267:247.
Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, et al: Effect of matching of Class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. N Engl J Med 1998; 339:1177.
Sayegh MH, Carpenter CB: Role of indirect allorecognition in allograft rejection. Int Rev Immunol 1996; 13:221.
Scheltinga SA, Johnston-Dow LA, White CB, et al: A generic sequencing based typing approach for the identification of HLA-A diversity. Hum Immunol 1997; 57:120.
Shaw S, Kavathas P, Pollack MS, et al: Family studies define a new histocompatibility locus, SB, between HLA-DR and GLO. Nature 1981; 293:745.
Shiina T, Tamiya G, Oka A, et al: Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC Class I region. Immunol Rev 1999; 167:193.
Simpson E, Roopenian D, Goulmy E: Much ado about minor histocompatibility antigens. Immunol Today 1998; 19:108.
Singer DS, Maguire J: Regulation of the expression of Class I MHC genes. CRC Crit Rev Immunol 1990; 10:235.
Snell GD: Studies in histocompatibility. Science 1981; 213:172.
Stern LJ, Wiley DC: Antigenic peptide binding by Class I and Class II histocompatibility proteins. Structure 1994; 2:245.
Storb R, Yu C, McSweeney P: Mixed chimerism after transplantation of allogeneic hematopoietic cells. *In* Thomas D, Blume KG, Forman SJ (eds): Hematopoietic Cell Transplantation, 2nd ed. Oxford, Blackwell Science, 1999, p 287.
Suciu-Foca N, Harris PE, Cortesini R: Intramolecular and intermolecular spreading during the course of organ allograft rejection. Immunol Rev 1998; 164:241.
Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB: Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. Am J Kidney Dis 1996; 28:159.
Sutton VR, Kienzle BK, Knowles RW: An altered splice site is found in the *DRB4* gene that is not expressed in HLA-DR7, Dw11 individuals. Immunogenetics 1989; 29:317.
Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumni C, et al: Proteosomes and antigen processing. Adv Immunol 1997; 64:1.
Terasaki PI, Takemoto S, Park MS, et al: HLA epitope matching. Transfusion 1992; 32:775.
Thorsby E, Piazza A: Joint Report II. Typing for HLA-D

determinants (LD-1 or MLC). *In* Kissmeyer-Nielsen F (ed): Histocompatibility Testing. Copenhagen, Munksgaard, 1975, p 414.

Todd JA, Bell JI, McDevitt HO: HLA-DQβ gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 1987; 329:599.

Tseng L-H, Lin M-T, Martin PJ, et al: Definition of the gene encoding the minor histocompatibility antigen HA-1 and typing for HA-1 from genomic DNA. Tissue Antigens 1998; 52:305.

Uematsu Y, Fischer-Lindahl K, Steinmetz M, et al: The same recombinational hot spots are active in crossing-over between wild/wild and wild/inbred mouse chromosomes. Immunogenetics 1988; 27:96.

Valiante NM, Uhrber M, Shilling HG, et al: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. Immunity 1997; 7:739.

Van Ham SM, Tjin EPM, Lillemier BF, et al: HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM mediated MHC Class II peptide loading. Curr Biol 1997; 7:950.

Van Rood JJ: HLA and I. Annu Rev Immunol 1993; 11:1.

Wade JA, Hurley CK, Hastings A, et al: Combinational diversity in DR2 haplotypes. Tissue Antigens 1993; 41:113.

Watts C: Capture and processing of exogenous antigens for presentation of MHC molecules. Annu Rev Immunol 1997; 15:821.

Wilke M, Pool J, den Haan JMM, et al: Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR. Tissue Antigens 1998; 52:312.

Williams F, Mallon E, Middleton D: Development of PCR-SSOP for HLA-A typing of bone marrow registry donors. Tissue Antigens 1997; 49:61.

Yu N, Ohashi M, Alosco S, et al: Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies. Tissue Antigens 1997; 50:380.

Zinkernagel RM: Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. Biosci Rep 1997a; 17:91.

Zinkernagel RM: The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. Scand J Immunol 1997b; 46:421.

CAPÍTULO 48

O complexo principal de histocompatibilidade e as doenças

Julio C. Delgado, M.D., Edmond J. Yunis, M.D.

Introdução 1021

Revisão da sequência de DNA codificadora do complexo principal de histocompatibilidade humano 1022

Genes na região não HLA ou região de classe III 1022
- Genes do fator de necrose tumoral e da linfotoxina α e β 1023
- Genes da proteína do choque térmico 70 (HSP70) 1023
- Genes *C2, C4* e *FB* 1023
- Tipagem de *C2, C4* e *FB* 1024
- Associação entre doenças e os genes *C2, C4* e *FB* 1024
- Haplótipos do complemento (complótipos) 1025

Haplótipos estendidos 1025

Associações entre MHC e doenças 1027
- Hemocromatose hereditária e gene *HFE* 1027
  - Hiperplasia suprarrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase 1028

Doenças específicas sem evidência de herança mendeliana e associadas ao MHC 1028
- Diabetes de tipo 1 1028
- Artrite reumatoide 1029
- Infecção pelo HIV-1 e progressão da AIDS 1029
- Tuberculose 1029

Métodos para detecção de associações ou ligações entre doenças e marcadores genéticos 1029
- Polimorfismo genético 1029
- Frequências genotípicas e fenotípicas 1029
- Força da associação 1030
- Análise de modo de herança baseada em pares de irmãos 1030
- Análise de modo de herança baseada em estudos populacionais 1030
- Método *lod score* 1030

Resumo 1031

Referências bibliográficas 1031

PONTOS-CHAVE

- A região genômica correspondente ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *main histocompatibility complex*) contém vários genes com funções imunorrelacionadas.
- A recente identificação de vários genes junto ao MHC ampliou as possibilidades de definição das bases genéticas da imunidade.
- É provável que o agrupamento de genes imunorrelacionados na região do MHC não seja uma mera coincidência, e sim o resultado de forças evolutivas unindo genes com funções semelhantes.
- O MHC está associado a mais doenças do que qualquer outra região no genoma humano.
- Associações não aleatórias de estiramentos fixos do DNA do MHC complicam o estudo dos genes determinantes da suscetibilidade, mas também proporcionam meios para sua identificação.
- Existem métodos para detectar as associações ou ligações existentes entre os polimorfismos encontrados no MHC e as doenças.
- Embora as proteínas de classes I e II codificadas sejam diferenciadas por meio das similaridades estruturais e funcionais compartilhadas pelos membros de cada classe, as moléculas de classe III somente podem ser definidas como não I e não II, porque seus genes e os respectivos produtos não apresentam características comuns nem são reconhecidos pelas células T.
- Apesar dos convincentes estudos genéticos mostrando a importância da região de classe III tanto na saúde como na doença, nenhum gene responsável pela doença e também nenhum mecanismo patológico são conhecidos para muitas das condições associadas.
- Quase metade dos genes junto à região do MHC de classe III atua no sistema imune inato, incluindo membros da cascata de fixação do complemento (C4, C2 e fator B [FB]) e da família do fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*).
- A deficiência do segundo componente do sistema complemento foi descrita somente em caucasianos, entre os quais representa o estado mais comum de deficiência de proteínas do complemento.
- A deficiência completa de C4 é uma condição extremamente rara. Os níveis de C4 no soro de pacientes portadores de alelos *nulos* de *C4* são bastante variáveis e não podem ser utilizados de modo confiável para detectar indivíduos heterozigotos para deficiência completa em razão da falta de correlação entre os níveis de *C4* e o número de genes C4 expressos.
- Haplótipos estendidos são altamente característicos de um subgrupo étnico e apresentam frequências menores ou até mesmo não ocorrem em nenhum dos outros grupos étnicos.
- É essencial conhecer a distribuição étnica de um alelo de MHC associado à doença, a fim de avaliar se nos pacientes a expressão desse alelo está aumentada em relação àquela observada em populações controle etnicamente pareadas, e se de fato trata-se de um marcador verdadeiro da distribuição étnica da doença.
- Um dos principais problemas com as associações que envolvem genes do MHC é a sua penetrância incompleta. Essa característica dificulta bastante e, às vezes, impossibilita os estudos sobre ligação e segregação formal comum.

Introdução

A compreensão do papel exercido pelo MHC na resposta imune e na patogênese de doenças requer a definição de polimorfismos existentes nas regiões das classes I e II, bem como dos genes situados na região central do MHC, por vezes denominada região não HLA ou região da classe III. É preciso destacar desde o início que existem regiões no DNA onde as recombinações ocorrem com frequência maior do que a esperada (i. e., no intervalo *HLA-DR* a *HLA-DP*). É particularmente importante o fato de haver constelações de DNA, ou DNA fixo, em que as recombinações são eventos raros. As duas constelações principais são a do complemento, localizada na região central, e a do *HLA-DR* e *DQ*, situada na região de classe II. Além disso, a análise dos haplótipos do MHC em diversas populações permitiu a identificação de uma proporção considerável de indivíduos que apresentam haplótipos específicos de grupos étnicos que parecem ser idênticos quanto ao intervalo *HLA-B* a *HLA-DR* e *DQ*. Esses haplótipos, conhecidos como haplótipos estendidos, devem ser considerados como unidades genéticas fixas que, aliadas às variantes do MHC neles ausentes, podem ajudar a compreender as respostas imunológicas e a associação às doenças. As variantes dos genes codificadores das classes I e II são detalhadas no Capítulo 47. No presente capítulo, são discutidos os genes não HLA, haplótipos estendidos, associações com doenças e métodos para detecção da associação existente entre as doenças e os marcadores genéticos.

Revisão da sequência de DNA codificadora do complexo principal de histocompatibilidade humano

Não surpreende o fato de a conclusão do sequenciamento do segmento de DNA correspondente ao MHC ter precedido a conclusão do sequenciamento de todo o genoma humano em quase quatro anos (MHC Sequencing Consortium, 1999). A pressa em completar o sequenciamento do MHC vinha da necessidade de compreender a biologia e a genética do MHC murino (H-2) e das regiões codificadoras do antígeno leucocitário humano (HLA, *human leucocyte antigen*). Tais conhecimentos foram obtidos inicialmente por meio de experimentos realizados em camundongos endógamos e de tipagem sorológica (revisados por Klein, 1986). Embora o MHC tenha sido descoberto há mais de 50 anos, sua natureza somente foi compreendida ao longo das duas últimas décadas, com o advento da clonagem de DNA e a descoberta da estrutura das moléculas de classes I e II (Bjorkman, 1987; Brown, 1993).

O MHC, cujos genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6, abrange cerca de 4 Mb e contém em torno de 200 *loci* identificados. É, sem dúvida, a região mais geneticamente densa do genoma humano sequenciada até o momento (revisado por Beck, 2000). Essa região também codifica as moléculas de classes I e II, que são as proteínas humanas mais polimórficas, algumas das quais possuindo mais de 500 variantes alélicas já identificadas (Marsh, 2004). Mais de 40% dos *loci* totalmente expressos na região do MHC foram associados a funções imunorrelacionadas. Esse agrupamento de genes imunorrelacionados na região do MHC talvez não seja mera coincidência, mas sim o resultado da ação de forças evolutivas que uniram os genes com funções semelhantes.

Tradicionalmente, a região do MHC é dividida em três sub-regiões, desde o telômero até o centrômero: HLA de classe I, não HLA de classe III e HLA de classe II. As funções dos genes codificadores do HLA de classes I e II foram expostas detalhadamente no capítulo anterior. Aqui, o foco será na abordagem da região do MHC de classe III e, em seguida, serão retomados os genes do HLA de classes I e II quando as associações com doenças forem discutidas.

Genes na região não HLA ou região de classe III

O MHC humano de classe III, ou região do MHC central, está localizado entre as regiões de classes I e II e constitui a região de maior densidade de genes em todo o genoma humano. Especificamente, a região do MHC de classe III contém cerca de 60 genes em uma sequência de ≈ 700 kb, sendo que o tamanho médio dos genes é ≈ 8,5 kb (Xie, 2003). Em comparação, o genoma humano inteiro contém em média menos de 11 genes/Mb e o tamanho médio dos genes varia de 27 a 45 Mb (Lander, 2001; Heilig, 2003). Embora as proteínas de classes I e II codificadas sejam diferenciadas por meio das similaridades estruturais e funcionais compartilhadas pelos membros de cada classe, as moléculas de classe III somente podem ser definidas como não I e não II, pois seus genes e respectivos produtos não apresentam características em comum nem são reconhecidos pelas células T. A região correspondente à classe III foi inteiramente analisada por eletroforese em gel de campo pulsado e por clonagem, utilizando cromossomo de levedura artificial e vetores cosmídeos (Dunham, 1987; Sargent, 1989; Spies, 1989; Kendall, 1990; Ragoussis, 1991; Xie, 2003). A Figura 48.1 mostra um mapa genético dessa região.

Apesar dos convincentes estudos genéticos mostrando a importância da região de classe III, tanto na saúde como na doença, nenhum gene responsável pela doença e também nenhum mecanismo patológico é conhecido para muitas das condições associadas. Uma razão para isso é o conhecimento incompleto das funções de quase 50% dos genes localizados na região do MHC de classe III. Recentemente, empregou-se um sistema di-híbrido de leveduras de alto rendimento com o intuito de analisar a função de 27 proteínas intracelulares codificadas por genes situados na região do MHC de classe III (Lehner, 2004). O sistema di-híbrido de leveduras de alto rendimento é um método que consiste na identificação *in vivo* da interação proteína-proteína por meio da reconstituição da atividade de um ativador de transcrição (Fields, 1989). Esse método se baseia nas propriedades da proteína GAL4, que é constituída por domínios separáveis responsáveis pela ligação ao DNA e ativação transcricional (Fields, 1989). Plasmídeos codificadores de duas proteínas híbridas – uma proteína constituída pelo domínio de ligação de DNA da GAL4 fundido a uma proteína X, e outra proteína formada pelo domínio de ativação da GAL4 fundido a uma proteína Y – são construídos e introduzidos em uma levedura. Assim, uma interação putativa entre as proteínas X e Y levaria à ativação transcricional de um gene *reporter* contendo um sítio de ligação para GAL4 (Chien, 1991). Notavelmente, esse estudo revelou que cerca de 1/3 das proteínas analisadas que eram codificadas por genes da região do MHC de classe III provavelmente atuavam no processamento do mRNA. Isso sugere, mais uma vez, o agrupamento de genes funcionalmente relacionados nessa região do genoma humano. Especificamente, quatro das proteínas codificadas na região do MHC de classe III (LSM2, UAP56, DOM3z e SKIV2L) são ortólogas às proteínas da levedura envolvidas no processamento de mRNA, enquanto outras cinco proteínas (BAT2, STK19, CLIC1, PBX2 e BAT5) interagem com as proteínas previamente implicadas no processamento do RNA. Constatou-se que três proteínas (STK19, PBX2 e NELF-E ou RDBP) interagem com as proteínas envolvidas na regulação transcricional.

A região mais próxima aos genes codificadores de classe II contém vários genes, entre os quais o *NOTCH-4*, que integra a família de proteínas sinalizadoras NOTCH. Várias tentativas foram feitas para estabelecer uma associação entre essas proteínas e a esquizofrenia (Skol, 2003; Wassink, 2003) e a alopécia areata (Tazi-Ahnini, 2003). O gene *TNXB* codifica a tenascina-X, uma grande proteína da matriz extracelular expressa em tecidos conjuntivos. Mutações afetando o gene *TNXB* podem causar a síndrome de Ehlers-Danlos (Burch, 1997). Recentemente, polimorfismos de *TNXB* também foram associados a esquizofrenia (Wei, 2004). Próximo ao *NOTCH-4* está o *RAGE* (gene que codifica o receptor de produtos finais da glicosilação avançada), integrante da superfamília das imunoglobulinas (IgSF). As mutações em ambos os genes *RAGE* murinos são importantes na pesquisa sobre o choque séptico (Liliensiek, 2004).

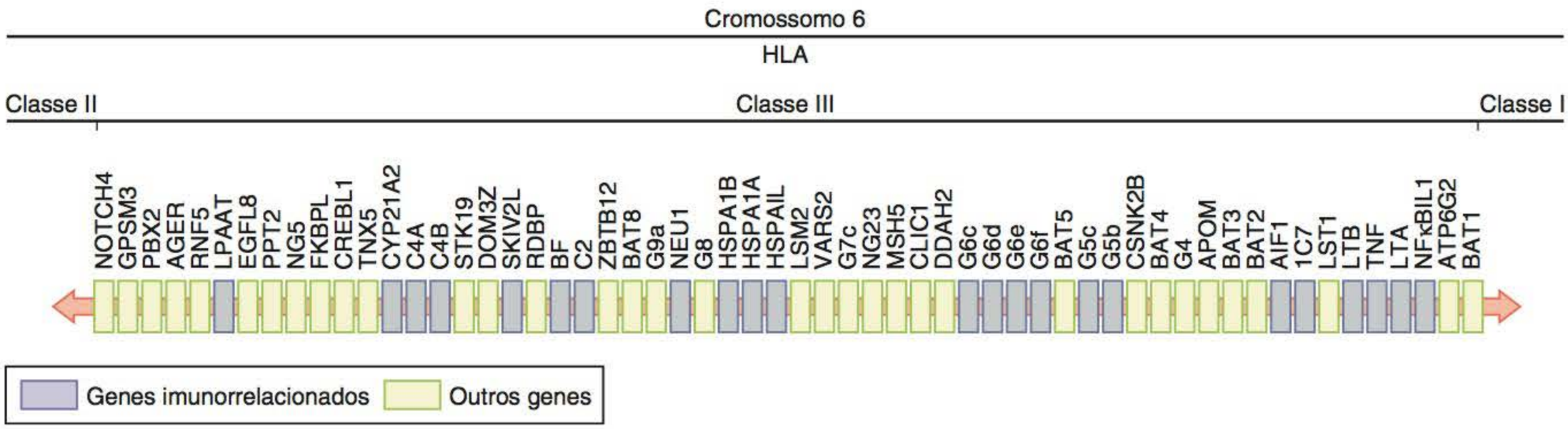


Figura 48.1 Mapa genético da região de classe III do complexo principal de histocompatibilidade. São ilustrados 58 genes em ordem, porém fora da escala, desde o centrômero até o telômero. Os genes que representam "*loci* imunológicos" são assinalados por retângulos azuis.

Conforme dito, quase metade dos genes localizados na região do MHC de classe III atua no sistema imune inato, incluindo os genes de componentes da cascata de fixação do complemento (*C4*, *C2* e *FB*) e da família do TNF, que são discutidos mais detalhadamente adiante, neste capítulo. Três outros membros das IgSF também estão localizados na região do MHC de classe III: o gene *1C7* e os genes menos caracterizados *G6f* e *G6b*. O gene *1C7*, localizado entre *LST1* e *LTB*, codifica a proteína NKp30, que é responsável pelo desencadeamento da atividade das células NK (Pende, 1999) e está especificamente envolvida na ação destrutiva das células dendríticas (Ferlazzo, 2002). O gene *NFKBIL1* (análogo do inibidor do NF-IB) também está localizado nessa região (Albertella, 1994). Recentemente, a proteína NFKBIL1 tem sido alvo de muito interesse, depois que um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) na região promotora de seu gene foi associado a artrite reumatoide (Okamoto, 2003). É provável que outros genes imunorrelacionados (p. ex., membros da família LY6, LST1 e AIF1) atuem no controle imunoinflamatório (Holzinger, 1995; Utans, 1995; Ribas, 1999). Por fim, os genes codificadores da enzima microssomal esteroide P450 21-hidrolase (*CYP21*) e três membros da principal família de proteínas do choque térmico 70 também estão contidos na região do MHC de classe III e serão discutidos posteriormente.

Genes do fator de necrose tumoral e da linfotoxina α e β

O TNF e as linfotoxinas α (LTα) e β (LTβ) são poderosas citocinas imunomoduladoras produzidas em resposta a estímulos inflamatórios. As proteínas TNF e LTα são, cada qual, codificadas por genes distintos (*TNF* e *LTA*) e compartilham cerca de 34% da identidade de aminoácidos (Carroll, 1987). O TNF e a LTα são mantidos como moléculas de superfície celular ou liberados pelas células. A LTα fica retida na superfície celular, por meio de uma região *transmembrana*. O TNF de superfície não resulta da presença de uma região *transmembrana*, e sim de uma associação com a LTβ (Browning, 1993). Esta, codificada pelo gene *LTB*, apresenta 21 e 24% de identidade de aminoácidos com o TNF e a LTα, respectivamente.

Até o momento, foram identificados diversos polimorfismos envolvendo o promotor do TNF, localizados nos nucleotídeos –1.030, –862, –856, –574, –375, –307, –243, –237 e +70, em relação ao sítio de início da transcrição (Wilson, 1992; Brinkman, 1994; D'Alfonso, 1994; Hamann, 1995; Zimmerman, 1996; Higuchi, 1998; Uglialoro, 1998). As endonucleases EcoRI e NcoI revelaram a existência de padrões polimórficos junto ao gene *LTA* (Partanen, 1988; Messer, 1991). O sítio polimórfico para a enzima EcoRI está situado no éxon 4, enquanto o sítio para NcoI foi mapeado no primeiro íntron do gene LTA. Sequências de DNA consistindo de microssatélites ou repetições TC/GA ou AC/GT de comprimentos variáveis junto à região correspondente ao gene *TNF* foram identificadas por sequenciamento em gel de poliacrilamida (Nedospasov, 1991). Existem cinco microssatélites: os *TNFa* e *TNFb* estão localizados a 3,5 kb teloméricos do gene *LTA*, e foram identificados 7 e 13 alelos, respectivamente, para *TNFa* e *TNFb*. O microssatélite *TNFc* está dentro do íntron 1 do gene LTA e possui 2 alelos. Os microssatélites *TNFd* e *TNFe*, também localizados no íntron 1, possuem 7 e 3 alelos, respectivamente (Jongeneel, 1991).

Ao longo da década passada, os *loci TNF* foram centro de grande atenção no que se refere à relevância dos polimorfismos apresentados por seu promotor na suscetibilidade a várias doenças autoimunes e infecciosas. Esse trabalho continua sendo controverso no âmbito genético e também, mais significativamente, no que se refere à relevância funcional. Conforme demonstrado recentemente para alguns dos SNPs no promotor do *TNF*, essas variações genéticas podem ser marcadores étnico-específicos de outros fatores associados e ainda não identificados, que exercem impacto sobre a resposta imune do hospedeiro no desenvolvimento de doenças autoimunes e na suscetibilidade ou resistência a doenças infecciosas em uma dada população (Delgado, 2002). Os polimorfismos na região promotora do *TNF* foram correlacionados, em estudos populacionais de larga escala, com: malária cerebral (McGuire, 1994), artrite reumatoide (Criswell, 2004), doença cardíaca coronária (Nicaud, 2002), diabetes de tipo 2 (Heijmans, 2002; Kubaszek, 2003), doença de Alzheimer (McCusker, 2001), espondilite anquilosante (McGarry, 1999), mortalidade no choque séptico (Mira, 1999) e leishmaniose mucocutânea (Cabrera, 1995). Os microssatélites de TNF *d3* e *d4* foram observados mais frequentemente em duas populações distintas que apresentavam agranulocitose induzida por clozapina (Turbay, 1997). Outros microssatélites de TNF foram associados à artrite reumatoide (Mu, 1999) e ao lúpus eritematoso sistêmico (Sturfelt, 1996). Com relação aos polimorfismos em *LTA*, análises em larga escala estabeleceram uma ligação entre os SNPs nas regiões promotora e codificadora do gene *LTA* e o infarto do miocárdio (Ozaki, 2002, 2004).

Genes da proteína do choque térmico 70 (HSP70)

As proteínas do estresse, ou proteínas do choque térmico (HSP, *heat shock proteins*), são expressas em reposta à atuação de uma variedade de estímulos de estresse sobre as células. Essa resposta foi observada em todas as espécies já avaliadas até o momento. A família de proteínas do estresse cujo tamanho é 70 kDa é caracterizada por uma sequência de aminoácidos de alta identidade, que está presente desde nos eucariontes primitivos até nos seres humanos. Vários estudos identificaram os *loci* da proteína do choque térmico 70 (HSP70) nos cromossomos 6, 14 e 21, bem como em pelo menos 1 cromossomo autossômico diferente (Hunt, 1985; Sargent, 1989). Três genes codificadores dos membros da família HSP70 estão localizados em posição telomérica ao *locus C2* (*HSPA1L*, *HSPA1A* e *HSPA1B*, anteriormente conhecidos como *HSP70-Hom*, *HSP70-1* e *HSP70-2*, respectivamente).

A análise da sequência dos genes *HSPA1A* e *HSPA1B* revelou que eles não possuem íntrons e codificam um produto proteico idêntico constituído por 641 aminoácidos. O gene *HSPA1L*, que também não possui íntrons e codifica a proteína de 641 aminoácidos, apresenta uma sequência com 90% de identidade em relação ao *HSPA1A* (Milner, 1990). Em razão do alto grau de similaridade de sequências existente entre as regiões codificadoras dos vários genes *HSP70*, as sondas de DNA correspondentes às regiões codificadoras tendem a apresentar hibridização cruzada. Contudo, as diferenças sequenciais existentes entre as regiões 5' e 3' não traduzidas são suficientes para desenvolver iniciadores e sondas de oligonucleotídeos que possibilitem realizar a amplificação e hibridização dos três genes de maneira específica (Milner, 1992).

Foram detectadas 3 substituições de nucleotídeos na extremidade 5' flanqueadora e em regiões não traduzidas de *HSPA1A*: uma transversão A–C na posição –110, uma transição T–C na posição +120 e uma transversão G–C na posição +190. Variações nas posições –110 e +120 influenciam a mobilidade na eletroforese em gel de poliacrilamida. Três formas alélicas foram identificadas: *HSPA1A A* (lenta), *B* (rápida) e *C* (intermediária). Sondas de oligonucleotídeos que contêm as variações de sequência nas posições –110 e +120 também permitem detectar esses 3 alelos após a amplificação específica do gene *HSPA1A* por PCR.

No gene *HSPA1B*, uma transição G-A na posição 1.267 resulta na perda de um sítio de restrição *Pst 1*. A hibridização do DNA digerido de *Pst 1* com uma sonda de *HSP70* produz um fragmento polimórfico de DNA com comprimento de 8,5 kb ou 9 kb. Recentemente, foi identificada uma transição C–T na posição –179 do *HSPA1B* (Temple, 2004). No gene *HSPA1L*, ocorre uma transição T–C na posição 2.437, junto ao sítio de restrição de *Nco1*, com formação de dois fragmentos alélicos de 1,5 kb e 0,5 kb.

Ultimamente, o grupo do gene *HPS70* tem chamado atenção graças a um estudo que associou ambos os *loci*, *HSPA1L* e *HLA-B*5701*, a hipersensibilidade ao fármaco antirretroviral abacavir (Martin, 2004). Outros polimorfismos envolvendo os genes *HSP70* foram correlacionados a resposta de citocinas no trauma (Schroder, 2003), doença de Parkinson (Wu, 2004) e risco de agranulocitose induzida por clozapina em judeus de Ashkenazi (Corzo, 1995).

Genes *C2*, *C4* e *FB*

Os genes *C2*, *C4* e *FB* codificam proteínas que exercem um papel importante na ativação do sistema complemento e, portanto, são componentes essenciais da imunidade inata e também da adaptativa. As proteínas C2, C4 e FB são codificadas em uma região de 120 kb do DNA genômico, a cerca de 300 kb do gene *HLA-DR* e a 600 kb do gene *HLA-B* (Carroll, 1984). *C2* e *FB* apresentam identidade considerável em termos de sequência de aminoácidos, além de compartilharem diversas características físico-químicas e funcionais. Isso sugere que ambos os genes

surgem a partir de uma duplicação em tandem de um gene ancestral análogo ao gene *FB*. Ambas são serina proteases (integrantes da família SERPIN de proteínas plasmáticas) e mediam a clivagem de C3 durante a ativação de suas respectivas vias do complemento. Por outro lado, C4 apresenta correlação estrutural e funcional com C3 e C5. Além disso, como contém um tioéster interno altamente reativo, também está relacionado à α_2-macroglobulina, que é um inibidor de C3 e de proteases.

Tipagem de *C2, C4* e *FB*

As proteínas C2, C4 e FB, codificadas na região do MHC de classe III, apresentam variações estruturais hereditárias que podem ser estudadas utilizando-se técnicas para detecção de diferenças de carga líquida de superfície devidas a diferenças de aminoácidos. São empregados dois métodos para separar essas proteínas: (1) eletroforese de alta voltagem em gel de agarose, que detecta variações de mobilidade produzidas pelas diferenças de carga observadas entre as proteínas em um dado pH; e (2) focalização isoelétrica em géis de poliacrilamida de camada delgada, que revelam suas diferenças em termos de pontos isoelétricos. As proteínas podem ser visualizadas por imunofixação eletroforética (com base no uso da insolubilidade dos complexos antígeno-anticorpo) ou pela detecção de atividade hemolítica funcional em camadas sobrepostas de géis, em que eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpo são combinados a um soro deficiente em complemento (Alper, 1983).

No nível proteico, a focalização isoelétrica mostra que C2 apresenta polimorfismos mínimos. Os alelos para C2 são *C* (comum) e, menos comumente, *B* (básico) que, por sua vez, apresenta três formas variantes básicas raras e quatro variantes ácidas (*A*) raras (Jahn, 1990). O sítio polimórfico para o alelo *C2*B* é transportado pelo fragmento C2a. A proteína C2 é geneticamente polimórfica em uma ampla variedade de grupos étnicos, embora *C2*C* corresponda aos genes *C2* em mais de 90% dos casos, na maioria das populações (Alper, 1976; Meo, 1977). Nas populações caucasianas e asiáticas, o alelo *C2*B* corresponde aos genes *C2* em 5 a 10% dos casos. Há ainda um alelo não expresso (*C2*QO*), encontrado em 2% da população europeia caucasiana (Truedsson, 1993a). Para a tipagem de *C2*, as proteínas são isoladas por focalização isoelétrica em géis de poliacrilamida e visualizadas por hemólise C2-induzida em géis sobrepostos. O soro humano normal diluído pode substituir o soro deficiente em C2 como reagente, uma vez que C2 é o fator limitante na via clássica do complemento.

Existem dois *loci* distintos – porém, intimamente relacionados – de genes codificadores da proteína C4 (*C4A* e *C4B*). É provável que esses *loci* resultem de uma duplicação em tandem de um gene codificador das duas formas de C4. A genética de *C4* é extraordinariamente complexa, não só ao nível genético como também ao nível proteico. Foi demonstrado que, em seres humanos, o número de genes *C4* varia entre 2 a 6, podendo chegar a 8 genes em casos excepcionais (Chung, 2002). Três quartos dos genes *C4* carregam sequências endógenas de retrovírus que podem conferir proteção intrínseca contra infecções por retrovírus exógenos (Schneider, 2001). Dados recentes sugerem a existência de uma correlação negativa entre a presença de sequências endógenas de retrovírus e os níveis de proteínas C4, bem como uma relação direta entre o número de genes e os níveis de proteína C4 (Yang, 2003).

Ao nível proteico, C4A e C4B diferem apenas em 4 resíduos de aminoácidos na cadeia α, entre as posições 1.101 e 1.106. C4B é várias vezes hemoliticamente mais ativo que C4A. Este, contudo, é mais ativo do que C4B em termos de inibição da formação e dissolução de imunocomplexos. As variantes de C4A geralmente carregam determinantes antigênicos de Rodgers (um epítopo Val-Asp-Leu-Leu da cadeia C4A), enquanto as variantes de C4B carregam determinantes Chido (um epítopo Ala-Asp-Leu-Arg da cadeia α de C4B). Existem extensos polimorfismos genéticos detectáveis nas proteínas C4A e C4B entre as populações, com mais de 35 variantes observadas por eletroforese em gel de agarose e por métodos de tipagem baseados em DNA (Awdeh, 1980; Sim, 1986; Schneider, 1996; Hui, 2004). Entre os alótipos *C4A* e *C4B*, os alelos mais comuns são *C4A*3* e *C4B*1*. *C4A*4*, *C4A*2*, *C4B*2* e *C4B*5* apresentam distribuição geral no mundo inteiro. *C4A*6* também é observado em muitas populações, exceto em alguns grupos mongoloides. *C4B*3* é identificado principalmente em grupos africanos e caucasianos.

A tipagem de C4 requer o uso combinado de várias técnicas: (1) imunofixação eletroforética após tratamento com neuraminidase. Os padrões produzidos mostram a presença de três bandas de cada variante com certo grau de sobreposição entre algumas variantes. O tratamento adicional da amostra com carboxipeptidase reduz cada variante a uma única banda. (2) A detecção de C4A *versus* C4B pelo ensaio hemolítico funcional. Esse método distingue os padrões sobrepostos de C4A ou C4B, pois as variantes de C4B apresentam atividade hemolítica 5 a 10 vezes maior do que as variantes C4A. (3) Reatividade sorológica de Rodgers (C4A) ou Chido (C4B). O soro é incubado com anti-Rogers humano ou anti-Chido, humano para testar o grau de inibição da aglutinação utilizando-se eritrócitos positivos apropriados. Alternativamente, as variantes de C4 podem ser tipificadas para reatividade de Rogers ou Chido, por meio de *immunoblotting*. Existem duas maneiras de detectar alelos nulos de *C4* heterozigotos. A eletroforese de amostras contendo C4 nulo (*C4A QO* e *C4B QO*) revela ausência das bandas em casos de homozigose. Para os casos de heterozigose, contudo, é necessário fazer a quantificação por inspeção visual, imunoeletroforese cruzada ou varredura densitométrica dos padrões de imunofixação. Um método alternativo consiste em determinar a presença e as proporções de cadeias α de C4A e C4B, após a análise dos imunoprecipitados por eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato sódico de dodecila. Mais recentemente, para complementar a alotipagem inconclusiva de proteínas C4A e C4B, têm sido empregados métodos de tipagem baseados no DNA, incluindo a amplificação de iniciador de sequência específica (SSP, *sequence-specific primer*), análise dos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*) e sequenciamento direto do DNA (revisado por Schneider, 2003).

O FB é sintetizado pelo gene *FB*. O FB humano é altamente polimórfico e, até o momento, foram identificados mais de 20 variantes, entre as quais diversas proteínas disfuncionais, proteínas presentes em baixas concentrações e alelos nulos. A tipagem do FB normalmente é realizada combinando-se a eletroforese em agarose e/ou focalização isoelétrica ao nível proteico, com a análise de PCR ao nível do DNA (Geserick, 1998). Empregando esses métodos, é possível identificar dois alelos bastante comuns (*BF*F* e *BF*S*), dois alelos menos comuns (*BF*F1* e *BF*S1*) e uma gama de alelos raros. As variantes são nomeadas de acordo com a migração da fração decimal no gel eletroforético: BF F a BF F1 designam as variantes que apresentam migração mais rápida, enquanto BF S a BF S1 são as designações atribuídas às variantes mais lentas. Nas populações caucasianas europeias, as frequências de *BF*F* e *BF*S* são iguais a 0,2 e 0,77, respectivamente, enquanto as frequências de *BF*F1* e *BF*S1* são ambas iguais a 0,01, e os alelos raros representam apenas 0,002. *BF*S* é mais comum em populações caucasianas, mongoloides e australoides, enquanto *BF*F* é mais frequente em populações negroides. *BF*F1* é observado em grupos africanos e também em algumas populações caucasianas.

Associação entre doenças e os genes *C2, C4* e *FB*

A deficiência do segundo componente do sistema complemento foi relatada apenas em caucasianos, sendo o estado de deficiência proteica do complemento mais comum nessa população (Silverstein, 1960; Klemperer, 1966). Indivíduos que apresentam deficiência total de C2 são homozigotos para alelos nulos de C2 (*C2*Q0* para quantidade igual a zero). *C2*Q0* resulta da deleção de um gene de 28 pb que gera uma *frame shift* e um códon de parada a 14 pb distalmente à extremidade do éxon 6 (Johnson, 1992). Notavelmente, *C2*Q0* apresenta uma frequência genética aproximada igual a 0,01 entre os caucasianos. Em raras ocasiões, a deficiência de C2 resulta de mutações de sentido incorreto (*missense*) que levam ao comprometimento da secreção de C2, denominada deficiência de C2 de tipo II (Wetsel, 1996). Embora a deficiência de C2 possa causar doença, a maioria dos pacientes permanece assintomática. Até 25% dos indivíduos homozigotos para deficiência de C2 apresentam suscetibilidade aumentada a infecções bacterianas, em decorrência de uma suposta resposta de anticorpos anormal (Densen, 1991; Alper, 2003). Entre 20 a 40% dos casos de deficiência de C2 relatados apresentam doença similar ao lúpus sistêmico (Truedsson, 1993b; Sullivan, 1994).

Há uma elevada incidência de alelos *nulos* de *C4* na população em geral. *C4A*Q0* e *C4B*Q0* resultam de deleções genéticas, códons de parada prematuros e outras mutações que resultam em falha de transcrição (Braun, 1990; Lokki, 1999). Trinta e cinco por cento dos indivíduos de todas as raças não expressam um gene *C4A* ou *C4B* (i. e., possuem *C4A*Q0* ou *C4B*Q0*), 8 a 10% possuem dois alelos nulos, e pouco menos de 1% dos indivíduos não expressam três alelos. Os haplótipos para a deficiência de C4 total (trans *C4A*Q0* e *C4B*Q0*) são extremamente raros (Hauptmann, 1986). O alelo *C4A*Q0*, particularmente em indivíduos homozigotos ou com deficiência total de C4, foi associado ao lúpus eritematoso sistêmico ou discoide (Dunckley, 1987; Nousari, 1999). É provável que essa suscetibilidade esteja relacionada ao manejo inadequado dos imunocomplexos (Fielder, 1983). Entre crianças homozigotas para *C4B*Q0*, a incidência de meningite bacteriana é 3,5 vezes maior (Colten, 1992). Os níveis séricos de C4 de pacientes que possuem alelos *nulos* de *C4* é extremamente variável e não pode ser utilizado de maneira confiável na detecção de indivíduos heterozigotos para a deficiência completa, pois não há correlação entre os níveis de C4 e o número de genes *C4* expressos (Truedsson, 1989).

A inexistência de qualquer deficiência de FB homozigota identificada em seres humanos conduziu à ideia de que tal condição poderia ser letal durante o desenvolvimento embrionário. Com base nos padrões de herança e nos níveis séricos, alguns heterozigotos para *FB*Q0* foram identificados como indivíduos com baixa quantidade de produtos proteicos (Siemens, 1992). A variante *FB F*, quando comparada à variante *FB S*, foi associada a uma concentração proteica maior e a uma atividade hemolítica menor (Lokki, 1991).

Haplótipos do complemento (complótipos)

Os quatro genes localizados na região do complemento ocupam aproximadamente 120 kb do DNA genômico (Carroll, 1984). Os genes *C2* e *FB* estão bem próximos entre si, estando separados por menos de 2 kb. Contudo, *FB* e *C4A* estão separados por cerca de 30 kb, e *C4A* e *C4B* estão a uma distância aproximada de 10 kb um do outro. Os alelos dos genes do complemento ocorrem como uma unidade ao nível populacional e apresentam notável desequilíbrio de ligação (DL) nos haplótipos determinados por meio de estudos familiares. Isso significa que eles ocorrem juntos, como conjuntos localizados no mesmo cromossomo e mais frequentemente esperados a partir das frequências de seus alelos individuais, sem recombinações bem documentadas. Por isso, os haplótipos dos quatro *loci* de complemento foram denominados *complótipos* (originalmente *complotypes*, em inglês), como uma forma de abreviação para "haplótipos do complemento" (Alper, 1983). Embora sua ordem, do telômero para o centrômero, seja *C2*, *FB*, *C4A*, *C4B* (Fig. 48.1), para maior clareza na utilização das variantes alélicas na designação dos complótipos, as posições de *FB* e *C2* são transpostas. Dessa forma, *FB*S*, *C2*C*, *C4A*Q0*, *C4B*1* constitui um complótipo cuja forma abreviada é *SC01*. Há mais de uma dúzia de complótipos entre os caucasianos, com frequências aproximadas de 0,01 ou mais (Tab. 48.1). Na maioria das populações, o complótipo *SC31* é o mais comum. *FC31* é comum em populações negroides, enquanto *SC42* é comum entre mongoloides asiáticos.

Haplótipos estendidos

Com base nos estudos sobre distribuição dos complótipos em relação às especificidades *HLA-B* e *HLA-DR* em haplótipos caucasianos normais, determinados por meio de estudos familiares, foi evidenciada a existência de um impressionante DL envolvendo a região inteira. Seria fácil reconhecer os conjuntos de alelos *HLA-B*, complótipos e *DR* que apresentaram *DL* de três pontos estatisticamente significativo (Fig. 48.2) e definiram quais seriam considerados haplótipos estendidos (Awdeh, 1983). Foi criada uma nomenclatura estenográfica para os haplótipos estendidos, em que os nomes das variantes *HLA-B*, complótipos e *HLA-DR* são escritos entre colchetes. Assim, o haplótipo estendido mais comum entre os caucasianos é o [*HLA-B8*, *SC01*, *DR3*]. Os haplótipos estendidos são altamente característicos de um subgrupo étnico e apresentam frequências menores ou simplesmente não ocorrem em todos os demais grupos étnicos (Alper, 1992; Fraser, 1990).

Estudos iniciais definiram haplótipos estendidos como sendo o intervalo genômico entre *HLA-B* e *-DR*. Tornou-se evidente, então,

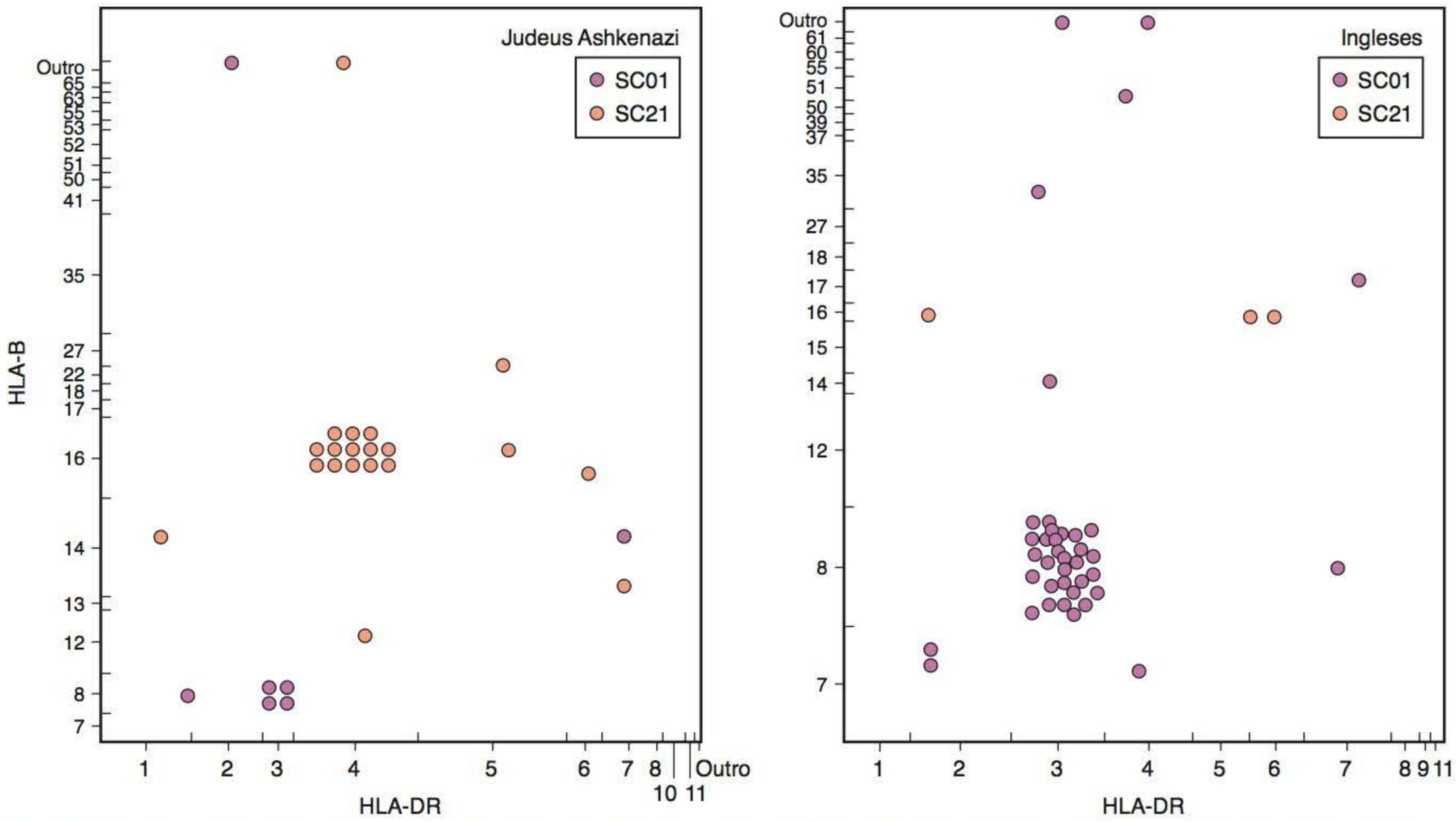


Figura 48.2 Distribuição de haplótipos dos complótipos (haplótipos de alelos do complemento) *SC01* (*BF*S, C2*C, C4A*QO, C4B*1*) e SC21 (*BF*S, C2*C, C4A*2, C4B*1*) em relação aos alelos *HLA-B* na ordenada, e aos alelos *HLA-DR* na abscissa. As alturas e larguras que representam cada especificidade HLA são proporcionais às frequências alélicas para as respectivas populações. Os agrupamentos representam o desequilíbrio de ligação e sinalizam os haplótipos estendidos (*HLA-B16(38), SC21, DR4*) em judeus Ashkenazi, (*HLA-B8, SC01, DR3*) em ingleses e, em extensão bem menor, em judeus. (De Alper, CA; Awdeh, Z; Yunis, EJ: *Conserved, extended MHC haplotypes*. Exp Clin Immunogenet 1992; 9:5, fig. 4. Copyright S. Karger AG, Basel.)

Tabela 48.1 Complótipos comuns em cromossomos normais de populações caucasianas

Complótipo	Frequência (%)
SC31	0,430
SC01	0,127
FC31	0,096
SC30	0,053
SC42	0,040
SC61	0,034
FC30	0,031
FC01	0,029
SC02	0,029
SC21	0,022
SB42	0,019
SC33	0,014
*SC2(1,2)**	0,013
SC32	0,011

Os complótipos aparecem abreviadamente, em letras e números, com quatro alelos em ordem arbitrária: FB, C2, C4A e C4B.

* O *locus C4B* é heteroduplicado.

Tabela 48.2 Haplótipos estendidos de MHC comuns

Haplótipo estendido	Alelo HLA-Cw	Etnia
[*HLA-B8, SC01, DR3, DQ2*]	*0701*	Norte da Europa
[*HLA-B7, SC31, DR2, DQ6*]	*0702*	Norte da Europa
[*HLA-B44, FC31, DR7, DQ2*]	*1601*	Europa
[*HLA-B44, SC30, DR4, DQ7/8*]	*0501*	Europa
[*HLA-B57, SC61, DR7, DQ2/3*]	*0602*	Norte da Europa
[*HLA-B14, SC22, DR1, DQ1*]	*0802*	Norte da Europa
[*HLA-B35, SC31, DR5, DQ3*]	*0401*	Sul da Europa
[*HLA-B38, SC21, DR4, DQ8*]	*1203*	Judeus Ashkenazi
[*HLA-B15, SC33, DR4, DQ8*]	*0304*	Norte da Europa
[*HLA-B18, F1C30, DR3, DQ2*]	*0501*	Bascos, Sardenha, Espanha
[*HLA-B18, S042, DR2*]*	*1203*	Norte da Europa
[*HLA-B42, FC(1,90)0, DR3*]†	*1701*	África

Dados obtidos a partir dos cromossomos de uma população caucasoide normal oriunda de Boston.

* Dados de pacientes com deficiência de C2 (Clavijo, 1998).

† Dados referentes aos cromossomos de uma população de indivíduos negros normais, residentes em Boston (Clavijo, 1999).

que outros alelos não caracterizados do MHC presentes no intervalo provavelmente foram incluídos. Embora os alelos *HLA-A* tenham apresentado variação limitada em termos de haplótipos estendidos, somente metade desses haplótipos apresenta associações alélicas de *HLA-A* exclusivas e significativas (Alper, 1982). O *locus HLA-Cw*, sem dúvida, foi o último a ser caracterizado. Com base na distância genética e em dados prévios de tipagem incompleta de pares HLA-B/Cw, evidenciou-se que haplótipos conservados também incluiriam a região genética do HLA-Cw. Assim, diferentes alelos *HLA-Cw* foram recentemente associados a haplótipos estendidos distintos (Tab. 48.2) (Clavijo, 1998). Além disso, microssatélites e vários sistemas de alelos *TNF* e *HSP* também foram estudados quanto aos haplótipos estendidos (Tab. 48.3). Mais recentemente, alguns modelos foram criados para descrever os tamanhos variáveis dos estiramentos de DNA conservado no MHC, utilizando as frequências conhecidas de quatro tipos distintos de pequenos blocos (< 0,2 Mb) de sequências de DNA relativamente conservadas: *HLA-Cw/B*; *TNF*; complótipo; e *HLA-DR/DQ* (Yunis, 2003). Empregando a identificação de alelos HLA e microssatélites de TNF, Yunis et al. (2003) demonstraram que alguns haplótipos estendidos se estenderam para os *loci HLA-A* e *HLA-DPB1*, os quais formam unidades genéticas fixas com, no mínimo, 3,2 Mb de DNA. Existem também fragmentos intermediários de haplótipos estendidos, que são, todavia, maiores do que qualquer um dos quatro blocos pequenos. Essa complexidade envolvendo a fixidez genética em vários níveis deve ser considerada nos estudos sobre associações com doenças genéticas, controle da resposta imune e diversidade humana.

Os haplótipos estendidos, que correspondem a pelo menos 30% dos haplótipos caucasianos normais, possuem uma sequência de DNA e uma estrutura grosseira relativamente fixa, além de conterem alelos bastante semelhantes, senão idênticos, até mesmo quando são encontrados em indivíduos aparentemente não relacionados. A frequência dos haplótipos estendidos é mais provavelmente subestimada, em vez de superestimada, visto que tais haplótipos devem ser determinados a partir de estudos familiares envolvendo milhares de casos de índices não relacionados. Recentemente, a sequência de referência do MHC (MHC Sequencing Consortium, 1999) foi utilizada como ponto de partida para numerosos estudos, em uma tentativa de determinar múltiplos haplótipos estendidos comuns e mais raros (Walsh, 2003; John, 2004; Stewart, 2004). Esses estudos ajudarão a facilitar a identificação

Tabela 48.3 Polimorfismos genéticos de *TNF* e *HSP* em relação a haplótipos estendidos comuns

	Complótipo				*HSP*		Marcadores *TNF*								
HLA-DR	***C4B***	***C4A***	***BF***	***C2***	***1B***	***1A***	***e***	***d***	***-307***	***-856***	***-862***	***a***	***b***	***HLA-B***	***HLA-Cw***
3	1	0	S	C	8,5	C	3	1	2	1	1	2	3	8	0701
2	1	3	S	C	9	A	3	3	1	1	1	11	4	7	0702
7	1	3	F	C	9	A	3	3	1	1	1	7,8	4	44	1601
4	0	3	S	C	9	A	3	3	1	1	1	6,7	5	44	0501
7	1	6	S	C	9	A	3	4	1	1	1	2	5	57	0602
5	1	3	S	C	9	A	3	3	1	1	1	5	5	35	0401
1	1,2	2	S	C	9	A	1	4	1	1	2	2	1	14	0802
4	1	2	S	C	9	A	3	3	1	2	1	10	4	38	1203
4	3	3	S	C	9	A	1	4	1	1	2	2	1	62	0304
2	2	4	S	0	9	A	3	3	1	2	1	10	4	18	1203
3	0	3	F1	C	8,5	C	3	4	1	1	1	1	5	18	0501

O número ou as letras abaixo de cada coluna se referem a uma variante alélica em particular do complemento, proteína do choque térmico (HSP), microssatélite de fator de necrose tumoral (TNF) ou polimorfismos do promotor de TNF que estão associados às especificidades do HLA, como observado. Veja o texto para explicação. No caso da TNF-307, 1 e 2 representam as variantes -307/G e -307/A, respectivamente. O alelo TNF-856/C é identificado como 1, enquanto o alelo TNF-856/T é identificado como 2. O alelo TNF-862/C é identificado como 1, enquanto o alelo TNF-862/A é identificado como 2.

Fonte: dados extraídos e modificados de Clavijo, 1998.

de *loci* precisos de doenças e também a entender melhor certos eventos, como recombinação e polimorfismo. Estudos que empregam técnicas de tipagem de espermatozoides de alta resolução sugeriram a presença de regiões de baixa recombinação junto ao MHC (Jeffreys, 2001). Uma dessas regiões foi descrita como estando próxima ao gene *LTA*, em que foi observada uma taxa de recombinação inferior à esperada entre *HLA-A* e *HLA-B* (Cullen, 2002). Permanece desconhecido o efeito dessas regiões de baixa recombinação sobre a associação com doenças. Além disso, foram questionados certos relatos recentes (baseados na análise de DLs aplicada aos dados de SNPs sem análise de heredograma) descrevendo a existência de blocos de sequências de DNA conservadas junto ao genoma humano que estariam separadas por sítios de alta atividade recombinante (Jeffreys, 2001; Gabriel, 2002). Esses relatos, identificando blocos de DNA conservado junto ao MHC, diferem dos estudos que empregaram análise de DL de haplótipos, definidos por estudos familiares (Dawkins, 1999; Yunis, 2003). Aparentemente, a análise isolada de DLs empregando dados de SNP carece de poder para distinguir as variações individuais de tamanho dos blocos de DNA, bem como da frequência de sua distribuição entre as populações. Sendo assim, os estudos de SNPs devem ser realizados com indivíduos cujos blocos já tenham sido determinados por meio de estudos familiares, a fim de elucidar a relação existente entre a presença de blocos de tamanho pequeno e de tamanho grande.

Associações entre MHC e doenças

O MHC está associado a mais doenças do que qualquer outra região do genoma humano. Os conceitos sobre complótipos e haplótipos estendidos foram revisados de modo a permitir a compreensão da relevância da existência de uma literatura abundante sobre os marcadores de doenças baseados no MHC. A maioria desses marcadores já relatados até então está contida em haplótipos estendidos. Essa localização provavelmente se deve ao simples fato de terem sido descritos inúmeros alelos de MHC associados a doenças, visto que não se trata de apenas um único par de bases envolvido, e sim de mais de 3 milhões de pares de bases do DNA conservado constituindo o marcador. Por exemplo, alelos do complemento, como *FB*F1* e *C4B*3*, foram associados ao diabetes de tipo 1, porque os haplótipos estendidos que os carregam ([*HLA-B18*, *F1C30*, *DR3*] e [*HLA-B62*, *SC01*, *DR3*]) são mais comuns nesses pacientes do que na população em geral. Essa associação significa que os haplótipos com comprimento de DNA genômico conservado equivalente a 3 milhões de bases ou mais contêm os alelos determinantes da suscetibilidade ao diabetes de tipo 1. É igualmente essencial conhecer o modo de distribuição étnica de um alelo de MHC associado, a fim de avaliar se a expressão desse alelo está aumentada nos pacientes em comparação ao observado nas populações controle etnicamente pareadas, ou se de fato constitui um marcador verdadeiro da distribuição étnica da doença. Além disso, é mais difícil mapear os genes responsáveis pela doença na população de caucasianos americanos do que em afro-americanos ou asiático-americanos, pois o nível de diversidade genética é menor entre os caucasianos. Quando forem divulgados os resultados do projeto MHC, no qual haplótipos consanguíneos de MHC oriundos de populações de etnias distintas foram escolhidos para análise sequencial (Allcock, 2002), os investigadores terão a oportunidade de identificar os genes responsáveis pela doença junto a pequenos fragmentos de DNA.

Há um número notável de casos de doenças que apresentam associação com os genes do MHC. A maior parte das associações entre MHC e doenças envolve autoimunidade e não apresenta uma nítida herança mendeliana. Existem diversos problemas que confundem as tentativas de compreender os mecanismos de herança por meio dos quais essas doenças ocorrem. Uma análise dos marcadores do MHC de pacientes e de seus respectivos familiares serviu para esclarecer o cenário apenas marginalmente. O principal problema das associações com genes do MHC é a penetrância incompleta desses genes, que dificulta bastante e até impossibilita a realização de estudos comuns de segregação e ligação. Essa situação é mais nítida em gêmeos monozigóticos que provavelmente possuem genes idênticos. Se um desses gêmeos desenvolve uma das referidas doenças (p. ex., diabetes melito de tipo 1), o outro gêmeo não necessariamente a desenvolverá. No caso do diabetes de tipo 1, a taxa de concordância parece ser maior que 50% (Rubinstein, 1977; Barnett, 1981). Isso sugere que a penetrância de uma doença em um hospedeiro totalmente suscetível é incompleta. Apesar de haver motivos excelentes para considerar genes do MHC como determinantes da suscetibilidade ao diabetes de tipo 1, o diabetes dependente de insulina se desenvolve em somente 15% dos irmãos de pacientes diabéticos com MHC idêntico. Essa diferença entre 50 e 15% constitui uma evidência da influência genética de um segundo *locus* (ou *loci*) não associado ao MHC, além de sugerir a influência de outros fatores (p. ex., fatores ambientais) na determinação da suscetibilidade.

A penetrância incompleta dificulta a determinação do modo específico de herança e reduz as chances de encontrar famílias com mais de um membro afetado em uma ou mais gerações. Famílias são utilizadas com frequência para determinar os modos de herança. Outro fator complicador é a incapacidade de determinar se o grupo que está sendo estudado é ou não constituído por pacientes homogêneos em termos de determinação genética. Cerca de 5 a 6% das famílias aleatórias com probando diabético de tipo 1 apresentam um segundo descendente afetado. Dentre esses pares de irmãos, cerca de 60% apresentam MHC idêntico, 35% são haploidênticos e um pequeno porcentual não compartilha nenhum haplótipo de MHC. Esse padrão sugere uma herança recessiva de um gene de suscetibilidade à doença associado ao MHC. Contudo, em última análise, os estudos familiares fornecem dados referentes aos haplótipos que são altamente úteis e em geral permitem determinar a homozigozidade de um marcador HLA entre os probandos. Tais estudos também estabeleceram que a associação ao MHC na maioria das doenças de interesse se baseia na ligação existente entre o gene determinante da suscetibilidade e o MHC.

Outro aspecto ainda desconhecido é o número de alelos diferentes de suscetibilidade a uma determinada doença junto a uma população específica qualquer. Nesse sentido, os haplótipos estendidos podem ser úteis. Quando sua expressão está aumentada entre os pacientes, esses genes provavelmente representam um único alelo de suscetibilidade que poderia estar presente em qualquer lugar na região de fixação. Todavia, alguns pacientes apresentam apenas partes desses haplótipos, fornecendo pouca informação sobre a localização do envolvimento alélico específico. Além disso, parece provável que as doenças associadas ao MHC sejam poligênicas. Por causa desses problemas, iniciaremos nossa discussão sobre a associação do MHC a doenças que possuem herança mendeliana e penetrância de 100%, ao menos com relação ao defeito bioquímico primário. Dois desses distúrbios já foram revisados neste capítulo: as deficiências proteicas de C2 e C4.

Hemocromatose hereditária e o gene *HFE*

A hemocromatose é uma doença autossômica recessiva que representa a doença metabólica hereditária mais comum na população caucasiana. A hemocromatose consiste em um defeito herdado que afeta o metabolismo do ferro, que resulta na falha do controle da absorção de ferro em termos de ajuste do aumento das reservas de ferro do corpo. Como resultado, há uma sobrecarga de ferro nos tecidos e os órgãos eventualmente são danificados (revisado por Adams, 2000). As manifestações mais comuns da hemocromatose são cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e cardiomiopatia. A descoberta do gene da hemocromatose hereditária (*HH*) na região do MHC baseou-se no achado inicial da frequência aumentada do alelo *HLA-A3* em pacientes com HH (Simon, 1976). Depois de anos de esforços concentrados nas vizinhanças do *locus HLA-A*, o gene *HFE* foi localizado a vários Mb de distância (Feder, 1996). O gene *HFE* codifica uma proteína constituída por 343 aminoácidos, que pertence a um grupo denominado moléculas associadas ao MHC de classe I, em razão das similaridades existentes entre essas moléculas e as moléculas do HLA de classe I.

O gene *HFE* apresenta duas mutações de sentido incorreto comuns: a mutação de C282Y, que resulta da substituição de uma tirosina por uma cisteína, e a mutação H63D, resultante da substituição de um aspartato por uma histidina. Diferente da mutação H63D, a mutação C282Y interfere na interação proteica com a β_2-microglobulina, abolindo a expressão de HFE na superfície celular (Feder, 1977; Waheed, 1997). Uma mutação homozigota C282Y está presente na maioria dos pacientes caucasianos com HH. Essa mutação apresenta uma frequência alélica notavelmente alta entre as populações do norte da Europa

(0,05-0,1%) e rara em populações não caucasianas. A mutação H63D está presente em alta frequência nos indivíduos-controle caucasianos (> 0,1%) e também foi encontrada em populações não caucasianas. Todavia, o papel dessa mutação na HH permanece desconhecido.

Hiperplasia suprarrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase

Imediatamente na extremidade 3' de cada *locus C4*, existem dois *loci* para a enzima esteroide suprarrenal 21-hidroxilase (*CYP21A* e *CYP21B*) (Carroll, 1985; Higashi, 1986; White, 1986). Os dois genes são altamente homólogos, contudo, três mutações promovem o término precoce da transcrição do gene *CYP21A*, de modo a transformá-lo em um pseudogene (White, 1988). A hiperplasia suprarrenal congênita é clinicamente heterogênea, apresentando uma forma caracterizada por uma grave perda de sal; uma segunda forma de início tardio mais suave e que se manifesta em grande parte por meio da masculinização em meninas; e uma terceira forma que é críptica e mais branda. A ligação desse distúrbio ao MHC foi descoberta antes da identificação de quaisquer associações com o MHC e também antes de os *loci CYP21* terem sido localizados junto ao MHC. Subsequentemente, estudos revelaram que 20% ou mais dos pacientes caucasianos europeus que apresentavam a forma caracterizada pela perda de sal possuíam o raro haplótipo estendido [*HLA-A1, Cw6, B47, FC(91)0, DRB1*07, DRB4*0101, DQA1*0201, DQB1*0201*] (Fleischnick, 1983). Foi demonstrado que esse haplótipo apresenta uma deleção de *C4B* e *CYP21B*, explicando assim a severidade dos sintomas e a completa deficiência enzimática nos indivíduos homozigotos para esse haplótipo. Entre os pacientes com doença críptica e mais branda, é comumente detectado um haplótipo estendido diferente: [*HLA-B65, SC2(1,2), DR1*] (Sinnott, 1991). Esse haplótipo é comum sobretudo no sul da Europa, com uma frequência maior que 0,01% entre os caucasianos residentes em Boston. Em todas as formas de deficiência de 21-hidrolase, a massa de haplótipos do MHC não é estendida e há uma grande variedade de complótipos, sugerindo que muitas mutações independentes levam à deleção ou ao desarranjo do gene *CYP21B*.

Doenças específicas sem evidência de herança mendeliana e associadas ao MHC

A Tabela 48.4 lista algumas doenças associadas ao MHC e seus marcadores. Essa lista não está completa, e serão discutidas somente algumas dessas doenças em maiores detalhes.

Diabetes de tipo 1

A mais estudada de todas as doenças associadas ao MHC é o diabetes melito de tipo 1 (Nepom, 1991; Thorsby, 1992; Winter, 1993; Lernmark, 1999). Os alelos dos genes de HLA de classe II – *DQB1*, *DQA1* e *DRB1* –, localizados na região do MHC, constituem os principais determinantes da predisposição genética ao diabetes de tipo 1. Vários alelos de cada um desses três *loci* estão associados à suscetibilidade ou à proteção contra a doença. Ocorrem aumentos notáveis da frequência de *HLA-DR3* e *HLA-DR4* entre os pacientes caucasianos (Thomson, 1984; Jenkins, 1991). Por meio da análise molecular baseada na tipagem do HLA, o aumento da expressão de *DR4* é detectado primariamente no subgrupo de *DR4* em DL com *DQB1*0302* (Kockum, 1993). Embora esse último gene atualmente seja considerado um marcador importante e, talvez, um determinante primário da suscetibilidade ao diabetes melito de tipo 1, é encontrado em apenas 70% dos pacientes caucasianos. Até mesmo naqueles que possuem esse gene há uma variabilidade em termos de risco relativo para o diabetes: *DRB1*0401, DQB1*0302* e *DRB1*0402, DQB1*0302* apresentam alto grau de associação com a doença, enquanto *DRB1*0404, DQB1*0302* apresentam menor associação. Em diversas populações de pacientes caucasianos com diabetes de tipo 1, há um excesso de heterozigotos *DR3/DR4* em relação ao número de homozigotos *DR3* ou DR4 previstos por meio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Kockum, 1999). Além disso, os riscos relativos para alguns genótipos *DR-DQ* não são apenas a soma ou o produto dos riscos relativos para haplótipos isolados. Por exemplo, o risco de um genótipo DRB1*03–*DQB1*02/DRB1*0401–DQB1*0302* muitas vezes é maior do que o risco associado aos genótipos homozigotos individuais DRB1*03–*DQB1*02* e *DRB1*0401–DQB1*0302*. Foi levantada a hipótese de que essa sinergia se dá por meio da alta suscetibilidade transcodificada pelos heterodímeros HLA-DQB1 e HLA-DQA1 (Koeleman, 2004). *DQA1*0301* está presente em todos os haplótipos *DR4* positivos, independentemente de carregarem *DQB1*0302*. Além disso, é possível que *DQA1*0301* por si só contribua para o risco. Por outro lado, *DRB1*1501, DQB1*0602* apresenta associação negativa com o diabetes de tipo 1. Indivíduos heterozigotos para *DRB1*1501* e *DQB1*0602*, que também possuem o gene da suscetibilidade para o diabetes de tipo 1 no outro haplótipo, não correm, contudo, risco de desenvolver a doença (proteção dominante), como se esperaria de uma doença recessiva (Noble, 1996). Um modelo recentemente proposto para o diabetes melito de tipo 1, que considera *DQB1* um determinante direto da suscetibilidade, sugere a existência de uma hierarquia de afinidades entre moléculas de classe II distintas que competem pela ligação ao mesmo peptídeo do diabetes de tipo 1 (Nepom, 1990). A suscetibilidade se manifesta quando um produto genético (p. ex., DQB1*0302) se liga e apresenta o peptídeo do diabetes de tipo 1. Na presença de um competidor de alta afinidade (DRB1*1501), esse evento não ocorre. Outro modelo propõe que o códon 57 da cadeia codificada por *DQB* exerce papel essencial na patogênese do diabetes de tipo 1. Foi sugerido que a presença de um ácido não aspártico na posição 57 de

Tabela 48.4 Exemplos de associações entre HLA e doenças

Doença	Etnia	Antígeno HLA	Referência
Espondilite anquilosante	Caucasianos, asiáticos, africanos	B27	Khan (1992) Rubin (1994)
Enteropatia de sensibilidade ao glúten	Caucasianos	DRB1*0301, DQB1*0201, DQA1*0501 DRB1*0701, DQB1*0201, DQA1*0501	Marsh (1992) Goggins (1994)
Pênfigo vulgar	Judeus	B38, DR4, DQ8; B35, DR4, DQ8	Ahmed (1990)
	Não judeus	B55, DR6, DQ5	Ahmed (1991)
Penfigoide cicatricial	Caucasianos	DR4, DQB1*0301	Yunis (1994) Delgado (1996)
Esclerose múltipla	Caucasianos	DRB1*1501, DQB1*0602, DQA1*0102	Marrosu (1992)
Narcolepsia	Caucasianos, judeus	DRB1*1501, DQB1*0602, DQA1*0102	Kwon (1995) Rogers (1997)
Diabetes de tipo 1 (suscetibilidade)	Caucasianos	DR3 or DR4, DQB1*0302, DQA1*0301	Thomson (1984) Kockum (1993) Noble (1996)
Diabetes de tipo 1 (resistência)	Caucasianos	DRB1*1501, DQB1*0602	Noble (1996)
Artrite reumatoide	Caucasianos	DR4 (DRB1*0401; DRB1*0404)	MacGregor (1995)
Infecção pelo HIV			
Progressão rápida para AIDS	Caucasianos	B35, Cw4	Kaslow (1996) Carrington (1999)
Progressão lenta para AIDS	Caucasianos	B27, B57	Kaslow (1996) Keet (1999)
Controle da viremia do HIV	Caucasianos	Bw4	Flores-Villanueva (2001)
Tuberculose	Asiáticos (Camboja)	DQB1*0503	Goldfeld (1998)
	Asiáticos (Índia, Indonésia)	DR2	Bothamley (1989) Rajalingam (1996)

DQB1 constitui um determinante importante da suscetibilidade ao diabetes de tipo 1 mediada pelos genes *DQB1* (Lee, 2001; Siebold, 2004). Esse conceito é sustentado pela presença de valina ou serina em excesso nessa posição, em indivíduos diabéticos que possuem haplótipos *HLA-DR3* ou *DR4*.

Artrite reumatoide

A associação entre marcadores de MHC e artrite reumatoide (AR) está bem documentada (Nepom, 1992; Ollier, 1992; Auger, 1998). Para a maioria das populações estudadas, o marcador primário associado é o *HLA-DR4* (MacGregor, 1995). Em caucasianos, por exemplo, os alelos DR4 mais comumente associados à AR são *DRB1*0401* e *DRB1*0404*, enquanto entre os pacientes japoneses, israelenses e chineses, o alelo mais comum é o *DRB1*0405*. Outras especificidades *HLA-DR* também estão associadas à AR: há relatos apontando a associação entre *DR1* e *AR* em pacientes caucasianos, japoneses, espanhóis, gregos e israelenses; *DR3* em kuwaitianos; *DR6* em índios americanos Yakima; *DR9* em chilenos; e *DR10* em pacientes espanhóis, gregos e israelenses (revisado por Zanelli, 2000). Para explicar esse amplo espectro de associações *HLA-DR* diferentes com a AR, foi proposto que uma sequência de peptídeos *DRB1* compartilhada está envolvida na manifestação da suscetibilidade à AR (Penzotti, 1996; Garavito, 2004). Os alelos associados à AR compartilham uma sequência altamente conservada de aminoácidos na terceira região hipervariável (aminoácidos 67 a 74). Esses resíduos poderiam afetar a ligação dos peptídeos e sua apresentação às células T (Hammer, 1995). Assim, se há um peptídeo artritogênico, este deve se ligar preferencialmente à sequência DRB1 da AR. Nenhum peptídeo artritogênico foi identificado até o momento. Uma explicação alternativa envolveria mimetização molecular entre DRB1 da AR e sequências antigênicas de um patógeno capaz de induzir AR (revisado por Albani, 1992). Foi identificada uma homologia entre a sequência compartilhada da AR e uma HSP de *Escherichia coli* (Auger, 1998). A AR difere clinicamente da AR juvenil (ARJ) e as associações com o HLA na ARJ são igualmente bastante diferentes. Além disso, outras associações *HLA-DR* são variáveis entre os subgrupos clínicos da ARJ (Stastny, 1993). Exemplificando, há relatos de que a frequência do haplótipo *HLA-DRB1*0801*, *DQA1*0401*, *DQB1*0402* esteja aumentada em todo o grupo pauciarticular e em pacientes com a forma pauciarticular persistente. O haplótipo *HLA-DRB1*1301*, *DRB3*0101*, *DQA1*0103*, *DQB1*0603* também estava associado em pacientes com ARJ pauciarticular persistente (Fernandez-Vina, 1994). Considerando que a forma poliarticular da ARJ é a ocorrência de AR em indivíduos jovens, *DRB1*0401* apresenta uma forte associação.

Infecção pelo HIV-1 e progressão da AIDS

Mais de 70 trabalhos sobre a associação do HLA com a progressão da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram publicados até o momento, abrangendo alguns poucos grupos étnicos. A maioria desses estudos apresenta poder limitado, em razão da escassa amostragem de pacientes e indivíduos-controle ou do uso de grupos de risco que apresentam sobreposição. Tais características dificultam a comparação dos estudos. Além disso, ao menos metade desses estudos foi realizada empregando-se tipagem sorológica de especificidades HLA, aumentando o grau de inconsistência entre eles. Apesar dessas limitações e graças ao desenvolvimento de métodos mais precisos e baseados em PCR para tipagem HLA na década passada (revistos no capítulo anterior), emergiram algumas associações nítidas e consistentes com a infecção pelo HIV e a progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), principalmente em pacientes caucasianos. O *HLA-B35*, um antígeno encontrado de forma predominante entre os caucasianos, é o antígeno HLA mais consistentemente descrito como estando associado à rápida progressão para AIDS (Kaslow, 1996; Carrington, 1999). O *HLA-B*27* e *HLA-B*57*, que são alelos raros na maioria das populações, foram consistentemente associados a uma progressão mais lenta para AIDS em pacientes caucasianos (Kaslow, 1996; Hendel, 1999; Keet, 1999). As moléculas de HLA-B podem ser classificadas conforme a presença de um epítopo *Bw4* ou *Bw6*. Tais epítopos são definidos por duas sequências distintas de aminoácidos nos resíduos 79-83 na porção carboxiterminal da hélice α_1 da fenda de ligação do HLA de classe I (Salter, 1989). Flores-Villaneuva et al. (2001) demonstraram recentemente que uma profunda supressão da viremia de HIV-1 apresenta uma associação significativa com a presença em homozigose dos alelos *HLA-B* que compartilham o epítopo HLA-Bw4 (Flores-Villaneuva, 2001). Outras análises de estudos baseados em grandes populações, especialmente aqueles que incluem grupos de etnias diferentes, como populações africanas e asiáticas, são urgentemente necessários para confirmar resultados prévios e descobrir novas associações potenciais em indivíduos de etnias distintas infectados com diversos subtipos de HIV-1. Tais estudos também seriam valiosos para o desenvolvimento de estratégias de vacinação contra o HIV, envolvendo a indução de respostas de células T $CD8^+$ HLA-restritas e étnico-específicas nas populações sujeitas a um risco maior de contrair a infecção pelo vírus.

Tuberculose

Vários alelos do sorotipo DR2 do HLA de classe II foram associados a suscetibilidade à tuberculose clínica progressiva (Bothamley, 1989; Khomenko, 1990; Rajalingam, 1996; Teran-Escandon, 1999). Mais recentemente, *HLA-DQB1*0503* foi associado à tuberculose clínica progressiva no Camboja (Godfeld, 1998). Essa associação é particularmente intrigante, pois o alelo *DQB1*0503* codifica uma modificação de aminoácido na posição 57 da cadeia β (β57), que influencia a bolsa de ligação peptídica putativa (P9) da molécula DQ. Conforme detalhado no capítulo anterior, peptídeos se ligam em conformação estendida a uma fenda existente na molécula de HLA de classe II que contém bolsas antígeno-específicas constituídas de cadeias laterais polimórficas (Brown, 1993; Stern, 1994). As moléculas HLA-DQ, codificadas pelos genes das cadeias polimórficas α e β de HLA-DQ, ligam-se a certos peptídeos que possuem aminoácidos ancorados em posições específicas junto às bolsas peptídicas de ligação. Estas são denominadas bolsas P1, P4 e P9 e estão situadas na fenda molecular de HLA-DQ (Lee, 2001; Siebold, 2004). Os aminoácidos existentes no códon 57 da cadeia de HLA-DQ são essenciais para a especificidade da ligação peptídica da bolsa P9, e dependem da presença de um ácido aspártico ou de um ácido não aspártico nessa posição (Kwok, 1996; Nepom, 1996; Quarsten, 1998). O alelo *DQB1*0503* codifica o ácido aspártico de carga negativa situado na posição 57 em substituição de uma alanina, que seria um aminoácido mais comum, sem carga e hidrofóbico. Assim, é possível que a apresentação MHC-restrita de peptídeos por macrófagos infectados pela tuberculose seja afetada no grupo de pacientes que expressam essa bolsa em particular, levando a uma resposta imunogênica menos intensa. Atualmente, estão em andamento estudos sobre a associação ao HLA que investigam se conjuntos de alelos HLA compartilham ou não especificidades de ligação associadas a suscetibilidade à tuberculose, combinados a experimentos funcionais para testar a capacidade desses alelos de se ligarem a peptídeos de *Mycobacterium tuberculosis* e estimular respostas de células T efetoras.

Métodos para detecção de associações ou ligações entre doenças e marcadores genéticos

Polimorfismo genético

O polimorfismo genético é definido como a ocorrência de dois ou mais alelos de um gene, cada um deles a uma frequência apreciável em uma mesma população. Essa frequência foi arbitrariamente definida como acima de 1%. Existem dois grupos de polimorfismos genéticos: equilibrado ou estável e transitório. Um polimorfismo equilibrado ou estável ocorre quando dois ou mais alelos são mantidos em uma população por meio de seleção. A vantagem heterozigota constitui o exemplo clássico de um polimorfismo equilibrado. Um polimorfismo transitório representa uma fase de alterações alélicas conduzidas por uma flutuação genética ou por seleção. O polimorfismo de um gene pode ser estável em uma dada população e transitório em outra, dependendo do efeito da seleção.

Frequências genotípicas e fenotípicas

Para determinar um polimorfismo genético, é necessário encontrar uma amostra representativa da população, avaliar os indivíduos, contar genes e estimar o número de genes contidos na população inteira. Por

exemplo, considerando-se uma população de 100 indivíduos estudada quanto a um traço genético ou alelo em particular em determinado gene, é possível definir a frequência fenotípica como sendo o número de indivíduos que apresentam o traço ou a variante genética. Para calcular a frequência (f) de um alelo, a frequência de cada um é adicionada e, em seguida, dividida pelo número total analisado:

$$f(x) = \frac{f(x)}{f(x) + f(y) + f(z)}.$$

É possível calcular a frequência do gene (g) sem saber o modo de herança, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$g = 1 - \sqrt{f}.$$

Força da associação

Foram inventados diversos métodos para detectar o grau de associação de marcadores genéticos com genes hipotéticos para suscetibilidade a doenças. Um desses métodos consiste em computar o risco de desenvolver uma doença entre indivíduos que carregam um alelo específico de um sistema polimórfico. Nessa estimativa, o risco relativo (RR), ou taxa de probabilidade, calcula o risco de possuir um marcador junto a uma população de indivíduos doentes comparativamente a uma população-controle. Essa força de associação é o delta de Bergston e Thomson (Svejgaard, 1983), que equivale à fração etiológica (FE) (Miettinen, 1976). Em uma dada população, se "a" indivíduos carregam o caráter específico ao mesmo tempo em que "b" indivíduos não o possuem, sendo que "c" indivíduos do grupo-controle (normal) carregam esse mesmo caráter, essa informação deve ser corretamente descrita em uma tabela 2 × 2:

	Caráter positivo	Caráter negativo
Paciente	a	b
Controle	c	d

A frequência do caráter nessa população de pacientes (h_p) é:

$$h_p = \frac{a}{a + b}.$$

O RR, ou taxa de probabilidade, é definido como:

$$\mathrm{RR} = \frac{a \times d}{b \times c}.$$

A FE é definida por:

$$\mathrm{FE} = \frac{\mathrm{RR} - 1}{\mathrm{RR}} \times \frac{a}{a + b}$$

$$= \frac{\mathrm{RR} - 1}{\mathrm{RR}} \times h_p.$$

Similarmente, diante do risco reduzido, quando RR < 1, pode ser utilizado o fator preventivo (FP):

$$\mathrm{FP} = \frac{(1 - \mathrm{RR})\, h_p}{\mathrm{RR}(1 - h_p) + h_p}.$$

As frações FE e FP podem variar entre 0 (sem associação) e 1 (associação máxima). Além de fornecerem estimativas da possibilidade de ter um marcador caso a doença já esteja presente, tais cálculos ignoram o modo como a doença em questão é geneticamente determinada. Esse aspecto é particularmente problemático quando se trata de modos de determinação genética recessivos ou mais complicados, em que ambos os haplótipos são importantes para a determinação da doença e, contudo, heterozigotos e homozigotos para um dado marcador são atribuídos com um mesmo peso (i. e., ambos são positivos para o marcador).

Análise de modo de herança baseada em pares de irmãos

A análise do modo de herança baseada em pares de irmãos foi introduzida para ajudar a solucionar os problemas associados à penetrância incompleta de genes de doenças e às variações de idade em que se dá o início delas (Penrose, 1935). A análise parte do princípio de que, se um HLA e/ou genes intimamente associados ao HLA não influenciam o desenvolvimento de uma doença, então os pares de irmãos afetados irão compartilhar haplótipos HLA com frequência normal: 25% compartilharão ambos os haplótipos, 50% compartilharão apenas um e 25% não compartilharão nenhum haplótipo. Dessa forma, são comparadas as distribuições observadas e esperadas do compartilhamento de haplótipos. Se os genes determinantes de suscetibilidade ou os respectivos marcadores a eles intimamente ligados forem raros e apresentarem penetrância completa em uma doença cuja determinação genética é puramente recessiva, a distribuição de irmãos compartilhando ambos, um ou nenhum haplótipo será igual a 100, 0 e 0, respectivamente. No caso da determinação dominante, a proporção seria 33, 66 e 0, respectivamente. O que se observa no diabetes, por exemplo (Rubinstein, 1977), é uma proporção igual a 60, 35 e 5, respectivamente, que se aproxima mais das predições recessivas do que das predições dominantes. Uma vez que o modo de herança tenha sido estabelecido, a frequência e a penetrância do gene da doença podem ser determinadas (Thomson, 1977).

Análise de modo de herança baseada em estudos populacionais

Thomson e Bodmer (1977) criaram um método para analisar dados populacionais referentes a marcadores intimamente ligados a *loci* de suscetibilidade a doenças com penetrância incompleta. Em essência, esse método prevê a proporção de homozigotos, heterozigotos e indivíduos não portadores do marcador associado que é prevista para os casos de herança dominante ou recessiva. A maior diferença entre esses dois modos de herança é observada na proporção de indivíduos homozigotos para o marcador. A aplicação desse método ao *HLA-B27* e espondilite anquilosante, em termos estatísticos, conduziu à rejeição de um mecanismo recessivo. Portanto, concluiu-se que a suscetibilidade à espondilite anquilosante é herdada como traço dominante.

Similarmente, o mesmo método de análise foi aplicado à distribuição de *FB*F1* entre 1.107 pacientes com diabetes melito de tipo 1 (Raum, 1981). Foram previstos 1,89 homozigotos para herança dominante e 6,2 homozigotos para herança recessiva. Foram encontrados 7 homozigotos *FB*F1* – um resultado consistente apenas com a herança recessiva. Outros modos de herança que podem ser rejeitados por essas observações incluem dominante simples, epistático (doença resultante da presença de genes não alélicos) e hiperdominante (doença com maior penetrância diante da presença de dois alelos específicos, em comparação à ocorrência de outras combinações, entre as quais a homozigose para cada alelo específico). Embora não seja possível excluir completamente um modelo misto com penetrâncias distintas para homozigotos e heterozigotos, existem outras considerações que tornam esse método insatisfatório.

Método *lod score*

O *lod score* é uma medida estatística da ligação entre um *locus* de marcador, como o do MHC, e um gene de suscetibilidade a doenças (Sutton, 1980). Na equação para calcular o *lod score*: (1) o valor Z é igual à proporção da probabilidade máxima de encontrar uma ligação ($P[F_1/1]$) pela probabilidade de não haver nenhuma ligação a um determinado valor de recombinação de θ; e (2) o valor $\theta(q)$, ou frequência de recombinação, é uma medida da distância a partir de um dado *locus* correspondente ao valor máximo de Z. O *lod score* expressa a probabilidade de os alelos de dois *loci* segregarem juntos, em termos da proporção das frequências de recombinação observada e esperada, quando dispostos de maneira independente. Diversos valores de (q) – de 0 a 0,5 – são substituídos na seguinte equação:

$$P(F_1/\theta) = 1/2\,[\theta^r(1-\theta)^{n-r} + \theta^{n-r}(1-\theta)^r],$$

Em que, n = número de crianças de uma dada família; e r = número de recombinantes. A probabilidade de obter um heredograma para um dado valor de θ (frequência de recombinação de 0 a 0,5) – que é expresso pela proporção de $P(F_1/\theta)$ em uma família a uma dada fração de recombinação θ (0-0,5) em relação a $P(F_1/0{,}5)$ na mesma família diante da ausência de recombinação – pode ser expressa como *lod score* (Z). O *lod score* é a soma de todos os valores z, em que Z é:

$$Z = \log_{10} \frac{P(F_1/\theta)}{P(F_1/0{,}5)}.$$

Valores de Z maiores que zero favorecem a ligação, enquanto valores de $Z \leq 0$ se opõem à ligação. Em geral, um valor de $Z > 3$ (para alguns valores de $0 < 0{,}5$) significa que as chances favoráveis à ligação são de 1.000 para 1 (valor de $p = 0{,}05$), opostamente à ausência ou independência da ligação. É mais fácil calcular a ligação para traços codominantes (i. e., HLA) do que para traços recessivos. Nos estudos que avaliam a ligação entre HLA e doença, os pais podem ter genes de suscetibilidade recessiv os ou dominantes sem penetrância. Existem problemas básicos associados ao uso do método do *lod score* para detecção de ligação de genes com penetrância parcial, além dos casos de irmãos suscetíveis sem penetrância. Quando os genes de suscetibilidade são comuns, como parece ocorrer no diabetes de tipo 1, permutas aparentes ou irmãos não idênticos são sugestivos da presença de genes de suscetibilidade adicionais em um dos pais.

Resumo

O MHC abrange numerosos alelos em diversos *loci*. A tipagem de alta resolução de genes de MHC de classes I e II, bem como a identificação de genes situados entre e próximos àqueles, ampliaram as possibilidades de definir as bases genéticas das respostas e doenças imunológicas de etiologia desconhecida, a exemplo das doenças autoimunes humanas. A associação não aleatória de marcadores a respostas imunológicas ou a doenças autoimunes, dada a presença na população de estiramentos fixos de DNA de MHC e haplótipos estendidos, além de seus respectivos fragmentos, complica o estudo dos genes de suscetibilidade, embora também proporcione meios para identificá-los. Ainda que o MHC humano seja a região do genoma mais intensivamente estudada, nem todos os genes expressos junto ao MHC foram identificados. É provável que alguns genes de MHC não identificados, e não um gene já conhecido, sejam determinantes de suscetibilidade a certas doenças associadas ao MHC humano.

Referências bibliográficas

Adams P, Brissot P, Powell LW: EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. J Hepatol 2000; 33:485–504.

Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, et al: Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:5056–5060.

Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, et al: Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:7658–7662.

Albani S, Tuckwell JE, Esparza L, et al: The susceptibility sequence to rheumatoid arthritis is a cross-reactive B cell epitope shared by the Escherichia coli heat shock protein dnaJ and the histocompatibility leukocyte antigen DRB10401 molecule. J Clin Invest 1992; 89:327–331.

Albertella MR, Campbell RD: Characterization of a novel gene in the human major histocompatibility complex that encodes a potential new member of the I kappa B family of proteins. Hum Mol Genet 1994; 3:793–799.

Allcock RJ, Atrazhev AM, Beck S, et al: The MHC haplotype project: a resource for HLA-linked association studies. Tissue Antigens 2002; 59:520–521.

Alper CA: Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and Bf. J Exp Med 144:1111–1115, 1976.

Alper CA, Awdeh ZL, Raum DD, et al: Extended major histocompatibility complex haplotypes in man: role of alleles analogous to murine t mutants. Clin Immunol Immunopathol 1982; 24:276–285.

Alper CA, Awdeh Z, Yunis EJ: Conserved, extended MHC haplotypes. Exp Clin Immunogenet 1992; 9:58–71.

Alper CA, Raum D, Karp S, et al: Serum complement 'supergenes' of the major histocompatibility complex in man (complotypes). Vox Sang 1983; 45:62–67.

Alper CA, Xu J, Cosmopoulos K, et al: Immunoglobulin deficiencies and susceptibility to infection among homozygotes and heterozygotes for C2 deficiency. J Clin Immunol 2003; 23:297–305.

Auger I, Toussirot E, Roudier J: HLA-DRB1 motifs and heat shock proteins in rheumatoid arthritis. Int Rev Immunol 1998; 17:263–271.

Awdeh ZL, Alper CA: Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:3576–3580.

Awdeh ZL, Raum D, Yunis EJ, et al: Extended HLA/complement allele haplotypes: evidence for T/t-like complex in man. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:259–263.

Barnett AH, Eff C, Leslie RD, et al: Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. Diabetologia 1981; 20:87–93.

Beck S, Trowsdale J: The human major histocompatability complex: lessons from the DNA sequence. Annu Rev Genomics Hum Genet 2000; 1:117–137.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 1987; 329:506–512.

Este artigo de referência mostra a primeira estrutura em cristal de uma molécula de HLA de classe I associada a um peptídeo.

Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM, et al: Association of tuberculosis and M. tuberculosis-specific antibody levels with HLA. J Infect Dis 1989; 159:549–555.

Braun L, Schneider PM, Giles CM, et al: Null alleles of human complement C4. Evidence for pseudogenes at the C4A locus and for gene conversion at the C4B locus. J Exp Med 1990; 171:129–140.

Brinkman BM, Giphart MJ, Verhoef A, et al: Tumor necrosis factor alpha-308 gene variants in relation to major histocompatibility complex alleles and Felty's syndrome. Hum Immunol 1994; 41:259–266.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]. Nature 1993; 364:33–39.

Este artigo de referência mostra a primeira estrutura em cristal de uma molécula de HLA de classe I associada a um peptídeo.

Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, et al: Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. Cell 1993; 72:847–856.

Burch GH, Gong Y, Liu W, et al: Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers–Danlos syndrome. Nat Genet 1997; 17:104–108.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, et al: Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. J Exp Med 1995; 182:1259–1264.

Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al: HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage [see comments]. Science 1999; 283:1748–1752.

Carroll MC, Campbell RD, Bentley DR, et al: A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. Nature 1984; 307:237–241.

Carroll MC, Campbell RD, Porter RR: Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:521–525.

Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, et al: Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:8535–8539.

Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, et al: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:9578–9582.

Chung EK, Yang Y, Rennebohm RM, et al: Genetic sophistication of human complement components C4A and C4B and RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in the major histocompatibility complex. Am J Hum Genet 2002; 71:823–837.

Clavijo OP, Delgado JC, Awdeh ZL, et al: HLA-Cw alleles associated with HLA extended haplotypes and C2 deficiency. Tissue Antigens 1998; 52:282–285.

Clavijo OP, Delgado JC, Yu N, et al: HLA-Cw*1701 is associated with two sub-Saharan African-derived HLA haplotypes: HLA-B*4201, DRB1*03 and HLA-B*4202 without DRB1*03. Tissue Antigens 1999; 54:303–306.

Colten HR, Rosen FS: Complement deficiencies. Annu Rev Immunol 10:809–834, 1992.

Corzo D, Yunis JJ, Salazar M, et al: The major histocompatibility complex region marked by HSP70-1 and HSP70-2 variants is associated with clozapine-induced agranulocytosis in two different ethnic groups. Blood 1995; 86:3835–3840.

Criswell LA, Lum RF, Turner KN, et al: The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. Arthritis Rheum 2004; 50:2750–2756.

Cullen M, Perfetto SP, Klitz W, et al: High-resolution patterns of meiotic recombination across the human major histocompatibility complex. Am J Hum Genet 2002; 71:759–776.

D'Alfonso S, Richiardi PM: A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. Immunogenetics 39:150–154, 1994.

Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, et al: Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. Immunol Rev 1999; 167:275–304.

Delgado JC, Baena A, Thim S, et al: Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 2002; 186:1463–1468.

Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, et al: A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1*0301 is present in clinical variants of pemphigoid. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:8569–8571.

Densen P: Complement deficiencies and meningococcal disease. Clin Exp Immunol 1991; 86(Suppl 1):57–62.

Dunckley H, Gatenby PA, Hawkins B, et al: Deficiency of C4A is a genetic determinant of systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. J Immunogenet 1987; 14:209–218.

Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, et al: Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:7237–7241.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 1996; 13:399–408.

Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, et al: The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. J Biol Chem 1997; 272:14025–14028.

Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, et al: Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. J Exp Med 2002; 195:343–351.

Fernandez-Vina M, Fink CW, Stastny P: HLA associations in juvenile arthritis. Clin Exp Rheumatol 1994; 12:205–214.

Fielder AH, Walport MJ, Batchelor JR, et al: Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null

alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. Br Med J (Clin Res Ed) 1983; 286:425–442.
Fields S, Song O: A novel genetic system to detect protein–protein interactions. Nature 1989; 340:245–246.
Fleischnick E, Awdeh ZL, Raum D, et al: Extended MHC haplotypes in 21-hydroxylase-deficiency congenital adrenal hyperplasia: shared genotypes in unrelated patients. Lancet 1983; 1:152–156.
Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, et al: Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:5140–5145.
Fraser PA, Moore B, Stein R, et al: Complotypes in individuals of African origin: frequencies and possible extended MHC haplotypes. Immunogenetics 1990; 31:89–93.
Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al: The structure of haplotype blocks in the human genome. Science 2002; 296:2225–2229.
Garavito G, Yunis EJ, Egea E, et al: HLA-DRB1 alleles and HLA-DRB1 shared epitopes are markers for juvenile rheumatoid arthritis subgroups in Colombian mestizos. Hum Immunol 2004; 65:359–365.
Geserick G, Otremba P, Schroder H, et al: Reference typing report for complement factor B. Exp Clin Immunogenet 1998; 15:261–263.
Goggins M, Kelleher D: Celiac disease and other nutrient related injuries to the gastrointestinal tract. Am J Gastroenterol 1994; 89:S2–S17.
Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, et al: Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. JAMA 1998; 279:226–228.
Trata-se do primeiro relato de um gene do MHC associado à suscetibilidade à tuberculose pulmonar.
Hamann A, Mantzoros C, Vidal-Puig A, et al: Genetic variability in the TNF-alpha promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM). Biochem Biophys Res Commun 1995; 211:833–883.
Hammer J, Gallazzi F, Bono E, et al: Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. J Exp Med 1995; 181:1847–1855.
Hauptmann G, Goetz J, Uring-Lambert B, et al: Component deficiencies. 2. The fourth component. Prog Allergy 1986; 39:232–249.
Heijmans BT, Westendorp RG, Droog S, et al: Association of the tumour necrosis factor alpha-308G/A polymorphism with the risk of diabetes in an elderly population-based cohort. Genes Immun 2002; 3:225–228.
Heilig R, Eckenberg R, Petit JL, et al: The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. Nature 2003; 421:601–607.
Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuanec H, et al: New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. J Immunol 1999; 162:6942–6946.
Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, et al: Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:2841–2845.
Higuchi T, Seki N, Kamizono S, et al: Polymorphism of the 5′-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. Tissue Antigens 1998; 51:605–612.
Holzinger I, de Baey A, Messer G, et al: Cloning and genomic characterization of LST1: a new gene in the human TNF region. Immunogenetics 1995; 42:315–322.
Hui J, Oka A, Tomizawa M, et al: Identification of two new C4 alleles by DNA sequencing and evidence for a historical recombination of serologically defined C4A and C4B alleles. Tissue Antigens 2004; 63:263–269.
Hunt C, Morimoto RI: Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:6455–6459.
Jahn I, Uring-Lambert B, Arnold D, et al: C2 reference typing report. Complement Inflamm 1990; 7:175–182.
Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R: Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. Nat Genet 2001; 29:217–222.
Jenkins D, Fletcher J, Penny MA, et al: DRB genotyping supports recessive inheritance of DR3-associated susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Hum Genet 1991; 49:49–53.
John S, Shephard N, Liu G, et al: Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. Am J Hum Genet 2004; 75:54–64.
Johnson CA, Densen P, Hurford RK, Jr., et al: Type I human complement C2 deficiency. A 28-base pair gene deletion causes skipping of exon 6 during RNA splicing. J Biol Chem 1992; 267:9347–9353.
Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, et al: Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:9717–9721.
Kaslow RA, Carrington M, Apple R, et al: Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. Nat Med 1996; 2:405–411.
Keet IP, Tang J, Klein MR, et al: Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. J Infect Dis 1999; 180:299–309.
Kendall E, Sargent CA, Campbell RD: Human major histocompatibility complex contains a new cluster of genes between the HLA-D and complement C4 loci. Nucleic Acids Res 1990; 18:7251–7257.
Khan MA, Kellner H: Immunogenetics of spondyloarthropathies. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:837–864.
Khomenko AG, Litvinov VI, Chukanova VP, et al: Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. Tubercle 1990; 71:187–192.
Klein J: Natural History of Major Histocompatibility Complex. New York, John Wiley & Sons, 1986.
Klemperer MR, Woodworth HC, Rosen FS, et al: Hereditary deficiency of the second component of complement (C′2) in man. J Clin Invest 1966; 45:880–890.
Kockum I, Sanjeevi CB, Eastman S, et al: Complex interaction between HLA DR and DQ in conferring risk for childhood type 1 diabetes. Eur J Immunogenet 1999; 26:361–372.
Kockum I, Wassmuth R, Holmberg E, et al: HLA-DQ primarily confers protection and HLA-DR susceptibility in type I (insulin-dependent)
diabetes studied in population-based affected families and controls. Am J Hum Genet 1993; 53:150–167.
Koeleman BP, Lie BA, Undlien DE, et al: Genotype effects and epistasis in type 1 diabetes and HLA-DQ trans dimer associations with disease. Genes Immun 2004; 5:381–388.
Kubaszek A, Pihlajamaki J, Komarovski V, et al: Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. Diabetes 2003; 52:1872–1876.
Kwok WW, Domeier ME, Johnson ML, et al: HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. J Exp Med 1996; 183:1253–1258.
Kwon OJ, Peled N, Miller K, et al: HLA class II analysis in Jewish Israeli narcoleptic patients. Hum Immunol 1995; 44:199–202.
Lander ES, Linton LM, Birren B, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409:860–921.
Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC: Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. Nat Immunol 2001; 2:501–507.
Lehner B, Semple JI, Brown SE, et al: Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. Genomics 2004; 83:153–167.
Lernmark A: Type 1 diabetes. Clin Chem 1999; 45:1331–1338.
Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, et al: Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. J Clin Invest 2004; 113:1641–1650.
Lokki ML, Circolo A, Ahokas P, et al: Deficiency of human complement protein C4 due to identical frameshift mutations in the C4A and C4B genes. J Immunol 1999; 162:3687–3693.
Lokki ML, Koskimies SA: Allelic differences in hemolytic activity and protein concentration of BF molecules are found in association with particular HLA haplotypes. Immunogenetics 1991; 34:242–246.
McCusker SM, Curran MD, Dynan KB, et al: Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumour necrosis factor alpha and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case–control study. Lancet 2001; 357:436–439.
McGarry F, Walker R, Sturrock R, et al: The -308.1 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. J Rheumatol 1999; 26:1110–1116.
MacGregor A, Ollier W, Thomson W, et al: HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. J Rheumatol 1995; 22:1032–1036.
McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, et al: Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature 1994; 371:508–510.
Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, et al: HLA-DQB1 genotype in Sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1 *0201 and *0302 alleles. Neurology 1992; 42:883–886.
Marsh MN: Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). Gastroenterology 1992; 102:330–354.
Marsh SG: Nomenclature for factors of the HLA system, update July 2004. Eur J Immunogenet 2004; 31:215–216.
Martin AM, Nolan D, Gaudieri S, et al: Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:4180–4185.
Meo T, Atkinson JP, Bernoco M, et al: Structural heterogeneity of C2 Complement protein and its genetic variants in man: a new polymorphism of the HLA region. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:1672–1675.
Messer G, Spengler U, Jung MC, et al: Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. J Exp Med 1991; 173:209–219.
MHC Sequencing Consortium: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. Nature 1999; 401:921–923.
Miettinen O: Estimability and estimation in case-referent studies. Am J Epidemiol 1976; 103:226–235.
Milner CM, Campbell RD: Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. Immunogenetics 1990; 32:242–251.
Milner CM, Campbell RD: Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. Immunogenetics 1992; 36:357–362.
Mira JP, Cariou A, Grall F, et al: Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. Journal of the American Medical Association 1999; 282:561–568.
Mu H, Chen JJ, Jiang Y, et al: Tumor necrosis factor a microsatellite polymorphism is associated with rheumatoid arthritis severity through an interaction with the HLA-DRB1 shared epitope. Arthritis Rheum 1999; 42:438–442.
Nedospasov SA, Udalova IA, Kuprash DV, et al: DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. J Immunol 1991; 147:1053–1059.
Nepom BS, Nepom GT, Coleman M, et al: Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and -DQ molecules. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:7202–7206.
Nepom GT: A unified hypothesis for the complex gene-

tics of HLA associations with IDDM. Diabetes 1990; 39:1153–1157.
Nepom GT, Erlich H: MHC class-II molecules and autoimmunity. Annu Rev Immunol 1991; 9:493–525.
Nepom GT, Nepom BS: Prediction of susceptibility to rheumatoid arthritis by human leukocyte antigen genotyping. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:785–792.
Nicaud V, Raoux S, Poirier O, et al: The TNF alpha/G-308A polymorphism influences insulin sensitivity in offspring of patients with coronary heart disease: the European Atherosclerosis Research Study II. Atherosclerosis 2002; 161:317–325.
Noble JA, Valdes AM, Cook M, et al: The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. Am J Hum Genet 1996; 59:1134–1148.
Nousari HC, Kimyai-Asadi A, Provost TT: Generalized lupus erythematosus profundus in a patient with genetic partial deficiency of C4. J Am Acad Dermatol 1999; 41:362–364.
Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, et al: Identification of I kappa BL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 2003; 72:303–312.
Ollier W, Thomson W: Population genetics of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:741–759.
Ozaki K, Inoue K, Sato H, et al: Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. Nature 2004; 429:72–75.
Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, et al: Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. Nat Genet 2002; 32:650–654.
Partanen J, Koskimies S: Low degree of DNA polymorphism in the HLA-linked lymphotoxin (tumour necrosis factor beta) gene. Scand J Immunol 1988; 28:313–316.
Pende D, Parolini S, Pessino A, et al: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. J Exp Med 1999; 190:1505–1516.
Penrose LS: The detection of autosomal linkage in pairs of brothers and sisters of unspecified parentage. Ann Eugen 1935; 6:133.
Penzotti JE, Doherty D, Lybrand TP, et al: A structural model for TCR recognition of the HLA class II shared epitope sequence implicated in susceptibility to rheumatoid arthritis. J Autoimmun 1996; 9:287–293.
Quarsten H, Paulsen G, Johansen BH, et al: The P9 pocket of HLA-DQ2 (non-Aspbeta57) has no particular preference for negatively charged anchor residues found in other type 1 diabetes- predisposing non-Aspbeta57 MHC class II molecules. Int Immunol 1998; 10:1229–1236.
Ragoussis J, Monaco A, Mockridge I, et al: Cloning of the HLA class II region in yeast artificial chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:3753–3757.
Rajalingam R, Mehra NK, Jain RC, et al: Polymerase chain reaction-based sequence-specific oligonucleotide hybridization analysis of HLA class II antigens in pulmonary tuberculosis: relevance to chemotherapy and disease severity. J Infect Dis 1996; 173:669–676.
Raum D, Awdeh Z, Alper CA: BF types and the mode of inheritance of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Immunogenetics 1981; 12:59–74.
Ribas G, Neville M, Wixon JL, et al: Genes encoding three new members of the leukocyte antigen 6 superfamily and a novel member of Ig superfamily, together with genes encoding the regulatory nuclear chloride ion channel protein (hRNCC) and an N ω-N ω-dimethylarginine dimethylaminohydrolase homologue, are found in a 30-kb segment of the MHC class III region. J Immunol 1999; 163:278–287.
Rogers AE, Meehan J, Guilleminault C, et al: HLA DR15 (DR2) and DQB1*0602 typing studies in 188 narcoleptic patients with cataplexy. Neurology 1997; 48:1550–1556.
Rubin LA, Amos CI, Wade JA, et al: Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. Arthritis Rheum 1994; 37:1212–1220.
Rubinstein P, Suciu-Foca N, Nicholson JF: Genetics of juvenile diabetes mellitus. A recessive gene closely linked to HLA D and with 50 per cent penetrance. N Engl J Med 1977; 297:1036–1040.
Salter RD, Parham P: Mutually exclusive public epitopes of HLA-A, B, C molecules. Human Immunology 1989; 26:85–89.
Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, et al: Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:1968–1972.
Schneider PM, Mauff G: Complement C4 protein and DNA typing methods. Methods Mol Biol 2003; 210:269–295.
Schneider PM, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C: Genetic polymorphism of the fourth component of human complement: population study and proposal for a revised nomenclature based on genomic PCR typing of Rodgers and Chido determinants. Eur J Immunogenet 1996; 23:335–344.
Schneider PM, Witzel-Schlomp K, Rittner C, et al: The endogenous retroviral insertion in the human complement C4 gene modulates the expression of homologous genes by antisense inhibition. Immunogenetics 2001; 53:1–9.
Schroder O, Schulte KM, Ostermann P, et al: Heat shock protein 70 genotypes HSPA1B and HSPA1L influence cytokine concentrations and interfere with outcome after major injury. Crit Care Med 2003; 31:73–79.
Siebold C, Hansen BE, Wyer JR, et al: Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:1999–2004.
Siemens I, Brenden M, Mauff G, et al: Apparently non-expressed alleles of factor B (BF) code for hypomorphic proteins. Immunogenetics 1992; 37:24–28.
Silverstein AM: Essential hypocomplementemia: report of a case. Blood 1960; 16:1338–1341.
Sim E, Cross SJ: Phenotyping of human complement component C4, a class-III HLA antigen. Biochem J 1986; 239:763–767.
Simon M, Bourel M, Fauchet R, et al: Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. Gut 1976; 17:332–334.
Sinnott PJ, Costigan C, Dyer PA, et al: Extended MHC haplotypes and CYP21/C4 gene organisation in Irish 21-hydroxylase deficiency families. Hum Genet 1991; 87:361–366.
Skol AD, Young KA, Tsuang DW, et al: Modest evidence for linkage and possible confirmation of association between NOTCH4 and schizophrenia in a large Veterans Affairs Cooperative Study sample. Am J Med Genet 2003; 118B:8–15.
Spies T, Bresnahan M, Strominger JL: Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:8955–8958.
Stastny P, Fernandez-Vina M, Cerna M, et al: Sequences of HLA alleles associated with arthritis in adults and children. J Rheumatol Suppl, 1993; 37:5–.
Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al: Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. Nature 1994; 368:215–221.
Stewart CA, Horton R, Allcock RJN, et al: Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. Genome Res 2004; 14:1176–1187.
Este artigo referencial é o primeiro dos inúmeros relatos que sem dúvida surgirão sobre a fina estrutura dos haplótipos do MHC para mapeamento das variantes genéticas que conferem a suscetibilidade às doenças.
Sturfelt G, Hellmer G, Truedsson L: TNF microsatellites in systemic lupus erythematosus – a high frequency of the TNFabc 2-3-1 haplotype in multicase SLE families. Lupus 1996; 5:618–622.
Sullivan KE, Petri MA, Schmeckpeper BJ, et al: Prevalence of a mutation causing C2 deficiency in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1994; 21:1128–1133.
Sutton HE: An Introduction to Human Genetics, 3rd ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1980.
Svejgaard A, Platz P, Ryder LP: HLA and disease 1982 – a survey. Immunol Rev 1983; 70:193–218.
Tazi-Ahnini R, Cork MJ, Wengraf D, et al: Notch4, a non-HLA gene in the MHC is strongly associated with the most severe form of alopecia areata. Hum Genet 2003; 112:400–403.
Temple SE, Cheong KY, Ardlie KG, et al: The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B. Intensive Care Med 2004; 30:1761–1767.
Teran-Escandon D, Teran-Ortiz L, Camarena-Olvera A, et al: Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. Chest 1999; 115:428–433.
Descreve o primeiro mapa genético baseado em sequências de um MHC humano.
Thomson G: HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Hum Genet 1984; 36:1309–1317.
Thomson G, Bodmer W (1977). The genetic analysis of HLA and disease association. In Dausset J, Svejgaard A (eds) HLA and Disease. Copenhagen, Munksgaard.
Thorsby E, Ronningen KS: Role of HLA genes in predisposition to develop insulin-dependent diabetes mellitus. Ann Med 1992; 24:523–531.
Truedsson L, Alper CA, Awdeh ZL, et al: Characterization of type I complement C2 deficiency MHC haplotypes. Strong conservation of the complotype/HLA-B-region and absence of disease association due to linked class II genes. J Immunol 1993; 151:5856–5863.
Truedsson L, Awdeh Z, Yunis EJ, et al: Quantitative variation of C4 variant proteins associated with many MHC haplotypes. Immunogenetics 1989; 30:414–421.
Truedsson L, Sturfelt G, Nived O: Prevalence of the type I complement C2 deficiency gene in Swedish systemic lupus erythematosus patients. Lupus 1993b; 2:325–327.
Turbay D, Lieberman J, Alper CA, et al: Tumor necrosis factor constellation polymorphism and clozapine-induced agranulocytosis in two different ethnic groups. Blood 1997; 89:4167–4174.
Uglialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, et al: Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. Tissue Antigens 1998; 52:359–367.
Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, et al: Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. J Clin Invest 1995; 95:2954–2962.
Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, et al: Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:12384–12389.
Walsh EC, Mather KA, Schaffner SF, et al: An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. Am J Hum Genet 2003; 73:580–590.
Wassink TH, Nopoulos P, Pietila J, et al: NOTCH4 and the frontal lobe in schizophrenia. Am J Med Genet 2003; 118B:1–7.
Wei J, Hemmings GP: TNXB locus may be a candidate gene predisposing to schizophrenia. Am J Med Genet 2004; 125B:43–49.
Wetsel RA, Kulics J, Lokki ML, et al: Type II human complement C2 deficiency. Allele-specific amino acid substitutions (Ser189 → Phe; Gly444 → Arg) cause impaired C2 secretion. J Biol Chem 1996; 271:5824–5831.
White PC, New MI, Dupont B: Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:5111–5115.
White PC, Vitek A, Dupont B, et al: Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:4436–4440.
Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, et al: Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992; 1:353.
Winter WE, Chihara T, Schatz D: The genetics of autoimmune diabetes. Approaching a solution to the problem. Am J Dis Child 1993; 147:1282–1290.
Wu YR, Wang CK, Chen CM, et al: Analysis of heat--shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. Hum Genet 2004; 114:236–241.

Xie T, Rowen L, Aguado B, et al: Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. Genome Res 2003; 13:2621–2636.

Yang Y, Chung EK, Zhou B, et al: Diversity in intrinsic strengths of the human complement system: serum C4 protein concentrations correlate with C4 gene size and polygenic variations, hemolytic activities, and body mass index. J Immunol 2003; 171:2734–2745.

Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Vina M, et al: Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. Tissue Antigens 2003; 62:1–20.

Revisão recente sobre os haplótipos estendidos do MHC e sobre blocos de haplótipos menores, bem como uma atualização de suas composições alélicas nas populações do planeta.

Yunis JJ, Mobini N, Yunis EJ, et al: Common major histocompatibility complex class II markers in clinical variants of cicatricial pemphigoid. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:7747–7751.

Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR: HLA class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations. Hum Immunol 2000; 61:1254–1261.

Zimmerman PA, Guderian RH, Nutman TB: A new TNFA promoter allele identified in South American Blacks. Immunogenetics 1996; 44:485–486.

CAPÍTULO 49

Distúrbios de imunodeficiência

Kimberly W. Sanford MD MT(ASCP), Susan D. Roseff MD

Sinais clínicos e sintomas de imunodeficiência 1036
Avaliação do sistema imune 1037
Investigações de primeiro nível 1037
- História clínica, exame físico e contagem sanguínea inicial 1037
- Imunoglobulinas 1038
- Imagem radiológica 1039
- Funções pulmonares 1039

Investigações de segundo nível 1039
- Produção de anticorpos 1039
- Subclasses de IgG 1039
- Imunidade mediada por células T 1039
- Avaliação funcional da célula T 1040
- Ensaios de *killing* polimorfonuclear 1040
- Avaliação do complemento 1041

Investigações de terceiro nível 1041
- Quantificações de enzimas para detecção de defeitos metabólicos 1041
- Ensaios para células *natural killer* 1041
- Análises adicionais de fagócitos 1041
- Citocinas e receptores de citocinas 1042
- Marcadores adicionais de superfície celular 1042
- Uso dos novos imunógenos na avaliação da produção de anticorpos 1043
- Genética molecular e diagnóstico pré-natal 1043

Resumo 1043
Referências bibliográficas 1044

PONTOS-CHAVE

- As imunodeficiências primárias constituem um grupo de distúrbios envolvendo um único gene.
- Em razão da complexidade do diagnóstico de uma imunodeficiência primária, é necessário haver cooperação entre clínico, pesquisador e patologista clínico.
- O diagnóstico de distúrbios de imunodeficiência primária requer uma abordagem lógica e baseada em testes diagnósticos realizados em etapas, em virtude da natureza complexa do sistema imune.
- A realização de imunoensaios complexos requer preparo para a coleta, a manipulação e a entrega da amostra a um laboratório de análises especializado.
- Em consequência dos avanços tecnológicos, o teste de genética molecular é cada vez mais empregado no diagnóstico primário de distúrbios de imunodeficiência.

As imunodeficiências constituem um grupo de distúrbios que envolvem um gene isolado, resultando em defeitos do sistema imune. As manifestações podem variar quanto a grau de severidade, tipos de sintomas exibidos ou ambos. Tais condições, quando permanecem sem serem detectadas e sem tratamento, podem levar o indivíduo à morte. Um defeito genético pode resultar na perda de uma enzima crítica, acarretar retardo do desenvolvimento de determinado aspecto do sistema imune, causar a perda de um componente estrutural ou criar uma proteína não funcional. A maioria desses distúrbios é ligada ao cromossomo X e, por isso, um número desproporcional de indivíduos do sexo masculino é afetado (cerca de 70% dos pacientes com distúrbios de imunodeficiência primária) (Puck, 1997a). A maioria das imunodeficiências primárias é detectada antes dos 20 anos de idade, contudo o diagnóstico pode ocorrer tardiamente, uma vez que a identificação desses distúrbios demanda um alto grau de suspeita clínica. Mais de 100 distúrbios de imunodeficiência primária já foram descritos. No entanto, mais de 90% dos pacientes diagnosticados são afetados por menos de 20 distúrbios de imunodeficiência (Puck, 1997a). Enquanto os distúrbios de imunodeficiência devem-se a mutações em um único gene, as imunodeficiências secundárias podem ser causadas por desnutrição, infecções virais, malignidades hematológicas ou de outros tipos, quimioterapia para tratamento de malignidades e medicamentos imunossupressores utilizados na terapia de uma variedade de doenças.

As barreiras físicas naturais do corpo constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Essas barreiras são a pele, o muco exposto nas superfícies mucosas e as células ciliadas presentes nos tratos respiratório, intestinal e genital. Em adição às barreiras físicas, as funções imunológicas do corpo exercem uma vigilância contínua atuando por meios adquiridos e inatos. A resposta imunológica adquirida é específica, requer exposição prévia ao antígeno para sensibilização e torna-se cada vez melhor a cada exposição subsequente a um mesmo antígeno. Essas respostas resultam da proliferação de células B e T antígeno-específicas, que são estimuladas pela ligação de seus receptores celulares aos respectivos antígenos. As células B produzem anticorpos antígeno-específicos destinados à eliminação de antígenos extracelulares. As células T auxiliam as células B a produzirem esses anticorpos e também matam células infectadas por vírus. As respostas inatas dispensam a prévia exposição ao antígeno e envolvem células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos e monócitos), complemento, citocinas e reagentes de fase aguda (Delves, 2000).

O sistema imune é constituído por um grupo de células e funções imunes interligadas, no qual a existência de qualquer defeito pode resultar em imunodeficiência. Estima-se que a incidência das doenças de imunodeficiência primária nos Estados Unidos seja de aproximadamente 1 a cada 200.000 bebês nascidos vivos, com exceção da deficiência de imunoglobulina A (IgA) (Winkelstein, 2000). A imunodeficiência mais comum – a deficiência seletiva de IgA – apresenta uma incidência de 1 em cada 328 doadores de sangue sadios (Clark, 1983). De uma forma geral, a incidência estimada das doenças de imunodeficiência primária diagnosticadas é de 1/10.000 (Smith, 1999; Immune Deficiency Foundation, 1992; Shearer, 1994). As incidências de imunodeficiências primárias estimadas para Austrália e Noruega, respectivamente, são de 2,1 a cada 100.000 (Baugmgart, 1997) e 6,8 a cada 100.000 (Ryser, 1988; Stray-Pedersen, 1997; Matamoros, 2000).

Por motivos desconhecidos, cerca da metade dos defeitos imunológicos relatados envolve a produção de um anticorpo defeituoso, em decorrência de um baixo número de células B ou da existência de células B com produção reduzida de anticorpo antígeno-específico. Menor produção de anticorpo antígeno-específico com frequência se manifesta como infecções pulmonares ou sinusais recorrentes, bem como septicemia bacteriana (Noroski, 1998). Essas infecções são tipicamente causadas por bactérias encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophillus influenzae*. Uma imunidade de células T defeituosa apresenta associação característica com infecções oportunistas causadas por vírus e fungos, como *Candida albicans*, *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI) e *Pneumocystis carinii* (Buckley, 2000). O tipo de infecção adquirido pelo paciente pode indicar o tipo de defeito de imu-

nidade celular que ele apresenta (Fig. 49.1). Os distúrbios de imunodeficiência primária também estão associados a doenças autoimunes e neoplasmas malignos (especialmente, linfomas) (Smith, 1999).

Sinais clínicos e sintomas de imunodeficiência

Frequentemente, a primeira indicação clínica de um defeito imunológico é a suscetibilidade aumentada a infecções recorrentes. O tipo de infecção recorrente fornece indícios sobre o defeito imunológico e ajuda a orientar o clínico na avaliação do paciente. Assim, a parte mais crítica da avaliação médica é a obtenção da história médica completa. Identificar crianças com imunodeficiências representa um desafio considerável para os pediatras, visto que as infecções tanto são comuns durante a infância normal quanto constituem a principal manifestação das imunodeficiências primárias. Portanto, a ocorrência de infecções frequentes e prolongadas aliada à falha do desenvolvimento, ou a ocorrência de infecções oportunistas requerem um completo *work up* imunológico (Puck, 1999). Um relato confirmado de um caso de imunodeficiência em irmão ou parente de primeiro grau do paciente também requer avaliação clínica e laboratorial imediata, mesmo que o paciente não possua história de infecções severas ou incomuns. Em um estudo envolvendo 70 pacientes com distúrbios de imunodeficiência primária, aproximadamente 18,6% tinham história familiar de imunodeficiência (Kobrynski, 2002).

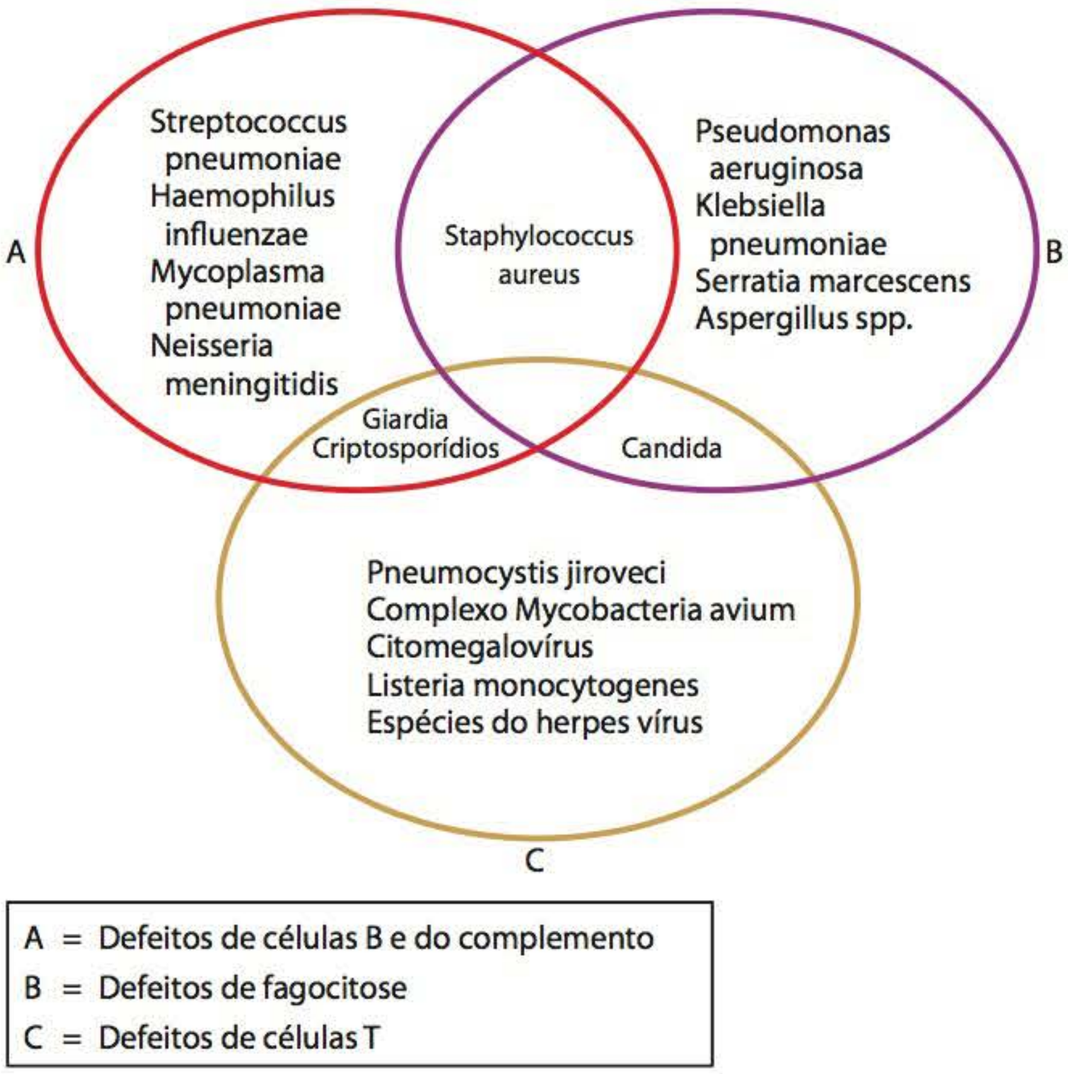


Figura 49.1 Infecções associadas a defeitos imunocelulares.

O conhecimento das manifestações clínicas mais comuns pode ajudar o clínico a identificar indivíduos mais propensos a terem um defeito imunológico primário. Os sinais e sintomas clínicos de imunodeficiência primária são esquematizados na Figura 49.2. Além desses sinais de alerta, o médico deve atentar aos elementos incomuns encontrados na história do paciente, como doença autoimune, linfadenopatia significativa, necessidade de um adulto para miringotomia, herpes-zoster severa ou aparecimento de herpes-zoster ainda na infância, diarreia incurável ou colite ulcerativa diagnosticada no paciente com menos de 1 ano de idade. Esses sinais e sintomas adicionais devem conduzir à imediata avaliação para detecção de um possível defeito imunológico.

Como não é prático investigar todo o sistema imune em todos os pacientes, o quadro clínico e a idade do paciente devem indicar ao clínico a parte do sistema imune que mais provavelmente está afetada. A obtenção de uma história detalhada e a realização de um exame físico completo podem estreitar a margem de possíveis defeitos envolvendo células T, células B, granulócitos ou sistema complemento. O papel das defesas do hospedeiro e sua correlação com diferentes distúrbios de imunodeficiência são representados na Figura 49.3.

Também é importante atentar para as circunstâncias clínicas e não apenas considerar exclusivamente o número ou o grau de severidade dos episódios de infecção (Atkinson, 2000). Exemplificando, quando um processo infeccioso afeta o mesmo sítio anatômico repetidas vezes, é mais provável que a etiologia seja estrutural, em vez da falha de uma das defesas do hospedeiro. Essa situação ocorre na osteomielite crônica de localização única, nos episódios recorrentes de pneumonia que afeta um único lobo pulmonar, ou nas infecções recorrentes de uma ferida cirúrgica. Além disso, certos distúrbios de imunodeficiência primária, como a doença granulomatosa crônica, podem surgir em fases mais tardias da vida do que seria esperado. Entretanto, ainda é importante ter em mente esses distúrbios ao estabelecer o diagnóstico diferencial (Lukela, 2005).

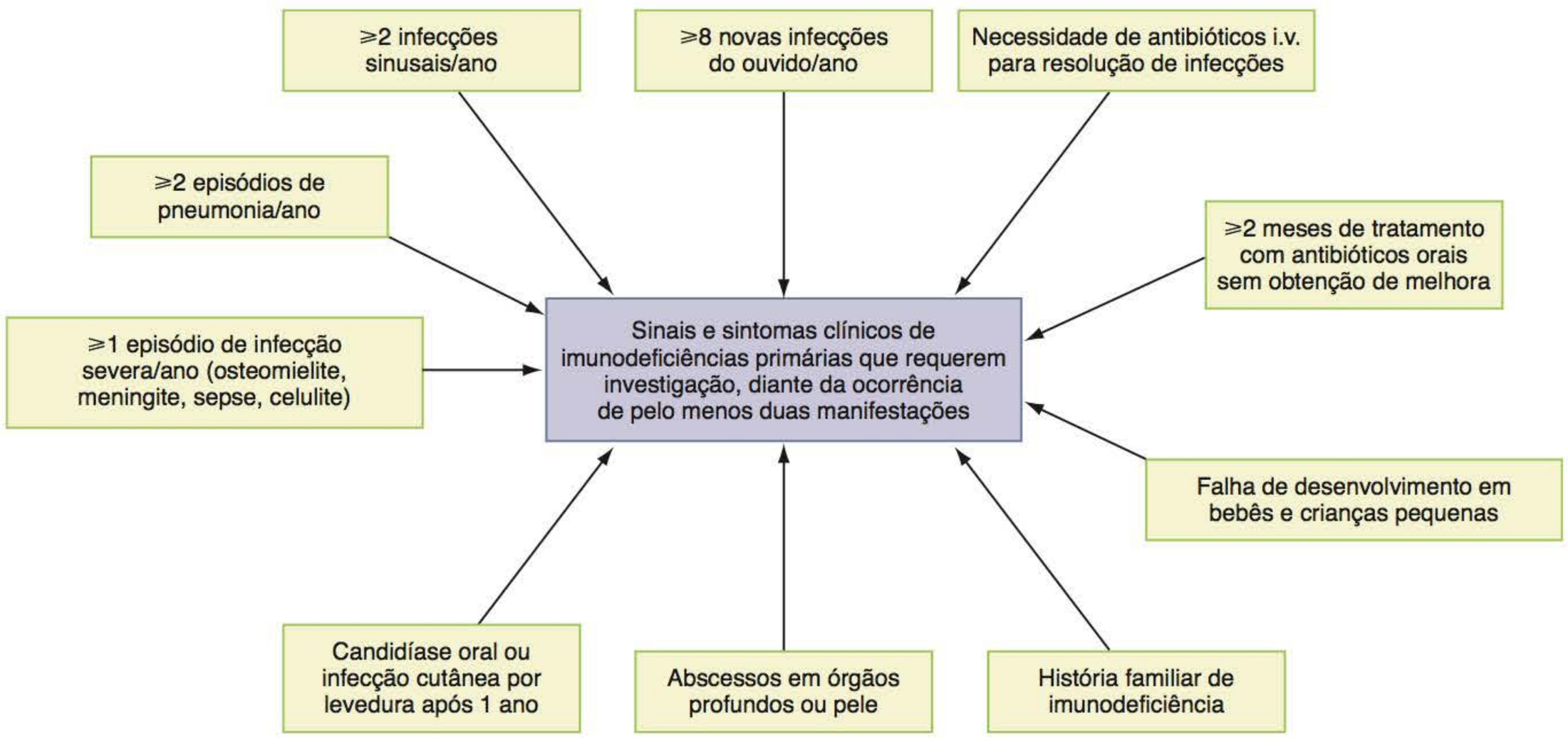


Figura 49.2 Sinais e sintomas clínicos das imunodeficiências primárias.

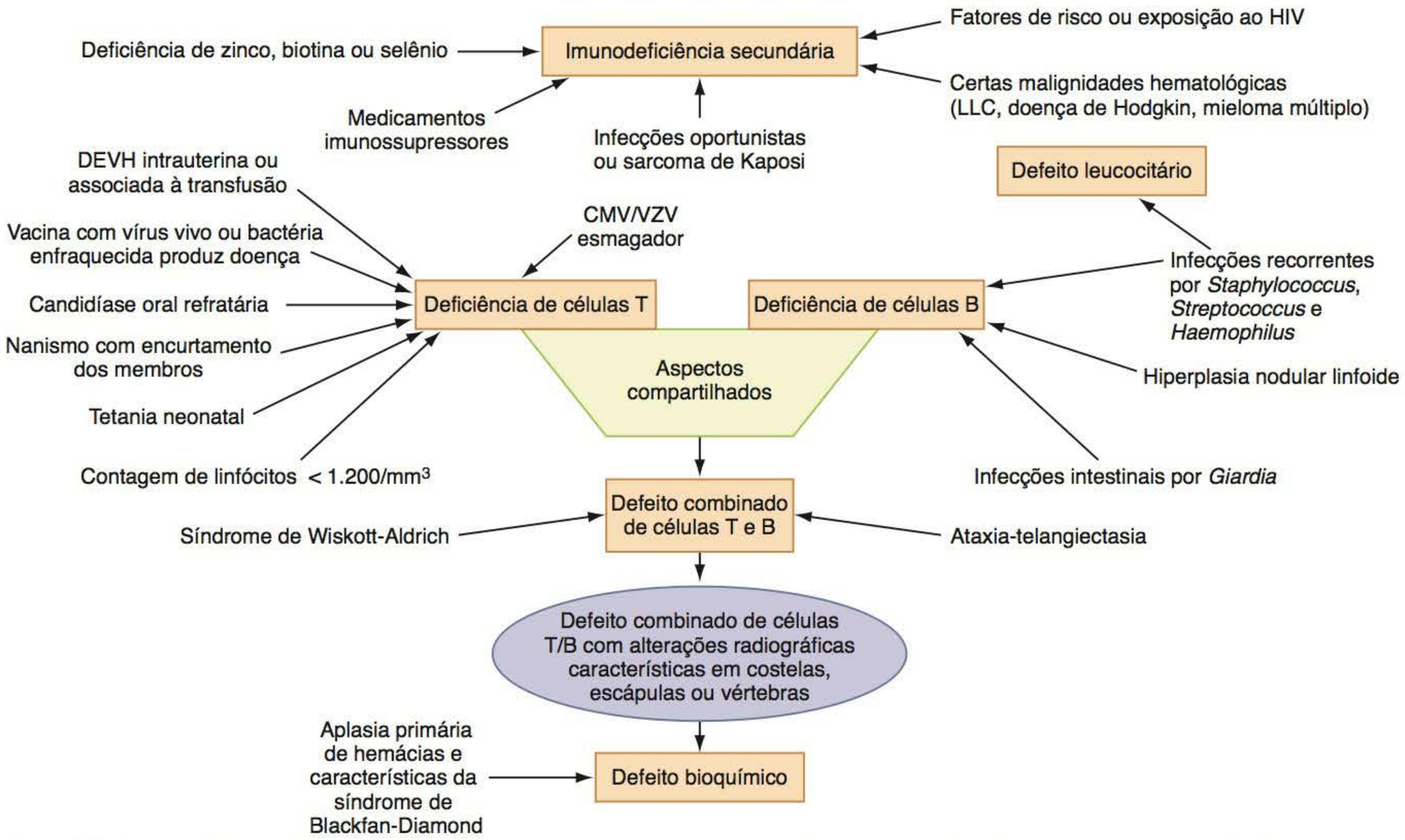


Figura 49.3 Padrões de distúrbios de imunodeficiência. CMV = citomegalovírus; DEVH = doença do enxerto *versus* hospedeiro; HIV = vírus da imunodeficiência humana; LLC = leucemia linfocítica crônica; VZV = vírus varicela-zoster.

Avaliação do sistema imune

Com base nas considerações anteriores, diante de uma suspeita de defeito imunológico, a avaliação do sistema imune é mais adequada quando executada em etapas. Os testes básicos de triagem são realizados primeiro e, subsequentemente, são realizados testes cada vez mais complexos, conforme a indicação. Por exemplo, se um paciente apresenta fortes sintomas clínicos sugestivos de distúrbios de células B ou T, porém a contagem de linfócitos está normal, justifica-se realizar mais investigações utilizando um painel de enumeração de linfócitos. A Figura 49.4 fornece uma visão geral dessa abordagem em etapas. A Figura 49.5 esquematiza um algoritmo de teste básico para imunodeficiências.

Investigação primária

- História e exame físico
- CCS/diferencial
- Raios X
- Quantificação de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA)
- Revisão de resultados de cultura anteriores
- Teste de função pulmonar

Investigação secundária

- Titulação para vacinas administradas (tétano, difteria, pneumococos)
- Análise de subclasses de IgG
- Painel de enumeração de linfócitos (CD_3, CD_4, CD_8, CD_{19}, CD_{16}, CD_{56})
- Níveis de complemento (CH_{50}, C_3, C_4)
- Teste cutâneo
- Estudos de proliferação de células mononucleares
- NBT

Investigação terciária

- Estudos enzimáticos (adenosina deaminase, purina nucleotídeo fosforilase)
- Estudos de citotoxicidade de células NK
- Estudos de fagocitose
- Histologia e análise imuno-histoquímica (ou de citometria de fluxo) de linfonodos ou órgãos linfoides
- Produção de citocinas
- Estudos avançados de complemento
- Biologia molecular

Figura 49.4 Abordagem por etapas para investigação laboratorial de imunodeficiências primárias. CCS = contagem completa de células sanguíneas; NBT = teste de nitroazul de tetrazólio em lâmina; célula NK = célula *natural killer*.

Investigações de primeiro nível

História clínica, exame físico e contagem sanguínea inicial

Uma história clínica abrangente fornece indícios primários para o diagnóstico de um distúrbio de imunodeficiência primária. Uma história típica inclui a ocorrência de infecções recorrentes e persistentes, ou de infecções causadas por micróbios incomuns. Os clínicos serão guiados pelos tipos de infecção adquiridos pelo paciente. Pacientes com imunodeficiências de imunoglobulinas tipicamente relatam aumento da incidência de infecções bacterianas. Infecções virais, fúngicas ou outro tipo de infecções oportunistas repetitivas estão associadas a imunodeficiências de células T. Pacientes com defeitos fagocíticos costumam relatar uma história de infecções por bactérias catalase-positivas (p. ex., *Staphylococcus* spp). Deficiências do complemento estão mais frequentemente associadas a infecções por *Staphylococcus pneumoniae* ou *Neisseria* spp. (Fig. 49.1) (Lindegren, 2004).

O exame físico pode revelar achados característicos de certos distúrbios de imunodeficiência primária em particular. Pacientes com esse tipo de doença são pálidos, letárgicos e parecem estar cronicamente doentes. Bebês e crianças pequenas afetadas podem apresentar falha de desenvolvimento e, por isso, é importante que sejam monitoradas quanto à altura e ao peso. Linfonodos, tonsilas ou adenoides pequenas ou

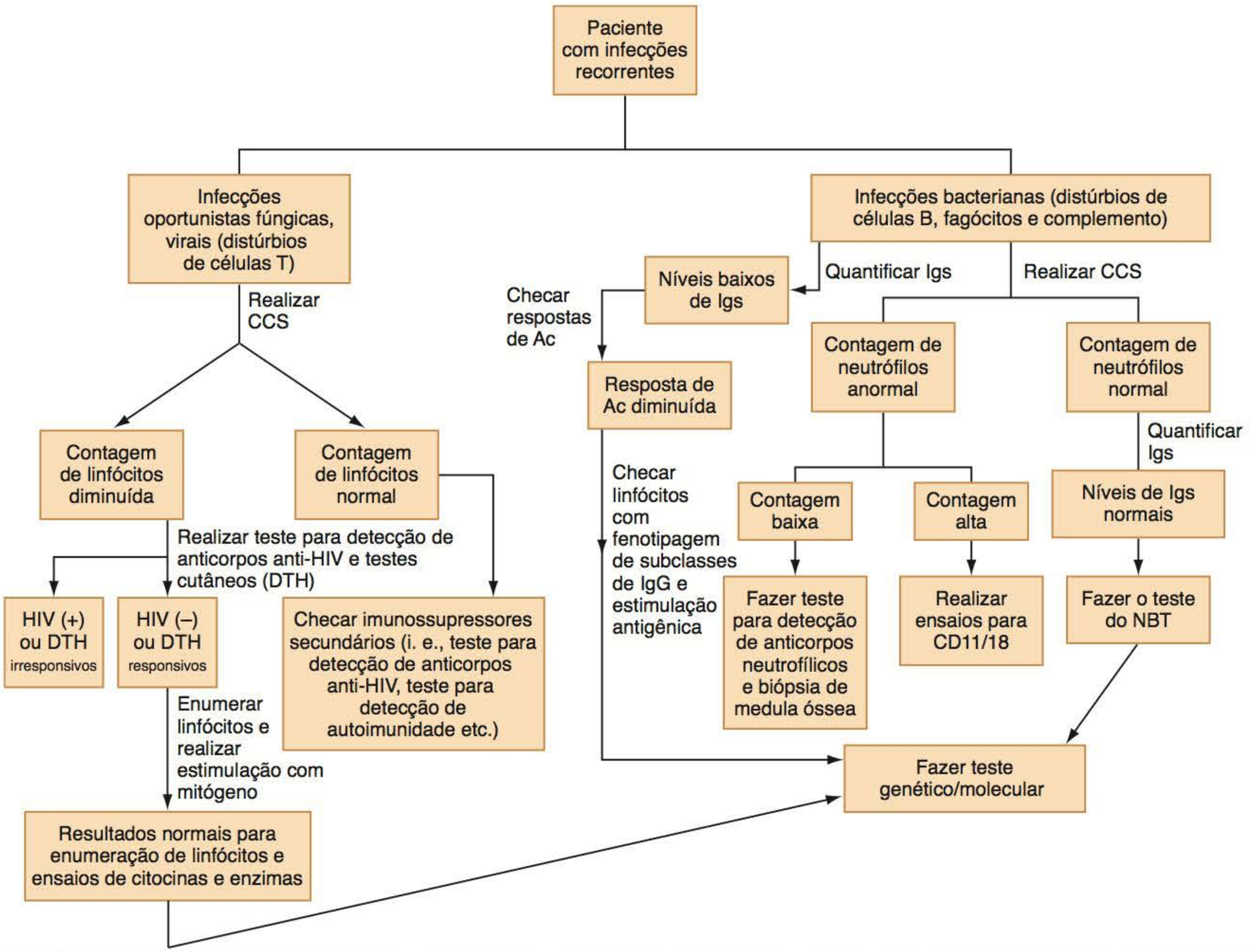


Figura 49.5 Algoritmo de teste para imunodeficiências. Ac = anticorpo; CCS = contagem completa de células sanguíneas; DTH = teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio (PPD); HIV = vírus da imunodeficiência humana; Igs = imunoglobulinas; NBT = teste de nitroazul de tetrazólio em lâmina.

ausentes são indicativos de agamaglobulinemia ligada ao X (Lindegren, 2004). Além das infecções respiratórias, bebês também podem apresentar rinite, conjuntivite e distúrbios hematológicos, gastrintestinais e autoimunes (Fleisher, 2003). Em contraste, pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) e imunodeficiência variável comum exibem linfonodos periféricos normais ou aumentados (Buckley, 2000). O defeito genético observado na síndrome de Wiskott-Aldrich causa imunodeficiências e trombocitopenia, com consequente propensão a contusões, petéquias e erupções cutâneas eczematosas (Zhu, 1997).

O primeiro teste a ser realizado para avaliar o sistema imune é a contagem sanguínea completa. Uma contagem de leucócitos sanguíneos e um diferencial fornecerão informações sobre a morfologia e o número de pequenos linfócitos (diâmetro < 10 μm). Os parâmetros normais variam de acordo com a idade do paciente e, por esse motivo, devem ser interpretados considerando as faixas etárias apropriadas. Independentemente da idade, espera-se que o paciente apresente uma contagem mínima maior que 1.200 pequenos linfócitos/mm^3. Como os linfócitos B representam uma pequena parte (≤10%) da população de linfócitos, uma deficiência absoluta deles reflete de modo primário uma deficiência de células T. Uma parte da primeira visita do paciente também deve incluir a obtenção de todos os registros médicos anteriores, incluindo relatos ou *slides* de patologia, bem como resultados de culturas e exames de raios X obtidos previamente.

Imunoglobulinas

Como as deficiências de anticorpos são doenças mais comuns do que outros defeitos imunológicos, deve ser enfatizada em primeiro lugar a investigação das imunoglobulinas e sua produção (Stiehm, 1996). Cerca de metade dos distúrbios de imunodeficiência primária estão relacionados à produção inadequada de anticorpos ou à produção de anticorpos não funcionais (Noroski, 1998). Os ensaios quantitativos para imunoglobulinas são prontamente disponibilizados em todos os laboratórios comerciais e nos grandes laboratórios hospitalares. Esses ensaios requerem apenas pequenos volumes de soro para as análises (ver Caps. 19 e 45). Como os valores de imunoglobulinas aumentam com a idade, é necessário comparar os dados obtidos com os valores referenciais normais para a faixa etária adequada, a fim de interpretar corretamente os resultados.

Durante os primeiros meses de vida, a IgG constitui a principal imunoglobulina encontrada no soro do bebê, sendo de origem materna. Em torno dos 3 meses de idade, a dissipação da concentração de IgG materna combinada a uma fase *lag* de produção desse anticorpo pelo próprio bebê resultam na formação de níveis de IgG de nadir. Entretanto, primeiramente a IgM e em seguida a IgA passam a ser sintetizadas pela criança. Assim, a presença dessas duas imunoglobulinas evidencia de maneira convincente a ausência de uma agamaglobulinemia ligada ao X, a qual é caracterizada por uma pan-hipogamaglobulinemia. Portanto, IgA, IgM e IgG devem ser quantificadas de modo simultâneo.

Os níveis de IgA muitas vezes não são significativos até os 6 meses de idade. Todavia, depois de 1 ano, a persistência de baixos níveis de IgA aponta a existência de um defeito permanente (Plebani, 1986). Alguns pacientes deficientes de IgA podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas leves, como maior incidência de infecções respiratórias ou gastrintestinais. Contudo, há pacientes que desenvolvem reações ana-

filáticas severas ou fatais ao plasma existente em produtos do sangue que contêm IgA (Lindegren, 2004).

A síndrome da hiper-IgM, um distúrbio hereditário de células T ligado ao X, caracteriza-se por níveis de IgM normais ou elevados e níveis acentuadamente baixos de IgA, IgG e IgE (Levy, 1997; Ramesh, 1998; Buckley, 2000). Entretanto, elevações marcantes dos níveis de IgE quase sempre integram a síndrome da hiper-IgE (Buckley, 1978) e são comuns na síndrome de Wiskott-Aldrich, nas deficiências de células T isoladas e na DGC. A síndrome de Wiskott-Aldrich também é caraterizada por uma notável elevação dos níveis séricos de IgA aliada a baixas concentrações de IgM (Ochs, 1998).

Uma forma simples de avaliar os níveis de anticorpos funcionais em crianças consiste em checar iso-hemaglutininas dirigidas contra antígenos ABO ausentes no paciente, pois a presença dessas moléculas é indicativa de uma produção de anticorpos funcionais ativa (Fleisher, 2003). As iso-hemaglutininas são anticorpos de ocorrência natural que se formam após os 2 ou 3 meses de idade; entretanto, o teste para detecção desses anticorpos não é válido para crianças de 4 a 6 meses em virtude da persistência das imunoglobulinas maternas. Além disso, por causa da relativa imaturidade ou, talvez, da exposição inadequada, crianças com imunidade normal podem apresentar baixas concentrações de iso-hemaglutininas entre 5 e 10 anos (Brecher, 2002).

Imagem radiológica

Estudos de raios X, tomografia computadorizada (TC) e imagem por ressonância magnética (IRM) podem ser úteis na avaliação das imunodeficiências. A pneumonia intersticial crônica é comum em bebês, crianças ou adultos com deficiências de células T, e deve ser confirmada por meio de exames de raios X do tórax. Com o passar do tempo, muitos pacientes com deficiência primária de células B (agamaglobulinemia, imunodeficiência variável comum) podem desenvolver fibrose pulmonar crônica ou bronquiectasia (Sweinberg, 1991; Cunningham-Rundles, 1999). A TC torácica de um paciente que apresenta infecções recorrentes do trato respiratório é a melhor alternativa para investigar a bronquiectasia. Se as alterações tiverem se desenvolvido, certamente será necessário realizar outras investigações.

No passado, vistas laterais da região cervical eram utilizadas para avaliar o tecido linfoide faríngeo em crianças. O exame de raios X, no entanto, não é recomendado para avaliação do tecido linfoide cervical, pois a informação obtida dessa forma pode ser conseguida de modo mais fácil utilizando métodos alternativos. Embora vistas frontais do tórax possam revelar a ausência da sombra tímica em bebês, o timo pode encolher facilmente em decorrência do estresse e, por esse motivo, a avaliação do tamanho tímico por esse método não é confiável. Por outro lado, anormalidades ósseas podem alertar o radiologista quanto ao aparecimento de um possível problema imunológico durante a infância. Um subgrupo de pacientes com imunodeficiências envolvendo anomalias de células T, ou de células T e B, apresenta nanismo com encurtamento dos membros. Esses pacientes exibem lesões características, de modo geral nas regiões metafisárias dos ossos longos. Pacientes com deficiência de adenosina deaminase de início na infância apresentam anormalidades esqueléticas prontamente identificáveis nas costelas e no quadril (Lindegren, 2004). Anomalias ósseas podem estar presentes em pacientes com síndrome de hiper-IgE. Tais anomalias incluem osteoporose difusa, fraturas subsequentes a traumatismos leves, craniossinostomose e defeitos da linha média óssea (Grimbacher, 1999).

Funções pulmonares

A imunodeficiência, especialmente quando persiste por algum tempo, com frequência afeta o sistema pulmonar e sua função, conforme já mencionado. Sendo assim, volumes pulmonares completos acompanhados de volumes expiratórios forçados devem ser testados mesmo que as radiografias torácicas estejam normais. Pacientes com defeitos de células T e B estão sujeitos a contrair infecções pulmonares com consequente broncoespasmo, doença restritiva ou obstrutiva, ou uma combinação dessas anomalias. Pacientes com deficiências tanto de IgA quanto de IgG2 apresentam testes de função pulmonar significativamente anormais, podendo haver uma relação causal entre essas deficiências e a deterioração da função dos pulmões (Bjorkander, 1985).

Investigações de segundo nível

Produção de anticorpos

A investigação da produção de anticorpo específico pode requerer apenas o monitoramento das respostas imunes a antígenos de vacinas, sendo o método mais direto para avaliação da função da célula B. Trata-se de uma abordagem útil para pacientes com história de infecções bacterianas recorrentes e concentrações de imunoglobulinas abaixo dos níveis normais. O método definitivo para avaliar as imunoglobulinas quantitativamente reduzidas consiste em medir os níveis de pré-imunização contra antígenos específicos e os níveis de anticorpos de pós-imunização após um período de 4 semanas. Se a criança ou o adulto recebeu as imunizações usuais no passado, os títulos de anticorpos para esses antígenos de vacina podem ser medidos. As respostas de vacina mais úteis para a avaliação são aquelas contra tétano, difteria, *Haemophilus* e pneumococos. Diversos laboratórios comerciais desenvolveram testes sensíveis, como o ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), que pode ser utilizado para avaliar a produção de anticorpos. A avaliação das respostas imunes às vacinas deve incluir as concentrações de anticorpo no soro pré-imunização e a idade do paciente, pois esses fatores afetam a resposta de anticorpos. O laboratório que realiza os testes fornece diretrizes para as respostas de anticorpo apropriadas. Em geral, espera-se um aumento de quatro vezes associado aos antígenos proteicos e um aumento de duas vezes para os antígenos polissacarídicos.

As respostas de anticorpo aos toxoides tetânico e diftérico são úteis para avaliar respostas dirigidas a antígenos dependentes de células T. A avaliação da função de células B requer a determinação das respostas aos antígenos carboidratos, que ativam diretamente essas células. É importante utilizar antígenos de carboidratos que não estejam conjugados a proteínas, como os antígenos meningocócicos e pneumocócicos polissacarídicos (Balmer, 2003). Crianças com menos de 2 anos de idade não respondem a antígenos de carboidratos não conjugados (Barrett, 1984), sendo que não devem ser administradas vacinas com vírus vivos a crianças nem a qualquer familiar do paciente até a exclusão da possibilidade de imunodeficiência (Go, 1996).

Subclasses de IgG

A IgG apresenta quatro subclasses – IgG1 a IgG4 – com características estruturais e biológicas distintas (Normansell, 1987; Schur, 1987). Embora os papéis individuais de cada subclasse de IgG não tenham sido estabelecidos, os anticorpos dirigidos a antígenos de carboidratos concentram-se na subclasse IgG2, sendo que muitos antígenos de parede celular bacteriana são constituídos de carboidratos (Scott, 1988). Assim, a ausência de uma resposta de IgG2 pode resultar na falha em desenvolver proteção contra infecção bacteriana. Essa relação é mais convincente em um eventual paciente com deficiência de IgA, que também apresente deficiência da subclasse IgG2 e não responda com produção de anticorpos a vacinas para pneumococos. A deficiência de uma subclasse de IgG também foi implicada como causa de infecções recorrentes em pacientes que apresentam níveis normais (ou quase normais) de IgG (Oxelius, 1979; Wedgwood, 1986; Shackelford, 1990; Gross, 1992; Popa, 1994).

A importância biológica da deficiência de subclasses de IgG nem sempre é nítida e alguns indivíduos totalmente desprovidos dos genes para IgG2, IgA e IgE são sadios (Lefranc, 1982; Migone, 1984). A IgG1 é o primeiro tipo de resposta de subclasse aos antígenos de carboidrato, sendo que a conversão para resposta de IgG2 ocorre conforme o indivíduo amadurece (Scott, 1988). Não há evidências de que os indivíduos cujas respostas se restringem à IgG1 estejam em desvantagem. Para determinar a importância biológica da deficiência de subclasses de IgG, é obrigatório testar a produção de anticorpos específicos, usualmente por meio da administração de vacina, como a contra tétano, difteria, *Haemophilus* e pneumococo. Apenas pacientes que apresentassem uma clara deficiência de anticorpos para múltiplos antígenos seriam considerados portadores de defeito imunológico significativo.

Imunidade mediada por células T

A migração das células-tronco a partir da medula óssea para o timo resulta no desenvolvimento das células T (Kruisbeek, 1999).

Durante o desenvolvimento destas células no timo, diversas moléculas de superfície são ligadas e desligadas de maneira controlada. Essas moléculas são identificadas de acordo com seu grupo de diferenciação (CD, *cluster of differentiation*). Os marcadores CD ajudam a distinguir o estágio de maturação e a função dos linfócitos (Buckley, 2000). Apesar da regressão do timo com o passar do tempo, o desenvolvimento das células T continua por toda a vida (Jamieson, 1999). Diferente dos anticorpos produzidos pelas células B, que reconhecem antígenos no estado natural, as células T reconhecem peptídeos combinados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) após o processamento pelas células apresentadoras de antígeno, por meio do receptor da célula T – o CD3 (Buckley, 2000).

Anticorpos monoclonais são úteis para a detecção dos marcadores CD dos linfócitos, além de permitirem a rápida enumeração das células T e das subclasses de células T. Isso pode ser feito utilizando pequenos volumes de sangue total. A designação CD subdivide as células T (como um grupo, $CD3^+$) em dois subgrupos principais – células T $CD4^+$ e $CD8^+$. As células T $CD4^+$ são referidas como "auxiliares" (*helper*), envolvidas na inicialização das reações imunes, na secreção de citocinas e na intensificação das respostas de células B. As células T $CD8^+$ também liberam citocinas e estão associadas a funções citotóxicas (*killer*). Os marcadores $CD4^+$ e $CD8^+$ presentes nas células T servem de moléculas sinalizadoras e trabalham em conjunto com os antígenos do MHC de classes I e II, no sentido de ampliar e estabilizar a ligação com os receptores das células T (TCR). As células $CD4^+$ reconhecem antígenos apresentados no contexto dos antígenos do MHC de classe II, enquanto as células $CD8^+$ reconhecem antígenos apresentados no contexto dos antígenos do MHC de classe I (Buckley, 2000). As doenças da imunodeficiência resultantes da geração de células T defeituosas podem resultar na perda total ou em baixos números de células T $CD3^+$, produzindo efeitos similares sobre as subclasses de células T, células $CD4^+$ e $CD8^+$. A síndrome de DiGeorge, por exemplo, resulta em baixos números de células $CD3^+$ (Hong, 1998). A deficiência do MHC de classe II resulta em baixos números de células $CD4^+$ (Klein, 1993) e em uma anormalidade da Zap-70 (uma molécula sinalizadora integral à atividade do TCR), com redução do número de células T $CD8^+$ (Elder, 1998). Diante da suspeita de um defeito imune, um painel de marcadores de células T é examinado por citometria de fluxo, bem como o percentual e a contagem absoluta de células em cada grupo são comparados aos valores de referência normais da faixa etária correspondente (Illoh, 2004).

Avaliação funcional da célula T

Uma história clínica de infecções oportunistas e uma contagem absoluta de linfócitos diminuída em uma contagem sanguínea completa devem conduzir a uma pronta investigação funcional das células T do paciente (Fleisher, 2003). A candidíase mucocutânea é outra indicação de defeito funcional de células T, sendo caracterizada pela extensão da infecção a partir das membranas mucosas sobre a continuidade da pele, podendo envolver as unhas dos dedos das mãos com inflamação granulomatosa (Atkinson, 2000; Lilic, 2001). Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (DTH, *delayed type hypersensitivity*) comumente são empregados para determinar a função das células T, pois medem a capacidade de memória, reconhecimento e apresentação de antígenos, e mobilização delas, bem como de gerar uma resposta inflamatória específica. Mesmo diante de uma contagem absoluta de linfócitos normal, devem ser realizados testes cutâneos de DTH sempre que houver suspeita de um defeito envolvendo a célula T. Entretanto, esses testes são difíceis de interpretar quando se trata de crianças, pois elas podem não ter sido suficientemente expostas para responder aos antígenos montando uma resposta imunogênica, de modo que uma resposta reduzida ou ausente pode ser normal. O teste cutâneo de hipersensibilidade deve incorporar mais de um antígeno (Kniker, 1985). Para garantir uma administração adequada e a correta interpretação dos resultados do teste, a equipe de funcionários deve ser bem treinada (Fleisher, 2003).

Informações sobre a capacidade das células T podem ser obtidas por meio de avaliações funcionais de respostas proliferativas *in vitro* a diferentes estímulos. Mitógenos, antígenos e aloantígenos constituem estímulos que induzem proliferação de células T. Os mitógenos usualmente são extratos de plantas pouco específicos, estimulando linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Os aloantígenos presentes em células de doadores sem grau de parentesco também estimulam células $CD4^+$ e $CD8^+$ de forma relativamente inespecífica. Pacientes com significativa deficiência de células T ainda podem apresentar respostas proliferativas a esses estímulos, indicando que tais células estão presentes mas são incapazes de eliminar agentes infecciosos no hospedeiro. Mesmo assim, as respostas proliferativas a antígenos específicos constituem um bom indicador da capacidade do hospedeiro de resistir à infecção (Lane, 1985). No caso de antígenos específicos, costuma-se utilizar antígenos de tétano, difteria e *Candida*, embora seja necessário haver exposição suficiente a eles. Portanto, esses antígenos não são confiáveis para testar crianças durante o primeiro ano de vida. Uma medida de respostas de células T que é útil para crianças consiste em cultivar células mononucleares do sangue periférico em presença de concentrações mitogênicas de anticorpos monoclonais anti-CD3. Essa estimulação normalmente induz proliferação de todas as células T $CD3^+$, enquanto a ausência de proliferação evidencia um severo defeito de células T (Hong, 1996).

Ensaios de *killing* polimorfonuclear

Testar a função dos neutrófilos requer um cuidadoso planejamento, pois, às vezes, as amostras precisam ser transportadas por longas distâncias até os grandes laboratórios de referência, nos quais as análises são feitas. O sangue coletado de um paciente deve ser submetido à investigação laboratorial o quanto antes, uma vez que os neutrófilos passam por processo de apoptose rapidamente após a coleta. Caso o sangue precise ser armazenado ou transportado, deve ser coletado em um tubo de polipropileno contendo conservante (p. ex., ácido etilenodiaminotetra-acético [EDTA] ou citrato), e mantido à temperatura ambiente (entre 20 e 25°C). Esse procedimento diminui a atividade metabólica e minimiza a adesão das células às paredes do tubo. Mesmo sob condições ideais, é possível preservar as células somente por até 24 ou 36 horas (Kuijpers, 1999).

Neutropenia ou disfunção de neutrófilos ocorre em infecções bacterianas ou fúngicas recorrentes na pele, nos linfonodos, no fígado, nos pulmões ou nos ossos. Ambas são mais frequentes em paciente sob terapia mielossupressora para tratamento de neoplasmas malignos. Esses distúrbios devem ser distinguidos da DGC, em que a fagocitose permanece normal em detrimento do *killing* intracelular defeituoso de microrganismos infecciosos, resultando na formação de abscesso ou granuloma no fígado, nos ossos e nos pulmões (Lekstrom-Himes, 2000). A herança da DGC é mais comumente ligada ao X ou autossômica recessiva, em razão da ocorrência de mutações envolvendo as regiões cromossômicas 16p24, 7q11.23 ou 1q25. Essas alterações resultam em defeitos de uma ou mais subunidades da NADPH oxidase, que é a enzima catalisadora da formação de peróxido de hidrogênio. Esse erro conduz a uma falha de explosão respiratória nos granulócitos após a ingestão fagocítica das bactérias (Meischl, 1998). Como resultado, o oxigênio molecular não é reduzido a superóxido e outros radicais livres, como radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, que são componentes importantes do mecanismo intracelular de destruição bacteriana (Babior, 1978). A DGC é, portanto, caracterizada por infecções recorrentes por organismos produtores de catalase (p. ex., *Staphylococcus aureus*), que são capazes de decompor o peróxido de hidrogênio produzido pelos granulócitos. Sendo assim, os organismos catalase-positivos conseguem sobreviver à ingestão intracelular, multiplicar-se e causar uma resposta tecidual granulomatosa que, quando excessiva, pode obstruir os tratos gastrintestinal e geniturinário. Infecções crônicas por *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., *Burkholderia cepacia* e *Aspergillus* spp. são particularmente problemáticas (Gallin, 1983, 1990). Entretanto, pacientes com DGC não enfrentam esse problema com relação aos organismos catalase-negativos.

A característica biológica fundamental dos leucócitos na DGC reside no fato de que essas células fagocitam as bactérias normalmente, sem destruí-las. Esse aspecto constitui a base do ensaio de *killing* bacteriano para DGC. Historicamente, o teste de nitroazul de tetrazólio (NBT) em lâmina tem sido o ensaio laboratorial utilizado na triagem da DGC que é realizada nos grandes laboratórios de referência (Park, 1968). Nesse ensaio, os neutrófilos do paciente são incubados com NBT, um corante amarelo-claro. Esse corante é ativado com forbol miristato acetato (PMA), um forte agente estimulador de ativação independente de receptor. Neutrófilos funcionais fagocitam, reduzem e precipitam o

corante NBT, formando depósitos intracelulares de formazan negro. Tais depósitos são indicativos da ocorrência de uma rápida ativação da enzima NADPH-oxidase, com consequente redução do oxigênio pela NADPH a superóxido que, logo após, é catalisado a peróxido de hidrogênio por ação da superóxido dismutase (SOD). Em seguida, um técnico estabelece microscopicamente os escores dos neurófilos que contêm depósitos intracelulares de formazan negro (Kuijpers, 1999). Entretanto, em muitos laboratórios, o teste do NBT em lâmina foi substituído por um teste de citometria de fluxo que detecta a oxidação intracelular de diclorofluoresceína diacetato di-hidrorrodamina 123 (O'Gorman, 1995). Esses corantes fluorescentes, uma vez oxidados, produzem substâncias intracelulares fluorescentes que são detectadas por citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um método mais objetivo e confiável para identificação de produtos intracelulares.

A síndrome de hiper-IgE (Buckley, 1978) é fenotipicamente semelhante à DGC, com abscessos cutâneos e pulmonares recorrentes. No entanto, a função dos leucócitos polimorfonucleares não constitui achado preponderante nessa doença (Buckley, 1978). Essa síndrome também inclui anomalias ósseas, fascies incomuns e candidíase cutânea. O defeito imunológico na síndrome da hiper-IgE ainda está pouco definido e, embora tenha sido mapeado no cromossomo 4, o defeito do hospedeiro ou o gene específico ainda não foi classificado. O diagnóstico da condição é indicado pela detecção de níveis de IgE acima de 2.000 UI/mL (que na verdade podem chegar a 20.000 ou 60.000 UI/mL), acompanhada das devidas manifestações clínicas (Grimbacher, 1999). No momento, não existem testes diagnósticos ou confirmatórios disponíveis para detecção da hiper-IgE que, então, é primariamente reconhecida por meio das manifestações clínicas (Grimbacher, 1999).

Avaliação do complemento

Foram descritos numerosos defeitos congênitos envolvendo o sistema complemento, ainda que não sejam causa frequente de distúrbios de imunodeficiência primária. Tais defeitos tipicamente estão associados à ausência de uma ou mais moléculas do complemento ou a uma proteína de complemento não funcional, com consequente redução da capacidade do complemento de ligar-se à superfície de microrganismos invasores. Defeitos individuais conduzem a síndromes clínicas distintas, como angioedema hereditário ou hemoglobinúria paroxística noturna, uma propensão a infecções bacterianas recorrentes ou doença autoimune (Schneider, 1999). Muitas das deficiências de base genética envolvendo a via de ativação clássica (C1, C2, C3, C4) e os componentes terminais (C5, C6, C7, C8 e C9) podem ser detectadas utilizando eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos em um ensaio para complemento hemolítico total (CH_{50}). Esse ensaio avalia a integridade funcional de C1-C9. Muitos laboratórios comerciais realizam esse ensaio que, para obtenção de resultados acurados, requer o uso de soro ou plasma recém-coletado e congelado em seguida. Portanto, a logística deve ser cuidadosamente coordenada quando as amostras precisarem ser transportadas a longas distâncias. As deficiências de componentes da via alternativa – fatores D, H e I, e properdina – são pouco comuns, todavia podem ser detectadas em ensaio hemolítico utilizando eritrócitos de coelho não sensibilizados como ativadores potentes da via alternativa. Se um desses ensaios resultar anormal, a identificação de componentes individuais deficientes é feita por testes funcionais e imunohistoquímicos que sejam específicos para cada componente (Cap. 46).

Investigações de terceiro nível

Quantificações de enzimas para detecção de defeitos metabólicos

Deficiências das enzimas adenosina deaminase e purina nucleosídeo fosforilase estão relacionadas ao metabolismo das purinas, resultando em deficiência imunológica. Pacientes com deficiência de adenosina deaminase apresentam achados similares aos daqueles com síndrome da imunodeficiência severa combinada (SCID, *severe combined immunodeficiency syndrome*). A SCID constitui uma coleção de distúrbios genéticos em que há um defeito severo envolvendo a função ou o desenvolvimento de células B e T. Em contraste com a SCID, os pacientes com deficiência de adenosina deaminase exibem displasia condro-óssea, resultando em anormalidades esqueléticas e linfopenia mais severa. A deficiência da adenosina deaminase é causada por uma mutação em um gene localizado no cromossomo 20q13.2-q13.11, que resulta no acúmulo tóxico de metabólitos que inibem a replicação celular e induzem a apoptose de linhagens celulares linfocíticas (Buckley, 2000). A falta de adenosina deaminase inicialmente causa perda de células T (em particular, de células T $CD4^+$), seguida da perda de células B, que leva ao desenvolvimento da forma combinada de deficiência de células T e B (SCID) (Hirschhorn, 1995). Assim como vários defeitos imunológicos primários que foram identificados pela primeira vez na forma homozigota severa, a deficiência de adenosina deaminase também foi diagnosticada em indivíduos adultos com linfopenia de CD4 e defeitos de células T significativos, na forma de deficiência parcial heterozigota (Shovlin, 1994).

A deficiência de purina nucleosídeo fosforilase é caracterizada pela ocorrência de infecções recorrentes, linfopenia, anormalidades neurológicas e distúrbios autoimunes (Myers, 2004). Essa deficiência enzimática provoca diminuição do número de células T e exerce pouco ou nenhum efeito sobre as células B. As enzimas purina nucleosídeo fosforilases usualmente são quantificadas em lisados de eritrócitos (Kizaki, 1977), entretanto o teste pode se tornar pouco confiável se o paciente tiver recebido produtos do sangue nos últimos 3 meses. Recentemente, a eletroforese capilar foi proposta como ensaio alternativo e de baixo custo. A eletroforese capilar pode proporcionar um alto grau de flexibilidade na separação em termos de diagnóstico de erros do metabolismo, além de ser capaz de determinar a atividade enzimática de purina nucleosídeo fosforilase ou de adenosina deaminase, bem como a presença de metabólitos tóxicos (Carlucci, 2003).

Ensaios para células *natural killer*

As células *natural killer* (NK) constituem um subgrupo de linfócitos que frequentemente atuam com as células T na erradicação de organismos intracelulares. A deficiência completa de células NK é rara e caracteriza-se pela ocorrência de infecções herpéticas recorrentes (Fleisher, 2003). As células NK possuem morfologia de linfócitos grandes granulares e expressam um grupo único de marcadores de superfície celular: CD16, CD56 e CD57 (Trinchieri, 1989). As células NK podem ser quantificadas de modo fácil por meio da detecção desses marcadores de superfície por citometria de fluxo. Entretanto, para avaliar a atividade funcional da célula NK, tradicionalmente são utilizados ensaios de liberação de cromo, que empregam células da linhagem K-562 marcadas com cromo 51 (Biron, 1989). Esse ensaio antigo tem suas próprias limitações, ou seja, é mais trabalhoso, incorpora o uso de materiais radioativos e não identifica os mecanismos de morte celular das células-alvo. Essas desvantagens conduziram ao desenvolvimento de métodos mais modernos, que dispensam o uso de radioatividade e utilizam técnicas de marcação fluorescente combinadas à citometria de fluxo para avaliar a função da célula NK. Outra técnica emprega um substrato colorimétrico para detectar granzima B, que é uma serina protease encontrada nos grânulos de linfócitos T citotóxicos e de células NK, cujo papel consiste em mediar a clivagem de substratos celulares na apoptose induzida pelos grânulos (Hoppner, 2002; Ewen, 2003).

Análises adicionais de fagócitos

Existem defeitos genéticos envolvendo o sistema imune inato que estão relacionados à formação ou à função dos grânulos junto aos neutrófilos. A mieloperoxidase é a enzima predominante detectada nos grânulos primários dos granulócitos e atua catalisando a formação de ácido hipocloroso (HOCl) que, por sua vez, destrói microrganismos (Kuijpers, 1999). Contudo, sua ausência usualmente não está associada à manifestação de sintomas clínicos, a não ser em pacientes com diabetes melito, que tornam-se mais suscetíveis à candidíase disseminada (Lanza, 1998). A deficiência de mieloperoxidase, herdada como defeito autossômico recessivo, é um dos distúrbios de neutrófilos hereditários mais comuns, no entanto, sua importância clínica permanece desconhecida (Lehrer, 1969; Klebanoff, 1999). Cerca de metade dos pacientes afetados apresenta deficiência de mieloperoxidase, enquanto os pacientes restantes apresentam concentrações normais de uma forma estruturalmente defeituosa da enzima (Nauseef, 1998).

A síndrome de Chédiak-Higashi e a deficiência granular específica são defeitos congênitos que resultam em distúrbios granulares de fagócitos. A síndrome de Chédiak-Higashi constitui um distúrbio autossômico recessivo em que todas as células contendo lisossomos apresentam grânulos gigantes anormais. Em neutrófilos, ocorre fusão de grânulos primários e secundários, com consequente retardo da fusão com os fagossomos, resultando em infecções bacterianas recorrentes. Pacientes com síndrome de Chédiak-Higashi apresentam neutropenia discreta, níveis normais de imunoglobulinas, defeitos envolvendo nervos periféricos, leve albinismo ocular e cutâneo, disfunção plaquetária leve e doença periodontal (Introne, 1999).

A deficiência específica de grânulos neutrofílicos é um distúrbio raro que se caracteriza pela ocorrência de infecções bacterianas recorrentes na pele e nos pulmões. Pacientes com essa deficiência não possuem grânulos neutrofílicos secundários ou específicos, os quais exercem papel importante na inflamação aguda, de modo que a migração dos neutrófilos é comprometida. O exame morfológico de neutrófilos corados revela a presença de anomalias características e trata da deficiência granular específica (Ganz, 1988).

Pacientes com deficiência de adesão leucocitária (DAL) de tipo 1 – um defeito envolvendo a integrina CD18, que constitui a cadeia β das moléculas LFA-1, Mac-1 e p150,95 (Anderson, 1987) – são suscetíveis a todas as infecções observadas em pacientes com DGC, além de otite média e cicatrização precária de feridas. Em geral, como os patógenos causam dano tecidual e inflamação, as moléculas de adesão existentes no endotélio vascular estão positivamente reguladas e são reconhecidas pelos neutrófilos circulantes que expressam os ligantes correspondentes. Como resultado final, os neutrófilos acumulam-se nos sítios de inflamação (Cap. 46). Pacientes com DAL não possuem as moléculas de adesão necessárias à diapedese, por isso apresentam neutropenia tecidual e, assim, mais infecções (Arnaout, 1993). Essa anormalidade tem início após o nascimento e é marcada por retardo da separação do cordão, desenvolvimento de úlceras cutâneas crônicas, periodontite, comprometimento da cicatrização e leucocitose. Leucócitos deficientes apresentam defeitos de adesão e das funções dependentes de adesão, como espalhamento, fagocitose e orientação quimiotática (Anderson, 1987).

A DAL de tipo 2 afeta principalmente neutrófilos e macrófagos, sendo que os pacientes com essa condição apresentam expressão defeituosa do ligante sialil-Lewis^X de selectinas e falha da conversão de manose GDP em fucose, resultando em uma síndrome clínica similar à DAL de tipo 1. O tipo 2 também é responsável pela expressão antigênica do raro grupo sanguíneo de Bombay (DAL-2) em hemácias (Etzioni, 1993).

A mobilidade leucocitária usualmente é avaliada por meio da observação da migração orientada pelas membranas de filtro ou em agarose (Nelson, 1975; Cates, 1981). A contagem do número de células em um determinado ponto final ou "filtro de parada" microscopicamente, ou por intermédio de marcação radioativa, apresenta a desvantagem de considerar apenas as células mais rápidas. Em consequência, pode ser obtida uma avaliação inacurada da maioria dos neutrófilos do paciente, de modo que é melhor contar o número de células em diferentes pontos ao longo do filtro (Kuijpers, 1999). Injeções de epinefrina e esteroides, que fazem os leucócitos polimorfonucleares abandonarem a marginação e saírem dos reservatórios medulares, são empregadas em outros tipos de avaliação da mobilidade desses leucócitos. Foi descrito um distúrbio envolvendo a actina, que é importante para a migração dos leucócitos polimorfonucleares (Southwick, 1988).

As proteínas de adesão existentes na superfície dos neutrófilos podem ser funcionalmente testadas utilizando diferentes ligantes imobilizados e ligados a uma monocamada de células endoteliais aderidas a uma lâmina de vidro, podendo ser quantificadas após o pré-tratamento com agentes quimiotáticos. O rolamento, a adesão e a migração dos neutrófilos podem ser monitorados no decorrer do tempo com auxílio de uma câmera de vídeo. A fagocitose atualmente pode ser avaliada por citometria de fluxo. Nessa técnica, os neutrófilos são incubados com microrganismos marcados com substância fluorescente, a amostra é lavada para remoção dos microrganismos marcados não digeridos e as células contendo microrganismos marcados ingeridos são contadas (Kuijpers, 1999). De maneira bastante semelhante, a citometria de fluxo pode ser empregada para avaliar o *killing* de micróbios, por meio do uso de corantes vitais que distinguem organismos vivos e mortos após a incubação com neutrófilos (Martin, 1992). É possível avaliar a degranulação empregando citometria de fluxo para medir na superfície dos neutrófilos a expressão de proteínas existentes na membrana dos grânulos (Kuijpers, 1999).

Citocinas e receptores de citocinas

As respostas imunes são reguladas por mediadores solúveis chamados citocinas. As citocinas produzem múltiplos eventos imunológicos ao interagirem com receptores apropriados presentes nos tecidos e nas células inflamatórias. As citocinas exercem papel importante ao atuarem como mensageiras junto ao sistema imune e em paralelo ao restante do corpo na regulação das respostas imunes (Mire-Sluis, 1998). A partir do estudo de pacientes com imunodeficiência, bem como de camundongos depletados de certos genes, foi possível expandir nosso conhecimento sobre o papel das citocinas nas defesas do hospedeiro. Deficiências de interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)-γ aumentam a suscetibilidade a infecções por salmonela e micobactérias (de Jong, 1998). O comprometimento da secreção ou da resposta à IL-12 compromete a formação do granuloma e, assim, permite o crescimento descontrolado de micobactérias (Jouanguy, 1999). Estudos recentes mostraram que a patofisiologia de vários desses distúrbios pode resultar de uma sinalização defeituosa de citocinas, com consequente disfunção ou retardo do desenvolvimento de células B, T e NK (Kelly, 2003). Mais notavelmente, a SCID ligada ao X humano está associada a defeitos envolvendo o gene de um receptor de IL (*IL2RG*), que codifica uma cadeia γ comum (γc) compartilhada por vários receptores de citocinas, tais como IL-4F, IL-7R, IL-9R e IL-15R. A produção comprometida de γc provoca disfunção de citocinas e falha de desenvolvimento nas células linfoides afetadas (Malek, 1999). Além disso, o gene *JAK3* codifica uma tirosina quinase que atua na transdução de sinal de receptores de citocinas contendo γc. Defeitos afetando esse gene foram identificados em pacientes com SCID autossômica recessiva. A IL-7 é uma citocina que exerce papel fundamental no desenvolvimento de célula T, sendo que um defeito genético envolvendo a subunidade α do receptor da IL-7 foi identificado em pacientes com um raro distúrbio de SCID B$^+$ (Notarangelo, 2000).

Marcadores adicionais de superfície celular

Moléculas do MHC de classes I e II

Foram descritas mutações congênitas afetando a expressão do MHC de classes I e II. As moléculas de classe II são encontradas primariamente nas células apresentadoras de antígeno, que iniciam a resposta imune adquirida. Como seria possível prever, defeitos genéticos envolvendo o MHC de classe II (a partir de mutações que afetam a ativação transcricional do gene do MHC de classe II) resultam em um profundo estado de imunodeficiência (Klein, 1993) que, de acordo com a nomenclatura estabelecida pela Organização Mundial da Saúde, é conhecido como deficiência do MHC de classe II. Essa deficiência é referida como síndrome do linfócito nu de tipo II, sendo caracterizada pela ausência de expressão de moléculas do MHC de classe II nas superfícies celulares. A educação tímica e a seleção de células T imaturas ficam comprometidas, em razão da perda do processamento de antígenos pelas moléculas do MHC de classe II. A quantidade de células B e T permanece normal nos pacientes com síndrome do linfócito nu, todavia, a contagem de células CD4$^+$ é reduzida em decorrência da perda do processamento antigênico adequado. Como resultado, esses pacientes tornam-se incapazes de responder a antígenos estranhos e apresentam infecções recorrentes causadas por bactérias, fungos, vírus e protozoários. Além disso, são irresponsivos aos testes cutâneos (hipersensibilidade tardia de tipo IV), apresentam menor capacidade de resposta a reações mistas de linfócitos e desenvolvem pan-hipogamaglobulinemia (Nekrep, 2003). Uma faceta interessante dessa síndrome é a ausência de um defeito envolvendo os genes do MHC de classe II. Em vez disso, o defeito ocorre em um dos quatro genes codificadores de fatores regulatórios que são essenciais à expressão de antígenos do MHC de classe II na superfície (Reith, 2001).

A eliminação do antígeno estranho pode ser realizada por intermédio da ligação da célula T CD8$^+$ aos antígenos do MHC de classe I, que são expressos em quase todas as células nucleadas. Estranhamente, os defeitos imunológicos resultantes da deficiência de MHC de classe I –

uma mutação envolvendo peptídeos transportadores citoplasmáticos do MHC de classe I (TAP-1 ou TAP-2) – produzem um defeito imunológico caracterizado por uma severa doença pulmonar, que se torna aparente na fase tardia da infância (Donato, 1995; de la Salle, 1999). No passado, essa imunodeficiência foi denominada síndrome do linfócito nu de tipo I ou deficiência de HLA de classe I, sendo caracterizada por uma diminuição da atividade de células T $CD8^+$ e de células NK (Yabe, 2002). O diagnóstico de ambos os defeitos envolve o exame da expressão desses antígenos do MHC em células linfoides do sangue periférico utilizando citometria de fluxo (Illoh, 2004).

Tratamento direcionado para os receptores de superfície celular

Relatos de casos recentes descreveram terapias direcionadas aos receptores de superfície celular para tratamento das complicações associadas aos distúrbios de imunodeficiência primária. Um exemplo é o antiCD20 (rituximabe), um anticorpo monoclonal dirigido contra o antígeno CD20 encontrado nos linfócitos B e utilizado na depleção de linfócitos B malignos e benignos periféricos. O tratamento bem-sucedido utilizando esses anticorpos monoclonais foi relatado para um caso de anemia hemolítica autoimune mediada por autoanticopos IgM (reativos a 37°C) em uma criança com imunodeficiência variável comum, e para um caso de distúrbio linfoproliferativo em uma criança com síndrome de Wiskott-Aldrich, por meio da depleção de células B periféricas de ambos os pacientes (Sebire, 2003; Wakim, 2004).

Uso dos novos imunógenos na avaliação da produção de anticorpos

Outra ferramenta valiosa para avaliação das respostas específicas de anticorpos é a vacinação com neoantígenos, como o bacteriófago ϕ X174 e a hemocianina de um molusco marinho (*keyhole limpet*). Esses neoantígenos também podem ser utilizados para avaliar pacientes submetidos à terapia de substituição de imunoglobulinas, dada a impossibilidade de monitorar as respostas de anticorpos às vacinas-padrão concomitantemente à infusão passiva de um grupo de imunoglobulinas. As respostas primárias e secundárias podem ser monitoradas, uma vez que os neoantígenos provocam uma resposta primária de IgM e, após a reexposição, induzem uma resposta secundária de IgG (Curtis, 1970; Ochs, 1971). Empregando os isótipos e os padrões de depuração de ϕ X174, é possível medir a resposta do paciente e, assim, definir os vários graus e subtipos de deficiência de células B (Ochs, 1971). Atualmente, essa avaliação só é disponibilizada por algumas instituições acadêmicas que utilizam protocolos de pesquisa (Fleisher, 2004).

Genética molecular e diagnóstico pré-natal

Diversos genes envolvidos em síndromes de imunodeficiência primária já foram identificados, clonados e sequenciados (Conley, 1992; Puck, 1993; Derry, 1994; Ramesh, 1998; Vihinen, 1999). Em muitos casos, modelos de camundongos *knockout* foram criados para possibilitar o estudo mais aprofundado da ação dos genes sobre a função imunológica. No passado, eram empregados métodos mais tradicionais de triagem para detecção de mutações genéticas responsáveis por imunodeficiências, tais como dideoxi *fingerprinting* e polimorfismo conformacional de fita única (Sarkar, 1992; Sheffield, 1993; Puck, 1997b). Avanços mais recentes obtidos por meio do uso de sequenciamento à base de fluorescência, que emprega dideoxinucleotídeos finalizadores marcados com fluorescência, tornaram possível identificar de maneira simples e sensível variações na sequência de DNA dos pacientes. As sequências capilares multicanais automatizadas constituem um método à base de fluorescência automatizado de detecção rápida de sequências para múltiplos pacientes em poucas horas. Esse método torna prático o sequenciamento direto para detecção de mutações genéticas responsáveis por imunodeficiências (Niemela, 2000). A identificação de genes mutados facilita o aconselhamento genético para diagnóstico pré-natal e ajuda na detecção do *status* de portador de genes defeituosos. Além disso, também auxilia na avaliação de distúrbios imunológicos previamente existentes e ainda não definidos. A síndrome da hiper-IgM constitui um excelente exemplo do modo como essas técnicas avançadas têm ampliado a compreensão acerca dos distúrbios de imunodeficiência primária. Antigamente, essa síndrome era classificada como um distúrbio isolado, porém o sequenciamento genético revelou a existência de cinco defeitos genéticos envolvendo as células B ou T com fenótipos variáveis (Durandy, 2004).

A análise das imunodeficiências com defeitos genéticos conhecidos implica testar sítios específicos de DNA, com o intuito de detectar mutações específicas. Métodos diferentes, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser empregados para detectar a presença ou a ausência de um gene em particular, enquanto o *immunoblotting* ou a citometria de fluxo podem ser utilizados na detecção de produtos proteicos e para confirmar um diagnóstico de imunodeficiência primária na ausência do produto genético. Exemplificando, o momento da determinação da etiologia de uma imunodeficiência é importante na SCID, que consiste em um grupo heterogêneo de imunodeficiências caracterizado por diversos defeitos moleculares distintos. A distinção dos vários defeitos moleculares existentes na SCID tem implicações sobre o tratamento, o diagnóstico pré-natal e o teste de portador. É importante determinar se um paciente possui SCID ligada ao X, pois essa condição pode ser tratada por meio de terapia genética. Uma SCID com deficiência de JAK3 é clinicamente indistinguível da SCID ligada ao X, contudo a terapia genética é ineficiente nesse caso (Cavazzana-Calvo, 2000). Antigamente, o teste para distinção desses defeitos moleculares demorava várias semanas para ser concluído, uma vez que a SCID com deficiência de JAK3 é codificada por 23 éxons. Essa diferenciação requeria análise de DNA por análise de polimorfismos conformacionais de fita única e sequenciamento de todos os éxons afetados. Métodos mais rápidos de triagem atualmente podem ser empregados para obtenção de diagnósticos sem demora, com as análises genéticas mais demoradas sendo realizadas em seguida para fins de confirmação. Esses ensaios baseados em proteína utilizam análise de citometria de fluxo de γc, *immunoblotting* para JAK3 e γc, e detecção de fosforilação de tirosina de JAK3 induzida por IL-2 (Gilmour, 2001). Todavia, esses ensaios não são úteis quando se trata de defeitos caracterizados por produtos proteicos não funcionais.

Os avanços tecnológicos permitiram detectar uma gama de defeitos imunológicos mais ampla ainda no pré-natal. Quando a mutação específica é conhecida ou sabe-se que o padrão de herança é ligado ao X, é possível realizar análises de marcadores polimórficos associados ou detectar mutações específicas. Amostras de vilosidades coriônicas, DNA de amniócitos preparado diretamente a partir de células fetais, ou linhagens celulares mantidas em cultura e expandidas podem ser analisadas (Durandy, 1985).

Muitas imunodeficiências primárias são distúrbios raros que talvez sejam difíceis de diagnosticar. Nesses casos, a detecção de mutações genéticas constitui o método mais confiável. Esses testes especializados não são prontamente disponibilizados e os médicos podem ter dificuldade para localizar laboratórios que realizem as análises genéticas necessárias. Existem bancos de dados e registros de mutações disponíveis que fornecem informações sobre testes para obtenção de dados clínicos, avaliação do estado imunológico, determinação da resposta de anticorpos e da função celular, bem como ensaios enzimáticos. Além disso, alguns registros disponíveis *on-line* contêm informações sobre os laboratórios que realizam esses ensaios, ampliando o alerta sobre os testes disponíveis e a capacidade de estabelecer diagnósticos exatos e imediatos (Samarghitean, 2004).

Resumo

A avaliação das defesas do hospedeiro é um processo extraordinariamente complexo que requer a cooperação do clínico, do pesquisador e do patologista clínico. Uma abordagem lógica, baseada na apreciação dos múltiplos sistemas envolvidos na defesa do hospedeiro e nas várias opções diagnósticas existentes, pode ajudar a orientar a identificação do distúrbio subjacente. O sucesso impressionante da terapia moderna, com incorporação de novos agentes antimicrobianos, tecnologia do DNA recombinante, transplante de medula óssea e terapia genética, garante maior precisão no delineamento e na caracterização do estado de imunodeficiência. A consequência disso é a melhoria do reconhecimento e, por fim, do tratamento desses pacientes.

Referências bibliográficas

Anderson DC, Springer TA: Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the MAC-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. Annu Rev Med 1987; 38:175.

Arnaout MA, Michishita M: Genetic abnormalities in leukocyte adhesion molecule deficiency. In: Gupta S, Griscelli C, eds. New concepts in immunodeficiency diseases. Chichester, West Sussex: John Wiley 1993:191–202.

Atkinson JC, O'Connell A, Aframian D: Oral manifestations of primary immunological diseases. J Am Dent Assoc 2000; 131:345–356

Babior BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes first of two parts. N Engl J Med 1978; 298:721–725.

Balmer P, North J, Baxter D, et al: Measurement and interpretation of pneumococcal IgG levels for clinical management. Clin Exp Immunol 2003; 133:364–369.

Barrett DJ, Lee CG, Ammann AJ, Ayoub EM: IgG and IgM pneumococcal polysaccharide antibody responses in infants. Pediatr Res 1984;18:1067–1071.

Baumgart KW, Britton WJ, Kemp A, et al: The spectrum of primary immunodeficiency disorders in Australia. J Allergy Clin Immunol 1997;100:415–423.

Biron CA, Byron KS, Sullivan JL: Severe herpes virus infections in an adolescent without natural killer cells. N Engl J Med 1989; 320:1731–1735.

Bjorkander J, Bake B, Oxelius VA, Hanson LA: Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3. N Engl J Med 1985; 313:720–724.

Brecher M, ed: Technical Manual. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2002.

Buckley RH, Becker WG: Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis. Immunol Rev 1978; 41:288–314.

Buckley RH: Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. N Engl J Med 2000; 343:1313–1324.

Carlucci F, Tabucchi A, Aiuti A, et al: Capillary electrophoresis in diagnosis and monitoring of adenosine deaminase deficiency. Clin Chem 2003; 49:1830–1838.

Cates KL: Defects in neutrophil chemotaxis. Clin Immunol Allergy 1981; 1:603.

Cavazzana-Calvo M, Haein-Bey S, de Saint BG, et al: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID) -X1 disease. Science 2000; 288:66–72.

Clark JA, Callicoat PA, Brenner NA, et al : Selective IgA deficiency in blood donors. Am J Clin Pathol 1983; 80:210–213.

Conley ME: Molecular approaches to analysis of X-linked immunodeficiencies: Annu Rev Immunol 1992; 10:215–238.

Curtis JE, Hersh EM, Harris JE, et al: The human primary immune response to keyhole limpet haemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. Clin Exp Immunol 1970; 6:473–491.

Cunningham-Rundles C: Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. J Appl Biomaterials 1999; 92:34–48.

De Jong R, Altare F, Haagen IA, et al: Severe mycobacterial and salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. Science 1998; 280:1435–1438.

De la Salle H, Zimmer J, Fricker D, et al: HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP-1. J Clin Invest 1999; 103:R9–R13.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system, first of two parts. N Engl J Med 2000; 343;1:37–49.

Visão geral do sistema imune e da função das respostas inata e adquirida, bem como do papel das células T e B. Este artigo também fornece um glossário de termos imunológicos comumente utilizados que os clínicos podem considerar útil.

Derry JM, Ochs HD, Francke U: Isolation of a novel gene mutated in Wiskott–Aldrich syndrome. Cell 1994; 78:635–644.

Donato L, de la Salle H, Hanau D, et al: Association of HLA class I antigen deficiency related to a *TAP2* gene mutation with familial bronchiectasis. J Pediatr 1995; 127:895–900.

Durandy A, Dumez Y, Griscelli C: Prenatal diagnosis of severe hereditary immunologic deficiencies. Arch Fr Pediatr 1985; 42:163–167.

Durandy A, Revy P, Fischer A: Human models of inherited immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation defects (hyper-IgM syndromes). Adv Immunol 2004; 82:295–330.

Elder ME: ZAP-70 and defects of T cell receptor signaling. Semin Hematol 1998; 35:310–320.

Etzioni A, Harlan JM, Pollack S, et al: Leukocyte adhesion deficiency (LAD) II: A new adhesion defect due to absence of sialyl Lewis X, the ligand for selectins. Immunodeficiency 1993; 4:307–308.

Ewen C, Kane KP, Shostak I, et al: A novel cytotoxicity assay to evaluate antigen-specific CTL responses using a colorimetric substrate for granzyme B. J Immunol Methods 2003; 279:89–101.

Fleisher RA, Oliveira JB: Functional and molecular evaluation of lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 2004;114:227–234.

Fleisher TA: Evaluation of suspected immunodeficiency. Medical Laboratory Observer 2003; February:10–21.

Uma visão geral da aplicação dos métodos laboratoriais na avaliação dos defeitos imunológicos. Inclui um teste de educação continuada.

Gallin JI: Recent advances in chronic granulomatous disease. Ann Intern Med 1983; 99:657–674.

Gallin JI, Malech HL: Update on chronic granulomatous diseases of childhood. JAMA 1990; 263:1533–1537.

Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, et al: Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak–Higashi syndrome and 'specific' granule deficiency. J Clin Invest 1988; 82:552–556.

Gilmour KC, Cranston T, Loughlin S, et al: Rapid protein-based assays for the diagnosis of T-B+ severe combined immunodeficiency. Br J Haematol 2001; 112:671–676.

Go E and Ballas Z: Anti-pneumococcal antibody response in normal subjects. J Allergy Clin Immunol 1996; 98:205–215.

Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, et al: Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. Am J Hum Genet 1999; 65:735–744.

Gross S, Blaiss MS, Herrod HG: Role of immunoglobulin subclasses and specific antibody determinations in the evaluation of recurrent infection in children. J Pediatr 1992; 121:516–522.

Hirschhorn R: Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. Clin Immunol Immunopathol 1995; 76:S219–S226.

Hong R: Disorders of the T-cell system. *In* Stiehm ER (ed.): Immunologic Disorders of Infants and Children, 4th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1996, pp 339–408.

Hong R: The DiGeorge anomaly (CATCH 22, DiGeorge/velocardiofacial syndrome). Semin Hematol 1998; 35:282–290.

Hoppner M, Luhm J, Schlenke P, et al: A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells. J Immunol Methods 2002; 267:157–163.

Illoh O. Current applications of flow cytometry in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. Arch Pathol Lab Med 2004; 128:23–31.

Immune Deficiency Foundation: The clinical presentation of the primary immunodeficiency diseases (physician's primer). Towson, MD, Immune Deficiency Foundation, 1992. Available on line at: www.primaryimmune.org/pubs/book_phys/book_phys.htm.

Introne W, Boissy RR, Gahl WA: Clinical, molecular and cell biological aspects of Chediak–Higashi syndrome. Mol Genet Metab 1999; 68:283–303.

Jamieson BD, Douek DC, Killian S, et al: Generation of functional thymocytes in the human adult. Immunity 1999; 10:569–575.

Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, et al: IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. Curr Opin Immunol 1999; 11:3416–3451.

Kelly J, Leonard WJ: Immune deficiencies due to defects in cytokine signaling. Curr Allergy Asthma Rep 2003; 5:396–401.

Kizaki H, Sakurada T: Simple micro-assay methods for enzymes of purine metabolism. J Lab Clin Med 1977; 89:1135.

Klebanoff SJ: Myeloperoxidase. Proc Assoc Am Physicians 1999; 111:383–389.

Klein C, Lisowska-Grospierre B, LeDeist F, et al: Major histocompatibility complex class II deficiency: clinical manifestations, immunologic features, and outcome. J Pediatr 1993; 123:921–928.

Kniker WT, Lesourd BM, McBryde JL, Corriel RN: Cell-mediated immunity assessed by multitest CMT skin testing in infants and preschool children. Am J Dis Child 1985; 139:840–845.

Kobrynski L: Evaluation of a clinical scoring system for the identification of patients with a possible primary immunodeficiency (Abstract 379). Presented at the Federation of Clinical Immunology Society Meeting, 2002.

Kuijpers TW, Weening RS, Roos D: Clinical and laboratory work-up of patients with neutrophil shortage or dysfunction. J Immunol Methods 1999; 232:211–229.

Este artigo fornece uma visão geral sucinta dos sinais e sintomas clínicos exibidos por pacientes, a fisiologia do sistema antimicrobiano de neutrófilos, os mecanismos dos ensaios utilizados para diagnosticar essas aberrações e os potenciais tratamentos destinados aos pacientes afetados.

Kruisbeek AM: Regulation of T cell development by the thymic microenvironment. Semin Immunol 1999; 11:1–70.

Lane HC, Depper JM, Greene WC, et al: Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. N Engl J Med 1985; 313:79–84.

Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. J Mol Med 1998; 76:676–681.

Lefranc M-P, Lefranc G, Rabbitts TH: Inherited deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in normal human individuals. Nature 1982; 300:760.

Lehrer RI, Cline MJ: Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to infection. J Clin Invest 1969; 48:1478.

Lekstrom-Himes JA, Gallin JI: Primary immunodeficiency diseases due to defects in phagocytes. N Engl J Med 2000; 343:1703–1714.

Este artigo de revisão fornece uma visão geral das imunodeficiências decorrentes de defeitos fagocíticos. Também traz tabelas resumidas sobre as síndromes, contendo o defeito genético correspondente, bem como fotografias clínicas e microscópicas para demonstrar as manifestações das imunodeficiências.

Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C: Clinical spectrum of X-linked hyper IgM syndrome. J Pediatr 1997; 131:47–54.

Lilic D, Gravenor I: Immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. J Clin Pathol 2001; 54:81–3.

Lindegren ML, Kobrynski L, Rasmussen SA : Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: A potential approach to genetic disorders. MMWR 2004; 53(RR01):1–29.

Resumo de um workshop *organizado pelo CDC para discutir estratégias destinadas a melhorar os resultados clínicos dos pacientes com imunodeficiências primárias. Este resumo discute a incidência e a prevalência ao nascimento das imunodeficiências primárias, métodos de triagem de recém-nascidos, dados de morbidade e mortalidade e informações para registros de imunodeficiência primária.*

Lukela M, DeGuzman D, Weinberger S, et al: Unfashionably late. N Engl J Med 2005; 352:64–69.

Malek T, Porter B, He Y. Multiple γc-dependent cytokines regulate T-cell development. Immunol Today 1999; 20:71–76.

Martin E, Bhakdi S. Flowcytometric assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by peripheral blood leukocytes. J Clin Microbiol 1992; 30:2246–2255.

Matamoros Flori N, Mila Llambi J, Espanol Boren T, et al : Primary immunodeficiency syndrome in Spain: first report of the National Registry in Children and Adult. Clin Immunol 2000; 20:477–485.

Meischl C, Roos D: The molecular basis of chronic granulomatous disease. Springer Semin Immunopathol 1998; 19:417–434.

Migone N, Oliviero S, De Lange G, et al: Multiple gene deletions within the human immunoglobulin heavy-chain cluster. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:5811.

Mire-Sluis AR, Thorpe R (eds): Cytokines. San Diego, CA, Academic Press, 1998.

Myers LA, Hershfield MS, Neale WT, et al: Purine nucleoside phosphorylase deficiency (PNP-def) presenting

with lymphopenia and developmental delay: successful correction with umbilical cord blood transplantation. J Pediatr 2004; 145:710–712.
Nauseef WM: Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. J Mol Med 1998; 76:661–668.
Nekrep N, Fontes JD, Geyer M, Peterlin BM: when the lymphocyte loses its clothes. Immunity 2003; 18:453–457.
Nelson RD, Quie PG, Simmons RL: Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J Imunol 1975; 115:1650.
Niemela JE, Puck JM, Fisher RE, et al: Efficient detection of thirty-seven new IL-2RG mutations in human X-linked severe combined immunodeficiency. Clin Immunol 2000; 95:33–38.
Normansell DE: Human immunoglobulin subclasses. Diagn Clin Immunol 1987; 5:115–128.
Noroski LM, Shearer WT: Screening for primary immunodeficiencies in the clinical immunology laboratory. Clin Immunol Immunopathol 1998; 86:237–245.
Notarangelo LD, Giliani S, Mella P, et al: Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gamma-JAK3 signaling pathway as a model. Immunobiology 2000; 202:106–119.
Ochs HD: The Wiskott–Aldrich syndrome. Semin Hematol 1998; 35:332–345.
Ochs HD, Davis SD, Wedgwood RJ: Immunologic responses to bacteriophage ΦX174 in immunodeficiency diseases. J Clin Invest 1971; 50:2559–2568.
O'Gorman MR, Corrochano V: Rapid whole-blood flow cytometry assay for diagnosis of chronic granulomatous disease. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2:227–232.
Oxelius VA: Quantitative and qualitative investigations of serum IgG subclasses in immunodeficiency diseases. Clin Exp Immunol 1979; 36:112–116.
Park BH, Fikrig SM, Smithwick EM: Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic aid. Lancet 1968; 2:532.
Plebani A, Ugazio AG, Monafo V, Burgio GR: Clinical heterogeneity and reversibility of selective immunoglobulin A deficiency in 80 children. Lancet 1986; 12:829–831.
Popa V: Airway obstruction in adults with recurrent respiratory infections and IgG deficiency. Chest 1994; 105:1066–1072.
Puck JM: Primary immunodeficiency diseases. JAMA 1997a;278:1835–41.
Puck JM: Genetic aspects of primary immunodeficiencies. In Ochs HD, Smith Die, Puck JM, eds. Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach. New York, Oxford University Press, 1999.
Puck JM, Deschenes SM, Porter JC, et al: The interleukin-2 receptor γ chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency. Hum Mol Genet 1993; 2:1099.
Puck JM, Middleton L, Pepper AE: Carrier and prenatal diagnosis of X-linked severe combined immunodeficiency: mutation detection methods and utilization. Hum Genet 1997b; 99:628–633.
Ramesh N, Seki M, Notarangelo LD, Geha RS: The hyper IgM (HIM) syndrome. Springer Semin Immunopathol 1998; 19:383–399.
Reith W, Mach B: The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. Annu Rev Immunol 2001; 19:331–373.
Ryser O, Morrell A, Hizid WE: Primary immunodeficiencies in Switzerland: first report of the nation registry in adults and children. J Clin Immunol 1988; 8:479–485.
Samarghitean C, Valiaho J, Vihinen M: Online registry of genetic and clinical immunodeficiency diagnostic laboratories, IDdiagnostics. J Clin Immunol 2004; 24:53–61.
Sarkar G, Yoon Hs, Sommer SS. Dideoxy fingerprinting (ddE): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. Genomics 1992; 13:441–443.
Schneider PM, Wurzner R: Complement genetics: biological implications of polymorphisms and deficiencies. Immunol Today 1999; 20:2–5.
Schur PH: IgG subclasses – a review. Ann Allergy 1987; 58:89–96.
Scott MG, Schackelford PG, Briles ED, Nahm MH: Human IgG subclasses and their relation to carbohydrate antigen immunocompetence. Diagn Clin Immunol 1988; 5:241–248.
Sebire NJ, Haselden S, Malone M, et al: Isolated EBV lymphoproliferative disease in a child with Wiskott–Aldrich syndrome manifesting as cutaneous lymphomatoid granulomatosis and responsive to anti-CD20 immunotherapy. J Clin Pathol 2003; 56:555–557.
Shackelford PG, Granoff DM, Madassery JV, et al: Clinical and immunologic characteristics of healthy children with subnormal serum concentrations of IgG2. Pediatr Res 1990; 27:16.
Shearer WT, Paul ME, Smith CW, Huston DP: Laboratory assessment of immune deficiency disorders. Immunol Allergy Clin North Am 1994:14:265–299.
Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, et al: The sensitivity of single stand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 1993; 16:325–332.
Shovlin CL, Simmon HA, Fairbanks LD, et al: Adult onset immunodeficiency caused by inherited adenosine deaminase deficiency. J Immunol 1994; 153:2331–2339.
Smith CIE, Ochs HD, Puck JM: Genetically determined immunodeficiency diseases: a perspective. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, eds. Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach. New York, Oxford University Press, 1999.
Southwick FS, Dabiri GA, Stossel TP: Neutrophil actin dysfunction is a genetic disorder associated with partial impairment of neutrophil actin assembly in three family members. J Clin Invest 1988; 82:1525–1531.
Stiehm ER, Conley ME: Immunodeficiency disorders: general considerations. *In* Stiehm ER (ed.): Immunologic Disorders of Infants and Children, 4th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1996, pp 201–252.
Stray-Pedersen A, Abrahamsen TG, Froland SS: Primary immunodeficiency diseases in Norway. Clin Immunol 1997; 17:333–339.
Sweinberg SK, Wodell RA, Grodofsky MP, et al: Retrospective analysis of the incidence of pulmonary disease in hypogammaglobulinemia. J Allergy Clin Immunol 1991; 88:96–104.
Trinchieri G: Biology of natural killer cells. Adv Immunol 1989; 47:187–376.
Vihinen M, Kwan SP, Lester T, et al: Mutations of the human *BTK* gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. Hum Mutat 1999; 13:280–285.
Wakim M, Shah A, Arndt PA, et al: Successful anti-CD20 monoclonal antibody treatment of severe autoimmune hemolytic anemia due to warm reactive IgM autoantibody in a child with common variable immunodeficiency. Am J Hematol 2004; 76:152–155.
Wedgwood RJ, Ochs HD, Oxelius VA: IgG subclass levels in the serum of patients with primary immunodeficiency. Monogr Allergy 1986; 20:80.
Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, et al: Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. Medicine (Baltimore) 2000; 79:155–169.
Yabe T, Kawamura S, Masako S, et al: A subject with a novel type I bare lymphocyte syndrome has tapasin deficiency due to deletion of 4 exons by Alu-mediated recombination. Blood 2002; 100:1496–1498.
Zhu Q, Watanabe C, Liu T, et al : Wiskott–Alrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. Blood 1997; 90:2680–2689.

CAPÍTULO 50

Avaliação clínica e laboratorial de doenças reumáticas sistêmicas

Carlos Alberto von Mühlen MD PhD, Robert M. Nakamura MD

Introdução e classificação das doenças reumáticas sistêmicas 1046
Lúpus eritematoso sistêmico e distúrbios lúpus-símile relacionados 1046
Fatores etiológicos no lúpus eritematoso sistêmico 1047
Quais são os critérios diagnósticos para o lúpus eritematoso sistêmico? 1047
Quais são as síndromes e as doenças "lúpus-símile"? 1048
Perfil de autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico 1048
Anticorpos contra DNA nativo ou DNA de fita dupla 1048
Anticorpos antiproteína Sm e antirribonucleoproteína nuclear 1049
Anticorpos contra SS-A/Ro e SS-B/La 1049
Subgrupos clínicos de lúpus eritematoso sistêmico associados a anticorpos contra SS-A/Ro 1049
Anticorpos anti-Ku e anti-Ki 1049
Anticorpos antiproteínas ribossômicas P 1050
Complexo multiproteico de antígeno nuclear da célula proliferante 1050
Anticorpos antifosfolipídeos no lúpus eritematoso sistêmico 1050
Lúpus discoide crônico e outras variantes cutâneas 1050
Lúpus eritematoso induzido por fármacos, anticorpos anti-histona e anticromatina 1050
Síndrome de Sjögren 1051
Escleroderma 1051
Anticorpos contra antígenos centroméricos 1052
Anticorpos contra Scl-70 (DNA topoisomerase I) 1052
Anticorpos contra RNA polimerases 1052
Autoanticorpos contra o antígeno nucleolar fibrilarina (U3-snRNP) 1052
Anticorpos dirigidos contra a região organizadora nucleolar 1052
Artrite reumatoide 1053
Fator reumatoide 1053
Anticorpo antiqueratina 1053
Fator antiperinuclear (APF) 1053
Antipeptídeos citrulinados 1053
Anti-RA33 1054
Polimiosite e dermatomiosite 1054
Conceito de síndromes de sobreposição 1054
Doença mista do tecido conjuntivo 1054
Biologia molecular e funções de certos autoantígenos nucleares e intracelulares 1054
Perfis de autoanticorpos em várias doenças reumáticas sistêmicas 1055
Quadro de decisão para *work up* diagnóstico de doenças autoimunes 1055
Métodos diagnósticos na detecção de autoanticorpos 1055
Variações da metodologia utilizada para detecção de autoanticorpos contra antígenos nucleares e intracelulares 1060
Ensaio imunossorvente ligado à enzima 1060
Immunoblotting 1060
Referências bibliográficas 1061

PONTOS-CHAVE

- Existem muitos tipos de autoanticorpos contra antígenos nucleares e intracelulares nas diversas doenças reumáticas sistêmicas. Atualmente, considera-se importante não só detectar a presença como a quantidade desses autoanticorpos no paciente, bem como identificar sua especificidade imunológica.
- Estudos anteriores revelaram a existência de distintos perfis diagnósticos de autoanticorpos em várias doenças reumáticas. Algumas dessas doenças são caracterizadas por presença ou ausência de um anticorpo específico, ou por diferenças quantitativas de níveis ou títulos de autoanticorpos.
- Houve um progresso significativo em termos de melhora da sensibilidade, da especificidade e do controle de qualidade de muitos testes laboratoriais para detecção de autoanticorpos contra antígenos intracelulares e nucleares.
- A microscopia de imunofluorescência (MIF), utilizando extratos celulares humanos, como de células HEp-2, possibilita a detecção sensível de anticorpos séricos que reagem de modo bastante específico contra as várias proteínas e os ácidos nucleicos celulares.
- Os testes amplamente empregados na triagem de autoanticorpos intracelulares são a MIF e os testes imunoenzimáticos. Os testes definitivos secundários para identificação específica de autoanticorpos contra antígenos nucleares são imunodifusão, imunoprecipitação, aglutinação de partículas, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) e métodos de *immunoblotting*.
- Os biólogos moleculares têm utilizado diversos autoanticorpos como sondas biológicas e elucidado as funções biológicas de diversos autoantígenos.

Introdução e classificação das doenças reumáticas sistêmicas

As doenças reumáticas são caracterizadas pela presença de um ou mais autoanticorpos que podem ser dirigidos contra componentes da superfície, do citoplasma, do envelope nuclear ou do núcleo da célula. Esse último grupo de autoanticorpos – autoanticorpos contra antígenos nucleares (ANAs, *autoantibodies to nuclear antigens*) – constitui a principal característica das doenças reumáticas sistêmicas (Tan, 1982, 1989; Nakamura, 1985, 1986, 1992; von Mühlen & Tan, 1994). Um número considerável de doenças reumáticas apresenta um perfil distintivo de autoanticorpos com especificidades diagnósticas. Além disso, foram elucidadas as funções bioquímicas e biológicas de diversos antígenos envolvidos em replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), *splicing* de precursor de ácido ribonucleico (RNA) e processamento de RNA (Tan, 1989). Tem sido difícil classificar as várias doenças reumáticas, em razão da falta de uma base etiológica consistente na maioria dos casos. Decker (1986) e o subcomitê de glossários do American College of Reumatology (ACR) desenvolveram uma classificação abrangente que ainda hoje é adotada. Uma classificação resumida de doenças reumáticas sistêmicas e distúrbios correlatos é mostrada na Tabela 50.1.

Lúpus eritematoso sistêmico e distúrbios lúpus-símile relacionados

O lúpus eritematoso sistêmico (SLE, *systemic lupus erythematosus*) é o protótipo das doenças reumáticas sistêmicas, apresentando os seguintes aspectos importantes (Nakamura, 1994a):

Tabela 50.1 Doenças reumáticas sistêmicas e distúrbios correlatos

1. Lúpus eritematoso sistêmico (SLE)
2. Lúpus eritematoso discoide (DLE)
3. Síndromes lúpus-símile
4. Lúpus eritematoso induzido por fármaco
5. Síndrome de Sjögren
6. Escleroderma/síndrome CREST (calcinose na cútis, fenômeno de Raynaud, desmotilidade esofágica, esclerodactilia, telangiectasia)
7. Artrite reumatoide (AR)
8. Dermatomiosite e polimiosite
9. Síndromes de sobreposição
   a. Doença mista do tecido conjuntivo (DMTC)
   b. AR e SLE (lúpus)
   c. SLE e escleroderma (lupoderma)
   d. Escleroderma e dermatomiosite (esclerodermatomiosite)
   e. Outras
10. Vasculite sistêmica
    a. Arterite de Takayasu
    b. Arterite de células gigantes e polimialgia reumática
    c. Granulomatose de Wegener
    d. Poliarterite nodosa e síndrome de Churg-Strauss
    e. Vasculite leucocitoclástica
    f. Outras
11. Síndromes mal definidas de doenças do tecido conjuntivo

1. é uma doença autoimune não órgão-específica, em que a lesão tecidual é mediada primariamente por imunocomplexos DNA-antiDNA;
2. é uma doença multissistêmica que afeta indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos, embora seja mais prevalente nas mulheres em idade fértil;
3. a doença está associada a um sistema imune hiperativo com múltiplas anormalidades;
4. pacientes com SLE apresentam resposta heterogênea e policlonal de anticorpos, com reação de formação de autoanticorpos envolvendo mecanismos similares àqueles observados na resposta imune típica a imunógenos estranhos (Fatenejad, 1998);
5. em um caso típico de SLE, são detectados em média três anticorpos circulantes distintos simultaneamente. A prevalência dos anticorpos apresenta uma ampla faixa de variação, tendo sido identificados mais de 110 tipos diferentes de autoanticorpos nessa condição (Sherer, 2004).

Fatores etiológicos no lúpus eritematoso sistêmico

A etiologia da doença ainda é pouco conhecida. Alguns fatores etiológicos significativos no SLE são (1) endócrino-metabólicos, (2) ambientais e (3) genéticos (Chan, 1989). O fator de risco mais forte associado ao desenvolvimento do SLE é o sexo feminino (Hochberg, 1990). Também foi considerada uma possível etiologia viral para o SLE (Pincus, 1982). A presença de ANAs foi determinada em funcionárias de laboratório submetidas a graus variáveis de exposição ao sangue de pacientes com SLE. A presença de anticorpos anti-DNA nativo foi maior entre as funcionárias de laboratório do que no grupo de mulheres não funcionárias não expostas ($p < 0{,}001$) (Zarmbinski, 1992). Esses resultados ajudam a sustentar a hipótese de que no sangue de pacientes com SLE pode haver um agente transmissível capaz de induzir formação de autoanticorpos.

Certos compostos químicos foram implicados no SLE (Hochberg, 1990). A síndrome do lúpus induzido por fármacos diante da administração de hidralazina, procainamida e isoniazida foi estudada para obtenção de indícios da patogênese do SLE. Diversos relatos apontaram o mecanismo de acetilação como sendo fator de risco para SLE. Estudos demonstraram maior taxa de concordância de SLE entre gêmeos mono e dizigóticos (Block, 1975). A concordância de SLE estava presente em 11 (58%) dos 19 gêmeos monozigóticos. O resultado final da interação de múltiplos fatores etiológicos é a ativação policlonal de células B nos pacientes com SLE, com produção de um amplo espectro de anticorpos (Nakamura, 1994a; Sherer, 2004).

Quais são os critérios diagnósticos para o lúpus eritematoso sistêmico?

Em 1971, o ACR (antigo American Rheumatism Association [ARA]) publicou os critérios preliminares para classificação do SLE (Cohen, 1971). Considerava-se que os pacientes tinham SLE se apresentassem sequencial ou simultaneamente 4 dos 5 critérios durante qualquer intervalo de observação. Em 1982, o Subcommittee for SLE Criteria da ARA publicou os critérios revisados, incorporando o novo conhecimento imunológico e a classificação melhorada da doença do SLE (Tan, 1982b). Os critérios revisados de 1982 para a classificação do SLE incluíam 11 categorias, adicionando (1) título anormal de ANAs determinado por imunofluorescência ou ensaio equivalente e (2) presença de anticorpos anti-DNA nativo e/ou anti-Sm. Em contraste com os critérios publicados em 1971, os critérios revisados de 1982 excluíram o fenômeno de Raynaud e a alopécia, em razão da falta de sensibilidade e especificidade.

Quando os critérios para classificação do SLE publicados pela ARA em 1982 foram comparados aos critérios de 1971, constatou-se uma melhora definida da sensibilidade e da especificidade. Os critérios de 1982 apresentaram sensibilidade igual a 96,7% e especificidade de 96% ao serem avaliados em pacientes diagnosticados com SLE e controle (Tan, 1982). Em 1997, foi publicada uma atualização dos critérios, eliminando o teste de células LE e incluindo a detecção de anticorpos anticardiolipina (Tab. 50.2). Essas modificações foram enfatizadas nas "Diretrizes para referência e supervisão do SLE em adultos", elaboradas pelo ACR *ad hoc* Committee on SLE Guidelines (Gladman, 1999).

Tabela 50.2 Atualização de 1997 dos critérios revistos em 1982 para classificação do lúpus eritematoso sistêmico

1 Erupções malares
2. Erupções discoides
3. Fotossensibilidade
4. Úlceras orais
5. Artrite não erosiva
6. Serosite (pleurite ou pericardite)
7. Distúrbio renal (proteinúria persistente, cilindros celulares)
8. Distúrbio neurológico
9. Distúrbio hematológico
   a. Anemia hemolítica com reticulocitose, OU
   b. Leucopenia < 4.000/mm^3 em ≥ 2 ocasiões, OU
   c. Linfopenia < 1.500/mm^3 em ≥ 2 ocasiões, OU
   d. Trombocitopenia < 100.000/mm^3 na ausência de fármaco agressor
10. Distúrbio imunológico
    a. Anti-DNA: anticorpo contra o DNA nativo em títulos anormais, OU
    b. Anti-Sm: presença de anticorpo contra o antígeno nuclear Sm, OU
    c. Achado positivo para anticorpos antifosfolipídeos, com base em: 1) níveis séricos anormais de anticorpos IgG ou IgM anticardiolipina; 2) resultado positivo em teste de detecção do anticoagulante lúpico, utilizando um método-padrão; 3) resultado falso-positivo em teste de sífilis que sabidamente apresenta positividade durante pelo menos 6 meses, confirmado por meio de teste de imobilização de *Treponema pallidum* ou por teste de absorção de anticorpos treponêmicos fluorescentes
11. Positividade para anticorpos antinúcleo
    Título anormal de anticorpos antinúcleo detectado por imunofluorescência ou ensaio equivalente, em qualquer momento e na ausência de fármacos sabidamente associados à síndrome do "lúpus induzido por fármaco"

A classificação proposta é baseada em 11 critérios. Para fins de identificação de pacientes em estudos clínicos, um indivíduo é considerado com SLE se apresentar pelo menos 4 dos 11 critérios, em sequência ou simultaneamente, em qualquer período da observação (Hochberg, 1997).

Quais são as síndromes e as doenças "lúpus-símile"?

Existem muitas doenças e síndromes que compartilham certos aspectos com o SLE sem, contudo, serem essa doença. Elas diferem do SLE quanto à etiologia e à patogênese. As doenças listadas nessa categoria incluem vasculite, crioglobulinemia, policondrite recorrente, doenças linfoproliferativas, febre reumática, glomerulonefrite, sífilis, hepatite lúpica, lúpus induzido por fármacos e malignidades ocultas (Panush, 1993). Há uma categoria de pacientes bastante ampla apresentando menos de 4 dos critérios da classificação da ARA para SLE (Lazaro, 1989; Lom-Orta, 1980; Schur, 1993) que, mesmo assim, é considerada como classe de pacientes com doenças "lúpus-símile". Com base na doença apresentada, tais pacientes foram classificados em: (1) doença reumática não diferenciada; (2) doença não reumática; (3) síndrome de sobreposição; e (4) lúpus incompleto, latente ou incipiente. Schur (1993) recomendou, similarmente aos critérios iniciais da ARA para diagnóstico da artrite reumatoide (AR), que os pacientes fossem identificados como tendo SLE clássico (vários critérios), SLE definitivo (4 ou mais critérios), SLE provável (3 critérios) ou SLE possível (2 critérios). Os pacientes que atendessem a 2 ou 3 critérios seriam considerados com lúpus incompleto, incipiente ou latente, além de lúpus possível e lúpus provável.

O acompanhamento desses pacientes revela que alguns continuam exibindo sintomas leves – continuando, portanto, a serem identificados com "doença indiferenciada do tecido conjuntivo" (DITC) – e poucos desenvolvem SLE definitivo, contudo muitos evoluem para outras doenças com melhor prognóstico. Na verdade, até 75% dos pacientes com DITC jamais chegam a atender os critérios diagnósticos para doenças reumáticas sistêmicas específicas (Mosca, 2004). Dos 99 pacientes com anticorpos anti-U1nRNP que acompanhamos durante 10 anos, muitos deles diagnosticados com DITC ao serem incluídos no grupo, desenvolveram sinais e sintomas característicos de AR, síndrome de Sjögren, lúpus sistêmico ou esclerodermia (Fig. 50.1) demonstrados pelo perfil de antígenos leucocitários humanos (HLA) e pelos títulos de anticorpos.

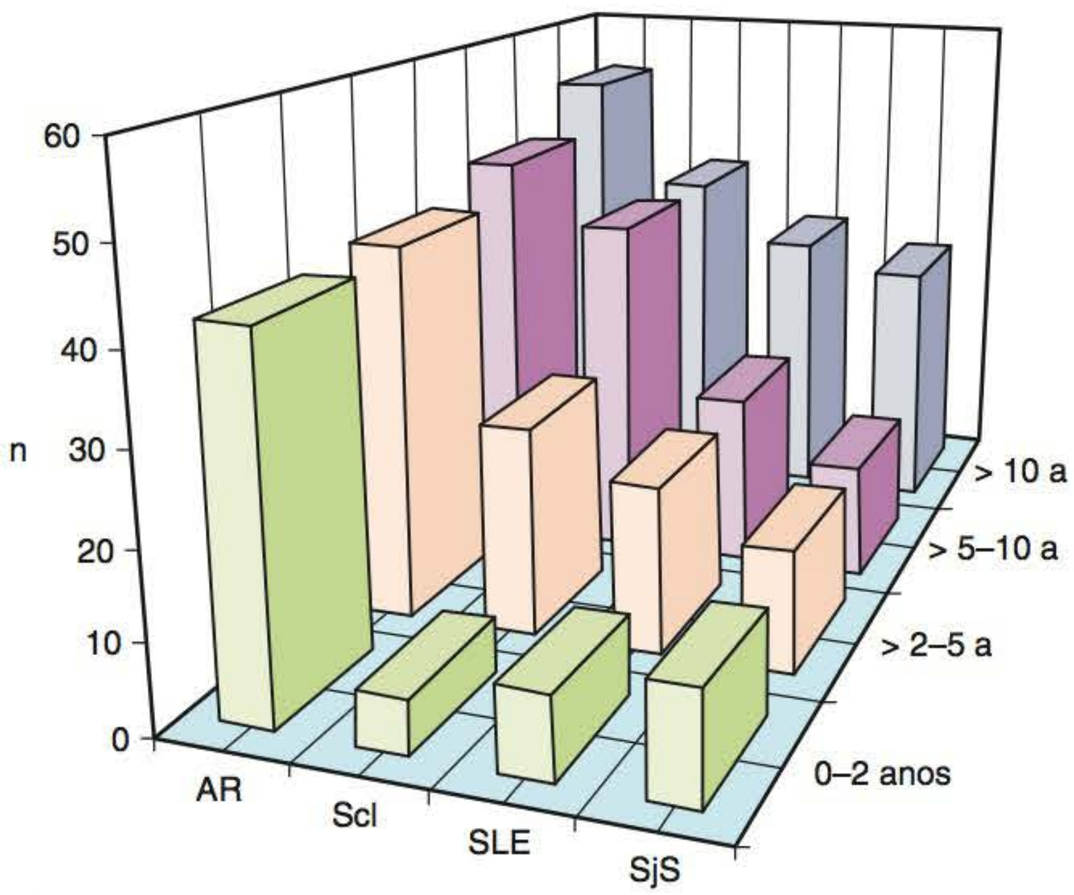


Figura 50.1 Critérios de classificação atendidos por 99 pacientes com anticorpos anti-U1nRNP no decorrer de um período de mais de 10 anos de observação. Muitos pacientes desse grupo foram classificados como apresentando doença indiferenciada do tecido conjuntivo nos 2 primeiros anos de manifestação de sintomas clínicos, enquanto 43 indivíduos puderam ser classificados como tendo artrite reumatoide (AR). O número de pacientes classificados como tendo AR não aumentou significativamente até o fim do estudo, porém os diagnósticos de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e esclerodermia (Scl) tiveram seus critérios atendidos com maior frequência (p = 0,02 e 0,0008, respectivamente, qui-quadrado para tendência). Nos pacientes que apresentavam desenvolvimento de SLE, os títulos de anticorpos anti-U1nRNP eram baixos e os antígenos HLA eram DR2/3. Aqueles que desenvolviam Scl apresentavam títulos elevados de anticorpos anti-U1nRNP e tinham HLA-DR4. SjS = síndrome de Sjögren. Fonte: von Mühlen, CA.; Genth, E.; e Mierau, R. (dados não publicados).

Perfil de autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico

O SLE é caracterizado pela presença de um amplo espectro de autoanticorpos, entre os quais anticorpos contra DNA nativo (dsDNA), cromatina, antígeno Sm, U1nRNP, SS-A/Ro, SS-B/La, além de diversas proteínas não histonas ou complexos RNA-proteínas não histonas (Nakamura, 1994a; Sherer, 2004). A policlonalidade de anticorpos é observada no SLE e no escleroderma, sendo raramente encontrada em outras doenças reumáticas sistêmicas. Anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP ribossômico e anticorpos contra antígeno nuclear da célula proliferante (anti-PCNA) são, em geral, específicos para SLE. Essa doença caracteriza-se por uma resposta de anticorpos heterogênea e policlonal, sendo que os casos típicos da doença estão associados à detecção simultânea de (em média) três anticorpos circulantes distintos. A prevalência dos autoanticorpos varia amplamente. Anticorpos contra DNA nativo e cromatina são detectáveis em até 90% dos pacientes, enquanto anticorpos contra PCNA e ciclina ou proteína Alu-RNA estão presentes em até 3% dos casos (von Mühlen, 1995) (Tab. 50.3).

Anticorpos contra DNA nativo ou DNA de fita dupla

Anticorpos anti-DNA de fita dupla (anti-dsDNA) são mais específicos para SLE, sendo observados com uma frequência de 40 a 90% entre os pacientes com SLE ativo (Buskila, 1992; Rekvig, 2003). Existem inúmeros relatos antigos referentes à detecção de anticorpos

Tabela 50.3 Antígenos e autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico

Antígeno	Estrutura molecular	Frequência do autoanticorpo (%)
DNA nativo	DNA de dupla fita	40–90
DNA desnaturado	DNA de fita única	70
Histonas	H1, H2A, H2B, H3, H4	50–70
Cromatina (nucleossomo)	Complexo DNA-histonas	50–90
Sm	Proteínas de 29(B'), 28(B), 16(D) e 13(E) kDa complexadas a U1, U2 e U4-U6 snRNAs; componente do spliceossomo	15–30
RNP nuclear (U1nRNP)	Proteínas de 70, 33(A) e 22(C) kDa complexadas a U1 snRNA; componente do spliceossomo	30–40
SS-A/Ro	Proteínas de 60 e 52 kDa complexadas a Y1-Y5 RNAs	24–60
SS-B/La	Fosfoproteínas de 48 kDa complexadas a Y1 transcritos de RNA Pol nascentes	9–35
Ku	Proteínas de 86 e 66 kDa, proteínas ligadoras de DNA	1–19
Proteína A1 de hnRNP	Proteína nuclear de 34 kDa	31–37
PCNA	Proteína de 36 kDa; proteína auxiliar da DNA polimerase	3
RNP ribossômico	Fosfoproteínas de 38, 16 e 15 kDa associadas a ribossomos	10–20
HSP-90	Proteína do choque térmico de 90 kDa	5–50
Complexo de Golgi	Golginas, giantinas	Desconhecida
HMG-17	Proteínas DNA-associadas de 9 a 17 kDa	34–70
β_2-glicoproteína I	Fosfolipídeos aniônicos, cardiolipina	25

As frequências referem-se principalmente aos pacientes com doença ativa.
PCNA = antígeno nuclear da célula proliferante; RNP = ribonucleoproteínas.
Fonte: modificado de Nakamura (1994a); Krapf (1996); Sherer (2004).

anti-dsDNA em pacientes com doenças diferentes do SLE. Entretanto, atualmente acredita-se que os anticorpos reativos ao DNA detectados em outras condições são, na verdade, anticorpos anti-DNA de fita única. Os testes para detecção de anticorpos anti-dsDNA com frequência utilizavam preparações de dsDNA contaminadas com DNA desnaturado ou DNA de fita única. Uma possível exceção seria a síndrome de Sjögren primária, cuja diferenciação em relação ao SLE às vezes torna-se difícil em indivíduos de idade mais avançada. O anticorpo contra o DNA exerce papel definitivo na patogênese do SLE. Nos estudos envolvendo pacientes com SLE, o aparecimento de anticorpos contra o DNA é acompanhado pelo surgimento do antígeno DNA circulante, seguindo-se uma sequência de eventos que resulta na formação de imunocomplexos. Esses imunocomplexos de DNA-anti-DNA, em sua maior parte contendo IgG3 ativadora de complemento, apresentam tropismo especial para membranas basais e depositam-se prontamente nos glomérulos renais. Essa deposição produz danos aos rins por meio da indução de mecanismos inflamatórios que terminam na ativação do complemento e na lise celular (Okamura, 1993). Os métodos mais antigos de detecção de anticorpos anti-DNA incluíam precipitação insensível, fixação do complemento e hemaglutinação passiva. Os métodos modernos são radioimunoensaio (RIA), imunofluorescência indireta (IFI) com *Crithidia luciliae* e ELISA (Buskila, 1992; Kavanaugh, 2002). Esses métodos permitem detectar anticorpos anti-DNA em 75 a 90% dos pacientes com SLE ativo não tratados. Recentemente, foi descrita a ocorrência de elevações transientes dos níveis desses anticorpos em pacientes com AR submetidos à terapia anti-TNF (Allanore, 2004; Bobbio-Pallavicini, 2004). Ocasionalmente, é possível que nessa situação ocorram casos clínicos lúpus-símile (Swale, 2003; Eriksson, 2005).

Anticorpos antiproteína Sm e antirribonucleoproteína nuclear

Anticorpos precipitantes contra o antígeno Sm são considerados marcadores altamente específicos do SLE (Tan, 1989). Anticorpos tanto para Sm quanto para ribonucleoproteínas nucleares (nRNP) são encontrados em pacientes com SLE. Os antígenos Sm e nRNP estão associados de maneira nítida, pois a nRNP não pode ser bioquimicamente isolada do antígeno Sm. Lerner e Steitz (1979), utilizando ferramentas de biologia molecular, demonstraram que os antígenos Sm e nRNP são partículas subcelulares constituídas de pequenos RNAs nucleares complexados a proteínas. A partícula ligada pelo anti-nRNP possui um componente denominado U1 (em que "U" significa "rico em uridina") e está complexada a no mínimo sete proteínas, cujas massas moleculares variam de 12 kDa a 68 kDa (Tan, 1989), sendo encontrada em 30 a 40% dos pacientes com SLE ativo (Ter Borg, 1990).

Os antígenos de Sm consistem em várias proteínas que, por convenção, foram denominadas B1 (29 kDa), D (16 kDa) e E (13 kDa) (Tan, 1989). Anticorpos anti-B1/B purificados apresentam reação cruzada com a proteína D e vice-versa, contudo nenhuma reação cruzada é observada em um percentual menor de soros de pacientes com SLE. Desse modo, existem ao menos dois epítopos na proteína B1/B que são reconhecidos pelo soro anti-Sm. Antígenos reativos com anticorpos anti-Sm e anti-RNA nuclear, portanto, entram na montagem de proteínas interativas e RNAs engajados no *splicing* de precursor de nRNA (Tan, 1989). Nenhum aspecto clínico característico é aparente em pacientes com SLE que apresentam anticorpos anti-Sm (Barada, 1981), todavia alguns autores argumentam que tais anticorpos estão associados à doença renal ou a distúrbios envolvendo o sistema nervoso central. Pacientes que possuem apenas anticorpos anti-nRNP apresentam baixa frequência de anticorpos contra DNA e de doença renal clinicamente aparente (Ter Borg, 1990). Anticorpos anti-Sm e anti-nRNP podem ser detectados por imunodifusão, hemaglutinação passiva ou contraimunoeletroforese. Entretanto, os métodos anteriormente mencionados não distinguem com acurácia anticorpos dirigidos contra pequenos polipeptídeos nRNA-associados distintos. As reatividades a diferentes RNAs individuais e polipeptídeos são melhor demonstradas, respectivamente, com o uso de técnicas de imunoprecipitação de RNA e *immunoblotting*. Foi demonstrado que o *immunoblotting* é mais sensível que os métodos convencionais para detecção de anti-Sm e anti-nRNP (Nakamura, 1994b). Atualmente, os testes laboratoriais mais utilizados para detecção de anticorpos anti-Sm e anti-nRNP são imunodifusão e ELISA. Esses testes diferenciam anticorpos anti-Sm e anti-nRNP, contudo não definem os epítopos específicos dos anticorpos presentes no soro dos pacientes. A especificidade e os epítopos dos anticorpos são melhor determinados pelos métodos de *Western* e *Northern blotting*.

Anticorpos contra SS-A/Ro e SS-B/La

Pacientes com SLE podem apresentar anticorpos contra SS-A/Ro e SS-B/La. A presença apenas de anticorpos anti-SS-A/Ro está bastante associada ao HLA-DR2 e a indivíduos mais jovens (< 22 anos de idade no início da doença). No SLE, a presença de anticorpos contra SS-A/Ro e SS-B/La está associada ao HLA-DR3 e à idade mais avançada (> 50 anos de idade no início da doença) (Hochberg, 1985). Em um estudo envolvendo 55 pacientes com SLE, aqueles que apresentaram anticorpos apenas contra SS-A/Ro desenvolveram doença renal significativamente mais séria (Hochberg, 1985). Esses pacientes também apresentaram maior incidência de anticorpos anti-DNA concomitante, em comparação aos pacientes lúpicos com anticorpos contra SS-A/Ro e SS-B/La (Chan, 1989). Os autoanticorpos anti-SS-A/Ro foram associados ao aparecimento de nefrite, vasculite, linfadenopatia, fotossensibilidade e leucemia em pacientes com SLE. Anticorpos anti-SS-B/La, assim como anticorpos anti-SS-A/Ro, são notáveis por sua forte associação com a síndrome de Sjögren, sendo detectados em mais de 2/3 dos pacientes com esse distúrbio. O antígeno SS-B/La é uma proteína celular ligada a pequenas espécies de RNA, constituindo uma pequena RNP que pode atuar no processamento dos transcritos da RNA polimerase III (Chan, 1989).

Subgrupos clínicos de lúpus eritematoso sistêmico associados a anticorpos contra SS-A/Ro

Níveis elevados de anticorpos anti-SS-A/Ro estão relacionados a vários distúrbios clínicos autoimunes, tais como: (1) lúpus eritematoso cutâneo subagudo; (2) síndrome do lúpus eritematoso neonatal, com bloqueio cardíaco congênito e lesões cutâneas; (3) deficiência homozigota de C2 e C4 com doença SLE-símile; (4) vasculite da síndrome de Sjögren primária, positividade para fator reumatoide (FR) e sintomas sistêmicos severos; (5) pacientes com SLE negativos para ANA; e (6) SLE com pneumonite intersticial (Bylund, 1991). Anticorpos precipitantes contra SS-A/Ro são detectados em 65 a 95% dos pacientes com subtipos de anticorpos anti-SS-A/Ro, sendo que mais de 90% dos pacientes apresentam níveis de anticorpos anti-SS-A/Ro detectáveis por ELISA (Bylund, 1991).

Anticorpos anti-Ku e anti-Ki

O sistema de antígenos Ku consiste em um par de proteínas denominadas p70/p80 (Francoeur, 1986; Reeves, 1992). Essas proteínas possuem alta afinidade pelo DNA e são conhecidas como proteínas ligadoras de DNA, que interagem covalentemente com as extremidades do DNA nativo. Empregando os ensaios de imunoprecipitação e *immunoblot*, autoanticorpos anti-Ku foram detectados em 10% dos soros de pacientes lúpicos, porém esses anticorpos estavam ausentes em 100 soros de pacientes com escleroderma. Por meio de estudos que utilizaram imunoensaio enzimático, Reeves (1992) demonstrou a presença de baixos níveis de anticorpos contra proteínas Ku em 39% dos pacientes com SLE, 55% dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) e 40% dos pacientes com escleroderma. A presença de anticorpos anti-Ki foi relatada pela primeira vez no Japão (Tojo, 1981), sendo observada em aproximadamente 10% dos pacientes com SLE. Foi constatada a existência de uma relação entre anticorpos anti-Ki e a manifestação de aspectos clínicos de artrite, pericardite e hipertensão pulmonar em pacientes com SLE. O antígeno Ki foi purificado a partir do timo de coelho e possui peso molecular de 32 kDa. Sakamoto et al. (1989) desenvolveram um método de ELISA e observaram a presença de anticorpos anti-Ki em 21% (30/140) dos pacientes com SLE, enquanto 11 dos 140 pacientes apresentaram resultado positivo para esse anticorpo nos testes de imunodifusão dupla.

Anticorpos antiproteínas ribossômicas P

Cerca de 10 a 20% dos soros de pacientes com SLE apresentam autoanticorpos dirigidos contra três fosfoproteínas ribossômicas de 15, 18 e 38 kDa detectados em ensaios de *Western blot*. Um estudo retrospectivo apontou a existência de uma associação entre anticorpos anti-rRNP e distúrbios do sistema nervoso central no SLE, principalmente com relação à manifestação de sintomas psicóticos (Bonfa, 1987). Não foi encontrada nenhuma associação com comprometimento cognitivo ou depressão em pacientes lúpicos. Diferenças significativas em termos de prevalência de anticorpos anti-rRNP foram encontradas entre indivíduos de raças diferentes. Esses anticorpos são mais frequentemente acompanhados de anticorpos anti-Sm e anti-U1nRNP em pacientes com SLE (Yalaoui, 2002). Ainda é preciso esclarecer o papel etiopatogênico do anticorpo anti-rRNP em relação aos sintomas associados ao sistema nervoso central apresentados por pacientes com lúpus (Nakamura, 1997; Isshi, 1998). Observações recentes de amostragens maiores de pacientes com SLE revelaram a existência de uma associação entre anticorpos anti-rRNP e anemia hemolítica, leucopenia, alopécia, erupções malares, proteinúria e complicações neurológicas (Hoffman, 2004; Mahler, 2006). Nenhuma correlação com a atividade da doença foi encontrada.

Complexo multiproteico de antígeno nuclear da célula proliferante

Anticorpos contra proteínas PCNA são detectados em 3% dos pacientes com SLE ativo, sem apresentar nenhuma associação clínica distintiva (Miyachi, 1978; Kaneda, 2004). Uma possível associação com aspectos envolvendo o sistema nervoso central, como mielite transversa, foi observada em nossos próprios pacientes (von Mühlen & Nakamura, resultados não publicados). O complexo PCNA foi caracterizado como sendo relacionado ao ciclo celular, enquanto os anticorpos anti-PCNA têm sido úteis como sondas para estudo dos agentes reguladores da replicação do DNA, da proliferação celular e da transformação blástica.

Anticorpos antifosfolipídeos no lúpus eritematoso sistêmico

A síndrome do anticoagulante lúpico/anticorpo antifosfolipídeo é caracterizada por presença de anticorpos circulantes contra fosfolipídeos e aspectos clínicos de trombose arterial e venosa, trombocitopenia, anemia hemolítica, abortos e diversos sintomas sistêmicos. Os anticorpos antifosfolipídeos são detectados com frequência em pacientes com SLE, além de outras doenças, como nas infecciosas (McNeil, 1991; Alarcón-Segovia, 1992). Estes são encontrados em até 60% dos pacientes com SLE. Trata-se de uma família de anticorpos bastante heterogênea em termos de função e imuno-histoquímica (McNeil, 1991). A cardiolipina (fosfolipídeo aniônico) é amplamente utilizada para detecção de anticorpos antifosfolipídeos. A maioria dos anticorpos anticardiolipina apresenta reação cruzada com fosfolipídeos zwiteriônicos (McNeil, 1991). Os anticorpos contra fosfolipídeos aniônicos podem ser IgG ou IgM, enquanto aqueles reativos contra fosfolipídeos zwiteriônicos frequentemente são IgM.

Os anticorpos antifosfolipídeos são identificados em pacientes lúpicos de três modos (Alarcón-Segovia, 1992): (1) resultado falso-positivo em teste sorológico para detecção de sífilis, por meio de um resultado positivo de teste de Laboratório de Pesquisas Sobre Doenças Venéreas (VDRL, Venereal Disease Research Laboratory), que consiste em um ensaio de floculação com partículas de carbono cobertas de colesterol, lecitina (fosfatidilcolina) e cardiolipina; (2) ensaio do anticoagulante lúpico, que é um prolongamento do tempo de tromboplastina parcial do caolim, sem correção com plasma normal; e (3) imunoensaio da cardiolipina, utilizando cardiolipina ou outros fosfolipídeos de carga negativa como antígenos e β_2-glicoproteína I como cofator. Pacientes com SLE usualmente apresentam reatividade contra o grupo fosfato de carga negativa presente em cardiolipina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol.

Harris et al. (1987, 1990) realizaram *workshops* internacionais para melhorar a precisão e a acurácia dos imunoensaios de detecção de anticorpos antifosfolipídeos. Soros de referência foram preparados e foram definidas unidades padrão (GPL e MPL). Uma GPL (MPL) equivale a 1 mg/mL de uma amostra de IgG (IgM) padrão purificada por afinidade. Entretanto, Lopez et al. (1992) sugeriram que é importante realizar um ensaio IgA-específico para detecção de anticorpos antifosfolipídeos na avaliação da síndrome antifosfolipídeo em pacientes com SLE. Aparentemente, o isótipo IgA é mais prevalente em indivíduos da raça negra.

Os ensaios recém-desenvolvidos para detecção de autoanticorpos contra a β_2-glicoproteína I parecem conferir maior especificidade aos achados, pois foi descrito que a β_2-glicoproteína constitui epítopo específico para os autoanticorpos antifosfolipídeos (Obermoser, 2004). Além disso, anticorpos IgA contra β_2-GP I ou anticorpos que reconhecem complexos β_2-glicoproteína I/oxLDL (lipoproteína oxidada de baixa densidade) parecem ser patogênicos na doença vascular aterosclerótica (Staub, 2003; Matsuura, 2004; Ranzolin, 2004).

Lúpus discoide crônico e outras variantes cutâneas

Uma forma benigna de lúpus pode se manifestar como lesões cutâneas "discoides" (em forma de moeda ou disco) sem os sintomas da doença sistêmica. Esse distúrbio é chamado lúpus eritematoso discoide crônico (CDLE, *chronic discoid lupus erythematosus*) (Sontheimer, 1992; Wallace, 1992). As características clínicas e laboratoriais do CDLE ainda não foram delineadas com clareza desde a adoção dos critérios de classificação do SLE revisados pelo ACR em 1982. As lesões cutâneas observadas no CDLE possuem as seguintes características: (1) eritema localizado persistente; (2) crostas aderentes; (3) formação de tampão folicular; (4) telangiectasia; e (5) atrofia (Wallace, 1992). O lúpus eritematoso cutâneo subagudo (SCLE, *subacute cutaneous lupus erythematosus*), outra condição cutânea similar, consiste no aparecimento de lesões papuloescamosas ou lesões sem crosta associadas principalmente à detecção de autoanticorpos anti-SS-A/Ro. Do mesmo modo, foram descritas variantes adicionais de CDLE, como a paniculite lúpica (também chamada lúpus profundo) e a urticária lúpica (Sontheimer, 1992).

Wallace et al. (1992) definiram CDLE como sendo a correspondência da descrição de CDLE ou SCLE, ou uma das variantes do SLE, em que os critérios de definição do SLE/ACR de 1982 não são cumpridos. Infelizmente, o CDLE é um distúrbio autoimune cutâneo em que falta uma anomalia sorológica unificadora diagnóstica. Trata-se de uma forma branda do lúpus eritematoso que raramente se expande para SLE. Por outro lado, há uma considerável sobreposição entre CDLE e SLE, uma vez que até 15% dos pacientes com SLE apresentam lesões cutâneas discoides. Cerca de 6 a 12% dos pacientes lúpicos apresentaram lúpus discoide no decorrer de alguns anos, antes do início da doença sistêmica (Wallace, 1992). Os ANAs são com frequência encontrados e, segundo as estimativas, apresentam uma prevalência de 6 a 50% no lúpus discoide. A proporção de casos de lúpus discoide entre os sexos (2 mulheres:1 homem) é consideravelmente menos tendenciosa em relação ao sexo feminino, quando comparada à forma sistêmica.

Lúpus eritematoso induzido por fármacos, anticorpos anti-histona e anticromatina

O lúpus induzido por fármacos é caracterizado pela presença de autoanticorpos anti-histonas. As histonas são moléculas proteicas básicas que contêm elevadas proporções molares dos aminoácidos de carga positiva lisina e arginina. As histonas são encontradas em células eucarióticas, intimamente associadas ao DNA genômico. A subunidade desse complexo histona-DNA é denominada nucleossomo e contém duas moléculas de cada histona "nuclear" (H2A, H2B, H3 e H4) e uma molécula de H1, além de DNA com comprimento aproximado de 200 pares de bases (Rubin, 1985, 1987).

Estudos sobre lúpus induzido por fármacos demonstraram que a enzima hepática acetiltransferase parece exercer papel importante nessa condição (Woosley, 1987). A acetiltransferase é uma enzima capaz de acetilar fármacos, como hidralazina e procainamida, exercendo papel significativo na desintoxicação e na excreção destes. Pacientes com baixos níveis de acetiltransferase mostraram-se mais propensos a desenvolver ANAs e sintomas clínicos, em comparação àqueles tratados com

hidralazina que apresentavam fenotipicamente níveis elevados dessa enzima. Pacientes cujos níveis de acetiltransferase eram altos e que apresentavam acetilação rápida não eram imunes ao desenvolvimento de ANAs. Esses pacientes, contudo, receberam doses de hidralazina por tempo mais prolongado e mais cumulativas antes de finalmente desenvolverem a doença. Tais achados referentes aos fenótipos da acetiltransferase foram confirmados pela observação de pacientes tratados com procainamida (Rubin, 1988). A procainamida é o fármaco mais comumente envolvido na autoimunidade induzida por fármacos.

No lúpus induzido por fármacos, são detectados anticorpos contra DNA de fita única e anti-histonas. No SLE, por outro lado, com frequência são encontrados anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm e anti-U1nRNP, além dos anticorpos anti-histonas. A procainamida é utilizada no tratamento de pacientes com arritmias cardíacas, sendo que a maioria deles eventualmente desenvolve anticorpos anti-histonas. No entanto, apenas 10 a 20% dos pacientes tratados com procainamida desenvolvem doença autoimune sintomática (Rubin, 1988). Nos pacientes assintomáticos, os anticorpos anti-histona são predominantemente IgM e exibem ampla reatividade contra todas as histonas individuais. Os pacientes com doença sintomática desenvolvem um tipo único de anticorpos anti-histona da classe IgG que, em vez de reagir com as histonas individuais, apresenta reatividade específica contra o complexo dimérico H2A-H2B (Rubin, 1988). Assim, a IgG anti-(H2A-H2B) é útil como marcador diagnóstico e apresenta alta sensibilidade e especificidade para a doença sintomática, contrastando com a forma benigna da autoimunidade induzida pela procainamida, em que anticorpos IgM reagem contra histonas individuais. Em ambos os tipos de lúpus eritematoso induzido por fármaco (hidralazina e procainamida), os anticorpos IgM estão presentes em níveis significativamente mais altos que os anticorpos IgG.

Cerca de 50% de todos os pacientes tratados com procainamida desenvolveram ANAs após 1 ano de tratamento (Tan, 1989). Aqueles que apresentavam acetilação lenta desenvolveram ANAs de modo mais rápido do que aqueles cuja acetilação era rápida (Woosley, 1987). Todos os pacientes submetidos ao tratamento prolongado com procainamida desenvolveram uma resposta positiva de ANAs independentemente do fenótipo de acetilação.

Como os anticorpos anti-histonas são encontrados em diversas condições, os anticorpos mais específicos (p. ex., anticromatina) estão substituindo os ensaios para detecção dos anticorpos anti-histona. Sinônimos para anticorpos anticromatina são fator da célula LE, anticorpos antinucleossomo, antidesoxirribonucleoproteína (DNP) e anti-(H2A-H2B-DNA). Esses anticorpos são encontrados em 75% de todos os pacientes com SLE, em até 100% dos pacientes com lúpus induzido por fármacos e em 20 a 50% dos pacientes com hepatite autoimune de tipo I (hepatite lúpica). Nos pacientes com SLE, os anticorpos anticromatina apresentam melhor correlação com a doença renal que os anticorpos anti-dsDNA (Burlingame, 2002, 2004; Cervera, 2003).

Síndrome de Sjögren

A síndrome de Sjögren é uma doença autoimune inflamatória progressiva marcada por ressecamento de olhos, boca e outras membranas mucosas (Schumacher, 1993; Ramos-Casals, 2005). A doença pode evoluir a partir das glândulas exócrinas para um distúrbio sistêmico, bem como para uma transformação linfoproliferativa de células B. É consideravelmente mais frequente nas mulheres do que nos homens, com prevalência crescente no decorrer de toda a vida adulta. Por vezes, a síndrome de Sjögren ocorre associada a outra doença reumática, como AR, SLE, cirrose biliar primária ou esclerose sistêmica (Tab. 50.4). As glândulas salivares ou lacrimais afetadas são infiltradas por agregados de linfócitos. As manifestações extraglandulares incluem linfadenopatia, vasculite cutânea e pneumonite intersticial.

A doença foi classificada em (1) síndrome de Sjögren primária, que não está associada a outra doença do tecido conjuntivo; e (2) síndrome de Sjögren secundária, em que a AR ou outro distúrbio autoimune está presente. A síndrome de Sjögren é conhecida por ocorrer como forma primária, cuja principal característica é a formação do complexo seco (ceratoconjuntivite seca e xerostomia). Na síndrome de Sjögren, os autoanticorpos normalmente são restritos aos antígenos SS-A/Ro e SS-B/La (Tan, 1989), contudo, alguns de nossos pacientes apresentaram especificidades isoladas distintas, como anti-complexo de Golgi ou anti-NuMA. Anticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La estão presentes no SLE, porém, em menor prevalência do que na síndrome de Sjögren. Anticorpos anti-SS-B/La são detectados em 60% dos pacientes com a síndrome e em 35% dos pacientes com SLE, enquanto os anticorpos anti-SS-A/Ro são encontrados em 40 e 15% dos pacientes, respectivamente (von Mühlen, 1995). A presença de anticorpos anti-SS-A/Ro, quando associada a anticorpos anti-SS-B/La, é indicativa de síndrome de Sjögren primária, às vezes em coexistência com SLE. A presença de anticorpos anti-SS-B é inferior a 1% na AR (Tan, 1988). Existe uma notável associação entre os anticorpos anti-SS-A/Ro e a ocorrência de vasculite sistêmica e cutânea (Bylund, 1991). A associação entre anticorpos anti-SS-A/Ro e vasculite foi observada em pacientes com doença do tecido conjuntivo não classificada. A determinação dos níveis de autoanticorpos anti-α-fodrina, que também são encontrados no soro AR, não contribui de forma significativa para o diagnóstico da síndrome de Sjögren (Ruffatti, 2004; Zandbelt, 2004). O padrão de pontilhados finos da coloração de ANAs é característico da síndrome de Sjögren (Fig. 50.2).

Tabela 50.4 Associações clínicas frequentes com a síndrome de Sjögren

1. Artrite reumatoide
2. Lúpus eritematoso sistêmico
3. Polidermatomiosite
4. Doença mista do tecido conjuntivo
5. Cirrose biliar primária
6. Vasculite sistêmica necrotizante
7. Tireoidite autoimune
8. Hepatite crônica ativa
9. Crioglobulinemia mista
10. Púrpura hipergamaglobulinêmica

Escleroderma

A esclerose sistêmica (escleroderma) é um distúrbio do tecido conjuntivo envolvendo múltiplos sistemas, cuja etiologia é desconhecida, caracterizado principalmente pela presença de lesões vasculares e fibrose tecidual. Pacientes com esclerose sistêmica apresentam produção espontânea de autoanticorpos contra antígenos nucleares, nucleolares e mitocondriais (Reimer, 1990; Rothfield, 1992; Ho, 2003; Cepeda, 2004), cuja detecção possui significado diagnóstico e prognóstico (Harris, 2003). O paciente com escleroderma usualmente apresenta heterogeneidade restrita de tipos de autoanticorpos, de modo que raramente é detectado mais de um tipo de autoanticorpo em um paciente individual. A Tabela 50.5 lista os diversos tipos de autoanticorpos descritos para o escleroderma.

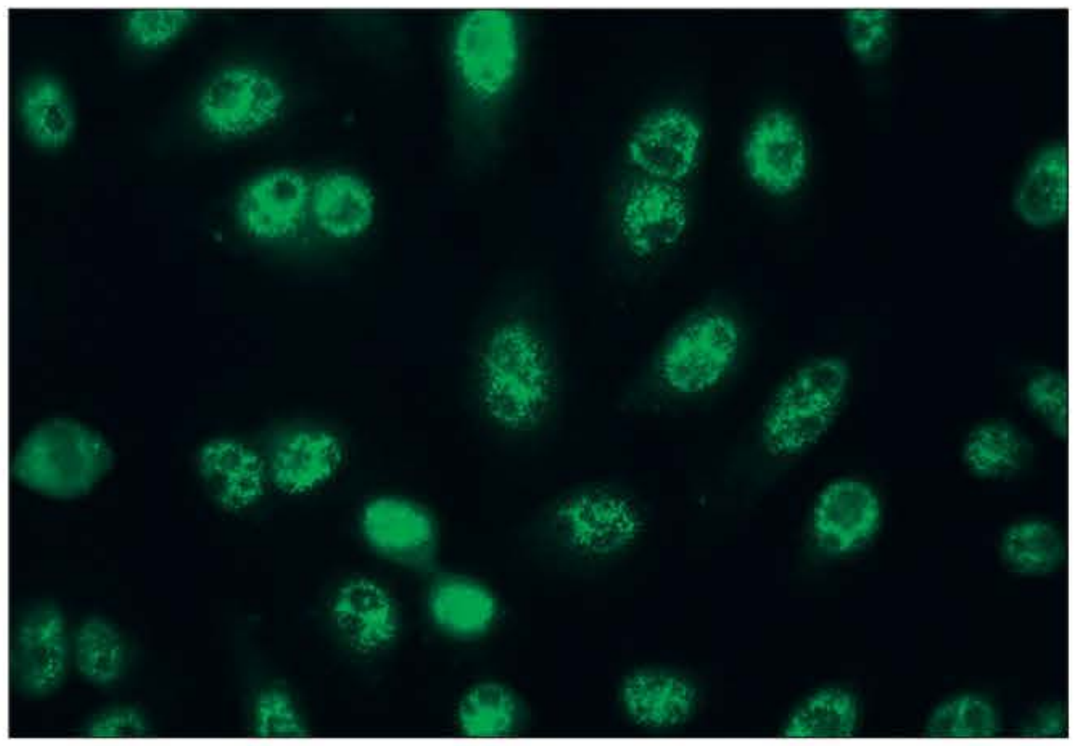


Figura 50.2 Anticorpos antinucleares na síndrome de Sjögren. Padrão nuclear salpicado fino no ensaio de imunofluorescência indireta utilizando células HEp-2, característico da presença de autoanticorpos anti-SS-A/Ro.

Tabela 50.5 Autoantígenos e autoanticorpos no escleroderma

Autoantígeno	Estrutura molecular	Frequência do autoanticorpo
Scl-70	Forma nativa com 100 kDa; produto de degradação com 70 kDa; DNA topoisomerase I	70% no escleroderma difuso; 20–59% em todos os pacientes; 13% na CREST
Centrômero	Proteínas de 17, 80 e 140 kDa localizadas nas placas interna e externa do cinetocoro	57–82% na CREST; 8% na forma difusa
RNA Pol I	Complexo de subunidades proteicas da RNA Pol I; 210-211 kDa	4–20% no escleroderma; 13% na forma difusa
RNA Pol II	Transcritos de mRNA	4%
RNA Pol III	Transcritos de rRNA 5S, tRNA	23% no escleroderma; 45% na forma difusa; 6% na CREST
Fibrilarina	Proteína de 34 kDa, componente da partícula de U3 RNP	6–8%; 5% na forma difusa; 10% na CREST
U1nRNP	Complexo do spliceossomo	2–5% em todos os pacientes; 24% na sobreposição polimiosite/escleroderma
PM-Scl	Complexo de 11 proteínas; 110 a 120 kDa	2–5%; 24% na sobreposição polimiosite/escleroderma
Ku	Proteína ligadora de DNA	1–14% no escleroderma; 26–55% na sobreposição polimiosite/escleroderma
Th/To	Proteína de 40 kDa, complexos com RNAs 7S e 8S	4–10% no escleroderma; 1–11% na forma difusa; 8–19% na CREST; até 3% na sobreposição polimiosite/escleroderma
NOR-90	Proteína de 90 kDa, fator de ligação de contracorrente humano, localizado na região organizadora do nucléolo	Raro

Pacientes com envolvimento cutâneo rapidamente progressivo e difuso, afetando as extremidades distais e com frequência as extremidades proximais e o tronco, apresentam maior risco de desenvolver comprometimento visceral precoce. Incluídos na classificação de escleroderma, há um grande subgrupo de pacientes com síndrome CREST (calcinose na cútis, fenômeno de Raynaud, desmotilidade esofágica, esclerodactilia e telangiectasia). O subgrupo de pacientes com CREST pode representar 20 a 30% do total de pacientes com escleroderma (Fritzler, 1980). Pacientes com a variante CREST apresentam envolvimento cutâneo limitado, confinado às extremidades distais dos dedos das mãos e da face. Além disso, o prognóstico e o curso clínico usualmente são mais favoráveis do que para os pacientes com envolvimento cutâneo difuso (Fig. 50.3).

Anticorpos contra antígenos centroméricos

Os autoanticorpos dirigidos contra antígenos do centrômero são detectados inicialmente por MIF. O antígeno centromérico foi localizado na região de condensação metafásica dos cromossomos. Estudos utilizando *immunoblotting* revelaram que os antígenos centroméricos consistem de três proteínas, com pesos moleculares de 16 kDa, 80 kDa e 120 kDa. Autoanticorpos contra proteínas do centrômero estão presentes em 50 a 80% dos pacientes do subgrupo CREST. Cerca de 25% dos pacientes com fenômeno de Raynaud idiopático concomitante a outros sinais ou sintomas de CREST apresentam anticorpos anticentrômero (Rothfield, 1992). Anticorpos anticentrômero estão mais frequentemente associados a uma baixa incidência de fibrose pulmonar e mortalidade, embora haja relato de um caso de risco aumentado de hipertensão pulmonar (Cepeda, 2004).

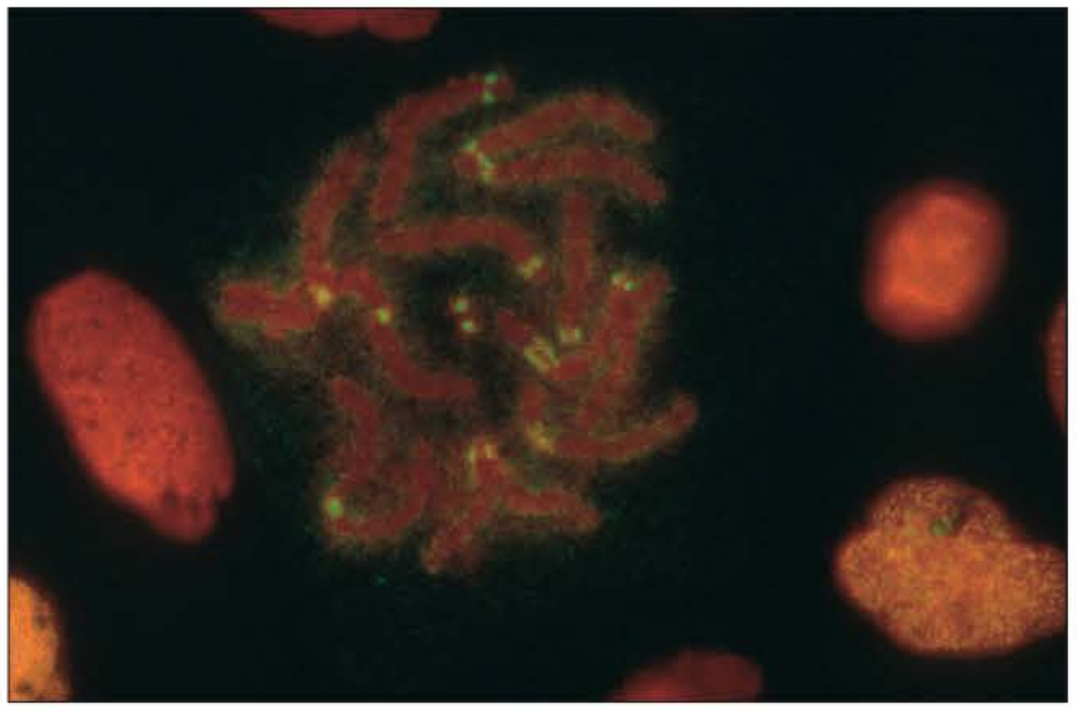


Figura 50.3 Esclerose sistêmica (escleroderma): estudo especial. Decoração centromérica em preparação rato/muntiaco com anticorpo anticentrômero.

Anticorpos contra Scl-70 (DNA topoisomerase I)

Um dos principais autoantígenos é o Scl-70, que inicialmente foi detectado como proteína de 70 kDa. Posteriormente, essa proteína foi reconhecida como sendo o produto da degradação de uma proteína de 95 kDa, a DNA topoisomerase I (Tan, 1989). O antígeno apresenta uma distribuição pontilhada que foi localizada no nucleoplasma e no nucléolo. Nos estudos iniciais, autoanticorpos contra Scl-70 foram detectados por imunodifusão em 20% dos pacientes com escleroderma não selecionados (Tan, 1982a). Já em estudos mais recentes, os autoanticorpos contra Scl-70 foram encontrados em 75% dos pacientes com a forma difusa severa de escleroderma, por meio de testes de imunodifusão (Jarzabek-Chorzelska, 1986). Esse último achado provavelmente foi consequência de uma melhor preservação do antígeno topoisomerase I nos testes, além de ter demonstrado uma maior prevalência de autoanticorpos anti-Scl-70 entre pacientes com escleroderma difuso severo (Nakamura, 1992). Em resumo, há na literatura diversos relatos em que os autoanticorpos anti-Scl-70 são associados a envolvimento cutâneo difuso, frequência aumentada de fibrose pulmonar e maior mortalidade.

Anticorpos contra RNA polimerases

Existem três RNA polimerases que catalisam a transcrição genética em RNA (von Mühlen, 1994). Autoanticorpos dirigidos contra as RNA polimerases tendem a ocorrer juntos em um mesmo paciente, parecem ser específicos para o escleroderma e são detectados principalmente em indivíduos com escleroderma difuso. Existe uma associação entre doença cutânea difusa, fibrose pulmonar intersticial, crise renal e maior mortalidade (Harris, 2003; Cepeda, 2004; Ioannidis, 2005).

Autoanticorpos contra o antígeno nucleolar fibrilarina (U3-snRNP)

O nome "fibrilarina" tem origem na localização do antígeno no componente fibrilar denso dos nucléolos. Anticorpos antifibrilarina são detectados com mais frequência em homens jovens com escleroderma, apresentando comprometimento articular mínimo e hipertensão pulmonar (von Mühlen, 1994; Harris, 2003).

Anticorpos dirigidos contra a região organizadora nucleolar

Os anticorpos contra a região organizadora nucleolar (NOR, *nucleolar organizing region*)-90 reconhecem o fator de transcrição da RNA polimerase I hUBF (*human upstream biding factor* ou fator de ligação de contracorrente humano) junto ao centro fibrilar do nucléolo. As NORs são regiões em que o nucléolo é restaurado após a mitose e que contêm agrupamentos de genes de RNA ribossômico, bem como sítios nos quais são reconhecidos os antígenos Scl-70, U3-RNA/fibrilarina, NOR-90 e RNAP polimerase I (von Mühlen, 1994; Fritzler, 1995; Dagher, 2002).

Artrite reumatoide

A AR é um distúrbio autoimune sistêmico caracterizado por uma artrite crônica, simétrica e erosiva nas articulações periféricas. Um percentual maior de pacientes apresenta títulos elevados de fatores reumatoides séricos. Pode haver manifestações não articulares associadas, tais como nódulos subcutâneos, vasculite, fibrose intersticial e anemia. As síndromes de Sjögren e Felty são comuns na AR. A causa primária dessa doença é desconhecida. A maioria dos pacientes com AR possui alelos de MHC de classe II DR4, DR1 ou ambos (Schumacher, 1993). A AR está associada à detecção de vários autoanticorpos, que podem servir de marcadores diagnósticos e prognósticos (Aho, 1994; Viander, 1997; Firestein, 2003). Esses anticorpos são:

1. fator reumatoide (FR);
2. anticorpos antifibrilarina (também conhecidos como anticorpos antiproteína citrulinada [ACPA, *anti-citrullinated-protein antibodies*]; Tab. 50.6):

a) anticorpos antiqueratina (AKA);
b) anticorpos antifator perinuclear (APF) (Fig. 50.4);
c) anticorpos contra peptídeos citrulinados (por vezes referido como anticorpos anti-CCP [*anti-cyclic-citrullinated-peptide* ou antipeptídeo cíclico citrulinado]);
d) anticorpos anti-As, dirigidos contra vimentina citrulinada.

3. anticorpos anti-RA33.

É possível que o aparecimento desses anticorpos preceda o início da AR clínica (Klareskog, 2004).

Tabela 50.6 Autoanticorpos comumente utilizados na artrite reumatoide

	FR IgM 1940	IFI APF 1964	ELISA anti-CCP1 1998	ELISA Anti-CCP2 2002	ELISA Anti-CCP3 2005
Sensibilidade (%)	66–85	60 (39–87)	60	69	74
Especificidade (%)	72	95 (73–99)	92	95–98	96

APF = fator antiperinuclear; CCP = peptídeo citrulinado cíclico (os números 1, 2 e 3 se referem aos ensaios de primeira, segunda e terceira geração, respectivamente); FR = fator reumatoide. Veja no texto as referências.

Fator reumatoide

O FR é um anticorpo dirigido contra a porção Fc da molécula de IgG. Estudos sobre FR mono e policlonais revelaram que esse anticorpo apresenta especificidade de ligação para outras substâncias, além da IgG, como componentes nucleares (Schumacher, 1993). O FR polirreativo usualmente é uma IgM de baixa afinidade. O FR não é específico para a AR e com frequência é detectado em casos de infecção crônica e outras condições inflamatórias sistêmicas. Nas doenças reumáticas, o FR apresenta considerável heterogeneidade imunoquímica. Além do usual FR da classe IgM, também foram detectados FRs das classes IgA e IgG. O FR da classe IgA foi relacionado à forma mais severa da doença, em que há erosões. O grupo dos FRs é um dos únicos grupos de autoanticorpos que estão nitidamente envolvidos na patogênese da doença (Smolen, 1998).

Anticorpo antiqueratina

O AKA reage contra o extrato córneo do esôfago de ratos (Young, 1979). Trata-se de um anticorpo bastante específico, porém pouco sensível como marcador da AR. Soros de pacientes com AR apresentam reação positiva em 36 a 59% dos casos, sendo que esse percentual cai para 0 a 3% no caso do soro de pacientes sadios normais (Aho, 1994). A maioria dos soros positivos para AKA também reage com o APF, sugerindo que ambos os antígenos compartilham algumas similaridades. Foi demonstrado que os AKAs reagem contra isoformas de filagrina ácido-neutras solúveis presentes nas formas epidérmica e molecular de (pró)filagrina no epitélio esofágico de ratos, em vez da citoqueratina (Simon, 1993; Sebbag, 2004).

Fator antiperinuclear (APF)

Esse anticorpo é reativo contra os grânulos de querato-hialina perinucleares encontrados nas células da mucosa bucal (Nienhuis, 1964). O aminoácido citrulina (não padrão) parece ser um componente essencial nos epítopos reconhecidos por esses autoanticorpos (Schellekens, 1998). O teste de imunofluorescência é sensível, porém menos específico que o teste para detecção de AKA em pacientes com AR. Testes positivos para APF foram relatados em 49 a 87% dos pacientes com AR (Janssens, 1988; Aho, 1994) e em até 5% dos casos envolvendo outras doenças do tecido conjuntivo ou em controles normais. Tanto os AKAs como os APFs foram detectados na fase soronegativa inicial da AR, evidenciando a evolução do diagnóstico dessa doença.

Antipeptídeos citrulinados

Anticorpos contra peptídeos citrulinados (CCP) detectados por ELISA constituem marcadores iniciais e específicos da AR (van Venrooij, 2004; Vossenaar, 2004; Hoffman, 2005). O antígeno utilizado na maioria dos ensaios é a filagrina citrulinada. A citrulina, um aminoácido não convencional, é gerada pela ação da enzima peptidil arginina desiminase (PAD, *peptidyl arginine deimminase*), que produz uma modificação pós-translação em peptídeos contendo arginina. Relatos atribuem a um ELISA de segunda geração uma especificidade de 98% para o diagnóstico da AR, bem como uma sensibilidade de 70%. Esses percentuais representam um aprimoramento significativo em relação ao teste de detecção de FR (Lee, 2003; Sebbag, 2004). Além disso, anticorpos anti-CCP podem ser detectados em 50% dos pacientes com AR em estágio inicial, quando o teste para FR ainda resulta negativo, permitindo estabelecer melhor o diagnóstico e iniciar o tratamento específico mais cedo. Na literatura, existem numerosos estudos apontando a existência de uma associação com a doença erosiva, mais severa e progressiva (Forslind, 2004; Kastbom, 2004; Sebbag, 2004).

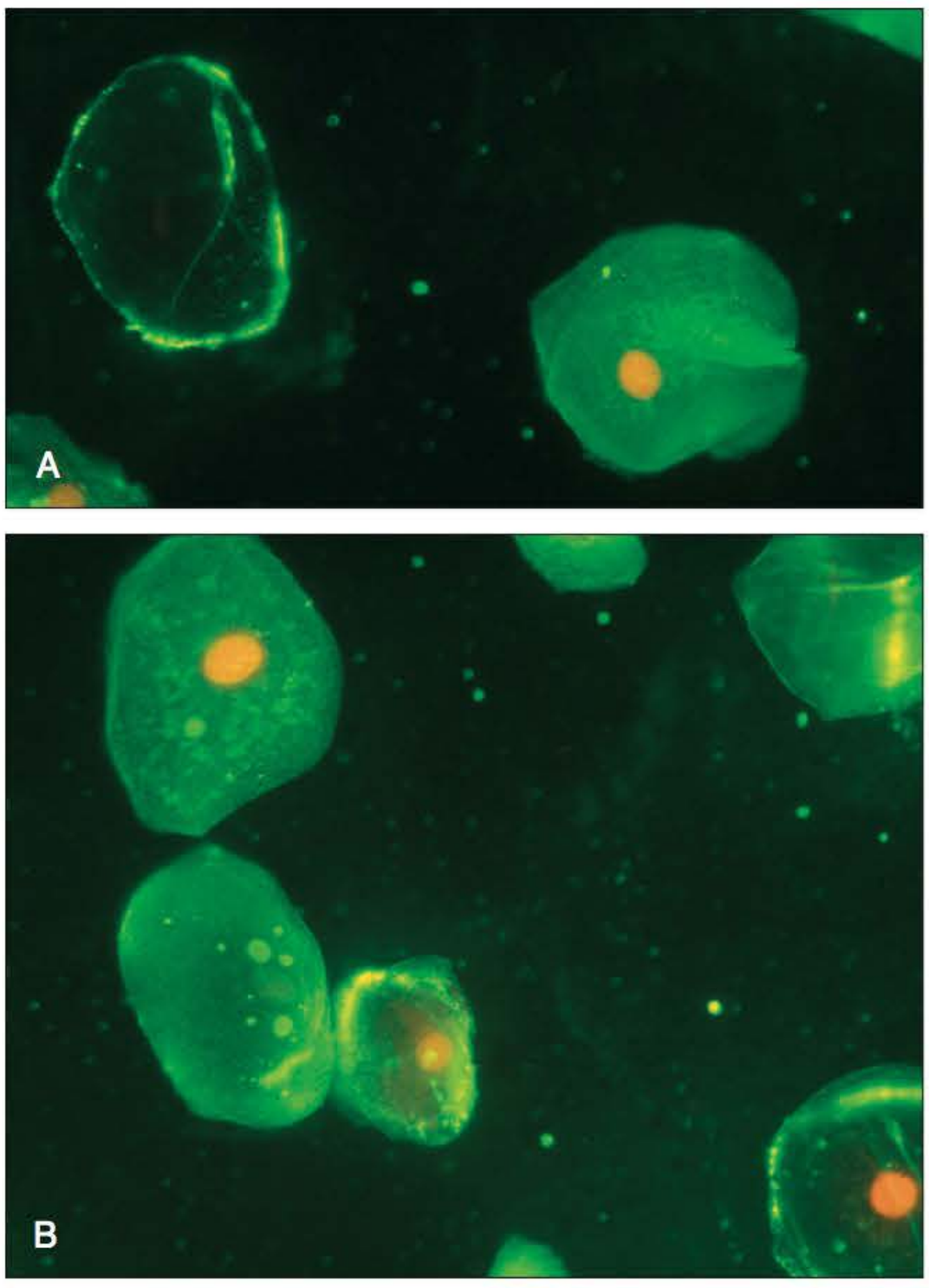


Figura 50.4 Fator antiperinuclear (APF) na artrite reumatoide. *A*, Preparação negativa para APF utilizando células da mucosa oral como substrato da imunofluorescência indireta. *B*, Preparação positiva para APF – observe os grânulos homogêneos densos em torno dos núcleos contracorados com brometo de etídio (cor alaranjada).

Anticorpos anti-CCP raramente são encontrados em outras condições clínicas, como em infecções virais (em geral, hepatite C), doença de Lyme, doença de Graves, SLE e síndrome de Sjögren (ambas associadas à doença articular erosiva). Crianças com AR juvenil, em geral, não são beneficiadas por esse teste laboratorial, cuja sensibilidade é de apenas 0,2 a 3%. Resultados positivos são obtidos junto ao subgrupo de crianças FR-positivas poliarticular, que comumente evoluem para a forma adulta erosiva da AR (Low, 2004).

Por outro lado, autoanticorpos anti-CCP podem discriminar melhor pacientes com AR e pacientes que apresentam manifestações poliarticulares associadas à infecção pelo vírus da hepatite C (Bombardieri, 2004). Diversos autores sugerem que o teste de detecção de anticorpos anti-CCP deve melhorar bastante a acurácia da classificação da AR, se forem incorporados aos critérios estabelecidos em 1987 pelo ACR.

Anti-RA33

Hassfeld et al. (1989) relataram a existência de anticorpo antinuclear (anti-RA33) que poderia ser específico para a AR. Obtido a partir de extratos de células HeLa, um antígeno de aproximadamente 33 kDa apresentou reatividade contra 36% dos 95 soros provenientes de pacientes com AR, e contra apenas 1 dos 170 soros de pacientes controle. O antígeno foi chamado RA33 e o autoanticorpo correspondente não apresenta relação discernível diante de outros anticorpos nucleares. O anticorpo anti-RA33 não está relacionado aos anticorpos anti-histona. Análises de *immunoblot* empregando extratos solúveis de células HeLa revelaram a presença de um autoanticorpo, cujo antígeno-alvo apresentava peso molecular aproximado de 33 kDa (anti-RA33), em 30% dos pacientes austríacos com AR e que estava ausente em pacientes com espondilite anquilosante ou artrite psoriática (Aho, 1994). Entretanto, entre pacientes finlandeses com AR, esses anticorpos apresentaram uma baixa prevalência de 6% (Aho, 1994). Autoanticorpos anti-RA33 também podem ser encontrados da DMTC e no SLE (Steiner, 1996).

Polimiosite e dermatomiosite

A polimiosite é uma doença inflamatória de etiologia desconhecida, que afeta o músculo estriado. Caracteriza-se pela presença de infiltrados inflamatórios na musculatura esquelética, associada à necrose e à degeneração das fibras musculares (Targoff, 1992). Essa doença é referida como dermatomiosite quando acompanhada de alterações cutâneas típicas. A polimiosite tem como característica sorológica a presença de numerosos autoanticorpos de especificidades diversas, que reconhecem diferentes sintetases de RNA transportador (tRNA) (von Mühlen, 1994; Targoff, 2002) (Tab. 50.7). Esses autoanticorpos definem um subgrupo de pacientes com polimiosite, artralgia, doença intersticial pulmonar e prognóstico pior do que aquele de pacientes sem autoanticorpos.

Anticorpos contra Jo-1 (histidil-tRNA sintetase) são detectados em 23 a 36% dos pacientes com polimiosite, a maioria dos quais com doença intersticial pulmonar (Targoff, 1992). Autoanticorpos contra treonil e alanil-tRNA sintetases são encontrados com menor prevalência na miosite autoimune. Em pacientes que apresentam uma síndrome clínica com aspectos sobrepostos de polimiosite e escleroderma, foi relatada a existência de um anticorpo denominado anti-PM-Scl (Tan, 1988). Este reage com um complexo constituído por 11 polipeptídeos, cujos pesos moleculares variam de 110 kDa a 120 kDa. Na MIF indireta, a presença do anticorpo anti-PM-Scl é identificada pela coloração do nucléolo e do nucleoplasma das células do substrato. Os anticorpos dirigidos contra Mi-2, um fator remodelador de ATPase estimulado pelo nucleossomo, dependente de DNA (Wang, 2001), são considerados específicos para a dermatomiosite (von Mühlen, 1995). Tem chamado a atenção a presença de anticorpos dirigidos contra um componente de 52 kDa do antígeno SS-A/Ro em uma parcela dos pacientes com polimiosite/dermatomiosite (Peene, 2002).

Conceito de síndromes de sobreposição

"Síndrome de sobreposição" é um termo utilizado para descrever casos em que o paciente exibe sintomas de mais de uma doença (Pope, 2002). Exemplificando, há relatos de pacientes que atendem aos critérios diagnósticos para SLE e também apresentam manifestações atípicas sugestivas de um segundo diagnóstico, como AR (Lazaro, 1989). Ainda é preciso esclarecer se as síndromes de sobreposição podem representar a coexistência de duas ou mais doenças distintas, ou se a síndrome da sobreposição constitui uma entidade diferenciada.

Tabela 50.7 Autoantígenos e autoanticorpos na polimiosite e na dermatomiosite

Autoantígeno	Estrutura molecular	Frequência do anticorpo
Jo-1	Proteína da histidil-tRNA sintetase, 52 kDa	23–36%
PL-7	Proteína da treonil-tRNA sintetase, 80 kDa	4% na polimiosite
PL –12	Proteína da alanil-tRNA sintetase, 110 kDa	3%
Mi-2	Complexo proteico nuclear, proteínas de 53 e 61 kDa	15–35% na polimiosite; 5–9% na dermatomiosite
Partícula de reconhecimento de sinal (SRP)	Proteína de 54 kDA complexada ao RNA 7SL	4–5% na polimiosite; não ocorre na dermatomiosite
PM-Scl	Complexo de 11 proteínas, 110–120 kDa	8–12% na polimiosite; 25% na sobreposição polimiosite/escleroderma
U1nRNP	Complexo do spliceossomo	4–17% na polimiosite/ dermatomiosite
56 kDa	56 kDa, componente de RNP	80%
5 EJ	Glicil-tRNA sintetase	< 3% na polimiosite
OJ	Isoleucil-tRNA sintetase	< 3% na polimiosite

Fonte: dados de Tan (1988), Nakamura (1992) e von Mühlen (1994).

Doença mista do tecido conjuntivo

O conceito de DMTC foi inicialmente proposto por Sharp et al. (1972). Os 20 pacientes descritos no estudo inicial apresentavam uma combinação de aspectos de modo geral associados ao SLE, esclerose sistêmica e polimiosite. De modo característico, utilizando o método da hemaglutinação, foi detectado um título mais alto de autoanticorpos contra uma ribonucleoproteína nuclear em todos os pacientes (Sharp, 1972). A falta de anormalidades renais e neurológicas, bem como a excelente resposta desses pacientes a pequenas doses de corticosteroides orais inicialmente justificaram a classificação como um grupo à parte do SLE e da esclerose sistêmica. Entretanto, o conceito de DMTC como um grupo isolado foi modificado com o passar do tempo. Muitos acreditam que a DMTC representa uma sobreposição de esclerose sistêmica, SLE e polimiosite (Niemelstein, 1980). Um grupo de pacientes originalmente diagnosticados com DMTC foi reavaliado após 8 anos, apresentando uma evolução geral do padrão de sobreposição para o perfil de uma doença única, sendo que o escleroderma foi o diagnóstico mais prevalente (Niemelstein, 1980). Parece haver uma considerável sobreposição que se torna evidente quando os critérios antes mencionados são aplicados a uma certa população de pacientes. Além disso, os estudos não sustentam por completo a existência da DMTC como uma entidade clínica individual. Recentemente, foi demonstrado que anticorpos dirigidos contra uma subunidade da nRNP presente em vesículas apoptóticas, denominada U1-70K, constituem marcadores de DMTC inicial com qualidade superior à dos autoanticorpos para U1nRNP (Hof, 2005).

Biologia molecular e funções de certos autoantígenos nucleares e intracelulares

Diversos autoanticorpos intracelulares, incluindo os ANAs, foram identificados como marcadores diagnósticos de doenças reumáticas, como SLE, escleroderma, síndrome de Sjögren, DMTC, lúpus induzi-

do por fármacos e polimiosite/dermatomiosite (Tan, 1989). Os autoanticorpos detectados nas doenças humanas têm sido utilizados como ferramentas para estudar várias funções e mecanismos biológicos moleculares. Os ANAs foram empregados na triagem de bibliotecas de expressão de cDNA, com subsequente identificação e autoantígenos. As funções biológicas que comprovadamente são inibidas por autoanticorpos são *splicing* de pré-mRNA, replicação do DNA, reparo do DNA, transcrição, transcrição de rRNA, movimentação cromossômica à base de microtúbulos durante a mitose e aminoacetilação de tRNAs (Tan, 1988, 1989, 1997a; Casiano, 1996).

Perfis de autoanticorpos em várias doenças reumáticas sistêmicas

Perfis distintos de ANAs são observados em doenças reumáticas diferentes, cujas características incluem presença ou ausência de certos anticorpos, bem como diferenças quantos aos títulos médios desses anticorpos (Nakamura, 1986; Tan, 1988; Bizzaro, 2004). Não obstante, é preciso atentar para o baixo valor preditivo positivo do teste de detecção de ANAs diante de uma baixa prevalência de doenças reumáticas sistêmicas e nas populações em processo de envelhecimento (Slater, 1996). São notáveis os seguintes aspectos:

1. múltiplos ANAs são detectados com frequência no SLE, por vezes com níveis elevados de anticorpos anti-dsDNA na doença ativa;
2. distinção de anticorpos anti-Sm, anti-rRNP e anti-PCNA para o SLE;
3. restrição de ANAs a anticorpos anti-histona e/ou anticromatina (antinucleossomo) no lúpus induzido por fármacos;
4. anticorpos contra U1nRNP ou ANAs contra RNP presentes com frequências distintas em várias doenças reumáticas;
5. a restrição dos ANAs ao U1nRNP (por definição da doença) ou a anticorpos contra RNP nuclear, na DMTC;
6. soros de pacientes com síndrome de Sjögren são caracterizados primariamente pela presença de anticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La;
7. pacientes com escleroderma que apresentam um perfil constituído de anticorpos contra Scl-70, antígenos do centrômero/cinetócoro, e outros antígenos nucleolares, como fibrilarina e Th/To;
8. a presença frequente do FR, anticorpos antiproteínas citrulinadas (AKA, APF, anti-CCP) e anti-RA33 na AR;
9. a presença de autoanticorpos anti-Jo-1, anti-Mi-2 e anti-PM-Scl na polimiosite/dermatomiosite;
10. o aparecimento de certos autoanticorpos, como anticentrômero, anti-CCP e anti-dsDNA, pode preceder em muitos anos a manifestação da doença clínica.

Quadro de decisão para *work up* diagnóstico de doenças autoimunes

A MIF utilizando substratos de células humanas, como as células HEp-2, permite a detecção sensível de anticorpos séricos reativos que apresentam considerável especificidade para várias proteínas e ácidos nucleicos celulares. Essa técnica atualmente é essencial nos laboratórios de imunologia comprometidos com o diagnóstico de rotina de doenças autoimunes humanas. A partir de um resultado positivo do teste de imunofluorescência, torna-se possível associar um padrão especifico à presença de um autoanticorpo distinto no soro de um dado paciente. Considerando que padrões distintos de autoanticorpos são observados em cada doença, como já discutido, o laboratorista oferece ao clínico a possibilidade real de estreitar a busca diagnóstica. A Tabela 50.8 mostra um quadro de decisões que foi desenvolvido com base nesses aspectos. A classificação do padrão citoplasmático para uso na rotina laboratorial é descrita na Tabela 50.9. As Figuras 50.5, 50.6 e 50.7 ilustram alguns exemplos de padrões de imunofluorescência observados em nossos laboratórios.

Métodos diagnósticos na detecção de autoanticorpos

Os métodos comumente utilizados para detecção de autoanticorpos são listados na Tabela 50.10. Testes amplamente empregados na triagem de autoanticorpos intracelulares são a MIF e os testes imunoenzimáticos combinados a diversos antígenos (Nakamura, 1994b), por vezes denominados "anti-ENA". Os testes secundários definitivos para identificação de ANAs são imunodifusão, imunoprecipitação, aglutinação de partículas, ensaio imunoenzimático e métodos de *immunoblotting* (Teodorescu, 1992). Uma pesquisa de ANAs por imunofluorescência com células HEp-2 resultará positiva em 98% dos casos, na triagem de pacientes com SLE ativo. Em outras palavras, um resultado negativo de imunofluorescência usualmente exclui o diagnóstico de SLE.

É difícil padronizar a técnica da imunofluorescência indireta para detecção de ANAs (IF-ANAs) (Nakamura, 1992; Feltkamp, 1996; Smolen, 1997). Diversos fatores estão envolvidos no desempenho dos testes de IF-ANA, tais como: (1) variações de substrato e fixador; (2) propriedades ópticas microscópicas; (3) método e quantificação dos resultados; (4) estabelecimento dos intervalos de referência; (5) interpretação dos resultados; (6) soro de referência; e (7) especificidade e avidez dos ANAs. Segundo as recomendações do

Tabela 50.8 Quadro de decisões para identificação de autoanticorpos selecionados empregando células HEp-2 e respectivas doenças associadas

1. Padrão nuclear		
Envelope (borda)		
Pontilhado, negativo para figuras mitóticas	→	Cirrose biliar primária
Contínuo, negativo para figuras mitóticas	→	Doenças hepáticas crônicas
Homogêneo, positivo para figuras mitóticas	→	SLE, SLE induzido por fármaco
Salpicado		
Grandes	→	hnRNP no SLE
Grosseiros	→	Sm, RNP no SLE, MCTC
Finos	→	SS-A/Ro, SS-B/La no SLE, síndrome de Sjögren
Pleomórficos	→	PCNA no SLE
Discretos		
Positivo para figuras mitóticas	→	Centrômero no escleroderma
Negativo para figuras mitóticas	→	p95 (Sp100) na cirrose biliar primária
2. Padrão nucleolar		
Homogêneo	→	PM-Scl no escleroderma
Maciço	→	Fibrilarina no escleroderma
Salpicado		
Figuras mitóticas pontilhadas	→	RNA pol I, NOR-90 no escleroderma
Figuras mitóticas homogêneas	→	Scl-70 no escleroderma
3. Padrão citoplasmático		
Pontilhados densos, finos	→	Jo-1, PL-7, PL-12 na polimiosite/dermatomiosite
Homogêneo	→	rRNP no SLE e no SLE juvenil
Fibrilar	→	Actina, miosina na DMTC, cirrose biliar primária, hepatite autoimune crônica
Segmentado	→	α-actinina, vinculina na miastenia grave, doença de Crohn, colite ulcerativa
Reticular	→	Mitocôndria na cirrose biliar primária
Polar	→	Complexo de Golgi na síndrome de Sjögren, SLE, infecções virais
Aparelho do fuso mitótico	→	NuMA na síndrome de Sjögren, SLE; corpo médio, p330[d] no câncer

DMCT = doença mista do tecido conjuntivo; NuMA = antígeno associado ao núcleo mitótico; PCNA = antígeno nuclear da célula proliferante; SLE = lúpus eritematoso sistêmico.

Fonte: modificado de Krapf, AR; von Mühlen, CA; Krapf, FE et al.: Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies. Munich, Urban & Schwarzenberg, 1996.

Tabela 50.9 Classificação de padrões citoplasmáticos na imunofluorescência indireta

Padrões citoplasmáticos na IFI (substrato celular)	Antígenos representativos	Doença e associações clínicas
1. Fibroso		
Fibras de estresse – fibras citoesqueléticas lineares, às vezes com pequenos depósitos granulares descontínuos (HEp-2, fibroblastos)	Actina Miosina não muscular	Ambos na hepatite crônica ativa, cirrose hepática e miastenia grave; actina na hepatite autoimune, doença de Crohn, CBP, hemodiálise prolongada, SHN, e raramente na DDTC
Filamentoso – filamentos e fibrilas dispersas para fora da borda nuclear (HEp-2, PtK2, células epiteliais)	Vimentina Queratina	O anticorpo antivimentina é produzido com frequência em decorrência da reação cruzada com anticorpos anti-α-hélice, sendo detectado em diversos tipos de interações em condições inflamatórias e na hemodiálise prolongada; é raro na DDTC; ambos são detectados no SHN; a queratina constitui o principal sistema na DHA (69%), sendo comum também na DDTC e na psoríase
Segmentado – pequenos segmentos de fibras (corpos densos periódicos) que são descorados (HEp-2, fibroblastos)	α-actinina, vinculina Tropomiosina	Miastenia grave, doença de Crohn, colite ulcerativa
2. Salpicado		
Salpicado fino – salpicados pequenos e pontilhados, na maioria dos casos acompanhados de um fundo homogêneo ou com salpicados finos e densos (HEp-2)	Muitas das aminoacil-tRNA sintetases, principalmente Jo-1	Polimiosite; "síndrome do Jo-1" (miosite e doença intersticial pulmonar)
Salpicado fino e denso – nebuloso, quase homogêneo e por todo o citoplasma (HEp-2)	rRNP, fosfoproteínas ribossômicas	SLE neuropsiquiátrico
Vareta granular – perinuclear, em forma de seta, grosseiramente granular, correspondendo às pilhas lamelares do complexo de Golgi (HEp-2)	Complexo de Golgi	Raro no SLE, SjS, DMTC, granulomatose de Wegener e outras doenças reumáticas sistêmicas; descrito na ataxia cerebelar idiopática, degeneração cerebelar paraneoplásica e nas infecções virais, incluindo EBV e HIV
Reticular grosseiro – difuso e grosseiro, reticular, granular (HEp-2)	Proteínas da parte interna da membrana mitocondrial (principalmente M2)	CBP; esclerose sistêmica (43%); raro em outras DDTC; anticorpos anticentrômero estão frequentemente associados
Salpicados pequenos e pontilhados – salpicados citoplasmáticos contáveis, distribuídos de maneira irregular (HEp-2)	Lisossomos/endossomos/ peroxissomos/proteassomos	Escleroderma limitado, glioblastoma e outras doenças neurológicas, efusão pleural idiopática
Reticular fino – difuso e fino, reticular, granular (HEp-2)	Retículo endoplasmático (?); outras proteínas desconhecidas	DHC; detectado em todos os tipos de condições inflamatórias (crônicas)
ANCA – pANCA – coloração perinuclear irregular; cANCA – salpicados densos, finos ou grosseiros (granulócitos de sangue periférico, células da linhagem leucêmica HL-60)	pANCA tem como alvo a mieloperoxidase; cANCA tem como alvo PR3 (proteinase 3)	Descrito pela primeira vez na vasculite sistêmica com glomerulonefrite necrotizante e na doença pulmonar inflamatória; granulomatose de Wegener (cANCA) e outras vasculites necrotizantes (pANCA); a catepsina G é o principal antígeno na colite ulcerativa, doença de Crohn e colangite esclerosante primária; hepatite autoimune; vasculite na terapia com PTU; recentemente, foi descrito na AR (32%); ANCA IgM na tuberculose e na malária

ANCA = anticorpos para antígeno neutrofílico citoplasmático; DHA = doença hepática alcoólica; DHC = doenças hepáticas crônicas; DDTC = doença difusa do tecido conjuntivo; EBV = vírus Epstein-Barr; HIV = vírus da imunodeficiência humana; IFI = teste de imunofluorescência indireta; DMTC = doença mista do tecido conjuntivo; SHN = soro humano normal; CBP = cirrose biliar primária; PM = polimiosite; PTU = propiltiouracil; RNP = ribonucleoproteína; SjS = síndrome de Sjögren; SLE = lúpus eritematoso sistêmico.

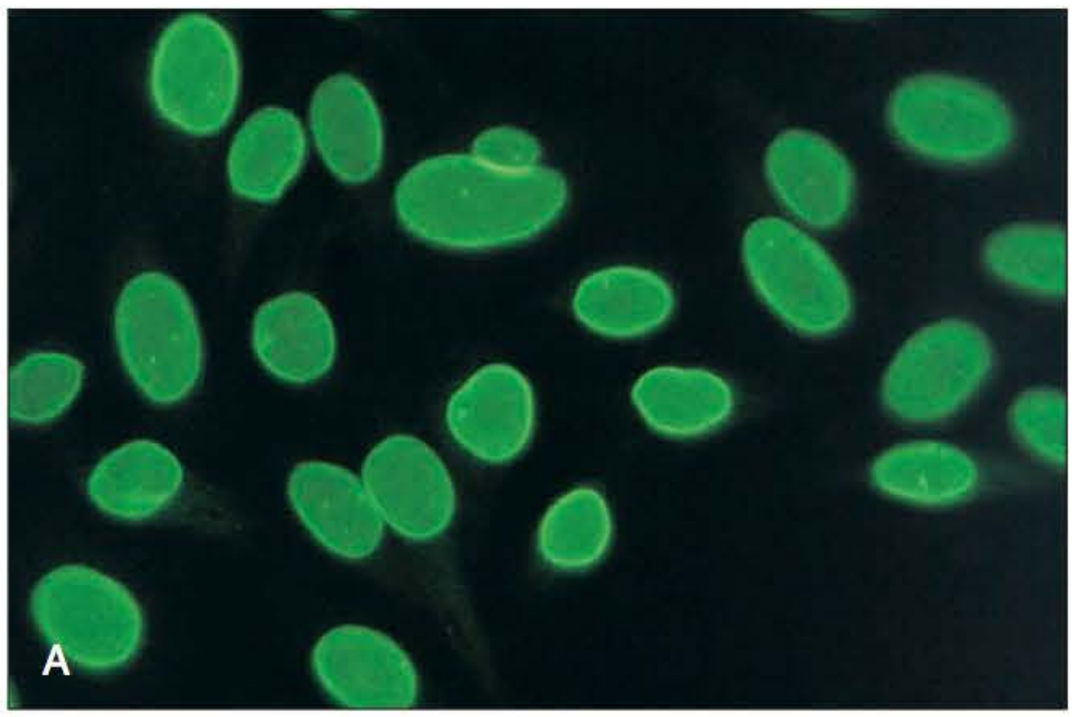
Fonte: modificado de Humbel (1993); utilizado com permissão de von Mühlen (1994); Stinton (2004).

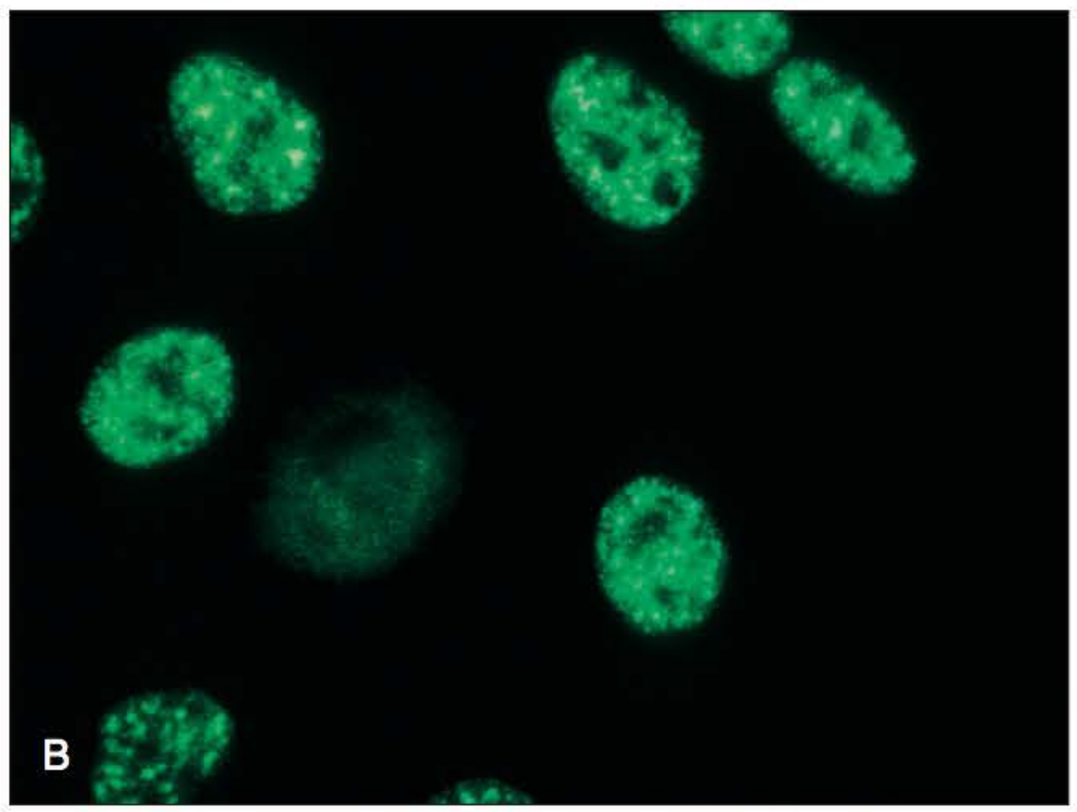
ANA Standardization Committee of the World Health Organization (Comitê de Padronização de ANA da Organização Mundial da Saúde), os laboratórios devem (1) relatar resultados de IF-ANA obtidos com diluições de 1:40 e 1:160; e (2) fornecer informações sobre o percentual de indivíduos normais com resultados positivos para essas diluições conforme suas próprias experiências (Tan, 1997b).

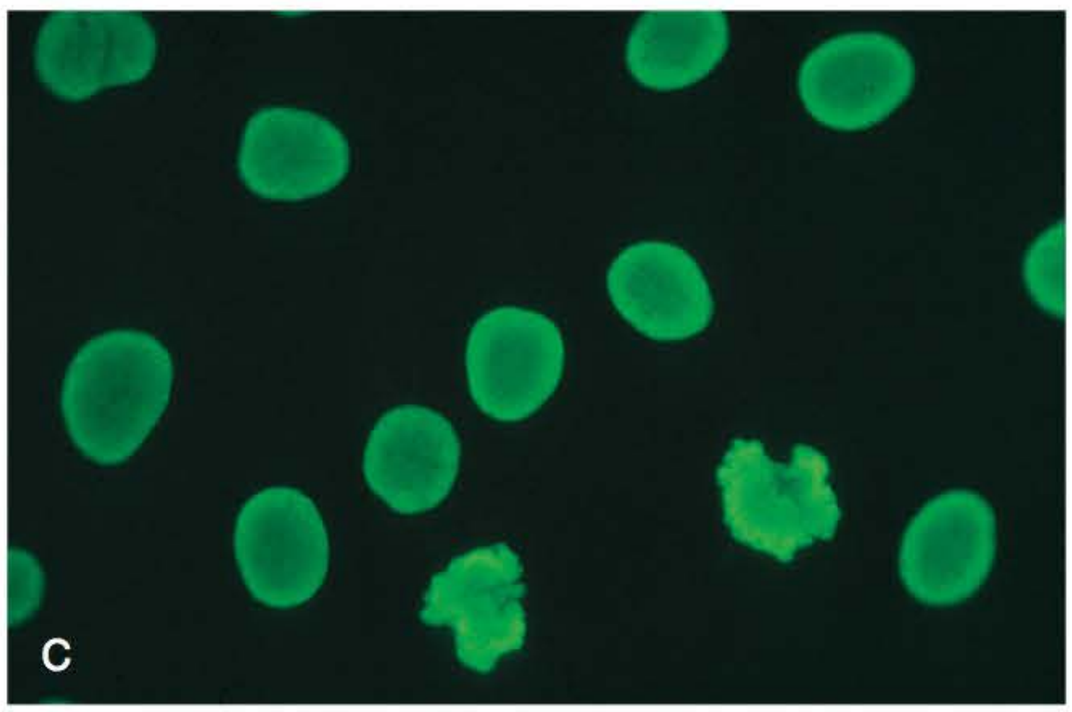
Bylund e Nakamura (1991) demonstraram a importância da determinação dos níveis de autoanticorpos anti-SS-A/Ro para os testes de triagem de autoanticorpos contra antígenos nucleares. A detecção de anticorpos anti-SS-A/Ro requer a implementação e a aderência a várias recomendações técnicas e de garantia de qualidade. Quando são empregados substratos celulares adequados contendo antígeno SS-A/Ro, uma parte considerável dos pacientes com LE ANA-negativos apresenta resultados positivos no teste de imunofluorescência indireta. Análises empregando os métodos de imunoprecipitina e imunodifusão dupla têm sido realizadas para determinar a especificidade de vários ANAs. A especificidade do ensaio na imunodifusão dupla em geral depende da qualidade dos demais soros controle utilizados no procedimento, bem como da natureza da preparação antigênica. Os testes de imunodifusão são pouco sensíveis, contudo resultados positivos apresentam alto grau de especificidade. *Kits* comerciais de imunodifusão são disponibilizados para detecção de anticorpos contra RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La e Scl-70, além de outros marcadores menos prevalentes (Nakamura, 1994b).

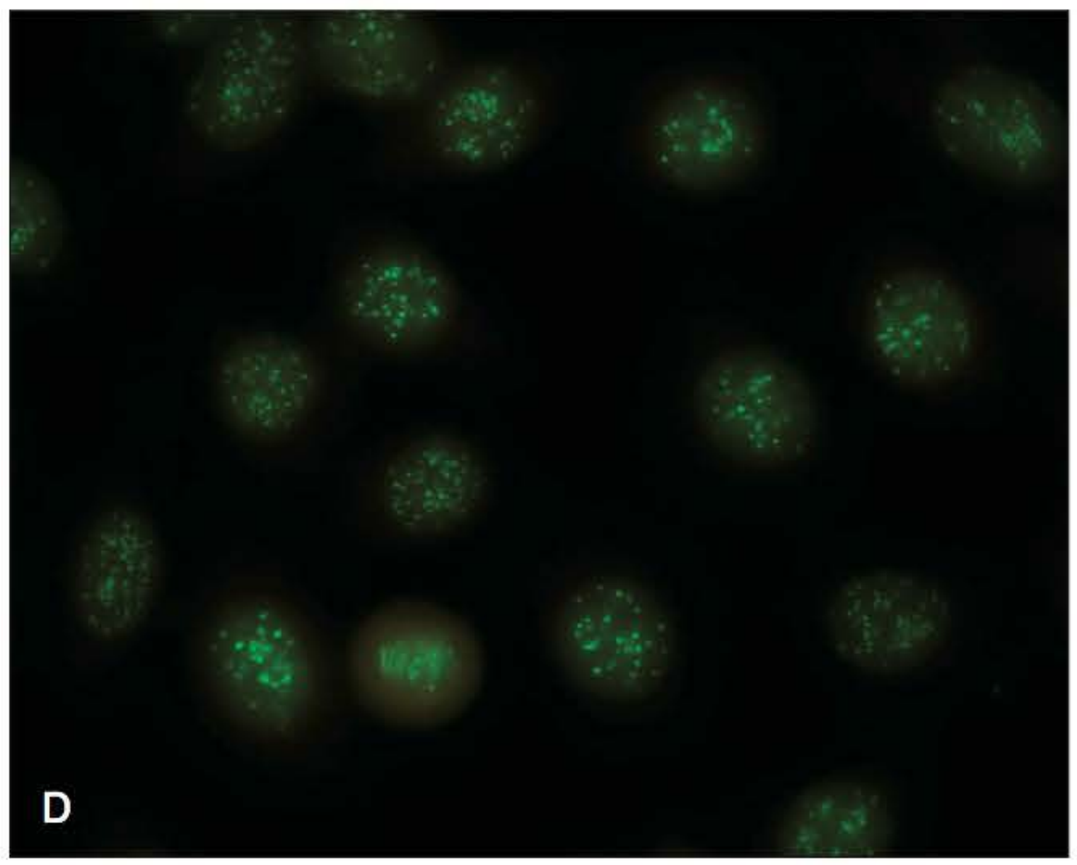
Um número crescente de ensaios imunoenzimáticos tem sido desenvolvido a partir do uso de antígenos-padrão purificados e de antígenos recombinantes (Saitta, 1992). Muitos desses ensaios são comprovadamente mais sensíveis que os métodos de imunodifusão comparáveis. Assim, dada à alta sensibilidade dos ensaios imunoenzimáticos, torna-se necessário determinar com cuidado o intervalo de referência para pacientes normais e os valores de *cut-off* apropriados. Em comparação aos testes de imunodifusão, os testes de ELISA são significativamente mais sensíveis, no entanto apresentam menor especificidade (Nakamura, 1992). Além disso, os testes de ELISA com frequência resultam positivos diante dos baixos títulos encontrados nos soros de pacientes com doenças reumáticas distintas do SLE. Exemplificando, a presença de anticorpos anti-Sm detectada por imunodifusão é considerada altamente específica para SLE. Todavia, nos testes de ELISA, resultados positivos para anticorpos anti-Sm foram obtidos em 23% dos 54 pacientes com AR, 25% dos 24 pacientes com esclerose sistêmica, 9% dos 11 pacientes com polimiosite e 2% dos 59 pacientes normais (Maddison, 1985). A maior sensibilidade aliada à menor especificidade pode gerar resultados de testes falso-positivos. Além disso, as associações clínicas com autoanticorpos distintos foram determinadas utilizando principalmente técnicas de imunodifusão.

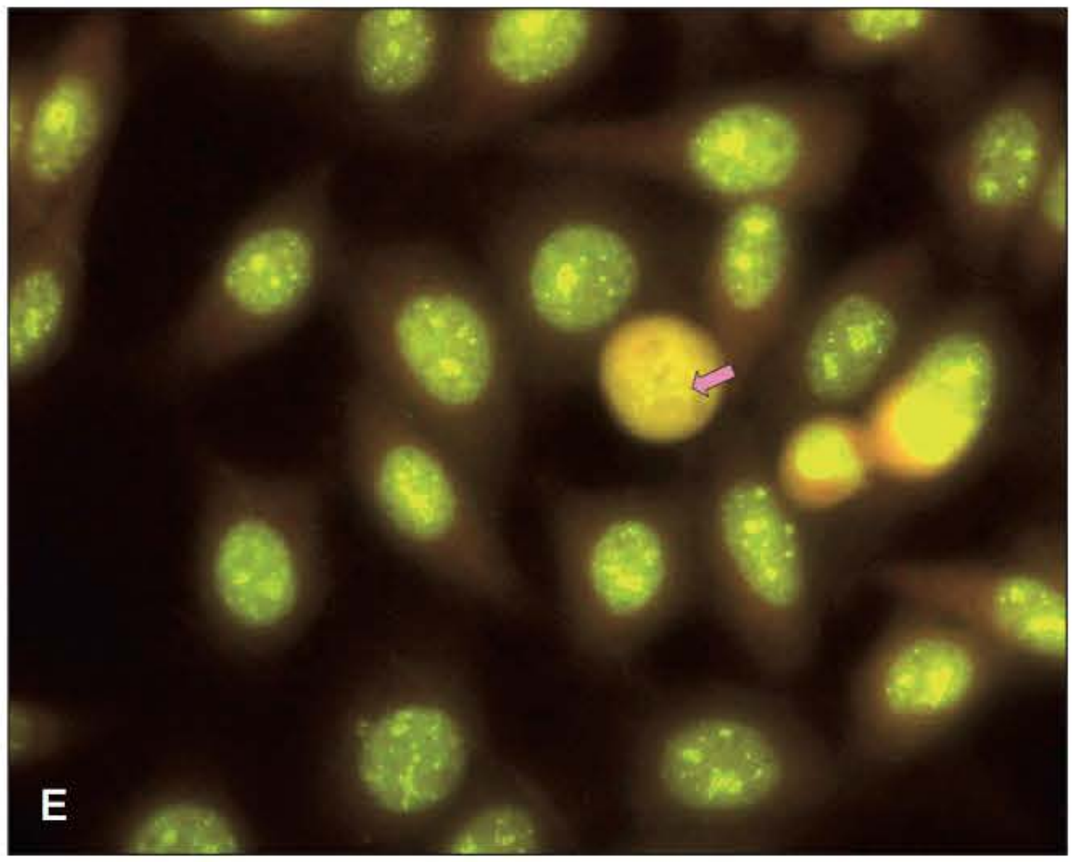
Os novos *kits* comerciais de ELISA desenvolvidos para fins de triagem têm a pretensão de detectar uma variedade de autoanticorpos em











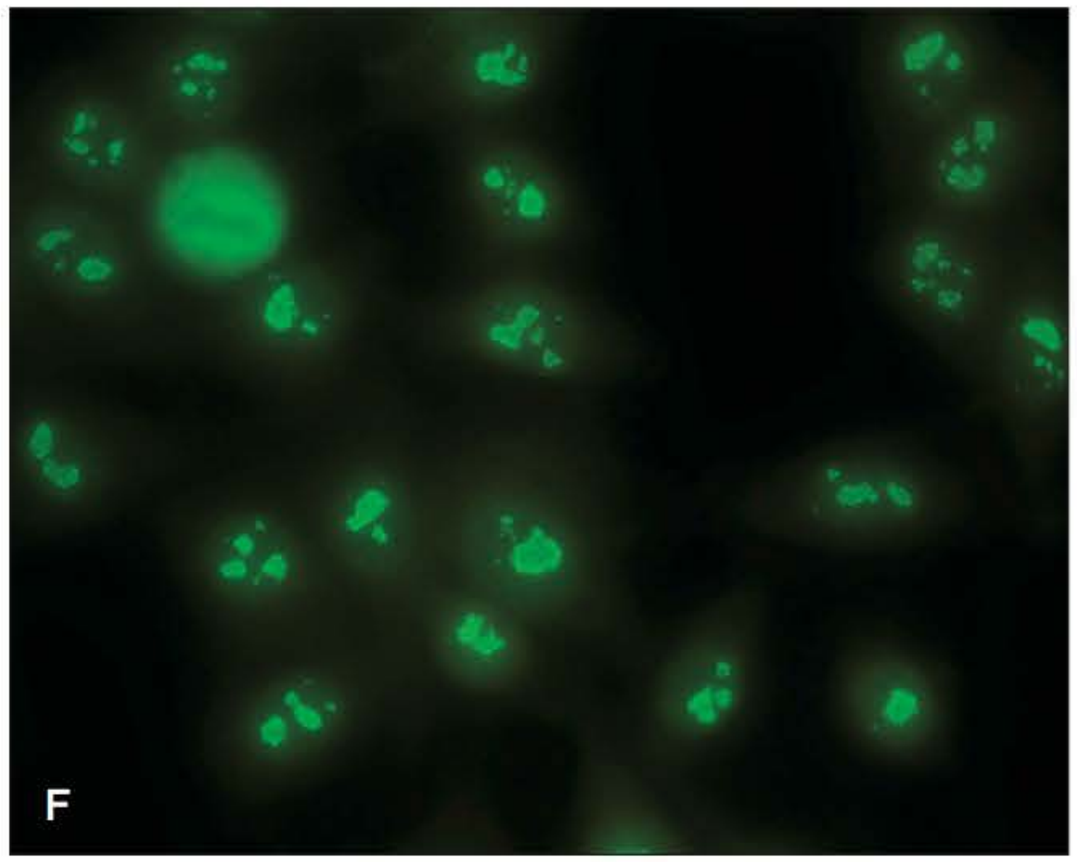


Figura 50.5 Imunofluorescência indireta com autoanticorpos contra antígenos nucleares e nucleolares em células HEp-2. Aumento de 400 x, coloração com isotiocianato de fluoresceína (FITC). *A*, Autoanticorpos contra proteínas laminas A, B e C do envelope nuclear conferem um padrão nuclear homogêneo em células HEp-2, associado a uma borda nucleoplásmica contínua. Nenhuma borda é observada quando os anticorpos são especificamente dirigidos contra histonas ou dsDNA. Relatos anteriores descrevendo um padrão periférico eliciado por anticorpos anti-dsDNA provavelmente devem ter sido produzidos por artefatos de fixação. *B*, O padrão nucleoplásmico salpicado é característico de autoanticorpos dirigidos contra os chamados "antígenos nucleares extraíveis", como o anticorpo anti-U1nRNP mostrado na foto. Os nucléolos e as células em metáfase são negativos. *C*, Autoanticorpos anti-dsDNA, com padrão homogêneo na interfase e também nas células metafásicas. *D*, Autoanticorpos anticentrômero, tipicamente encontrados em pacientes com a forma limitada do escleroderma (síndrome CREST), embora também estejam presentes na cirrose biliar primária. Salpicados distintos são observados nos núcleos interfásicos, sendo um para cada par cromossômico, que se agregam nas placas metafásicas durante a divisão celular. *E*, Autoanticorpos contra NOR-90 e RNA polimerase I induzem o mesmo padrão nas células HEp-2, com salpicados nucleolares e pontos ao longo de alguns fusos mitóticos nas células metafásicas (seta). Esses anticorpos podem ser diferenciados por meio de outros ensaios, como *immunoblot* ou imunoprecipitação. *F*, Autoanticorpos dirigidos contra a fibrilarina (U3-nRNP) produzem uma coloração maciça em todos os nucléolos.

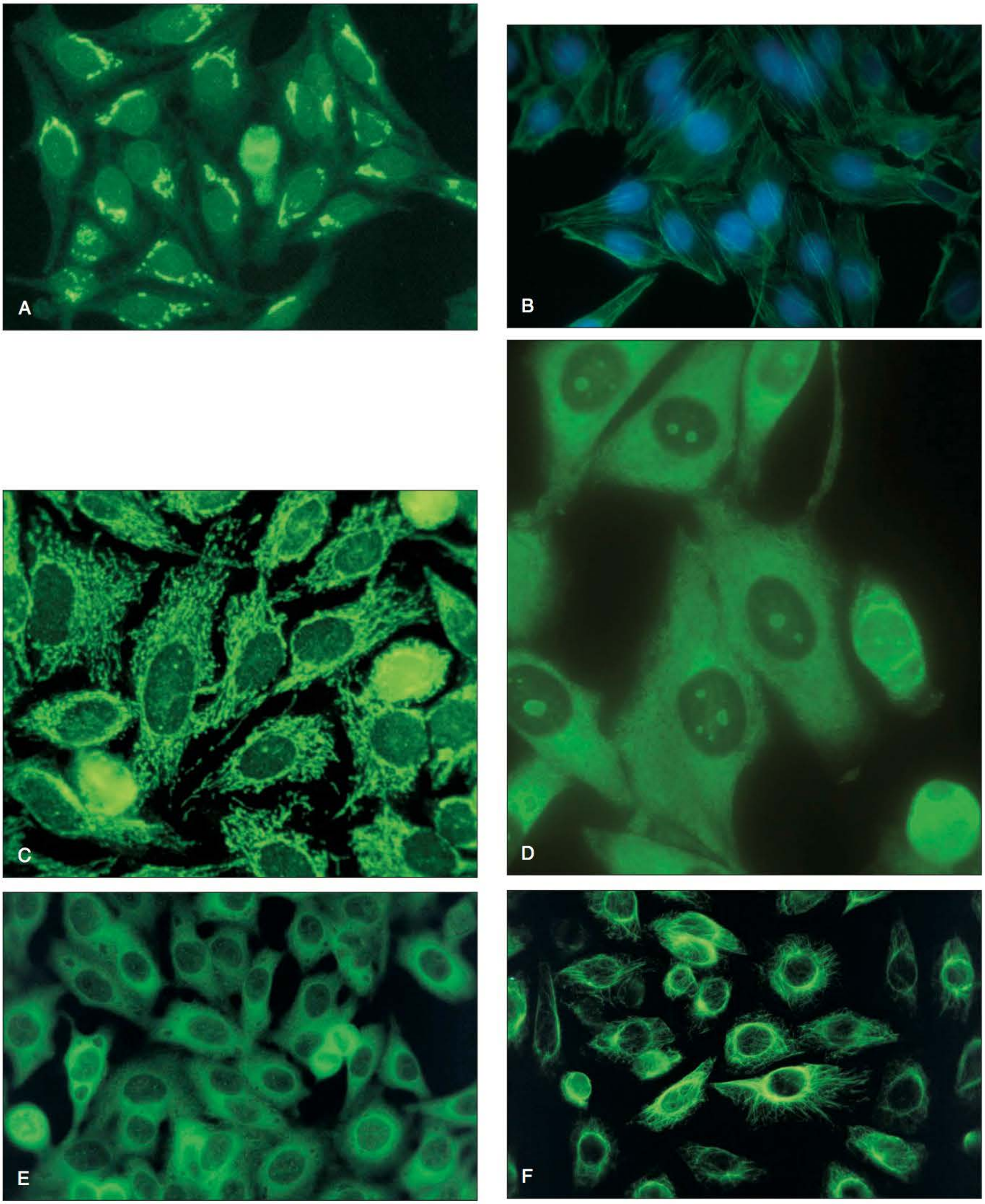
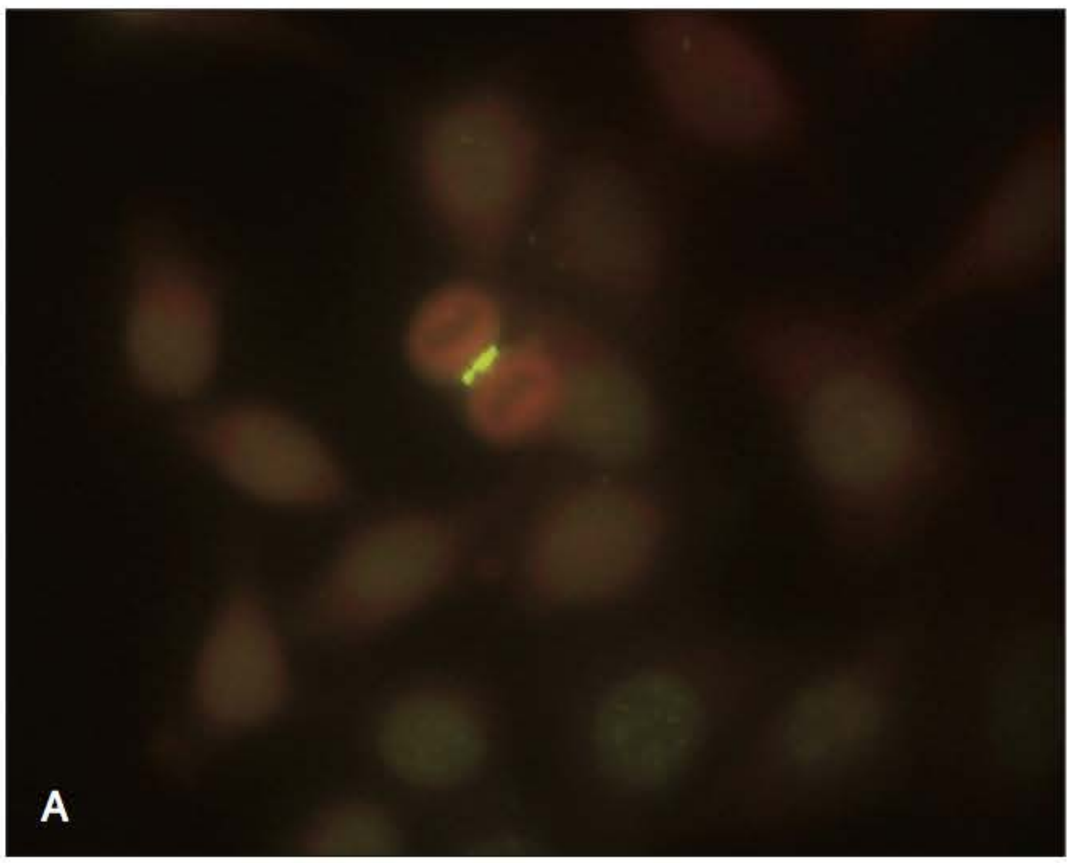
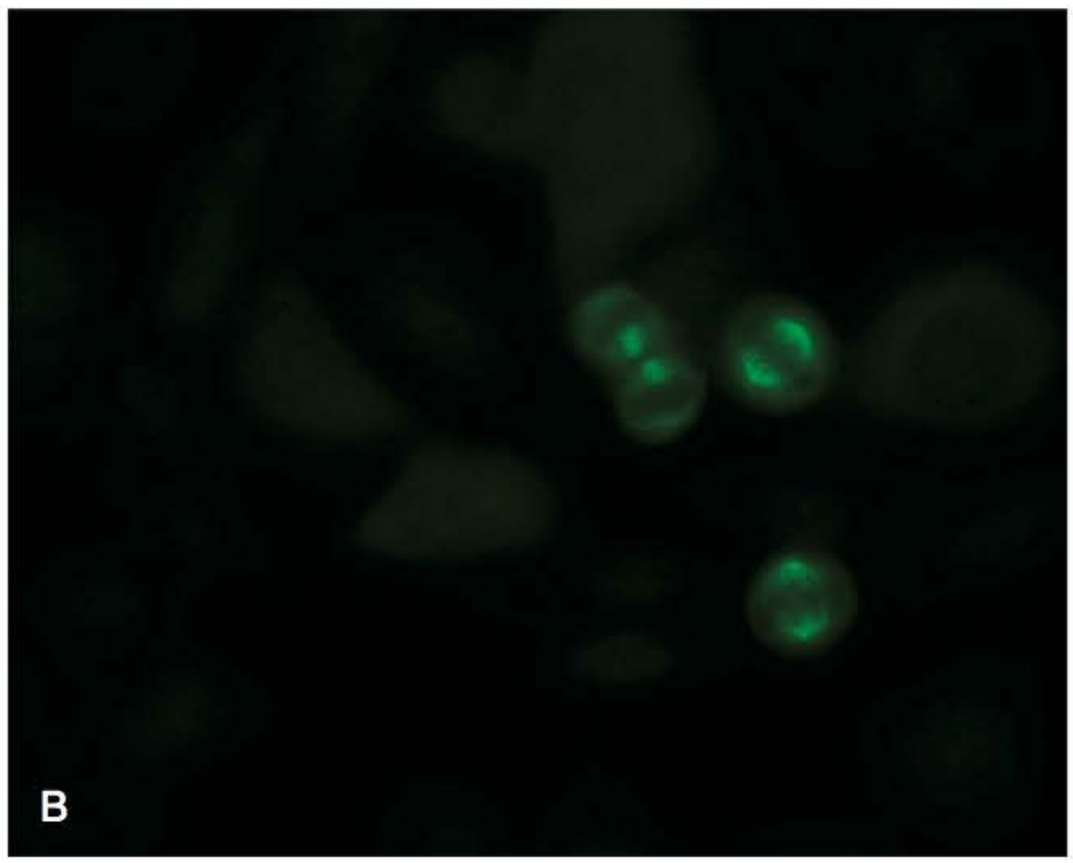
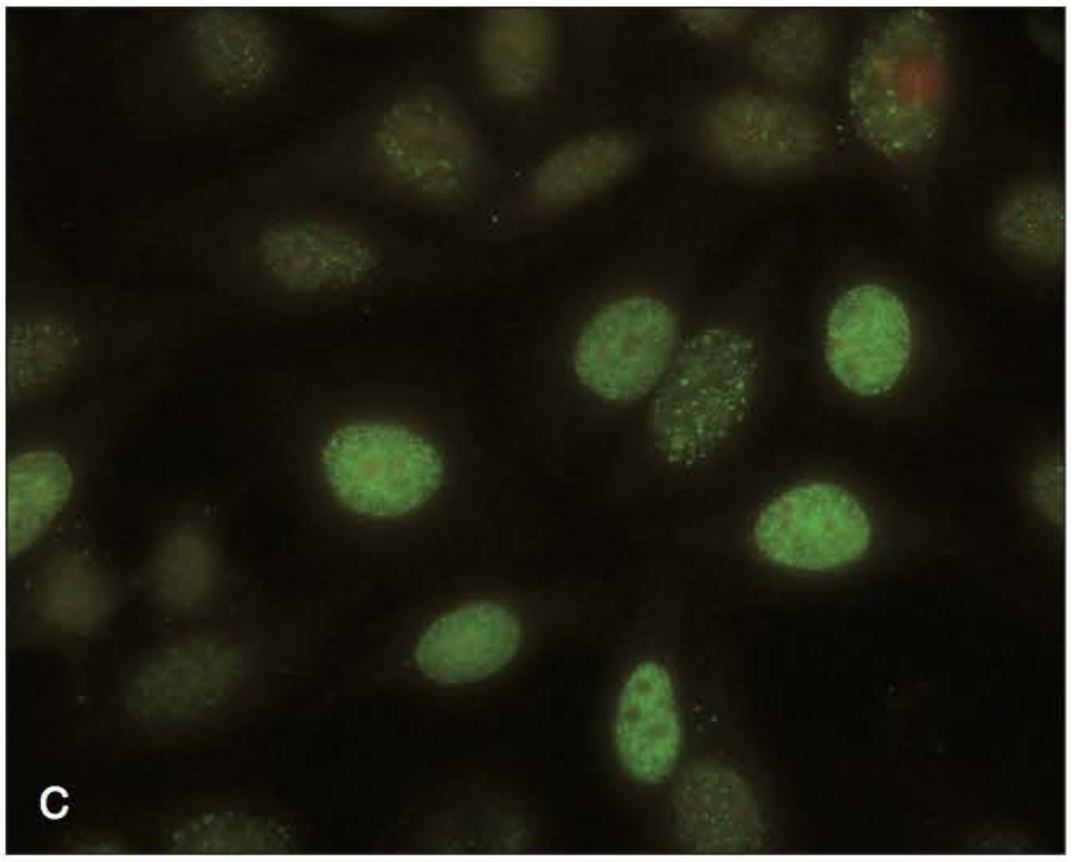
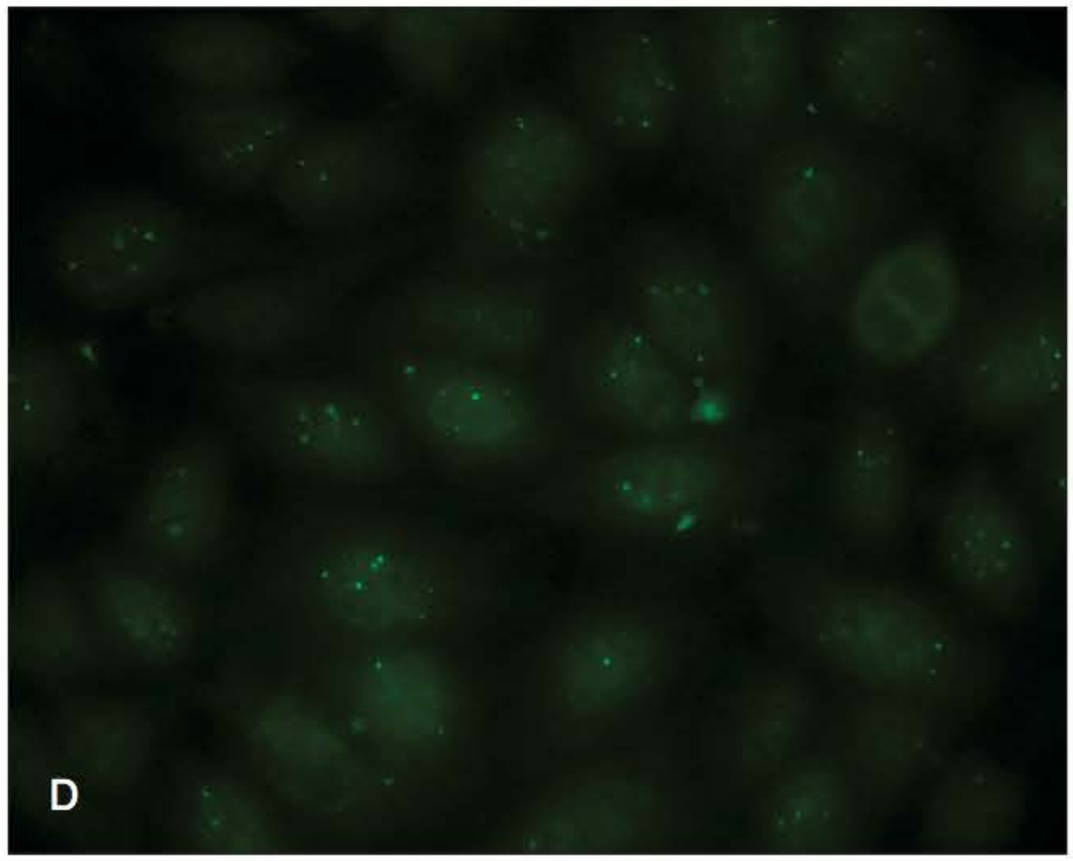


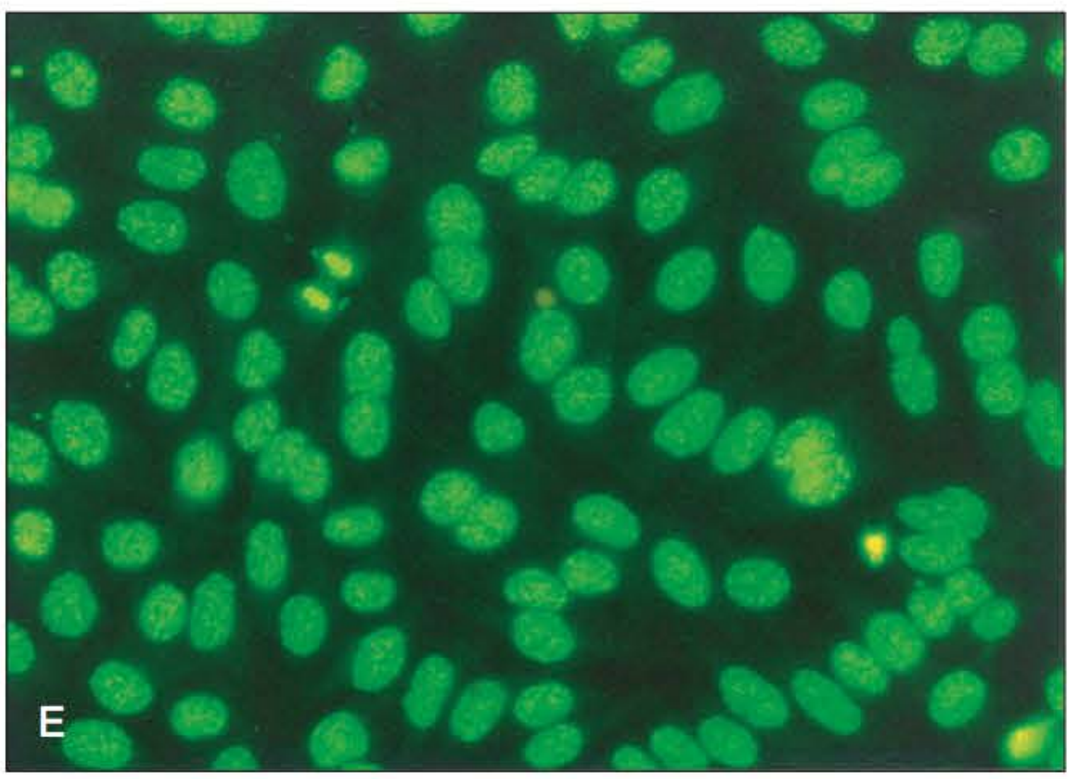
Figura 50.6 Imunofluorescência indireta de células HEp-2 com autoanticorpos para diferentes antígenos citoplasmáticos. Aumento de 400 x, coloração com FITC. *A*, Pode ser observado o padrão característico de autoanticorpos contra o complexo de Golgi, em que os grânulos estão agrupados em um dos polos da célula e poupam os núcleos. *B*, Autoanticorpos contra miosina não muscular decoram as fibras de estresse do citoesqueleto (os núcleos coram-se de azul com DAPI). Esses anticorpos são encontrados em pacientes com miastenia grave e doenças hepáticas crônicas. *C*, Autoanticorpos antimitocondriais estão associados a um padrão granular grosseiro que envolve totalmente o citoplasma, sendo observado principalmente na cirrose biliar hepática. *D*, Padrão granular denso, quase homogêneo, citoplásmico, obtido com anticorpos anti-rRNP. Esses anticorpos têm como alvo as fosfoproteínas ribossômicas, além de estarem associados a manifestações envolvendo o sistema nervoso central em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Como é possível notar na foto, tais anticorpos em geral também coram os nucléolos, conferindo um padrão homogêneo, ainda que fracamente. *E*, Decoração homogênea do citoplasma produzida por autoanticorpos contra PL-7 na polimiosite. *F*, Anticorpos antiqueratina são observados sob a forma de coloração filamentar das fibras de estresse citoesqueléticas e constituem a principal especificidade encontrada na doença hepática alcoólica (69%); também ocorrem comumente na artrite reumatoide (36 a 59%), psoríase e indivíduos sadios.











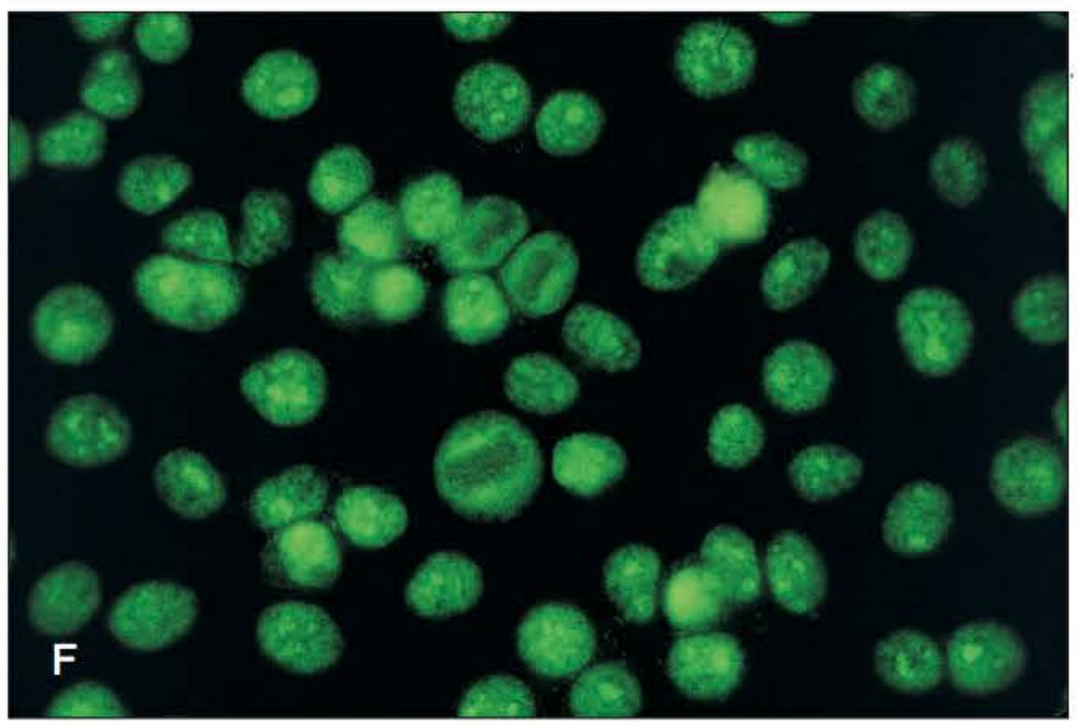


Figura 50.7 Alguns dos demais padrões distintos de imunofluorescência indireta em células HEp-2. Aumento de 400 x, coloração com FITC. *A*, As células em final de metáfase apresentam antígenos em condensação no corpo médio, também denominado região da ponte intercelular. *B*, Os polos do fuso mitótico nas células em divisão podem ser decorados com anticorpos dirigidos contra o aparelho do fuso mitótico, como o NuMA. *C*, Autoanticorpos anti-PCNA produzem um mosaico de padrões nucleoplásmicos, que variam de homogêneos a diferentes tipos de salpicados, de acordo com as fases da divisão celular (detalhes no texto). *D*, Padrão obtido com autoanticorpos anti-p80-coilina, em que é possível observar entre 1 e 8 pontos nucleoplásmicos. *E*, Um dos padrões mais comumente observados no laboratório de rotina: salpicado, fino e denso em núcleos em interfase e também em células mitóticas. Trata-se de um autoanticorpo inespecífico que é encontrado em doenças de tecido conjuntivo sistêmicas, embora também esteja presente em cistite intersticial, câncer de mama e reações alérgicas. *F*, Colorações nucleares e nucleolares são observadas em presença de autoanticorpos anti-Ku. Os cromossomos das células mitóticas são negativos (veja a associação clínica descrita no texto).

Tabela 50.10 Métodos para detecção de autoanticorpos contra antígenos nucleares e intracelulares

Método	Fonte de antígeno	Sensibilidade e uso
Microscopia de imunofluorescência	Corte de tecido; linhagens celulares	Ensaio sensível, com frequência utilizado para triagem
Imunodifusão dupla (Ouchterlony)	Extratos de tecido e de células	Requer reação de precipitação; alta especificidade, contudo é pouco sensível
Contraimunoeletroforese	Extratos de tecido e de células	Maior sensibilidade e rapidez, se comparada ao procedimento de imunodifusão
Immunoblotting, Western blot	Extratos de células	Bastante sensível; permite a detecção de anticorpos contra antígenos solúveis e insolúveis
Dot blot, linear blot (imunoensaios lineares)	Antígenos recombinantes ou nativos purificados	Ensaio qualitativo, cuja sensibilidade é mediana
ELISA	Antígenos recombinantes ou nativos purificados	Bastante sensível; quantitativo; alto rendimento; pode determinar a classe de anticorpo; baixo custo
Ensaio múltiplo com microesferas	Antígenos recombinantes ou nativos purificados	Bastante sensível (em comparação ao ELISA); semiquantitativo; rápido; tecnologia patenteada de alto custo

único ensaio aberto; contudo, o uso de frações "totais" de antígenos celulares em cada poço da placa de ELISA não é tecnicamente viável no momento. Tais ensaios não são 100% sensíveis para triagem de ANAs, pois não detectam autoanticorpos antinucleolares específicos, anticorpos anti-PCNA nem anticorpos contra tipos de NuMA distintos, por exemplo. Os resultados obtidos utilizando-se esses kits, até o momento, devem especificar corretamente para o médico quais tipos de autoanticorpo são testados, de modo a não implicar que uma dada amostra seja "negativa para todos os anticorpos nucleares". Cada kit de teste de ELISA, nesse caso, deve ser validado quanto às especificidades de anticorpos que de fato é capaz de detectar (von Mühlen, 2002).

Mais recentemente, ensaios múltiplos passaram a ser incorporados no trabalho de rotina de grandes laboratórios. O imunoensaio múltiplo com microesferas fluorescentes utiliza propriedades espectrais, de modo a permitir a determinação simultânea de vários autoanticorpos com apenas uma única incubação, dispensando as etapas de lavagem. Há pouco tempo, demonstramos que os resultados obtidos com um ensaio múltiplo patenteado foram favoravelmente comparáveis aos resultados fornecidos por ELISAs já estabelecidos (Martins, 2004) – os percentuais obtidos em termos de concordância, sensibilidade e especificidade, respectivamente, para cinco antígenos nucleares avaliados foram: 99,1, 100 e 98,8% para SS-A; 98,6, 88,9 e 99,5% para SS-B; 97,6, 95,8 e 97,9% para Sm; 97,2, 92,7 e 98,8% para RNP; 93,6, 50 e 99% para Scl-70. O imunoensaio múltiplo baseado em microesferas fluorescentes parece ser um método sensível e específico para detecção e semiquantificação de anticorpos comuns no soro humano. Grupos de autoanticorpos clinicamente importantes, como aqueles encontrados no SLE ou na vasculite sistêmica, podem ser testados com rapidez em um único lote.

Variações da metodologia utilizada para detecção de autoanticorpos contra antígenos nucleares e intracelulares

É provável que os melhores estudos sobre os diferentes métodos utilizados para detecção de autoanticorpos contra antígenos intracelulares tenham sido descritos por um European Consensus Study Group (Grupo de Estudos de Consenso Europeu). O European Consensus Study Group for the Detection of Autoantibodies to Intracellular Antigens in Rheumatic Diseases (Grupo de Estudos de Consenso Europeu para Detecção de Autoanticorpos Contra Antígenos Intracelulares em Doenças Reumáticas) foi formado em 1988 e, no período de 1989 a 1992, organizou quatro *workshops* anuais (van Venrooij, 1991; Charles, 1992). Nos anos de 1988 e 1989, foram realizados *workshops* de consenso com o intuito de definir uma concordância interlaboratorial na detecção das especificidades de autoanticorpos em doenças reumáticas. Um total de 28 laboratórios participaram do estudo utilizando diversas metodologias. Os objetivos do estudo de consenso iniciado em 1989 eram (1) definir um consenso interlaboratorial na detecção de autoanticorpos e especificidades; (2) testar se as discrepâncias observadas eram devidas à metodologia empregada; e (3) fazer recomendações para garantir a obtenção de resultados de maior qualidade, com maior sensibilidade e especificidade.

Ensaio imunossorvente ligado à enzima

Nos estudos realizados em 1988 e 1989, foram encontradas muitas reações falso-positivas. Tais reações foram produzidas pelo uso de reagentes bloqueadores precários na execução do procedimento. Além disso, foram utilizadas preparações de antígenos não purificadas. No estudo cooperativo realizado nos anos de 1990 e 1991, os laboratórios que utilizaram ELISA apresentaram desempenho muito bom, com poucos resultados falso-positivos ou estranhamente negativos. Os ensaios de ELISA também apresentaram bom desempenho em termos de seleção de soros com especificidades múltiplas.

O percentual de laboratórios clínicos que utiliza ELISA aumentou de 25 para 47% ao longo do período de 4 anos (1989 a 1992). Homburger et al. (1998) descreveram a comparação de um ELISA comercial com a IF-ANA em células HEp-2, e concluíram que ambos os métodos eram substancialmente equivalentes quanto à detecção de ANAs de importância clínica em pacientes com doenças reumáticas sistêmicas. Emlen e O'Neill (1997), ao contrário, testaram seis *kits* comerciais de ELISA e constataram a existência de diferenças significativas em termos de detecção de ANAs por imunofluorescência e ELISA. Um grupo de cientistas internacionais, reunidos pela Organização Mundial da Saúde, descreveu o desempenho de vários testes de ELISA comerciais, evidenciando que (1) nenhuma marca de fabricante foi nitidamente superior em relação às demais quanto ao grau de sensibilidade, especificidade e precisão de seus produtos; e (2) as áreas carentes de aprimoramento eram os *kits* para detecção de anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm (Tan, 1999). É preciso ter bastante cautela ao selecionar os reagentes e os *kits* comerciais de ELISA. Uma boa fonte de informações sobre o controle de qualidade adotado para os melhores reagentes comerciais é a revisão periódica do College of American Pathologists na área de imunologia.

Immunoblotting

Essa técnica é bastante sensível e constitui um método importante para caracterização da natureza específica de diversos autoanticorpos. Uma vantagem significativa é a possibilidade de identificar um anticorpo específico utilizando preparações de antígeno de extrato celular bruto (Fig. 50.8). O *European Consensus Study* observou os aspectos referentes ao teste de *immunoblotting* (Nakamura, 1994b):

1. a preparação do antígeno é muito importante para o procedimento de *immunoblotting*;
2. a detecção de anticorpos contra nRNP, Sm e Scl-70 foi aceitável. Esse método sensível é útil na detecção de múltiplas especificidades de anticorpos presentes em uma mesma amostra;
3. o método requer controles bem feitos para monitoramento das bandas de peso molecular. As bandas de histona, por exemplo, podem ser confundidas com um antígeno centromérico (CENP-A, 19 kDa), enquanto a Scl-70 (topoisomerase I) pode ser confundida com outras bandas de 100 kDa;
4. pode haver degradação proteica no extrato celular de antígeno utilizado no *immunoblotting*, especialmente no caso dos antígenos Scl-70 e centroméricos;

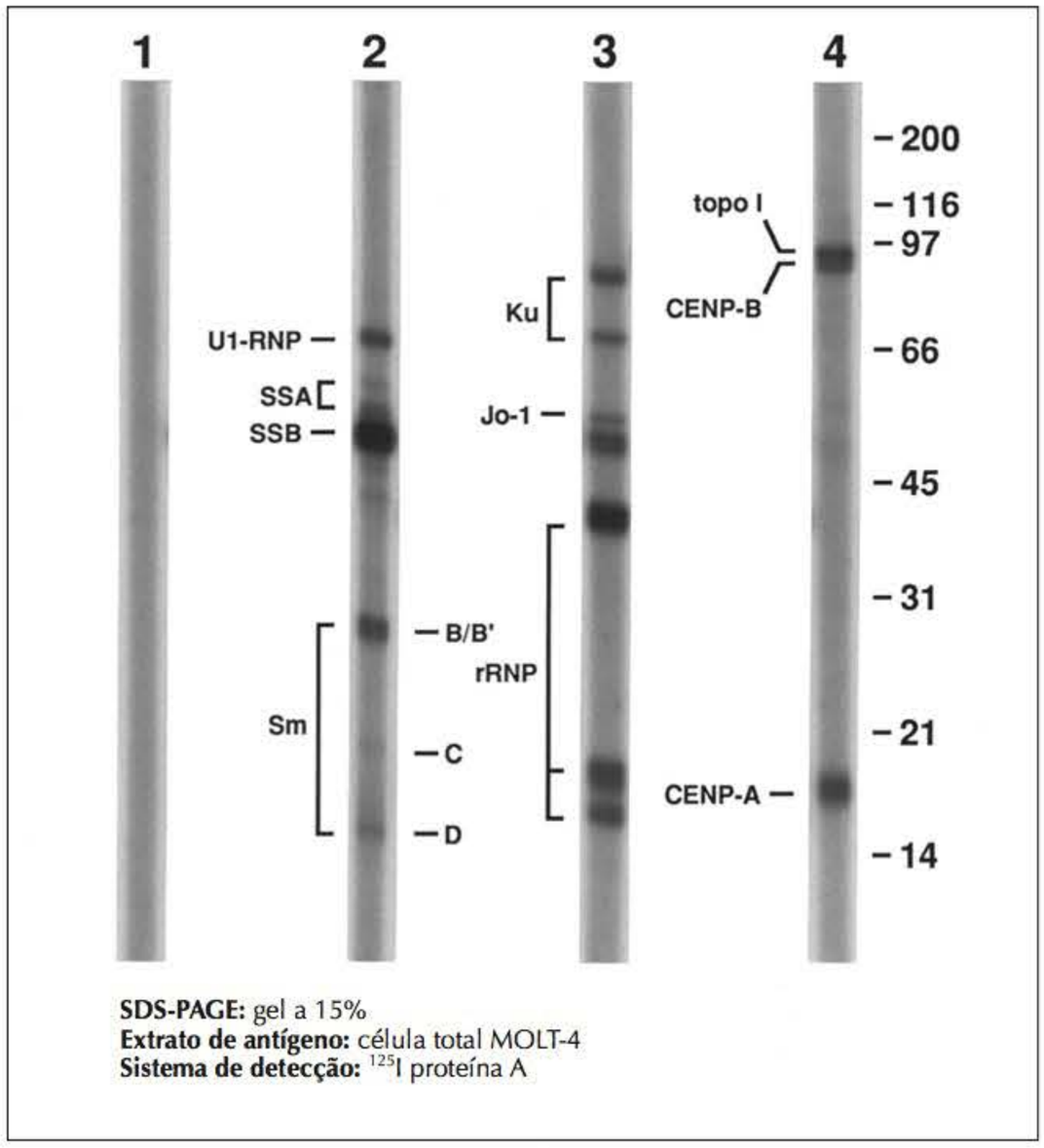


Figura 50.8 Análise de *immunoblotting* de autoanticorpos comumente encontrados em doenças reumáticas. Na *tira 1*, a membrana de nitrocelulose foi testada com soro humano normal (controle negativo) e nenhuma reatividade foi observada, conforme o esperado. As três tiras seguintes apresentam bandas distintas obtidas com a mistura de soros controle positivos de especificidades conhecidas. A *tira 2* exibe reatividades contra ribonucleoproteínas (RNPs) SS-A (52 e 60 kDa), SS-B (48 kDa), Sm (B/B', 28 kDa; e D, 14 kDa) e U1nRNP (proteína de 70 kDa), além de uma banda fraca em aproximadamente 19 kDa (antígeno C). A proteína A, com 32 kDa e igualmente reconhecida de forma característica pelos anticorpos contra U1nRNP, está ausente nesse experimento. A *tira 3* mostra as bandas obtidas utilizando protótipo humano de antissoro para Jo-1 (52 kDa), Ku (2 bandas em torno das regiões de 70 e 80 kDa) e RNP ribossômico (15, 18 e 37 kDa). Uma pequena banda acima do antígeno de 52 kDa não é identificada. A *tira 4* mostra as bandas mais comumente observadas quando se utiliza soro de pacientes com escleroderma (p. ex., anticorpos anti-DNA topoisomerase I [Scl-70, 95 kDa] e anticentrômero [16 kDa, CENP-A, e 80 kDa, CENP-B]). À direita, estão indicadas as posições em kDa da ampla faixa de padrões de pesos moleculares. (Com permissão de von Mühlen, CA; Tan, EM: Autoantibody specificities in autoimune rheumatic diseases. Rev Bras Reumatol 1994; 34: 173.)

5. o anticorpo anti-Sm é distinguido pela presença de anticorpo anti-D (o antígeno D é uma proteína de 16 kDa contida em todas as principais partículas de nRNP);
6. o anticorpo anti-SS-B/La é prontamente detectado por *immunoblotting*. O anticorpo anti-SS-A/Ro é precariamente detectado por essa técnica, além de ser insensível, uma vez que o antígeno SS-A/Ro pode não apresentar uma estrutura adequada para reconhecimento.

Referências bibliográficas

Aho K, Paluso T, Kurki P: Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenic implications. Semin Arthritis Rheum 1994; 23:379.

Alarcón-Segovia D, Perez-Vasquez ME, Villa AR, et al: Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1992; 21:275.

Allanore Y, Sellam J, Batteux F, Job Deslandre C, Weill B, Kahan A: Induction of autoantibodies in refractory rheumatoid arthritis treated by infliximab. Clin Exp Rheumatol 2004; 22:756.

Barada FA, Andrews BS, Davis JS, Taylor RP: Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation of Sm antibody titers with disease activity and other laboratory parameters. Arthritis Rheum 1981; 24:1236.

Bizzaro N, Wiik A: Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. Clin Exp Rheumatol 2004; 22:349.

Block SR, Winfield JB, Lockshin MC, et al: Studies of twins with systemic lupus erythematosus: A review of the literature and presentation of 12 additional sets. Am J Med 1975; 59: 533.

Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avalle S, Bugatti S, Montecucco C: Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. Arthritis Res Ther 2004;6:R264.

Bombardieri M, Alessandri C, Labbadia G, Iannuccelli C, Carlucci F, Riccieri V, Paoletti V, Valesini G: Role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in discriminating patients with rheumatoid arthritis from patients with chronic hepatitis C infection-associated polyarticular involvement. Arthritis Res Ther 2004; 6:R137.

Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD et al: Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. N Engl J Med 1987; 317:265.

Burlingame RW, Cervera R: Anti-chromatin (anti-nucleosome) autoantibodies. Autoimmun Rev 2002;1:321.

Burlingame RW: Recent advances in understanding the clinical utility and underlying cause of antinucleosome (antichromatin) autoantibodies. Clin Appl Immunol Rev 2004; 4:351.

Os anticorpos anticromatina são a marca registrada da doença lúpica e esta revisão traz todos os dados importantes que justificam essa afirmação.

Buskila D, Shoenfeld Y: Anti-DNA antibodies. *In* Lahita RG (Ed): Systemic Lupus Erythematosus, 2nd ed. New York, Churchill Livingstone, 1992, p 205.

Bylund DJ, Nakamura RM: Importance of detection of SS-A/Ro autoantibody in screening immunofluorescence tests for autoantibodies to nuclear antigens. J Clin Lab Anal 1991; 5:212.

Casiano CA, Tan EM: Recent developments in the understanding of antinuclear antibodies. Int Arch Allergy Immunol 1996; 111:308.

Cepeda EJ, Reveille JD: Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. Curr Opin Rheumatol 2004;16:723.

Cervera R, Vinas O, Ramos-Casals M, et al: Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. Ann Rheum Dis 2003; 62:431.

Chan EK, Tan EM: Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 1989; 1: 376.

Charles PJ, van Venrooij WJ, Maini RN: The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases, 1989–1992. Clin Exp Rheumatol 1992; 10:507.

Cohen AS, Reynolds WE, Franklin EC, et al: Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Bull Rheum Dis 1971; 21:643.

Dagher JH, Scheer U, Voit R, et al: Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. J Rheumatol 2002;29:1543.

Decker JL: Glossary Subcommittee of ARA Committee on Rheumatologic Practice. Arthritis Rheum 1986; 26:1029.

Emlen W, O'Neill L: Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. Arthritis Rheum 1997; 40:1612.

Eriksson C, Engstrand S, Sundqvist KG, Rantapää-Dahlqvist S: Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF. Ann Rheum Dis 2005; 64:403.

Fatenejad S, Bennett M, Moslehi J, Craft J: Influence of antigen organization on the development of lupus autoantibodies. Arthritis Rheum 1998; 41:603.

Feltkamp TEW: Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. Ann Rheum Dis 1996; 55:723.

Firestein GS: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 2003; 423:356.

Forslind K, Ahlmén M, Eberhardt K, Hafström I, Svensson B: Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). Ann Rheum Dis 2004; 63:1090.

Francoeur AM, Peebles CL, Gomper PT, Tan EM: Identification of Ki (Ku, p70/p80) autoantigens and analysis of anti-Ki autoantibody reactivity. J Immunol 1986; 136:1648.

Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E: The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. Am J Med 1980; 69:520.

Fritzler MJ, von Muhlen CA, Toffoli SM, et al: Autoantibodies to the nucleolar organizer antigen NOR-90 in children with systemic rheumatic diseases. J Rheumatol 1995; 22:521.

Gladman DD, Urowitz MB, Esdaile JM, et al: Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults. Arthritis Rheum 1999; 42:1785.

Harris EN: The second International Anticardiolipin Standardization Workshop: the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS) groups. Am J Clin Pathol 1990; 94: 476.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes ERV: Evaluation of the anticardiolipin test: report of an international workshop held 4 April 1986. Clin Exp Immunol 1987; 68:215.

Harris ML, Rosen A: Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. Curr Opin Rheumatol 2003; 15:778.

Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, et al: Demonstration of a new antinuclear antibody (anti RA-33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1989; 32:1515.

Ho KT, Reveille JD: The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. Arthritis Res Ther 2003; 5:80.

Hochberg MC: Systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 1990; 16:617.

Hochberg MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (letter). Arthritis Rheum 1997; 40:1725.

Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, et al: Systemic lupus erythematosus: a review of clinical laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. Medicine 1985; 64:285.

Hof D, Cheung K, de Rooij DJRAM, et al: Autoantibodies specific for apoptotic U1–70K are superior serological markers for mixed connective tissue disease. Arthritis Res Ther 2005; 7:R302.

Hoffman IE, Peene I, Meheus L, et al: Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2004; 63:1155.

Hoffman IE, Peene I, Pottel H, et al: Diagnostic performance and predictive value of rheumatoid factor, anti-citrullinated peptide antibodies, and the HLA shared epitope for diagnosis of rheumatoid arthritis. Clin Chem 2005; 51:261.

Homburger HA, Cahen YD, Griffiths J, Jacob GL: Detection of antinuclear antibodies: comparative evaluation of enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. Arch Pathol Lab Med 1998; 122:993.

Humbel RL: Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. *In* Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): Manual of Biological Markers of Disease. Dordrecht, Kluwer Academic, 1993, pp 1–16.

Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, et al: Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. Am J Med 2005;118:2.

Isshi K & Hirohata S: Differential roles of the anti-ribosomal P antibody and antineuronal antibody in the pathogenesis of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41:1819.

Janssens X, Veys EM, Verbruggen G, Declecq L: The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1988; 15:1346.

Jarzabek-Chorzelska M, Balszczyk M, Jablonska S, et al: Scl-70 antibody, a specific marker of systemic sclerosis. Br J Dermatol 1986; 115:393.

Kaneda K, Takasaki Y, Takeuchi K, et al: Autoimmune response to proteins of proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes in patients with connective tissue diseases. J Rheumatol 2004;31:2142.

Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T: Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). Ann Rheum Dis 2004; 63:1085.

Kavanaugh AF, Solomon DH: Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. Arthritis Rheum 2002; 47:546.

Klareskog L, Alfredsson L, Rantapaa-Dahlqvist S, et al: What precedes development of rheumatoid arthritis? Ann Rheum Dis 2004; 63(Suppl 2): ii28.

Krapf AR, von Mühlen CA, Krapf FE, et al: Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies. Munich, Urban & Schwarzenberg, 1996.

Lazaro MA, Maldonado-Cocco JA, Catoggio LJ, et al: Clinical and serological characteristics of patients with overlap syndrome: Is mixed connective tissue disease a distinct clinical entity? Medicine 1989; 68:58.

Lee DM, Schur PH: Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. Ann Rheum Dis 2003; 62:870.

Lerner MR, Steitz JA: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:5495.

Lom-Orta H, Alarcón-Segovia D, Diaz-Jouanen E: Systemic lupus erythematosus. Differences between patients who do and who do not fulfill classification criteria at the time of diagnosis. J Rheumatol 1980; 7:831.

Lopez LR, Santos ME, Espinoza LR, La Rosa FG: Clinical significance of immunoglobulin A versus immunoglobulins E and M anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with thrombosis, thrombocytopenia, and recurrent abortion. Is J Clin Pathol 1992; 98:447.

Low J, Chauhan A, Kietz D, et al: Determination of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol 2004; 31:1829.

McNeil HP, Chesterman CH, Krilis SA: Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. Adv Immunol 1991; 49:193.

Maddison PF, Skinner RP, Vlachoviannopoulos P, et al: Antibodies to nRNP, Sm, Ro (SSA) and La (SSB) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. Clin Exp Immunol 1985; 62:337.

Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, et al: International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. Clin Vaccine Immunol 2006; 13:77–83.

Martins TB, Burlingame R, von Muhlen CA, et al: Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11:1054.

Matsuura E, Lopez LR: Are oxidized LDL/beta2-glycoprotein I complexes pathogenic antigens in autoimmune-mediated atherosclerosis? Clin Dev Immunol 2004;11:103.

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978; 121:2228.

Mosca M, Baldini C, Bombardieri S: Undifferentiated connective tissue diseases in 2004. Clin Exp Rheumatol 2004; 22:S14.

Nakamura RM: Role of autoantibody tests in the diagnostic evaluation of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE). Clin Lab Med 1997; 17:379.

Nakamura RM, Bylund DJ: Contemporary concepts for clinical and laboratory evaluation of systemic lupus erythematosus and 'lupus-like' syndromes. J Clin Anal 1994a; 8:347.

Nakamura RM, Bylund DJ, Tan EM: Current status of available standards for quality improvement of assays for the detection of autoantibodies to nuclear and intracellular antigens. J Clin Lab Anal 1994b; 8:360.

Nakamura RM, Peebles CL, Rubin RL, et al: Autoantibodies to nuclear antigens. *In* Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases, 2nd ed. Chicago, IL, American Society of Clinical Pathology, 1985, p 1.

Nakamura RM, Tan EM: Recent advances in laboratory tests and the significance of autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. Clin Lab Med 1986; 6:41.

Nakamura RM, Tan EM: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. Clin Lab Med 1992; 12:1.

Nienhuis RLF, Mandema E: A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the perinuclear factor. Ann Rheum Dis 1964; 23:302.

Nimelstein SH, Brody S, McShane D, and Holman HR: Mixed connective tissue disease: a subsequent evaluation of the original 25 patients. Medicine 1980; 59:239.

Obermoser G, Bitterlich W, Kunz F, Sepp NT: Clinical significance of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Int Arch Allergy Immunol 2004;135:148.

Okamura M, Kanayama Y, Amastu K, et al: Significance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double-stranded and single-stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. Ann Rheum Dis 1993; 52:14.

Panush RS, Greer JM, Morshedian KK: What is lupus? What is not lupus? Rheum Dis Clin North Am 1993; 19:223.

Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F: Diagnostic associations in a large and consecutively identified population positive for anti-SSA and/or anti-SSB: the range of associated diseases differs according to the detailed serotype. Ann Rheum Dis 2002; 61:1090.

Pincus T: Studies regarding a possible function for viruses in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25:847.

Pope JE: Scleroderma overlap syndromes. Curr Opin Rheumatol 2002;14:704.

Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J: Primary Sjögren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. Ann Rheum Dis 2005; 64:347.

Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, et al: Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. Arq Bras Cardiol 2004; 83:141.

Rekvig OP, Nossent JC: Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: a time for new paradigms? Arthritis Rheum 2003; 48:300.

Reeves WH: Antibodies of the p70/p80 (Ku) antigens in systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:391.

Reimer G: Autoantibodies against nuclear, nucleolar, and mitochondrial antigens in systemic sclerosis (scleroderma). Rheum Dis Clin North Am 1990; 16:169.

Rothfield NF: Autoantibodies in scleroderma. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:483.

Rubin RL: Autoimmune reactions induced by procainamide and hydralazine. *In* Kammuller M, Bloksma M, Siemen W (eds): Autoimmunity and Toxicology: Immune Dysregulation Induced by Drugs and Chemicals. Amsterdam, Elsevier, 1988, p 119.

Rubin RL, McNally EM, Nusinow SR, et al: IgG antibodies to the histone complex H2A–H2B characterize procainamide-induced lupus. Clin Immunol Immunopathol 1985; 36:49.

Rubin RL, Waga S: Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1987; 14(Suppl 13):118.

Ruffatti A, Ostuni P, Grypiotis P, et al: Sensitivity and specificity for primary Sjögren's syndrome of IgA and IgG anti-alpha-fodrin antibodies detected by ELISA. J Rheumatol 2004; 31:504.

Saitta MR, Keene JD: Molecular biology of nuclear autoantigens. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:283.

Sakamoto M, Takasaki Y, Yamanaka K, et al: Purification and characterization of Ki antigen and detection of anti-Ki antibody by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1989; 32:1554.

Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, et al: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 1998; 101:273.

Schumacher HR, Klippel JH, Koopman WJ: Primer on the Rheumatic Diseases, 10th ed. Atlanta, GA, Arthritis Foundation, 1993.

Schur PH: Clinical features of SLE. *In* Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds): Textbook of Rheumatology, vol 2, 4th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993, p 1017.

Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, et al: Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2004; 71:493.

Relato bastante informativo, com destaques históricos sobre esse importante grupo de autoanticorpos especificamente encontrados na artrite reumatoide.

Sharp GC, Irwin WS, Tan EM, et al: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable antigen (ENA). Am J Med 1972; 52:148.

Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y: Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. Semin Arthritis Rheum 2004; 34:501.

Relato mais completo da prevalência e especificidade dos autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico, abrangendo anticorpos dirigidos contra antígenos nucleares, citoplasmáticos, fosfolipídicos, de membrana celular, entre outros.

Simon M, Girbal E, Sebbag M, et al: The cytokeratin

filament-aggregating protein fillagrin is the target of the so-called 'antikeratin antibodies,' autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. J Clin Invest 1993; 92:1387.

Slater CA, Davis RB, Shmerling RH: Antinuclear antibody testing: a study of clinical utility. Arch Intern Med 1996; 156:1421.

Smolen JS, Steiner G: Are autoantibodies active players or epiphenomena? Curr Opin Rheumatol 1998; 10:201.

Smolen JS, Steiner G, Tan EM: Standards of care: the value and importance of standardization. Arthritis Rheum 1997; 40:410.

Sontheimer RD, Gilliam JN: Systemic lupus erythematosus and the skin. *In* Lahita RG (ed.): Systemic Lupus Erythematosus, 2nd Ed. New York, Churchill Livingstone, 1992, p 657.

Staub HL, Norman GL, Crowther T, et al: Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. Arq Neuropsiquiatr 2003; 61:757.

Steiner G, Skriner K, Hassfeld W, Smolen JS: Clinical and immunological aspects of autoantibodies to RA33/hnRNP-A/B proteins – a link between RA, SLE and MCTD. Mol Biol Rep 1996; 23:167.

Stinton LM, Eystathioy T, Selak S, et al: Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. Clin Immunology 2004; 110:30.

Swale VJ, Perrett CM, Denton CP, et al: Etanercept-induced systemic lupus erythematosus. Clin Exp Dermatol 2003; 28:604.

Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. Adv Immunol 1982; 33:167.

Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF, Rubin RL: Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin Immunol Immunopathol 1988; 47:121.

Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989; 44:93.

Trata-se de um artigo de revisão clássico no campo dos autoanticorpos, suas associações clínicas e a natureza molecular dos autoantígenos, escrito por um cientista que descobriu muitos dos autoanticorpos marcadores mais importantes para a reumatologia.

Tan EM: Autoantibodies and autoimmunity: a three--decade perspective. A tribute to Henry G Kunkel. Ann NY Acad Sci 1997a; 815:1.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1993; 25:1271.

Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al: Range of antinuclear antibodies in 'healthy' individuals. Arthritis Rheum 1997b; 40:1601.

Tan EM, Smolen JS, McDougal JS et al: A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear antibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. Arthritis Rheum 1999; 42:455.

Este artigo é o primeiro da tentar esclarecer a difícil tarefa de padronizar as práticas laboratoriais. Numerosas recomendações úteis para pesquisadores, técnicos e clínicos ajudam a compreender os resultados de ELISA.

Targoff IN: Autoantibodies in polymyositis. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:455.

Targoff IN: Laboratory testing in the diagnosis and management of idiopathic inflammatory myopathies. Rheum Dis Clin North Am 2002; 28:859.

Teodorescu M, Froelich CJ: Laboratory evaluation of systemic lupus erythematosus. *In* Lahita RG (ed.): Systemic Lupus Erythematosus, 2nd ed. New York, Churchill Livingstone, 1992, p 345.

Ter Borg EJ, Groen H, Horst G, et al: Clinical association of antiribonucleoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Sem Arthritis Rheum 1990; 20:164.

Tojo T, Kaburaki J, Hayakawa M, et al: Precipitating antibody to a soluble nuclear antigen 'Ki' with specificity for systemic lupus erythematosus. Ryumachi 1981; 21(Suppl): 129.

Van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN: The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. J Immunol Methods 1991; 140:507.

Van Venrooij WJ, Vossenaar ER, Zendman AJ: Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev 2004; 3 Suppl 1:S17.

Viander M: Clinically useful antibody assays – systemic rheumatic diseases. *In* Lefkovits I (ed.): Immunology Methods Manual. San Diego, CA, Academic Press, 1997, pp 1610–1624.

Von Mühlen CA, Tan EM: Autoantibody specificities in autoimmune rheumatic diseases. Rev Bras Rheumatol 1994; 34:173.

Von Mühlen CA, Tan EM: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Sem Arthritis Rheum 1995; 24:323.

Descrição bastante abrangente dos principais autoanticorpos encontrados nas doenças reumáticas sistêmicas, com associações clínicas e dados moleculares para autoantígenos.

Von Mühlen CA, Nakamura RM: Guidelines for selecting and using laboratory tests for autoantibodies to nuclear, nucleolar and other related cytoplasmic antigens. *In* Nakamura RM, Keren DF, Bylund DJ (eds): Clinical and Laboratory Evaluation of Human Autoimmune Diseases. Chicago, IL, ASCP Press, 2002, pp 183–198.

Vossenaar ER, van Venrooij WJ: Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis. Clin Applied Immunol Rev 2004: 4:239.

Discussão histórica e clínica sobre os autoanticorpos anti-CCP, apresentando algumas evidências de um possível papel etiológico dos autoanticorpos na artrite reumatoide.

Wallace DJ, Pistiner M, Nessim S, et al: Cutaneous lupus erythematosus without systemic lupus erythematosus: Clinical and laboratory features. Semin Arthritis Rheum 1992; 21:221.

Wang HB, Zhang Y: Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. Nucleic Acids Res 2001; 29:2517.

Woosley RL, Drager DE, Reidenber MM, et al: Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. N Engl J Med 1987; 298:1157.

Yalaoui S, Gorgi Y, Hajri R, et al: Autoantibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. Joint Bone Spine 2002; 69:173.

Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, et al: Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. Br Med J 1979; ii: 97.

Zandbelt MM, Vogelzangs J, Van De Putte LB, et al: Anti-alpha-fodrin antibodies do not add much to the diagnosis of Sjögren's syndrome. Arthritis Res Ther 2004; 6:R33-R38.

Zarmbinski MN, Messner RP, Mandel JS: Anti-dsDNA antibodies in laboratory workers handling blood from patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1992; 19:1380.

CAPÍTULO 51

Vasculite

Rex M. McCallum MD, David J. Bylund MD

Classificação 1064
Patogênese da vasculite 1064
Perspectiva do uso de testes laboratoriais clínicos 1065
Testes de rotina 1066
Testes especiais 1066
Alguns padrões de teste na vasculite 1066
Anticorpo antineutrofílico citoplasmático 1067
Métodos de detecção 1067
Especificidade antigênica 1067
Associações com doenças 1068
Interpretação do teste 1068
Sinopse das principais síndromes vasculíticas idiopáticas 1069
Poliarterite nodosa 1069
Síndrome de Churg-Strauss 1070
Poliangiite microscópica 1070
Granulomatose de Wegener 1071
Granulomatose linfomatoide 1072
Púrpura de Henoch-Schönlein 1072
Arterite (temporal) de célula gigante 1074
Arterite de Takayasu 1074
Angiite primária do sistema nervoso central 1075
Doença de Kawasaki 1075
Resumo 1076
Referências bibliográficas 1076

PONTOS-CHAVE

- A etiologia e a patogênese da vasculite permanecem obscuras e pouco compreendidas, além de poderem variar conforme as diferentes formas da condição.
- Falta um sistema de classificação padrão das vasculites idiopáticas que seja de ampla aceitação.
- O diagnóstico das vasculites necrotizantes sistêmicas idiopáticas requer um alto grau de suspeita.
- Não há testes laboratoriais clínicos patognomônicos para pacientes com vasculite necrotizante sistêmica.
- Os testes para detecção de anticorpos contra o antígeno neutrofílico citoplasmático (ANCAs) são mais valiosos quando solicitados de forma seletiva, diante de situações clínicas em que alguma forma de vasculite ANCA-associada constitua uma séria consideração. Esses testes não devem ser utilizados para fins de triagem.
- A detecção de ANCA, em particular na associação de ANCAs citoplasmáticos (c-ANCAs) com a granulomatose de Wegener, tornou-se um importante adjunto no diagnóstico da vasculite necrotizante sistêmica.
- O padrão de imunofluorescência de c-ANCA deve ser confirmado por ELISA para proteinase 3 (PR-3).
- O padrão de ANCA perinuclear (p-ANCA) na microscopia de fluorescência indireta é diagnosticamente inespecífico, de modo que os soros positivos para p-ANCA devem ser testados por ELISA para detecção de MPO-ANCA.
- A biópsia com confirmação histológica da vasculite continua sendo o teste laboratorial mais importante para o diagnóstico da vasculite necrotizante sistêmica.

As expressões clínica, laboratorial e patológica da vasculite necrotizante sistêmica são proteicas. Os clínicos deparam-se com um paciente que apresenta ampla variedade de sintomas e/ou sinais confusos e conflitantes. O diagnóstico da síndrome de vasculite necrotizante sistêmica requer uma avaliação abrangente que correlacione a história individual e o exame físico do paciente aos dados laboratoriais, de imagem e patológicos. Embora a vasculite possa ocorrer em qualquer parte do corpo, foram definidos padrões distintivos da doença que, uma vez identificados, indicam a presença de distúrbios específicos com tratamento e prognóstico específicos (Langford, 1995, 2003).

A vasculite necrotizante sistêmica é patologicamente caracterizada pela ocorrência de inflamação produtora de lesões vasculares. Essas lesões podem incluir a proliferação de células da íntima para dentro do lume vascular, com consequente estreitamento ou até fechamento do espaço que acarreta isquemia e possível infarto de estruturas anatômicas localizadas distalmente em relação ao sítio de lesão vascular. Do mesmo modo, a parede vascular pode se tornar delgada e enfraquecida, até haver formação de um aneurisma ou rompimento do vaso.

A vasculite (primária) idiopática ocorre quando o dano inflamatório vascular constitui o principal achado clinicopatológico e não há nenhuma outra doença subjacente. A vasculite secundária ocorre quando lesões vasculíticas acompanham um distúrbio subjacente (Tab. 51.1). O presente capítulo enfoca as vasculites idiopáticas e os testes laboratoriais clínicos considerados úteis para o diagnóstico e a supervisão dessa condição. Na vasculite secundária, como os métodos diagnósticos e de supervisão concentram-se nos distúrbios subjacentes, eles serão discutidos nos capítulos apropriados deste livro. Contudo, comentários acerca da avaliação laboratorial de lesão de órgão-terminal na vasculite idiopática são relevantes à vasculite secundária.

Classificação

Falta um sistema de classificação padrão para as vasculites idiopáticas que seja aceito de modo amplo. Historicamente, essas condições têm sido classificadas com base em várias combinações de achados clínicos e patológicos (Jennette, 1997, 1998b), embora classificações de trabalho tenham sido aprimoradas nos últimos anos, em decorrência dos esforços para criação de uma nomenclatura padrão (Hunder, 1990; Jennette, 1994b; Hoffman, 1998a; Langford, 2003). O esquema de classificação fornecido na Tabela 51.2 foi modificado a partir do esquema adotado pelos Institutos Nacionais de Saúde (National Institutes of Health) (Langford, 1995). A Tabela 51.3 contém os nomes e as definições de vasculites adotados pela Chapel Hill Consensus Conference (Conferência de Consenso Chapel Hill) sobre a nomenclatura da vasculite sistêmica (Jennette, 1994b). A íntima associação existente entre os ANCAs e as vasculites necrotizantes de pequenos vasos contribuiu para as novas considerações acerca da classificação (Falk, 2004). Esses esquemas não foram criados para utilização no diagnóstico de pacientes individuais (Langford, 2003).

Patogênese da vasculite

A etiologia e a patogênese das vasculites permanecem obscuras e pouco compreendidas, além de poderem variar conforme as diferentes formas da condição (Langford, 2003). A maioria das vasculites idiopá-

Tabela 51.1 Vasculites necrotizantes sistêmicas secundárias

Vasculite associada a fármaco
Vasculite associada à proteína estranha
Vasculite associada à infecção
Vasculite em malignidades
Granulomatose linfomatoide
Vasculite urticariforme hipocomplementêmica
Púrpura hipergamaglobulinêmica
Vasculite crioglobulinêmica
Vasculite por radiação
Vasculite do transplante (rejeição vascular)
Vasculite associada à doença do tecido conjuntivo
Artrite reumatoide
Lúpus eritematoso sistêmico
Síndrome de Sjögren
Escleroderma
Dermatomiosite/polimiosite
Sarcoidose
Policondrite recorrente
Síndrome do anticorpo antifosfolipídeo
Doença de Behçet

Fonte: adaptada de Langford, CA; McCallum, RM: Idiopathic vasculitis. *In* Belch, JJF; Zurier, RB (eds): Connective Tissue Diseases. London, Chapman & Hall, 1995, p. 179, com permissão.

Tabela 51.2 Vasculites necrotizantes sistêmicas idiopáticas (primárias)

Vasculite de pequenos vasos
Granulomatose de Wegener
Púrpura de Henoch-Schönlein
Angiite primária do sistema nervoso central
Vasculite de vasos médios
Síndrome de Churg-Strauss
Poliarterite nodosa
Doença de Kawasaki
Vasculite de vasos grandes
Arterite de célula gigante (temporal)
Arterite de Takayasu

ticas é atribuída a uma lesão vascular imunomediada, que é induzida por mecanismos diversos, tais como: (1) depósitos de imunocomplexo; (2) ligação direta de autoanticorpos a estruturas da parede vascular (p. ex., antígenos do endotélio ou da membrana basal) ou aos neutrófilos, quando a vasculite é ANCA-associada; e (3) inflamação mediada por células T (Jennette, 1994a) (Tab. 51.4). Os efeitos patogênicos desses diferentes mecanismos unem-se todos em uma via final comum de lesão vascular, que ativa mediadores humorais e celulares da inflamação. Moléculas de adesão envolvidas na resposta imune normal parecem mediar as respostas imunes patológicas observadas na vasculite. Há relatos de que anomalias quantitativas e qualitativas da produção de citocinas são detectadas na vasculite sistêmica. Foram observados níveis aumentados de interleucina (IL)-1, IL-2, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)-β e TNF-α (Grau, 1989; Arimura, 1993), bem como aumento da produção de TNF-α por células mononucleares circulantes (Deguchi, 1990). Tais mediadores iniciam a infiltração de células inflamatórias, a ativação do complemento e as cascatas de coagulação, além de regularem positivamente outras moléculas inflamatórias (Conn, 1993; Niles, 1995; Sneller, 1997; Langford, 2003). Existem evidências substanciais do envolvimento direto dos ANCAs no dano tecidual que ocorre na vasculite. Camundongos deficientes do gene ativador recombinante desenvolvem vasculite ao serem tratados com infusão de anticorpos antimieloperoxidase e propiltiouracil, que se acumula nos grânulos neutrofílicos e está associada à vasculite ANCA-associada (Seo, 2004b). Por fim, foi descrita a existência de uma associação entre o escore de Birmingham de atividade da vasculite, o grau de extensão da doença e o número de células B ativadas (Seo, 2004b).

Tabela 51.3 Nomes e definições das vasculites estabelecidos pelo Chapel Hill Consensus

	Conferência
Vasculite de vasos grandes	
Arterite de célula gigante (temporal)	Arterite granulomatosa da aorta e dos seus principais ramos, com predileção para os ramos extracraniais da artéria carótida Com frequência, envolve a artéria temporal Usualmente, ocorre em pacientes com mais de 50 anos e por vezes está associada à polimialgia reumática
Arterite de Takayasu	Inflamação granulomatosa da aorta e seus principais ramos. Usualmente, ocorre em pacientes com menos de 50 anos de idade
Vasculite de vasos médios	
Poliarterite nodosa (clássica)	Inflamação necrotizante de artérias de pequeno e médio calibre sem glomerulonefrite ou vasculite de arteríolas, capilares ou vênulas
Doença de Kawasaki	Arterite envolvendo artérias de grande, médio e pequeno calibre, e associada à síndrome do linfonodo mucocutâneo. As artérias coronárias com frequência estão envolvidas. Pode haver envolvimento da aorta e das veias. Ocorre normalmente em crianças
Vasculite de pequenos vasos	
Granulomatose de Wegener	Inflamação granulomatosa envolvendo o trato respiratório, e vasculite necrotizante afetando vasos de pequeno e médio calibre (capilares, vênulas, arteríolas e artérias). É comum haver glomerulonefrite necrotizante
Churg-Strauss	Inflamação granulomatosa e rica em eosinófilos envolvendo o trato respiratório e vasculite necrotizante afetando os vasos de pequeno e médio calibre. Associada à asma e à eosinofilia
Poliangiite microscópica	Vasculite necrotizante, com pouca ou nenhuma deposição de imunocomplexos. Afeta pequenos vasos (capilares, vênulas ou arteríolas)
Púrpura de Henoch-Schönlein	Vasculite com imunodeposição de IgA dominante, que afeta pequenos vasos (capilares, vênulas ou arteríolas)
Vasculite crioglobulinêmica essencial	Vasculite com imunodeposição de crioglobulina afetando pequenos vasos (capilares, vênulas ou arteríolas). Tipicamente, envolve pele, intestino e glomérulos, além de estar associada a artralgias e artrite
Vasculite leucocitoclástica cutânea	Angiite leucocitoclástica cutânea isolada, sem vasculite sistêmica nem glomerulonefrite

Perspectiva do uso de testes laboratoriais clínicos

Ao avaliar pacientes com doenças multissistêmicas complicadas, o clínico tem como objetivo estabelecer um diagnóstico acurado que permita definir um tratamento adequado. Como a vasculite não apresenta aspectos patognomônicos clínicos nem laboratoriais, o médico deve utilizar combinações de achados clínicos, laboratoriais, de imagem e patológicos para identificar os padrões da doença. Essa abordagem permite o diagnóstico específico ou a classificação da doença apresentada pelo paciente como pertencente a um grupo de distúrbios vasculares tratados de forma semelhante, mesmo quando nenhuma entidade específica é identificável.

Tabela 51.4 Potenciais mecanismos de dano vascular em síndromes de vasculite primária selecionadas

Formação de imunocomplexo
Poliarterite nodosa associada à hepatite B
Púrpura de Henoch-Schönlein
Crioglobulinemia mista essencial
Produção de anticorpos antineutrofílicos citoplasmáticos
Granulomatose de Wegener
Poliangiite microscópica
Síndrome de Churg-Strauss
Respostas patogênicas de linfócitos T e formação de granuloma
Arterite de célula gigante (temporal)
Arterite de Takayasu
Granulomatose de Wegener
Síndrome de Churg-Strauss

Assumir que um paciente apresenta vasculite baseando-se estritamente nos sintomas clínicos é uma decisão bastante arriscada, em razão da existência de um número significativo de possibilidades diagnósticas distintas aliada à ausência de achados patognomônicos. Em consequência, torna-se necessário obter confirmação histológica ou angiográfica da vasculite a partir do exame de uma biópsia tecidual ou de uma angiografia, a fim de estabelecer o diagnóstico definitivo antes de iniciar a terapia (Mandell, 1994; Langford, 2003).

Os testes laboratoriais clínicos têm valor limitado na determinação do diagnóstico específico de vasculite (Mandell, 1994; Langford, 2003), ainda que os clínicos os utilizem como ferramenta auxiliar na identificação dos padrões de envolvimento de órgãos característicos da vasculite, na avaliação da extensão e do grau de severidade de danos em órgão-alvo, na distinção entre vasculite idiopática e formas secundárias alternativas do distúrbio, e no estabelecimento de valores basais para fins de supervisão. A associação do ANCA a certas vasculites idiopáticas contribui significativamente para o diagnóstico e a supervisão da condição. Os ANCAs são discutidos com detalhe adiante.

Ao avaliar um paciente cujos diagnósticos diferenciais incluam vasculite, recomenda-se considerar os princípios descritos a seguir, com relação ao uso e à interpretação dos testes laboratoriais clínicos.

Testes de rotina

Pacientes com história e dados de exame físico sugestivos de vasculite idiopática apresentam com frequência um conjunto de queixas multissistêmicas confusas desenvolvidas há certo tempo. Os testes de primeira ordem incluem: culturas para agentes infecciosos (principalmente se o paciente apresentar febre), realização de contagem sanguínea completa acompanhada de contagem diferencial, taxa de sedimentação eritrocitária (ESR), urinálise, painel bioquímico do sangue e testes de avaliação funcional órgão-específicos (p. ex., função hepática).

Testes especiais

Os testes especiais ajudam a diferenciar a vasculite idiopática das demais formas alternativas na determinação do diagnóstico diferencial de trabalho. Os testes laboratoriais relevantes devem ser aqueles que identificam os autoanticorpos circulantes (listados na Tab. 51.5) e imunocomplexos. A biópsia tecidual direta para confirmação histológica da vasculite, com ou sem angiografia, é considerada o teste definitivo para vasculite idiopática.

Alguns padrões de teste na vasculite

Certos padrões de resultados de testes laboratoriais clínicos são considerados úteis:

- a leucopenia e/ou a trombocitopenia constituem achados raros na vasculite idiopática e sua detecção sugere diagnósticos alternativos, como lúpus eritematoso sistêmico, neoplasma, distúrbios de medula óssea, granulomatose linfomatoide ou hiperesplenismo (Mandell, 1994);

Tabela 51.5 Anticorpos associados à vasculite

Anticorpo	Doença associada	Principal(is) método(s) de teste
ANCA, usualmente c-ANCA	Granulomatose de Wegener	MIF, ELISA
ANCA, c-ANCA ou p-ANCA	Poliangiite microscópica	MIF, ELISA
Anticorpos anti-C1q	Vasculite urticariforme hipocomplementêmica	Ligação de C1q
Anticorpos contra hepatite B	Poliarterite nodosa associada à hepatite B	ELISA
ANA	Lúpus eritematoso sistêmico	MIF, ELISA
Crioglobulinas mistas	Vasculite crioglobulinêmica	Crioprecipitação, IEF, IF
SS-A (Ro), SS-B (La)	Síndrome de Sjögren	MIF, ELISA, IDF
Fator reumatoide	Artrite reumatoide	AGL, ELISA
Anticorpos contra hepatite C	Poliarterite nodosa associada à hepatite C	EIA
Anti-DNA	Lúpus eritematoso sistêmico	MIF, ELISA

ANA = anticorpos antinucleares; ANCA = autoanticorpos antineutrofílicos citoplasmáticos; c-ANCA = ANCA citoplasmático; EIA = imunoensaio enzimático; ELISA = ensaio imunossorvente ligado à enzima; IDF = imunodifusão; IEF = imunoeletroforese; IF = imunofixação; MIF = microscopia por imunofluorescência indireta; AGL = aglutinação do látex; p-ANCA = ANCA perinuclear.

- a ESR, embora seja um achado inespecífico, está normalmente elevada na vasculite idiopática. Caso a ESR não esteja elevada antes da terapia, é improvável que o diagnóstico seja arterite de células gigantes (temporal) ou granulomatose de Wegener;
- pacientes com leucemia de células pilosas podem apresentar vasculite com aspectos histológicos de poliarterite nodosa associada à pancitopenia (Mandell, 1994);
- a anemia com níveis de hemoglobina abaixo de 9 g/dL resulta de condições distintas de anemia decorrente de doença crônica, como hemólise, sangramento oculto ou doença renal (Mandell, 1994).
- diante da suspeita de poliarterite nodosa, devem ser realizados testes sorológicos para avaliação da função hepática, detecção de infecção por vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e citomegalovírus (CMV) (Golden, 1994; Mandell, 1994; Langford, 2003). De modo semelhante, indica-se a realização de testes sorológicos para hepatites B e C quando o paciente apresenta crioglobulinas, vasculite leucocitoclástica detectada por biópsia cutânea e/ou doença renal;
- níveis séricos elevados de creatinina ou aldolase podem indicar miosite ou isquemia muscular (Mandell, 1994);
- os testes para detecção de anticorpos antinucleares (ANAs) e fator reumatoide (FR) são úteis apenas quando há suspeita de doença de tecido conjuntivo ou artrite;
- pacientes com vasculite reumatoide apresentam índices elevados de FR;
- a eosinofilia no sangue periférico ocorre em uma ampla variedade de distúrbios inflamatórios. Cerca de 15 a 20% dos pacientes com poliarterite nodosa ou granulomatose de Wegener podem apresentar eosinofilia, contudo em níveis bem inferiores do que aqueles detectados na síndrome de Churg-Strauss;
- a identificação de c-ANCAs sustenta o diagnóstico de granulomatose de Wegener em pacientes com achados clínicos dessa condição;
- pacientes com granulomatose de Wegener não tratada não apresentam leucopenia;
- a primeira urina da manhã, tanto antes quanto após a centrifugação, deve ser cuidadosamente examinada quanto ao conteúdo de proteínas, hematúria, células e cilindros observados na glomerulonefrite que pode ocorrer na vasculite. Caso a amiloidose renal esteja presente no diagnóstico diferencial, a proteinuria normalmente ocorre livre de células.

Anticorpo antineutrofílico citoplasmático

O ANCA reage com antígenos presentes no citoplasma do neutrófilo (Tervaert, 1991; Jennette, 1993a), que estavam anteriormente protegidos (Seo, 2004b). A identificação desse autoanticorpo tornou-se adjunto importante no diagnóstico da vasculite necrotizante sistêmica (Niles, 1993; Seo, 2004b).

Métodos de detecção

Vários métodos laboratoriais – entre os quais a microscopia de fluorescência indireta (MIF), o ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA), o radioimunoensaio, o *Western blotting*, o *dot blotting*, a citometria de fluxo, a imunoprecipitação e as técnicas de imunoensaio enzimático de captura – têm sido empregados para detectar ANCAs (Wieslander, 1991; Roberts, 1992; Seo, 2004b). Em geral, MIF e ELISA são os métodos de teste mais utilizados para essa finalidade. A MIF é o método de detecção de ANCAs mais sensível e amplamente utilizado.

A MIF utiliza como substrato neutrófilos humanos normais isolados. Esses neutrófilos são citocentrifugados em lâminas de vidro contendo múltiplos poços, fixados com etanol a 99% e incubados com várias diluições do soro do paciente. Os neutrófilos também podem ser fixos à lâmina utilizando as técnicas de aderência, esfregaço ou gotejamento (Roberts, 1990, 1992). As lâminas são coradas com conjugado anti-imunoglobulina (Ig) humana poliespecífico marcado com fluoresceína. Recomenda-se o uso de conjugado poliespecífico em razão da ocorrência de c-ANCAs de classes IgM e IgA (Roberts, 1992). As lâminas são examinadas ao microscópio de fluorescência. Quando se adota a MIF, podem ser observados três padrões de coloração de neutrófilos: c-ANCA, p-ANCA e "padrões atípicos" (Seo, 2004b).

Os c-ANCAs são caracterizados pela coloração granular fina do citoplasma neutrofílico, mais acentuadamente entre os lobos nucleares. O núcleo do neutrófilo em si não é corado (Fig. 51.1). Os critérios adotados para diferenciar c-ANCAs de coloração citoplasmática inespecífica produzida pela presença de outros autoanticorpos são: (1) ausência da intensificação central; (2) coloração citoplasmática em menos de 95% dos neutrófilos; (3) especificidade não neutrofílica (p. ex., os linfócitos presentes na lâmina não devem ser corados em presença de ANCAs verdadeiros); e (4) granularidade citoplasmática heterogênea (Roberts, 1992; Savige, 1998).

Os p-ANCAs são caracterizados pela coloração da área perinuclear (Fig. 51.2), embora possa haver coloração nuclear mimetizando a presença de ANAs diante de títulos elevados desse autoanticorpo (Niles, 1993). O padrão de coloração perinuclear que define p-ANCA é produzido pela redistribuição dos antígenos-alvo a partir do citoplasma para a região perinuclear neutrofílica, quando o etanol é utilizado no preparo de neutrófilos humanos para substrato (Jennette, 1993a) (Fig. 51.3). Quando os neutrófilos são fixados com formalina, em vez de álcool, o antígeno-alvo é imobilizado e o padrão de imunofluorescência torna-se citoplasmático (Jennette, 1993a). O papel da utilização de neutrófilos fixados com formalina para detecção de ANCAs no trabalho de rotina diagnóstica continua sendo controverso (Chowdhury, 1999). É difícil distinguir p-ANCA dos "padrões atípicos" (Seo, 2004b).

Especificidade antigênica

A especificidade antigênica de c-ANCA foi identificada como sendo uma serina protease neutra de 29 kDa – a PR-3. Essa protease localiza-se junto aos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e nos lisossomos peroxidase-positivos dos monócitos (Roberts, 1992; Niles, 1993; Seo, 2004b). Em muitos pacientes, a PR-3 também é encontrada na membrana plasmática de neutrófilos e monócitos em repouso (Seo, 2004b). Na vasculite, a presença de p-ANCA usualmente se deve à existência de autoanticorpos contra a mieloperoxidase (MPO-ANCA) (Falk, 1988). É notável que muitos p-ANCAs não são dirigidos contra a MPO, mas reagem com outras enzimas citoplasmáticas neutrofílicas, tais como elastase, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, azurocidina ou catepsina G (Jennette, 1993a; Niles, 1993; Hoffman, 1998b). Os padrões de ANCA devem ser confirmados por testes mais específicos para PR-3 e MPO, cujos respectivos anticorpos estão mais frequentemente associados à vasculite (Savige, 2000; Langford, 2003; Seo, 2004b).

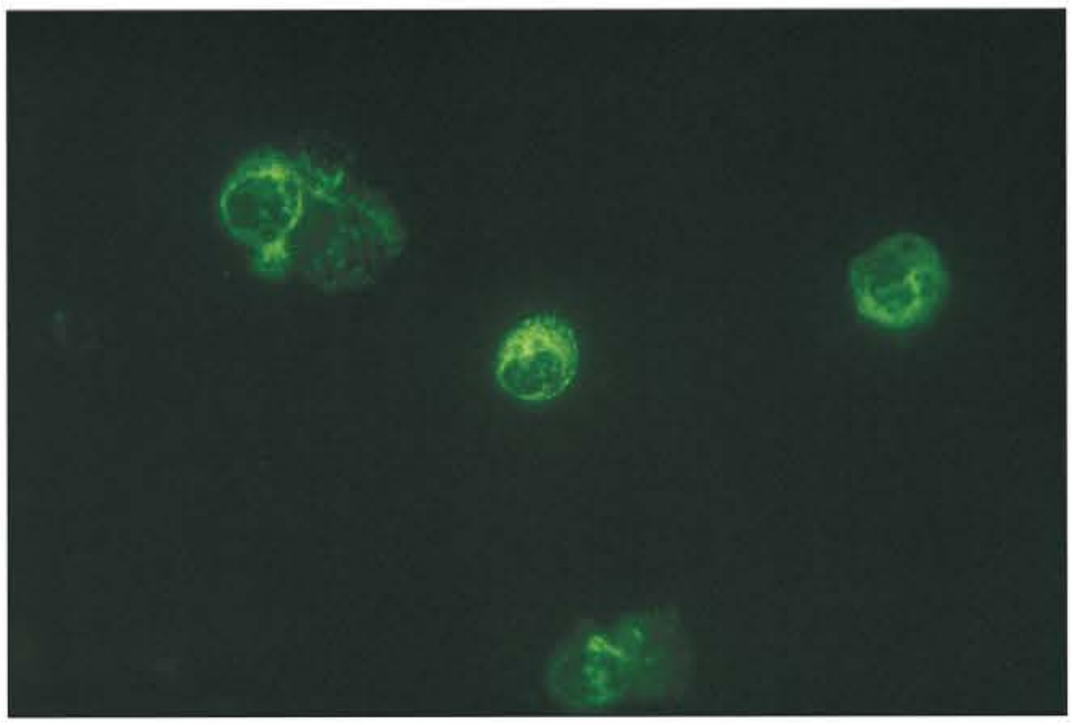


Figura 51.1 Padrão citoplasmático de anticorpos antineutrofílicos citoplasmáticos (c-ANCA). A maioria dos neutrófilos fixados com etanol apresenta fluorescência citoplasmática finamente granular, com intensificação central. Ausência de coloração nuclear (× 400).

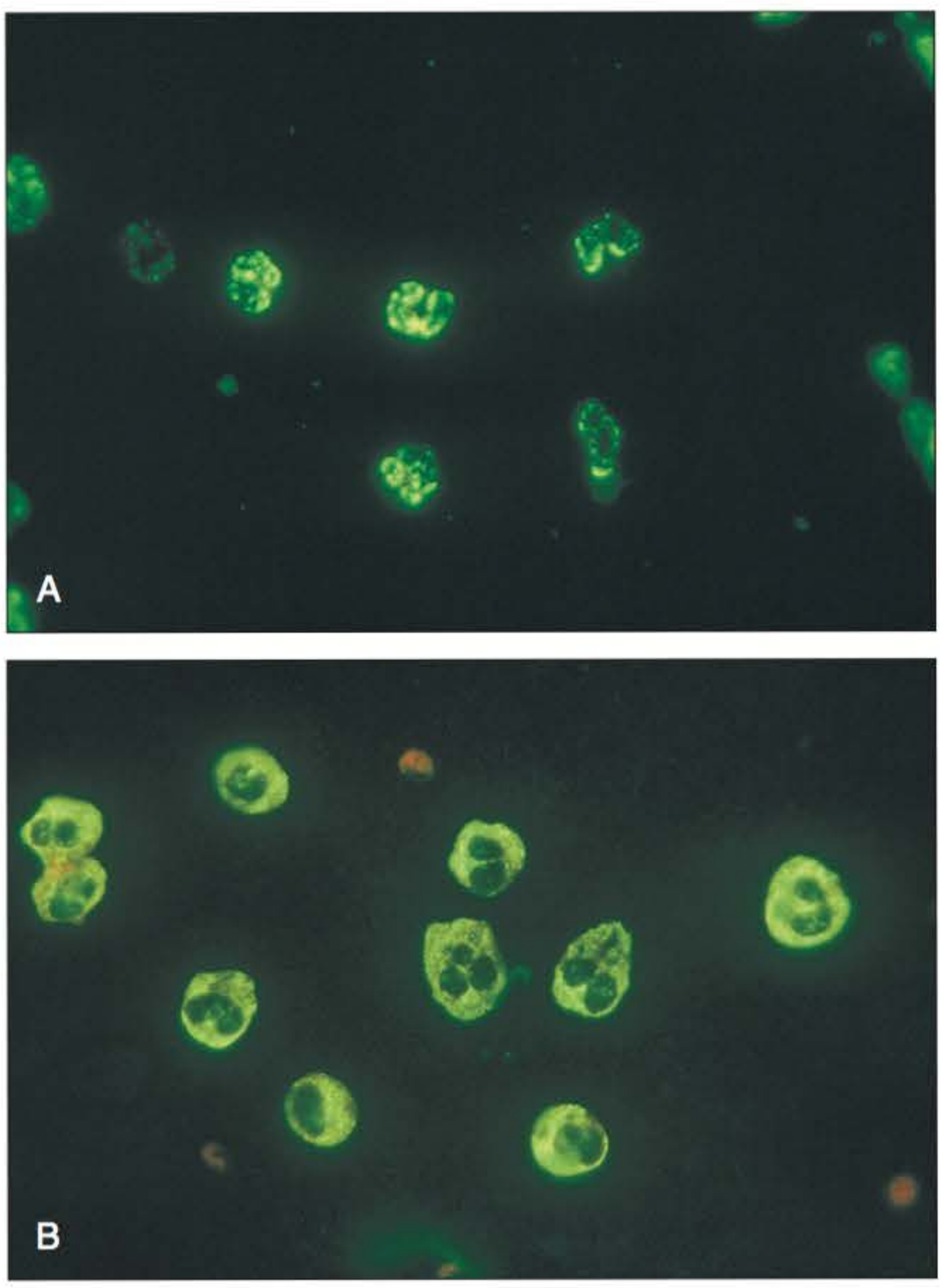


Figura 51.2 Padrão perinuclear de anticorpos antineutrofílicos citoplasmáticos (p-ANCA). A maioria dos neutrófilos fixados com etanol apresenta fluorescência perinuclear e nuclear, sem coloração citoplasmática (*A*, × 400). Essa coloração se torna citoplasmática quando os neutrófilos são fixados com formalina, em vez de álcool (*B*, × 400).

ELISAs para detecção de anticorpos anti-PR-3 (PR-3-ANCA) apresentam boa correlação com a presença de c-ANCAs, desde que a MIF seja realizada por profissionais experientes (Niles, 1993; Roberts, 1992). Um ELISA para detecção de PR-3-ANCA deve ser cuidadosamente validado, dando atenção especial ao uso de técnicas comprovadas de preparação de antígenos de fase sólida e ao uso da subtração de fundo, ou de uma etapa de absorção específica, para controlar a ligação inespecífica de Igs à fase sólida (Roberts, 1992; Niles, 1993;

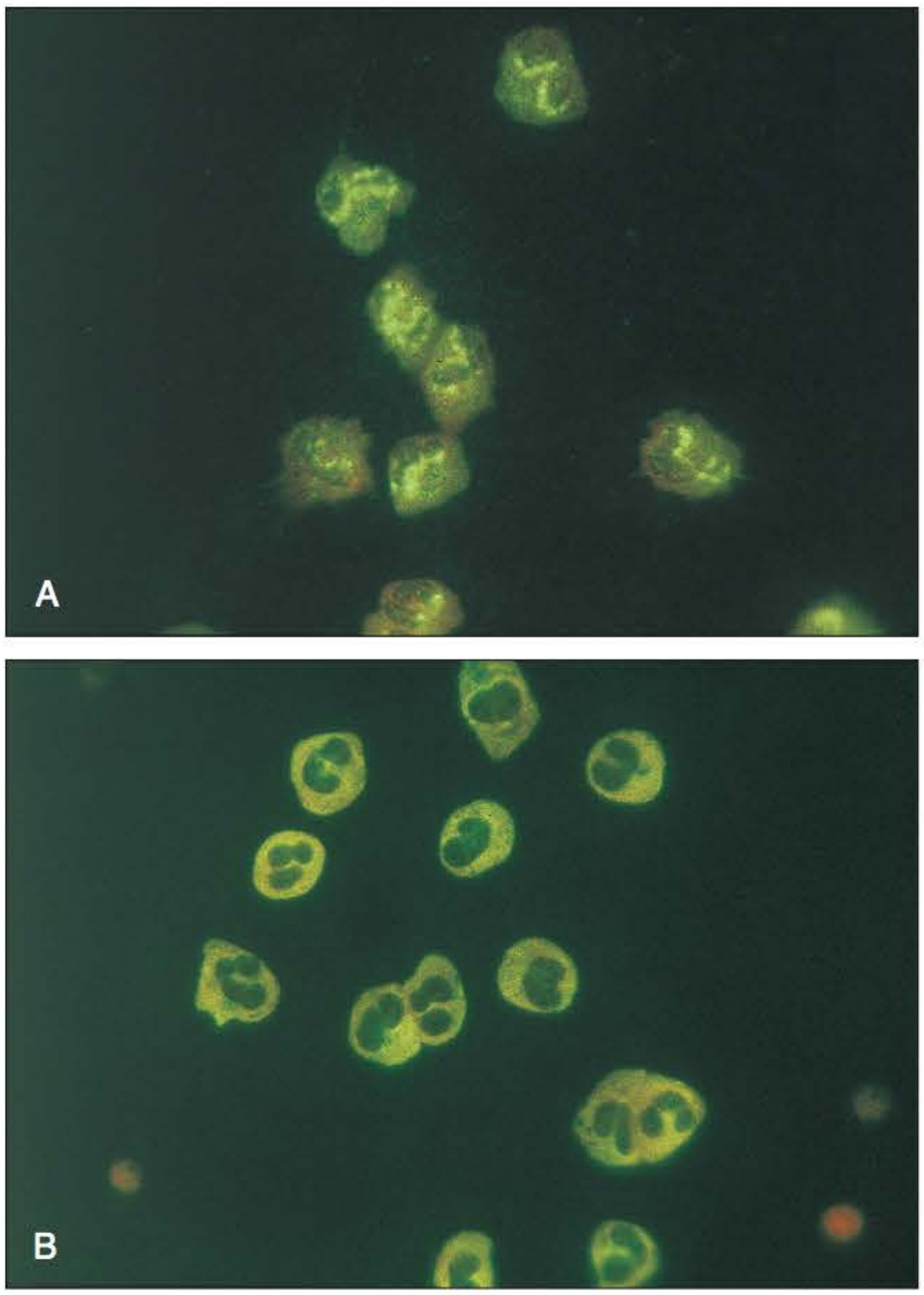


Figura 51.3 Padrão perinuclear de anticorpos antineutrofílicos citoplasmáticos atípico em neutrófilos fixados com etanol apresentando fluorescência perinuclear (*A*, × 500). Os neutrófilos não são corados quando fixados com formalina, em vez de álcool (*B*, × 500).

Wang, 1997). Na Europa, estão sendo realizados esforços no sentido de padronizar ELISAs de fase sólida (Hagen, 1996, 1998).

Já estão disponíveis ELISAs para detecção de PR-E e MPO, produzidos com licença para comercialização. A maioria emprega a cobertura de antígenos direta padronizada de micropoços de placas de poliestireno, de modo que a pureza do antígeno tem importância crítica na definição da sensibilidade e da especificidade analíticas dos ensaios (Niles, 1993; Roberts, 1992). As tentativas de preservar a conformação nativa dos antígenos são consideradas importantes, pois os ANCAs anti-PR-3 são dirigidos contra epítopos conformacionais (Hoffman, 1998b).

A correlação existente entre p-ANCA e a detecção de MPO por ELISA, contudo, é insatisfatória (Roberts, 1992). Diversos autoanticorpos, incluindo ANAs, anticorpos antielastase neutrofílica e ANAs granulócito-específicos (GS-ANA), são capazes de produzir um padrão de p-ANCA na MIF. Dessa forma, soros que produzem fluorescência nuclear na MIF requerem testes adicionais para confirmação da presença de MPO-ANCA. O teste de MPO-ELISA é recomendado para confirmar a especificidade anti-MPO, pois sabe-se que ANAs ou GS-ANAs e MPO-ANCAs ocorrem concomitantemente. A MIF empregando células Hep-2 não faz essa distinção de maneira adequada, uma vez que ANA e MPO-ANCA podem ocorrer juntos, enquanto GS-ANA pode resultar negativo em células Hep-2 (Roberts, 1992; Specks, 1994).

O ELISA possui limitações e, por fim, cada laboratório deve verificar com atenção as alegações do fabricante para que o clínico possa receber informações sobre as características de desempenho do teste. Isso se torna especialmente importante em situações clínicas confusas, quando surgem discrepâncias entre a apresentação clínica e os resultados laboratoriais, e/ou diante de resultados discordantes de MIF e ELISA.

Resumindo, recomenda-se que a combinação de MIF e ELISA seja utilizada na detecção de ANCAs específicos para PR-3-MPO. É preciso estar atento a controle de qualidade, relatórios e situações em que os ANCAs são detectados em doenças autoimunes não vasculíticas (Savige, 2003).

Associações com doenças

Vasculite

Ambos, PR-3-ANCA (c-ANCA) e MPO-ANCA (p-ANCA), estão associados à granulomatose de Wegener, à poliarterite nodosa, à poliangiite microscópica, à síndrome de Churg-Strauss, à vasculite idiopática necrotizante paucimune e à glomerulonefrite crescente, além das síndromes de sobreposição da poliangiite (Niles, 1993; Langford, 2003; Seo, 2004b). O PR-3-ANCA é identificado em cerca de 70 a 80% dos pacientes com granulomatose de Wegener ativa, enquanto o MPO-ANCA é detectado em menos de 10% desses pacientes (Wiik, 2002; Seo, 2004b). Cerca de 80 a 90% dos pacientes com poliarterite microscópica ativa apresentam PR-3-ANCA (30%) ou MPO-ANCA (60%) (Wiik, 2002). O MPO-ANCA é identificado em pacientes com síndrome de Churg-Strauss ou glomerulonefrite paucimune em 50 a 80% dos pacientes com doença ativa. Esse último grupo de doenças raramente está associado ao PR-3-ANCA, em vez do MPO-ANCA (Langford, 2003; Seo, 2004b).

Há relatos da coexistência de ANCAs e anticorpos antimembrana basal glomerular (anti-GBM) (Bonsib, 1993; Niles, 1993).

Doença inflamatória dos tratos gastrintestinal e hepatobiliar

Há uma variedade de testes sorológicos emergentes, incluídos os testes para detecção de p-ANCA, que são relevantes para o diagnóstico e o tratamento da colite ulcerativa, da doença de Crohn (Sandborn, 2004) e dos distúrbios envolvendo o sistema hepatobiliar (Jennette, 1993b). Há relatos da detecção de p-ANCAs em 75 a 80% dos pacientes com colite ulcerativa ativa ou colangite esclerosante primária (Klein, 1991; Lo, 1993; Ellerbroek, 1994), em 75% dos pacientes com hepatite crônica ativa, cerca de 30% dos pacientes com cirrose biliar primária (Kallenberg, 1992; Mulder, 1993), e em 20% dos pacientes com doença de Crohn (Roberts, 1992; Jennette, 1993b). As especificidades do antígeno-alvo na doença intestinal inflamatória ainda não foram totalmente definidas, embora haja relatos da presença de autoanticorpos contra lactoperoxidase, proteína bacteriana de aumento da permeabilidade (Hoffman, 1998b), lactoferrina (Peen, 1993) e catepsina G (Jennette, 1993b). A maioria dos pacientes adultos com colite ulcerativa possui p-ANCAs detectáveis que são sensíveis à DNAse, sendo que essa característica ajuda a diferenciar entre p-ANCAs associados à doença intestinal inflamatória e p-ANCAs associados a outros distúrbios, como hepatite autoimune e colangite esclerosante primária (Nakamura, 2003). Um subgrupo de pacientes com doença de Crohn apresentando p-ANCAs pode ter desenvolvido um comprometimento de cólon que mimetiza a apresentação clínica da colite ulcerativa.

Outras doenças

A presença de ANCAs também foi descrita em outras doenças, como lúpus eritematoso induzido por fármacos, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Felty e artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, polimiosite e dermatomiosite, artrite reumatoide juvenil, artrite reativa, policondrite recidivante, síndrome de anticorpos antifosfolipídeos, síndromes mielodisplásicas, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), cromomicose, amebíase invasiva, endocardite bacteriana subaguda, fibrose cística e alguns neoplasmas (Jennette, 1993b; Peter, 1993; Hoffman, 1998b; Choi, 2000). Nos distúrbios do tecido conjuntivo, devem ser excluídos os ANAs que mimetizam p-ANCAs. Muitos pacientes tratados com hidralazina parecem desenvolver MPO-ANCAs (Roberts, 1992). A vasculite associada ao propiltiouracil foi associada à positividade para ANCAs (Hoffman, 1998b; Langford, 2003).

Interpretação do teste

A interpretação dos testes de detecção de ANCAs deve considerar vários fatores (Hagen, 1998; Hoffman, 1998a; Vassilopoulos, 1999; Seo, 2004a).

- Os testes de detecção de ANCAs não devem ser utilizados como testes de triagem em grupos de pacientes não selecionados, que apresentem baixa prevalência de vasculite (Langford, 1998a).
- Os testes de detecção de ANCAs são mais valiosos quando solicitados de maneira seletiva, em situações clínicas nas quais alguma forma de vasculite ANCA-associada constitua uma séria consideração.
- O padrão de imunofluorescência de c-ANCA deve ser confirmado por ELISA para PR-3 (Savige, 1999; Langford, 2003; Seo, 2004b).
- A reatividade anti-PR-3 é mais frequente na granulomatose de Wegener ativa ou na poliarterite nodosa, mas também pode ser observada na glomerulonefrite em crescente idiopática ou na síndrome de Churg-Strauss.
- Na granulomatose de Wegener, c-ANCA é considerado altamente sensível para sinalização da doença sistêmica ativa (Vassilopoulos, 1999).
- O valor preditivo de um título de c-ANCA aumentado como prenúncio de recidiva da granulomatose de Wegener permanece controverso, uma vez que nem toda elevação do título de c-ANCA é acompanhada da piora dessa condição (Specks, 1994; Langford, 2003).
- A elevação do título de ANCAs constitui fator de risco para exacerbação da doença, no entanto, isoladamente é insuficiente para justificar o ajuste da medicação imunossupressora (Langford, 2003; Seo, 2004b).
- O padrão de p-ANCA na MIF é inespecífico em termos diagnósticos.
- Soros positivos para p-ANCA devem ser testados por ELISA para detecção de MPO-ANCA (Savige, 1999; Seo, 2004b).
- MPO-ANCA é detectado mais frequentemente na poliarterite nodosa, na glomerulonefrite em crescente idiopática ou na síndrome de Churg-Strauss; todavia, também pode ser observado na granulomatose de Wegener.
- Nem o diagnóstico de vasculite necrotizante sistêmica nem a decisão de iniciar o tratamento devem se basear apenas no resultado positivo de um teste de detecção de ANCAs.
- Um resultado negativo no teste de detecção de ANCAs não deve ser utilizado para excluir doenças.

Por fim, a interpretação dos resultados de um teste de detecção de ANCAs depende da experiência individual do clínico que trata o paciente com vasculite, bem como do padrão da doença manifestada pelo paciente observado (Jennette, 1998a; Langford, 2003; Seo, 2004b).

Sinopse das principais síndromes vasculíticas idiopáticas

Poliarterite nodosa

Epidemiologia

A poliarterite nodosa, como todas as vasculites idiopáticas, é uma doença pouco comum. As estimativas da prevalência da poliarterite nodosa variam de 4,6 em um milhão na Inglaterra e 9 em um milhão em Olmstead County (Minnesota, EUA), a 77 em cem mil na população hiperendêmica para hepatite B de esquimós do Alasca (Conn, 1993; Langford, 1995). A poliarterite nodosa afeta indivíduos de ambos os sexos e de qualquer faixa etária, contudo é mais comum entre os homens (proporção homem:mulher = 2:1) com idade entre 40 e 60 anos (Langford, 1995). Não foi observada nenhuma predileção racial (Conn, 1993). Entre os pacientes de idade mais avançada que apresentam a doença, há alguns que passaram a ser considerados como tendo poliangiite microscópica (Langford, 2003).

Aspectos clínicos

As manifestações clínicas da poliarterite nodosa clássica são altamente variáveis. Os pacientes apresentam com frequência sintomas inespecíficos, como febre, perda de peso e mal-estar. É comum haver hipertensão, que é considerada importante evidência diagnóstica. Embora a poliarterite nodosa possa ocorrer em qualquer sistema orgânico, o quadro clínico predominante consiste no envolvimento sintomático da pele, das articulações, dos nervos periféricos, do trato gastrintestinal e dos vasos renais não glomerulares (Conn, 1993; Savage, 2000; Langford, 2003). Testes que indicam função hepática anormal sugerem a possibilidade de haver uma infecção concomitante pelo vírus da hepatite B (Langford, 1995, 2003; Savage, 2000). O envolvimento pulmonar raramente ocorre na poliarterite nodosa, chegando a ser controverso. Embora alguns pesquisadores admitam a existência da poliarterite nodosa pulmonar (Lie, 1989), outros acreditam que tais pacientes na verdade apresentam síndrome de Churg-Strauss ou granulomatose de Wegener, pois a doença pulmonar é comum nessas condições (Langford, 1995; Fauci, 1998). O curso da poliarterite nodosa é caracterizado por remissões, recidivas e, quando não tratada, alta mortalidade (Fauci, 1998). Mediante tratamento, estima-se que a taxa de sobrevida de 5 anos seja de 80%, com menos de 10% dos pacientes apresentando recidiva (Langford, 2003).

Achados laboratoriais clínicos

Os resultados dos testes laboratoriais clínicos, ainda que sejam diagnóstico-inespecíficos, refletem a natureza inflamatória sistêmica da poliarterite nodosa. Em geral, observam-se anemia normocrômica, leucocitose neutrofílica, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e ESR acentuadamente elevada. A determinação dos níveis séricos de creatinina e de nitrogênio ureico sanguíneo (BUN), aliada à urinálise para detecção de proteinúria, hematúria e sedimento anormal são importantes na avaliação da função renal. A positividade para ANAs ou FR encontrada em 10 a 40% desses pacientes pode estar associada a níveis reduzidos dos componentes C3 e C4 do complemento. Todos os pacientes com poliarterite nodosa devem ser submetidos a testes para infecção por hepatite B, hepatite C e HIV (Conn, 1993; Langford, 1995, 2003). A eosinofilia é uma ocorrência rara e, quando presente em níveis elevados, deve conduzir à hipótese de síndrome de Churg-Strauss (Fauci, 1998).

Diagnóstico

Pode ser difícil diagnosticar a poliarterite nodosa, dada sua apresentação inespecífica, seu potencial envolvimento de órgãos de modo variado e difuso e sua baixa prevalência. Entretanto, havendo suspeita, o diagnóstico é estabelecido com base na angiografia e/ou na demonstração histológica da poliarterite nodosa em biópsia de tecido proveniente de sítio(s) sintomático(s), como músculo, nervo, rim e testículos. Em termos de patologia, a poliarterite nodosa constitui uma arterite necrotizante focal, contudo panmural, de artérias musculares de pequeno e médio calibre (Fig. 51.4), que ocorre preferencialmen-

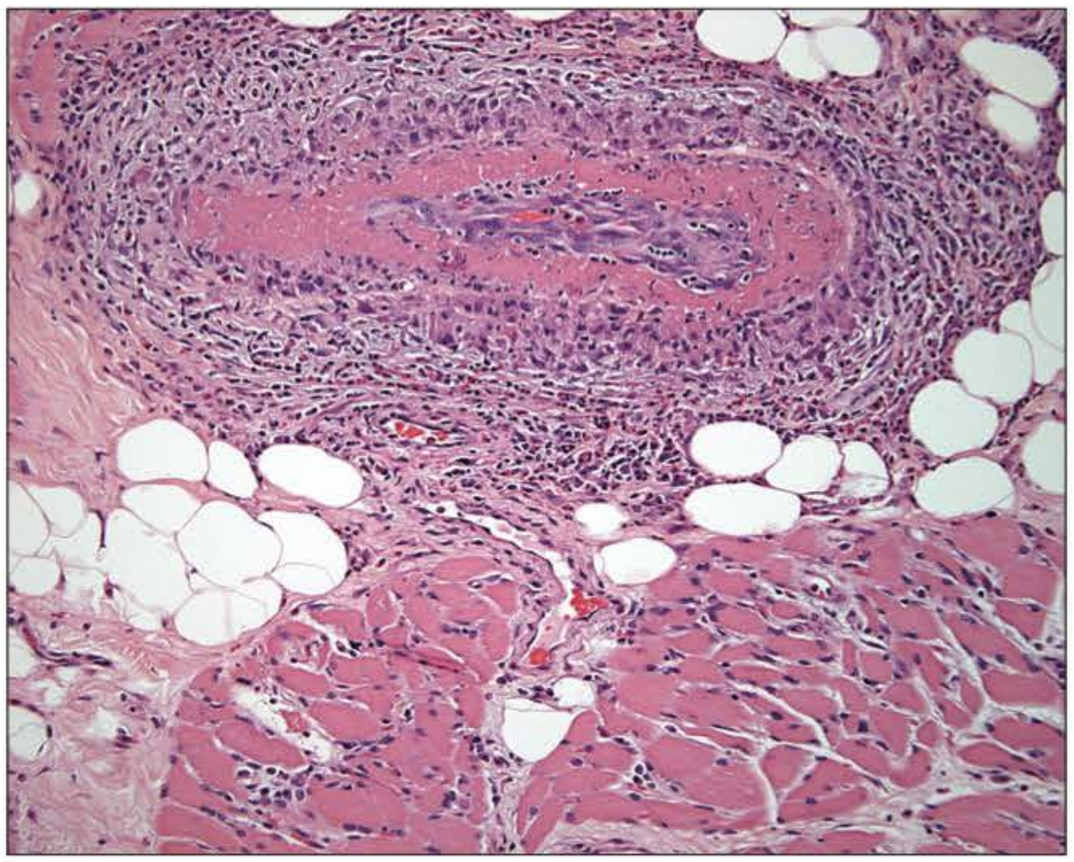


Figura 51.4 Poliarterite nodosa. A biópsia de músculo esquelético revela arterite necrotizante pan-mural circunferencial de uma pequena artéria muscular, que apresenta inflamação de células mistas, necrose fibrinoide e endarterite proliferativa. Nesse caso, os eosinófilos constituem um proeminente elemento da inflamação, contudo os granulomas estão ausentes (Hematoxilina & Eosina [H&E], × 200).

te em pontos de ramificação vascular. A presença de uma inflamação necrotizante de células mistas acompanhada de necrose fibrinoide, seja circunferencial ou segmentar, junto à parede vascular, constitui a principal lesão característica da poliarterite nodosa. O microaneurisma ou a dilatação aneurismática são igualmente característicos da fase aguda da poliarterite nodosa. O processo inflamatório é resolvido com fibrose, podendo acarretar uma endarterite proliferativa. Outro aspecto característico é a mistura de lesões ativas e/ou em cicatrização adjacentes a segmentos normais do vaso sanguíneo (Langford, 1995).

A angiografia pode ser especialmente valiosa na identificação de anormalidades gastrintestinais, ou diante da indisponibilidade de um potencial sítio para obtenção de biópsia. Em particular, a angiografia deve ser considerada antes de qualquer tentativa de obtenção de biópsia fechada com agulha a partir do fígado ou do rim de pacientes sob suspeita de poliarterite nodosa, uma vez que a predileção dos aneurismas por esses locais aumenta o risco de sangramento severo (Langford, 1995).

Tratamento e prognóstico

Os pacientes são tratados com glicocorticoides. A meta da terapia à base de glicocorticoides é promover o controle da doença sem induzir as potenciais complicações associadas ao fármaco em si. Uma alternativa é utilizar ciclofosfamida para tratar pacientes com poliarterite nodosa severa (com envolvimento gastrintestinal, cardíaco e do sistema nervoso central [SNC]), pacientes para os quais a terapia de corticosteroides falhou, e para os casos em que se deseja poupar o uso de esteroides para pacientes que apresentam efeitos colaterais significativos ao tratamento com corticosteroides (Langford, 1995, 2003; Jayne, 2000; Watts, 2000). O uso de glicocorticosteroides melhorou significativamente o prognóstico da doença, prolongando a taxa de sobrevida de 5 anos de 13% para 50 a 60%. Embora a maioria dos casos de morte ocorra em 1 ano, seja antes ou após esse período, a mortalidade resulta com maior frequência de infecção, complicação do tratamento ou sequelas de obliteração vascular, como infarto do miocárdio ou derrame (Langford, 1995). A poliarterite nodosa associada à hepatite infecciosa e à infecção pelo HIV deve ser tratada com medicação antiviral ou antirretroviral, respectivamente (Langford, 2003).

Síndrome de Churg-Strauss

Epidemiologia

A síndrome de Churg-Strauss é uma condição clínica rara, cuja prevalência foi estimada em 3 a cada um milhão de indivíduos (Conn, 1993; Langford, 2003). Essa síndrome normalmente tem início entre 15 e 69 anos, sendo 38 a média da idade em que a vasculite aparece pela primeira vez (Langford, 1995).

Aspectos clínicos

A síndrome de Churg-Strauss, também chamada granulomatose e angiite alérgica, é uma vasculite necrotizante sistêmica que se caracteriza por ocorrência de inflamação granulomatosa vascular e extravascular, envolvimento de múltiplos órgãos e associação com rinite alérgica, asma severa, febre e hipereosinofilia (Fauci, 1998; Langford, 1995, 2003). As manifestações clínicas da síndrome de Churg-Strauss podem assemelhar-se em diversos aspectos àquelas da poliarterite nodosa, entretanto, diferem no sentido de que a doença pulmonar é típica e a doença renal é infrequente, além de usualmente menos severas na síndrome de Churg-Strauss do que na poliarterite nodosa (Fauci, 1998).

O curso clínico da síndrome de Churg-Strauss com frequência divide-se em três fases distintas, embora na realidade essas fases nem sempre sejam identificáveis ou possam apresentar sobreposição (Langford, 1995, 2003): (1) uma fase prodrômica caracterizada por doença respiratória alérgica; (2) uma fase eosinofílica caracterizada por hipereosinofilia no sangue periférico e nos tecidos; e (3) uma fase vasculítica. O envolvimento cardíaco, seja uma cardite eosinofílica transmural ou uma vasculite coronária, ocorre em 25 a 62% dos pacientes e constitui a principal causa de morte (Langford, 1995, 2003). Existe uma associação entre mal prognóstico e envolvimento de sítios como coração, SNC, trato gastrintestinal e rins (Langford, 2003).

Achados laboratoriais clínicos

Uma das características mais marcantes da síndrome de Churg-Strauss é a notável eosinofilia periférica, que pode ser observada em qualquer fase da doença. A contagem de eosinófilos periféricos chega a mil eosinófilos/μL em pelo menos 80% dos pacientes (Conn, 1993). Entretanto, alguns pacientes podem não apresentar eosinofilia se tiverem se submetido previamente a tratamentos com esteroides para asma ou para a ampla e rápida flutuação das contagens de eosinófilos que ocorre nesse distúrbio. A normalização da contagem de eosinófilos em reposta ao tratamento com esteroides é uma característica da síndrome de Churg-Strauss, e permite distingui-la da síndrome hipereosinofílica, cuja eosinofilia pode ser resistente a esse tratamento. O grau de eosinofilia pode apresentar correlação com a atividade da doença vasculítica em alguns pacientes.

Os demais achados laboratoriais são inespecíficos. Anemia, leucocitose e aumento da ESR com frequência acompanham a fase vasculítica. Pode haver elevação dos níveis séricos de IgE. Os títulos de FR no soro em geral são baixos. Há relatos de que os níveis séricos de complemento permanecem normais (Conn, 1993). Diferentemente da poliarterite nodosa, não foi descrita nenhuma associação entre a síndrome de Churg-Strauss e a hepatite B (Langford, 1995).

Diagnóstico

Historicamente, o diagnóstico da síndrome de Churg-Strauss baseia-se apenas na demonstração da vasculite eosinofílica necrotizante, da infiltração tecidual eosinofílica e do granuloma extravascular. Na prática, contudo, são poucas as biópsias que contêm todos esses achados. Para aumentar as chances de identificar e diagnosticar a síndrome de Churg-Strauss, em vez de enfatizar esses indicadores diagnósticos, deveriam ser considerados os aspectos clínicos. Para tanto, foram recomendados os seguintes critérios:

1. asma (Katzenstein, 2000);
2. eosinofilia no sangue periférico, com excesso de $1{,}5 \times 10^3$ células/μL;
3. vasculite sistêmica envolvendo dois ou mais órgãos extrapulmonares (Conn, 1993).

O diagnóstico definitivo ainda requer a comprovação da vasculite por biópsia. Uma biópsia pulmonar aberta não confirma todos os aspectos histológicos da síndrome de Churg-Strauss e deve ser considerada antes da instituição da terapia, caso haja alguma preocupação relacionada a uma possível infecção. Quando os sintomas clínicos assim indicam, com frequência as amostras mais úteis para a biópsia são obtidas de músculos, nervo sural, próstata e rim. O diagnóstico diferencial da síndrome de Churg-Strauss inclui poliarterite nodosa, granulomatose de Wegener e síndrome hipereosinofílica (Langford, 1995, 2003).

Tratamento e prognóstico

Os corticosteroides constituem a base do tratamento. A utilidade da terapia imunossupressora com azatioprina ou ciclofosfamida precisa ser melhor estudada (Langford, 1995). O diagnóstico precoce da síndrome de Churg-Strauss e o tratamento com corticosteroides resultam em uma taxa de sobrevida de 5 anos igual a 62%. Insuficiência cardíaca congestiva e infarto do miocárdio são responsáveis por 48% dos casos de morte na síndrome de Churg-Strauss. Hemorragia cerebral, insuficiência renal, perfuração ou hemorragia gastrintestinal, estado asmático e insuficiência respiratória também constituem causas de morte entre os pacientes com a síndrome. Todos esses aspectos devem apontar para a forte consideração de uma terapia com agente citotóxico (ciclofosfamida) combinada à administração de corticosteroides (Langford, 1997). O encurtamento do intervalo entre o aparecimento da asma e o início da vasculite é considerado um sinal de prognóstico desfavorável.

Poliangiite microscópica

Epidemiologia

A poliangiite microscópica foi distinguida recentemente da poliarterite nodosa, e pouco se conhece acerca de sua epidemiologia.

Aspectos clínicos

A poliangiite microscópica acomete um grupo heterogêneo de pacientes que, por definição, apresentam vasculite necrotizante sistê-

mica em pequenos vasos com pouca ou nenhuma imunodeposição (Langford, 2003). Os aspectos sinalizadores da poliangiite microscópica são glomerulonefrite, hemorragia pulmonar, mononeurite múltipla e febre, de modo similar à granulomatose de Wegener (Langford, 2003; Seo, 2004b). Trata-se de uma condição cuja apresentação com frequência é aguda e severa. A doença neurológica (periférica ou central) manifesta-se em 60 a 70% dos casos, enquanto as artralgias/artrite estão presentes em 40 a 60% dos pacientes e a doença cutânea apresenta uma incidência de 50 a 65% (Langford, 2003).

Achados laboratoriais e clínicos

Radiografias torácicas revelam a presença de nódulos, infiltrados ou hemorragia alveolar em até 70% dos pacientes. Proteinúria e hematúria compatíveis com glomerulonefrite ocorrem em 75 a 90% dos pacientes. A eletromiografia/velocidade de condução nervosa fornece evidências de doença neurológica periférica em até 2/3 dos pacientes. Imagens obtidas do SNC evidenciam a existência de uma doença neurológica central em 10% dos indivíduos acometidos pela poliangiite microscópica (Langford, 2003).

Diagnóstico

A poliangiite microscópica é diagnosticada quando o exame de biópsia detecta a vasculite necrotizante não granulomatosa de vasos de pequeno a médio calibre. Nos pulmões, os capilares são observados em face da hemorragia alveolar e na ausência da imunofluorescência linear observável na síndrome de Goodpasture. A biópsia renal revela uma glomerulonefrite necrotizante segmentar com poucos ou nenhum imunocomplexo (Langford, 2003).

Tratamento e prognóstico

Pacientes que correm risco de morte por apresentarem doenças em pulmões, rins ou nervos devem ser tratados com ciclofosfamida (2 mg/kg/dia) e prednisona (1 mg/kg/dia), de modo semelhante ao tratamento da granulomatose de Wegener (ver a seguir) (Langford, 2003). A doença menos severa pode ser tratada apenas com corticosteroides. Estima-se uma sobrevida de 5 anos de 74%, com 1/3 dos pacientes apresentando recidivas (Langford, 2003).

Granulomatose de Wegener

Epidemiologia

Faltam informações detalhadas sobre a prevalência e a incidência anual da granulomatose de Wegener, contudo, estima-se que essa condição seja menos comum do que a poliarterite nodosa. A granulomatose de Wegener acomete indivíduos de qualquer idade, raça ou sexo, embora afete predominantemente caucasianos e apresente uma discreta prevalência na população masculina (Conn, 1993). A média de idade dos pacientes no momento em que a condição aparece é 41 anos (Langford, 1995). Homens e mulheres são igualmente afetados (Langford, 2003).

Aspectos clínicos

A granulomatose de Wegener é uma síndrome clinicopatológica de etiologia desconhecida, caracterizada patologicamente por inflamação granulomatosa necrotizante dos tratos respiratórios superior e inferior, glomerulonefrite segmentar focal e vasculite necrotizante, envolvendo sobretudo pequenas e médias artérias. A granulomatose de Wegener manifesta-se na região ouvido/nariz/garganta como sinusite, obstrução ou ulceração nasal, otite média ou perda da audição (Lie, 1989; Fauci, 1998). Cerca de 45% dos pacientes apresentam envolvimento pulmonar quando a doença se manifesta, e 85% desenvolvem doença pulmonar em algum momento durante o curso da granulomatose. As manifestações pulmonares comuns são infiltração pulmonar, nódulos pulmonares, hemoptise ou pleurite (Fauci, 1998). Embora a doença renal inicialmente aflija apenas cerca de 18% desses pacientes, 80% deles apresentam glomerulonefrite em algum momento ao longo do curso da síndrome (Fauci, 1998). Outros sinais comuns de doença sistêmica incluem erupções cutâneas, artralgias, febre, manifestações oculares e perda de peso (Lie, 1989; Fauci, 1998). Embora tenham sido descritos pacientes com granulomatose de Wegener limitada ao trato respiratório sem envolvimento renal ("granulomatose de Wegener limitada"), mais de 50% dos pacientes com essa forma limitada da doença eventualmente desenvolvem doença mais generalizada (Langford, 1995).

Achados laboratoriais clínicos

Os achados laboratoriais clínicos típicos da granulomatose de Wegener incluem leucocitose moderada sem eosinofilia marcante, anemia normocrômica discreta e trombocitose (Conn, 1993; Langford, 1995). O paciente sem tratamento não apresenta leucopenia e esse achado ajuda a distinguir a granulomatose de Wegener de outras condições. A presença de c-ANCA sustenta o diagnóstico. Imunocomplexos circulantes, quantificáveis por ligação ao C1q, podem ser detectados em presença de níveis normais de complemento e de hipergamaglobulinemia. Os níveis de IgA com frequência estão aumentados (Conn, 1993; Langford, 1995). Os indicadores de envolvimento glomerular são hematúria microscópica ou bruta, proteinúria, cilindros de hemácias e/ou níveis elevados de creatinina sérica e BUN. Mais de 50% dos pacientes são positivos para FR, contudo, usualmente, são negativos para ANA (Langford, 1995; Fauci, 1998). Testes sorológicos para detecção de autoanticorpos anti-GBM resultam negativos. Antes do tratamento, 80% desses pacientes apresentam ESR elevada.

Diagnóstico

Embora os achados clínicos e laboratoriais possam ser sugestivos, o diagnóstico da granulomatose de Wegener deve ser estabelecido apenas mediante comprovação por biópsia, confirmação histológica ou detecção de c-ANCA em paciente com sinusite, infiltração ou nódulos pulmonares e glomerulonefrite (Langford, 1998b, 2003). O tecido pulmonar obtido por meio de biópsia aberta de pulmão proporciona a melhor oportunidade para estabelecer um diagnóstico acurado (Langford, 1995). Em 90% dos casos, uma biópsia transbronquial não fornece tecido adequado para determinação do diagnóstico. Embora o tecido oriundo da cabeça e do pescoço seja mais diretamente acessível, aspectos patológicos característicos são observados em menos de 23% dessas amostras de biópsia. O tecido com utilidade diagnóstica proveniente da região da cabeça e do pescoço é melhor obtido (em ordem de frequência decrescente) a partir dos seios paranasais, do tecido nasal e da região subglótica. As alterações glomerulares presentes no tecido de biópsia renal, embora sejam sugestivas de granulomatose de Wegener, raramente são diagnosticadas (Langford, 1995).

Apesar do amplo espectro morfológico da granulomatose de Wegener, a lesão patológica que constitui a principal característica dessa condição é a vasculite granulomatosa necrotizante. Os vasos afetados sofrem necrose fibrinoide com infiltração inicial de leucócitos polimorfonucleares e, em seguida, de células mononucleares. O tecido pulmonar pode revelar a existência de qualquer combinação de necrose, vasculite e inflamação granulomatosa. Também pode haver microabscessos e células gigantes multinucleadas dispersas em um fundo intensamente inflamatório (Yi, 2001) (Fig. 51.5). Todavia, as amostras de biópsia geralmente não incluem todos esses aspectos característicos. O achado, em geral, mais observado no exame da biópsia renal é a glomerulonefrite necrotizante segmentar, que está presente em vários graus em 80% das amostras. A vasculite renal não associada aos glomérulos é incomum e ocorre em apenas 8% das biópsias.

Vários distúrbios mimetizam a granulomatose de Wegener, tais como doenças infecciosas ou doenças granulomatosas não infecciosas, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de Goodpasture, granuloma de linha média idiopático, granulomatose linfomatoide e neoplasmas das vias aéreas superiores ou de pulmão (Fauci, 1998). Dentre essas condições, a infecção constitui uma importante consideração, visto que um diagnóstico equivocado pode ter consequências fatais se for tratado de forma indevida com terapia imunossupressora (Langford, 1995).

Tratamento e prognóstico

O regime de administração diária de ciclofosfamida e corticosteroides por via oral é a terapia de escolha para a granulomatose de Wegener. Empregando esse regime, os National Institutes of Health relataram obtenção de uma melhora notável ou remissão parcial em 91% dos pacientes, e remissão total em 75% dos casos. Foi observada

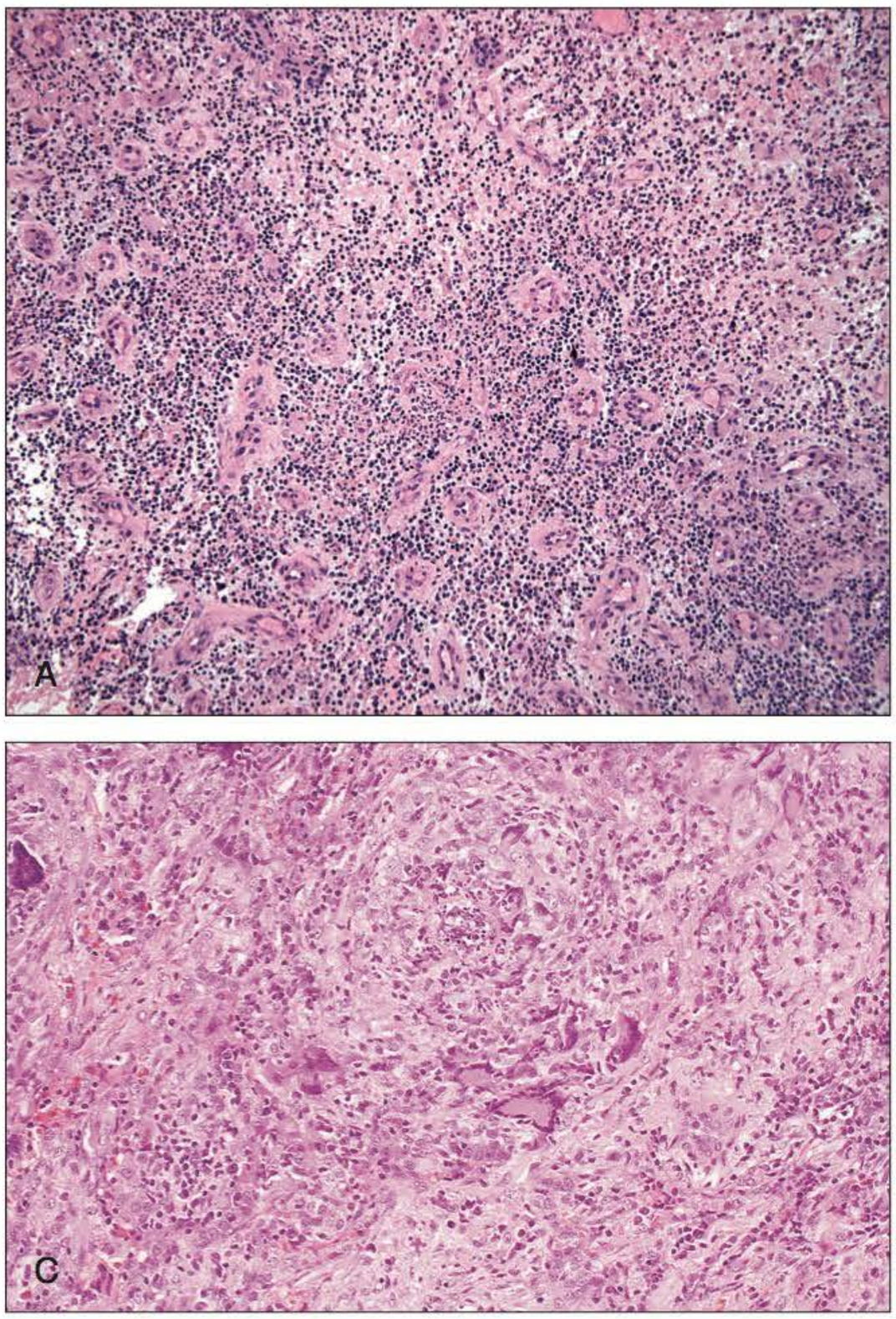


Figura 51.5 Granulomatose de Wegener. O tecido do seio paranasal revela a presença de um infiltrado de células inflamatórias mistas florido em um fundo do tipo de tecido de granulação. As células inflamatórias são células gigantes multinucleadas e microabscessos de neutrófilos (*A*, H&E, × 200). A biópsia de pulmão mostra a ocorrência de inflamação nodular com necrose (*B*, H&E, × 20) e de vasculite granulomatosa (*C*, H&E, × 200).

uma taxa de mortalidade geral de 20%, dos quais 13% puderam ser parcial ou completamente atribuídos à granulomatose de Wegener. Apesar da acentuada melhora em termos de sobrevida e remissão, comparativamente à mortalidade de 100% entre os pacientes não tratados, também houve casos de recidiva e morbidade associados tanto à doença quanto ao tratamento. Metade dos casos de remissão completa foram seguidos da ocorrência de pelo menos um episódio de recaída decorridos em 3 meses a 16 anos da remissão (Langford, 1995; de Groot, 2001). O metotrexato representa uma alternativa ao uso da ciclofosfamida para pacientes com doenças que constituam ameaça imediata à vida (Langford, 1997). Do mesmo modo, metotrexato (entre 20 e 25 mg/semana) ou azatioprina (2 mg/kg/dia) podem ser administrados para manutenção da remissão após 3 a 6 meses de tratamento indutor de remissão com ciclofosfamida. Essa terapia é instituída por mais 1 ou 2 anos (Langford, 2003). Durante o primeiro ano do curso da granulomatose de Wegener, a extensão da doença renal representa o fator mais proximamente relacionado ao prognóstico (Koldingsnes, 2002). Em seguida, o envolvimento pulmonar se torna o indicador prognóstico mais importante e a glomerulonefrite parece não afetar o prognóstico de maneira significativa.

Granulomatose linfomatoide

A granulomatose linfomatoide é considerada um distúrbio linfoproliferativo incomum, que evolui para linfoma maligno em cerca de 50% dos pacientes. A granulomatose linfomatoide afeta sobretudo os pulmões, nos quais mimetiza clinicamente a granulomatose de Wegener. Entretanto, os achados histológicos característicos incluem uma proeminente infiltração de vasos sanguíneos ("angiocêntrica") e uma destruição que mimetiza vasculite (Fig. 51.6), contudo a morfologia celular é mais sugestiva de linfoma ou distúrbio linfoproliferativo (Langford, 1995). Não existem testes laboratoriais clínicos específicos.

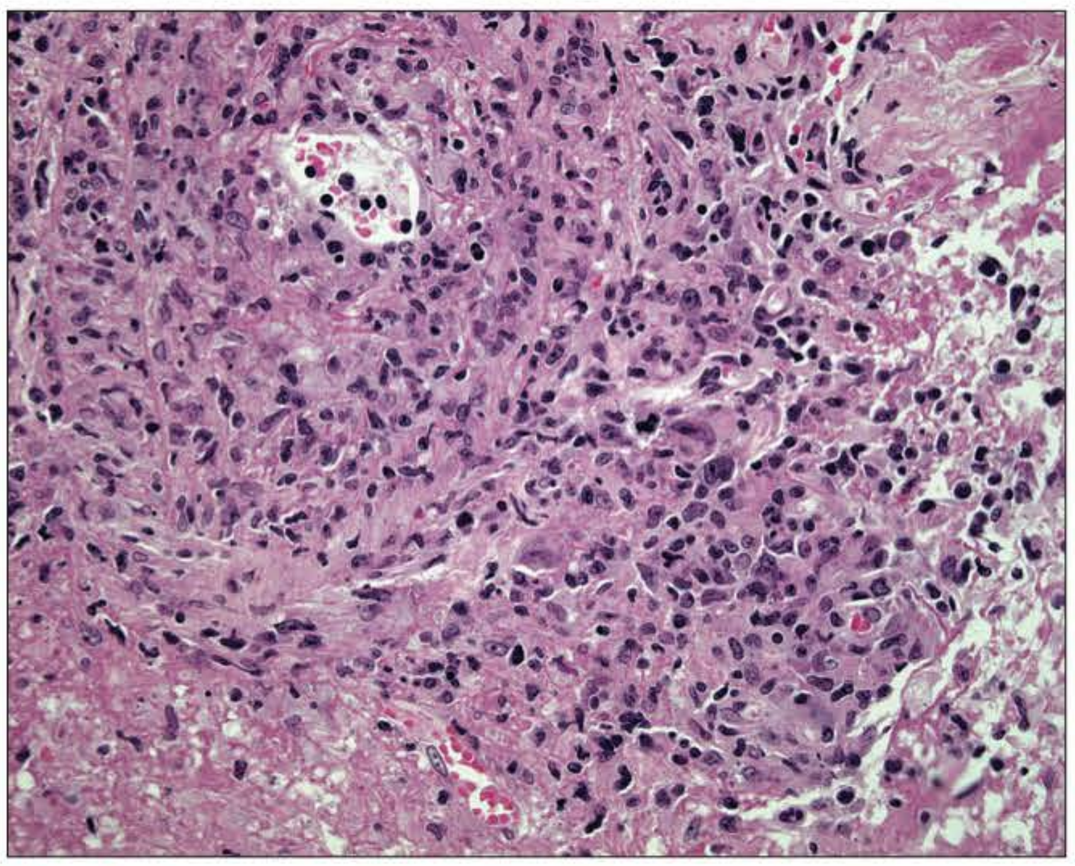


Figura 51.6 Granulomatose linfomatoide. A biópsia de pulmão revela a presença de misturas de células linfoides atípicas e histiócitos, com proeminente infiltração de vaso sanguíneo ("angiocêntrica") e destruição mimetizando vasculite. As células linfóides atípicas são células B malignas (H&E, × 400; cortesia do dr. Robert W. Sharpe).

Púrpura de Henoch-Schönlein

Epidemiologia

A púrpura de Henoch-Schönlein ocorre primariamente em crianças na faixa etária de 4 a 11 anos (Conn, 1993), no entanto, também aflige

alguns indivíduos adultos. Essa condição se manifesta durante a primavera e, de forma clássica, segue-se a uma infecção no trato respiratório superior (Conn, 1993; Langford, 2003). A púrpura de Henoch-Schönlein afeta sobretudo indivíduos do sexo masculino, com uma predominância de 3:2 (Langford, 1995).

Aspectos clínicos

A púrpura de Henoch-Schönlein, por vezes referida como púrpura anafilactoide, é uma vasculite sistêmica de pequenos vasos, classificada como um subgrupo de vasculite de hipersensibilidade. Sua etiologia é desconhecida. Os achados clínicos incluem púrpura palpável não trombocitopênica, artralgias, doença renal e anomalias envolvendo o trato gastrintestinal (Langford, 1995, 2003). Cerca de 70% dos pacientes com púrpura de Henoch-Schönlein manifestam sinais e sintomas gastrintestinais, incluindo dores de cólicas abdominais associadas a náusea e vômitos, presença de sangue ou muco nas fezes, hemorragia gastrintestinal com risco de vida e intussuscepção (Langford, 1995). A doença renal associada é caracterizada pela glomerulonefrite proliferativa focal, cuja expressão clínica varia de hematúria isolada com presença de cilindros de hemácias, insuficiência renal aguda, até insuficiência renal (Lie, 1989; Langford, 1995; Fauci, 1998).

Achados clínicos e laboratoriais

Os estudos laboratoriais clínicos em púrpura de Henoch-Schönlein são inespecíficos e primariamente úteis para a exclusão de outros distúrbios, bem como na procura de evidências do envolvimento renal. Podem ser observadas leucocitose e ESR elevada. A realização de testes para determinação da contagem sanguínea completa acompanhada da contagem de plaquetas e da medida da coagulação são importantes na avaliação da púrpura cutânea. No caso da púrpura de Henoch-Schönlein, a púrpura não decorre da trombocitopenia. O exame de fezes com guaiaco deve ser realizado de modo intermitente para obtenção de evidências de perda de sangue oculto. Os níveis séricos de complemento usualmente permanecem normais, embora haja relatos da existência de uma associação entre a púrpura de Henoch-Schönlein e a ausência congênita da molécula C2 do complemento (Conn, 1993). Urinálise e determinação dos níveis de creatinina sérica devem ser realizadas no início da manifestação da doença e, subsequentemente, duas vezes por semana, até o desaparecimento dos sinais sistêmicos (Langford, 1995). O exame de biópsia cutânea da púrpura revela a ocorrência de vasculite com deposição de IgA (Langford, 2003) (Fig. 51.7).

Diagnóstico

O diagnóstico da púrpura de Henoch-Schönlein raramente é difícil, a não ser quando o envolvimento de outros sítios importantes precede o aparecimento da púrpura palpável. Diferente de outras vasculites necrotizantes sistêmicas, seu diagnóstico é clínico e os estudos laboratoriais são empregados para excluir outros distúrbios. A biópsia renal, que aponta a glomerulonefrite proliferativa, tipicamente é desnecessária ao diagnóstico, embora seja utilizada para avaliar o grau de severidade da doença e estimar seu prognóstico. Os distúrbios a serem considerados no diagnóstico diferencial incluem aqueles que causam abdômen agudo, nefrite ou púrpura (Langford, 1995).

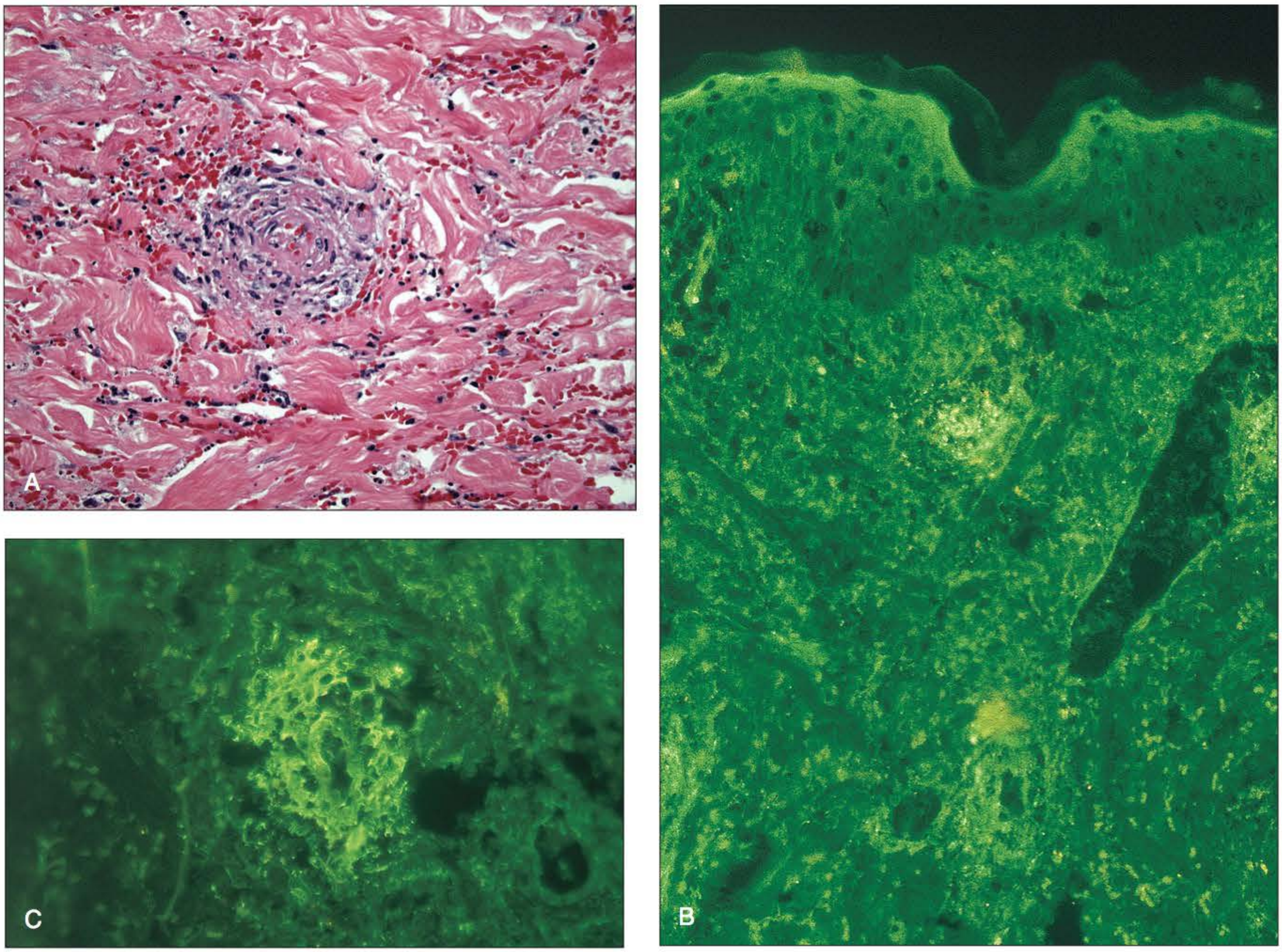


Figura 51.7 Púrpura de Henoch-Schönlein. A biópsia de pele mostra uma vasculite leucocitoclástica com necrose fibrinoide de pequenos vasos sanguíneos na derme superficial, associada a uma quantidade abundante de debris leucocitoclásticos nucleares perivasculares (*A*, H&E, × 400). A imunofluorescência direta da biópsia de pele revela a imunofluorescência vascular granular da IgA (*B*, × 200) e correspondente à imunofluorescência do fibrinogênio vascular e perivascular (*C*, × 500).

Tratamento e prognóstico

O tratamento é de suporte, sendo que não há tratamento específico com benefícios comprovados para a nefrite na púrpura de Henoch-Schönlein. Embora os glicocorticoides possam ser úteis para a redução do edema, da dor articular e do desconforto abdominal, a terapia prolongada com essa substância não tem utilidade, pois não diminui o risco de doença recorrente nem melhora o prognóstico renal (Langford, 1995). Agentes não salicílicos utilizados para analgesia podem suavizar a articulação e o desconforto associado aos tecidos moles. A terapia destinada a pacientes adultos é similar à terapia pediátrica, embora haja necessidade de controlar cuidadosamente a hipertensão nos primeiros (Langford, 1995).

Essa doença, em geral autolimitada e com duração de 6 a 16 semanas, tem um bom prognóstico (Conn, 1993). A taxa de mortalidade é de aproximadamente 1 a 3% (Langford, 1995) e a doença renal constitui a principal causa de morte (Langford, 1995). O pior resultado está associado aos pacientes que apresentam nefrite aguda, em especial síndrome nefrótica, com menos de 50% dos indivíduos afetados recuperando a normalidade da função renal e da urinálise em um período de 2 anos. O percentual de glomérulos com crescentes também pode ser útil como indicador prognóstico, contudo, é importante notar que o curso da púrpura de Henoch-Schönlein pode ser extremamente variável. Pacientes que apresentam anomalias clínicas ou histológicas severas podem se recuperar por completo, enquanto aqueles com alterações discretas podem evoluir para insuficiência renal. A doença reaparece em 25 a 40% dos pacientes, consistindo principalmente em manifestações cutâneas. A deterioração ou a melhora podem ser mais evidentes durante os primeiros 2 ou 3 anos após a resolução do episódio agudo, embora alterações significativas no resultado também tenham sido observadas mais tardiamente. O acompanhamento regular, com medidas da pressão sanguínea e urinálise, é extremamente importante pelo menos durante os primeiros 5 anos após um episódio de púrpura de Henoch-Schönlein (Langford, 1995, 2003).

Arterite (temporal) de célula gigante

Epidemiologia

A arterite de célula gigante é um distúrbio vasculítico relativamente comum. Estudos epidemiológicos demonstraram o aumento da incidência com o avanço da idade. Um estudo que incluiu arterite de célula gigante comprovada por biópsia demonstrou taxa de incidência anual da ordem de 23,3 a cada cem mil indivíduos com mais de 50 anos de idade (Conn, 1993). Quase todos os casos de arterite de célula gigante benigna ocorrem após os 50 anos e são duas vezes mais frequentes entre as mulheres do que na população masculina (Langford, 2003).

Aspectos clínicos

A arterite de célula gigante é uma doença sistêmica caracterizada por inflamação vascular granulomatosa, com envolvimento de médias e grandes artérias. Apesar de múltiplos sítios arteriais poderem ser afetados, a arterite de célula gigante classicamente envolve a artéria temporal e/ou outros ramos da artéria carótida (Fauci, 1998). As manifestações clínicas incluem febre, dor de cabeça, diplopia e claudicação mandibular em pacientes com mais de 50 anos de idade. A neurite óptica isquêmica pode provocar cegueira repentina, em especial nos pacientes não tratados (Fauci, 1998). A arterite de célula gigante está intimamente associada à polimialgia reumática, que se caracteriza por rigidez e dor no pescoço, nos ombros, na parte inferior das costas, nos quadris e nas coxas, podendo piorar de manhã e melhorar com a realização de atividades ao longo do dia (Fauci, 1998; Langford, 2003). Os achados do exame físico podem incluir sensibilidade na artéria temporal, nodularidade e ausência de pulsações (Langford, 2003).

Achados laboratoriais clínicos

Os achados laboratoriais clínicos incluem ESR elevada e anemia normocrômica. Os níveis séricos de fosfatase alcalina comumente estão altos. Há relatos de desenvolvimento de hipergamaglobulinemia e aumento dos níveis de complemento e imunocomplexos (Fauci, 1998).

Diagnóstico

O diagnóstico é feito com base na identificação das manifestações clínicas típicas, bem como na identificação de uma elevada ESR em paciente idoso que pode ou não apresentar sintomas de polimialgia reumática (Fauci, 1998). O diagnóstico é confirmado por biópsia da artéria temporal mostrando um infiltrado panmural de células mononucleares, que pode ser granulomatoso e conter células gigantes, tipicamente revelando o rompimento da lâmina elástica interna (Langford, 2003) (Fig. 51.8).

Tratamento e prognóstico

A arterite de célula gigante é tratada com glicocorticoides, sendo que a resposta clínica a essa terapia em geral é dramática. O prognóstico é bom, visto que a maioria dos pacientes apresenta remissão total mantida após a terapia com glicocorticoides (Fauci, 1998). Infelizmente, o indivíduo afetado pela cegueira secundária à arterite de célula gigante raramente recupera a visão, mesmo quando tratado com rapidez e elevadas concentrações de corticosteroides (Hayreh, 2002). O tratamento começa com 60 mg de prednisona ao dia, sendo iniciada a administração afunilada em 2 ou 4 semanas. Os pacientes com frequência necessitam receber esse tratamento durante 2 anos (Langford, 2003).

Arterite de Takayasu

Epidemiologia

Assim como diversas vasculites idiopáticas, a arterite de Takayasu é incomum e sua epidemiologia atualmente é pouco conhecida. Esse distúrbio é mais prevalente em adolescentes e mulheres jovens, na faixa etária de 10 a 30 anos. De fato, 80 a 90% dos casos ocorrem em mulheres. Embora seja mais comum no Japão, não há comprovação de que essa doença apresente restrição racial ou geográfica (Conn, 1993; Fauci, 1998).

Aspectos clínicos

A arterite de Takayasu é uma vasculite granulomatosa de médias e grandes artérias elásticas, que causa estenose, oclusão ou aneurisma vascular. Apresenta forte predileção pelo arco aórtico e seus ramos maiores, incluindo as artérias pulmonares (Langford, 1995, 2003; Fauci, 1998; Johnston, 2002). Esse distúrbio por vezes é denominado síndrome do arco aórtico ou doença da ausência de pulsação. Os pacientes apresentam sintomas sistêmicos agudos, tais como febre, mal-estar, sudorese noturna e perda de peso. A isquemia nos órgãos que recebem suprimento sanguíneo pelo(s) vaso(s) afetado(s) produz sinais e sintomas órgão-específicos (Smetana, 2002). Na obstrutiva

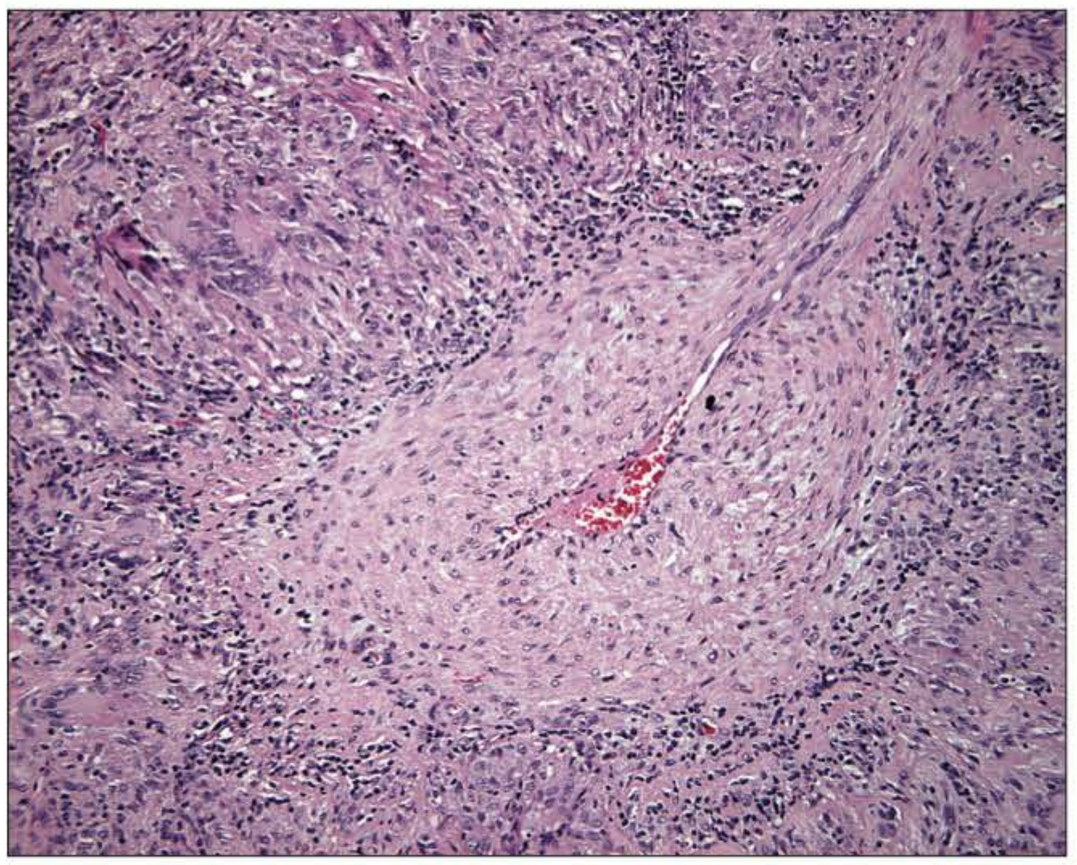


Figura 51.8 Arterite de célula gigante (temporal). A biópsia da artéria temporal revela infiltração pan-mural de células mononucleares com uma concentração proeminente de células gigantes associada ao rompimento da lâmina elástica interna (H&E, × 200).

crônica, a pulsação arterial diminui ou está ausente nas artérias envolvidas (Langford, 1995), mais comumente na artéria subclávia (Fauci, 1998). Ruídos vasculares e hipertensão são comuns (Langford, 1995). Outros achados incluem regurgitação, cardiomegalia secundária à hipertensão aórtica ou pulmonar e derrame (Fauci, 1998). A arterite de Takayasu pode evoluir lentamente, estabilizar ou provocar a rápida morte do paciente (Fauci, 1998).

Achados laboratoriais clínicos

Os estudos laboratoriais da arterite de Takayasu definem um distúrbio inflamatório sistêmico (Langford, 1995). A ESR está elevada em 7 a 100% dos pacientes com doença ativa e tende a normalizar-se ao longo do tempo. A ESR é considerada um índice de atividade inflamatória confiável e por isso tem sido utilizada para monitorar a efetividade da terapia. Foi demonstrado que a resolução da doença, em termos sintomáticos e angiograficamente, está correlacionada com a queda da ESR, embora a série de estudos cirúrgicos tenha descrito que 44% dos pacientes clinicamente silenciosos não foram submetidos à biópsia arterial (Langford, 2003).

Os estudos hematológicos com frequência revelam a ocorrência de anemia normocrômica de grau leve a moderado e/ou leucocitose discreta. Os resultados dos testes de detecção de FR e ANA normalmente são negativos. Pode haver hipergamaglobulinemia, hiperfibrinogenemia e hipoalbuminemia (Conn, 1993). Imunocomplexos circulantes podem estar presentes em até 50% desses pacientes, contudo, aparentemente não apresentam correlação com a atividade da doença.

Diagnóstico

A arterite de Takayasu é diagnosticada com base na correlação dos dados fornecidos por história, exame físico e angiografia. A doença deve ser considerada como possibilidade diagnóstica em qualquer mulher jovem que apresente ausência ou diminuição acentuada da frequência de pulsação periférica, discrepâncias de pressão sanguínea e/ou ruídos arteriais (Fauci, 1998). Os achados angiográficos característicos ajudam a confirmar o diagnóstico clínico. Raramente há necessidade ou é realizada uma biópsia para confirmação tecidual do diagnóstico clínico (Fauci, 1998; Langford, 2003). A predileção dessa síndrome por mulheres jovens constitui um aspecto importante que com frequência distingue a doença de outros diagnósticos possíveis, em particular da arterite de célula gigante (Langford, 1995).

Tratamento e prognóstico

Em pacientes com doença ativa, a terapia à base de corticosteroides constitui o tratamento inicial de escolha. Quando a doença persiste mesmo com a administração dos corticosteroides, o paciente pode receber ciclofosfamida ou metotrexato. Agentes vasodilatadores, anticoagulantes e anti-inflamatórios não esteroidais são empregados para promoção de alívio sintomático. Pode haver necessidade de intervenção cirúrgica para tratamento da estenose ou da oclusão vascular sintomática (Langford, 1995; Hoffman, 2003).

O curso clínico da arterite de Takayasu é variável. Embora ocorram remissões espontâneas, a maioria dos pacientes requer tratamento. O prognóstico parece estar associado à presença e ao grau de severidade de complicações. As principais complicações são retinopatia de Takayasu, hipertensão secundária, insuficiência da válvula aórtica e aneurisma aórtico/arterial (Langford, 1995). A sobrevida geral declina de 72 a 97%, aos 5 anos, para 59%, aos 10 anos, conforme aumenta o número e/ou a severidade das complicações (Langford, 1995; Nordborg, 2003). As mortes associadas à doença usualmente decorrem de complicações vasculares, como insuficiência cardíaca congestiva, derrame, infarto do miocárdio e ruptura de aneurisma (Langford, 1995).

Angiite primária do sistema nervoso central

Epidemiologia

A angiite primária do sistema nervoso central (APSNC) é uma condição rara, em que na dificuldade para estabelecer um diagnóstico definitivo entravam os estudos epidemiológicos. A APSNC é um pouco mais comum em homens do que em mulheres (4:3), e afeta indivíduos com idade média de 43 anos (Langford, 1995).

Aspectos clínicos

Pacientes com APSNC apresentam dores de cabeça, déficits neurológicos focais e alteração do estado mental, paraparesia, quadriparesia, neuropatias craniais, convulsões e ataxia (Calabrese, 1997; Fauci, 1998). Os sintomas iniciais são mais generalizados, enquanto os sintomas e os sinais focais em geral se desenvolvem mais tardiamente no curso da doença (Langford, 1995). Em 15% dos casos, há envolvimento da medula espinal (Calabrese, 1997). O curso pode evoluir de modo rápido ou aumentar e diminuir no decorrer de um longo período. Sintomas sistêmicos são raros.

Achados laboratoriais clínicos

Os estudos laboratoriais são inúteis para o estabelecimento do diagnóstico de APSNC, contudo exercem papel importante na exclusão de outros processos patológicos. A maioria dos pacientes apresenta ESR elevada. Apenas 17% dos pacientes desenvolvem anemia, enquanto os demais parâmetros hematológicos em geral permanecem normais. FR, ANA e ANCA tipicamente estão ausentes. Todavia, o líquido cerebrospinal (LCE) costuma estar anormal, apresentando aumento da pressão de abertura, concentração proteica elevada e pleiocitose linfocítica. Por outro lado, também é possível que o LCE esteja absolutamente normal e, nesse caso, os testes nem sempre excluem a possibilidade de vasculite (Langford, 1995).

Diagnóstico

O diagnóstico da APSNC continua sendo baseado na exclusão. Os critérios diagnósticos propostos incluem disfunção do SNC, que não pode ser explicada por meio de investigação clínica, laboratorial ou neurológica; registro com angiogramas e/ou biópsia de arterite junto ao SNC; e ausência de evidências de vasculite sistêmica ou outra condição que apresente aspectos angiográficos ou patológicos secundários.

Dada a dificuldade em termos de segurança com relação a esse último critério, e também porque a angiografia apresenta baixa capacidade de discriminar as formas inflamatória e não inflamatória de doença vascular (Calabrese, 1997), as biópsias de SNC são pouco utilizadas. O papel da biópsia cerebral no diagnóstico da APSNC é controverso, embora seja defendido que o exame dessa biópsia é essencial para estabelecer um diagnóstico definitivo (Calabrese, 1997). A aplicação disseminada da biópsia cerebral é impedida não só por sua natureza invasiva, como também pela inconsistência da demonstração histológica da vasculite diante da natureza fragmentada desse processo. O rendimento da biópsia pode ser aprimorado por meio da obtenção de amostras do parênquima e dos vasos leptomeníngeos. Dada a dificuldade para obtenção, com segurança, de um diagnóstico dessa doença, torna-se do mesmo modo importante realizar a biópsia para excluir outras etiologias possíveis. Em termos de histologia, há uma inflamação mista segmentar acompanhada de necrose, que envolve principalmente as pequenas e médias artérias craniais. Também pode haver inflamação granulomatosa e com frequência é detectada trombose. As artérias extracraniais raramente estão envolvidas (Langford, 1995; Rhodes, 1995). Portanto, diagnósticos diferenciais devem ser cuidadosamente considerados em todos os casos, bem como utilizados para decidir quais testes são apropriados para sustentar o diagnóstico de APSNC e para excluir outros processos. A combinação de imagem de ressonância magnética e da análise do LCE apresenta forte valor preditivo negativo, além de excluir a possível consideração da APSNC na maioria das situações clínicas (Calabrese, 1997).

Tratamento e prognóstico

O tratamento agressivo é indicado para pacientes em que outros distúrbios já foram excluídos, para aqueles com diagnóstico de APSNC comprovado e quando há evidências de desenvolvimento de dificuldades neurológicas progressivas (Calabrese, 1997). Defende-se a terapia de combinação, utilizando corticosteroides e ciclofosfamida diária, ainda que o prognóstico da APSNC seja precário, com 60 a 70% dos pacientes morrendo em decorrência da doença em um período de 1 ano após o diagnóstico (Langford, 1995).

Doença de Kawasaki

A doença de Kawasaki – ou síndrome do linfonodo mucocutâneo – é uma forma de vasculite com envolvimento de pequenas e médias

artérias (Fig. 51.9). Essa doença ocorre tipicamente em crianças que apresentam linfadenite cervical e alterações na pele e nas membranas mucosas. A doença de Kawasaki usualmente é autolimitada, contudo a arterite causa aneurismas coronários em 25% dos pacientes. Até 3% dos pacientes morrem, geralmente em decorrência da vasculite coronária. Autoanticorpos dirigidos contra a célula endotelial foram detectados em pacientes com doença de Kawasaki (Fauci, 1998).

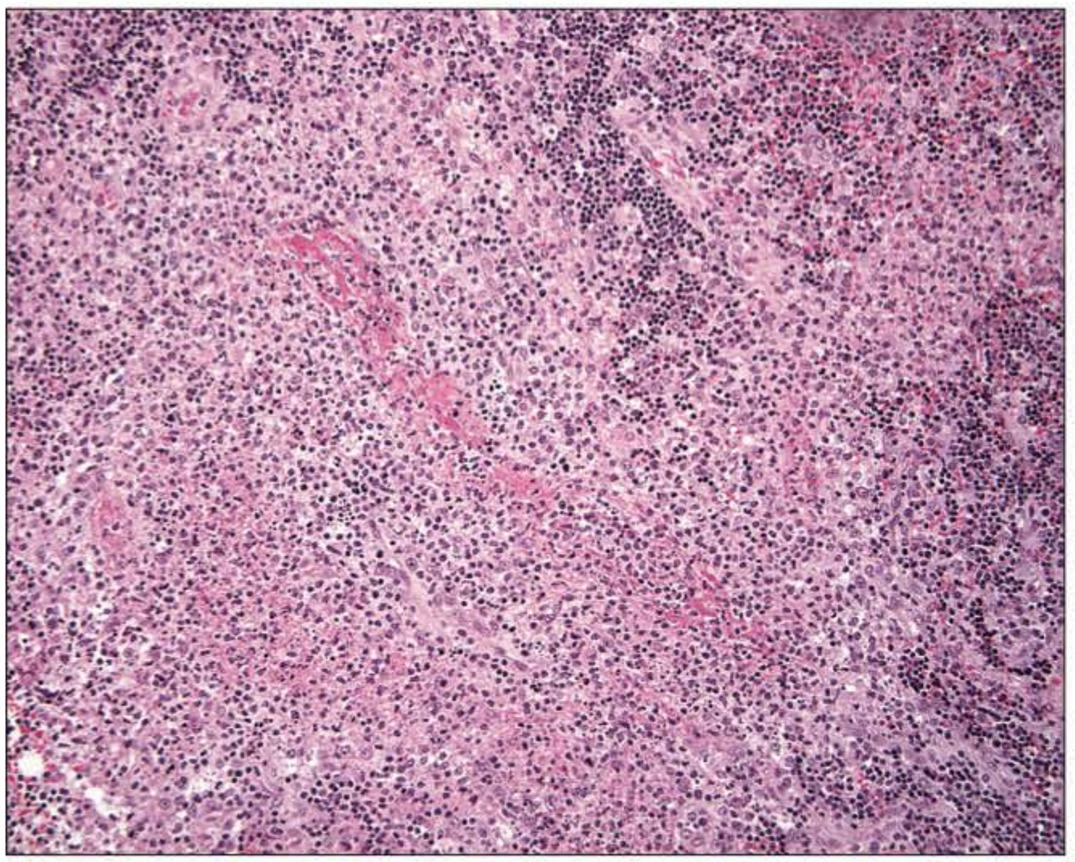


Figura 51.9 Doença de Kawasaki. A biópsia de linfonodo mostra a presença de vasculite necrotizante com trombos de fibrina e inflamação mista, incluindo neutrófilos (H&E, × 200; cortesia do dr. Robert W. Sharpe).

Resumo

O diagnóstico das vasculites necrotizantes sistêmicas idiopáticas requer alto grau de suspeita e pode ser uma tarefa difícil, em razão das numerosas considerações diagnósticas diferenciais. Não existem testes laboratoriais clínicos patognomônicos para pacientes com vasculites necrotizantes sistêmicas, contudo, há testes que são úteis para definir a extensão e os padrões de envolvimento dos órgãos. ANCA e suas associações com a vasculite necrotizante sistêmica, em particular a associação de c-ANCA com a granulomatose de Wegener, transformaram-se em um importante teste sorológico empregado para avaliar tais pacientes. Entretanto, clínicos e laboratoristas que utilizam esse teste devem possuir conhecimento abrangente de suas características operacionais, incluindo as limitações, conforme as condições em que o teste é executado no laboratório. A biópsia tecidual de sítio(s) sintomático(s) com confirmação histológica da vasculite necrotizante é considerada o procedimento laboratorial mais importante para o diagnóstico das vasculites necrotizantes sistêmicas.

Referências bibliográficas

Arimura Y, Minoshima S, Kamiya Y: Serum myeloperoxidase and serum cytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. Clin Nephrol 1993; 40:256–264.

Bonsib SM, Goeken JA, Kemp JD: Coexistent anti-neutrophil cytoplasmic antibody and antiglomerular basement membrane antibody associated disease = report of six cases. Mod Pathol 1993; 6(5):526–530.

Calabrese L, Duna GF, Lie JT: Vasculitis in the central nervous system. Arthritis Rheum 1997; 40:1189–1201.

Choi HK, Lamprecht P, Niles JL: Subacute bacterial endocarditis with positive cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-proteinase 3 antibodies. Arthritis Rheum 2000; 43:226–231.

Chowdhury SM, Broomhead V, Spickett GP: Pitfalls of formalin fixation for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies. J Clin Pathol 1999; 52:475–477.

Conn DL, Hunder GG, O'Duffy JD: Vasculitis and related disorders. *In* Kelley WN, Harris ED, Jr, Ruddy S, et al. (eds): Textbook of Rheumatology. 4th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993, p 1077.

De Groot K, Adu D, Savage CO, EUVAS (European Vasculitis Study Group): The value of pulse cyclophosphamide in ANCA-associated vasculitis: meta-analysis and critical review. Nephrol Dial Transplant 2001; 16:2018–2027.

Deguchi Y, Shibata N, Kishimoto S: Enhanced expression of the tumour necrosis factor/cachectin gene in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic vasculitis. Clin Exp Immunol 1990; 81:311–314.

Ellerbroek PM, Oudkerk Pool M, Ridwan BU, et al: Neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in ulcerative colitis. J Clin Pathol 1994; 47:257–262.

Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N Engl J Med 1988; 318:1651–1657.

Falk RJ, Jennette JC: Thoughts about the classification of small vessel vasculitis. J. Nephrol 2004; 17(Suppl 8):S3–S9.

Fauci AS: The vasculitis syndromes. *In* Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. (eds): Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed. New York, McGraw-Hill, 1998, pp 1910–1922.

Golden MP, Hammer SM, Wanke CA, Albrecht MA: Cytomegalovirus vasculitis. Case reports and review of the literature. Medicine 1994; 73:246–255.

Grau GE, Roux-Lombard P, Gysler C, et al: Serum cytokine changes in systemic vasculitis. Immunology 1989; 68:196–198.

Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, et al: Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. J Immunol Methods 1996; 196:1–15.

Hagen EC, Daha MR, Hermans J, et al: Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR project for ANCA assay standardization. Kidney Int 1998; 53:743–753.

Hayreh SS, Zimmerman B, Kardon RH: Visual improvement with corticosteroid therapy in giant cell arteritis. Report of a large study and review of literature. Acta Ophthalmol Scand 2002; 80:353–367.

Hoffman GS: Classification of the systemic vasculitides: antineutrophil cytoplasmic antibodies, consensus and controversy. Clin Exp Rheumatol 1998a; 16:111–115.

Hoffman GS, Specks U: Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Arthritis Rheum 1998b; 41:1521–1537.

Hoffman GS: Large-vessel vasculitis: unresolved issues. Arthritis Rheum 2003; 48:2406–2414.

Hunder GG, Arend WP, Bloch DA, et al: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Introduction. Arthritis Rheum 1990; 33:1065–1067.

Jayne D: Evidence-based treatment of systemic vasculitis. Rheumatology 2000; 39:585–595.

Jennette JC: Pathogenic potential of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. Lab Invest 1994a; 70:135.

Jennette JC, Ewert BH, Falk RJ: Do antineutrophil cytoplasmic autoantibodies cause Wegener's granulomatosis and other forms of necrotizing vasculitis? Rheum Dis Clin North Am 1993a; 19:1–14.

Jennette JC, Falk RJ: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. Am J Clin Pathol 1993b; 99:221–223.

Jennette JC, Falk RJ: Small-vessel vasculitis. N Engl J Med 1997; 337:1512–1523.

Jennette JC, Falk RJ: Vasculitis. *In* Rose NR, Mackay IR (eds): The Autoimmune Diseases, 3rd ed. San Diego, CA, Academic Press, 1998a, pp 705–724.

Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. Arthritis Rheum 1994b; 37:187–192.
Destaca conclusões e propostas importantes feitas na Chapel Hill Consensus Conference on the Nomenclature of Systemic Vasculitis.

Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ: Diagnostic predictive value of ANCA serology. Kidney Int 1998b; 53:796–798.

Johnston SL, Lock RJ, Gompels MM: Takayasu arteritis: a review. J Clin Pathol 2002; 55:481–486.
Excelente revisão da história, características clínicas, diagnósticos diferenciais, classificação, imunologia e tratamentos deste distúrbio raro, porém bem conhecido.

Kallenberg CG, Mulder AH, Tervaert JW: Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. Am J Med 1992; 93:675–682.

Klein R, Eisenburg J, Weber P, et al: Significance and specificity of antibodies to neutrophils detected by western blotting for the serological diagnosis of primary sclerosing cholangitis. Hepatology 1991; 14:1147–1152

Koldingsnes W, Nossent H: Predictors of survival and organ damage in Wegner's granulomatosis. Rheumatology 2002; 41:572–581.

Langford CA: New developments in the treatment of Wegener's granulomatosis, polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg–Strauss syndrome. Curr Opin Rheumatol 1997; 9:26–30.

Langford CA: The diagnostic utility of c-ANCA in Wegener's granulomatosis. Cleve Clin J Med 1998a; 65:135–140.

Langford CA: Treatment of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg–Strauss syndrome: where do we stand? Arthritis Rheum 2001; 44:508–512.

Langford CA: Vasculitis. J Allergy Clin Immunol 2003; 111:S602–S612.
Excelente revisão atual sobre vasculite.

Langford CA, Klippel JH, Balow JE, et al: Use of cytotoxic agents and cyclosporine in the treatment of autoimmune disease, Part 2: Inflammatory bowel disease, systemic vasculitis, and therapeutic toxicity. Ann Intern Med 1998b; 129:49–58.

Langford CA, McCallum RM: Idiopathic vasculitis. *In* Belch JJF, Zurier RB (eds): Connective Tissue Diseases. London, Chapman & Hall, 1995, p 179.

Lie JT: Systemic and isolated vasculitis: a rational approach to classification and pathologic diagnosis. Pathol Annu 1989; 24:25–114.

Lo SK, Chapman RWG, Cheeseman P, et al: Antineutrophil antibody: a test for autoimmune pri-

mary sclerosing cholangitis in childhood? Gut 1993; 34:199–202.
Mandell BF, Hoffman GS: Differentiating the vasculitides. Rheum Dis Clin North Am 1994; 20:409–442.
Mulder AH, Horst G, Haagsma EB, et al: Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. Hepatology 1993; 17:411–417.
Nakamura RM, Matsutani M, Barry M: Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. Clin Chim Acta 2003; 335:9–20.
Niles JL: Value of tests for antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and treatment of vasculitis. Curr Opin Rheumatol 1993; 5:18–24.
Niles JL, McCluskey RT: Vasculitis. *In* Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT (eds): Diagnostic Immunopathology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1995, p 95.
Nordborg E, Nordborg C: Giant cell arteritis: epidemiological clues to its pathogenesis and an update on its treatment. Rheumatology 2003; 43:413–421.
Peen E, Almer S, Bodemar G, et al: Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. Gut 1993; 34:56–62.
Peter HH, Metzger D, Rump A, et al: ANCA in diseases other than systemic vasculitis. *In* Anonymous. Proceedings of the 5th International ANCA Workshop, August 31–September. Cambridge, UK, St John's College, 1993, p 12.
Rhodes RH, Madelaire C, Petrelli M, et al: Primary angiitis and angiopathy of the central nervous system and their relationship to systemic giant cell arteritis. Arch Pathol Lab Med 1995; 119:334–349.
Roberts DE: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. Clin Lab Med 1992; 12:85–98.
Roberts DE, Peebles C, Daggett R: A simplified method of preparing neutrophil slides in the examination for antibodies to cytoplasmic antigens. J Clin Pathol 1990; 43:83–84.
Sandborn WJ. Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. Rev Gastroenterol Disord 2004; 4:167–174.
Artigo mais recente sobre os testes sorológicos emergentes considerados relevantes para casos de colite ulcerativa e doença de Crohn.
Savage CO, Harper L, Cockwell P, et al: ABC of arterial and vascular disease: Vasculitis. Br Med J 2000; 320:1320–1328.
Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, Wiik A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: a review of the clinical and laboratory features. Kidney Int 2000; 57:846–862.
Discute alguns dos avanços relacionados ao teste de ANCA, critérios diagnóticos para vasculites ANCA-associadas e complicações associadas ao tratamento.
Savige J, Dimech W, Fritzler M, et.al: Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003 120:312–318.
Savige J, Gillis D, Benson E, et al: International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111:507–513.
Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R: A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. J Clin Pathol 1998; 51:568–575.
Seo P, Stone JH: Large-vessel vasculitis. Arthritis Rheum 2004a; 1:128–139.
Seo P, Stone JH: The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. Am J Med 2004b; 117:39–50.
Revisão atual sobre as vasculites ANCA-associadas, que discute o papel dos ensaios para ANCA no diagnóstico e tratamento, e destaca uma abordagem para avaliação e supervisão dessas doenças.
Smetana GW, Shmerling RH: Does this patient have temporal arteritis? JAMA 2002; 287:92–101.
Sneller MC, Fauci AS: Pathogenesis of vasculitis syndromes. Med Clin North Am 1997; 81:221–242.
Specks U, Homburger HA: Laboratory medicine and pathology: anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. Mayo Clin Proc 1994; 69:1197–1198.
Tervaert JW, Limburg PC, Elema JD, et al: Detection of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: a useful adjunct to classification of patients with biopsy-proven necrotizing arteritis. Am J Med 1991; 91:59–66.
Vassilopoulos D, Hoffman GS: Clinical utility of testing for antineutrophil cytoplasmic antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6:645–651.
Wang G, Csernok E, deGroot K: Comparison of eight commercial kits for quantitation of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). J Immunol Methods 1997; 208:203–211.
Watts RA, Scott DGI, Pusey CD, Lockwood CM: Vasculitis – aims of therapy. An overview. Rheumatology 2000; 39:229–237.
Wieslander J: How are antineutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? Am J Kidney Dis 1991; 18:154–158.
Wiik A: Rational use of ANCA in the diagnosis of vasculitis. Rheumatology 2002; 41:481–483.
Yi ES, Colby TV: Wegener's granulomatosis. Semin Diagn Pathol 2001; 18:34–46.

CAPÍTULO 52

Doenças autoimunes órgão-específicas

David J. Bylund MD, Robert M. Nakamura MD

Métodos de detecção 1078
Microscopia de imunofluorescência indireta 1079
Pele 1080
Pênfigo 1080
Penfigoide 1081
Epidermólise bolhosa adquirida e lúpus eritematoso bolhoso 1082
Dermatite herpetiforme 1083
Dermatose linear por IgA 1083
Lúpus eritematoso 1083
Vasculite 1084
Fígado 1084
Autoanticorpos 1084
Doenças hepáticas 1085
Glândula tireoide 1087
Doenças da tireoide 1087
Autoanticorpos 1088
Rim 1089
Glomerulonefrite 1089
Doença antimembrana basal glomerular 1089
Glândula suprarrenal 1090
Doença de Addison 1090
Pâncreas 1090
Diabetes melito 1090
Trato gastrintestinal 1091
Anemia perniciosa 1091
Enteropatia glúten-sensitiva 1092
Colite ulcerativa e doença de Crohn 1092
Sistema nervoso 1092
Miastenia grave 1092
Esclerose múltipla 1093
Neuropatias 1093
Autoanticorpos antiproteína neuronal 1093
Autoanticorpos antigangliosídeo neuronal 1093
Outros órgãos 1093
Coração 1093
Músculo 1094
Resumo 1094
Referências bibliográficas 1094

PONTOS-CHAVE

- O aspecto clínico dominante das doenças autoimunes órgão-específicas é a inflamação crônica, geralmente localizada em um órgão específico para cada doença individual.
- Permanece indefinida a etiologia de quase todas as doenças autoimunes órgão-específicas.
- A imunofluorescência direta é essencial para a resolução do diagnóstico diferencial microscópico de distúrbios bolhosos acantolíticos e subepidérmicos.
- A presença de autoanticorpos circulantes em títulos significativos frequentemente é útil para estabelecer a etiologia de distúrbios autoimunes hepáticos.
- Os anticorpos antimitocondriais (AMAs) são os marcadores diagnósticos mais específicos e sensíveis da cirrose biliar primária (CBP). Como diretriz geral, considera-se altamente preditivo de CBP um título de AMA maior ou igual a 1:160.
- A prevalência da enteropatia glúten-sensitiva/espru celíaco na população dos EUA é considerada bem maior do que as estimativas anteriores.
- Na enteropatia glúten-sensitiva/espru celíaco, autoanticorpos IgA antiendomísio reconhecem a transglutaminase tecidual (tTG) – o autoantígeno primário na enteropatia glúten-sensitiva (EGS). Hoje em dia, ensaios imunossorventes ligados a enzimas (ELISAs) são disponibilizados para detecção de anticorpos anti-tTG. A identificação desses anticorpos é considerada diagnosticamente sensível e específica apenas para EGS ou para EGS associada à dermatite herpetiforme.
- Por questões relativas à especificidade, o uso de ensaios para detecção de anticorpo antiantígeno neutrofílico citoplasmático perinuclear (p-ANCA) sensível à DNAse e anticorpos contra *Saccharomyces cerevisiae* deve se restringir aos pacientes que apresentam colite e não deve ser aplicado à população em geral.
- Os avanços técnicos ocorridos nos ensaios de ELISA disponibilizaram essa tecnologia para a maioria dos laboratórios clínicos, de modo que muitos ensaios para detecção de autoanticorpos órgão-específicos (p. ex., contra tireoide, rim, células das ilhotas pancreáticas, sistema nervoso periférico [SNP] e central [SNC]) tornaram-se amplamente disponíveis para os casos em que a microscopia de imunofluorescência indireta é impraticável.

Os distúrbios autoimunes podem ser classificados amplamente em doenças sistêmicas ou órgão-direcionadas (Nakamura, 2002). O presente capítulo discute a maioria das doenças autoimunes listadas na Tabela 52.1.

O aspecto clínico dominante desses distúrbios autoimunes é a inflamação crônica, em geral localizada em um único órgão específico para cada doença individual. Nesse grupo de distúrbios autoimunes, o agrupamento familiar das doenças é notavelmente frequente. Os autoanticorpos relevantes podem ou não ser espécie-específicos, contudo, de fato exibem especificidade para um dado antígeno presente no órgão ou tecido afetado.

Neste capítulo, foram incluídas algumas doenças associadas a autoanticorpos e lesões inflamatórias restritas a um ou a poucos órgãos, que combinam aspectos clinicopatológicos de doenças autoimunes órgão-específicas e sistêmicas. Os distúrbios autoimunes hepáticos, como a CBP ou a hepatite autoimune, exemplificam as doenças desse grupo. Com exceção dos autoanticorpos dirigidos contra receptores tireoidianos, a patogênese dos autoanticorpos nas doenças órgão-específicas continua amplamente indeterminada.

Métodos de detecção

A microscopia de imunofluorescência direta (MIFD) constitui o método laboratorial utilizado para detecção de imunodepósitos em um dado tecido do paciente. A microscopia de imunofluorescência indireta (MIFI), descrita de maneira resumida a seguir, é o método mais utilizado para detectar autoanticorpos circulantes específicos para órgãos ou tecidos-alvo. Hoje em dia, os laboratórios clínicos empregam ELISA com mais frequência, em razão do aprimoramento dos aspectos técnicos desse método.

Tabela 52.1 Doenças autoimunes órgão-específicas

Órgão e doença	Autoanticorpo	Método(s) de detecção
Glândula tireoide		
Tireoidite autoimune	Antiperoxidase tireoidiana	ELISA; MIFI em substrato de tireoide de macaco sem fixação
	Antitireoglobulina	MIFI em substrato de tireoide de macaco fixada em metanol; hemaglutinação passiva; aglutinação do látex
Doença de Graves	Antirreceptor de TSH	*Radioreceptor binding assay*; *cAMP bioassay*
Glândula suprarrenal		
Doença de Addison	Antiadrenocortical	MIFI em substrato de córtex suprarrenal de macaco ou humano sem fixação
Glândula paratireoide		
Paratireoide	Antiproteínas endoteliais da paratireoide	MIFI em substrato de glândula paratireoide bovina sem fixação
Pâncreas		
Diabetes melito tipo 1A	Anticélulas insulares	MIFI em substrato de pâncreas humano sem fixação (grupo sanguíneo O)
	Insulina-associado	Radioimunoprecipitação
	Antidescarboxilase do ácido glutâmico	ELISA; RIA; *immunoblotting*
Músculo		
Dermatomiosite/polimiosite	Anti-PM-1; anti-Jo-1	ELISA; imunodifusão
Trato gastrintestinal		
Gastrite atrófica	Anticélula parietal gástrica	MIFI em substrato de estômago/rim murino
Anemia perniciosa	Antifator intrínseco	Ensaio de ligação de vitamina B_{12} radioativa
	Anticélulas ductais salivares	MIFI em substrato de glândula salivar humana sem fixação
	Anticélula parietal gástrica	MIFI em substrato de mucosa gástrica humana, de macaco, murina ou de rato
Colite ulcerativa	Anticólon; antilipopolissacarídeo	MIFI em substrato de cólon humano ou de rato; hemaglutinação
	DNAse-sensível p-ANCA-associado	MIFI em substrato de neutrófilos fixados em etanol
Doença de Crohn	ASCA	ELISA
Doença celíaca	Antitransglutaminase tecidual	ELISA
	IgA antiendomísio	MIFI em substrato de esôfago de macaco
	Antigliadina	ELISA
Fígado		
Hepatite autoimune	Antimúsculo liso	MIFI em substrato de estômago/rim murino
	Antimicrossomo hepático/renal	MIFI em substrato de estômago/rim murino; ELISA
	ANA	Células HEp-2
Cirrose biliar primária	Antimitocondrial (M2)	MIFI em substrato de estômago/rim murino; ELISA
Colangite esclerosante primária	p-ANCA	MIFI em substrato de neutrófilos fixados em etanol
Neurológica		
Miastenia grave	Anti-ACh-R	Imunoprecipitação ACh-R conjugado à α-bungarotoxina marcada com ^{125}I (antimúsculo esquelético humano)
Doença desmielinizante (i. e., esclerose múltipla)	Antimielina; antitubulina, antiproteína básica da mielina; antiglicoproteína associada à mielina	MIFI em substrato de medula espinal de mamífero; ELISA; *immunoblotting*
Rins		
Doença anti-MBG	Antiglomerular e antimembrana basal pulmonar	ELISA
Pele		
Pênfigo	Anti-EIE (desmogleínas)	MIFD de biópsia de pele; MIFI em substrato de esôfago de macaco ou de cobaia
Penfigoide	Anti-ZMB (proteínas hemidesmossômicas)	MIFD de biópsia de pele; MIFI em substrato de esôfago de macaco
Dermatite herpetiforme	Antitransglutaminase tecidual	ELISA
	IgA antiendomísio	Esôfago de macaco
Pênfigo paraneoplásico	Anti-EIE e anti-ZMB	MIFD de biópsia de pele; MIFI em substrato de urotélio de bexiga de rato
Dermatose linear por IgA	IgA anti-ZMB	MIFD de biópsia de pele; MIFI em substrato de esôfago de macaco
Pênfigo por IgA	IgA anti-EIE	MIFD de biópsia de pele; MIFI em substrato de esôfago de macaco

ACh-R = receptor de acetilcolina; ASCA = anticorpos contra *Saccharomyces cerevisiae*; ZMB = zona de membrana basal; cAMP = monofosfato de adenosina cíclico; MIFD = microscopia de imunofluorescência direta; ELISA = ensaio imunossorvente ligado à enzima; EIE = espaços intercelulares; MIFI = microscopia de imunofluorescência indireta; p-ANCA = anticorpos antiantígeno neutrofílico citoplasmático perinuclear; RIA = radioimunoensaio; TSH = hormônio estimulador da tireoide.

Microscopia de imunofluorescência indireta

Esse procedimento de teste é essencialmente o mesmo, exceto quanto ao substrato utilizado para ligação dos autoanticorpos-alvo. O procedimento geral consiste em:

1. Preparar diluições do soro do paciente para fins de triagem, ou preparar soluções seriadas, bem como controles apropriados com solução salina de tampão fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*).
2. Utilizar uma câmara úmida para incubar por 20 a 30 minutos os soros diluídos e controles, aplicados sobre camadas de substrato fixadas em múltiplos poços de lâminas de vidro. Esse substrato é constituído de corte de tecido obtido em criostato. As lâminas não devem secar.
3. Remover as lâminas da câmara úmida. Lavar rápida e cuidadosamente cada lâmina, 2 a 3 vezes, em PBS à temperatura ambiente. Em seguida, lavar as lâminas em PBS por 15 minutos, trocando a solução de lavagem uma vez no decorrer desse período.
4. Remover uma lâmina de cada vez do PBS de lavagem. Utilizando papel mata-borrão, eliminar o excesso de solução para secar a lâmina. Fazer o procedimento para cada lâmina individualmente

e colocá-las outra vez em câmara úmida. Aplicar em cada poço a solução diluída de conjugado marcado com fluoresceína. Incubar as lâminas à temperatura ambiente durante 20 minutos. Não deixar as lâminas secarem.

5. Lavar as lâminas durante 10 minutos em PBS com contracorante azul de Evans.
6. Montar as lâminas com lamínulas.
7. Observar as lâminas montadas ao microscópio de fluorescência.
8. Armazenar as lâminas no escuro a 4°C.

Pele

A detecção de autoanticorpos é altamente útil no *work-up* da doença bolhosa cutânea. Em pacientes com doenças cutâneas autoimunes, os autoanticorpos detectados reagem contra a zona de membrana basal (ZMB), os espaços intercelulares epidérmicos (EIE) ou os vasos sanguíneos dérmicos, conforme resumido na Tabela 52.2. Existem diversas revisões técnicas excelentes, que detalham o uso da imunofluorescência para examinar a pele (Crosby, 1993; Flotte, 1995).

Pênfigo

O pênfigo se refere a um grupo de distúrbios caracterizados clinicamente pelo aparecimento de bolhas, que apresentam características histológicas de acantólise. Existem três subtipos principais de pênfigo: vulgar, foliáceo e paraneoplásico (Nousari, 1999a). Cada um desses subtipos é caracterizado pela presença de autoanticorpos dirigidos contra as moléculas desmossômicas de adesão. A MIFI é empregada para detecção de autoanticorpos circulantes, enquanto a MIFD (mais informativa) é utilizada para identificar autoanticorpos ligados ao tecido, e ambas são utilizadas nas avaliações iniciais, com o intuito de maximizar a sensibilidade diagnóstica.

Pênfigo vulgar

Trata-se de um distúrbio raro que ocorre em indivíduos de todas as raças e grupos étnicos, embora a incidência seja discretamente maior na população judia. A doença afeta ambos os sexos, sendo mais comum em indivíduos na faixa etária de 40 a 60 anos (Becker, 1993). A desmogleína 3 constitui o principal antígeno no pênfigo vulgar (Naparstek, 1993; Lin, 1998). Existem testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-desmogleína 3.

Tabela 52.2 Doenças autoimunes cutâneas

Achados imunológicos essenciais ao diagnóstico
Espaços intercelulares epidérmicos
Pênfigo
Pênfigo paraneoplásico
Zona de membrana basal
Penfigoide
Penfigoide gestacional
Epidermólise bolhosa adquirida
Dermatose linear por IgA
Dermatose bolhosa crônica da infância
Papilas dérmicas ± zona de membrana basal
Dermatite herpetiforme
Achados imunológicos de utilidade diagnóstica
Manifestações cutâneas em doenças reumáticas sistêmicas
Dermatomiosite/polimiosite
Lúpus eritematoso
Doença mista do tecido conjuntivo
Policondrite recidivante
Síndrome de Sjögren
Esclerose sistêmica
Vasculite

Microscopia de imunofluorescência direta

O exame da pele perilesional por MIFD revela um padrão de imunofluorescência linear/granular produzido por imunoglobulinas G (IgG) e componente C3 contra os EIEs, bem como ausência de coloração para ZMB (Fig. 52.1). Esse padrão é descrito com frequência como "tela de arame" (*chicken wire*) e cora preferencialmente a metade inferior da epiderme. A IgG (sobretudo IgG4) está presente em quase 100% dos pacientes, enquanto C3 é detectado em 50 a 100% dos casos, em geral nas áreas acantolíticas (Becker, 1993; Flotte, 1995; Lin, 1998). Em 30 a 50% dos pacientes, são detectados anticorpos IgA ou IgM imunorreativos (Izuno, 1986). A imunofluorescência apenas para C3, sem IgG, é descrita no pênfigo induzido por fármacos e no impetigo (Nousari, 1997).

Microscopia de imunofluorescência indireta

A MIFI deve detectar autoanticorpos IgG dirigidos contra a superfície das células epiteliais escamosas em 100% dos pacientes com doença ativa (Nousari, 1997). O esôfago de macaco é considerado o melhor substrato tecidual (Fig. 52.2).

A presença de autoanticorpos do pênfigo vulgar constitui um achado anormal, seja qual for o título detectado. De uma forma geral, o título de anticorpos apresenta correlação com a atividade da doença, e títulos aumentados podem ser preditivos de recidiva (Becker, 1993; Crosby, 1993). Existem exceções para essa correlação, todavia, de modo que o teste seriado dos títulos de IgG para monitoramento desses pacientes deve ser cuidadosamente correlacionado com os achados clínicos. Pacientes que apresentam apenas lesões na mucosa oral podem não apresentar autoanticorpos circulantes detectáveis para pênfigo vulgar. Nesses pacientes, o diagnóstico é estabelecido por MIFD (Izuno, 1986).

Baixos títulos de autoanticorpos análogos aos anticorpos anti-EIE podem ser detectados com pouca frequência em diversas condições, tais como queimaduras na pele, alergia à penicilina ou outros fármacos, necrólise epidérmica tóxica, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), miastenia grave, penfigoide e líquen plano. Raramente esses anticorpos são detectados em indivíduos sadios (< 1%) (Becker, 1993; Mutasim, 1993b; Nousari, 1997).

Pênfigo foliáceo

Os subgrupos de pênfigo foliáceo incluem o pênfigo foliáceo idiopático, pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem), pênfigo foliáceo indu-

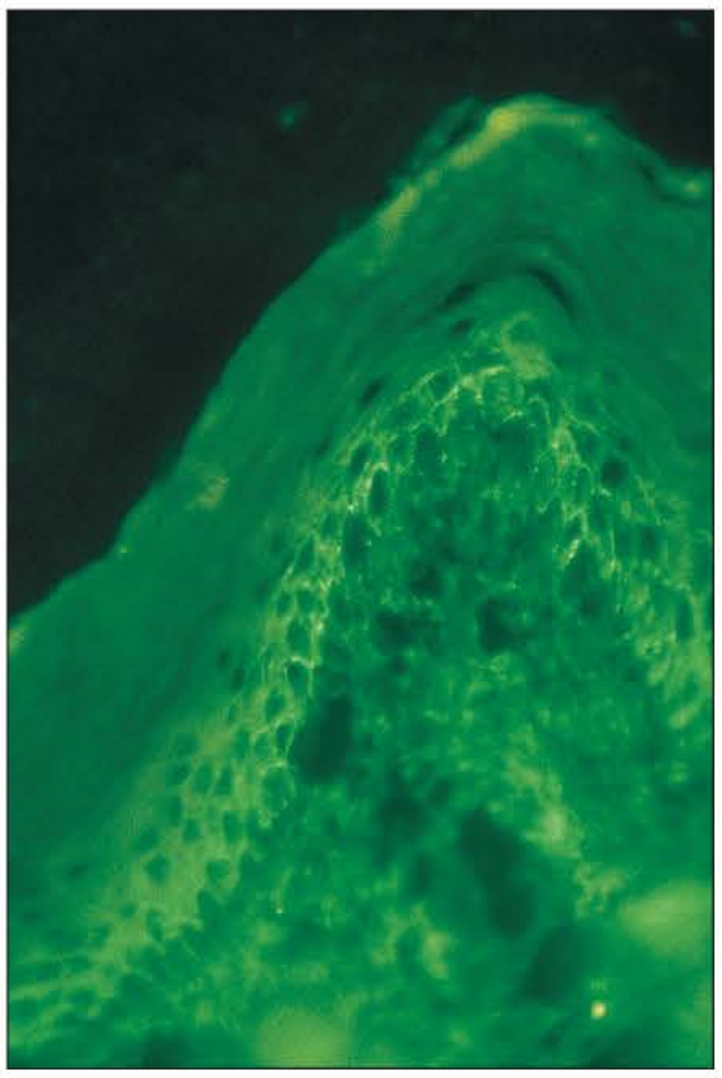


Figura 52.1 Microscopia de imunofluorescência direta de lesão cutânea de paciente com pênfigo. Padrão de deposição linear/granular de C3 sobretudo nas superfícies celulares (espaços intercelulares) de queratinócitos basais, sem imunofluorescência na zona de membrana basal (× 400).

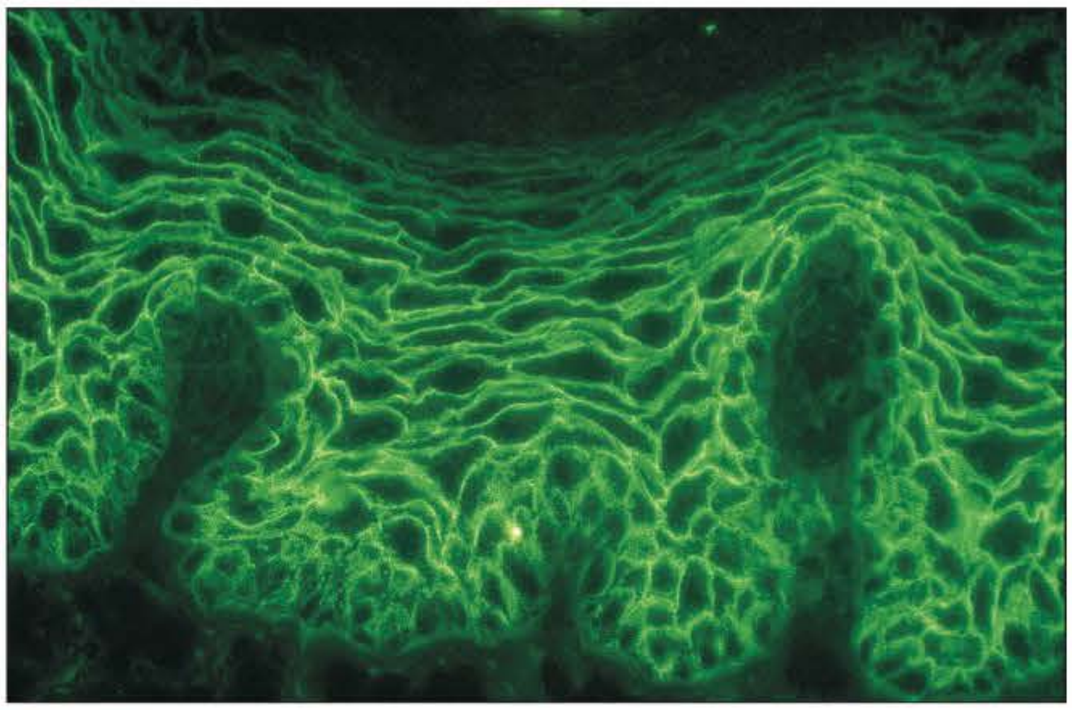


Figura 52.2 Microscopia de imunofluorescência indireta de paciente com pênfigo. Imunofluorescência linear por deposição de IgG nas superfícies celulares epiteliais (espaços intercelulares) com o uso de esôfago de camundongo como substrato tecidual (× 250).

zido por fármacos e pênfigo eritematoso (PER). A desmogleína 1 constitui o principal antígeno no pênfigo foliáceo (Lin, 1998; Naparstek, 1993). Existem ELISAs que detectam anticorpos antidesmogleína 1.

Microscopia de imunofluorescência direta

Para todas as formas de pênfigo foliáceo (exceto o eritematoso), o padrão observado na MIFD é semelhante ao do pênfigo vulgar. Em alguns casos, a coloração predomina na epiderme superficial, no nível do estrato granuloso. No pênfigo eritematoso, há uma coloração linear dos EIEs epidérmicos combinada a uma imunorreatividade ao longo da ZMB.

Microscopia de imunofluorescência indireta

A MIFI deve detectar autoanticorpos IgG anti-EIE circulantes em quase 100% dos pacientes com pênfigo foliáceo que apresentam doença ativa (Nousari, 1997). Cerca de 90% desses pacientes apresentam autoanticorpos detectáveis quando esôfago de macaco é utilizado como substrato em estudos indiretos. O esôfago de cobaia é um pouco mais sensível, detectando também os 10% restantes dos pacientes com doença, e os títulos indiretos tendem a ser mais altos do que aqueles detectados com esôfago de macaco (Jiao, 1997).

Pênfigo paraneoplásico

O pênfigo paraneoplásico – distúrbio incomum caracterizado pelo aparecimento de vesículas dolorosas ou erosões nas membranas mucosas e na pele – é uma condição apresentada por pacientes com neoplasmas. As vesículas ou erosões usualmente eclodem na boca, contudo há relatos de seu aparecimento em outros sítios mucosos. Entre os neoplasmas malignos associados ao pênfigo paraneoplásico estão o linfoma maligno, leucemia linfocítica crônica, timoma, carcinoma de células escamosas broncogênico e sarcomas. Raramente o pênfigo paraneoplásico ocorre associado a neoplasmas benignos (Camisa, 1993; Mutasim, 1993c; Flotte, 1995).

Os critérios que definem o pênfigo paraneoplásico, listados a seguir, foram propostos por Mutasim (1993c):

- erosões mucosas dolorosas e erupção cutânea polimórfica, com lesões papulares que progridem para vesículas e lesões erosivas que afetam o tronco, membros, palmas das mãos e solas dos pés, associadas a um neoplasma ainda oculto ou clinicamente detectado;
- acantólise suprabasilar, necrose de queratinócitos e alterações na interface vacuolar observados em cortes teciduais à microscopia de luz;
- detecção de autoanticorpos IgG anti-EIE combinados a um padrão linear/granular de complemento e IgG ao longo da ZMB;
- detecção de autoanticorpos anti-EIE circulantes que se ligam ao urotélio da bexiga de roedores e ao esôfago de macaco/cobaia;
- imunoprecipitação de um complexo constituído de quatro proteínas ligadas por autoanticorpos. Esse achado é, sobretudo, uma ferramenta de pesquisa, todavia fornece informação clínica útil em casos difíceis.

O pênfigo paraneoplásico associado a neoplasmas malignos sinaliza um prognóstico extremamente ruim. Embora haja relatos de melhora clínica ou remissão das lesões mucocutâneas após a ressecção do tumor, o tratamento do pênfigo paraneoplásico associado a malignidades é apenas de suporte. O pênfigo paraneoplásico associado a um neoplasma benigno regride após a ressecção do tumor (Mutasim, 1993c).

Microscopia de imunofluorescência direta

A MIFD da pele e/ou mucosa oriunda da região paralesional de pacientes com pênfigo paraneoplásico revela a presença de IgG anti-EIE imunorreativa, com ou sem componentes do complemento. Depósitos de componentes do complemento (C3, C1q) na ZMB em padrão granular ou (menos comumente) linear também são detectados por imunofluorescência, além da IgG anti-EIE (Mutasim, 1993c).

Microscopia de imunofluorescência indireta

A MIFI, utilizando esôfago de macaco e urotélio de bexiga de roedor, revela a presença de IgG imunorreativa contra EIE e ao longo da ZMB. A ligação ao epitélio da bexiga de roedores (rato ou camundongo) constitui importante achado diferencial, que distingue o pênfigo paraneoplásico dos demais tipos de pênfigo (Liu, 1993; Mutasim, 1993c).

Pênfigo por IgA (dermatose intercelular por IgA)

Microscopia de imunofluorescência direta

A dermatose intercelular por IgA é um distúrbio vesicobolhoso intraepidérmico raro. Estudos diretos mostram um padrão de imunofluorescência linear nos EIE para IgA, que é suprabasilar e particularmente acentuado na epiderme superior.

Microscopia de imunofluorescência indireta

A MIFI detecta autoanticorpos IgA anti-EIE circulantes (Teraki, 1991; Flotte, 1995).

Penfigoide

Penfigoide bolhoso

O penfigoide bolhoso é uma doença bolhosa subepidérmica de causa desconhecida, que pode ocorrer em pacientes de qualquer faixa etária, embora afete sobretudo adultos com mais de 60 anos de idade (Fig. 52.3A). Esse distúrbio envolve as superfícies flexoras dos braços, pernas, virilhas, axilas e porção inferior do abdômen. As membranas mucosas orais podem ser afetadas, contudo, em raros casos essas lesões constituem o sinal de apresentação ou predominante – característica que diferencia o penfigoide do pênfigo vulgar.

Os principais antígenos do penfigoide bolhoso são duas proteínas hemidesmossômicas de queratinócitos: uma intracelular de 230 kDa (antígeno 1 do penfigoide bolhoso) e uma transmembrana de 180 kDa (antígeno 2 do penfigoide bolhoso) (Nousari, 1997; Lin, 1998).

Microscopia de imunofluorescência direta

A MIFD da pele paralesional sem vesículas, obtida da borda de uma vesícula fresca, é diagnosticamente sensível e, de maneira típica, revela um padrão linear de imunofluorescência na ZMB em quase 100% dos pacientes (Fig. 52.3B). C3 e IgG, ou apenas C3, são os imunorreagentes predominantes. Ainda IgA e/ou IgM podem estar presentes em até 25% dos pacientes, normalmente conferindo uma fluorescência mais fraca e combinada à IgG (Izuno, 1986; Crosby, 1993; Korman, 1993).

Um padrão linear de imunofluorescência na ZMB epidérmica pode ser identificado em vários distúrbios clínicos discrepantes, tais como penfigoide de membrana mucosa benigno, epidermólise bolhosa adquirida, penfigoide gestacional (herpes gestacional) e lúpus eritematoso bolhoso.

O exame de biópsias cutâneas diretas obtidas pela técnica de *salt-split* (separação da pele em cloreto de sódio) é útil para ajudar a distinguir esses distúrbios (Domloge-Hultsch, 1991). No penfigoide bolhoso e no penfigoide gestacional, o padrão linear de fluorescência por IgG está loca-

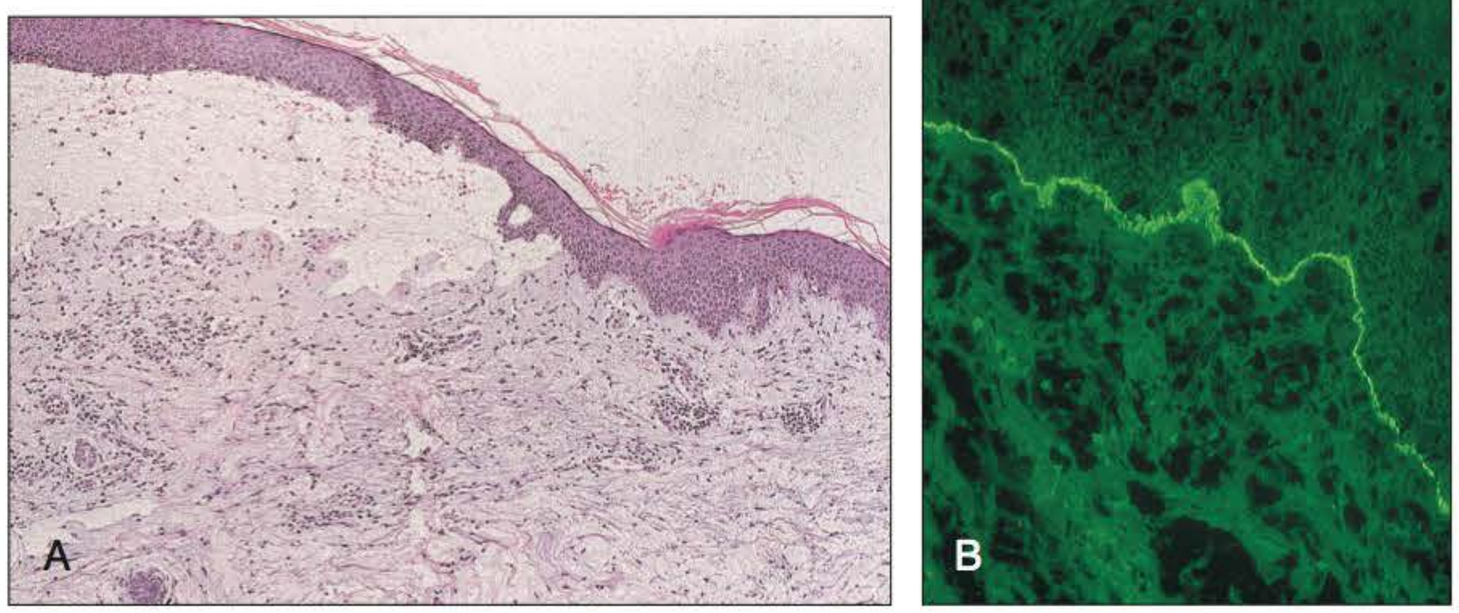


Figura 52.3 Biópsia de pele de paciente com penfigoide, revelando uma fenda subepidérmica, epiderme não necrótica e inflamação variável, frequentemente acompanhada de eosinófilos proeminentes (*A*, hematoxilina e eosina [H&E], × 100). A microscopia de imunofluorescência direta revela uma intensa deposição linear de C3 ao longo da zona de membrana basal (*B*, × 400).

lizado no lado epidérmico (ou raiz) da fenda. Entretanto, pode ser observada uma imunofluorescência linear por C3 ao longo das regiões epidérmica e dérmica. Na epidermólise bolhosa adquirida e no lúpus eritematoso bolhoso, os imunorreagentes são vistos ao longo da lateral dérmica da fenda (Nousari, 1997). Estabelecer uma correlação clínica, portanto, torna-se importante para considerar as alternativas diagnósticas.

Microscopia de imunofluorescência indireta

O penfigoide bolhoso é sorologicamente caracterizado pela presença de autoanticorpos circulantes contra a ZMB, seja na mucosa cutânea ou na mucosa oral. A MIFI detecta autoanticorpos IgG anti-ZMB circulantes em cerca de 50% dos pacientes com penfigoide, contudo, a sensibilidade da detecção aumenta para 70 a 80% quando o substrato utilizado é a pele humana preparada pela técnica de *salt-split* (Izuno, 1986; Domloge-Hultsch, 1991; Nousari, 1997). No penfigoide bolhoso, 80% dos pacientes apresentam autoanticorpos que se ligam apenas à raiz da pele separada em cloreto de sódio. Na epidermólise bolhosa adquirida e no lúpus eritematoso bolhoso, 50% dos pacientes apresentam autoanticorpos que se ligam à base dérmica (ou raiz) da pele separada (Domloge-Hultsch, 1991; Crosby, 1993; Korman, 1993).

Penfigoide benigno de membrana mucosa

O penfigoide benigno de membrana mucosa, ou penfigoide cicatricial, afeta de maneira consistente as mucosas oral e ocular. Outros sítios mucosos em que essas lesões aparecem podem ser nasofaringe, laringe, genitais, reto e esôfago (Mutasim, 1993a). Após a resolução, as lesões sofrem cicatrização e a complicação mais temida desse processo é a cegueira.

Microscopia de imunofluorescência direta

O padrão observado na MIFD é similar ao do penfigoide bolhoso. Esse método apresenta sensibilidade de 90%, contudo, é possível aumentá-la com o exame de biópsias adicionais. O penfigoide cicatricial localizado crônico, também conhecido como penfigoide cicatricial de Brunsting-Perry, é uma variante do penfigoide benigno de membrana mucosa, que permanece localizada na cabeça e na região cervical (Sarret, 1991). Nessa variante, a MIFD revela a presença de IgG apenas na ZMB, sem IgA nem IgM. Autoanticorpos anti-ZMB circulantes raramente são detectados (Izuno, 1986).

Microscopia de imunofluorescência indireta

A MIFI detecta autoanticorpos IgG circulantes em menos de 33% dos pacientes com penfigoide benigno de membrana mucosa, em que o substrato utilizado é a mucosa oral. Esses anticorpos são detectados em apenas 5 a 15% dos pacientes com a doença quando são utilizados substratos convencionais (Sarret, 1991; Crosby, 1993; Nousari, 1997). Estudos que empregam pele humana preparada por *salt-split* podem revelar depósitos de IgA, IgG ou ambas em cerca de 80% desses pacientes (Sarret, 1991).

A atividade da doença não apresenta correlação com a presença e título dos autoanticorpos.

Penfigoide gestacional

Raramente a doença bolhosa subepidérmica do penfigoide gestacional (herpes gestacional) se desenvolve durante ou logo após a gravidez (Izuno, 1986). As lesões são tipicamente pruriginosas e localizadas sobretudo no abdômen ou nos membros.

Microscopia de imunofluorescência direta

Com a MIFD, um dos achados típicos é a fluorescência linear por deposição de C3 na ZMB. Depósitos associados de IgG são detectados em 30 a 40% dos casos, porém IgA e IgM raramente são encontradas (Izuno, 1986).

Microscopia de imunofluorescência indireta

O padrão linear dos depósitos de C3 somente é visualizado ao longo da ZMB, contudo os títulos de autoanticorpos frequentemente são baixos demais para serem detectados com os substratos convencionais de MIFI. Todavia, é possível detectar complemento por imunofixação de complemento utilizando como substrato pele humana normal separada em cloreto de sódio (Izuno, 1986; Nousari, 1997).

Epidermólise bolhosa adquirida e lúpus eritematoso bolhoso

A epidermólise bolhosa adquirida e o lúpus eritematoso bolhoso são doenças bolhosas subepidérmicas adquiridas, caracterizadas pela presença de autoanticorpos dirigidos contra o colágeno de tipo VII, presente entre as proteínas da ZMB (Gammon, 1993). A epidermólise bolhosa adquirida pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade, sendo mais comum em adultos na faixa etária de 40 a 50 anos. Não há nenhuma predileção étnica ou por um dos sexos. Todos os pacientes sofrem com uma combinação de vesículas, erosões, cicatrizes, cistos epidérmicos (milhetes) e despigmentação da pele, mais frequentemente localizados nas superfícies cutâneas extensoras suscetíveis a traumatismos, como joelhos, cotovelos, dorso das mãos e dos pés (Gammon, 1993). O lúpus eritematoso bolhoso ocorre em pacientes com lúpus eritematoso.

Microscopia de imunofluorescência direta

Utilizando a MIFD, constata-se que os pacientes com epidermólise bolhosa adquirida e lúpus eritematoso bolhoso apresentam um padrão linear de imunorreagentes na ZMB, que mais comumente se deve à presença de IgG e C3. No exame direto de biópsias de pele preparada por *salt-split*, os imunorreagentes lineares estão localizados no aspecto dérmico (ou assoalho) da vesícula induzida.

Microscopia de imunofluorescência indireta

Apenas cerca de 40% dos pacientes com epidermólise bolhosa adquirida apresentam autoanticorpos demonstráveis, em que o substrato utilizado é a pele humana sem tratamento com sal. Empregando a técnica indireta da pele separada em cloreto de sódio, é possível identificar autoanticorpos circulantes em aproximadamente de 50 a 85% dos pacientes (Fine, 1994; Nousari, 1997).

Dermatite herpetiforme

A dermatite herpetiforme é uma doença bolhosa subepidérmica severamente pruriginosa, associada a uma enteropatia de sensibilidade ao glúten (Fig. 52.4A). A dermatite herpetiforme também está associada aos tipos de histocompatibilidade HLA B8-DR3 (Crosby, 1993).

Microscopia de imunofluorescência direta

A biópsia direta deve ser obtida a partir da pele paralesional, pois uma biópsia de pele lesional pode ser negativa. A MIFD detecta um padrão granular associado à IgA nas extremidades das papilas dérmicas de aproximadamente 80 a 100% dos pacientes com dermatite herpetiforme (Flotte, 1995) (Fig. 52.4B). Pode haver depósitos de IgA concomitantes ao longo da ZMB. Depósitos de C3 com frequência são encontrados com IgA, porém não é comum detectar IgG e/ou IgM (Izuno, 1986).

Microscopia de imunofluorescência indireta

Pacientes com dermatite herpetiforme não apresentam autoanticorpos anti-ZMB detectáveis. Entretanto, autoanticorpos IgA antiendomísio são detectados em 80% dos pacientes com a doença. Esses autoanticorpos são identificados por seu padrão de imunofluorescência característico na camada muscular subepitelial da mucosa do esôfago de macaco (Peters, 1989).

Dermatose linear por IgA

A dermatose linear por IgA é um raro distúrbio bolhoso subepidérmico adquirido, que nos dias de hoje é considerado uma entidade clínica à parte, em vez de uma variante da dermatite herpetiforme, como se pensava no passado (Izuno, 1986; Crosby, 1993). Muitos casos são considerados idiopáticos, entretanto, foram descritas formas induzidas por fármacos e formas sistêmicas associadas ao distúrbio (Kuechle, 1994; Nousari, 1995, 1999; Bouldin, 2000). A dermatose bolhosa crônica da infância é similar à dermatose linear por IgA, tanto clínica quanto imunopatologicamente (Elenitsas, 1995).

Microscopia de imunofluorescência direta

Em quase 100% dos casos, a MIFD apresenta uma intensa deposição linear de IgA ao longo da ZMB e, ao mesmo tempo, nenhuma deposição nas papilas dérmicas (Izuno, 1986). Embora ocasionalmente possa ser observada uma fraca coloração da ZMB por C3 concomitante, não é comum detectar outros imunorreagentes além da IgA.

Microscopia de imunofluorescência indireta

Autoanticorpos IgA anti-ZMB circulantes podem ser detectados por MIFI em cerca de 10 a 30% dos casos (Crosby, 1993; Flotte, 1995).

Lúpus eritematoso

O lúpus eritematoso (Fig. 52.5A) é um distúrbio sorologicamente caracterizado pela presença de múltiplos autoanticorpos, tais como anticorpos antinucleares (ANAs), anti-DNA nativo, anti-histonas e anti-Sm.

Microscopia de imunofluorescência direta

Por meio da MIFD, é possível observar um padrão característico grosseiro, granular e contínuo de deposição de Igs e complemento ao longo da ZMB epidérmica em 50 a 95% dos pacientes com SLE (Izuno, 1986). A presença de depósitos de complexo de ataque à membrana, constituídos por moléculas C5b-9 do complemento, na ZMB da pele lesional pode servir de marcador do SLE (Helm, 1993).

Se por um lado esses pacientes comumente apresentam depósitos de IgG, IgM e componentes do complemento (C3 e/ou C1q) (Figs. 52.5B e C), por outro, é possível identificar a presença de Igs de todas as classes (Izuno, 1986). Quando a pele não lesional apresenta ao mesmo tempo um padrão típico de IgG, IgA e/ou IgM, há maiores chances de que o diagnóstico seja de SLE (Izuno, 1986).

Embora característico, esse padrão de reação pode ser observado em outros distúrbios, como a doença mista do tecido conjuntivo, dermatomiosite, reação do enxerto *versus* hospedeiro, erupções medicamentosas e vasculite (Izuno, 1986). Portanto, é obrigatório correlacionar os resultados diretos com a apresentação clínica e com os resultados obtidos por microscopia de luz de biópsia de pele. Essa informação, então, é interpretada no contexto dos achados diretos do indivíduo com o objetivo de classificar o tipo clínico de lúpus eritematoso. Numerosas publicações citam a utilidade da MIFD para o diagnóstico de SLE a partir de biópsias de pele, com ou sem lesões, e de sítios expostos ou protegidos da luz solar. Em pacientes diagnosticados com SLE, a pele normal exposta ao Sol apresenta reação positiva em 70% dos casos, enquanto a pele normal mantida ao abrigo da luz solar apresenta reação positiva em apenas 40% dos pacientes (Izuno, 1986). Entretanto, o potencial de prever a atividade da doença ou o envolvimento renal desse modo continua sendo controverso (Izuno, 1986). Talvez a aplicação clínica mais prática dos testes laboratoriais consista no diagnóstico diferencial de SLE a partir do SLE discoide. Até 95% dos indivíduos com lúpus eritematoso discoide apresentam um padrão grosseiro, granular e contínuo de deposição na ZMB, que é similar ao padrão observado no SLE (Izuno, 1986). Contudo, os achados positivos de MIFD no lúpus eritematoso discoide se restringem à pele lesional, enquanto no SLE resultados positivos de MIFD podem ser obtidos a partir de biópsias de pele com ou sem lesões (Izuno, 1986).

O lúpus eritematoso cutâneo subagudo é clinicamente caracterizado por artrite, manifestações sistêmicas suaves e autoanticorpos anti-SS-A/Ro. A MIFD de biópsias de pele oriundas desses pacientes revela a presença de depósitos de Igs e/ou complemento na ZMB em apenas 50% das biópsias de pele lesional e em 30% das biópsias de pele sem envolvimento (Izuno, 1986). A MIFI é positiva em 50 a 70% dos pacientes com lúpus eritematoso cutâneo subagudo.

Outras doenças autoimunes sistêmicas importantes não fornecem achados com especificidade diagnóstica por MIFD ou por MIFI.

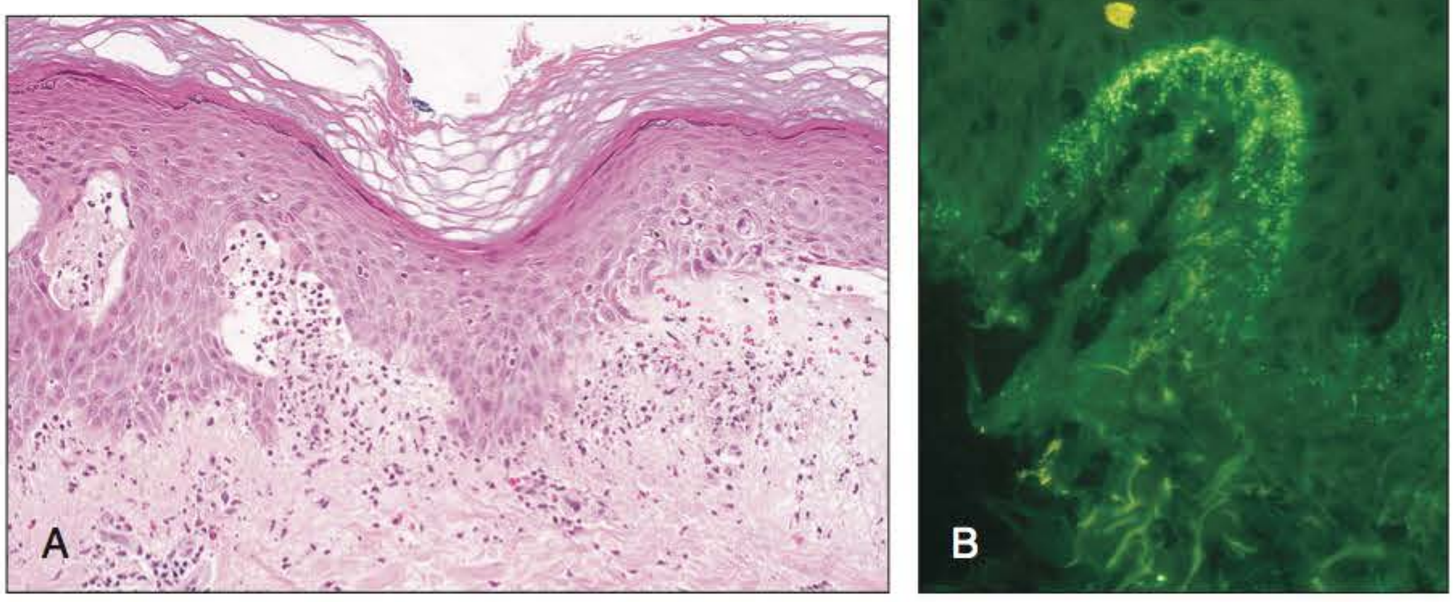


Figura 52.4 Biópsia de pele de paciente com dermatite herpetiforme mostrando fenda subepidérmica, epiderme não necrótica e microabscessos neutrofílicos nas extremidades das papilas dérmicas (*A*, H&E, × 200). A microscopia de imunofluorescência direta revela um padrão granular de imunofluorescência por deposição de IgA nas extremidades das papilas dérmicas e, em menor extensão, ao longo da região da membrana basal (*B*, × 400).

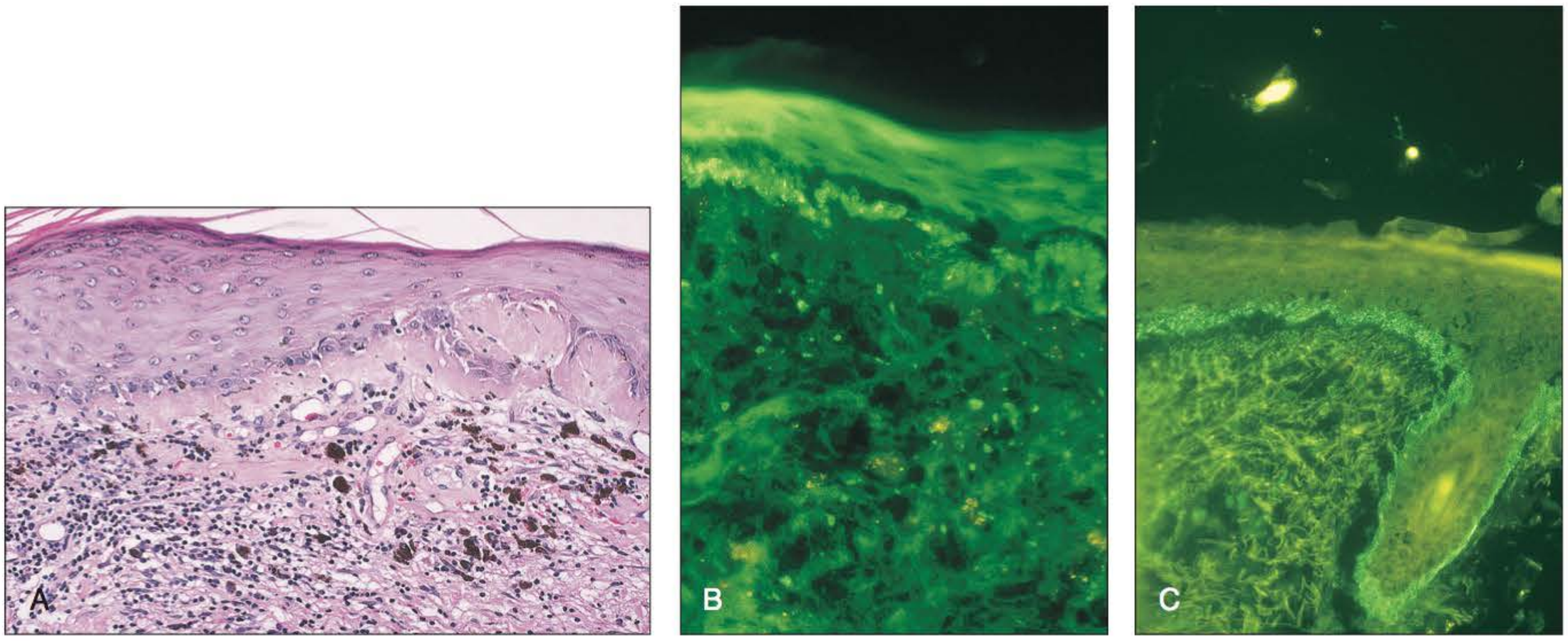


Figura 52.5 Biópsia de pele de paciente com lúpus eritematoso indicando a ocorrência de atrofia epidérmica, alteração vacuolar de queratinócitos basais, espessamento marcante da zona de membrana basal, inflamação perivascular e intersticial, sobretudo linfocítica, e incontinência de melanina (*A*, H&E, × 500). A microscopia de imunofluorescência direta revela um padrão granular contínuo de imunofluorescência por deposição de C3 (*B*, × 500) e C1q (*C*, × 200) ao longo da zona de membrana basal.

Apesar de alguns pacientes apresentarem depósitos granulares de IgM ao longo da ZMB, esse achado imunopatológico é considerado um marcador completamente inespecífico, que pode ser detectado não só na doença autoimune, mas também em um número significativo de dermatites inflamatórias, ou na pele exposta ao Sol de indivíduos normais em termos clínicos (Izuno, 1986).

Vasculite

A vasculite (ver Cap. 51) que ocorre na pele possui alguns sinônimos: vasculite leucocitoclástica, vasculite alérgica e vasculite/angiite de hipersensibilidade. Histologicamente, os pequenos vasos sanguíneos da derme apresentam tumefação de células endoteliais, exocitose neutrofílica, debris nucleares ("leucocitoclasia") e necrose aliados ao extravasamento de hemácias.

Microscopia de imunofluorescência direta

O exame da biópsia de uma lesão, obtida em 24 horas após o seu aparecimento, pode revelar a presença de depósitos vasculares de IgM, C3, fibrinogênio e ocasionalmente IgG. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de vasculite. É provável que a biópsia de lesões surgidas há mais de 24 horas não tenha utilidade, pois a coloração inespecífica do fibrinogênio pode ser o único achado nesse material. A confirmação histológica do diagnóstico, portanto, é essencial. A púrpura de Henoch-Schönlein é diagnosticada mediante a observação de um padrão granular de imunofluorescência vascular produzido pela IgA, com ou sem C3, em um cenário clínico apropriado.

Fígado

Autoanticorpos

Autoanticorpos antinucleares

Os ANAs são mais comumente detectados por MIFI, embora os ELISAs estejam se tornando populares nos laboratórios clínicos para identificação de autoanticorpos específicos. Os ANAs constituem um grupo bastante heterogêneo, e quase todos os subtipos detectados em doenças reumáticas são encontrados em indivíduos com hepatite autoimune. Os padrões de fluorescência homogêneo ou salpicado em células HEp-2 são mais comuns em pacientes com hepatite autoimune. Na doença hepática, também foi descrita a presença de autoanticorpos específicos para o DNA de dupla fita (Mann, 1992). Títulos de ANAs acima de 1:80 são detectados em aproximadamente 80% dos pacientes com hepatite autoimune (Nakamura, 1991). Entretanto, ANAs também podem ser encontrados em cerca de 60% dos pacientes com CBP, 50% dos indivíduos com doença hepática associada ao alcoolismo, 40% dos pacientes com hepatite viral de tipo B e 25% dos pacientes com hepatite autoimune que também apresentam anticorpos antimicrossomais hepáticos/renais (LKMs, *anti-liver-kidney microsomal*) (Nakamura, 1991). Autoanticorpos anticentrômeros podem ser identificados em 10 a 15% dos pacientes com CBP.

Autoanticorpos antimitocondriais

Foram identificados nove antígenos mitocondriais que reagem com anticorpos antimitocondriais (AMAs). AMAs dirigidos contra os antígenos M2 e M9 são considerados os marcadores diagnósticos mais importantes da CBP (Bylund, 1992).

AMAs detectados por MIFI, utilizando estômago/rim de roedores como substrato, apresentam um padrão de fluorescência típico que reflete uma coloração citoplasmática homogênea dos túbulos renais e de regiões de células parietais estomacais. Os túbulos distais também são positivos. Essa coloração dos túbulos distais representa um importante ponto de diferenciação entre a reatividade dos AMAs e dos LKMs, uma vez que os túbulos distais renais não se coram na presença destes últimos.

O autoantígeno M2 consiste em uma mistura que contém vários componentes do complexo da 2-oxo-desidrogenase ácida mitocondrial. O autoantígeno M2 dominante em pacientes com CBP é a subunidade E2 (70 kDa) da piruvato desidrogenase (PDH-E2) (Manns, 1992). O segundo autoantígeno mitocondrial mais comum é a subunidade E2 (50 kDa) da cadeia ramificada da oxo-ceto-desidrogenase ácida (BCOADH-E2) (Manns, 1992). Um grupo de autoanticorpos séricos denominados autoanticorpos mitocondriais de ocorrência natural (NOMAs, *naturally occurring mitochondrial autoantibodies*) é detectado em indivíduos que entraram em contato com pacientes com CBP e até mesmo em técnicos de laboratório que processam soros desses pacientes (Bylund, 1992). Os NOMAs raramente são produzidos em pacientes com CBP, no entanto são encontrados no soro de pacientes infectados pelo vírus Epstein-Barr, citomegalovírus e em distúrbios infecciosos. Os NOMAs são dirigidos contra epítopos presentes nos antígenos M2 e M9 encontrados na CBP, contudo não reconhecem os antígenos identificados pelos AMAs (Bylund, 1992). Embora a importância dos NOMAs seja incerta, sua presença em indivíduos que mantêm contato com pacientes com CBP levantou questões sobre a possível presença de agentes contagiosos no soro desses pacientes (Bylund, 1992).

Autoanticorpos antimúsculo liso

Os autoanticorpos antimúsculo liso (SMAs, *smooth muscle autoantibodies*) são encontrados em cerca de 50% dos pacientes com hepatite autoimune clássica e com frequência acompanham os ANAs

(Nakamura, 1991). Quando ocorrem na doença hepática, os SMAs são dirigidos contra a actina F. Esta, por sua vez, integra o citoesqueleto do hepatócito e está intimamente associada à membrana plasmática (Nakamura, 1991). De modo típico, o título de SMAs é maior ou igual a 1:80 no soro de um paciente com hepatite autoimune. Todavia, é possível detectar baixos títulos de SMAs em pacientes com outras doenças, bem como em indivíduos aparentemente sadios (Nakamura, 1991).

A MIFI, utilizando estômago de roedores como substrato, é comumente empregada para detecção de SMAs, que coram a lâmina própria muscular do estômago produzindo um padrão uniforme e consistente. A coloração específica da camada muscular mucosa e das paredes dos vasos sanguíneos é um aspecto característico. Se um bloco de tecido de estômago/rim de roedor é utilizado como substrato, pode haver uma fraca coloração das zonas mesangiais glomerulares em decorrência da presença da actina F nessa região. Quando o substrato utilizado são células HEp-2, em vez de outros substratos, a presença dos SMAs é revelada pela MIFI por meio de uma coloração citoplasmática com padrão semelhante a "cordas".

Autoanticorpos antimicrossomais hepáticos/renais

Os LKMs coram os microssomos dos hepatócitos e das células tubulares renais proximais quando são detectados por MIFI com o uso de estômago/rim de roedor como substrato. Os túbulos renais distais são caracteristicamente negativos para imunofluorescência. A ocorrência simultânea de AMA e LKM, embora possível, é muito improvável.

ELISAs capazes de detectar LKMs estão começando a ser disponibilizados para uso em laboratório clínico. A presença de LKMs também pode ser confirmada por *Western blotting*, embora esse ensaio em geral esteja disponível somente em laboratórios de pesquisa.

Por meio da técnica de *Western blotting*, os LKMs foram agrupados em três subtipos distintos com base em seus antígenos-alvo (Manns, 1992). Um componente de 50 kDa do citocromo P450 IID6 foi identificado como principal antígeno-alvo do LKM-1 (Manns, 1992). O LKM-2, dirigido contra o citocromo P450 IIC9, foi detectado em pacientes sob tratamento com ticrinafeno (Manns, 1992). Esse fármaco foi retirado do mercado americano. O LKM-3 foi identificado no soro de pacientes com hepatite viral crônica de tipo D (Manns, 1992).

Outros autoanticorpos hepáticos

Os demais grupos remanescentes de autoanticorpos hepáticos incluem os anticorpos anticitoesqueleto, anticitosol, antimembrana hepática, antilamininas nucleares, hepato-específico e antirreceptor de asialoglicoproteína. Todos esses autoanticorpos foram identificados em pacientes com doenças hepáticas autoimunes, porém, não são amplamente utilizados como marcadores diagnósticos (Nakamura, 1991).

Doenças hepáticas

A Tabela 52.3 lista os padrões sorológicos característicos da hepatite autoimune, CBP e colangite esclerosante primária. Estes são distúrbios tipicamente crônicos, definidos pela detecção de elevadas concentrações de transaminases séricas durante um período mínimo de 6 meses.

Os diagnósticos diferenciais clínicos mais comuns são a doença hepática associada ao alcoolismo, lesão hepática induzida por fármacos, hepatites virais e fígado gorduroso associado ao diabetes melito ou obesidade. Os diagnósticos diferenciais menos comuns incluem hemocromatose idiopática, doença de Wilson, deficiência de α_1-antitripsina e envolvimento hepático associado a doenças sistêmicas.

Hepatite autoimune

A hepatite autoimune ocorre classicamente em mulheres em torno dos 35 anos, que apresentam elevadas concentrações de aminotransferases séricas, hipergamaglobulinemia, amenorreia, artralgias e autoanticorpos circulantes, como ANA, SMA e LKM. Por definição, essas pacientes não apresentam evidência sorológica de hepatite viral, doença de Wilson ou outras doenças no diagnóstico diferencial. Em termos de histologia, a biópsia hepática tipicamente revela uma hepatite crônica com interface ativa (Fig. 52.6A). A resposta do paciente ao tratamento com corticosteroides é dramática e a falha em responder põe em dúvida o diagnóstico de hepatite autoimune.

A hepatite autoimune representa um grupo heterogêneo de distúrbios de etiologia incerta. Não existem aspectos patognomônicos. O International Autoimmune Hepatites Group (IAHG, Grupo Internacional de Hepatite Autoimune) integrou aspectos clínicos e laboratoriais apresentados pelo paciente a um sistema de escores para estabelecer o diagnóstico definitivo ou provável de hepatite autoimune. A Tabela 52.4 lista os parâmetros laboratoriais clínicos adotados como critério para o diagnóstico da hepatite autoimune. Outros critérios e a interpretação da pontuação constam nas referências (Johnson, 1993; Manns, 1998). É importante salientar que a ausência de ANA, SMA ou LKM são exclui o diagnóstico dessa doença.

Embora subtipos de hepatite autoimune baseados nos padrões de autoanticorpos detectados sejam descritos na literatura médica, a utilidade clínica dessa subclassificação é duvidosa. Além disso, o IAHG não recomenda a subclassificação da hepatite autoimune baseada em perfis de autoanticorpos. A partir de uma perspectiva clínica, a hepatite autoimune pode ser vista como uma doença hepática crônica caracterizada pela presença de uma variedade de autoanticorpos. A maioria dos especialistas parece considerar os tipos 1 e 2 de hepatite autoimune como as principais formas dessa doença, enquanto os demais subtipos ainda são discutidos.

Como diversos subtipos são amplamente cotados, a subclassificação da hepatite autoimune de acordo com o perfil sorológico será abordada de forma breve nesta seção.

A presença de ANAs caracteriza a hepatite autoimune clássica (tipo 1). Os SMAs também são frequentemente detectados (Figs. 52.6B e C). Embora os AMAs sejam marcadores diagnósticos específicos e sensíveis da CBP, conforme descrito adiante, também é possível detectar esses anticorpos em cerca de 15% dos pacientes que apresentam aspectos clínicos e histológicos de hepatite autoimune, tais como melhora

Tabela 52.3 Doenças autoimunes hepáticas

	ANA	LKM	SLA	SMA	AMA	Anti-HCV	p-ANCA	ACA	Terapia
Hepatite autoimune									
Tipo 1	+	–	–	+	–	–	±	–	Imunossupressão
Tipo 2a	–	+	–	–	–	–	–	–	Imunossupressão
Tipo 2b	–	+	–	–	–	+	–	?	
Tipo 3	–	–	+	±	±	–	–	–	Imunossupressão
Tipo 4	–	–	–	+	–	–	–	–	Imunossupressão
CBP	–	–	–	–	+	–	–	–	Suportiva; transplante
CEP	–	–	–	–	–	–	+	–	Suportiva; transplante
CAI	+	–	–	–	–	–	–	+	Imunossupressão

ACA = anticorpo antianidrase carbônica; AMA = anticorpo antimitocondrial; ANA = anticorpos antinúcleo; CAI = colangite autoimune; CBP = cirrose biliar primária; CEP = colangite esclerosante primária; HCV = vírus da hepatite C; LKM = anticorpos antimicrossomo hepático/renal; p-ANCA = anticorpos antiantígeno neutrofílico citoplasmático perinuclear; SLA = anticorpo antiantígeno hepático solúvel; SMA = anticorpo antimúsculo liso.

Fonte: modificada de Manns, MP: Autoimmune diseases of the liver. Clin Lab Med 1992; 12:25-40.

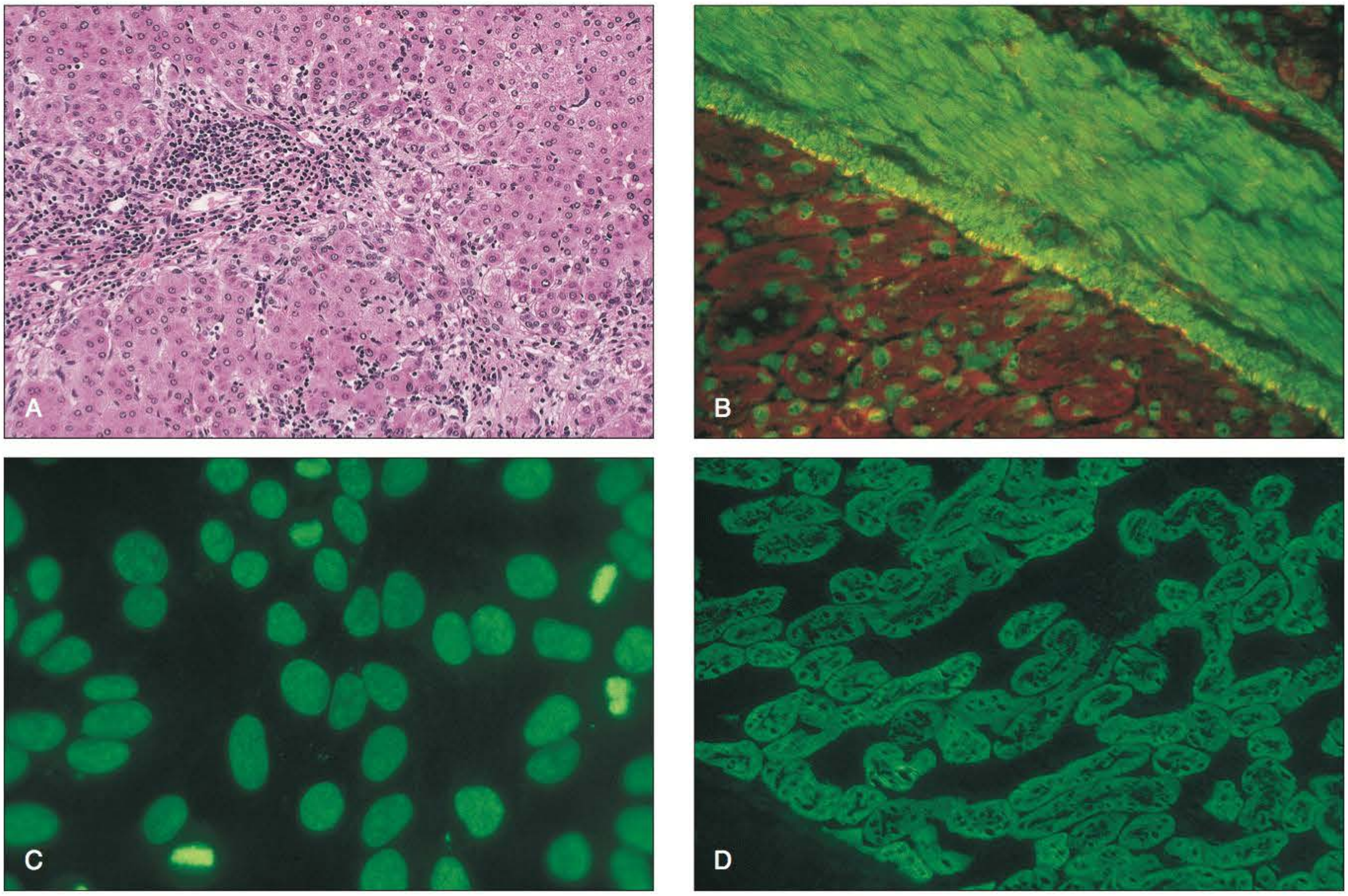


Figura 52.6 Biópsia de fígado de paciente com hepatite autoimune não tratada mostrando uma proeminente inflamação portal e lobular, com atividade de interface e frequentemente inúmeros plasmócitos na principal borda inflamada (*A*, H&E, × 500). A MIFI, nesse caso, mostra a presença de anticorpos antimúsculo liso e antinuclear combinados, utilizando estômago/rim de camundongo como substrato (*B*, × 200). O padrão de ANAs observado na doença hepática muitas vezes é homogêneo (*C*, × 400). MIFI para detecção de autoanticorpos antimicrossomo hepático/renal com o uso de estômago/rim de camundongo como substrato. Observa-se um padrão de imunofluorescência citoplasmático finamente granular nos túbulos renais proximais, mas não nos túbulos distais (*D*, × 200).

clínica em resposta à terapia imunossupressora. Considera-se que esses pacientes apresentam uma síndrome com aspectos "sobrepostos" de hepatite autoimune e de CBP. O título de AMAs nesse subgrupo de hepatite autoimune em raros casos ultrapassa 1:40 (Bylund, 1992). Além disso, a especificidade antigênica desses AMAs é similar àquela observada na CBP clássica (Manns, 1992). A doença hepática em que são detectados LKMs (Fig. 52.6D), conhecida como hepatite autoimune tipo 2, foi subdividida em subgrupos 2a e 2b. Em geral, pacientes com essa variante são negativos para ANAs e SMAs. Entretanto, autoanticorpos antimicrossomais tireoidianos, antitireoglobulina e anticélula parietal (anti-CP) são detectados com frequência. A hepatite autoimune tipo 2 é caracterizada por baixos níveis de IgA e uma hipergamaglobulinemia menos proeminente do que aquela observada no tipo 1 (Manns, 1992). O tipo 2a ocorre em mulheres jovens, que apresentam títulos elevados de LKM-1, sorologia negativa para vírus da hepatite C e, contudo, doença responsiva aos esteroides.

A variante representada pelo tipo 2b ocorre em pacientes mais velhos e não há tanta preponderância feminina. Os pacientes afetados apresentam títulos baixos de LKM-1, manifestam doença hepática mais branda e com frequência são sorologicamente positivos para o vírus da hepatite C. Nesses casos, a doença tende a ser menos responsiva à imunossupressão do que no tipo 2a.

Alguns investigadores propuseram um terceiro subgrupo de hepatite autoimune, separado de outros subgrupos com base na identificação do autoanticorpo antiantígeno hepático solúvel (SLA, *anti-soluble-liver autoantibody*) no soro (Manns, 1992). Embora seja possível que a identificação desse anticorpo venha a se tornar importante, pois o SLA foi relatado como o único marcador sorológico encontrado em cerca de 25% dos pacientes com hepatite autoimune, os testes confiáveis para sua detecção são de execução tecnicamente difícil e, até o momento, não estão disponíveis de forma rotineira nos laboratórios clínicos (Manns, 1992).

É possível que títulos elevados de SMAs dirigidos contra a actina F caracterizem um quarto subgrupo de hepatite autoimune, que é observado frequentemente em crianças pequenas (Manns, 1992).

Cirrose biliar primária

A CBP é um distúrbio colestático crônico e progressivo, que ocorre tipicamente em mulheres jovens ou de meia-idade. As pacientes podem ser assintomáticas ou apresentar sintomas de colestase (prurido). Os estudos laboratoriais apontam uma elevação dos níveis de fosfatase alcalina, com ou sem hiperbilirrubinemia, bem como títulos elevados de IgM e AMAs. Podem ocorrer fenômenos imunológicos extra-hepáticos associados, como o fenômeno de Raynaud, complexo seco, artrite reumatoide, tireoidite, escleroderma ou doença celíaca (Bylund, 1992; Manns, 1992). Em termos histológicos, o fígado apresenta vários estágios de colangite destrutiva não supurativa (Fig. 52.7A).

Os AMAs constituem os marcadores diagnósticos mais específicos e sensíveis para CBP (Figs. 52.7B e C). Como diretriz geral, um título de AMA maior ou igual a 1:160 é considerado altamente preditivo de CBP, embora cerca de 10% dos pacientes com a doença apresentem títulos de AMA menores ou iguais a 1:16 (Bylund, 1992). Foi demonstrado que cerca de 95% dos pacientes que apresentam aspectos típicos de CBP possuem AMAs anti-M2 e/ou anti-M9. Os 5% restantes são AMA negativos.

A causa da CBP é desconhecida. Foram propostos vários mecanismos patogenéticos para a lesão imunorrelacionada do ducto biliar, que caracteriza a doença (Gershwin, 2000). Embora essa doença esteja classicamente associada à presença de AMAs no soro, a principal forma de

Tabela 52.4 Parâmetros laboratoriais e escores para diagnóstico de hepatite autoimune

Parâmetros clínicos laboratoriais	Escore
Bioquímica	
Proporção de fosfatase alcalina aumentada em relação à aminotransferase	
> 3,0	–2
< 3,0	+2
Globulina sérica total, γ-globulina ou IgG (× limite superior normal)	
> 2,0	+3
1,5–2,0	+2
1,0–1,5	+1
< 1,0	0
Autoanticorpos (MIFI)	
Adultos	
ANA, SMA, LKM	
> 1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
< 1:40	0
Crianças	
ANA, LKM	
> 1:20	+3
1:10 ou 1:20	+2
< 1:10	0
SMA	
> 1:20	+3
1:20	+2
< 1:20	0
AMA	
Detectado	–2
Não detectado	0
Adultos e crianças (sem detecção de ANA, SMA, LKM)	
Outros autoanticorpos hepáticos (SLA, ASGP-R, LC-1)	
Detectado	+2
Não detectado	0
Marcadores virais	
HAV ou HBV agudo	–3
HCV por ELISA e/ou RIBA	–2
RNA de HCV por PCR	–3
Outras infecções virais ativas	–3
Soronegatividade para vírus conhecidos	+3
Fatores genéticos	
Alótipo HLA B8-DR3 ou DR4	+1

Fonte: adaptada de Johnson PJ, McFarlane IG: Convenors on behalf of the panel. Meeting report: International autoimmune hepatitis group. Hepatology 1993; 18:998-1008.

lesão tecidual observada é a lesão imunológica dos ductos biliares interlobulares intra-hepáticos mediada pelas células T (Batts, 1991; Manns, 1991, 1988; Poupon, 1996). A descoberta do anticorpo antirretroviral em pacientes com CBP foi atribuída à existência de uma resposta autoimune ou de uma imunorreatividade contra proteínas virais que compartilham determinantes antigênicos com retrovírus (Mason, 1998).

O diagnóstico de CBP AMA-negativa deriva da apresentação clínica, achados do exame de biópsia hepática e colangiograma para exclusão de colangite esclerosante primária.

Colangite esclerosante primária

A colangite esclerosante primária ocorre tipicamente em homens com história de enteropatia inflamatória e/ou diarreia. Em 50% desses pacientes, a colite ulcerativa constitui a enteropatia inflamatória associada à colangite esclerosante primária. Um diagnóstico de colangite esclerosante primária em geral se baseia na colangiografia, que revela uma característica padrão em forma de contas nos ductos biliares, em decorrência das estenoses multifocais existentes nesses sítios (Fig. 52.8A). A lesão histológica mais marcante é a colangite fibrosa de grandes e/ou pequenos ductos biliares, ainda que na prática seja observado um amplo espectro de lesões inflamatórias crônicas ao exame da biópsia hepática (Fig. 52.8B).

Estudos bioquímicos de rotina demonstraram que há elevação dos níveis de fosfatase alcalina e aumento da concentração de aminotransferases, com ou sem hiperbilirrubinemia. Embora possa haver ANAs, os AMAs estão ausentes.

Ademais, relatos apontam uma alta prevalência de p-ANCAs atípicos, detectada por MIFI em neutrófilos fixados com etanol e formalina (Manns, 1992; Lo, 1994; Gur, 1995; Bansi, 1996).

Colangiopatia/colangite autoimune

A colangite/colangiopatia autoimune é uma doença hepática colestática crônica, que aparentemente não constitui uma variante da colangite esclerosante primária (Goodman, 1995; Tsui, 1997). A apresentação clínica e o aspecto histológico do fígado assemelham-se ao que se observa na CBP, contudo os achados sorológicos mimetizam a hepatite autoimune tipo 1. Os AMAs não são detectados. Além disso, um autoanticorpo dirigido contra a anidrase carbônica foi detectado em alguns pacientes com colangite autoimune (Gordon, 1995).

Apesar de a conexão existente entre colangite autoimune e CBP ainda não estar elucidada, a colangite autoimune pode ser a CBP AMA-negativa. De uma forma geral, os pacientes com colangite autoimune são responsivos à imunossupressão.

Glândula tireoide

Doenças da tireoide

As doenças autoimunes tireoidianas são a doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto (Burek, 1995).

Doença de Graves

O paciente com doença de Graves apresenta sintomas de hipertireoidismo e bócio difuso. A incidência atinge o pico na terceira ou quarta década de vida e a proporção entre os sexos é de 4 a 8 mulheres:1 homem. Cerca de 60 a 70% desses pacientes também manifestam distúrbios oculares (Patrick, 1993). Dados laboratoriais apontam um aumento dos níveis de tri-iodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), bem como da captação de T_3. A terapia é direcionada para a redução da capacidade da tireoide de responder à estimulação promovida pelos autoanticorpos. Para tanto, as opções são a realização de uma tireoidectomia subtotal, administração de iodo radioativo ou uso de fármacos antitireoidianos, como propiltiouracil ou metimazol (Patrick, 1993).

Tireoidite de Hashimoto

A tireoidite de Hashimoto é a forma mais comum de tireoidite. Caracteriza-se funcionalmente pela lenta progressão para hipotireoidismo. Nos pacientes com hipotireoidismo, os níveis de T_3 e T_4 e a captação de T_3 são baixos, ao mesmo tempo em que os níveis de hormônio estimulador da tireoide (TSH) aumentam de maneira anormal (Patrick, 1993). A incidência da tireoidite de Hashimoto atinge o pico na terceira à quinta década de vida, com uma proporção de 10 mulheres:1 homem. Os autoanticorpos dirigidos contra a tireoglobulina (anti-Tg) e a tireoperoxidase (TPO) são clinicamente os mais importantes para o diagnóstico (Patrick, 1993). Contudo, até 20% da população de mulheres adultas sem doença clínica apresenta anticorpos anti-Tg e anti-TPO detectáveis, levantando dúvidas acerca da importância patogênica desses autoanticorpos (Patrick, 1993). A reposição de hormônio tireoidiano é reservada às pacientes com hipotireoidismo comprovado.

Existem similaridades entre a doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto (Utiger, 1991). Ambas estão associadas ao HLA-B8 e compartilham uma patogênese fundamentalmente semelhante. Além

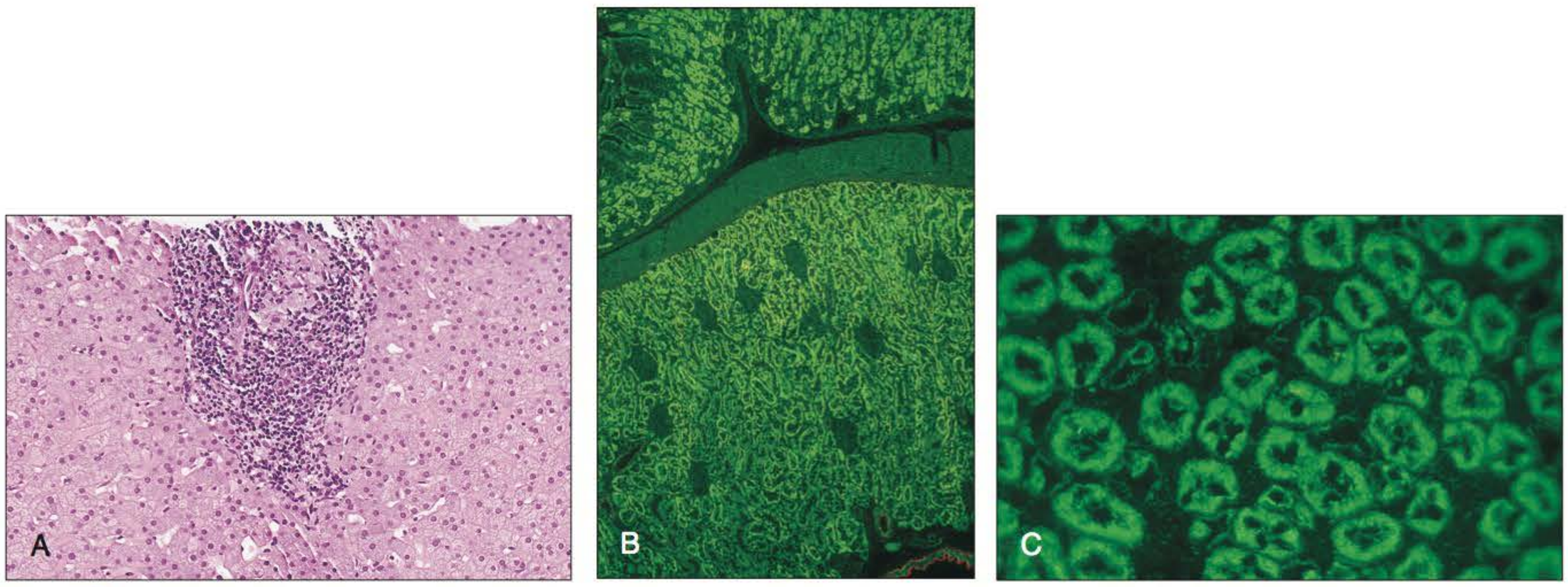


Figura 52.7 Biópsia de fígado de paciente com cirrose biliar primária. Observa-se uma inflamação portal variável acompanhada de colangite linfocítica não supurativa e, nesse exemplo, uma lesão ductal florida com inflamação granulomatosa centralizada no ducto biliar interlobular (*A*, H&E, × 200). A MIFI revela a imunofluorescência difusa dos túbulos renais, incluindo os túbulos distais (*B*, × 200), que apresenta um aspecto citoplasmático homogêneo ao maior aumento (*C*, × 500).

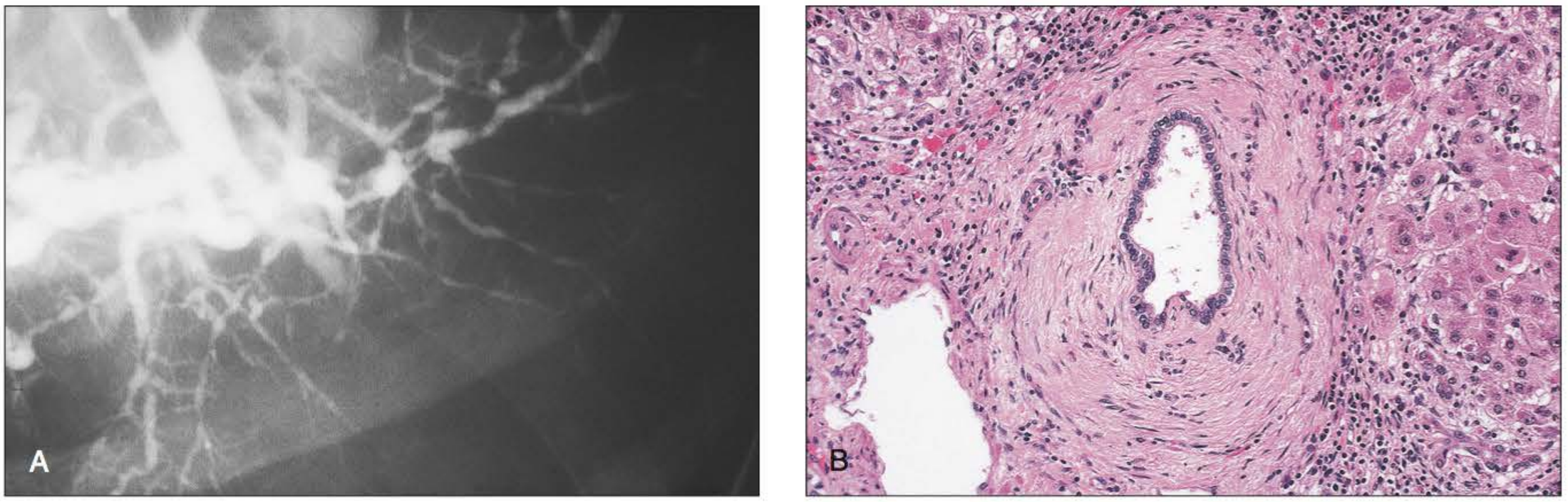


Figura 52.8 Colangiograma de paciente com colangite esclerosante primária, exibindo a característica padrão em contas dos ductos biliares, decorrente da presença de estenoses multifocais nos sítios corados (*A*). A biópsia hepática revela uma proeminente fibrose periductal com o típico padrão em "casca de cebola" (*B*, H&E, × 500).

disso, acredita-se que a doença de Graves pode evoluir para tireoidite de Hashimoto (Utiger, 1991; Patrick, 1993).

Autoanticorpos

Existem três autoanticorpos principais que são considerados importantes nas doenças autoimunes tireoidianas: anti-TPO, anti-Tg e antirreceptor de TSH (anti-TSH-R) (Naparstek, 1993). Embora os anticorpos anti-TPO e anti-Tg sejam considerados marcadores da doença autoimune tireoidiana, seu papel etiológico não foi comprovado. É possível que esses autoanticorpos também estejam presentes em outras doenças autoimunes órgão-específicas. Por outro lado, o anticorpo anti-TSH-R exerce um papel nitidamente causal na doença autoimune tireoidiana (Naparstek, 1993).

Autoanticorpos antitireoperoxidase

O autoanticorpo anti-TPO é dirigido contra um antígeno de 105 kDa que está contido na fração microssomal do citoplasma das células epiteliais da tireoide (Burek, 1995). O ELISA está se tornando um método disponível comum para detecção de anticorpos anti-TPO.

Historicamente, a MIFI é um método popular e sensível para detecção desses anticorpos ("anticorpos antimicrossomais"). O teste de MIFI utiliza como substrato cortes de tecido humano ou de macaco obtidos em criostato, sem fixação e secos ao ar. O soro positivo cora o citoplasma das células epiteliais foliculares tireoidianas, sem corar o núcleo (Fig. 52.9A). O autoanticorpo anti-TPO deve ser diferenciado dos AMAs, diante da observação de um padrão de coloração citoplasmática grosseiro e granular. Para tanto, o soro deve ser testado utilizando como substrato estômago/rim de camundongo.

O anticorpo anti-TPO pode ser detectado no soro de pacientes com doença de Graves ou tireoidite de Hashimoto, e a presença e o título desses anticorpos estão fortemente correlacionados com a doença clínica ativa (Burek, 1995). Há certa controvérsia entre os pesquisadores com relação ao fato de a determinação isolada de anticorpos anti-TPO ser suficiente para detectar com segurança a doença autoimune tireoidiana (Nordyke, 1993; Kaplan, 1999). O papel patogênico desses autoanticorpos permanece incerto (Naparstek, 1993).

Autoanticorpos antitireoglobulina

Os autoanticorpos anti-Tg têm como alvo a tireoglobulina, que constitui a forma de armazenamento dos hormônios tireoidianos nos folículos da glândula (Burek, 1995). Existem diversos métodos para quantificação desses anticorpos, incluindo a hemaglutinação passiva quantitativa, MIFI e ELISA.

A hemaglutinação passiva quantitativa, com cloreto crômico ou hemácias tratadas com ácido tânico, é o método mais utilizado e mais sensível para detecção de anticorpos anti-Tg (Burek, 1995). Os anticorpos anti-Tg detectados por hemaglutinação são definidos pela detecção de títulos acima de 1:1.000 em cerca de 80% dos pacientes com tireoidite de Hashimoto (Burek, 1995). Esses anticorpos também podem estar presentes em pacientes com doença de Graves (60%) ou carcinoma de tireoide (30%), além de outros distúrbios autoimunes

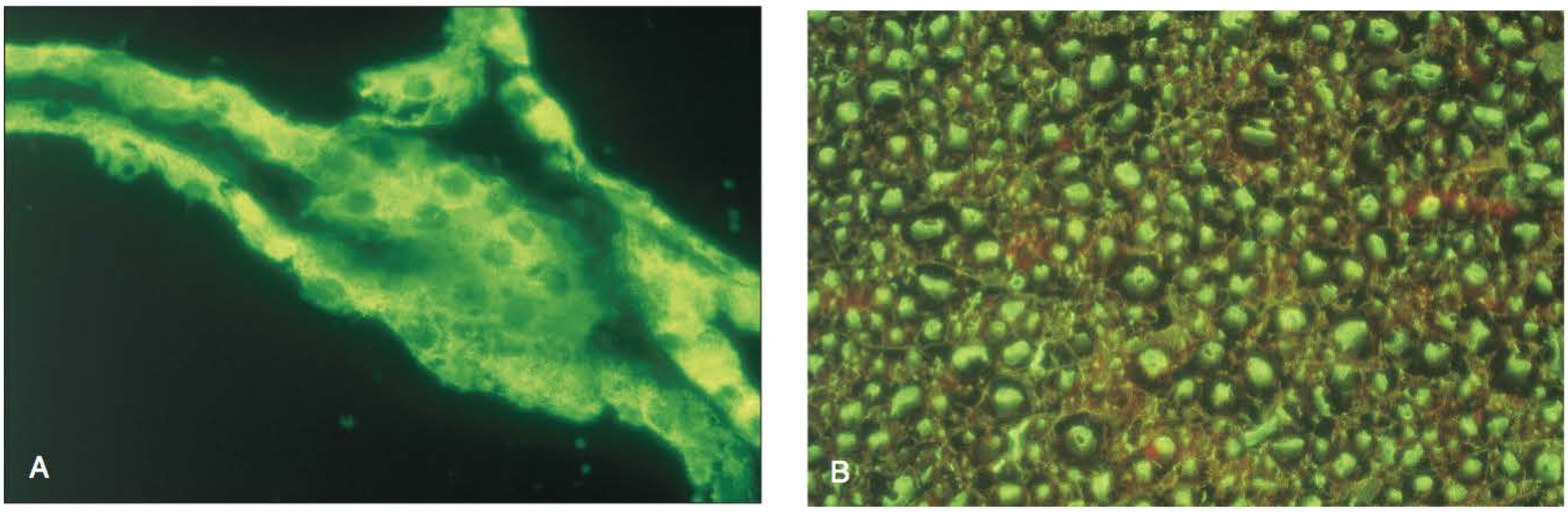


Figura 52.9 Microscopia de imunofluorescência indireta para detecção de autoanticorpos antimicrossomo tireoidiano, com o uso de tireoide de macaco sem fixação como substrato (*A*, × 400); e de autoanticorpos antitireoglobulina, utilizando como substrato cortes de glândula tireoide de macaco obtidos em criostato e fixados em metanol (*B*, × 200).

(p. ex., anemia perniciosa ou síndrome de Sjögren), e em 3 a 18% da população de indivíduos aparentemente normais. Nesses casos, contudo, os títulos detectados por hemaglutinação com frequência (> 90%) são inferiores a 1:1.000 (Burek, 1995).

Para localizar os anticorpos anti-Tg, a MIFI deve usar como substrato cortes de glândula tireoide de macaco obtidos em criostato e fixados em metanol (Fig. 52.9B). A fixação é necessária para prevenir a perda da tireoglobulina durante as etapas de lavagem. Foram descritos três padrões de imunofluorescência que podem ser observados em presença dos autoanticorpos anti-Tg (Burek, 1995): (1) padrão flocular; (2) espaços coloides opacos, mas com fluorescência periférica brilhante; e (3) coloração difusa, brilhante e uniforme dos coloides, em padrão de "vidro fosco" atribuído à reação dos anticorpos anti-Tg com CA2 (Burek, 1995). O CA2, também conhecido como segundo antígeno coloidal, é detectado como único marcador sorológico da tireoidite autoimune em 5 a 8% dos pacientes positivos para anticorpos anti-Tg por MIFI e, ao mesmo tempo, negativos para esses mesmos autoanticorpos por outros métodos (Bigazzi, 1992).

Autoanticorpos antirreceptor do hormônio estimulador da tireoide

Os autoanticorpos anti-TSH-R consistem em dois grupos de autoanticorpos que podem estimular ou bloquear os TSH-Rs e provocar, respectivamente, hiper ou hipotireoidismo. Autoanticorpos anti-TSH-R que se ligam a tais receptores e estimulam a produção de TSH são referidos como imunoglobulinas estimuladoras da tireoide (TSIs, *thyroid-stimulating immunoglobulins*). De modo oposto, autoanticorpos anti-TSH-R que se ligam aos receptores e bloqueiam a ligação e função do TSH são referidos como imunoglobulinas inibidoras da ligação à tireoide (TBIIs, *thyroid-binding inhibitory immunoglobulins*) (Mooij, 1993; Brunt, 1995). É provável que as TSIs causem hipertireoidismo em pacientes com doença de Graves (Wilkin, 1990; Bigazzi, 1992; Brunt, 1995). A prevalência desses anticorpos varia de 55 a 95%, dependendo do método de detecção (Bigazzi, 1992; Brunt, 1995). Os TSIs usualmente pertencem à classe IgG e estimulam a produção de hormônios tireoidianos ao ativarem o sistema da adenilato ciclase após se ligarem aos TSH-Rs (Patrick, 1993).

A detecção dos autoanticorpos anti-TSH-R é complexa e não faz parte da rotina de testes clínicos. Trata-se de um teste que pode ser utilizado para confirmar a doença de Graves em pacientes com hipertireoidismo que apresentam resultados equivocados nas pesquisas laboratoriais de rotina (Bigazzi, 1992). Ademais, um dos ensaios para detecção desses anticorpos pode ser utilizado no monitoramento de pacientes submetidos à terapia de reposição hormonal ou que tenham sido diagnosticados com tireotoxicose neonatal (Bigazzi, 1992).

Existem duas classes principais de ensaios para detecção de anticorpos anti-TSH-R: os bioensaios e os ensaios de ligação. Os aspectos metodológicos desses ensaios são revisados na literatura (Bigazzi, 1992; Patrick, 1993; Gupta, 1988). Os ensaios mais modernos, que avaliam soros de pacientes com base na estimulação de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*) em células de tireoide de rato, mantidas em cultura, podem representar um avanço em relação aos bioensaios de execução tecnicamente complicada (Burek, 1995).

Os TSIs são quantificados por meio de bioensaios que determinam o aumento da atividade mediada pelos TSH-Rs, seja medindo a liberação de cAMP, seja determinando a captação de iodo pelas células tireoidianas mantidas em cultura (Brunt, 1995). Os TBIIs são quantificados pela determinação da inibição da ligação de TSH radiomarcado ao seu receptor, ou utilizando bioensaios para detecção de cAMP (Brunt, 1995).

Rim

Glomerulonefrite

A glomerulonefrite é uma das principais causas de doença renal. Acredita-se que mecanismos imunomediados exerçam papel importante na patogênese da glomerulonefrite, embora tais mecanismos autoimunes putativos ainda precisem de confirmação experimental.

A MIFD tem papel significativo no estudo e diagnóstico da glomerulonefrite (Fig. 52.10). Os padrões de imunorreatividade podem ser divididos em padrões de deposição granular ou de deposição linear nos glomérulos ou outras estruturas renais examinadas por MIFD. Os depósitos granulares foram atribuídos à presença de imunocomplexos (ICs) que sedimentam fora do sangue circulante e se formam *in situ* (McCluskey, 1995). A Tabela 52.5 resume os padrões de imunodeposição observados na MIFD e associados às principais doenças glomerulares. Existem várias revisões abrangentes sobre esses distúrbios na literatura especializada (Heptinstall, 1992; McCluskey, 1995). Entretanto, para o propósito dessa discussão, somente os autoanticorpos antimembrana basal glomerular (anti-MBG) são abordados com mais detalhes.

Doença do anticorpo antimembrana basal glomerular

É variada a apresentação clínica de pacientes com doença anti-MBG. Cerca de 50% desses pacientes apresentam somente a doença renal, enquanto os 50% restantes apresentam sintomas renais e pulmonares. Estes últimos sofrem de uma condição conhecida como síndrome de Goodpasture. Pacientes com doença anti-MBG raramente apresentam apenas a doença pulmonar (Wilson, 1987).

O diagnóstico da doença anti-MBG requer a detecção de autoanticorpos anti-MBG dirigidos contra o domínio NC1 do colágeno tipo IV (McCluskey, 1995), também denominado antígeno de Goodpasture. Os métodos disponíveis para detecção de anticorpos anti-MBG circulantes são MIFI, ELISA e radioimunoensaio (RIA) (Wilson, 1987; McCluskey, 1995). Ademais, alguns pesquisadores desenvolveram um teste de *Western blot* sensível (McCluskey, 1995). Dada a difícil padronização e a necessidade de mão de obra experiente

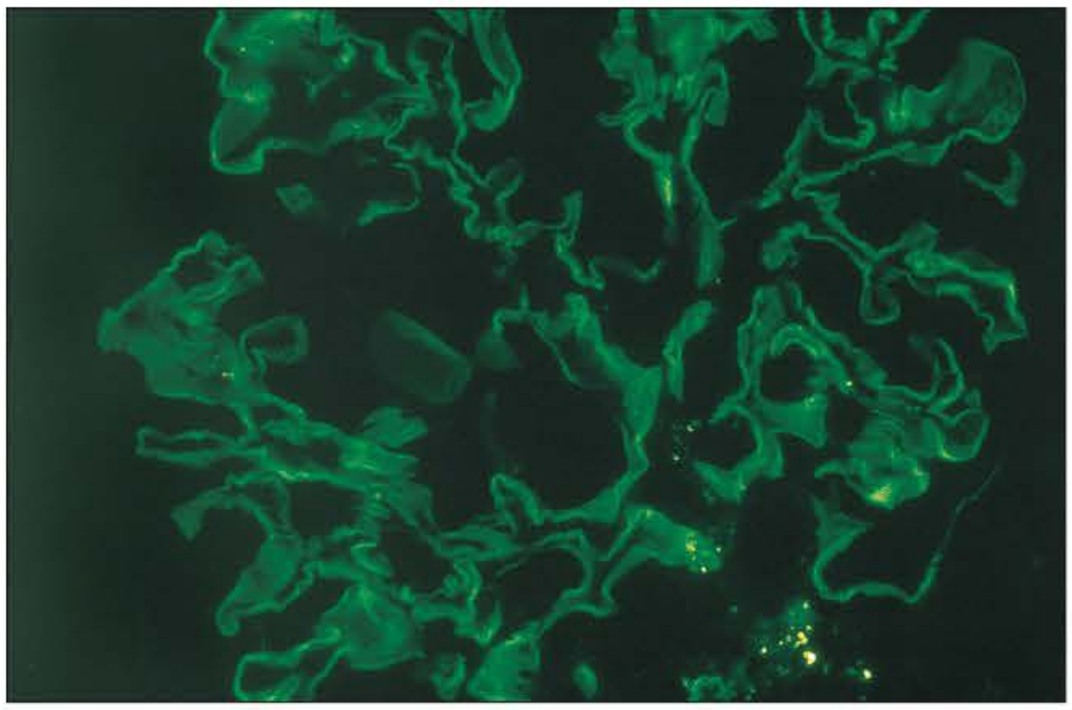


Figura 52.10 Microscopia de imunofluorescência direta revelando um padrão global e linear de imunofluorescência de membrana basal glomerular em um caso de doença antimembrana basal glomerular (× 400).

Tabela 52.5 Principais doenças glomerulares com achados de imunofluorescência direta

Padrão de imunofluorescência e doença	Imunorreativo(s)
Depósitos granulares, mesangiais e MBG	
Glomerulonefrite pós-estreptocócica aguda	C3 difuso ± IgG, IgM
Nefrite lúpica proliferativa difusa	IgG, IgA, IgM, C3
Glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP, tipo I)	C3, IgG, IgM
Glomerulonefrite em crescente por imunocomplexo idiopática	IgG, C3 ± IgM
Doença de depósitos densos (GNMP, tipo II)	C3 (globular) ± IgM
Infecções crônicas (p. ex., endocardite bacteriana)	IgG, IgM, C3
Predominantemente granular, mesangial	
Nefrite lúpica	
Mensagial	IgG, C3; normalmente, IgM, IgA
Proliferativa focal	IgG, C3, IgA; depósitos focais nos capilares da alça
Púrpura de Henoch-Schönlein	IgA predominante; IgG, IgM, C3
Nefropatia por IgA	IgA predominante; por vezes IgG, IgM, C3
Predominantemente granular, MBG	
Nefrite lúpica membranosa	IgG, C3, IgA, IgM
Crioglobulinemia mista	IgM, IgG, C3; massas intravasculares
MBG linear	
Nefrite anti-MBG	IgG, C3; IgA e IgM infrequente
Nefropatia de cadeia leve	Normalmente cadeia leve κ, pode estar na MBT, vasos sanguíneos, interstício

MBG = membrana basal glomerular; MBT = membrana basal tubular.

Modificada de McCluskey RT, Collins AB, Niles JL: Kidney. In Colvin RB; Bhan AK; McCluskey RT (eds): Diagnostic Immunopathology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1995, p 109.

para execução da MIFI, os métodos utilizados para detecção desses anticorpos enfocam preferencialmente a validação de RIA ou ELISA quantitativos. Hoje em dia, um kit de ELISA com licença comercial é disponibilizado para quantificação dos autoanticorpos anti-MBG. Esse ensaio determina os valores do paciente a partir de uma curva-padrão e expressa faixas de valores negativos, limítrofes ou positivos. A maioria dos pacientes com doença anti-MBG ativa parece apresentar valores acima de 100 unidades. Embora valores limítrofes possam ser encontrados na doença anti-MBG ativa e na doença quiescente, tais valores também foram detectados em pacientes com distúrbios renais que não apresentavam doença anti-MBG.

A coexistência de autoanticorpos antiantígeno neutrofílico citoplasmático (ANCA, *antineutrophil cytoplasmic antibodies*) foi documentada em alguns pacientes com glomerulonefrite de evolução rápida (McCluskey, 1995). A coexistência desses dois autoanticorpos varia de 0 a 40% dos pacientes com glomerulonefrite de progressão rápida e, quando acompanhada por evidências da presença de ANCA em pacientes com doença anti-MBG, está associada a um melhor prognóstico renal (McCluskey, 1995).

Glândula suprarrenal

Doença de Addison

A insuficiência adrenocortical crônica não tuberculosa, ou doença de Addison, apresenta uma prevalência de 3 a 6 casos a cada 100.000 indivíduos (Muir, 1993). Cerca de 65 a 70% desses pacientes apresentam autoanticorpos circulantes contra as células do córtex suprarrenal. Esses autoanticorpos são demonstrados por MIFI com o uso de cortes de córtex suprarrenal humano congelados como substrato (Muir, 1993; Patrick, 1993; Burek, 1995). A 21-hidroxilase e a 17α-hidroxilase são dois autoantígenos identificados como reativos aos autoanticorpos antiadrenocorticais (Song, 1994; Devendra, 2004). Os autoanticorpos antiadrenocorticais não são detectados na doença de Addison causada por tuberculose ou por outros agentes exógenos (Patrick, 1993). Notavelmente, cerca de 45% dos indivíduos assintomáticos com autoanticorpos antiadrenocorticais no soro desenvolvem comprometimento da função adrenocortical em um período de 2,5 anos após a detecção dos anticorpos (Muir, 1991).

A doença de Addison associada à presença de autoanticorpos é mais diagnosticada em indivíduos na faixa etária de 20 a 50 anos, além de ser 2 a 3 vezes mais frequente entre as mulheres quando diagnosticada após os 30 anos de idade (Muir, 1993; Patrick, 1993).

Os testes laboratoriais indicam acidose metabólica, hipercalemia, hiponatremia e baixos níveis séricos de cloreto e bicarbonato. Os níveis plasmáticos de cortisol também estão baixos, enquanto os níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) estão elevados (VanArsdel, 1993). Em consequência, a terapia consiste na reposição de glicocorticoides e mineralocorticoides (Patrick, 1993).

A doença de Addison associada à presença de autoanticorpos pode ocorrer de forma isolada ou, mais comumente, ser acompanhada de outros distúrbios autoimunes, como parte integrante de uma síndrome poliglandular (Muir, 1993). Entre essas doenças paralelas, estão a tireoidite autoimune, anemia perniciosa ou diabetes melito insulino-dependente (Patrick, 1993).

Além dos autoanticorpos antiadrenocorticais, outros dirigidos contra a suprarrenal foram detectados em pacientes com doença de Addison, tais como autoanticorpos anticélula esteroide e autoanticorpos que se ligam aos receptores do ACHT (anti-ACTH-R) (Muir, 1993).

Pâncreas

Diabetes melito

Diabetes melito (ver Cap. 16) é o termo diagnóstico aplicado a um grupo de distúrbios metabólicos que compartilham a hiperglicemia como característica comum (Eisenbarth, 1995). O diagnóstico dessa condição é crítico, e sua importância é atestada pelo fato de as complicações diabéticas agudas e crônicas que envolvem múltiplos órgãos absorverem 15% do total de gastos com assistência à saúde nos EUA. Todavia, um progresso considerável foi alcançado em termos de assistência à saúde para pacientes diabéticos, graças à constatação de que o controle agressivo da glicemia reduz o risco de desenvolvimento e progressão de complicações vasculares.

Subtipos clínicos

Os principais subgrupos clínicos do diabetes melito são: diabetes tipo 1A imunomediado; diabetes tipo 1B não imunomediado e com

severa deficiência de insulina; e um subgrupo de diabetes do adulto tipo 2, com autoanticorpos anti-ilhotas, que é denominado diabetes melito autoimune latente (American Diabetes Association, 1997; Devendra, 2004). O diabetes melito tipo 2, antes denominado diabetes melito não insulinodependente, ocorre com mais frequência em indivíduos obesos com mais de 30 anos de idade.

Os principais tipos de autoanticorpos circulantes detectados no diabetes melito tipo 1A são: autoanticorpos anticélulas insulares (ICAs, *islet cell autoantibodies*); autoanticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD); autoanticorpos anti-insulina (IAAs); e autoanticorpos associados ao insulinoma-2 e 2-β, (Lan, 1996; Schmidli, 1998; Devendra, 2004).

Autoanticorpos anticélula de ilhota

A MIFI constitui o método classicamente utilizado para detecção de ICAS (Atkinson, 1993b). Cortes congelados de pâncreas humano são utilizados como substrato tecidual para detectar um padrão de fluorescência específico, finamente granular e citoplasmático em todas as células das ilhotas pancreáticas (Fig. 52.11). Recomenda-se obter o substrato de indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo O, a fim de reduzir a interferência de fundo inespecífica produzida pelas isohemaglutininas ABO. Por meio da MIFI, os ICAs são detectados em cerca de 80% dos pacientes recém-diagnosticados com diabetes tipo 1A, em 3 a 4% dos parentes não diabéticos de pacientes com diabetes tipo 1A e em apenas 0,5% dos indivíduos normais em termos clínicos (Atkinson, 1994). Entre os ICAs estão autoanticorpos que reagem de maneira específica contra a GAD, bem como anticorpos não GAD reativos (Kaufman, 1992; Atkinson, 1993).

A titulação dos ICAs deve ser expressa em unidades da Juvenile Diabetes Foundation (JDF, Fundação do Diabetes Juvenil), que se refere a um soro padrão que contém 80 unidades, estabelecido a partir da Immunology of Diabetes Workshop (Oficina de Imunologia do Diabetes). Títulos acima de 20 unidades JDF parecem ter significado prognóstico (Maclaren, 1992). Existem ensaios para detecção de ICAs com substrato de primata comercialmente disponíveis.

Autoanticorpos anti-insulina

Os IAAs são detectados em cerca de 50% dos pacientes com diabetes tipo 1A no momento do diagnóstico e antes do início da terapia à base de insulina (Atkinson, 1994). Esses autoanticorpos em geral são quantificados pelo ensaio de radioimunoprecipitação competitivo, que é exigente em termos de técnica. Esse ensaio não distingue entre IAAs de ocorrência espontânea e IAAs produzidos como resultado da terapia insulínica. Portanto, é necessário quantificar os IAAs antes da administração de insulina.

Autoanticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico

Os autoanticorpos anti-GAD são detectados na maioria dos pacientes recém-diagnosticados com diabetes tipo 1A e em cerca de 80% dos indivíduos pré-diabéticos que sejam parentes de primeiro grau de pacientes diabéticos (Hagopian, 1993; Schatz, 1995). Os dois autoantígenos GAD, classificados com base na massa molecular, são designados GAD65 e GAD67 (Atkinson, 1993a). Os anticorpos anti-GAD são dirigidos primariamente contra a isoforma GAD65, que é encontrada sobretudo nas ilhotas pancreáticas e no SNC, nos quais atua como enzima responsável pela formação do neurotransmissor inibitório ácido γ-aminobutírico (Maclaren, 1988; Marmeier, 1992; Kaufman, 1992; Luhder, 1994). A forma GAD67 predomina nos nervos periféricos (Atkinson, 1993; Falorni, 1994).

GADAs também estão associados à rara síndrome do homem rígido (Eisenbarth, 1995). De maneira curiosa, uma alta porcentagem desses pacientes apresenta diabetes tipo 1A.

Interpretação e utilidade clínica dos autoanticorpos no diabetes tipo 1A

Os autoanticorpos ICA, anti-GAD e IA-2 atualmente são utilizados como marcadores preditivos do diabetes. O ICA é um marcador específico associado a um alto risco de desenvolvimento de diabetes tipo 1A, embora esses anticorpos não persistam. O autoanticorpo anti-GAD em geral é detectado antes do diagnóstico de diabetes e seus títulos declinam após o início do diabetes clínico (Schatz, 1994). A

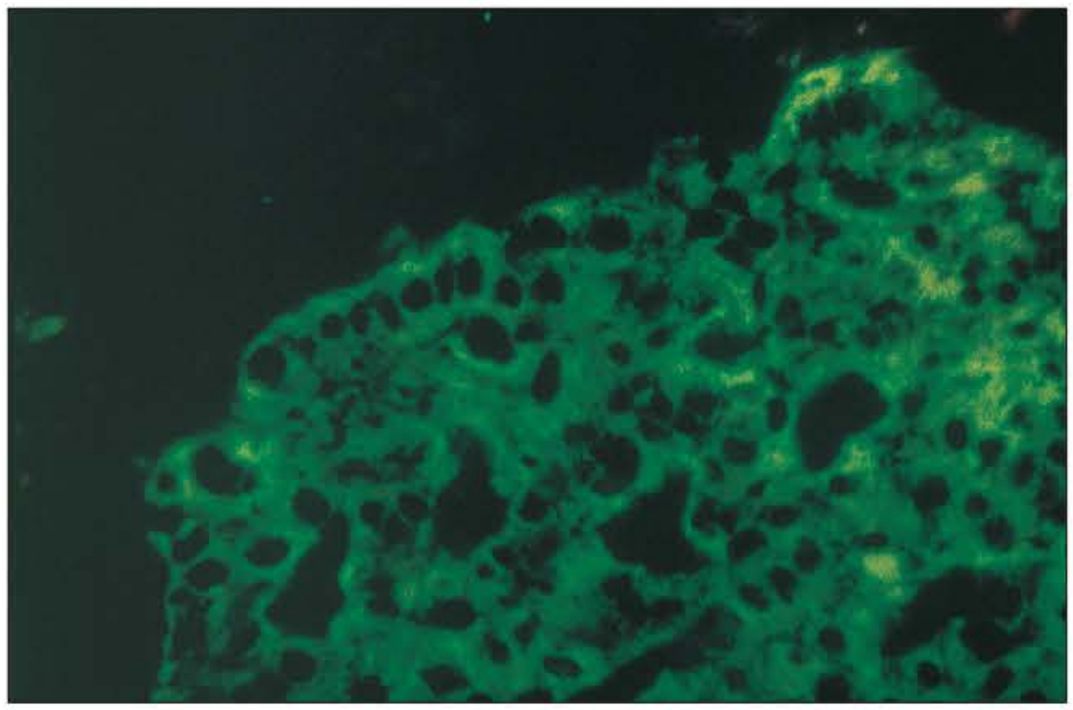


Figura 52.11 Microscopia de imunofluorescência indireta para detecção de autoanticorpos anticélula insular, com o uso de pâncreas de indivíduo com tipo sanguíneo O como substrato (× 400).

triagem inicial para detecção de autoanticorpos associados ao diabetes tipo 1A limita-se ao ICA e IAA (Devandra, 2004).

A identificação de autoanticorpos anti-ilhotas pode ser utilizada para confirmar a autoimunidade em pacientes com diabetes agudo, diferenciando o diabetes tipo 1A do 1B. O uso desses marcadores para identificar indivíduos que correm risco de desenvolver o tipo 1A está sendo avaliado, com o intuito de determinar a necessidade de realizar estudos metabólicos para avaliação do grau de intolerância subclínica à glicose e solicitação de imunoterapia na fase pré-clínica do diabetes (Maclaren, 1992). A quantificação dos anticorpos anti-GAD por ELISA eventualmente poderá melhorar a viabilidade da triagem disseminada desses autoanticorpos.

Além dos autoanticorpos já discutidos, pacientes com diabetes também podem apresentar autoanticorpos anti-TPO, anti-CP e antiadrenocorticais. Por esse motivo, tais pacientes devem ser submetidos ao menos uma vez à triagem para detecção desses anticorpos (Maclaren, 1992).

Trato gastrintestinal

Anemia perniciosa

A anemia perniciosa é caracterizada por uma acloridria resistente à histamina, hipergastrinemia e deficiência de vitamina B_{12} (Brown, 1995). O início insidioso dos sintomas neurológicos e o desenvolvimento de anemia megaloblástica constituem aspectos típicos do curso clínico (Patrick, 1993). Morfologicamente, ao exame da biópsia da mucosa do corpo gástrico é evidenciada uma gastrite atrófica crônica.

A anemia perniciosa está associada à detecção de autoanticorpos anti-CP em 90% dos pacientes, bem como de autoanticorpos antifator intrínseco (anti-FI) em 60 a 75% dos casos, e os anticorpos anti-FI são mais específicos para a anemia perniciosa (Brown, 1995; Burek, 1995). Os autoanticorpos anti-CP são detectados por MIFI com o uso de blocos teciduais de estômago/rim de camundongo. Esses blocos de tecidos combinados proporcionam a intensificação da coloração das células parietais na ausência de coloração concomitante dos túbulos renais, como seria esperado na presença de AMAs (Fig. 52.12).

Os anticorpos anti-FI são comumente detectados por RIA. Entre os dois tipos conhecidos de anticorpos anti-FI, o de tipo 1 ou autoanticorpo bloqueador impede a ligação do FI à vitamina B_{12}. O anticorpo anti-FI de tipo 2 ou autoanticorpo de ligação reage com a vitamina B_{12} livre ou complexada e inibe a ação do FI (Patrick, 1993; Karen, 1994). Do ponto de vista diagnóstico, o autoanticorpo anti-FI tipo 1 é considerado mais sensível e específico para anemia perniciosa (Karen, 1994). Entretanto, a identificação de anticorpos anti-CP ou anti-FI é desnecessária para estabelecer o diagnóstico dessa doença. A anemia perniciosa pode estar associada a outras doenças autoimunes, como a tireoidite autoimune ou a doença de Addison, e também pode se manifestar integrando a síndrome autoimune poliglandular (1 ou 2) (Patrick, 1993).

Enteropatia de sensibilidade ao glúten

A EGS ou espru celíaco é uma doença que afeta o intestino delgado, caracterizada pela má absorção da gordura gastrintestinal. Até pouco tempo, a EGS era considerada uma doença rara nos Estados Unidos. Nos dias atuais, contudo, sua prevalência é considerada bem maior do que as estimativas anteriores e a doença acomete cerca de 1% da população americana (Ferguson, 1997; NIH Consensus, 2004; Rostom, 2004). Os pacientes podem apresentar manifestações não gastrintestinais que dominam a apresentação clínica, tais como anemia, sintomas neurológicos e doenças autoimunes (Green, 2003). A hiper-reatividade ao glúten ou a seus derivados constitui a causa da ESG (Brown, 1995). O exame da biópsia do intestino delgado de um paciente com ESG apresenta resultado variavelmente anormal, todavia as alterações características são atrofia das vilosidades, alongamento da cripta, presença de linfócitos intraepiteliais e mitoses nas criptas.

Pacientes com ESG apresentam diversas alterações imunológicas. De maneira curiosa, esses pacientes costumam apresentar altos níveis séricos de IgA, exceto aqueles com deficiência de IgA, que é uma condição mais frequente entre indivíduos com ESG do que na população normal (Brown, 1995). Pacientes com ESG podem apresentar autoanticorpos IgA antiendomísio, antirreticulina e/ou antigliadina. Os anticorpos IgA antiendomísio são detectáveis por MIFI com o uso de esôfago de macaco como substrato (Fig. 52.13). Esses autoanticorpos detectam a transglutaminase tecidual (tTG), que constitui o antígeno primário da ESG (Dieterich, 1997). Nos dias atuais, os anticorpos anti-tTG podem ser detectados por ELISA. A identificação desses anticorpos é considerada diagnosticamente sensível e específica para ESG isolada ou para ESG associada à dermatite herpetiforme (ESG-DH) (Talal, 1997). A determinação do título de autoanticorpos IgA antiendomísio pode ser utilizada no monitoramento da adesão do paciente a uma dieta livre de glúten (Karen, 1994).

Os autoanticorpos antirreticulina são detectados por MIFI em bloco tecidual de estômago/rim de camundongo. Esses anticorpos são detectáveis em adultos (40%) e também em crianças (60%) com ESG, bem como em adultos com ESG-DH (20%). Entretanto, são inespecíficos para fins diagnósticos e, em geral, perderam a utilidade diagnóstica na ESG. Também podem ser encontrados em pacientes com doença de Crohn, miastenia grave, síndrome de Sjögren e outros distúrbios do tecido conjuntivo.

Os autoanticorpos antigliadina são detectados por ELISA em quase todos os pacientes com ESG ou ESG-DH (Brown, 1995). O antígeno-alvo – gliadina – é purificado a partir do glúten e empregado em um ELISA de fase sólida para detecção desses autoanticorpos. Assim como os anticorpos IgA antiendomísio, os autoanticorpos antigliadina podem ser utilizados no monitoramento da aderência do paciente a uma dieta isenta de glúten. Os anticorpos antigliadina são menos específicos do que os anticorpos anti-tTG e antiendomísio.

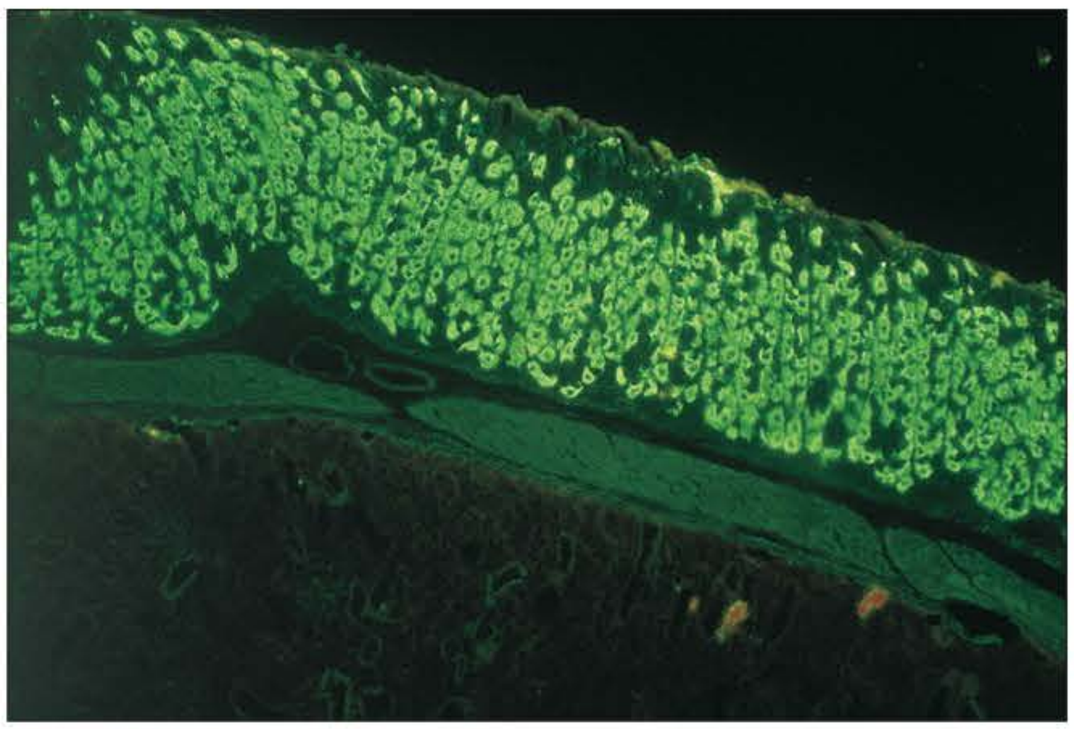


Figura 52.12 Microscopia de imunofluorescência indireta para detecção de autoanticorpos anticélula parietal, com o uso de estômago/rim murino como substrato (× 400).

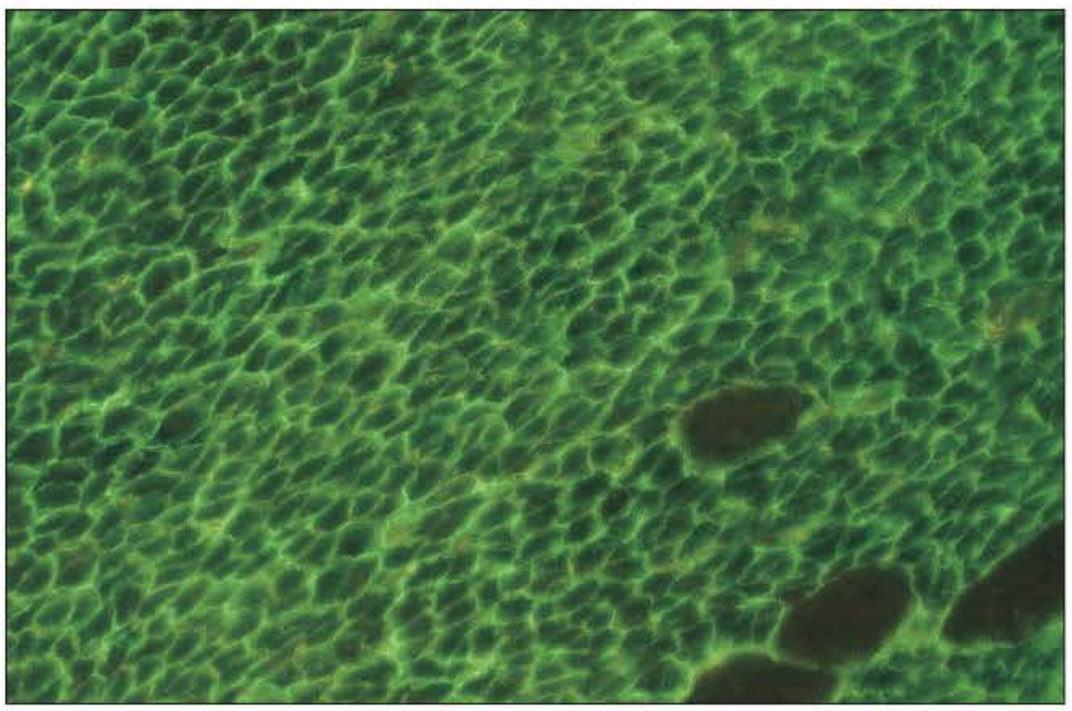


Figura 52.13 Microscopia de imunofluorescência indireta para detecção de autoanticorpos IgA antiendomísio em substrato constituído por esôfago de macaco (× 400).

Um paciente com quadro de ESG deve ser submetido a testes enquanto estiver sob dieta normal (contendo glúten). Em pacientes com manifestação de doença hepática crônica, a presença de anticorpos anti-tTG e/ou IgA antiendomísio, desde que no cenário clínico apropriado, é indicativa de ESG. Contudo, a maioria dos clínicos considera ser necessário obter a confirmação histológica por meio do exame de biópsia de intestino delgado, antes de estabelecer o diagnóstico de ESG. Uma sorologia negativa não exclui esse diagnóstico, enquanto a deficiência de IgA deve ser considerada em pacientes com apresentação clínica sugestiva de ESG. Caso seja identificada uma deficiência de IgA, deve ser realizado o teste de detecção de anticorpos IgG anti-tTG ou IgG antiendomísio (NIH Consensus, 2004).

A adoção de uma dieta restritiva ao glúten pode ser monitorada por meio da quantificação dos níveis de autoanticorpos anti-tTG, IgA antiendomísio ou gliadina.

Colite ulcerativa e doença de Crohn

Uma ampla variedade de condições inflamatórias afetam o trato gastrintestinal. A colite ulcerativa e a doença de Crohn constituem os dois distúrbios mais comuns do grupo de enteropatias inflamatórias idiopáticas. Nos últimos anos, vários marcadores sorológicos se tornaram úteis para avaliar pacientes com enteropatia inflamatória. Esses marcadores são p-ANCA, anticorpos contra *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), anticorpos antipancreáticos, anticorpos OmpC, anticorpos I-2 e anticorpos antibastonetes cocoides anaeróbios (Nakamura, 2003).

A maioria dos pacientes adultos com colite ulcerativa (60 a 80%) apresenta p-ANCAs detectáveis que são sensíveis à DNAse, ajudando a diferenciar o p-ANCA associado à enteropatia inflamatória do p-ANCA associado a outros distúrbios, tais como hepatite autoimune e colangite esclerosante primária (Nakamura, 2003). Cerca de 10 a 30% dos pacientes com doença de Crohn também podem apresentar p-ANCA, e esse subgrupo clínico pode apresentar um comprometimento de cólon que mimetiza a apresentação clínica da colite ulcerativa.

O ASCA é expresso em até 70% dos pacientes com doença de Crohn, e parece ser altamente específico (Vasiliauskas, 2000). Esses anticorpos são dirigidos contra os epítopos oligomanosídicos de *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura, 2003). Os ASCAs podem ser detectados por ELISA.

Por razões relativas à especificidade, o uso desses testes deve se limitar aos pacientes com colite e não deve ser aplicado para a população em geral.

Sistema nervoso

Miastenia grave

A miastenia grave é um distúrbio neuromuscular caracterizado pela fraqueza muscular associada ao uso, fadiga e presença de autoanticorpos antirreceptor de acetilcolina (anti-ACh-R). Os ACh-Rs, localizados

nas membranas pós-sinápticas das fibras musculares esqueléticas, ligam-se à ACh oriunda das terminações nervosas e causam contração muscular, desde que a ACh tenha sido liberada em quantidade suficiente (Naparstek, 1993; Rose, 1995). Os autoanticorpos anti-ACh-R interferem nessa função neuromuscular, acarretando fadiga e fraqueza muscular.

Os autoanticorpos anti-ACh-R são detectados em cerca de 90% dos pacientes com miastenia grave (Rose, 1995). A α-bungarotoxina (α--BTx) radiomarcada é utilizada em RIAs competitivos para quantificar diferentes formas de anticorpos anti-ACh-R (Barna, 1995). A α--BTx é uma proteína encontrada no veneno de cobra que se liga de modo essencialmente irreversível ao ACh-R. Entretanto, o sítio de ligação da α-BTx no ACh-R difere do sítio de ligação do anticorpo anti-ACh-R (Rose, 1995). ACh-Rs são obtidos a partir de extratos de músculo esquelético humano desnervados, como os tecidos provenientes de amputações diabéticas, ou ainda de culturas de células teciduais. Para realização do teste, os ACh-Rs são marcados com α-BTx e incubados com o soro do paciente para permitir a ligação de quaisquer anticorpos anti-ACh-R presentes aos sítios próximos dos sítios de ligação da α-BTx. Após a incubação, os complexos radiomarcados são precipitados com anticorpos anti-Igs humanos polivalentes e é feita a quantificação da radioatividade contida no precipitado lavado, após a correção para ligações inespecíficas. O grau de radioatividade no precipitado é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos anti-ACh-R presente no soro do paciente.

É possível introduzir modificações nesse ensaio de ligação para identificar anticorpos anti-ACh-R bloqueadores e autoanticorpos moduladores. Em um ensaio de bloqueio, o soro de paciente com autoanticorpos anti-ACh-R é incubado com ACh-Rs antes da adição de α-BTx. A base dessa técnica parte do princípio de que o anticorpo anti-ACh-R capaz de bloquear a ligação da α-BTx também bloqueia a ligação da ACh ao receptor (Rose, 1995). Assim, a quantidade de radioatividade existente no precipitado é inversamente proporcional à quantidade de anticorpos anti-ACh-R presente no soro do paciente.

Acredita-se que a modulação dos autoanticorpos anti-ACh-R acelera a degradação do ACh-R, contudo a quantificação desses anticorpos no laboratório clínico não é realizada com frequência, em razão da dificuldade técnica envolvida.

Esclerose múltipla

A esclerose múltipla é uma doença desmielinizante relativamente comum, que envolve a substância branca do encéfalo e da medula espinal. É mais frequente em mulheres (2 mulheres:1 homem) e em geral se torna evidente na fase de adulto jovem, com uma ampla variedade de manifestações clínicas possíveis. Cerca de 50% desses pacientes passam por períodos alternados de doença ativa e remissões. Nos demais casos, os pacientes apresentam um curso progressivo crônico (Steinman, 1993; McFarland, 1995). O diagnóstico de esclerose múltipla deriva dos achados clínicos e da exclusão de todos os outros possíveis distúrbios.

Embora a causa da esclerose múltipla seja desconhecida, os mecanismos autoimunes envolvidos são considerados importantes na patogênese da doença (McFarland, 1995). Todavia, não há nenhum tipo de autoanticorpo circulante característico encontrado na esclerose múltipla que seja suficientemente aceito como diagnóstico para uso nas determinações de rotina dos laboratórios clínicos.

Por outro lado, o exame laboratorial do líquido cerebrospinal (LCE) fornece informações importantes que sustentam o diagnóstico da esclerose múltipla no cenário clínico adequado (Barna, 1997). Pacientes com essa doença apresentam uma intensificação anormal da síntese de IgG no SNC, de modo que a determinação do índice de IgG e da taxa de síntese de IgG fornece resultados úteis, ainda que inespecíficos (Valenzuela, 1987; Zweiman, 1991; Karen, 1994; McFarland, 1995). A avaliação do LCE para detecção de bandas oligoclonais também é útil no cenário clínico apropriado, pois essas bandas são identificadas em mais de 90% dos pacientes com esclerose múltipla. Contudo, a presença dessas bandas não possui especificidade diagnóstica, já que é possível detectá-las em pacientes com diversos distúrbios, tais como neurossífilis, vasculite no SNC, doença de Lyme, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Creutzfeldt-Jakob, derrame, síndrome de Guillain-Barré e neoplasmas (Karen, 1994). A eletroforese de proteínas séricas também deve ser realizada para garantir que as bandas oligoclonais encontradas no LCE não sejam oriundas do vazamento de soro para dentro do LCE. As bandas oligoclonais dos LCE usualmente são quantificadas por eletroforese em gel de agarose de alta resolução com o uso de amostras concentradas de LCE (Karen, 1994).

Neuropatias

Recentemente, um grupo de síndromes neurológicas têm sido foco de considerável atenção. Essas síndromes afetam os SNC ou SNP e estão associadas à detecção de autoanticorpos (Naparstek, 1993). Estes são detectados por ELISA, MIFI ou imuno-histoquímica. A importância da identificação desses anticorpos sem dúvida aumenta conforme/se os estudos clínicos correlacionarem sua presença a uma doença particular ou a um benefício terapêutico. Entretanto, até o momento, esses autoanticorpos são inespecíficos para a doença e podem ser encontrados após traumatismos no SNC. Os autoanticorpos dirigidos contra componentes neurais primários são os anticorpos antiproteínas neuronais ou antigangliosídeos neuronais (Zeballos, 1992; Darnell, 2003).

Autoanticorpos antiproteína neuronal

Um subgrupo de pacientes com degeneração cerebelar paraneoplásica apresenta autoanticorpos anti-Yo que em geral são detectados quase no momento da descoberta do neoplasma maligno. Os anticorpos anti-Yo são detectáveis como uma fluorescência nas células de Purkinje por meio da MIFI feita com tecido cerebelar humano. A identificação dos anticorpos anti-Yo em um paciente sabidamente sem malignidade deve conduzir a uma cuidadosa avaliação para detecção de neoplasma maligno (Zeballos, 1992).

Os autoanticorpos anti-Ri são específicos para neurônios. Sua identificação parece se limitar a pacientes com carcinoma de mama e opsoclono paraneoplásico (Zeballos, 1992). Os anticorpos anti-Ri são caracterizados por produzirem uma fluorescência dos núcleos neuronais à MIFI.

Os autoanticorpos anti-Hu também são neurônio-específicos, sendo visíveis como uma fluorescência nuclear neuronal à MIFI. Esses autoanticorpos podem ser identificados em pacientes com carcinoma de pequenas células do pulmão e encefalomielite paraneoplásica (Zeballos, 1992).

Autoanticorpos antigangliosídeo neuronal

Os gangliosídeos são componentes glicolipídicos encontrados nas membranas externas das células nervosas periféricas (Naparstek, 1993). Neuropatias motoras periféricas podem ocorrer em pacientes que apresentam gamopatias monoclonais de IgM, cuja paraproteína de IgM reage com os gangliosídeos GM_1 ou GM_{1b} (Zeballos, 1992). Embora seja possível identificar anticorpos anti-GM_1 ou anti-GM_{1b} em uma ampla variedade de síndromes neurológicas, sua presença em títulos elevados é mais característica de doença neuronal motora do que de outras doenças alternativas (Zeballos, 1992).

Outros órgãos

Coração

Autoanticorpos antimiocárdio

A detecção de autoanticorpos dirigidos contra o miocárdio tem sido relatada como parte integrante de várias condições em que há dano ao músculo estriado cardíaco, tais como infarto do miocárdio, após a realização de cirurgias cardíacas e cardiomiopatias. Entretanto, a identificação desses anticorpos pode ajudar a diferenciar uma cardiomiopatia imunomediada de outras causas de miocardite (Naparstek, 1993; Burek, 1995). A MIFI com o uso de cortes congelados de coração de macaco é empregada para detecção de autoanticorpos antimiocárdio. A coloração específica do miocárdio também pode ser determinada pela exclusão da reatividade em músculo esquelético não cardíaco. Infelizmente, AMAs e/ou autoanticorpos heterofilos produzem uma fluorescência que pode ser confundida com a fluorescência produzida pelos autoanticorpos antimiocárdio.

Autoanticorpos antimúsculo esquelético

Os autoanticorpos antimúsculo esquelético possuem pouca aplicabilidade clínica. Baixos títulos (< 1:30) podem ser detectados em indivíduos aparentemente sadios. Alguns pacientes com distúrbios miocárdicos podem apresentar títulos de até 1:60. Embora altos títulos (> 1:60) de anticorpos antimúsculo esquelético tenham sido detectados em pacientes com miastenia grave, os ensaios para detecção de anticorpos anti-ACh-R apresentam maior utilidade clínica para diagnóstico ou monitoramento dessa doença. Os anticorpos antimúsculo esquelético são detectados por MIFI com o uso de cortes congelados de músculo esquelético de coxa de macaco (Fig. 52.14).

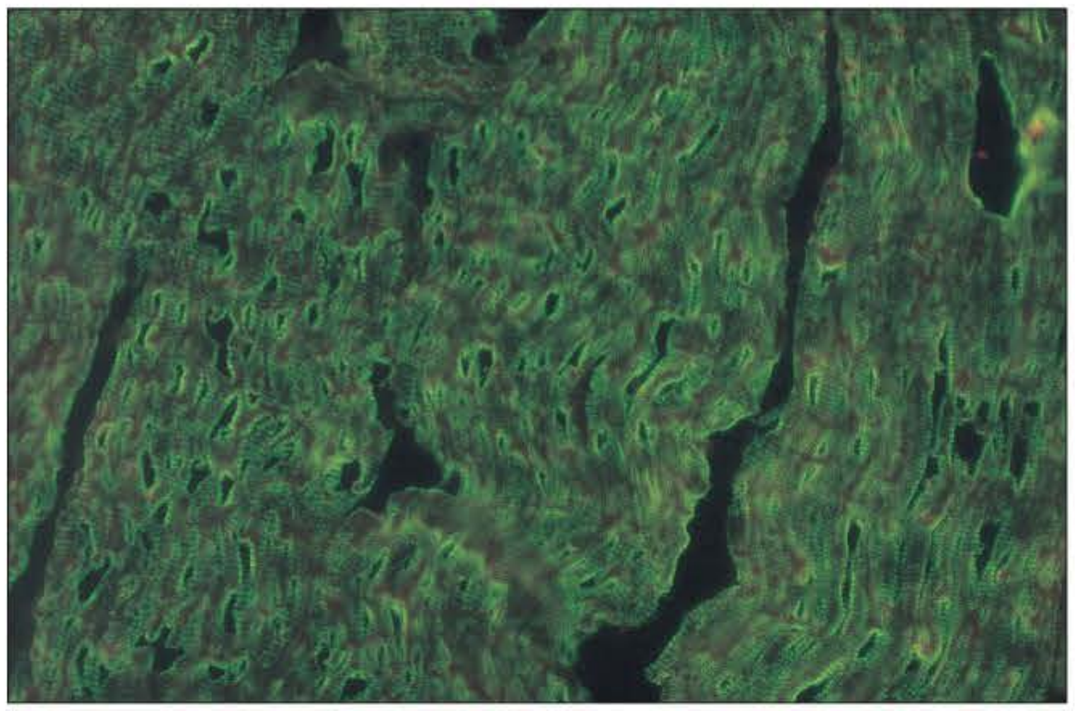


Figura 52.14 Microscopia de imunofluorescência indireta para detecção de autoanticorpos antimúsculo esquelético, com o uso de cortes congelados de músculo esquelético de coxa de macaco como substrato (× 400).

Resumo

Os autoanticorpos exercem papel importante no estudo de pacientes com doença autoimune órgão-específica. Sua detecção pode ser importante no diagnóstico de algumas dessas doenças, como a doença de Graves; contudo, na maioria dos casos a identificação desses anticorpos serve apenas para sustentar o diagnóstico. De modo semelhante, apesar de alguns desses anticorpos estarem diretamente envolvidos na patogênese de uma doença (p. ex., pênfigo), sua presença, frequentemente, atua como marcador de uma lesão imunológica subjacente atribuível a outro mecanismo patológico. É o que ocorre, por exemplo, no diabetes melito tipo 1A. Técnicas mais modernas de biologia molecular revelaram – e continuarão a revelar – a natureza específica de muitos antígenos-alvo desses autoanticorpos. Espera-se que esse trabalho venha elucidar os mecanismos por trás das doenças, possibilitando o aprimoramento dos testes diagnósticos e, talvez, novos rumos terapêuticos. Os avanços técnicos alcançados pelo teste de ELISA tornaram essa tecnologia disponível à maioria dos laboratórios clínicos, de modo que numerosos ensaios para detecção de autoanticorpos órgão-específicos estão mais disponíveis nas situações em que a MIFI é inviável.

Referências bibliográficas

American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20:1183–1197.

Atkinson MA, Kaufman D, Newman D, et al: Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 1993a; 91:350–356.

Atkinson MA, Maclaren NK: Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 1993b; 92:1608–1616.

Atkinson MA, Maclaren NK: The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1994; 331:1428–436.

Bansi DS, Fleming KA, Chapman RW: Importance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: prevalence, titre, and IgG subclass. Gut 1996; 38:384–389.

Barmeier H, Ahlmeen J, Landin-Olsson M, et al: Quantitative analysis of islet glutamic acid decarboxylase p64 autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. Autoimmunity 1992; 13:187–196.

Barna BP, Gupta MK: Laboratory analyses of blood. *In* Barna BP (ed.): Laboratory Handbook of Neuroimmunologic Disease. Chicago, IL, ASCP Press, 1995, p 106.

Barna BP, Valenzuela R, Gupta MK: Laboratory analyses of cerebrospinal fluid. *In* Barna BP (ed.): Laboratory Handbook of Neuroimmunologic Disease. Chicago, IL, ASCP Press, 1995, p 65.

Batts KP, Ludwig J: Histopathology of autoimmune chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, and primary sclerosing cholangitis. *In* Krawitt EL, Wiesner RH (eds): Autoimmune Liver Disease. New York, Raven Press, 1991, pp 75–92.

Becker BA, Gaspari AA: Pemphigus vulgaris and vegetans. *In* Dermatologic Clinics, Vol II. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993, pp 429–452.

Bigazzi PE, Burek CL, Rose NR: Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal, and surface receptor antigens. *In* Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, et al (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1992, p 765.

Bouldin MB, Clowers-Webb HE, Davis JL, et al: Naproxen-associated linear IgA bullous dermatosis: case report and review. Mayo Clin Proc 2000; 75:967–970.

Brown WR, Claman HN, Strober W: Immunologic diseases of the gastrointestinal tract. *In* Frank MM, Austen KF, Claman HN, et al (eds): Samter's Immunologic Diseases, 5th ed. Boston, MA, Little, Brown & Co, 1995, vol II, p 1151.

Brunt LM: Immunologic disorders of the thyroid gland and autoimmune polyendocrinopathies. *In* Frank MM, Austen KF, Claman HN, et al (eds): Samter's Immunologic Diseases, 5th ed. Boston, MA, Little, Brown & Co, 1995, vol II, p 975.

Burek CL, Rose NR: Autoantibodies. *In* Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT (eds): Diagnostic Immunopathology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1995, pp 207–230.

Bylund DJ, McHutchison J, Nakamura RM: Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. Clin Immunol Newsletter 1992; 12:1–5.

Camisa C, Helm TN: Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease. Arch Dermatol 1993; 129:883–886.

Crosby DL, Diaz LA: Autoimmune diseases of the skin. *In* Altman LC (ed): Immunology and Allergy Clinics of North America: Autoimmune Diseases. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993, p 395.

Darnell RB, Posner JB: Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. N Engl J Med 2003; 349;1543–1554.

Revisão atualizada e abrangente sobre anticorpos paraneoplásicos.

Devendra D, Yu L, Eisenbarth GS: Endocrine autoantibodies. Clin Lab Med 2004; 24:275–303.

A mais recente e acurada revisão sobre a autoimunidade orgânica endócrina.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med 1997; 3:797–780.

Domloge-Hultsch N, Bisalbutra P, Gammon WR, et al: Direct immunofluorescence microscopy of 1 mol/L sodium chloride-treated patient skin. J Am Acad Dermatol 1991; 24:946–951.

Eisenbarth GS, Castano L: Diabetes mellitus. *In* Frank MM, Austen KF, Claman HN, et al (eds): Samter's Immunologic Diseases, 5th ed. Boston, MA, Little, Brown & Co, 1995, vol II, p 1007.

Elenitsas R, Jaworksy C, Murphy GF: Diagnostic methodology: immunofluorescence. *In* Murphy GF (ed.): Dermatopathology. A Practical Guide to Common Disorders. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1995, pp 29–45.

Falorni A, Grubin CE, Takei I, et al: Radioimmunoassay detects the frequent occurrence of autoantibodies to the Mr 65,000 isoform of glutamic acid decarboxylase in Japanese insulin-dependent diabetes. Autoimmunity 1994; 19:113–125.

Ferguson A: Celiac disease, an eminently treatable condition, may be underdiagnosed in the United States. Am J Gastroenterol 1997; 92:1252–1254.

Fine J-D: Laboratory tests for epidermolysis bullosa. Dermatol Clin 1994; 12:123–132.

Flotte TJ, Margolis RJ, Mihm MC Jr: Skin. *In* Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT (eds): Diagnostic Immunopathology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1995, p 123.

Gammon WR, Briggaman RA: Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to Type VII collagen. Dermatol Clin 1993; 11:535–547.

Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, et al: Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. Immunol Rev 2000; 172:210–225.

Goodman ZD, McNally PR, Davis DR, et al: Autoimmune cholangitis: a variant of primary biliary cirrhosis. Clinicopathologic and serologic correlations in 200 cases. Dig Dis Sci 1995; 40:1232–1242.

Gordon SC, Quattrociocchi-Longe TM, Khan BA, et al: Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. Gastroenterology 1995; 108:1802–1809.

Green PHR, Jabri B: Coeliac disease. Lancet 2003; 362:383–391.

Excelente revisão sobre doença celíaca.

Gupta MK: Recent advances in laboratory tests for autoantibodies to thyrotropin receptor protein in Graves' disease. Clin Lab Med 1988; 8:303–323.

Gur H, Shen G, Sutjita M, et al: Autoantibody profile of primary sclerosing cholangitis. Pathobiology 1995; 63:76–82.

Hagopian WA, Karlsen AE, Gottsater A, et al: Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD65) shows that 64K autoantibody positivity at onset predicts diabetes type. J Clin Invest 1993; 91:368–374.

Helm KF, Peters MS: Deposition of membrane attack complex in cutaneous lesions of lupus erythematosus. J Am Acad Dermatol 1993; 28:687–691.

Heptinstall RH: Pathology of the Kidney, 4th ed. Boston, MA, Little, Brown & Co, 1992.

Izuno GT: Cutaneous immunofluorescence. Clin Lab Med 1986; 6:85–102.

Jiao D, Bystryn J-C: Sensitivity of indirect immunofluorescence, substrate specificity, and immunoblotting in the diagnosis of pemphigus. J Am Acad Dermatol 1997; 37:211–216.

Johnson PJ, McFarlane IG: Convenors on behalf of the panel. Meeting report: International autoimmune hepatitis group. Hepatology 1993; 18:998–1008.

Resumo excelente sobre parâmetros laboratoriais clínicos, incluindo a sorologia útil para diagnóstico e classificação da hepatite autoimune.

Kaplan MM: Clinical perspectives in the diagnosis of thyroid disease. Clin Chem 1999; 45:1377–1383.

Karen DF: Immunology and serology. *In* Jacobs DS, DeMott WR, Finley PR, et al (eds): Laboratory Test Handbook, 3rd ed. Hudson, OH, Lexi-Comp, 1994, p 627.

Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzer M, et al: Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 1992; 89:283–292.

Korman NJ: Bullous pemphigoid. Dermatol Clin 1993; 11:483–498.

Kuechle MK, Stegemeir E, Maynard B, et al: Drug-induced linear IgA bullous dermatosis: report of six cases and review of the literature. J Am Acad Dermatol 1994; 30:187–192.

Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, et al: IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:6367–6370.

Lin M-S, Liu Z, Drolet BA, et al: Cutaneous autoimmune diseases. *In* Rose NR, Mackay IR (eds): The Autoimmune Diseases, 3rd ed. San Diego, Academic Press, 1998, pp 545–570.

Liu AY, Valenzuela R, Helm TN, et al: Indirect immunofluorescence on rat bladder transitional epithelium: a test with high specificity for paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol 1993; 28:696–699.

Lo SK, Fleming KA, Chapman RW: A 2-year follow-up study of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis: relationship to clinical activity, liver biochemistry and ursodeoxycholic acid treatment. J Hepatol 1994; 21:974–978.

Luhder F, Schlosser M, Mauch L, et al: Autoantibodies against GAD65 rather than GAD67 precede the onset of type 1 diabetes. Autoimmunity 1994; 19:71–80.

McCluskey RT, Collins AB, Niles JL: Kidney. *In* Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT (eds): Diagnostic Immunopathology, 2nd ed. New York, Raven Press, 1995, p 109.

McFarland HF, McFarlin DE: Immunologically mediated demyelinating diseases of the central and peripheral nervous system. *In* Frank MM, Austen KF, Claman HN, et al (eds): Samter's Immunologic Diseases, 5th ed. Boston, MA, Little, Brown & Co, 1995, vol II, p 1081.

Maclaren N: Immunology of diabetes mellitus. Ann Allergy 1992; 68:5–9.

Maclaren NK: Prespectives in diabetes: How, when, and why to predict IDDM. Diabetes 1988; 37:1591–1594.

Manns MP: Cytoplasmic autoantigens in autoimmune hepatitis: Molecular analysis and clinical relevance. Semin Liver Dis 1991; 11:205–214.

Manns MP: Autoimmune diseases of the liver. Clin Lab Med 1992; 12:25–40.

Manns MP, Lüttig B, Obermayer-Straub P: Autoimmune diseases: The liver. *In* Rose NR, Mackay IR (eds): The Autoimmune Diseases, 3rd ed. San Diego, CA, Academic Press, 1998, pp 511–544.

Manns MP, Nakamura RM: Autoimmune liver diseases. *In* Deodhar S (ed): Clinics in Laboratory Medicine. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1988, pp 281–301.

Mason AL, et al: Retroviral antibodies in primary biliary cirrhosis. Lancet 1998; 351:1620–1624.

Mooij P, Drexhage HA: Autoimmune thyroid disease. Clin Lab Med 1993; 13:683–697.

Muir A, Maclaren NK: Autoimmune diseases of the adrenal glands, parathyroid glands, gonads, and hypothalamic-pituitary axis. Endocrinol Metab Clin North Am 1991; 20:619–644.

Muir A, Schatz DA, Maclaren NK: Autoimmune Addison's disease. Springer Semin Immunopathol 1993; 14:275–284.

Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ: Cicatricial pemphigoid. *In* Dermatologic Clinics. Bullous Diseases, vol II. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993a, pp 499–510.

Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ: Drug-induced pemphigus. *In* Dermatologic Clinics. Bullous Diseases, vol II. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993b, pp 463–471.

Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ: Paraneoplastic pemphigus. *In* Dermatologic Clinics. Bullous Diseases, vol II. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1993c, pp 473–481.

Nakamura RM. Concepts of autoimmunity and autoimmune diseases. *In* Nakamura RM, Bylund DJ, Keren DF (eds): Clinical and Laboratory Evaluation of Human Autoimmune Diseases. Chicago, IL, ASCP Press, 2002, pp 13–35.

Visão geral sucinta do sistema imune, tolerância, principais fatores associados ao desenvolvimento da doença autoimune e classificação da doença autoimune.

Nakamura RM, Bylund DJ: Diagnostic significance of autoantibodies in autoimmune chronic active hepatitis. Clin Immunol Newsletter 1991; 11:161–167.

Nakamura RM, Matsutani M, Barry M: Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. Clin Chim Acta 2003; 335:9–20.

Naparstek Y, Plotz PH: The role of autoantibodies in autoimmune disease. Annu Rev Immunol 1993; 11:79–104.

NIH Consensus: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement Celiac Disease June 28–30, 2004. Available on line at: http://consensus.nih.gov/cibs/118/118celiacPDF.pdf.

As mais recentes declarações consensuais sobre doença celíaca com afirmações resumidas dos elementos fundamentais para tratamento e pesquisa futuros.

Nordyke RA, Gilbert FI, Miyamoto LA, et al: The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. Arch Intern Med 1993; 12;153:862–865.

Nousari HC, Anhalt GJ: Bullous skin diseases. Curr Opin Immunol 1995; 7:844–852.

Nousari HC, Anhalt GJ: Skin diseases. *In* Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, et al (eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th ed. Washington, DC, ASM Press, 1997, pp 997–1004.

Possivelmente o melhor resumo das doenças de pele autoimunes.

Nousari HC, Anhalt GJ: Pemphigus and bullous pemphigoid. Lancet 1999a; 354:667–672.

Nousari HC, Kimyai-Asadi A, Caeiro JP, et al: Clinical, demographic, and immunohistologic features of vancomycin-induced linear IgA bullous disease of the skin. Medicine 1999b; 78:1–8.

Patrick C: Organ-specific autoimmune diseases. Immunol Ser 1993; 58:423–436.

Peters MS, McEvoy MT: IgA antiendomysial antibodies in dermatitis herpetiformis. J Am Acad Dermatol 1989; 21:1225–1231.

Poupon R, Poupon RE: Primary biliary cirrhosis. *In* Zakim D, Boyer TD (eds): Hepatology – A Textbook of Liver Disease, 3rd ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1996, pp 1329–1365.

Rose JW, McFarlin DE: Myasthenia gravis. *In* Frank MM, Austen KF, Claman HN, et al (eds): Samter's Immunologic Diseases, 5th ed. Boston, MA, Little, Brown & Co, 1995, vol II, p 1061.

Rostom A, Dube C, Cranney A, et al. Celiac Disease. Summary, Evidence Report/Technology Assessment No. 104. (Prepared by the University of Ottawa Evidence-based Practice Center, under Contract No. 290–02–0021.) AHRQ Publication No. 04-E029–1. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2004.

Sarret Y, Hall R, Cobo LM, et al: Salt-split human skin substrate for the immunofluorescent screening of serum from patients with cicatricial pemphigoid and a new method of immunoprecipitation with IgA antibodies. J Am Acad Dermatol 1991; 24:952–958.

Schatz D, Krischer J, Horne G, et al: Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. J Clin Invest 1994; 93:2403–2407.

Schatz D, Winter W: Recent advances in the immunopathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitis. Curr Opin Pediatr 1995; 7:459–465.

Schmidli RS, Colman PG, Cui L, et al: Antibodies to the protein tyrosine phosphatases IAR and IA-2 are associated with progression to insulin-dependent diabetes (IDDM) in first-degree relatives at-risk for IDDM. Autoimmunity 1998; 28:15–23.

Song YH, Connor EL, Muir A, et al: Autoantibody epitope mapping of the 21-hydroxylase antigen in autoimmune Addision's disease. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:1108–1112.

Steinman L: Misguided assaults on the self produce multiple sclerosis, juvenile diabetes and other chronic illnesses. Promising therapies are emerging. Sci Am 1993; 269:106–114.

Talal AH, Murray JA, Goeken JA, et al: Celiac disease in an adult population with insulin-dependent diabetes mellitus: use of endomysial antibody testing. Am J Gastroenterol 1997; 92:1280–1283.

Teraki Y, Amagai N, Hashimoto T, et al: Intercellular IgA dermatosis of childhood. Selective deposition of monomer IgA1 in the intercellular space of the epidermis. Arch Dermatol 1991; 127(2):221–224.

Tsui WMS, Lam TW: The mystery of autoimmune cholangitis: a new entity or variant? Adv Anat Pathol 1997; 4:64–69.

Utiger RD: The pathogenesis of autoimmune thyroid disease. N Engl J Med 1991; 325:278–279.

Van Arsdel PP: Autoimmune endocrinopathies. In: Altman LC, ed. Immunology and allergy clinics of North America: autoimmune diseases. Philadelphia: Saunders; 1993:371.

Valenzuela R, Barna BP: Calculation of CNS IgG synthesis. *In* Barna BP (ed.): Laboratory Handbook of Neuroimmunologic Disease. Chicago, IL, ASCP Press, 1995, p 97.

Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, et al. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. Gut 2000; 47:487–496.

Wilkin TJ: Receptor autoimmunity in endocrine disorders. N Engl J Med 1990; 323:1318–1324.

Wilson CB: Immune aspects of renal diseases. JAMA 1987; 258:2957–2961.

Zeballos RS, McPherson RA: Update of autoantibodies in neurologic disease. Clin Lab Med 1992; 12:61–83.

Zweiman B, Lisak RP: Autoantibodies: autoimmunity and immune complexes. *In* Henry JB (ed): Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1991, p 885.

CAPÍTULO 53

Doenças alérgicas

Henry A. Homburger MD

Mecanismos de hipersensibilidade imediata 1096
- O fenótipo alérgico: genes candidatos 1097
- Regulação da síntese de IgE: interações moleculares e celulares 1097
- Imunoglobulina E: características estruturais e funcionais 1098
- Células e mediadores das reações de hipersensibilidade imediata 1099

Teste laboratorial na avaliação das doenças alérgicas 1100
- O fundamento do teste 1100
- Técnicas de teste *in vivo*: testes cutâneos e de provocação de órgão-alvo 1100
- Quantificação de IgE: métodos analíticos e intervalos de referência 1101
- Quantificação de anticorpos IgE: aplicações clínicas 1101
- Quantificação de anticorpos IgE: métodos analíticos e relatório de resultados 1102
- Quantificação de anticorpos IgE: aplicações clínicas 1103
- Testes para detecção de mediadores de reações de hipersensibilidade imediata 1107

Referências bibliográficas 1107

PONTOS-CHAVE

- A imunoglobulina E (IgE) é a mais importante das moléculas desencadeadoras de inflamação alérgica.
- Os testes laboratoriais que estabelecem elevada probabilidade de doença alérgica têm se tornado cada vez mais importantes, pois os resultados fornecidos justificam o encaminhamento de pacientes a especialistas em alergia e permitem aos médicos prestadores de assistência primária decidir se devem ou não supervisionar tais pacientes junto a suas próprias práticas.
- Novos tratamentos para doenças alérgicas, como os anticorpos monoclonais IgE, requerem como justificativa de uso a constatação de níveis aumentados de IgE ou da presença de anticorpos IgE no soro.
- Investigações clínicas sobre a história natural de doenças alérgicas em crianças demonstraram uma sequência reproduzível de sensibilização a alérgenos, que torna cada vez mais importante estabelecer o diagnóstico de alergia ainda no estágio inicial da doença, com o intuito de amenizar a progressão para doenças mais graves (p. ex., asma).
- Os testes de detecção de IgE e de anticorpos IgE são solicitados principalmente para fins diagnósticos.
- A quantificação de IgE em crianças e adultos tem valor limitado no diagnóstico da doença alérgica. Os níveis séricos de IgE mais altos são encontrados tipicamente em pacientes com hipersensibilidade a vários alérgenos e combinações de asma, dermatite atópica e rinite. Níveis elevados apresentam alto valor preditivo para a doença alérgica.
- A quantificação de anticorpos IgE é útil e pode ser recomendada nas seguintes situações clínicas:
  - avaliação de crianças com significativa história familiar de doença alérgica, que estejam apresentando os sinais iniciais da doença;
  - avaliação de crianças e adultos com suspeita de doença respiratória alérgica, com o objetivo de estabelecer o diagnóstico e definir a especificidade da sensibilidade a alérgenos (polens, poeira, antígenos fúngicos e alimentos);
  - confirmar a expressão clínica da sensibilidade a alimentos em pacientes com sensibilidade anafilática ou asma, angioedema ou doença cutânea;
  - avaliação da sensibilidade a alérgenos presentes no veneno de cobra, especialmente para ajudar a definir a especificidade do veneno quando os testes cutâneos fornecem resultados equivocados;
  - confirmar o diagnóstico de hipersensibilidade à penicilina em pacientes com sensibilidade anafilática;
  - confirmar a presença de anticorpos IgE contra certos alérgenos ocupacionais (p. ex., látex da borracha natural).
- O teste para detecção de anticorpos IgE não serve para avaliar os efeitos da imunoterapia nem para excluir o diagnóstico de sensibilidade anafilática a venenos de insetos em pacientes tratados. Esses testes são indicados apenas para pacientes submetidos ao exame físico, dos quais tenha sido obtida uma história médica abrangente.

As doenças alérgicas são comuns tanto em crianças quanto em adultos. Estima-se que a prevalência cumulativa dessas doenças nos Estados Unidos chegue a 30% (Sly, 1999; Downs, 2001). De acordo com dados recentes, mais de 31 milhões de indivíduos sofrem de asma e, em meio a essa população, existem mais de 9 milhões de crianças (Weiss, 2001). Estudos epidemiológicos recentes apontam um aumento alarmante da incidência de asma. Como em muitas categorias amplas de doença, estima-se que os gastos anuais com as doenças alérgicas sejam de algumas dezenas de bilhões de dólares. Tomadas coletivamente, as doenças alérgicas constituem um dos principais problemas de saúde pública.

Está bem documentado que os sinais e sintomas clínicos das doenças alérgicas são difíceis de distinguir daqueles associados a outras etiologias (Host, 2003). As manifestações clínicas podem ser relativamente brandas e autolimitadas, como na rinite alérgica sazonal, ou severas e com notável morbidade, como na asma. Os testes laboratoriais são úteis para avaliar pacientes com doença alérgica, contudo, a sua otimização depende do conhecimento dos mecanismos básicos da hipersensibilidade imediata, bem como da atenção para com as relações empíricas existentes entre os resultados de testes e seus valores preditivos diagnósticos. O presente capítulo aborda esses aspectos, começando com uma revisão sobre a biologia da hipersensibilidade imediata e o "fenótipo alérgico", seguida de uma discussão detalhada dos testes laboratoriais aplicados na avaliação de crianças e adultos com doenças alérgicas. Enfatiza-se a identificação do número mínimo de testes necessários para obtenção de altos valores preditivos positivos e negativos em diferentes situações clínicas. Menção específica também é feita às aplicações clínicas em que os testes laboratoriais não são custo-efetivos ou podem levar a conclusões clínicas errôneas.

Mecanismos de hipersensibilidade imediata

A IgE é a mais importante das moléculas desencadeadoras de inflamação alérgica. No final da década de 1960, pesquisadores trabalhando em dois laboratórios independentes descreveram uma nova classe de Igs responsável pela atividade sérica de sensibilização cutânea, que era encontrada em pacientes com doenças alérgicas (Bennich, 1969; Ishizaka, 1966). Essa Ig, originalmente denominada IgND, por fim passou a se chamar IgE (Ishizaka, 1967). Nos anos subsequentes, os

investigadores se concentraram em desvendar os mecanismos biológicos básicos que controlam a produção de IgE por linfócitos B imunocompetentes, bem como os mecanismos promotores do recrutamento de células inflamatórias e da liberação de mediadores vasoativos por células efetoras IgE-sensibilizadas no sítio de inflamação alérgica. Estudos recentes tiveram como objetivo investigar os determinantes genéticos do fenótipo alérgico (atópico) e identificar os genes responsáveis pela regulação da produção de IgE.

O fenótipo alérgico: genes candidatos

Sabe-se que a probabilidade de desenvolver doenças alérgicas é fortemente influenciada pela história familiar (Taylor, 1981; Sibbald, 1980). Indivíduos com predisposição genética frequentemente são denominados atópicos, termo sinônimo de "fenótipo clínico alérgico". Resultados de estudos epidemiológicos sugerem que os níveis séricos de IgE são influenciados por vários genes, sendo que estudos clínicos demonstraram que os níveis de proteína IgE no soro são várias vezes maiores em indivíduos com fenótipo de IgE alta do que naqueles com fenótipos de IgE baixa (Martinez, 1994). Em nível estrutural, foram identificados alguns genes candidatos que podem atuar na determinação do fenótipo alérgico, contudo, os resultados obtidos ainda são controversos e variam dependendo das populações estudadas (Ono, 2000). Estudos de análise de ligação identificaram as localizações cromossômicas de vários genes candidatos, enquanto os estudos de posicionamento clonal sustentaram a existência de uma relação entre genes de alergia putativos e outros sabidamente codificadores de moléculas envolvidas na regulação da resposta imune, tais como os antígenos leucocitários humanos (HLA; cromossomo 6p21–23), a cadeia β do receptor de Fc de IgE de alta afinidade (cromossomo 11q), diversas citocinas e receptores de citocinas (cromossomo 5q31–33 e gene codificador de receptor α da interleucina [IL]-4), tirosinas quinases e fatores de transcrição nuclear (Tab. 53.1) (Ono, 2000). Entre os vários genes candidatos, algumas das evidências mais significativas do papel genético nas doenças alérgicas estão associadas aos genes do complexo principal de histocompatibilidade. Os alelos HLA de classe II localizados no cromossomo 6p determinam a responsividade aos aeroalérgenos peptídicos comuns Derp p e Derp f, provenientes de ácaros encontrados na poeira (*Dermatophagoides pterynissinus* e *Dermatophagoides farinae*). Esses alelos são encontrados ligados a outros *loci* associados à hiper-responsividade bronquial em asmáticos (Hizawa, 1998; Lara-Marquez, 1999). Uma ligação semelhante foi proposta para um gene de atopia, que está em íntima ligação a um *locus* codificador da cadeia β do receptor de Fcε de IgE no cromossomo 11q. Esse gene de atopia putativo foi descrito em diversos estudos, incluindo um estudo sobre famílias de indivíduos afro-americanos asmáticos com responsividade aumentada à *D. farinae* e aos alérgenos do pólen de grama (Sandford, 1995). Estudos sobre a regulação da síntese de IgE demonstraram que as citocinas IL-4 e IL-13 induzem síntese de IgE por linfócitos B, além de promoverem diferenciação de células T auxiliares/indutoras de fenótipo Th2 (ver adiante). O grupo de genes codificadores de citocina ao qual pertence o gene da IL-4 está localizado no cromossomo 5q, ligado a um *locus* que influencia as respostas de IgE a vários aeroalérgenos (Ober, 1998). Outros *loci* que podem exercer algum papel no fenótipo alérgico incluem o gene codificador de receptor α da IL-4 (cromossomo 16). Esse gene contém mutações que influenciam a transdução de sinal pelo fator de transcrição STAT6 (ver adiante). O STAT6, por sua vez, promove transcrição das cadeias pesadas ε de Igs (Hershey, 1997).

Tabela 53.1 Genes e o fenótipo alérgico

Cromossomo	*Locus* genético	Fenótipo
6p21–23	Região HLA D	Respondedor ou não respondedor a alérgenos comuns
11q13	Cadeia β do receptor $F_c\varepsilon$	Responsividade aumentada a aeroalérgenos; fenótipo de IgE elevada
5q31–33	Citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Fenótipo de IgE elevada; responsividade a aeroalérgenos
16	Receptor de IL-4	Fenótipo de IgE elevada

Regulação da síntese de IgE: interações moleculares e celulares

Conforme mencionado anteriormente, os genes de classe II localizados na região do HLA D exercem forte influência nas respostas individuais a antígenos exógenos (Pieters, 2000; Wang, 2002). Os produtos genéticos da região altamente polimórfica do HLA D, que são as moléculas DR, DQ e DP expressas na membrana plasmática de células B e células dendríticas apresentadoras, ligam-se ao antígeno para processamento e apresentação às células T imunocompetentes e, assim, iniciam a resposta imune (Wang, 2002). As respostas imunes celular e humoral subsequentes são determinadas por uma inter-relação complexa de interações celulares, envolvendo contatos célula-célula e secreção de citocinas (estimuladoras e inibidoras). A produção de anticorpos IgE maduros por linfócitos B exemplifica esses mecanismos (Fig. 53.1).

A princípio, todos os linfócitos B produzem anticorpos IgM. A especificidade antigênica é determinada pelo rearranjo dos éxons V, D e J que codificam porções da região variável da Ig, para criação de um *motif* (gene) de região variável (VDJ). Esse *motif* VDJ codifica a porção ligadora de antígeno (Fab) da cadeia pesada de uma Ig madura. O *motif* VDJ rearranjado está em contracorrente em relação aos éxons codificadores das regiões constantes das diversas cadeias pesadas de Ig, incluindo os éxons γ, ε e α. A produção de transcritos maduros para moléculas de Ig completas contendo essas cadeias pesadas requer novos rearranjos no *locus* de cadeia pesada (IgH). Tais rearranjos resultam em mudança de expressão dos domínios da região constante da cadeia pesada, que passam de μ a outro isótipo (p. ex., ε). Esse processo é referido como recombinação delecional de mudança de isótipo, uma vez que os éxons codificadores dos domínios da cadeia μ são eliminados por ação de endonucleases em um processo irreversível (Coico, 2003).

A síntese de moléculas maduras de IgE ocorre em uma série de etapas, que têm início na expressão de transcritos de linhagem germinativa (estéreis) da cadeia pesada ε. A transcrição de linhagem germinativa deve ocorrer antes da conclusão da recombinação delecional de mudança isotípica. Esse processo envolve a interação com um éxon promotor situado em contracorrente em relação aos quatro éxons codificadores dos domínios da cadeia pesada ε (ver adiante) (Fig. 53.1). O promotor ε contém sítios de ligação para vários fatores de transcrição, tais como STAT6 e NF-κB, que conduzem a transcrição ativando o promotor. Mutações envolvendo os sítios de ligação para esses fatores de transcrição bloqueiam a mudança de isótipo para IgE. Como os transcritos de linhagem germinativa não codificam uma cadeia pesada funcional, é necessário que esses transcritos sejam novamente metabolizados pelas endonucleases para que sejam criadas moléculas de cadeias pesadas funcionais. As endonucleases eliminam Cμ e ligam novas sequências VJD e Cε adjacentes. Toda a cascata metabólica requer tanto interações célula-célula quanto mediadores solúveis (Oettgen, 2001).

As citocinas produzidas pelas células T auxiliares/indutoras de fenótipo Th2 são necessárias à produção de transcritos de cadeia pesada de IgE. As células Th2 produzem diversas citocinas que atuam como fatores de crescimento para linfócitos B, como IL-4 e IL-13, indutoras da produção de transcritos de linhagem germinativa ε em linfócitos B humanos (Vercelli, 1989; Defrance, 1994). Essas citocinas exercem seus efeitos interagindo com receptores multiméricos de superfície celular. Os receptores de IL-4 e IL-13 compartilham uma cadeia α de ligação ao ligante, bem como uma cadeia transmembrana γ, que participa da transdução de sinal (Palmer-Crocker, 1996). A ligação de IL-4 e IL-13 aos seus receptores induz uma série de reações de fosforilação, que resulta na transcrição do DNA conduzida por fatores de transcrição fosforilados. As tirosina quinases da família Janus (JAK1, 2 e 3) estão associadas aos domínios intracelulares dos receptores de IL-4 e IL-13, e catalisam a fosforilação dos receptores de modo a permitir que os mesmos se liguem a fatores de transcrição intracelulares. Os fatores de transcrição, que incluem STAT6 e NF-κB, são fosforilados, dimerizam e são translocados para o núcleo, onde se ligam ao promotor ε e induzem expressão de transcritos de linhagem germinativa ε (Oettgen, 2001).

Coincidindo com a interação entre células apresentadoras de antígeno e linfócitos T já descrita, que ocorre via receptor de célula T

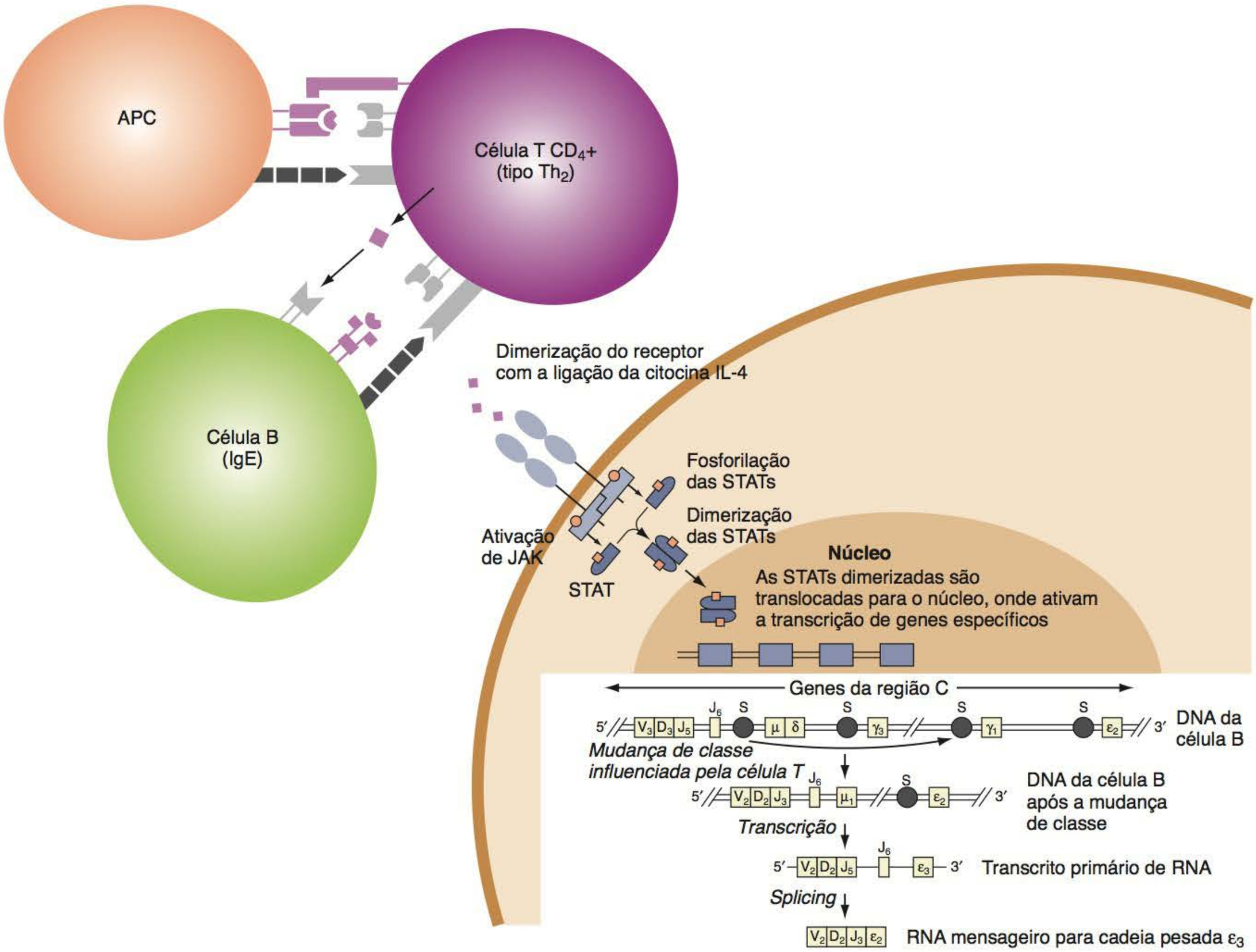


Figura 53.1 Interações celulares e moleculares reguladoras da síntese de IgE.

(TCR), um segundo nível de interação célula-célula é requerido para promoção da mudança de expressão da cadeia pesada ε para μ pelos linfócitos B (Oettgen, 2001). A ligação do TCR resulta na regulação positiva da expressão de CD40 ligante (CD154) na superfície da célula T. O CD40 ligante interage com o CD40 presente na superfície de linfócitos B e catalisa a ativação do NF-εB. Este, por sua vez, facilita a ativação do promotor e via STAT6, bem como de outras proteínas induzidas por ativação (Oettgen, 2001). A importância do CD40 ligante (CD154) para o processo de mudança de classe pode ser constada em alguns pacientes com síndrome de hiper-IgM ligada ao X, que são deficientes em CD40 ligante e incapazes de produzir anticorpos IgG, IgA ou IgE (Korthauer, 1993).

Imunoglobulina E: características estruturais e funcionais

Ishizaka e Ishizaka foram os primeiros a demonstrar que os anticorpos IgE possuem atividade reagente e são diferentes das demais Igs (Ishizaka, 1966). Esses pesquisadores criaram um antissoro de coelho dirigido contra a fração de Igs rica em reagina isolada do soro de um paciente atópico. Após a absorção com Igs purificadas de todos os isótipos conhecidos (IgG, IgA, IgM e IgD), o antissoro ainda reagia com a γ_1-globulina presente no soro de pacientes alérgicos. Após a imunoprecipitação com esse antissoro, foi abolida a atividade de sensibilização cutânea do soro oriundo de diferentes pacientes atópicos.

Evidências conclusivas da singularidade imunoquímica e atividade reagente da IgE foram obtidas pouco tempo depois, quando se descobriu que proteínas do mieloma humano reagiam com o referido antissoro (Bennich, 1969). Experimentos realizados com fragmentos de Ig preparados por digestão enzimática de proteínas IgE de mieloma indicaram conclusivamente que a atividade de sensibilização cutânea requeria a existência de uma região Fc? intacta. Esses experimentos também demonstraram que os determinantes antigênicos exclusivos das moléculas de IgE estavam contidos no fragmento Fc? (Bennich, 1969). A Tabela 53.2 resume as propriedades físico-químicas e funções imunológicas das diferentes regiões da molécula de IgE, determinadas por meio de experimentos que utilizaram proteínas IgE de melanoma humano purificadas e fragmentos de Igs preparados por digestão enzimática. A Figura 53.2 mostra um diagrama ilustrativo da estrutura da IgE humana.

Anticorpos IgE humanos sensibilizam a pele e a induzem a liberar histamina – um fenômeno referido como anafilaxia cutânea passiva. A

Tabela 53.2 Propriedades físico-químicas da imunoglobulina E

Classe de cadeia H	ε
Fórmula molecular	ε_2L_2
Coeficiente(s) de sedimentação	8
Peso molecular	190.000
Carboidratos (%)	11,7
Fixação do complemento (via clássica)	Não fixa
Meia-vida no soro (dias)	2
Transferência placentária	Não ocorre
Atividade reagente	4^+; fragmentos contendo Fc inibem a atividade de sensibilização cutânea da IgE, ao contrário dos fragmentos contendo Fab

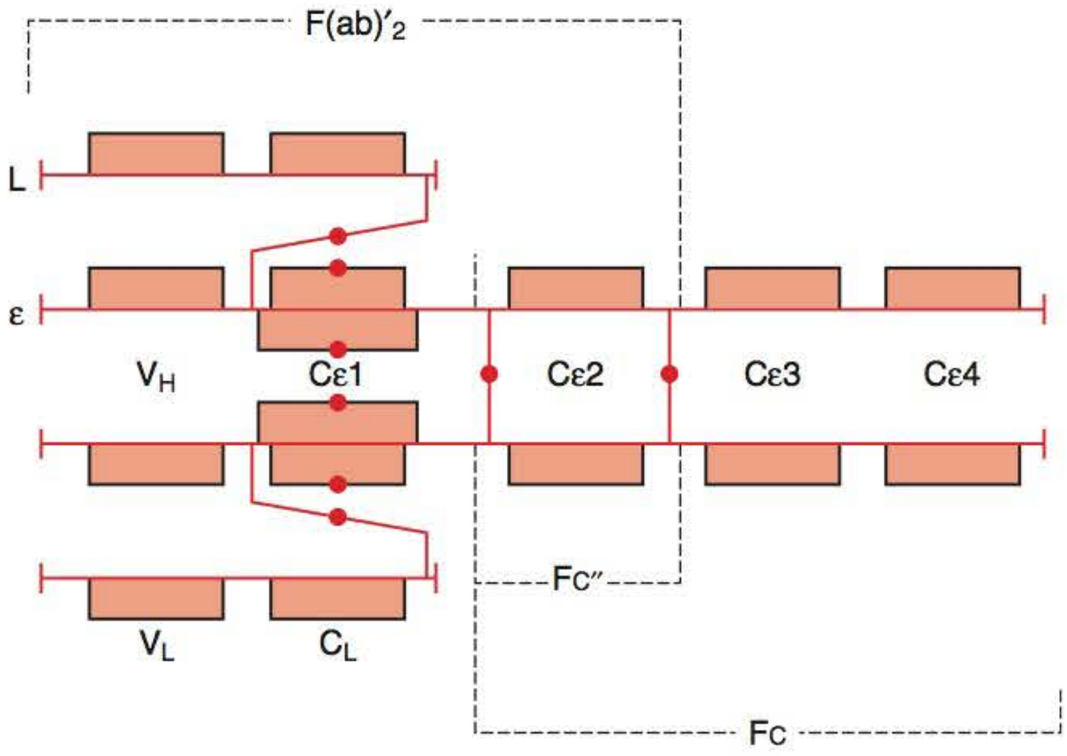


Figura 53.2 Estrutura da IgE.

atividade sensibilizadora cutânea da IgE é sensível ao calor. O aquecimento a 56°C durante 2 horas modifica irreversivelmente os domínios $C_\varepsilon3$ e $C_\varepsilon4$ da molécula de IgE, abolindo sua atividade de sensibilização cutânea (Ishizaka, 1967). A ligação às células efetoras é igualmente abolida pela redução e alcalinização das ligações dissulfeto intercadeias. A IgE humana agregada não fixa complemento pela via clássica. Não há significativa transferência placentária de IgE humana.

Células e mediadores das reações de hipersensibilidade imediata

Os mastócitos são as principais células efetoras das reações de hipersensibilidade imediata, embora outros tipos celulares, como eosinófilos, basófilos, neutrófilos e linfócitos, estejam envolvidos na promoção e manutenção da inflamação alérgica (Church, 2003). Os mastócitos e basófilos chegaram a ser considerados tipos celulares intimamente relacionados, pois ambos apresentam coloração metacromática por corantes básicos e contêm histamina em grânulos pré-formados. Evidências mais recentes sugeriram que os basófilos são derivados de precursores de granulócitos, enquanto os mastócitos derivam de precursores de células mononucleares e possuem receptores para fator de células-tronco (Galli, 1990). Os basófilos se desenvolvem na medula óssea e entram na circulação como células maduras, enquanto os mastócitos sofrem maturação nos tecidos onde residem como células maduras.

Os mastócitos tipicamente contêm até 10 vezes mais histaminas por célula do que os basófilos. Existem duas populações de mastócitos fenotipicamente distintas, denominadas Mt (com base no conteúdo de triptase) e Mtq (com base no conteúdo de triptase e quimase). Os Mt são encontrados nas superfícies mucosas, em sítios de inflamação alérgica, com frequência perto de linfócitos T. Os Mtq são mais numerosos em sítios submucosos e no tecido conjuntivo, além de não estarem associados à inflamação alérgica nem à infiltração de linfócitos T (Irani, 1986).

Os mastócitos contêm mediadores pré-formados e mediadores recém-sintetizados, que exercem papel importante na inflamação alérgica. Os principais mediadores pré-formados encontrados nos grânulos dos mastócitos são histamina, triptase e quimase (proteases neutras), hidrolases ácidas (p. ex., hexosaminidase), heparina, sulfatos de condroitina (proteoglicanas), além de diversas citocinas e agentes quimiotáticos (IL-3, IL-4, TNF-α e IL-8). Os mediadores recém-formados incluem os produtos do metabolismo do ácido araquidônico pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) (prostaglandinas [PGs]) e lipoxigenase (LOX) (leucotrienos [LTs]).

O mecanismo primário de liberação dos mediadores pré-formados pelos mastócitos e basófilos envolve sinalização transmembrana mediada pela IgE de superfície celular (homocitotrópica), que se liga a receptores de IgE (Fcε RI) difusamente localizados na membrana plasmática das células efetoras. A ligação dos anticorpos IgE aos Fcε RI é reversível, contudo, de altíssima afinidade ($Ka = 10^{10}\ M^{-1}$) (Wank, 1983). Enquanto os anticorpos IgE presentes no sangue possuem meia-vida de apenas 2 a 3 dias, estima-se que a meia-vida da IgE ligada ao Fcε RI no mastócito seja superior a 10 dias. Cada célula pode apresentar 40.000 a 500.000 receptores. Células cultivadas em presença de IgE apresentam maior número de receptores, possivelmente como reflexo da regulação positiva da expressão de Fcε RI pela IgE. O Fcε RI é um receptor multimétrico, composto de subunidades α, β e γ do seguinte modo: α_1, β_1 e γ_2. A ligação aos anticorpos IgE é medida pela subunidade α, enquanto as subunidades β e γ contêm regiões transmembrana que atuam na sinalização transmembrana (Ravetech, 1991).

As moléculas de Fcε RI são móveis, junto à membrana plasmática das células sensibilizadas, conforme indicaram estudos de *capping* (capeamento) utilizando anticorpos anti-IgE conjugados à fluoresceína. Essa mobilidade a curtas distâncias é considerada importante para a liberação de mediadores por mastócitos e basófilos. Estudos extensivos utilizando basófilos e mastócitos sensibilizados *in vitro* com proteínas IgE de mieloma ou com anticorpos IgE específicos revelaram que a liberação de histamina é desencadeada por ligações cruzadas (ou pontes) de receptores de IgE ocupados por ação de antígenos multivalentes, de anticorpos anti-IgE intactos ou de seus fragmentos $F(ab')_2$, mas não por haptenos univalentes ou fragmentos Fab de anticorpos anti-IgE.

O sinal inicial para liberação de mediadores pré-formados, bem como para síntese e liberação de PGs e leucotrienos a partir de mastócitos sensibilizados por IgE, é a ligação cruzada do Fcε RI por uma alérgeno multivalente. A degranulação ocorre por meio de um processo de exocitose. A agregação de receptores pelo alérgeno provoca metilação dos fosfolipídeos da membrana, ativação da adenilato ciclase, aumento temporário da concentração intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e influxo de íons de Ca^{2+}, com consequente fusão dos grânulos e membranas celulares durante a exocitose. A aumentada concentração intracelular de Ca^{2+} também ativa a fosfolipase A_2, que, por sua vez, promove síntese de ácido araquidônico derivado dos lipídeos da membrana celular. Nos mastócitos, o ácido araquidônico livre é metabolizado a PGD_2, por enzimas da via da COX (COX-2, PG sintase e isomerase), e a cisteinil LTs (LTB_4, LTC_4, LTD_4 e LTE_4), por enzimas da via da 5-LOX (Church, 2003) (Fig. 53.3).

A histamina é o mediador da inflamação alérgica mais conhecido. Quando injetada por via intradérmica, ela promove uma característica reação de pápula e eritema que resulta da ocorrência simultânea de vasoconstrição das vênulas pós-capilares e de eritema neurogênico (Petersen, 1997). A histamina presente nos mastócitos está contida no interior de grânulos pré-formados, sendo que cada célula contém aproximadamente de 3 a 8 pg de histamina. Após ser liberada pelos mastócitos, a histamina interage com receptores específicos acoplados à proteína G, denominados H1-H4 (Wess, 1997; Gether, 2000; Church, 2003). A ligação do receptor histamínico H1 ativa a fosfolipase C, com consequente ativação da proteína C quinase e mobilização de Ca^{2+}, que promovem as respostas celulares associadas à inflamação alérgica. Os efeitos da histamina são mediados por receptores distintos em diferentes tecidos. Os receptores H1 existentes nas vias aéreas promovem contração da musculatura lisa bronquial e produção de muco, enquanto os receptores H2 presentes no estômago promovem secreção de ácido. Os receptores H3 e H4 são encontrados nos nervos histaminérgicos e nas células da medula óssea, respectivamente. A histamina é degrada em duas vias enzimáticas, sendo que o principal metabólito – ácido *N*-metilimidazol acético (MIAA) – resulta da metilação e deaminação sequenciais da histamina pelas enzimas *N*-metil transferase e monoamina oxidase. A maior parte da histamina secretada é excretada como MIAA na urina, e uma pequena quantidade aparece sob a forma não degradada.

As proteínas mais abundantes nos grânulos dos mastócitos são as proteases neutras, dentre as quais a triptase e a quimase são as mais familiares. Conforme já observado, os mastócitos são classificados de acordo com seu conteúdo dessas duas proteases. Os Mt predominam na mucosa intestinal e nas vias aéreas, enquanto os Mta são encontrados no tecido conjuntivo cutâneo e na submucosa intestinal. A triptase de mastócitos humanos é um tetrâmero constituído por subunidades de 31 a 38 kDa, cuja massa molecular aproximada é de 130 kDa (Schwartz, 1981). Duas subunidades de cDNA da triptase, denominadas α e β, foram clonadas a partir de mastócitos humanos e apresentam cerca de 90% de homologia sequencial entre si (Miller, 1990). A maior parte da triptase encontrada no soro humano corresponde à

subunidade α, e é provável que seja liberada constitutivamente pelos mastócitos. A triptase β é armazenada dentro dos grânulos de secreção, formando complexo não covalente com a proteoglicana heparina, e liberada mediante ativação celular. Em consequência, a triptase α fornece a massa estimada dos mastócitos, enquanto a triptase β constitui um marcador de ativação de mastócitos e de liberação de mediadores (Schwartz, 1987). A meia-vida da triptase na circulação é de aproximadamente 90 minutos (Schwartz, 1989). Além de atuar como enzima, a triptase promove crescimento de fibroblastos e células de músculo liso, ativa mastócitos e promove liberação do agente quimiotático IL-8 pelas células epiteliais (Cairns, 1996).

PGs e LTs recém-sintetizados são importantes mediadores pró-inflamatórios da alergia. Dentre as PGs mediadoras encontradas nos mastócitos, a principal é a PGD_2 (Fig. 53.3). A PGD_2 é bem mais potente do que a histamina, em termos de base molar, embora seja liberada em quantidades menores pelos mastócitos ativados (Church, 2003). A PGD_2 e seu metabólito 9α,11β PGF_2 promovem constrição da musculatura lisa das vias aéreas, vasodilatação periférica e inibição da agregação plaquetária. A ativação de mastócitos periféricos mediada pela IgE também resulta na síntese e liberação de cisteinil LTs (LTC_4, LTD_4 e LTE_4) (Fig. 53.3). Essas moléculas são broncoconstritores extremamente poderosos, cuja ação é até 1.000 vezes mais potente do que a ação da histamina, e podem induzir aumento da permeabilidade vascular e produção de muco. Na literatura antiga sobre alergia, os LTs eram referidos como substâncias de reação lenta da anafilaxia (SRS-A). Seu papel na resposta asmática é demonstrado pelas triagens clínicas, que revelam a eliminação efetiva de parte considerável da resposta asmática inicial ao alérgeno mediante a administração de antagonistas de LT (Findlay, 1992). A inflamação alérgica com frequência ocorre em dois estágios: uma resposta imunomediada ao contato com o alérgeno, que ocorre em poucos minutos, e uma reação tardia em até 24 horas após a exposição ao alérgeno. Essa resposta bifásica é comum na asma. Ambos os estágios da resposta alérgica dependem da presença e do engajamento de anticorpos IgE ligados à célula. A resposta inicial reflete os efeitos dos mediadores histamina, PG e LT. A resposta tardia é produzida pelo recrutamento de células inflamatórias, incluindo eosinófilos e neutrófilos, para os sítios de inflamação alérgica, seguido da liberação de mediadores por essas células ativadas. Essa resposta tardia é facilitada pela liberação de citocinas e agentes quimiotáticos por mastócitos ativados, que promovem a infiltração e degranulação dos leucócitos inflamatórios.

Teste laboratorial na avaliação das doenças alérgicas

O fundamento do teste

Os testes laboratoriais para detecção de doenças alérgicas são disponibilizados há mais de 30 anos (Wide, 1967). A base desses testes são os imunoensaios para detecção de proteína total de IgE (IgE) e de anticorpos IgE específicos para alérgenos (anticorpos IgE) no soro. Na maior parte do tempo, ao longo desses anos, houve apenas um modesto interesse na realização do repertório completo de testes localmente, em laboratórios clínicos hospitalares; muitas instituições optam por enviar suas amostras a laboratórios de referência para que sejam analisadas. Mais recentemente, o uso de testes laboratoriais na avaliação de pacientes com doenças alérgicas tem sido conduzido por modificações envolvendo os planos de assistência à saúde supervisionados, o desenvolvimento de novos fármacos terapêuticos para tratamento de doenças alérgicas, o aprimoramento de métodos analíticos para quantificação de anticorpos IgE e a ampliação do conhecimento sobre a história natural de desenvolvimento de doenças alérgicas, especialmente no caso das crianças. Antes da era da assistência supervisionada, usualmente, uma criança ou pessoa adulta que apresentasse sinais e sintomas de doença alérgica poderia ser examinada por um especialista em alergias, não havendo necessidade de prévia avaliação médica. Atualmente, esse cenário mudou para muitos pacientes, cujos planos de saúde exigem que seus clientes passem por uma avaliação inicial junto a médicos de atendimento básico. Diante desse paradigma, os testes laboratoriais que estabelecem uma alta probabilidade de doença alérgica adquirem maior importância, pois os resultados fornecidos justificam o encaminhamento do paciente a um especialista em alergias e também permitem aos médicos de atendimento básico decidir se devem ou não supervisionar o paciente em sua própria prática. Além disso, os novos tratamentos farmacológicos para doenças alérgicas, como a administração de anticorpos monoclonais anti-IgE, requerem a justificação de seu uso por meio da demonstração de níveis elevados de IgE ou da presença de anticorpos IgE no soro do paciente (Soler, 2001; Lanier, 2003). Os métodos analíticos para quantificação de anticorpos IgE também foram significativamente aperfeiçoados. Conforme detalhado adiante, a atual geração de métodos de teste apresenta pouca semelhança com os testes originalmente introduzidos logo após a descoberta da IgE. Por fim – e talvez de forma mais significativa –, as investigações clínicas acerca da história natural das doenças alérgicas em crianças revelaram uma sequência reprodutível de sensibilização a alérgenos que torna cada vez mais importante estabelecer o diagnóstico de alergia ainda em idade precoce, a fim de amenizar a evolução para doenças mais sérias, como a asma (Wahn, 2000).

No campo da alergia clínica, os testes para detecção de IgE e anticorpos IgE são solicitados sobretudo para fins diagnósticos. Os resultados podem ter significado prognóstico ou servir como guia para terapias específicas, como a evitação de um dado alérgeno ou a imunoterapia. Contudo, os dados laboratoriais têm pouca importância na avaliação da resposta a tais terapias ou no monitoramento do curso da doença. Além disso, a utilidade dos resultados de um teste diagnóstico é determinada empiricamente, conforme seja fácil ou difícil estabelecer um diagnóstico acurado no cenário clínico, bem como por meio do estudo dos resultados clínicos que podem justificar a realização de triagens de terapia farmacológica sem um diagnóstico etiológico específico (conhecida como terapia empírica) (Gendo, 2004). Mesmo assim, em diversas situações clínicas, uma supervisão definitiva requer que os alérgenos agressores sejam identificados de maneira inequívoca. Exemplificando, é necessário definir a especificidade do alérgeno em casos de sensibilidade anafilática a alérgenos presentes em alimentos, fármacos e veneno de insetos, no caso de pacientes com indicação de tratamento por imunoterapia e para aqueles que apresentam alergias ocupacionais ou sensibilidade a determinados alérgenos, como o látex da borracha natural.

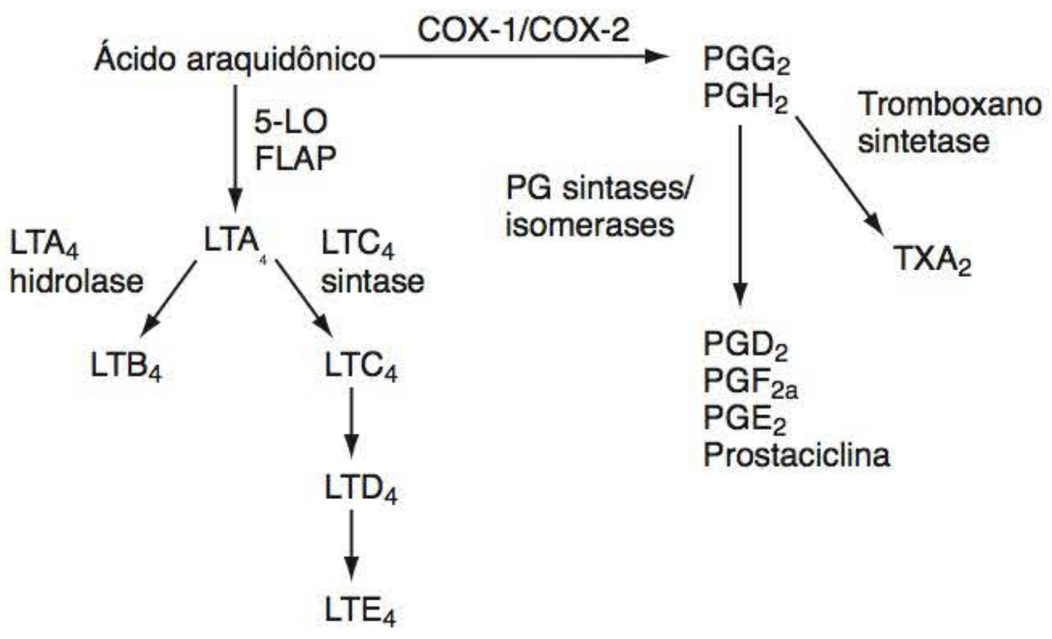


Figura 53.3 Metabolismo do ácido araquidônico. COX = ciclo-oxigenase; PG = prostaglandina; TX = tromboxano; LT = leucotrieno; 5-LO = 5-lipoxigenase; FLAP = proteína ativadora de 5-lipoxigenase.

Técnicas de teste *in vivo*: testes cutâneos e de provocação de órgão-alvo

É impossível discutir o uso dos testes laboratoriais para diagnóstico e supervisão das doenças alérgicas sem mencionar os testes de hipersensibilidade imediata *in vivo*, em particular os testes cutâneos e de provocação de órgão-alvo. Os testes *in vivo* são considerados os padrões da acurácia e confiabilidade diagnóstica. A habilidade de reproduzir uma reação alérgica específica por meio de uma provocação *in vivo* é considerada, pela maioria dos especialistas em alergia, a técnica mais sensível para demonstração da existência de hipersensibilidade imediata e para determinação da especificidade do alérgeno.

Os testes cutâneos são realizados por meio de uma injeção intradérmica e pelo método da picada na pele (Demoly, 1998). A resposta à injeção intradérmica de um extrato de alérgeno é classificada

medindo-se o diâmetro da reação de pápula e eritema imediatamente após a injeção. Uma reação classificada como 1+ corresponde a uma pápula de 5 a 10 mm. Uma resposta dessa magnitude geralmente é considerada evidência de sensibilidade específica a algum alérgeno. Indivíduos altamente sensíveis com frequência desenvolvem pápulas com pseudópodos e diâmetros maiores que 15 mm. Testes cutâneos realizados pelo método da picada na pele empregam extratos de alérgeno mais concentrados (até 1.000 vezes mais concentrados do que os extratos utilizados no teste intradérmico) e a classificação muita vezes é omitida. A média dos diâmetros de pápula (em milímetros) é registrada e serve como indicação do grau de sensibilidade. Uma estimativa mais quantitativa da sensibilidade a um dado alérgeno pode ser obtida utilizando-se a técnica da titulação de ponto final. Essa técnica consiste em uma modificação dos métodos intradérmico e da picada na pele. São utilizadas diluições seriadas de 10 vezes de um extrato de alérgeno padronizado, começando pela maior diluição. A sensibilidade de ponto final é definida como a maior diluição que produz uma reação 1+.

Os testes de provocação de órgão-alvo têm utilidade clínica e para fins de investigação. A adaptação dessa técnica envolve o teste de provocação brônquica para diagnóstico da asma; teste de provocação rinoconjuntiva para diagnóstico de rinite alérgica; teste de eliminação e provocação alimentar para diagnóstico de asma induzida por alimento; e desafio da picada para diagnóstico de sensibilidade anafilática a veneno de inseto. A aplicação dos testes de provocação em situações clínicas rotineiras é limitada pela necessidade de utilizar extratos de alérgeno padronizados e com potência definida, bem como pelo número limitado de alérgenos que podem ser testados em um dado indivíduo em uma única ocasião. Os procedimentos para realização do teste de eliminação e provocação alimentar, por exemplo, requerem períodos de abstinência de vários dias, sendo que o teste pode ser invalidado pelo consumo inadvertido de um alimento em particular durante esse período.

Quantificação de anticorpos IgE: métodos analíticos e intervalos de referência

Uma variedade de métodos imunoquímicos tem sido utilizada para quantificar IgE, incluindo imunoensaios de deslocamento competitivo, ensaios imunométricos (de sanduíche) utilizando anticorpos radiomarcados e anticorpos de segundo estágio marcados com enzima; e nefelometria de sensibilidade aumentada (Homburger, 1998). Os ensaios imunométricos não isotópicos constituem o método mais amplamente utilizado. O método comercial de uso mais popular emprega anticorpos anti-IgE ligados a uma fase sólida de celulose de alta capacidade para capturar a IgE presente em uma amostra. Em seguida, a IgE ligada é detectada por um anticorpo de segundo estágio, que é marcado com enzima e gera um produto fluorescente. A quantidade de produto gerada é proporcional à quantidade de IgE capturada no primeiro estágio do ensaio. Esse ensaio é capaz de quantificar concentrações de IgE na faixa de 2 a 5.000 kU/L (1 kU equivale a aproximadamente 2,4 μg de IgE). Os calibradores de ensaio utilizados em produtos comerciais são rastreáveis por um padrão internacional (preparação 75/502 para IgE humana da Organização Mundial da Saúde [OMS]).

Existem diversos estudos sobre a concentração de IgE no soro de crianças e adultos sadios, não alérgicos. A síntese de IgE ocorre no feto humano, durante a 11ª semana de gestação, contudo, o soro de cordão umbilical tipicamente contém menos de 1 kU de IgE/L (Homburger, 1998). Em crianças, a concentração sérica de IgE aumenta lentamente com a idade até atingir os níveis observados em adultos, em torno dos 10 anos de idade (Tab. 53.3). Tanto em crianças quanto em adultos, estudos envolvendo indivíduos sadios com frequência produzem histogramas de quantificação de IgE que apresentam inclinação positiva com intervalos de confiança de 95%, que são aparentemente elevados, se comparados aos níveis médios de IgE. Em consequência, muitos laboratórios relatam intervalos de referência logaritmicamente transformados, com limite superior "normal" descrito como sendo igual a +1 DP da distribuição geométrica de uma idade correlata (Tab. 53.3). Essa convenção é confusa para muitos clínicos, de modo que se tornou prática comum considerar 100 kU/L como limite superior normal em indivíduos adultos não alérgicos.

Tabela 53.3 Intervalos de referência de IgE sérica em crianças e adultos

Idade	Média (kU/L)	+ 1 DP (kU/L)
6 semanas	0,6	2,3
3 meses	1,0	4,1
6 meses	1,8	7,3
9 meses	2,6	10
12 meses	3,2	13
2 anos	5,7	23
3 anos	8,0	32
4 anos	10	40
5 anos	12	48
6 anos	14	56
7 anos	16	63
8 anos	18	71
9 anos	20	78
10 anos	22	85
*Adultos	13,2	41

* Em adultos, a média +2 DP do valor de corte é 127 kU/L. Consulte a explicação fornecida no texto.

Quantificação de IgE: aplicações clínicas

A quantificação da proteína IgE no soro foi avaliada de modo abrangente quanto à utilidade clínica como teste de triagem no diagnóstico de várias doenças alérgicas; quanto ao seu valor preditivo como indicador da probabilidade de desenvolvimento de doença alérgica por bebês e crianças assintomáticos; e como indicador prognóstico para adultos com certos tipos de doença alérgica crônica. A quantificação de IgE também pode ser útil na avaliação de pacientes com suspeita de doenças de imunodeficiência, doenças parasíticas ou a rara síndrome da hiper-IgE.

A síndrome da hiper-IgE foi descrita pela primeira vez em 1972, por Buckley et al. Esses pesquisadores relataram o caso de dois pacientes que apresentavam níveis séricos elevados de IgE, dermatite difusa, furunculose recorrente e pneumonia com pneumatoceles secundária à infecção por *Staphylococcus aureus*. Relatos subsequentes de pacientes com esse distúrbio definiram a síndrome clínica: elevação extrema dos níveis séricos de IgE (2.000–50.000 kU/L), com os pacientes desenvolvendo eosinofilia no sangue e nos tecidos, bem como forte positividade para reações de pápula e eritema a alérgenos inalantes, polens, alimentos e antígenos bacterianos e fúngicos. Apesar desses achados, a asma é incomum entre pacientes com síndrome de hiper-IgE (Buckley, 1978).

A síntese de IgE, refletida pelos níveis séricos, foi estudada em pacientes com uma variedade de imunodeficiências primárias. Níveis aumentados de IgE foram descritos em alguns pacientes com deficiências parciais de imunidade celular. As doenças de imunodeficiência em que ocorre ausência total de síntese de Igs G, A e M, como se observa na doença da imunodeficiência severa combinada, caracteristicamente mostram diminuição da síntese de IgE e diminuição marcante dos níveis séricos de IgE. Os níveis séricos de IgE são variáveis em pacientes com deficiência de IgA. Pacientes com ataxia telangiectasia tipicamente apresentam níveis reduzidos, no entanto, os pacientes com deficiência isolada de IgA podem apresentar níveis de IgE normais ou modestamente aumentados. A doença alérgica não é comum em pacientes com doenças de imunodeficiência, exceto naqueles que apresentam severa deficiência de IgA, cujos níveis séricos de IgE são elevados.

A infiltração parasítica do trato gastrintestinal ou de órgãos parenquimatosos estimula acentuadamente a síntese de IgE, e estudos feitos com animais de laboratório sugerem que os anticorpos IgE específicos são importantes para a defesa do hospedeiro contra parasitas como *Nippostrongylus brasiliensis* e *Schistosoma mansoni*. Concentrações séricas de IgE acima de 1.000 kU/L são regularmente encontradas em crianças que vivem em áreas endêmicas de infestação parasitária. Outras doenças causadas por parasitas sabidamente estão associadas ao aumento dos níveis séricos de IgE, tais como larva migrans visceral (*Toxocara*

canis), capilaríase intestinal (*Capillaria phillippinensis*), esquistossomose, ancilostomose e equinococose. Em pacientes com doença parasitária, constatou-se que os níveis séricos de IgE sofrem uma queda acentuada após o tratamento bem-sucedido com fármacos antiparasitários.

Ao rever a utilidade dos níveis séricos de IgE como parâmetro para o teste diagnóstico de doenças alérgicas, recomenda-se discutir seu uso para crianças e adultos separadamente. Níveis elevados de IgE no soro ao nascimento ou durante a infância com frequência predizem o desenvolvimento de alergia clínica (Kjellman, 1984). Níveis séricos de IgE acima do limite correspondente ao 95° percentil da idade são detectados em 75% das crianças com história familiar biparental de doença alérgica. Entre as crianças sadias com níveis de IgE maiores que o equivalente a 1 DP da média para uma determinada idade, observou-se uma incidência 10 vezes maior de desenvolvimento de doença alérgica nos 18 meses subsequentes, em comparação a um grupo de indivíduos com níveis de IgE mais baixos. Embora sejam preditivos do desenvolvimento de uma doença alérgica no futuro, esses dados fornecem relativamente pouca informação que possa fundamentar decisões clínicas específicas.

A quantificação de IgE em crianças tem importância limitada para o diagnóstico da doença alérgica. A quantificação de IgE em bebês parece ser importante para o diagnóstico da doença alérgica no sentido de alertar o médico quanto à possibilidade da doença em caso de diagnóstico clínico diverso. Níveis séricos de IgE acima de +1 DP, nesses casos, sustentam o diagnóstico de doença alérgica. Contudo, níveis de IgE normais não excluem o diagnóstico de doença alérgica durante a infância ou em fases posteriores da vida. Os resultados fornecidos por outros testes diagnósticos, incluindo os testes de detecção de anticorpos IgE, são mais específicos (ver adiante). Nas situações clínicas em que os sinais de doença alérgica manifestados são evidentes (p. ex., eczema e rinite em bebê com história de família atópica), o nível sérico de IgE fornece pouca informação adicional. A situação é bastante similar quando se trata de crianças mais velhas. A quantificação de IgE no soro possui limitada sensibilidade diagnóstica para a doença alérgica. Em geral, crianças com hipersensibilidade a diversos alérgenos e apresentando múltiplas doenças alérgicas exibem níveis séricos de IgE elevados. Por outro lado, crianças com hipersensibilidade a uma gama menor de alérgenos e envolvimento limitado de órgão-alvo frequentemente apresentam níveis normais. A sensibilidade diagnóstica é maior em pacientes com sensibilidade clínica a um certo número de alérgenos distintos. Em crianças atópicas, a presença de doença cutânea e manifestações gastrintestinais aumenta a probabilidade de os níveis séricos de IgE sofrerem elevação. Crianças com doenças alérgicas envolvendo diversos órgãos tendem a apresentar elevações de níveis séricos de IgE de maior magnitude do que os aumentos observados naquelas com doença mais limitada. O nível aumentado de IgE possui uma excelente especificidade diagnóstica para a doença alérgica.

A quantificação dos níveis de IgE tem moderada utilidade diagnóstica para a maioria dos indivíduos adultos com suspeita de doença alérgica. Os resultados dos estudos clínicos para detecção de alergia respiratória do adulto indicam que aproximadamente 50% dos adultos com asma extrínseca e menos de 5% deles com asma denominada intrínseca (não atópica) apresentam níveis séricos de IgE elevados. Adultos asmáticos com hipersensibilidade a um número limitado de alérgenos usualmente apresentam níveis normais. Em adultos, os níveis mais altos de IgE são detectados em pacientes apresentando hipersensibilidade a vários alérgenos e uma combinação de asma, dermatite atópica e rinite. Assim como em crianças, a limitada sensibilidade diagnóstica dos níveis séricos de IgE restringe a utilidade clínica da quantificação desses anticorpos nos casos em que o diagnóstico de doença alérgica é praticamente incerto (Klink, 1990). Todavia, isso não significa afirmar que os níveis de IgE não devem ser determinados nesses casos, pois níveis elevados apresentam alto valor preditivo para doença alérgica.

A aspergilose broncopulmonar alérgica está associada à elevação dos níveis séricos de IgE. Essa doença ocorre tipicamente em pacientes com asma extrínseca, em geral de longa duração. Os níveis séricos de IgE estão aumentados durante a infiltração pulmonar aguda, contudo, pode haver considerável flutuação durante o curso da doença. Uma concentração normal de IgE em um paciente com doença pulmonar ativa virtualmente exclui esse diagnóstico.

Quantificação de anticorpos IgE: métodos analíticos e relatório de resultados

Dois métodos são comumente utilizados para testar os anticorpos IgE: teste cutâneo de alérgeno pelos métodos da picada ou intradérmico (ver anteriormente) e teste *in vitro* por imunoensaio métrico. Um terceiro método envolve medir a liberação de mediadores inflamatórios ou a expressão de antígenos de ativação na superfície de basófilos sanguíneos expostos ao alérgeno *in vitro*. Os métodos que envolvem células sanguíneas se baseiam na quantificação de histamina ou LTC_4 liberados por leucócitos basófilos (métodos de determinação da liberação de histamina por leucócitos) ou na detecção por citometria de fluxo dos antígenos de ativação (CD63 ou CD203c) expressos na superfície dos basófilos após a exposição ao alérgeno (de Weck, 1993; Nolte, 1993). Emboras esses métodos atualmente sejam comercializados, ainda não são amplamente adotados. Os ensaios celulares requerem que as amostras de sangue sejam testadas dentro de 24 horas, sendo que até 15% dos indivíduos não liberam histamina *in vitro*. Os ensaios fundamentados na detecção de marcadores de ativação dispensam a liberação de um mediador, mas podem estar sujeitos a resultados falso-positivos em decorrência do condicionamento (*priming*) com IL-3, que deve ser realizado antes da exposição ao alérgeno. Os resultados fornecidos por estudos clínicos iniciais utilizando ensaios celulares comerciais apontam uma sensibilidade relativamente fraca, quando esses ensaios são comparados aos testes cutâneos para diversos alérgenos, como alimentos e veneno de inseto (Maly, 1997).

Os ensaios imunométricos para detecção de IgE foram introduzidos no final da década de 1960 (Wide, 1967). Os métodos originais (primeira geração) empregavam imunossorventes, preparados por meio do acoplamento covalente de alérgenos a Sephadex ativado com cianogênio, discos de papel ou partículas de celulose microcristalinas, como reagentes de captura para anticorpos IgE. Após a incubação com soro, a fase sólida era lavada com tampão e radiomarcada, para em seguida serem adicionados anticorpos anti-IgE purificados por afinidade que atuavam como proteína de detecção. Esses métodos eram semiquantitativos e seus resultados eram determinados pela comparação com uma curva de dose-resposta referencial, que media a ligação dos anticorpos IgE da solução calibradora ao pólen de bétula imunossorvente. Os resultados eram expressos como classes variáveis de 0 (negativo) a 4+ (fortemente positivo). O método comercial original era referido pelo termo "teste radioalergossorvente" (RAST). Os testes de primeira geração para detecção de anticorpos IgE apresentavam diversas limitações: os imunossorventes tinham capacidade limitada de ligação aos anticorpos IgE, resultando em baixa sensibilidade analítica, períodos de incubação longos e interferência produzida pela competição com anticorpos IgG. Os alérgenos empregados no preparo dos imunossorventes variavam consideravelmente entre lotes distintos e de um fabricante para outro. O desenvolvimento dos métodos de segunda geração para detecção de anticorpos IgE, no início da década de 1990, era marcado pela habilidade de quantificar os anticorpos IgE. Esse avanço notável foi conseguido graças à criação de um alérgeno imunossorvente de alta capacidade, que era dotado de uma capacidade de ligação a anticorpos significativamente maior do que aquela apresentada pelos reagentes de fase sólida antigos (Ewan, 1990). A calibração era baseada na preparação de referência 75/502 da OMS. Uma abordagem quantitativa diferente envolvia a ligação de alérgenos à biotina, que permitia o uso de pérolas comuns acopladas à avidina para captura de complexos IgE-alérgeno de fase líquida (Iwamoto, 1990). Atualmente, existem ensaios comerciais aprovados para uso pelo Food and Drug Adminstration (FDA), que são baseados em ambos os tipos de reagentes. Os métodos de segunda geração contam com alguns aprimoramentos, como uma melhor sensibilidade analítica para detecção de anticorpos IgE a concentrações da ordem de 0,35 kU/L; resistência à interferência dos anticorpos IgG; melhor consistência entre lotes diferentes; e tempos de incubação mais rápidos com disponibilização dos resultados em menos de 6 horas. Melhoras significativas também foram introduzidas nos alérgenos reagentes, com caracterização e preparo de certo número de proteínas recombinantes a partir de alérgenos complexos clinicamente importantes. Entre esses alérgenos, estão ácaros da poeira, gato, *Alternaria tenuis*, amendoim e látex da borracha natural. Proteínas recombinantes (p. ex., Hevb 5 de *Hevea brasiliensis*

5 [látex da borracha natural]) atualmente são empregadas em reagentes de testes comerciais para alérgenos e contribuem para aumentar a sensibilidade diagnóstica desses produtos (Bernstein, 2003). Embora sejam muito melhores do que os ensaios antigos e apesar de terem sido aprovados para uso pelo FDA, os referidos ensaios de segunda geração produzidos por diferentes fabricantes e os recém-introduzidos ensaios de terceira geração (automatizados) ainda não são capazes de fornecer resultados de testes equivalentes em todos os casos. Os ensaios diferem quanto à composição de alérgenos reagentes e padronização de procedimentos. Clínicos e laboratoristas devem ter cautela ao escolher o método de teste comercial a ser utilizado (Hamilton, 2004).

Os testes para quantificação dos níveis de anticorpos IgE também foram adaptados para detectar vários anticorpos distintos ao mesmo tempo. Por meio do acoplamento de vários alérgenos à mesma fase sólida, é possível testar uma única alíquota de soro quanto à presença de vários anticorpos diferentes sem perda da sensibilidade analítica (Ownby, 1984). Existem testes com múltiplos alérgenos comercialmente disponíveis com os quais é possível testar a presença de anticorpos IgE de ocorrência comum em crianças e adultos atópicos. O desempenho clínico desses testes ultrapassa o de outros testes de triagem comumente empregados para exclusão da hipersensibilidade imediata como etiologia da doença (Ownby, 1984). Além disso, múltiplos alérgenos reagentes são úteis e confiáveis para testar o soro quanto à presença de anticorpos dirigidos contra classes de alérgeno comuns (p. ex., pólen de grama ou alimentos de certos grupos), considerando algoritmos com indicação para teste de especificidades individuais somente quando os testes de triagem resultam positivos.

Quantificação de anticorpos IgE: aplicações clínicas

As atuais recomendações de uso clínico do teste de detecção de IgE são baseadas nos resultados de estudos clínicos em que a sensibilidade e o valor preditivo dos resultados de anticorpos IgE foram comparados aos de outros testes diagnósticos, incluindo testes cutâneos e de provocação. O teste de detecção de anticorpos IgE apresenta certas vantagens em relação ao cutâneo: não impõe risco ao paciente e seus resultados não são influenciados pelo tratamento concomitante com anti-histamínicos ou broncodilatadores. Além disso, ele pode ser preferível ao teste cutâneo em determinados grupos de pacientes, como no caso de bebês, com dermografismo ou pacientes com dermatite amplamente disseminada. Por outro lado, também há algumas desvantagens: o teste sorológico é caro, se for utilizado de forma indiscriminada, e os resultados não são prontamente disponibilizados. Recentemente, o teste de detecção de IgE utilizando múltiplos alérgenos e imunossorventes com mais de um alérgeno acoplado à superfície foi considerado um teste de triagem sensível e custo-efetivo para ser utilizado em casos de alergia inalatória.

É difícil definir a especificidade e sensibilidade diagnóstica absoluta dos resultados referentes ao anticorpo IgE, uma vez que não existe nenhum método de referência aceito universalmente (padrão-ouro) para definir a sensibilidade a um dado alérgeno. Entretanto, na maioria dos estudos clínicos, os resultados dos testes de detecção de anticorpo IgE foram comparados aos resultados dos testes diagnósticos *in vivo* e às histórias de doença alérgica. A partir desses estudos, ficou evidente que a sensibilidade diagnóstica varia consideravelmente, dependendo do tempo decorrido entre a exposição a um alérgeno e a realização do teste; da classe de alérgeno testada; da idade do paciente; e dos órgãos-alvo afetados. Para o propósito desse capítulo, convém considerar separadamente as seguintes aplicações clínicas: doenças alérgicas da infância (incluindo alergia alimentar), doenças alérgicas do adulto, sensibilidade ao veneno de insetos e alergias farmacológicas e ocupacionais.

Crianças com predisposição genética ao desenvolvimento de doenças alérgicas (conhecidas como crianças atópicas) frequentemente apresentam uma sequência previsível de sinais e sintomas de doença, que evolui no decorrer de toda a infância. Esse conceito é denominado "marcha alérgica". Em bebês geneticamente predispostos, o eczema (dermatite atópica) costuma ser a primeira manifestação da doença alérgica. Bebês e crianças atópicas com menos de 3 anos de idade também podem apresentar sintomas gastrintestinais (cólica, diarreia, vômito e dor abdominal) ou sofrer de otite crônica. Menos comumente, crianças nessa idade já apresentam chiado asmatiforme recorrente. À medida que a criança atópica amadurece, os sintomas cutâneos e gastrintestinais muitas vezes são substituídos pela piora dos sintomas respiratórios, com desenvolvimento de rinite alérgica e asma. A Figura 53.4 representa graficamente a sequência inteira da "marcha alérgica".

Independentemente da idade, os sintomas de doença alérgica manifestados pela criança são inespecíficos para hipersensibilidade imediata, podendo ser confundidos com facilidade com outras etiologias. Cada vez mais, os médicos têm reconhecido que a terapia empírica para crianças com suspeitas de doença alérgica é inaceitável, pois com frequência resulta no tratamento desnecessário ou inadequado, à base de anti-histamínicos, corticosteroides inalados ou sistêmicos e antibióticos. A terapia empírica permite que a "marcha alérgica" evolua sem controle, fazendo com que seja perdida a oportunidade de reduzir a exposição do paciente aos alérgenos agressores. Embora os resultados das investigações clínicas ainda sejam inconclusivos, há fortes evidências sugestivas de que a prática de evitar os alérgenos agressores e a instituição de uma farmacoterapia ideal podem diminuir o risco de sensibilização a alérgenos adicionais e interromper a progressão para doenças respiratórias alérgicas graves na fase tardia da infância (Wahn, 1998; Platts-Mills, 2003).

Em uma recente declaração de consenso, a European Academy of Allergy and Clinical Immunology fez a seguinte recomendação (Host, 2003): de uma forma geral, todos os indivíduos apresentando possíveis "sintomas alérgicos" severos, persistentes ou recorrentes, bem como aqueles que necessitam de tratamento profilático contínuo, devem ser testados quanto a alergias específicas, independentemente da idade da criança.

Nessa descrição, estão incluídas as crianças com doença cutânea, sintomas gastrintestinais (cólica, diarreia, vômito ou falha de crescimento), chiado asmatiforme recorrente, otite, rinite ou asma. Os testes laboratoriais para detecção de anticorpos IgE e os testes cutâneos foram considerados essencialmente intercambiáveis para o propósito de avaliar essas crianças (Host, 2003).

A escolha de alérgenos adequados para o teste é determinada principalmente pela idade da criança. Os alérgenos agressores mais comuns para bebês e crianças com menos de 3 anos de idade são os alimentos, notavelmente os alérgenos proteicos encontrados no leite de vaca, ovos brancos, trigo e soja (Nickel, 1997; Sampson, 2001). A hipersensibilidade imediata aos alérgenos alimentares na infância comumente está associada a eczema, sintomas gastrintestinais, otite crônica e chiado asmatiforme. Menos frequentemente, crianças severamente atópicas com menos de 3 anos de idade podem apresentar anticorpos IgE detectáveis que reagem contra os ácaros da poeira (*D. farinae* e *D. pteronyssinus*). Esses alérgenos inalantes constituem causa comum de asma entre crianças maiores. Com exceção da rara ocorrência de anafilaxia em uma criança cujos sintomas estejam fortemente associados

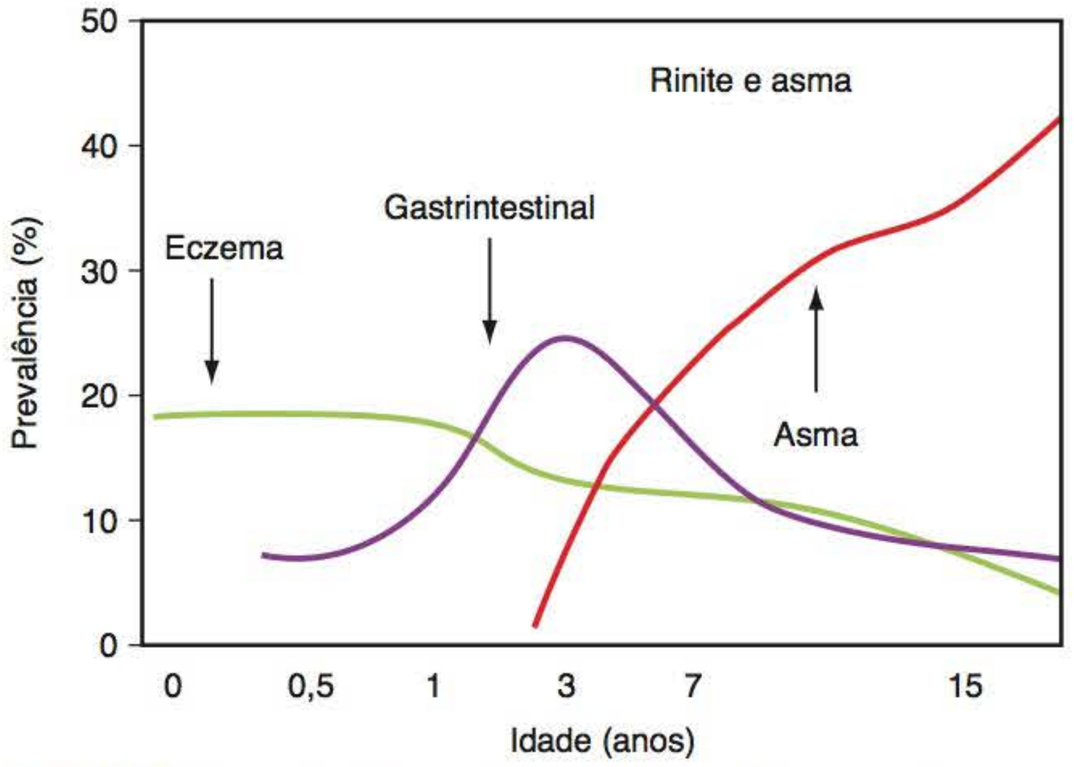


Figura 53.4 Relação entre idade e manifestações clínicas da doença alérgica em crianças.

à ingestão de um alimento em particular (p. ex., amendoim), raramente é necessário realizar testes para detecção de anticorpos IgE adicionais se os testes de reação aos alérgenos alimentares comuns tiverem resultado negativos. Além disso, a doença respiratória alérgica causada por alérgenos inalantes comuns, como polens e bolores, é incomum antes dos 3 anos de idade, de modo que o teste de rotina para detecção de anticorpos IgE contra tais alérgenos não tem utilidade na rotina. No grupo de crianças com menos de 3 anos, o diagnóstico presuntivo de uma doença alérgica pode ser estabelecido por meio de testes para detecção de anticorpos IgE contra alérgenos comuns presentes em alimentos e nos ácaros da poeira. Testes que resultam positivos para anticorpos IgE contra esses alérgenos possuem duplo significado: estabelecem uma forte probabilidade de haver doença de hipersensibilidade imediata e indicam risco aumentado de sensibilização a alérgenos adicionais em fases posteriores da infância (Nickel, 1997). Por isso, a identificação de anticorpos IgE dirigidos contra alérgenos alimentares comuns em crianças com menos de 3 anos de idade e bebês sintomáticos é importante para adotar alternativas de tratamento adequadas e para decidir procurar encaminhamento para um especialista em alergia.

Em crianças com menos de 3 anos de idade, muitas vezes, é mais conveniente testar o soro quanto à presença de anticorpos IgE do que realizar testes de picada na pele. Os níveis de anticorpos IgE preditores de hipersensibilidade imediata clinicamente significativa, com altos valores preditivos positivos, são algo variáveis entre os diferentes alimentos. Além disso, a significância clínica de níveis baixos de anticorpos IgE para alimentos comuns é limitada (Sampson, 1997, 2001). Mesmo assim, considerando as relações graficamente representadas na Figura 53.5, é evidente que quanto maiores forem os níveis de anticorpos IgE, maior será a probabilidade de sensibilidade clinicamente significativa a cada alérgeno alimentar.

As doenças alérgicas em crianças com mais de 3 anos de idade tipicamente se manifestam como sinais e sintomas respiratórios, como rinite, chiado asmatiforme e tosse persistente (Fig. 53.4). É útil considerar o trato respiratório inteiro como um único órgão-alvo. A rinite e a asma alérgica com frequência ocorrem juntas. A maioria das crianças asmáticas também apresenta rinite e as crianças com rinite frequentemente sofrem de asma, a qual pode ser clínica ou subclinicamente aparente (Sly, 1999). Quando a doença se desenvolve e passa a afetar o trato respiratório, a realização de testes de detecção de anticorpos IgE contra alérgenos inalantes adquire importância bem maior para a tomada de decisão clínica (Host, 2003). Como existem inúmeros alérgenos inalantes diferentes disponíveis para teste, é importante ser seletivo ao realizar o teste inicial para crianças com sinais e sintomas respiratórios, a fim de evitar testes desnecessários. Os dados fornecidos pelas investigações clínicas sustentam abordagens complementares: o uso de pequenos painéis de alérgenos inalantes individuais e a realização de testes de detecção de anticorpos IgE com múltiplos alérgenos, a fim de detectar a presença de diversos anticorpos simultaneamente.

A escolha dos alérgenos a serem utilizados nos testes para crianças com doenças respiratórias depende da idade e das manifestações clínicas por elas apresentadas (Tab. 53.4). Após os 3 ou 4 anos de idade, crianças atópicas comumente desenvolvem anticorpos IgE contra alérgenos presentes em ambientes internos, tais como ácaros da poeira, epitélios animais (gatos e cães) e baratas. As especificidades de anticorpos que as crianças desenvolvem por último são contra aeroalérgenos comuns em ambientes externos, tais como bolores e polens inalantes de árvores, grama e ervas daninhas. Ainda falta um consenso quanto ao número de alérgenos inalantes a ser testado na avaliação de crianças com sintomas respiratórios. Por outro lado, todos concordam que o teste deve incluir ácaros de poeira, epitélio de gato ou cão, bolor constituído por espécie ubíqua (p. ex., *Alternaria tenuis*) e alérgenos de pólen apropriados (Host, 2003). O teste para detecção de anticorpos IgE contra alérgenos de pólen é indicado para crianças maiores, em especial quando os sintomas são sazonais; se for possível, deve-se realizá-lo durante a manifestação dos sintomas. É bem sabido

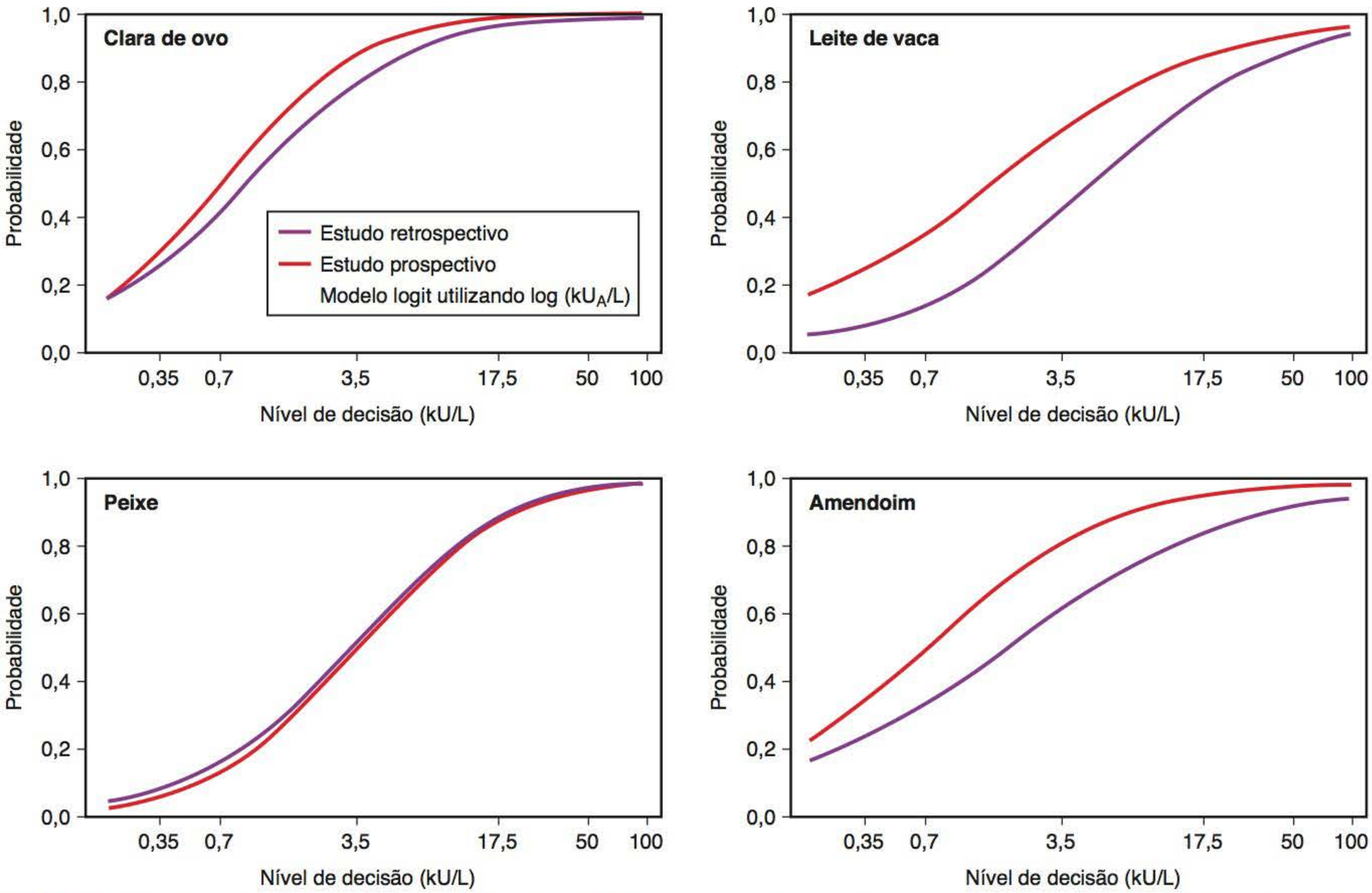


Figura 53.5 Probabilidade de reação contra alérgenos alimentares diante de níveis crescentes de anticorpos IgE. (Com permissão de Sampson, HA: Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food alergy. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:891-896.)

Tabela 53.4 Testes de detecção de anticorpos IgE selecionados para avaliação de crianças com sinais clínicos de alergia

Idade (anos)	Sinais de doença	Alérgenos
Menos de 3	Eczema com ou sem chiado asmatiforme e otite	Alimentos comuns: ovos brancos, leite, trigo, soja; ácaros da poeira doméstica (*Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*)
Acima de 3 ou 4	Rinite, chiado asmatiforme, asma	Inalantes perenes comuns: ácaros da poeira doméstica, gatos ou cães, baratas, *Alternaria tenuis*
Acima de 3 ou 4	Rinite, chiado asmatiforme, asma com exacerbações sazonais	Inalantes perenes comuns: os mesmos do item anterior, acrescidos de inalantes de pólen (polens de árvores, grama ou erva daninha)

que os níveis de anticorpos IgE contra inalantes sazonais variam de acordo com as estações do ano. Portanto, a realização desses testes de detecção de anticorpos IgE contra inalantes de pólen é praticamente inútil quando os alérgenos estão ausentes no meio ambiente, uma vez que os resultados poderão ser falsamente negativos. O teste de detecção de anticorpos IgE utilizando múltiplos alérgenos é eficiente como método de triagem para detecção da presença de anticorpos IgE contra alérgenos de pólen. Um resultado positivo indica a presença de anticorpos IgE contra ao menos um dos alérgenos presentes no imunossorvente, embora seja inespecífico para um dado alérgeno em particular. Desse modo, um resultado positivo é útil para identificar pacientes que poderiam ser beneficiados pela realização de mais testes empregando alérgenos reagentes individuais.

No caso de indivíduos adultos que apresentam rinite alérgica ou asma alérgica (extrínseca), os testes de detecção de anticorpos IgE são confiáveis para identificação de sensibilidade a todas as classes de alérgenos. As sensibilidades mais comuns são contra aeroalérgenos comuns, incluindo ácaros de poeira, barata, epitélios animais, esporos de mofo, alérgenos de pólen e alérgenos de poeira orgânica (Hamilton, 2004). O teste é indicado para casos em que há probabilidade de os resultados influenciarem a escolha da modalidade de tratamento (Gendo, 2004). Em adultos com suspeita de rinite alérgica, o teste de detecção de anticorpo IgE tem maior utilidade para estabelecimento do diagnóstico, quando a probabilidade pré-teste de doença é relativamente baixa (inferior a 30%). Esses pacientes tipicamente não apresentam achados clínicos com forte indício de etiologia alérgica. Nessa situação, resultados de teste positivos aumentam bastante a probabilidade pós-teste de doença diante dos aeroalérgenos mais comuns, incluindo epitélios animais, bolores e polens. Entre os pacientes com história clínica significativa (sintomas nasais proeminentes e reações desencadeadas por alérgenos), é menos provável que o teste seja útil e muitas vezes há indicação de tratamento empírico. Resultados de vários estudos indicam que os testes cutâneos e os testes de detecção de anticorpos IgE de segunda geração apresentam utilidade clínica essencialmente equivalente para pacientes adultos com rinite alérgica, sendo que qualquer um desses dois testes pode ser utilizado para identificar alérgenos a serem incluídos em regimes de imunoterapia (Gendo, 2004). A adoção da imunoterapia com alérgenos para tratamento de pacientes adultos asmáticos é mais controversa, pois apenas alguns estudos comprovaram nitidamente sua eficácia. A decisão de realizar o teste de detecção de anticorpos IgE para adultos asmáticos deve ser considerada caso a caso, sendo mais provável que o teste seja útil para pacientes apresentando reações desencadeadas por alérgenos evidentes ou submetidos à exposição ocupacional a alérgenos exclusivos.

Novos tratamentos farmacológicos para doenças alérgicas foram disponibilizados nos últimos anos. Em particular, o tratamento da asma alérgica severa foi influenciado pela introdução da farmacoterapia anti-IgE (Busse, 2001; Soler, 2001; Lanier, 2003). Os fármacos anti-IgE são anticorpos monoclonais humanizados dirigidos contra a IgE, que se ligam à cadeia pesada ε e inibem a ligação dos anticorpos IgE aos receptores correspondentes localizados nos mastócitos. Ao interferirem na ligação dos anticorpos IgE às células efetoras, os anticorpos anti-IgE efetivamente bloqueiam a liberação de mediadores inflamatórios resultante da exposição ao alérgeno. Resultados de estudos clínicos da farmacoterapia da asma apontaram a redução das taxas de exacerbação da doença e dos requerimentos de fármacos corticosteroides pelos pacientes tratados (Soler, 2001; Lanier, 2003).

Para o médico poder tratar um paciente utilizando anticorpos anti-IgE, é necessário relatar que o paciente possui anticorpos IgE contra aeroalérgenos perenes e níveis basais elevados de IgE sérica (30–700 kU/L). Os anticorpos anti-IgE também foram testados com sucesso em pacientes alérgicos ao amendoim e naqueles com rinite alérgica severa.

Como já mencionado, a disponibilidade de ensaios quantitativos para anticorpos IgE estendeu a utilidade desse teste a diversas aplicações clínicas (Yunginger, 2000). Uma dessas áreas constitui a avaliação da hipersensibilidade a alérgenos alimentares. A quantificação dos anticorpos IgE é indicada para avaliar pacientes que apresentam sintomas induzidos por alimentos com efeitos sobre diversos órgãos terminais, incluindo pele, trato gastrintestinal, vias aéreas, além de reatividade sistêmica. O padrão-ouro para determinação da hipersensibilidade a um dado alérgeno alimentar é o método da provocação com alimento placebo-controlado duplo-cego. Dados recentes indicam que os níveis de anticorpos IgE podem ser utilizados para predizer as respostas à provocação com vários alimentos comuns (Fig. 53.5). Tais resultados definem os níveis de anticorpos IgE abaixo dos quais a probabilidade de obtenção de um resultado negativo excede 95%, e acima dos quais uma provocação se torna desnecessária. Tentativas similares de definir valores de corte para níveis de IgE preditivos da reatividade aos aeroalérgenos inalantes falharam em definir níveis que pudessem ser utilizados em diferentes situações práticas (Soderstrom, 2003).

O teste de detecção de anticorpos IgE tem utilidade diagnóstica para casos com suspeita de sensibilidade ao(s) veneno(s) dos himenópteros. Indivíduos sensíveis ao veneno de abelhas, vespas amarelas, vespões ou marimbondos podem manifestar sinais de anafilaxia após sofrerem uma picada, bem como urticária, angioedema, broncoespasmo ou colapso vascular. A taxa de mortalidade relatada para casos de reação sistêmica induzida por picadas de inseto é de 30 a 40 casos por ano, contudo, é provável que esse valor subestime a incidência real. A história natural da sensibilidade a venenos não tratada ainda é conhecida apenas parcialmente. Em diversos casos de pacientes que apresentam sensibilidade anafilática comprovada, é possível desencadear uma história clínica de reações progressivamente mais graves a episódios de picadas sucessivos. Por outro lado, a sensibilidade ao veneno parece melhorar espontaneamente em alguns indivíduos. A decisão de tratar um paciente utilizando imunoterapia com veneno baseia-se na avaliação clínica do risco de anafilaxia diante de possíveis picadas futuras.

O indicador mais confiável de sensibilidade a venenos é a resposta a um desafio em que o paciente é deliberadamente picado. No entanto, esse teste não é amplamente realizado, sendo necessário apenas em raras ocasiões, para estabelecer o diagnóstico de sensibilidade a venenos em casos de paciente sem tratamento prévio. Os testes cutâneos com veneno e os testes para detecção de anticorpos IgE são úteis para confirmar a impressão clínica de sensibilidade a venenos, bem como para definir sua especificidade. Estudos comparativos apontam o teste cutâneo como uma modalidade diagnóstica mais sensível, sendo que cerca de 80% dos pacientes com teste cutâneo positivo apresentam níveis elevados de anticorpos IgE específicos para o veneno (Golden, 2003). Os testes de detecção de anticorpos IgE utilizando veneno são úteis sobretudo para confirmar os resultados dos testes cutâneos, definir a especificidade do alérgeno da hipersensibilidade a venenos e, em pacientes seletos, identificar a sensibilidade ao veneno diante de uma história clínica positiva não confirmada por teste cutâneo com inoculação de veneno por via intradérmica (Golden, 2003).

Com exceção do desafio da picada, não há testes *in vitro* ou *in vivo* capazes de predizer com segurança a resposta clínica à picada de um inseto em um paciente tratado, após a imunoterapia com veneno. Embora os níveis séricos de anticorpos IgG aumentem de forma marcante em decorrência da imunoterapia com veneno, ainda não foi definido nenhum valor de corte que pudesse ser utilizado para identificar pacientes fora de risco. As estimativas semiquantitativas dos níveis de anticorpos IgG não têm utilidade clínica, enquanto os níveis de anticorpos IgE após o tratamento não apresentam correlação consistente

com o estado clínico. A decisão de interromper a imunoterapia com veneno é tomada com base em estudos clínicos, que revelam elevadas taxas de proteção decorridos aproximadamente 3 anos de tratamento (Yunginger, 1998).

A quantificação de anticorpos IgE também foi aplicada ao diagnóstico da alergia farmacológica. Embora diversos fármacos e seus metabólitos sejam capazes de desencadear a síntese de anticorpos, existem dados clínicos e resultados de quantificações de anticorpos IgE disponíveis apenas para as penicilinas e metabólitos correspondentes, bem como para certos fármacos polipeptídicos, como a insulina. A penicilina e seu isômero – o ácido penicilânico – se combinam a proteínas séricas via ligações amida para dar origem a porções alérgicas: peniciloil-proteína e proteína-ácido penicilênico, respectivamente conhecidas como determinantes antigênicos maior e menor (Fig. 53.6). Níveis quantificáveis de anticorpos IgM e IgG específicos para o determinante peniciloil são comuns em pacientes tratados com penicilina. Todavia, ainda que títulos elevados desses anticorpos persistam no plasma durante períodos relativamente curtos, títulos mais baixos com frequência podem ser detectados anos após o tratamento (Shepherd, 1991).

O diagnóstico de hipersensibilidade à penicilina baseia-se no teste cutâneo utilizando penicilina, peniciloil-polilisina e uma mistura antigênica minoritária. Testes cutâneos com resultados positivos são pouco frequentes, em especial quando o feitos de forma remota, após o tratamento com penicilina. Menos de 30% dos pacientes com prováveis histórias de hipersensibilidade imediata à penicilina apresentam resultados positivos no teste cutâneo, enquanto as reações de hipersensibilidade imediata à terapia com penicilina raramente ocorrem em pacientes com resultados negativos de teste cutâneo. Adotando os resultados dos testes cutâneos como referência diagnóstica, estudos clínicos relataram a detecção de anticorpos IgE quantificáveis dirigidos contra o determinante peniciloil em quase 100% dos pacientes com resultados positivos de teste cutâneo. Anticorpos antipeniciloil não foram detectados nos indivíduos do grupo controle. Com base nesses dados, é razoável recomendar a realização de testes *in vitro* para detecção de anticorpos IgE antipeniciloil apenas para pacientes com história recente de reações de hipersensibilidade. É possível que ocorram resultados falso-negativos imediatamente após as reações mediadas por IgE. Além disso, apesar de a maioria dos dados publicados indicar que resultados falso-negativos são raros, a ausência de anticorpos específicos contra a peniciloil-polilisina não exclui totalmente a possibilidade de haver anticorpos IgE de importância clínica dirigidos contra outros metabólitos da penicilina (Weiss, 1988).

As doenças alérgicas, em particular a asma, podem ser causadas por uma ampla variedade de alérgenos encontrados no ambiente de trabalho. A asma pode ser o resultado de mecanismos alérgicos e não alérgicos. A lista de agentes etiológicos associados à asma ocupacional alérgica é longa e inclui: proteínas animais, enzimas, proteínas vegetais, legumes, anidridos, sais metálicos, corantes, isocianatos e pó de madeira. Existem testes de detecção de anticorpos IgE disponíveis para vários desses alérgenos.

Recentemente, enfatizou-se o látex da borracha natural como alérgeno presente no cenário da prestação de assistência à saúde, tanto no meio de trabalho quanto em certos pacientes (p. ex., pacientes com espinha bífida, que foram submetidos a vários procedimentos cirúrgicos). O látex da borracha natural é um alérgeno complexo que contém vários alérgenos proteicos. O teste de detecção de anticorpos IgE antilátex é útil para identificar indivíduos sensibilizados. Cerca de 90% dos pacientes com resultado positivo de teste cutâneo apresentam níveis detectáveis de anticorpos IgE contra os alérgenos do látex (Hamilton, 2003).

Concluindo essa seção, sobre o teste de detecção de anticorpos IgE, convém resumir alguns dos principais pontos abordados anteriormente. A quantificação dos anticorpos IgE é útil e pode ser recomendada nas seguintes situações clínicas: 1) avaliação de crianças com significativa história familiar de doença alérgica, que estejam apresentado sinais clínicos da doença; 2) avaliação de crianças e adultos com suspeita de doença respiratória alérgica, com o objetivo de estabelecer o diagnóstico e definir a especificidade relativa ao alérgeno da sensibilidade a polens, poeira, antígenos fúngicos e alimentos; 3) confirmar a expressão clínica de sensibilidade a alimentos em pacientes com sensibilidade anafilática

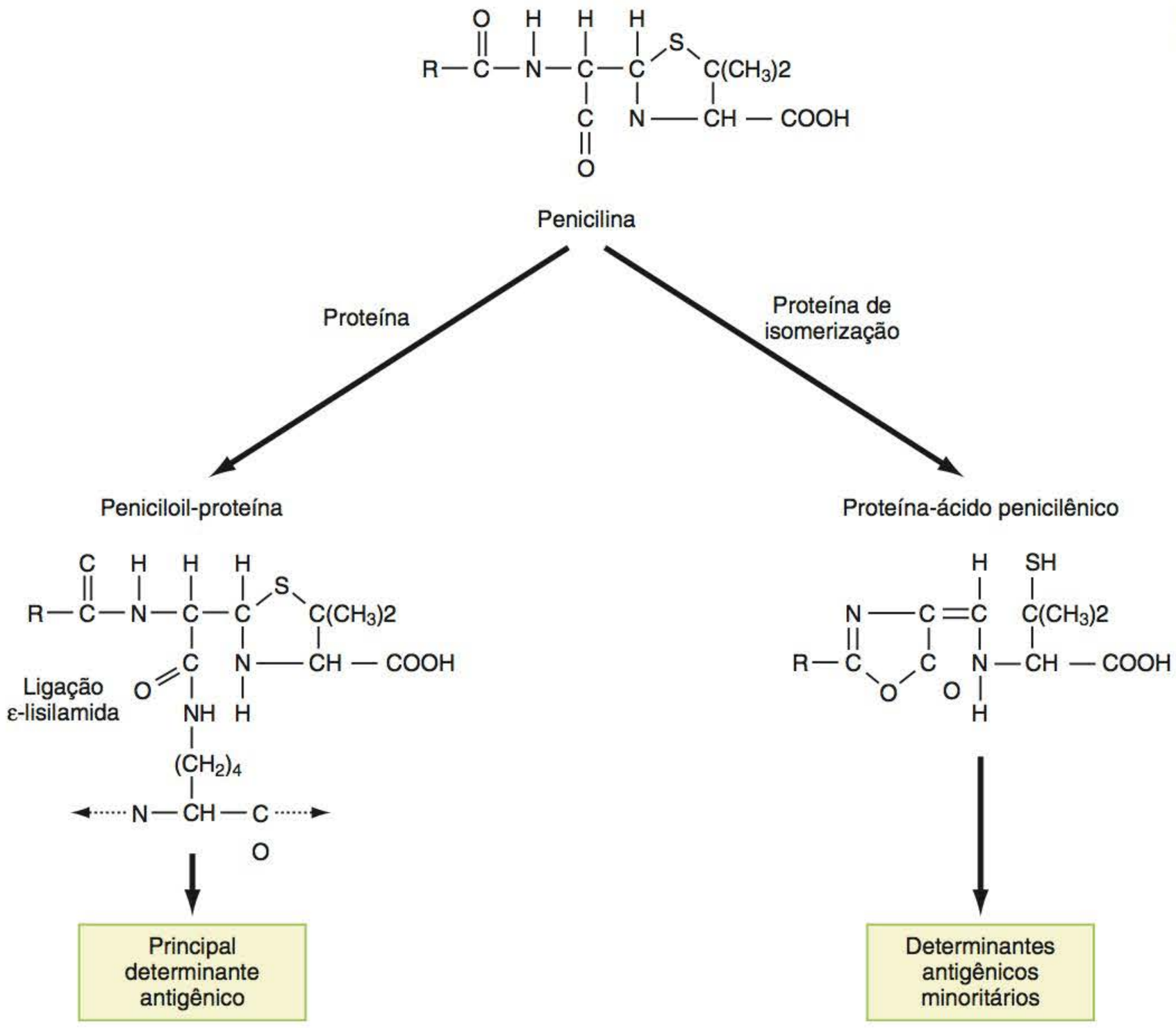


Figura 53.6 Alérgenos derivados da penicilina.

ou asma, angioedema ou doença cutânea; 4) avaliar a sensibilidade a alérgenos do veneno de insetos, em particular como ferramenta de auxílio para identificação da especificidade referente ao veneno diante de resultados equivocados de teste cutâneo; 5) confirmar o diagnóstico de hipersensibilidade à penicilina para pacientes com sensibilidade anafilática; e 6) confirmar a presença de anticorpos IgE contra certos alérgenos ocupacionais (p. ex., látex da borracha natural). O teste de detecção de anticorpos IgE não serve para avaliar os efeitos da imunoterapia nem para excluir o diagnóstico de sensibilidade anafilática a venenos de inseto no caso de pacientes tratados. O teste de detecção de anticorpos IgE é indicado apenas para pacientes dos quais tenha sido obtida uma completa história médica e exame físico.

Testes para detecção de mediadores de reações de hipersensibilidade imediata

Conforme já observado, há certo número de mediadores envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata, tais como histamina, triptase, cisteinil leucotrienos e PGD_2. Cada um desses mediadores promove inflamação nas doenças alérgicas humanas ou em modelos animais de alergia e anafilaxia. Esses mediadores induzem vários dos efeitos biológicos característicos das reações alérgicas. Apesar desses achados, a quantificação de mediadores nos líquidos corporais apresenta limitada utilidade clínica para o diagnóstico diferencial das doenças alérgicas. A quantificação de histamina no plasma ou na urina pode ser valiosa no caso de pacientes com anafilaxia, quando os testes são realizados imediatamente após um episódio anafilático (Friedman, 1989), mesmo assim é preciso ter o cuidado de obter amostras adequadas. A hemólise pode produzir resultados de níveis de histamina falsamente elevados no sangue, enquanto alimentos ricos em histamina ou colonização bacteriana podem promover um falso aumento dos níveis urinários. Em tais condições clínicas, um teste considerado mais útil é a quantificação de triptase em amostras de sangue (Schwartz, 1987, 1989). Após o episódio anafilático, os níveis sanguíneos de triptase aumentam rapidamente (30 minutos a 1 hora) e permanecem altos por até 12 horas. Em comparação, a histamina é depurada rapidamente do sangue, onde apresenta uma meia-vida de alguns minutos. Os LTs são ativos ao nível local e estão presentes em concentrações mínimas nos líquidos corporais. Os LTs raramente são quantificados no sangue para a determinação do diagnóstico de doença alérgica.

Referências bibliográficas

Bennich H, Ishizaka K, Ishizaka T, et al: A comparative antigenic study of gamma E-globulin and myeloma-IgND. J Immunol 1969; 102:826–831.

Bernstein DI, Biagini RE, Karnani R, et al: In vivo sensitization to purified *Hevea brasiliensis* proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex. J Allergy Clin Immunol 2003; 111:610–616.

Buckley R: Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis. Immunol Rev 1978; 41:288.

Busse W, Corren J, Lanier BQ, et al: Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 108:184–90.

Este artigo revisa as indicações clínicas do uso da terapia anti-IgE e apresenta os resultados dos estudos clínicos iniciais sobre essa nova modalidade de tratamento.

Cairns JA, Walls AF: Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. J Immunol 1996; 156:275–83.

Church MK, Shute JK, Sampson HA: Mast cell-derived mediators. *In* Adkinson NF, Yunginger JW, Busse W, et al (eds): Middleton's Allergy Principles & Practice. St Louis, MO, Mosby 2003, pp 189–212.

Este capítulo revisa os mediadores inflamatórios de mastócitos e seus papéis na inflamação alérgica.

Coico R, Sunshine G, Benjamini E: The genetic basis of antibody structure. *In* Immunology: A Short Course. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, 2003; 79–89.

Defrance T, Carayon P, Billian G, et al: Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. J Exp Med 1994; 179:135–143.

Demoly P, Francois-Bernard M, Bousquet J: In vivo methods for study of allergy skin tests, techniques, and interpretation. *In* Middleton E, Reed C, Ellis E, et al. Allergy Principles & Practice. St Louis, MO, Mosby/Year Book, 1998, vol 1, pp 430–439.

De Weck A: Cellular allergen stimulation test (CAST): a new dimension in allergy diagnostics. ACI News 1993; 1/5:9–14.

Downs SH, Marks GB, Sporik R, et al: Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. Arch Dis Child 2001; 84:20–23.

Ewan PW, Coote D: Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. Allergy 1990; 45:22–29.

Findlay SR, Barden JM, Easley CB, et al: Effect of the oral leukotriene antagonist, ICI 204,219, on antigen-induced bronchoconstriction in subjects with asthma. J Allergy Clin Immunol 1992; 89:1040–1045.

Friedman B, Steinberg S, Meggs W, et al: Analysis of plasma histamine levels in patients with mast cell disorders. Am J Med 1989; 87:649.

Galli SJ: New insights into 'the riddle of the mast cells': microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. Lab Invest 1990; 62:5–33.

Gendo K, Larson EB: Evidence-based diagnostic strategies for evaluating suspected allergic rhinitis. Ann Intern Med 2004; 140:278–289.

Este artigo é uma metanálise de estudos que comparam métodos diagnósticos in vitro *e* in vivo *na avaliação de pacientes com alergias respiratórias.*

Gether U: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocr Rev 2000; 21:90–113.

Golden DB, Tracy JM, Freeman TM, et al: Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. J Allergy Clin Immunol 2003; 112:495–498.

Hamilton RG, Franklin Adkinson N, Jr: In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. J Allergy Clin Immunol 2004; 114:213–225; quiz 226.

Este artigo é uma revisão abrangente sobre a evolução e o desempenho de ensaios in vitro *para anticorpos IgE.*

Hamilton RG, Rossi C, Yeang H, et al: Latex specific IgE assay sensitivity enhanced using Hev b 5 enriched latex allergosorbent. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(Suppl): S174.

Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, et al: The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. N Engl J Med 1997; 337:1720–1725.

Hizawa N, Collins G, Rafnar T, et al: Linkage analysis of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). J Allergy Clin Immunol 1998; 102:4418.

Homburger HA: Methods in laboratory immunology. *In* Middleton E, Reed C, Ellis E, et al. Allergy Principles & Practice. St Louis, MO, Mosby/Year Book, 1998, vol 1, pp 417–429.

Host A, Andrae S, Charkin S, et al: Allergy testing in children: why, who, when and how? Eur J Allergy Clin Immunol 2003; 58:1–11.

Excelente revisão sobre doenças alérgicas em crianças. Este artigo apresenta as recomendações de consenso de sociedades de alergia europeias para avaliação de crianças com suspeita de doenças alérgicas.

Irani A, Schecter N, Craig S: Two types of mast cells that have distinct neutral protease compositions. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 82:1214–1218.

Ishizaka K, Ishizaka T: Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA- or gammaG-globulin. J Allergy 1966; 37:169–185.

Ishizaka K, Ishizaka T, Menzel AE: Physicochemical properties of reaginic antibody. VI. Effect of heat on gamma-E-, gamma-G- and gamma-A-antibodies in the sera of ragweed sensitive patients. J Immunol 1967; 99:610–618.

Iwamoto I, Yamazaki H, Kimura A, et al: [A novel liquid--phase enzyme immunoassay AlaSTAT for IgE antibody determination]. Arerugi 1990; 39:1374–1379.

Kjellman NI, Croner S: Cord blood IgE determination for allergy prediction–a follow-up to seven years of age in 1,651 children. Ann Allergy 1984; 53:167–171.

Klink M, Cline MG, Halonen M, et al: Problems in defining normal limits for serum IgE. J Allergy Clin Immunol 1990; 85:440–444.

Korthauer U, Graf D, Mages HW, et al: Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature 1993; 361: 539–541.

Lanier B, Corren W, Lumry J, et al: Omalizumab is effective in the long-term control of severe allergic asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 2003; 1:154–159.

Lara-Marquez ML, Yunis JJ, Layrisse Z, et al: Immunogenetics of atopic asthma: association of DRB1*1101 DQA1*0501 DQB1*0301 haplotype with *Dermatophagoides* spp.-sensitive asthma in a sample of the Venezuelan population. Clin Exp Allergy 1999; 29:60–71.

Maly F, Marti-Wyss S, Blumber S, et al: Mononuclear blood cell sulpholeukotriene generation in the presence of interleukin 3 and whole blood histamine release in honeybee and yellow jacket venom allergy. J Invest Allergy Clin Immunol 1997; 7:217–224.

Martinez FD, Holberg CJ, Halonen M, et al: Evidence for Mendelian inheritance of serum IgE levels in Hispanic and non-Hispanic white families. Am J Hum Genet 1994; 55:555–565.

Miller JS, Moxley G, Schwartz LB: Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase. J Clin Invest 1990; 86:864–870.

Nickel R, Kulig M, Forster J, et al: Sensitization to hen's egg at the age of twelve months is predictive for allergic sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years. J Allergy Clin Immunol 1997; 99:613–617.

Nolte H: The clinical utility of basophil histamine release. Allergy Proc 1993; 14:251–254.

Ober C, Cox NJ, Abney M, et al: Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Hum Mol Genet 1998; 7:1393–1398.

Oettgen HC, Geha RS: IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:429–440.

Este artigo apresenta uma revisão abrangente sobre a imunobiologia da síntese de IgE.

Ono SJ: Molecular genetics of allergic diseases. Annu Rev Immunol 2000; 18:347–366.

Este artigo revisa estudos básicos e clínicos sobre genes associados a doenças alérgicas.

Ownby DR, Anderson JA, Jacob GL, et al: Development and comparative evaluation of a multiple-antigen RAST as a screening test for inhalant allergy. J Allergy Clin Immunol 1984; 73:466–472.

Palmer-Crocker RL, Hughes CC, Pober JS: IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured

human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain. J Clin Invest 1996; 98:604–609.
Petersen LJ, Church MK, Skov PS: Histamine is released in the wheal but not the flare following challenge of human skin in vivo: a microdialysis study. Clin Exp Allergy 1997; 27:284–295.
Pieters J: MHC class II-restricted antigen processing and presentation. Adv Immunol 2000; 75:159–208.
Platts-Mills TA: Allergen avoidance in the treatment of asthma and rhinitis. N Engl J Med 2003; 349:207–208.
Ravetech J, Kinet J: Fc receptors. Ann Rev Immunol 1991; 9:457.
Sampson HA: Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:891–896.
Trata-se de um artigo clínico que discute o uso dos níveis de anticorpos IgE para prever as respostas a desafios com alimentos, controlados com placebo e duplo-cegos. Os níveis de decisão são apresentados para vários alérgenos alimentares comuns.
Sampson HA, Ho DG: Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. J Allergy Clin Immunol 1997; 100:444–451.
Sandford AJ, Moffatt MF, Daniels SE, et al: A genetic map of chromosome 11q, including the atopy locus. Eur J Hum Genet 1995; 3:188–194.
Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF: Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. J Biol Chem 1981; 256:11939–11943.
Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, et al: Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. N Engl J Med 1987; 316:1622–1626.
Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, et al: Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. J Clin Invest 1989; 83:1551–1555.
Shepherd G: Allergy to β-lactam antibiotics. Immunol Allergy Clin North Am 1991; 11:611.
Sibbald B, Horn ME, Brain EA, et al: Genetic factors in childhood asthma. Thorax 1980; 35:671–674.
Sly RM: Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 1999; 82:233–248; quiz 248–252.
Soderstrom L, Kober A, Ahlstedt S, et al: A further evaluation of the clinical use of specific IgE antibody testing in allergic diseases. Allergy 2003; 58:921–928.
Soler M, Matz J, Townley R, et al: The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. Eur Respir J 2001; 18:254–261.
Taylor B, Broom BC: Atopy in medical students. Ann Allergy 1981; 47:197–199.
Vercelli D, Jabara HH, Arai K, et al: Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. J Exp Med 1989; 169:1295–1307.
Wahn U: Allergic factors associated with the development of asthma and the influence of cetirizine in a double-blind, randomised, placebo-controlled trial: first results of ETAC. Early Treatment of the Atopic Child. Pediatr Allergy Immunol 1998; 9:116–124.
Este artigo revisa o desenvolvimento das doenças alérgicas de acordo com a idade em crianças que apresentam predisposição hereditária à atopia. Discute-se a eficácia do tratamento precoce da criança alérgica.
Wahn U: What drives the allergic march? Allergy 2000; 55:591–599.
O artigo discute a conhecida marcha alérgica. Este conceito é importante para compreender o desenvolvimento de doenças alérgicas com a idade em crianças e a sensibilização sequencial a alérgenos de diferentes classes, incluindo alimentos, inalatórios perenes e inalatórios sazonais.
Wang JH, Reinherz EL: Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. Mol Immunol 2002; 38:1039–1049.
Wank SA, DeLisi C, Metzger H: Analysis of the rate-limiting step in a ligand–cell receptor interaction: the immunoglobulin E system. Biochemistry 1983; 22:954–9.
Weiss KB, Sullivan SD: The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:3–8.
Weiss ME, Adkinson NF: Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. Clin Allergy 1988; 18:515–540.
Wess J: G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. FASEB J 1997; 11:346–354.
Wide L, Bennich H, Johansson SG: Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. Lancet 1967; 2: 1105–1107.
Yunginger JW: Insect Allergy. *In* Middleton E, Reed C, Ellis E, et al. Allergy Principles & Practice. St Louis, MO, Mosby/Year Book, 1998, vol 2, pp 1063–1072.
Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA, et al: Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 1077–1084.
Este artigo revisa técnicas quantitativas para medir os níveis de anticorpos IgE, incluindo métodos in vivo *e* in vitro. *É revisado o uso de medidas quantitativas no diagnóstico e supervisão de pacientes com doenças alérgicas.*

PARTE VII

Microbiologia médica

Editado por

Gail L. Woods MD, Richard A. McPherson MD

CAPÍTULO 54

Infecções virais

Michael Costello PhD, Margaret Yungbluth MD

Introdução 1112
Cultura viral 1112
Detecção de antígeno viral e detecção molecular 1114
Sorologia viral 1115
Coleta e transporte de amostra 1116
Equipamentos e suprimentos 1117
Síndromes infecciosas virais clínicas 1117
Infecções herpéticas mucocutâneas 1117
Orientação para a coleta e manipulação de amostras 1117
Isolamento do vírus herpes simples em cultura celular 1117
Detecção direta do vírus herpes simples 1119
Diagnóstico sorológico 1119
Infecções virais do trato respiratório 1119
Influenza 1119
Bronquiolite por vírus sincicial respiratório 1120
Crupe 1120
Metapneumovírus 1120
Coleta de amostra 1120
Ensaio de antígeno viral 1121
Isolamento viral 1122
Mononucleose infecciosa e infecções relacionadas 1122
Diagnóstico sorológico 1123
Mononucleose infecciosa heterófila negativa 1124
Síndrome da fadiga crônica 1124
Infecções virais congênitas e perinatais 1124
Citomegalovírus 1125
Rubéola 1125
Vírus herpes simples 1125
Vírus da imunodeficiência humana, parvovírus, enterovírus e vírus da hepatite B 1127
Meningite e encefalite viral 1127
Diagnóstico laboratorial 1128
Exantemas e doenças cutâneas virais comuns 1128
Gastroenterite viral 1131
Diagnóstico laboratorial 1131
Hepatite viral e infecção retroviral 1131
Infecções pelo retrovírus e pelo vírus da imunodeficiência humana 1132
Infecções virais em hospedeiros imunocomprometidos 1134
Referências bibliográficas 1135
Sites e endereços de e-mail 1138

PONTOS-CHAVE

- Vírus são as causas mais frequentes de doenças infecciosas humanas e produzem doenças que variam de resfriados banais e um imunocomprometimento fatal e infecções oportunistas.
- O isolamento viral em cultura celular e a identificação de antígeno viral são comumente realizados em laboratórios hospitalares para o diagnóstico de infecções virais genitais e mucocutâneas, respiratórias, gastrintestinais, do sistema nervoso central e disseminadas. Métodos moleculares sofisticados vêm se tornando mais comuns no diagnóstico de rotina.
- O diagnóstico viral acurado é fundamental para o tratamento ideal do paciente – para o uso razoável de drogas antivirais, redução da realização de exames laboratoriais desnecessários e terapia antimicrobiana inadequada, e para a aplicação de procedimentos de controle de infecção – e para o controle de epidemias pelos serviços de saúde pública.
- Muitos vírus comuns crescem *in vitro* em cultura celular, utilizando linhagens celulares primárias diploides ou heteroploides. O crescimento, usualmente, é detectado por alterações citopáticas que ocorrem na monocamada da cultura celular ou pela detecção de antígeno viral nas células com anticorpos específicos fluorescentes. Alguns vírus importunos somente se propagam em tecido de camundongo recém-nascido ou de ovo embrionado. Alguns vírus não crescem em nenhum sistema de cultura.
- A técnica de cultura *shell vial* utiliza a monocamada celular em um frasco cheio com meio de cultura. A amostra é inoculada por centrifugação na superfície celular. Após curta incubação (1 a 3 dias), a monocamada é corada com anticorpo viral específico marcado com fluoresceína. Esse método é utilizado para a identificação precoce do vírus herpes simples (HSV), citomegalovírus (CMV), varicela zoster vírus (VZV), vírus respiratórios e enterovírus.
- Sistemas de cultura híbridos utilizam duas linhagens celulares na mesma lamela do *shell vial*. Essa mistura aumenta e simplifica a recuperação de vírus respiratórios comuns (influenza, parainfluenza, vírus sincicial respiratório [RSV[e adenovírus), enterovírus e HSV/HZV.
- Testes de hibridização do ácido nucleico e amplificação do ácido nucleico (NAAT) detectam vírus por meio do reconhecimento de segmentos específicos do DNA ou do RNA do genoma viral. A hibridização *in situ* é uma técnica direta com sonda para a detecção do papilomavírus humano (HPV), CMV, HSV e parvovírus B19 no tecido. A sua especificidade é alta, mas a sua sensibilidade é abaixo da ideal.
- NAATs como a reação em cadeia da polimerase, amplificação por deslocamento de fita e amplificação baseada na sequência do ácido nucleico, aumentaram a sensibilidade do diagnóstico molecular além da cultura ou dos métodos de detecção de antígeno.
- A visualização direta de partículas virais pela microscopia eletrônica pode identificar características morfológicas exclusivas de vários agentes da gastroenterite viral (p. ex., rotavírus, adenovírus entérico, norovírus, astrovírus e calicivírus). Nenhum desses vírus replica em linhagens de cultura celular padrão.
- A sorologia viral possui duas aplicações principais: diagnóstico de infecção recente e determinação de imunidade. A demonstração de anticorpo IgM específico durante a doença aguda ou aumento de 4 vezes do anticorpo IgG entre o soro da fase aguda e o da fase de convalescença indica infecção aguda. A sorologia é particularmente útil quando a cultura e a pesquisa de antígeno não estiverem disponíveis ou não forem factíveis. A persistência de IgG específica é um marcador da condição imune para vários vírus (p. ex., sarampo, caxumba, VZV, hepatites A e B). Métodos imunoenzimáticos são sensíveis e amplamente utilizados.

Introdução

Vírus são as causas mais frequentes de doenças infecciosas humanas e são responsáveis por um espectro de enfermidades que vão do resfriado comum a um imunocomprometimento fatal decorrente da destruição de linfócitos T $CD4^+$ causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

A virologia evoluiu rapidamente da caracterização da morfologia viral pela microscopia eletrônica ao desenvolvimento de métodos de cultura celular para o desenvolvimento de vacina até a definição detalhada da bioquímica viral necessária para a terapia de engenharia antiviral.

Atualmente, existem procedimentos de cultura celular simples para isolamento de muitos vírus e técnicas moleculares sofisticadas de identificação viral e para a avaliação quantitativa da resposta à terapia. Tanto hospitais comunitários quanto universitários realizam, frequentemente, exames para a investigação de infecções virais respiratórias, do sistema nervoso central, gastrintestinais e disseminadas. O diagnóstico acurado e realizado no momento adequado é fundamental para o tratamento ideal do paciente, promoção do uso adequado de drogas antivirais, redução de exames desnecessários e uso supérfluo de antibióticos e implementação eficiente de precauções de enfermagem para limitar a disseminação nosocomial (Aitken, 2001). Benefícios adicionais do diagnóstico acurado incluem iniciativas centradas de controle e a prevenção da saúde pública para infecções causadas por influenza, HIV, arbovírus e enterovírus. Curiosamente, a falha na identificação de vírus tradicionais em epidemias aparentes levou à caracterização imediata pelos Centers for Disease Control and Prevention da meningoencefalite epidêmica causada pelo vírus *West Nile Virus* (WNV) e da variante do coronavírus responsável pela síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) grave.

Várias referências excelentes fornecem informações detalhadas sobre a taxonomia e a patogenicidade de vírus humanos (Fields, 2001; Murray, 2003). Este capítulo revisa as síndromes virais comuns que geram a maioria dos testes em um laboratório hospitalar típico. A organização e a equipe, equipamentos e suprimentos, coleta de amostra e seleção de teste são discutidos com o isolamento e métodos de investigação. A maioria dos hospitais apresenta uma variedade de infecções virais comuns em crianças e adultos saudáveis e imunocomprometidos justificando a existência de um serviço de virologia. A Tabela 54.1 apresenta um sumário de volumes de testes e de taxas de recuperação do Lutheran General Hospital, um hospital comunitário que dá assistência primária a adultos e crianças e possui serviço de obstetrícia de alto risco, neonatologia, hematologia-oncologia e para pacientes com HIV. Hospitais com diferentes perfis de especialidades médicas apresentam os mesmos vírus, com variações nas porcentagens relativas de isolamento. O tempo médio de detecção para a maioria dos vírus é comumente de 2 dias ou menos (mesma escala de tempo para as culturas bacterianas de rotina) e reflete o uso de ensaios rápidos de antígenos, culturas em *shell vial* com esquemas curtos de incubação e testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs). As taxas globais de recuperação de vírus são altas (16–23%), várias vezes superior a de culturas bacterianas de rotina de sangue ou fezes, culturas de micobactérias ou exames de ovos e parasitas (Costello, 1996). Muitos vírus comuns apresentam variações sazonais (Fig. 54.1). O vírus da influenza, o vírus sincicial respiratório e os vírus da parainfluenza 1 e 2 circulam a cada inverno. Infecções por adenovírus, vírus da parainfluenza 3 e herpes simples ocorrem durante todo o ano. A doença por enterovírus ocorre mais no final do verão e início do outono. Esses padrões temporais influenciam as necessidades da equipe laboratorial, sendo mais onerosas em hospitais pediátricos.

Tabela 54–1 Detecção viral para laboratórios hospitalares comunitários – porcentagem e tempos típicos de detecção (Lutheran General Hospital, Park Ridge, IL)

Vírus	% de Amostras Positivas 1995	1998	2004	Tempos típicos de detecção
Herpes simples	34	25	22	1–2 dias
Citomegalovírus	3	4	4	3 dias
Adenovírus	5	6	8	3 dias
Influenza A	6	11	9	2 dias
Enterovírus	8	7	10	4 dias
Varicela zoster	2	1	<1	3–5 dias
Influenza B	1	<1	4	2 dias
Parainfluenza	6	4	10	2 dias
Vírus sincicial respiratório	27	41	31	8–48 horas
Sarampo e parotidite	<1	0	0	5 dias
Total de amostras processadas	3.323	3.040	2.750	
Recuperação dos vírus	21%	23%	16%	

Existem três métodos laboratoriais diagnósticos principais para a detecção viral e cada um deles apresenta vantagens e limitações (Fig. 54.2). A cultura e a detecção de antígeno ou exigem vírus viável ou fragmentos virais relativamente intactos; amostras devem ser coletadas durante a replicação viral ativa. Os NAATs apresentam maior sensibilidade e, por causa da relativa estabilidade do DNA e do RNA, permite maior liberdade para a coleta. No entanto, sua interpretação pode ser mais difícil, pois a positividade pode persistir na fase de recuperação. Ensaios moleculares podem separar a infecção ativa da latente porque eles visam um componente do genoma viral que está replicando ativamente; o ensaio de reação da cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR, *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) para RNA específico do citomegalovírus (CMV) identifica a replicação viral ativa enquanto a PCR DNA-específica também é positiva na latência. O diagnóstico sorológico tradicional exige o soro dos estágios agudo e de convalescença da infecção para demonstrar um aumento significativo do título do anticorpo viral específico. A detecção de anticorpo IgM vírus-específico pode diagnosticar a doença aguda a partir de uma única amostra de soro obtida durante o período agudo ou o período inicial de convalescença. Testes de anticorpo IgG vírus-específico são tipicamente utilizados para documentar a condição imune.

Todos os materiais e reagentes necessários para o isolamento do vírus, ensaios de antígenos e procedimentos sorológicos são disponibilizados por fornecedores comerciais. O número de vírus que podem ser detectados ou quantificados pelo NAAT continua a aumentar e vários desses testes são produzidos comercialmente. Procedimentos desenvolvidos pelo próprio laboratório exigem uma considerável *expertise* técnica e todos os métodos moleculares demandam um controle de qualidade rigoroso para garantir a acurácia e para minimizar a contaminação. Apesar dessas restrições, os NAATs são particularmente úteis para a identificação de vírus que se propagam lentamente, ou não se propagam em culturas celulares, e a sua sensibilidade e acurácia quantitativa são superiores às dos procedimentos convencionais.

Cultura viral

A propagação do vírus em cultura de tecido foi desenvolvida há aproximadamente 50 anos. Ainda é um método diagnóstico versátil e abrangente. Muitos vírus importantes do ponto de vista clínico replicam *in vitro* e a recuperação do vírus correlaciona-se bem com a doença aguda, no entanto, a cultura é trabalhosa, exige proficiência técnica e significa pelo menos um dia para a obtenção de resultados positivos.

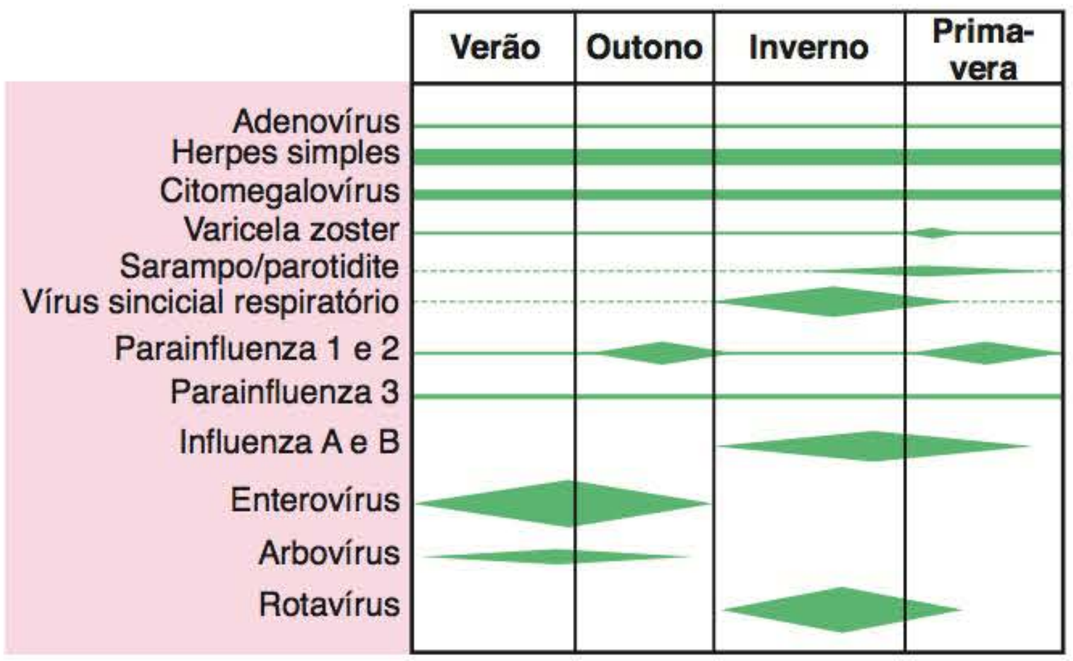


Figura 54.1 Variação sazonal de infecções virais.

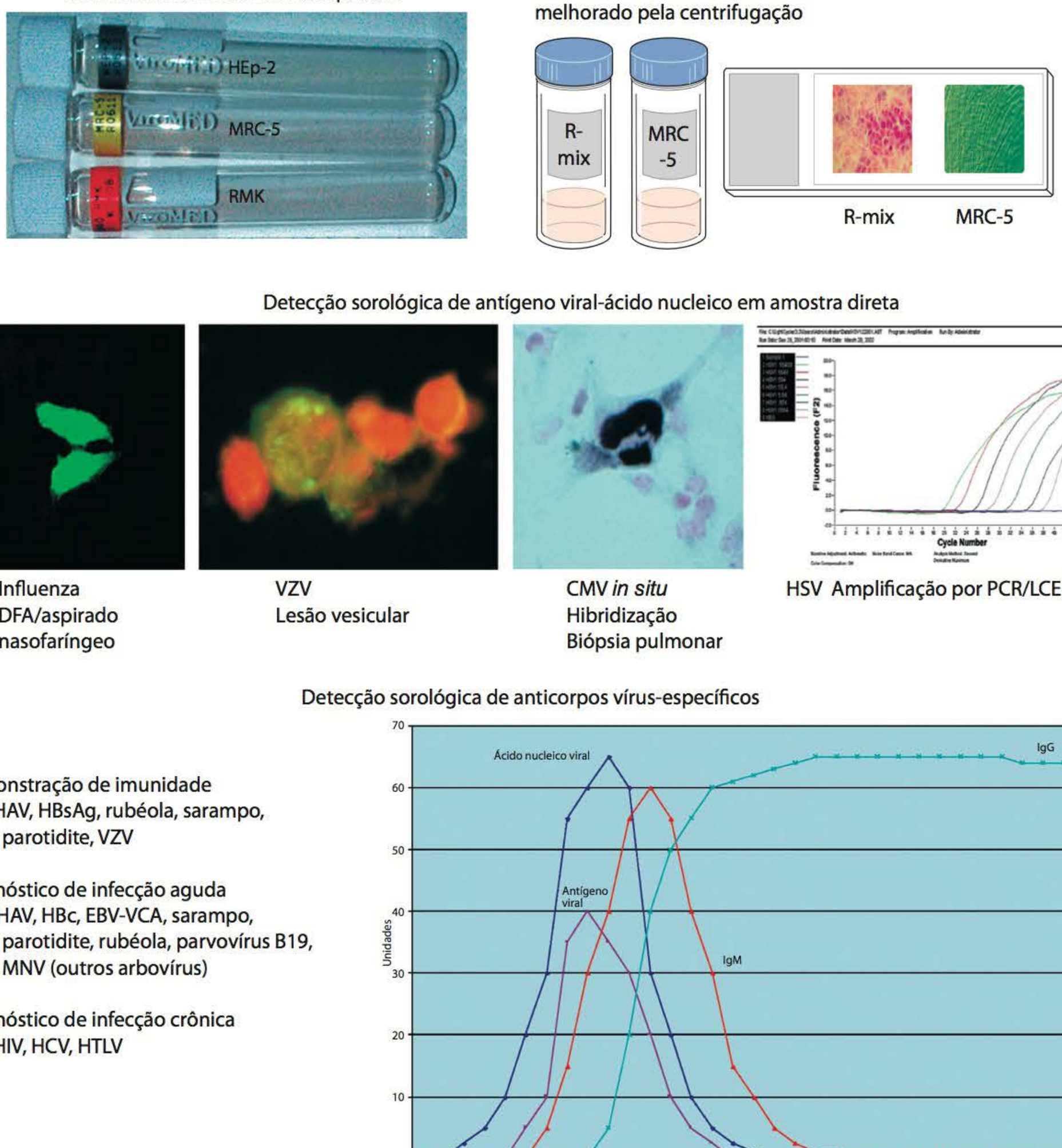


Figura 54.2 Métodos laboratoriais para o diagnóstico de infecções virais.

A replicação em camundongo recém-nascido ou em ovos embrionados pode ser essencial para alguns vírus raros, mas é raramente realizada fora de serviços de pesquisa (Nalonen, 1998). Células de cultura de tecido são divididas em três categorias: culturas de células primárias, linhagens celulares diploides e linhagens celulares heteroploides. Culturas de células primárias são preparadas diretamente a partir do órgão principal (p. ex., rim de macaco ou de coelho) por meio da picagem e tripsinização; a mistura é transferida para um tubo ou *shell vial*, onde as células se fixam e formam uma monocamada confluente sobre a superfície de vidro. O meio sobrenadante com sais inorgânicos isotônicos tamponados, glicose, aminoácidos, vitaminas e cofatores em um pH fisiológico sustenta a viabilidade celular. O meio essencial mínimo de Eagle em solução salina balanceada de Earl ou Hanks é um sistema nutriente versátil e é comumente suplementado com uma baixa concentração de soro bovino fetal rico em proteínas e pobre em imunoglobulinas para manter a monocamada saudável, sem, contudo, promover a proliferação celular. As linhagens de células diploides usualmente são fibroblastos diploides humanos (HDF, *human diploid fibroblasts*) derivados do pulmão ou do prepúcio do neonato, e a maioria das células apresentam um número de cromossomo diploide normal. As células são distribuídas em um meio de crescimento rico em soro e podem ser realizadas subculturas de 20 a 50 vezes. Os exemplos incluem MRC-5, WI-38 e fibroblastos do prepúcio. Linhagens celulares heteroploides são derivadas de tumores malignos e podem ser cultivadas indefinidamente. Elas são aneuploides e se dividem rapidamente. As linhagens heteroploides incluem HEp-2 (carcinoma de laringe), HeLa (carcinoma de colo de útero) e A549 (carcinoma de laringe).

Deve-se checar culturas primárias em busca de contaminação por vírus endógenos. As linhagens celulares diploides e heteroploides devem ser testadas periodicamente em busca de contaminação por *Mycoplasma* e sensibilidade persistente à infecção viral. Os fornecedores de células são responsáveis por esse controle de qualidade. Células "híbridas" são um novo conceito; a monocamada é uma mistura de dois tipos de células que juntas suportam o crescimento de uma ampla gama de vírus. O R-Mix contém A549 e células pulmonares de marta com adição de tripsina e recuperará os agentes respiratórios – vírus da

influenza e parainfluenza, vírus sincicial respiratório (VSR) e adenovírus. O E–Mix contém células das linhagens *buffalo green monkey* (de rim) e A549 para maximizar a recuperação de enterovírus. Os vírus apresentam alguma diferença no que diz respeito à sua capacidade de replicar em cultura, de modo que espécimes importantes devem ser inoculados em uma variedade de linhagens celulares para maximizar a recuperação. A Figura 54.3 mostra as preferências virais de algumas linhagens celulares comuns; todas estão disponíveis no comércio e podem ser fornecidas em tubos, *shell vials* ou frascos. Cada laboratório deve selecionar linhagens suficientes para cobrir os patógenos virais usuais em sua população de pacientes e pode variar o número e o tipo para suprir as demandas sazonais (Chapin, 2003; Clarke, 2004).

A replicação viral em tubo de monocamada é identificada pela inspeção da camada celular em um microscópio de contraste de fase invertido em busca de alterações citopáticas causadas pela proliferação viral. Os tubos com monocamada são versáteis: uma única linhagem celular pode suportar o crescimento de vários vírus, cada um produzindo efeitos citopáticos diferentes ou outras características identificadoras (hemaglutinação, hemadsorção, interferência). Os efeitos citopáticos podem ocorrer em 1 a 3 dias (HSV, *herpes simplex virus*) ou podem não ser reconhecidos por 5 a 20 dias (VSR, *varicella zoster virus* [VZV], CMV). Por essa razão, culturas podem ter sua incubação prolongada para 2 semanas ou mais. Com a técnica de *shell vial*, a camada celular está localizada em uma lâmina redonda, com a monocamada para o lado de cima, em um *shell vial*. A amostra é inoculada no frasco, o qual é centrifugado para aumentar a fixação viral à superfície celular. Após uma incubação de 1 a 3 dias, a monocamada é testada para o antígeno viral específico, usualmente com um corante de anticorpo fluorescente (Gleaves, 1985; Clarke, 2004). *Shell vials* são ideais para a identificação de um único vírus (HSV) ou número limitado de vírus (VSR e influenza) e para a detecção mais rápida de agentes de crescimento lento (p. ex., CMV e VZV). Lesões vesiculares genitais causadas por HSV são excelentes candidatas para a cultura em *shell vial*. A sua sensibilidade é de quase 100% em comparação à cultura tradicional em tubo e a virada para amostras negativas diminui de 1 semana para 1 dia. *Shell vials* são comparáveis ou superiores aos métodos com tubo para recuperação de CMV na urina, mas a cultura em tubo de *backup* é recomendada para maximizar a recuperação de CMV do sangue periférico, líquidos corporais e biópsias.

Detecção de antígeno viral e detecção molecular

A identificação rápida por métodos diretos é especialmente útil quando existe uma terapia antiviral específica (para HSV, VZV, CMV, influenza) disponível e quando o controle hospitalar é um fator (influenza, VSR, rotavírus e VZV). O antígeno viral é detectado com sensibilidade e especificidade comparáveis pelo imunoensaio direto com anticorpo fluorescente (DFA, *direct fluorescent antibody*) e imunoensaio enzimático (EIA, *enzyme immunoassay*). O DFA apresenta a vantagem da visualização microscópica do conteúdo celular da amostra, de modo que a adequação da amostra pode ser facilmente verificada (Rossier, 1989), no entanto, trata-se de um procedimento muito laborioso e sua realização não pode ser factível durante epidemias virais respiratórias sazonais com alta demanda de amostras. O EIA exige um julgamento interpretativo menos subjetivo do que o DFA, mas a avaliação automática da qualidade da amostra é perdida. O DFA é melhor realizado com um microscópio epifluorescente e controles positivos e negativos devem ser analisados rotineiramente. Muitos procedimentos de EIA foram elaborados para a testagem de uma única amostra com verificação de controles negativo e positivo incorporados em uma cassete de uso único. Métodos automatizados de EIA para a testagem em lote combinam os componentes de lavagem, de espectrofotometria e de processamento de dados em um sistema completo. Controles positivo e negativo são padrões em cada processamento e a leitura da amostra do paciente é interpretada utilizando um valor de *cut-off* estabelecido.

Testes de hibridização do ácido nucleico e de amplificação molecular detectam vírus reconhecendo segmentos específicos do genoma do

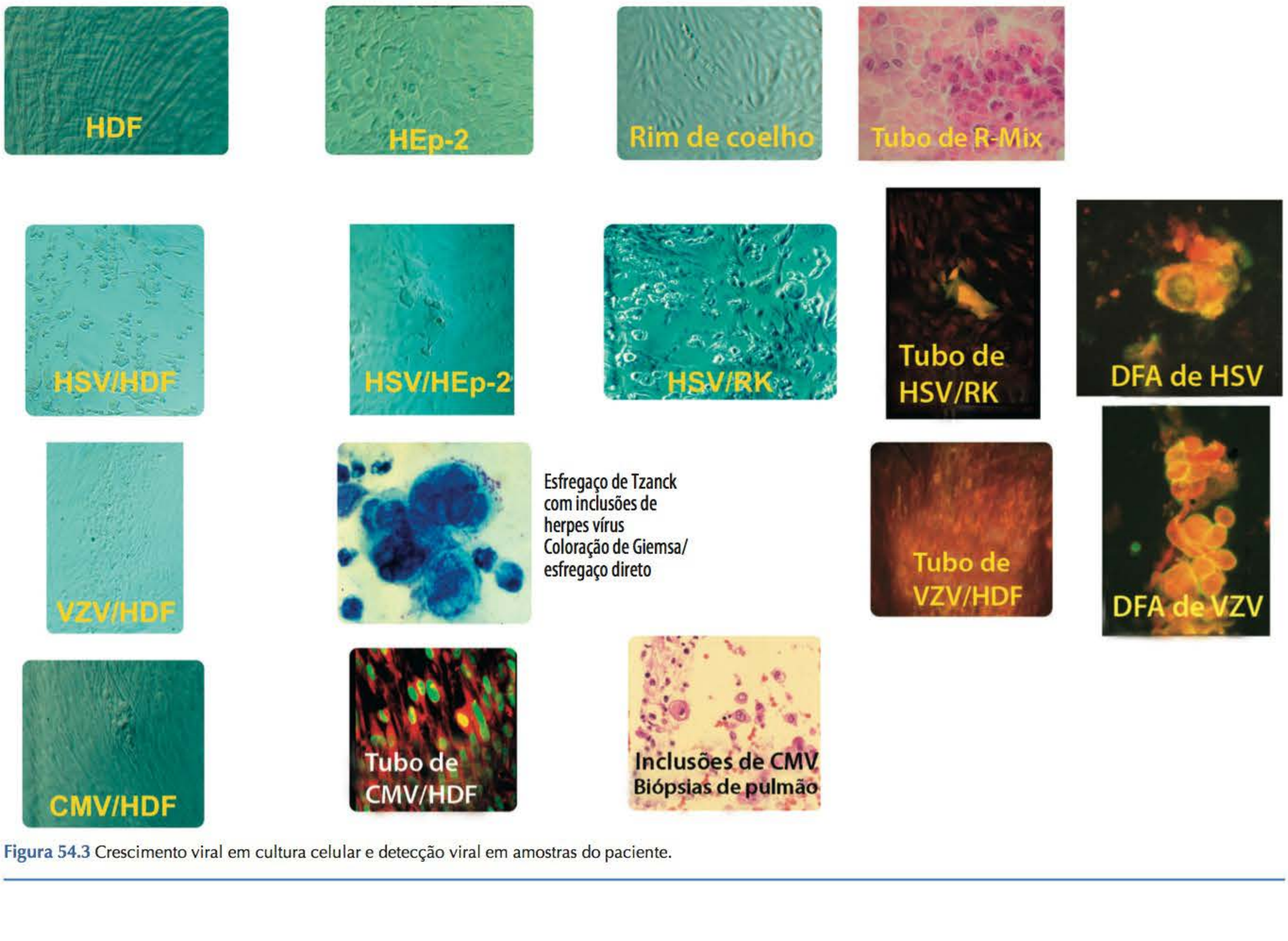
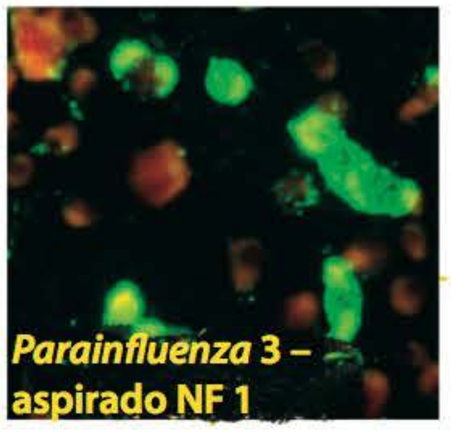
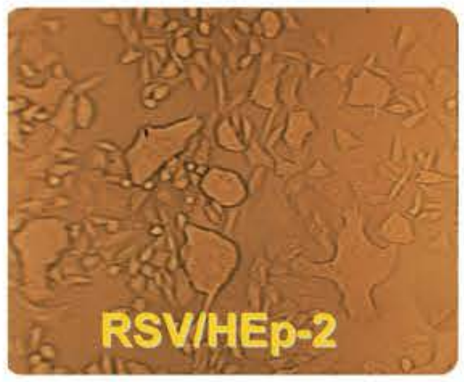
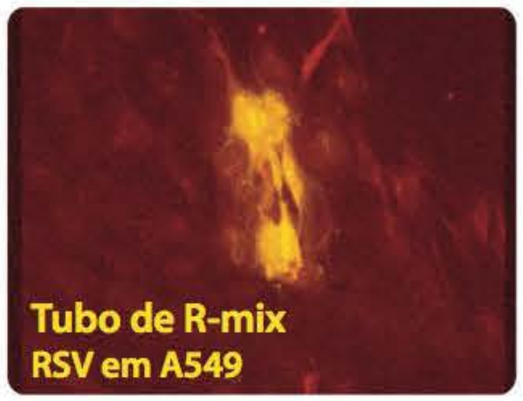
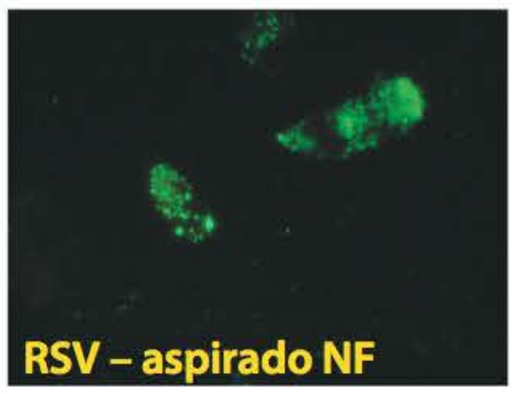


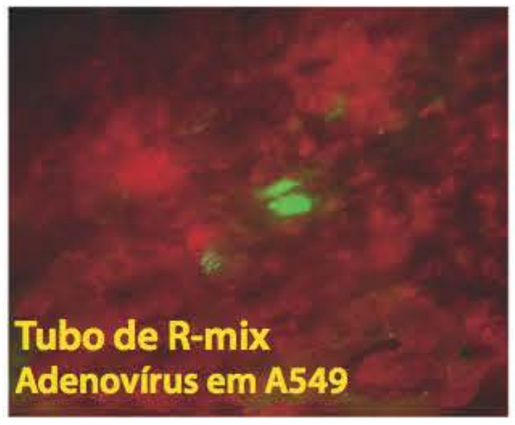
Figura 54.3 Crescimento viral em cultura celular e detecção viral em amostras do paciente.











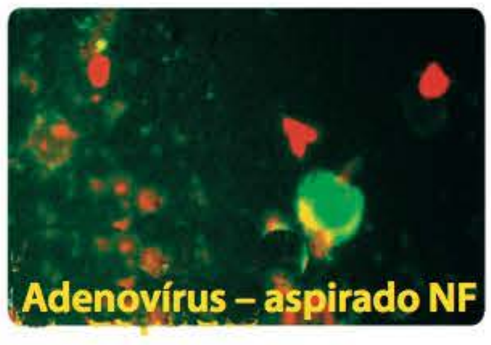


Figura 54.3 (*continuação*)

DNA ou do RNA viral. A hibridização *in situ* é uma técnica com sonda direta utilizada em patologia cirúrgica para identificar o papilomavírus humano (HPV), CMV, HSV e parvovírus B19. A sua especificidade é excelente, mas a sensibilidade abaixo da ideal limita o seu valor clínico. Os testes de amplificação do ácido nucleico aumentam a sensibilidade do diagnóstico molecular além da do ensaio do antígen e da cultura pela duplicação exponencial sequencial do oligonucleotídeo viral alvo (PCR, amplificação por deslocamento de cadeia [SDA, *strand displacement amplification*] e amplificação baseada na sequência do ácido nucleico [NASBA, *nucleic acid sequence-based amplification*]) ou pela amplificação de um marcador quimioluminescente fixado (métodos de captura híbrida e de DNA ramificado [bDNA, *branched DNA*]). A PCR e a amplificação do bDNA tornaram-se padrões para a monitoração quantitativa do HIV e do vírus da hepatite C (HCV) (Nolte, 2003). A PCR é o método mais sensível para o diagnóstico da meningite por enterovírus e da encefalite por HSV (Tang, 1998; Read, 1999; Romero, 2003). A detecção por PCR do vírus Epstein-Barr (EBV) no líquido cerebrospinal (LCE) é diagnóstico de linfoma do sistema nervoso central em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A utilidade clínica da PCR aumentou enormemente devido à introdução da amplificação em "tempo real". As etapas de amplificação e a detecção do *amplicon* ocorre no mesmo tubo fechado. Múltiplas amostras podem ser processadas simultaneamente e o número de ciclo de detecção é proporcional ao número de cópia viral. A determinação quantitativa do CMV por PCR no líquido broncoalveolar é preditiva da pneumonia viral em pacientes submetidos a um transplante de medula óssea e a investigação preventiva do CMV por PCR no sangue prevê a infecção em indivíduos submetidos a transplantes de órgãos maciços. A automação dos NAATs, particularmente com a incorporação de padrões internos e etapas do processo configuradas para evitar a contaminação cruzada do *amplicon*, acelerou o tempo de processamento e reduziu erros falso-negativos e falso-positivos. Até o momento, existe uma quantidade limitada de produtos comerciais, mas vários kits para identificação de patógenos virais comuns estão sendo desenvolvidos. A adesão rigorosa às exigências relativas à coleta de amostra e ao processamento deve ser mantida para preservar o ácido nucleico viral e maximizar a detecção.

A visualização direta por meio da microscopia eletrônica de partículas virais utilizando a coloração negativa com ácido fosfotúngstico tem sido útil na avaliação da gastroenterite viral, haja vista a replicação do rotavírus, adenovírus entérico, norovírus, astrovírus e calicivírus ser ruim ou não ocorrer em monocamadas celulares padrões, mas possuírem características ultraestruturais distintas.

Sorologia viral

O diagnóstico sorológico da infecção viral é atrativo porque amostras de soro são de fácil obtenção, transporte e armazenamento. A sorologia vira possui duas aplicações principais: diagnóstico de infecção recente e determinação da imunidade. A evidência de infecção recorrente/recente exige a demonstração de IgM vírus-específica durante o estágio agudo da doença ou a demonstração de um aumento de quatro vezes ou mais do título de IgG vírus-específica entre o soro do período agudo e o do período de convalescença. A IgM específi-

ca é usualmente encontrada no sangue durante a primeira semana de infecção primária e, geralmente, se torna indetectável em 1 a 3 meses. Os métodos de EIA são mais sensíveis e podem identificar a persistência de IgM durante um período quase duas vezes maior que os ensaios por imunofluorescência. A especificidade e a sensibilidade dos ensaios de IgM melhoraram com a remoção do fator reumatoide e da IgG para eliminar a competição com a IgM pelo antígeno viral. A IgG vírus-específica é produzida 1 a 2 semanas após a infecção primária, atinge o máximo em 4 a 8 semanas e diminui em seguida, mas geralmente permanece detectável indefinidamente. A resposta imune secundária após uma reinfecção ou reativação viral gera um perfil sorológico diferente: a IgM pode reaparecer transitoriamente e em baixo título e o título de IgG aumenta rapidamente. Esses são apenas padrões gerais de resposta. A intensidade, a especificidade, o *timing* e a classe de anticorpo são influenciados pelo vírus infectante, pelo local da infecção e pela condição imune do hospedeiro. Na infecção congênita, anticorpos IgG maternos cruzam a placenta para o interior da circulação fetal, mas qualquer IgM, IgA ou IgE detectada no cordão umbilical ou no sangue do neonato representa anticorpo produzido pelo feto ou neonato após uma infecção perinatal primária.

A sorologia é particularmente útil quando a qualidade da amostra e as condições de transporte forem abaixo das ideais para a realização de cultura ou testagem direta do antígeno. Se uma doença viral não for suspeitada na avaliação inicial, a sorologia pode ser então a única ferramenta diagnóstica disponível após a oportunidade de realização de cultura ou testes de antígeno ter passado. A sorologia é uma opção diagnóstica lógica para vírus que exigem procedimentos complexos de isolamento (EBV, herpesvírus humano 6) ou inoculação animal (arbovírus, alguns vírus Coxsackie A) ou que apresentam risco biológico (HIV, arbovírus, vírus que causam febre hemorrágica). Para algumas infecções, a sorologia é rápida e barata. O sarampo e a caxumba podem ser diagnosticados por meio de cultura, mas o anticorpo específico IgM é detectável em 3 dias após o início da doença. O vírus da rubéola cresce em cultura celular, mas a pesquisa de IgM é muito mais simples. O vírus pode não estar mais presente quando os sintomas da infecção se manifestam. O WNV e outros arbovírus frequentemente já foram eliminados do LCE no momento em que o paciente desenvolve encefalite, tornando a sorologia o método diagnóstico preferido. Infecções com pródromo prolongado apresentam, geralmente, anticorpo detectável quando o paciente se torna sintomático (EBV e CMV). Situações específicas para o diagnóstico sorológico estão listadas na Figura 54.2.

Coleta e transporte de amostra

O sucesso de qualquer teste diagnóstico depende da coleta e do transporte adequados da amostra. O laboratório deve estabelecer diretivas realistas relativas à manipulação ideal da amostra e uma estratégia de descarte de amostra e, em seguida, circular essas informações para as equipes clínicas e unidades de enfermagem (Tab. 54.2). Amostras para cultura, detecção de antígenos e para a amplificação de ácido nucleico devem ser obtidas durante o período agudo da doença quando a liberação de vírus é maior. A recuperação viral não é confiável durante o período de convalescença.

O meio de transporte viral contém uma solução salina tamponada, um estabilizador proteico, um indicador do pH e antibióticos para inibir contaminantes bacterianos e fúngicos. Meios de transporte com múltiplos objetivos (vírus, *Chlamydia* e *Mycoplasma*) foram desenvolvidos (M4, FlexTrans). A maioria das formulações estabiliza os vírus por 24 horas ou menos (Johnson, 1990). Todas as amostras, com exceção de amostras de sangue, devem ser transportadas e armazenadas a 4°C até a sua manipulação. O transporte de amostras, em temperatura ambiente, pode ser inevitável em algumas circunstâncias, mas os médicos devem considerar o efeito negativo sobre a recuperação. Amostras de sangue para o isolamento de vírus sempre devem ser mantidas em temperatura ambiente e processadas para a realização de cultura no dia da coleta. O preparo de culturas virais é melhor quando realizado no dia da chegada das amostras ao laboratório, preferivelmente nas 36 horas que sucedem a coleta. Pelo menos uma sessão de inoculação de cultura deve ser programada durante os plantões de fim de semana. Amostras somente devem ser congeladas (–20°C) como último recurso. O sangue e a urina para isolamento de CMV ou amostras das vias respiratórias para pesquisa de VSR não devem ser congelados.

Tabela 54.2 Coleta de amostra para síndromes virais comuns

Síndrome	Vírus comuns	Amostra preferida e condições de transporte	Validação da qualidade da amostra	Testes mais úteis
Bronquiolite/bronquite	VSR, PIV, adenovírus, influenza A e B	Aspirado nasofaríngeo, BAL (*swab*); transporte em gelo	Células colunares ciliadas ou macrófagos alveolares	DFA, EIA, cultura, teste do ácido nucleico
Influenza	Influenza A e B			
Pneumonia	VSRI, PIV, influenza A, adenovírus			
Conjuntivite	HSV, adenovírus, enterovírus, VZV	Raspado conjuntival (*swab*) em meio de TM; transporte em gelo	Células epiteliais	DFA, cultura, teste do ácido nucleico
Erupção cutânea vesicular	HSV, VZV	Líquido vesicular/células em meio de VTM ou esfregaço para DFA; transporte em gelo	Células epiteliais	Teste do ácido nucleico, cultura, DFA
Meningite	Enterovírus, HSV, Nilo Ocidental/arbovírus	LCE; transporte em gelo		Teste do ácido nucleico, cultura, IgM
Encefalite	HSV, Nilo Ocidental/arbovírus, raiva	LCE, tecido encefálico fresco; transporte em gelo		Teste do ácido nucleico, cultura, IgM
Enterite	Rotavírus, norovírus, adenovírus entéricos	Fezes frescas; transporte imediato	O *swab* deve estar coberto de fezes	Rotavírus e adenovírus – EIA; norovírus – RNA
Infecção viral disseminada	CMV, HSV, VZV, adenovírus	Sangue, biópsia de tecido, BAL, LCE; transporte imediato		Amplicação do ácido nucleico (quantitativo para CMV), cultura
	HIV	Sangue		Sorologia, carga viral do HIV
Infecção viral pré-natal/neonatal	HSV1 e 2, CMV, enterovírus, parvovírus B19, rubéola	LCE, líquido vesicular, biópsia de tecido, líquido amniótico, urina; transporte imediato		Amplificação do ácido nucleico, cultura, sorologia

BAL = lavado brancoalveolar; CMV = citomegalovírus; DFA = anticorpo fluorescente; EIA = enzima imunoenzimática; HIV = vírus da imunodeficiência humana; HSV = vírus herpes simples; LCE = líquido cerebrospinal; PIV = vírus parainfluenza; VSR = vírus sincicial respiratório; VZV = varicela zoster vírus.

Equipamentos e suprimentos

A maioria dos equipamentos de virologia é relativamente barata e já é utilizada nos departamentos de microbiologia e imunologia. Uma cabina de fluxo laminar de biossegurança classe II deve ser utilizada para o preparo de cultura e sempre que culturas forem manipuladas para proteger o técnico de aerossóis infecciosos e reduzir a contaminação de cultura de tecido. Uma centrífuga com transportadores cobertos para acomodar *shell vials* deve estar disponível. Incubadoras para manter células não inoculadas e para incubar células inoculadas são necessárias, preferivelmente com uma tomada interna para a conexão de um tambor rolante. Também são necessários um microscópio de contraste de fase invertido para identificar efeitos citopáticos em monocamadas de cultura celular, um microscópio de epifluorescência para DFA e imunofluorescência indireta e espaço no *freezer* a –20°C (–70°C quando disponível, é também desejável) para armazenamento de amostras e reagentes. O nitrogênio líquido é caro e não é essencial para laboratórios que adquirem linhagens celulares.

Todos os suprimentos e reagentes para identificação dos vírus comuns estão disponíveis no comércio. Culturas celulares são nutridas por uma solução salina balanceada (Hanks ou Earle) com adição de tampões, soro e uma mistura de nutrientes como, por exemplo, o Eagle *minimum essential medium* (MEM). O Eagle MEM é uma formulação definida precisamente de aminoácidos, açúcares, vitaminas, cofatores e outras necessidades metabólicas para a monocamada celular. O soro fetal bovino ou de bezerro (FBS, *fetal bovine serum*) é um suplemento nutricional e hormonal popular adicionado ao MEM; 5 a 10% de FBS são utilizados para o meio de crescimento de cultura celular e 2% para a manutenção do meio. Soluções de tripsina (solução 0,25%), salina tamponada com fosfato (PBS), de glutamina e de bicarbonato de sódio, meio de transporte viral (VTM, *viral transport medium*) e misturas antibióticas para a descontaminação da amostra também devem ser estocadas no laboratório conforme a necessidade (Clarke, 2004).

Laboratórios que realizam serviços diagnósticos virais pela primeira vez devem considerar o início das atividades com testes simples como cultura para HSV. Exames e culturas para influenza, RSV e rotavírus podem ser adicionados durante os meses de inverno. A identificação do CMV é uma prioridade para um hospital com pacientes imunocomprometidos. O isolamento de enterovírus pode ser oferecido inicialmente no verão e no outono. Culturas e teste de antígenos para VZV, adenovírus e vírus da parainfluenza devem ser adições razoáveis na medida em que o tempo e a experiência da equipe aumentam. O laboratório deve estar familiarizado com as exigências da coleta e do transporte de amostras dos laboratórios do serviço público e dos serviços de referência que provêm sorologia, teste de antígeno e amplificação de ácido nucleico suplementares, de modo que o envio de amostras seja feito de modo eficaz.

Síndromes infecciosas virais clínicas

Uma abordagem do diagnóstico laboratorial separa infecções virais em síndromes clínicas específicas. Isso encoraja o médico a associar um grupo razoável, porém, limitado, de vírus à doença do paciente. A solicitação deve especificar dados demográficos do paciente, diagnóstico clínico e vírus suspeitos de modo que o esforço do laboratório possa ser simplificado e focado na testagem rápida, eficaz e de boa produtividade. Neste capítulo, as seguintes doenças virais serão analisadas:
infecções herpéticas mucocutâneas;
síndromes respiratórias pediátricas e do adulto;
mononucleose infecciosa;
infecções congênitas e neonatais;
infecções virais do sistema nervoso central;
exantemas e infecções cutâneas virais;
infecções entéricas virais;
hepatite viral e infecção pelo HIV e por retrovírus;
infecções virais no hospedeiro imunocomprometido.

Infecções herpéticas mucocutâneas

A família *Herpesviridae* contém dois vírus que caracteristicamente produzem infecções cutâneas e da membrana mucosa escamosa do corpo: HSV e VZV. Ambos são comuns e, embora geralmente não sejam potencialmente letais, a eficácia da terapia com aciclovir exigiu um diagnóstico laboratorial imediato, paraticularmente para o HSV (Corey, 2005). A resistência ao aciclovir foi documentada e chega até a 10% em pacientes submetidos a um transplante de medula óssea (Szatanek, 2004). O VZV é discutido na seção sobre o exantema viral neste capítulo.

O HSV é onipresente e infecta todos os grupos raciais no mundo inteiro. As duas cepas de HSV (sorotipos 1 e 2) compartilham muitas características moleculares e biológicas e ambos infectam preferencialmente o epitélio escamoso, no entanto, cada um possui um perfil antigênico específico e uma epidemiologia um pouco diferente. O HSV1 é transmitido pela saliva para infectar as superfícies orofaríngea e lábio-facial. Lesões podem ocorrer na pele exposta de lutadores (*herpes gladiatorum*) ou nas mãos de profissionais da saúde após contato direto com saliva (panarício herpético). A infecção inicial pelo HSV1 ocorre, geralmente, antes da puberdade. A infecção primária é frequentemente assintomática, embora uma minoria substancial apresente febre e gengivoestomatite dolorosa. Casos de úlcera genital pelo HSV1 foram relatados (Ribes, 2001).

O HSV1 infecta diretamente células ectodérmicas. Quando o vírus replica, as células escamosas perdem sua integridade citoplasmática, permitem o extravasamento de líquido e separam-se umas das outras para formar uma vesícula. Bactérias da superfície convertem a vesícula em pústula, a qual, em seguida, ulcera quando ocorre lise completa das células epiteliais lesadas. Lesões herpéticas curam sem deixar cicatrizes quando as camadas epidérmicas regeneram. A resposta imune imediata envolve células *natural killers*, linfócitos T citotóxicos e a produção de anticorpos neutralizadores; entretanto, apesar dos fatores celulares e humorais, o HSV1 é capaz de migrar por meio de fibras nervosas sensoriais até o gânglio trigêmeo e persistir indefinidamente em um estado dormente no núcleo neuronal (Corey, 2005). Episodicamente, o HSV se reativa e viaja através dos axônios neurossensoriais até a boca e os lábios, onde ele novamente se replica nas células escamosas. A maioria das infecções herpéticas recorrentes é assintomática ou produz vesículas transitórias com importância apenas cosmética. No caso de comprometimento grave da imunidade mediada por célula (na AIDS e em pacientes transplantados), a reativação da infecção pode ser grave ou mesmo fatal. A encefalite é outra infecção rara, porém, devastadora, pelo HSV1. Ambas as complicações serão discutidas em sessões posteriores neste capítulo.

A infecção pelo HSV2 é observada principalmente nas superfícies escamosas genitais e é transmitida por meio do contato sexual íntimo. Aproximadamente 40 milhões de norte-americanos provavelmente estão infectados, com uma estimativa de 1 milhão de novos casos anuais. A identificação de HSV2 em crianças é mais incomum e levanta a preocupação da ocorrência de abuso sexual; no entanto, a partir da adolescência, a soroprevalência aumenta constantemente até a meia-idade e é proporcional ao número de parceiros sexuais (Fleming, 1997). Nos Estados Unidos, a soroprevalência do HSV2 é de 22%; em indivíduos com 13 anos de idade ou mais, a soropositividade ajustada à idade aumentou 30% desde 1980. O HSV2 produz o mesmo padrão de lesões mucocutâneas primárias e recorrentes observadas na infecção oral pelo HSV1. A latência é estabelecida nos gânglios neurais sacrais, mas a taxa de reativação é pelo menos duas vezes maior que a do HSV1 e pode ocorrer meningite transitória. Lesões primárias e recorrentes pelo HSV2 curam completamente em indivíduos com função imune celular normal. A principal preocupação é a exposição de neonatos durante o parto vaginal. O herpes neonatal é analisado posteriormente neste capítulo.

Orientação para a coleta e manipulação de amostras

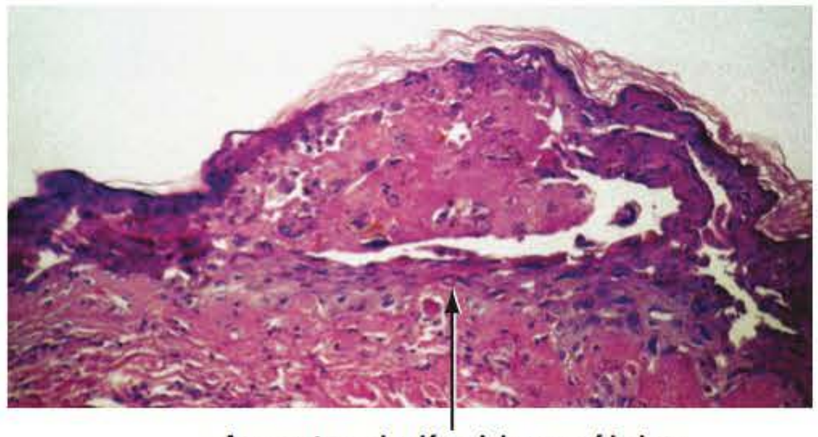
O HSV é provavelmente o vírus humano cuja cultura é a mais fácil e mais rapidamente realizada. Testes de antígeno também são procedimentos relativamente simples. A coleta de amostra é simples e o HSV é suficientemente durável, de modo que o transporte e a manipulação laboratorial imediatos não são essenciais.

Isolamento do vírus herpes simples em cultura celular

Amostras em *swab* em meio de transporte viral (VTM) com antibióticos podem tolerar o retardo de 12 horas do transporte em temperatura ambiente (22°C) com apenas uma perda viral modesta. Amostras

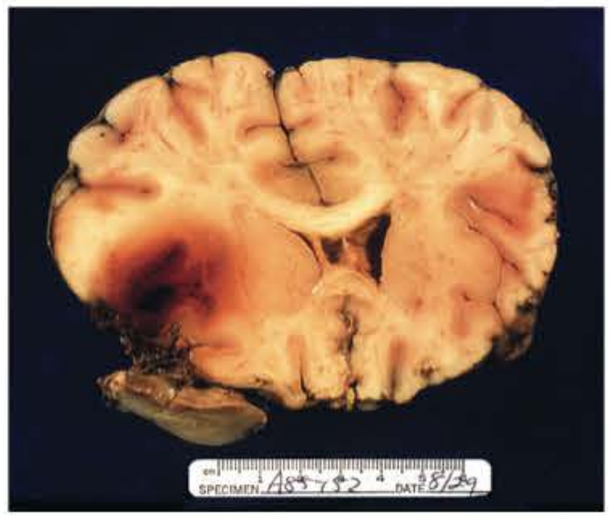
devem ser inoculadas em culturas celulares no dia da recepção, mas a refrigeração por uma noite é aceitável. O isolamento do HSV é ainda o teste diagnóstico padrão-ouro na prática e é mais sensível que qualquer ensaio de antígeno. O HSV cresce excepcionalmente bem em várias linhagens celulares: fibroblastos humanos (WI-38, MRC-5, prepúcio) são escolhas populares, mas linhagens celulares de rim de coelho, pulmão de marta, HeLa, rabdomiossarcoma (RD), Vero e Hep-2 também são úteis. Células primárias de rim de macaco (PMK, *primary monkey kidney*) não são confiáveis. Dois tubos de cultura de tecido (p. ex., um com rim de coelho [RK, *rabbit kidney*] e um com MRC-5) são usualmente inoculados. O procedimento é sumariado na Figura 54.4.

O HSV replica rapidamente. Efeitos citopáticos ocorrem usualmente no segundo ou terceiro dia de incubação. Culturas de lesões genitais que não revelam efeitos citopáticos do HSV após 5 a 7 dias de incubação são consideradas negativas. Como outros vírus (VZV, adenovírus, enterovírus etc.) podem ser recuperados do sistema nervoso central (SNC), córnea, boca e outros locais não genitais, essas culturas devem ser incubadas por 2 semanas. Células individuais infectadas pelo HSV primeiramente aumentam de volume e se tornam arredondadas, com lesão celular disseminando-se rapidamente por meio da monocamada. O HSV2 frequentemente causa formação de sincício quando ocorre coalescência das membranas citoplasmáticas das células infectadas (Fig. 54.4). Esse efeito citopático é característico, embora não seja exclusivo, do HSV. Alterações causadas por outros vírus, toxinas, ou mesmo tricomonas, podem ser confundidas com os efeitos citopáticos causados pelo HSV, de modo que a confirmação com a coloração DFA (*direct fluorescent antibody*) é recomendada. Células



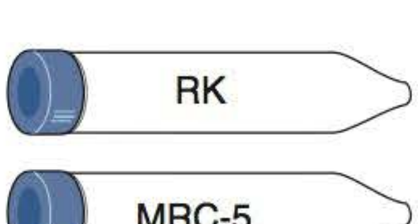
Amostra de líquido e células

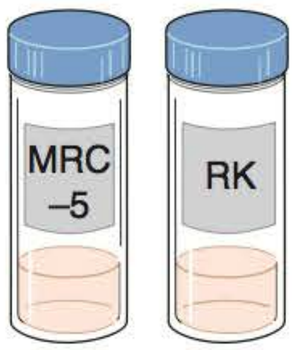
LCE, mínimo 1 mL
Biópsia de tecido ou *swab* de vesícula em VTM



LCE

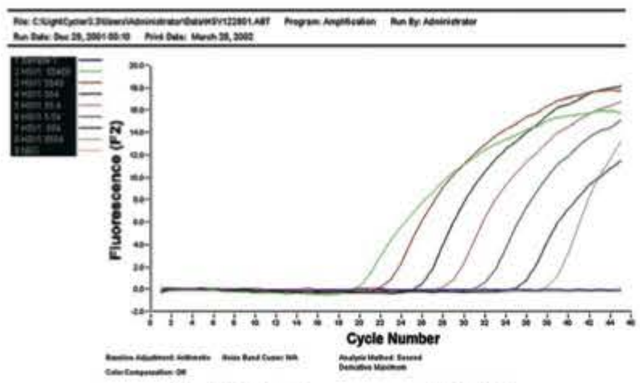
LCE/líquido corporal
Mínimo 1 mL





Purificar o DNA viral/remover inibidores

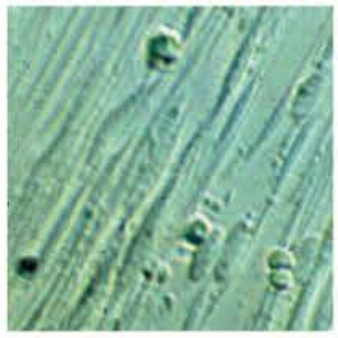
Adicionar a amostra ao *master mix* e rodar o ensaio amplificado. O ensaio ideal amplifica e detecta *amplicons* simultaneamente (tempo real).



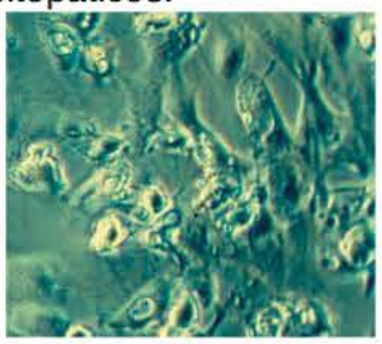
RT-PCR para o HSV

Descartar o meio de manutenção dos tubos de cultura celular. Inocular 0,2 a 0,4 mL. VTM sobrenadante/tubo. Manter os tubos a 35°C por 60 minutos para a adsorção viral. Descartar o líquido do inóculo; adicionar 2 mL de meio de manutenção fresco. Incubar a 35°C por 5 a 7 dias.

Checar diariamente a ocorrência de efeitos citopáticos.



MRC-5

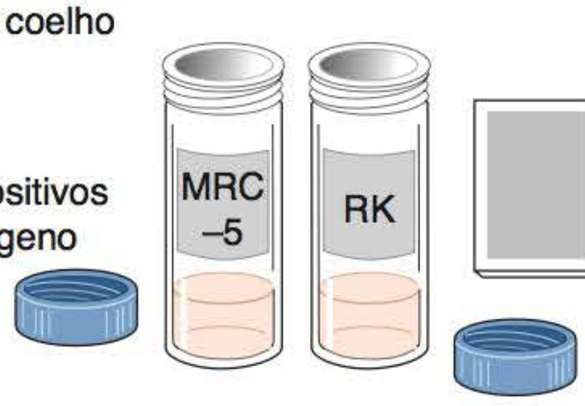


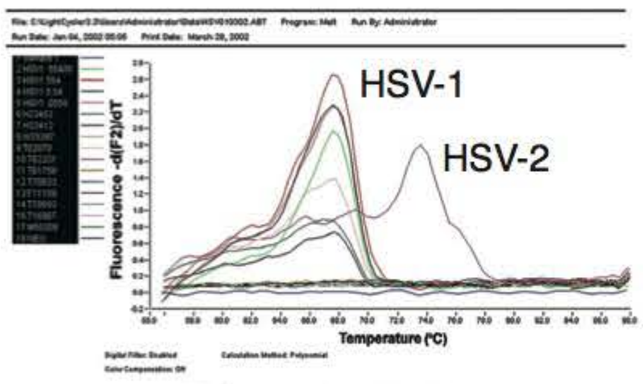
Rim de coelho

Descartar o meio de manutenção dos *shell vials*. Centrifugar os *shell vials* a 700 x G por 60 minutos. Descartar o líquido do inóculo. Adicionar 1 mL de meio de manutenção fresco. Incubar a 35°C por 16 a 36 horas.

Remover o meio de manutenção. Lavar a monocamada 2 vezes com PBS, fixar com acetona por 10 minutos. Secar ao ar livre. Coloração DFA da monocamada para pesquisa do antígeno do HSV. Informar resultados positivos e negativos.

Confirmar efeitos citopáticos positivos com coloração DFA para o antígeno do HSV. Informar todas as culturas negativas em 5 a 7 dias.





Diferenciação da temperatura de fusão do HSV-1 e HSV-2

Figura 54.4 Culturas em tubo tradicional e em *shell vial* para vírus herpes simples (HSV) e amplificação do DNA do HSV. DFA = anticorpo fluorescente direto; LCE = líquido cerebrospinal; PBS = solução salina tamponada com fosfato; PCR = reação de cadeia de polimerase; VTM = meio de transporte viral.

da monocamada são raspadas, transferidas para uma lâmina de vidro, fixadas em acetona e, a seguir, coradas com anticorpos mono ou policlonais contra o HSV (Lipson, 1991). Colorações DFA específicos para anticorpos monoclonais podem diferenciar o HSV1 do HSV2. Essa informação geralmente é pouco útil para a impressão clínica e a sorotipagem pode ser reservada para casos que envolvem questões médico-legais ou que apresentam ambiguidade clínica.

A demanda de culturas de HSV levou ao uso da cultura intensificada pela centrifugação em *shell vial*, na qual o antígeno viral pode ser identificado na monocamada pela cultura DFA apenas após 1 dia de incubação (Gleaves, 1985) (Fig. 54.4).

Detecção direta do vírus herpes simples

Um esfregaço direto de uma vesícula herpética corado com reagente de Giemsa pode demonstrar a presença de células gigantes epiteliais sinciciais multinucleadas e inclusões intranucleares. O esfregaço de Tzanck não é específico para a infecção por HSV (alterações idênticas são observadas na catapora e na VZV) e é positiva em apenas 67% das lesões herpéticas no estágio de vesícula. A coloração imuno-histoquímica de esfregaços diretos (Fig. 54.3) com anticorpos anti-HSV marcados com fluoresceína ou imunoperoxidase elimina a confusão com o VZV e o antígeno viral pode ser identificado em células que ainda não apresentam inclusão nuclear ou formação de sincício, entretanto, quando comparada com a cultura, a coloração DFA apresenta um resultado falso-negativo em pelo menos 20 a 30% dos exames (Moseley, 1981; Lafferty, 1987). Todos os resultados negativos de testes de amostras diretas devem ser considerados como possíveis falso-negativos que devem ser validados por cultura paralela. Por outro lado, o diagnóstico por PCR de infecção herpética genital mucocutânea é 20 a 30% mais sensível que a cultura e pode resultar em uma diminuição acentuada do tempo de virada em comparação com a cultura (Espy, 2000). A PCR é superior para a identificação da liberação viral mucocutânea assintomática, oito vezes mais sensível que a cultura (Cone, 1994). Na avaliação de úlcera genital, a pesquisa por amplificação do ácido nucleico multiplex demonstrou uma sensibilidade de 100% para a detecção do HSV com uma melhoria substancial do diagnóstico de cancro sifilítico ou de sífilis primária (Orle, 1996).

Diagnóstico sorológico

Existe uma homologia antigênica ampla entre o HSV1 e o HSV2, de modo que a testagem sorológica acurada exige antígenos que sejam sorotipo-específicos. Os métodos de EIA e *Western blot* que utilizam a glicoproteína G (gG) do envelope do antígeno do HSV1 e do HSV2 não detectam anticorpos que reagem de modo cruzado (Ashley, 1988; Morrow, 2003). A aplicação mais valiosa de testagem de anticorpo específico do HSV2 é a avaliação sorológica de gestantes para se prever o risco de transmissão neonatal (Ashley, 1999; Cherpes, 2003).

Infecções virais do trato respiratório

Anualmente, ocorrem vários milhões de consultas e hospitalizações nos Estados Unidos por causa de infecções do trato respiratório, a maioria delas sendo de origem viral. As infecções variam de resfriados triviais à laringotraqueobronquite (crupe), bronquiolite e pneumonia graves. Os resfriados e as faringites geralmente são tratados clinicamente sem a realização de exames laboratoriais, no entanto, o número de solicitações de testes de antígeno e culturas para o diagnóstico de infecções do trato respiratório inferior pode ser responsável por uma parte significativa da carga de trabalho, principalmente no inverno (Tab. 54.1). Os vírus da influenza e o VSR são os agentes patogênicos respiratórios mais importantes nos adultos. Em crianças jovens, os agentes mais importantes são o VSR, vírus da parainfluenza, vírus da influenza e adenovírus.

Influenza

Os vírus da influenza A e B causam, durante as estações frias, epidemias anuais de doença febril aguda dos tratos respiratórios superior e inferior. A influenza A é geralmente mais comum que a B e produz doença mais grave (Fig. 54.5). Antígenos da influenza mudam por meio de mutações de ponto no genoma (impulso antigênico, influenza A e B) e por meio da recombinação de segmentos do RNA viral humano e animal (desvio antigênico, influenza A), de modo que os anticorpos de uma infecção prévia podem não ser protetores em uma epidemia posterior. A influenza dissemina-se facilmente de pessoa a pessoa por meio de gotículas em aerossol ou de mãos contaminadas (Troanor, 2005).

O vírus da influenza replica rapidamente nas células colunares ciliadas da faringe e da árvore traqueobrônquica. O início da febre é, geralmente, abrupto. A necrose epitelial respiratória viral causa dor de garganta e tosse, mas a mialgia, cefaleia e fraqueza generalizada são tipicamente mais severas que os sintomas respiratórios. A gripe não complicada geralmente desaparece após 4 a 5 dias. Anualmente, nos Estados Unidos, ocorrem aproximadamente 100.000 hospitalizações e 20.000 mortes relacionadas à influenza. Em uma minoria de pacientes, a necrose viral aguda estende-se para as células de revestimento alveolar, produzindo uma pneumonia grave potencialmente letal (Yeldandi, 1994). A maioria dos óbitos é causada pela broncopneumonia bacteriana secundária quando o trato respiratório lesado pelo vírus é infectado por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou outras bactérias da faringe. A infecção estafilocócica secundária é particularmente preocupante por causa da atual distribuição disseminada do *S. aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade. A superinfecção bacteriana é mais comum em pacientes com doença pulmonar crônica ou insuficiência cardíaca congestiva preexistente. São complicações raras a miocardite, meningoencefalite, síndrome de Reye e síndrome de Guillain-Barrè.

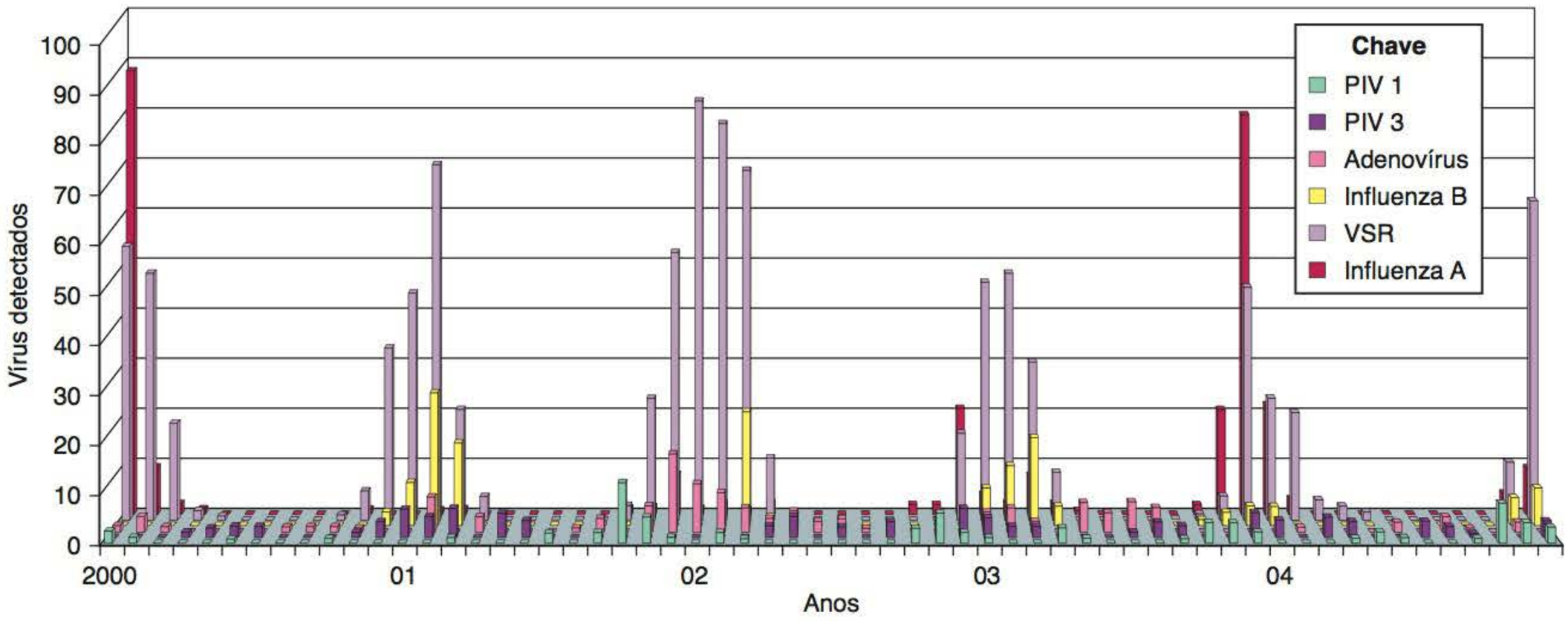


Figura 54.5 Variação sazonal de infecções virais respiratórias.

A influenza é melhor diagnosticada durante os 2 a 3 primeiros dias de doença quando a liberação viral é máxima. A RT-PCR é o método mais sensível para o diagnóstico, mas ainda não está amplamente disponível (Erdman, 2003; Templeton, 2004). A cultura é o segundo teste diagnóstico mais sensível. Amostras de secreção/aspirado nasofarígeno são ideais e a amostra de escarro expectorado é aceitável se ela apresentar células colunares brônquicas, macrófagos alveolares ou neutrófilos. *Swabs* nasofaríngeos e de orofaringe podem ser satisfatórios, mas geralmente não são amostras ideais cuja adequação não pode ser avaliada. A cultura em *shell vial* com incubação de 1 a 2 dias apresenta uma sensibilidade excelente (Dunn, 2004) e pode afetar o tratamento do paciente ou a profilaxia de contatos. A cultura tradicional com monocamadas celulares e hemadsorção celular (Fig. 54.3) pode não fornecer um resultado positivo por 2 a 7 dias.

A coloração DFA do antígeno da influenza é útil para o diagnóstico rápido. Amostras de secreção nasofaríngea/aspirado nasofaríngeo contêm abundantes células epiteliais colunares infectadas pelo vírus e são as amostras preferidas. A sensibilidade varia de 77 a 93% para a detecção da influenza A e de 70 a 80% para a influenza B (mais elevada em pacientes pediátricos). A especificidade é superior a 95% e é fortemente influenciada pela experiência do microscopista e pela qualidade da amostra. *Swabs* da orofaringe e da nasofaringe geralmente não apresentam quantidade suficiente de células colunares para a coloração DFA. Métodos imunoenzimáticos imunocromatográficos comerciais são rápidos, de fácil execução e apresentam uma boa sensibilidade para a detecção do antígeno da influenza quando realizados com secreção nasofaríngea/aspirado nasofaríngeo. O imunoensaio óptico do antígeno neuraminidase da influenza A e B também apresenta boa sensibilidade diagnóstica para secreção nasofaríngea (80%) e escarro expectorado (83%) (Mulford, 1999). A sensibilidade depende da qualidade da amostra. Em geral, a melhor amostra é a secreção nasofaríngea/aspirado nasofaríngeo tanto para adultos quanto para crianças. A coleta de secreção nasofaríngea/aspirado nasofaríngeo é revista na Figura 54.6. Métodos imunoenzimáticos devem ser reforçados pela cultura durante períodos não epidêmicos uma vez que o valor preditivo positivo é ruim em situações de baixa prevalência.

Bronquiolite por vírus sincicial respiratório

O VSR é a causa mais importante de doença viral grave do trato respiratório inferior em lactentes e crianças de baixa idade (Anderson, 1990; Hall, 1998, 2001). O VSR é transmitido por gotículas de aerossol e epidemias ocorrem anualmente (Fig. 54.5). Não existe vacina para o VSR. A imunidade ao VSR é incompleta e de curta duração. Múltiplas infecções de intensidade decrescente ocorrem ao longo da vida, embora o VSR possa causar doença pulmonar grave no idoso e em indivíduos imunocomprometidos (Pohl, 1992; Falsey, 2005). O VSR, como o vírus da influenza, infecta células epiteliais colunares ciliadas da nasofaringe até os bronquíolos distais. A manifestação mais grave do VSR é a bronquiolite. Ela afeta bebês com menos de 1 ano de idade cujas pequenas vias aéreas terminais são facilmente ocluídas pelas células epiteliais necróticas e resíduos inflamatórios. A obstrução bronquiolar leva ao aprisionamento de ar e à hipóxia, a qual pode ser grave. As infecções mais graves por VSR ocorrem em lactentes prematuros, em crianças com doença cardiopulmonar subjacente ou imunodeficiência e em receptores de transplantes. A profilaxia com imunoglobulina anti-VSR é útil para lactentes prematuros (Meissner, 2003).

O diagnóstico rápido do VSR no paciente internado é importante para a implementação de medidas de controle de infecção para prevenir a disseminação nosocomial (Hall, 1998). O VSR é um vírus particularmente frágil e lábil e pode não permanecer viável se o transporte da amostra for retardado. Após a inoculação em cultura celular, ele replica lentamente com desenvolvimento tardio de efeitos citopáticos (Fig. 54.3). O tempo de isolamento varia de 3 a 10 dias (Arens, 1986; Tristram, 2003). A cultura em *shell vial* melhora um pouco a recuperação do VSR e encurta o tempo de isolamento para 2 dias (Dunn, 2004). A detecção do antígeno do VSR em secreções respiratórias pela coloração DFA ou por EIA é tão sensível ou superior à cultura e a disponibilidade do resultado é clinicamente relevante. Testes rápidos tornaram-se métodos práticos definitivos para o diagnóstico do VSR em crianças (Ohm-Smith, 2004). O EIA é de realização fácil e rápida; entretanto, o kit de reagentes é um pouco caro e os métodos não incluem um mecanismo automático para verificar a adequação da amostra. A coloração DFA exige mais tempo e *expertise* interpretativa, mas ele pode ser facilmente expandido para testar múltiplos vírus e a confirmação da qualidade da amostra é simples. A RT-PCR apresenta uma sensibilidade superior em relação a todos os outros métodos e é mais confiável para amostras de pacientes geriátricos, mas ainda não está disponível facilmente (Falsey, 2002; Perkins, 2005).

Crupe

O crupe é mais comumente causado pelo vírus parainfluenza (PIV) (Henrickson, 2003). O PIV1 e o PIV2 atingem o pico durante o tempo frio; o PIV3 causa doença durante todo o ano. Os PIVs (particularmente o PIV3) encontram-se em segundo lugar como causa mais frequente de infecções virais do trato respiratório inferior em crianças de baixa idade (Fig. 54.5). A necrose epitelial viral e o edema mucoso da laringe, traqueia e grandes brônquios estreitam as vias aéreas, produzindo rouquidão, tosse "de cachorro" e padrão respiratório estridoloso causado pela obstrução e característico do crupe. A imunidade é transitória e infecções de repetição são comuns, no entanto, em crianças mais velhas e adultos, os sintomas são menos graves e estão centrados no trato respiratório superior. A cultura de secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo é o método diagnóstico atual mais sensível, mas a demonstração pela coloração DFA do antígeno do PIV em secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo apresenta uma boa sensibilidade, variando de 69 a 85% (Costello, 1993). Amostras DFA-negativas devem ser submetidas à cultura para maximizar a recuperação.

Metapneumovírus

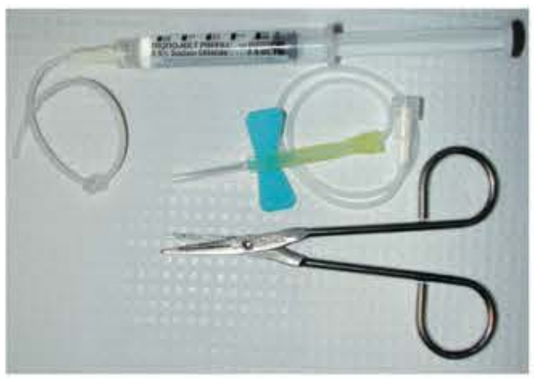
O metapneumovírus humano (hMPV) é um vírus RNA recentemente reconhecido, classe *Metapneumovirus*. Como o VSR, o hMPV causa uma variedade de infecções respiratórias, incluindo doença das vias aéreas, bronquite e bronquiolite, síndrome similar à causada pela influenza e pneumonia. O hMPV foi implicado em 4 a 21% dos lactentes com bronquiolite aguda (Maggi, 2003; Xepapadaki, 2004). Crianças muito jovens, idosos e indivíduos imunocomprometidos são os que apresentam a maioria das infecções sintomáticas, similar às causadas pelo VSR (Stockton, 2002; van den Hoogen, 2001, 2004). A sazonalidade é algo similar à do VSR e ocorrem recorrências da infecção ao longo da vida. A doença respiratória causada pelo hMPV tende a ser menos grave que a causada pelo VSR. Coinfecções com os dois vírus são frequentemente mais graves que as infecções causadas apenas por um deles (Konig, 2004).

Atualmente, o diagnóstico do hMPV é limitado à detecção por RT-PCR. É o "padrão-ouro", mas não é uma realidade para a maioria dos hospitais comunitários. O hMPV pode crescer em células LLC-MK2 ou células Vero, mas o crescimento leva até 14 dias sem efeitos citopáticos detectáveis (Deffrasnes, 2005). A cultura de secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo e amostras brônquicas utilizando *shell vial* e coloração DFA para anticorpo monoclonal anti-hMPV e o uso mais disseminado da cultura podem levar a um maior conhecimento da verdadeira incidência de infecções por hMPV (Ebihara, 2005; Landry, 2005).

Coleta de amostra

Mixovírus e adenovírus respiratórios podem infectar células epiteliais colunares ciliadas da nasofaringe até o alvéolo, de modo que quando uma doença das vias aéreas inferiores (crupe, bronquiolite, pneumonia ou influenza) for suspeitada, a mucosa das vias respiratórias superiores ainda é o local mais fácil e mais acessível para a coleta de amostra para cultura ou ensaio de antígeno. Amostras devem ser coletadas durante os primeiros dias da doença, quando a replicação viral é maior. Um *swab* da orofaringe colocada em meio de transporte viral com antibióticos pode ser aceito para a cultura de influenza, mas o seu resultado é 10 a 20% inferior. O escarro expectorado também é adequado para cultura (Kimball, 1983; Yungbluth, 1998), particularmente em adultos que apresentam tosse produtiva.

Secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo podem ser coletados pela inserção de um cateter conectado a uma seringa, por meio das narinas até a nasofaringe, e instilando 1 a 3 mL de soro fisiológico e, a seguir, aspirando secreções mucosas diretamente para o interior da seringa.



Seringa com solução salina estéril e tubo com borboleta cortado para corrigir o comprimento. Instilar 1 a 4 mL de solução salina via nasofaringe, reaspirar (ver vídeo da coleta em www.nasalaspirationkit.com). Dar um nó no tubo e enviar o aspirado da seringa imediatamente para o laboratório para a realização de EIA e cultura DFA.

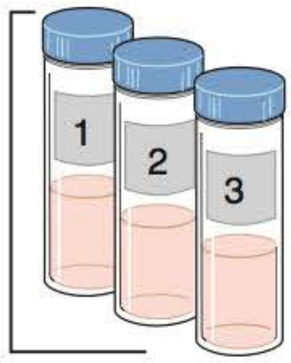
Realizar EIA para VSR e influenza A/B segundo instruções do fabricante.

Centrifugar o aspirado nasofaríngeo a 500 x G por 10 minutos a 4°C

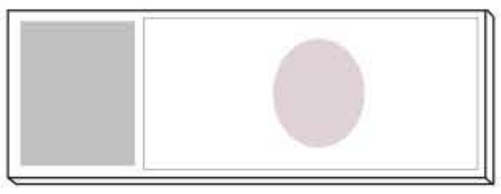
Sobrenadante para cultura

Adicionar 0,2 mL de sobrenadante em 3 *shell vials*. Centrifugar a 700 x G por 60 minutos. Adicionar 1,0 mL de meio de manutenção do sobrenadante livre de soro. Tampar e incubar a 35°C.

R-Mix: A549/Mv1Lu



Remover o *shell vial* #1 da incubadora após 16 a 24 h. Aspirar o meio, adicionar 1 mL de acetona e, a seguir, aspirar a acetona. Adicionar 1 mL de acetona e tampar. Manter em temperatura ambiente por 10 minutos. Aspirar a acetona e deixar o sobrenadante secar ao ar livre no *shell vial*. Corar com coquetel ou FITC-anticorpos monoclonais contra vírus respiratórios. Montar a lâmínula invertida sobre a lâmina de microscopia utilizando meio de montagem. Ler com microscópio epifluorescente (250 x).



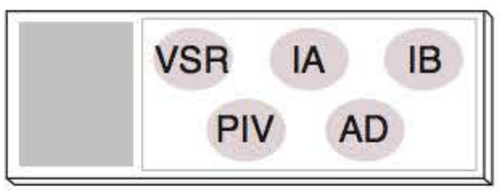
Coquetel de anticorpos monoclonais marcados FITC

24 horas
análise do *shell vial*

24 horas
análise do *shell vial*

Positivo

Remover o *shell vial* #2 da incubadora. Aspirar deixando ~0,15 mL de meio sobrenadante e coletar células. Adicionar ~10 µL de suspensão celular nas cavidades de uma lâmina revestida de Teflon. Corar com FITC-anticorpos monoclonais individuais para vírus respiratórios (30 minutos a 37°C).



Negativo

Continuar a incubar os *shell vials* #2 e #3 por mais 24 horas. Corar o *shell vial* #2 com coquetel de FITC. Se possível, processar o *shell vial* #3 com FITC-anticorpos monoclonais individuais. Ver instruções sobre o processamento de 24 horas, à esquerda.

Precipitado para coloração FA

Lavar o precipitado 2x em PBS para remover o muco. Suspender novamente as células em 0,1 mL de PBS. Colocar ~30 µL de suspensão celular nos poços (10 mm) de lâminas recobertas com Teflon. Secar ao ar livre e, a seguir, fixar em acetona por 5 minutos à temperatura ambiente. Corar com FITC-anticorpos monoclonais individuais contra vírus respiratórios (30 minutos a 37°C).

Secar ao ar livre. Adicionar meio de montagem e lamínula. Ler ao microscópio epifluorescente (250x).

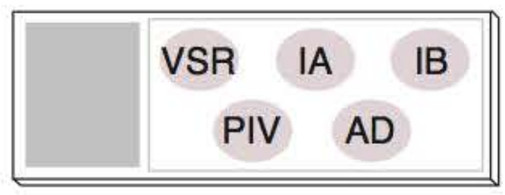


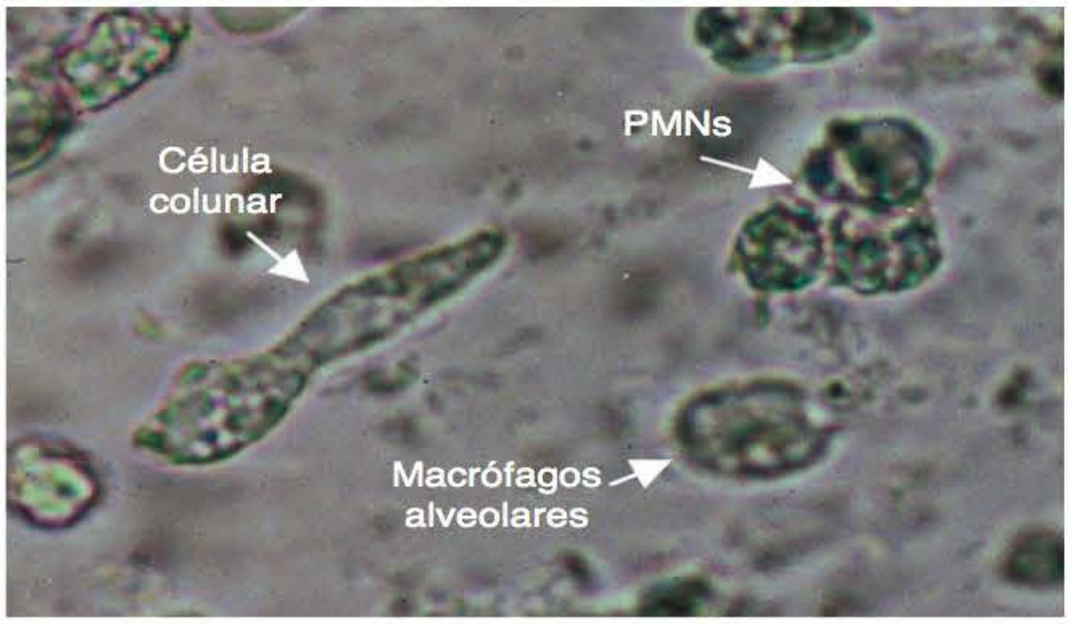
Figura 54.6 Diagnóstico laboratorial de infecções virais respiratórias empregando ensaios diretos para detecção de antígenos, imunoensaio enzimático (EIA) e teste com anticorpo fluorescente direto (TAFD), bem como cultura em *shell vial*. FITC = isotiocianato de fluoresceína; PBS = solução salina tamponada com fosfato; VSR = vírus sincicial respiratório.

Todas as amostras devem ser transportadas em gelo imediatamente para minimizar a perda de VSR. A qualidade da amostra deve ser verificada antes da realização da cultura ou do ensaio do antígeno. Secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo com pelo menos duas células epiteliais colunares ciliadas por campo de 250x fornecem uma recuperação quatro vezes maior de agentes patogênicos virais respiratórios (Tab. 54.3).

Ensaio de antígeno viral

A Figura 54.6 mostra um procedimento de cultura e ensaio de antígeno para o diagnóstico viral respiratório. A detecção reproduzível e acurada do antígeno viral por DFA exige *expertise* interpretativa. Por essa razão, quando possível, a cultura viral e o ensaio do antígeno devem ser realizados para maximizar a recuperação. Hospitais com um grande serviço pediátrico rotineiramente testam amostras respiratórias com um painel de vírus (VSR, influenza A e B, PIVs e adenovírus) durantes os meses de inverno quando o orçamento permite. Adultos devem ser testados para o vírus da influenza. O VSR também deve ser considerado em pacientes idosos. A amostra de secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo é utilizada para o EIA e, a seguir, é lavada com PBS (*phosphate buffered saline*) e centrifugada. O sobrenadante é

Tabela 54.3 Recuperação de vírus de aspirado nasofaríngeo. Relação com a adequação da amostra



Amostra (n = 2.173)	Número de amostras	% com recuperação viral positiva
Secreções nasofaríngeas com <1 célula colunar por campo de 250x	243	6
Secreções nasofaríngeas com >2 células colunares por campo de 250x	1.930	27

11% das amostras apresentaram quantidade insuficiente de células e exigiram uma nova coleta.

utilizado para a cultura viral. Se a coloração DFA para antígenos virais for solicitada, o depósito celular é novamente suspenso em PBS e disperso em lâminas revestidas de Teflon ou de poli-L-lisina. Esfregaços secos ao ar são fixados com acetona 100% e corados para antígenos virais utilizando anticorpos específicos conjugados à fluoresceína com contracoloração com azul de Evans. Preparações de secreções/aspirado nasofaríngeo citocentrifugadas podem aumentar a recuperação celular (Landry, 2000). Observe o número de células epiteliais colunares ciliadas e o grau de coloração inespecífica causado pelo muco residual ou neutrófilos. A Figura 54.3 mostra coloração DFA de secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo positiva para influenza A, parainfluenza 3, VSR e adenovírus. Antissoros conjugados à fluoresceína são testados para a especificidade com um painel de células de controle de cultura tissular sabidamente positiva. Os lotes do reagente devem mostrar uma consistência na distribuição e intensidade da coloração celular. Métodos DFA apresentam especificidade e sensibilidade excelentes (Hughes, 1988; Landry, 2000).

Vários EIA para VSR e influenza A estão disponíveis no comércio. A especificidade e a sensibilidade desses produtos são bem boas, comparáveis à coloração DFA (Hughes, 1988; Thomas, 1991; Miller, 1993; Ohm-Smith, 2004; Weinberg, 2005). Em secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo, deve-se checar a presença de células epiteliais colunares ciliadas. Uma montagem úmida preparada misturando uma gota da amostra com uma gota de soro fisiológico é examinada com uma magnificação de 250x para verificar que existe uma quantidade suficiente de células colunares nasofaríngeas (Tab. 54.3). Amostras de *swab* da orofaringe e da nasofaringe contêm muito pouco material celular para a pré-triagem.

Isolamento viral

As mesmas exigências e restrições relativas à amostra para ensaios de antígeno se aplicam à cultura viral. Culturas de secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo em adultos e crianças não imunocomprometidos podem ser modificadas para se adequarem às epidemias sazonais de influenza, VSR e PIV (Fig. 54.6). No mínimo, os laboratórios de virologia devem tentar isolar o VSR e o vírus da influenza durante o inverno. Se a estrutura permitir, o PIV e o adenovírus podem ser incluídos para pacientes pediátricos. A cultura apresenta um resultado diagnóstico global 10 a 20% superior ao ensaio do antígeno para todos os agentes, excetuando-se o VSR. A cultura também pode ser expandida para recuperar vírus que não foram incluídos no painel de antígenos. Atualmente, a cultura para hMPV não é oferecida pela maioria dos hospitais.

Swabs da orofaringe para cultura de influenza somente devem ser colocados em meio de transporte viral com antibióticos na coleta e devem ser transportados imediatamente, preferivelmente em gelo. O escarro que contém células do trato respiratório inferior e/ou inflamação aguda também é aceitável para a cultura de influenza e deve ser colocado em meio de transporte viral com antibióticos. O frasco do meio de transporte viral deve ser agitado vigorosamente. A inoculação da cultura não deve ser retardada por mais de 24 horas; obviamente, é preferível que ela seja realizada no mesmo dia da coleta. Para a recuperação imediata, o sobrenadante é inoculado em *shell vials* duplicados (dois com rim canino Madin-Darby [MDCK, *Madin-Darby canine kidney*] tripsinizado e dois com rim de macaco Rhesus [RMK, *Rhesus monkey kidney*]), os quais são alimentados após centrifugação com FBS-free MEM (o soro bovino pode conter anticorpos contra o vírus da influenza). Após incubação de 1 a 2 dias a 35°C, monocamadas de *shell vial* são corados com DFA para antígeno da influenza. Se a estrutura do laboratório permitir, um tubo de *back-up* de RMK ou MDCK também pode ser inoculado, incubado em um tambor rolante e, a seguir, examinado para se verificar se houve crescimento viral com a adição de eritrócitos frescos de cobaia. O vírus da influenza, como o PIV e o sarampo, não produz efeitos citopáticos de maneira consistente, entretanto, esses vírus causam hemaglutinação com antígenos na superfície da cultura de tecido, e a aderência do eritrócito de cobaia à monocamada indica a presença de vírus que causa hemadsorção. Um esquema de testagem diária de hemadsorção é preferível (Minnich, 1987). Quando a hemadsorção é observada, as células da monocamada devem ser testadas com um conjunto de antissoros para determinar qual vírus está presente. A Figura 54.3 apresenta uma monocamada de *shell vial* de RMK positiva para influenza A após 2 dias de incubação e uma monocamada do tubo RMK infectada com influenza A que apresenta hemadsorção de eritrócitos de cobaia no terceiro dia.

A Figura 54.6 sumaria um procedimento de cultura em *shell vial* para secreções nasofaríngeas/aspirado nasofaríngeo utilizando uma monocamada celular "híbrida" que contém células A-549 e de pulmão de marta (MvL, *mink lung*) que, em conjunto, suportam o crescimento de VSR, influenza A e B, adenovírus e vírus da parainfluenza. Comparada com as linhagens celulares tradicionais, essa mistura híbrida de células apresenta uma taxa global de recuperação de 96 a 100%, com diminuição do tempo de resposta e custo global reduzido de materiais e trabalho (Schindler, 1999).

Laboratórios que realizam somente cultura de VSR devem considerar o uso de *shell vials* no lugar dos tubos tradicionais para reduzir o tempo de recuperação. Células HEp-2 ou A-549 em Eagle MEM suplementado com 2 a 5% de soro bovino fetal suportam a replicação do VSR. Monocamadas do tubo de cultura celular devem ser checadas diariamente em busca de efeitos citopáticos por 10 dias. A Figura 54.3 mostra efeitos citopáticos do VSR no sincício celular multinucleado, um padrão que é influenciado pelo conteúdo de cátion e pelo frescor do meio de manutenção (Shahrabadi, 1988; Tristram, 2003). O adenovírus também replica em linhagens celulares HEp-2 e A-549 e produz um arredondamento tipo uva e aumento de volume das células da monocamada, usualmente em torno do quinto ao sétimo dia. A cultura em *shell vial* encurta a detecção do adenovírus para 3 dias (Fig. 54.3).

Existem vários métodos sorológicos para detecção de anticorpos antivirais específicos, no entanto, nenhum deles é prático para o diagnóstico rápido e a conduta clínica. O diagnóstico sorológico é mais útil para estudos epidemiológicos da saúde pública.

Mononucleose infecciosa e infecções relacionadas

A mononucleose infecciosa é uma doença linfoproliferativa sistêmica comum, usualmente causada pela infecção primária pelo EBV. O EBV faz parte da família *Herpesviridae* e, como o HSV, infecta a maioria da população mundial. O EBV é disseminado pela saliva. A infecção primária no início da infância geralmente é assintomática, mas, em adolescentes e adultos jovens, frequentemente produz a mononucleose infecciosa clássica. Anualmente, ocorrem aproximadamente 150.000 casos de mononucleose nos Estados Unidos (Cohen, 2000; Schooley,

2005). O EBV infecta primeiramente o epitélio faríngeo, de modo que a dor de garganta e a febre tipicamente marcam o início da mononucleose infecciosa. O EBV é notavelmente linfotrópico: ele liga-se ao receptor C3d (CD21) na superfície de linfócitos B e inicia uma proliferação blástica policlonal de células B, que gera uma gama policlonal de anticorpos IgM inespecíficos. O sistema imune mediado por células responde com células NK (*natural killer*) e linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ para erradicar células B infectadas. Linfócitos B infectados pelo EBV acumulam-se nos linfonodos através do corpo e linfócitos T citotóxicos defensivos infiltram-se em áreas interfoliculares nodais, no baço e no fígado e circulam como linfócitos atípicos no sangue periférico (Strickler, 1993). Como fatores mediados por célula controlam a replicação do EBV, os sintomas da mononucleose infecciosa diminuem e a linfadenopatia, a esplenomegalia e a hepatite desaparecem.

Como outros herpesvírus, o EBV persiste em estado de latência. Uma pequena porcentagem de núcleos de linfócitos B contém RNA codificado do EBV (EBER, *Epstein-Barr encoded RNA*), o antígeno nuclear do Epstein-Barr (EBNA, *Epstein-Barr nuclear antigen*) e antígenos proteicos latentes da membrana que mantêm o genoma do EBV dormente nas células B imortalizadas. Linfócitos T $CD8^+$ restringem a proliferação do EBV nessas células B infectadas cronicamente, no entanto, a reativação assintomática do EBV é comum e até 20% dos adultos saudáveis esporadicamente liberam o vírus infeccioso na saliva. No comprometimento da imunidade mediada por células (AIDS, transplantes de órgãos, doença linfoproliferativa ligada ao X), o EBV não consegue ser controlado e doenças francas (p. ex., leucoplasia pilosa oral e doença linfoproliferativa das células B e linfomas) podem ocorrer. O DNA e o EBER do EBV podem ser identificados pela técnica de amplificação do ácido nucleico no LCE de pacientes com linfoma primário do SNC e pela hibridização *in situ* (ISH, *in situ hybridization*) em receptores de transplante que desenvolvem doença linfoproliferativa de células B durante a terapia imunossupressora. O EBV também está ligado ao carcinoma nasofaríngeo em asiáticos e ao linfoma de Burkitt africano. Aparentemente, o EBV atua como um iniciador e, a seguir, fatores proliferativos (p. ex., coinfecção ou desregulação imune) levam ao processo maligno.

Diagnóstico sorológico

Na mononucleose infecciosa, linfócitos T citotóxicos e linfócitos apoptóticos circulam no sangue (Fisher, 1996). A linfocitose atípica (>10% de linfócitos totais) é relativamente insensível para o diagnóstico da mononucleose, mas apresenta uma especificidade de pelo menos 95%. O EBV pode ser cultivado em linhagens celulares linfoblastoides, mas a positividade não diferencia a infecção primária da reativação. A testagem sorológica é o principal método laboratorial para o diagnóstico da mononucleose infecciosa (Schooley, 2005). A proliferação de linfócito B policlonal da infecção aguda pelo EBV gera a produção transitória, mas usualmente inofensiva, de autoanticorpos comoa IgM anti-i (aglutinina fria), fator reumatoide e anticorpo antinuclear. Talvez as imunoglobulinas mais incomuns produzidas na mononucleose infecciosa sejam os anticorpos heterófilos de Paul-Bunnel. Esses anticorpos da classe IgM apresentam uma afinidade por eritrócitos ovinos, equinos e bovinos e não são direcionados contra qualquer antígeno do EBV. Aparentemente, eles são anticorpos randômicos produzidos durante a proliferação policlonal de linfócitos B induzida pelo EBV. Eles aparecem durante a primeira semana da mononucleose infecciosa, diminuem durante o período de convalescença e, comumente, tornam-se indetectáveis em 3 a 6 meses. Durante a doença do soro e, ocasionalmente, em outras infecções virais, vários anticorpos heterófilos são produzidos, entretanto, o anticorpo heterófilo com forte afinidade por antígenos do eritrócito bovino inalterada pela adsorção com antígeno de rim de cobaia (teste diferencial de absorção) é específico para a mononucleose infecciosa aguda. Vários testes comerciais misturam diretamente o soro do paciente em uma lâmina com uma suspensão de antígeno de rim de cobaia seguido pela adição de antígeno preservado de eritrócito equino ou bovino, frequentemente ligado a partículas de látex. A aglutinação ocorre quase que imediatamente se o anticorpo heterófilo da mononucleose infecciosa estiver presente. Testes rápidos de aglutinação e modificações da fase sólida são aproximadamente 80 a 90% sensíveis, com uma taxa de falso-positivo inferior a 2% e um valor preditivo positivo de 95% ou mais, e são considerados excelentes testes rápidos (Farhat, 1993; Linderholm, 1994; Gerber, 1996; Rogers, 1999). A sua principal limitação é a sensibilidade: o anticorpo heterófilo está presente em mais de 90% dos adolescentes e adultos e em menos de 40% em crianças mais jovens com mononucleose infecciosa.

Quando a infecção primária pelo EBV evolui para a fase de latência, vários antígenos do EBV se expressam sequencialmente e os anticorpos específicos gerados são marcadores valiosos do estágio da infecção. O antígeno do capsídeo viral (VCA, *viral capsid antigen*) é produzido durante a infecção lítica aguda. O anticorpo IgM anti-VCA é um marcador específico e sensível da infecção primária aguda pelo EBV. A IgG anti-VCA usualmente está presente no início dos sintomas e persiste por toda a vida. Os antígenos precoces (DNA polimerase e timidina quinase) são produzidos durante a infecção aguda e a replicação ativa do EBV. O anticorpo anti-EA-D está presente na infecção recente, mas o anticorpo EA-R é um marcador tardio persistente. Quando a mononucleose infecciosa desaparece, uma pequena porcentagem de linfócitos B com EBV imortalizado escapa à destruição imune e retém de maneira latente o DNA do EBV como um episssomo circularizado. O EBNA é responsável pela duplicação e sobrevida desse episssomo. Por essa razão, a produção de IgG anti-EBNA tipicamente ocorre após a resolução da infecção aguda pelo EBV.

Os padrões sorológicos encontrados nos vários estágios da infecção pelo EBV são sumariados na Tabela 54.4. Ensaios sorológicos imunofluorescentes utilizam linhagens celulares linfoblastoides com a produção de EBV interrompida em estágios específicos para a expressão de antígenos específicos. Os métodos imunofluorescentes são sensíveis e específicos, mas apresentam certa subjetividade interpretativa. Os

Tabela 54.4 Perfis sorológicos na infecção pelo vírus Epstein-Barr

Interpretação	Anticorpos heterófilos (IgM)	VCA (IgM)	VCA (IgG)	Antígeno precoce (IgG)	EBNA-1 (IgG)
Nunca infectado (sensível)	–	–	–	–	–
Infecção primária atual	+/– (50–85%)*	+ (70–100%)	+ (98–100%)	+ (60–80%)	– (0%)
Mononucleose infecciosa	++	++	++	++	–
Infecção primária recente	–/+	–/+	++	+	–
Infecção primária remota	–	–	++	+	+
Paciente imunocomprometido com ativação persistente	+/–	–/+	++	++	+/–

Perfis sorológicos atípicos podem exigir mais testes (teste de avidez VCA-IgG, *Western blot* ou reação de cadeia de polimerase) para avaliação.

* Resultados positivos são mais baixos em pacientes mais jovens.

EA = antígeno precoce; EBNA = antígeno nuclear de Epstein-Barr; VCA = antígeno do capsídeo viral

Fonte: adaptado de Hess RD: Minireview. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective still challenging after 35 years. J Clin Microbiol. 2004; 42:3381-87.

imunoensaios enzimáticos utilizando VCA purificado ou recombinante apresentam mais de 95% de sensibilidade e quase 100% de especificidade e têm a vantagem da interpretação objetiva e do processamento automático (Gerber, 1996; Chan, 1998; Tranchard-Bunel, 1999; Hess, 2004). A maioria dos médicos depende da demonstração de linfócitos atípicos no sangue periférico, teste heterófilo rápido e IgM e IgG anti-VCA para o diagnóstico da mononucleose infecciosa. Testes heterófilos quantitativos de referência em tubo e dosagens de IgG anti-EBNA e IgG anti-EA são procedimentos mais complexos do ponto de vista procedural e apresentam uma menor aplicabilidade prática.

Mononucleose infecciosa heterófila negativa

Dos muitos pacientes que apresentam um quadro clínico típico de mononucleose infecciosa, 70% ou mais apresentam um teste heterófilo positivo, identificando o EBV como a causa. Dos 30% que não apresentam anticorpo heterófilo, até 50% apresentam IgM anti-VCA, o que também confirma uma infecção aguda pelo EBV. Em aproximadamente 15% dos pacientes com mononucleose linfoproliferativa febril, uma infecção primária por *Toxoplasma gondii*, CMV, herpesvírus humano 6 (HHV6) ou HIV é demonstrada. Nos 5 a 10% restantes, nenhuma etiologia é estabelecida.

A toxoplasmose é discutida no Capítulo 61. O diagnóstico acurado é mais crítico na gestação, em indivíduos imunocomprometidos e na coriorretinite (Remington, 2004). A infecção primária pelo CMV adquirida na infância é usualmente assintomática, enquanto que adolescentes e adultos podem apresentar uma doença linfoproliferativa febril sistêmica (Wreghitt, 2003). O isolamento do CMV na saliva ou na urina não é útil porque a reativação e a liberação assintomáticas são muito comuns. A recuperação de CMV de leucócitos circulantes é válida e sensível, porém, é cara e longa para ser realizada em comparação com o diagnóstico sorológico. A pesquisa sorológica de IgM anti-CMV por método imunofluorescente é complicada pelo fato de as células substrato infectadas pelo CMV expressarem receptores para a porção Fc da imunoglobulina. O método imunofluorescente anticomplemento (ACIF, *anticomplement IFA*) é mais complexo, mas ele reduz erros falso-positivos. Imunoensaios enzimáticos para IgM-específico apresentam uma acurácia global que é comparável ao ensaio ACIF-IFA para IgM e apresenta menor variação interpretativa subjetiva (Smith, 1987; VanEnk, 1991; Roseff, 1993).

O HHV6 é outro vírus linfotrófico onipresente com afinidade pelas células T. Ele causa a roséola (exantema súbito), uma exantema febril comum em crianças de baixa idade (Braun, 1997; Zerr, 2005). A ocorrência de infecção primária após a infância está associada à mononucleose (Akashi, 1993). Tanto os métodos imunofluorescentes quanto os imunoensaios enzimáticos específicos para IgM podem diagnosticar a infecção aguda. O vírus pode ser identificado na saliva e no sangue pelo método PCR, mas este não é prático para o diagnóstico de rotina (Steeper, 1990; Chiu, 1998; Zerr, 2005).

A infecção pelo HIV1 pode produzir uma doença aguda que simula clinicamente a mononucleose infecciosa (Kessler, 1987). Até 50% dos pacientes desenvolvem febre, linfadenopatia, linfocitose atípica e, ocasionalmente, lesão hepatocelular ou meningoencefalite leve. O EIA padrão anti-HIV usualmente não detecta anticorpo IgG específico durante a fase inicial da infecção, mas a quantificação do HIV no plasma pelo método RT-PCR é tipicamente alta (10^5 cópias/mL) (Henrard, 1994). EIA, *Western blot* e imunofluorescência são testes que se tornam positivos para anticorpos anti-HIV em 1 a 3 meses, quando as características da infecção aguda desaparecem (Schupbach, 2003).

A Figura 54.7 apresenta um algoritmo da avaliação sorológica de um paciente com sintomas de mononucleose infecciosa. Apesar da testagem laboratorial abrangente para essas causas conhecidas de mononucleose, **nenhum** agente etiológico é identificado em 5 a 10% dos casos.

Síndrome da fadiga crônica

Tanto a impressa médica quanto a leiga discutiu longamente uma entidade clínica caracterizada por uma fadiga incapacitante persistente acompanhada por febre, faringite, linfadenopatia dolorosa, artralgias e mialgias (Holmes, 1987, 1988; Klonoff, 1992). Embora as características clínicas dessa síndrome sugiram uma causa infecciosa, até o momento nenhum agente etiológico foi claramente identificado. Relatos iniciais indicavam que o EBV, seja como infecção primária crônica persistente ou reativada, era responsável porque muitos pacientes apresentavam títulos elevados anti-EBV, anti-VCA e anti-EA, no entanto, os exames sorológicos não eram padronizados nem reproduzíveis e a cultura para EBV e a hibridização *in situ* realizada com saliva e leucócitos circulantes não mostraram diferenças entre pacientes com síndrome da fadiga crônica e controles normais. Alguns estudos sugeriram um papel para o CMV, *T. gondii*, HHV6 e HHV7 e o vírus da leucemia de células T humana (HTLV), mas outros relatos não conseguiram confirmar um papel causal (Gold, 1990; Reeves, 2000). A testagem imunológica e sorológica não é útil para o diagnóstico ou prognóstico. A síndrome da fadiga crônica permanece sendo definida pelos sinais e sintomas clínicos e não pelos resultados de exames laboratoriais (Lloyd, 1998; Gantz, 2001).

Infecções virais congênitas e perinatais

O útero grávido é um meio isolado estéril que protege o útero contra a lesão microbiana externa. Bactérias da vagina materna que atravessam a barreira cervical com falhas causam infecções durante a gestação, mas a infecção materna também pode se disseminar pela via sanguínea até o feto através da placenta ou pode envolver o bebê diretamente

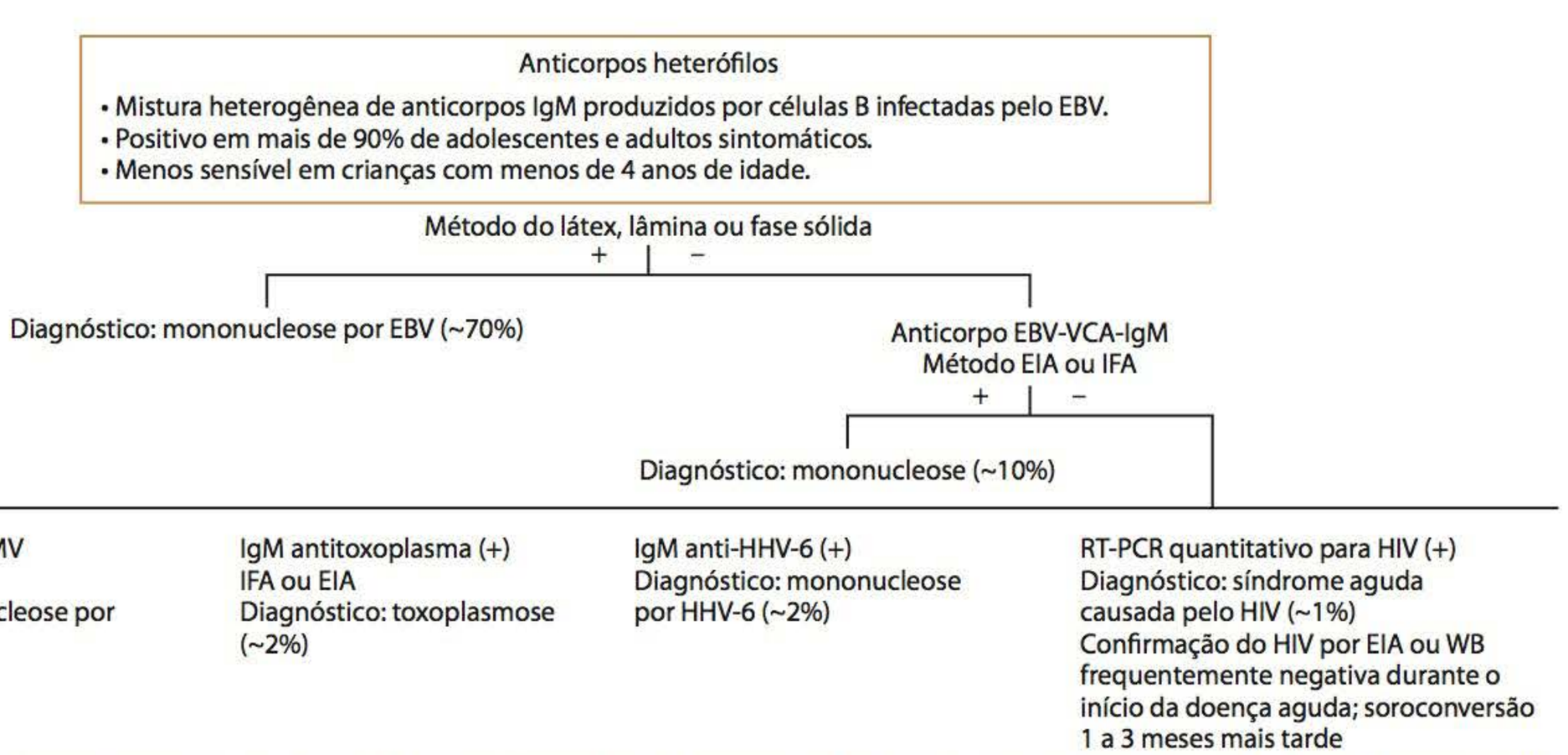


Figura 54.7 Avaliação sorológica de pacientes com sintomas clínicos de mononucleose infecciosa aguda e linfocitose atípica. Nenhum diagnóstico é estabelecido em 5 a 10% dos casos. CMV = citomegalovírus; CVA = antígeno do capsídeo viral; EBV = vírus Epstein-Barr; EIA = enzima imunoenzimática; HHV = vírus herpes humano; HIV = vírus da imunodeficiência humana; IFA = anticorpo fluorescente indireto; Ig = imunoglobulina; RT-PCR = reação da cadeia de polimerase da transcriptase reversa; WB = *Western blot*.

no momento do parto, quando ele for vaginal. Essas infecções perinatais são coletivamente denominadas infecções TORCH, indicando *to*xoplasma (ver Cap. 61), *r*ubéola, *c*itomegalovírus, *h*erpes simples vírus e outros microrganismos como o HIV, parvovírus, enterovírus e *Treponema pallidum* (ver Cap. 58). Infecções por esses agentes podem ser silenciosas ou causar apenas sintomas menores na mãe. Contudo, o sistema imune fetal imaturo não produz uma resposta celular ou humoral efetiva e a necrose tissular pode ser grave ou mesmo fatal.

O diagnóstico de infecções perinatais está centrado em duas questões: identificação de infecção materna aguda (particularmente infecção primária) e verificação do envolvimento do feto ou neonato. A infecção materna é melhor estabelecida pela recuperação do microrganismo suspeitado, mas para muitos deles isso não é prático e a demonstração sorológica de anticorpo IgM específico, embora imperfeita, é o teste diagnóstico de primeira linha. A infecção materna cruza a placenta em 30 a 60% dos casos. A ultrassonografia pode detectar lesão orgânica fetal (microcalcificações, microcefalia, hidrocefalia, visceromegalia, hidropsia etc.), mas a recuperação do microrganismo por meio de cultura, a demonstração de seu antígeno ou genoma no sangue ou tecidos fetais ou a detecção de anticorpo específico é necessária para confirmar a infecção fetal. A seleção de testes para diagnóstico de infecções perinatais e congênitas comuns é resumida na Tabela 54.5. A triagem de rotina de todas as gestantes para avaliação da imunidade contra a rubéola é uma conduta padrão, contudo a pesquisa de anticorpos contra toxoplasma, HSV e CVM não é aconselhada. Métodos sorológicos de pesquisa de IgM em particular podem apresentar variações inter- e intralaboratoriais, com erros falso-positivos e falso-negativos. Os ensaios para detecção de IgG não diferenciam a infecção materna primária da recorrente ou latente, e não podem prever o envolvimento fetal. Os testes devem ser reservados para mães com suspeita de infecção.

Citomegalovírus

O CMV é a infecção intrauterina mais comum e afeta 1% dos neonatos norte-americanos. Aproximadamente 90% desses lactentes são assintomáticos ao nascimento. O isolamento do CMV na urina ou na saliva ou a detecção de IgM anti-CMV pode ser o único indicador de infecção congênita. Os 10% sintomáticos podem apresentar icterícia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Aproximadamente 10% deles morrerão e o restante apresentará sequela neurológica permanente. A infecção primária por CMV na mãe é frequentemente virêmica, com risco de infecção fetal hematógena transplacentária e lesão tissular pré-natal (Stagno, 1982; Revello, 2002). A reativação da infecção por CMV na mãe também pode atravessar a placenta, no entanto o anticorpo IgG anti-CMV materno também a atravessa e é de um certo modo protetor. Essas crianças usualmente são assintomáticas, mas 5 a 15% apresentam perda auditiva neurossensorial ou dificuldades neurodesenvolvimentais (Istas, 1995). A reinfecção materna com uma nova cepa de CMV apresenta um maior risco de causar infecção congênita sintomática (Boppana, 2001).

Ensaios IgM-específicos passaram da fixação de complemento, imunoensaio com fluorescência de anticorpos e imunoensaio com fluorescência de anticorpos anticomplemento para imunoensaios enzimáticos que utilizam antígenos recombinantes do CMV refinados e captura de IgM para melhorar a especificidade e sensibilidade. A IgM pode persistir por mais de 3 meses em pelo menos um terço das mulheres adultas, obscurecendo um pouco o valor interpretativo de um resultado positivo durante a gestação. O teste de avidez de IgG para CMV também pode ser útil na diferenciação de infecção recente versus infecção remota, similar à avaliação da sorologia para toxoplasma na gestação (Revello, 2002; Remington, 2004). A identificação da viremia por CMV em uma gestante não imunocomprometida por meio da cultura em *shell vial* de leucócitos do sangue periférico ou a detecção da antigenemia de pp65 do CMV ou do DNA do CMV por PCR no sangue é uma evidência conclusiva de infecção primária materna. Entretanto, estima-se que o risco de envolvimento fetal seja de aproximadamente 40% e nenhum teste realizado na mãe pode prever acuradamente a infecção fetal.

Os testes pré-natais mais confiáveis para verificar a infecção fetal são a cultura viral e a detecção por PCR do CMV no líquido amniótico, as quais apresentam uma sensibilidade combinada de 75 a 92% (Revello, 2002). O vírus no líquido amniótico indica uma liberação abundante de um feto infectado e um resultado positivo apresenta uma especificidade de 100% para a doença. A detecção de IgM anti-CMV no sangue do cordão umbilical é menos sensível (55–60%) por causa do retardo da resposta imune fetal após a exposição. A pesquisa do DNA do CMV por PCR em sangue coletado por meio da cordocentese apresenta uma sensibilidade de 84%. A carga viral alta de CMV no líquido amniótico foi proposta como um indicador da gravidade da lesão tissular fetal.

A detecção de IgM anti-CMV no sangue do cordão coletado no momento do parto também é diagnóstica, mas apresenta resultado falso-negativo em 30% dos casos (Fowler, 1992). A recuperação do CMV por meio de cultura ou de PCR da urina, saliva, LCE ou sangue do neonato também é muito sensível. A sensibilidade da detecção do DNA por PCR é de quase 100%. Amostras devem ser coletadas durante as 2 primeiras semanas após o nascimento para se evitar a confusão com a infecção adquirida no período pós-natal (Nelson, 1995; Revello, 2002). Não existe um valor preditivo definido para a monitoração da carga viral. Inclusões nucleares típicas do CMV em preparações citológicas urinárias são específicas, mas muito insensíveis. Mesmo o material de autópsia pode apresentar algumas células diagnósticas remanescentes quando a necrose tissular for avançada.

Rubéola

A rubéola (sarampo alemão) é altamente transmissível e produz febre leve e erupção cutânea transitória em crianças e adultos. Todas as infecções são virêmicas e a disseminação transplacentária durante o primeiro trimestre de gestação produz malformações cardíacas, oculares e encefálicas teratogênicas devastadoras (Schluter, 1998). A rubéola não é mais endêmica nos Estados Unidos por causa da vacinação generalizada. A análise do genoma demonstra que os casos de rubéola mais recentes são importados da América Latina. A investigação pré-natal de rotina é uma prática padrão. Somente quatro casos de infecção congênita foram identificados desde 2001, três dos quais em mulheres imigrantes (MMWR, 2005). Havendo suspeita de rubéola aguda em gestante, o método diagnóstico mais direto é a pesquisa de IgM antirrubéola no soro materno por EIA ou imunoensaio com fluorescência de anticorpos (IFA). A cultura para rubéola é tecnicamente complexa e não está disponível rotineiramente. O método RT-PCR para o RNA do vírus da rubéola em líquido amniótico é 100% sensível e específico e também pode ser realizado em tecido placentário e tecidos de autópsia (Revello, 1997; Mace, 2004). O neonato infectado congenitamente é IgM-positivo e também excreta o vírus na urina por meses ou anos.

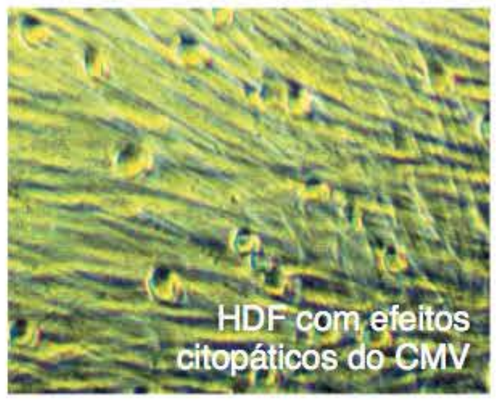
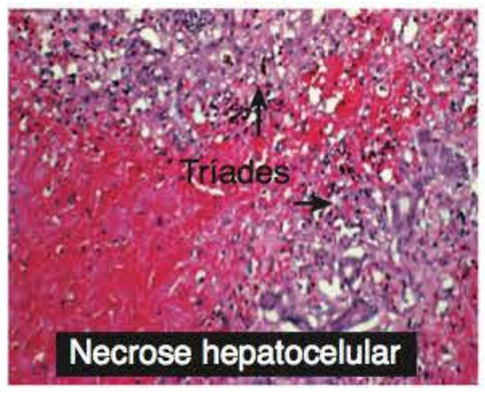
Vírus herpes simples

A aquisição primária do HSV genital durante a gestação apresenta um alto risco de corioamnionite herpética ascendente com aborto espontâneo, trabalho de parto prematuro e exposição mucocutânea da criança durante o parto vaginal (Brown, 1987). É a infecção genital primária por HSV, em vez das recorrências, que coloca o bebê em grande risco por duas razões: o número total de lesões é frequentemente maior na infecção primária e o soro materno contém IgM, mas pouca ou nenhuma IgG para a proteção transplacentária passiva do bebê (Prober, 1987).

A apresentação da maioria dos bebês durante o trabalho de parto é de vértice, de modo que o couro cabeludo e a face são os primeiros a entrar em contato com o HSV no trato materno. A exposição da parede torácica e das nádegas ao vírus ocorre no parto com apresentação pélvica. Vesículas se formam onde a pele e as membranas mucosas são diretamente inoculadas com vírus. Como a resposta imune do neonato ainda é imatura, uma fonte importante para o bebê modificar a infecção é a IgG materna contra o HSV. Quando essa proteção passiva está ausente, a replicação viral e a disseminação visceral podem progredir sem controle (Whitley, 1988). As mucosas conjuntival e oral e lesões cutâneas comumente são riscas em vírus. Se ocorrer disseminação, qualquer víscera pode ser infectada.

A conduta obstétrica é baseada em vários achados. A cultura de rotina para HSV de todas as gestantes ou neonatos no momento do parto apresenta um resultado positivo em 0,2% e não é recomendada (Prober, 1988). Culturas de controle pré-natal do HSV com herpes genital recorrente comprovado não consegue prever quais gestantes irão liberar o vírus no momento do parto (Arvin, 1986). Estudos de mulheres que apresentaram o primeiro episódio comprovado de herpes genital durante a gestação demonstraram que metade delas

Tabela 54.5 Teste laboratorial para infecções congênitas e perinatais

Patógeno	Sorologia materna	Cultura, ensaio para antígeno, amplificação do ácido nucleico	Sorologia fetal ou para o neonato
Citomegalovírus 	IgM EIA Avidez para IgG	Cultura para CMV: sangue materno Cultura para CMV: urina, saliva, sangue, tecidos (2 primeiras semanas) do neonato Inclusões nucleares do CMV: tecidos PCR para CMV: líquido amniótico, sangue do cordão umbilical intraútero PCR para CMV; sangue do recém-nascido, tecidos	IgM EIA
Herpes simples vírus	IgM (EIA) para HSV1 e HSV2 (glicoproteína G)	PCR ou cultura para HSV: conjuntiva, mucosa oral, pele, LCE do neonato Inclusões nucleares do HSV: tecidos do neonato, lesões cutâneas	IgM EIA ou IFA
		Sonda amplificada: LCE, sangue, tecidos, material de orofaringe do neonato Cultura para enterovírus: sangue, LCE, tecidos, fezes, material de orofaringe do neonato Solicitar tipagem do enterovírus a laboratórios da saúde pública	
	IgM (EIA ou IFA) PCR para PB19: sangue	PCR para PB19: sangue materno Inclusões nucleares virais em eritroblastos ISH em eritroblastos para PB19 PCR para PB19: placenta, tecidos fetais, sangue	IgM EIA
Vírus da hepatite B	HBsAg, HBc-IgM, anti-HBsAg	PCR quantitativa, vacinação e imunoglobulina para o neonato	
Vírus da imunodeficiência humana	HIV (EIA e *Western blot*) Quantificação do RNA do HIV	PCR para DNA do HIV no neonato RT-PCR para o RNA do HIV após 3 meses de idade	Monitorar o HIV por EIA para possível soroconversão (6–18 meses)
Rubéola	IgM (EIA ou IFA)	Cultura para rubéola: urina do neonato RT-PCR para rubéola: líquido amniótico, placenta, tecido fetal ou do neonato	IgM EIA ou IFA

CMV = citomegalovírus; HBc = antígeno do *core* do vírus da hepatite B; HBsAg = antígeno de superfície do vírus da hepatite B; HIV = vírus da imunodeficiência humana; HSV = herpes-vírus simples; IFA = ensaio por imunofluorescência indireta; Ig = imunoglobulina; ISH = hibridização *in situ*; PCR = reação de cadeia de polimerase.

apresentavam herpes genital primário verdadeiro e elas apresentavam uma alta taxa de complicações (amnionite herpética, trabalho de parto prematuro, infecções neonatais graves). Quase cinquenta por cento das mulheres que adquiriram a infecção primária pouco antes do trabalho de parto tiveram filhos gravemente afetados (Brown, 1997). Mães com herpes genital recorrente apresentam uma taxa muito mais baixa de infecção neonatal, com envolvimento limitado a sítios mucocutâneos e sem disseminação visceral (Brown, 1987, 1991).

É uma prática aceita que mulheres em trabalho de parto com lesões genitais suspeitas de serem herpéticas sejam submetidas à cesariana pa-

ra prevenir uma possível exposição do bebê. Mulheres com história de herpes genital recorrente podem ter um parto vaginal se não houver lesões ativas, mas a monitoração clínica cuidadosa dos neonatos (incluindo cultura para HSV das mucosas conjuntiva e oral e de qualquer lesão cutânea suspeita) é justificada. A infecção herpética neonatal pode ser silenciosa por até vários dias antes da doença se manifestar. Apesar da terapia antiviral, a infecção disseminada é frequentemente fatal. Lactentes com infecção restrita ao sistema nervoso central que sobrevivem sempre apresentam um retardo mental grave.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HSV foi discutido anteriormente. A sorologia tipo-específica do HSV atualmente está disponível e pode identificar mulheres soronegativas com parceiros soropositivos, enfatizando o risco de aquisição da doença durante a gestação (Ashley, 1999; Cherpes, 2003). A citologia de Tzanck e ensaios rápidos de antígeno são frequentemente positivos para lesões vesiculares, mas não podem substituir a cultura (a qual fornece um resultado positivo em 24 horas, especialmente quando *shell vials* são utilizados). A identificação do DNA do HSV por PCR no soro do neonato, LCE e lesões mucocutâneas apresenta uma maior sensibilidade que a cultura e é particularmente valiosa para a detecção do vírus no LCE e para o acompanhamento da terapia em bebês sabidamente com envolvimento do SNC (Kimberlin, 1996, 2004).

Vírus da imunodeficiência humana, parvovírus, enterovírus e vírus da hepatite B

O HIV pode disseminar-se pela via hematogênica e infectar o feto, com trofoblastos placentários e macrófagos de Hofbauer atuando como reservatórios celulares. Entretanto, aproximadamente 75% das infecções perinatais são adquiridas durante o trabalho de parto, quando o bebê é exposto ao sangue materno. O risco perinatal de aquisição do HIV varia de 13 a 45%, dependendo da carga viral de HIV1 da mãe, mas a taxa de transmissão cai para menos de 2% mediante a administração de drogas antivirais à mãe durante a gestação e o parto, bem como para o neonato (Watts, 2002). O HIV também é transmissível no pós-parto, em leucócitos no leite materno.

O diagnóstico de infecção materna pelo HIV é direto (EIA positivo para o anticorpo anti-HIV com confirmação pelo método de *Western blot*). A triagem de rotina é fortemente recomendada no primeiro trimestre da gestação e gestantes soropositivas devem receber profilaxia antiviral. A IgG materna atravessa a placenta e persiste no sangue da criança por até 15 meses, de modo que os imunoensaios enzimáticos padrões para o HIV não podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção neonatal. Variações do EIA e do *Western blot* para a detecção de anticorpos IgM e IgA (nenhum deles transferido passivamente para o feto e ambos sendo produzidos pelo bebê) podem identificar acuradamente um bebê infectado. A sensibilidade depende da idade e a testagem não é confiável nos primeiros três meses de vida. O ensaio para o antígeno p24 do HIV também apresenta uma sensibilidade aquém da ideal durante o período pós-natal imediato (Quinn, 1991; Sison, 1992). Se a infecção tiver ocorrido no útero, o sangue do neonato é positivo para o DNA do HIV que foi transcrito e integrado nas suas células linfoides circulantes. A pesquisa do DNA do HIV por PCR apresenta uma sensibilidade diagnóstica superior a 95% no primeiro mês de vida (Rogers, 1989; Bremer, 1996). A pesquisa do DNA do HIV por RT-PCR resulta positiva ao nascimento se o bebê tiver sido infectado pela via transplacentária e se torna positiva em algumas semanas quando ele tiver sido infectado durante o trabalho de parto. Este exame também é utilizado para a monitoração quantitativa para avaliar a resposta do bebê à terapia antirretroviral.

O parvovírus B19 (PB19) causa um eritema infeccioso exantemático infantil benigno e autolimitado (quinta doença) (Heegaard, 2002; Young, 2004). Aproximadamente 50% das mulheres jovens são soronegativas e a infecção durante a gestação apresenta um risco de 25% de infecção fetal. A estimativa de morte fetal varia de 2 a 38% (Alder, 1993). O PB19 tem como alvo células progenitoras eritroides. A citotoxicidade virótica causa anemia fetal, hidropsia e morte intrauterina (Anand, 1987; Tolfvenstam, 2001). Eritroblastos infectados apresentam inclusões nucleares tipo *ground-glass*. O parvovírus apenas pode ser cultivado em medula óssea humana contendo células precursoras eritrocitárias. A infecção aguda é diagnosticada sorologicamente por meio da detecção de IgM específica no sangue materno ou fetal ou pela detecção do DNA viral por meio da hibridização *in situ* ou PCR no líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical (Bruu, 1995; Zerbini, 1996).

A infecção por enterovírus é muito comum, com 10 milhões ou mais casos anuais nos Estados Unidos. Muitas infecções por enterovírus são virêmicas. A infecção materna pouco antes do parto dissemina o vírus ao feto através da placenta e o bebê nasce com vírus disseminado, mas sem anticorpo IgG materno adquirido passivamente para modificar a infecção. Epidemias nosocomiais com o pessoal do berçário como fonte do vírus também foram relatadas. O vírus ECHO 11 é particularmente virulento, causando necrose hepatocelular e meningoencefalite que é frequentemente fatal. Vírus Coxsackie B podem produzir lesão miocárdica neonatal (Bryant, 2004). A infecção perinatal por outros enterovírus usualmente é benigna. Os métodos RT-PCR, NASBA e amplificação do ácido nucleico que detectam uma sequência comum presente em todos os enterovírus apresentam uma sensibilidade excelente, superior à cultura padrão (Abzug, 1995; Landry, 2003). O vírus ECHO cresce bem em culturas em *shell vial* e em tubos padrões (linhagens celulares PMK, HDF e RD). Amostras adequadas para a cultura viral incluem o sangue neonatal, LCE, *swab* de orofaringe e anal ou tecidos em casos fatais. A tipagem do enterovírus geralmente pode ser obtida por meio de laboratórios de saúde pública regionais ou nacionais (americanos) (Modin, 1986).

A infecção materna pelo vírus da hepatite B é frequentemente transmitida verticalmente. O bebê pode ser infectado via transplacentária ou durante o parto com a exposição ao sangue materno. A investigação do antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg) é a investigação pré-natal padrão. Se a investigação materna for positiva, o neonato deve receber imunoglobulina antivírus da hepatite B (HBV) imediatamente após o nascimento com a primeira dose da vacina contra hepatite B (Poland, 2004).

Meningite e encefalite viral

Anualmente, vários milhares de infecções virais do sistema nervoso central ocorrem nos Estados Unidos com variação considerável da morbidade e da mortalidade. O diagnóstico laboratorial acurado e rápido ajuda no tratamento do paciente e é importante para intervenções da saúde pública para controlar insetos vetores de arbovírus e investigar fontes de transmissão aquáticas. A proliferação viral nas meninges que recobrem o encéfalo induz a inflamação aguda com febre, cefaleia, rigidez nucal e pleocitose no LCE. Na encefalite, o vírus replica no parênquima encefálico; a inflamação e a necrose tissular podem ser difusas ou podem produzir lesão expansiva com efeito de massa. Muitos vírus estão associados à meningite ou à encefalite, mas é comum a sobreposição de lesões com envolvimento de ambas as regiões anatômicas (meningoencefalite), particularmente na infecção por arbovírus (Fig. 54.9).

A encefalite viral não é incomum nos Estados Unidos. A média relatada de casos anuais é de aproximadamente 2000. O diagnóstico acurado é limitado pelo fato de alguns vírus neurotrópicos serem delicados e exigirem métodos moleculares para a detecção. Arbovírus e HSV causam a encefalite mais aguda nos Estados Unidos. A encefalite por HSV geralmente é uma reativação do HSV1 latente que atinge a córtex cerebral através dos nervos olfatórios ou trigêmeos, produzindo uma grande massa necrótica. Anualmente, ocorrem aproximadamente 700 casos de encefalite herpética; o seu padrão é esporádico e não sazonal. A sua progressão é rápida e a sua mortalidade é alta, mas o diagnóstico precoce e o tratamento com aciclovir reduz a mortalidade e o nível de incapacidade permanente (Whitley, 1995; Mitchell, 1997).

Mosquitos são vetores para centenas de vírus neurotrópicos em todo o mundo, entretanto, somente cinco *arbovírus* são encontrados regularmente nos Estados Unidos: vírus da encefalite do Nilo ocidental, equino ocidental e oriental, St Louis e California-LaCrosse. O grupo dos arbovírus é heterogêneo e a transmissão pelo mosquito é o seu disseminador comum. As mais frequentes na América do Norte são as famílias dos flavivírus, togavírus e bunyavírus. Antes da epidemia do WNV (*West Nile virus*), o número anual de casos nos Estados Unidos variava de 100 a 2000. A doença atingia o pico quando a população de mosquitos era maior. A gravidade e a mortalidade são mais elevadas com o vírus equino oriental, o menos frequente do grupo (Calisher, 1994). A epidemia do WNV iniciou-se em 1999 em New York e, a seguir, foi dissemina-

da por aves infectadas da costa leste por meio da América e, em torno de 2004, atingiu todos os estados. O número total estimado de infecções humanas pelo WNV é atualmente de aproximadamente 1 milhão. Cerca de 200.000 pacientes apresentaram doença clínica com sintomas variando de uma febre simples até uma meningite, encefalite e paralisia polimielítica flácida. Incapacidades encefalíticas e paralíticas de longo prazo foram relatadas com muitas mortes (Nash, 2001; Petersen, 2004). A via típica de aquisição são as picadas de mosquitos, mas a transfusão sanguínea e o transplante de órgãos também são responsáveis por vários casos (Iwamoto, 2003; Pealer, 2003; Kleinman, 2005). Atualmente, investiga-se em doadores de sangue a presença de WNV por meio da amplificação do ácido nucleico, interrompendo efetivamente esse mecanismo de disseminação (Busch, 200). No momento da apresentação da doença do SNC, o WNV e muitos outros arbovírus frequentemente não podem ser cultivados no sangue ou no LCE. Por essa razão, o diagnóstico depende da pesquisa de IgM específica por EIA no LCE e no soro. A amplificação do ácido nucleico também pode ser realizada no LCE com o sequenciamento direto do vírus quando for necessário. Serviços públicos de saúde e laboratórios de referência oferecem uma gama de testes para arbovírus regionais comuns, mas centenas de arbovírus são endêmicos fora dos Estados Unidos (Ásia, África, América Latina e partes da Europa Oriental). A testagem da infecção por arbovírus em viajantes está disponível em laboratórios da saúde pública. Deve-se fornecer uma história detalhada da viagem e informações clínicas com amostras de sangue, LCE ou de tecidos que serão submetidos à cultura, detecção de ácido nucleico ou diagnóstico sorológico (Fig. 54.9). Informações atuais sobre a atividade global dos arbovírus e o risco para os turistas estão disponíveis no site www.cdc.gov/travel.

Existem mais de 60 enterovírus, alguns dos quais causam encefalite (Coxsackie e echovírus). A poliomielite paralítica causada pela necrose de neurônios motores da medula espinal ou do tronco cerebral produzida pelo poliovírus foi eliminada na maior parte do mundo, com doença residual na África e na Ásia. O vírus da raiva viaja via fibras nervosas diretamente ao SNC e produzem lesão encefálica necrotizante. Cepas de morcego e não caninas são responsáveis pela maioria dos casos nos Estados Unidos. Uma epidemia recente foi rastreada e chegou a um órgão transplantado de um doador que morreu de raiva não diagnosticada (Plotkin, 2000; Smith, 2003; MMWR, 2004). O sarampo, a parotidite, a mononucleose e a varicela raramente complicam com encefalite aguda (Cherry, 1998). O HHV6 também produz lesão encefálica focal (Issacson, 2005). A replicação do HIV nas células gliais do SNC podem causar demência progressiva na AIDS avançada (Atwood, 1993). Infecções encefálicas necrotizantes oportunistas com destruição da oligodendrócitos pelo HSV, CMV, VZV e JC poliomavírus também podem ocorrer em indivíduos imunocomprometidos e são analisadas abaixo.

Os enterovírus causam 75% das meningites virais nos Estados Unidos e geralmente causam uma doença relativamente benigna e transitória. Os enterovírus disseminam-se rapidamente de pessoa a pessoa por via orofecal e apresentam uma sazonalidade distinta, com epidemias anuais ocorrendo no outono e inverno (Fig. 54.6). A maior parte das infecções diagnosticada clinicamente ocorre em crianças. A meningoencefalite grave crônica pode ocorrer em pacientes com hipogamaglobulinemia. Qualquer infecção do SNC por enterovírus com encefalite é mais virulenta e pode deixar sequelas permanentes (McKinney, 1987). A infecção aguda pelo HIV ocasionalmente produz inflamação meníngea aguda (Schupbach, 2003). Cerca de 1% das infecções genitais primárias por HSV2 é acompanhado de meningite transitória. O HSV2 é a principal causa da meningite linfocítica benigna recorrente de Molllaret. A parotidite, o sarampo e infecções por adenovírus raramente causam meningite aguda.

Diagnóstico laboratorial

A ampla avaliação laboratorial da doença viral do SNC está além do escopo da maioria dos hospitais. Um plano simplificado para a realização de testes passo a passo, baseado no quadro clínico, pode coordenar a execução dos testes internos por meio do uso eficiente de laboratórios de referência e do serviço público (Fig. 54.9). No caso de pacientes imunocomprometidos, o teste inicial do líquido espinal/biópsia cerebral utilizando a amplificação de ácido nucleico para HSV e enterovírus, adicionado de cultura viral, pode ser acompanhado da realização de testes de detecção de IgM no soro e no LCE para os arbovírus sazonais regionais prevalentes. Quando houver indicação clínica, o LCE mantido a –20°C com o soro da fase aguda e o da fase de convalescença pode ser encaminhado para realização de testes mais detalhados para detecção de arbovírus, bem como de cultura e novos ensaios de amplificação de ácido nucleico para as causas menos comuns de meningite ou encefalite viral. A epidemia de WNV de 1999 foi rapidamente identificada por causa dos esforços combinados e coordenados entre laboratórios hospitalares e governamentais (MMWR, 1999). Apesar de uma investigação detalhada, a não identificação de uma causa infecciosa para a encefalite é frequente (Glaser, 2003).

Pacientes imunocomprometidos podem apresentar doença do SNC causada pelos mesmos vírus que afligem um hospedeiro saudável. Várias infecções virais oportunistas também podem causar comprometimento do SNC. O JC poliomavírus, CMV, VZV e HSV podem causar doença do SNC. O linfoma linfocítico de célula B quase sempre está relacionado à infecção pelo EBV. A pesquisa de EBV por PCR no LCE diagnostica o linfoma do SNC. As técnicas de ampliação do ácido nucleico disponíveis são mais sensíveis que a cultura ou a microscopia eletrônica e pode ser realizada no LCE e no tecido de biópsia encefálica (Koralnik, 2005).

A abordagem mais prática para o diagnóstico de encefalite viral é a amplificação do ácido nucleico contido no LCE. As identificações do enterovírus por RT-PCR e do HSV, VZV, EBV, CMV e HHV6 por PCR são mais sensíveis que a recuperação viral por meio de cultura celular do LCE ou de tecido encefálico. Vários ensaios caseiros e sistemas comerciais foram desenvolvidos (Abzug, 1995; Domingues, 1998; Tang, 1999a; Landry, 2003; Romero, 2003; DeBiasi, 2004). A investigação preliminar de aumento de proteínas e pleocitose no LCE é aconselhável pois os herpesvírus raramente são identificados quando a dosagem de proteínas e a contagem celular forem normais (Tang, 1999a). A biópsia encefálica ainda é realizada ocasionalmente, usualmente quando existe suspeita de tumor ou de infecção não viral (Whitley, 1989). Uma biópsia de 0,5 cm^3 é suficiente para o exame anátomo-patológico, *imprint* para exame direto, amplificação do ácido nucleico e cultura para todos os microrganismos infecciosos. O isolamento do HSV na cultura celular foi discutido anteriormente. A recuperação de outros vírus também deve ser tentada, de modo que a amostra deve ser inoculada em todas as linhagens celulares que o laboratório possuir. *Imprints* corados com reagentes DFA podem demonstrar a presença de células infectadas pelo HSV. Alguns arbovírus e enterovírus requerem inoculação animal para replicação. Quando necessário, o tecido deve ser congelado a –20°C e a amostra deve ser encaminhada para um laboratório da saúde pública ou de referência.

Os enterovírus são os agentes mais comuns de meningite asséptica aguda. Os NAATs (RT-PCR e NASBA) são o padrão-ouro para a identificação de enterovírus no LCE com resultados de 128 a 142% em comparação com a recuperação em cultura celular (Rotbart, 1994, 1997; Kessler, 1997; Romero, 1999; Landry, 2003). São necessários 10 a 100 μl de LCE para a RT-PCR. O teste de microtitulação simplificado reduziu o tempo de espera para 6 horas. Várias linhagens tissulares (PMK, HDF, HEp-2, RD e *buffalo green monkey*) suportam o crescimento de muitos enterovírus e também do HSV, VZV, vírus do sarampo, vírus da parotidite e adenovírus. A cultura híbrida de *E-mix* em *shell vial* também é uma excelente opção para cultura de enterovírus e outros agentes relacionados (Huang, 2002). Em cada tubo ou *shell vial* deve ser inoculado diretamente 0,1 a 0,2 mL de LCE, sem atraso. Os efeitos citopáticos do enterovírus começam como uma alteração picnótica focal com arredondamento celular que, a seguir, progride rapidamente através da monocamada celular (Fig. 54.8). Os efeitos citopáticos são identificados em 4 dias em até 69% das culturas positivas. Monocamadas em *shell vial* ou tubos podem ser coradas com reagentes DFA para todos os tipos de enterovírus (Lipson, 2001). A tipagem específica de enterovírus está disponível nos laboratórios da saúde pública.

Exantemas e infecções cutâneas virais comuns

Muitos vírus visam principalmente a pele. Alguns infectam a epiderme escamosa via inoculação direta (herpes oral e genital, verrugas causadas pelo papilomavírus humano ou *molluscum poxvirus*), mas exantemas são causados por vírus que se disseminam pela via hema-

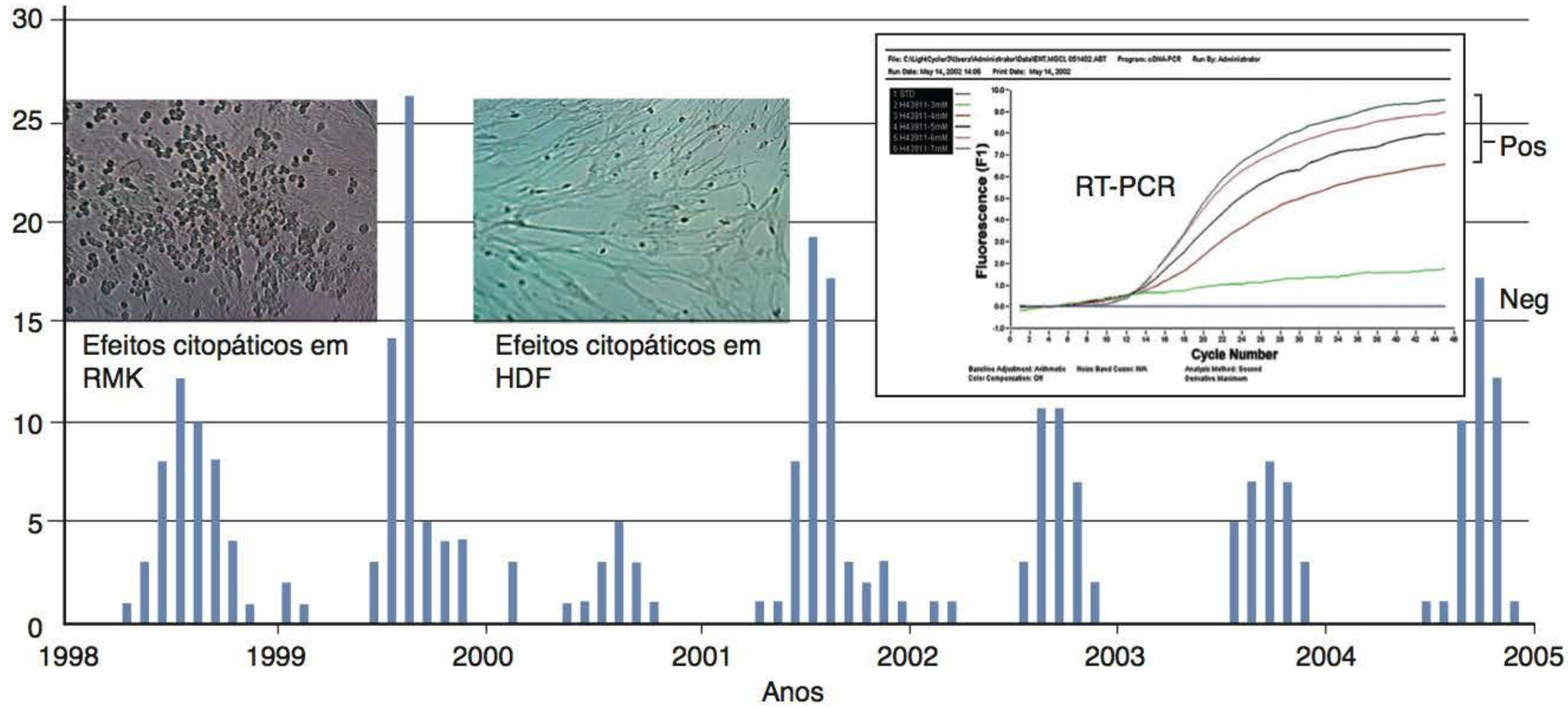


Figura 54.8 Detecção de enterovírus por efeitos citopáticos em culturas celulares e pela reação de cadeia de polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR). Variação sazonal com picos de atividade no tempo quente. HDF = fibroblastos diploides humanos; RMK = rim de macaco Rhesus. (Advocate Lutheran General Hospital, Park Ridge, IL).

togênica para a pele e membranas mucosas (VZV, sarampo, rubéola, enterovírus, parvovírus, HHV6) (Cherry, 1993). Muitos desses exantemas infantis benignos são diagnosticados clinicamente, sem investigação laboratorial, e podem ser prevenidos pela vacinação. Contudo, a cultura viral, a identificação de antígeno ou a confirmação sorológica podem ser úteis para definir a extensão da doença em casos graves, para que sejam aplicadas as medidas preventivas de controle de infecção em pacientes hospitalizados ou para selecionar a terapia antiviral adequada. Os procedimentos laboratoriais diagnosticados são apresentados na Tabela 54.6.

O VZV causa varicela (catapora) e herpes zoster. Na varicela, o VZV é disseminado por gotículas infectadas de aerossol respiratório, multiplica-se na nasofaringe e, em seguir, entra na corrente sanguínea e desloca-se até a pele (Arvin, 1996). A replicação no epitélio escamoso causa vesículas pruriginosas que evoluem rapidamente para úlceras, as quais acabam formando crosta e não deixam cicatrizes, de modo similar às lesões cutâneas causadas pelo HSV. Em crianças saudáveis, os sintomas sistêmicos são leves e as sequelas são raras. Nos adultos, gestantes, neonatos e pacientes imunocomprometidos, a doença geralmente é mais grave. Além das lesões cutâneas típicas, pode ocorrer

LCE ou tecido de biópsia encefálica em meio de transporte viral*

- Amplificação do ácido nucleico para HSV e enterovírus
- Cultura celular: inoculação de E-mix, HDF, PMK, rim de coelho, HEp-2, rabdomiossarcoma etc.
- LCE/tecido adicional, congelar a –20°C
- Coletar soro na fase aguda; congelar parte a –20°C
- Encaminhar LCE e soro da fase aguda ao laboratório da saúde pública para pesquisa de anticorpos IgM antivírus do Nilo Ocidental/arbovírus regionais

Diagnóstico estabelecido

(+) Teste de ácido nucleico amplificado para HSV ou enterovírus
(+) Isolamento de vírus em cultura de células
(+) WNV/IgM arbovírus regionais

Nenhuma infecção viral identificada – mais testes conforme indicado clinicamente

- Teste de ácido nucleico amplificado armazenado (–20°C) do LCE
- VZV, EBV, HIV, CMV, vírus JC etc.
- Coletar soro convalescente
- Consultar com a saúde pública/laboratório de referência; fornecer histórico clínico e de viagem. Enviar soros agudos e convalescentes pareados, bem como amostras congeladas de LCE/tecido para testes adicionais.

Meningite asséptica	Meningoencefalite/encefalite	Paciente imunocomprometido
• Enterovírus	• WNV, outros arbovírus regionais	• CMV, HSV, VZV
• WNV, outros arbovírus regionais	• HSV	• HIV
• HIV	• Enterovírus	• EBV
• HSV2	• EBV	• Vírus JC
• EBV	• Arbovírus associado a viagens	• Enterovírus
• Arbovírus associado a viagens	• VZV, sarampo, RSV, influenza, adenovírus	• HHV6
• Sarampo VZV, parotidite, adenovírus	• Raiva	

* Consulte a saúde pública/laboratório de referência para o volume de LCE necessário para todos os NAATs e sorologia ordenada. 0,5 cm^3 de tecido da biópsia geralmente é suficiente para gravação, cirurgia patológica, microbiologia abrangente e testes de ácido nucleico amplificado.

Figura 54.9 O diagnóstico laboratorial de meningite viral e encefalite. CMV = citomegalovírus; CSF = líquido cerebrospinal; EBV = vírus Epstein-Barr; HDF = fibroblastos da diploide humana; HHV = vírus herpes humano; HIV = vírus da imunodeficiência humana; HSV = vírus herpes simples; PMK = rim de macaco primário; RD = rabdomiossarcoma; RK = rim de coelho; RSV = vírus respiratório sincicial; VTM = meio de transporte viral; VZV = vírus varicela-zoster; WNV = vírus West Nile.

Tabela 54.6 Diagnóstico laboratorial de exantemas virais comuns

Exantema	Vírus	Cultura/ensaios para antígeno e ácido nucleico	Sorologia
Varicela/herpes zoster	Varicela zoster	Esfregaço de Tzanck Coloração DFA Cultura (a mais sensível é em *shell vial*), PCR*	IgM (EIA) (varicela) IgG (EIA) para avaliação da imunidade pós-varicela Testes comerciais de IgG anti-VZV não são confiáveis para documentar a imunidade pós-vacinação
Erupção cutânea por enterovírus (doença mão-pé-boca)	Enterovírus	Cultura, RT-PCR	
Sarampo	Sarampo	Cultura*	IgM (EIA ou IFA)*
Rubéola	Rubéola	Cultura*	IgM (EIA)*
Eritema infeccioso	Parvovírus B19		IgM (EIA ou IFA)*
Exantema súbito	HHV6	Cocultura em linfoblastos*	IgM (EIA)*
Condiloma anogenital	Papilomavírus	Captura híbrida amplificada; tipos de baixo/alto risco	
HSV	HSV1 e HSV2	Sonda amplificada, cultura, coloração DFA	Anticorpo específico antiglicoproteína gG1 e gG2G do HSV*

Se a varicela for considerada para um paciente com lesões vesiculares, contatar o serviço de saúde pública local para obter instruções específicas.

* Teste disponível em laboratórios de pesquisa e de referência.

DFA = imunofluorescência direta; EIA = enzima imunoenzimática; HHV = vírus herpes humano; HSV = vírus herpes simples; IFA = anticorpo fluorescente direto; RT-PCR = reação de cadeia de polimerase da transcriptase reversa; VZV = vírus varicela-zóster.

pneumonia e envolvimento visceral (Gershon, 1976). Após a resolução da varicela, a infecção latente pelo VZV estabelece-se em gânglios neurais sensoriais (Arvin, 1996). Quando ocorre reativação do vírus, o VZV dissemina-se dos gânglios trigeminal ou das raízes dorsais para a pele e produz vesículas cutâneas dolorosas com distribuição dermatomérica (herpes zoster). A herpes zoster é mais comum em idosos e indivíduos com imunocomprometimento. Quando ocorre em adolescentes e adultos deve-se suspeitar de infecção por HIV. Qualquer erupção vesicular que levanta a possibilidade de varicela deve ser imediatamente notificada ao serviço de saúde pública.

O líquido da vesícula é rico em vírus e é a amostra ideal para a cultura e a coloração DFA (Fig. 54.3). O VZV replica em linhagens celulares HDF. A cultura tradicional em tubo é lenta e não é sensível; a cultura em *shell vial* produz um melhor resultado (até 75%) e permite uma detecção mais rápida (Brinker, 1993). A coleta de amostra é idêntica à realizada para vesículas causadas pelo HSV (Fig. 54.4). O preparo da cultura também é similar ao preparo da cultura para herpes, entretanto, os tubos são mantidos por 2 semanas e as monocamadas de *shell vial* são coradas no terceiro e no quinto dias com reagente DFA para VZV. Os efeitos citopáticos do VZV ocorrem em linhagens celulares HDF como pequenas áreas de células arredondadas, aumentadas de volume e refrativas. Como o comportamento do VZV em cultura de tecido pode ser imprevisível, a coloração DFA de células da vesícula para o antígeno viral é o teste diagnóstico mais sensível, rápido e prático (Schrim, 1989). Ensaios de RT-PCR também foram desenvolvidos (Tang, 1999b; Weidmann, 2003).

Dos aproximadamente 70 sorotipos de enterovírus, vários produzem erupções vesiculares ou maculopapulares (Coxsackie B1 e A9 e echovírus 2, 4, 9, 11, 19 e 33), usualmente durante os meses de verão. A doença mão-pé-boca (Coxsackie A16) em crianças de baixa idade manifesta-se com vesículas na língua e nas regiões palmares e plantares. Os membros adultos da família de crianças infectadas ocasionalmente também desenvolvem doença sintomática. O diagnóstico laboratorial é limitado à cultura celular e à RT-PCR. Vesículas das regiões plantares e palmares devem ser completamente debridadas e as células escamosas expostas devem ser vigorosamente removidas com um cotonete. A identificação do enterovírus na cultura celular foi descrita anteriormente. A coloração DFA e a sorologia não são práticas para o diagnóstico de exantemas causados por enterovírus (Cherry, 1963; DeChamps, 1988).

O sarampo é altamente contagioso e manifesta-se com sintomas sistêmicos e respiratórios (febre, conjuntivite, coriza, lesões orais, tosse e erupções cutâneas eritematosas maculopapulares generalizadas). A vacinação diminuiu dramaticamente a incidência do sarampo, mas ele ainda persiste em países pobres. A morbidade e a mortalidade do sarampo são altas por causa da pneumonia e da desnutrição que acompanham o quadro. O vírus pode ser isolado da nasofaringe, mas a infecção aguda é mais facilmente diagnosticada sorologicamente por meio da detecção da IgM específica para o sarampo. A imunidade após a infecção natural presumivelmente é duradoura, verificada pela presença de IgG específica, no entanto, a imunidade após a vacinação pode desaparecer nos últimos anos de adolescência. A reinfecção que ocorrer nessa condição pode ser atípica e o diagnóstico sorológico é particularmente útil.

O parvovírus B19 causa eritema infeccioso (quinta doença), uma doença febril infantil comum com uma erupção cutânea maculopapular distinta que confere à face a aparência semelhante à produzida por um "tapa na bochecha" (Young, 2004). A infecção pelo PB19 em adultos frequentemente causa artralgias. O parvovírus infecta células precursoras eritroblásticas na medula óssea e pode provocar crise aplásica em pacientes com hemoglobinopatia ou infecção pelo HIV. A infecção primária durante a gestação pode causar aplasia eritrocitária fetal com hidropsia fetal. O diagnóstico laboratorial foi analisado anteriormente neste capítulo.

O vírus da rubéola causa o sarampo alemão, uma doença febril leve com uma erupção cutânea maculopapular transitória (Cherry, 1993). A infecção em crianças não tem consequência, embora a rubéola no adulto possa estar associada a artralgias. A única complicação séria da rubéola é a disseminação transplacentária ao feto, com o risco de malformação congênita. A infecção aguda é diagnosticada pela detecção de IgM vírus-específica. A verificação da condição imune é determinada pela pesquisa de IgG específica.

O HHV6, um vírus linfotrófico que infecta linfócitos, é a causa do exantema súbito (*roseola infantum*), uma doença comum no início da infância com febre alta e uma erupção cutânea maculopapular fugaz quando a febre diminui abruptamente (Salahuddin, 1986; Prober, 2005; Zerr, 2005). A infecção primária pelo HHV6 em crianças mais velhas e em adultos produz uma doença linfoproliferativa sistêmica febril que se assemelha à mononucleose aguda (discutida anteriormente). Ela pode causar pneumonite em pacientes imunodeprimidos (Cone, 1993). O diagnóstico laboratorial foi revisto anteriormente.

Os papilomavírus humanos são onipresentes e encontrados em todas as sociedades. Existem centenas de tipos de HPV definidos por sequências de DNA exclusivas e vários tipos de HPV têm como alvo diferentes locais cutâneos ou mucosos do corpo. A maioria das infecções cutâneas verrucosas das mãos e pés causadas pelo HPV são transitórias e sem consequência clínica. O intercurso sexual transmite tipos de HPV que estão associados à doença condilomatosa anogenital. Tipos de HPV de baixo risco geralmente provocam lesões proliferativas intraepiteliais escamosas de baixo grau que frequentemente desaparecem. A infecção por um tipo de HPV de alto risco apresenta uma probabilidade muito maior de infecção viral persistente do epi-

télio escamoso do colo uterino, vagina, vulva ou períneo, a qual pode evoluir para uma lesão intraepitelial displásica e progredir para um carcinoma escamoso invasivo ao longo do tempo. As características histopatológicas e citopatológicas de lesões causadas pelo HPV são bem descritas nos textos de patologia, entretanto, a detecção do HPV melhorou com o uso da amplificação do ácido nucleico. O método de amplificação do sinal de captura híbrida é mais amplamente utilizado e pode identificar tanto tipos de HPV de baixo quanto de alto risco na citologia cervical em meio líquido (Burd, 2003). Várias estratégias foram sugeridas para o uso eficiente da testagem adjuvante ou reflexa do HPV para maximizar a detecção e o acompanhamento do tratamento (Kim, 2003; Kulasingham, 2002; Wright, 2002).

Gastroenterite viral

A gastroenterite viral causa uma morbidade e uma mortalidade importantes no mundo, principalmente em crianças de baixa idade de países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, a enterite viral é raramente fatal, mas ela causa pelo menos 3 milhões de episódios anualmente e aproximadamente 200.000 hospitalizações pediátricas (Parashar, 1998). Os vírus responsáveis constituem um grupo diverso e todos são onipresentes. A diarreia grave incapacitante por rotavírus, adenovírus entéricos, calicivírus, astrovírus e coronavírus é bem confinada aos lactentes e crianças pequenas. Todos os tratamentos são suportivos (Thielman, 2004).

Os rotavírus causam a maioria dos casos de diarreia aquosa em lactentes e crianças pequenas nos Estados Unidos (Musher, 2004). Ocasionalmente, idosos internados em asilos apresentam infecções sintomáticas. A transmissão é fecal-oral. Epidemias ocorrem durante o tempo frio em climas temperados e durante o ano todo, nas regiões tropicais. A desidratação com desequilíbrio eletrolítico é a complicação mais séria. O rotavírus consegue sobreviver transitoriamente em superfícies inanimadas. Precauções de isolamento entérico devem ser implementadas para prevenir a disseminação nosocomial ou em serviços de *daycare* (p. ex., creches, asilos etc.).

Os sorotipos 40 e 41 do adenovírus estão associados à gastroenterite e são responsáveis por 10 a 20% dos casos pediátricos. A enterite por adenovírus é clinicamente similar à causada pelo rotavírus, mas sem sazonalidade. O coronavírus e o astrovírus têm causado epidemias hospitalares e em centros de *daycare* (Mitchell, 1993), gastroenterite leve em adultos e diarreia em pacientes com HIV (Grohmann, 1993).

O norovírus e os calicevírus morfologicamente relacionados (Sapporo, Hawaii, Snow Mountain etc.) causam gastroenterite aguda específica caracterizada por náusea e vômito que são mais intensos que a diarreia que os acompanha. O norovírus não possui envelope e consegue sobreviver em superfícies inanimadas assim como em água contaminada, frutos do mar e alimentos preparados. Ele foi identificado em várias epidemias comunitárias e nacionais e em epidemias em navios de cruzeiro e em centros de *daycare*. Todas as faixas etárias são vulneráveis, mas as crianças mais velhas e os adultos são as vítimas usuais (Hedberg, 1993; MMWR, 2001; Griffin, 2003).

Diagnóstico laboratorial

Os vírus que causam gastroenterite apresentam crescimento precário ou não crescem em linhagens celulares padrão. O diagnóstico tem sido baseado na morfologia específica de cada vírus, quando amostras de fezes apresentam coloração negativa por ácido fosfotúngstico e são examinadas ao microscópio eletrônico. Vírus podem ser identificados acuradamente por microscopia eletrônica (Petric, 2003), mas esse recurso não está disponível na maioria dos laboratórios. O diagnóstico de infecção por rotavírus tem maior relevância clínica. A técnica de aglutinação do látex e os imunoensaios permitem detectar com facilidade e acurácia o antígeno do rotavírus nas fezes. Todos os métodos apresentam uma especificidade excelente e o EIA é um pouco mais sensível (Thomas, 1994; Dennehy, 1999). O diagnóstico rápido é útil para formação de coortes de pacientes e na implementação de medidas de controle de infecção para conter a disseminação nosocomial. Havendo necessidade, já existe no mercado um EIA para a detecção de antígeno de adenovírus. EIA e RT-PCR, além dos estudos sobre genótipo-parentesco, foram desenvolvidos para o norovírus e outros vírus causadores de gastroenterite (Atmar, 2001; Burton-MacLeod, 2004; Pang, 2004). Os testes são realizados em laboratórios de saúde pública e são bastante úteis na avaliação de epidemias relacionadas a alimentos.

Hepatite viral e infecção retroviral

Muitos vírus são hepatotóxicos. O vírus da febre amarela e outros arbovírus hepatotróficos causam necrose hepatocelular maciça. Linfócitos T atípicos agregam-se no fígado e podem causar lesão hepática transitória durante a síndrome da mononucleose aguda causada pelo EBV, CMV, HHV6 e HIV. Adenovírus, HSV, VZV, CMV e outros vírus ECHO ocasionalmente produzem hepatite agressiva em indivíduos com imunocomprometimento (Hierholzer, 1992), entretanto, infecções pelos vírus das hepatites A, B, C, D e E caracteristicamente causam lesão hepatocítica lítica e são responsáveis pela maioria dos casos clínicos de hepatite infecciosa (Iwarson, 1992).

Os vírus das hepatites A (HAV) e E (HEV) não possuem envelope e a sua transmissão é fecal-oral. O tratamento inadequado de esgoto e as condições de vida em ambientes lotados constituem fatores ligados a epidemias transmissíveis pela água, sendo que o HAV é disseminado por meio de alimentos contaminados. O HAV é um picornavírus, distinto dos enterovírus, porém, relacionado a eles. Crianças em creches e instituições lotadas, assim como os profissionais que atuam nesses locais, apresentam maior risco de contrair hepatite A (Cuthbert, 2001; Iwarson, 1992; Emerson, 2004). Em crianças, a doença aguda é leve e frequentemente assintomática. Os adultos ocasionalmente desenvolvem infecção grave, mas a hepatite fulminante e a morte são raras. O marcador da infecção aguda mais prático é o anticorpo IgM. A recuperação é completa e não ocorre cronificação do estado infeccioso. Atualmente, existem vacinas contra o HAV (Craig, 2004). O HEV está relacionado aos calicevírus. Epidemias ocorrem em países em desenvolvimento e em campos de refugiados com condições sanitárias e de alimentação aquém das ideais, mas são raras em nações industrializadas. Adolescentes e adultos jovens são os mais comumente afetados. A mortalidade é rara, exceto em gestantes onde a taxa de mortalidade atinge 20% (Duff, 1998). O HEV não causa infecção crônica. O anticorpo IgG é produzido imediatamente e persiste indefinidamente em baixo título. A pesquisa de IgM específica é um teste confiável para a infecção aguda (Schlauder, 2003).

O HBV é facilmente transmitido pelo sangue e, classicamente, ele é adquirido por meio de transfusões, compartilhamento de agulhas ou lesão ocupacional com objetos pontiagudos contaminados. A infecção pode ser adquirida pela via placentária durante a gestação. O contato sexual e a exposição domiciliar ao vírus em líquidos corporais também são vias de disseminação importante. A infecção aguda é frequentemente sintomática, com grande parte da lesão hepática sendo causada pelos linfócitos T citotóxicos $CD8^+$. Um por cento dos indivíduos desenvolve necrose hepatocelular maciça fulminante fatal. O HBV também pode persistir como uma infecção crônica. Até 90% dos neonatos com HBV adquirido verticalmente tornam-se portadores crônicas em comparação com 25% das crianças infectadas e 10% dos adultos. Mesmo em infecções aparentemente resolvidas, o DNA do HBV persiste apesar da produção pelo hospedeiro de anticorpos contra o *core* e antígenos *e*. A lesão hepatocelular causada por células T progride na infecção crônica. A inflamação implacável progride para a cicatrização cirrótica em pelo menos 2% das infecções crônicas (Lok, 2002; Ganem, 2004). A cirrose induzida pelo HBV é um fator de risco para o carcinoma hepatocelular. A infecção pelo HBV e as sequelas são preveníveis. A vacinação de neonatos e crianças diminuiu significativamente a incidência de infecção crônica pediátrica e carcinoma hepatocelular (Chang, 1997; Poland, 2004). A resposta à terapia antiviral em pacientes com infecção crônica pode ser monitorada pela pesquisa da carga viral do HBV (Shyamala, 2004).

A coinfecção ou superinfecção pelo vírus da hepatite δ (HDV) acelera a lesão hepatocítica e a mortalidade (taxa de até 30%) (Polish, 1993). O HDV é um vírus incompleto que exige o antígeno de superfície do HBV para a expressão completa e replicação. O HDV pode ser transmitido de pessoa a pessoa em situações domésticas em áreas endêmicas (América do Sul, África, Itália), mas a transfusão e o uso abusivo de drogas intravenosas são os principais fatores de risco nos Estados Unidos (Hadziyannis, 1997).

Estima-se que haja 4 milhões de norte-americanos infectados pelo HCV e que ele seja a principal causa de hepatite não A não B. Desde o

advento da testagem sorológica e da amplificação do ácido nucleico, a hepatite C associada à transfusão caiu dramaticamente (Cuthbert, 1994; Lauer, 2001; National Institutes of Health, 2002; Stramer, 2004). O uso abusivo de drogas parenterais e ferimentos por punções inadvertidas em trabalhadores da saúde sabidamente são meios de transmissão. Contudo, em muitos casos, nenhuma fonte é identificada. A transmissão do HCV durante a gestação ou por meio do contato sexual ou doméstico é muito menos eficiente que a transmissão do HBV e do HIV. A hepatite fulminante e fatal é rara. Contudo, a eliminação de linfócitos T citotóxicos é inadequada na maioria dos pacientes. Aproximadamente 80% das infecções tornam-se crônicas, com fibrose hepatocelular que pode evoluir para a cirrose (20%) e carcinoma hepatocelular (1 a 4% por ano em pacientes cirróticos). A coinfecção pelo HIV ou HBV, assim como o consumo de etanol, acelera a evolução natural. A superinfecção pelo HAV pode provocar hepatite fulminante. O tratamento com α-interferon peguilado e ribavirina produz remissão sustentada da hepatite C crônica e pode modificar significativamente ou prevenir sequelas graves de longo prazo (McHutchison, 1998). Contudo, a taxa de resposta é menor para o genotipo 1, o qual representa 75% das infecções nos Estados Unidos (Zein, 2000).

A investigação de terceira geração utilizando a quimioluminescência e imunoensaios enzimáticos (CIA e EIA) do anticorpo do HCV expandiu o número de antígenos virais refinados. A sensibilidade e a especificidade estão entre 95 e 98% (Richter, 2002; Ismail, 2004). Por causa da alta taxa de hepatite C crônica e do resultado favorável da terapia antiviral, um algoritmo para a testagem eficaz que começa com uma investigação do anticorpo anti-HCV por quimioluminescência (CIA) ou EIA foi recomendado pelo CDC. Um resultado de pesquisa do anticorpo anti-HCV com uma alta relação sinal/*cutoff* tem uma alta probabilidade de ser um resultado positivo verdadeiro na infecção crônica. A determinação quantitativa do HCV por PCR é então adequada para verificar a viremia e começar a terapia antiviral. Uma baixa relação sinal/*cutoff* da pesquisa do anticorpo anti-HCV apresenta uma alta probabilidade de ser um resultado falso-positivo e, por essa razão, a comfirmação com um ensaio de terceira geração de *immunoblot* recombinante (RIBA, *recombinant immunoblot assay*) é útil antes de ser realizada a pesquisa da carga viral (MMWR, 2003). A estratégia algorítmica apresenta uma sequência de testagem lógica que minimiza exames onerosos e desnecessários e fornece informações úteis para o tratamento. O GB vírus C é um flavivírus relacionado ao HCV e foi identificado na hepatite pós-transfusional; entretanto, como a importância clínica do GBV-C não foi bem caracterizada, as pesquisas de anticorpo e do RNA do GBV-C não são recomendadas em pacientes com hepatopatia crônica (Hadziyannis, 1998). Curiosamente, a coinfecção por GBV-C e HIV parece induzir uma atividade antiviral do hospedeiro contra o HIV e prolongar a sobrevida (Xiang, 2001).

Nenhum dos vírus da hepatite replica em linhagens celulares de culturas padrões. A detecção de anticorpos específicos IgM e IgG e de antígenos virais específicos indica o estágio da infecção causada por cada vírus. A carga viral determinada pela amplificação do ácido nucleico é utilizada para monitorar a resposta ao tratamento da infecção crônica. A Tabela 54.7 apresenta um resumo dos marcadores virais e sorológicos na hepatite viral.

Infecções pelo retrovírus e pelo vírus da imunodeficiência humana

O HIV-1 é um retrovírus da família *Lentiviridae* que atualmente apresenta uma distribuição mundial. O HIV infecta e destrói linfócitos T $CD4^+$ e acaba levando a infecções oportunistas debilitantes e processos malignos (Stein, 1992; Schupbach, 2003). O HIV também é neurotrópico e pode causar meningite aguda e encefalopatia lentamente destrutiva (Atwood, 1993). A cepa de HIV-2 presente na África Ocidental é um pouco menos patogênica, com menor risco de transmissão e de progressão para a AIDS.

Metade dos indivíduos com infecção aguda pelo HIV apresenta sintomas similares ao da mononucleose antes de entrar no estágio latente assintomático. Durante a infecção aguda, níveis de RNA do HIV circulante são altos, mas o anticorpo pode não ser ainda detectável. O tempo médio para a destruição das células $CD4^+$ suficiente para o desenvolvimento de todas as características da AIDS é de 10 a 11 anos. De 5 a 10% dos indivíduos desenvolvem AIDS em 3 anos, e a mesma percentagem de indivíduos mantêm uma contagem de $CD4^+$ estável e permanecem assintomáticos indefinidamente (Munoz, 1995). Crianças infectadas verticalmente ao nascimento frequentemente apresentam uma evolução acelerada.

Existem vários ensaios imunoenzimáticos disponíveis no comércio para o anticorpo anti-HIV feitos com uma gama de antígenos do HIV recombinantes e purificados. Os kits de terceira geração apresentam geralmente uma especificidade e uma sensibilidade excelentes e podem detectar o anticorpo anti-HIV 2 a 4 semanas após a infecção. Os imunoensaios enzimáticos de quarta geração que combinam a pesquisa de anticorpo anti-HIV e a detecção de antígenos do HIV apresentam uma sensibilidade ainda maior no reconhecimento da infecção inicial, no entanto, os bancos de sangue em países industrializados rotineiramente testam, em doadores de sangue, o RNA do HIV pela amplificação do ácido nucleico para identificar doadores que se encontram no período de janela sorológica (Busch, 2000; Ly, 2001; Candotti, 2003; Schupbach, 2003; Stramer, 2004). Os bancos de sangue norte-americanos pesquisam o anticorpo anti-HIV-2 e é o exame padrão na África e na Europa. Um resultado positivo de pesquisa de anticorpo anti-HIV por EIA deve ser repetido e, a seguir, confirmado por um teste adicional como, por exemplo, um ensaio imunofluorescente ou *Western blot* (Carlson, 1987). O *Western blot* é o método de verificação mais popular e demonstra anticorpos que reagem com antígenos específicos do HIV. Ele é menos sensível que o EIA, mas um padrão de banda positiva clássico fornece uma evidência sorológica convincente de infecção pelo HIV (MMWR, 1991). O resultado laboratorial de todos os exames sorológicos deve ser conciso e evitar o uso de comentários ambíguos ou confusos (Hewitt, 1992).

O HIV é propagado em cultura de tecido por meio da cultivação conjunta de linfócitos ou tecidos do paciente infectado com linfócitos de um doador normal que tenham sido estimulados com fitohemaglutinina, interleucina-2 e interferon. A cultura é complexa, cara e perigosa e não deve ser tentada em laboratórios hospitalares. A cultura para HIV foi grandemente suplantada pela amplificação do ácido nucleico. Existem disponíveis no comércio kits de RT-PCR, NASBA, amplificação mediada por transcrição (TMA, *transcription mediated amplification*) e bDNA. Além dos exames de rotina do doador de sangue, a amplificação do ácido nucleico também foi proposta como um componente da investigação de rotina do HIV (Pilcher, 2005). O tratamento antirretroviral aumentou dramaticamente a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes com HIV (Freedberg, 2001; Aberg, 2004). Ensaios quantitativos do RNA do HIV para mensurar a carga viral no plasma revolucionaram a monitoração da terapia antirretroviral. Reduções do RNA do HIV relacionadas ao tratamento superiores a 0,5 a 1,0 log cópias/mL correlacionam-se com uma progressão clínica mais lenta. A não adesão ao tratamento acarretou o aparecimento de mutantes do HIV resistentes a fármacos, os quais podem ser identificados através da genotipagem e da fenotipagem. A genotipagem faz o sequenciamento dos genes do HIV para identificar oligonucleotídeos mutantes que estão ligados à resistência a medicamentos e tem uma grande utilidade clínica. A fenotipagem é complexa e envolve a amplificação de genes da protease e da transcriptase reversa no vírus do paciente suspeito, a inserção desses genes em um vírus-teste e, em seguida, a testagem da sensibilidade *in vitro* desse vírus criado em laboratório contra drogas antivirais específicas. Um "fenótipo virtual" pode ser criado a partir dos dados de mutação genotípica para determinar a probabiliade de sensibilidade fenotípica real *in vitro*, com os dois métodos geralmente apresentando uma correlação excelente (Shafer, 2002; Hirsch, 2003; Clavel, 2004).

A transmissão intrauterina ou perinatal de mães infectadas pelo HIV pode ser dramaticamente reduzida com o tratamento. O ensaio do DNA do HIV pró-viral por PCR é utilizado principalmente para diagnosticar a infecção pelo HIV transmitida verticalmente durante os primeiros meses de vida (ver Infecções Congênitas e Perinatais acima). O HTLV infecta linfócitos T $CD4^+$ e causa a leucemia de célula T em adultos. Esse tipo de leucemia ocorre em 2 a 4% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 em áreas endêmicas do Japão (Folks, 1998). O HTLV-I também causa mielopatia/paraparesia espástica tropical, uma doença neurológica degenerativa crônica caracterizada por fraqueza progressiva de membros inferiores, espasticidade e perda da

Tabela 54.7 Testes sorológicos e virológicos para vírus da hepatite

		IgM anti-HAV	IgG + IgM anti-HAV	HBsAg	Anti-HBs	IgM anti-HBc	IgG + IgM anti-HBc	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA	Pesquisa anti-HCV	HCV RIBA	HCV-RNA Quantitativo	Anti-HDV	Anti-HEV
HAV	– aguda	+	+												
	– remota	–	+												
HBV	– inicial			+	–	+	+	+	–	+					
	– janela			–	–	+	+	–	–	+					
	– resolução			–/+	+	–	+	–/+	+	–/+					
	– crônica			+	–/+	–	+	+/–	+/–	+					
	– remota			–	+	–	+/–	–	+/–	–/+					
HCV	– Screen*										+ Baixa relação sinal/*cutoff*	Confirmar com RIBA			
	– aguda										+ Alta relação sinal/*cutoff*		Realizar RNA quantitativo		
	– crônica										+/–	+/–	+		
	– remota										+	+	–		
HDV	– superinfecção	+	–	–	+	–	+/–	–						+	
HEV															+

+ = positivo; – = negativo

* Ver MMWR 2003; RR-03 para algoritmo detalhado para testagem e notificação.

HAV = vírus da hepatite A; HBc = antígeno do *core* da hepatite B; HBeAg = antígeno e da hepatite B; HBsAg = antígeno de superfície da hepatite B; HBV = vírus da hepatite B; HCV = vírus da hepatite C; HDV = vírus da hepatite δ; HEV = vírus da hepatite E; RIBA = ensaio *immunoblot* recombinante; S/C = relação sinal/*cutoff*.

função sensorial e controle vesical (Manns, 1999). O HTLV-II foi isolado em pacientes com leucemia de células cabeludas, mas a associação não está clara. Existem imunoensaios enzimáticos para a pesquisa de anticorpos disponíveis e eles são utilizados pelos bancos de sangue para investigar o sangue doado.

Infecções virais em hospedeiros imunocomprometidos

A resposta imune à infecção viral é uma interação complexa de fatores humorais e celulares. O sistema imune mediado por células responde à infecção aguda com linfócitos *natural killer* granulosos grandes que circulam no sangue e nos tecidos, identifica células do hospedeiro com antígenos virais e destrói as mesmas por meio da lise proteolítica. Antígenos virais são processados por macrófagos e apresentados aos linfócitos B e T. Células $CD4^+$ produzem citocinas que promovem a expansão clonal de células $CD8^+$ citotóxicas sensibilizadas, as quais então eliminar células do hospedeiro que contêm antígeno viral. Qualquer comprometimento das interações normais entre macrófagos, células $CD4^+$, $CD8^+$ e *natural killer* reduz a capacidade do hospedeiro de controlar a doença viral. A imunidade mediada por células também é crítica na supressão de vírus que apresentam uma latência estabelecida (p. ex., HSV, CMV e EBV). Em indivíduos saudáveis, a maioria das infecções reativadas por esses vírus é assintomática ou produz uma doença limitada, confinada a uma pequena área anatômica (p. ex., herpes genital ou oral). Com o comprometimento da função imune celular, infecções recorrentes podem ser localmente agressivas ou podem disseminar e produzir lesão grave em múltiplos órgãos.

O número de pacientes imunocomprometidos continua a aumentar. Corticosteroides, quimioterapia e radiação, fármacos imunossupressores para prevenir a rejeição de transplante e a obliteração de linfócitos $CD4^+$ pelo HIV comprometem a regulação imune celular e aumentam a vulnerabilidade a infecções virais. Infecções primárias, como a mononucleose, influenza e varicela, são frequentemente mais graves. Condilomas anogenitais causados pelo HPV apresentam uma evolução acelerada para a displasia escamosa e o carcinoma. As doenças virais mais graves frequentemente são reativações de microrganismos endógenos dormentes (CMV, HSV e VZV). Lesões necrotizantes orais e perianais pelo HSV e herpes zoster com envolvimento de múltiplos dermátomos podem ocorrer. A reativação do EBV está ligada ao linfoma do SNC em pacientes com AIDS e a distúrbios linfoproliferativos pós-transplante, como foi descrito anteriormente.

As infecções virais oportunistas mais comuns em pacientes com HIV ou transplantados são causadas pelo CMV (Drew, 1992a; Sia, 2000). Pacientes adultos com AIDS com contagem de células CD4 inferior a $100/mm^3$ apresentam risco de reativação do CMV latente. A retinite é uma complicação frequente. A pneumonia e o envolvimento gastrintestinal e do SNC pelo CMV também são comuns e a doença disseminada afetando múltiplos órgãos na autópsia também não é incomum (Drew, 1992b). A doença causada pelo CMV também pode se desenvolver a partir da infecção primária em pacientes pediátricos com HIV e também em receptores de transplante soronegativos. A infecção primária pelo CMV apresenta um maior risco de recorrência da doença em receptores de transplante de órgãos sólidos. A sorologia tem pouco valor prático para o diagnóstico da infecção primária aguda pelo CMV nessa situação. A produção de IgM pode ser comprometida em receptores de medula óssea e de células-tronco. A determinação da soroconversão (IgG) exige amostras do período agudo e de convalescença. A sorologia é muito útil para investigar doadores de sangue para limitar a transfusão de hemoderivados positivos para CMV em pacientes que nunca receberam transfusão e para avaliar a condição do doador e do receptor. Imunoensaios enzimáticos para a IgG anti-CMV são mais sensíveis, apresentam *endpoints* objetivos e evitam problemas de interpretação da ligação do complemento dos métodos de imunofluorescência.

Inclusões citomegálicas típicas são específicas para a identificação da infecção por CMV em materiais de biópsia e lavado broncoalveolar, mas a coloração de hematoxilina-eosina não é sensível. A sensibilidade aumenta um pouco com a imunoperoxidase ou a hibridização *in situ*, mas o isolamento do vírus apresenta uma maior acurácia diagnóstica. O CMV replica quase que exclusivamente em linhagens celulares HDF. O crescimento é lento, com o tempo de incubação de 7 dias ou mais antes do surgimento de efeitos citopáticos. O fibroblasto infectado inicialmente retém sua forma fusiforme quando o núcleo aumenta de volume e se torna refrativo. Finalmente, a célula torna-se redonda e distorcida e o vírus dissemina-se para os fibroblastos adjacentes, produzindo uma área maior de células lesadas (Fig. 54.3).

A recuperação do CMV diminui em 1 a 2 dias com a cultura em *shell vial* (Gleaves, 1984, 1987). Monocamadas de HDF são inoculadas por centrifugação com leucócitos do sangue periférico (coletados pela separação por gradiente de densidade), lavado broncoalveolar, líquido ou tecido homogeneizado. Após uma incubação de 16 a 40 horas, a monocamada é corada com anticorpo conjugado à fluoresceína contra o antígeno precoce do CMV. Os fibroblastos infectados apresentam uma fluorescência homogênea de todo o núcleo (ver Fig. 54.3). A carga de CMV usualmente é alta em pacientes com HIV infectados em estágio final e a cultura apresenta uma sensibilidade diagnóstica excelente em amostras de tecido e lavado broncoalveolar (95 a 100%). A cultura em *shell vial* de leucócitos do sangue periférico apresenta vantagens relacionadas ao tempo necessário para sua realização, contudo a sensibilidade é de apenas 75%, se comparada à inoculação em tubo com monocamada, de modo que a cultura em tubo de *back-up* é recomendada. A recuperação do CMV em ambos os tipos de cultura é otimizada quando amostras são inoculadas imediatamente em monocamadas de células frescas. O resultado é pior se a inoculação for retardada (Brumback, 1997; Roberts, 1997). Uma outra vantagem da cultura em *shell vial* é que os resultados são semiquantitativos (Buller, 1992; Slavin, 1992). Um inoculado padrão de células (leucócitos e células do lavado broncoalveolar) e uma contagem de núcleos de fluorescentes CMV na monocamada do *shell vial* pode gerar um número que possui um valor clínico na estimativa da gravidade da infecção, para monitorar a resposta terapêutica e para prever o prognóstico. O CMV é a causa mais comum de viremia em pacientes comprometidos, entretanto, o VZV, o HSV, o adenovírus e, ocasionalmente, o enterovírus podem ser recuperados. Culturas em tubos tradicionais HDF e A549 mantidas por 14 dias recuperarão esses agentes assim como o CMV (Stanberry, 1994). Quando a imunossupressão é grave, pacientes com AIDS e receptores de transplante apresentam risco de outras infecções virais com envolvimento específico de órgão ou local. Infecções do sistema nervoso central foram descritas anteriormente. O adenovírus, o HSV e o VZV podem se manifestar com pneumonite; a infecção herpética (HSV e VZV) pode se manifestar inicialmente no esôfago e regiões mucocutâneas e, a seguir, disseminar. Por essa razão, amostras de biópsia de mucosa, pele ou tecido devem ser inoculadas em uma série abrangente de linhagens celulares para maximizar a recuperação.

A infecção pelo CMV em receptores de transplante de órgão maciço e medula óssea alogênica apresenta graves implicações. O vírus pode lesar diretamente órgãos transplantados e a toxicidade das drogas antivirais ou a redução/modulação da terapia imunossupressora pode ameaçar a sobrevivência do transplante. A viremia pelo CMV é um marcador sensível da replicação viral ativa com ameaça potencial ao transplante e risco de pneumonia oportunista. A detecção precoce permite o uso preventivo de agentes antivirais com melhor conservação do transplante e diminuição da morbidade. A cultura sanguínea de controle para o CMV utilizando tubos tradicionais é um mau preditor para o desenvolvimento da doença pelo CMV e não tem sido útil na definição de ajustes do tratamento (Falagas, 1997). Culturas de controle em *shell vial* apresentam um melhor valor prognóstico, mas ensaios quantitativos sequenciais do antígeno pp65 do CMV no sangue periférico e a detecção do DNA do CMV por PCR no sangue são mais sensíveis e identificam a viremia mais precocemente (Boeckh, 1998; Mendez, 1998; Sia, 2000; Razonable, 2002). A pesquisa de antígeno do CMV é realizada pelo método de coloração de neutrófilos do sangue periférico por imunofluorescência ou de imunoperoxidase (Gerna, 1992; Storch, 1994; Erice, 1995; Landry, 1996). A neutropenia é a principal limitação prática. Mensurações quantitativas do CMV por PCR são preditores úteis da doença causada pelo CMV em pacientes submetidos a transplantes hepáticos e renais (Drouet, 1995). Um número de cópias elevado constante do DNA do CMV é um bom preditor do risco de retinite em pacientes com HIV e baixa contagem de CD4 (Rasmussen, 1997). A amplificação do ácido nucleico para o mRNA do CMV tem uma vantagem potencial de especificidade para a replicação viral ativa. O surgimento do CMV no sangue permite pre-

ver uma doença sistêmica causada pelo CMV. Métodos quantitativos de DNA também têm sido utilizados para avaliar a resposta a agentes antivirais. O método de testagem da sensibilidade a drogas antivirais utilizando o ensaio de redução de placa ou o ensaio genotípico de mutações associadas à resistência pode ser indicado em pacientes que não respondem à terapia (Erice, 1999; Sia, 2000; Razonable, 2002).

Referências bibliográficas

Aberg JA, Gallant JE, Anderson J, et al: Primary care guidelines for management of persons infected with HIV: recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2004; 39:609–629.

Abzug MJ, Loeffelholz M, Rotbart H: Diagnosis of neonatal enterovirus infection by polymerase chain reaction. J Pediatr 1995; 126:447–450.

Aitken C and Jeffries DJ: Nosocomial spread of viral disease. Clin Microbiol Rev 2001; 14:528–546.

Akashi K, Eizuru Y, Sumiyoshi Y, et al: Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary HH6 infection in an adult. N Engl J Med 1993; 329:168–171.

Alder SP, Manganello AM, Koch WL, et al: Risk of human parvovirus B19 infections among school and hospital employees during endemic periods. J Infect Dis 1993; 168:361.

Anand A, Grayes B, Brown T, et al: Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. N Engl J Med 1987; 316:183, 1987.

Anderson LJ, Parker RA, Stikas RL, et al: Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. J Infect Dis 1990; 161:640.

Arens MQ, Swierkosz EM, Schmidt RR, et al: Enhanced isolation of respiratory syncytial virus in cell culture. J Clin Microbiol 1986; 23:800.

Arvin AM: Varicella zoster virus. Clin Microbiol Rev 1996; 9:361–381.

Arvin AM, Hensleigh PA, Prober CG, et al: Failure of antepartum maternal cultures to predict the infant's risk of exposure to herpes simplex virus at delivery. N Engl J Med 1986; 315:796.

Ashley RL, Milton J, Lee F, et al: Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot assay for detecting antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera. J Clin Microbiol 1988; 26:662.

Ashley RL, Wald A: Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. Clin Microbiol Rev 1999; 12:1–8.

Atmar RL, Estes MK: Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14:15–37.

Atwood WJ, Berger JR: Human immunodeficiency virus type 1 infection of the brain. Clin Microbiol Rev 1993; 6:339.

Boeckh M, Boivin G: Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998; 11:533.

Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, et al: Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. N Engl J Med 2001; 344:1366–1371.

Braun DK, Dominguez G, Pellet PE: Human herpesvirus 6. Clin Microbiol Rev 1997; 10:521.

Bremer JW, Lew JF, Cooper GV, et al: Diagnosis of infection with HIV-1 by a DNA polymerase chain reaction among infants enrolled in the Women and Infants' Transmission Study. J Pediatr 1996; 129:198–207.

Brinker JP, Doern GV: Comparison of MRC-5 and A-549 cells in conventional cultures and shell vial assays for the detection of varicella-zoster virus. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 17:75.

Brown ZA, Benedetti J, Ashley R, et al: Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. N Engl J Med 1991; 325:1247.

Brown ZA, Selke S, Xeh J, et al: The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. N Engl J Med 1997; 337:509–515.

Brown ZA, Vontver LA, Benedetti J, et al: Effects on infants of a first episode of genital herpes during pregnancy. N Engl J Med 1987; 317:1246.

Brumback BG, Solejack SN, Morris MV, et al: Comparison of culture and the antigenemia assay for detection of cytomegalovirus in blood specimens submitted to a reference laboratory. J Clin Microbiol 1997; 35:1819.

Bruu AL, Nordbo SA: Evaluation of five commercial tests for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19. J Clin Microbiol 1995; 33:1363–1365.

Bryant PA, Tingay D, Dargaville PA, et al: Neonatal coxsackie B virus infection – a treatable disease? Eur J Pediatr 2004; 163:223–228.

Buller RS, Bailey TC, Ettinger NA, et al: Use of a modified shell vial technique to quantitate cytomegalovirus viremia in a population of solid organ transplant recipients. J Clin Microbiol 1992; 30:2620.

Burd EM: Human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Microbiol 2003; 16:1–17.

Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, et al: Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. J Clin Microbiol 2004; 42:2587–2595.

Busch MP: Closing the windows on viral transmission by blood transfusion. *In* Stramer SL (ed.): Blood Safety in the New Millennium. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2000.

Busch MP, Tobler LH, Saldanha J, et al: Analytical and clinical sensitivity of West Nile Virus RNA screening and supplemental assays available in 2003. Transfusion 2005; 45:492–499.

Calisher CH: Medically important arboviruses of the United States and Canada. Clin Microbiol Rev 1994; 7:89.

Candotti D, Richetin A, Cant B, et al: Evaluation of a transcription-mediated amplification-based HCV and HIV-RNA duplex assay for screening individual blood donations; a comparison with a minipool testing system. Transfusion 2003; 43:215–225.

Carlson JR, Lee J, Henrichs SH, et al: Comparison of indirect immunofluorescence and Western blot for detection of anti-human immunodeficiency virus antibodies. J Clin Microbiol 1987; 28:494.

Chan KH, Luo RX, Chen HL, et al: Development and evaluation of an EBV immunoglobulin M ELISA based on the 18-kilodalton matrix protein for diagnosis of primary EBV infection. J Clin Microbiol 1998; 26:3359.

Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al: Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan childhood hepatoma study group. N Engl J Med 1997; 336:1855–1859.

Chapin KC, Westenfeld FW: Reagents, stains, media and cell lines: virology. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Cherpes TL, Ashley RL, Meyn LA, et al: Longitudinal reliability of Focus glycoprotein G-based type-specific enzyme immunoassays for detection of herpes simplex virus types 1 and 2 in women. J Clin Microbiol 2003; 41:671–674.

Cherry JD: Contemporary infectious exanthems. Clin Infect Dis 1993; 16:199.

Cherry JD, Shields WD: Enecphalitis and meningoencephalitis. *In* Cherry JD, Feigin RD (eds): Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 4th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1998.

Cherry JD, Lerner AM, Klein JO, et al: Coxsackie A9 infections with exanthems with particular reference to urticaria. Pediatrics 1963; 31:819.

Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, et al: Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and viral load. J Infect Dis 1998; 178:1250.

Clarke L: Selection, maintenance and observation of uninoculated monolayer cell cultures. Viral culture: isolation of viruses in cell cultures. *In* Eisenberg HD (ed.): Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. Washington, DC, ASM Press, 2004.

Clavel F, Hance AJ: HIV drug resistance. N Engl J Med 2004; 350:1023–1035.

Cohen JI: Epstein–Barr virus infection. N Engl J Med 2000; 343:481–492.

Cone RW, Hackman RC, Haung M, et al: Human herpesvirus 6 in lung tissue from bone marrow transplant patients with pneumonia. N Engl J Med 1993; 329:156.

Cone RW, Hobson AC, Brown Z, et al: Frequent detection of genital herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction among pregnant women. JAMA 1994; 272:792.

Corey L: Herpes simplex virus. *In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia, PA, Elsievier Churchill Livingstone, 2005.

Costello M, Smernoff NT, Yungbluth M, et al: Laboratory diagnosis of viral respiratory infections. Lab Med 1993; 24:152.

Craig AS, Schaffner W: Prevention of hepatitis A with the hepatitis A vaccine. N Engl J Med 2004; 350:476–481.

Cuthbert JA: Hepatitis C: Progress and problems. Clin Microbiol Rev 1994; 7:505.

Cuthbert JA: Hepatitis A: old and new. Clin Microbiol Rev 2001; 14:38–58.

DeBiasi RL, Tyler KL: Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. Clin Microbiol Rev 2004; 17:903–925.

DeChamps C, Peigue-Lafeuille HH, Laveran H, et al: Four cases of vesicular lesions in adults caused by enterovirus infections. J Clin Microbiol 1988; 26:2182.

Deffrasnes C, Cote S, Boivin G: Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR. J Clin Microbiol 2005; 43:488–490.

Dennehy PH, Harhn M, Nelson SM, et al: Evaluation of the ImmunoCardSTAT! rotavirus assay for detection of group A rotavirus in fecal specimens. J Clin Microbiol 1999; 37:1977.

Domingues RB, Lakeman FD, Mayo MS, Whitley FJ: Application of competitive PCR to cerebrospinal fluid samples from patients with herpes simplex encephalitis. J Clin Microbiol 1998; 36:2229–2234.

Drew WL: Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. Clin Infect Dis 1992a; 14:608.

Drew WL: Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 1992b; 5:204.

Drouet E, Colimon R, Michelson S, et al: Monitoring levels of human cytomegalovirus DNA in blood after liver transplantation. J Clin Microbiol 1995; 33:389.

Duff P: Hepatitis in pregnancy. Semin Perinatol 1998; 22:277–283.

Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, et al: Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. J Clin Microbiol 2004; 42:79–82.

Ebihara T, Endo R, Ma X, et al: Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent antibody test. J Clin Microbiol 2005; 43:1138–1141.

Emerson SU, Purcell RH: Running like water – the omnipresence of hepatitis E. N Engl J Med 2004; 351:2367–2368.

Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, et al: GeneScan reverse transcription–PCR for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. J Clin Microbiol 2003; 41:4298–4303.

Erice A: Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. Clin Microbiol Rev 1999; 12:286–297.

Erice A, Holm MA, Sanjuan MV, et al: Evaluation of CMV-vue antigenemia assay for rapid detection of cytomegalovirus in mixed-leukocyte blood fractions. J Clin Microbiol 1995; 33:1014.

Espy MJ, Ross TK, Teo R, et al: Evaluation of LightCycler PCR for implementation of laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. J Clin Microbiol 2000; 38:3116–3118.

Falagas ME, Snydman DR, Ruthazer R, et al: Surveillance cultures of blood, urine, and throat specimens are not valuable for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. Clin Infect Dis 1997; 24:824.
Falsey AR, Formica MA, Walsh EE: Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. J Clin Microbiol 2002; 40:817–820.
Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, et al: Respiratory syncytial virus in elderly and high-risk adults. N Engl J Med 2005; 352:1749–1759.
Farhat SE, Finn S, Chua R, et al: Rapid detection of infectious mononucleosis-associated heterophile antibodies by a novel immunochromatographic assay and a latex agglutination test. J Clin Microbiol 1993; 31:1597.
Fields BN: Fields Virology, 4th ed. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 2001.
Fisher MS, Guerra CG, Hickman JR, et al: Peripheral blood lymphocyte apoptosis. A clue to the diagnosis of acute infectious mononucleosis. Arch Pathol Lab Med 1996; 120:951.
Fleming DT, McQuillan GM, Johnson RE, et al: Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. N Engl J Med 1997; 337:1105.
Folks TM, Khabbaz RF: Retroviruses and associated diseases in humans. *In* Mahy BWJ, Collier L (eds): Microbiology and Microbial Infections. Virology. New York, Oxford University Press, 1998.
Fowler KB, Stagno S, Pass RF, et al: The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med 1992; 326:663.
Freedberg KA, Losina E, Weinstein MC, et al: Cost effectiveness of combination antiretroviral therapy for HIV disease. N Engl J Med 2001; 344:824–831.
Ganem D, Prince AM: Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. N Engl J Med 2004; 350:1118–1129.
Gantz NM, Coldsmith EE: Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia resources on the world wide web: a descriptive journey. Clin Infect Dis 2001; 32:938–948.
Gerber MA, Shapiro DE, Ryan RW, et al: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay procedure for determining specific Epstein–Barr virus serology and of rapid test kits for diagnosis of infectious mononucleosis. J Clin Microbiol 1996; 34:3240–3241.
Gerna G, Revello MG, Percivalle E, et al: Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation cytomegalovirus antigenemia. J Clin Microbiol 1992; 30:1232–1237.
Gershon AA, Raker R, Steinberg S, et al: Antibody to varicella-zoster virus in parturient women and their offspring during the first year of life. Pediatrics 1976; 58:692.
Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, et al: In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998–2000. Clin Infect Dis 2003; 36:731–742.
Gleaves CA, Lee CF, Kirsch L, et al: Evaluation of a direct fluorescein-conjugated monoclonal antibody for detection of cytomegalovirus in centrifugation culture. J Clin Microbiol 1987; 25:1548.
Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, et al: Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. J Clin Microbiol 1984; 19:917.
Gleaves CA, Wilson DJ, Wold AD, et al: Detection and serotyping of herpes simplex virus in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16h postinoculation. J Clin Microbiol 1985; 21:29.
Gold D, Bowden R, Sixbey J, et al: Chronic fatigue: a prospective clinical and virologic study. JAMA 1990; 264:48.
Griffin DA, Donaldson KA, Paul JH, et al: Pathogenic human viruses in coastal waters. Clin Microbiol Rev 2003; 16:129–143.
Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, et al: Enteric viruses and diarrhea in HIV infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med 1993; 329:14.
Hadziyannis, SJ: Review: hepatitis delta. J Gastroenterol Hepatol 1997; 12:289–298.
Hadziyannis, SJ: Fulminant hepatitis and the new G/GBV-C flavivirus. J Viral Hepat 1998; 5:15–19.
Hall CB: Respiratory syncytial virus. *In* Cherry JD, Feigin RD (eds): Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 4th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1998.
Hall CB: Medical progress: RSV and parainfluenza. N Engl J Med 2001; 344:1917–1928.
Hedberg CW, Osterholm MT: Outbreaks of food-borne and water borne gastroenteritis. Clin Microbiol Rev 1993; 6:199.
Heegaard ED, Brown KE: Human Parvovirus B19. Clin Microbiol Rev 2002; 15:485–505.
Henrard Dr, Phillips J, Windsor I, et al: Detection of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen and plasma RNA. Relevance to indeterminate serology tests. Transfusion 1994; 34:376.
Henrickson KJ: Parainfluenza viruses. Clin Microbiol Rev 2003; 16:242–264.
Hess RD: Minireview. Routine Epstein–Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. J Clin Microbiol 2004; 42:3381–3387.
Hewitt DJ, Peddecord KM, Francis DP, et al: Content and design of laboratory report forms for human immunodeficiency virus type 1 antibody testing. Am J Clin Pathol 1992; 98:1992.
Hierholzer JC: Adenoviruses in the immunocompromised host. Clin Microbiol Rev 1992; 5:262.
Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al: Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with HIV1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. Clin Infect Dis 2003; 37:113–128.
Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM, et al: Chronic fatigue syndrome: a working case definition. Ann Intern Med 1988; 108:387.
Holmes GP, Kaplan JE, Stewart JA, et al: A cluster of patients with a chronic mononucleosis-like syndrome. Is Epstein–Barr virus the cause? JAMA 1987; 257:2297.
Huang YT, Yam P, Huimin Y, et al: Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. J Clin Microbiol 2002; 40:366–371.
Hughes JH, Mann DR, Hamparian VV, et al: Detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1988; 26:588.
Isaacson E, Glaser CA, Gorghani B, et al: Evidence of human herpesvirus 6 in 4 immunocompetent patients with encephalitis. Clin Infect Dis 2005; 40:890–893.
Ismail N, Fish GE, Smith MB: Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence immunoassay for rapid detection of HbsAg, antibodies to HbsAg and antibodies to hepatitis C virus. J Clin Microbiol 2004; 42:610–617.
Istas AS, Dermmier GJ, Dubbins JC, et al: Surveillance for congenital CMV disease. Report from the National Congenital CMV Disease Registry. Clin Infect Dis 1995; 20:665.
Iwamoto M, Jernigan DB, Gausch A, et al: Transmission of West Nile Virus from an organ donor to four transplant recipients. N Engl J Med 2003; 348:2196–2203.
Iwarson I: The five main types of hepatitis: an alphabetical update. Scand J Infect Dis 1992; 24:129.
Johnson EB: Transport of viral specimens. Clin Microbiol Rev 1990; 3:120.
Kessler HA, Blaau W, Spear J, et al: Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. JAMA 1987; 258:1196–1199.
Kessler HH, Sanker B, Rabenau H, et al: Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. J Clin Microbiol 1997; 35:976–977.
Kim JJ, Wright TC, Goldie SJ: Cost effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. JAMA 2002; 287:2382–2390.
Kimball AM, Foy HM, Cooney MK, et al: Isolation of respiratory syncytial and influenza viruses from the sputum of patients hospitalized with pneumonia. J Infect Dis 1983; 147:181.
Kimberlin DW: Neonatal herpes simplex infection. Clin Microbiol Rev 2004; 17:1–13.
Kimberlin DW, Lakeman FD, Arvin AM, et al: Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. J Infect Dis 1996; 174:1162.
Kleinman S, Glynn SA, Busch M, et al: The 2003 West Nile Virus United States epidemic: the America's Blood Centers experience. Transfusion 2005; 45:469–479.
Klonoff DC: Chronic fatigue syndrome. Clin Infect Dis 1992; 15:812.
Konig B, Konig W, Arnold R, et al: Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. J Clin Microbiol 2004; 42:4632–4635.
Koralnik IJ: Neurologic diseases caused by HIV-1 and opportunistic infections. *In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia, PA, Elsievier Churchill Livingstone, 2005.
Kulasingham SL, Hughes JP, Kiviat NB, et al: Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities. JAMA 2002; 288:1749–1757.
Lafferty WE, Krofft S, Remmington M, et al: Diagnosis of herpes simplex virus by direct immunofluorescence and viral isolation from samples of external genital lesions in a high prevalence population. J Clin Microbiol 1987; 25:323.
Landry ML, Ferguson D: SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. J Clin Microbiol 2000; 38:708–711.
Landry ML, Ferguson D, Cohen S, et al: Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. J Clin Microbiol 2005; 43:1950–1952.
Landry ML, Ferguson D, Stevens-Ayers T, et al: Evaluation of CMV Brite Kit for detection of cytomegalovirus pp65 antigenemia in peripheral blood leukocytes by immunofluorescence. J Clin Microbiol 1996; 34:1337.
Landry ML, Garner R, Ferguson D: Comparison of the NucliSens Basic Kit (nucleic acid sequence-based amplification) and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR Assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. J Clin Microbiol 2003; 41:5006–5010.
Lauer GM, Walker BD: Hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2001; 345:41–52.
Linderholm M, Bowman J, Juto P, et al: Comparative evaluation of nine kits for rapid diagnosis of infectious mononucleosis and Epstein–Barr virus-specific serology. J Clin Microbiol 1994; 32:259.
Lipson SM, David K, Shaikh F, et al: Detection of precytopathic effect of enteroviruses in clinical specimens by centrifugation-enhanced antigen detection. J Clin Microbiol 2001; 39:2755–2759.
Lipson SM, Salo RJ, Leonardi GP: Evaluation of five monoclonal antibody-based kits or reagents for the identification and culture confirmation of herpes simplex virus. J Clin Microbiol 1991; 29:466.
Lloyd AR: Chronic fatigue and chronic fatigue syndrome: shifting boundaries and attributions. Am J Med 1998; 105:7S.
Lok A: Chronic hepatitis B. N Engl J Med 2002; 346:1682–1683.
Ly TD, Martin L, Daghfal D, et al: Seven Human Immunodeficiency Virus (HIV) antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. J Clin Microbiol 2001; 39:3122–3128.
Mace M, Cointe D, Six C, et al: Diagnostic value of RT-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. J Clin Microbiol 2004; 42:4818–4820.
McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. N Engl J Med 1998; 352:1426–1432.
McKinney RE, Katz SL, Wilfert CM: Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. Rev Infect Dis 1987; 9:334–356.
Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, et al: Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. J Clin Microbiol 2003; 41:2987–2991.
Manns A, Hisada M, LaGrenade K: Human T-lymphotrophic virus type 1 infection. Lancet 1999; 353:1951.

Meissner HC, Long SS: Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for prevention of RSV infections. Pediatrics 2003; 112:1447–1452.

Mendez JC, Espy MJ, Smith TF, et al: Evaluation of PCR primers for early diagnosis of cytomegalovirus infection following liver transplantation. J Clin Microbiol 1998; 36:526.

Miller H, Milk R, Diaz-Mitoma K, et al: Comparison of the VIDAS RSV assay and the Abbott Testpack RSV with direct immunofluorescence for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates.J Clin Microbiol 1993; 31:1336.

Minnich II, Ray CG: Early testing of cultures for detection of hemadsorbing viruses. J Clin Microbiol 1987; 25:421.

Mitchell DK, Vaan R, Morrow AL, et al: Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. J Pediatr 1993; 123:725.

Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, et al: Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:2873.

MMWR: Interpretive criteria used to report Western blot results for HIV-1-antibody testing – United States. Morbid Mortal Weekly Rep 1991; 40:692.

MMWR: Outbreak of West Nile-like viral encephalitis – New York, 1999. Morbid Mortal Weekly Rep 1999; 48:845.

MMWR: Norwalk-like viruses. Public health consequences and outbreak management. Morbid Mortal Weekly Rep 2001; 50(RR09); 1–18.

MMWR: Alter MJ, Kuhnet WL, Finelli L: Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Morbid Mortal Weekly Rep 2003; 52:RR-3.

MMWR: Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma and Texas, 2004. Morbid Mortal Weekly Rep 2004; 53:586–589.

MMWR: Achievements in Public Health: elimination of rubella and congenital rubella syndrome – United States, 1969–2004. Morbid Mortal Weekly Rep 2005; 54:279–282.

Modin JF: Perinatal echovirus infection: Insights from a literature review of 61 cases of serious infection and 16 outbreaks in nurseries. Rev Infect Dis 1986; 8:918.

Morrow RA, Friedrich D, Krantz E: Performance of the Focus and Kalon enzyme-linked-immunosorbent assays for antibodies to herpes simplex virus type 2 glycoprotein G in culture-documented cases of genital herpes. J Clin Microbiol 2003; 41:5212–5214.

Moseley RC, Corey L, Benjamin D, et al: Comparison of viral isolation, direct immunofluorescence, and indirect immunoperoxidase techniques for detection of genital herpes simplex virus infection. J Clin Microbiol 1981; 13:913.

Mulford WS, Buller RS, Lewis L, et al: Evaluation of the Biostar Flu Optical Immunoassay (OIA) for rapid detection of influenza virus in pediatric and adult patients. Clinical Virology Symposium, 1999, Abstract S9.

Munoz A, Kirby AJ, He YD, et al: Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. J Acquir Immun Defic Syndr Hum Retrovirol 1995; 8:496–505.

Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Musher DM, Musher BL: Contagious acute gastrointestinal infections. N Engl J Med 2004; 351:2417–2427.

Nalonen PE, Madeley CR: The laboratory diagnosis of viral infection. *In* Collier L, Balows A, Sussman M (eds): Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. New York, Oxford University Press, 1998.

Nash D, Mostashari F, Fine A, et al: The outbreak of West Nile Virus infection in the New York City area in 1999. N Engl J Med 2001; 344:1807–1814.

National Institutes of Health: Consensus Statement of Management of Hepatitis C. National Institutes of Health 2002; 19:10–12.

Nelson CT, Istas AS, Wilkerson MK, et al: PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic tool for congenital CMV infection. J Clin Microbiol 1995; 33:314.

Nolte FS, Caliendo AM: Molecular detection and identification of microorganisms. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Ohm-Smith MJ, Nassos Ps, Haller BL: Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol 2004; 42:2996–2999.

Orle KA, Gates CA, Martin DH, et al: Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. J Clin Microbiol 1996; 34:49.

Pang X, Lee B, Chiu L, et al: Evaluation and validation of real-time reverse-transcriptase PCR assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus. J Clin Microbiol 2004; 42:4679–4685.

Parashar UD, Holman RC, Clarke MJ, et al: Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States: 1993 through 1995: surveillance based on new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code. J Infect Dis 1998; 177:13.

Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al: Transmission of West Nile Virus through blood transfusion in the United States in 2002. N Engl J Med 2003; 349:1236–1245.

Perkins SM, Webb DL, Torrance SA, et al: Comparison of a real-time reverse transcription PCR assay and a culture technique for quantitative assessment of viral load in children naturally infected with respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol 2005; 43:2356–2362.

Petersen LR, Hayes EB: Westward ho? – the spread of West Nile Virus. N Engl J Med 2004; 351:2257–2259.

Petric M, Tellier R: Rotaviruses, caliciviruses, astroviruses and other diarrheic viruses. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Pilcher CD, Fiscus SA, Nguyen TQ, et al: Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. N Engl J Med 2005; 352:1873–1883.

Plotkin SA: Rabies. Clin Infect Dis 2000; 30:4–12.

Pohl C, Green M, Wald ER, et al: Respiratory syncytial virus infections in pediatric liver transplant recipients. J Infect Dis 1992; 165:166.

Poland GA, Jacobson RM: Prevention of Hepatitis B with the Hepatitis B vaccine. N Engl J Med 2004; 351:2832–2838.

Polish LB, Gallagher M, Fields H, et al: Delta hepatitis: molecular biology and clinical epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1993; 6:211.

Prober C: Sixth disease and the ubiquity of human herpesviruses. N Engl J Med 2005; 352:753–755.

Prober CG, Hensleigh PA, Boucher F, et al: Use of routine viral cultures at delivery to identify neonates exposed to herpes simplex virus. N Engl J Med 1988; 318:887.

Prober CG, Sullender WM, Yasukawa II, et al: Low risk of herpes simplex virus infections in neonates exposed to the virus at the time of vaginal delivery to mothers with recurrent genital herpes simplex virus infections. N Engl J Med 1987; 316:240.

Quinn TC, Klein RL, Halsey N, et al: Early diagnosis of perinatal HIV infection by detection of viral-specific IgA antibodies. JAMA 1991; 266:3439.

Rasmussen L, Zipeto D, Wolitz RA, et al: Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. J Infect Dis 1997; 176:1146.

Razonable RR, Paya CV, Smith TF: Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. J Clin Microbiol 2002; 40:746–752.

Read SJ, Kurtz JB: Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. J Clin Microbiol 1999; 37:1352.

Reeves WC, Stamey FR, Black JB, et al: Human herpesviruses 6 and 7 in chronic fatigue syndrome: a case-control study. Clin Infect Dis 2000; 31:48–52.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG: Minireview: recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004; 42:941–945.

Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, et al: Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by RT-PCR. J Clin Microbiol 1997; 35:708.

Revello MG, Gerna G: Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. Clin Microbiol Rev 2002; 15:680–715.

Ribes JA, Steele AD, Seabolt JP, et al: Six year study of the incidence of herpes in genital and nongenital cultures in a central Kentucky Medical Center patient population. J Clin Microbiol 2001; 39:3321–3325.

Richter SS: MiniReview: Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. J Clin Microbiol 2002; 40:4407–4412.

Roberts TC, Buller RS, Gaudreault M, et al: Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. J Clin Microbiol 1997; 35:2224.

Rogers MF, Ou C, Rayfield M, et al: Use of the polymerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of HIV in infants born to seropositive mothers. N Engl J Med 1989; 320:1649.

Rogers R, Windust A, Gregory J: Evaluation of a novel dry latex preparation for demonstration of infectious mononucleosis heterophile antibody in comparison with three established tests. J Clin Microbiol 1999; 37:95.

Romero JR: Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:1161–1169.

Romero JR, Kimberlin DW: Molecular diagnosis of viral infections of the central nervous system. Clin Lab Med 2003; 23:843–865.

Roseff SD, Campos JM: Detection of cytomegalovirus antibodies in serum using the TransSTAT-CMV and CMV Scan assays. Am J Clin Pathol 1993; 99:539.

Rossier JE, Miller HR, Phipps PH: Rapid viral diagnosis by immunofluorescence. Ottawa, University of Ottawa Press, 1989.

Rotbart HA, Ahmed A, Hickey S, et al: Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. Pediatr Infect Dis J 1997; 16:409.

Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al: Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microbial detection assay. J Clin Microbiol 1994; 32:2590.

Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al: Isolation of a new virus HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science 1986; 234:596.

Schindler S, Sholtis W, Hadziyannis E, et al: Rapid detection of respiratory viruses using a mink lung/A549 mixed cell line. Clinical Virology Symposium, 1999, Abstract S16.

Schlauder GG, Dawson GJ: Hepatitis E virus. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Schluter WW, Reef SE, Redd SC, et al: Changing epidemiology of congenital rubella syndrome in the United States. J Infect Dis 1998; 178:636.

Schooley RT: Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis). *In* Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia, Elsievier Churchill Livingstone, 2005.

Schrim J, Meulenberg G, Pastoorm P, et al: Rapid detection of varicella zoster virus in clinical specimens using monoclonal antibodies on shell vials and smears. J Med Virol 1989; 28:1.

Schupbach J: Human immunodeficiency viruses. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Shafer RW: Genotypic testing for HIV-1 drug resistance. Clin Microbiol Rev 2002; 15:247–277.

Shahrabadi MS, Lee PW: Calcium requirement for syncytium formation in HEp-2 cells by respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol 1988; 26:139.

Shyamala V, Arcangel P, Cottrell J, et al: Assessment of the Target-Capture PCR Hepatitis B Virus DNA Quantitative Assay and comparison with commercial HBV DNA quantiative assays. J Clin Microbiol 2004; 42:5199–5204.

Sia IG, Patel R: New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplants. Clin Microbiol Rev 2000; 13, 83.

Sison A, Campos JM: Laboratory methods for early detection of HIV type 1 in newborns and infants. Clin Microbiol Rev 1992; 5:238.

Slavin MA, Gleaves CA, Schoch HG, et al: Quantification of cytomegalovirus in bronchoalveolar fluid after alloge-

neic marrow transplantation by centrifugation culture. J Clin Microbiol 1992; 30:2776.
Smith, J: Rabies virus. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.
Smith RF, Elder BL: Evaluation of Cytomegelisa immunoglobulin M assay and comparison with indirect fluorescent antibody testing of QAE-Sephadex A50-treated sera. Am J Clin Pathol 1987; 87:230.
Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, et al: Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. N Engl J Med 1982; 306:945–949.
Stanberry LR, Floyd-Reising A, Connelly BL, et al: Herpes simplex viremia: report of eight pediatric cases and review of the literature. Clin Infect Dis 1994; 18:401.
Steeper TA, Horwitz CA, Ablashi DV, et al: The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6 in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein–Barr virus or cytomegalovirus. Am J Clin Pathol 1990; 93:776.
Stein DS, Korvick JA, Vermund SH, et al: CD4 lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. J Infect Dis 1992; 165:352.
Stockton J, Stephenson I, Fleming D, et al: Human metapneumovirus as a cause of community acquired respiratory illness. Emerg Infect Dis 2002; 8:897–901.
Storch GA, Buller RS, Bailey TC, et al: Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid organ transplant recipients. J Clin Microbiol 1994; 32:997.
Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al: Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. N Engl J Med 2004; 351:760–768.
Strickler JG, Fedeli F, Horwitz CA, et al: Infectious mononucleosis in lymphoid tissue. Histopathology, *in situ* hybridization and differential diagnosis. Arch Pathol Lab Med 1993; 117:269.
Szatanek CD, Aymard M, Thouvenot D, et al: Surveillance Network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year followup. J Clin Microbiol 2004; 42:242–249.
Tang YW, Hibbs JR, Tau KR, et al: Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infection. Clin Infect Dis 1999a; 29:803.
Tang YW, Mitchell, PS, Espy MJ, et al: Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. J Clin Microbiol 1999b; 37:2127.
Tang YW, Rys PN, Rutledge BJ, et al: Comparative evaluation of colorimetric microtiter plate systems for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998; 36:2714.
Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, et al: Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and B viruses, respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. J Clin Microbiol 2004; 42:1564–1569.
Thielman NM, Guerrant RL: Acute infectious diarrhea. N Engl J Med 2004; 350:38–47.
Thomas EE, Book LE: Comparison of two rapid methods for detection of RSV (TestPack RSV and Ortho RSV ELISA) with direct immunofluorescence and virus isolation for the diagnosis of pediatric RSV infection. J Clin Microbiol 1991; 29:632.
Thomas EE, Roscoe DL, Brook L, et al: The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. Am J Clin Pathol 1994; 101:742.
Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Norbeck O, et al: Frequency of human parvovirus B19 infection in intrauterine fetal death. Lancet 2001; 357:1494–1497.
Tranchard-Bunel D, Gras-Masse H, Bourez B, et al: Evaluation of an Epstein–Barr Immunoglobulin M ELISA using a synthetic convergent peptide library, or mixotope, for diagnosis of primary EBV infection. J Clin Microbiol 1999; 37:2366.
Tristram DA: Respiratory syncytial virus. *In* Murray PR (ed.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.
Troanor JJ: Influenza virus. *In* GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia, Elsievier Churchill Livingstone, 2005.
Van den Hoogen BG, de Jong JC, Goren J, et al: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med 2001; 7:719–724.
Van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA: Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. Pediatr Infect Dis J 2004; 23(1 Suppl):S25–S32.
VanEnk RA, James KK, Thompson KD: Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. Am J Clin Pathol 1991; 95:428.
Watts DH: Management of HIV infection in pregnancy. N Engl J Med 2002; 346:1879–1891.
Weidmann M, Meyer-Konig U, Hufert FT: Rapid detection of herpes simplex virus and varicella zoster virus by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41:1565–1568.
Weinberg A, Walker ML: Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12:367–370.
Whitley RJ, Cobbs CG, Alford CA: Disease that mimics herpes simplex virus encephalitis. JAMA 1989; 262:234.
Whitley RJ, Corey L, Arvin A, et al: Changing presentation of herpes simplex virus infections in neonates. J Infect Dis 1988; 158:109.
Whitley RJ, Lakeman F: Herpes simplex virus infection of the central nervous system: therapeutic and diagnostic considerations. Clin Infect Dis 1995; 20:414–420.
Wreghitt RG, Teare EL, Sule O, et al: Cytomegalovirus infection in immunocomptetent patients. Clin Infect Dis 2003; 37:1603–1606.
Wright TC, Cox JT, Massad LS, et al: 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. JAMA 2002; 287:2120–2129.
Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, et al: Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. J Clin Virol 2004; 30:267–270.
Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, et al: Effect of coinfection with GB Virus C on survival among patients with HIV infection. N Engl J Med 2001; 345:707–714.
Yeldandi AV, Colby TV: Pathologic features of lung biopsy specimens from influenza pneumonia cases. Hum Pathol 1994; 25:47.
Young NS, Brown KE: Parvovirus B19. N Engl J Med 2004; 350:586–597.
Yungbluth M, Costello M, Cutler C, Levin M: Rapid shell vial culture of sputum for influenza A virus: implications for infection control. Abstract #1689, Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 1998, San Francisco.
Zein NN: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev 2000; 13:223–235.
Zerbini M, Musiani M, Gentilomi G, et al: Comparative evaluation of virological and serological methods in prenatal diagnosis of parvovirus B19 fetal hydrops. J Clin Microbiol 1996; 34:603–608.
Zerr DM, Amalia SM, Selke SS, et al: A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. N Engl J Med 2005:352:768–776.

Sites e endereços de e-mail

Centers for Disease Control and Prevention: http://www.cdc.gov/
Diversos periódicos, artigos e materiais (grátis).
Infectious Diseases Society of America: http://www.idsociety.org
Diretrizes de cuidados e tratamentos (grátis).
World Health Organization: http://www.who.int/
Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology: http://www.apic.org/
Medscape: http://www.medscape.com
American Society for Microbiology: http://www.asmusa.org
Diversos artigos e materiais (grátis).
European Society for Clinical Virology: http://www.eur.nl/FGG/VIRO/ESCV/
National Centers for Infectious Diseases: http://www.cdc.gov/ncidod/
National Institutes of Health: http://www.nih.gov
New England Journal of Medicine: http://www.nejm.org
Pan American Society for Clinical Virology: http://www.virology.org/
All the Virology on the WWW: http://www.virology.net
Johns Hopkins Infectious Disease: http://www.hopkins-id.edu/
Mike.Costello@advocatehealth.com
myungbluth@reshealthcare.org

CAPÍTULO 55

Infecções por clamídias, riquétsias e micoplasmas

Gail L. Woods MD, David H. Walker MD

Infecções por clamídias 1139
- Estrutura 1139
- Replicação 1140
- *Chlamydia trachomatis* 1140
- *Chlamydophila* (antiga *Chlamydia*) *psittaci* 1141
- *Chlamydophila* (antiga *Chlamydia*) *pneumoniae* 1141
- Diagnóstico laboratorial 1142
- Tratamento 1143

Infecções por riquétsias 1143
- Infecções causadas por organismos do gênero *Rickettsia* 1144
- Tifo rural causado por *Orientia tsutsugamushi* 1147
- Infecções causadas por organismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* 1147
- Infecções causadas por *Coxiella burnetii* 1149
- Infecções causadas por organismos do gênero *Bartonella* 1150

Infecções por micoplasmas 1151
- *Mycoplasma pneumoniae* 1151
- Micoplasmas genitais 1152
- Diagnóstico laboratorial 1152
- Tratamento 1153

Referências bibliográficas 1153

PONTOS-CHAVE

- A constitui a causa bacteriana mais comum de doenças sexualmente transmissíveis nos Estados Unidos.
- O método mais sensível para detecção de é a amplificação de DNA.
- A (antiga) é responsável por no mínimo 10% das pneumonias adquiridas na comunidade. O diagnóstico da infecção é mais frequentemente sorológico.
- Infecções por riquétsias tratáveis, incluindo-se a febre maculosa das Montanhas Rochosas, o tifo epidêmico, o tifo rural, a erliquiose monocitotrófica humana e a anaplasmose granulocitotrófica humana, raramente são diagnosticadas por sorologia durante o estágio agudo da doença, devido à ausência de uma resposta humoral precoce.
- Diagnósticos molecular e imuno-histoquímico são métodos efetivos para o diagnóstico de riquetsioses e erliquioses, respectivamente, embora em geral não sejam disponibilizados.
- A endocardite da febre Q consiste em uma infecção crônica que usualmente é diagnosticada pela detecção de títulos elevados (= 1:800 no ensaio de anticorpos imunofluorescentes) dirigidos contra o antígeno de fase I de .
- O diagnóstico clínico-epidemiológico da doença da arranhadura de gato pode ser confirmado sorologicamente, por meio da detecção de anticorpos contra ou pelo teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se amostra de aspirado de linfonodo.
- A pneumonia causada por frequentemente é diagnosticada com base apenas nas manifestações clínicas. O diagnóstico definitivo requer a detecção de IgM específica, alteração de quatro vezes no título de anticorpos IgG entre amostras de soro obtidas na fase aguda e na fase convalescente, ou detecção de ácido nucleico no escarro (ou outra amostra proveniente do trato respiratório) por amplificação de ácido nucleico.

As infecções humanas causadas por clamídias, riquétsias e micoplasmas são discutidas separadamente, porque os patógenos responsáveis diferem da maioria das demais bactérias em vários aspectos: são organismos menores, possuem estrutura de parede celular diferente e, além disso, clamídias e muitas riquétsias são parasitas intracelulares obrigatórios.

Infecções por clamídias

As clamídias apresentam tropismo pelas células epiteliais colunares. Sua parede celular é semelhante à parede das bactérias Gram-negativas. Contêm tanto ácido desoxirribonucleico (DNA) quanto ácido ribonucleico (RNA), possuem ribossomos procarióticos e sintetizam suas próprias proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Dividem-se por fissão binária e são suscetíveis a determinados antibióticos em particular. Diferentemente da maioria das bactérias, as clamídias são "parasitas energéticos". Trata-se de organismos desprovidos de citocromos e, portanto, incapazes de sintetizar metabólitos de trifosfato de adenosina (ATP). Por esse motivo, são bactérias intracelulares obrigatórias e não se replicam fora das células.

As clamídias são classificadas na ordem *Chlamydiale*, família *Chlamydiacea* – a única família que contém patógenos humanos (Everett, 1999). Existem dois gêneros e três espécies patogênicas para o ser humano: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila* (antiga *Chlamydia*) *psittaci* e *Chlamydophila* (antiga *Chlamydia*) *pneumoniae*. A Tabela 55.1 lista características úteis para diferenciação dessas três espécies. Esses gêneros também contêm outras seis espécies que ainda não foram associadas a infecções humanas. Existem três biótipos de *C. trachomatis*: pneumonite murina, linfogranuloma venéreo (LGV, *lymphogranuloma venereum*) e tracoma. Os dois últimos biótipos infectam preferencialmente seres humanos. O biótipo LGV apresenta quatro sorotipos (L1, L2, L2a, L3), e há 15 sorotipos incluídos no biótipo tracoma: A, B, Ba e C, associados ao tracoma; D-K, Da, Ia e Ja, associados a infecções genitais.

Estrutura

Existem duas formas morfologicamente distintas de clamídia. O corpo elementar consiste em uma estrutura densa e esférica, com 0,2 a 0,4 μm de diâmetro, que contém RNA ribossômico procariótico e possui uma rígida parede celular. A rigidez da parede celular é conferida pela presença de proteínas de parede celular em extensivas ligações cruzadas dissulfeto. Constitui a forma infecciosa do organismo, apresentando capacidade de sobrevida limitada no meio extracelular. O corpo reticulado, com 0,6 a 1,0 μm de diâmetro, é a forma intracelular e metabolicamente ativa, incapaz de sobreviver fora das células. O DNA circular fechado, presente em ambas as formas, está organizado de maneira compactada em um nucleoide central e possui um genoma constituído por 1 a 1,2 milhão de pares de bases nucleotídicas.

Existem dois componentes da membrana externa do corpo elementar das clamídias que possuem importância diagnóstica. O mais proeminente é a proteína de membrana externa principal (MOMP, *major outer membrane protein*), que consiste em uma proteína transmem-

Tabela 55.1 Características úteis para diferenciação das espécies de *Clamydia* e *Chlamydophila* patogênicas para o homem

Parâmetro	*Chlamydia trachomatis*	Espécies de *Chlamydophila psittaci*	*Chlamydophila pneumoniae*
Suscetibilidade a sulfas	Suscetível	Resistente	Resistente
Coloração da inclusão por glicogênio	Positiva	Negativa	Negativa
Formato do corpo elementar	Redondo	Redondo	Formato de pera ou redondo

brana com epítopos sorotipo-, espécie-, gênero- e família-reativos definidos por anticorpos monoclonais. A infecção por clamídias induz a formação de anticorpos MOMP-específicos, no entanto, continua desconhecido o papel desses anticorpos na imunidade protetora. A membrana externa das clamídias também contém um antígeno lipopolissacarídeo (LPS), que constitui o principal antígeno detectado em testes sorológicos gênero-específicos para infecção por clamídias. Anticorpos monoclonais e antissoros polivalentes monoespecíficos anti-LPS ou anti-MOMP são empregados em testes de anticorpo fluorescente diretos (TAFDs) e em imunoensaios enzimáticos (EIAs) para detecção do antígeno de clamídia em amostras clínicas.

Replicação

As clamídias se replicam no citoplasma das células hospedeiras infectadas. O ciclo de desenvolvimento tem início com a fixação do corpo elementar a uma microvilosidade existente na célula colunar suscetível, mediada por pontes de heparina. O corpo elementar desce pela microvilosidade e se aloja nas indentações da membrana plasmática celular. Nesse local, a clamídia entra na célula hospedeira por endocitose, sendo que *C. psittaci, C. pneumoniae* e *C. trachomatis* permanecem no endossomo durante o desenvolvimento intracelular. Os endossomos que contêm corpos elementares de *C. psittaci* não são acidificados nem se fundem aos lisossomos celulares. Os que contêm corpos elementares de *C. trachomatis* fundem-se uns aos outros e, às vezes, aos lisossomos. Decorridas de 6 a 8 horas após a entrada do corpo elementar na célula hospedeira, as alterações ocorridas em sua parede celular resultam na transição para corpo reticulado e subsequente início da síntese de DNA, RNA e proteínas, bem como em sua divisão por fissão binária. As mitocôndrias da célula hospedeira migram e se posicionam opostamente ao endossomo em expansão, permitindo que o corpo reticulado utilize o ATP da célula hospedeira. Os corpos reticulados começam a se reorganizar após 18 a 24 horas de infecção e, provavelmente, com a depleção de nutrientes, amadurecem em corpos elementares que são liberados da célula hospedeira. As células infectadas por *C. psittaci* usualmente sofrem danos sérios, e os organismos são liberados mediante lise celular dentro de 48 horas. Em contrapartida, a inclusão de *C. trachomatis* parece ser expulsa pela fusão de sua membrana à membrana plasmática decorridas 72 a 96 horas após a infecção, deixando uma lesão na membrana da célula hospedeira sobrevivente.

Chlamydia trachomatis

O *C. trachomatis* constitui a causa mais comum de doença sexualmente transmissível nos Estados Unidos. É também importante como causa de cegueira em regiões endêmicas de tracoma situadas no Oriente Médio, África do Norte e norte da Índia.

Epidemiologia, patologia e manifestações clínicas

O ser humano é o único hospedeiro natural de todas as cepas de *C. trachomatis*. As manifestações clínicas e especificidade de órgão associadas a infecções humanas por *C. trachomatis* são determinadas tanto pelo mecanismo de transmissão quanto pelas propriedades da cepa infectante. Em termos de epidemiologia, as infecções por *C. trachomatis* são classificadas em três categorias: tracoma clássico, infecções sexualmente transmissíveis de adultos e infecções perinatais dos tratos ocular e respiratório.

O tracoma clássico constitui causa importante de cegueira em áreas onde o saneamento público inadequado e a higiene pessoal são precários, além de ser a mais comum causa de cegueira evitável em todo o mundo (Solomon, 2004). De maneira típica, a infecção é transmitida entre crianças por meio dos dedos da mão, fomites e provavelmente moscas. Nas áreas endêmicas, é incomum adultos e crianças contraírem conjuntivite por clamídia; entretanto, a maioria das crianças são cronicamente infectadas poucos anos após o nascimento. A exposição repetida a *C. trachomatis* eventualmente resulta em queratoconjuntivite folicular crônica, cicatrização conjuntival e formação de pano (invasão de vasos dentro da córnea).

As infecções sexualmente transmissíveis de indivíduos adultos induzidas por *C. trachomatis* incluem LGV e uretrite/cervicite, além das complicações associadas. O LGV é endêmico na Ásia, África e América do Sul. Nos Estados Unidos, cerca de 500 casos são relatados a cada ano. A doença afeta homens mais frequentemente do que mulheres, sendo mais comum em indivíduos com baixo *status* socioeconômico que vivem nos estados do sudeste americano, homens homossexuais e indivíduos que visitaram países com endemia de LGV além das fronteiras dos Estados Unidos. O LGV é sexualmente transmitido por meio de fomites, sendo que aerossóis produzidos em acidentes laboratoriais causam pneumonite, efusão pleural e linfadenopatia mediastínica ou hilar (Jones, 2000). É provável que os reservatórios da infecção sejam indivíduos assintomáticos ou sintomáticos com infecções uretrais, cervicais ou anorretais.

O LGV é a única infecção causada por *C. trachomatis* que produz envolvimento multissistêmico e manifestações constitucionais. Durante a fase primária, há o desenvolvimento de uma pequena vesícula indolor, pápula não endurecida ou úlcera, com frequência no lado externo dos genitais, após um período de 3 dias a 3 semanas da exposição. Essa vesícula se resolve rapidamente e não deixa cicatriz. O estágio secundário é caracterizado por uma linfadenopatia supurativa regional, febre, calafrios, anorexia, dor de cabeça, mialgias e artralgias, e tem início dentro de 2 a 6 semanas após a exposição. O exame histológico dos linfonodos afetados revela a presença de granulomas em torno de abscessos em forma de estrela. Os linfonodos afetados tornam-se opacos e eventualmente supurados, produzindo fístulas drenantes que se cicatrizam ao longo de vários meses. A fibrose e a resultante drenagem linfática anormal são responsáveis pela enduração ou estenoses uretrais ou retais, bem como pelo linfedema genital que se desenvolvem durante o terceiro estágio.

Anualmente, nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 3 milhões de infecções não LGV por *C. trachomatis* entre adolescentes e jovens adultos sexualmente ativos. Os custos anuais associados às infecções por clamídia não tratadas e complicações correlatas estão estimados em mais de 2 bilhões de dólares (Peipert, 2003). O espectro clínico das infecções sexualmente transmissíveis causadas por cepas não LGV de *C. trachomatis* é similar ao da doença causada por *Neisseria gonorrhoeae* (ver Cap. 56). Entre os homens, *C. trachomatis* é responsável por 30 a 50% dos casos de uretrite não gonocócica; todavia, 85 a 90% dos homens que hospedam *C. trachomatis* na uretra são assintomáticos (Peipert, 2003). Em raras ocasiões, a uretrite causada por *C. trachomatis* evolui para epididimite. Entre os homens homossexuais, cepas não LGV de *C. trachomatis* foram associadas à proctite. O organismo também foi recuperado da uretra de 70% dos homens com síndrome de Reiter não tratada associada à uretrite (Keat, 1983). A infecção genital por *C. trachomatis* é provavelmente mais prevalente entre mulheres do que em homens. Entre as mulheres com atividade sexual, os fatores de risco para a infecção por clamídia são a pouca idade (< 25 anos), intercurso precoce, uso inconsistente de barreiras contraceptivas, vários parceiros sexuais, bem como ser solteira ou divorciada, negra ou ter *status* socioeconômico baixo. A infecção da endocérvix por *C. trachomatis* com frequência é assintomática, porém, ao menos 1/3 das mulheres apresenta sinais de infecção no exame físico. O mais comum é a cervicite mucopurulenta, que pode se disseminar para a uretra e bexiga urinária, resultando em "síndrome uretral aguda" de piúria sem bacteriúria, ou para o endométrio e trompas de Falópio, produzindo endometrite ou salpingite. Infecções não tratadas que envolvem o trato reprodutivo superior podem evoluir para doença inflamatória pélvica ou causar cicatrização e disfunção do sistema de transporte de ovidutos, com consequente infertilidade, gravidez ectópica ou dor pélvica crônica. A disseminação intraperitoneal da infecção pode causar peritonite aguda, peri-hepatite (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis), periapendicite ou periesplenite. A infecção por clamídia durante a gravidez está associada ao parto prematuro, ruptura prematura de membranas,

baixo peso ao nascimento, morte neonatal e endometrite pós-parto. Um pequeno percentual dos indivíduos adultos com infecção genital por clamídia desenvolve conjuntivite por inclusão.

Nos países desenvolvidos, onde a infecção sexualmente transmissível por *C. trachomatis* é epidêmica, o organismo pode ser transmitido da mãe infectada para o bebê durante a passagem pelo canal do parto. Dados provenientes de um estudo realizado na América do Norte indicam que 60 a 70% dos bebês expostos a *C. trachomatis* durante o parto normal são infectados por esse organismo, enquanto a infecção pós-parto por cesariana é incomum (Jones, 2000). O *C. trachomatis* é isolado a partir da conjuntiva de bebês infectados em 1 a 2 semanas, bem como da nasofaringe logo após a infecção. Há uma queda da taxa de isolamento a partir da conjuntiva 5 a 6 semanas depois da infecção, no entanto, ainda é possível recuperar o *C. trachomatis* a partir da nasofaringe, conjuntiva, reto e vagina (usualmente sem aparecimento de sintomas) durante vários meses.

A conjuntivite por inclusão, que é a manifestação mais comum de infecção por *C. trachomatis* em bebês, desenvolve-se em quase 80% dos bebês cujas culturas conjuntivais ou exame citológico revelam a presença do organismo (Jones, 2000). Uma secreção mucopurulenta aparece entre 2 a 25 dias após o nascimento, e há casos em que a conjuntiva se torna inflamada e edematosa. Os sintomas usualmente se resolvem sem terapia, após vários meses e sem deixar sequelas, embora possa haver formação de cicatriz.

Aproximadamente 20 a 30% dos bebês que adquirem a infecção por *C. trachomatis* ao nascimento desenvolvem pneumonite intersticial. A doença tem início quando o bebê atinge entre 2 semanas e 3 meses de idade (pico em 3 a 6 semanas), com aparecimento de congestão nasal seguida de tosse em *staccato* com taquipneia e estertores, contudo, sem febre. Cerca de metade desenvolve conjuntivite em algum momento. Os sintomas duram várias semanas, entretanto os estertores inspiratórios e alterações roentgenográficas podem persistir durante meses.

Chlamydophila (antiga *Chlamydia*) *psittaci*

A pneumonia associada à exposição aos pássaros foi descrita em 1879, na Suíça. Até a década de 1920, a doença era rara nos Estados Unidos e na Europa, mas nessa época tornou-se moda ter aves tropicais como animais de estimação. Em 1930, o patógeno foi isolado por Bedson a partir de tecidos humanos e de aves, durante a investigação de um surto no zoológico de Londres.

Epidemiologia

A infecção causada por *Chlamydophila* (antiga *Chlamydia*) *psittaci* (denominada psitacose) ocorre no mundo inteiro. As aves psitaciformes são consideradas o principal reservatório, contudo a maioria das espécies de aves pode ser infectada pelo organismo. Aves infectadas podem se mostrar obviamente doentes e morrer em decorrência da doença, entretanto, com frequência apresentam sinais brandos, como anorexia, diarreia, letargia e penas eriçadas. A doença humana é esporádica e foi associada à exposição a papagaios, canários, pombos, pardais, patos, calopsitas, aves domésticas (em especial perus) e, ocasionalmente, mamíferos. Donos de aves de estimação correspondem a cerca de 50% dos 40 a 60 casos relatados anualmente nos Estados Unidos. Funcionários de *pet shops*, criadores de pombos, empregados de zoológico, veterinários e outros profissionais que trabalham com aves estão expostos a um maior risco de contrair a infecção. Ocorreram surtos em estabelecimentos de processamento de peru, principalmente entre os trabalhadores que abatiam e depenavam as aves, e entre aqueles encarregados de remover as vísceras das carcaças (Centers for Disease Control, 1990). Ao longo das duas últimas décadas, houve uma queda dramática da prevalência da psitacose nos Estados Unidos, em decorrência da adição de tetraciclina à ração das aves, exigência de medicação para aves psitaciformes comercialmente importadas antes da entrada no país e reprodução doméstica de periquitos.

O *C. psittaci* é encontrado no sangue, tecidos, excrementos e penas de aves infectadas, podendo ser liberado durante meses após a infecção aguda. A infecção usualmente é transmitida ao ser humano por meio da inalação de aerossóis infecciosos derivados das fezes, pó de fezes e secreções de aves infectadas por *C. psittaci*. No entanto, ela também pode ser transmitida pela bicada da ave ou por contato boca-bico. O contato com aves não deve ser íntimo nem prolongado. Raramente ocorre a transmissão de *C. psittaci* de um indivíduo a outro.

Patogênese e patologia

O *C. psittaci* entra no corpo via trato respiratório e é transportado até os macrófagos hepáticos e esplênicos, nos quais os organismos se replicam. Em seguida, eles caem na circulação sanguínea e seguem até os pulmões, que constituem o alvo primário da infecção, entre outros órgãos. O exame histológico do tecido pulmonar revela a presença de linfócitos nos espaços alveolares e intersticiais, bem como de muco que obstrui os bronquíolos. É possível observar pequenas hemorragias e macrófagos que contêm inclusões intracitoplasmáticas. Os linfonodos hilares, fígado e baço podem estar aumentados e conter focos de necrose. Em casos fatais, pode haver envolvimento do miocárdio, pericárdio, meninges, cérebro e adrenais.

Manifestações clínicas

Após um período de incubação de 1 a 2 semanas, a psitacose manifesta-se de forma abrupta (com calafrios e febre) ou mais gradualmente (com febre e mal-estar crescentes). Um sintoma proeminente é a tosse seca e curta, ocasionalmente produtiva com escarro mucoide que exibe estrias de sangue. A frequência cardíaca frequentemente é baixa em relação à temperatura corporal, e o indivíduo afetado costuma apresentar uma forte dor de cabeça. Mal-estar, anorexia, mialgias dolorosas e artralgias são comuns, podendo haver também erupções cutâneas maculares (manchas de Horder) parecidas com as manchas róseas observadas na febre tifoide. O indivíduo pode apresentar diminuição da atividade mental ao final da primeira semana de doença, sendo que alguns se queixam de problemas gastrintestinais. *C. psittaci* constitui causa rara de endocardite destrutiva, e a maioria dos indivíduos afetados apresentam história de doença cardíaca reumática ou anomalias valvulares congênitas (Jones, 1982).

Chlamydophila (antiga *Chlamydia*) *pneumoniae*

Em 1986, um organismo de clamídia único, a princípio considerado uma cepa de *C. psittaci*, foi associado à doença do trato respiratório aguda em seres humanos. Esse organismo recebeu o nome TWAR, cujas letras correspondiam à identificação laboratorial dos dois primeiros isolados: TW-183 (isolado em 1965, a partir do olho de uma criança do grupo controle de uma triagem para vacina contra tracoma, realizada na Tailândia) e AR-39 (recuperado no mesmo ano, na Universidade de Washington, a partir da garganta de um estudante com faringite). Logo após sua identificação, dados fornecidos por estudos de homologia de DNA e microscopia eletrônica revelaram que esse organismo único representava uma espécie à parte, a qual foi denominada *Chlamydia pneumoniae* e posteriormente reclassificada como *Chlamydophila pneumoniae* (Campbell, 1987; Chi, 1987; Cox, 1988; Everett, 1999). Cepas de *C. pneumoniae* e *C. psittaci* apresentam cerca de 10% de homologia de sequência de DNA. Em determinadas condições, o corpo elementar de *C. pneumoniae* tem o formato de uma pera, mas exibe uma forma arredondada em condições distintas, assim como os corpos elementares de *Chlamydophila psittaci* e *Chlamydia trachomatis*.

Epidemiologia

A epidemiologia da infecção por *Chlamydophila pneumoniae* baseia-se em dados de estudos retrospectivos, que avaliaram o soro coletado de indivíduos com doenças do trato respiratório. Cerca de 50% dos adultos apresentam anticorpos contra *C. pneumoniae*. As taxas de prevalência de anticorpo são baixas em crianças, aumentam agudamente em adolescentes e continuam a subir até a meia-idade, permanecendo elevadas nos idosos. Essas taxas são 10 a 25% maiores entre os homens. Dados de estudos sorológicos retrospectivos e prospectivos indicam que a doença causada por *C. pneumoniae* é endêmica nos Estados Unidos e epidêmica na Escandinávia e Finlândia, embora não apresente nenhuma periodicidade sazonal (Grayston, 1990, 1989). O *C. pneumoniae* parece ser um patógeno primariamente de seres humanos, que é transmitido de um indivíduo a outro e não possui reservatórios em aves ou outros animais. Ainda falta determinar o mecanismo e o local de transmissão, o período de incubação e a infecciosidade desse organismo.

Patogênese

A patogênese da infecção por *C. pneumoniae* é desconhecida. Como a doença geralmente é suave e autolimitada, não existem estudos de autópsia disponíveis.

Manifestações clínicas

Estima-se que o *C. pneumoniae* seja responsável por no mínimo 10% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade (Grayston, 1990). A pneumonia costuma ser branda e apresenta apenas uma única infiltração subsegmentar que, no entanto, pode ser grave, principalmente em idosos e em indivíduos com doença crônica. Muitas vezes, inicia-se com faringite e rouquidão, seguidas de tosse persistente. Embora a pneumonia seja a síndrome mais comumente associada à infecção por *C. pneumoniae*, estudos sorológicos conduzidos durante epidemias entre recrutas militares revelaram que apenas cerca de 10% das infecções por *C. pneumoniae* resultam em pneumonia. Tais descobertas sugerem que a infecção com frequência é branda ou assintomática e imperceptível. Outras manifestações da infecção por *C. pneumoniae* são bronquite, faringite, febre de origem indeterminada, otite, doença similar à gripe, miocardite, endocardite e, ainda que haja controvérsias, uma possível aterosclerose (Campbell, 1998; Maraha, 2004).

Diagnóstico laboratorial

Chlamydia trachomatis

As amostras para detecção de *C. trachomatis* são determinadas pelo tipo de doença suspeita (Tab. 55.2). Foi demonstrado que a triagem de mulheres que apresentam risco de contrair infecção genital por *C. trachomatis* (já descrita) diminui a taxa de doença pélvica inflamatória e, assim, previne sequelas reprodutivas subsequentes (Nelson, 2001). O sistema de transporte escolhido deve ser adequado ao método do teste utilizado. As técnicas específicas de coleta são discutidas no Capítulo 63. A maioria das infecções envolve as membranas mucosas, de modo que as amostras devem ser coletadas diretamente da superfície envolvida. Além disso, essas amostras devem conter uma quantidade apropriada de células epiteliais infectadas. Secreções purulentas são inadequadas e precisam ser removidas antes da coleta da amostra com o auxílio de um *swab* ou escova. Entre os tipos disponíveis de *swab*, é preferível utilizar *swabs* Dracon ou com ponta de raiom. *Swabs* com haste de madeira devem ser evitados, porque a madeira é tóxica para o organismo. *Swabs* de alginato de cálcio podem ser tóxicos para as clamídias ou para as células que sustentam seu crescimento. *Swabs* com ponta de algodão são aceitáveis, porém, ocasionalmente, também são tóxicos para as clamídias. A coleta de urina para o teste de amplificação de DNA deve seguir as orientações do fabricante.

Cultura de células

A cultura celular é o método de referência para o diagnóstico das infecções por clamídia e deve ser realizada quando o diagnóstico for contestado e em casos de suspeita de agressão ou abuso sexual. As linhagens celulares mais comumente utilizadas são as células McCoy ou as *buffalo green monkey*. Ambas as linhagens celulares apresentam sensibilidade equivalente, contudo, as últimas são mais facilmente mantidas e resistentes a substâncias citotóxicas, além de estarem associadas a inclusões maiores e mais numerosas (Krech, 1989). A adição de ciclo-heximida (0,5–1,5 μL/mL) ao meio de cultura aumenta a sensibilidade. As monocamadas celulares crescem sobre lamínulas de vidro dentro de *shell vials* (tubos) ou em placas de cultura de 24 poços, ou ainda na superfície de poliestireno dos poços de placas de cultura de 96 ou 48 poços. Para intensificar a recuperação do *C. trachomatis*, as amostras são sonicadas ou agitadas com o auxílio de um vórtex antes da inoculação nos corpos elementares de liberação oriundos das células hospedeiras. Além disso, os tubos ou placas de cultura inoculados são centrifugados. Após um período de 48 a 72 horas de incubação, as monocamadas são fixadas e coradas com anticorpos monoclonais conjugados à fluoresceína. Quando se emprega um sistema de cultura de 96 poços, a passagem de amostras negativas para *C. trachomatis* em 48 horas pode intensificar a detecção. Entretanto, a passagem não aumenta significativamente a detecção em sistemas de *shell vials* ou em placas de 24 poços.

Tabela 55.2 Amostras para detecção de *Chlamydia trachomatis*

Doença	Amostra
Cervicite mucopurulenta	*Swab* endocervical, urina
Síndrome uretral aguda (mulheres)	*Swab* uretral, urina
Endometrite aguda	Aspirado endometrial
Salpingite aguda	Biópsia de trompa de Falópio
Uretrite não gonocócica (homens)	*Swab* uretral, urina
Conjuntivite por inclusão	Raspado/*swab* conjuntival
Tracoma	Raspado/*swab* conjuntival
Linfogranuloma venéreo	Aspirado de linfonodo, biópsia de lesão ulcerada, soro
Pneumonite (crianças)	Soro, aspirado tranqueobronquial, *swab* nasofaríngeo

A urina é considerada aceitável para alguns imunoensaios enzimáticos e para uso em testes comerciais de amplificação de ácido nucleico.

Métodos de detecção direta não cultura

Testes com anticorpos fluorescentes diretos. O TAFD permite a visualização direta dos corpos elementares de *C. trachomatis* em esfregaços de amostras clínicas. O tempo de processamento total é de 30 a 60 minutos. Trata-se do único teste que permite avaliar diretamente a adequação da amostra. Amostras que contêm células colunares epiteliais ou células escamosas metaplásticas são consideradas aceitáveis. Ao contrário, amostras que contêm poucas células colunares, quantidade excessiva de muco ou predominância de células escamosas são consideradas inapropriadas. Entretanto, a interpretação do exame do esfregaço é subjetiva, e a fadiga do operador pode representar um problema diante da existência de um grande volume de amostras.

Existem anticorpos monoclonais comercializados por vários fabricantes. Anticorpos dirigidos contra a MOMP espécie-específica de *C. trachomatis* parecem ser mais específicos, além de produzirem uma fluorescência mais intensa do que aquela produzida por anticorpos anti-LPS de clamídia (Cles, 1988). Ocasionalmente, até mesmo anticorpos espécie-específicos coram bactérias diferentes de *C. trachomatis*, talvez devido à ligação inespecífica de imunoglobulinas ou à reatividade cruzada. A coloração de outros organismos, distintos de *C. trachomatis*, é especialmente frequente no caso das espécies retais. Portanto, para esse sítio, é preferível realizar culturas, ainda que alguns reagentes do TAFD tenham sido aprovados para avaliação de amostras retais. Também há relatos de reatividade cruzada entre *Chlamydiaceae* e *Bartonella*.

A sensibilidade do TAFD apresentou uma variação de 50% a quase 100%, quando comparada à cultura como padrão, bem como uma especificidade ≥ 95%. A sensibilidade depende da prevalência da infecção na população em avaliação e também do número de corpos elementares necessários para que o resultado seja positivo (Barnes, 1989). Em geral, a sensibilidade é maior diante de valores mais baixos de corte para os corpos elementares e em populações com alta prevalência da doença.

Imunoensaios enzimáticos. Os EIAs detectam LPS de clamídia empregando anticorpos mono- ou policlonais marcados com uma enzima que converte um substrato incolor em um produto corado. Ambos os sistemas, de fase sólida (com utilização de plástico ou pérolas recobertas com anticorpos) e de membrana, são comercializados. O tempo de processamento total varia de 15 a 30 minutos para os sistemas de membrana e de 3 a 4 horas para os sistemas de fase sólida. As vantagens proporcionadas pelo EIA são a interpretação objetiva dos resultados e a facilidade de uso para lotes de amostras numerosas.

Com o TAFD, as sensibilidades dos EIAs são variáveis (cerca de 70 a 100%), se comparadas à cultura como padrão, além de tenderem a ser mais altas em populações com alta prevalência da doença (p. ex., indivíduos que comparecem a uma clínica de tratamento de doenças sexualmente transmissíveis) (Barnes, 1989; Mills, 1992; Clarke, 1993; Ehret, 1993; Kluytmans, 1993; Warren, 1993). A especificidade do EIA é igual a 95% ou maior. As causas de resultados falso-positivos são a ocorrência de infecção bacteriana no trato urinário (Demaio, 1991) ou a contaminação da amostra com muco cervical ou secreções vaginais. Esse último problema pode ser reduzido pelo aperfeiçoamento da técnica de coleta (remoção do muco cervical e obtenção de uma amostra endocervical verdadeira) e pelo uso de anticorpos bloqueadores (Mills, 1992).

Testes de hibridização de ácido nucleico. Atualmente, é comercializada uma sonda de DNA marcado com éster de acridínio, que é complementar ao RNA ribossômico de *C. trachomatis* e permite a detecção desse organismo em amostras urogenitais e de conjuntiva. O teste requer um banho-maria e um medidor de luminescência. O tempo de processamento total é de 2 a 3 horas. Comparado à cultura como método de referência-padrão, o teste de sonda apresenta sensibilidade variável tanto para amostras endocervicais como para amostras uretrais obtidas de homens com auxílio de *swab* (76–97%) (Iwen, 1991; Kluytmans, 1991, 1994; Blanding, 1993; Clarke, 1993; Warren, 1993; Centers for Disease Control, 2002b). A especificidade do teste de sonda é igual a 97% ou maior, podendo ser aprimorada pela utilização de um ensaio competitivo com sonda (Woods, 1996).

Amplificação de ácido nucleico. Atualmente, são comercializados diversos testes de amplificação de ácido nucleico para detecção direta de *C. trachomatis* em amostras endocervicais obtidas com auxílio de *swab*, amostras uretrais masculinas obtidas com *swab* e amostras de urina de homens e mulheres. O tempo total necessário para obtenção de um resultado é de 2 a 5 horas, dependendo do teste utilizado e do número de amostras processadas. Dados obtidos por vários estudos, em que foram comparados os métodos de amplificação de ácido nucleico e cultura de células, indicam que os testes de amplificação são altamente específicos e mais sensíveis do que a cultura (Goessens, 1997; Carroll, 1998; Ferrero, 1998; Mahony, 1998; Puolakkainen, 1998; Toye, 1998; Wylie, 1998; Vincelette, 1999; van der Pol, 2001; Koumans, 2003; Boyadzhyan, 2004; Gaydos, 2004).

Verificação de testes não cultura

Especialistas dos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomendam que os resultados positivos de testes distintos da cultura celular (TAFD, EIA, sonda, amplificação de ácido nucleico) sejam verificados com um teste complementar, caso um resultado falso-positivo possa acarretar consequências médicas, sociais ou psicológicas (Centers for Disease Control, 1993, 2002b). Em populações de baixa prevalência, essa verificação provavelmente deve fazer parte da rotina, contudo deveria ser seletiva nas populações de alta prevalência. A confirmação com culturas é uma prática ideal, no entanto, requer a coleta de uma segunda amostra durante a primeira visita ou na visita de retorno. Métodos alternativos de verificação são EIAs bloqueadores, um ensaio de competição com utilização de sonda, a avaliação do meio de transporte por TAFD ou a repetição de amostras positivas pela utilização da amplificação de ácido nucleico com um alvo diferente.

Testes sorológicos

Os testes sorológicos têm pouco valor diagnóstico para as infecções genitais causadas por clamídia. Isso se deve a dois motivos: primeiro, os anticorpos contra *C. trachomatis* persistem após a resolução da infecção, de modo que um teste sorológico que resulte positivo não necessariamente está correlacionado com a doença ativa; segundo, muitos testes sorológicos são inespecíficos para *C. trachomatis*, pois detectam anticorpos gênero-específicos. As únicas exceções são o diagnóstico de LGV e pneumonite por *C. trachomatis* em bebês. Como o LGV está associado a um longo período de latência e seu diagnóstico clínico com frequência é retardado, os anticorpos em geral estão presentes quando o soro é coletado na fase aguda, de forma que o aumento de quatro vezes dos títulos observado entre as fases aguda e de convalescência muitas vezes não pode ser registrado. Assim, um título único ou estável de fixação de complemento da ordem de 1:64 ou mais sustenta o diagnóstico presumível de LGV. Para se estabelecer o diagnóstico de pneumonite por *C. trachomatis* em bebês, o método de escolha pode ser a detecção de anticorpos IgM por imunofluorescência (um título igual ou maior que 1:32 é considerado diagnóstico).

Chlamydophila psittaci

O *C. psittaci* pode ser mantido em cultura celular, porém, recomenda-se que esse tipo de cultura seja feito apenas em laboratórios especialmente equipados e que contem com funcionários experientes, pois se trata de um organismo bastante virulento, associado a infecções adquiridas no ambiente laboratorial. Infecções por *C. psittaci* usualmente são diagnosticadas por meio de métodos sorológicos, de preferência com utilização de amostras de soro obtidas nas fases aguda e de convalescência. O diagnóstico é sustentado pela constatação de um aumento de quatro vezes ou mais dos títulos de anticorpos fixadores de complemento entre as amostras obtidas de um paciente com sintomas de psitacose. A detecção de um único título de 1:32 ou mais em amostra de indivíduo com doença compatível constitui evidência presumível de psitacose. De modo geral, os anticorpos são detectados ao final da segunda semana de doença, contudo, a instituição de uma terapia antibiótica precoce é capaz de retardar o aparecimento desses anticorpos em várias semanas. Elevações falso-positivas dos títulos de anticorpo são incomuns em indivíduos com doença do legionário.

Chlamydophila pneumoniae

O diagnóstico da infecção causada por *C. pneumoniae* é baseado sobretudo em testes sorológicos (Grayston, 1990). O teste de microimunofluorescência com antígeno TWAR é específico para *C. pneumoniae*. Anticorpos IgM surgem aproximadamente em 3 semanas após o início da doença primária; seus títulos em geral declinam nos 2 a 6 meses subsequentes até atingirem níveis indetectáveis e podem não reaparecer em caso de reinfecção. Os anticorpos IgG são detectados em 6 a 8 semanas após o início da doença primária, persistindo ao longo de toda a vida do indivíduo, e seus títulos podem subir em 1 a 2 semanas após a reinfecção. São resultados de testes sorológicos consistentes com infecção aguda: uma elevação equivalente a quatro vezes dos títulos de IgG nas amostras de soro obtidas entre as fases aguda e de convalescência; um título único igual a 1:512 ou maior; ou um título de IgM igual a 1:16 ou maior. O *C. pneumoniae* pode ser isolado em cultura celular, no entanto esse isolamento é mais difícil do que para o *C. trachomatis* (Roblin, 1992).

Tratamento

As tetraciclinas constituem o tratamento de escolha para infecções por clamídias. Para infecções genitais por *C. trachomatis*, os regimes recomendados são azitromicina (1 g por via oral, 1 dose) ou doxiciclina (100 mg por via oral, duas vezes ao dia, durante 7 dias). Outros agentes efetivos são eritromicina, ofloxacina ou levofloxacina (Centers for Disease Control, 2002a). As infecções oculares por *C. trachomatis* requerem tratamento sistêmico com tetraciclina (para adultos), eritromicina ou sulfisoxazol (para recém-nascidos). A terapia tópica suprime os sintomas, contudo, não erradica o organismo. Os macrolídeos são agentes alternativos aceitáveis para o tratamento de infecções por *C. pneumoniae*. As sulfonamidas são ineficazes contra *C. psittaci* e *C. pneumoniae*.

Infecções por riquétsias

Riquétsia é um conceito que se desenvolveu historicamente, à medida que a natureza molecular e física dos vírus foi sendo definida (Weiss, 1988). Contrastando com os agentes virais humanos, que também necessitam de células eucariônticas hospedeiras para replicação intracelular, as riquétsias possuem uma parece celular de bactérias Gram-negativas, e seu crescimento é inibido por determinados antibióticos em particular. Considerando-se outras bactérias intracelulares obrigatórias, as riquétsias se distinguem em termos de ecologia e por serem frequentemente transmitidas por vetores artrópodes. O esquema taxonômico tradicional das riquétsias baseado nessas características fenotípicas (i. e., crescimento intracelular e transmissão por vetores artrópodes) necessita de modificações substanciais à luz das análises contemporâneas de sequência genética. Os gêneros que contêm riquétsias patogênicas para o homem são *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Coxiella* e *Bartonella* (antiga *Rochalimaea*) (Dumler, 2001; Yu, 2003). Apesar da associação histórica com a riquetsiologia e da transmissão por artrópodes, as espécies de *Bartonella* são cultiváveis em meio de cultura livre de células e não pertencem à ordem *Rickettsiales* (Brenner, 1993). Essa ordem, por sua vez, inclui os gêneros *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia*, que são mais próximos entre si do que em relação ao gênero *Coxiella*. Agrupadas de acordo com o gênero, as seguintes doenças são descritas no presente capítulo: *Rickettsia* – febre maculosa das Montanhas Rochosas, febre botonosa, febre africana transmitida pela mordida do carrapato, riquetsiose variceliforme e tifo murino; *Orientia* – tifo rural; *Ehrlichia* – erliquiose monocitotrófica humana causada por *Ehrlichia*

chaffeensis, e infecção humana por *Ehrlichia ewingii*; *Anaplasma* – anaplasmose granulocitotrófica humana; *Coxiella* – febre Q; e *Bartonella* – doença da arranhadura de gato, angiomatose bacilar e peliose, febre das trincheiras e bartonelose sul-americana. As doenças de cada gênero abrangem agrupamentos clínicos e patológicos coesivos, sendo que as doenças por riquétsias impõem um conjunto semelhante de desafios cuja solução requer abordagens técnicas igualmente similares.

Infecções causadas por organismos do gênero *Rickettsia*

Estrutura e função

As riquétsias associadas ao grupo das febres maculosas e ao grupo do tifo são bactérias que apresentam íntima proximidade genética, exibem a morfologia de bacilos delgados (0,3–0,5 μm × 1–2 μm) e possuem uma parede celular Gram-negativa que contém LPS com componentes antigênicos que diferenciam esses dois grupos. Todas as espécies de *Rickettsia* vivem livres no citosol da célula hospedeira e se dividem por fissão binária. As riquétsias se fixam à célula hospedeira por meio de uma proteína adesina, entram nessa célula via indução de fagocitose e escapam do fagossomo (Walker, 1984; Li, 1992, 1998; Uchiyama, 1999). Essas funções podem ocorrer em questão de minutos e estão associadas a uma atividade de fosfolipase aparentemente oriunda da riquétsia (Silverman, 1992). As riquétsias do grupo das febres maculosas são impulsionadas para dentro das células, bem como durante a liberação a partir dessas células, por estimulação da polimerização de actina F em um dos polos da célula hospedeira (Heinzen, 1993; Gouin, 2004). As riquétsias que apresentam essa atividade (p. ex., *Rickettsia rickettsii*) escapam mais precocemente das células hospedeiras e se disseminam com maior rapidez para outras células. Em comparação, aquelas que não manifestam esse tipo de atividade (p. ex., *Rickettsia prowazekii*) se dividem no meio intracelular e dão origem a inúmeras bactérias, até que a célula hospedeira estoura liberando os novos organismos. De acordo com a filogenia molecular, as espécies de *Rickettsia* patogênicas para os seres humanos evoluíram e deram origem a três genogrupos (Tabela 55.3) (Roux, 1995, 1997; Stothard, 1995). O grupo do tifo inclui *R. prowazekii* e *Rickettsia typhi*. O grupo central da febre maculosa engloba *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia aeschlimannii* e *Rickettsia slovaca*. Um clado recém-reconhecido inclui *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* e *Rickettsia felis*. Era tradição considerar *R. akari* e *R. australis* membros relativamente distantes do grupo da febre maculosa, cujas espécies compartilham os antígenos do LPS.

Febre maculosa das Montanhas Rochosas

Sendo a mais grave de todas as riquetsioses, a febre maculosa das Montanhas Rochosas apresenta no momento um significativo índice caso-fatalidade de 5%, mesmo entre crianças e adultos jovens anteriormente sadios e imunocompetentes (Dalton, 1995a; Paddock, 1999). Na natureza, a *R. rickettsii* normalmente vive em carrapatos: *Dermacentor variabilis*, o carrapato de cães americanos, na região correspondente aos 2/3 orientais dos Estados Unidos e na Califórnia; *Dermacentor andersoni*, o carrapato da madeira das Montanhas Rochosas, na região ocidental dos Estados Unidos; *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato marrom de cães, no México; e *Amblyomma cajennense*, na América do Sul. Essas espécies de carrapato abrigam *R. rickettsii* ao longo dos diferentes estágios da muda (larva, ninfa e adulto) e ainda transovariamente de uma geração a outra. Menos de 1 em cada 1.000 carrapatos abriga a *R. rickettsii* virulenta, pois essa cepa parece ser levemente patogênica para os carrapatos (Niebylski, 1999). Novas linhagens de carrapatos se tornam infectadas ao se alimentarem em roedores riquetsêmicos, repondo a população de organismos mantida transovariamente nos carrapatos (Gage, 1990).

As infecções ocorrem quando e onde seres humanos encontram carrapatos infectados por *R. rickettsii* (Helmick, 1984). Embora haja relatos de casos recentes de febre maculosa das Montanhas Rochosas em quase todos os estados americanos, com exceção do Havaí, Alasca e Vermont, a incidência mais alta é observada nos estados sulinos de Atlantic (de Maryland a Georgia) e nos estados centrais de Oklahoma, Missouri, Arkansas e Tennessee. A maioria dos casos ocorre no fim da primavera e verão. Contudo, sobretudo nas regiões sulinas localizadas a altas latitudes, pode haver alguns casos até mesmo durante o inverno. A incidência maior ocorre entre crianças e demais indivíduos que se expõem aos carrapatos durante a prática de atividades ao ar livre. Os índices caso-fatalidade são bem mais altos entre indivíduos com mais de 30 anos de idade. Casos fulminantes de febre maculosa das Montanhas Rochosas (com a morte do paciente em torno do quinto dia de infecção) estão associados à hemólise moderada, por exemplo, entre os homens afro-americanos que apresentam deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Walker, 1983).

As riquétsias são inoculadas na derme do paciente com a secreção das glândulas salivares de carrapatos infectados, 6 a 10 horas após o carrapato ter se alimentado, e se disseminam hematogenicamente por todo o corpo do indivíduo. O endotélio vascular constitui o alvo da infecção intracelular, sendo que também pode haver certo grau de infecção intracelular das células musculares lisas adjacentes. O endotélio infectado é lesado em decorrência do dano produzido por espécies reativas de oxigênio às membranas celulares e por uma possível atividade de fosfolipase (Silverman, 1992, 1997). O dano ao endotélio resulta em aumento da permeabilidade vascular, edema, hipovolemia e hipotensão. As consequências da lesão vascular, no nível do sistema nervoso central (SNC) e dos pulmões, que ameaçam a vida são meningoencefalite por riquétsia e edema pulmonar não cardiogênico. Inicialmente, durante o curso da infecção, as lesões apresentam riquétsias endoteliais sem trombos nem resposta celular. Posteriormente, a característica infiltração linfo-histiocítica perivascular surge como pneumonia intersticial, miocardite intersticial, nódulos gliais perivasculares cerebrais e lesões vasculares semelhantes na derme, trato gastrintestinal, fígado, músculos esqueléticos e rins. A lesão severa pode ser acompanhada de hemorragias focais, contudo raramente ocorrem microinfartos, a não ser na substância branca encefálica.

A doença clínica usualmente se manifesta como febre, dor de cabeça e mialgia em 2 a 14 dias após a mordida do carrapato (Kaplowitz, 1981). Náuseas, vômitos, dor e sensibilidade abdominal, além de diarreia, são mais frequentes durante os 3 primeiros dias de infecção. A erupção cutânea, que em geral aparece em 3 a 5 dias, tipicamente se manifesta como manchas em torno dos punhos e tornozelos que, mais adiante, surgem também nos braços, pernas e tronco. As lesões tornam-se maculopapulares, e metade dos indivíduos afetados desenvolve petéquias no centro de várias pápulas maculares. O característico envolvimento das palmas das mãos e solas dos pés é observado em metade dos casos, como uma manifestação tardia. A insuficiência renal constitui um aspecto da doença severa. O envolvimento do SNC é um mau sinal. Convulsões e coma ocorrem em 8 a 10% dos casos em geral, no entanto é raro haver coagulação intravascular disseminada (Elghetany, 1999).

Febre africana transmitida pela mordida do carrapato, febre botonosa e outras febres maculosas

A *R. conorii* foi isolada no sul da Europa; norte, leste e sul da África; Israel; Turquia; Índia; Paquistão; Rússia; Georgia e Ucrânia. A ecologia desse organismo e a epidemiologia da febre botonosa estão intimamente associadas aos carrapatos, em especial *R. sanguineus*, que mantém as riquétsias por via transovariana e transmite a infecção aos seres humanos enquanto se alimenta (Walker, 1991). Casos importados são diagnosticados em viajantes que retornam aos Estados Unidos e ao norte da Europa vindos da região da Bacia do Mediterrâneo. O índice de fatalidade entre pacientes hospitalizados é de 1,4 a 5,6%, em particular entre pacientes com doenças subjacentes. Uma forma mais branda da doença causada por *R. africae* ocorre a uma frequência provavelmente maior entre viajantes que retornam da região do sul da África (McQuiston, 2004). A doença clínica assemelha-se àquela recentemente associada nas Américas a *R. parkeri*, que, em essência, é coespecífica a *R. africae* (Paddock, 2004). As escaras produzidas pela mordida do carrapato com frequência são múltiplas; linfadenopatias regionais são comumente observadas, e as erupções cutâneas costumam ser escassas, às vezes vesiculares e com frequência estão ausentes. A *R. sibirica* foi isolada na Rússia, China, Mongólia e Paquistão. A *R. japonica* (cepa *heilongjiangiensis*) ocorre também na China e Rússia. As infecções humanas por *R. australis* ocorrem somente na Austrália e Tailândia. Após um período de incubação médio de 7 dias, essas doenças se manifestam com febre,

dor de cabeça e mialgias. Com frequência, uma escara pode ser descoberta durante um exame minucioso da pele durante essa fase. A patologia dessas febres maculosas é bem descrita na *tache noire* ("mancha motora") ou escara que se forma no local da mordida do carrapato para inoculação das riquétsias (Walker, 1988a). A infecção e lesão endotelial por *R. conorii* na escara resultam em necrose dérmica e epidérmica e também em edema perivascular. As defesas do hospedeiro que destroem as riquétsias intracelulares são as citocinas secretadas por linfócitos T e macrófagos, que infiltram a região em torno dos vasos sanguíneos dérmicos infectados, e linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ (Herrero-Herrero, 1987; Valbuena, 2002). A ativação das células endoteliais pelas citocinas, entre as quais interferon-γ e fator de necrose tumoral-α, resulta na indução de mecanismos de destruição das riquétsias, e, por fim, a depuração desses organismos é mediada pelos linfócitos T citotóxicos. A infecção endotelial disseminada leva ao aparecimento de erupções cutâneas maculopapulares, meningoencefalite e lesões vasculares nos pulmões, rins, trato gastrintestinal e coração (Walker, 1985). A necrose hepatocelular multifocal e as lesões similares a granulomas apresentam correlação moderada com concentrações aumentadas de transaminases hepáticas (Walker, 1986).

Tabela 55.3 Infecções por *Rickettsia, Orientia, Ehrlichia, Anaplasma, Neorickettsia, Coxiella* e *Bartonella*

Agente etiológico	Doença	Distribuição geográfica	Transmissão
Febres maculosas			
R. rickettsii	Febre maculosa das Montanhas Rochosas	Américas do Norte, Central e do Sul	Mordida do carrapato
R. conorii	Febre botonosa	Sul da Europa, África, Rússia, Georgia, Oriente Médio, subcontinente indiano	Mordida do carrapato
R. africae	Febre africana transmitida pela mordida do carrapato	Sul e leste da África, Caribe	Mordida do carrapato
R. parkeri	Febre americana transmitida pela mordida do carrapato	Américas do Norte e do Sul	Mordida do carrapato
R. sibirica	Tifo do carrapato do norte da Ásia	Rússia, China, Mongólia, Paquistão, Europa, África	Mordida do carrapato
R. japonica	Febre maculosa japonesa	Japão, China	Mordida do carrapato
R. honei	Febre maculosa da Ilha de Flinders	Austrália, sudeste asiático	Mordida do carrapato
R. slovaca	Linfadenopatia transmitida pelo carrapato	Europa	Mordida do carrapato
Febres de tifo			
R. prowazekii	Tifo epidêmico	Potencialmente no mundo inteiro; nas últimas décadas: África, Américas do Sul e Central, México e Ásia	Fezes de piolhos parasitas do corpo humano
R. prowazekii	Doença de Brill-Zinsser	No mundo todo; qualquer lugar onde atualmente vivam indivíduos que tenham contraído tifo epidêmico no passado	Recrudescência de infecção latente
R. prowazekii	Tifo do esquilo voador	Estados Unidos	Provavelmente fezes de pulga ou piolho parasitas do esquilo voador
R. typhi	Tifo murino	No mundo inteiro, na região dos trópicos e subtrópicos	Fezes de pulga
Outras febres causadas por riquétsias			
R. akari	Riquetsiose variceliforme	Estados Unidos, Ucrânia, Croácia, Coreia	Mordida do ácaro
R. australis	Tifo do carrapato de Queensland	Leste da Austrália	Mordida do carrapato
R. felis	Febre maculosa por *R. felis*	No mundo todo	Provavelmente mordida ou fezes de pulga
Tifo rural			
Orientia tsutsugamushi	Tifo rural	Sudeste asiático, Japão, China, Sri Lanka, Índia, Rússia asiática, Tadjiquistão, Indonésia, Pacífico ocidental, norte da Austrália	Mordida de ácaro trombiculídeo
Erliquioses			
E. chaffeensis	Erliquiose monocitotrófica humana	Estados Unidos, África, Ásia	Mordida do carrapato
E. ewingii	Erliquiose ewingii	Estados Unidos	Mordida do carrapato
Anaplasma phagocytophila	Anaplasmose granulocitotrófica humana	Estados Unidos, Eurásia	Mordida do carrapato
Neorickettsia sennetsu	Riquetsiose de Sennetsu	Ásia	Desconhecida
Coxielose			
C. burnetii	Febre Q	No mundo inteiro	Inalação de aerossóis oriundos de animais infectados, possivelmente ingestão de produtos animais
Bartoneloses			
B. bacilliformis	Febre de Oroya, verruga peruana	Ocidente da América do Sul	Picada do mosquito-pólvora
B. henselae	Doença da arranhadura do gato, angiomatose e peliose bacilar, endocardite	No mundo inteiro	Arranhadura ou mordida de filhote de gato
B. clarridgeiae	Doença similar à arranhadura do gato	Provavelmente em todo o mundo	Provavelmente arranhadura ou mordida de gato
B. quintana	Febre das trincheiras, endocardite	No mundo inteiro	Fezes de piolho do gênero *Pediculus*

Riquetsiose variceliforme

A *R. akari* se mantém na natureza por meio da transmissão transovariana em um ácaro gamasídeo (*Liponyssoides sanguineus*), um ectoparasita do camundongo doméstico (*Mus musculus*). A *R. akari* foi isolada apenas nos Estados Unidos, Croácia, Ucrânia e Coreia, talvez mais como forma significativa de indicação da escassez de investigações acerca das riquétsias do que da real distribuição dessas espécies de riquétsia.

No local da mordida do carrapato, uma pápula se desenvolve ao longo do período de incubação aproximado de 10 dias, evoluindo para se transformar em uma escala de 1 a 2,5 cm. A doença se manifesta inicialmente por meio de calafrios, febre, mal-estar, dor de cabeça severa e mialgia. Após 2 a 6 dias, surgem erupções cutâneas maculopapulares, que posteriormente se tornam papulares ou (nos casos clássicos) pustulares e, por fim, vesiculares. Alguns pacientes também apresentam náuseas, vômitos, faringite, fotofobia, esplenomegalia e rigidez da nuca.

O exame histopatológico de uma escara revela a necrose de coagulação na epiderme, lesão vascular subjacente e uma infiltração linfo-histiocítica perivascular em que os macrófagos parecem ser a principal célula-alvo de infecção (Brettman, 1981; Kass, 1994; Walker, 1999b). É provável que a linfadenopatia regional e as erupções cutâneas reflitam a disseminação linfógena e hematógena, respectivamente.

Febre maculosa por R. felis (transmitida pela pulga)

A *R. felis* é um organismo amplamente disperso, mantido transovariamente em pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*) com aparente envolvimento de gambás no ciclo zoonótico. Há registros de infecções humanas na América do Norte, Europa e Ásia (Schriefer, 1994a; Zavala-Velazquez, 2000; Raoult, 2001; Parola, 2003).

Tifo murino e tifo epidêmico

A infecção endêmica causada por *R. typhi* e transmitida por pulgas – tifo murino – atualmente é considerada a infecção mais importante do grupo do tifo nos Estados Unidos. É responsável por uma extensiva morbidade em todas as regiões quentes do planeta (Azad, 1990). Historicamente, as infecções epidêmicas causadas por *R. prowazekii* e transmitidas por piolhos exercem impacto significativo sobre o desfecho de campanhas militares, bem como sobre o flagelo de populações em geral, que foram devastadas pela guerra, fome e desastres naturais (Zinsser, 1935; Patterson, 1993). A *R. prowazekii* continua causando doença em algumas áreas de pobreza ao redor do mundo e ressurge em determinadas situações, como durante a Guerra Civil de Burundi, nas condições de extrema pobreza das populações indígenas dos Andes e diante da situação de transtorno social e econômico em que vive a Rússia. A recrudescência das infecções por *R. prowazekii* pode se dar anos após a infecção primária de imigrantes oriundos de áreas afligidas pelo tifo. Nos Estados Unidos, ocorre a transmissão endêmica desse organismo a partir do ciclo de infecção natural de esquilos voadores e seus ectoparasitas (McDade, 1980; Reynolds, 2003).

O tifo murino ocorre particularmente em áreas costeiras tropicais e subtropicais, onde abundam a pulga do *Rattus norvegicus* e do rato oriental (Azad, 1990). As pulgas bebem o sangue que contém riquétsias de ratos infectados e mantêm a infecção por todo o seu tempo normal de sobrevida. Como a transmissão transovariana ocorre apenas em baixos níveis, a transmissão horizontal constitui um fator essencial à manutenção de *T. typhi* na natureza. Existem outros ciclos em mamífero-artrópodes que mantêm as riquétsias e resultam na transmissão da infecção a seres humanos (p. ex., a pulga do gato, *C. felis*, e o gambá encontrado no Texas e na Califórnia) (Schriefer, 1994b).

Acredita-se que o homem adquire a infecção via inoculação intradérmica das fezes de pulgas infectadas na pele escoriada durante o ato de se coçar. Entretanto, há casos em que a transmissão se dá pela inalação de aerossóis que contém riquétsias a partir das fezes secas da pulga infectada ou pela inoculação desse organismo por meio da picada da pulga. Após um período de incubação de 1 a 2 semanas, a doença se inicia com o aparecimento de uma febre que às vezes é acompanhada de severa dor de cabeça, calafrios, mialgias e náuseas. Uma erupção cutânea macular ou maculopapular, mais proeminente no tronco, aparece em 5 a 6 dias em 80% dos pacientes com pele clara e em 20% dos pacientes com pele de pigmentação escura. Uma pequena proporção de pacientes apresenta tosse e infiltração pulmonar. Indivíduos que desenvolvem doenças severas também podem entrar em coma, apresentar convulsões e outros sinais neurológicos. Cerca de 10% dos pacientes hospitalizados necessitam de internação na unidade de terapia intensiva, sendo que 1 a 2% dos pacientes com tifo murina morrem (Dumler, 1991).

As lesões patológicas do tifo murino incluem o inchaço endotelial e a infiltração linfo-histiocítica perivascular que envolve vasos sanguíneos na derme, SNC, pulmões, coração, trato gastrintestinal e rins (Walker, 1989). As consequências mais sérias são a meningoencefalite e a lesão alveolar difusa.

Riquétsias como agentes de bioterrorismo

As espécies *R. prowazekii* e *R. rickettsii* são agentes selecionados, cuja posse é legalmente restrita a cientistas cadastrados em instituições aprovadas, onde os laboratórios são submetidos a rigorosas normas de proteção e segurança. Esses organismos são encontrados na natureza, podem ser isolados e propagados e promovem infecção por meio de aerossóis estáveis com infectividade semelhante à de uma única bactéria.

Sem o pronto diagnóstico e tratamento, teríamos índices caso-fatalidade da ordem de 15 a 25% em indivíduos previamente sadios. O potencial de desenvolvimento de resistência por mecanismos genéticos aos únicos antibióticos efetivos (tetraciclina e cloranfenicol) tornaria intratáveis esses casos de tifo e febre maculosa das Montanhas Rochosas. Ainda que os índices de caso-fatalidade fossem menores, a dispersão bioterrorista de *R. typhi* ou *R. conorii* também poderia criar terror e sobrepujar os sistemas médico e de saúde pública.

Diagnóstico laboratorial

Diferentemente da maioria das doenças infecciosas, para as quais se procura um diagnóstico preciso durante a fase aguda, quando são tomadas decisões terapêuticas críticas, as doenças causadas por riquétsias usualmente são diagnosticadas de forma aguda com base apenas na suspeita clínico-epidemiológica, recebendo tratamento empírico de acordo com as suspeitas (Kaplowitz, 1981). O diagnóstico sorológico, muitas vezes solicitado de modo equivocado na fase inicial do curso da doença, fornece a maioria dos diagnósticos laboratoriais que são confirmados pela demonstração de um aumento mínimo de quatro vezes dos títulos somente durante a fase de convalescência. Mesmo quando são utilizados os métodos sorológicos mais sensíveis, em menos de 20% dos pacientes são detectados anticorpos específicos contra as riquétsias no momento em que o indivíduo procura atendimento médico. Nesse momento, outras abordagens diagnósticas adotadas são a demonstração imuno-histológica das riquétsias em lesões cutâneas, identificação imunocitológica das riquétsias em células endoteliais soltas circulantes, detecção do DNA de riquétsia em amostras de sangue e tecido por PCR (*polymerase chaim reaction*) (Furuya, 1995; Schriefer, 1994a; Sexton, 1994; Williams, 1994) e cultivo de riquétsias a partir de amostras de sangue e tecidos. No entanto, esses testes não se encontram disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos.

As riquétsias foram originalmente demonstradas em tecidos de pacientes com febre maculosa das Montanhas Rochosas e tifo epidêmico, por meio da técnica de Wolbach com emprego da coloração de Giemsa, durante e logo após a I Guerra Mundial. Esse método – essencialmente uma arte perdida – requer atenção cuidadosa aos detalhes de fixação e coloração das riquétsias, e, desse modo, sua execução não é bem-sucedida nos laboratórios de histologia modernos. Um método de Brown-Hopps modificado é capaz de corar uma pequena fração dos organismos, que são vistos como bacilos legados junto às células endoteliais. Uma abordagem mais sensível e específica para visualização das riquétsias em um corte tecidual é a imuno-histologia, seja por coloração de imunofluorescência ou imunoenzimática, empregando-se anticorpos específicos para o grupo da febre maculosa ou do tifo (Kaplowitz, 1983; Walker, 1989, 1997b, 1999b; Dumler, 1990). A coloração histoquímica de biópsias de pele obtidas de pacientes com febre maculosa das Montanhas Rochosas apresenta uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 100%. Pacientes com febre botonosa, febre africana transmitida pela mordida do carrapato e riquetsiose variceliforme também foram diagnosticados pela detecção imuno-histológica das riquétsias em lesões de erupções cutâneas e escaras. Um anticorpo monoclonal dirigido contra um epítopo específico do grupo da febre maculosa (localizado no LPS da parede celular) revela a presença de *R. rickettsii, R. conorii, R. akari, R. japonica, R. australis, R. africae, R. honei* e *R. sibirica* em tecidos fixados em formalina e parafinados. De modo semelhante,

um anticorpo monoclonal específico para o LPS do grupo do tifo é útil na detecção de *R. typhi* e *R. prowazekii* (Walker, 1997b). Atualmente, os reagentes necessários ao diagnóstico imuno-histológico das riquetsioses não são comercializados, entretanto convém que sejam desenvolvidos kits para diagnóstico específico dos grupos de riquétsias mediante utilização de anticorpos produzidos em laboratórios de pesquisa.

Uma abordagem diagnóstica única consiste na demonstração imunocitológica de *R. conorii* em células endoteliais soltas circulantes. Essas células são capturadas a partir de amostras de sangue de pacientes, com o auxílio de pérolas imunomagnéticas recobertas com anticorpos monoclonais específicos para um antígeno de superfície das células endoteliais humanas (Drancourt, 1992; La Scola, 1996a). Em pacientes com febre botonosa, esse método apresenta uma sensibilidade de 58% para o exame de uma única amostra de sangue, podendo ser utilizado antes do aparecimento das erupções cutâneas. Essas erupções cutâneas devem estar presentes para a escolha do local de obtenção da biópsia de pele a ser analisada para o diagnóstico imuno-histológico.

A PCR tem sido empregada com sucesso para detecção diagnóstica de *R. rickettsii, R. conorii, R. japonica, R. africae, R. parkeri, R. felis, R. sibirica, R. slovaca, R. aeschlimannii, R. typhi* e *R. prowazekii* a partir de amostras clínicas, tais como biópsias de escaras ou erupções, sangue periférico, creme leucocitário, plasma, tecido de necropsia e vetores artrópodes removidos de pacientes. Essa abordagem pode falhar na detecção de ácidos nucleicos de riquétsias no início da infecção, após o desenvolvimento de imunidade ou após a instituição de um tratamento antimicrobiano efetivo (Tzianabos, 1989; Schriefer, 1994a; Sexton, 1994; Furuya, 1995; Roux, 1999; Walker, 2003; Fournier, 2004).

É comum isolar riquétsias a partir de culturas de células em tubos, livres de antibióticos e aprimoradas por centrifugação, realizadas em laboratórios de referência e de pesquisa, que são de nível de biossegurança 3 e dispõem de conhecimento especializado.

O teste sorológico considerado "padrão-ouro" para detecção de riquetsioses é o imunoensaio com fluorescência de anticorpo indireto (IFA, *immunofluorescent antibody*) (Kaplan, 1986). O teste da imunoperoxidase indireto para detecção de anticorpos fornece resultados similares. Nos Estados Unidos, para casos de infecções por riquétsias dos grupos de febre maculosa e tifo, títulos de IFA iguais a 1:64 ou maiores são considerados diagnósticos em circunstâncias clínico-epidemiológicas compatíveis. Nos países com alta prevalência de indivíduos que apresentam anticorpos contra essas riquétsias, devido à hipótese de estimulação por riquétsias não patogênicas ou à possibilidade de infecção subclínica ou não diagnosticada, o diagnóstico é estabelecido mediante detecção de títulos maiores. Seja qual for o caso, considera-se diagnóstica uma elevação dos títulos de anticorpos equivalente a quatro vezes, com uma titulação mínima de 1:64. A sensibilidade da IFA para detecção de febre maculosa das Montanhas Rochosas é de 94 a 100%, enquanto a especificidade é de 100%. Adotando como valor de corte para IgG um título de 1:128 e para IgM um título de 1:32, o teste da imunoperoxidase indireta fornece resultados similares e ainda proporciona a vantagem de requerer apenas um microscópio de luz, em vez de um microscópio com luz ultravioleta.

Os testes sorológicos comercializados atualmente incluem imunofluorescência indireta, aglutinação do látex e imunoensaio enzimático em fase sólida (Kelly, 1995). O teste de aglutinação do látex e o imunoensaio enzimático em fase sólida fornecem informações de utilidade diagnóstica, contudo geralmente não são considerados tão confiáveis quanto a IFA. Os testes de Weil-Felix, que medem a aglutinação das cepas OX-19 e OX-2 de *Proteus vulgaris* (Kaplan, 1986), são insensíveis e inespecíficos, de modo que seu uso somente é aceitável em países em desenvolvimento, onde não há outro método disponível.

Tratamento

Os grupos de riquetsioses de febre maculosa e tifo são tratados de modo efetivo com doxiciclina, tetraciclina ou cloranfenicol (Raoult, 1991). As fluoroquinolonas, azitromicina e claritromicina são ativas contra algumas riquétsias *in vitro*. A ciprofloxacina, ofloxacina e perfloxacina têm sido utilizadas com sucesso no tratamento da febre botonosa, enquanto a azitromicina e a claritromicina são empregadas no tratamento da febre botonosa suave em crianças. Todavia, esses agentes ainda não foram avaliados e não são recomendados para o tratamento da febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Tifo rural causado por *Orientia tsutsugamushi*

A parede celular Gram-negativa de *Orientia* (antiga *Rickettsia*) *tsutsugamushi* difere daquela observada nas riquétsias dos grupos de febre maculosa e tifo. Essa parede apresenta um folheto externo mais espesso e um folheto interno mais delgado no envelope exterior, importantes proteínas distintas e ausência de LPS e peptidoglicano (Tamura, 1995). As riquétsias causadoras do tifo rural crescem no citoplasma da célula hospedeira e são liberadas por meio de um processo que envolve arrancar porções da membrana celular onde as riquétsias se ligam. A *O. tsutsugamushi* é mantida de modo transovariano em ácaros do gênero *Leptotrombidium* (Traub, 1978). Os ovos infectados dão origem a larvas, que representam o único estágio a se alimentar em um hospedeiro animal. Os ratos adquirem a infecção depois que as larvas (ácaros trombiculídeos) que contêm riquétsias se alimentam de seus líquidos teciduais, contudo as larvas de ácaro que adquirem riquétsias não transmitem a infecção a sua prole. Assim, seres humanos e ratos são os únicos hospedeiros acidentais, não essenciais e que morrem em decorrência do tifo rural por riquétsias. O tifo rural ocorre nos países situados junto ao triângulo constituído por Japão, Paquistão e norte da Austrália. A infecção é adquirida em áreas de vegetação densa, onde populações abundantes de ratos abrigam grandes populações de ácaros trombiculídeos.

O. tsutsugamushi infecta células endoteliais mais extensivamente do que macrófagos (Moron, 2001). A lesão patológica básica é a lesão vascular com inflamação linfo-histiocítica perivascular, que é encontrada no sítio cutâneo onde os ácaros trombiculídeos inoculam as riquétsias e também no cérebro, pulmão, coração, trato gastrintestinal e rim.

Após um período de incubação de 6 a 21 dias, a doença se manifesta com febre, dor de cabeça e, em alguns pacientes, mialgia, tosse e sintomas gastrintestinais (Watt, 1999). Metade dos pacientes ocidentais desenvolve uma escara, em geral antes da manifestação da febre, contudo, isso é raro na população indígena. Do mesmo modo, metade dos ocidentais com infecção primária desenvolve erupção cutânea macular ou maculopapular em 2 a 9 dias após a manifestação da doença. Pacientes gravemente doentes podem desenvolver hipotensão, meningoencefalite, insuficiência renal aguda e fenômenos hemorrágicos. A menos que sejam tratados com medicação antimicrobiana adequada, 7% dos casos são fatais. O tifo rural pode afetar aqueles que percorrem trilhas e outros viajantes expostos aos ácaros trombiculídeos em regiões endêmicas. O diagnóstico do tifo rural em uma região endêmica requer a detecção de títulos iguais a 1:400 ou maiores por IFA, cuja especificidade é de 96% e a sensibilidade é de 48%. Caso seja adotada como critério a constatação de um aumento de quatro vezes desse título a no mínimo 1:200, a especificidade passa a ser igual a 98%, e a sensibilidade sobe para 54%. O teste da imunoperoxidase indireta constitui método similar que dispensa a necessidade de um microscópio de fluorescência. O teste de aglutinação da cepa OX-K de *Proteus mirabilis* é mais prontamente disponível, contudo é insensível. Ensaios sorológicos com utilização de um antígeno recombinante de 56 kDa que representa a principal proteína de superfície imunodominante, entre os quais o teste da vareta medidora de nível em ensaio de fluxo lateral rápido e o imunoensaio enzimático de captura com IgM, têm fornecido resultados promissores e aguardam sua comercialização (Jang, 2003; Jiang, 2003).

A PCR é utilizada no diagnóstico do tifo rural há mais de uma década (Murai, 1992; Furuya, 1993; Kawamori, 1993; Sugita, 1993) e já demonstrou sua eficácia na prática (Manosroi, 2003). A PCR em tempo real propicia um diagnóstico altamente sensível e específico com tempo de resposta imediato (Jiang, 2004).

O tratamento com fármaco tetraciclina, como a doxiciclina, ou com cloranfenicol mostrou-se efetivo, a não ser em alguns casos ocorridos no norte da Tailândia, onde a rifamicina e a azitromicina constituem alternativas (Watt, 1996, 2000).

Infecções causadas por organismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*

Estrutura e função

A família *Anaplasmataceae* é constituída por quatro gêneros (*Ehrlichia, Anaplasma, Neorickettsia* e *Wolbachia*). As erlíquias e anaplasmas são cocobacilos pequenos (0,5 μm), transmissíveis pelo carra-

pato, intracelulares obrigatórios e Gram-negativos, que residem dentro de vacúolos citoplasmáticos em leucócitos (Yu, 2003). Essa colônia intravacuolar de bactérias, que são coradas pelo método de Wright-Giemsa, assemelha-se a uma amora e por isso é denominada *morula* (termo latino para "amora"). Os organismos de *Neorickettsia*, que são pequenas bactérias intracelulares obrigatórias, residem em parasitas trematódeos de caracóis aquáticos, insetos e peixes, sendo transmitidos pela ingestão dos hospedeiros parasitados (p. ex., a *Neorickettsia helminthoeca* é encontrada em trematódeos que parasitam o salmão do qual cães se alimentam na região noroeste do Pacífico). As espécies de *Wolbachia* residem em artropódes e vermes de filária (p. ex., *Onchocerca volvulus*), atuando na patogênese da doença humana.

Conhecidos e estudados há muito tempo como agentes de doenças veterinárias, as espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* recentemente emergiram como patógenos humanos. Isso é consequência primariamente de sua recente descoberta em seres humanos, rápida caracterização com auxílio das modernas ferramentas moleculares e o crescimento das populações e da distribuição geográfica de determinados carrapatos cujo hospedeiro é o veado. Os patógenos humanos bem descritos nos Estados Unidos incluem *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *Anaplasma phagocytophila*. Na Ásia, *Neorickettsia sennetsu* é o agente da doença que se assemelha à mononucleose infecciosa.

Erliquiose monocitotrófica humana

A *E. chaffeensis* é transmitida por carrapatos, sobretudo da espécie *Amblyomma americanum*, que é conhecido como carrapato da estrela solitária, mas também das espécies *D. variabilis* e *Ixodes pacificus* (Anderson, 1992a; Ewing, 1995; Kramer, 1999). Os casos de doença predominam na zona rural e são sazonais (68% ocorrem entre maio e julho) (Fishbein, 1994; Olano, 2003a). Há registros de que veados que atuam como reservatório e cães infectados também constituem potenciais reservatórios hospedeiros. Os carrapatos são infectados ao se alimentarem como larvas ou ninfas, carregando as erlíquias durante as mudanças de um estágio a outro, até transmitirem a infecção ao se alimentarem de sangue novamente. A erliquiose monocitotrófica humana foi relatada em 47 estados norte-americanos, sendo que a maioria dos casos ocorreu dentro do raio de alcance de *A. americanum*, no terceiro dos estados americanos situado ao sul de uma linha que se estende de New Jersey ao Kansas. O número de casos relatados é particularmente alto em Oklahoma, Missouri, Arkansas, Tennessee e Maryland.

Desde que o primeiro caso de erliquiose humana foi descrito nos Estados Unidos em 1987, mais de 1.000 pacientes com infecção por *E. chaffeensis* confirmada em laboratório já foram registrados pelo CDC, e mais de 2.000 casos em um laboratório comercial (Fishbein, 1994). Cerca de 3% dos casos foram fatais, e essa incidência poderia ter sido bem maior se muitos pacientes não tivessem sido efetivamente tratados com antibióticos (Fichtenbaum, 1993; Fishbein, 1994). O grau de severidade da infecção é refletido pela admissão hospitalar de 41 a 62% dos pacientes (Fishbein, 1994; Olano, 2003a, 2003b). Embora os casos severos com frequência estejam associados a pacientes de idade mais avançada, crianças também são suscetíveis à doença (Schultz, 1997). A duração média da doença, segundo ampla série do CDC e incluindo-se os casos tratados, era de 23 dias. Os sinais e sintomas configuram uma doença sistêmica sem aspectos clinicamente diagnósticos: febre (97%), dor de cabeça (81%), mialgia (68%), anorexia (66%), náuseas (48%), vômitos (37%), erupções cutâneas (6% no início, 25% durante a primeira semana, 36% no geral), linfadenopatia regional (29%), tosse (26%), faringite (26%), diarreia (25%), dor ou sensibilidade abdominal (22%), fotofobia (27%) e confusão (20%) (Fishbein, 1994; Olano, 2003b). As complicações graves incluem síndrome da angústia respiratória do adulto, coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal. As descobertas laboratoriais clínicos são: leucopenia (60%), trombocitopenia (68%) e elevação dos níveis de transaminases hepáticas (86%). O envolvimento do SNC com manifestação de convulsões e coma foi descrito por meio de pleiocitose, aumento da contração de proteínas e presença de *E. chaffeensis* no líquido cerebrospinal (LCE), bem como pela detecção de lesões cerebrais durante a autópsia (Dunn, 1992; Ratnasamy, 1996; Walker, 1997a). A severidade da infecção depende da idade do paciente (Olano, 2003a). Em pacientes imunocomprometidos, incluindo-se aqueles com síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS), a erliquiose monocitotrófica humana pode constituir uma infecção notável, com crescimento em massa de erlíquias e desfecho fatal (Paddock, 1993; Walker, 1997a). Casos de infecções brandas também foram documentados. *E. chaffeensis* estabelece uma infecção persistente em seus hospedeiros naturais, e há o relato de um caso humano em que isso ocorre (Dumler, 1993b).

Depois da entrada por meio da mordida do carrapato, a disseminação de *E. chaffeensis* se dá por vias linfáticas e/ou hematógenas. As mórulas erliquiosas foram observadas em monócitos e macrófagos de medula óssea, sangue periférico (raramente), sinusoides hepáticos, baço, linfonodos, meninges, rins, trato gastrintestinal e epicárdio (Dumler, 1993a; Walker, 1997a; Sehdev, 2003). O exame da medula óssea com frequência revela a presença de granulomas, hiperplasia mieloide e megacariocitose. Outras lesões relatadas incluem infiltração linfo-histiocítica perivascular nos rins, meninges, cérebro e coração; pneumonite mononuclear intersticial; focos de morte celular similar à apoptose no fígado, linfonodos e baço; hiperplasia reticular endotelial difusa; eritrofagocitose e colestase.

Infecção humana por Ehrlichia ewingii

Reconhecida a princípio como patógeno canino em 1971, a *E. ewingii* também é transmitida por carrapatos da espécie *A. americanum* (Ewig, 1971; Anziani, 1990). Esse organismo compartilha antígenos com *E. chaffeensis*, porém infecta principalmente neutrófilos. Uma alta proporção de pacientes infectados apresenta comprometimento imunológico, sugerindo que pacientes imunocompetentes podem ser relativamente resistentes à doença (Buller, 1999; Paddock, 2001).

Anaplasmose granulocitotrófica humana

Mais de 1.000 casos de erliquiose granulocítica humana foram registrados, sendo que a maioria deles ocorreu na região do meio-oeste superior (Wisconsin e Minnesota) e nos estados do nordeste (New York, Connecticut, Rhode Island e New Jersey) dos Estados Unidos. Contudo, foram confirmadas infecções autóctones ao sul, ao longo do litoral leste, além da Califórnia e da Europa (Bakken, 1994; Aguero-Rosenfeld, 1996; Petrovec, 1997; Horowitz, 1998). A infecção é transmitida por carrapatos das espécies *Ixodes scapularis*, *I. pacificus* e *Ixodes ricinus*. O camundongo de pata branca (*Peromyscus leucopus*) e outros pequenos mamíferos são os prováveis reservatórios hospedeiros nos Estados Unidos. Na Europa, o veado vermelho, carneiros, cabras e gado exercem esse papel (Hodzic, 1998). A patologia é pouco definida. É possível observar neutrófilos que contêm mórulas no sangue periférico e em vários órgãos, infiltrações de órgãos reticuloendoteliais por macrófagos espumosos, infiltração linfo-histiocítica perivascular em múltiplos órgãos e apoptose hepatocelular focal (Walker, 1997a). A fatalidade com frequência está associada à ocorrência de infecções oportunistas secundárias por fungos e vírus (Hardalo, 1995).

A anaplasmose granulocitotrófica humana varia de assintomática a severa, sendo que um número significativo de pacientes diagnosticados requer hospitalização (Bakken, 1994). A infecção é fatal em menos de 1% dos casos. O início se dá pela manifestação de calafrios, febre, dor de cabeça e mialgia. A maioria dos casos apresenta trombocitopenia, enquanto a leucopenia está presente em quase metade dos indivíduos afetados. A lesão hepatocelular manifesta-se como elevação dos níveis de enzimas hepáticas, sendo que pacientes gravemente doentes podem apresentar uma doença similar ao choque séptico, com envolvimento de múltiplos órgãos.

Diagnóstico laboratorial

O isolamento das erlíquias e anaplasmas a partir do sangue humano em culturas de células livres sem antibióticos tem sido obtido com mais frequência para *A. phagocytophila* (células HL-60) do que para *E. chaffeensis* (células DH-82). Em uma única ocasião, esse isolamento foi obtido para *E. ewingii* (Dawson, 1991; Edelman, 1996; Goodman, 1996; Perez, 1996; Childs, 1999). A amplificação do DNA de erlíquia por PCR, utilizando-se iniciadores espécie-específicos, constitui uma eficiente ferramenta diagnóstica para todas as erliquioses humanas (Anderson, 1992b; Chen, 1994; Everett, 1994; Buller, 1999; Comer, 1999). Para detecção da erliquiose monocitotrófica humana, o PCR apresenta uma sensibilidade de 79 a 100%, sendo que para casos de anaplasmose granulocitotrófica causada por *A. phagocytophila*, o PCR apresenta uma sensibilidade de 48 a 86% (Anderson, 1992b; Everett,

1994). O atraso do curso, um nível mais baixo de erliquemia e o tratamento com tetraciclina reduzem a sensibilidade da detecção das erlíquias por PCR. Os genes-alvo clinicamente validados são rRNA 16S (*rrs*), glicoproteína de 120 kDa, *groESL, nadA* e *VLPT* para *E. chaffeensis*; *rrs* para *E. ewingii* e *rrs, ank-1, msp2* e *ftsZ* para *A. phagocytophila* (Dumler, 2004). Embora em muitos casos seja uma tarefa trabalhosa, a identificação das mórulas em neutrófilos do sangue periférico estabelece o diagnóstico de anaplasmose humana ou erliquiose, podendo ser realizada em qualquer laboratório clínico. Trata-se de uma abordagem mais sensível para casos de infecção por *A. phagocytophila* (30–80%) do que por *E. chaffeensis* (7–17% em pacientes imunocompetentes e uma proporção bastante elevada em pacientes imunocomprometidos [Hamilton, 2004]). É importante evitar interpretações falso-positivas em decorrência da detecção de granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle, sobreposição de plaquetas, corpos apoptóticos ou partículas contaminantes. A identificação imuno-histoquímica de *E. chaffeensis* pode ser realizada em amostras de tecido (Dumler, 1993a; Yu, 1993).

O diagnóstico sorológico constitui a abordagem usual para se estabelecer o diagnóstico da erliquiose humana, utilizando-se antígenos de *E. chaffeensis* e *A. phagocytophila* propagados em cultura celular nos ensaios de IFA (Nicholson, 1997; Walls, 1999; Olano, 2003b). Esse método é bastante sensível para demonstrar a soroconversão a um título igual a 1:64 ou maior, em 2 a 4 semanas após o início da doença. O resultado sorológico que se espera obter com uma amostra de soro agudo é a ausência de anticorpos. Desse modo, o tratamento deve ser iniciado empiricamente, tendo-se como base fatores clínicos e epidemiológicos, e não deve ser suspenso até a confirmação laboratorial. As opiniões variam, quanto ao título sérico único considerado diagnóstico para *E. chaffeensis*, de 1:64 a 1:256. Observa-se reatividade cruzada de *A. phagocytophila* e *E. chaffeensis* em cerca de 20% dos pacientes com erliquiose monocitotrófica humana e erliquiose granulocítica humana. Assim, em particular nas regiões geográficas onde essas infecções se sobrepõem, se houver possibilidade de exposição associada a viagens, é essencial determinar os títulos de anticorpos dirigidos contra ambos os organismos. Uma diferença de títulos equivalente a 4 vezes determina a presença do agente infeccioso. Os casos em que são constatadas diferenças de títulos de até 2 vezes são classificados como erliquiose de etiologia indeterminada.

Em termos de sorologia, é mais problemático distinguir *E. chaffeensis* de *E. ewingii*, pois este último ainda precisa ser cultivado. A técnica de *Western immunoblotting* é uma ferramenta de pesquisa útil atualmente empregada para distinguir a infecção por *E. chaffeensis*, por meio de sua proteína distintiva de 120 kDa e da família de proteínas de 28 kDa, da infecção produzida por *A. phagocytophila*, que está associada a padrões de proteína de 42 a 49 kDa (Asanovich, 1997; Chen, 1997a, 1997b; Zhi, 1997). Uma promessa para o futuro é o desenvolvimento de ensaios sorológicos com utilização dessas e outras proteínas recombinantes (Yu, 1999; Knowles, 2003).

Tratamento

A doxociclina é o fármaco de escolha para o tratamento dessas erliquioses humanas (Bakken, 1994; Fishbein, 1994). O uso de cloranfenicol é controverso, pois há relatos de de que seu uso encurta a duração do curso da erliquiose monocitotrófica humana (Fishbein, 1994) e, ao mesmo tempo, está associado a um resultado fatal. Estudos em cultura de células demonstraram que *E. chaffeensis* e *A. phagocytophila* são resistentes a esse fármaco, bem como a certos fármacos comumente prescritos, incluindo-se β-lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos e sulfonamidas (Branger, 2004; Brouqui, 1992; Klein, 1997). *Anaplasma phagocytophila* é suscetível a rifampina e rifabutina em cultura celular, sendo que a rifampina tem sido utilizada com sucesso no tratamento de um número limitado de mulheres grávidas e crianças (Krause, 2003).

Infecções causadas por *Coxiella burnetii*

Estrutura e função

A *C. burnetii* está filogeneticamente bem distante de outras riquétsias patogênicas e é o único organismo classificado no grupo γ das proteobactérias. Essas bactérias Gram-negativas variam morfologicamente de bastonetes a cocos, sendo que o exame por microscopia eletrônica revela a presença de duas formas distintas: células grandes (0,5 a 1,2 μm) e pequenas células densas (0,5 μm). Foi proposto que essas formas representam um ciclo de desenvolvimento no qual existe uma forma similar a um esporo.

Ênfase considerável tem sido dada a um fenômeno laboratorial associado ao cultivo de *C. burnetii* por meio de longas passagens em culturas de células ou de ovos, referido como a perda da capacidade do organismo de sintetizar uma molécula integral de LPS. Essa alteração da síntese de uma molécula integral para a síntese de uma molécula truncada de LPS, análoga à conversão do fenótipo liso para o rugoso das espécies de Enterobacteriaceae, foi denominada *variação de fase* (de fase I para fase II). A fase I é encontrada na natureza, bem como em indivíduos e animais infectados. A fase II ocorre em laboratório, como consequência de deleções de genes sem vantagem seletiva em condições de passagem fora do hospedeiro.

A *Coxiella burnetii* entra na célula-alvo – o macrófago – por fagocitose, após interagir com a integrina $\alpha_v\beta_3$, sendo altamente adaptada (p. ex., síntese de superóxido dismutase e fosfatase ácida) às condições acídicas do interior do fagolisossomo, onde se replica por fissão binária transversal.

Febre Q

A denominação "febre Q" deriva do *status* desconhecido de sua etiologia, quando a síndrome clínico-epidemiológica foi descrita pela primeira vez como *query fever* (*query* é o termo em inglês que significa pergunta, dúvida, empregado nesse caso porque o agente etiológico da febre era desconhecido). A ecologia de *C. burnetii* inclui infecções silenciosas em animais: muitas espécies de carrapatos, ungulados (em particular ovelhas, gado e cabras), outros mamíferos (incluindo-se gatos e coelhos selvagens), peixes, aves e marsupiais (Marrie, 1988, 1997). Seres humanos usualmente são infectados por inalação, em especial dos aerossóis derivados de produtos infectados gerados durante o nascimento de animais domésticos, tanto de pecuária como de estimação. É provável que a infecção humana também se dê pela ingestão de leite contaminado não pasteurizado (Fishbein, 1992). Numerosas infecções humanas ocorrem como doenças ocupacionais entre indivíduos que trabalham em abatedouros, agricultores e veterinários. Todavia, casos urbanos de doenças não ocupacionais costumam ocorrer em certas populações avaliadas quanto a tais condições, a exemplo dos pacientes imunocomprometidos que vivem na França (Brouqui, 1993).

A maioria das infecções humanas é assintomática (Marrie, 1990). A doença aguda com frequência pode ser uma doença febril autolimitada e indiferenciada, pneumonia, hepatite ou meningoencefalite (Drancourt, 1991; Tissot Dupont, 1992). É improvável que cada um dos pacientes com mialgias, anorexia e dor de cabeça seja investigado quanto ao diagnóstico de febre Q, apesar de essa síndrome constituir a apresentação clínica mais plausível dessa infecção e contribuir para uma significativa proporção dos pacientes que apresentam tais sintomas em algumas populações. As manifestações da pneumonia da febre Q são variáveis: a tosse pode ser improdutiva ou estar ausente, enquanto a pneumonia pode ser severa e progredir rapidamente ou ser detectada por radiografia, como múltiplas infiltrações arredondadas ou segmentares sem manifestação de sintomas pulmonares. A hepatite da febre Q pode exibir uma apresentação clínica semelhante à de uma hepatite viral aguda, ou pode ter a apresentação patológica da hepatite granulomatosa.

A febre Q crônica é considerada sinônimo de endocardite por *C. burnetii*, contudo também ocorre menos frequentemente como infecção de um aneurisma, prótese vascular ou osteomielite (Marrie, 1990; Brouqui, 1993). A endocardite da febre Q crônica usualmente envolve válvulas aórtica ou mitral danificadas, na forma de uma doença não febril que pode se manifestar como insuficiência cardíaca, hepatoesplenomegalia, murmúrios cardíacos variáveis e perda de peso. A doença associada à presença de imunocomplexos circulantes envolve glomerulonefrite ou erupções cutâneas do tipo púrpura à base de vasculite.

A patologia da febre Q aguda inclui pneumonia bronquiolar intersticial-alveolar mista, com presença de células mononucleares inflamatórias e inflamação granulomatosa no fígado e medula óssea (Walker, 1988b). Os granulomas da febre Q por vezes contêm um vacúolo central claro e um anel circundante de fibrina, bem como macrófagos epitelioides. Esses granulomas em rosca não são lesões patognomônicas nem constituem a única forma de granuloma que ocorre no fígado e

na medula óssea de pacientes com febre Q. As válvulas cardíacas envolvidas na endocardite da febre Q apresentam uma pequena vegetação e uma inflamação subaguda e crônica mista, com muitos macrófagos espumosos cujo citoplasma é repleto de organismos de *C. burnetii* (Lepidi, 2003).

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da febre Q é mais frequentemente estabelecido por meio da demonstração dos anticorpos contra *C. burnetii* (Fournier, 1996, 1998). Os métodos sorológicos utilizam antígenos de fases I e II e por vezes avaliam a produção de anticorpos classe-específicos. Os testes de imunoensaio enzimático e IFA indireta são altamente específicos e mais sensíveis dos que os testes de fixação de complemento. Na febre Q aguda, os anticorpos contra antígenos de fase II surgem mais cedo após a infecção, enquanto os anticorpos contra antígenos de fase I podem ser detectados em 2 semanas após o início da doença. Em geral, a febre Q aguda está associada a títulos elevados de anticorpos contra os antígenos de fase II e a títulos menores de anticorpos contra antígenos de fase I. Por IFA, um título de IgG antiantígeno de fase II igual a 1:200 ou maior e um título de IgM antiantígeno de fase II igual a 1:50 ou maior apresentam sensibilidade de 58% e especificidade de 92% para detecção de febre Q aguda. Na febre Q crônica, anticorpos contra antígenos de fase I são detectados em títulos mais altos (p. ex., títulos iguais a 1:800, ou maiores, de IgG antiantígeno de fase I, detectados por IFA), enquanto os títulos de anticorpos contra antígenos de fase II em geral são iguais aos títulos da fase I ou menores. Uma resposta de IgA contra os antígenos de fase I com frequência é observada em pacientes com febre Q crônica. Pelo teste de fixação do complemento, um título igual a 1:128, ou maior, de anticorpos contra antígenos de fase I também é considerado diagnóstico de febre Q crônica, embora alguns pacientes apresentem títulos menores. Devido à reatividade cruzada de *Bartonella henselae* e *Bartonella quintana* com *C. burnetii*, não se deve fazer um teste sorológico para diagnóstico de endocardite por *Bartonella* antes que os títulos de anticorpos contra *C. burnetii* tenham sido determinados (La Scola, 1996b). Na endocardite da febre Q, o título de anticorpos contra *C. burnetii* é substancialmente mais alto do que o título de anticorpos contra *Bartonella*. Um teste de IFA com utilização de *C. burnetii* e *B. henselae* distingue com eficácia a bactéria causadora da infecção (Rolain, 2003b).

Foram desenvolvidos ensaios de PCR contra diversos genes-alvo e, durante as 2 primeiras semanas de febre Q aguda, o teste de PCR em tempo real é mais sensível (24%) do que o teste sorológico de IFA (14%) (Fournier, 2003). É provável que a PCR utilizando amostra de sangue ou creme leucocitário detecte uma proporção maior de casos com *Coxiella*.

Outros métodos de diagnóstico sorológico da endocardite da febre Q crônica incluem a detecção de *C. burnetii* por coloração imunohistoquímica (sensibilidade de 32%), microscopia eletrônica, cultura (sensibilidade de 64%) e PCR (sensibilidade de 75%) (Lepidi, 2003). Utilizando-se culturas *in vitro*, é possível isolar *Coxiella burnetii* a partir do sangue ou válvulas cardíacas infectadas, mediante o emprego de um sistema aprimorado de cultura de células HEL em tubos por centrifugação. Esse método é capaz de detectar a presença de coxielas em 7 dias, contudo deve ser realizado somente em instalações apropriadas para culturas celulares que tenham sido aprovadas para o nível 3 de contenção de risco biológico.

Tratamento

A doxiciclina é efetiva na redução da duração do curso da febre Q, quando administrada nos 3 primeiros dias subsequentes ao início da infecção (Levy, 1991). As fluoroquinolonas ou uma combinação de macrolídeos e rifampina constituem medicações alternativas para a terapia de pacientes que não podem ser tratados com tetraciclina. O tratamento da endocardite crônica causada por *C. burnetii* requer a administração prolongada de doxiciclina e quinolona, que muitas vezes não erradica a infecção (Marrie, 1997). O tratamento bem-sucedido é indicado pela constatação da queda lenta dos títulos de anticorpos IgG antiantígeno de fase I. Nesse caso, quando o título desses anticorpos atinge níveis abaixo de 1:200, é possível considerar a interrupção do tratamento. A válvula cardíaca com frequência é substituída por questões hemodinâmicas.

Infecções causadas por organismos do gênero *Bartonella*

Estrutura e função

O gênero *Bartonella* foi removido da ordem *Rickettsiales* (Brenner, 1993; Birtles, 1996). Os patógenos humanos *B. quintana* (agente etiológico da febre das trincheiras – uma importante doença transmitida por piolhos, contraída por indivíduos sem teto durante as I e II Guerras Mundiais), *B. henselae* (agente etiológico da doença da arranhadura do gato), *Bartonella elizabethae* e *Bartonella vinsonii* (associadas à endocardite infecciosa), bem como *Bartonella bacilliformis* (uma bactéria transmitida pelo mosquito-pólvora, que causa anemia hemolítica aguda febril e produz lesões cutâneas crônicas conhecidas como verrugas peruanas na América do Sul) são cultivados em meio enriquecido com sangue e atmosfera que contém 5% de CO_2. Esses bacilos Gram-negativos intracelulares facultativos não produzem ácido a partir de carboidratos e usualmente vivem nos eritrócitos de seus hospedeiros mamíferos naturais. Entre as numerosas espécies recém-descritas de *Bartonella*, suspeita-se de que *Bartonella clarridgeiae* seja um segundo agente etiológico da doença da arranhadura do gato (Kordick, 1997).

Doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar e peliose bacilar

B. henselae é transmitida aos seres humanos pela arranhadura ou mordida de filhotes de gato infectados, que apresentam bacteremia por vários meses e, ao mesmo tempo, aparentam estar saudáveis (Tappero, 1993; Chomel, 1995; Bergmans, 1997; Heller, 1997). As bactérias são transmitidas de um gato a outro pela pulga de gatos (Chomel, 1996; Higgins, 1996). A natureza da doença é significativamente determinada pelo hospedeiro. Em hospedeiros imunocompetentes, 80% têm menos de 21 anos de idade e apresentam uma pápula ou pústula cutânea no local de inoculação, além de linfadenopatia regional. Menos de 2% dos pacientes sofrem complicações, tais como envolvimento hematogenamente disseminado do fígado, baço, pulmão, osso, SNC, retina, conjuntiva ou pele (Liston, 1996; Wade, 2000; Verdon, 2002). A histopatologia das lesões produzidas na doença da arranhadura do gato consiste em granulomas que circundam microabscessos estrelados. Em pacientes severamente imunocomprometidos, a infecção por *B. henselae* manifesta-se como febre e bacteremia, ou pelo aparecimento de lesões angioproliferativas cutâneas ou viscerais. Nesse último caso, as lesões são caracterizadas por proliferações vasculares lobulares de células endoteliais arredondadas e formação de agrupamentos de pequenos capilares ao redor de capilares ectáticos separados por um estroma mucinoso ou fibrótico, que contém agrupamentos de neutrófilos, restos de neutrófilos e microcolônias granulares de bartonelas. Na pele, essas lesões são denominadas *angiomatose bacilar*, enquanto as lesões situadas no fígado e baço são chamadas *pelioses hepáticas* e *esplênicas*, respectivamente. As lesões também podem se disseminar para outros sítios. As lesões angioproliferativas produzidas por *B. henselae* e *B. quintana* em pacientes imunocomprometidos são bastante parecidas com a verruga peruana produzida por *B. bacilliformis* (Koehler, 1997). As espécies *B. henselae, B. quintana, B. vinsonii* (subesp. *berkhoffii*) e *B. elizabethae* foram referidas como agentes da endocardite infecciosa (Drancourt, 1995; Roux, 2000).

Febre das trincheiras e angiomatose bacilar

A *B. quintana* causa bacteremia prolongada em indivíduos convalescentes, que são seu aparente reservatório. Foi constatado que as infecções eram transmitidas do indivíduo ao piolho (*Pediculus humanus corporis*) e deste para outro indivíduo nas trincheiras de frentes de batalha, durante a I Guerra Mundial (Bruce, 1921). Entre os franceses sem teto, 14% apresentam bacteremia e 80% destes são afebris (Brouqui, 1999).

Quando o indivíduo se coça, as fezes do piolho carregadas com organismos de *B. quintana* penetram na pele, e, em aproximadamente 8 dias, tem início uma doença cujo grau de severidade é variável. As manifestações incluem febre (com duração inferior a 1 semana), dor de cabeça, mialgias, dor pré-tibial e erupções cutâneas maculares evanescentes. Recidivas ocorrem com frequência a intervalos de 4 a 5 dias. A bacteremia persiste durante semanas, meses ou por períodos mais prolongados, servindo como fonte de piolhos, mesmo quando o indivíduo se sente relativamente saudável. Os casos atualmente regis-

trados afetam alcoólatras e moradores de rua que vivem em cidades americanas e europeias (Spach, 1995; Foucault, 2002).

Febre de Oroya e verruga peruana

A bartonelose sul-americana, que se manifesta como uma doença aguda (denominada febre de Oroya) ou na forma de lesões cutâneas crônicas (conhecidas como verrugas peruanas), é transmitida pela picada do mosquito-pólvora do gênero *Lutzomiya*. Indivíduos portadores permanecem assintomáticos por tempo prolongado e atuam como reservatórios de *B. bacilliformis*. Após o período de incubação de aproximadamente 3 semanas, a febre de Oroya surge de maneira incidiosa, acompanhada de anorexia, dor de cabeça, mal-estar e febre baixa. Essa febre também pode surgir abruptamente, com calafrios, febre alta, dor de cabeça e alterações do estado mental. As bactérias de *Bartonella* invadem as hemácias e provocam alterações eritrocíticas que resultam em eritrofagocitose e anemia. As verrugas peruanas são caracterizadas pelo aparecimento de nódulos insensíveis e de cor avermelhada a púrpura, que demoram 1 a 2 meses para crescer e duram de meses a anos. É uma condição que pode ser subsequente à febre de Oroya ou ocorrer sem manifestação de sintomas prévios (Arias-Stella, 1986; Walker, 1999a).

Diagnóstico laboratorial

O isolamento de *B. henselae* e *B. quintana* a partir de pacientes tem sido feito por meio da liberação das bactérias intraeritrocíticas por lise celular, seguida de centrifugação e incubação a 35°C, em atmosfera úmida que contenha CO_2 e em meio ágar-sangue chocolate ou ágar-sangue Columbia, durante mais de 1 mês (Tierno, 1995). Esses organismos de *Bartonella* são bacilos Gram-negativos, com diâmetro de 0,2 a 0,5 μm e comprimento de 1 a 3 μm. *B. henselae* é negativa para oxidase, catalase e urease, além de não utilizar carboidratos. Sua identificação é feita pela observação de movimentos de contorção em preparações a fresco, coloração imunofluorescente, análise da composição de ácidos graxos, sequenciamento de DNA ou hibridização (Scott, 1996). A PCR detecta o DNA de *B. henselae* em 31% das biópsias de linfonodo e em 55% dos aspirados de linfonodo (Bergmans, 1996). *B. bacilliformis* pode ser cultivada a partir do sangue, pela inoculação de organismos em ágar-sangue Columbia suplementado com 5% de sangue desfibrinado ou outro meio suplementado com sangue ou hemina, aliada à detecção das colônias após um período médio de 18 dias.

Em termos formais, o diagnóstico da doença da arranhadura do gato requer uma combinação de critérios clínicos, epidemiológicos e patológicos. Estudos histopatológicos, entre os quais a coloração de Warthin-Starry e a imuno-histoquímica, têm sido utilizados para sustentar o diagnóstico de angiomatose bacilar e doença da arranhadura do gato. A febre de Oroya pode ser diagnosticada pela visualização das bactérias *Bartonella* intraeritrocíticas, que aparecem como cocos ou bacilos (às vezes assumindo um formato curvado ou a forma de anel) em amostras de sangue periférico cuidadosamente coradas pelo método de Giemsa, a fim de se evitar a interpretação equivocada de artefatos. O diagnóstico das infecções causadas por *B. henselae* e *B. quintana* usualmente é estabelecido por meio da demonstração sorológica de anticorpos por imunofluorescência ou imunoensaio enzimático (Dalton, 1995b). O diagnóstico sorológico da endocardite causada por *Bartonella* deve incluir a medida dos títulos de anticorpos dirigidos contra *C. burnetii*, que podem estimular a produção de títulos de anticorpos anti-*Bartonella* com reatividade cruzada (Maurin, 1997; Rolain, 2003a). Os títulos de anticorpos contra antígenos de fase I de *C. burnetii* são bem mais altos do que os títulos de anticorpos anti-*Bartonella* detectados na endocardite da febre Q, sendo que um ensaio de *Western immunoblotting* após a absorção cruzada fornece um diagnóstico definitivo em caso de necessidade (Houpikian, 2003). A PCR em tempo real é outra técnica que pode ser utilizada para se estabelecer o diagnóstico da endocardite por *Bartonella* (Zeaiter, 2003).

Tratamento

A doença da arranhadura do gato usualmente é autolimitada, no entanto a linfadenopatia é resolvida com maior rapidez mediante tratamento com azitromicina (Bass, 1999). Os fármacos de escolha para o tratamento da angiomatose bacilar são a doxiciclina, a eritromicina ou a azitromicina. A endocardite por *Bartonella* apresenta um resultado mais favorável quando tratada com aminoglicosídeo (Raoult, 2003). Pode haver recidivas, que requerem tratamento ou até mesmo terapia de manutenção prolongada. A ciprofloxacina atualmente é o fármaco preferido para tratamento da febre de Oroya. A dificuldade para tratar bactérias intraeritrocíticas (p. ex., *B. quintana*) em seres humanos é evidente, diante da falta de atividade bactericida da doxiciclina, fluoroquinolonas e β-lactâmicos, além da incapacidade da gentamicina (o agente antimicrobiano mais ativo) de atingir níveis intraeritrocíticos bactericidas (Rolain, 2000). A bacteremia crônica por *B. quintana* é combatida pela administração de gentamicina durante 14 dias, seguida da administração de doxiciclina por 28 dias (Foucault, 2003). A verruga peruana é tratada com rifampina por via oral.

Infecções por micoplasmas

Foi comprovado em 1962 que os micoplasmas causam doença humana. Nesse ano, constatou-se que uma espécie de micoplasma (subsequentemente nomeada *Mycoplasma pneumoniae*) era o agente etiológico da pneumonia atípica primária (Chanock, 1962). Os micoplasmas são os menores organismos de vida livre conhecidos. São pleiomórficos, variando de células esféricas com 0,2 μm de diâmetro a filamentos que medem 0,1 μm de largura por 1 a 2 μm de comprimento. A maioria dos micoplasmas são organismos anaeróbios facultativos que se replicam por fissão binária. São únicos entre as bactérias, pois não possuem parede celular. São incapazes de sintetizar precursores de parede celular, necessitando de colesterol e esteróis correlatos para a síntese de membrana. Os micoplasmas também são desprovidos das vias enzimáticas de síntese de purina e pirimidinas, portanto requerem meios de cultura complexos (como infusão de caldo de carne e coração suplementada com soro de cavalo, extrato de levedura e ácidos nucleicos) para poderem crescer *in vitro*. As espécies potencialmente patogênicas, *M. pneumoniae* e os micoplasmas genitais (*Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*), são discutidas a seguir. Os demais micoplasmas integram a flora humana normal, principalmente dos tratos respiratório e geniturinário.

Mycoplasma pneumoniae

Epidemiologia

M. pneumoniae é encontrado no mundo inteiro. Epidemias ocorrem em meio a populações que vivem confinadas (como crianças em escolas, famílias e recrutas militares), tipicamente a intervalos de 4 a 8 anos e sobretudo no final do verão e do outono. Por um lado, nos anos sem epidemia, as infecções ocorrem o ano todo e geralmente são disseminadas de forma lenta, parecendo necessitar do contato íntimo com indivíduos doentes. Por outro lado, durante a época de epidemia, a disseminação da infecção é rápida, e a ocorrência de pontos de fonte de surto nos quais não se observa uma exposição com proximidade e de longa duração sugere que *M. pneumoniae* pode ser transmitido por meio de aerossóis que contêm pequenas partículas. As taxas de infecção por *M. pneumoniae* são maiores entre crianças em idade escolar e adultos jovens, sendo que os casos de pneumonia são mais frequentes entre indivíduos na faixa etária de 5 a 20 anos, especialmente entre aqueles com 15 a 19 anos de idade. A infecção por *M. pneumoniae* é comum antes dos 5 anos de idade, entretanto costuma ser assintomática ou produzir uma doença branda com coriza e chiado e sem febre nem pneumonia (Fernald, 1975).

Patogênese e patologia

M. pneumoniae, um parasita de superfície, coloniza a mucosa do trato respiratório. Sua capacidade de fixar-se às células da mucosa respiratória, escapar da fagocitose e modular o sistema imune é essencial para que a doença seja iniciada. Sua motilidade por deslizamento lhe permite penetrar por meio das secreções respiratórias, enquanto a forma filamentosa e flexível aliada às organelas de fixação terminais facilita a localização nas criptas e pregas da membrana da célula hospedeira, bem como entre as microvilosidades e cílios, onde permanece protegido contra a fagocitose. A fixação de *M. pneumoniae* às células hospedeiras é mediada pela proteína P1, que interage com glicoproteínas que contêm ácido neuramínico na superfície da membrana da célula hospedeira (Chandler, 1982; Geary, 1987). O peróxido de hidrogênio e o superóxido produzidos por esse micoplasma podem lesar

as células da mucosa, causando ciliostase e esfacelamento das células superficiais (Almagor, 1984).

Fatores relacionados com o hospedeiro também estão envolvidos na patogênese da doença causada por *M. pneumoniae*. A prevalência aparentemente alta dessa infecção entre bebês e crianças pequenas, a natureza suave da doença nessa faixa etária e a ocorrência de casos mais graves entre indivíduos de idade mais avançada sugerem que a doença severa pode ser resultado da resposta imune do hospedeiro à reinfecção. Entretanto, o mecanismo específico por trás da lesão à célula hospedeira permanece desconhecido. Além disso, suspeita-se de que as manifestações extrapulmonares da doença (discutidas adiante) sejam imunomediadas, pois é pouco comum isolar organismos de *M. pneumoniae* a partir de fontes não respiratórias. A interação entre *M. pneumoniae* e o determinante antigênico I das hemácias, que contém as requeridas sequências de poli-*N*-acetilgalactosamina 2,3-sialilada, pode modificar o antígeno I e convertê-lo em um antígeno estranho que estimula a produção de aglutininas frias. Outros anticorpos autoimunes produzidos durante a infecção por *M. pneumoniae* (anticorpos dirigidos contra os pulmões, cérebro, músculo liso e linfócitos) podem apresentar derivações semelhantes.

A primeira linha de defesa durante uma infecção primária por *M. pneumoniae* consiste na ativação da via alternativa do complemento e na fagocitose dos organismos no nível da superfície mucosa. Derivados galactosil e glicosil existentes na membrana de superfície do organismo parecem estimular a produção de anticorpos, dos quais o mais importante é uma IgA encontrada principalmente nas secreções das mucosas. Os antígenos proteicos intracelulares de *M. pneumoniae* expostos durante sua fagocitose e subsequente degradação estimulam reações mediadas por linfócitos T, que aparentemente determinam o grau de gravidade da doença.

Existem poucos relatos que descrevem as descobertas patológicas da doença causada por *M. pneumoniae*, uma vez que a maioria das infecções é autolimitada e a obtenção de tecido raramente é realizada. Nos casos fatais, áreas de consolidação desiguais são encontradas nos pulmões. O exame histológico dos focos envolvidos revela a existência de bronquite, bronquiolite e pneumonite intersticial e alveolar, com coleções bronquiolares de linfócitos e plasmócitos acompanhadas de macrófagos e neutrófilos em caso de necrose celular.

Manifestações clínicas

A manifestação mais comum da doença causada por *M. pneumoniae* é a traqueobronquite. A pneumonia, observada em cerca de 1/3 dos indivíduos infectados, tem início gradual em 2 a 3 semanas após a exposição. O paciente apresenta febre, mal-estar, dor de cabeça, faringite e uma tosse curta improdutiva e persistente (Baum, 2000; Waites, 2004). Uma sinusite clinicamente não aparente é uma manifestação comum, sendo que o paciente pode desenvolver miringite. A radiografia pulmonar revela uma broncopneumonia unilateral no lobo inferior ou a presença de ocasionais infiltrados bilaterais. A contagem de leucócitos do sangue periférico a princípio se mantém normal, contudo aumenta à medida que a doença evolui. Erupções cutâneas maculopapulares ou, menos comumente, vesiculares surgem em cerca de 15% dos casos poucos dias após o início da infecção. Sem a terapia antimicrobiana, a febre cessa em 2 a 14 dias, porém o mal-estar, a tosse e as anormalidades radiográficas persistem durante 2 a 6 semanas. Em um pequeno percentual das crianças e adultos infectados, a pneumonia é grave o bastante para requerer hospitalização. Esses pacientes podem desenvolver abscessos pulmonares, efusões pleurais, infecções bacterianas secundárias, bronquiectasias ou recidiva clínica. É incomum haver manifestações extrarrespiratórias (anemia hemolítica clinicamente aparente, com característicos títulos bastante altos de aglutininas frias; eritema multiforme, eritema nodoso e urticária; encefalite, meningoencefalite, mono- ou polineurite e meningite; miocardite e pericardite, além de artralgias e, em casos raros, artrites) (Ponka, 1979; Cassell, 1981; Baum, 2000; Waites, 2004).

Micoplasmas genitais

Epidemiologia

A colonização de bebês por micoplasmas genitais ocorre durante a passagem pelo canal de parto infectado e usualmente persiste por meses de 2 anos. As espécies *U. urealyticum* e *M. hominis* podem ser isoladas a partir do trato genital de até 30% dos bebês do sexo feminino (são isoladas menos frequentemente a partir do trato genital de bebês do sexo masculino), sendo isoladas a partir do nariz e garganta de até 15% dos bebês de ambos os sexos (Klein, 1969). Em um determinado estudo, 20% das meninas em idade pré-puberdade estavam colonizadas com ureaplasmas, e 6% apresentavam *M. hominis*, contudo micoplasmas genitais raramente foram isolados de meninos em idade pré-puberdade (Hammerschlag, 1978). A colonização por micoplasmas genitais após a puberdade ocorre por contato sexual. Cerca de 60% das mulheres sadias sexualmente ativas apresentam *U. urealyticum* na vagina, e cerca de 20% apresentam organismos de *M. hominis*.

Manifestações clínicas

A *U. urealyticum* é responsável por alguns casos de uretrite não gonocócica. Essa infecção foi associada à febre pós-parto, corioamnionite e baixo peso ao nascimento, embora nenhuma relação causal com esse último aspecto tenha sido comprovada. Trata-se de uma causa rara de uretrocistite em indivíduos imunossuprimidos (Taylor-Robinson, 1980, 1985; Cassell, 1986). *M. hominis* constitui uma das causas de febre pós-aborto e de febre pós-parto, sendo uma causa incomum de bacteremia, artrite, peritonite, meningite, osteomielite e infecções de feridas principalmente em indivíduos imunocomprometidos, mas também em certos indivíduos sem imunodeficiência subjacente aparente (Taylor-Robinson, 1980; DeGirolami, 1982; McMahon, 1990).

Diagnóstico laboratorial

Micoplasma pneumoniae

Para estabelecer o diagnóstico da infecção causada por *M. pneumoniae*, recomenda-se obter amostras de soro e utilizar *swab* para coletar material da garganta, entretanto o líquido do lavado broncoalveolar, escarro e tecido pulmonar também são considerados amostras satisfatórias. Um teste sorológico inespecífico capaz de fornecer informações úteis consiste na detecção de aglutininas frias. Estas são anticorpos IgM dirigidos contra o antígeno I dos eritrócitos humanos. As aglutininas frias surgem no fim da primeira semana ou no início da segunda semana de doença em pelo menos metade dos indivíduos infectados, contudo sua presença não é diagnóstica da infecção por *M. pneumoniae*. O diagnóstico definitivo baseia-se na detecção do organismo, de anticorpos IgM específicos ou de uma alteração equivalente a quatro vezes dos títulos de IgG entre amostras de soro de fase aguda e de fase convalescente.

Para isolar a *M. pneumoniae*, um sistema de cultura bifásico é inoculado e incubado em um frasco vedado, sendo mantido por até 3 semanas em atmosfera que contenha 5 a 10% de CO_2 ou em condições anaeróbicas, a 37°C. As culturas são examinadas ao microscópio (40×) 1 a 2 vezes por semana para detecção das típicas colônias esféricas, com centro denso e camada externa delgada (semelhante a um "ovo frito"), incorporadas ao ágar. Tais colônias, consistentes com *M. pneumoniae*, devem ser testadas para β-hemólise (*M. pneumoniae* é β-hemolítico) do seguinte modo: ágar a 1% derretido, preparado com salina a 0,85% e resfriado a 50°C é misturado ao sangue de carneiro ou cobaia para obtenção de uma concentração de eritrócitos de 5%. Em seguida, uma camada delgada dessa mistura é despejada sobre a placa de ágar. A cultura é reincubada por 24 horas e examinada ao microscópio para observação da hemólise.

Como o isolamento de *M. pneumoniae* pode demorar várias semanas, testes mais rápidos são mais úteis para o diagnóstico. A detecção de IgM específica em uma única amostra de soro é considerada diagnóstica da infecção aguda. Caso a IgG seja quantificada, torna-se necessário testar amostras de soro de fase aguda e de fase convalescente, e o diagnóstico é estabelecido com base na detecção de um aumento mínimo de quatro vezes dos títulos de anticorpo. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos também podem fornecer um diagnóstico rápido (Loens, 2003), todavia atualmente não existem testes de amplificação aprovados pelo FDA para detecção direta de *M. pneumoniae*.

Micoplasmas genitais

As espécies *U. urealyticum* e *M. hominis* podem ser isoladas a partir de amostras obtidas com *swab* da uretra, vagina ou endocérvix, bem

como de amostras de sangue, urina, material coletado de abscessos, secreções prostáticas, sêmen ou tecidos.

Diversos sistemas de cultura podem ser empregados para isolar micoplasmas genitais (Clyde, 1984; Yajko, 1984; Wood, 1985; Phillips, 1986). Tradicionalmente, eram empregados sistemas separados para cada espécie (ágar U e caldo U para *U. urealyticum*; ágar H e caldo H para *M. hominis*), pois o pH ideal para o crescimento dos organismos é diferente para essas espécies (pH 5,5 a 6,5 para *U. urealyticum* e pH 6 a 8 para *M. hominis*). Entretanto, atualmente existem sistemas de cultura únicos capazes de detectar com eficácia organismos de ambas as espécies (Yajko, 1984; Wood, 1985; Phillips, 1986). Culturas em caldos são incubadas em condições anaeróbias em tubos de ensaio vedados. Culturas em ágar são incubadas em condições anaeróbias ou em atmosfera que contenha 5 a 7% de CO_2 e observadas diariamente ao microscópio. *M. hominis* também cresce em ágar-sangue de carneiro, onde produz pontos de colônias não hemolíticas, bem como na maioria dos caldos de sangue utilizados como meios de cultura, embora não apresente evidências visíveis de seu crescimento.

Colônias de *M. hominis*, que medem 200 a 300 μm de diâmetro e exibem o típico aspecto de "ovo frito", usualmente surgem em até 5 dias. Em caldos que contêm vermelho fenol e 0,1% de arginina, a *M. hominis* metaboliza a arginina em amônia e promove a mudança da cor amarela para a cor vermelha. As placas de ágar U são observadas diariamente durante 4 dias e, no quarto dia, são coradas com 1 a 2 gotas de solução de $CaCl_2$-urea. As colônias de *U. urealyticum*, que medem 15 a 16 μm de diâmetro, coram-se de marrom-escuro dentro de 5 minutos. Em caldo U, a *U. urealyticum* produz um desvio de pH e, por conseguinte, a cor muda do amarelo para o vermelho. O caldo, então, é retirado com o auxílio de uma alça, transferido para placas de ágar e semeado em estrias para isolamento.

Tratamento

A terapia antimicrobiana é contraindicada para casos de faringite ou traqueobronquite por *M. pneumoniae*. Tetraciclina, fluoroquinilona ou macrolídeo são fármacos efetivos para o tratamento da pneumonia induzida por *M. pneumoniae*, embora essa terapia aparentemente não altere a transmissão do organismo. A *M. hominis* é suscetível à clindamicina e às novas quinolonas, contudo é resistente à eritromicina. Existem muitos isolados suscetíveis às tetraciclinas. A *U. urealyticum* é suscetível à eritromicina, bem como aos macrolídeos e quinolonas mais recentes, todavia é resistente à clindamicina. Diversos isolados também são resistentes às tetraciclinas.

Referências bibliográficas

Aguero-Rosenfeld ME, Horowitz HW, Wormser GP, et al: Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a Medical Center in New York State. Ann Intern Med 1996; 125:904.

Almagor M, Kahane I, Yatziv S: Role of superoxide anion in host cell injury induced by *Mycoplasma pneumoniae* infection. J Clin Invest 1984; 73:842.

Anderson BE, Greene CE, Jones DC, Dawson JE: *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int J Syst Bacteriol 1992a; 42:299.

Anderson BE, Sumner JW, Dawson JE, et al: Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992b; 30:775.

Anziani OS, Ewing SA, Barker RW: Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. Am J Vet Res 1990; 51:929.

Arias-Stella J, Leiberman PH, Erlandson RA, et al: Histology, immunohistochemistry and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. Am J Surg Pathol 1986; 10:595.

Asanovich KM, Bakken JS, Madigan JE, et al: Antigenic diversity of granulocytic *Ehrlichia* isolates from humans in Wisconsin and New York and a horse in California. J Infect Dis 1997; 176:1029.

Azad AF: Epidemiology of murine typhus. Annu Rev Entomol 1990; 35:553.

Bakken JS, Dumler JS, Chen S-M, et al: Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States: a new species emerging? JAMA 1994; 272:212.

Barnes RC: Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin Microbiol Rev 1989; 2:119.

Bass J, Freitas B, Freitas A: Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat scratch disease. Pediatric Infect Dis J 1999; 17:447.

Baum SG: *Mycoplasma pneumoniae* and atypical pneumonia. *In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000, p 2018.

Bergmans AMC, de Jong CMA, van Amerongen G, et al: Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. J Clin Microbiol 1997; 35:2256.

Bergmans AMC, Schellekens JFP, VanEmbden JDA, et al: Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. J Clin Microbiol 1996; 34:254.

Birtles RJ, Raoult D: Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. Int J Syst Bacteriol 1996; 46:891.

Blanding J, Hirsch L, Stranton N, et al: Comparison of the Clearview Chlamydia, the PACE 2 assay, and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* from cervical specimens in a low-prevalence population. J Clin Microbiol 1993; 31:1622.

Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, et al: Comparison of the APTIMA CT and GC Assays with the APTIMA Combo 2 Assay, the Abbott LCx Assay, and Direct Fluorescent-Antibody and Culture Assays for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2004; 42:3089.

Branger S, Rolain JM, Raoult D: Evaluation of antibiotic suspectibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4822.

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, et al: Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., and *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol 1993; 43:777.

Brettman LR, Lewin S, Holzman RS, et al: Rickettsialpox: report of an outbreak and a contemporary review. Medicine 1981; 60:363.

Brouqui P, Dupont HT, Drancourt M, et al: Chronic Q fever: ninety-two cases from France, including 27 cases without endocarditis. Arch Intern Med 1993; 153:642.

Brouqui P, La Scola B, Roux V, et al: Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. N Engl J Med 1999; 340:184.

Brouqui P, Raoult D: In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans, *Ehrlichia chaffeensis*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:2799.

Bruce D: Trench fever. Final report of the war office trench fever investigation committee. J Hyg 1921; 20:258.

Buller RS, Arans M, Hmiel SP, et al: *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med 1999; 341:148.

Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT: Characterization of the new *Chlamydia* agent, TWAR, as a unique organism by restriction endonuclease analysis and DNA-DNA hybridization. J Clin Microbiol 1987; 25:1911.

Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT: *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. Emerg Infect Dis 1998; 4:571.

Carroll KC, Aldeen WE, Morrison M, et al: Evaluation of the Abbott LCx ligase chain reaction assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine and genital swab specimens from sexually transmitted disease clinic population. J Clin Microbiol 1998; 36:1630.

Cassell GH, Cole BC: Mycoplasmas as agents of human disease. N Engl J Med 1981; 304:80.

Cassell GW, Waites KB, Gibbs RS, et al: Role of *Ureaplasma urealyticum* in amnionitis. Pediatr Infect Dis 1986; 5:S247.

Centers for Disease Control: Psittacosis at a turkey processing plant – North Carolina, 1989. MMWR 1990; 39:460.

Centers for Disease Control and Prevention: Special focus: Surveillance for reproductive health. MMWR 1993; 42:SS-6.

Centers for Disease Control and Prevention: Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. MMWR 2002a; 51: RR-6.

Provides guidelines for treatment of chlamydia as well as other sexually transmitted diseases. Also gives a brief description of the various infections and recommendations regarding management of sexual partners.

Centers for Disease Control and Prevention: Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections. MMWR 2002b; 51:RR-15.

Discusses nonculture tests, both amplified and nonamplified, for diagnosis of genital infection with C. trachomatis and N. gonorrhoeae.

Chandler DKF, Grabowski MW, Barile MF: *Mycoplasma pneumoniae* attachment: Competitive inhibition by mycoplasmal binding component and by sialic acid containing glycoconjugates. Infect Immun 1982; 38:598.

Chanock RM, Hayflick L, Barile MF: Growth on artifical medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc Natl Acad Sci USA 1962; 48:41.

Chen SM, Cullman LC, Walker DH: Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytotropic ehrlichiosis to different strains of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. Clin Diagn Lab Immunol 1997a; 4:731.

Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al: Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 1994; 32:589.

Chen SM, Yu X-J, Popov VL, et al: Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. J Infect Dis 1997b; 175:856.

Chi EY, Kuo CC, Grayston JT: Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. J Bacteriol 1987; 169:3757.

Childs JE, Sumner JW, Nicholson WL, et al: Outcome of diagnostic tests using samples from patients with culture-proven human monocytic ehrlichiosis: Implication for surveillance. J Clin Microbiol 1999; 37:2997.

Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, et al: *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. J Clin Microbiol 1995; 33:2445.

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, et al: Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J Clin Microbiol 1996; 34:1952.

Clarke LM, Sierra MF, Daidone BJ, et al: Comparison of the Syva Microtrak enzyme immunoassay and Gen-probe Pace 2 with cell culture for diagnosis of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in a high-prevalence female population. J Clin Microbiol 1993; 31:968–971.

Cles LD, Bruch K, Stamm WE: Staining characteristics of six commercially available monoclonal immunofluorescence reagents for direct diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. J Clin Microbiol 1988; 26:1735.

Clyde WA Jr, Kenny GE, Schachter J: Laboratory diagnosis of chlamydial and mycoplasmal infections. *In*: Drew WL (ed.): Cumitech 19. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1984.

Comer JA, Nicholson WL, Sumner JW, et al: Diagnosis of human ehrlichiosis by PCR assay of acute-phase serum. J Clin Microbiol 1999; 37:31.

Cox RL, Kuo CC, Grayston JT, et al: Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia* sp. strain TWAR to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. Int J Syst Bacteriol 1988; 38:265.

Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC, et al: National surveillance for Rocky Mountain spotted fever, 1981–1992: Epidemiologic summary and evaluation of risk factors for fatal outcome. Am J Trop Med Hyg 1995a; 52:405.

Dalton MJ, Robinson LE, Cooper J, et al: Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. Arch Intern Med 1995b; 155:1670.

Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, et al: Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1991; 29:2741.

DeGirolami PC, Madoff S: *Mycoplasma hominis* septicemia. J Clin Microbiol 1982; 16:566.

Demaio J, Boyd RS, Rensi R, et al: False-positive Chlamydiazyme results during urine sediment analysis due to bacterial urinary tract infections. J Clin Microbiol 1991; 29:1436.

Drancourt M, George F, Brouqui P, et al: Diagnosis of Mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads. J Infect Dis 1992; 166:660.

Drancourt M, Mainardi JL, Brouqui P, et al: *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* endocarditis in three homeless men. N Engl J Med 1995; 332:419.

Drancourt M, Raoult D, Xeridat B, et al: Q fever meningoencephalitis in five patients. Eur J Epidemiol 1991; 7:134.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al: Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designations of *Ehrlichia equi* and 'HE agents' as subjective synonums of *Ehrlichia phagocytophilia*. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 6:2145.

Dumler JS, Brouqui P: Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:559.

Dumler JS, Dawson JE, Walker DH: Human ehrlichiosis: hematopathology and immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. Hum Pathol 1993a; 24:391.

Dumler JS, Gage WR, Pettis GL, et al: Rapid immunoperoxidase demonstration of *Rickettsia rickettsii* in fixed cutaneous specimens from patients with Rocky Mountain spotted fever. Am J Clin Pathol 1990; 93:410.

Dumler JS, Sutker WL, Walker DH: Persistent infection with *Ehrlichia chaffeensis*. Clin Infect Dis 1993b; 17:903.

Dumler JS, Taylor JP, Walker DH: Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980–1987. JAMA 1991; 266:1365.

Dunn BE, Monson TP, Dumler JS, et al: Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. J Clin Microbiol 1992; 30:2207.

Edelman DC, Dumler JS: Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. Mol Diagn 1996; 1:41.

Ehret JM, Leszcynski JC, Douglas JM, et al: Evaluation of Chlamydiazyme enzyme immunoassay for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from men. J Clin Microbiol 1993; 31:2702.

Elghetany TM, Walker D: Hemostatic changes in Rocky Mountain spotted fever and Mediterranean spotted fever. Am J Clin Pathol 1999; 112:159.

Everett ED, Evans KA, Henry RB, et al: Human ehrlichiosis in adults after tick exposure: Diagnosis using polymerase chain reaction. Ann Intern Med 1994; 120:730.

Everett KDE, Bush RM, Andersen AA: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 1999; 49:415.

Ewing SA, Dawson JE, Kocan AA, et al: Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1995; 32:368.

Ewing SA, Roberson WR, Buckner RG, Hayat CS: A new strain of *Ehrlichia canis*. J Am Vet Med Assoc 1971; 159:1771.

Fernald GW, Collier AM, Clyde WA Jr: Respiratory infections due to *Mycoplasma pneumoniae* in infants and children. Pediatrics 1975; 55:327.

Ferrero DV, Meyers HN, Schultz DE, Willis SA: Performance of the Gen-Probe amplified *Chlamydia trachomatis* assay in detecting *Chlamydia trachomatis* in endocervical and urine specimens from women and urethral and urine specimens from men attending sexually transmitted disease and family planning clinics. J Clin Microbiol 1998; 36:3230.

Fichtenbaum CJ, Peterson LR, Weil GJ: Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness with features of the toxic shock syndrome. Am J Med 1993; 95:351.

Fishbein DB, Dawson JE, Robinson LE: Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. Ann Intern Med 1994; 120:736.

Fishbein DB, Raoult D: A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. Am J Trop Med Hyg 1992; 47:35.

Fournier PE, Casalta JP, Habib G, et al: Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke endocarditis service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. Am J Med 1996; 100:629.

Fournier PE, Marrie T-J, Raoult D: Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol 1998; 36:1823.

Fournier PE, Raoult D: Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol 2003; 41:5094.

Fournier PE, Raoult D: Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. J Clin Microbiol 2004; 42:3428.

Foucault C, Barrau K, Brouqui P, et al: *Bartonella quintana* bacteremia among homeless people. Clin Infect Dis 2002; 35:684.

Foucault C, Raoult D, Brouqui P: Randomized open trial of gentamicin and doxycycline for eradication of *Bartonella quintana* from blood in patients with chronic bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:2204.

Furuya Y, Katayama T, Yoshida Y, et al: Specific amplification of *Rickettsia japonica* DNA from clinical specimens by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33:487.

Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, et al: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31:1637.

Gage KL, Burgdorfer W, Hopla CE: Hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) as a source for infecting immature *Dermacentor variabillis* (Acari: Ixodidae) with *Rickettsia rickettsii*. J Med Entomol 1990; 27:615.

Gaydos CA, Theodore M, Dalesio N, et al: Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 3041.

Geary SJ, Gabridge MG: Characterization of a human lung fibroblast receptor site for *Mycoplasma pneumoniae*. Isr J Med Sci 1987; 23:462.

Goessens WHF, Mouton JW, vanDer Meijden WI, et al: Comparison of three commercially available amplification assays, AMP CT, LCx, and COBAS AMPLICOR, for detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine. J Clin Microbiol 1997; 35:2628.

Goodman JL, Nelson C, Vitale B, et al: Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. N Engl J Med 1996; 334:209.

Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers, V, et al: The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. Nature 2004; 427–457.

Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, et al: A new respiratory pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J Infect Dis 1990; 161:618.

Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, et al: Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8:191.

Hamilton KS, Standaert SM, Kinney MC: Characteristic peripheral blood findings in human ehrlichiosis. Mod Pathol 2004; 17:512.

Hammerschlag MR, Alpert S, Rosner I, et al: Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. Pediatrics 1978; 62:57.

Hardalo CJ, Quagliarello V, Dumler JS: Human granulocytic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. Clin Infect Dis 1995; 21:910.

Heinzen RA, Hayes SF, Peacock MG, et al: Directional actin polymerization associated with spotted fever group rickettsia infection of vero cells. Infect Immun 1993; 61:1926.

Heller R, Artosis M, Xemar V, et al: Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. J Clin Microbiol 1997; 35:1327.

Helmick CG, Bernard KW, D'Angelo LJ: Rocky Mountain spotted fever: clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. J Infect Dis 1984; 150:480.

Herrero-Herrero JI, Walker DH, Ruiz-Beltran R: Immunohistochemical evaluation of the cellular immune response to *Rickettsia conorii* in 'taches noires.' J Infect Dis 1987; 155:802.

Higgins JA, Radulovic S, Jaworski DC, et al: Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). J Med Entomol 1996; 33:490.

Hodzic E, Fish D, Maretzki CM, et al: Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. J Clin Microbiol 1998; 36:3574.

Horowitz HW, Aguero-Rosenfeld ME, McKenna DF, et al: Clinical and laboratory spectrum of culture-proven human granulocytic ehrlichiosis: comparison with culture-negative cases. Clin Infect Dis 1998; 27:1314.

Houpikian P, Raoult D: Western immunoblotting for *Bartonella* endocarditis. Clin Diag Lab Immunol 2003; 10:95.

Iwen PC, Blair TMH, Woods GL: Comparison of the Gen-probe Pace 2™ system direct fluorescent-antibody, and cell culture for detecting *Chlamydia trachomatis* in cervical specimens. Am J Clin Pathol 1991; 95:578.

Jang W-J, Huh M-S, Park K-H, et al: Evaluation of an immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Orientia tsutsugamushi* infection. Clin Diag Lab Immunol 2003; 10:394.

Jiang J, Chan T-C, Temenak JJ, et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orienta tsutsugamushi*. Am J Trop Med Hyg 2004; 70:351.

Jiang J, Marienau KJ, May LA, et al. Laboratory diagnosis of two scrub typhus outbreaks at Camp Fuji, Japan in 2000 and 2001 by enzyme-linked immunosorbent assay, rapid flow assay, and Western blot assay using outer membrane 56-kD recombinant proteins. Am J Trop Med Hyg 2003; 69:60.

Jones RB, Batteiger BE: *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). *In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000, p 1989.

Jones RB, Priest JB, Kuo C: Subacute chlamydial endocarditis. JAMA 1982; 247:655.

Kaplan JE, Schonberger LB: The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. Am J Trop Med Hyg 1986; 35:840.

Kaplowitz LG, Fischer JJ, Sparling PF: Rocky Mountain

spotted fever: a clinical dilemma. Curr Clin Top Infect Dis 1981; 2:89.
Kaplowitz LG, Lange JV, Fischer JJ, et al: Correlation of rickettsial titers, circulating endotoxin, and clinical features in Rocky Mountain spotted fever. Arch Intern Med 1983; 143:1149.
Kass EM, Szaniawski WK, Levy H, et al: Rickettsialpox in a New York City hospital, 1980 to 1989. N Engl J Med 1994; 331:1612.
Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, et al: Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. J Vet Med Sci 1993; 55:749.
Keat A, Thomas BJ, Taylor-Robinson D: Chlamydial infection in the etiology of arthritis. Br Med Bull 1983; 39:168.
Kelly DJ, Chan CT, Paxton H, et al: Comparative evaluation of a commercial enzyme immunoassay for the detection of human antibody to *Rickettsia typhi.* Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2:356.
Klein JO, Buckland D, Finland M: Colonization of newborn infants by mycoplasmas. N Engl J Med 1969; 280:1025.
Klein MB, Nelson CM, Goodman JL: Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: Promising activity of quinolones and rifamycins. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:76.
Kluytmans JAJW, Goessens WHF, Mouton JW, et al: Evaluation of Clearview and Magic Lite tests, polymerase chain reaction, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1993; 31:3204.
Kluytmans JAJW, Goessens WHF, vanRijsoort-Vos JH, et al: Improved performance of Pace 2 with modified collection system in combination with probe competition assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in urethral specimens from males. J Clin Microbiol 1994; 32:568.
Kluytmans JAJW, Niesters HGM, Mouton JW, et al: Performance of nonisotopic DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1991; 29:2685.
Knowles TT, Alleman AR, Sorenson HL, et al: Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. Clin Diag Lab Immunol 2003; 10:520.
Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, et al: Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. N Engl J Med 1997; 337:1876.
Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, et al: *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). J Clin Microbiol 1997; 35:1813.
Koumans EH, Black CM, Markowitz LE, et al: Comparison of methods for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* using commercially available nucleic acid amplification tests and a liquid pap smear medium. J Clin Microbiol 2003; 41:1507.
Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, et al: Detection of the agents of human ehrlichioses in ioxdid ticks from California. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:62.
Krause PJ, Corrow CL, Bakken JA: Successful treatment of human granulocytic ehrlichiosis in children using rifampin. Pediatrics 2003; 112:e652.
Krech T, Bleckmann M, Paatz R: Comparison of buffalo green monkey cells and McCoy cells for isolation of *Chlamydia trachomatis* in a microtiter system. J Clin Microbiol 1989; 27:2364.
La Scola B, Raoult D: Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. J Clin Microbiol 1996a; 34:2722.
La Scola B, Raoult D: Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii.* J Clin Microbiol 1996b; 34:2270.
Lepidi H, Houpikian P, Liang Z, et al: Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, and histologic studies. J Infect Dis 2003; 187:1097.
Levy PY, Drancourt M, Etienne J, et al: Comparison of different antibiotic regimens for therapy of 32 cases of Q fever endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:533.
Li H, Walker DH: Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. Infect Immun 1992; 60:2030.
Li H, Walker DH: rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. Microb Pathog 1998; 24:289.
Liston TE, Koehler JE: Granulomatous hepatitis and necrotizing splenitis due to *Bartonella henselae* in a patient with cancer: case report and review of hepatosplenic manifestations of bartonella infection. Clin Infect Dis 1996; 22:951.
Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M: Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2003; 41:4915.
Discusses various nucleic acid amplification methods that have been examined for direct detection of M. pneumoniae in respiratory specimens. Includes a discussion of specimen processing and quality control.
McDade JE, Shepard CC, Redus MA, et al: Evidence of *Rickettsia prowazekii* infections in the United States. Am J Trop Med Hyg 1980; 29:277.
McMahon DK, Dummer JS, Pasculle AR, et al: Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults. Am J Med 1990; 89:275.
McQuiston JH, Paddock CD, Singleton J, Jr, et al: Imported spotted fever rickettsioses in United States travelers returning from Africa: a summary of cases confirmed by laboratory testing at the Centers for Disease Control and Prevention, 1999–2000. Am J Trop Med Hyg 2004; 70:98.
Mahony J, Chong S, Jang D, et al: Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification; identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. J Clin Microbiol 1998; 36:3122.
Manosroi J, Chutipongvivate S, Auwanit W, et al: Early diagnosis of scrub typhus in Thailand from clinical specimens by nested polymerase chain reaction. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34:831.
Maraha B, Berg H, Kerver M, et al: Is the perceived association between *Chlamydia pneumoniae* and vascular diseases biased by methodology? J Clin Microbiol 2004; 42:3937.
Marrie TJ (ed.): Q fever. Vol. I: The Disease. Boca Raton, FL, CRC Press, 1990.
Marrie TJ, Durrant H, Williams C, et al: Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in maritime Canada. J Infect Dis 1988; 158:101.
Marrie TJ, Raoult D: Q fever – a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents 1997; 8:145.
Maurin M, Eb F, Etienne J, et al: Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. J Clin Microbiol 1997; 35:2283.
Mills RD, Young A, Cain K, et al: Chlamydiazyme plus blocking assay to detect *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. Am J Clin Pathol 1992; 97:209.
Moron CG, Popov VL, Feng H-M, et al: Identification of the target cells of *Orientia tsutsugamushi* in human cases of scrub typhus. Mod Pathol 2001; 14:752.
Murai K, Tachibana N, Okayama A, et al: Sensitivity of polymerase chain reaction assay for *Rickettsia tsutsugamushi* in patients' blood samples. Microbiol Immunol 1992; 36:1145.
Nelson HD, Helfand M: Screening for chlamydial infection. Am J Prev Med 2001; 20(3S):95–107.
Nicholson WL, Comer JA, Sumner JW, et al: An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1997; 35:1510.
Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG: Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). Appl Environ Microbiol 1999; 65:773.
Olano JP, Hogrefe W, Seaton, et al: Clinical manifestations, epidemiology, and laboratory diagnosis of human monocytotropic ehrlichiosis in a commercial laboratory setting. Clin Diag Lab Immunol 2003a; 10:891.
Olano JP, Masters E, Hogrefe W, et al: Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri. Emerg Infect Dis 2003b; 9:1579.
Paddock CD, Folk SM, Shore GM, et al: Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 2001; 33:1586.
Paddock CD, Greer PW, Ferebee TL, et al: Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. J Infect Dis 1999; 179:1469.
Paddock CD, Suchard DP, Grumbach KL, et al: Brief report: Fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. N Engl J Med 1993; 329:1164.
Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, et al: *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clin Infect Dis 2004; 38:805.
Parola P, Miller RS, McDaniel, et al: Emerging rickettsioses of the Thai–Myanmar border. Emerg Infect Dis 2003; 9:592.
Patterson KD: Typhus and its control in Russia, 1870–1940. Med Hist 1993; 37:361.
Peipert JF: Genital chlamydial infections. N Engl J Med 2003; 349:2424.
Provides an excellent overview of genital infections with C. trachomatis, including epidemiology, screening strategies, and treatment.
Perez M, Rikihisa Y, Wen B: *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol 1996; 34:2133.
Petrovec M, Furlan SL, Zupanc TA, et al: Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol 1997; 35:1556.
Phillips LE, Goodrich KH, Turner RM, et al: Isolation of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma urealyticum* from obstetrical and gynecological patients by using commercially available medium formulations. J Clin Microbiol 1986; 24:377.
Ponka A: The occurrence and clinical picture of serologically verified *Mycoplasma pneumoniae* infections with emphasis on central nervous system, cardiac, and joint manifestations. Ann Clin Res 1979; 11(Suppl 24):1.
Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, et al: Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. J Clin Microbiol 1998; 36:1489.
Raoult D, Drancourt M: Antimicrobial therapy of rickettsial diseases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:2457.
Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, et al: Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis. Arch Intern Med 2003; 163:226.
Raoult D, La Scola B, Enea M, et al: A flea-associated rickettsia pathogenic for humans. Emerg Infect Dis 2001; 7:73.
Ratnasamy N, Everett ED, Roland WE, et al: Central nervous system manifestations of human ehrlichiosis. Clin Infect Dis 1996; 23:314.
Reynolds MG, Krebs JW, Comer JA, et al: Flying squirrel-associated typhus, United States. Emerg Infec Dis 2003; 9:1341.
Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR: Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae.* J Clin Microbiol 1992; 30:1968.
Rolain JM, Fournier PE, Raoult D, et al: First isolation and detection by immunofluorescence assay of *Bartonella koehlerae* in erythocytes from a French cat. J Clin Microbiol 2003a; 41:4460.
Rolain JM, Lecam C, Raoult D: Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*. Clin Diag Lab Immunol 2003b; 10:1147.
Rolain JM, Maurin M, Bryskie A, et al: *In vitro* activities of telithromycin (HMR 3647) against *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliforis*, and *Ehrlichia chaffeensis.* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1391.
Roux V, Eykrn S, Wyllie S, Raoult D: *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 2000; 38:1698.

Roux V, Raoult D: Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. Res Microbiol 1995; 146:385.

Roux V, Raoult D: Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging disease. J Clin Microbiol 1999; 37:596.

Roux V, Rydkina E, Eremeeva M, Raoult D: Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int J Syst Bacteriol 1997; 47:252.

Schriefer ME, Sacci JB, Jr., Dumler JS, et al: Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. J Clin Microbiol 1994a; 32:949.

Schriefer ME, Sacci JB, Higgins A, et al: Murine typhus: updated roles of multiple urban components and a second typhus like rickettsia. J Med Entomol 1994b; 31:681.

Schultze GE, Jacobs RF: Human moncytic ehrlichiosis in children. Pediatrics 1997; 100:E10.

Scott MA, McCurley TL, Vnencakjones CL, et al: Cat scratch disease – detection of *Bartonella henselae* DNA in archival biopsies from patient with clinically, serologically, and histologically defined disease. Am J Pathol 1996; 149:2161.

Sehdev AES, Dumler JS: Hepatic pathology in human monocytic ehrlichiosis. Am J Clin Pathol 2003; 119:859.

Sexton DJ, Kanj SS, Wilson K, et al: The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. Am J Trop Med Hyg 1994; 50:59.

Silverman DJ: Oxidative cell injury and spotted fever group rickettsiae. *In* Anderson BE (ed.): Rickettsial Infection and Immunity. New York, Plenum Press, 1997, p 79.

Silverman DJ, Santucci LA, Meyers N, et al.: Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. Infect Immun 1992; 60:2733.

Solomon AW, Peeling RW, Foster A, Mabey DCW: Diagnosis and assessment of trachoma. Clin Microbiol Rev 2004; 17:982.

Provides an excellent review of trachoma, including an historical perspective, an overview of the developmental cycle, clinical presentation, and laboratory diagnosis.

Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, et al: *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. N Engl J Med 1995; 332:424.

Stothard DR, Fuerst PA: Evolutionary analysis of the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* using 16S rRNA gene sequences. Syst Appl Microbiol 1995; 18:52.

Sugita Y, Yamakawa Y, Takahasi K, et al: A polymerase chain reaction system for rapid diagnosis of scrub typhus within six hours. Am J Trop Med Hyg 1993; 49:636.

Tamura A, Ohashi N, Urakami H, et al: Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1995; 45:589.

Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, et al: The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. JAMA 1993; 269:770.

Taylor-Robinson D, Furr PM, Webster ADB: *Ureaplasma urealyticum* causing persistent urethritis in a patient with hypogammaglobulinemia. Genitourin Med 1985; 61:404.

Taylor-Robinson D, McCormack WM: Medical progress: the genital mycoplasmas. N Engl J Med 1980; 302:1003.

Tierno PM, Jr, Inglima K, Parisi MT: Detection of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* bacteremia using BacT/Alert blood culture system. Am J Clin Pathol 1995; 104:530.

Tissot Dupont HL, Raoult D, Brouqui P, et al: Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. Am J Med 1992; 93:427.

Toye B, Woods W, Bobrowska M, Ramotar K: Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. J Clin Microbiol 1998; 36:2356.

Traub R, Wisseman CL Jr, Farhang-Azad A: The ecology of murine typhus – a critical review. Trop Dis Bull 1978; 75:237.

Tzianabos TB, Anderson BE, McDade JE: Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. J Clin Microbiol 1989; 27:2866.

Uchiyama T: Role of major surface antigens of *Rickettsia japonica* in the attachment to host cells. *In* Raoult D, Brouqui P (eds): Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millenium. Paris, Elsevier, 1999, p 182.

Valbuena G, Feng H-M, Walker DH: Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellus parasites. Microbes Infect 2002; 4:625.

Van der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L, et al: Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. J Clin Microbiol 2001; 39:1008.

Verdon R, Geffray L, Collet T, et al: Vertebral osteomyelitis due to *Bartonella henselae* in adults: a report of 2 cases. Clin Infect Dis 2002; 35: e141.

Vincelette J, Schirm J, Bogard M, et al: Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1999; 37:74.

Wade N, Levi L, Jones M, et al: Optic disk edema associated with peripapillary serous retinal detachment: an early sign of systemic *Bartonella henselae* infection. Am J Ophthalmol 130:327, 2000.

Waites KB, Talkington DF: *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004; 17:697.

Provides an in-depth review of M. pneumoniae, including taxonomy, pathogenesis, clinical syndromes, diagnosis, and treatment.

Walker DH: Pathology of Q fever. *In* Walker DH (ed.): Biology of Rickettsial Diseases, vol 1. Boca Raton, FL, CRC Press, 1988b, p 17.

Walker DH, Bouyer DH: Rickettsia. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003, p 1005.

Walker DH, Dumler JS: Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. Arch Pathol Lab Med, 1997a; 121:78.

Walker DH, Feng HM, Ladner S, et al: Immunohistochemical diagnosis of typhus rickettsioses using an histochemical diagnosis of typhus rickettsioses using an anti-lipopolysaccharide monoclonal antibody. Mod Pathol 1997b; 10:1038.

Walker DH, Fishbein DB: Epidemiology of rickettsial diseases. Eur J Epidemiol 1991; 7:237.

Walker DH, Gear JHS: Correlation of the distribution of *Rickettsia conorii*, microscopic lesions, and clinical features in South African tick bite fever. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:361.

Walker DH, Guerra H, Maguina C: *Bartonelloses*. *In* Guerrant RL, Walker DH, Weller PF (eds): Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice: Philadelphia, PA, Churchill Livingstone, 1999a, p 482.

Walker DH, Hawkins HK, Hudson P: Fulminant Rocky Mountain spotted fever: its pathologic characteristics associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Arch Pathol Lab Med 1983; 107:121.

Walker DH, Hudnall SD, Szaniawski WK, Feng HM: Monoclonal antibody-based immunohistochemical diagnosis of rickettsialpox: the macrophage is the principal target. Mod Pathol 1999b; 12:529.

Walker DH, Occhino C, Tringali GR, et al: Pathogenesis of rickettsial eschars: the *tache noire* of boutonneuse fever. Hum Pathol 1988a; 19:1449.

Walker DH, Parks FM, Betz TG, et al: Histopathology and immunohistologic demonstration of the distribution of *Rickettsia typhi* in fatal murine typhus. Am J Clin Pathol 1989; 91:720.

Walker DH, Staiti A, Mansueto S, et al: Frequent occurrence of hepatic lesions in boutonneuse fever. Acta Trop 1986; 43:175.

Walker TS: Rickettsial interactions with human endothelial cells in vitro: adherence and entry. Infect Immun 1984; 44:205.

Walls JJ, Aguero-Rosenfeld M, Bakken JS, et al: Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. J Clin Microbiol 1999; 37:2968.

Warren R, Dwyer B, Plackett M, et al: Comparative evaluation of detection assays for *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 1993; 31:1663.

Watt G, Chouriyagune C, Ruangweerayud R, et al: Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in northern Thailand. Lancet 1996; 348:86.

Watt G, Kantipong P, Jongsakul K, et al: Doxycycline and rifampicin for mild scrub-typhus infections in northern Thailand: a randomized trial. Lancet 2000; 356:1057.

Watt G, Walker DH: Scrub typhus. *In* Guerrant RL, Walker DH, Weller PF (eds): Tropical Infectious Diseases, Principles, Pathogens, and Practice. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone, 1999, p 592.

Weiss E: History of rickettsiology. *In* Walker DH (ed.): Biology of Rickettsial Diseases. Boca Raton, FL, CRC Press, 1988, vol I, p 15.

Williams WJ, Radulovic S, Dasch GA, et al: Identification of *Rickettsia conorii* infection by polymerase chain reaction in a soldier returning from Somalia. Clin Infect Dis 1994; 19:93.

Wood JC, Lu RM, Peterson EM, et al: Evaluation of Mycotrim-GU for isolation of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma urealyticum*. J Clin Microbiol 1985; 22:789.

Woods GL, Garza DM: Use of Gen-Probe probe competition assay as a supplement to probes for direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1996; 34:177.

Wylie JL, Moses S, Babcock R, et al: Comparative evaluation of Chlamydiazyme, PACE 2, and AMP-CT assays for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:3488.

Yajko DM, Balston E, Wood D, et al: Evaluation of PPLO, A7B, E, and NYC agar media for the isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma* species from the genital tract. J Clin Microbiol 1984; 19:73.

Yu X-J, Brouqui P, Dumler JS, et al: Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in human tissue by using a species specific monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1993; 31:3284.

Yu X-J, Crocquent-Valdes PA, Cullman LC, et al: Comparison of *Ehrlichia chaffeensis* recombinant proteins for serologic diagnosis of human monocytotropic ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1999; 37:2568.

Yu X-J, Walker DH: The order *Rickettsiales*. *In* Dworkin M, et al (eds): The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd ed. New York, Springer-Verlag, 2003. Available on line at: http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125.

Zavala-Velazquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sanchez-Elias RA, et al: *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatán. Lancet 2000; 356:1079.

Zeaiter Z, Fournier PE, Greub G, et al: Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. J Clin Microbiol 2003; 41:919.

Zhi N, Rikihisa Y, Kim HY, et al: Comparison of major antigenic proteins of six strains of the human granulocytic ehrlichiosis agent by Western immunoblot analysis. J Clin Microbiol 1997; 35:2606.

Zinsser H (ed): Rats, Lice, and History. New York, Little, Brown, 1935.

Very readable historical account of the toll that disease takes, especially in times of conflict.

CAPÍTULO 56

Bacteriologia clínica

Gerri S. Hall PhD, Gail L. Woods MD

Processamento da amostra 1157
- Coloração de Gram 1157
- Técnicas de cultura 1158

Bactérias de importância clínica 1158
- Cocos Gram-positivos 1158
- Bastonetes Gram-positivos 1165
- Bactérias Gram-negativas – cocos 1170
- Bactérias Gram-negativas – bacilos 1173
- Bactérias Gram-negativas – bacilos não fermentativos 1176
- Bactérias Gram-negativas – bactérias HACEK 1182
- Outros bacilos Gram-negativos 1183
- Bactérias anaeróbicas 1188

Referências bibliográficas 1190

Leituras adicionais 1192

PONTOS-CHAVE

- As bactérias podem ser classificadas com base na reação à coloração de Gram (Gram-positivas ou Gram-negativas), na forma (cocos, bacilos, cocobacilos, espiroquetas), na atmosfera preferida (aeróbicas, microaerofílicas, anaeróbicas) e na presença ou ausência de esporos; e podem ser identificadas com base nos principais testes bioquímicos, componentes antigênicos (p. ex., antígenos da parede celular, toxinas) e/ou aspectos moleculares.
- Entre os cocos Gram-positivos, os patógenos humanos mais importantes (e as infecções que costumam causar) são *Staphylococcus aureus* (infecções da pele e de tecidos moles, bacteriemia, síndrome do choque tóxico), *Streptococcus pyogenes* (faringite e suas complicações não supurativas, infecções da pele e de tecidos moles), *Streptococcus agalactiae* (bacteriemia neonatal e meningite), *Streptococcus pneumoniae* (pneumonia adquirida na comunidade, meningite), *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (infecções nosocomiais do trato urinário e bacteriemia).
- Entre os bacilos Gram-positivos, os patógenos humanos mais importantes (e as infecções que costumam causar) são *Listeria monocytogenes* (meningite, bacteriemia), espécies de *Nocardia* (pneumonia, infecções de tecidos moles, abscesso cerebral), *Bacillus anthracis* (infecções da pele e de tecidos moles, pneumonia; agente de bioterrorismo) e *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), raramente encontrado em laboratórios clínicos nos EUA.
- Entre os cocos Gram-negativos, os patógenos humanos mais importantes (e as infecções que costumam causar) são *Neisseria meningitidis* (meningite) e *Neisseria gonorrhoeae* (gonorreia).
- Os bacilos Gram-negativos incluem *Enterobacteriaceae*, muitos deles parte da microbiota normal do trato gastrintestinal, bacilos Gram-negativos não fermentadores (p. ex., *Pseudomonas aeruginosa*), encontrados no ambiente e causadores de infecções humanas quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas, organismos halofílicos (espécie de *Vibrio*), bactérias microaerofílicas (*Campylobacter, Helicobacter*), organismos exigentes (espécies de *Legionella, Bordetella, Francisella tularensis*, espécies de *Brucella* e *Haemophilus*), além de outras bactérias encontradas com pouca frequência.
- Entre as *Enterobacteriaceae*, os patógenos humanos mais importantes (e as infecções que costumam causar) são *Escherichia coli* (infecção do trato urinário, diarreia, bacteriemia), *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* (infecção do trato urinário, pneumonia), espécies de *Proteus* (infecção do trato urinário), espécies de *Salmonella* (diarreia, febre tifoide), espécies de *Shigella* (diarreia), espécies de *Enterobacter* (pneumonia nosocomial, infecção do trato urinário, bacteriemia) e espécies de *Serratia* (pneumonia nosocomial).
- Entre os anaeróbios, os patógenos humanos mais importantes (e as infecções que costumam causar) são o grupo do *Bacteroides fragilis* (infecções intra-abdominais, abscessos) e espécies de *Clostridium*, especialmente *Clostridium perfringens* (infecções de tecido mole, intoxicação alimentar), *Clostridium tetani* (tétano) e *Clostridium difficile* (diarreia associada a antibiótico).

Uma ampla variedade de espécies bacterianas pode ser encontrada em amostras clínicas. Para avaliar o significado clínico desses organismos de maneira adequada, é indispensável conhecer a população bacteriana normal presente nas diferentes localizações anatômicas. Em alguns casos, o número de organismos presentes pode ser extremamente alto, por exemplo, 10^6 microrganismos/cm^2 de pele, 10^9 microrganismos/mL de secreções orais e 10^{11} microrganismos/g de conteúdo do cólon. É importante obter amostras com contaminação mínima da microbiota normal, o que pode ser difícil, mas é possível conseguir em condições ideais seguindo os procedimentos apropriados. Tais procedimentos, em conjunto com as técnicas de processamento que servem para facilitar a obtenção de microrganismos patogênicos, serão discutidos no Capítulo 63, que começa com uma curta discussão sobre os procedimentos laboratoriais usados para processar uma amostra para cultura bacteriana, seguida de uma discussão mais profunda sobre as espécies de bactérias comumente consideradas patógenos humanos.

Processamento da amostra

Coloração de Gram

Alguns argumentam que o exame direto de uma amostra corada pelo Gram é um dos procedimentos mais importantes realizados pelo laboratório de microbiologia. A coloração de Gram fornece informações rápidas, usadas pelo clínico para escolher o tratamento antimicrobiano adequado, e também ajuda o técnico do laboratório a avaliar a qualidade da amostra e até que ponto certos organismos obtidos na cultura vão se desenvolver. Dá-se mais atenção aos organismos presentes em quantidade abundante nas amostras que contêm muitos leucócitos que àqueles em pequeno número na ausência de leucócitos.

Para preparar um esfregaço a ser corado, coloca-se uma alíquota da parte mais purulenta ou sanguinolenta da amostra em uma lâmina de microscopia limpa, de forma que crie áreas espessas e finas. No caso de líquidos corporais estéreis, pode-se usar uma citocentrífuga para concentrar a amostra por 10 a 100 vezes (Peterson, 1988). Deixa-se o material na lâmina secar ao ar, fixando-o com metanol ou calor leve e, em seguida, corando-o com os reagentes para coloração de Gram (cristal violeta, iodo de Gram, álcool e safranina). Os organismos com parede celular Gram-positiva resistem à coloração com metanol e retêm a cor púrpura do cristal violeta; os organismos com parede celular Gram-negativa se coram de vermelho com a safranina.

Os esfregaços corados são examinados inicialmente sob objetiva de pequeno aumento, com o intuito de visualizar estruturas grandes, como larvas de nematódeos, espirais de Curschmann, grânulos grandes, microcolônias bacterianas ou formas de fungos. Em seguida, usa-se uma lente de imersão em óleo para avaliar o tipo de bactéria presente. Como é preciso que haja 10^5 organismos/mL para que se consiga

ver um microrganismo por campo de imersão em óleo (1.000×), os esfregaços têm de ser examinados com cuidado para que seja possível detectar pequenos números de microrganismos.

São avaliados o tamanho, a forma e a reação de Gram dos microrganismos, fazendo-se um relatório com o máximo de descrição possível; registrar a presença de cocos Gram-positivos em pares que lembram *Streptococcus pneumoniae* (Fig. 56.1) é mais útil que simplesmente relatar a presença de cocos Gram-positivos em cadeias. A presença de leucócitos ou hemácias deve ser quantificada e registrada, bem como qualquer bactéria intracelular observada. A correlação das observações à coloração de Gram com os resultados de cultura é uma boa maneira de verificar a qualidade das colorações e da cultura. A demonstração de muitas bactérias à coloração de Gram que não crescem em cultura pode ser indício da presença de microrganismos incomuns que requeiram meios mais especializados e incapacidade do pessoal do laboratório de reconhecer certos tipos de colônias em cultura, ou ainda pode sugerir um resultado positivo falso à coloração de Gram em decorrência da contaminação de reagentes ou dos materiais coletados, como *swabs*, ou interpretação incorreta dos resultados da coloração de Gram. Os resultados da coloração de Gram também poderiam indicar a necessidade de inocular meios adicionais para uma espécie específica. Por exemplo, o achado de muitos cocobacilos Gram-positivos em uma amostra do trato respiratório poderia indicar a necessidade de uma placa de chocolate para detectar *Haemophilus* sp., o que não seria possível em placa de ágar-sangue. Outros corantes, como o laranja de acridina, podem ser utilizados para corar frascos de sangue para cultura, líquido cerebrospinal (LCE) ou preparações com sobrenadante. Esse é um tipo de corante fluorescente que proporciona uma coloração rápida e, às vezes, mais sensível para bactérias e fungos (Mirrett, 1982), que vão produzir uma fluorescência alaranjada, enquanto células de mamíferos se coram de verde. É necessária alguma experiência para a interpretação acurada da coloração com laranja de acridina, bem como a preparação correta dos esfregaços para evitar uma quantidade excessiva de material celular, que pode resultar em "muito" DNA celular e mascarar a presença de qualquer DNA bacteriano.

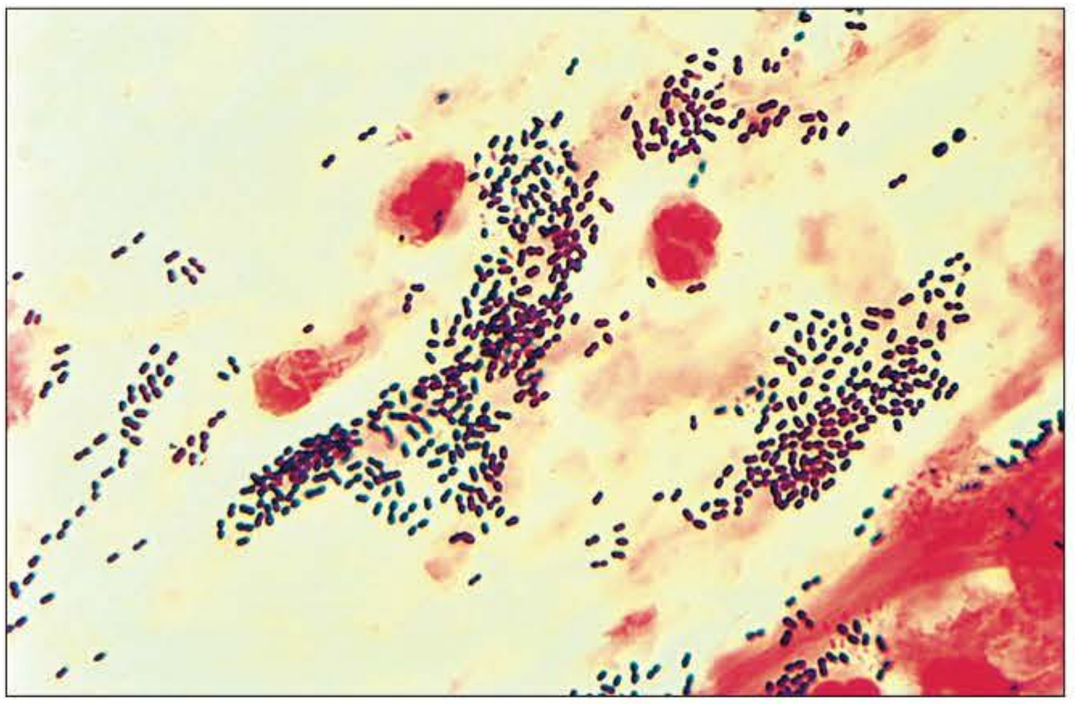


Figura 56.1 Coloração de Gram de um esfregaço de escarro mostrando neutrófilos, detritos e diplococos Gram-positivos, sugestivos de infecção pneumocócica (imersão em óleo).

Técnicas de cultura

Os meios para cultura são selecionados com o intuito de fornecer condições ideais para o crescimento de patógenos comumente encontrados em determinado local ou em um tipo particular de amostra. Dá-se consideração às necessidades especiais de crescimento de bactérias associadas a certo tipo de infecção ou à necessidade de selecionar certas bactérias patogênicas a partir de uma população mista de microbiota nativa. Portanto, os meios escolhidos podem incluir meios seletivos e diferenciais, além do ágar padrão enriquecido.

Ágar suplementado com sangue é um bom meio de crescimento geral e demonstra a ação hemolítica das colônias sobre os eritrócitos. Antibióticos ou substâncias químicas podem ser acrescentados para se criar um meio seletivo como o ágar com colistina e ácido nalidíxico (CNA) ou o ágar com álcool feniletílico (PEA), usados para inibir o crescimento de bacilos Gram-negativos enquanto permite o de bactérias Gram-positivas. O aquecimento do sangue para fazer ágar-chocolate e o acréscimo de suplementos vitamínicos resulta em um meio enriquecido com hemina (fator X) e dinucleotídeo de adenina nicotinamida (fator V) disponíveis para o isolamento de Haemophilus spp. e outras bactérias exigentes. Bacilos Gram-negativos podem ser separados dos Gram-positivos usando-se um sal biliar e corante em um meio como o ágar de McConkey que, além disso, divide as colônias em lactose-positivas e lactose-negativas, tornando-se assim seletivo e diferencial. As orientações para a seleção dos meios a serem usados em diferentes tipos de amostras estão na Tabela 56.1.

Culturas bacterianas em geral são incubadas à 35°C e examinadas primeiro após 24 a 48 horas de incubação. O acréscimo de CO_2 em concentrações de 5 a 10% é essencial ou estimula o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* e *S. pneumoniae*, devendo ser feito sempre que possível. Exceções a essa recomendação são as culturas em meios seletivos e diferenciais em que se recorre à alteração no pH (que pode ser afetado pelo acréscimo de CO_2) para diferenciar tipos de colônia (p. ex., ágar de xilose–lisina–desoxicolato [XLD], ágar Hektoen entérico [HE]).

Para recuperação de anaeróbios, os meios inoculados devem ser colocados em um ambiente anaeróbico o mais rapidamente possível. Dispõe-se de vários tipos de sistemas de cultura anaeróbica. Um deles é o frasco anaeróbico, em que se acrescenta água a uma embalagem geradora de H_2 e CO_2, e o O_2 é convertido de forma catalítica com H_2 em água com *pellets* de alumínio revestidos por paládio contidos em uma câmara com tampa. Uma modificação desse sistema é um saco de plástico transparente com seu próprio gerador de gás e o catalisador paládio, projetado para manter uma placa de ágar.

Outra abordagem para a cultura anaeróbica é a caixa ou câmara enluvada anaeróbica, que consiste em uma grande câmara de plástico transparente na qual não entra ar e que é preenchida com uma mistura de gases sem oxigênio, ou seja, de nitrogênio, hidrogênio e dióxido de carbono. Amostras, placas e tubos são introduzidos ou removidos da câmara por meio de uma trava de troca de gases. A anaerobiose é mantida pelos catalisadores de paládio e pelo gás hidrogênio na câmara. Todas as manipulações dentro da câmara são feitas com luvas de neoprene que vedam a parede da câmara ou, no caso de sistemas "sem luvas", por meio de um orifício com luvas que se ajustam de maneira perfeita em torno dos antebraços de quem faz a manipulação. As câmaras contêm incubadores internos que mantêm a temperatura de incubação. Cada sistema anaeróbico tem suas vantagens e desvantagens, mas todos são efetivos da mesma forma para o isolamento de bactérias anaeróbicas clinicamente significativas a partir de amostras.

As culturas bacterianas devem ser examinadas rotineiramente após 18 a 24 horas de incubação. A exceção é a cultura anaeróbica, que em geral é examinada 48 horas depois, para que bactérias de crescimento mais lento possam produzir colônias visíveis. Em geral, meios sólidos são mantidos por 48 horas, enquanto os meios líquidos o são por mais 24 a 48 horas. Quando for diferente para microrganismos específicos, será mencionado neste texto.

Quando a cultura é examinada pela primeira vez, faz-se um relatório preliminar, o qual é atualizado à medida que se disponha de mais informação. Certos resultados (p. ex., coloração de Gram positiva para sangue ou LCE, isolamento de um microrganismo que requeira medidas contra infecção) são relatados ao provedor de saúde assim que a informação estiver disponível. Relatórios finais são feitos quando todo o trabalho da cultura estiver completado.

Bactérias de importância clínica

Cocos Gram-positivos

Estafilococos

Características

Estafilococos são cocos esféricos catalase-positivos que, em geral, aparecem em aglomerados no formato de cachos em esfregaços corados (Fig. 56.2). Crescem bem em qualquer meio nutridor que conte-

Tabela 56.1 Diretrizes para seleção do meio para várias amostras

	Meios para a recuperação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas					Meios para a recuperação de bactérias anaeróbicas		
Amostra	**BAP**	**MAC ou EMB**	**CBA**	**Broth**[†]	**Outros**	**BAP**[*]	**BBE**	**PEA**
Cavidades corporais					Considerar o uso de BCB para grandes volumes de líquidos			
Líquido								
Cerebrospinal	X		X	X (para amostras de derivações)				
Peritoneal	X	X	X		BCB	X	X	X
Pleural; pericárdico	X		X	X	BCB	X		
Sinovial	X		X	X	BCB			
Feridas								
Aspirado	X	X	X			X	X	X
Swab[‡]	X	X						
Tecido[§]	X	X	X	X		X	X	X
Trato respiratório								
Escarro	X	X	X					
Garganta	X							
Lavado bronquiolar	X	X	X		CYE[#]			
Escovado; lavados	X	X	X			X[¶]	X[¶]	X[¶]
Nasal	X							
Geniturinário								
Vaginal/retal para grupo B				LIM	Seletivo ou cromogênico			
Estreptococos (GBS)					Meios GBS			
Outros	X	X	X		Meios GC[‖]	X	X	X
Cérvix					Meios GC			
Uretra/pênis					Meios GC			
Urina								
Jato médio	X	X			Tela; cromoágar			
Aspirado suprapúbico	X	X						
Fezes			X	EB	HE ou XLD; Campy			
Olhos	X	X	X**			X**		
Orelha; aspirado interno	X	X				X		
Cateteres vasculares	X							

Orientações específicas para organismos individuais serão incluídas onde forem descritas no texto.

[*] Considerar um CDC BAP ou um ágar-sangue para *Brucella*, ou outro BAP "enriquecido" para recuperação de anaeróbicos; uma placa com um lago de ágar-sangue com antibióticos também pode ser apropriada.

[†] Caldo comum suplementado com tioglicolato; no entanto, para aeróbios, uma infusão de cérebro e coração pode ser adequada. [‡] Não recomendado para culturas anaeróbicas. [§] Se microrganismos específicos, ou situações, outros meios podem ser adicionados. [¶] Se for usado um broncoscópio protegido para a coleta da amostra. || Meio de Thayer-Martin ou Martin-Lewis ou outros meios enriquecidos para recuperação de *N. gonorrhoeae*. ** Caso se suspeite de *Propionibacterium acnes* em casos de endofalmite, pode-se usar caldo de tioglicolato e/ou BAP anaeróbico.

BAP = placa com ágar-sangue; BCB = frascos para hemocultura; BBE = ágar-bile esculina para *Bacteroides*; Campy = meio seletivo para *Campylobacter*; CBA = ágar-sangue com chocolate; CYE = extrato em carvão para levedura; para *Legionella* ou *Nocardia*; EB = caldo enriquecido, como GN ou Selenito; o mesmo para *swabs* retais, menos cultura seletiva para *Campylobacter*; EMB = eosina-azul de metileno; HE = ágar entérico Hektoen; LIM = caldo enriquecido para estreptococos do grupo B; MAC = ágar de MacConkey; PEA = álcool feniletílico; XLD = ágar xilose–lisina–desoxicolato.

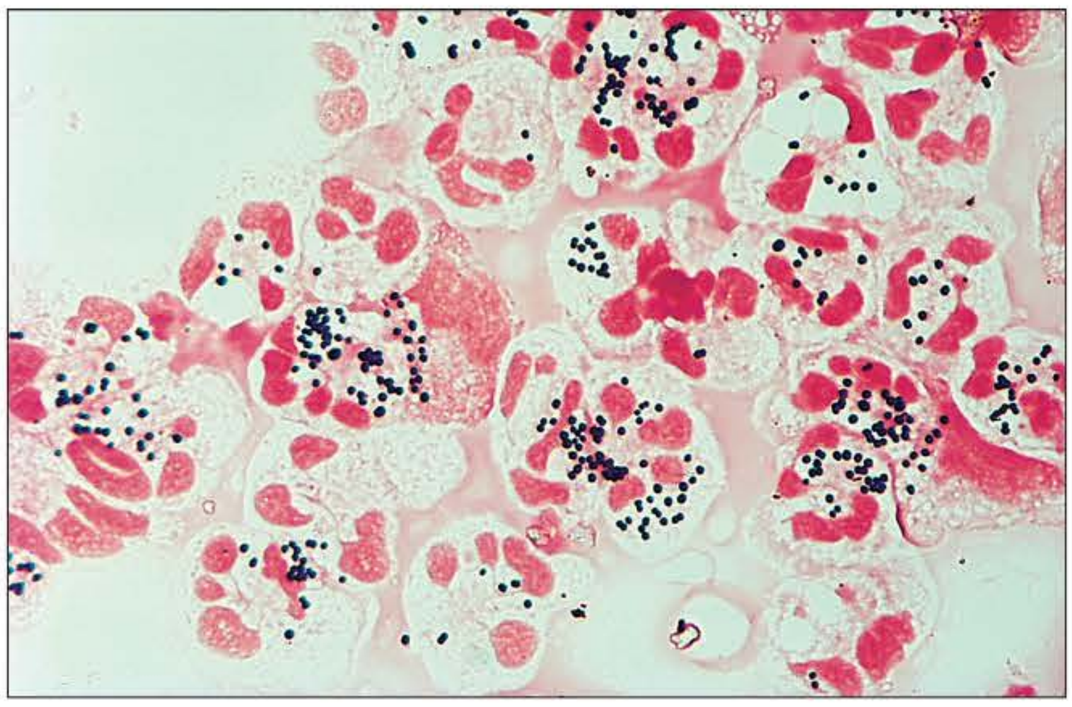


Figura 56.2 Preparação citocentrifugada de líquido cerebrospinal corado pelo Gram mostrando muitos neutrófilos, material amorfo liso e cocos Gram-positivos em pares, cadeias curtas e aglomerados, sugestivos de infecção estafilocócica (imersão em óleo).

nha peptona, em condições aeróbicas e anaeróbicas, e podem produzir hemólise do sangue de várias espécies de animais e pigmento amarelo ou alaranjado em certos tipos de ágar. O crescimento de estafilococos é prontamente detectado em placas de ágar-sangue ou em vários tipos de caldo nutridor. Um meio seletivo para o isolamento de *Staphylococcus aureus* é o que contenha NaCl a 7,5 a 10% com manitol.

Os testes úteis para distinguir estafilococos de micrococos (em geral considerados não patogênicos) estão relacionados na Tabela 56.2 (Kloos, 1999). Diferencia-se o *S. aureus* de outras espécies de estafilococos sobretudo por sua produção de coagulases, que são capazes de coagular o plasma. Foram reconhecidas duas formas antigenicamente distintas de coagulase, uma ligada à parede celular e que se denomina fator de aglomeração e é detectada pelo teste da coagulase em lâmina, e a outra livre da parede celular e que é detectada pelo teste da coagulase em tubo (em geral considerado o teste definitivo para a presença da enzima coagulase). Há produtos comerciais para aglutinação no látex que detectam o fator de aglomeração e a proteína A no *S. aureus* com boas sensibilidade e especificidade. Tais ensaios podem ser apropriados em situações nas quais a reprodutibilidade do teste está em questão em decorrência da inexperiência dos técnicos que realizam o ensaio. Também existe um produto para fluorescência na hibridização *in situ* (FISH) (*S.*

Tabela 56.2 Testes para diferenciar estafilococos de micrococos

	Estafilococos	Micrococos
Suscetibilidade à lisostafina	S	R
Produção aeróbica de ácido a partir de glicerol	+	–
Produção anaeróbica de ácido a partir de glicose	+	–
Lisozima (50 µg disk)	R	S
Suscetibilidade à bacitracina (0,04U)	R	S
Oxidase modificada	–	+

Adaptado de: Mahon CR, Manuselis G: Textbook of Diagnostic Microbiology, 2nd ed. London, WB Saunders, 2000, p. 332.

aureus PNA FISH de AdvanDx, Woburn, MA), para diferenciar o *S. aureus* dos estafilococos coagulase-negativos em um frasco de cultura de sangue positivo para cocos Gram-positivos em aglomerados.

Manifestações clínicas e patogênese

O *S. aureus* pode estar presente entre a microbiota nativa da pele, olhos, trato respiratório superior, trato gastrintestinal, uretra e, com pouca frequência, vagina. Portanto, a infecção pode surgir de uma fonte endógena ou exógena. Os fatores importantes no desenvolvimento de infecções causadas pelo *S. aureus* incluem rupturas na continuidade e na integridade de mucosas e superfícies cutâneas, presença de corpos estranhos ou implantes, doenças virais prévias, terapia antimicrobiana prévia e doenças subjacentes com defeitos na imunidade celular e humoral.

As infecções causadas pelo *S. aureus* podem afetar múltiplos sistemas orgânicos. Entre as mais comuns estão as que envolvem a pele e seus apêndices, como o impetigo, foliculite, mastite e infecções de feridas cirúrgicas. O *S. aureus* está entre as causas que acarretam bacteriemia em pacientes hospitalizados, podendo causar endocardite, em particular em pessoas com cardiopatia valvular esquerda e em usuários de drogas intravenosas. O *S. aureus* é a causa mais comum de abscesso epidural espinhal e flebite intracraniana supurativa, podendo ser recuperado de abscessos cerebrais, tipicamente após traumatismo. A meningite causada pelo *S. aureus* é incomum e em geral segue-se a traumatismo craniano ou algum procedimento neurocirúrgico.

O *S. aureus* é responsável por muitos casos de osteomielite, é a causa mais comum de artrite séptica em crianças pré-puberais e às vezes é responsável pela artrite séptica em adultos. Nos trópicos, pode causar abscessos espontâneos profundos nos músculos, afetando sobretudo pessoas desnutridas com infecção parasitária concomitante (Chiedozi, 1979). O *S. aureus* é uma causa infrequente de pneumonia adquirida na comunidade, mas uma causa comum de pneumonia nosocomial, que em geral segue-se à aspiração de microrganismos nasofaríngeos endógenos. Os fatores predisponentes incluem infecção com os vírus do sarampo ou da influenza A, fibrose cística e deficiência imune. Infecções do trato urinário causadas pelo *S. aureus* são raras, porém é possível encontrar pielonefrite, abscessos intrarrenais e perirrenais.

Vários fatores desempenham um papel na virulência do *S. aureus*. A cápsula, se presente, tem propriedades antifagocíticas. Os peptidoglicanos da parede celular têm atividade semelhante à da endotoxina, estimulando a liberação de citocinas por macrófagos, a ativação do complemento e a agregação de plaquetas. A proteína A, uma substância imunologicamente ativa na parede celular, tem propriedades antifagocíticas baseadas em sua capacidade de ligar o fragmento Fc da imunoglobulina (Ig)G. Pode ser que outras proteínas de superfície designadas como componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesão da matriz (MSCRAMM, *microbialsurface components recognizing adhesive matrix molecules*) desempenhem um papel importante na capacidade dos estafilococos de colonizar os tecidos do hospedeiro.

O *S. aureus* produz inúmeras toxinas. A exotoxina TSST-1 é responsável pela síndrome do choque tóxico, e as enterotoxinas A–E são responsáveis pela intoxicação alimentar por estafilococos. As toxinas esfoliativas, toxinas epidermolíticas A e B, causam eritema cutâneo e a separação da pele observada na síndrome da pele escaldada. Várias enzimas também são produzidas, tais como protease, lipase e hialuronidase, todas capazes de destruir tecido e, provavelmente, agir para facilitar a disseminação de infecção.

As doenças mediadas por toxina causadas pelo *S. aureus* incluem a síndrome da pele escaldada, intoxicações alimentares e a síndrome do choque tóxico. A síndrome da pele escaldada ocorre em lactentes infectados por uma cepa do *S. aureus* que produz toxina esfoliativa. A doença começa abruptamente com eritema, seguido em 2 a 3 dias pela formação de bolhas flácidas, que se rompem, deixando áreas desnudas que acabam por resolver-se por completo. A intoxicação alimentar por estafilococos, caracterizada por náuseas, vômitos, cãibras abdominais e diarreia, ocorre 1 a 6 horas após a ingestão de alimentos contaminados com a enterotoxina estafilocócica pré-formada.

A síndrome do choque tóxico é uma doença multissistêmica que acomete indivíduos sem anticorpos contra a TSST-1 e colonizados ou infectados com cepas de *S. aureus* que produzem a TSST-1 ou raramente a enterotoxina B ou C. A doença é mais comum em mulheres com 15 a 25 anos de idade que usam tampões durante a menstruação, mas também pode ocorrer em indivíduos que não menstruam, incluindo mulheres no período pós-parto, pessoas com ferida cirúrgica ou outras infecções focais e indivíduos que tenham sido submetidos a algum procedimento cirúrgico no nariz ou nos seios nasais. A síndrome do choque tóxico começa de modo abrupto com febre, mialgias, vômitos e diarreia, seguidos por hipotensão, choque hipovolêmico e um exantema eritematoso que frequentemente envolve as palmas e plantas e descama em 1 a 2 semanas. O diagnóstico é clínico, e o isolamento do *S. aureus* de qualquer local não é necessário. A recuperação completa é a regra, embora possam ocorrer episódios repetidos.

Mais recentemente, casos de infecção adquirida na comunidade por *S. aureus* resistente à oxacilina tornaram-se mais comuns. Nesses isolados, foi encontrada uma toxina conhecida como leucocidina Panton–Valentine (PVL), que em raros casos é associada a cepas hospitalares de *S. aureus* (Vandenesch, 2003). Demonstrou-se que a PVL é responsável por necrose cutânea e infecções de tecidos moles, bem como, ainda que com menos frequência, pneumonia necrotizante e ocasionalmente fatal (Francis, 2005). Os indivíduos em risco são, na sua maioria, crianças envolvidas em esportes de contato e indivíduos que vivem em instituições, como prisões (MMWR, 2003; Pan, 2003).

As infecções causadas por espécies de estafilococos coagulase-negativos em geral ocorrem associadas a corpos estranhos, sobretudo próteses valvares implantadas, articulares e shunts. O *S. epidermidis* é a espécie mais envolvida em tais infecções. O *S. saprophyticus* é uma causa importante de bacteriúria, em particular em mulheres jovens com vida sexual ativa. O *S. hemolyticus*, embora um isolado relativamente raro em amostras clínicas, pode ser resistente à vancomicina, agente ao qual a maioria dos estafilococos coagulase-negativos é suscetível.

Diagnóstico laboratorial

A observação microscópica de cocos Gram-positivos arredondados típicos aglomerados em esfregaços de material obtido de lesões ainda não abertas nem drenadas ou em esfregaços feitos com o caldo de uma cultura sanguínea positiva é indicativa de infecção estafilocócica.

O *S. aureus* produz coagulase, enzima que liga o fibrinogênio plasmático, fazendo com que os microrganismos se aglutinem ou o plasma coagule; quase todos os demais estafilococos não fazem isso. Mais de 95% dos isolados de *S. aureus* são identificados pelo teste da coagulase em lâmina, que detecta a enzima ligada à célula (fator de aglomeração), e quase todos os isolados são identificados pelos testes da coagulase em tubo, que detectam coagulase livre.

O teste da coagulase em lâmina é feito misturando-se uma emulsão densa de microrganismos com plasma em uma lâmina de vidro de microscopia. O teste é positivo se ocorrer aglomeração em 30 segundos. O *Staphylococcus lugdunensis* e o *Staphylococcus schleiferi* são outros dois estafilococos que dão resultado positivo nesse teste. Um controle que consiste em emulsificar uma colônia suspeita em solução fisiológica deve ser feito para cada lâmina de teste, para garantir que não ocorra autoaglutinação. Caso isso aconteça, o resultado da lâmina de teste deve ser considerado insuficiente para a determinação da natureza do isolado quanto à coagulase.

Para o teste da coagulase em tubo, são transferidas várias colônias para um tubo que contém plasma, que é incubado à 35°C por 4 horas; em seguida, verifica-se se houve formação de coágulo. Caso isso não

tenha ocorrido, o tubo é incubado novamente à temperatura ambiente e reexaminado depois de um total de 20 horas de incubação. O teste deve ser examinado após 4 horas porque a maioria dos isolados de *S. aureus* produz um coágulo nesse intervalo e algumas cepas produzem uma fibrinolisina que pode lisar o coágulo e, assim, ocasionar uma reação negativa falsa se o teste só for visto após 20 horas. O *Staphylococcus intermedius* e o *Staphylococcus hyicus* também serão positivos no teste da coagulase em tubo, porém são primordialmente patógenos de animais, encontrados apenas em raros casos em amostras humanas.

Existem no comércio vários ensaios de aglutinação em látex para identificação rápida do *S. aureus*. Tais ensaios detectam a proteína A e o fator de aglomeração, e alguns também detectam polissacarídeo capsular, que melhora a capacidade de detectar *S. aureus* resistente à meticilina (oxacilina). O *S. saprophyticus* e o *Staphylococcus sciuri* são duas outras espécies de estafilococos que podem ser positivas à aglutinação no látex.

Foram reconhecidas muitas espécies de estafilococos coagulase-positivas. Porém, com exceção do *S. saprophyticus*, que é resistente à novobiocina, a identificação desses isolados até o nível de espécie não é uma prática indicada nem clinicamente. Se necessário, podem ser feitas tentativas de identificar tais isolados até o nível de espécie mediante o uso de kits comerciais, cuja acurácia comprovada fica entre 70 e mais de 90% (Bannerman, 2003). Uma alternativa é enviar os isolados para um laboratório de referência capaz de realizar ensaios bioquímicos padrões ou ensaios moleculares, como a análise do RNAr 16S (Lee, 2001). Os estafilococos podem ser classificados em cepas com finalidades epidemiológicas, na tentativa de identificar fontes comuns de infecções com base em sua suscetibilidade a diferentes bacteriófagos, perfis de plasmídeos, ácidos graxos celulares, eletroforese de enzimas multilocus ou tipagem cromossômica molecular (eletroforese em campo de gel pulsado e reação em cadeia da polimerase repetitiva [rep-PCR]). Em geral, esses testes estão disponíveis apenas em laboratórios de referência.

Suscetibilidade antimicrobiana

Mais de 90% dos estafilococos são resistentes à penicilina. Como tal resistência se deve a uma β-lactamase codificada por plasmídeo, a sensibilidade à penicilina deve ser confirmada após um período de indução (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2003a) com um agente β-lactâmico.

A resistência às penicilinas (metcilina, oxacilina, nafcilina) nas bactérias resistentes à penicilinase ocorre em até 80% dos estafilococos coagulase-negativos e em até 50% dos *S. aureus*. A resistência a esse grupo de agentes microbianos é mediada pelo gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada, PBP2a. A resistência é tipicamente heterogênea, significando que apenas raras células (1 em 10^4 a 10^8) expressam o traço de resistência. Por isso, é preciso seguir as orientações específicas para garantir a detecção: como tradição, usa-se um disco com 1 μg de oxacilina para o teste da difusão em disco. Mais recentemente, o CLSI (ou o antigo NCCLS) sugeriu que, caso se use a difusão em disco como método para detectar *S. aureus* resistente à oxacilina (MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), um teste com disco que contenha 30 μg de cefoxitina é um indicador melhor do que a oxacilina. Para predizer a presença de resistência mediada pelo *mecA* no *S. aureus* (e no *S. lugdunensis*), o CLSI recomenda que isolados com zonas de tamanho > 20 mm sejam considerados suscetíveis (S) e aqueles com zonas de tamanho < 19 mm sejam relatados como resistentes à oxacilina (R) (Velasco, 2005). No caso de estafilococos coagulase-negativos (exceto *S. lugdunensis*), > 25 mm = S e < 24 mm = R (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS 2005). Deve-se usar oxacilina em caldo de Mueller–Hinton suplementado com cátions contendo NaCl a 2% para o teste de microdiluição, incubando-se placas de ágar e bandejas de microtitulação por um total de 24 horas a 35°C. Para triar isolados de *S. aureus* quanto à resistência à oxacilina, usa-se um cotonete para inocular um ponto em ágar de Mueller–Hinton suplementado com NaCl a 4% e com 6 g/mL de oxacilina, incubando-se as placas por 24 horas. Foram desenvolvidos vários ensaios para a detecção rápida de resistência à oxacilina. Eles incluem amplificação do ácido nucleico, ensaios com sonda de ácido nucleico para *mecA* e aglutinação em látex para PBP2a (o MRSA Screen Test, Denka-Seiken Co., Tóquio, Japão) e PBP 2' (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) (Chediac-Tannoury, 2003; Chapin, 2004). Para a detecção de MRSA em *swabs* nasais, há duas abordagens. Existem meios cromogênicos específicos mais novos para a detecção de MRSA que requerem incubação apenas por uma noite, mas permitem a detecção fácil de colônias com coloração específica que são MRSA (Perry, 2004). O IDI (Infectio Diagnostics, Inc., Canadá, recentemente Gene-Ohm) tem um ensaio baseado na PCR, feito com o instrumento Smart Cycler (Cepheid, Sacramento, CA), que pode detectar diretamente o MRSA em amostras clínicas em menos de 90 minutos (Warren, 2004). Embora os estafilococos resistentes à oxacilina possam parecer suscetíveis às cefalosporinas, devem ser considerados resistentes a todos os agentes β-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), incluindo os carbapenéns. Cepas adquiridas em hospitais em geral também são resistentes a muitos antibióticos não β-lactâmicos. As cepas CA-MRSA recém-reconhecidas ainda continuam suscetíveis à maioria dos antibióticos não β-lactâmicos (Daum, 2002).

A clindamicina pode ser usada para tratar infecções estafilocócicas. Uma resistência induzível, devida a mecanismos que envolvem uma classe de genes que inativam enzimas conhecidos como genes *erm*, pode não ser detectada em testes de suscetibilidade rotineiros. Esse gene *erm* também confere resistência cruzada aos macrolídeos (p. ex., eritromicina) e estreptograminas (quinupristina-dalfopristina). Um isolado de *S. aureus* resistente à eritromicina, mas suscetível à clindamicina em um teste de concentração inibitória mínima (MIC, *minimum inhibitory concentration*; diluição em caldo ou ágar ou teste E), deve ser avaliado quanto à resistência à clindamicina pelo teste "D", como segue. Um disco de 15 μg de eritromicina e um de 2 μg de clindamicina são colocados a 15 mm de distância sobre a superfície de uma placa de ágar-sangue inoculada com o isolado em questão. Após incubação por uma noite, se houver resistência induzível à clindamicina, haverá uma opacificação da zona de clindamicina de inibição no lado perto do disco de eritromicina, dando o aspecto de uma "zona D" (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2005).

A resistência à vancomicina, embora vista em raros casos no *S. aureus*, é um assunto sério que os laboratórios precisam confirmar e triar. Isolados de *S. aureus* com suscetibilidade intermediária à vancomicina (VISA, *vancomycin intermediately susceptible S. aureus*) têm MICs na faixa intermediária (8 a 16 μg/mL) (Cosgrove, 2004). Houve três casos relatados de *S. aureus* resistente à vancomicina com MICs de vancomicina tão altas quanto 1.024 μg/mL (Centers for Disease Control, 2004b). Como a última não foi detectada de maneira uniforme em sistemas automatizados para testes de suscetibilidade, os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomendam que todos os isolados de *S. aureus* testados em um instrumento automatizado também sejam testados por um ensaio de triagem para vancomicina, para assegurar que a MIC correta seja determinada. Isso em geral é feito inoculando-se 100 μL de uma suspensão de McFarland 0,5 do *S. aureus* em uma placa de ágar-sangue com 6 μg/mL de vancomicina e incubando-se por uma noite. Isolados positivos que tenham valores elevados de MIC (4 μg/mL) devem ser enviados para um laboratório de referência para confirmação e, nos EUA, os casos confirmados devem ser encaminhados para os CDC.

Estreptococos e enterococos

Características

Os estreptococos são cocos Gram-positivos catalase-negativos, esféricos, ovoides ou em forma de lanceta, vistos frequentemente em pares ou cadeias, e são anaeróbicos facultativos. Algumas cepas requerem acréscimo de CO_2 para seu isolamento inicial, mas podem perder essa exigência em subculturas. Os estreptococos podem ser classificados de forma ampla de acordo com a reação hemolítica em ágar-sangue (Tab. 56.3). As cepas que hemolisam por completo os eritrócitos em torno de suas colônias denominam-se β-hemolíticas e podem ser classificadas ainda nos grupos de Lancefield com base em carboidratos sorologicamente reativos. Membros importantes desse grupo incluem o *Streptococcus pyogenes* (grupo A) e o *Streptococcus agalactiae* (grupo B). A Figura 56.3 é uma coloração de Gram de *S. pyogenes* (estreptococo do grupo A) em uma amostra de material de abscesso no braço de um paciente com celulite. As cepas que provocam hemólise parcial (causam "esverdeamento" do ágar) são α-hemolíticas. Um membro importante desse grupo é o *S. pneumoniae*. Os estreptococos que não hemolisam sangue são γ-hemolíticos. Um membro impor-

Tabela 56.3 Classificação de estreptococos e enterococos

Hemólise	Grupo de Lancefield	Espécie
β	A	*Streptococcus pyogenes*
	B	*Streptococcus agalactiae*
	C	*Streptococcus dysgalactiae*
	D	*Enterococcus* sp.
α ou γ	D	*Enterococcus* sp.
	D	*Streptococcus bovis*
	Nenhum	Grupo Viridans*
α	Nenhum	*Streptococcus pneumoniae*

* Pequenas colônias variantes do grupo de Lancefield A, C, F ou G, ou cepas não agrupáveis, podem sofrer qualquer hemólise.

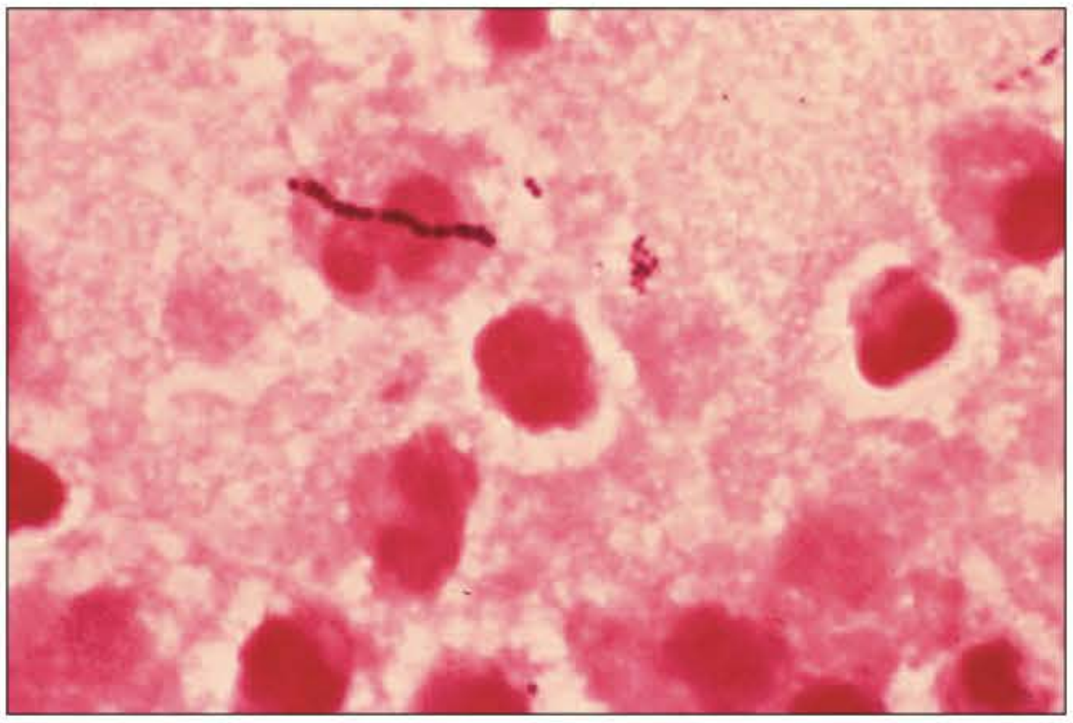


Figura 56.3 Coloração de Gram do *Streptococcus pyogenes* (estreptococo do grupo A) de um caso de celulite.

tante desse grupo é o *Streptococcus bovis*. Alguns *S. agalactiae* também podem ser γ-hemolíticos. A maioria dos estreptococos restantes α e γ-hemolíticos é denominada coletivamente "viridans", incluindo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus anginosus*. O grupo de microrganismos antes conhecidos como estreptococos nutricionalmente variantes (dependentes de piridoxal, B6 ou tiol, satélites) agora é designado no gênero *Abiotropha* ou *Granulicatella*.

Os membros do gênero *Enterococcus*, antes conhecidos como estreptococos do grupo D porque seus antígenos da parede celular reagem com antissoros do grupo D, são suficientemente diferentes dos outros membros do gênero *Streptococcus* para serem considerados um gênero separado. Tais microrganismos são cocos Gram-positivos que ocorrem de maneira isolada, em pares ou cadeias curtas. São anaeróbicos facultativos. A maioria dos enterococos é α ou γ-hemolítica em ágar-sangue, mas alguns podem exibir hemólise β. As espécies mais comuns são *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*; cepas móveis amarelas de enterococos, em geral não patogênicas, incluem *Enterococcus cassilflavus* e *Enterococcus gallinarum*. As duas últimas espécies em geral são intrinsecamente resistentes à vancomicina, sendo importante diferenciá-las do *E. faecium* e do *E. faecalis* resistentes à vancomicina.

Outros gêneros de cocos Gram-positivos catalase-negativos que podem ser isolados de amostras clínicas incluem *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Stomatococcus*, *Gemella*, *Aerococcus* e *Lactococcus* spp. Tais microrganismos são considerados de baixa virulência potencial e, em geral, patogênicos apenas em hospedeiros imunocomprometidos. Contudo, alguns desses isolados podem ser confundidos com os estreptococos viridans, em particular, e sua diferenciação é importante por causa de sua baixa virulência e seu potencial de resistência à vancomicina. Deve-se considerar uma diferenciação adicional se estiverem sendo considerados estreptococos viridans resistente à vancomicina.

Manifestações clínicas e patogênese

Uma das manifestações clínicas mais comuns das infecções causadas pelos estreptococos do grupo A é a faringite, que pode ser acompanhada por febre escarlatina, um exantema pontilhado sobrejacente a eritema difuso que em geral surge primeiro no pescoço ou na parte superior do tórax, torna-se generalizado e em seguida descama. As infecções cutâneas causadas por estreptococos do grupo A incluem celulite, erisipela e pioderma. A febre reumática aguda, que se caracteriza por cardite, poliartrite, eritema marginado, coreia e nódulos subcutâneos, pode ocorrer 1 a 5 semanas após a faringite causada por estreptococos do grupo A. A glomerulonefrite aguda pode se desenvolver 10 dias a 3 semanas após a faringite causada por estreptococos do grupo A ou o pioderma da mesma origem.

A partir do final da década de 1980, síndromes clínicas graves causadas por estreptococos do grupo A, como fasciite necrotizante, miosite, febre escarlatina maligna, bacteriemia e síndrome do choque tóxico, começaram a ser vistas cada vez com mais frequência. Elas têm sido associadas a altos índices de morbidade e mortalidade, de até 30% ou mais. A razão desse aumento não é entendida por completo, mas parece ter relação com alterações na prevalência dos microrganismos com "potencial de virulência" exacerbado (Kaplan, 2005).

O *S. pyogenes* produz inúmeros fatores de virulência. Um dos mais importantes é a proteína M antifagocítica da parede celular. Anticorpos contra a proteína M específica conferem imunidade vitalícia do tipo específica; no entanto, como existem animais de 60 tipos de proteína M, pode ocorrer infecção com um estreptococo do grupo A que tenha uma proteína M diferente. Outro componente importante da parede celular é o ácido lipoteicoico, que permite aderência bacteriana ao epitélio respiratório. O *S. pyogenes* também elabora cerca de 20 produtos extracelulares, tais como enzimas (estreptolisinas, hialuronidase, estreptocinase, desoxirribonucleases [DNases] e a dinucleotidase da adenina nicotinamida [NADase]) e toxinas eritrogênicas. A estreptolisina O, uma enzima antigênica lábil ao oxigênio, induz hemólise sobre a superfície em placas de ágar-sangue; e a estreptolisina S, uma enzima não antigênica estável ao oxigênio, causa hemólise na superfície. Nenhuma estreptolisina provou ter papel na patogênese de doença humana. A estreptocinase promove atividade fibrinolítica ao converter o plasminogênio em plasmina, e a hialuronidase pode acentuar a disseminação do microrganismo pelo tecido conjuntivo. O significado patogênico das DNases e da NADase é desconhecido. Toxinas pirogênicas (eritrogênicas; sorotipos A, B, C) são produzidas por isolados de *S. pyogenes* infectados com um bacteriófago temperado específico. Sua pirogenicidade é causada por uma ação direta sobre o hipotálamo. Também se descobriu que o estreptococo do grupo A tem superantígenos (SAGs) com alta capacidade mitogênica; eles foram associados a casos de infecções estreptocócicas mais graves, como a fasciite necrotizante ou a síndrome do choque tóxico (Kotb, 2002).

A patogênese da febre reumática aguda não está totalmente explicada. Certos tipos de proteína M do *S. pyogenes* podem ser reumatogênicos. A presença de complexos de imunoglobulina e do componente C3 do complemento com bainhas sarcolêmicas de miofibras cardíacas de indivíduos com cardite reumática sugere que a miocardite resulte da produção de anticorpos direcionados contra uma proteína M estreptocócica da parede celular que tem reação cruzada com o tecido miocárdico. Além disso, foi identificado um antígeno do *S. pyogenes* que apresenta reação cruzada com o coração ou tecido e compartilha epítopos imunológicos com a proteína M, mas é distinto dela (Barnett, 1990). O dano renal na glomerulonefrite aguda é causado por depósitos de complexos imunes circulantes estreptocócicos-antiestreptocócicos nos glomérulos e pela subsequente ativação do complemento. Reações mediadas por célula a uma membrana basal glomerular alterada ou a ativação da via alternada do complemento também podem estar envolvidas.

As infecções mais comuns causadas pelos estreptococos do grupo B são sepse neonatal, pneumonia e meningite. A colonização do material do trato genital está associada à colonização de lactentes e a risco de doença neonatal, com infecções de início precoce ocorrendo nos primeiros dias de vida após o parto e as de início tardio surgindo após uma semana de idade. Para reduzir a incidência de doença neonatal, os CDC publicaram orientações específicas que possibilitam a identificação e o tratamento precoces de mulheres colonizadas por

estreptococos do grupo B, bem como a identificação e o tratamento dos neonatos sob risco de desenvolver doença (Schuchat, 1996; Centers for Disease Control, 2004a). Devem ser colhidas amostras vaginais/retais de todas as mulheres grávidas com 35 a 37 semanas de gestação para processamento com vistas à detecção de estreptococos do grupo B. Os resultados desse exame devem estar disponíveis durante o parto, para que a profilaxia apropriada possa ser oferecida à mãe antes do parto, a fim de prevenir a infecção do recém-nascido. As infecções por estreptococos do grupo B em adultos incluem endometrite pós-parto, bacteriemia, infecções cutâneas e de tecidos moles, pneumonia, endocardite, meningite, artrite e osteomielite.

Os estreptococos dos grupos C e G são semelhantes ao *S. pyogenes* pelo fato de causarem uma ampla gama de infecções, incluindo bacteriemia, endocardite, meningite, artrite e infecções do trato respiratório e da pele. A infecção faríngea causada por esses estreptococos é semelhante à causada pelos do grupo A, exceto por não ocorrerem as sequelas não supurativas da febre reumática.

As infecções causadas pelo *S. pneumoniae* são pneumonia, meningite (especialmente em lactentes e pacientes idosos), bacteriemia espontânea (em pessoas sem o baço), otite, sinusite e peritonite espontânea. O *S. pneumoniae* faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior de 25 a 50% das crianças em idade pré-escolar, 36% daquelas em idade escolar e quase 20% dos adultos, denominados portadores (Hendley, 1975; Lopez, 1999). Sua disseminação é facilitada por infecções do trato respiratório superior e aglomerações. Pode desenvolver-se pneumonia quando as defesas imunes do hospedeiro estão comprometidas. A maioria dos casos é endógena, após aspiração de secreções orais com microbiota normal que inclui *S. pneumoniae*. Ocorre transmissão de uma pessoa para outra durante epidemias, por meio de aerossóis. O principal fator de virulência do *S. pneumoniae* é sua cápsula polissacarídica antifagocítica, e as cepas com uma cápsula mucoide espessa são especialmente virulentas. Existem vacinas destinadas a proteger contra a infecção por pneumococos de muitos dos tipos de polissacarídeo capsular predominantes. Uma nova vacina para lactentes e crianças previne a doença pneumocócica invasiva.

A endocardite bacteriana é a infecção mais comum causada pelos estreptococos viridans; outras incluem abscessos no cérebro ou no fígado, bacteriemia e cáries dentárias. A bacteriemia por *S. bovis* foi associada a malignidades do trato gastrintestinal. Os enterococos não são altamente patogênicos, mas constituem uma causa comum de infecções do trato urinário em pessoas hospitalizadas. Também podem causar endocardite, bacteriemia e infecções de feridas. Os enterococos resistentes à vancomicina têm um grande potencial de infecção, sobretudo em pacientes imunocomprometidos e naqueles que possuem dispositivos implantados (Shay, 1995; Orloff, 1999).

Diagnóstico laboratorial

Os estreptococos crescem bem em ágar-sangue ou chocolate. O ágar-sangue é preferido porque as propriedades hemolíticas do microrganismo podem ser avaliadas. Ao fazer culturas de *swabs* vaginais/retais de mulheres grávidas especificamente para estreptococos do grupo B, as amostras devem primeiro ser inoculadas em um caldo seletivo, como LIM ou Carrot, ou em ágar seletivo, ágar-granada, para enriquecimento destinado a esse microrganismo (Schuchat, 1996, Claeys, 2001; Gupta, 2004; Heelan, 2005). Os testes que podem ser feitos no laboratório de microbiologia clínica para a identificação presumível de espécies de estreptococos β-hemolíticos são mostrados na Figura 56.4. Mais de 99% dos isolados de estreptococos do grupo A são suscetíveis à bacitracina, mas uma porcentagem muito pequena de isolados de estreptococos do grupo B e 10 a 20% dos isolados de estreptococos dos grupos C e G também são suscetíveis. Portanto, os resultados do teste de suscetibilidade à bacitracina fornecem uma identificação presumível. Um isolado pode ser chamado de estreptococo do grupo A de forma presumível com base na hidrólise do teste com 1-pirrolidonil-β-naftilamida (PYRase) (Wellstood, 1987). Todos os isolados de estreptococos do grupo A e mais de 99% dos de enterococos são PYRase-positivos. A identificação de estreptococos do grupo A é confirmada por sorotipagem, aglutinação no látex ou uma sonda de ácido nucleico. Também se dispõe de uma sonda de ácido nucleico (Gen-Probe, San Diego, CA) para a detecção direta de estreptococos do grupo A em *swabs* da garganta (Chapin, 2002).

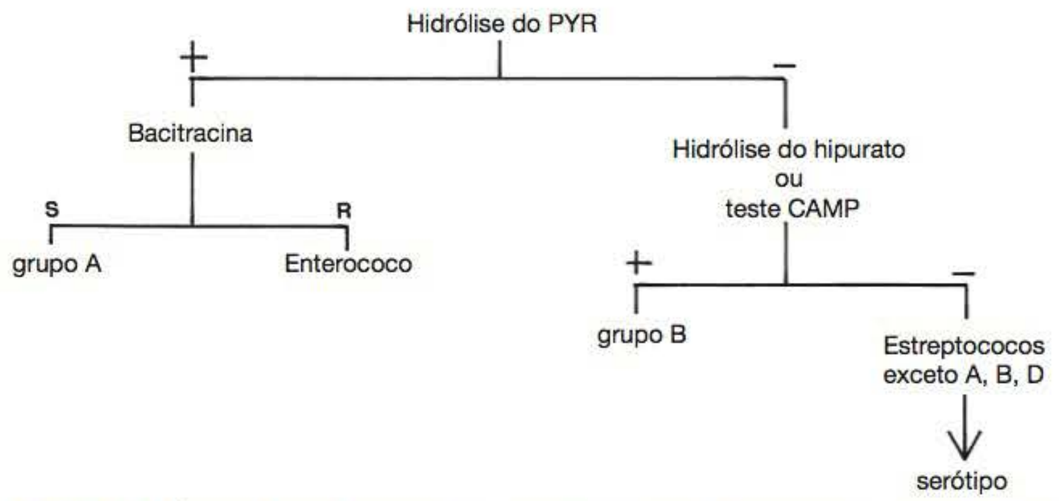


Figura 56.4 Árvore decisória de testes para denominar de forma presumível as espécies β-hemolíticas de *Streptococcus*. (+ = resultado positivo; – = resultado negativo; S = suscetível; R = resistente.) (Com permissão de Woods GL, Gutierez Y: Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993.)

Estreptococos do grupo A podem ser detectados diretamente em amostras de *swabs* de garganta com o uso de kits comerciais capazes de fornecer resultados rápidos. Esses testes são altamente específicos, porém, em razão de sua baixa sensibilidade, que varia de 31 a 95% em diferentes estudos (Wegner, 1992; Carroll, 1996), um resultado negativo ao teste direto deve ser seguido por cultura ou sondagem. Testes sorológicos para detectar anticorpos em amostras de soro das fases aguda e convalescente para estreptolisina O e DNase B são usados primariamente para diagnosticar febre reumática aguda e glomerulonefrite aguda após infecção com estreptococo do grupo A.

Um isolado β-hemolítico que hidrolisa hipurato ou tem uma reação positiva ao teste CAMP é denominado presumivelmente estreptococo do grupo B. Isolados de presumíveis estreptococos do grupo B de locais estéreis do corpo devem ser identificados por sorotipagem (usando-se aglutinação em látex ou testes de coaglutinação) ou por sonda de DNA quimioluminiscente. A sonda de DNA também pode ser usada para identificar estreptococos do grupo B que crescem em LIM ou outros caldos seletivos de cultura (Daly, 1991; Bourbeau, 1997). Isolados de estreptococos β-hemolíticos dos grupos C, D, F e G são identificados por sorotipagem com reagentes de aglutinação no látex. O ensaio IDI-Smart Cycler mencionado antes pode ser usado para detectar estreptococos do grupo B em amostras vaginais-retais ou em cultura, como caldo LIM (Picard, 2004).

Dispõe-se de ensaios por aglutinação no látex para a detecção direta de estreptococos do grupo B (bem como *S. pneumoniae*, alguns sorotipos de *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* e *H. influenzae* tipo b) no LCE, soro e urina. Como esses ensaios mostraram sensibilidade equivalente à da coloração de Gram, ou menor, podem dar resultados positivos falsos, e em geral não fornecem informação útil adicional além da proporcionada pela coloração de Gram do LCE, daí não têm utilidade clínica e, como os testes rápidos de antígeno bacteriano são muito mais caros e trabalhosos que a coloração de Gram, a maioria dos laboratórios não os oferece mais ou restringe bastante seu uso (Thomas, 1994).

Os testes usados para identificar presumivelmente estreptococos α e γ-hemolíticos e enterococos são mostrados na Figura 56.5. Colônias α-hemolíticas mucoides ou achatadas com uma parte central deprimida são sugestivas de *S. pneumoniae*, e sua suscetibilidade ao cloridrato de etil-hidroxicupreína, mais comumente conhecida como optoquina (disco P), e a solubilidade biliar deve ser testada. O *S. pneumoniae* é suscetível a ambos; outros estreptococos α-hemolíticos são resistentes à optoquina e apresentam resposta variável à bile. Um ensaio com antígeno urinário para a detecção de *S. pneumoniae* também pode ser realizado (Sopena, 2005).

Colônias α-hemolíticas que não são de *S. pneumoniae* e colônias γ-hemolíticas são testadas para hidrólise da PYRase; enterococos são PYRase-positivos, e estreptococos viridans são negativos. Além disso, todos os enterococos crescem na presença de NaCl a 6,5%, mas os estreptococos viridans não. Os enterococos hidrolisam esculina na presença de bile (causando crescimento visível e escurecimento do ágar), mas até 10% dos estreptococos viridans também são positivos para a esculina. Outros ensaios bioquímicos são necessários para identificar enterococos até o nível de espécie (Facklam, 1989a). A maioria dos isolados clínicos é *E. faecalis*.

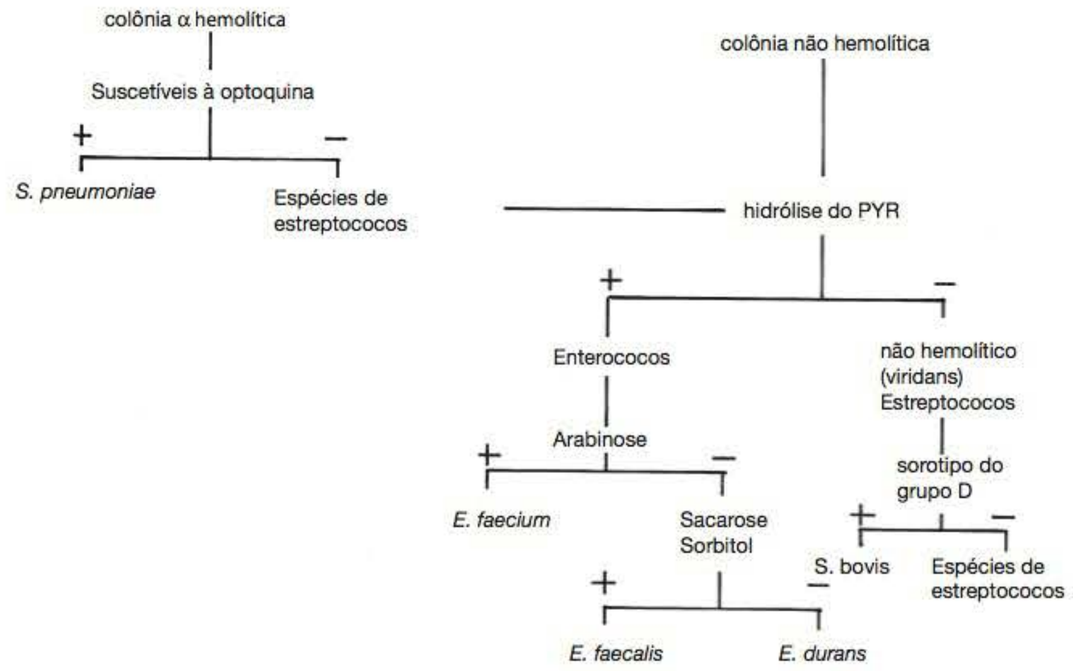


Figura 56.5 Árvore decisória de testes para denominar de forma presumível as espécies α-hemolíticas de *Enterococcus*. (+ = resultado positivo; – = resultado negativo; S = suscetível; R = resistente.) (Com permissão de Woods GL, Gutierez Y: Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993.)

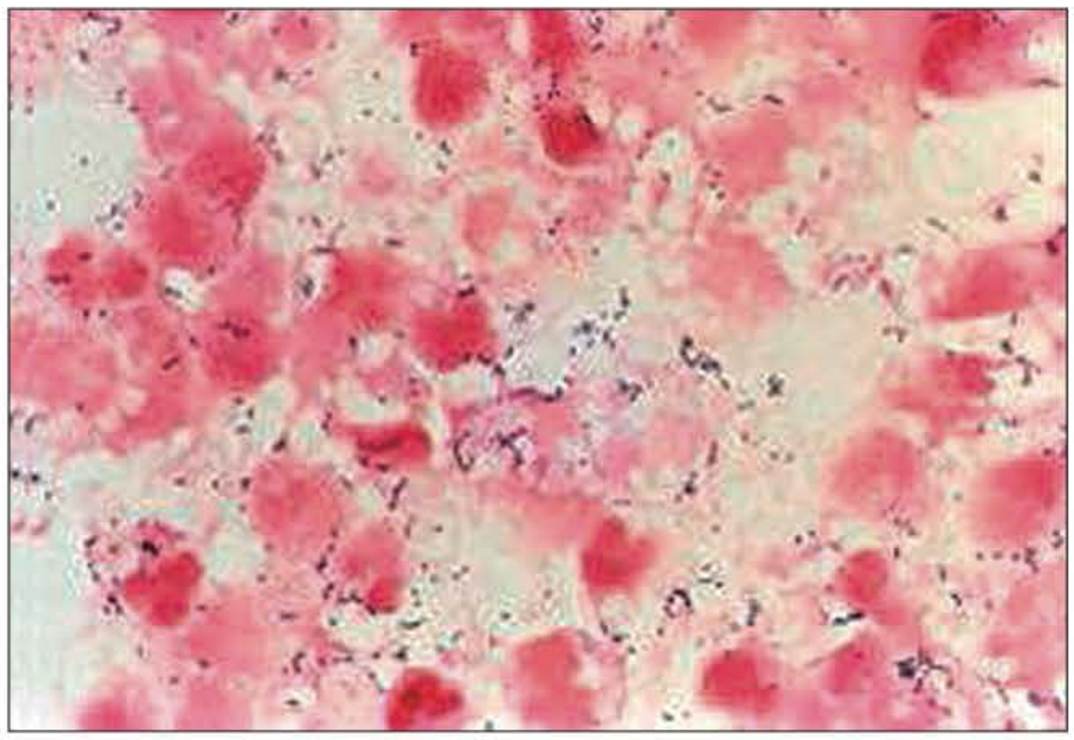


Figura 56.6 Coloração de Gram de um *Streptococcus viridans*, especificamente um membro do grupo milleri, em amostra de um abscesso cerebral.

Estreptococos α-hemolíticos resistentes à optoquina e PYRase-negativos e estreptococos γ-hemolíticos PYRase-negativos e que não crescem em NaCl a 6,5% são agrupados como não hemolíticos (viridans). A identificação das espécies individuais de estreptococos viridans requer testes bioquímicos convencionais (Coykendall, 1989). Sistemas de kits para identificar esses microrganismos também estão disponíveis em ampla escala no comércio. Em geral não é necessária a identificação completa das espécies de estreptococos viridans. Membros dos estreptococos viridans pertencentes aos estreptococos milleri, por serem geralmente reconhecidos pelo seu odor característico de "caramelo", podem ser relatados, se presentes, para alertar os clínicos acerca desse grupo de viridans, por sua propensão à formação de abscesso e sua suscetibilidade uniforme à penicilina. A Figura 56.6 é um exemplo de coloração de Gram de um membro do grupo milleri de estreptococos viridans de um abscesso cerebral.

Não existem estreptococos resistentes à vancomicina, porém às vezes um isolado similar aos viridans é relatado como resistente à vancomicina. Em geral, é um enterococo, mas poderia ser um membro de alguns gêneros mais incomuns, como *Leuconostoc* ou *Pediococcus*. Se a resistência à vancomicina tiver sido demonstrada, seria importante diferenciar o *Leuconostoc* e o *Pediococcus* intrinsecamente resistentes à vancomicina dos enterococos que tenham adquirido resistência à vancomicina. As características que poderiam ser usadas para isso estão relacionadas na Tabela 56.4 (revisto por Facklam, 1989b). A diferenciação de *Aerococcus* sp. também está incluída nesse quadro, por causa de sua similaridade com *Enterococcus* sp.

Os membros do gênero Abiotropha não crescem na ausência de piridoxal. Em geral, primeiro são reconhecidos como colônias satélites que crescem em torno de uma colônia de *S. aureus*. As características diferenciais de Abiotrophia defectiva e Abiotrophia adiacens são revistas em outro texto (Ruoff, 1990).

Tabela 56.4 Características diferenciais entre enterococos, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Aerococcus*

	Enterococos	***Aerococcus***	***Leuconostoc***	***Pediococcus***
Coloração de Gram	Cadeias pares e curtas	Tétrades	Cocos, cocobacilos, e bastonetes; pares e cadeias	Tétrades e pares; células esféricas
Hemólise	β ou α ou γ	α ou γ	α ou γ	α ou γ
Esculina na bile	+	V	V	+
Crescimento em NaCl a 6,5%	+	+	V	V
PYR	+	*	–	–
LAP	+	*	–	+
Suscetibilidade à vancomicina	S/R	S	R	R

LAP = leucina aminopeptidase; PYR = L-pirrolidonil-β-naftilamida; V = reações variáveis.

* *Aerococcus urinae* é positiva para PYR e LAP; *Aerococcus viridans* é PYR-positiva e LAP-negativa.

Suscetibilidade antimicrobiana

Os antibiogramas dos estreptococos dos grupos A, B, C e G são previsíveis (todos são suscetíveis à penicilina); portanto, testes rotineiros de suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos são desnecessários, a menos que não se possa usar penicilina, como no caso de alergia a ela. Em tal situação, podem estar indicados testes para resistência a macrolídeos, clindamicina e tetraciclinas. Pode ocorrer resistência induzível à clindamicina com estreptococos (i. e., os do grupo B), e uma zona D de teste, conforme descrita antes para o *S. aureus*, pode estar indicada se o isolado estreptocócico encontrado for resistente à eritromicina. Ainda não foram publicadas orientações específicas para os testes com estreptococos D. Como o *S. pneumoniae* com resistência intermediária ou alta à penicilina (MIC de 0,12 a 1 μg/mL ou > 2 μg/mL, respectivamente) é encontrado em todo o mundo, os isolados devem ser triados quanto à suscetibilidade à penicilina por difusão em disco com 1 μg de oxacilina. Os isolados que não forem suscetíveis por esse método precisam ser avaliados também por teste de macro ou microdiluição, usando-se caldo Mueller-Hinton suplementado com sangue equino lisado ou o teste E para determinar a MIC da penicilina. Também ocorre resistência às cefalosporinas de terceira geração; portanto, os isolados também devem ser testados quanto à suscetibilidade a esses agentes antimicrobianos.

Os testes de suscetibilidade devem ser realizados com isolados de estreptococos não hemolíticos (viridans) de locais estéreis do corpo, porque pode ocorrer resistência à penicilina. Espécies de enterococos também devem ser testadas, sobretudo para identificar resistência de alto nível à penicilina ou ampicilina e à estreptomicina e gentamicina, bem como resistência à vancomicina (Tenover, 1993). Os enterococos são resistentes à vancomicina (MIC > 32 μg/mL), em razão da presença de genes resistentes, conhecidos como genes van. Embora muitos desses genes tenham sido descritos, os mais comuns são *vanA*, *vanB* e *vanC*. O *vanA* e o *vanB*, que conferem alto nível de resistência e são encontrados predominantemente no E. faecium e no E. faecalis (embora a maioria no E. faecium), são genes adquiridos derivados de plasmídeos e podem causar problemas de controle de infecção envolvendo a transmissão dessa resistência. A diferenciação entre essa resistência à vancomicina e a intrínseca e de nível inferior (genes *vanC*) nas espécies móveis amarelas de enterococos deve ser feita em laboratórios e relatada como tal à equipe de controle de infecção.

Espécies de Gemella e Aerococcus

Outros cocos não estreptocócicos Gram-positivos catalase-negativos de importância cada vez maior são os pertencentes aos gêneros *Gemella*

e *Aerococcus*. *Gemella* sp. (*Gemella haemolysans* e *Gemella morbillorum*) lembram os estreptococos viridans, embora geralmente produzam colônias menores. *G. haemolysans* foi associado a endocardite e meningite. A coloração de Gram em geral demonstra diplococos com os lados adjacentes achatados, o que pode ser confundido com *Neisseria* sp., porque as células podem perder a cor com facilidade. *G. haemolysans* é aeróbico, e *G. morbillorum* é anaeróbico. O último costuma aparecer como cocos em pares ou cadeias curtas. Ambos são PYR-positivos e negativos ao NaCl a 6% e à hidrólise pela esculina (o que os diferencia dos enterococos). O *G. morbillorum* também é positivo para a leucina-aminopeptidase (LAP). Ambos em geral são suscetíveis à penicilina. Como outros cocos Gram-positivos, se houver dúvida quanto à morfologia do microrganismo, isto é, se é um bastonete curto ou um coco, a coloração de Gram a partir de cultura em caldo costuma resolver o problema.

Duas espécies principais de Aerococcus podem ser clinicamente relevantes e/ou isoladas de amostras clínicas: *Aerococcus urinae* e *Aerococcus viridans*. Ambas lembram os estreptococos viridans e os enterococos em placas de ágar, mas à coloração de Gram em geral aparecem em tétrades. Recentemente, o *A. urinae* foi reconhecido como patógeno no trato urinário; além disso, foi isolado do sangue em casos de endocardite. É PYR-negativo e LAP-positivo, em contraste com o *A. viridans*, que é PYR-positivo e LAP-negativo (Tab. 56.4). Ambos crescem na presença de NaCl a 6,5%. Não são anaeróbios, e o *A. viridans* em geral não cresce em condições anaeróbicas. O *A. urinae* em geral é suscetível à penicilina e à nitrofurantoína, mas pode ser resistente às sulfonamidas. Houve variabilidade em sua resposta ao trimetoprim (Ruoff, 2003).

Bastonetes Gram-positivos

Corynebacterium e *Arcanobacterium*

Características

As corinebactérias (ou "difteroides", como às vezes são conhecidas) aparecem no esfregaço corado por Gram como bastonetes Gram-positivos ligeiramente curvos, com lados não paralelos e às vezes com extremidades mais largas, o que lhes dá um aspecto de baqueta de tambor (Fig. 56.7). São microrganismos catalase-positivos. Há mais de 46 espécies do gênero *Corynebacterium*, a maioria raramente patogênica para humanos; exceções notáveis são o *Corynebacterium diphteriae* e as espécies ou variedades estreitamente relacionadas *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. As espécies do gênero *Arcanobacterium* de relevância clínica incluem *Arcanobacterium haemolyticum*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Arcanobacterium bernardiae*. As espécies desse gênero também aparecem como bastonetes irregulares à coloração de Gram, mas podem ser diferenciadas com facilidade das corinebactérias por sua reação negativa à catalase.

Manifestações clínicas e patogênese

No local inicial da infecção em células epiteliais das tonsilas ou da orofaringe, o *C. diphtheriae* elabora uma exotoxina que causa necrose celular local e inflamação subsequente. A exotoxina produzida por cepas de *C. diphtheriae* infectadas com um bacteriófago específico é absorvida na circulação. A distribuição da exotoxina pela corrente sanguínea pode ocasionar alterações degenerativas no coração, no sistema nervoso e nos rins. A molécula da toxina consiste em dois fragmentos: o A, que contém o local enzimaticamente ativo, e o B, que compreende o local de ligação do receptor. Uma vez na célula, a síntese de proteína é interrompida. A bactéria e a toxina produzem um exsudato seroso e infiltrado celular da mucosa na faringe. As lesões exsudativas coalescem, formando uma pseudomembrana negro-acinzentada que é característica da difteria. Embora produção de toxina e patogenicidade em geral sejam consideradas sinônimos, as pseudomembranas podem formar-se em pessoas infectadas com cepas não toxigênicas. A extensão da pseudomembrana superiormente na nasofaringe ou inferiormente na laringe pode ser tão acentuada a ponto de causar obstrução respiratória. Embora ocorram infecções de outras partes do corpo pelo *C. diphtheriae*, as mais frequentes observadas hoje nos EUA são as da pele. A transmissão do *C. diphtheriae* se dá por núcleos nas gotículas do trato respiratório ou por contato a partir de focos da infecção cutânea.

Como fazem parte da flora normal da pele e de mucosas, é difícil estabelecer o papel etiológico das outras corinebactérias. Seu significado clínico em geral aumenta se o microrganismo for observado em esfregaços corados pelo Gram associado a leucócitos e isolado de um local estéril e de múltiplas amostras. Observou-se que o *Corynebacterium jeikeium* apresenta associação nítida a infecções de próteses implantadas (p. ex., em válvulas cardíacas, no LCE e em articulações), causa endocardite bacteriana subaguda e está envolvido em uma variedade de infecções oportunistas. O *Corynebacterium ureolyticum* foi associado a infecção do trato urinário, bem como a bacteriemia, endocardite e infecções de feridas (Nebreda-Mayoral, 1994). Quando identificados, o *Corynebacterium striatum* e o *Corynebacterium amycolatum* são os corineformes mais comuns da microbiota cutânea, podendo tornar-se patogênicos. É digno de nota que em geral são resistentes aos antibióticos β-lactâmicos, característica com frequência atribuída apenas ao *C. jeikeium* (Crabtree, 2003).

O *A. haemolyticum* foi associado a faringite e infecções de feridas e de tecidos moles (Gaston, 1996). O *A. pyogenes* e o *A. bernardiae* são associados à formação de abscesso.

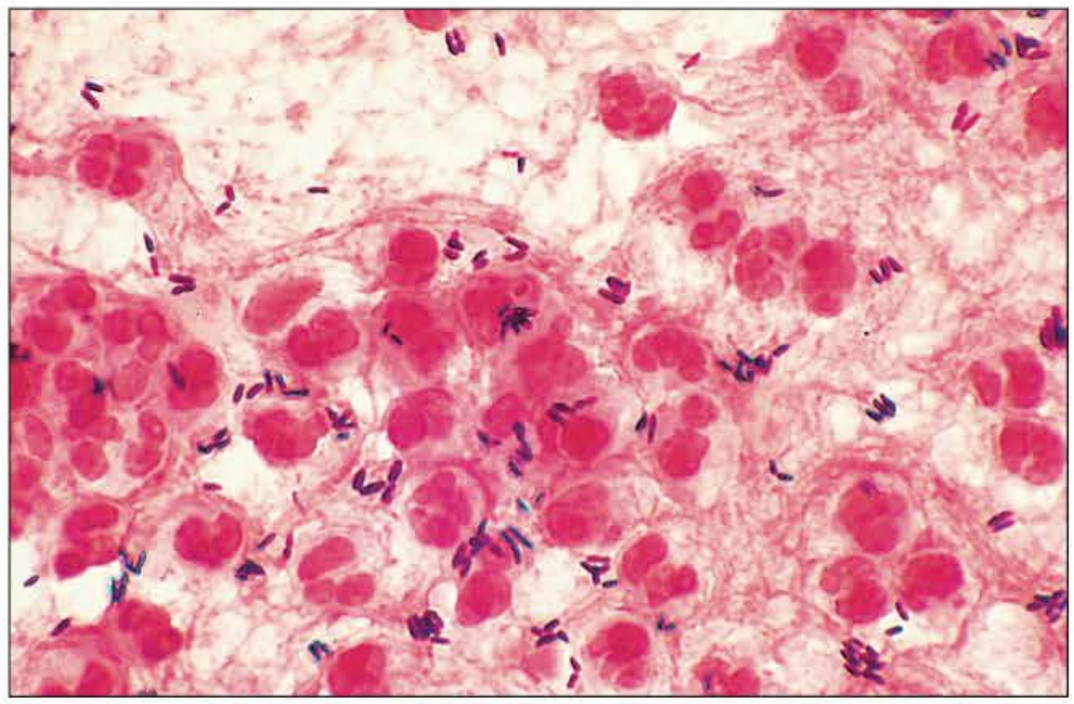


Figura 56.7 Escarro corado pelo Gram mostra muitos neutrófilos, restos amorfos e bacilos corineformes Gram-positivos (imersão em óleo).

Diagnóstico laboratorial

Graças à relativa raridade da difteria nos EUA hoje, o diagnóstico pode passar despercebido ao exame clínico, e o laboratório pode ter dificuldade em reconhecer o microrganismo em culturas. Sempre se deve fornecer um diagnóstico presuntivo para o laboratório, para que a amostra seja manipulada da maneira adequada. As amostras devem ser obtidas com *swab* com extremidade de algodão ou poliéster, de regiões inflamadas da nasofaringe e, se possível, sob a pseudomembrana. Caso se suspeite que lesões cutâneas serão positivas para *C. diphteriae*, a amostra mais apropriada deve ser um aspirado da lesão. As corinebactérias crescem no ágar de rotina que contém sangue; contudo, são preferidos ágar-sangue com cistina-telurita (CT) ou o meio de Tinsdale. No meio CT, as colônias de *C. diphteriae* são cinzentas ou negras após 48 horas de incubação, podendo ser grandes ou pequenas, achatadas ou convexas. Outras espécies que não o *C. diphteriae* podem produzir colônias negras nos meios CT ou de Tinsdale, embora em geral sejam menores. Se o laboratório não tiver esses dois meios ao solicitar a identificação de *C. diphteriae*, é possível usar ágar com colistina e ácido nalaidíxico (CNA), embora assim seja mais difícil reconhecer possíveis cepas dessa bactéria.

A classificação das corinebactérias ou difteroides orais e da pele é difícil e confusa. As características diferenciais de algumas espécies são mostradas na Tabela 56.5. Dispõe-se de sistemas comerciais para identificar muitos dos membros desse grupo de microrganismos (Gavin, 1992; Hudspeth, 1998). Quando se suspeita que isolados sejam *C. diphteriae*, é preciso testá-los quanto à produção de exotoxina. A eleboração de exotoxina pode ser detectada in vitro com o teste de imunodifusão Elek, mas em geral isso não faz parte da rotina de um laboratório clínico. Nos EUA, os isolados devem então ser enviados para um laboratório estatal ou de referência, onde isso possa ser realizado. Os testes baseados na PCR descritos são uma alternativa a que se pode recorrer para detectar o gene da toxina (Efstratiou, 2000). O

Tabela 56.5 Características diferenciais de algumas espécies do gênero *Corynebacterium* e microrganismos relacionados

Teste	*C. diphtheriae*	*C. ulcerans*	*C. pseudotuberculosis*	*C. jeikeium*	*Arcanobacterium haemolyticum*	*Arcanobacterium pyogenes*
Catalase	+	+	+	+	–	–
Hemólise	v	+	+	–	+	+
Gelatinase	–	+	–	–	–	+
Urease	–	+	+	–	–	–
Redução de nitrato	v	–	v	–	–	–
Fermentação da sacarose	–	–	v	–	v	v

+ = positivo; – = negativo; v = variável.

C. jeikeium em geral produz um brilho metálico característico na superfície das placas de ágar-sangue. O *C. striatum* e o *C. amycolatum* fazem parte da microbiota cutânea comum e podem ser responsáveis por infecções; é discutível a necessidade de identificá-los de forma específica, além de ser difícil fazê-lo. Essas últimas cepas costumam ser resistentes a muitos antibióticos, sobretudo o *C. jeikeium*.

As espécies do gênero *Arcanobacterium* são β-hemolíticas em ágar-sangue de carneiro. As colônias nesse ágar são pequenas após 48 horas de incubação, e a hemólise pode passar despercebida. O crescimento e a hemólise são melhores em um ambiente com CO_2. Tais espécies são catalase-negativas. As reações bioquímicas usadas para determinar as espécies de corinebactérias também são úteis para as de Arcanobacterium (Funke, 1997). O *A. haemolyticum* produz fosfolipase D, que é responsável pela reação CAMP reversa com *S. aureus*. Aquele microrganismo inibe a hemólise em torno do risco do *S. aureus*, produzindo um triângulo invertido sem hemólise.

Suscetibilidade antimicrobiana

Embora a antitoxina continue a ser o único método específico para tratamento da difteria, administram-se antibióticos aos pacientes com a doença e aos portadores assintomáticos de cepas toxigênica. Em geral, o *C. diphteriae* é inibido pelas penicilinas e pelos macrolídeos. As suscetibilidades antimicrobianas de outras espécies de corinebactérias ou difteroides são um pouco menos previsíveis. O *C. jeikeium* em geral é resistente às penicilinas e cefalosporinas, variavelmente suscetível à maioria dos outros antibióticos e quase uniformemente suscetível à vancomicina. No entanto, outras espécies de corinebactérias podem ser resistentes de maneira similar aos antibióticos β-lactâmicos. A terapia de infecções causadas por esses microrganismos em geral é complicada pelo comprometimento das defesas do hospedeiro e por materiais de próteses implantadas. As arcanobactérias são sensíveis à penicilina e a outros β-lactâmicos, à rifampicina, à tetraciclina e aos macrolídeos. Pode haver atividade reduzida pelas fluoroquinolonas e pelos aminoglicosídeos (Funke, 2003).

Prevenção

Os métodos de prevenção contra a difteria são quase exclusivamente os programas de imunização ativa e passiva com antibióticos suplementares para eliminar o estado de portador de cepas toxigênicas durante epidemias.

Listeria

Características

As espécies do gênero *listeria* são bastonetes Gram-positivos não ramificados que não formam esporos. Observa-se crescimento ideal de *Listeria monocytogenes* (Fig. 56.8), a única espécie do gênero que é patogênica para humanos, entre 30 e 37°C, porém pode ocorrer em temperaturas tão baixas quanto 4°C. As colônias são pequenas após 24 horas e exibem uma zona estreita de hemólise β em ágar-sangue. Ocorre uma motilidade oscilante característica de suspensões salinas das colônias à temperatura ambiente, mas em rarso casos a 35°C. Essa motilidade dependente da temperatura também é notada em meios semissólidos, nos quais o crescimento tem formato de guarda-chuva no alto do meio.

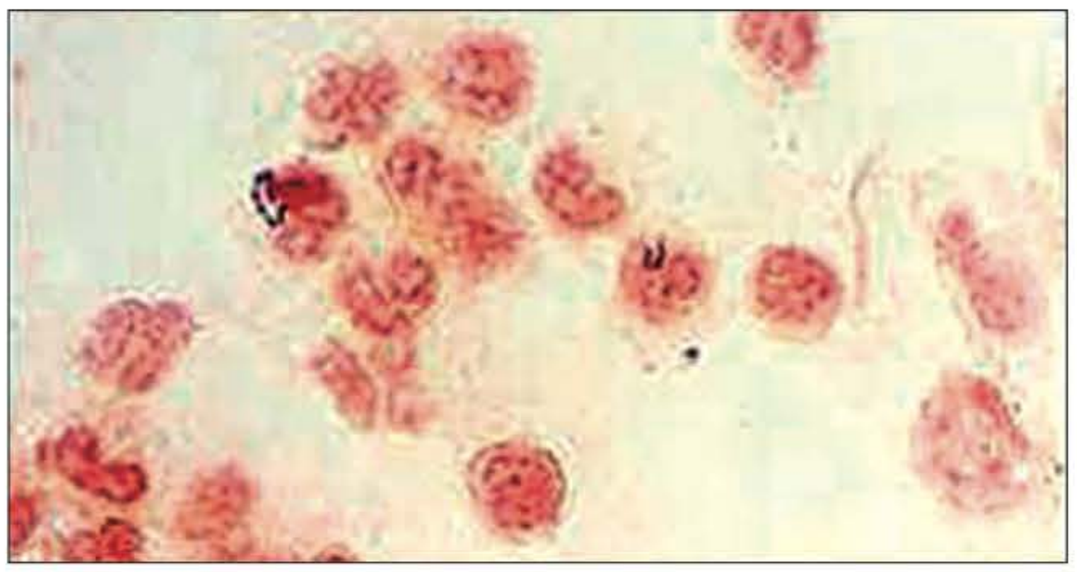


Figura 56.8 Coloração de Gram de uma amostra de líquido cerebrospinal em que cresceu *Listeria monocytogenes*. Os bacilos curtos são vistos dentro de leucócitos.

Manifestações clínicas e patogênese

A *L. monocytogenes* é encontrada no solo, na poeira, na água, nos esgotos e no leite cru, não pasteurizado. A transmissão do microrganismo por alimentos como salada de repolho cru, leite pasteurizado e queijos moles resultou nas epidemias mais graves na América do Norte e na Europa (Fleming, 1985; Linnan, 1988, MacDonald, 2005). De acordo com dados de fontes microbiológicas de alimentos, a *L. monocytogenes* foi detectada em 2 a 3% dos laticínios, 20% dos queijos moles e carnes processadas, 30% de certos vegetais (couve/repolho, rabanete) e até 50% das carnes vermelhas cruas e dos frangos crus (Broome, 1993). Um estado de portador transitório é encontrado em 2-20% dos animais e humanos.

É provável que defeitos no sistema imune estejam envolvidos na produção de doença, porque muitas pessoas com listeriose estão imunossuprimidas. Macrófagos e linfócitos T são as defesas do hospedeiro mais importantes contra a *L. monocytogenes*. A virulência desse microrganismo está relacionada com a produção de listeriolisina O, uma proteína de 52 kDa com propriedades hemolíticas e citotóxicas que é secretada em condições de baixo pH e baixa concentração de ferro, como existiria em um fagolisossomo. Postula-se que a proteína se liga de forma irreversível ao colesterol na membrana lisossômica, causando sua ruptura e permitindo a multiplicação bacteriana irrestrita dentro do citoplasma do fagócito.

As manifestações clínicas da listeriose diferem em mulheres grávidas, neonatos e indivíduos imunocomprometidos, que são os grupos de mais alto risco. A listeriose durante a gravidez, mais comum no terceiro trimestre, manifesta-se como um resfriado. Ocorre bacteriemia concomitantemente, tempo durante o qual o conteúdo uterino é infectado. A progressão para amnionite pode induzir o parto prematuro ou aborto séptico em 3 a 7 dias. A infecção da mãe é autolimitada porque a fonte de infecção é removida com o parto do feto infectado e o conteúdo uterino. A listeriose neonatal pode ter início precoce ou tardio. A doença de início precoce, que se manifesta ao nascimento ou poucos dias depois, resulta da infecção in utero. Os lactentes apresentam temperatura instável, comprometimento hemodinâmico e dificuldade respiratória; granulomas amplamente disseminados, em particular

envolvendo a placenta, a parte posterior da faringe e a pele, são característicos da doença, mas nem sempre estão presentes. Presume-se que a doença de início tardio, que acomete lactentes a termo de mães sem complicações na gravidez, seja adquirida após o parto, mas na maioria dos casos a fonte é desconhecida. As manifestações clínicas de meningite tornam-se aparentes vários dias a semanas após o nascimento.

A listeriose neonatal em geral ocorre em indivíduos imunossuprimidos, mas em cerca de um terço dos casos nenhum fator de risco é identificado. Aproximadamente metade dessas infecções manifesta-se como meningite; outras formas de listeriose do sistema nervoso central (SNC) incluem cerebrite e abscessos no tronco cerebral e na medula espinhal. Bacteriemia primária ou infecções focais fora do SNC são incomuns. A doença causada por *L. monocytogenes* associada a alimentos tornou-se mais comum nos últimos anos, e pacientes imunocomprometidos, como aqueles com leucemias, submetidos a transplante de medula óssea e sob terapias imunossupressoras, são alertados a não consumirem laticínios não cozidos para evitar infecção com esse microrganismo.

Diagnóstico laboratorial

As colônias são pequenas, cinza-azuladas e circundadas por uma zona estreita de hemólise β em ágar-sangue. Uma reação positiva à catalase diferencia a *L. monocytogenes* de estreptococos do grupo B com aspecto semelhante. Os microrganismos são móveis à temperatura ambiente e produzem ácido a partir de glicose, trealose e salicina. Outras características bioquímicas da *L. monocytogenes* e as diferenças entre os gêneros *Listeria* e *Erysipelothrix* estão relacionadas na Tabela 56.6.

Suscetibilidade antimicrobiana

Em geral, a *L. monocytogenes* é sensível à penicilina, à ampicilina, à eritromicina, ao cloranfenicol, à tetraciclina e à gentamicina. As cefalosporinas não devem ser testadas contra *Listeria* sp., pois são ineficazes in vivo, qualquer que seja o resultado in vitro. Detectou-se resistência ao cloranfenicol, aos macrolídeos e às tetraciclinas em vários isolados clínicos (Bille, 2003). A ampicilina, sozinha ou combinada com um aminoglicosídeo, foi utilizada com sucesso no tratamento de infecções causadas por *L. monocytogenes*. É possível usar trimetoprim-sulfametoxazol como terapia alternativa em pacientes alérgicos à penicilina.

Erysipelothrix

Características

O *Erysipelothrix rhusiopathiae* é um bacilo anaeróbico facultativo Gram-positivo, catalase-negativo, não formador de esporos e imóvel, com ampla distribuição mundial. As células das colônias de fase lisa são bastonetes pequenos, retos ou ligeiramente curvos, enquanto as de colônias rugosas são longas e filamentosas.

Manifestações clínicas e patogênese

O *E. rhusiopathiae* em geral é transmitido para humanos a partir de animais, por meio de ferimentos cutâneos com objetos contaminados ou em contato com sangue, carne, vísceras ou fezes de animais infectados. O microrganismo está amplamente disseminado na natureza em animais silvestres e domésticos, aves, peixes e matéria orgânica em decomposição, causando infecção em suínos, ovinos, coelhos, bovinos, aves em geral e de granja. Açougueiros, trabalhadores de abatedouros, pescadores, manipuladores de peixe, processadores de frangos e veterinários correm risco de adquirir a infecção. A forma de erisipeloide mais comum é uma infecção cutânea local que se manifesta por dor, edema (inchaço) e uma erupção cutânea que se caracteriza por uma zona violácea lentamente progressiva e ligeiramente elevada em torno do local da inoculação. O edema e o eritema migram de modo perférico, e a lesão involui sem descamar. A doença sistêmica é rara, mas há inúmeros relatos de casos de septicemia e endocardite. Também há raros casos relatados de artrite e abscesso cerebral.

Diagnóstico laboratorial

Biópsia ou aspirados de tecido das lesões erisipeloides são as melhores amostras para cultura. Os microrganismos estão localizados profundamente na camada subcutânea da margem da lesão; portanto, *swabs* da superfície da pele não são úteis. O microrganismo cresce em ágar-sangue ou ágar-sangue com chocolate, mas pode levar 7 dias para isso. Há meios de hemocultura convencionais para seu isolamento a partir de sangue.

O *E. rhusiopathiae* é negativo para oxidase e catalase. Caracteristicamente, produz H_2S no meio tríplice de ágar, açúcar e ferro (TSIA). Não é móvel, não reduz nitratos em nitritos e fermenta glicose e lactose. Um traço muito característico desse microrganismo é o padrão de crescimento em forma de "limpador de cachimbo" em culturas de gelatina incubadas a 22°C. Pode ser prontamente distinguido de *Listeria* spp. (ver Tab. 56.6).

Suscetibilidade antimicrobiana

Esse gênero é suscetível às penicilinas, às cefalosporinas, ao imipeném, à eritromicina, à clindamicina, ao cloranfenicol, às tetraciclinas e às fluoroquinolonas, porém é resistente às sulfonamidas, aos aminoglicosídeos e à vancomicina.

Bacillus

Características

Os membros desse gênero são aeróbicos estritos ou anaeróbicos facultativos, em forma de bastões, formadores de esporos, Gram-positivos e catalase-positivos. A Figura 56.9 é uma coloração de Gram de *Bacillus* sp., vistos no líquido pleural. Com a notável exceção do *Bacillus anthracis*, em geral são móveis por meio de flagelos laterais ou peritríquios. Algumas cepas são negativas à coloração de Gram e, por suas reações variáveis à oxidase, são confundidas com bacilos Gram-negativos. A característica diagnóstica mais confiável do gênero é a formação de esporos, que ocorre otimamente e em uma variedade de meios em condições aeróbicas a 25-30°C. Nos esfregaços corados pelo Gram, os endosporos são detectáveis pela presença de defeitos que não se coram ou orifícios dentro da célula. Os próprios esporos podem ser corados por qualquer um dos vários métodos.

Manifestações clínicas e patogênese

Das numerosas espécies do gênero, o *B. anthracis* é a única uniforme e altamente patogênica. Quando se suspeita que um material abriga essa espécie, é preciso muito cuidado ao manipulá-lo. O trabalho

Tabela 56.6 Características diferenciais de *Listeria monocytogenes* e *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Teste	*L. monocytogenes*	*E. rhusiopathiae*
β-hemólise	+	−
Crescimento a 4°C	+	−
Catalase	+	−
Motilidade	+	−
Hidrólise da esculina	+	−
Utilização de gluconato	+	−
Voges-Proskauer	+	−
H_2S em triplo, açúcar-ferro-ágar	−	+

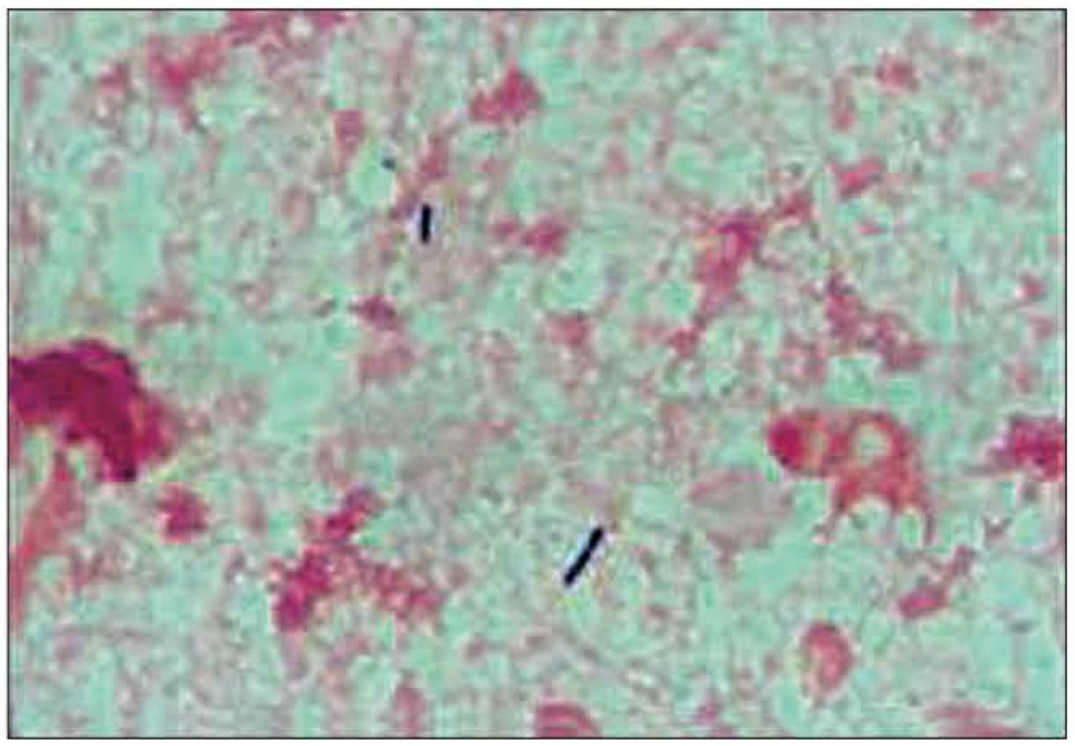


Figura 56.9 Coloração de Gram do *Bacillus cereus* no líquido pleural.

deve ser realizado em cabines de segurança biológica por pessoas que estejam usando luvas, avental, máscara e imunizadas; as superfícies de trabalho precisam ser desinfetadas com hipoclorito a 5% ou fenol a 5%, e todos os suprimentos, materiais e equipamentos têm de ser descontaminados. Como os esporos de *B. anthracis* foram usados como uma forma de bioterrorismo, as culturas com quadro de *B. anthracis* devem ser manipuladas apenas por laboratórios de referência ou de saúde pública.

São reconhecidas três formas de antraz: cutânea, inalatória e intestinal. Na sua forma cutânea, o antraz produz uma lesão macular pequena e vermelha que progride para uma vesícula e finalmente necrose com formação de escara negra característica. Podem ocorrer linfadenopatia e septicemia. A mortalidade aproximada nos casos dessa forma da doença que não são tratados é de 20%. A inalação dos esporos de antraz pode ocasionar broncopneumonia aguda, mediastinite e septicemia ("doença do tosquiador"). A mortalidade em casos reconhecidos dessa forma é de quase 100%. O antraz intestinal segue-se à ingestão de alimento contaminado e manifesta-se por náuseas, vômitos e diarreia. Em alguns casos, há sangramento intestinal, seguido por prostração, choque e morte. Pode ocorrer septicemia nas três formas de antraz, e ela pode levar a meningite fatal purulenta.

Um dos principais fatores nas capacidades patogênicas do microrganismo é sua cápsula polipeptídica de glutamil, que inibe a fagocitose; anticorpos anticapsulares não protegem contra a doença. Uma toxina complexa com três componentes (fator de edema, antígeno protetor e fator letal) é responsável pelos sinais e sintomas do antraz.

Humanos infectam-se com antraz por contato com, inalação ou ingestão de animais infectados, suas carcaças ou seus subprodutos. Bovinos, ovinos, equinos e caprinos são os animais mais infectados e fornecem uma fonte imediata de microrganismos vegetativos que esporulam e perpetuam a contaminação ambiental.

Embora geralmente saprófitas, outras espécies de *Bacillus* podem causar doença. O *Bacillus cereus* foi associado a infecção na orelha, pneumonia, infecção de ferida ocular pós-traumática, septicemia e endocardite. Pacientes com pneumonia e septicemia em geral são imunossuprimidos. A bacteriemia costuma estar associada ao uso de drogas intravenosas ou com dispositivos intravasculares contaminados.

Duas formas de gastrenterite estão associadas a espécies de *Bacillus*. A intoxicação alimentar causada por *Bacillus* pode ocorrer 1 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado com *B. cereus* que tenha produzido uma toxina termoestável pré-formada. As principais manifestações da intoxicação alimentar por *Bacillus* são náuseas, vômitos, cãibras e às vezes diarreia. Tipicamente, essa forma de gastroenterite por *Bacillus* resulta da preparação de grande quantidade de alimentos que não são reaquecidos antes de serem servidos. O *B. cereus* do tipo 1 cresce particularmente bem em arroz refogado e é mais resistente ao calor que outros tipos, de modo que essa forma de gastroenterite é com frequência vista em associação com o consumo de arroz cozido em restaurantes chineses. A segunda forma de gastroenterite causada por *Bacillus* spp. resulta da contaminação de pratos à base de carne e vegetais e caracteriza-se pelo início de cãibras e diarreia 8 a 16 horas após a ingestão do alimento contaminado. Em tais circunstâncias, as principais manifestações da infecção por *B. cereus* são causadas pela produção de uma enterotoxina termolábil.

Diagnóstico laboratorial

Quando se suspeitar de antraz cutâneo, deve-se coletar líquido da vesícula e material sob a margem da escara com *swab* para esfregaço e cultura. Quando o médico suspeitar de inalação de antraz, a saliva deve ser coletada para esfregaço e cultura. Na forma intestinal, devem ser feitas culturas de fezes. Ante o quadro de meningite, devem ser feitos esfregaços e culturas do LCE. No estágio septicêmico, devem ser realizadas hemoculturas.

O achado de células Gram-positivas grandes com formato de vagões nos esfregaços de qualquer uma dessas amostras sugere o diagnóstico. A microscopia de fluorescência, disponível em alguns laboratórios estatais e nos CDC nos EUA, pode fornecer um diagnóstico presuntivo rápido. Conforme mencionado antes, em razão do uso do *B. anthracis* em ataques terroristas, laboratórios sentinelas (nível A) devem enviar quaisquer isolados provavelmente pertencentes a esse microrganismo ao seu laboratório estadual ou aos CDC.

As espécies de *Bacillus* crescem bem em ágar-sangue de carneiro. As colônias de *B. anthracis* em geral são achatadas, com margens irregulares ("cabeça de medusa"), parecem esbranquiçadas com uma superfície de vidro moído e não costumam ser hemolíticas. A Figura 56.10 demonstra a morfologia da colônia de *B. anthracis* em ágar-sangue. Ao serem tocadas com uma alça de inoculação, as colônias são firmes, viscosas e erguem-se como claras de ovo batidas em neve. A colônia em cabeça de medusa pode ser vista no caso de *B. cereus* e outras espécies do gênero. Os bacilos do antraz não são móveis, seja ao suspender-se uma gota para teste ou em meios semissólidos, e a maioria das demais espécies é móvel. A motilidade pelo método de suspender uma gota é um teste diferencial útil para distinguir *B. anthracis* de *B. cereus*, mas só deve ser feito com um caldo de cultura fresco do microrganismo. Outras características e reações bioquímicas que podem ser usadas para identificar isolados até o nível de espécie foram resumidas por Logan e Turnbull (Logan, 1999).

O diagnóstico de gastroenterite por *B. cereus* não pode ser feito com acurácia por cultura de fezes porque os microrganismos podem ser um componente da flora intestinal nativa. Portanto, o diagnóstico depende da cultura quantitativa do alimento contaminado. A presença de 10^5 unidades formadoras de colônia ou mais (UFC)/g no alimento constitui evidência presuntiva de intoxicação por *B. cereus* (Logan, 1999).

Suscetibilidade antimicrobiana

Embora suscetível a uma variedade de agentes, a antibioticoterapia para o antraz está centrada no uso de fluoroquinolonas, que são altamente ativas contra o *B. anthracis*. As cepas dessa espécie são em geral suscetíveis aos antibióticos β-lactâmicos, porém muitas cepas de *Bacillus* spp. elaboram β-lactamases na natureza e, portanto, tais agentes em geral não são considerados os fármacos de primeira linha preferidos até que se conheça a suscetibilidade específica do isolado. No entanto, a maioria das cepas é inibida pelas fluoroquinolonas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e cloranfenicol em baixas concentrações.

Prevenção

A prevenção do antraz em humanos idealmente depende do seu controle nos animais. O diagnóstico imediato nos animais doentes, seu isolamento e o tratamento, além da cremação de carcaças, estão indicados quando ocorrem surtos esporádicos. Nas áreas enzoóticas, faz-se a vacinação com preparações de esporos não encapsulados. Pessoas expostas ocupacionalmente também devem ser imunizadas. A doença diarreica aguda causada pelo *B. cereus* pode ser prevenida pela cocção e pela refrigeração adequadas dos alimentos preparados em grandes volumes, para prevenir a proliferação das formas vegetativas das bactérias e a formação da enterotoxina.

Nocardia

Características

Nos esfregaços corados pelo Gram de amostras clínicas, *Nocardia* spp. aparecem como bacilos Gram-positivos longos e finos, ramificados,

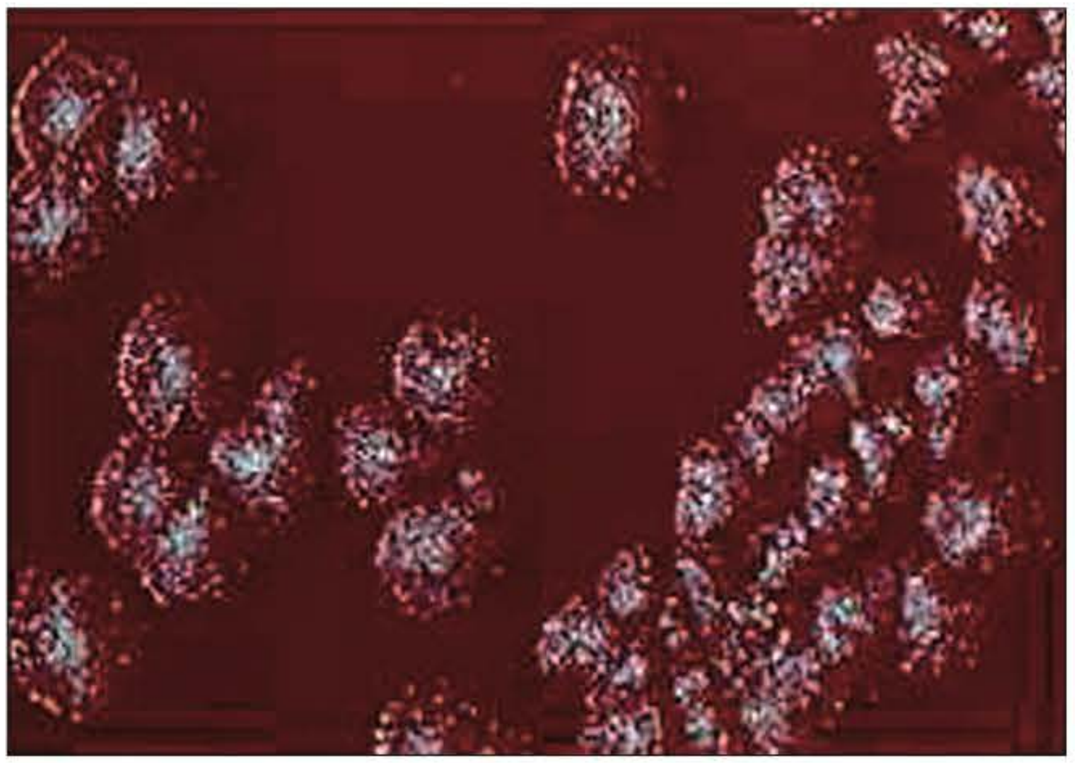


Figura 56.10 Colônias de *Bacillus anthracis* em ágar-sangue. Notar as margens irregulares das colônias.

em forma de contas de rosário (Fig. 56.11). A qualidade que mais as distingue é sua estabilidade parcial em ácido; as células coram-se positivamente com um corante ácido-rápido modificado (Ziehl–Neelsen ou Kinyoun), o que as diferencia das *Actinomyces*, que podem ter um aspecto similar ao Gram. Pode ser difícil demonstrar a estabilidade parcial em ácido, o que melhora deixando-se o microrganismo crescer por cerca de quatro dias em ágar Middlebrook 7H10 ou em caldo de leite com tornassol. A maioria das infecções clínicas foi causada por membros do complexo *Nocardia* asteroides, mais comumente *Nocardia cyriageorgica*, seguida por *Nocardia brasiliensis* e, em raros casos, *Nocardia otitidis caviarum* (Cloud, 2004).

Manifestações clínicas e patogênese

As nocárdias são encontradas no solo e em matéria orgânica em todo o mundo, causando doença em muitos animais, inclusive peixes. A infecção humana é ligeiramente mais comum em indivíduos do sexo masculino que feminino. Em geral, é adquirida por inalação do microrganismo, mas pode ocorrer após traumatismo e contato com solo contaminado, ou então o microrganismo pode entrar no corpo pelo trato gastrintestinal, quando o material contaminado entra em contato com uma área de ulceração em mucosa.

Nos pulmões, *Nocardia* spp. são fagocitadas por macrófagos alveolares e crescem de maneira intracelular, desencadeando uma reação inflamatória mista (de neutrófilos, linfócitos e macrófagos) que acaba por resultar na formação de abscesso ou, em alguns casos, granuloma. Estudos in vitro das defesas contra *Nocardia* spp. sugerem que os neutrófilos, macrófagos ativados e células T citotóxicas estão envolvidos. Embora os neutrófilos não destruam *Nocardia* spp. virulentas, inibem seu crescimento, possivelmente suprimindo a infecção até que os macrófagos sejam ativados por completo. Se a infecção não ficar contida no pulmão, os microrganismos disseminam-se para outros tecidos pelo crescimento avançado, ocasionando empiema, acometimento da parede torácica e fístulas de drenagem, ou por disseminação hematogênica, resultando na formação de abscesso, em especial no cérebro, nos tecidos subcutâneos e nos rins. O fator primordial do hospedeiro associado a maior risco de nocardiose é a disfunção celular imune, embora muitas pessoas infectadas com *Nocardia* spp. não tenham um defeito imune celular ou humoral reconhecido (Wilson, 1989).

A doença pulmonar, a manifestação mais frequente da nocardiose, caracteriza-se por febre, anorexia, perda de peso, tosse, dispneia e dor torácica pleurítica. A doença cutânea e subcutânea pode apresentar-se como pioderma, celulite, abscesso único ou múltiplos abscessos, doença linfocutânea que lembra a esporotricose ou nódulos. Nas Américas Central e do Sul, as infecções primárias com *N. brasiliensis* podem produzir um actinomicetoma (massa granulomatosa endurecida com trajetos fistulosos que drenam pus e grânulos de "enxofre"), tipicamente nos membros inferiores. A doença disseminada em geral é causada por membros do complexo *N. asteroides* e origina-se no pulmão na maioria dos casos, manifestando-se tipicamente como abscessos únicos ou múltiplos no SNC. A pele é o segundo local mais comum de disseminação, seguida pelos rins, fígado e linfonodos.

Diagnóstico laboratorial

Nocardia spp. crescem de forma aeróbica na maioria dos meios seletivos como ágar-sangue de carneiro e ágar-chocolate, ágar-batata-glicose, ágar glicosado de Sabouraud e meios de Löwenstein–Jensen ou Middlebrook e no caldo 7H9 usado para cultura de micobactérias. Esses microrganismos crescem em extrato de levedura tamponado com carvão (BCYE), usado também para o isolamento de *Legionella* spp. É importante notar que *Nocardia* spp. nem sempre sobrevivem aos procedimentos de descontaminação empregados para recuperar micobactérias. A incubação na presença de CO_2 a 10% facilita o crescimento. *Nocardia* spp. podem crescer em 48 horas, mas as colônias tipicamente aparecem em 5 a 20 dias como formas céreas, nodosas ou aveludadas rugosas, em geral com pigmento amarelo ou alaranjado, dependendo da espécie. A observação de filamentos ramificados que se coram apenas com um corante ácido-rápido modificado distingue *Nocardia* spp. de micobactérias. *Nocardia* spp. são diferenciadas da maioria dos outros actinomicetos aeróbicos pelo teste de resistência à ação da lisozima (*Nocardia* spp. são resistentes; *Streptomyces* spp., *Rhodococcus* spp., *Gordona* spp. e *Actinomadura* spp. são suscetíveis) e sua morfologia em ágar com água potável. O último pode ajudar a diferenciar a *Nocardia* que se ramifica do *Rhodococcus* sp., que não o faz, por exemplo. Como muitas novas espécies de *Nocardia* foram reconhecidas nos últimos anos, o uso de testes bioquímicos (p. ex., caseína, hipoxantina, tirosina, xantina) não é suficiente para sua identificação. Testes moleculares (p. ex., sequenciamento do DNAr 16S ou análise PCR padrão da enzima de restrição, PRA) são necessários para a identificação acurada da espécie (Patel, 2004). A identificação até o nível de espécie é importante por causa da variabilidade nos padrões de suscetibilidade a antibiótico entre as espécies (Tab. 56.7).

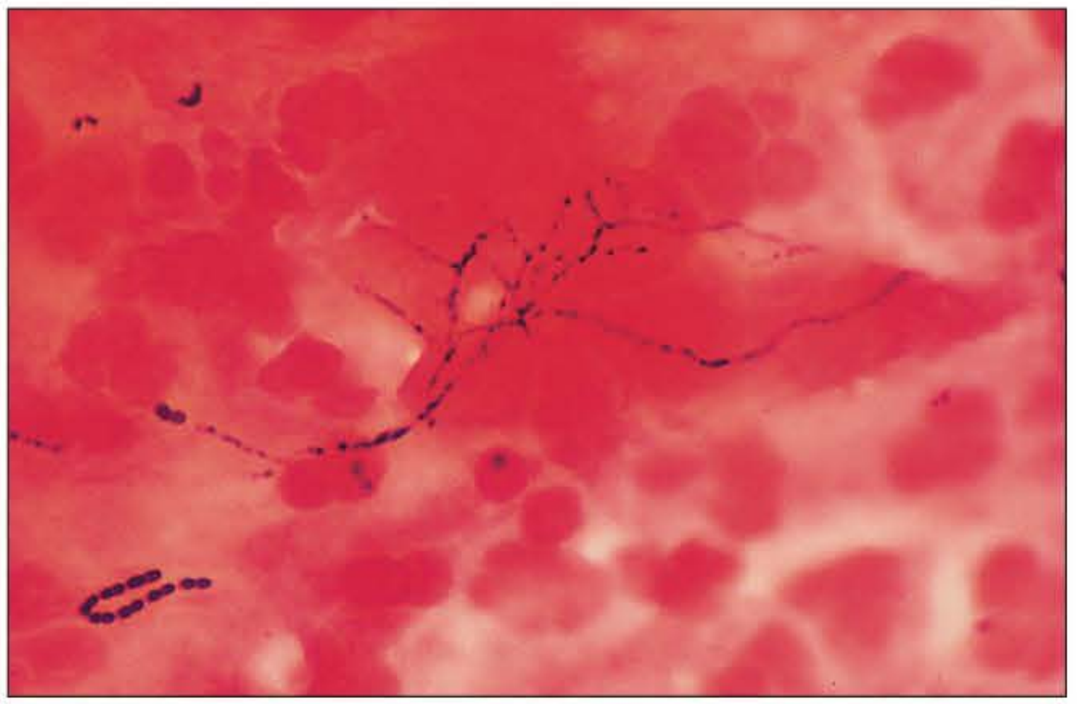


Figura 56.11 Esfregaço de escarro corado pelo Gram mostra neutrófilos, restos amorfos e bacilos Gram-positivos filamentosos, em forma de contas, ramificados (imersão em óleo).

Suscetibilidade antimicrobiana

As sulfonamidas (sozinhas ou combinadas com trimetoprim, p. ex., trimetoprim–sulfametoxazol) em geral são os agentes antimicrobianos de escolha; entretanto, o tratamento antimicrobiano ideal depende das espécies de *Nocardia* presentes, do padrão de suscetibilidade da cepa em questão e do tipo de infecção. Outros antimicrobianos potenciais incluem a amicacina, a claritromicina, o imipeném ou uma quinolona, dependendo da espécie isolada.

Outros actinomicetos aeróbicos

Outros gêneros de actinomicetos de relevância clínica para humanos incluem *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Actinomadura* e *Streptomyces*. Outro membro, Tropheryma whippelii, não é cultivável e é o agente provável da doença de Whipple.

Manifestações clínicas e patogênese

Os membros desse grupo de microrganismos é onipresente no ambiente e têm sido isolados do solo, de água doce, do mar e de matéria orgânica.

O *Rhodococcus equi* é a espécie mais comum do gênero patogênica para humanos. É um patógeno oportunista no hospedeiro com grave imunocomprometimento, causando uma pneumonia granulomatosa lentamente progressiva. Pode ser isolado do sangue de pacientes infectados, e é provável que seja adquirido por via respiratória, possivelmente como resultado da exposição a animais infectados. É provável que a capacidade do microrganismo de persistir nos macrófagos e acabar por destruí-los seja responsável por sua capacidade de causar doença. As infecções causadas por *Gordona* spp. e *Tsukamurella* spp. são relatadas apenas em raros casos. As espécies de *Tsukamurella* parecem ser patogênicas apenas na presença de certas condições clínicas (p. ex., imunossupressão, corpo estranho ou infecção crônica ativa, como tuberculose). *Actinomadura* spp. são uma causa frequente de micetomas actinomicóticos, a maioria observada em países tropicais e subtropicais, onde o hábito de caminhar descalço aumenta a chance de exposição por meio de ferimentos penetrantes repetidos. *Streptomyces* spp. têm sido tradicionalmente considerados de pouco significado clínico, mas foi identificada uma espécie, *Streptomyces somaliensis*, como agente etiológico de micetomas actinomicóticos. Outras espécies de *Streptomyces* somente às vezes têm sido relatadas como de importância clínica.

Tabela 56.7 Diferenciação de *Nocardia* spp. com base no padrão de suscetibilidade antimicrobiana

	Amic	Amox/clav	Cefotax	Ceftriax	Ciproflox	Clari	Gent	Imi	Kana	Linez	Mino	Sulfa	Tobra	Amp	Erit	Carb
Nocardia cyracigeorgica (*N. asteroides* padrão medicamentoso VI)/*N. asteroides* VII	S	R	S	S	R	R		S	S	S	S/I	S		R	R	
Nocardia farcinica (padrão medicamentoso V)	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S/I	R/S	R	R	R	
Nocardia nova complexo* (padrão medicamentoso III)	S	R	S	S	R	S		S		S	S/I	S		S	S	R
Nocardia abscessus (padrão medicamentoso 1)	S	S	S	S	R	R		R/S		S	S/I	S		S	R	S
Nocardia brasiliensis	S	S	S/R	S/R	R	R	S	R	R	S	S/I	S	S	R	R	S
Nocardia pseudobrasiliensis		S	S/R	S/R	S	S	S	R	R	s	R	S	S	R		S
Nocardia otitidiscaviarum (em geral R a todos β-lactâmicos)	S	R	R	R	S		S	R	S†	S	S/I	S		R		R
Complexo *Nocardia transvalensis* (padrão medicamentoso IV)	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S/I	S	R	R	R	
Nocardia brevicatana/paucivorans	S			S	S		R	S	S	S	S/I	S	S	S		S

Tabela baseada na maioria dos isolados testados.

* Inclui *N. nova/veterana/africana*. † Zona da canamicina ≥ zona da amicacina.

Amic = amicacina; Amox/clav = amoxicilina/clavulanato; Amp = ampicilina; Carb = carbenicilina; Cefotax = cefotaxima; Ceftriax = ceftriaxona; Ciproflox = ciprofloxacina; Clari = claritromicina; Erit = eritromicina; Gent = gentamicina; I = intermediário; Imi = imipeném; Kana = canamicina; Linez = linezolid; Mino = minociclina; R = resistente; S = suscetível; Sulfa = sulfametoxazol; Tobra = tobramicina.

(Reproduzido com permissão do Dr. Richard Wallace e Ms. Barbara Brown-Elliott.)

Diagnóstico laboratorial

Os actinomicetos aeróbicos apresentam crescimento lento e podem exigir 2 a 3 semanas de incubação, crescendo na maioria dos meios não seletivos usados para isolar bactérias, micobactérias e fungos. As espécies de *Rhodococcus* crescem como cocobacilos em ziguezague. Foram observados filamentos ramificados rudimentares em meios líquidos. As colônias podem ser ásperas, lisas ou mucoides e ter pigmentos que variam de amarelo, coral, laranja ou rosa profundo depois de vários dias de incubação. O R. equi em geral é rosa-pálido, amarelo-pálido ou coral e pode parecer lodoso. *Gordona* spp. variam de colônias lisas, mucoides, aderentes aos meios para colônias secas, elevadas. O pigmento produzido pode ser bege a cor de salmão. *Tsukamurella* spp. são ligeiramente ácido-rápidas pelo Kinyon modificado. São vistas como longos bastonetes que se fragmentam em três partes. Não produzem hifas aéreas. As colônias são circulares, com margens inteiras ou rizoides. Podem ser secas ou cremosas, com um pigmento branco a alaranjado. Colônias rugosas podem ser produzidas após 7 dias de incubação. As espécies de *Actinomadura* formam colônias céreas, cerebriformes, consistentes, membranosas brancas, amarelas, rosadas ou vermelhas. As colônias de Streptomyces são secas a calcárias, empilhadas ou pregueadas, branco-acinzentadas a amarelas e têm o odor de um porão mofado. Uma ampla variedade de pigmentos é produzida e colore o substrato e as hifas. Algumas espécies não produzem hifas aéreas. Como ocorre com *Nocardia* spp., a identificação completa desses membros de actinomicetos aeróbicos em geral requer métodos de sequenciamento molecular (Garter, 2004).

Bactérias Gram-negativas – cocos

Neisseria

Características

Esses gêneros são cocos Gram-negativos imóveis, aeróbicos e positivos para catalase e oxidase; estão em geral dispostos em pares; e apresentam superfícies adjacentes achatadas, o que lhes confere um aspecto de rim ou grãos de café (Fig. 56.12). Esses microrganismos são um tanto exigentes, e às vezes requerem o acréscimo de sangue, soro, colesterol ou ácido oleico ao meio para contrabalançar os inibidores do crescimento, como ácidos graxos. *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* em geral requerem incubação imediata em CO_2 para crescimento; entretanto, isso depende da cepa, varia com a fase da curva de crescimento do organismo e em geral é perdido em subculturas. *N. meningitidis* e a maioria de *N. gonorrhoeae* não são inibidas pela presença de vancomicina ou lincomicina, colistina e nistatina, característica particularmente útil

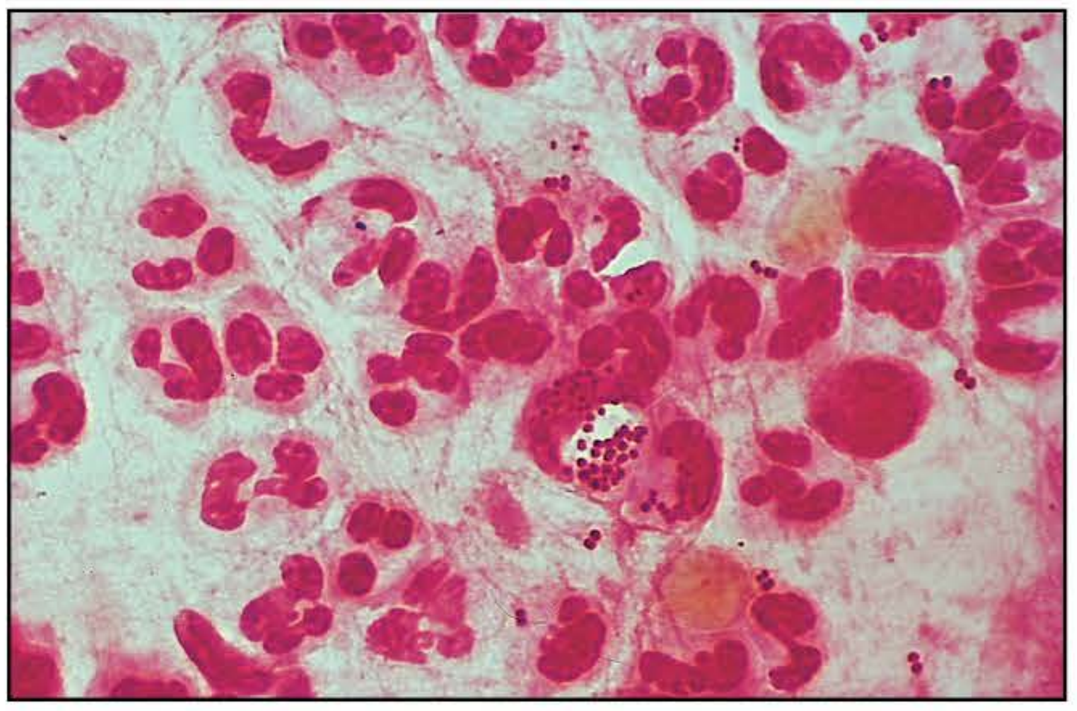


Figura 56.12 Esfregaço de escarro corado pelo Gram mostrando muitos neutrófilos e diplococos Gram-negativos intracelulares, sugestivos de infecção por *Neisseria meningitidis* (imersão em óleo).

no seu isolamento seletivo de amostras contaminadas com outras bactérias. Em raros casos, isolados de *N. gonorrhoeae* (em especial cepas AUH, que requerem arginina, uracil e hipoxantina) são suscetíveis à vancomicina.

Manifestações clínicas e patogênese

Embora infecções oportunistas causadas por espécies de *Neisseria* que não *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* tenham sido relatadas às vezes em hospedeiros comprometidos, essas espécies em geral não são patogênicas. A *N. meningitidis* pode colonizar as mucosas do trato respiratório superior, evento em geral seguido em 7 a 10 dias pela formação de anticorpos bactericidas e hemaglutinantes, que podem não eliminar o estágio de portador, mas conferem imunidade específica do grupo. Em alguns casos, a doença surge logo após a colonização, mais frequentemente na forma de meningococcemia e meningite. O organismo também tem uma tendência a invadir serosas e tecidos articulares, com o desenvolvimento de pleurite, pericardite e artrite. Ocorre transporte de *N. meningitidis* da nasofaringe em 5 a 15% dos indivíduos sadios, podendo ser maior em grupos confinados, como recrutas militares. Não foi estabelecida uma correlação direta entre as taxas de portador e a incidência da doença, com a possível exceção de membros de casas onde há muitas pessoas ou um lactente ou criança doente durante epidemias da doença. A *N. meningitidis* também foi isolada de fontes genitais, nas quais seu significado clínico é incerto. Quando cultivada dessas fontes, a bactéria pode ser identificada de forma errônea como *N. gonorrhoeae*, a menos que sejam feitos testes apropriados para distingui-las.

O principal fator de virulência da *N. meningitidis* é um complexo de lipopolissacarídeo e endotoxina, que em animais de experimentação ativa a cascata da coagulação, com depósito de fibrina em pequenos vasos, produção de hemorragia nas suprarrenais e em outros órgãos e alteração da resistência vascular periférica, resultando em choque e morte.

A patogênese e as manifestações clínicas das infecções por *N. gonorrhoeae* diferem um pouco daquelas de *N. meningitidis*. Os tipos patogênicos (1 e 2) de *N. gonorrhoeae* aderem por meio de pelos, que não são produzidos por tipos não patogênicos (3 e 4), a várias células humanas. Esses pelos antigenicamente heterogêneos, que representam um dos principais fatores de virulência da *N. gonorrhoeae*, podem inibir a fagocitose e estimular a formação de anticorpo específico da cepa. Outros fatores possíveis de virulência da *N. gonorrhoeae* estão definidos com menos clareza. Tanto a *N. gonorrhoeae* quanto a *N. meningitidis* produzem uma protease IgA, que também pode ser importante em sua patogênese, porque a IgA é a classe de anticorpo que predomina nas secreções de mucosas.

Diagnóstico laboratorial

O único elemento mais importante no diagnóstico laboratorial de infecções causadas por *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* é a amostra, o que inclui a seleção, a colheita e o transporte apropriados para o laboratório (ver Cap. 63). As espécies patogênicas são sensíveis ao ressecamento e a extremos de temperatura, razão pela qual o material deve ser cultivado imediatamente para facilitar a recuperação. São mesofílicas e crescem pouco, quando o fazem, à temperatura ambiente. Muitas requerem incubação imediata em CO_2 (2 a 8%) para o isolamento primário. Meios que contêm sangue chocolatado são comumente usados para culturas e devem conter antibióticos (i. e., vancomicina ou lincomicina, bem como colistina, nistatina ou anisomicina e trimetoprim) se a amostra estiver contaminada com microbiota nativa. Gonococos suscetíveis à vancomicina crescem em meios que contêm lincomicina; contudo, por causa da interação sinérgica da lincomicina com o trimetoprim, o último deve ser omitido dos meios que contêm lincomicina. A inoculação direta de amostras "à beira do leito" seguida pela incubação imediata a 35°C em CO_2 é ótima. Isso pode ser obtido de várias maneiras: colocando-se o meio em um frasco com vela, colocando-se o meio em um saco vedado que contenha um comprimido de ácido cítrico bicarbonato ou usando-se um meio contido em um frasco com atmosfera de CO_2. Se algum desses sistemas de cultura tiver de ser enviado para um laboratório de referência para processamento, primeiro precisará ser incubado durante a noite para garantir o crescimento dos microrganismos.

Um isolado de amostra urogenital que mostra o aspecto de colônia apropriado em um meio seletivo presumivelmente pode ser chamado de *N. gonorrhoeae* com base nos resultados da coloração de Gram e dos testes de oxidase e catalase. Esfregaços corados pelo Gram preparados a partir de colônias de *N. gonorrhoeae* devem mostrar diplococos Gram-negativos típicos, mas os organismos podem ocorrer em tétrades, especialmente de culturas jovens. Todas as espécies de *Neisseria* são positivas para a oxidase, e todas elas também, exceto *N. elongata*, são positivas para a catalase. Como outras neissérias além da *N. gonorrhoeae* podem ser recuperadas de locais urogenitais, testes confirmatórios são praticamente indispensáveis e necessários para todos os isolados de locais extragenitais e quando se suspeita de abuso sexual (de preferência por mais de um método).

A confirmação de *N. gonorrhoeae* e a identificação de outras espécies de *Neisseria* baseiam-se no crescimento e nas características bioquímicas (Tab. 56.8) (Knapp, 1988). O método padrão de identificação é a detecção da produção de ácido a partir de carboidratos em um meio básico de cistina, tripticase e ácido (CTA) e outros testes bioquímicos convencionais. Todavia, ante as desvantagens dos métodos convencionais, testes de identificação mais rápida são usados na maioria dos

Tabela 56.8 Diferenciação entre espécies de *Neisseria* e *Moraxella catarrhalis*

	N. gonorrhoeae	*N. meningitidis*	*N. cinerea*	*N. lactamica*	*N. sicca*	*N. subflava*	*N. flavescens*	*N. mucosa*	*M. catarrhalis*
Crescimento									
Meio de Thayer–Martin	+*	+	–	+	–	–	+	–	†
Ágar nutriente, 25°C	–	–	–	–	+	+	–	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Redução de nitrato	–	–	–	–	–	–	–	+	+
DNase	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Produção de ácido a partir de									
Glicose	+	+	–‡	+	+	+	–	+	–
Maltose	–	+	–	+	+	+	–	+	–
Lactose	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Sacarose	–	–	–	–	+	D§	–	+	–
Frutose	–	–	–	–	+	–	–	–	–

* A maioria das cepas suscetíveis à vancomicina não cresce no meio de Thayer-Martin. † Algumas cepas positivas e outras negativas. ‡ Pode ocorrer reação fraca com a utilização de testes rápidos em carboidrato. § Biovariante *perflava*, +; biovariante *flava*, –.

+ = ≥ 90% de cepas positivas; – = ≥ 90% de cepas negativas; D = variável.

laboratórios clínicos. Testes para a detecção direta de *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* em amostras clínicas também estão disponíveis. A tipagem de isolados de *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* é feita primordialmente para estudos epidemiológicos.

Com o método padrão de identificação, é testada a produção de ácido a partir de glicose, maltose, lactose, sacarose e frutose em um meio básico de CTA e um controle sem carboidrato. Coloca-se o inóculo nos tubos, que são incubados a 35 a 37°C em ar ambiente e examinados a intervalos de 24 horas, até que as reações sejam interpretáveis, ou por 72 horas. Os resultados esperados com as espécies de *Neisseria* são mostrados na Tabela 56.8. Em alguns casos, entretanto, um isolado de *N. meningitidis* produz reações aberrantes com carboidratos: glicose-negativas, maltose-negativas ou assacarolíticas. Se houver forte suspeita de *N. meningitidis* nesses casos, a identificação pode ser confirmada por aglutinação em lâmina, pelo uso de um conjunto de antissoros polivalentes ou soros específicos de grupos sorológicos individuais. Além dos testes convencionais para degradação de carboidrato, a redução de nitrato e nitritos e a produção de DNase devem ser avaliadas. A última é especialmente útil para a identificação de Moraxella catarrhalis, que é DNase-positiva (*Neisseria* spp. são DNase-negativas). As desvantagens dos testes convencionais são a necessidade de um inóculo forte e de trabalhar-se com culturas puras, a demora e a falha de crescimento de algumas cepas exigentes de *N. gonorrhoeae*.

Vários sistemas comerciais detectam produção de ácido a partir de carboidratos, em geral em 1 a 4 horas (Knapp, 1988). O inóculo precisa ser preparado a partir de uma cultura pura do isolado, de modo que a identificação em geral fica disponível 24 horas após o isolamento. As reações ácidas de algumas *N. gonorrhoeae* e, em menor extensão, *N. meningitidis* pode ser difícil de interpretar ou são aberrantes em alguns kits, e cepas de *N. gonorrhoeae*, que são produtoras fracas de ácido a partir de glicose, podem parecer glicose-negativas. Algumas cepas de *Neisseria cinerea*, que não produzem ácido a partir de glicose, podem parecer glicose-positivas em alguns sistemas.

Testes de substrato enzimático fornecem identificação rápida (1 a 4 horas) apenas de isolados de diplococos Gram-negativos oxidase-positivos recuperados em um meio seletivo (Kellogg, 1995; Knapp, 1988). Eles são valiosos para diferenciar cepas maltose-negativas de *N. meningitidis* de *N. gonorrhoeae*, mas as alterações de cor podem ser sutis e, se mal interpretadas, podem fazer com que isolados de *N. meningitidis* e outras *Neisseria* spp. sejam chamados de modo incorreto de *N. gonorrhoeae*. Além disso, cepas de *N. cinerea* e *Kingella denitrificans* que crescem em meios seletivos para gonococos podem ser identificadas erroneamente como *N. gonorrhoeae*, se não confirmado por outros procedimentos. Produtos comerciais que combinam testes de substrato enzimático com testes convencionais modificados fornecem identificação acurada de *Neisseria* e *Haemophilus* (Janda, 1987, 2002).

Os testes imunológicos para *N. gonorrhoeae*, em particular coaglutinação, podem ser usados para confirmar a identificação bioquímica de *N. gonorrhoeae*. Há três testes para isso, o Phadebact Monoclonal GC Test (Boule Diagnostics AB, Huddinge, Suíça), o GonoGen I (New Horizons Diagnostics, Columbia, MD) e o GonoGen II (New Horizons Diagnostics). Houve relatos de resultados positivos falsos e negativos falsos com esses reagentes (Dillon, 1988; Kellogg, 1995, Janda, 1993). Pode-se usar uma sonda de ácido nucleico quimioluminiscente para a detecção de *N. gonorrhoeae*, para confirmação em cultura ou detecção direta do microrganismo em amostras de *swab* endocervical ou uretral (Limberger, 1992; Hale, 1993; Janda, 1993). Também se dispõe de ensaios de amplificação de ácido nucleico para uso em amostras de *swab* endocervical ou uretral e urina, que podem ter maior sensibilidade quando comparados com a sonda de ácido nucleico e as técnicas de cultura, em grande parte porque o problema com a viabilidade do microrganismo não é uma questão (Carroll, 1998; Kehl, 1998).

Existem ensaios de aglutinação no látex para a detecção direta de antígenos de *N. meningitidis* no LCE, no soro e na urina. Conforme discutido antes (ver Estreptococos), verificou-se que a sensibilidade desses ensaios era menor ou igual à da coloração de Gram, e os resultados de tais testes parecem ter pouco impacto sobre os cuidados com o paciente (Granoff, 1986; Maxson, 1994; Perkins, 1995; Bhisitkul, 1994); portanto, muitos laboratórios deixaram de oferecer esse teste.

Suscetibilidade antimicrobiana

Apesar da recuperação ocasional de cepas de *N. meningitidis* com menor suscetibilidade à penicilina, a penicilina G continua sendo o fármaco de escolha para o tratamento da meningite meningocócica (Janda, 2003). Acredita-se que a menor suscetibilidade da *N. meningitidis* à penicilina deva-se à pouca ligação da penicilina pelas proteínas de ligação da penicilina, PBP2 e PBP3, à parede celular. Outras espécies de *Neisseria* também demonstraram essa baixa afinidade pela penicilina (Saez-Nieto, 1992; Janda, 2003). Outros agentes que têm boa atividade contra *N. meningitidis* incluem as cefalosporinas de amplo espectro e o cloranfenicol. A rifampicina, a minociclina e as fluoroquinolonas podem ser usadas para a profilaxia entre contatos domésticos. Até o momento, não há métodos padronizados de testes de suscetibilidade ou pontos de ruptura nos documentos do CLSI; no entanto, é muito provável que sejam incluídos nos suplementos mais novos nos próximos anos. O CLSI recomenda que se use um teste de microdiluição em caldo ou um teste MIC por diluição em ágar com caldo de Mueller-Hinton suplementado com cátion (com sangue de equino a 2 a 5%) ou ágar de Mueller-Hinton (com sangue ovino a 5% [vol/vol]). Meios enriquecidos como o IsoVitaleX (1%) também podem ser necessários. Nos laboratórios em que o teste de suscetibilidade de *N. meningitidis* não é feito, pode-se fazer o da β-lactamase com o uso de um teste de cefalosporina cromogênico, o teste das cefinas nitrocefinas, se o médico suspeitar de baixa suscetibilidade ou falha clínica da penicilina. Se positivos, os isolados podem então ser encaminhados para um laboratório de referência para outros testes.

Em razão da resistência amplamente disseminada de *N. gonorrhoeae* à penicilina e à tetraciclina (Fox, 1997), as recomendações atuais para o tratamento incluem as cefalosporinas de espectro estendido ou as fluoroquinolonas mais novas. Embora não pareça haver qualquer resistência às cefalosporinas, documentou-se resistência às fluoroquinolonas. Portanto, os testes de suscetibilidade devem ser feitos se os sintomas persistirem após o tratamento. A produção de β-lactamase pode ser detectada com o uso de uma cefalosporina cromogênica. A difusão em disco com ágar GC e 1% de suplemento de crescimento é recomendada para determinar a suscetibilidade da *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas, quinolonas e espectinomicina. O documento do CLSI recomenda o método da diluição em ágar ou um método de difusão em disco para testar *N. gonorrhoeae* (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS 2003b). Além disso, pode ser feito um teste E. No caso de alguns agentes, apenas o ponto de ruptura da suscetibilidade está disponível, pois ainda não há cepas resistentes documentadas. Caso se identifique um resultado "não suscetível" com uma cefalosporina de terceira geração, por exemplo, deve-se fortemente considerar a realização de testes confirmatórios, para que então sejam enviados para um laboratório de referência (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2005).

Prevenção

Uma vacina polissacarídica contra os sorogrupos A, C, Y e W135 de *N. meningitidis* está liberada nos EUA e é recomendada para militares da ativa, pessoas que vivem em áreas epidêmicas de países em desenvolvimento, indivíduos com o baço afuncional ou ausente e estudantes secundaristas. A profilaxia com antibiótico deve ser limitada aos contatos domésticos e a quem tenha contato com secreções orais de pacientes. Hoje em dia, a rifampicina é o fármaco de escolha.

O uso de antibióticos antes da exposição para prevenir doenças gonocócicas não é estimulado por causa dos riscos potenciais de sensibilização e da emergência de cepas resistentes. A única exceção a essa regra é a aplicação de solução de nitrato de prata ou pomada de eritromicina nos olhos de recém-nascidos para prevenir a oftalmia gonocócica (e por clamídia).

Moraxella catarrhalis

A *M. catarrhalis* pode estar presente na orofaringe de crianças e adultos saudáveis. É um microrganismo encapsulado que contêm pelos que se estendem de sua membrana externa e servem como adesinas. As infecções mais comuns que causam são bronquite, otite, sinusite e pneumonia (especialmente em pessoas com doença pulmonar crônica subjacente) (Catlin, 1990). A *M. catarrhalis* é uma causa infrequente de bacteriemia, endocardite, meningite, infecções urogenitais e oftalmia neonatal. A Figura 56.13 é uma coloração de Gram de es-

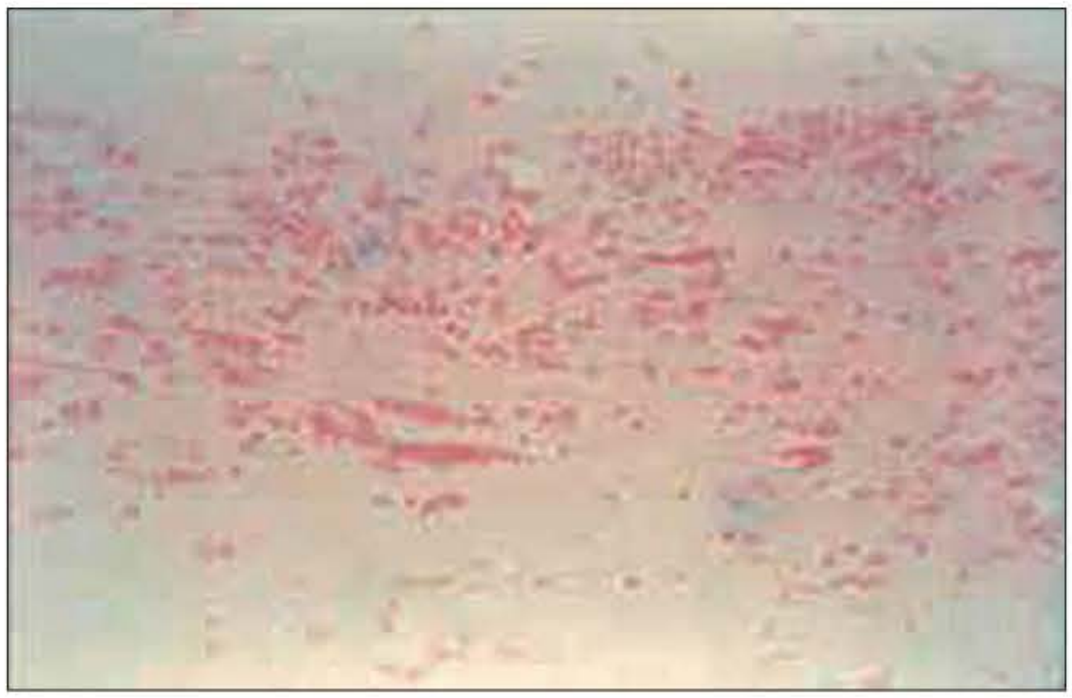


Figura 56.13 Coloração de Gram de *Moraxella catarrhalis* em uma amostra de escarro. Notar os diplococos Gram-negativos intracelulares que lembram *Neisseria* sp.

carro em que esse microrganismo é visto em grande quantidade dentro e fora de leucócitos polimorfonucleares. Essa espécie já fez parte do gênero *Neisseria* e depois foi transferida para o *Branhamella* por pouco tempo. A *M. catarrhalis* é um coco com morfologia que lembra a de *Neisseria* sp., ao contrário de outros membros do gênero *Moraxella* (p. ex., *Moraxella lacunata*, *Moraxella osloensis* e *Moraxella atlantae*), que parecem bastonetes. A *M. catarrhalis* é uma bactéria positiva para oxidase e catalase, mas pode ser diferenciada de *Neisseria* sp. por sua capacidade de crescer pontamente em ágar-sangue e chocolate, sua falta de metabolismo oxidativo (os açúcares serão negativos) e sua produção de DNase. Quase todos os isolados produzem β-lactamase, que pode ser detectada com o uso de nitrocefina. Embora se suponha que sejam resistentes à penicilina por causa disso, tais isolados em geral permanecem suscetíveis às cefalosporinas, ao trimetoprim-sulfametoxazol e às combinações de inibidores da β-lactamase.

Bactérias Gram-negativas – bacilos

Os bacilos Gram-negativos são um grupo complexo que se divide em: *Enterobacteriaceae*, aqueles encontrados normalmente no trato gastrintestinal ou que colonizam e causam infecções primárias nele; bacilos Gram-negativos não fermentativos, que em geral não são encontrados como parte da microbiota normal de humanos, sendo bactérias do ambiente; não *Enterobacteriaceae*, que podem causar infecções gastrintestinais, como *Vibrio* e *Campylobacter*; agentes infecciosos com características epidemiológicas específicas, como Legionella e Francisella; e outros bacilos Gram-negativos, incluindo *Haemophilus* spp. e outros gêneros.

Enterobacteriaceae

Características

As *Enterobacteriaceae* são bacilos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, não formam esporos, são imóveis ou possuem flagelos peritríquios, são oxidase-negativos e Gram-negativos que produzem ácido de forma fermentativa a partir de glicose e reduzem nitratos em nitritos. A Figura 56.14 é uma coloração de Gram de *E. coli*, mas poderia representar qualquer membro das *Enterobacteriaceae*. Os gêneros incluídos nesse grupo são: *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* e *Yokenella*. Apenas alguns deles serão comentados aqui.

Manifestações clínicas e patogênese

As *Enterobacteriaceae* são encontradas em plantas, no solo, na água e nos intestinos de humanos e animais. Têm sido associadas a muitas infecções clínicas, incluindo abscessos, pneumonia, meningite, septicemia e infecções do trato urinário. Aquelas comumente associadas a infecção humana incluem *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. e *Providencia* spp. A Figura 56.15 é uma coloração de Gram do LCE de um

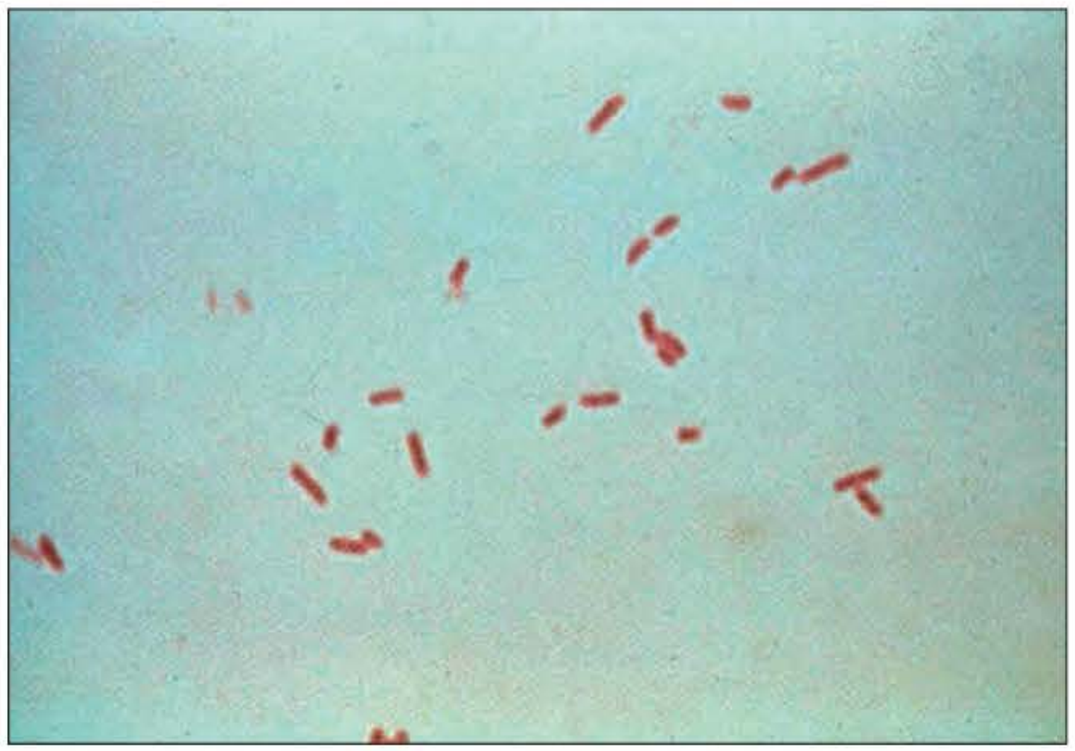


Figura 56.14 Coloração de Gram de uma amostra de urina positiva para *E. coli*. Os bastonetes Gram-negativos curtos e robustos são típicos de qualquer membro das *Enterobacteriaceae*.

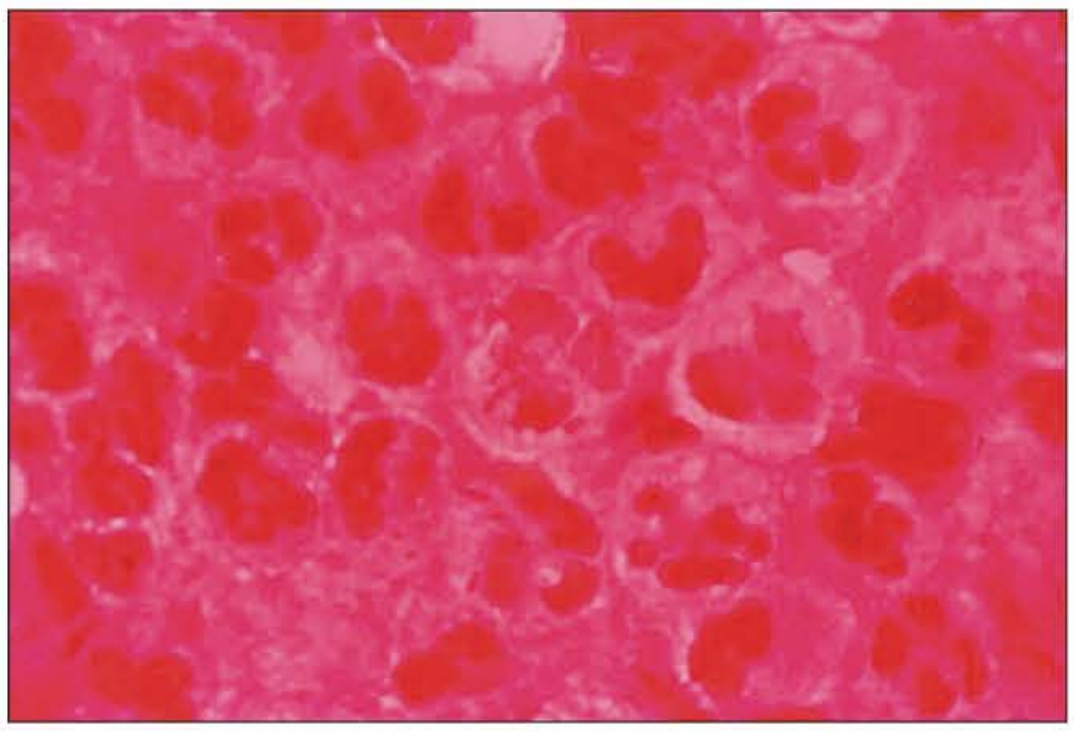


Figura 56.15 Coloração de Gram de uma amostra de líquido cerebrospinal de um neonato, contendo bacilos Gram-negativos com crescimento de *Escherichia coli*.

recém-nascido cuja cultura foi positiva para *E. coli*. No trato urinário, os isolados frequentes são *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*. Pneumonias por Gram-negativos associadas às *Enterobacteriaceae* costumam ser causadas por *K. pneumoniae*. Bacteriemias Gram-negativas relacionadas com *Enterobacteriaceae* são causadas com frequência por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. É provável que as infecções adquiridas em hospitais sejam causadas por membros dos gêneros resistentes a antibióticos, como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia*. *Enterobacteriaceae* associadas à diarreia incluem *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* (êntero-hemorrágica [produtora da toxina Shiga], enterotoxigênica, enteroinvasiva, enteropatogênica, enteroaderente) e *Yersinia* spp. *Shigelas* são raramente isoladas de outras fontes que não o trato gastrintestinal, enquanto as salmonelas são com mais frequência isoladas de outras fontes, como urina ou sangue.

Endotoxinas presentes nas paredes celulares das *Enterobacteriaceae*, bem como de outros bacilos Gram-negativos, são responsáveis por muito da morbidade e da mortalidade resultantes de infecções associadas a essas bactérias. As endotoxinas consistem em metades lipídicas e polissacarídicas com pequenas quantidades de aminoácidos, sendo conhecidas geralmente como lipopolissacarídeos, que podem eliciar febre, calafrios, hipotensão, granulocitose, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada e ativação das vias clássica e alternativa do complemento. O choque endotóxico resulta de septicemia por Gram-negativos, e a endotoxina reage com macrófagos, leucócitos, plaquetas, complemento e outras proteínas séricas para aumentar os níveis sanguíneos de enzimas proteolíticas e substâncias vasoativas, o que resulta em acúmulo de sangue, aumento da vasoconstrição

periférica e diminuição do débito cardíaco. Já ficou claro que os efeitos letais da endotoxina dependem da atividade de macrófagos e da responsividade, e que a produção de caquectina a partir dos macrófagos ativados desempenha um papel importante ao causar choque profundo e lesão em múltiplos órgãos (Tracey, 1988).

Outros fatores patogênicos das *Enterobacteriaceae* incluem o antígeno K1, associado a uma alta porcentagem de cepas de *E. coli* que causam meningite neonatal; a cápsula de *K. pneumoniae* que, como a dos pneumococos, inibe a fagocitose; o antígeno Vi de *Salmonella sorotipo typhi*, que pode interferir na destruição intracelular do microrganismo; e vários antígenos de superfície, como as fímbrias, que medeiam a aderência do microrganismo às superfícies mucosas.

Os fatores mediados por plasmídeo parecem desempenhar um papel importante nas propriedades invasivas de *Salmonella*, *Shigella* e cepas enteroinvasivas de *E. coli*. Além disso, as enterotoxinas termolábeis (LT) e as termoestáveis de *E. coli* são mediadas por plasmídeo. A LT estimula a adenilato ciclase nas células da mucosa do intestino delgado que, por sua vez, ativa o AMPc, causando a secreção de líquido e eletrólitos no lúmen intestinal e provocando diarreia aquosa. Em contraste, as enterotoxinas termoestáveis (ST) parecem ativar a guanilato ciclase.

Diagnóstico laboratorial

O isolamento de bacilos Gram-negativos de amostras contaminadas é muito facilitado pelo uso de meios diferenciais e seletivos (Tab. 56.10). Eosina azul de metileno (EMB) e ágar de MacConkey podem ser usados de forma intercambiável como meios minimamente seletivos e diferenciais para, a princípio, selecionar e diferenciar bacilos Gram-negativos que fermentam a lactose dos que não o fazem. Ágar XLD e ágar HE são meios diferenciais mais seletivos, que são em especial úteis para selecionar *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em artérias muito contaminadas, como fezes. O sulfeto de bismuto é um meio muito seletivo, especialmente útil para a detecção de salmonelas em endemias e epidemias. *Salmonella* spp. produzem H_2S e são reconhecidas com facilidade pela produção de colônias com o centro negro nos ágares XLD, HE e sulfeto de bismuto. Um meio enriquecido, como selenito F ou caldo para Gram-negativo (GN), pode ser útil para detectar números baixos de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. nas fezes. Ágar cefsulodina-irgasano-novobiocina (CIN) incubado à temperatura ambiente é seletivo e diferencial para a recuperação de Yersinia enterocolytica. As colônias aparecem como olhos de touro, com centros vermelhos e bordas transparentes. O ágar de MacConkey com sorbitol como açúcar fermentável é um meio diferencial capaz de diferenciar a *E. coli* 0157:H7 que não fermenta o sorbitol associada à síndrome hemolítico-urêmica da maioria das outras *E. coli*.

No caso de algumas *Enterobacteriaceae*, poucas características simples das colônias ou reações bioquímicas podem ser usadas para a identificação presumível de um isolado. Por exemplo, *Proteus* spp. se aglomeram em ágar-sangue, *Klebsiella* spp. formam colônias mucoides, Serratia marcescens podem produzir um pigmento vermelho, *Salmonella* spp. produzem H_2S e *E. coli* é indol-positiva. A identificação definitiva dessas e outras espécies requer outros testes bioquímicos. Inúmeros esquemas baseados no uso de meios bioquímicos convencionais foram descritos para a identificação das *Enterobacteriaceae*. As características diferenciais das *Enterobacteriaceae* mais comumente encontradas no laboratório clínico são mostradas na Tabela 56.10. Existem kits preparados no comércio e dispositivos automatizados convenientes e acurados para identificação da grande maioria dos isolados pertencentes às *Enterobacteriaceae*. Em certas circunstâncias, a identificação é feita com acurácia em poucas horas. Sistemas semiautomatizados também combinam a identificação e os testes de suscetibilidade antimicrobiana em uma única unidade. Em geral, a acurácia da identificação entre esses sistemas é muito alta e comparável.

A classificação das *Enterobacteriaceae* foi submetida a revisão considerável nos últimos anos, como resultado da hibridização do DNA e de outros estudos. Como o agrupamento fenotípico com base nas reações bioquímicas nem sempre é consistente com sua relação com o DNA, o uso de tribos (p. ex., Klebsielleae, Proteeae) para reunir as espécies nas *Enterobacteriaceae* foi interrompido.

Em termos históricos, o gênero *Salmonella* foi dividido nas seguintes espécies: *S. typhi*, *Salmonella paratyphi* A e B, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. Como se descobriu que todos os grupos são estreitamente relacionados em termos genéticos, a terminologia atual agora reconhece apenas duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori* (raramente isolada de humanos), e cada uma possui múltiplas subespécies. Há seis subespécies de *S. enterica*, e a subespécie I (*S. enterica* subesp. enterica) é o isolado humano habitual. Há mais de 2.000 sorotipos de Salmonella, a maioria na subespécie enterica. A sorotipagem baseia-se na reatividade imunológica dos antígenos "O" somáticos termoestáveis, cujo conteúdo predominante é de lipopolissacarídeo, e antígenos "H" flagelados termolábeis. Nos EUA, os sorotipos Salmonella typhimurium e Salmonella enteritidis são os mais comuns. O sorotipo Salmonella typhi também produz um antígeno polissacarídico capsular termolábil Vi. Na prática, a maioria dos laboratórios clínicos identifica isolados de *Salmonella* spp. com base nas reações bioquímicas e usa reagentes imunológicos específicos do grupo para caracterizar isolados em um sorogrupo específico. Testes comerciais de aglutinação em lâmina para diferenciar grandes sorogrupos, A, B, C e D, são úteis para diferenciar a salmonela tifoide das cepas não tifoides. O sorotipo *S. typhi* tem o sorogrupo D e o antígeno Vi. A identificação adicional do sorotipo específico em geral é feita apenas pelas secretarias estaduais de saúde ou outros laboratórios de referência. Em termos bioquímicos, os isolados que lembram *Shigella* também são

Tabela 56.9 Diferenciação entre bacilos aeróbicos Gram-negativos

Teste	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella oxytoca*	*Proteus mirabilis*	*Proteus vulgaris*	*Shigella* spp.	*Citrobacter freundii*
Indol	+	–	+	–	+	D	–
Metil vermelho	+	– ou +	D	+	+	+	+
Voges–Proskauer	–	+	+	– ou +	–	–	–
Citrato (Simmons)	–	+	+	D	D	–	+
H_2S (triplo, açúcar-ferro-ágar)	–	–	–	+	+	–	+
Urease	–	+	+	+	+	–	D
Fenilalanina desaminase	–	–	–	+	+	–	–
Lisina descarboxilase	+ ou –n–	+	+	–	–	–	–
Arginina di-hidrolase	– ou +	–	–	–	–	–	D
Ornitina descarboxilase	D	–	–	+	–	D	– ou +
Motilidade	+ ou –	–	–	+*	+*	–	+
Ácido produzido a partir de lactose	+	+	+	–	–	–	+ ou (+)

* Aglomeração em ágar-sangue e chocolate.

+ = ≥ 90% de reações positivas em 2 dias; – = ≥ 90% de reações negativas; (+) = reações positivas em 3 a 7 dias; + ou – = reações da maioria das cepas positivas; – ou + = reações da maioria das cepas negativas; D = reações diferentes [+, (+), ou –].

Tabela 56.9 Diferenciação entre bacilos aeróbicos Gram-negativos (*continuação*)

Yersinia enterocolitica	***Enterobacter cloacae***	***Serratia marcescens***	***Morganella morganii***	***Providencia alcalifaciens***	***Salmonella* Sorotipo *choleraesuis***	***Salmonella* Sorotipo *typhi***	***Salmonella* Sorotipo *paratyphi A***
D	–	–	+	+	–	–	–
+	–	+ ou –	+	+	+	+	+
+ (25°C)/ –(37°C)	+	+	–	–	–	–	–
–(25°C)	+	+	–	+	(+)	–	–
–	–	–	–	–	D	+	– ou +
+	D	– ou +	+	–	–	–	–
–	–	–	+	–	–	–	–
–	–	–	–	–	+	+	–
–	+	–	–	–	(+)	– ou (+)	– ou +
+	+	+		+	–	+	–
+ + (25°C)/–(37°C)	+	+	+ ou –	+	+	+	+
D	D	–	–	–	–	–	–

Tabela 56.10 Meios entéricos diferenciais e seletivos

Meio	**Gram-positivo Agente bacteriostático**	**Carboidrato fermentável**	**Indicador**	**Cor da colônia Fermentador**	**Não fermentador**	**Categoria**
Eosina azul de metileno (EMB)	Eosina Y Azul de metileno	Lactose*	Eosina Y Azul de metileno	Vermelho ou preto com brilho	Incolor	S, D
MacConkey	Cristal violeta Sais biliares	Lactose	Vermelho neutro	Vermelho	Incolor	S, D
Xilose-lisina-desoxicolato (XLD)	Sais biliares	Xilose Lactose Sacarose	Fenol vermelho	Amarelo	Vermelho	S, D
Hektoen entérico (HE)	Sais biliares	Salicina Lactose Sacarose	Bromotimol azul	Amarelo-laranja	Verde, azul-verde	S, D
Salmonella–Shigella (SS)	Sais biliares	Lactose	Neutro vermelho	Vermelho	Incolor	S
Sulfito de bismuto (BS)	Verde brilhante	Glicose	Sulfito de bismuto	†	†	S
Tiossulfato citrato sais biliares sacarose (TCBS)‡	Sais biliares pH 8,6	Sacarose	Timol azul Bromotimol azul	Amarelo	Incolor	S, D

* Formulação de Levine. † As colônias de salmonelas produtoras de H_2S são pretas. ‡ Usado para isolamento de vibriões.
D = diferencial; S = seletivo.

classificados pela reatividade do antígeno "O", assim como os isolados de *E. coli* que são identificados como causas potenciais de diarreia, síndrome hemolítico-urêmica ou púrpura trombocitopênica trombótica. Tais *E. coli* também são classificadas pelo tipo de toxina produzida. Há kits comerciais para identificar *E. coli* 0157 e detectar alguns tipos de toxinas em cultura ou amostras de fezes; no entanto, esse tipo de teste em geral é encaminhado para instituições estatais.

Suscetibilidade antimicrobiana

A suscetibilidade das *Enterobacteriaceae* a vários agentes antimicrobianos é altamente variável. Espera-se que algumas cepas de *E. coli* e *P. mirabilis* tenham suscetibilidade à ampicilina, por exemplo (embora a resistência esteja aumentando em ambas), mas não à maioria dos outros membros de significado clínico das *Enterobacteriaceae*. Espera-se resistência às cefalosporinas de primeira geração (cefazolina, cefalotina) em *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus vulagaris*, *Providencia* spp., *Morganella* spp. e *Yersinia* spp.; a suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, por exemplo) permanece em muitos membros das *Enterobacteriaceae*. Entretanto, a presença de β-lactamases de espectro estendido e genes Amp-C, que são reconhecidos pela resistência às cefalosporinas de terceira geração, está aumentando em cepas selecionadas. A maioria das *Enterobacteriaceae* é suscetível aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. É muito incomum um membro das *Enterobacteriaceae* ser resistente aos carbapenéns (p. ex., imipeném, meropeném ou ertapeném) e, caso se encontre resistência, isso deve ser confirmado antes que a resistência ao carbapeném seja relatada. Como o padrão de suscetibilidade das *Enterobacteriaceae* é imprevisível, como regra geral devem ser realizados testes de suscetibilidade caso se esteja considerando a terapia antimicrobiana. Não é preciso fazer teste de suscetibilidade algum se não for instituída a terapia antimicrobiana, pois as infecções entéricas sem complicações devidas a salmonelas, em que a terapia realmente prolonga o estado de portador, ou quando há uma microbiota bacteriana mista e suscetibilidades individuais, podem não ser apropriadas.

Plesiomonas

Características

O Plesiomonas shigelloides, a única espécie do gênero Plesiomonas, é um bastonete Gram-negativo anaeróbico facultativo, positivo para oxidase e catalase, que fermenta glicose. Uma evidência molecular recente demonstra que esse gênero está mais estreitamente relacionado com o gênero Proteus. Por isso, foi colocado na família *Enterobacteriaceae* (Farmer, 2003) como o único membro oxidase-positivo desse grupo de bacilos Gram-negativos.

Manifestações clínicas e patogênese

O *P. shigelloides* é encontrado em ambientes aquáticos limitados geograficamente pela temperatura mínima de crescimento de 8°C. Pode ser encontrado em águas doces e de estuários, em geral nos países tropicais. Foi implicado como uma causa de gastroenterite, sobretudo após a ingestão de mariscos não cozidos. A amostra de fezes diarreicas com frequência contém leucócitos polimorfonucleares e eritrócitos,

embora também possa ocorrer uma doença semelhante ao cólera. Em casos esporádicos, pode ocorrer gastroenterite, bem como em surtos. As manifestações extraintestinais da infecção por *P. shigelloides* inclui meningite, septicemia, celulite, artrite e endoftalmite (Ampofo, 2001).

Sabe-se relativamente pouco sobre os fatores de virulência do *P. shigelloides*. O microrganismo parece ter propriedades invasivas, e há dados sugestivos de atividade enterotoxigênica (Brenden, 1988).

Diagnóstico laboratorial

O *P. shigelloides* pode ser isolado em uma variedade de meios entéricos seletivos e não seletivos, incluindo ágar HE. A produção de ácido a partir de lactose é variável, mas nos meios entéricos o microrganismo em geral parece não ser fermentador de lactose. É indol-positivo, reduz nitratos em nitritos, produz atalase, é positivo para o metil vermelho e fermenta glicose, maltose e trealose (Brenden, 1988).

Suscetibilidade antimicrobiana

O *P. shigelloides* é suscetível a uma variedade de agentes antimicrobianos, como cefalosporinas, trimetoprim-sulfametoxazol, imipeném e quinolonas (Abbott, 2003b). A suscetibilidade às penicilinas é variável, por causa da presença de uma β-lactamase similar à de *Aeromonas* spp.

Bactérias Gram-negativas – bacilos não fermentadores

Um grupo de bacilos Gram-negativos que não fermentam glicose nem outros açúcares costumam ser categorizados em conjunto como "não fermentadores", correspondendo a cerca de 15% dos bacilos Gram-negativos encontrados em pacientes hospitalizados. Embora haja muitos gêneros de não fermentadores, 75% daqueles de relevância clínica são Pseudomonas aeruginosa; a maioria dos outros 25% é composta por *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* ou *Burkholderia cepacia*. Como um grupo, em geral são bactérias ambientais, que não são encontradas como parte da microbiota normal do corpo humano, exceto como colonizadores em pacientes hospitalizados. Podem ser isolados sem dificuldade de água, solo, vegetais, plantas e superfícies hospitalares. Embora não tenham características bioquímicas uniformes, costumam ser positivos para oxidase e negativos para lactose em meios seletivos como o ágar de MacConkey (embora algumas das espécies pareçam não crescer nesses meios), e em geral são resistentes a muitos dos antibióticos efetivos contra membros das *Enterobacteriaceae*. As quatro espécies mencionadas neste parágrafo e outras serão comentadas neste capítulo.

Pseudomonas

Características

O gênero Pseudomonas foi submetido a uma extensa revisão, e agora muitas das espécies antes classificadas nesse gênero foram reclassificadas nos gêneros *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* e *Brevundimonas*. Das espécies que continuam, *P. aeruginosa* é o patógeno humano mais significativo. A Figura 56.16 é a coloração de Gram de *P. aeruginosa* em uma amostra de escarro.

Os pseudomonas são bacilos Gram-negativos estritamente aeróbicos, positivos para catalase e oxidase. Seu metabolismo é respiratório e nunca são fermentativos com oxigênio como aceptor terminal de elétrons. Alguns pseudomonas são móveis por meio de flagelos polares.

Manifestações clínicas e patogênese

Os pseudomonas são encontrados em ambientes úmidos. Alguns dos hábitats mais incomuns desses microrganismos incluem cosméticos, piscinas, banheiras e a parte interna da sola de tênis. No caso do último, *P. aeruginosa* pode infectar ferimentos por punção. A espécie que causa maiores morbidade e mortalidade hoje é *P. aeruginosa*. Outras espécies do gênero, embora geralmente isoladas de amostras clínicas, apenas às vezes estão envolvidas em casos de doença.

P. aeruginosa é onipresente no ambiente hospitalar, e existe em praticamente qualquer lugar onde haja umidade, inclusive em equipamento médico e soluções de desinfetantes e sabões. Só em raros casos é encontrado como parte da microbiota normal de pessoas sadias, mas em pacientes hospitalizados as taxas de colonização aumentam de acordo com a duração da permanência hospitalar. *P. aeruginosa* pode causar infecção grave em pacientes com queimaduras, ferimentos traumáticos e cirúrgicos; após manipulação do trato urinário; em pacientes com doenças dos sistemas hematopoético, reticuloendotelial e linfoide, bem como naqueles com comprometimento das defesas celulares e humorais. A infecção pulmonar ocorre comumente em pacientes com fibrose cística. A taxa de mortalidade é maior em pacientes com leucopenia grave (menos de 1.000 neutrófilos polimorfonucleares/mm^3).

O *P. aeruginosa* produz um polissacarídeo, uma endotoxina e proteases que inativam componentes do complemento, inibindo assim até certo ponto a opsonização e a resposta inflamatória, além de, talvez, contribuir para sua invasividade. A exotoxina A promove dano celular e invasão tecidual e é tóxica para macrófagos.

Diagnóstico laboratorial

Em geral, pode-se suspeitar da presença de *P. aeruginosa* em culturas por seu odor de uva (ou tortilha de milho) mofada, por seu aspecto enrugado ou de vidro moído de suas colônias em ágar-sangue de carneiro e pela presença de um ou dos dois pigmentos: um "azul-esverdeado" fluorescente (Fig. 56.17) e/ou um metálico decorrente do pigmento pioverdina. Sua identificação pode ser feita com facilidade mediante uma reação positiva à oxidase, uma reação alcalina/neutra no TSIA, crescimento a 42°C e a formação de um brilho e/ou pigmento no TSIA e ágar P para pseudomonas. Outros testes que podem ser realizados são mostrados na Tabela 56.11. Devem ser feitos testes com carboidratos no meio basal O-F, que contém uma quantidade mínima de peptona e uma quantidade relativamente grande de carboidrato, propiciando assim a detecção de quantidades muito pequenas de ácido formado por esse grupo de bactérias. Em geral, as reações se completam em 48 horas, mas podem precisar de até 7 dias.

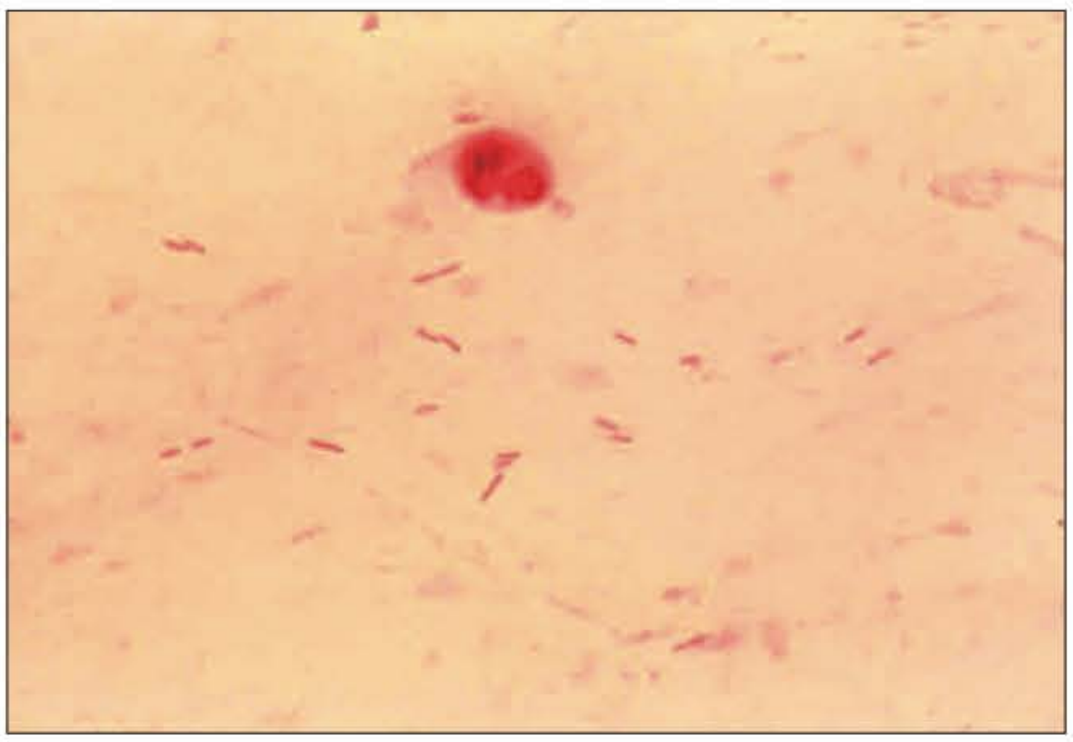


Figura 56.16 Coloração de Gram de *Pseudomonas aeruginosa* em uma amostra de escarro. Notar os bacilos Gram-negativos mais longos, em comparação com os da Figura 56.13.

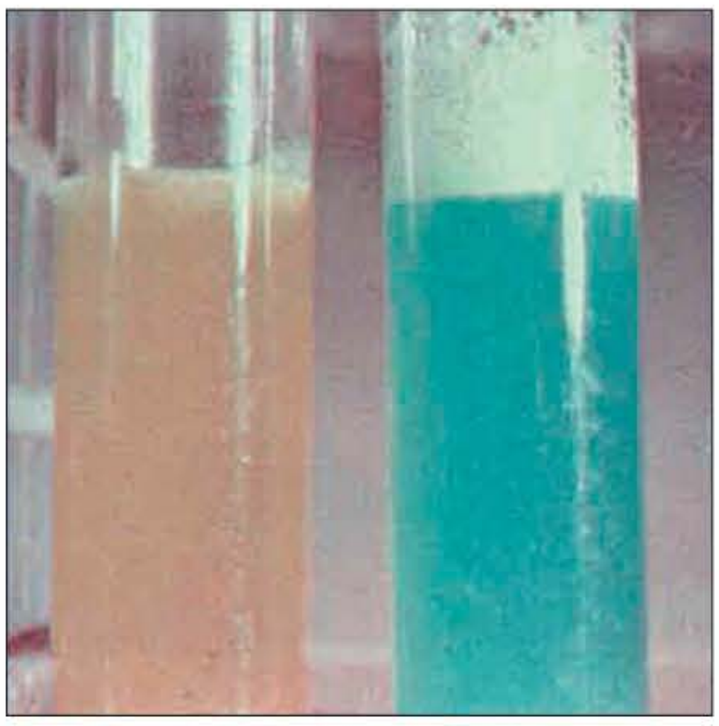


Figura 56.17 Pigmento de piocianina extraído de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 56.11 Características diferenciais de bacilos não fermentadores Gram-negativos isolados de material clínico

	Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas fluorescens*	*Pseudomonas putida*	*Burkholderi cepacia*	*Stenotrophomonas maltophilia*	*Acinetobacter baumanii*
Oxidase	+	+	+	+	–	–
Piocianina	+	–	–	–	–	–
Fluoresceína	+	–	+	–	–	–
Oxidação da glicose	+	+	+	+	+/–	+
42°C	+	–	–	+/–	+/–	+
DNase	–	–	–	–	+	–/+
Crescimento em ágar de MacConkey	+	+	+	+	+	+*
Motilidade	+	+	+	+	+	–

* Cor púrpura no ágar de MacConkey.

+/– = resultados variáveis, maioria das cepas positivas; –/+= resultados variáveis, maioria das cepas negativas.

Suscetibilidade antimicrobiana

Como regra geral, os testes de suscetibilidade devem ser feitos para todos os isolados de significado clínico de *P. aeruginosa*. As cepas hospitalares de *P. aeruginosa* podem ser resistentes a muitas classes de antibióticos. Os isolados em geral são suscetíveis aos aminoglicosídeos, às carboxi e ureidopenicilinas, à ceftazidima ou cefepina, aos carbapenéns e às quinolonas. Todavia, a resistência múltipla está aumentando, sobretudo nas unidades de tratamento intensivo e em pacientes com infecções duradouras por pseudomonas, como aqueles com fibrose cística e outras síndromes crônicas (Friedland, 2004; Hauser, 2005). Tem-se solicitado aos laboratórios que testem outros antibióticos, especialmente colistina ou polimixina B, quando esses isolados resistentes são encontrados. Recentemente, o CLSI forneceu pontos de ruptura para o teste com polimixina B que podem ser interpretados para esse fármaco e a colistina (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS 2005).

Acinetobacter

Características

Os microrganismos desse gênero são curtos, em forma de bastão ou esféricos, imóveis, oxidase-negativos, estritamente aeróbicos e Gram-negativos. Em um esfregaço corado pelo Gram, em geral aparecem em pares, e pode ser difícil corá-los.

Manifestações clínicas e patogênese

Acinetobacter spp. são encontradas comumente no solo e na água e de maneira incomum na pele e em mucosas de pessoas sadias. Sabe-se pouco sobre os fatores de virulência desse grupo de microrganismos, mas parece que formam pequenas quantidades de endotoxina. Embora sejam em geral não patogênicos, têm sido cada vez mais associados a septicemia, pneumonia, bacteriúria nosocomiais e infecção de feridas.

Diagnóstico laboratorial

Acinetobacter spp. podem ser distinguidas prontamente de pseudomonas com base na falta de mobilidade, na incapacidade de reduzir nitrato e na reação negativa à oxidase. Podem produzir colônias cor de púrpura características no ágar de MacConkey. Existem mais de 25 espécies, mas sua diferenciação é difícil e em geral são classificadas em conjunto no complexo Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumanii. As cepas clínicas não hemolíticas que oxidam glicose (cepas sacarolíticas) costumam ser designadas *A. baumanii*, enquanto as não sacarolíticas (que não oxidam a glicose) são *Acinetobacter lwoffi*, se não hemolíticas, ou *Acinetobacter haemolyticus*, se hemolíticas (Gerner-Smidt, 1991). A espécie de maior relevância clínica é *A. baumanii*.

Suscetibilidade antimicrobiana

Acinetobacter spp. são resistentes à maioria dos antibióticos β-lactâmicos e aminoglicosídicos disponíveis. A resistência aos aminoglicosídeos é causada por acetil, adenilil e fosfotransferases mediadas por plasmídeo. *Acinetobacter* spp. podem ser suscetíveis à doxiciclina, ao trimetoprim–sulfametoxazol, às quinolonas, às ureidopenicilinas, ao imipeném, à ampicilina–sulbactam e à ceftazidima. Os carbapenéns (imipeném ou meropeném) são considerados os mais ativos, porém foram descritas taxas de resistência de até 11% em cepas nosocomiais em todos os EUA (Gales, 2001). Devem ser feitos testes de suscetibilidade para isolados clínicos significativos, em geral com solicitação do clínico.

Espécies de Burkholderia

Burkholderia sp. são bastonetes aeróbicos, não formadores de esporos, Gram-negativos e, exceto Burkholderia mallei, móveis por terem flagelos polares. São catalase-positivos, e a maioria é oxidase-positiva. No ágar de MacConkey, produzem colônias lactose-negativas.

Significado clínico e patogênese

Esses microrganismos são encontrados no ambiente em água, no solo e nas plantas. Em razão de sua predileção por ambientes aquáticos, alguns podem ser encontrados no ambiente hospitalar e ter o potencial de causar infecções nosocomiais.

Dois patógenos humanos importantes do gênero Burkholderia são Burkholderia pseudomallei e Burkholderia cepacia. O primeiro, adquirido por inalação ou contato com abrasões cutâneas, causa a amelioidose. A autoinfecção pode ser assintomática, tornar-se crônica ou causar uma sepse fulminante. A amelioidose é mais prevalente no Sudeste Asiático e na Austrália, mas também pode ocorrer em outros ambientes tropicais e subtropicais.

B. cepacia, um patógeno nosocomial associado a equipamento contaminado, medicações e desinfetantes, pode causar bacteriemia, infecções do trato urinário, artrite séptica e infecções do trato respiratório. Também é um patógeno importante em pacientes com fibrose cística e naqueles com doença granulomatosa crônica. Os pacientes com fibrose cística que adquirem a infecção crônica por esse microrganismo têm uma taxa de sobrevida diminuída.

As espécies de *Burkholderia* crescem bem nos meios padrões dos laboratórios, incluindo ágar-sangue e chocolate. O isolamento de *B. cepacia* em amostras contaminadas como escarro pode ser mais fácil em meios seletivos, por exemplo, ágar para PC (*Pseudomonas cepacia*), OFBL (base fermentatiava oxidativa, polimixina B, bacitracina lactose) e BCSA (ágar seletivo para *B. cepacia*) (Welch, 1987). É necessária uma variedade de testes bioquímicos para diferenciar esses microrganismos entre si (Kiska, 1996).

Suscetibilidade antimicrobiana

A suscetibilidade desses microrganismos aos agentes antimicrobianos varia consideravelmente. *B. cepacia* é muito resistente a vários antimicrobianos, mas em geral é suscetível à piperacilaina, à ceftazidima, ao cloranafenicol e ao trimetoprim-sulfametoxazol. Cepas de pacientes com fibrose cística que receberam esquemas repetidos de antibióticos são propensas à resistência a esses agentes. O CLSI recomenda relatar apenas ceftazidima, meropeném, minociclina e trimetoprim-sulfametoxazol para *B. cepacia*.

Stenotrophomonas maltophilia

Características

Stenotrophomonas maltophilia é um patógeno nosocomial significativo. Os fatores de risco para colonização ou infecção por esse microrganismo são ventilação mecânica, uso de antibióticos de amplo espectro, cateterismo e neutropenia.

Diagnóstico laboratorial

As reações bioquímicas importantes que distinguem *S. maltophilia* são sua reação negativa à oxidase e positiva para a atividade da DNase. As colônias crescem em ágar-sangue (colônias esverdeadas como lavanda) e ágar de MacConkey; as bactérias não são móveis nem fermentativas.

Suscetibilidade antimicrobiana

S. maltophilia é inerentemente resistente a muitos antibióticos, em particular aos carbapenéns. Trimetoprim–sulfametoxazol é o antibiótico de escolha, embora algumas cepas sejam resistentes (Gales, 2001). O CLSI recomenda relatar apenas levofloxacina, trimetoprim–sulfametoxazol e minociclina. Há pontos de ruptura para a interpretação desses agentes quanto à MIC e ao teste de difusão em disco (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2005).

Outros bacilos Gram-negativos não fermentativos incluem membros dos gêneros Alcaligenes, Achromobacter, Flavobacterium, Flavimonas, Chryseomonas, Acidovorax, Brevundimonas, Comamonas e Ralstonia, entre outros. Eles são isolados com pouca frequência de amostras clínicas e, quando o são, podem representar contaminação ou colonização.

Vibrio

Características

Vibrio spp. são bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos, oxidase-positivos, curtos, curvos ou retos e em geral móveis por meio de flagelos polares; fermentam carboidratos e reduzem nitratos em nitritos. Várias espécies têm importância clínica (Tab. 56.12).

Manifestações clínicas e patogênese

Entre os vibriões, *Vibrio vulnificus* causa a doença mais grave. Infecções de feridas e septicemia causadas por esse microrganismo quase sempre são fatais. Em geral, a doença está associada ao consumo de ostras cruas ou lesão relacionada com ostras. Doença hepática preexistente quase sempre está presente na doença grave. A função hepática diminuída resulta em maior disponibilidade de ferro e parece facilitar o crescimento do microrganismo.

A produção da toxina do cólera pelo *Vibrio cholerae* O1 é uma causa bem conhecida de epidemias dessa doença, que se manifesta por perda intestinal maciça de líquido e desidratação. A toxina do cólera medeia esse efeito ao ligar-se e ativar a adenilato ciclase das células no intestino delgado, resultando em hiperssecreção de eletrólitos e água (Kaper, 1995). Cepas não O1 do *V. cholerae* causam uma gastroenterite autolimitada, mas não são responsáveis por epidemias da doença. Quase todas as cepas não O1 do *V. cholerae* não produzem a toxina do cólera, mas sim dois tipos de hemolisinas e uma enterotoxina termoestável.

Vibrio mimicus e *Vibrio parahaemolyticus* causam primariamente gastroenterite. O mecanismo da patogenicidade do *V. parahaemolyticus* parece estar mais relacionado com a invasividade que com a produção da enterotoxina. Mais de 95% dos isolados de *V. parahaemolyticus* de pacientes com gastroenterite produzem uma hemolisina livre da célula que é letal para camundongos quando injetada em altas doses e é descrita como fenômeno de Kanagawa. Esse microrganismo halofílico está muito distribuído no ambiente marinho, podendo contaminar peixes e mariscos. Surtos de doença diarreica aguda após a ingestão de alimento contaminado são sobretudo comuns no Japão, mas também ocorreram nos EUA e em outros países.

Diagnóstico laboratorial

Embora antigamente só causasse preocupação quanto a viajantes dos EUA para outros países, foram descritos casos de doença causada pelo *V. cholerae* nos EUA, associados à ingestão de mariscos contaminados provenientes da Costa do Golfo. Além disso, a gastroenterite causada pelo *V. parahaemolyticus* e por outros vibriões halofílicos em

Tabela 56.12 Características diferenciais das espécies de *Vibrio*

Teste	*V. cholerae*	*V. mimicus*	*V. damsela*	*V. parahaemolyticus*	*V. alginolyticus*	*V. vulnificus*	*V. fluvialis*	*V. metschnikovii*	*V. hollisae*
Indol	+	+	–	+ ou –	D	+	– ou +	D	+
Voges–Proskauer	– ou +	–	+	–	+	–	–	+	–
Lisina descarboxilase	+	+	+	+	+	+	–	D	–
Ornitina descarboxilase	+	+	–	+ ou –	D	D	–	–	–
Arginina di-hidrolase	–	–	+	–	–	–	+	D	–
Lactose	(+)	– ou +	–	–	–	+	–	D	–
Sacarose	+	+	–	+	+	D	+	+	–
Manitol	+	+	–	+	+	D	+	+	–
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Arabinose	–	–	– ou +	–	–	–	+	–	+
Salicina	–	–	–	–	–	+	–	– ou +	–
Celobiose	–	–	–	–	–	+	D	– ou +	–
$NO_3 \rightarrow NO_2$	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Crescimento em caldo nutritivo mais NaCl (%)									
0	+	+	–	–	–	–	F+ ou –	–	–
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	– ou (+)	– ou (+)	+	+	+	+	+	+	(+)
8	–	–	–	+	+	–	–	D	–
10	–	–	–	–	+	–	–	D	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Ver símbolos na Tabela 56.9.

F+ = fracamente positivo.

mariscos contaminados foi descrita em muitas partes daquele país, em particular em áreas costeiras. Assim, é importante que os laboratórios clínicos possam cultivar espécies de *Vibrio* a partir de fezes quando indicado, com base na história de viagens e consumo alimentar.

Com exceção do *V. cholerae* e do *V. mimicus*, o crescimento desse grupo de microrganismos requer meios que contenham NaCl. A maioria dos meios sólidos e líquidos usados para cultura de bactérias contém bastante sódio, de modo que o uso de meios especiais em tais circunstâncias não é necessário. Meios seletivos com sacarose, como o de sais biliares com tiossulfato citratado, são muito úteis para cultivar *Vibrio* spp. em amostras fecais. Certas espécies (*V. cholerae* e *Vibrio alginolyticus*) fermentam a sacarose e mostram-se como colônias amarelas nesse meio. Um meio enriquecido, como o de água peptona alcalina, pode ser usado antes para uma subcultura em meio sólido, a fim de facilitar a recuperação de *Vibrio* spp. nas fezes. É possível diferenciar as espécies desse gênero e de outros bacilos entéricos Gram-negativos de acordo com as reações listadas na Tabela 56.12. Pode ser necessário realizar testes bioquímicos com vibriões halofílicos em meios suplementados com NaCl a 1 a 3%. Se forem inoculados em TSIA e ágar-ferro-lisina (LIA) com propósitos de triagem, suas reações serão ácidas slant/ácidas butt sem gás (A/A) ou H_2S e alcalinas slant/alcalinas butt (K/K), respectivamente. Nem todos os sistemas de identificação Gram-negativa disponíveis no comércio são confiáveis para a identificação de *Vibrio* spp., e só devem ser usados quando ficar comprovado que são acurados.

Suscetibilidade antimicrobiana

Podem ser feitos testes para detectar a suscetibilidade antimicrobiana pelo método da difusão em disco com ágar de Mueller-Hinton e microdiluição em caldo usando-se o caldo de Mueller-Hinton ajustado com cátion e incubação a 35°C por 16 a 18 horas. O CLSI estabeleceu padrões de interpretação para o *V. cholerae* testado com ampicilina, tetraciclina, doxiciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol e sulfonamidas (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2005). Não existem padrões de interpretação para outras espécies de *Vibrio*.

Aeromonas

Características

Os membros desse gênero são bacilos Gram-negativos em forma de bastão anaeróbios facultativos, oxidase e catalase-positivos. Em geral são móveis por meio de flagelos polares, embora algumas espécies possam ser imóveis. Formam ácidos a partir de carboidratos por metabolismo respiratório e fermentativo e reduzem nitratos em nitritos.

Manifestações clínicas e patogênese

Aeromonas spp. são encontradas sobretudo em ambientes aquáticos, tendo sido isoladas de água potável, rios, solo e vários alimentos, e apenas raramente são encontradas em ambientes marinhos. Esses microrganismos têm sido associados tanto a doença intestinal quanto extraintestinal. Embora não haja evidência definitiva que demonstre seu papel na doença gastrintestinal, sua presença nas fezes é mais frequentemente associada a diarreia que a um estado de portador assintomático. É possível que seu papel na etiologia de doença diarreica esteja relacionado com a produção de uma enterotoxina por algumas cepas. Também foram descritas uma hemolisina e um fator citopático. Tais espécies podem causar ainda infecção de feridas adquiridas de forma traumática ou septicemia em pacientes imunocomprometidos (Janda, 1991, 1994).

Diagnóstico laboratorial

O isolamento de um bacilo Gram-negativo fermentador e oxidase-positivo de uma amostra apropriada deve sugerir a possibilidade de *Aeromonas* spp., que crescem prontamente nos meios convencionais de laboratório e produzem colônias que lembram as de *Pseudomonas* spp., esverdeadas, com aspecto de vidro moído e cheiro de fruta. A maioria das espécies é β-hemolítica em ágar-sangue. O isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de amostras fecais pode ser mais fácil pela inoculação em ágar-sangue que contenha ampicilina ou meio CIN. Existem mais de 14 espécies reconhecidas desse gênero; o complexo *Aeromonas hydrophila*, o complexo *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* são os isolados mais comuns de amostras humanas.

Suscetibilidade antimicrobiana

Aeromonas spp. são suscetíveis às quinolonas, aminoglicosídeos, carbapenéns e trimetoprim-sulfametoxazol, mas produzem uma β-lactamase que medeia a resistência às penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (Abbott, 2003a). Pode ser difícil detectar carbapenemases, ainda que sejam raras, pelos métodos convencionais para detectar suscetibilidade, incluindo sistemas automatizados (Rossolini, 1996). Observou-se que as espécies de Aeromonas mantêm resistência a plasmídeos tanto de *Enterobacteriaceae* quanto de *Pseudomonas* spp.

Campylobacter

Características

Campylobacter spp. são bacilos Gram-negativos pequenos (0,5 a 8 μm de comprimento por 0,2 a 0,5 μm de largura), móveis, não formadores de esporos, curvos (em forma de vírgula) ou em forma de S, que crescem otimamente em uma atmosfera que contenha 5 a 10% de oxigênio e, portanto, são considerados microaerofílicos. A Figura 56.18 é a coloração de Gram de um *Campylobacter jejuni* de cultura. O *C. jejuni* é a causa mais comum de enterite bacteriana nos EUA. Outras espécies do mesmo gênero associadas a enterite são *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis*. *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* é uma causa de tromboflebite séptica, artrite, peritonite, abscessos e pericardite (Penner, 1988), especialmente em pessoas com alguma doença crônica subjacente.

Manifestações clínicas e patogênese

C. jejuni é encontrado em todo o mundo como comensal do trato gastrintestinal de bovídeos silvestres ou domesticados, ovinos, suínos, caprinos, cães, gatos e aves, sobretudo perus e galinhas. É a causa mais comum de enterite antibacteriana nos EUA, com uma ocorrência estimada de 1.000 casos por 100.000 indivíduos. A incidência da infecção no Reino Unido e em outras nações desenvolvidas é semelhante à observada nos EUA, enquanto nos países subdesenvolvidos provavelmente é maior. As infecções em geral ocorrem no verão e no outono, sendo com frequência resultantes da ingestão de alimentos mal cozidos, em geral aves de granja. Além disso, vários surtos de *C. jejuni* foram associados a leite não pasteurizado e defeitos em sistemas municipais de água. O espectro de doença varia de assintomática a grave. A diarreia pode ter ou não sangue ou leucócitos fecais. Os sintomas podem durar até uma semana e em geral são autolimitados. Também podem ocorrer infecções extraintestinais, como bacteriemia, artrite reativa, infecções do trato urinário e meningite. O *C. jejuni* é a causa antecedente mais conhecida de síndrome de Guillain-Barré. A patogênese desse microrganismo não é entendida por completo; parece que ele coloniza primeiro a camada mucosa intestinal e em seguida é capaz de se translocar através da superfície epitelial para o tecido subjacente.

O principal hábitat do *C. fetus* subespécie fetus é o intestino de ovinos e bovinos, mas também pode ser encontrado no trato genital desses animais, em suas placentas, no conteúdo gástrico de fetos abortados e, com menor frequência, em outros animais e aves. Os

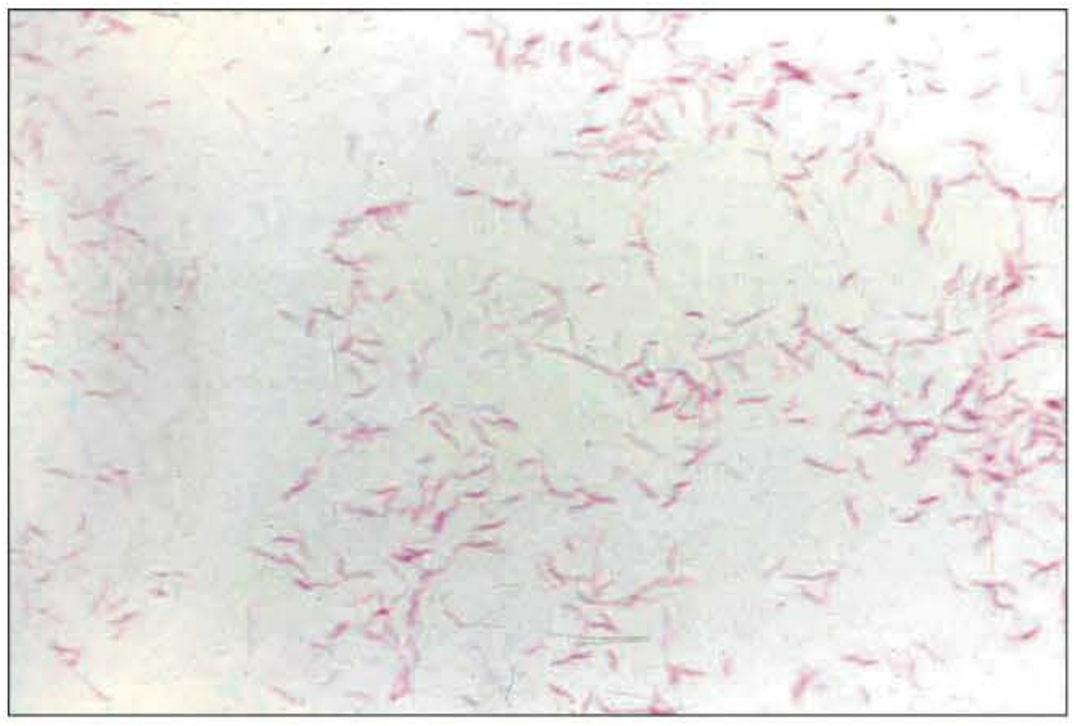


Figura 56.18 *Campylobacter jejuni* corado pelo Gram: notar o aspecto em forma de vírgula dos bacilos.

mecanismos de transmissão da infecção para humanos não são completamente entendidos. O contato direto com um animal infectado é possível, porém menos de um terço dos indivíduos infectados tem antecedentes de exposição ambiental ou ocupacional. Alimento ou água contaminados podem ser veículos para a infecção, ou ela pode originar-se de uma fonte endógena.

Diagnóstico laboratorial

Uma única amostra fecal geralmente é adequada para detectar patógenos entéricos, como *Campylobacter* spp. O exame para leucócitos fecais não é recomendado porque eles podem estar presentes em apenas 25% dos casos. Existe um ensaio imunoenzimático (EIA) para a detecção direta dos antígenos de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras fecais (Tolcin, 2000; Dediste, 2003).

Vários meios podem ser usados para o isolamento seletivo de *Campylobacter* spp., incluindo ágar com carvão-cefoperazona-desoxicolato, meio seletivo à base de carvão, meio semissólido para motilidade sem sangue, meio de Skirrow e ágar para *Campylobacter* com 5% de sangue ovino e cinco antimicrobianos (cefalotina, trimetoprim, vancomicina, polimixina B e anfotericina B). A maioria das espécies de *Campylobacter* requer um ambiente microaeróbico (5% de O_2, 10% de CO_2 e 85% de N_2), que pode ser produzido com embalagens geradoras de gás. A quantidade de oxigênio em um frasco com vela é muito baixa para manter o crescimento de *Campylobacter* spp., e por essa razão o frasco não deve ser usado. A incubação das placas a 42°C aumenta a seletividade para *C. jejuni*.

Caso se suspeite de *Campylobacter* spp. em uma cultura de sangue com base na história clínica ou no aspecto de um microrganismo à coloração de Gram, o caldo deve ser submetido novamente a cultura em uma placa não seletiva com ágar-sangue e incubado a 37°C em ambiente microaeróbico.

Em geral, *Campylobacter* spp. produzem colônias cinzentas, achatadas, irregulares e dispersas, que podem tornar-se arredondadas, convexas e brilhantes à medida que o conteúdo nos meios é reduzido. Um aspecto típico à coloração de Gram e uma reação positiva à oxidase de uma colônia que tenha crescido em um meio seletivo a 42°C podem ser relatados como *Campylobacter* spp. O *C. jejuni* é capaz de hidrolisar hipurato, é suscetível ao ácido nalidíxico e resistente à cefalotina. O *C. coli* é negativo para a hipuricase.

Cepas de *C. fetus* subespécie fetus são resistentes ao ácido nalidíxico, não hidrolisam hipurato e ordinariamente não crescem a 42°C.

Suscetibilidade antimicrobiana

O *C. jejuni* é variavelmente suscetível aos agentes antimicrobianos. A maioria não é suscetível às penicilinas ou cefalosporinas. Nos casos de infecção intestinal, a eritromicina é o fármaco de escolha, e as quinolonas são como terapia alternativa. No entanto, o tratamento em geral não proporciona garantia na gastroenterite simples por *Campylobacter* sp. em um indivíduo sadio nos demais aspectos. Foi encontrada resistência a ambos os agentes. Até o momento, não existem métodos padronizados para testar a suscetibilidade desse grupo de microrganismos, mas um documento do CLSI dá orientações para tais testes agora em um formato proposto (CLSI, M-4SP).

Helicobacter

Características

Helicobacter spp. são bacilos Gram-negativos espiralados ou curvos e não formadores de esporos, que medem de 0,3 a 1 μm de largura e de 1,5 a 10 μm de comprimento. São móveis por flagelos múltiplos bipolares ou monopolares, aeróbicos e têm um metabolismo respiratório.

Manifestações clínicas e patogênese

Helicobacter spp. são encontradas no trato gastrintestinal de mamíferos e aves. A transmissão de um hospedeiro para outro ocorre tanto por via oral-oral quanto fecal-oral. Helicobacter pylori é considerada uma das espécies "gástricas" desse gênero. No estômago, vive dentro ou sob a camada mucosa adjacente ao epitélio, mas também é encontrada no duodeno, na saliva e nas fezes.

A infecção com *H. pylori* pode resultar em sintomas agudos de gastrite. A maioria dos pacientes infectados desenvolve gastrite crônica ativa, que pode levar a dispepsia não ulcerosa ou úlceras duodenais. O *H. pylori* foi associado a 90% das úlceras duodenais e quase todas as úlceras gástricas. A infecção com *H. pylori* também foi associada a carcinoma e linfoma gástricos (Parsonnet, 1991, 1994; Murray, 1993). A prevalência da gastrite associada ao *H. pylori* aumenta com a idade, sugerindo que o microrganismo é adquirido à medida que as pessoas ficam mais velhas.

As espécies "entéricas" de *Helicobacter*, como *H.* (antigamente *Campylobacter*) *cinaedi* e *H. fennelliae*, foram implicadas em casos de gastroenterite. Em raros casos, esses microrganismos podem invadir a corrente sanguínea e ser isolados de hemoculturas.

Diagnóstico laboratorial

Tipicamente, métodos que não cultura têm sido utilizados para diagnosticar a infecção por *H. pylori*. Caldo de ureia é usado em um desses testes, um teste não invasivo que detecta a atividade da urease do *H. pylori* medindo o CO_2 marcado com C^{14} e C^{13} no ar expelido pelo paciente após ingestão de ureia marcada. Ensaios sorológicos também são bastante usados em pacientes sintomáticos para detectar anticorpos contra o *H. pylori*, mas como a maioria dos adultos já foi exposta ao *H. pylori*, esse teste pode ser inespecífico, exceto como um recurso epidemiológico ou de vigilância sanitária. Em alguns casos, são obtidas biópsias dos tecidos acometidos, e essas são submetidas a exame histológico após coloração com hematoxilina e eosina ou Gram, para detectar a presença de microrganismos com a morfologia típica do *H. pylori*. Como o microrganismo hidrolisa a ureia de maneira muito rápida, parte da biópsia gástrica pode ser colocada diretamente no caldo com ureia ou em ágar com ureia, para detectar hidrólise da ureia em 1 a 24 horas (teste CLO). Um EIA comercial para a detecção do antígeno de *H. pylori* nas fezes é uma alternativa não invasiva para o diagnóstico de infecção pelo *H. pylori* (Premier Platinum HpSA, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH). A sensibilidade desse ensaio chega a 89%, com especificidade de até 95% (Montiero, 2001). A PCR também foi relatada como um método sensível para detecção de *H. pylori* (Makristathis, 1998).

Para cultura, as amostras de tecido devem ser mantidas a 4°C e processadas até duas horas depois da colheita. Os meios de transporte incluem caldo de Brucella com 20% de glicerol, caldo Alberti de glicerina com 20% de glicerol, solução fisiológica isotônica com 4% de glicose e meios de transporte de Stuart. As amostras processadas podem ser inoculadas em um de vários meios, como infusão de coração e cérebro (BHIA), Brucella, Columbia ou Skirrow suplementado com sangue equino, soro equino ou sangue de carneiro. O acréscimo de vancomicina, anfotericina e cefsulodina é recomendado como agentes seletivos. Os meios inoculados devem ser incubados em uma atmosfera microaeróbica (5 a 10% de CO_2, 80 a 90% de N_2 e 5 a 10% de O_2) sob alta umidade a 35°C por 5 a 7 dias. O acréscimo de 5 a 8% de H_2 na atmosfera facilita o crescimento do *H. pylori*, que em geral produz colônias pequenas, cinzentas e translúcidas nesses meios, tem o aspecto espiralado Gram-negativo característico em esfregaços corados e é positivo para oxidase, catalase e urease. As fezes em geral não são cultivadas para *Helicobacter* spp. entéricas. Tais espécies crescem e podem ser detectadas por sistemas de hemocultura automatizados em uso em muitos laboratórios, mas podem requerer incubação por mais tempo que os 5 dias habituais.

Suscetibilidade antimicrobiana

Esquemas com múltiplos fármacos são usados para tratar a infecção por *H. pylori*. Em geral, incluem dois antibióticos (metronidazol, claritromicina, tetraciclina ou amoxicilina) e um "antiácido". Cepas resistentes ao metronidazol e à claritromicina foram relatadas. Para testes de suscetibilidade, o CSLI recomenda diluição em ágar usando-se ágar de Mueller-Hinton mais 5% de sangue de carneiro (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2005). São fornecidos os pontos de ruptura para a claritromicina.

Haemophilus

Características

Os membros desse gênero são bastonetes Gram-negativos oxidase-positivos, anaeróbicos facultativos, pequenos, pleomórficos ou cocobacilos com necessidade potencial de fator X (hemina) e/ou V (NAD). A Figura 56.19 mostra um *H. influenzae* em uma amostra de abscesso cerebral.

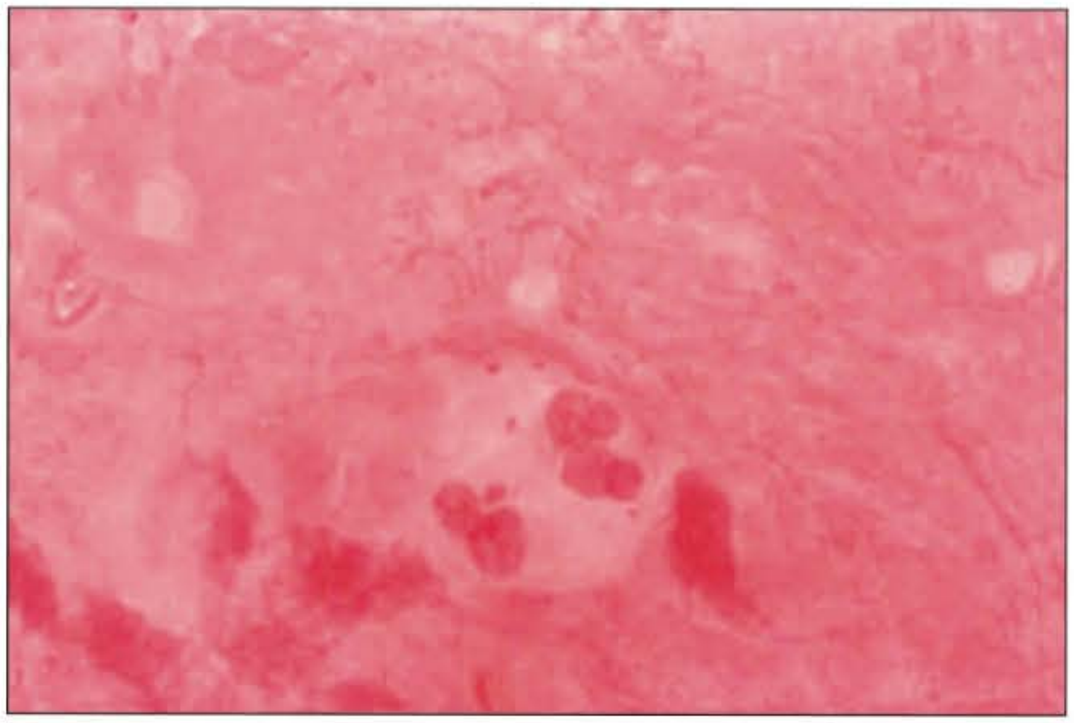


Figura 56.19 Cocobacilos de *Haemophilus influenzae* corados pelo Gram em amostra de um abscesso cerebral.

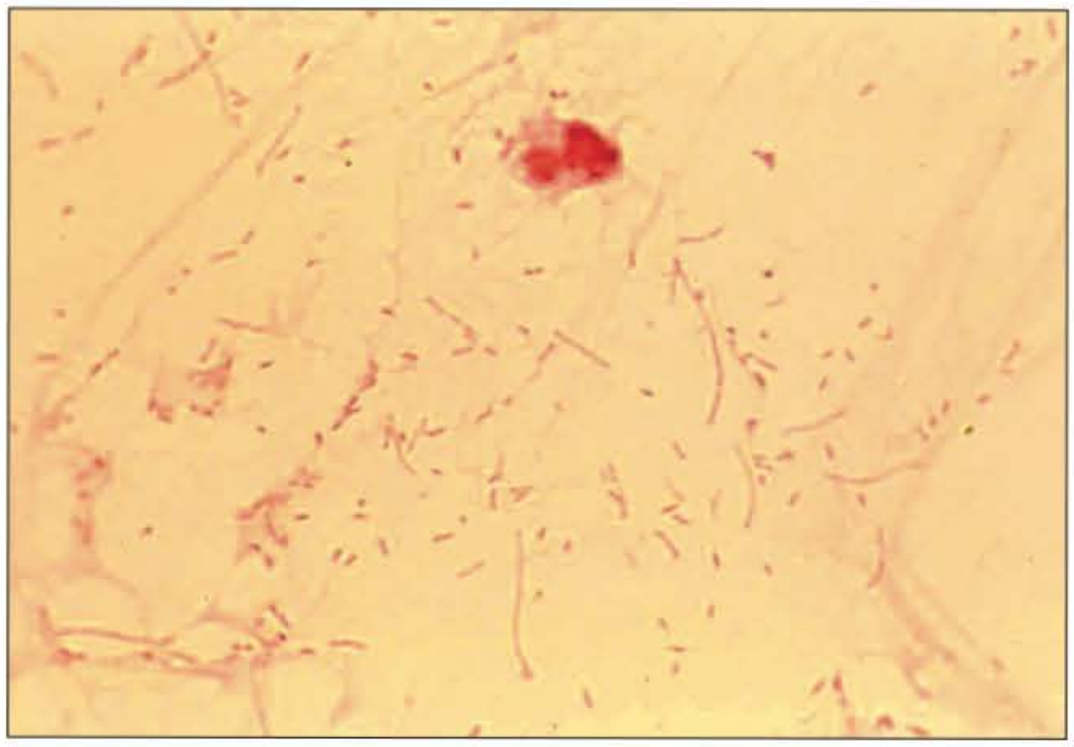


Figura 56.20 Notar a natureza pleomórfica do *Haemophilus influenzae* vista nessa coloração de Gram do líquido cerebrospinal.

Manifestações clínicas e patogênese

A maioria das *Haemophilus* spp. é habitante normal do trato respiratório superior. Algumas podem residir no trato gastrintestinal ou urogenital. Ocorre disseminação interpessoal por gotículas respiratórias. As infecções causadas por *Haemophilus* spp. variam de conjuntivite e otite média a meningite e endocardite. Aquelas em geral consideradas patógenos humanos são *H. influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi* e *Haemophilus aphrophilus*.

O principal fator de virulência do *H. influenzae* é a cápsula polissacarídica, da qual há seis sorotipos (a–f). As cepas que não possuem cápsula são conhecidas como não tipáveis. A endotoxina não é produzida pelo *H. influenza*, e a espécie é rapidamente morta assim que é ingerida por macrófagos, a menos que haja deficiência de anticorpo, complemento ou fagócitos. O papel dos anticorpos na imunidade também é pouco entendido. Os anticorpos se desenvolvem com a idade, presumivelmente após infecção natural com *H. influenzae* ou com microrganismos que tenham reação antigênica cruzada, de modo que a maioria das pessoas com mais de 15 anos de idade tem anticorpos. Não se sabe que anticorpos são protetores, nem o nível deles em que funcionam assim.

Desde a introdução de uma vacina contra *H. influenzae* do tipo b em meados da década de 1980, houve uma queda acentuada na incidência de infecção invasiva, como meningite e epiglotite causadas por esse microrganismo (Centers for Disease Control, 1994). A Figura 56.20 demonstra a natureza pleomórfica dessa bactéria, conforme observada nessa amostra de LCE. Cepas não tipáveis de *H. influenzae* são associadas mais frequentemente a otite média aguda e exacerbações agudas de bronquite crônica. Em geral, o *H. parainfluenzae* é um comensal no trato respiratório superior, mas também pode causar doença grave, como endocardite. O *H. aphrophilus*, outro comensal do trato respiratório superior, pode causar endocardite, abscesso cerebral, pneumonia, meningite e bacteriúria. O *H. ducreyi* é responsável pela doença sexualmente transmissível cancroide.

Diagnóstico laboratorial

O isolamento de *Haemophilus* spp. em geral requer a presença de fator X e/ou V no meio de cultura. O primeiro é mais frequentemente fornecido pela incorporação de hemácias lisadas pelo calor ("chocolatadas") em ágar, embora também possa ser fornecido por hemácias humanas, de equino ou de coelho. O fator V (NAD) é comumente fornecido pela incorporação de extrato de levedura ou outros suplementos apropriados no meio ou por uma suspensão de estafilococos, riscada na superfície do ágar e em torno da qual crescem colônias satélites de cepas dependentes de *Haemophilus* spp. As características diferenciais dos membros desse gênero estão relacionadas na Tabela 56.13.

As necessidades dos fatores X e V são determinadas pela ausência ou presença de crescimento nos meios que contêm esses fatores. Um método alternativo para testar a dependência de fator X é o teste da profirina descrito por Kilian (1974), que determina a capacidade de espécies dependentes usarem o ácido δ-aminolevulínico na biossíntese de porfobilinogênio e porfirinas. A formação de porfobilinogênio pode ser detectada pela adição de reagente de Kovac à mistura da reação e pela observação do desenvolvimento de uma cor vermelha na fase aquosa. Uma alternativa é demonstrar a formação de porfirinas na mistura da reação por fluorescência vermelha sob uma lâmpada de Wood. As propriedades hemolíticas de *Haemophilus* spp. podem ser determinadas em ágar-sangue de coelho ou equino.

Em geral, deve-se distinguir *H. aphrophilus* de espécies como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis* e *Eikenella corrodens* (Tab. 56.14), todas associadas a endocardite bacteriana subaguda.

O cultivo de *H. ducreyi* a partir de lesões cancroides é problemático. Um esfregaço de material da lesão corado pelo Gram pode ser útil quando são vistos bacilos Gram-negativos em pares ou fileiras ("cardumes de peixe"). A Figura 56.21 mostra uma coloração de Gram "típica" de *H. ducreyi* de material clínico. O material pode ser inoculado em meio básico GC mais 1% de hemoglobina, 5 a 10% de soro de feto de bezerro, 1%

Tabela 56.13 Características diferenciais das espécies de *Haemophilus* de importância médica

	Porfirina	Dependente do fator X	Dependente do fator V	Aumenta com CO_2	Hemólise*	Catalase
Haemophilus influenzae	−	+	+	+	−	+
Haemophilus haemolyticus	−	+	+	−	+	+
Haemophilus parahaemolyticus	+	−	+	−	+	V
Haemophilus ducreyi	−	+	−	V	−	−
Haemophilus parainfluenzae	+	−	+	V	−	V
Haemophilus aphrophilus	+	−	−	+	−	−
Haemophilus paraprophilus	+	−	−	+	−	−

* Em sangue de equinos e coelhos.

Fonte: adaptado de Mahon CR, Manuselis G: Textbook of Diagnostic Microbiology, 2ª ed. London, WB Saunders, 2000, p. 435.

Tabela 56.14 Características diferenciais de *Haemophilus aphrophilus, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*

Teste	*H. aphrophilus*	*A. actinomycetemcomitans*	*C. hominis*	*E. corrodens*	*K. kingae*
Oxidase	+/–	–/F	+	+	+
Catalase	–	+	–	–	–
Utilização de δ-ALA	+	+	+	+	+
Necessidade de V	–	–	–	–	–
Indol	–	–	+	–	–
Urease	–	–	–	–	–
Lisina descarboxilase	–	–	–	+	–
Ácido a partir de glicose	+	+	+	–	(+)
Sacarose	+	–	+	–	–
Lactose	+	–	–	–	–
Manitol	–	+	D	–	–
Xilose	–	D	–	–	–

δ-ALA = ácido δ-aminolevulínico; F = fraco.

Ver símbolos na Tabela 56.9.

Figura 56.21 Bacilos de *Haemophilus ducreyi* de uma lesão genital.

de IsoVitaleX (BBL Microbiology Systems) e 3 μg/mL de vancomicina, ou em ágar de Mueller-Hinton mais 5% de sangue equino, 1% de fator vitamina enriquecido com aminoácido e 3 μg/mL de vancomicina.

Suscetibilidade antimicrobiana

Hoje em dia, o CSLI recomenda testar *H. influenzae* isolado de sangue ou LCE contra ampicilina, cloranfenicol, uma cefalosporina de terceira geração e meropeném (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2003a). A resistência à ampicilina pode chegar a 40 a 60% nos EUA, variando conforme a geografia, e em geral pode ser mediada pela produção de β-lactamase, mas raros isolados são resistentes com base em alterações na permeabilidade da membrana externa ou afinidade pelas proteínas de ligação da penicilina. A resistência às cefalosporinas de segunda ou terceira geração não foi documentada nos EUA. O teste de suscetibilidade de *H. influenzae* requer o uso de meio de teste para Haemophilus (HTM). O tratamento recomendado para a autoinfecção por *H. ducreyi* é eritromicina; agentes alternativos incluem azitromicina, ciprofloxaina, ceftriaxona, amoxicilina-clavulanato e trimetoprim-sulfametoxazol. Embora não haja muitos dados sobre a suscetibilidade de outras espécies do gênero aos antibióticos, presume-se que a resistência seja maior entre cepas de *H. influenzae*.

Bactérias Gram-negativas – bactérias HACEK

Há cinco pequenos cocobacilos Gram-negativos que fazem parte da microbiota oral normal e são em alguns casos associados a endocardite bacteriana e, em raros casos, a outras infecções. São oportunistas que entram na corrente sanguínea, colonizam valvas cardíacas danificadas e causam uma forma lentamente progressiva e indolente e endocardite. Em geral requerem 1 a 2 dias a mais antes do isolamento em hemoculturas, e são uniformemente suscetíveis a muitos agentes antimicrobianos. A sigla HACEK vem de *Haemophilus* sp. (influenzae, parainfluenzae e aphrophilus mais comumente), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella* sp. As características diferenciais dos membros desse grupo estão relacionadas na Tabela 56.14.

Haemophilus sp.

H. influenzae foi discutido neste capítulo. *H. aphrophilus* também faz parte do grupo HACEK e não requer fator X ou V, de modo que pode crescer facilmente em ágar-sangue ou chocolate e não requerer CO_2 para seu crescimento. Em geral é suscetível a agentes β-lactâmicos; o tratamento normalmente consiste na combinação de um β-lactâmico com um aminoglicosídeo.

Actinobacillus

Características

A. actinomycetemcomitans é um cocobacilo Gram-negativo não formador de esporos ou bastonete curto, que cresce tanto aeróbica quanto anaerobicamente. O acréscimo de 5 a 10% de CO_2 facilita o crescimento. As colônias em ágar-sangue surgem lentamente e permanecem pequenas.

Manifestações clínicas e patogênese

Os actinobacilos são encontrados nas mucosas dos tratos respiratório e geniturinário de humanos e animais. Em geral, causam doença apenas em indivíduos imunocomprometidos ou quando são introduzidos acidentalmente no tecido circundante sadio, por exemplo, por traumatismo. *A. actinomycetemcomitans* tem baixo nível de patogenicidade. Seu nome deriva de sua associação frequente a lesões actinomicóticas. Contudo, nos últimos anos, foi mais frequentemente relatada como uma causa de endocardite bacteriana subaguda, periodontite e abscesso cerebral. Dois fatores de virulência são conhecidos: uma leucotoxina e uma colagenase.

Diagnóstico laboratorial

A. actinomycetemcomitans cresce em ágar-sangue e chocolate. Após 24 a 72 horas, as colônias têm 1 a 3 mm de diâmetro e um enrugamento central. O microrganismo é catalase-positivo, oxidase-negativo ou fracamente positivo e urease-negativo. É preciso recorrer a outros ensaios bioquímicos para diferenciá-lo de outros bacilos Gram-negativos de crescimento lento um tanto exigentes (Tab. 56.14).

Suscetibilidade antimicrobiana

Esse microrganismo é resistente à penicilina, mas em geral é suscetível a muitos outros antibióticos, incluindo cefalosporinas,

combinações de β-lactâmicos com inibidor da β-lactamase, fluoroquinolonas e tetraciclina.

Cardiobacterium hominis

Características

C. hominis é um bacilo Gram-negativo não formador de esporos que faz parte da microbiota oral normal. É um anaeróbio facultativo que não requer CO_2, embora seu crescimento seja facilitado em condições microaerofílicas. O crescimento ocorre em ágar-sangue e chocolate, mas não no ágar de MacConkey, e é melhor se deixado por mais de 48 horas.

Manifestações clínicas e patogênese

Cardiobacterium hominis pode causar endocardite bacteriana subaguda, semelhante a outros membros HACEK; também pode ser responsável por casos de periodontite.

Diagnóstico laboratorial

As colônias com 48 horas de incubação são pequenas e podem ter um pigmento amarelo, embora a maioria seja branca. O microrganismo em geral é positivo para a oxidase e o indol, mas negativo para catalase, urease, esculina e redução de nitrato. Pode haver produção de ácido a partir de glicose, maltose e sacarose.

Suscetibilidade antimicrobiana

Em geral, os isolados são suscetíveis às penicilinas e cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclinas. É comum a resistência à clindamicina. Ainda não foram relatadas β-lactamases.

Eikenella

Características

Antigamente classificadas como Bacteroides corrodens, os "bacilos corrosivos" facultativamente anaeróbicos passaram a ser designados Eikenella corrodens. Tais microrganismos são bacilos Gram-negativos oxidase-positivos, catalase-negativos e não fermentativos, cujas colônias podem corroer o ágar ou formar fossetas nele. O crescimento é facilitado por 5 a 10% de CO_2 e em geral requer a presença de fator X no meio.

Manifestações clínicas e patogênese

Pouco se sabe sobre os fatores que contribuem para a virulência do microrganismo, mas sabe-se que ele tem baixa patogenicidade para animais. E. corrodens reside predominantemente na cavidade oral e é isolada com frequência do trato respiratório superior. Como as outras bactérias HACEK, é responsável pela endocardite bacteriana subaguda. Foi recuperada de abscessos, celulite e infecções de feridas, em geral após mordidas humanas. As infecções costumam estar misturadas com outros microrganismos.

Diagnóstico laboratorial

O crescimento é observado em ágar-sangue ou chocolate, mas não no de MacConkey. Os fatores mais marcantes de E. corrodens em cultura são o odor distintivo de água sanitária e as fossetas características no ágar, mas não ocorrem fossetas com todas as cepas. As colônias aparecem lentamente (2 a 4 dias) e em geral são pequenas (0,5–1 mm de diâmetro). Quase sempre E. corrodens tem de ser distinguida de outros bacilos Gram-negativos exigentes de crescimento lento (Tab. 56.14).

Suscetibilidade antimicrobiana

E. corrodens é suscetível às penicilinas, às quinolonas e à tetraciclina, variavelmente suscetível aos aminoglicosídeos e resistente à clindamicina e ao metronidazol.

Kingella sp.

Características

Kingella abrange três espécies reconhecidas: *K. kingae* (uma das espécies HACEK), *Kingella oralis* e *Kingella denitrificans*. São bastonetes a cocobacilos Gram-negativos que requerem mais CO_2 para seu crescimento ótimo. As colônias crescem em ágar-sangue (β-hemolíticas) e chocolate, mas não no de MacConkey após dois dias.

Manifestações clínicas e patogênese

K. kingae é a mais patogênica das três espécies. É um membro do grupo HACEK, causando uma endocardite indolente, lentamente progressiva. Além disso, está associada a artrite séptica/osteomielite, em geral em crianças, e septicemia.

Diagnóstico laboratorial

K. kingae é oxidase-positiva e produz ácido a partir de glicose, embora de maneira tardia. É negativa para o indol e a catalase.

Suscetibilidade antimicrobiana

K. kingae é suscetível à penicilina e à maioria dos outros antibióticos aos quais outros membros do grupo HACEK são suscetíveis.

Outros bacilos Gram-negativos

Legionella

Características

Legionella spp. são bacilos Gram-negativos que não formam esporos, são delgados e coram-se levemente. Foram reconhecidas pela primeira vez como causa de doença humana durante uma epidemia de pneumonia entre membros da Pennsylvania American Legion que chegaram à Filadélfia para celebrar o bicentenário em 1976. Existem hoje mais de 20 espécies denominadas e várias ainda sem nome. A maioria dos casos clínicos foi causada por Legionella pneumophila, sorogrupo 1. A Figura 56.22 demonstra a excelente coloração de *Legionella* spp. com um corante de prata Dieterle.

Manifestações clínicas e patogênese

Legionella spp. são encontradas no ambiente associadas à água. Acredita-se que o crescimento dentro de protozoários ambientais seja um fator importante para a sobrevivência do microrganismo no ambiente. A transmissão para humanos ocorre pela exposição a água contaminada (p. ex., de torneiras, chuveiros, fontes públicas). Não se tem notícia de infecção interpessoal ou adquirida em laboratório.

As infecções podem ser subclínicas, pulmonares ou extrapulmonares. Em geral manifestam-se como uma pneumonia fibrinopurulenta aguda, com distribuição lobular. Em termos histológicos, há um infiltrado alveolar de neutrófilos e macrófagos, acompanhado por extravasamento de fibrina e hemácias. *Legionella* spp. podem ser encontradas dentro de macrófagos alveolares. A Figura 56.23 é a coloração de Gram do escarro de um paciente com pneumonia por *L. pneumophila*, bactéria também isolada de hemoculturas.

Diagnóstico laboratorial

Legionella spp. podem ser isoladas em ágar BCYE suplementado com fatores de crescimento, como l-cistina, sal férrico e α-cetoglutarato. Esse meio pode ser seletivo para cultura de locais não estéreis do corpo pelo acréscimo de cefamandol, polimixina B, anisomicina e vancomicina (Edelstein, 1987). O ágar-chocolate também pode aju-

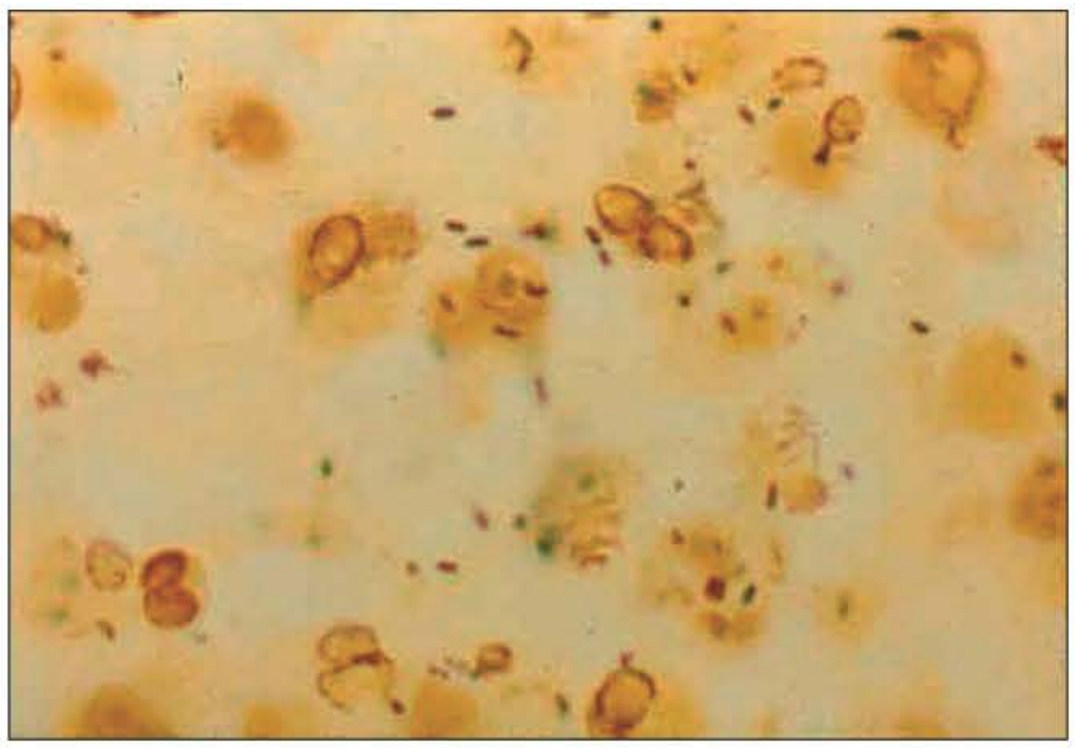


Figura 56.22 *Legionella pneumophila* em uma amostra clínica corada pela prata de Dieterle.

dar no crescimento de legionela. O tratamento do escarro com um ácido fraco (0,2 M de HCl/KCl em pH de 2,2) por quatro minutos ou calor (60°C) por dois minutos pode ajudar a reduzir a contaminação por outros microrganismos, mas também reduz o número de legionelas.

Os meios inoculados devem ser incubados por cinco dias em atmosfera úmida com não mais de 2 a 5% de CO_2. As colônias em geral aparecem iridescentes e têm consistência viscosa. Isolados com a morfologia típica à coloração de Gram devem ser subcultivados em ágar-sangue, onde não haverá crescimento. Esses microrganismos podem ser fracamente positivos para oxidase e catalase, bem como para gelatinase, e em geral são móveis. A possível identificar esse microrganismo com maior acurácia usando-se ensaios de anticorpo específico do tipo. A Figura 56.24 é uma coloração de Gram de *L. pneumophila* de cultura.

Legionella spp. podem ser detectadas ou identificadas pela coloração do anticorpo fluorescente direto (DFA) de amostras ou colônias em culturas. A sensibilidade do exame de DFA de amostras respiratórias varia de 25 a 75%, mas é consideravelmente maior em biópsias pulmonares abertas. Entretanto, o uso desse teste diminuiu graças à disponibilidade de testes mais sensíveis, como o ensaio do antígeno urinário e/ou métodos de PCR diretos. Foram relatadas reações cruzadas entre *L. pneumophila* e outras espécies do gênero, bem como com algumas cepas de *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacteroides fragilis*. A sensibilidade do DFA para a detecção de outras espécies no escarro é desconhecida (Edelstein, 1987).

O teste do antígeno urinário para *L. pneumophila* sorogrupo 1 tem sensibilidade relatada de 80 a 90%, embora se deva notar que a antigenúria pode persistir por muitos meses após a infecção. Mostrou-se que o uso do teste do antígeno urinário dentro e fora de uma unidade de tratamento intensivo (UTI) tem um impacto positivo no caso do paciente (Edelstein, 1987; Garbino, 2004; Sopena, 2005).

O diagnóstico de legionelose também pode ser estabelecido por sorologia caso se detecte um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpo em pelo menos 1:128. Um único título de anticorpo de 1:256 constitui evidência presuntiva de infecção passada. A sensibilidade do diagnóstico sorológico da doença causada por outras espécies que não *L. pneumophila* sorogrupo 1 não é conhecida, e a especificidade dos testes de anticorpo para a doença causada por outras espécies é menor do que para a *L. pneumophila* sorogrupo 1 (Edelstein, 1987). Foram desenvolvidos ensaios PCR para a detecção direta de *Legionela* sp. em amostras clínicas e para identificação sequenciada de isolados cultivados. Foram relatadas sensibilidades de 64 a 100% e especificidades de 88 a 100% (Stout, 2003). O uso desses ensaios pode proporcionar resultados mais rápidos, em especial quando usados em testes diretos com amostras; além disso, a identificação de outras espécies que não *L. pneumophila*, que é problemática com DFA e sorologia, poderia aumentar a demanda por esses ensaios.

Suscetibilidade antimicrobiana

Em razão da natureza intracelular de *Legionella* sp. em infecções clínicas, os resultados de testes de suscetibilidade in vitro não são capazes de predizer a resposta clínica a antibióticos. Portanto, não devem ser feitos testes de suscetibilidade. A terapia em geral consiste em eritromicina e rifampicina. Outros agentes que têm sido usados incluem trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas, claritromicina e azitromicina.

Bordetella

Características

As bordetelas são cocobacilos diminutos, estritamente aeróbicos e não fermentativos, que requerem ácido nicotínico, cisteína e, em geral, metionina, mas não fator X ou V para seu crescimento. Ocorre variação de fase de cepas virulentas lisas para cepas avairulentas rugosas após cultura em meios artificiais.

Manifestações clínicas e patogênese

Bordetella spp. são encontradas no trato respiratório de animais de sangue quente. A *Bordetella bronchiseptica* causa primariamente a tosse dos canis em cães, embora raramente possa causar sintomas semelhantes aos da coqueluche em hospedeiros humanos imunocomprometidos. A *Bordetella parapertussis*, que infecta humanos e cordeiros, é um patógeno humano incomum. A infecção pode ser assintomática ou causar uma tosse semelhante à da coqueluche, ou mais frequentemente bronquite. A *B. pertussis*, o agente etiológico da tosse sibilante, causa doença apenas em humanos.

Figura 56.23 *Legionella pneumophila* corada fracamente negativa pelo Gram em infiltrado pulmonar.

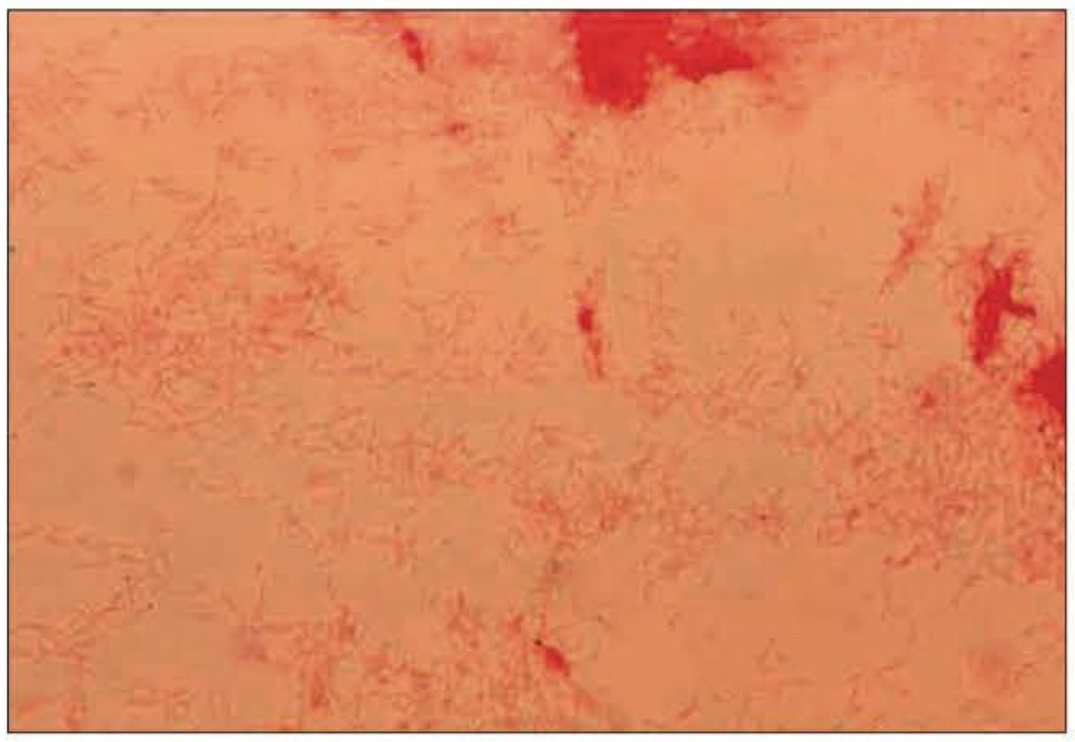


Figura 56.24 Coloração de Gram de cultura de *Legionella pneumophila*.

B. pertussis, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* produzem inúmeros fatores de virulência. A toxina adenilato ciclase inibe as funções efetoras imunes e outras células, criando um alto nível intracelular de 3',5'-fosfato cíclico de adenosina. A citotoxina traqueal causa cilioestase e morte celulares. Hemaglutinina filamentosa, pertactina e fímbras estão envolvidas na adesão. *B. pertussis* também é a única a produzir a toxina pertussis, que inibe os fatores de transdução do sinal intracelular ao transferir a ribose do difosfato de adenosina para proteínas G das células.

Acredita-se que, em uma infecção pertussis, o microrganismo primeiro adira ao epitélio ciliado do trato respiratório e a células efetoras imunes por meio de fímbrias, hemaglutinina filamentosa, toxina pertussis e pertactina. A toxina pertussis e a da adenilato ciclase funcionam juntas para inibir o sistema imune do hospedeiro, e a citotoxina traqueal lesa o epitélio respiratório. Como resultado, há inflamação e necrose epitelial, leucocitose e linfocitose, acúmulo de secreções, tosse e, por fim, broncopneumonia, episódios hipóxicos e encefalopatia.

A *B. pertussis* contém um antígeno protetor que, quando combinado com o anticorpo, abole sua infectividade. No entanto, parece que tanto a imunidade celular quanto a humoral são necessárias para erradicar o microrganismo.

Diagnóstico laboratorial

A taxa de isolamento de *B. pertussis* a partir de pacientes declina com a duração da doença. A amostra mais recomendada é o *swab* nasofaríngeo; entretanto, aspirados nasofaríngeos colhidos com um

cateter macio de borracha têm fornecido taxas maiores de isolamento nas mãos de algumas pessoas. Uma amostra mais invasiva como líquido colhido por lavado broncoalveolar também pode ser cultivada. Em geral, *swabs* ou aspirados devem ser inoculados nos meios adequados, como ágar de Regan-Lowe, à beira do leito do paciente. Para envio a laboratórios de referência, o meio inoculado deve ser incubado por pelo menos 24 horas antes do transporte, para permitir algum crescimento inicial do microrganismo.

O exame direto de esfregaços corados com antissoro monoclonal ou policlonal de *B. pertussis* conjugado com fluoresceína pode proporcionar um diagnóstico rápido. Como a sensibilidade do DFA é baixa, também é preciso fazer cultura para excluir um resultado negativo falso ao DFA. Podem ocorrer reações negativas falsas com o DFA, em especial quando se usa um anticorpo policlonal. A detecção direta de *B. pertussis* em amostras clínicas pela PCR é logo substituída pelo DFA em muitos laboratórios e está se tornando também rapidamente o método primário para detecção de *B. pertussis*. Existem produtos comerciais que devem facilitar a reprodutibilidade dos resultados entre os laboratórios (Khanna, 2005). Contudo, os resultados do teste da PCR podem continuar positivos por mais tempo que os da cultura ou DFA, mesmo com o tratamento antimicrobiano apropriado. Também se dispõe de métodos de PCR para a detecção direta de *B. parapertussis* em amostras clínicas (Dragsted, 2004).

As culturas, quando feitas, devem ser incubadas em ambiente úmido a 35°C, sem o acréscimo de CO_2. *B. pertussis* cresce lentamente, e as colônias podem não ser visíveis por 3 a 4 dias, devendo ser mantidas por 7 a 12 dias antes de serem descartadas como negativas. As colônias de *B. pertussis* são pequenas, arredondadas e brilhantes, podendo ter a aparência de uma gota de mercúrio. Microrganismos com a morfologia da colônia e a coloração de Gram típicas devem ser subcultivados em ágar-sangue para verificar a ausência de crescimento nesse meio. Reações positivas à catalase e à oxidase e negativas à urease podem ser usadas para a identificação presuntiva de um microrganismo como *B. pertussis*. A *B. parapertussis* cresce mais rapidamente e o fará em ágar-sangue e, em alguns casos, no ágar de MacConkey. As colônias são negativas para oxidase e positivas para catalase e urease. A *B. bronchiseptica* cresce bem tanto em ágar-sangue quanto no de MacConkey e é a mais bioquimicamente ativa das três, sendo positiva para catalase, oxidase, urease e redução de nitrato.

Suscetibilidade antimicrobiana

É provável que agentes antimicrobianos não desempenhem papel algum no tratamento da coqueluche, mas as culturas da nasofaringe tornam-se negativas depois de um a dois dias de tratamento, o que pode evitar complicações bacterianas em pacientes com a doença e ser efetivo para prevenir a disseminação da doença para contatos não imunes. O teste de suscetibilidade não está indicado para *B. pertussis*. A eritromicina é o fármaco de escolha para tratamento e profilaxia, mas trimetoprim-sulfametoxazol é uma alternativa aceitável.

Brucella spp.

Características

As brucelas são microrganismos cocobacilares Gram-negativos pequenos (0,5 a 0,7 μm * 0,6 a 1,5 μm). Nos esfregaços, ocorrem de maneira isolada, em pares ou cadeias curtas, e descreveu-se que possuem aspecto de areia. Não são móveis, são estritamente aeróbicas, positivas para a catalase e em geral também para a oxidase. O crescimento em laboratório costuma ser facilitado pela presença de 5 a 10% de CO_2 e requer meios complexos, o que melhora com o acréscimo de sangue ou soro. Das espécies reconhecidas, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella canis* são patógenos humanos.

Manifestações clínicas e patogênese

Brucella spp. são parasitas intracelulares que infectam uma ampla variedade de espécies animais (inclusive humanos) e também foram encontradas em alguns insetos e carrapatos. São patógenos veterinários e humanos importantes. Os hospedeiros preferenciais de *B. melitensis* são ovinos e caprinos, de *B. abortus* são bovinos, de *B. suis* são suínos e de *B. canis* são os cães, porém ocasionalmente cada espécie pode infectar outros animais. Humanos podem infectar-se ao inalar o microrganismo, por contato direto com material infectado, incluindo carcaças de animais, membros fetais, secreção vaginal, fetos, pele ou mucosas, ou pela ingestão de leite ou derivados não pasteurizados de animais infectados. São relatados cerca de 100 casos por ano de brucelose humana nos EUA. Um fator de risco comum é o consumo de queijo importado feito com leite de cabra não pasteurizado.

Em geral, ocorre linfadenopatia com disseminação e localização secundária no sistema reticuloendotelial e formação de granulomas no fígado, no baço, nos ossos, no trato geniturinário, nos pulmões e nos tecidos moles. Os microrganismos podem ser vistos dentro de fagócitos. Os sinais e sintomas costumam ser variáveis e inespecíficos, ocorrendo calafrios, febre, sudorese e anorexia com frequência. A febre é caracteristicamente diurna ("ondulante").

Diagnóstico laboratorial

Brucella spp. são com mais frequência recuperadas de sangue e medula óssea e com menor frequência de material obtido de abscessos no baço e no fígado. O microrganismo cresce nos meios padrões dos laboratórios, incluindo ágar para Brucella, ágar-sangue, ágar-chocolate e soja tripticase. Algumas cepas crescem no ágar de MacConkey. *Brucella* spp. crescem nos meios usados para cultura de amostras de sangue. Muitas referências recomendam incubar as hemoculturas por pelo menos 21 dias, fazendo-se subcultura às cegas no início e ao término do período de incubação; todavia, tais recomendações podem não ser necessárias com os sistemas mais modernos de hemocultura automatizados, e alguns têm demonstrado ser confiáveis para a recuperação de *Brucella* spp. em cinco dias ou menos, sem subcultura às cegas (Bannatyne, 1997; Yagupsky, 1997). *Brucella* spp. são reconhecidas como microrganismos de bioterrorismo da classe A e, como tais, só devem ser manipuladas em laboratórios de saúde pública e/ou nos CDC. A identificação e os testes para esse microrganismo serão descritos aqui como complementação, mas não devem ser realizados em laboratórios sentinelas, o que inclui a maioria dos laboratórios hospitalares.

Meios sólidos devem ser incubados em uma atmosfera com 5 a 10% de CO_2. Esses microrganismos crescem de forma lenta e, mesmo após 48 horas de incubação, pode ser difícil ver colônias. Eles podem ser identificados de forma presuntiva como *Brucella* spp. com base em um aspecto característico à coloração de Gram e resultados positivos para catalase, oxidase e urease. A atividade da urease manifesta-se de forma rápida (em cerca de 15 minutos) no caso de *B. suis* e mais lentamente (2 a 24 horas) com *B. melitensis* e *B. abortus*. Como a brucelose pode ser adquirida em laboratórios, o pessoal que trabalha neles deve ser notificado quanto à suspeita do microrganismos em amostras, fazendo todas as manipulações em uma cabine de segurança biológica ante a possibilidade de *Brucella* spp.

A identificação desses microrganismos até o nível de espécie requer testes com exigência de CO_2, produção de H_2S, hidrólise da ureia, sensibilidade ao corante e de fago. A maioria dos laboratórios hospitalares encaminha esses testes para as secretarias de saúde ou outros laboratórios de referência. O uso de recursos moleculares, como a PCR, provavelmente será um meio mais efetivo de detectar casos de brucelose no futuro (Queipo-Ortuno, 2005).

O diagnóstico de brucelose pode ser feito por sorologia. Um título mínimo de 1:160 em um teste de aglutinação padrão em tubo é sugestivo do diagnóstico, mas só é possível aceitar evidência de brucelose recente quando ocorre um título quatro vezes maior ou mais durante o primeiro ou segundo meses de doença. Pode ocorrer efeito pró-zona em pacientes com títulos tão altos quanto 1:640, de modo que todo soro de pacientes com quadro da doença deve ser diluído até pelo menos 1:1.280. Ocorre reatividade cruzada com Francisella tularensis e *V. cholerae*, até tesmo após vacinação para cólera.

Suscetibilidade antimicrobiana

O tratamento consiste em combinações de tetraciclina, aminoglicosídeos, rifampicina e trimetoprim-sulfametoxazol por períodos prolongados. Embora ocorram falhas do tratamento, não se devem a resistência antimicrobiana, e os testes de suscetibilidade não são recomendados.

Pasteurella

Características

As pasteurelas são bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas, positivas para oxidase e catalase, cuja morfologia varia de coco-

bacilos a bastonetes longos filamentosos. Das oito espécies conhecidas como infecciosas para humanos (*Pasteurella multocida*, *Pasteurella bettyae*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella aerogenes*), *P. multocida* é o patógeno humano mais importante. *Pasteurella* spp. são fenotipicamente similares a *Actinobacillus* spp., e estudos de hibridização do DNA e comparações do rRNA 16S mostraram que *P. pneumotropica*, *P. haemolytica* e *P. aerogenes* estão mais estreitamente relacionadas com o gênero *Actinobacillus* que com *Pasteurella*.

Manifestações clínicas e patogênese

Pasteurella spp., em especial *P. multocida*, são encontradas como comensais no trato respiratório superior de aves e mamíferos, sendo frequentemente isoladas de ferimentos causados por mordidas ou arranhaduras de animas. Mordidas de gatos são infectadas com mais frequência que as de cães. As infecções locais podem tornar-se sistêmicas, havendo inúmeros relatos de septicemia, osteomielite e meningite. As pasteurelas têm sido associadas a infecções do trato respiratório, como sinusite, abscesso peritonsilar, mastoidite, abscesso pulmonar, pneumonia, empiema, bronquite e bronquiectasia, em geral em pacientes com doença pulmonar crônica.

Diagnóstico laboratorial

As pasteurelas crescem bem em ágar-sangue e só raramente conseguem crescer em meios diferenciais Gram-negativos, como EMB ou ágar de MacConkey. O achado de um bacilo Gram-negativo que cresce em ágar-sangue apenas, é positivo para oxidase e indol e negativo para ONPG fornece forte evidência presuntiva do isolamento de *P. multocida*, a espécie encontrada com mais frequência. Além disso, a suscetibilidade à penicilina, conforme evidenciada por uma larga zona de inibição em torno de um disco de penicilina em uma placa de ágar-sangue, é boa evidência de que o isolado seja *P. multocida*.

Suscetibilidade antimicrobiana

A resistência aos agentes antimicrobianos é vista raramente em isolados humanos. As pasteurelas em geral são suscetíveis à penicilina e à tetraciclina e a muitos outros antibióticos. A penicilina é o fármaco de escolha para o tratamento.

Francisella

Características

F. tularensis é um bacilo Gram-negativo muito pequeno, estritamente aeróbico, cocoide a pleomórfico e em forma de bastão, que requer cistina ou cisteína para seu crescimento. Ocorre uma coloração bipolar clara com corantes à base de anilina.

Manifestações clínicas e patogênese

F. tularensis é encontrada em animais silvestres e domésticos, aves, artrópodes, água, lama e fezes de animais. O reservatório primário desse microrganismo é a cauda de coelhos. A transmissão para humanos ocorre pela picada de carrapato, por inoculação cutânea direta de um animal infectado, inoculação conjuntival, inalação ou ingestão de carne infectada mal cozida ou água contaminada. Ocorrem várias formas da doença, como ulceroglandular, glandular, oculoglandular, orofaríngea, intestinal, pneumônica e tifoide. São relatados cerca de 100 casos por ano de tularemia nos EUA. A *F. tularensis* é considerada um dos agentes de bioterrorismo da classe A, razão pela qual a pesquisa de casos suspeitos limita-se a laboratórios autorizados. A maioria dos laboratórios clínicos é considerada sentinela e, quando se suspeitar do microrganismo, os isolados devem ser enviados para as secretarias de saúde ou outros laboratórios selecionados.

A tularemia manifesta-se após um período de incubação de 1 a 10 dias de várias formas. Cefaleia, febre, calafrios, vômitos e mialgias são ocorrências características no início. Na doença ulceroglandular, ocorrem linfadenite e linfadenopatia na região que drena a lesão primária. A lesão é inicialmente papular e depois ulcerativa. A dor oculoglandular caracteriza-se por inflamação da conjuntiva e em geral uma pápula na pálpebra inferior, com linfadenite dos nodos pré-auriculares, parotídeos, submaxilares e cervicais anteriores. A forma intestinal de tularemia caracteriza-se por lesões ulcerativas na boca, na garganta e no trato gastrintestinal superior.

A virulência parece estar relacionada com a morfologia lisa das colônias. Subculturas repetidas resultam em uma alteração das colônias de lisas para enrugadas, com perda concomitante da virulência. Cepas altamente virulentas para humanos têm atividade ureidase da citrulina e fermentam glicerol, estando mais frequentemente associadas à doença transmitida por carrapatos em coelhos. Não foram reconhecidas toxinas.

Deve-se suspeitar de tularemia em qualquer indivíduo de área endêmica que tenha tido contato com animais silvestres ou rebanhos, história de picada de carrapato, engajado-se em atividades em fazendas, bebido água impura ou sido exposto a culturas ou animais infectados no laboratório. Montadores de armadilhas, caçadores, trabalhadores da indústria de couro ou de carnes, agricultores e pessoal de laboratório correm o maior risco. Por causa de suas manifestações de proteano, é fácil confundir a tularemia com muitas outras doenças, como brucelose, antraz, esporotricose, febre tifoide, tuberculose, histoplasmose e sífilis.

Diagnóstico laboratorial

O material adequado para exame inclui líquido ou raspados da lesão primária, aspirados de linfonodos regionais aumentados, escarro, lavados faríngeos e aspirados gástricos. O isolamento da bactéria é difícil por ter necessidades especiais em termos de crescimento, e ela cresce de forma lenta, permitindo a proliferação de outros microrganismos presentes na amostra. Cresce em ágar de glicose e cisteína suplementado com 5% de sangue de coelho desfibrinado, ágar-chocolate com IsoVitalX ou ágar BCYE. Alguns isolados podem crescer até em ágar-sangue ou ágar-soja tripticase. Se o material clínico estiver contaminado com outros microrganismos, podem-se acrescentar penicilina, polimixina B e cicloeximida para inibir seu crescimento. É preciso cuidado especial ao manipular material infectado para evitar aerossolização ou contato direto com a pele. Os clínicos devem sempre avisar o pessoal do laboratório ante a suspeita de *F. tularensis*, de modo que as precauções cabíveis possam ser tomadas para evitar a exposição a esse microrganismo.

As culturas são incubadas a 35°C, com ou sem acréscimo de CO_2. As colônias em geral surgem em 2 a 4 dias e são azul-acinzentadas a brancas, arredondadas, lisas e ligeiramente mucoides. No ágar com sangue, pode-se observar uma zona pequena de hemólise α. Por causa do perigo de trabalhar com o microrganismo no laboratório, quando se suspeitar de um isolado, este deve ser enviado para um laboratório de referência, como os CDC, para confirmação por um teste de aglutinação em lâmina ou anticorpo fluorescente direto.

O diagnóstico de *F. tularensis* pode ser estabelecido por sorologia. Títulos de aglutinação tão baixos quanto 1:40 na ausência de doença prévia são diagnósticos e podem aumentar nas primeiras três semanas até níveis de 1:640 ou mais. As aglutininas de brucela também podem aumentar de forma inespecífica, mas em geral até um nível consideravelmente mais baixo (Johansson, 2004).

Suscetibilidade antimicrobiana

A estreptomicina é bactericida, enquanto as tetraciclinas e o cloranfenicol são basteriostáticos para *F. tularensis*. Como podem ocorrer recidivas após o tratamento com agentes bacteriostáticos, a estreptomicina é o agente de escolha.

Gardnerella

Características

Gardnerella vaginalis é um cocobacilo ou bastonete Gram-variável fino. Há anos esse microrganismo, por sua associação à vaginose bacteriana, é chamado *Haemophilus vaginalis* e *Corynebacterium vaginale*, o que mostra ainda mais seu aspecto variável ao Gram. Não há produção de catalase, e as células não são móveis. O crescimento é mais bem observado após 48 horas de incubação em atmosfera enriquecida com 5% de CO_2. As colônias são pequenas e exibem hemólise β nos meios que contêm sangue humano ou de coelho.

Manifestações clínicas e patogênese

Esse microrganismo está associado à vaginose bacteriana, mas não é a causa do problema. Foi encontrado no sangue de pacientes com febre puerperal, e também pode causar infecções em recém-nascidos. É parte da microbiota anorretal de adultos sadios de ambos os sexos, bem como de crianças. Também faz parte da microbiota vaginal en-

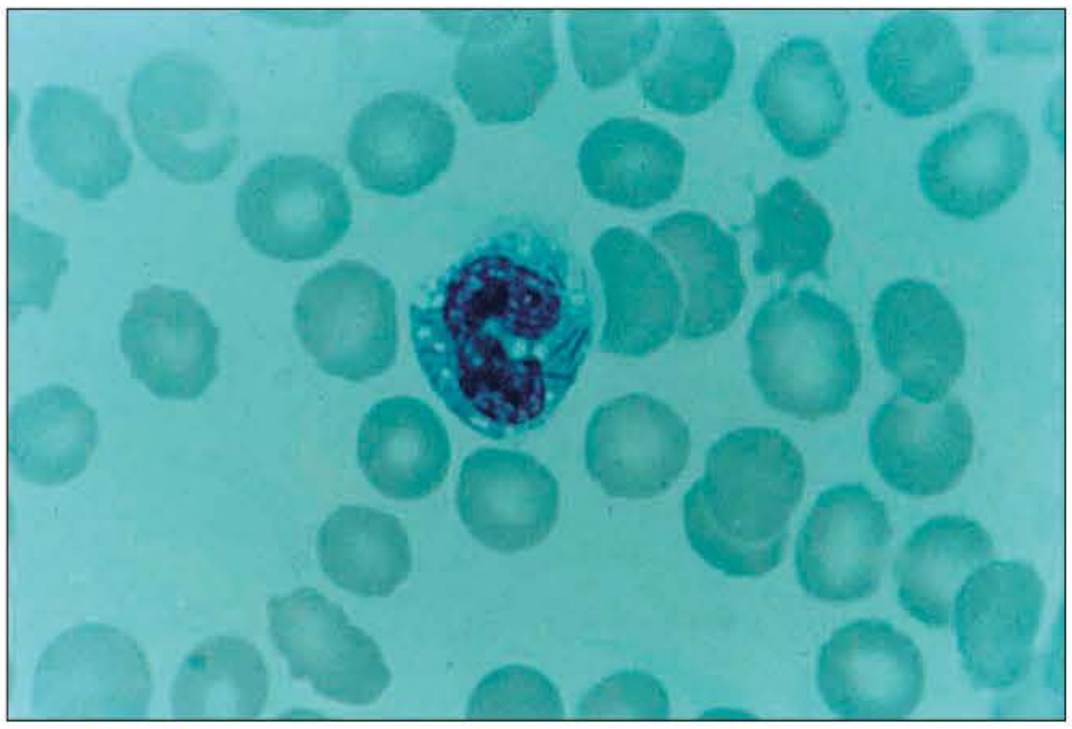


Figura 56.25 Esfregaço sanguíneo positivo para *Capnocytophaga canimorsus* em paciente com septicemia (coloração de Wright).

Figura 56.26 Coloração de Gram de *Capnocytophaga ochraceus*. Notar os bacilos fusiformes.

dógena de mulheres em idade reprodutiva.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de vaginose bacteriana não requer cultura, sendo feito pelo exame direto de secreções vaginais quanto à presença de células características (células epiteliais cobertas com bactérias nas margens celulares), pequenos bastonetes e cocobacilos Gram-negativos, ausência de lactobacilos (bastonetes finos Gram-positivos), pH > 4,5 e um odor de peixe conferido por amina após o acréscimo de cloreto de potássio (KOH) a 10% às secreções. Uma coloração de Gram comparativa é o teste de laboratório que deve ser realizado quando se submete corrimento vaginal ao diagnóstico de vaginose bacteriana (Nugent, 1991). Uma alternativa é a existência de uma sonda de ácido nucleico (Affirm, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) que verifica se há alta concentração de *G. vaginalis* como marcador para vaginose bacteriana (Briselden, 1994). Quando observado em cultura, o microrganismo é identificado de forma presumível com base na hemólise sobre uma dupla camada de ágar-sangue humano Tween após 48 horas de incubação.

Suscetibilidade antimicrobiana

O teste de suscetibilidade para *G. vaginalis* não é recomendado, nem existem orientações para realizá-lo. O metronidazol é o fármaco de escolha para a vaginose bacteriana. Infecções sistêmicas causadas por esse microrganismo podem ser tratadas com ampicilina porque ele não produz β-lactamase.

Capnocytophaga

Capnocytophaga é um gênero de bactérias Gram-negativas em forma de bastão a filamentosas, anaeróbicas facultativas. As espécies incluem *Capnocytophaga ochraceus*, *Capnocytophaga canimorsus* (antigamente DF-2), *Capnocytophaga gingivalis* e *Capnocytophaga sputigena*, entre outras. *C. canimorsus* faz parte da microbiota oral de cães e gatos; as outras podem ser encontradas como parte da microbiota oral normal humana.

Manifestações clínicas e patogênese

C. ochraceus pode causar uma bacteriemia transitória ou endocardite em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (Parenti, 1985). Também foi associada a periodontite. *C. canimorsus é* uma causa de septicemia fatal após infecções de feridas que ocorrem em sequência à mordida de cães ou gatos. Os pacientes com essa septicemia fatal têm fatores predisponentes em razão de uma esplenectomia prévia ou alcoolismo (Lion, 1996). Meningite, endocardite, artrite e infecções oculares também foram documentadas com *C. canimorsus*. A Figura 56.25 é uma coloração de Wright de *C. canimorsus* vista em um esfregaço sanguíneo de paciente com septicemia por *C. canimorsus*. Note a natureza intracelular dos bacilos.

O isolamento de *Capnocytophaga* spp. requer inoculação em ágar-sangue ou chocolate e incubação em ambiente com 5 a 10% de CO_2, em geral por mais de 24 horas. As colônias em geral são ligeiramente pigmentadas de amarelo ou laranja e podem disseminar-se por causa da motilidade "deslizante". A coloração de Gram costuma mostrar células alongadas, finas, em forma de fuso, quase sempre com esse aspecto fusiforme. A Figura 56.26 mostra a coloração de Gram de *C. ochraceus*, demonstrando os bacilos fusiformes. *C. ochraceus* é negativa para oxidase e catalase; *C. canimorsus* é positiva para oxidase e catalase. *Capnocytophaga* spp. em geral são suscetíveis a muitos antibióticos, incluindo β-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, clindamicina e quinolonas, sendo resistentes aos aminoglicosídeos. Há descrições ocasionais de β-lactamases nesse gênero, embora a resposta aos β-lactâmicos ou combinações de inibidor da β-lactamase tenha sido boa (Jolivet-Gougeon, 2000).

Calymmatobacterium

Características

Calymmatobacterium granulomatis é um bastonete Gram-negativo imóvel encapsulado e pleomórfico, que pode ser cultivado em meio de saco vitelino de ovos frescos. O microrganismo tem determinantes antigênicos similares aos de *Klebsiella* spp., levando alguns especialistas a classificar tais espécies entre as *Enterobacteriaceae*.

Manifestações clínicas e patogênese

O microrganismo não produz doença em animais. Em humanos, causa o granuloma inguinal (donovanose), que se caracteriza por lesões ulcerogranulomatosas da pele e da mucosa do trato genital e de áreas inguinais.

Diagnóstico laboratorial

Um fragmento de tecido removido da margem de uma úlcera é pressionado e esfregado contra uma lâmina de microscopia de vidro e corado pelo Wright ou Giemsa. O achado de bastonetes pequenos, retos ou curvos e pleomórficos, com extremidades arredondadas e grânulos polares característicos, conferindo um aspecto de "alfinete de segurança" dentro de células mononucleares, é o meio mais efetivo de estabelecer o diagnóstico.

Suscetibilidade antimicrobiana

Tetraciclinas, eritromicina, ampicilina e cloranfenicol são ativos contra *C. granulomatis*. Pode haver desenvolvimento de resistência à estreptomicina.

Streptobacillus

Características

Streptobacillus é um bastonete Gram-negativo anaeróbico facultativo, fermentativo, não encapsulado e imóvel que com frequência ocorre em cadeias ou filamentos longos, em geral com uma série de tumefações bulbosas ovais a alongadas, que lhe conferem um aspecto de contas de um rosário. A morfologia microscópica varia com o tempo, sendo mais homogeneamente filamentosa em culturas jovens e tornando-se fragmentada em cocobacilos irregulares com a idade. Os microrganismos da fase L com aspecto de "ovo frito" podem ocorrer de maneira espontânea em ágar, estabilizando-se caso se incorpore penicilina ao meio. A Figura 56.27 é um esfregaço de *Streptobacillus moniliformis* feito a partir de cultura de um paciente com febre

causada por mordida de rato.

Manifestações clínicas e patogênese

S. moniliformis ocorre como microbiota nativa do trato respiratório superior de roedores silvestres e de laboratório. A infecção (febre causada pela mordida de rato ou doença de Haverhill) em humanos segue-se à mordida de roedores, ingestão de comida contaminada ou lesões traumáticas. Podem surgir linfangite local e linfadenite até três semanas depois, seguidas de febre, calafrios, mal-estar e, por fim, um exantema morbiliforme maculopapular generalizado ou petequial. Alguns pacientes desenvolvem uma poliartrite migratória. Foi relatada endocardite. A histopatologia é inflamação crônica inespecífica.

Diagnóstico laboratorial

O microrganismo cresce em infusão de ágar-coração suplementado com soro equino inativado pelo calor e extrato de levedura. Os meios inoculados devem ser incubados a 35°C em ambiente úmido com 10% de CO_2.

As colônias em caldo formam umas bolas fofas, enquanto aquelas em ágar são pequenas e ligeiramente translúcidas a opacas, com bordas um pouco irregulares. Variantes da fase L podem formar-se em ágar. Como o microrganismo é relativamente inerte, sua identificação é complexa. Os testes bioquímicos têm de ser feitos em infusão de ágar-coração ou caldo suplementado com extrato de levedura e soro equino.

Suscetibilidade antimicrobiana

S. moniliformis é suscetível à penicilina, mas, para tratar as formas L, deve-se usar aminoglicosídeo ou tetraciclina.

Prevenção e controle

Como 10 a 65% dos ratos estão infectados com o microrganismo, seu controle e as precauções contra mordidas representam os únicos métodos efetivos de controle da doença.

Bactérias anaeróbicas

É importante enfatizar outra vez que os anaeróbios representam um dos principais componentes da microbiota nativa da pele e de mucosas; portanto, seu isolamento e sua identificação dependem da seleção e da colheita adequadas das amostras, bem como do transporte apropriado até o laboratório. As infecções anaeróbicas em geral são mistas, consistindo em várias espécies de aeróbios ou anaeróbios com anaeróbios facultativos; portanto, a primeira tarefa ao examinar uma cultura anaeróbica é separar os anaeróbios facultativos dos obrigatórios. Com a experiência, os anaeróbios mais isolados em geral podem ser reconhecidos com base na morfologia de suas colônias e microscópica e presumivelmente identificados com alguns testes adicionais. A identificação definitiva baseia-se nas reações bioquímicas, características fisiológicas e genéticas, bem como na patogenicidade e nos testes de neutralização da toxina.

O ponto até que os anaeróbios são identificados varia de acordo com as facilidades e habilidades disponíveis, o interesse do pessoal do laboratório e da equipe clínica e a utilidade clínica da informação disponível do laboratório.

Definições e características

Um anaeróbio requer uma atmosfera com tensão reduzida de oxigênio para seu crescimento, ele não consegue crescer na superfície de meios sólidos em uma atmosfera de ar ambiente com 10% de CO_2. Uma bactéria anaeróbica facultativa cresce na presença ou ausência de ar ambiente. O termo microaerófilo ainda não foi definido com clareza, mas costuma ser aplicado a bactérias, em geral campilobacter e estreptococos, que crescem apenas ou preferencialmente em uma atmosfera com O_2 reduzido e mais CO_2.

Patogênese e fatores de virulência

Pouco se sabe sobre os fatores responsáveis pelas propriedades patogênicas e a virulência da maioria dos outros anaeróbios que não os clostrídios. Foram identificadas atividades endotóxicas, proteolíticas e de heparinase entre as *Bacteroidaceae*. A cápsula polissacarídica do *B. fragilis* promove a formação de abscesso. Os clostrídios, por outro lado, elaboram exotoxinas potentes, incluindo toxinas letais e necrotizantes, hemolisinas, lecitinases, gelatinases e hialuronidases.

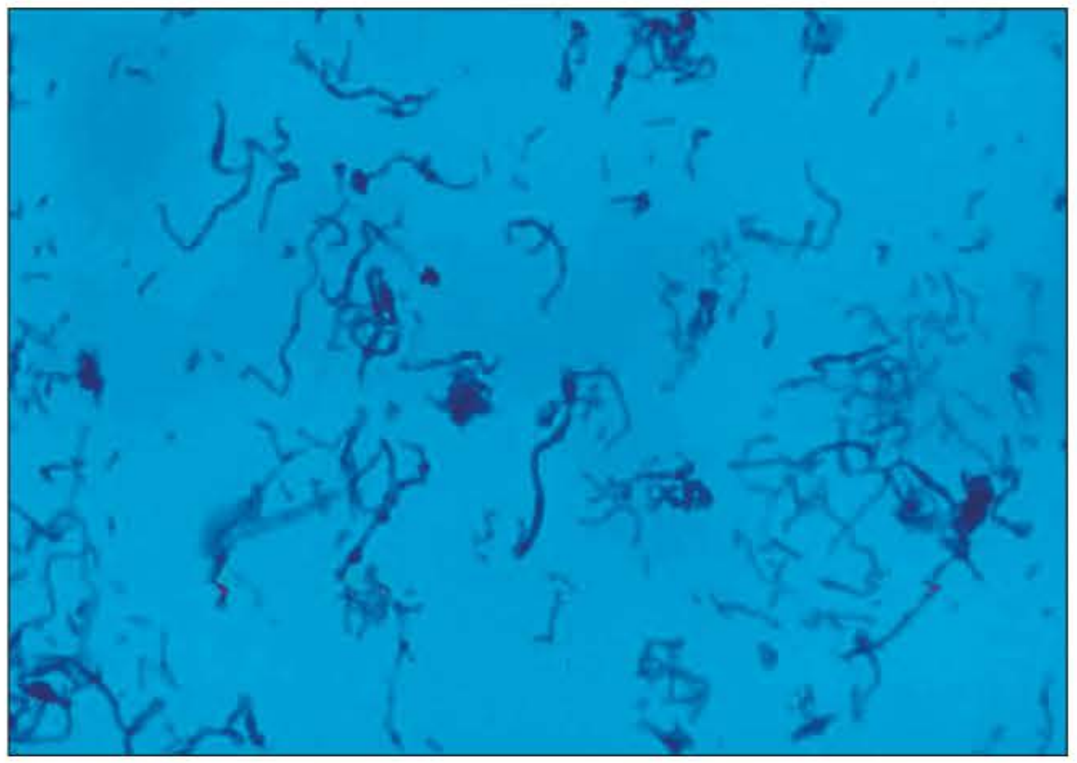


Figura 56.27 Coloração de Gram de *Streptobacillus* moniliforme em cultura. (Cortesia da Dra. Nancy Cornish.)

Embora a infecção por clostrídios possa ter origem exógena ou endógena, a doença causada por outros anaeróbios em geral tem origem endógena, a partir da microbiota anaeróbica nativa normal de uma mucosa contígua, cuja integridade tenha sido rompida por cirurgia, instrumentação, traumatismo ou malignidade.Essencial ao estabelecimento de anaeróbios no processo infeccioso é uma queda no potencial de oxidação-redução (Eh) da área, que pode resultar de uma falha no suprimento sanguíneo ou da multiplicação de outras bactérias no local.

Embora as infecções e intoxicações por clostrídios sejam inquestionavelmente de extrema importância médica, o papel de outros anaeróbios como causadores de celulite e mionecrose foi reconhecido apenas em tempos relativamente recentes. A maioria dos isolados de *Clostridium perfringens* resulta da simples contaminação de uma ferida. Em tais circunstâncias, os clostrídios podem multiplicar-se em restos celulares, um hematoma ou tecido necrótico, sem sintomatologia clínica observável. A celulite anaeróbica é um processo necrotizante dos tecidos moles. Seu início é gradual, mas pode progredir de maneira rápida e extensa. Há produção de gás, mas o processo em geral não envolve músculo. Além dos clostrídios ou em vez deles, a bacteriologia da celulite anaeróbica pode envolver cocos anaeróbicos e bacilos anaeróbicos Gram-negativos.

Em contraste com a celulite anaeróbica, a gangrena gasosa ou mionecrose causada por clostrídios é um processo invasivo rapidamente progressivo que acarreta alterações acentuadas nos músculos. A distinção entre celulite anaeróbica e gangrena gasosa é crítica para evitar uma cirurgia desnecessariamente agressiva e mutilante na primeira condição.

Os clostrídios citotóxicos associados à gangrena gasosa incluem *C. perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium sporogenes* e *Clostridium bifermentans*. Enquanto o *C. perfringens* tem sido a espécie mais envolvida na gangrena gasosa, a prevalência das outras espécies nesse processo tem variado muitíssimo.

O tétano e o botulismo são descritos como intoxicações e não como infecções, porque suas manifestações estão relacionadas com a elaboração de neurotoxinas potentes. O botulismo é mais frequentemente uma consequência da ingestão de alimentos processados em casa e conservados ou embalados de maneira inadequada, porém surtos esporádicos da doença foram associados a alimentos processados comercialmente e feridas infectadas com o microrganismo. O período de incubação do botulismo é curto: os sinais e sintomas em geral ocorrem entre 18 e 36 horas após a ingestão de alimento contaminado. Dos sete tipos antigênicos de toxina botulínica conhecidos, o tipo A é o mais comum nos casos de intoxicação alimentar na América do Norte, seguido pelos tipos B, E e F. A toxina é absorvida a partir do trato intestinal, raramente de um ferimento, e por fim adere a terminações motoras, impedindo assim a liberação de acetilcolina nas ter-

minações nervosas.

De modo característico, o tétano ocorre em pessoas não imunizadas nas duas primeiras semanas após um ferimento traumático por punção, laceração ou abrasão. Há relatos de casos no pós-operatório, após procedimentos dentários, parto e aborto ou em associação a estase e úlceras de decúbito. A toxina, tetanoespasmina, é transportada para gangliosídeos no SNC via linfáticos e corrente sanguínea, bem como por migração através dos espaços perineurais de nervos periféricos.

O *Clostridium difficile* é a principal causa de diarreia nosocomial e o patógeno primário responsável pela colite pseudomembranosa. É uma causa rara de abscessos, infecções de feridas, osteomielite, pleurite, peritonite, septicemia e infecções do trato urogenital. As taxas de transporte do *C. difficile* e suas toxinas são altas (50% ou mais) em neonatos, mas a doença é rara (Bartlett, 1997). A colonização, com ou sem produção de toxina, pode ser mantida por vários meses; porém, quando a microbiota adulta se estabelece aos 6 a 12 meses de idade, as taxas de colonização caem e apenas cerca de 3% dos adultos sadios normais são colonizados com o microrganismo. O *C. difficile* quase sempre é adquirido no hospital por pessoas que recebem agentes antimicrobianos via exposição direta ou indireta a reservatórios humanos ou inanimados. Embora as penicilinas e cefalosporinas estejam implicadas mais frequentemente, qualquer agente antimicrobiano pode desencadear doença associada ao *C. difficile*. É raro a doença ocorrer sem exposição a antibiótico, mas há relatos de casos após terapia com agentes antineoplaásicos que têm atividade antibacteriana. A colite pseudomembranosa é uma doença mediada por toxina em que não se sabe se ocorre invasão microbiana da mucosa. O *C. difficile* produz duas toxinas. A toxina A, uma toxina fracamente citopática, é responsável sobretudo pela atividade enterotóxica do microrganismo. A toxina B, uma citotoxina potente, parece ter um papel menor na doença humana. Embora tenham sido isoladas cepas negativas para a toxina A, foram isoladas cepas positivas para a toxina B de pacientes sintomáticos (Johnson, 1998). O uso de um ensaio PCR no laboratório para a detecção tanto da toxina A quanto da toxina B pode aumentar a sensibilidade (Lemee, 2004).

Conforme mencionado previamente, outras bactérias anaeróbicas, em particular os cocos anaeróbicos e bacilos Gram-negativos, foram associadas a celulite anaeróbica, além das espécies histotóxicas de clostrídios ou em vez delas. Esses microrganismos fazem parte da microbiota nativa das mucosas da cavidade oral e dos tratos gastrintestinal e geniturinário. Como tais, são encontrados em pneumonias por aspiração, abscessos pulmonares, empiemas, infecções e abscessos intra-abdominais, abscessos pélvicos, abscessos cerebrais e bacteriemias. Infecções intra-abdominais anaeróbicas comumente acompanham cirurgia abdominal e, em especial, do cólon, estando com mais frequência associadas ao grupo *B. fragilis*. Bacteriemias anaeróbicas significativas em termos clínicos também são mais causadas por essa espécie.

Diagnóstico laboratorial

A identificação de bactérias anaeróbicas até o nível de espécie pode ser bastante complexa; no entanto, o ponto até o qual os isolados de bactérias anaeróbicas são identificados varia muito e pode ser limitado à informação básica que tem utilidade clínica. Por exemplo, a microbiota anaeróbica mista de locais como uma úlcera de decúbito, fístula perirretal ou abscesso intra-abdominal pode ser relatada simplesmente como microbiota fecal mista sem identificação específica de seus componentes. A determinação da espécie de um isolado pode ser limitada àquelas presentes em cultura pura de um líquido ou local corporal normalmente estéril e obtida por um de vários kits comerciais de ensaio bioquímico disponíveis ou usando-se cromatografia gasosa-líquido. Deve-se entender que o valor clínico de qualquer relato da presença de bactérias anaeróbicas está diretamente relacionado com a velocidade de registrar tais resultados do laboratório. Os procedimentos de identificação que levam 1 a 2 semanas para se completar em geral são de interesse apenas acadêmico.

Em decorrência da progressão rápida e da morbidade e mortalidade consideráveis, o diagnóstico inicial e o tratamento de doenças causadas pelos clostrídios precisa basear-se em sua apresentação e suas manifestações clínicas. Em alguns pacientes com tétano, nenhuma ferida primária é evidente. Quando há um ferimento, em raros casos são vistos microrganismos típicos de *C. tetani* em esfregaços corados, mesmo que sejam recuperados de culturas. Além disso, por causa da ampla distribuição mundial desse microrganismo na natureza, seu isolamento a partir de uma ferida não é necessariamente indicativo do diagnóstico de tétano. A confirmação laboratorial de botulismo requer a detecção da toxina em soro, feridas, conteúdo gástrico, fezes ou no alimento suspeito de ser o responsável pela doença. Os procedimentos para extrair a toxina e fazer os testes de neutralização em camundongo são complexos; portanto, sugere-se que materiais apropriados sejam encaminhados para os CDC para exame. Deve-se fazer uma consulta telefônica em tais circunstâncias para assegurar que as amostras requisitadas sejam colhidas e transportadas da maneira apropriada e as autoridades de saúde estejam alertas.

Nos casos de suspeita de celulite anaeróbica ou gangrena gasosa, o laboratório pode ser útil por examinar exsudato ou tecido microscopicamente. O achado de numerosos bacilos Gram-positivos grandes em forma de vagão (Fig. 56.28) é uma confirmação presuntiva do diagnóstico. Esfregaços corados também podem ser diagnósticos de miosite estreptocócica anaeróbica. Culturas de exsudato, tecido e sangue também devem ser realizadas. Mais uma vez, o nível ou a extensão da identificação varia de modo considerável entre os laboratórios; entretanto, o *C. perfringens* pode ser identificado com facilidade pela morfologia à coloração de Gram, pela produção de zonas duplas de hemólise em ágar-sangue e por uma reação de Nagler positiva em ágar de gema de ovo. O diagnóstico laboratorial de diarreia causada pelo *C. difficile* é obtido com mais rapidez detectando-se a toxina diretamente em fezes por um EIA ou ensaio de cultura celular. Como alternativa, *C. difficile* recuperado de fezes pode ser testado quanto à produção de toxina. Há relatos de métodos de PCR para a detecção das toxinas do *C. difficile* (Lemee, 2004).

Um dos grupos mais comuns de bactérias anaeróbicas de importância clínica é o complexo *B. fragilis*. Os isolados desse complexo crescem de modo seletivo no meio de bile e esculina para bacteroides e têm morfologia característica à coloração de Gram, conforme vista na Figura 56.29. Esses bacilos Gram-negativos são encontrados como microbiota normal na maior parte dos tratos gastrintestinal e geniturinário. As infecções causadas pelo complexo incluem abscesso abdominal, abscesso pélvico, bacteriemia e abscesso cerebral. Em raros casos, pode estar envolvido com doença pulmonar. Embora a maioria das infecções anaeróbicas seja polimicrobiana, o *B. fragilis* sozinho é responsável pelas infecções que mencionadas neste parágrafo.

Um bacilo Gram-positivo anaeróbico, o *Propionibacterium acnes*, foi associado a casos de endoftalmite que ocorrem após cirurgia de catarata. Além disso, o *P. acnes* pode estar associado a infecções de derivações ventriculares em pacientes com hidrocefalia; raramente, o *P. acnes* pode causar endocardite, artrite séptica ou outras infecções. O isolamento desse microrganismo pode requerer incubação prolongada, em geral até por 10 dias. A Figura 56.30 é uma coloração de Gram de *P. acnes* no líquido vítreo de um paciente meses após cirurgia de catarata.

Figura 56.28 Coloração de Gram de um esfregaço de exsudato de um ferimento que tinha grandes bolhas de gás mostra bacilos Gram-positivos no formato de vagão, sugestivos de doença causada por clostrídios (imersão em óleo).

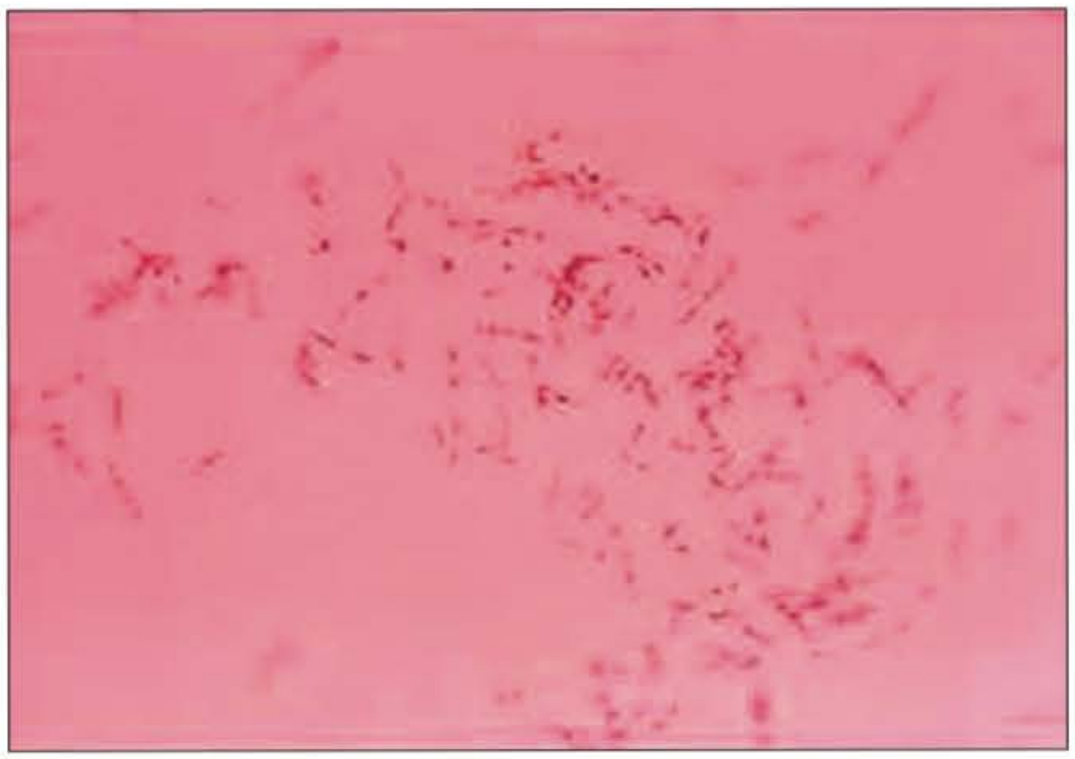


Figura 56.29 Coloração de Gram de *Bacteroides fragilis* em caldo de cultura.

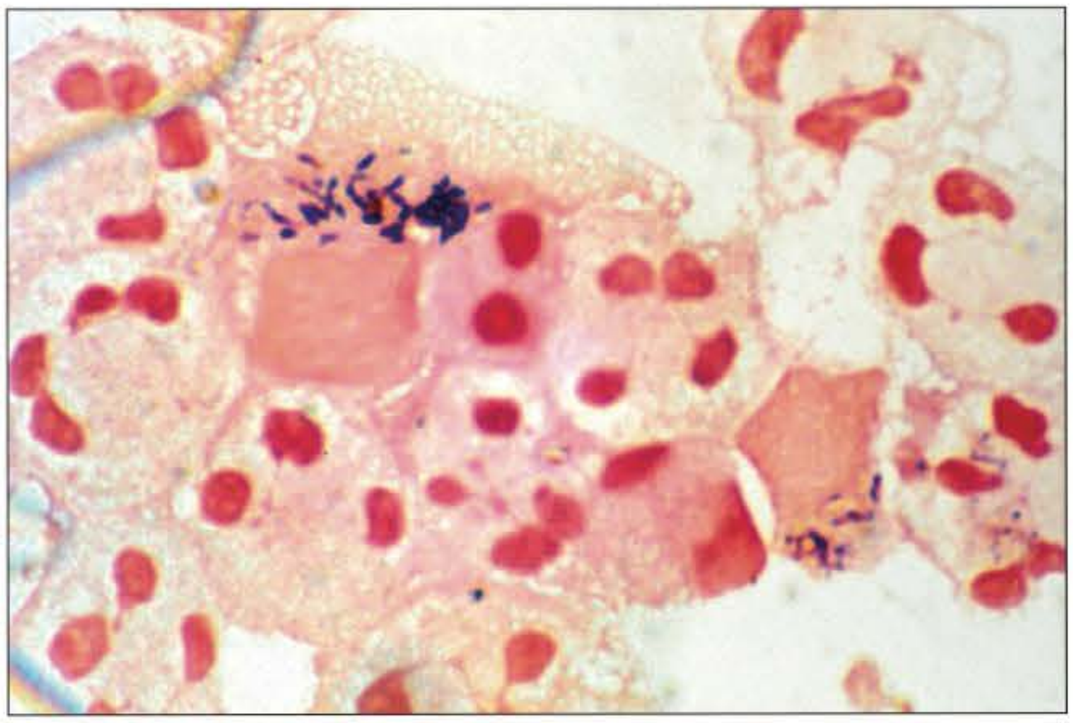


Figura 56.30 Coloração de Gram de *Propionibacterium acnes* de líquido do humor vítreo.

Suscetibilidade antimicrobiana

Os testes de suscetibilidade para bactérias anaeróbicas em geral são desnecessários. As principais indicações para testes são situações clínicas em que as decisões quanto à seleção de agentes é crítica em razão (1) da falha dos esquemas terapêuticos habituais e da persistência da infecção, (2) do papel fundamental dos agentes antimicrobianos na determinação do prognóstico da infecção ou (3) da dificuldade para tomar decisões terapêuticas empíricas com base em precedentes. As infecções das quais isolados devem ser testados são abscesso cerebral, endocardite, osteomielite, infecções articulares, de dispositivos protéticos ou enxertos vasculares e bacteriemia refratária ou recorrente (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2004). Em tais circunstâncias, os testes devem incluir alguns membros do grupo *B. fragilis*, outras espécies de bacteroides, certas fusobactérias, *C. perfringens* e *Clostridium ramosum*. Alguns agentes, como o metronidazol, cloranfenicol, imipeném, ampicilina-sulbactam e ticarcilina-clavulanato, são quase sempre ativos contra bactérias anaeróbicas e não precisam ser testados com propósitos clínicos. Assim, os testes devem limitar-se aos agentes alternativos com atividade imprevisível, como a penicilina, a clindamicina, a cefoxitina, o cefotetano e as cefalosporinas de terceira geração. Embora um método de diluição em ágar tenha sido recomendado com finalidades de referência, o teste no laboratório clínico em geral é realizado pelo método da microdiluição ou teste E. Testes em lotes de isolados salvos anualmente são recomendáveis para desenvolver antibiogramas para uso empírico por parte dos clínicos e monitorar possível desenvolvimento de resistência.

Referências bibliográficas

Abbott SL: *Aeromonas*. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003a, pp 701–705.

Abbott SL: *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003b, pp 684–700.

Discussão excelente dos testes bioquímicos úteis para a identificação de Enterobacteriaceae.

Ampofo K, Graham P, Ratner A, et al: Plesiomonas shigelloides sepsis and splenic abscess in an adolescent with sickle-cell disease. Pediatr Inf Dis J 2001; 20:1178–1179.

Bannatyne RM, Jackson MC, Memish S: Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. J Clin Microbiol 1997; 35:2673.

Bannerman T: *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 384–404.

Excelente revisão dos testes bioquímicos úteis para a identificação de cocos aeróbicos Gram-positivos catalase-positivos. Além disso, inclui uma discussão sobre os importantes mecanismos de resistência e testes que permitem a detecção de isolados resistentes.

Barnett LA, Cunningham MW: A new heart-cross-reactive antigen in *Streptococcus pyogenes* is not M protein. J Infect Dis 1990; 162:875.

Bartlett JG: *Clostridium difficile* infection: pathophysiology and diagnosis. Semin Gastrointest Dis 1997; 8:12.

Bhisitkul DM, Hogan AE, Tanz RR: The role of bacterial antigen detection tests in the diagnosis of bacterial meningitis. Pediatr Emerg Care 1994; 10:67.

Bille J, Rocourt J, Swaminathan B: *Listeria* and *Erysipelothrix*. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 461–471.

Bourbeau PP, Heiter BJ, Figdore M: Use of GenProbe AccuProbe Group B Streptococcus test to detect group B streptococci in broth cultures of vaginal-anorectal specimens from pregnant women: comparison with traditional culture method. J Clin Microbiol 1997; 35:144–7.

Brenden RA, Miller MA, Janda JM: Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infection in humans. Rev Infect Dis 1988; 10:303.

Briselden AM, Hillier SL: Evaluation of Affirm VPmicrobial identification test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1994; 32:148–152.

Broome CV: Listeriosis: can we prevent it? New monitoring techniques are helping to prevent this relatively rare but frequently fatal food-borne disease. ASM News 1993; 59:444.

Carroll K, Reimer L: Microbiology and laboratory diagnosis of upper respiratory tract infections. Clin Infec Dis 1996; 23:4442.

Carroll KC, Aldeen WE, Morrison M, et al: Evaluation of the Abbott LCx ligase chain reaction assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine and genital swab specimens from a sexually transmitted disease clinic population. J Clin Microbiol 1998; 36:1630.

Catlin BW: *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. Clin Microbiol Rev 1990; 3:293.

Centers for Disease Control: Progress toward elimination of *Haemophilius influenzae* type b disease among infants and children United States, 1987–1993. Morbid Mortal Wkly Rep 1994; 43:144.

Centers for Disease Control: Laboratory Practice for prenatal Group B Streptococcus screening – seven states, 2003. Morbid Mortal Wkly Rep 2004a; 53:506–509.

Centers for Disease Control: Vancomycin resistant *S. aureus* – New York, 2004. Morbid Mortal Wkly Rep 2004b; 53:322–323.

Chapin KC, Blake P, Wilson CD: Performance characteristics and utilization of rapid antigen test, DNA probe, and culture for the detection of Group A Streptococcus in an acute care clinic. J Clin Microbiol 2002; 40:4207–4210.

Chapin KC, Musgnug MC: Evaluation of the PBP2a Latex agglutination assay for identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures. J Clin Microbiol 2004;42:1283–1284.

Chediac-Tannoury R, Araj GF: Rapid MRSA detection by Latex Kit. Clin Lab Sci 2003;16:198–202.

Chiedozi LC: Pyomyositis: review of 205 cases in 112 patients. Am J Surg 1979; 137:255.

Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M: Modified Granada Agar Medium for detection of Group B Streptococcus carriage in pregnant women. Clin Microbiol Infect 2001; 7:22–24.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Methods for Suscetibilidade antimicrobiana Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard, 6th ed. CLSI/NCCLS Publication M11-A6. Wayne, PA, NCCLS, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated Fastidious Bacteria — Proposed Guideline. CLSI/NCCLS publication M45-P. Wayne, PA, CLSI 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Methods for Dilution Suscetibilidade antimicrobiana Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, 7th ed. CLSI/NCCLS Document M7-A5. Wayne, PA, CLSI, 2006a.

Essencial para laboratórios que realizam testes de suscetibilidade antimicrobiana por diluição em caldo.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard, 9th ed. CLSI, NCCLS Document M2-A9. Wayne, PA, CLSI, 2006b.

Essencial para laboratórios que realizam testes de suscetibilidade antimicrobiana por difusão em disco.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Performance Standards for Suscetibilidade antimicrobiana Testing; 16th Informational Supplement. M100-S16. Vol 26(1). Wayne, PA, CLSI, 2006c.

Essencial para a interpretação apropriada e o registro dos resultados dos testes de suscetibilidade antibacteriana.

Cloud JL, Woods GL: Nocardia species in the era of sequencing technology. Abstract of Paper read at ASM General Meeting, May 2004.

Cosgrove SE, Carroll KC, Perl TM: *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Clin Infect Dis 2004; 39:539–545.

Discussão excelente do mecanismo de suscetibilidade reduzida à vancomicina no S. aureus *e testes que permitem sua detecção.*

Coykendall AL: Classification and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev 1989; 2:315.

Crabtree JH, Garcia NA: *Corynebacterium striatum* peritoneal dialysis catheter exit site infections. Clin Nephrol 2003; 60:270–274.

Daly JA, Clifton NA, Seskin KC, et al: Use of rapid, nonradioactive DNA probes in culture confirmation tests to detect *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, and *Enterococcus* spp. from pediatric patients with significant infections. J Clin Microbiol 1991; 29:80–82.

Daum RS, Ito T, Hiramatsu K: A novel methicillin resistant cassette in community-acquired MRSA isolates of diverse genetic backgrounds. J Infect Dis 2002; 186:1344–1347.

Dediste A, Vandenberg O, Vlaes L, et al: Evaluation of the ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. Clin Microbiol Infect 2003; 9:1085–1089.

Dillon JR, Carballo M, Pauze M: Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitek, Gonochek II, GonoGen, Phadebact monoclonal GC OMNI test, and Syva Microtrak Test. J Clin Microbiol 1988; 26:493.

Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, et al: Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. J Med Microbiol 2004; 53:745–754.

Edelstein PH: Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Semin Respir Infect 1987; 2:235.

Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, et al: Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. J Infect Dis 2000; 181 :S138–S145.

Facklam RR, Collins MD: Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989a; 27:731.

Facklam RR, Hollis D, Collins MD: Identification of gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. J Clin Microbiol 1989b; 27:724.

Farmer JJ: Enterobacteriaceae:Introduction and Identification. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 643.

Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, et al: Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Engl J Med 1985; 312:404.

Fox KK, Knapp JS, Holmes KK, et al: Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States 1988–1994: the emergence of decreased susceptibility to the fluoroquinolones. J Infect Dis 1997; 175:1396.

Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, et al: Severe community onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton Valentine Leucocidin gene. Clin Infect Dis 2005; 40:100–107.

Friedland I, Gallagher G, King T, et al: Antimicrobial susceptibility patterns in *P. aeruginosa*: data from a multicenter intensive care unit surveillance study (ISS) in the United States. J Chemother 2004; 16:437–441.

Funke G, Bernard KA: Coryneform Gram-positive rods. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 472–501.

Funke G, Renaud FNR, Freney J, Riegel P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. J Clin Microbiol 1997; 35:3122–3126.

Gales AC, Jones RN, Forward KR, et al: Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–1999). Clin Infect Dis 2001; 32:104–113.

Garbino J, Bornand JE, Uckay I, et al: Impact of the *Legionella* urinary antigen test on the management and improvement of antibiotic use. J Clin Pathol 2004; 57:1302–1305.

Gaston DA, Zurowski SM. *Arcanobacterium haemolyticum* pharyngitis and exanthem. Three case reports and a literature review. Arch Dermatol 1996; 132:61–64.

Gavin SE, Leonard RB, Briselden AM, Coyle MB. Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* sp. and other coryneforms. J Clin Microbiol 1992; 30:1692–1695.

Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J: Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 1991; 29:277–282.

Granoff DM, Murphy TV, Ingram DL, et al: Use of rapidly generated results in patient management. Diagn Microbiol Infect Dis 1986; 4(Suppl):157S.

Gupta C, Briski LE: Comparison of 2 culture media and 3 sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B Streptococcus in pregnant women. J Clin Microbiol 2004; 42:3975–3977.

Gurtler V, Mayall BC, Seviour R: Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*. FEMS Microbiol Rev 2004; 28:377–405.

Hale YM, Melton ME, Lewis JS, et al: Evaluation of the Pace 2 *Neisseria gonorrhoeae* assay by three public health laboratories. J Clin Microbiol 1993; 31:451.

Hauser AR, Siriam P: Severe *P. aeruginosa* infections: tracking the conundrum of drug resistance. Postgrad Med 2005; 117:41–48.

Heelan JS, Struminsky J, Lauro P, Sung CJ: Evaluation of a new selective enrichment broth for detection of Group B Streptococcus in pregnant women. J Clin Microbiol 2005; 43:896–897.

Hendley JO, Sande MA, Stewart PM, et al: Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. Carriage rates and distribution of types. J Infect Dis 1975; 132:55.

Hudspeth MK, Hunt S, Citron DM, Goldstein EJ: Evaluation of the RAPID ID CB Plus system for identification of *Corynebacterium* sp. and other gram positive rods. J Clin Microbiol 1998; 36:543–547.

Janda JM: Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev 1991; 4:397.

Janda WM, Guthertz LS, Kokka RP, et al: *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. Clin Infect Dis 1994; 19:77.

Janda WM, Knapp JS: *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 585–608.

Janda JM, Malloy PJ, Schreckenberger PC: Clinical evaluation of the Vitek *Neisseria–Haemophilus* identification card. J Clin Microbiol 1987; 25:37.

Revisão excelente dos métodos úteis para a identificação dos aeróbicos diplococos Gram-negativos.

Janda WM, Montero MC, Wilcoski LM: Evaluation of the Bacti Card Neisseria for identification of pathogenic *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:875–879.

Janda WM, Wilcoski KL, Mandel P, et al: Comparison of monoclonal-based methods and a ribosomal ribonucleic acid probe test for *Neisseria gonorrhoeae* culture confirmation. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12:177–184.

Johansson A, Forsman M, Sjostedt A: The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 2004; 112:898–907.

Johnson S, Gerding DN: *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998; 26:1027.

Jolivet-Gougeon A, Buffet A, Dupuy C, et al: In vitro susceptibilities of *Capnocytophaga* isolates to β-lactam antibiotics and β-lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:3186–3188.

Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM: Cholera. Clin Microbiol Rev 1995; 8:48.

Kaplan EL: Pathogenesis of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: evasive after half a century of clinical, epidemiological, and laboratory investigations. Heart 2005; 91:3–4.

Kehl SC, Georgakas K, Swain GR, et al: Evaluation of the Abbott LCx assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical swab specimens from females. J Clin Microbiol 1998; 36:3549.

Kellogg JA, Orwig LK: Comparison of GonoGen, GonoGen II, and MicroTrak direct fluorescent antibody test with carbohydrate fermentation for confirmation of culture isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 1995; 33:474.

Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, et al: The pneumoplex assays, a multiplex PCR enzyme-hybridization assay that allows the simultaneous detection of 5 organisms, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Bordetella pertussis* and its real-time counterpart. J Clin Microbiol 2005; 43:565–571.

Kilian M: A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. Acta Pathol Microbiol Scand 1974; 82:835.

Kilian M: *Haemophilus*. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 623–635.

Kiska DL, Kerr A, Jones MC, et al: Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996;34:886–891.

Kloos WE, Bannerman TL: *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 264–282.

Knapp JS: Historical perspective and identification of *Neisseria* and related species. Clin Microbiol Rev 1988; 1:415.

Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, et al: An immunogenetic and molecular basis for differences in the outcome of invasive Group A streptococcal infections. Nat Med 2002; 8:1398–1404.

Lee MK and Park AJ: Rapid species identification of coagulase negative staphylococci by rRNA spacer length polymorphisms. J Infect 2001; 42; 189–194.

Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al: Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture *of Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2004;42:5710–5714.

Limberger RJ, Biega R, Evancoe A, et al: Evaluation of culture and the Gen-Probe Pace 2 assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens transported to a state health laboratory. J Clin Microbiol 1992; 30:1162.

Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, et al: Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N Engl J Med 1988; 319:823.

Lion C, Escande F, Burdin JC: *Capnocytophaga camimorsus* infections in humans: review of the literature and a case report. Eur J Epidemiol 1996; 12:521–533.

Logan NA, Turnbull PCB: *Bacillus* and recently derived genera. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 357–369.

Lopez R, Cima MD, Vazquez F, et al: Epidemiologic studies of *S. pneumoniae* carriage in healthy primary school aged children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18:771–776.

MacDonald PD, Whitwam RE, Boggs JD, et al: Outbreaks of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. Clin Infect Dis 2005; 40:677–682.

Makristathis A, Pasching E, Schutze K, et al: Detection of *H. pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1998; 36:2772–2774.

Maxson S, Lewno MJ, Schutze GE: Clinical usefulness of cerebrospinal fluid bacterial antigen studies. J Pediatr 1994; 125:235.

Mirrett S, Lauer BA, Miller GA, Reller LB: Comparison of acridine orange, methylene blue, and gram stain for blood cultures. J Clin Microbiol 1982; 14:562–566.

MMWR: Methicillin resistant *S. aureus* infections among competitive sports participants-2000–2003. Morbid Mortal Wkly Rep 2003; 52:793–798.

Montiero L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, et al: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. Am J Gastroenterol 2001; 96:353–358.

Murray DM: Clinical relevance of infection by *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Newslett 1993; 15:33.

Nebreda-Mayoral T, Munoz-Bellido JL, Garcia-Rodriguez JA: Incidence and characteristics of urinary tract infections caused by *Corynebacterium urealyticum* (*Corynebacterium* group D2). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:600–604.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991; 29:297–301.

Orloff SL, Bush AM, Olyaei AJ, et al: Vancomycin resistant enterococcus in liver transplant patients. Am J Surg 1999; 177:418–422.

Pan ES, Diep BA, Carlton HA, et al: Increasing prevalence of MRSA infections in California jails. Clin Infect Dis 2003; 37:1384–1388.

Parenti DM, Snydman DR: *Capnocytophaga* species: infections in nonimmunocompromised and immunocompromised hosts. J Infect Dis 1985; 151:140–147.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325:1127.

Parsonnet J, Hansen S, Rodriquez L, et al: *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994; 330:1267.

Patel JB, Wallace RJ, Brown-Elliott BA, et al: Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. J Clin Microbiol 2004; 42:2530–2540.

Penner JL: The genus *Campylobacter*: a decade of progress. Clin Microbiol Rev 1988; 1:157.

Perkins MD, Mirrett S, Reller LB: Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J Clin Microbiol 1995; 33:1486.

Perry JD, Davies A, Butterworth LA, et al: Development and evaluation of a chromagar media for methicillin resistant *S. aureus*. J Clin Microbiol 2004; 42:4519–4523.

Peterson LR, Shanholtzer CJ: Using the microbiology laboratory in the diagnosis of pneumonia. Semin Respir Infect 1988; 3:106.

Picard FJ, Bergeron MG: Laboratory detection of Group B streptococci for prevention of perinatal disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:665–671.

Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P: Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. Clin Infect Dis 2005; 40:260–264.

Rossolini GM, Walsh T, Amicosante G: The *Aeromonas* metallo-β-lactamases: genetics, enzymology, and contribution to drug resistance. Microb Drug Resist 1996; 2:245–251.

Ruoff KL: Update on nutritionally variant streptococci (*Streptococcus defectivus* and *Streptococcus adjacens*). Clin Microbiol Newslett 1990; 12:97.

Ruoff KL: *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other infrequently isolated aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 434–444.

Saez-Nieto JA, Lujan R, Berron S, et al: Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitis* in Spain: A 5-year history (1985–1989). Clin Infect Dis 1992; 14:394.

Schuchat A, Whitney C, Zangwill K: Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Morbid Mortal Wkly Rep 1996; 45:RR-7:1.

Shay DK, Maloney SA, Montecalvo M, et al: Epidemiology and mortality risk of vancomycin resistant enterococcal blood stream infections. J Infect Dis 1995; 172:993–1000.

Sopena N, Sabia M, Neunos 2000 Study Group: Multicenter study of hospital-acquired pneumonia in the non-ICU patient. Chest 2005; 127:213–219.

Stout JE, Rihs JD, Yu VL: *Legionella*. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003, pp 809–823.

Discute os testes úteis para o diagnóstico de doença dos legionários e métodos para a identificação de espécies de Legionella.

Tenover FC, Tokars J, Swenson J, et al: Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993; 31:1695.

Thomas JG: Routine CSF antigen detection for agents associated with bacterial meningitis: another point of view. Clin Microbiol Newsl 1994; 16:89–95.

Tolcin R, LaSalvia MM, Kirkley BA: Evaluation of the Alexin ProSpecT Campylobacter Microplate Assay. J Clin Microbiol 2000; 38:3853–5.

Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A: Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. J Infect Dis 1988; 157:413.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al: Community-acquired methicillin resistant *S. aureus* carrying the Panton Valentine Leucocidin gene: worldwide emergence. Emerg Infec Dis 2003; 9:978–984.

Velasco D, DelMar Tomas M, Cartelle M, et al: Evaluation of different methods for detection of methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2005; 55:379–382.

Revisão excelente dos métodos para detecção de S. aureus *resistente à oxacilina.*

Warren DK, Liao RS, Merz LR, et al: Detection of methicillin resistant *S. aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2004; 42:5578–5581.

Wegner D, Witte D, Schrantz R: Insensitivity of rapid antigen detection methods and single blood agar plate culture for diagnosing streptococcal pharyngitis. JAMA 1992; 267:695.

Welch DF, Muszynski MJ, Pai CH, et al: Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1987; 25:1730–1734.

Wellstood SA: Rapid, cost-effective identification of group A streptococci and enterococci by pyrrolidonyl-β-naphthylamide hydrolysis. J Clin Microbiol 1987; 25:1805.

Wilson JP, Turner AP, Kirchner KA, et al: Nocardial infections in renal transplant recipients. Medicine 1989; 68:38.

Woods GL, Gutierez Y: Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993.

Yagupsky P, Peled N, Press J, et al: Comparison of BACTEC 9240 peds plus medium and Isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. J Clin Microbiol 1997; 35:1382.

Leituras adicionais

Finegold SM: Anaerobic Bacteria in Human Disease. New York, Academic Press, 1977.

Forbes B, Sahm D, Weissfeld A (eds): Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 11th ed. St Louis, MO, CV Mosby, 2002.

Koneman EW, Allen SD, Janda W, et al: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia, PA, JB Lippincott, 1997.

Krieg NR, Holt JC (eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1984.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003.

Washington JA II (ed): Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 2nd ed. New York, Springer-Verlag, 1985.

CAPÍTULO 57

Testes de agentes antimicrobianos *in vitro*

Michael B. Smith MD, Gail L. Woods MD

Definições 1193

Métodos inibitórios para o teste de suscetibilidade 1194
- Teste de diluição 1194
- Epsilômetro 1194
- Difusão em disco 1195
- Testes diretos para β-lactamase 1195
- Considerações técnicas do teste 1195
- Sistemas instrumentais automatizados comerciais 1197

Indicações para o teste de suscetibilidade 1198

Seleção de antibióticos para o teste 1199

Seleção de antibióticos para o relatório 1202

Relatórios de suscetibilidade antimicrobiana cumulativos 1202

Testes bactericidas 1202
- Concentração bactericida ou letal mínima 1203
- Estudos de taxa de destruição 1203
- Teste bactericida sorológico 1204

Referências bibliográficas 1204

PONTOS-CHAVE

- A concentração inibitória mínima (CIM), ou a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento visível de um organismo *in vitro*, difere do ponto de ruptura, ou a concentração de antibiótico (expressa em CIM) que determina se um isolado é classificado como suscetível, intermediário ou resistente.
- Os valores de CIM são determinados pelos métodos inibitórios de teste, que incluem diluição em macrocaldo, diluição em microcaldo e epsilômetro (E-teste). O teste de difusão em disco, que é mais qualitativo do que quantitativo, não resulta diretamente em um valor de CIM, contudo, baseia-se na correlação direta dos tamanhos de zona inibitória com os valores de CIM.
- Seja qual for o método de teste de suscetibilidade utilizado, são necessárias condições padronizadas de meio, concentração de inóculo e tempo de incubação e temperatura para obtenção de resultados acurados e reproduzíveis. Essas condições são publicadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e representam o padrão da prática laboratorial.
- Existem sistemas instrumentais automatizados comerciais que permitem realizar com rapidez um grande volume de testes de suscetibilidade. Entretanto, apesar das vantagens em termos de velocidade e eficiência proporcionadas por esses sistemas, é preciso lembrar que cada um deles possui pontos fracos específicos. Além dos gastos associados ao uso desses equipamentos, alguns sistemas apresentam problemas de detecção de fenótipos específicos de resistência.
- Tanto as indicações para realização de testes de suscetibilidade de isolados individuais quanto a seleção dos antibióticos a serem testados e incluídos no relatório constituem aspectos a serem determinados por cada laboratório, com base nas recomendações publicadas pelo CLSI, mediante consulta do médico e do departamento de doenças infecciosas do estabelecimento.
- Os relatórios cumulativos de suscetibilidade antimicrobiana (antibiogramas) devem ser publicados pelos laboratórios, segundo as diretrizes estabelecidas pelo CLSI, pelo menos uma vez por ano. É essencial que o médico use essas compilações ao iniciar um tratamento empírico, assim como os farmacêuticos necessitam utilizá-las no monitoramento da necessidade de administrar novos antibióticos e como tentativa de controlar os custos dos fármacos destacando o uso de antibióticos menos caros.
- A utilização de testes de suscetibilidade bactericida (concentração bactericida mínima, estudos de taxa de destruição e teste sorológico bactericida) tem como propósito ser útil em certas circunstâncias específicas relacionadas com a avaliação das características de novos antibióticos, terapia de tipos específicos de infecção, uso concomitante de vários antibióticos ou avaliação da eficácia de um dado antibiótico em condições estimuladas *in vivo*. Esses testes são tecnicamente exigentes, seu uso é controverso, e a maioria dos laboratórios solicita sua execução junto a laboratórios de referência e/ou restringe sua utilização aos médicos especialistas em doenças infecciosas.

A escolha de um agente antibiótico em particular depende de numerosos fatores, tais como o local de infecção; fatores relacionados com o hospedeiro (p. ex., estado imunológico, função hepática e renal, história de alergias); características de absorção, propriedades farmacocinéticas e requerimentos de dosagem do fármaco; suscetibilidade local e padrões de resistência; experiência pessoal com antibióticos individuais; custo de cada antibiótico e suscetibilidade do isolado ao antibiótico (quando conhecida). Embora em muitos casos a seleção do tratamento inicial seja empírica, os testes de suscetibilidade são importantes para ajudar a modificar a terapia, se houver indicação. Essa modificação pode ser necessária se: 1) o organismo infeccioso for resistente ao antibiótico administrado, 2) a dose de antibiótico for inadequada ou 3) puder ser utilizado um fármaco igualmente eficaz e mais econômico.

Definições

À medida que são adquiridos mais conhecimentos acerca dos mecanismos de resistência antimicrobiana, métodos moleculares para determinação da resistência vão sendo disponibilizados. Esses métodos atualmente constituem a minoria em relação àqueles convencionais ou fenotípicos. Além disso, a maioria limita-se a aplicações específicas para espécies específicas. Em contrapartida, ao menos uma vez e em numerosos casos, diversos métodos do tipo fenotípico são empregados na maioria dos laboratórios de microbiologia que realizam teste de suscetibilidade antimicrobiana. Esses métodos detectam a expressão fenotípica de um mecanismo de resistência presente em um dado isolado. Alguns exemplos são a diluição em caldo, diluição em ágar, difusão em disco e difusão em gradiente (E-teste). Sistemas comerciais baseados em métodos fenotípicos também são utilizados em muitos laboratórios que necessitam de sistemas condescendentes com um alto volume de *throughput* (número de testes que podem ser realizados em um determinado intervalo de tempo).

O CLSI (antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]) estabeleceu categorias de interpretação para combinações antibiótico-patógeno específicas. Essas categorias são "suscetível", "intermediária" e "resistente". As definições dessas categorias constam em publicações do CLSI, que delineiam os padrões de desempenho para testes de diluição (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a) e para testes de difusão em disco (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003b). Apesar de essas publicações não passarem por revisões anuais, o CLSI publica um suplemento informativo anual (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005) que contém atualizações e alterações dos padrões de desempenho. A classificação "suscetível" implica uma infecção produzida por isolado específico que pode ser tratada de maneira adequada com a dose reco-

mendada de um dado antibiótico. A classificação "resistente" implica uma resposta improvável ou ausente por parte do isolado a concentrações viáveis de antibiótico administrado em doses normais. Entre essas duas categorias, há a classificação "intermediário", criada para atuar como "tampão" e evitar que fatores técnicos envolvidos na execução de testes de suscetibilidade produzam discrepâncias significativas na interpretação. A classificação "intermediária" também implica a existência de uma infecção causada por um isolado específico que pode ser tratada com altas doses de antibiótico, ou de uma infecção localizada em um sítio anatômico onde o antibiótico é concentrado (p. ex., antibióticos β-lactâmicos na urina). Todavia, é importante lembrar que esses testes e interpretações são estimativas da atividade antimicrobiana *in vitro*. A atividade antimicrobiana *in vivo* depende de muitos fatores, tais como dose, via de administração, estado imunológico, espaço de distribuição do antibiótico, características farmacocinéticas do antibiótico e *status* funcional hepático e/ou renal do paciente. Esses fatores atuam sobre a resposta do paciente à terapia e devem ser considerados na avaliação médica e no plano de tratamento. O teste de suscetibilidade, portanto, é um adjuvante do tratamento do paciente e por si só não prediz completamente a resposta do paciente à terapia.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana podem ser classificados de acordo com o ponto final adotado – inibição ou destruição. A maioria dos testes utilizados em laboratórios de microbiologia considera a inibição. Existem usos limitados que se aplicam à determinação da atividade letal de um antibiótico *in vitro*.

O parâmetro inibitório que constitui a base da maioria dos testes de suscetibilidade é a CIM. Trata-se da menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento visível de um organismo em um sistema *in vitro*. Os resultados da CIM dependem não só da relação existente entre o organismo e o antibiótico, mas também de uma variedade de fatores ambientais que afetam a interação entre os organismos e o antibiótico no sistema. Esses fatores incluem o pH e as concentrações iônicas do meio de cultura utilizado, a temperatura de incubação do sistema, a atmosfera de incubação, a quantidade de organismos inoculada e a duração da incubação do sistema. Para haver reprodutibilidade intra- e interlaboratorial, bem como para que diferentes laboratórios obtenham os mesmos resultados, é necessário padronizar essas variáveis. Nos Estados Unidos, o CLSI é responsável pela padronização dos métodos e instituição do controle de qualidade, além de publicar periodicamente atualizações detalhadas dos padrões, que podem ser adotadas como referência pelos laboratórios.

A CIM deve ser distinguida do ponto de ruptura interpretativo. O ponto de ruptura representa o nível de antibiótico (quantitativamente expresso como CIM) que determina se um isolado é classificado como suscetível, intermediário ou resistente. Pontos de ruptura permitem que a CIM seja utilizada como ferramenta auxiliar na predição da resposta do paciente infectado à terapia (Mouton, 2002). Nesse contexto, o ponto de ruptura microbiológico deve ser diferenciado do ponto de ruptura clínico. Enquanto o primeiro separa diferentes isolados em suas suscetibilidades a um dado antibiótico segundo uma distribuição modal, o ponto de ruptura clínico permite avaliar a probabilidade de haver uma resposta do paciente à terapia (Mouton, 2002). Se o isolado for suscetível, se a CIM para a referida combinação espécie-fármaco for inferior ao ponto de ruptura clínico que permite a classificação na categoria suscetível, então a probabilidade de sucesso terapêutico é boa. Contudo, se o isolado for resistente, haverá maior probabilidade de falha terapêutica. Deve ser evidente que a determinação de um ponto de ruptura clínico é uma tarefa complexa e depende não só da relação antibiótico-microrganismo e de quaisquer mecanismos de resistência que o patógeno eventualmente apresente, mas também da relação existente entre o fármaco e o paciente. A concentração de fármaco que pode ser obtida a partir dos diversos compartimentos do corpo do paciente (sangue, líquido cerebrospinal [LCE], urina etc.) e, consequentemente, a quantidade de antibiótico disponível para combater a infecção dependem das propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas do antibiótico que, por sua vez, são modificadas pelo estado funcional de diversos sistemas corporais no paciente (p. ex., sistema hepático ou renal). É preciso realizar numerosas triagens para examinar todos esses fatores – dados devem ser coletados e analisados, para que os pontos de ruptura sejam determinados após extensivos estudos. O CLSI publica pontos de ruptura para uso em laboratórios clínicos nos Estados Unidos, bem como os avalia e atualiza anualmente (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).

Métodos inibitórios para o teste de suscetibilidade

Teste de diluição

No teste de diluição, uma quantidade padronizada de microrganismos é inoculada em uma série de tubos, poços ou placas de cultura que contêm uma gama de concentrações de antibióticos em um veículo, como um caldo ou ágar, usualmente começando-se por uma integral de potência 2 (p. ex., 128 μg/mL) seguida de uma diminuição baseada em $\log_2$ (p. ex., 64, 32, 16, 8, 4) até a menor concentração a ser testada. Por questões de conveniência e economia, tornou-se comum limitar a faixa de concentrações de cada agente antimicrobiano testado às concentrações que abrangem os pontos de ruptura diferenciadores das categorias "suscetível" e "resistente". De fato, alguns sistemas comercializados contêm apenas uma única concentração de um dado agente antimicrobiano.

O método da macrodiluição em caldo utiliza tubos de ensaio-padrão, os quais são observados a olho nu para determinação de um eventual crescimento presente no meio. Por seu caráter trabalhoso, o sistema de macrodiluição em caldo deixou de ser utilizado pela maioria dos laboratórios de microbiologia clínica. Contudo, a metodologia desse sistema constitui a base fundamental de diversos sistemas modernos de teste de suscetibilidade. De modo semelhante, o método da diluição em ágar – em que o antibiótico testado é incorporado ao ágar sólido em placas de Petri – é um método mais antigo e trabalhoso, atualmente pouco empregado na rotina dos modernos laboratórios de microbiologia. Entretanto, como o isolado a ser testado é transferido para o ágar em que constitui um ponto isolado, o método da diluição em ágar permite testar múltiplos isolados em uma única placa. Além disso, esse método permite testar algumas espécies mais exigentes, que não crescem bem em caldos. Com exceção do grupo *Bacterioides fragilis*, a diluição em ágar é o único método padronizado aprovado pelo CLSI para uso como teste de suscetibilidade de espécies anaeróbias (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004).

A microdiluição em caldo é o método de diluição mais comumente utilizado nos modernos laboratórios de microbiologia. Esse método constitui a base da maioria dos sistemas comercializados. Bandejas de microtitulação que contêm anticorpos, descartáveis e comercialmente preparadas, são disponibilizadas na forma de dispositivos autônomos, que são manualmente inoculados e cuja leitura é feita visualmente. Alternativamente, esses sistemas também são disponibilizados como sistemas automatizados cuja leitura é feita utilizando-se métodos espectrofotométricos. Atualmente, embora existam numerosos sistemas aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso como testes de suscetibilidade automatizados nos Estados Unidos, os dois mais utilizados são o Vitek system (bioMerieux Vitek, Hazelwood, MO, EUA) e o Microscan system (Baxter Diagnostics, Inc., Sacramento, CA, EUA). Esses sistemas já existem há vários anos, possuem extensos bancos de dados e proporcionam a vantagem de contar com um *software* que permite a coleta de dados de antibiograma, além de fornecer um sistema de interpretação especializado para auxiliar na interpretação dos resultados. Como o preparo das bandejas de microtitulação *in-house* é trabalhoso e requer um extensivo teste para garantia de qualidade, as bandejas e os sistemas comercialmente preparados se tornaram bastante populares. Entretanto, esses produtos são um tanto caros, e os antibióticos fornecidos com uma determinada bandeja nem sempre estão exatamente de acordo com o formulário da instituição.

Epsilômetro

O epsilômetro (ou E-teste; AB Biodisk, Solna, Suécia) é uma tira plástica que contém um gradiente crescente de um dado antibiótico em um dos lados e uma escala de CIM contínua no lado oposto. A tira é colocada sobre a superfície de uma placa de ágar previamente inoculada com o isolado de interesse. O antibiótico contido na tira se difunde pelo ágar circundante segundo um gradiente que corresponde ao gradiente da tira. Quando o isolado é suscetível, forma-se uma

elipse de inibição de crescimento em meio ao crescimento bacteriano na placa. O ponto da escala de CIM em que a elipse de inibição intercepta a tira é a CIM (Fig. 57.1). Foi demonstrado que a CIM obtida por meio do E-teste apresenta boa correlação com aquela obtida pelos métodos da diluição em ágar ou caldo utilizando-se diversas combinações de espécie bacteriana-antibiótico (Baker, 1991). Trata-se de um método útil, pois permite testar antibióticos individuais contra isolados específicos, particularmente quando são testadas bactérias exigentes que crescem melhor em meio ágar especial (p. ex., *Haemophilus influenzae*). Contudo, existem limitações, e o método é caro demais para ser utilizado como método de rotina laboratorial para a maioria dos testes de suscetibilidade. Alguns antibióticos sensíveis ao pH podem fornecer valores de CIM que não apresentam correlação exata com os métodos da diluição em caldo (Gerrado, 1996).

Difusão em disco

No teste de difusão em disco (Kirby-Bauer), bastante restrito às bactérias aeróbias de crescimento rápido e às bactérias anaeróbias facultativas, um disco de papel que contém uma determinada quantidade (sem ser a concentração) de agente antimicrobiano é transferido para uma superfície de ágar previamente inoculada com um inóculo-padrão do isolado de interesse. O teste é feito em uma placa de ágar, cujo diâmetro mede 150 mm, que permite testar até 12 antibióticos de uma vez. O antibiótico difunde-se no ágar do disco, e, como resultado, forma-se uma zona de inibição de crescimento no ponto em que uma concentração crítica de agente antimicrobiano contida no meio inibe o crescimento da bactéria, após um determinado intervalo padronizado de tempo (16–18 horas) (Fig. 57.2). Foi demonstrado que o diâmetro da zona de inibição é inversamente proporcional à CIM. A relação existente entre ambos pode ser expressa por uma curva linear de regressão. Os equivalentes do diâmetro da zona de inibição para interpretações suscetíveis, intermediárias e resistentes podem ser extrapolados a partir das respectivas interceptações da curva de regressão com os valores correspondentes de CIM.

A difusão em disco é um método simples que fornece um resultado qualitativo de suscetibilidade. Esse método permite modificar facilmente a bateria de antibióticos testados, além de ser econômico em relação aos demais métodos. Para laboratórios com grande volume de material, todavia, a falta de automatização pode ser um impedimento. Além disso, embora existam modificações que permitem testar as espécies mais exigentes (p. ex., *Streptococcus pneumoniae* e outras espécies de *Streptococcus*; *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae*), muitas outras espécies fastidiosas e de microrganismos anaeróbios ainda não podem ser testadas por meio dessa metodologia (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003b).

Testes diretos para β-lactamase

Os testes diretos para β-lactamase não são inibitórios. Trata-se de testes fenotípicos que detectam a produção de β-lactamase por um organismo. Eles são discutidos com os testes inibitórios porque, assim como estes, são comumente utilizados nos laboratórios clínicos. Basicamente, existem três tipos de testes diretos: acidométrico, iodométrico e cromogênico. O método cromogênico é o mais suscetível e específico, substituiu os demais tipos de testes em termos de uso laboratorial, e é o único tipo que discutiremos aqui. O teste cromogênico consiste em um disco de papel impregnado com cefalosporina cromogênica (nitrocefina). Uma alça repleta de bactérias a serem testadas é simplesmente passada no disco. Se houver organismos produtores de β-lactamase, haverá hidrólise da cefalosporina cromogênica, e a cor amarela do disco se tornará vermelha. Essa reação usualmente ocorre em 1 minuto, contudo, os discos devem ser observados por até 15 minutos para obtenção de uma leitura final. Um teste positivo indica que a bactéria não responderá às penicilinas suscetíveis à penicilinase. O teste é útil para testar a suscetibilidade de diversas espécies, entre as quais *H. influenzae, Moraxella catarrhalis, Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e microrganismos anaeróbios Gram-negativos (exceto do grupo de *B. fragilis*). No caso de algumas espécies (p. ex., *Staphylococcus*), é preciso notar que um teste positivo é indicativo de produção de penicilinase, enquanto um teste negativo é considerado inconclusivo. As β-lactamases estafilocócicas são induzidas, em vez

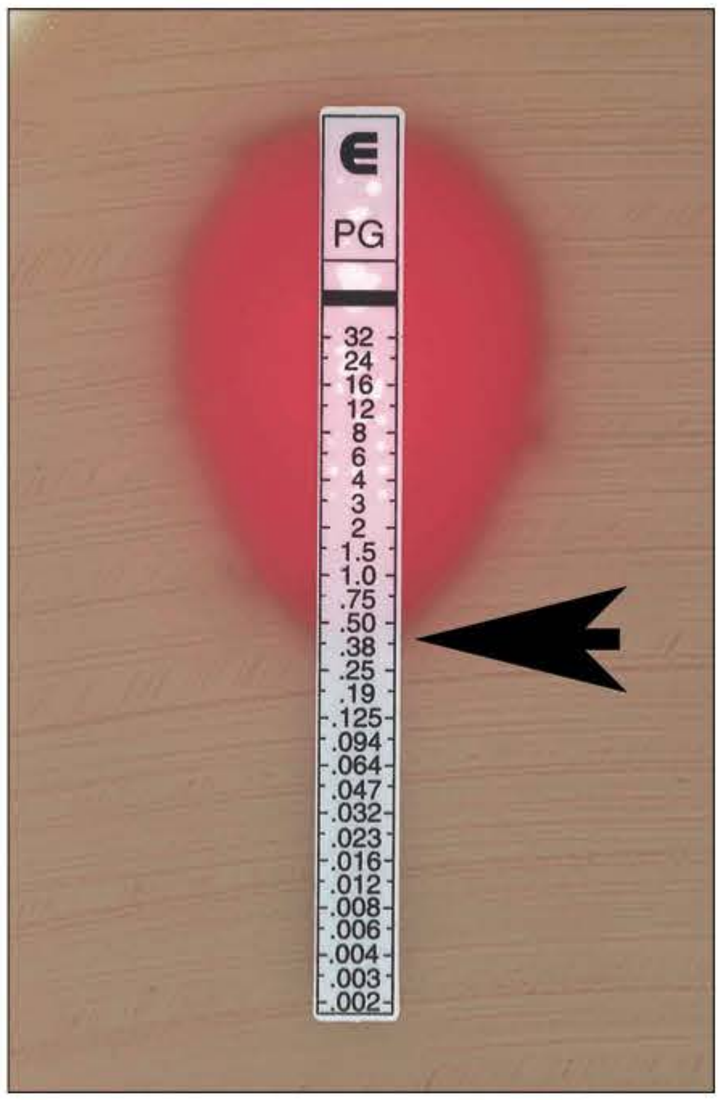


Figura 57.1 Epsilômetro ou E-teste. Um gradiente de antibiótico (no exemplo, penicilina) é incorporado à tira plástica, que é colocada sobre a superfície de ágar onde um organismo (*Streptococcus pneumoniae*) foi semeado em faixas. A intersecção da zona de inibição com a escala numérica da tira é lida como CIM (seta).

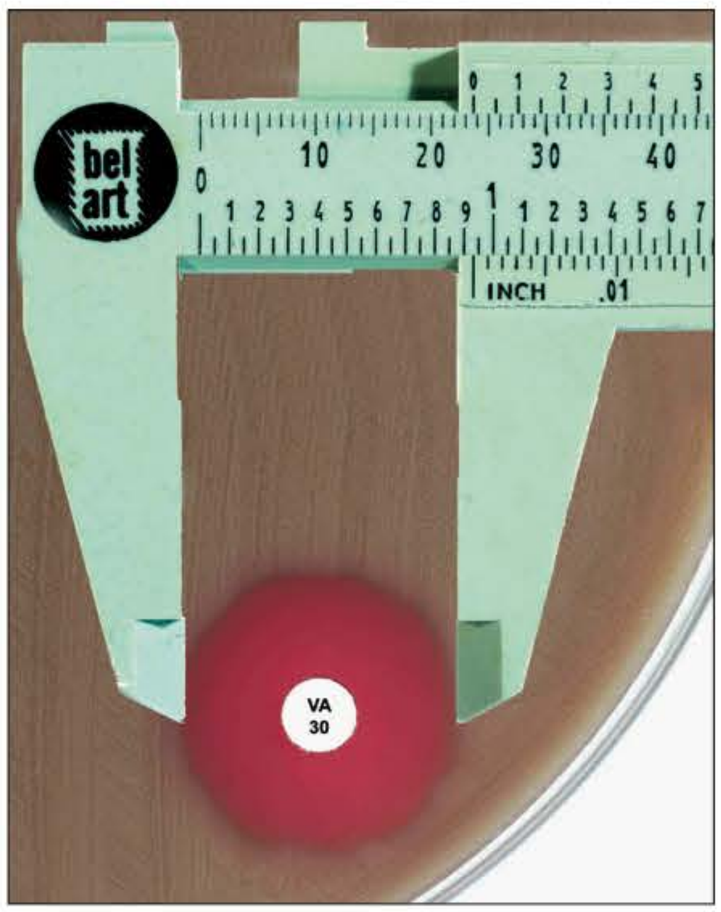


Figura 57.2 Difusão em disco. É obtida a medida da zona de inibição em torno do disco de antibiótico (no exemplo, vancomicina) depositado na superfície de ágar onde o organismo (*Streptococcus pneumoniae*) foi semeado em faixas. Os resultados possíveis são "suscetível", "intermediário" ou "resistente", de acordo com o tamanho da zona.

de constitutivas, como nas demais espécies listadas. Se um isolado de estafilococos resulta negativo no teste com nitrocefina, é preciso expô-lo a níveis subletais de um agente β-lactâmico (uma fonte simples consiste no crescimento a partir das bordas da zona inibitória, ao redor de um disco que contenha um agente β-lactâmico, como a oxacilina, em uma placa de difusão em disco) e repetir o teste.

Considerações técnicas do teste

Seja qual for o método de teste (diluição ou difusão em disco) adotado por um laboratório, a utilização de um procedimento padronizado é de importância fundamental para a produção de resultados

acurados e reproduzíveis. Nos Estados Unidos, organizações profissionais (p. ex., a American Society for Microbiology, Infectious Diseases Society of America), agências governamentais e indústria privada trabalham unidas e em consenso sob a orientação do Area Committee on Microbiology of the CLSI. Esses grupos trabalham juntos no Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing, no Area Committee on Microbiology, para produzir uma série de documentos que descrevem procedimentos padronizados para testes de suscetibilidade destinados a bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a, 2003b), bactérias anaeróbias (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004), micobactérias, nocárdias e outros actinomicetos aeróbios (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003c), fungos filamentosos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000b) e leveduras (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002c, 2004). O Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing revisa os textos de cada documento em um ciclo de 3 anos, bem como revisa e corrige anualmente as tabelas que detalham pontos de ruptura da CIM ou pontos de ruptura de diâmetros de zona. Os procedimentos padronizados e publicados pelo CLSI representam o padrão da prática laboratorial, e cabe aos laboratórios garantir a disponibilização das tabelas e textos mais recentes, bem como a incorporação das revisões dessas tabelas e textos aos métodos e políticas adotados no estabelecimento.

Meio

Uma variável importante no teste de suscetibilidade é a composição do meio. Atualmente, para testar bactérias aeróbias e bactérias facultativas, o CLSI recomenda o uso de caldo ou ágar Mueller-Hinton, que apresentam uma boa reprodutibilidade de lote a lote; baixo conteúdo de sulfonamida, trimetoprim e inibidores de tetraciclina e sustentam o crescimento da maioria das bactérias patogênicas não fastidiosas. Algumas bactérias, como os estreptococos, não crescem bem sobre ou em caldo ou ágar Mueller-Hinton, mas esse problema pode ser solucionado pela adição de sangue de carneiro desfibrinado ou sangue de cavalo lisado ao meio, a uma concentração final de 2 a 5% (v/v).

Vários componentes ou suplementos para o meio Mueller-Hinton podem afetar os resultados dos testes de suscetibilidade. Nos testes de diluição em caldo e difusão em disco, variações da concentração de cálcio, magnésio e zinco afetam os resultados (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a, 2003b). O excesso de cálcio e magnésio faz que os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* testados contra aminoglicosídeos, bem como todas as bactérias testadas contra tetraciclinas, pareçam mais resistentes. A diminuição dos níveis desses cátions resultará na constatação de uma falsa suscetibilidade. O nível de íons cálcio afeta os resultados do teste para daptomicina, enquanto o conteúdo de íons zinco influenciará os resultados do teste para carbapenêmicos. O pH do meio também influenciará os resultados do teste, devendo estar entre 7,2 e 7,4 para que sejam obtidos resultados acurados. Um pH abaixo desse intervalo pode acarretar perda de potência de fármacos como aminoglicosídeos, quinolonas e macrolídeos, enquanto outros (p. ex., penicilinas) parecem apresentar atividade excessiva. Um pH acima de 7,4 pode produzir efeitos opostos.

Para os testes de diluição em ágar ou caldo, a suplementação do ágar ou caldo Mueller-Hinton, respectivamente, com NaCl a 2% (p/v) é recomendada para melhorar a detecção de estafilococos resistentes à oxacilina (meticilina) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a). Uma abordagem alternativa para detectar *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente ou estafilococos coagulase-negativos consiste no procedimento de triagem em placa com oxacilina (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a). A adição de NaCl a 4% (p/v) e 6 μg de oxacilina/mL ao ágar Mueller-Hinton para, em seguida, inocular uma alíquota suspensão de isolado de 0,5 McFarland, permite detectar estafilococos oxacilina-resistentes (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a). Os enterococos resistentes à vancomicina podem ser detectados por meio de um procedimento similar de triagem em ágar, utilizando-se ágar BHI suplementado com 6 μg de vancomicina/mL (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a).

Outros aspectos relacionados com o meio que merecem destaque estão associados ao teste de suscetibilidade de organismos fastidiosos. No caso das espécies de *Haemophilus*, o meio de teste para *Haemophilus* (HTM, *Haemophilus test medium*) é recomendado para a CIM dos testes de diluição em caldo (a diluição em ágar não é válida para o gênero) ou de difusão em disco. Para *N. gonorrhoeae*, indica-se o ágar GC (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a, 2003b). O meio Mueller-Hinton que seja tanto quanto possível isento de timidina é importante para uma determinação acurada da suscetibilidade de um isolado ao trimetoprim-sulfametoxazol. Algumas espécies podem utilizar a timina ou timidina do meio para desviar o mecanismo de ação do trimetoprim e das sulfonamidas, resultando em uma falsa resistência. A fosforilase da timidina pode ser incorporada ao meio para melhorar a confiabilidade do teste com trimetoprim-sulfametoxazol.

Para o teste de suscetibilidade de microrganismos anaeróbios, o método de referência é a diluição em ágar com emprego de ágar de *Brucella* suplementado com sangue hemolisado de carneiro, hemina e vitamina K_1 (método de Wadsworth). Esse método é também o único aprovado pelo CLSI para uso como teste de suscetibilidade para a maioria das espécies anaeróbias (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). Os métodos de difusão em disco e de diluição em caldo atualmente não são recomendados para anaeróbios, pois apresentam fraca correlação com o método da diluição em ágar. Uma exceção a essa regra são as espécies do grupo *B. fragilis*, para as quais uma alternativa aprovada é a microdiluição com emprego de caldo de *Brucella* que contenha hemina, vitamina K e sangue de cavalo lisado a 5%. Em comparação à diluição em ágar, o número de antibióticos que podem ser testados pelo método da diluição em microcaldo é mais limitado.

Outros aspectos relacionados com o meio também podem afetar a difusão em disco. Exemplificando, a profundidade da camada de ágar nas placas deve ser igual a 4 mm, caso contrário, o gradiente de difusão do antibiótico será afetado. Será constatada uma falsa resistência se a camada de ágar for muito profunda e, ao contrário, uma camada de ágar rasa resultará em falsa suscetibilidade. Quando o ágar Mueller-Hinton é suplementado com sangue, as zonas de inibição de crescimento podem ser de 2 a 3 mm menores do que aquelas produzidas em ágar sem suplementação. A suplementação com sangue de carneiro também pode resultar na formação de zonas de margens indistintas em torno dos discos de trimetoprim-sulfametoxazol ou na produção de uma película de crescimento com a zona de inibição.

Inóculo

Variações do tamanho do inóculo são responsáveis por uma significativa variação dia a dia nos resultados dos testes de suscetibilidade. Usar um inóculo adequado é particularmente importante para a detecção acurada da resistência à oxacilina por estafilococos, bem como às penicilinas de amplo espectro e cefalosporinas por isolados Gram-negativos que contêm β-lactamases de classe I (p. ex., *Enterobacter, Citrobacter, Pseudomonas*). O CLSI recomenda suspensões de inóculo com densidade igual a 0,5 McFarland (em comparação ao padrão de turbidez da suspensão de $BaSO_4$) para uso em testes de difusão em disco (que fornecem uma concentração bacteriana final de 1–2 x 10^8 CFU/mL) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003b). Para a diluição em caldo, a suspensão de 0,5 McFarland é diluída a uma concentração bacteriana final de 5 x 10^5 CFU/mL (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a). A importância de uma densidade acurada de inóculo é bem ilustrada pela ocorrência frequente de uma alta taxa de suscetibilidade de *Enterobacter cloacae* à ampicilina em laboratórios que utilizam sistemas de diluição em microcaldo. Embora a taxa de suscetibilidade não deva ultrapassar 5% para essa espécie, os laboratórios com frequência relatam taxas acima desse percentual (às vezes, de até 40%). Isso se deve diretamente à densidade demasiado baixa do inóculo. Usuários de métodos de microdiluição em caldo devem realizar avaliações quantitativas da densidade de seus inóculos regularmente.

Um segundo fator relacionado com o inóculo é o método de preparação. Existem dois métodos de preparação de inóculos. O primeiro é o método do crescimento, em que de 3 a 5 colônias de bactérias são inoculadas no caldo e incubadas até que o crescimento bacteriano produza uma turbidez equivalente ao padrão de 0,5 McFarland. O outro é o método da suspensão direta de colônias, em que as colônias obtidas a partir de placas de 18 a 24 horas são utilizadas para produção de

uma suspensão equivalente ao padrão de 0,5 McFarland. Para a maioria das espécies, ambos os métodos são equivalentes. Para as espécies mais exigentes (p. ex., *H. influenzae, S. pneumoniae*, outros estreptococos, *N. gonorrhoeae*) ou para a detecção da resistência à oxacilina por estafilococos, recomenda-se o método da suspensão direta de colônias (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a, 2003b).

Incubação

As condições de incubação também afetam os resultados dos testes. Em geral, recomenda-se a incubação de um dia para o outro (*overnight*, 16 a 20 horas), em atmosfera ambiente a 35°C. Contudo, há exceções. Isolados de *S. pneumoniae, H. influenzae* e *N. gonorrhoeae* requerem incubação em atmosfera que contenha 5% de CO_2, sendo que as espécies *S. pneumoniae* e *N. gonorrhoeae* devem ser incubadas por 20 a 24 horas, em vez de por 16 a 20 horas. Os estafilococos e enterococos também devem ser incubados durante 24 horas, a fim de garantir a detecção da resistência à oxacilina e à vancomicina, respectivamente. No caso dos microrganismos anaeróbios, as placas de diluição em ágar devem ser incubadas por 42 a 48 horas, enquanto as placas de diluição em caldo são incubadas por 46 a 48 horas. As espécies de *Candida* são incubadas durante 46 a 50 horas quando testadas por diluição em caldo, ao passo que *Cryptococcus neoformans* requer incubação durante 70 a 74 horas. Mais detalhes podem ser obtidos consultando-se os devidos padrões do CLSI.

Sistemas instrumentais automatizados comerciais

De acordo com os resultados de uma recente pesquisa sobre preferências metodológicas e acurácia de testes, realizada pelo College of American Pathologists, a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica nos Estados Unidos atualmente utiliza sistemas à base de microdiluição, sendo que na maioria dos casos são adotados sistemas automatizados comerciais (Jones, 2001). Um dos motivos que levaram a essa troca do teste de difusão em disco pela tecnologia da diluição automatizada foi o ganho em eficácia proporcionado pela inoculação em réplicas dos sistemas combinados dos testes de identificação e suscetibilidade, bem como pelo *software* administrativo que integra vários desses sistemas. Outro motivo está relacionado com conceitos equivocados quanto ao fato de que os valores de CIM sejam mais acurados e quanto a quais são as preferências dos médicos. Entretanto, muitos médicos não especializados em doenças infecciosas encontram dificuldade para interpretar e utilizar os valores de CIM, necessitando que os laboratórios relatem tais valores acompanhados das categorias interpretativas. Além disso, como não existem estudos que demonstrem a superioridade clínica definitiva dos valores de CIM em relação às categorias interpretativas isoladas na prática de rotina (o que não surpreende, pois ambos apresentam forte correlação estatística), a opção por utilizar o teste de diluição ou o teste de difusão pode ser feita de acordo com a conveniência ou considerando-se os aspectos econômicos.

Existem muitas opções disponíveis entre os sistemas comercializados. Antes de adquirir um sistema desse tipo, o administrador do laboratório deve considerar se as vantagens proporcionadas pela inoculação em replicatas e pelos sistemas de supervisão de dados compensam os custos adicionais dos produtos, comparativamente à simplicidade e economia oferecidas pelo teste de difusão em disco. Há uma tendência para se considerar o teste de difusão em disco arcaico e pouquíssimo sofisticado para a prática laboratorial moderna. Contudo, esse teste fornece resultados acurados que podem ser facilmente compreendidos pelos prestadores de assistência à saúde, além de serem econômicos, flexíveis e convenientes a quase todas as situações clínicas. A falta de automatização do teste, porém, talvez represente um impediente ao uso por laboratórios com alto volume de exames.

A escolha de um sistema automatizado em particular deve se basear em numerosas considerações. Estas incluem o volume de testes, o nível exigido de conhecimentos especializados, a necessidade de supervisão dos dados, a necessidade de um sistema comum de identificação de bactérias, a compatibilidade com sistemas de informação laboratorial, o custo do equipamento (compra ou locação), o custo de suprimentos descartáveis, reagentes e contratos de serviços, bem como a disponibilidade de espaço. No caso do sistema VITEK (bioMerieux, Hazelwood, MO, EUA), os agentes antimicrobianos ficam contidos nos poços de um cartão de plástico que possui de 35 a 40 poços. O sistema é composto por um módulo preenchedor-selador, uma incubadora leitora, um módulo computacional, um terminal de dados e uma impressora. O sistema VITEK 2 atualmente tem substituído a repetição original do sistema. Enquanto o sistema original monitorava a turbidez junto aos poços, o VITEK 2 combina um fluorímetro multicanais a um fotômetro para registrar a fluorescência, turbidez e dados colorimétricos a intervalos de 15 minutos, possibilitando a obtenção de dados de identificação e suscetibilidade dentro de um período de 4 a 15 horas.

Existem diversos sistemas de microdiluição em que os reagentes antimicrobianos são fornecidos em estado congelado ou liofilizado. A escolha desses sistemas baseia-se não só na disponibilidade de espaço para armazenamento (*freezers*) das bandejas quanto também no tempo de manipulação requerido por cada sistema. O Microscan Walkaway (Dade Microscan, Sacramento, CA, EUA) incuba e varre qualquer ponto das 40 a 96 bandejas de microdiluição previamente reidratadas e inoculadas de forma manual. O sistema é capaz de ler painéis convencionais por turbidimetria após incubação de um dia para o outro, ou painéis rápidos que utilizam metodologia fluorométrica.

O Sensititre Automated Reading e o Incubation System (ARIS, TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH, EUA) também detectam fluorescência em bandejas Sensititre, sendo que os sistemas são totalmente automatizados. O Sensititre oferece duas opções de ajuste de bandeja: uma delas contém substrato fluorogênico nos poços e é utilizada tanto no sistema ARIS automatizado como no Autoreader semiautomático; a outra opção requer adição do substrato fluorogênico, que pode ser lido manualmente (sem substrato), com o Autoreader ou no ARIS. Entre os sistemas atualmente aprovados pelo FDA, o VITEK 2, o Microscan e o ARIS proporcionam uma capacidade de *walkway*, que permite aos técnicos ficarem livres para realizar outras tarefas no laboratório.

A velocidade do teste de suscetibilidade é bastante destacada pelos fabricantes desses sistemas, entretanto, apenas alguns estudos avaliaram se o fornecimento mais rápido de resultados de suscetibilidade realmente tem importância clínica ou financeira. Em um estudo não aleatorizado, Matsen (1985) relatou os resultados fornecidos em 2 a 5 horas por sistemas de testes de suscetibilidade e de difusão em disco e, em seguida, perguntou aos médicos se a obtenção mais rápida de resultados influenciava suas escolhas de terapia antimicrobiana. Em 31,7% dos casos, os médicos indicaram que, baseados na obtenção rápida de resultados, iniciavam o tratamento com um antibiótico diferente daquele que escolheriam mediante obtenção convencional de resultados. Cerca de 17% dos médicos afirmaram que os resultados rápidos "provavelmente" afetariam suas escolhas. Em um estudo prospectivo e aleatorizado que envolveu 794 pacientes de cirurgia geral, Vincent et al. (1985) forneceram resultados rápidos para metade dos pacientes e resultados convencionais para a outra metade dos pacientes. Os pesquisadores constataram que a terapia antimicrobiana fora modificada em 14,5% dos casos no grupo de pacientes que receberam resultados rápidos e em 8,8% dos casos no grupo de pacientes que receberam resultados convencionais ($p < 0,001$). Todavia, não houve diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos em termos de duração da hospitalização.

Doern et al. (1994) avaliaram o impacto clínico dos testes rápidos de identificação e suscetibilidade bacteriana sobre pacientes hospitalizados de um centro de assistência médica terciária. Os tempos médios de entrega dos resultados dos testes de identificação e suscetibilidade foram, respectivamente: 9,6 horas e 11,3 horas para o grupo de pacientes submetidos aos testes rápidos, e 19,6 horas e 25,9 horas para os pacientes submetidos aos testes *overnight* ($p < 0,0005$). Não foram encontradas diferenças significativas entre ambos os grupos em termos de descritores demográficos, além do tempo decorrido para entrega dos resultados. A duração média das hospitalizações foi sempre a mesma em ambos os grupos, contudo, as taxas de mortalidade foram menores no grupo de pacientes submetidos ao teste rápido (8,8% *vs* 15,3%). Além disso, para os pacientes do grupo de teste rápido foram significativamente menores: o número de testes laboratoriais, os procedimentos de obtenção de imagem, os dias de intubação e de estada na UTI, a duração do tempo decorrido antes das alterações da terapia antimicrobiana e o custo geral da hospitalização do paciente. Em um estudo similar, Barenfanger et al. (1999), por um lado, não encontraram diferenças em termos de mortalidade entre o grupo de pacientes

para os quais foram fornecidos resultados rápidos de testes de suscetibilidade e os pacientes que receberam resultados convencionais de rotina (diferença média de 5,2 horas). Por outro lado, os pesquisadores constataram que houve uma redução significativa da duração da hospitalização (diferença média de 2 dias; $p = 0{,}0006$) e do custo total da internação (diferença média de U$ 2.395,00; $p = 0{,}04$) para os pacientes que receberam os resultados dos testes de suscetibilidade rapidamente.

Embora pareça se tratar de um caso válido para os benefícios proporcionados pelos sistemas automatizados de teste de suscetibilidade, é preciso lembrar que esses sistemas também apresentam pontos fracos. Além dos gastos envolvidos em sua aquisição e na compra de seus suprimentos, os sistemas automatizados (sobretudo quando utilizados em modo "rápido" durante 3 a 5 horas) foram associados a problemas de detecção de fenótipos de resistência específicos. Os painéis do Microscan Rapid Pos MIC, por exemplo, foram associados à dificuldade de detectação da resistência à vancomicina em enterococos (Tenover, 1995). Além disso, Jorgensen et al. (2004) descreveram recentemente a incapacidade dos sistemas automatizados de caldo (no estudo foi avaliado o VITEK 2) de detectar resistência induzida à clindamicina em estafilococos. Apesar das falhas, esses sistemas exercem papel importante nos testes de suscetibilidade em laboratórios que realizam grande volume de análises, na medida em que suas fraquezas ocasionais são compensadas por metodologias adicionais de teste.

Indicações para o teste de suscetibilidade

A necessidade de realizar testes de suscetibilidade varia em função das espécies infectantes. Bactérias aeróbias de crescimento rápido ou anaeróbias facultativas, por um lado, requerem teste se a suscetibilidade ao agente antimicrobiano de escolha for imprevisível. Por outro lado, se a suscetibilidade for previsível, na maioria dos casos torna-se desnecessário realizar o teste para um isolado. Nos Estados Unidos, por exemplo, não há relatos de resistência à penicilina por *Streptococcus pyogenes*. Sendo assim, é apropriado tratar com penicilina um paciente com faringite por *S. pyogenes* sem realizar o teste de suscetibilidade. A realização do teste é justificada caso o paciente seja alérgico ao antibiótico de escolha primária utilizado no tratamento da infecção e, ao mesmo tempo, a suscetibilidade do microrganismo ao agente antibiótico alternativo seja imprevisível. Se o paciente do exemplo anterior fosse alérgico à penicilina e o médico desejasse tratá-lo com eritromicina, seria então apropriado realizar o teste, pois apenas cerca de 60% dos isolados de *S. pyogenes* são suscetíveis à eritromicina nos Estados Unidos (Jacobs, 2003). É importante ter em mente que o teste de isolados deve se restringir àqueles clinicamente significativos, pois o teste de isolados "contaminantes" ou de isolados integrantes da "flora normal" é caro, demorado e pode conduzir à administração desnecessária de antibióticos (Bates, 1991). Portanto, essa possibilidade deve ser evitada. Em alguns pacientes, contudo, as espécies consideradas integrantes da flora normal ou contaminantes podem ter importância clínica. Esses pacientes com frequência são imunocomprometidos, e, nessas circunstâncias, convém realizar o teste de suscetibilidade.

No passado, a terapia antibiótica para tratamento de infecções causadas por microrganismos anaeróbios muitas vezes era empírica, uma vez que os perfis de suscetibilidade das espécies anaeróbias eram considerados relativamente previsíveis, os testes de suscetibilidade ainda não estavam padronizados e havia provas limitadas de que o resultado desses testes apresentava correlação com o resultado clínico. Na literatura recente, estudos demonstram que os padrões de suscetibilidade de muitos anaeróbios estão mudando e, ao menos no caso de algumas espécies, a suscetibilidade observada *in vitro* apresenta correlação com o resultado clínico (Nguyen, 2000; Snydman, 2002). O CLSI atualmente recomenda que se testem isolados individuais oriundos de infecções específicas, incluindo-se abscessos cerebrais, endocardite, osteomielite, infecção articular, infecção de próteses ou dispositivos vasculares e bacteremia (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). Além disso, devem ser testadas as espécies que costumam ser resistentes ou particularmente virulentas, a exemplo de certas espécies de *Bacteroides, Prevotella, Fusobacterium, Clostridium, Bilophila* e *Sutterella*. Atualmente, o método da diluição em ágar é o único método de teste de suscetibilidade aprovado pelo CLSI para todas as espécies de anaeróbios de relevância clínica (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). A única exceção é o grupo de *B. fragilis*, para o qual foi aprovado o uso da microdiluição em caldo (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). Os laboratórios incapacitados para realizar a diluição em ágar talvez queiram realizar a microdiluição em caldo para isolados do grupo de *B. fragilis* que mereçam ser testados e encaminhar outras espécies passíveis de teste a laboratórios de referência. Para outros isolados não descritos anteriormente, o teste de suscetibilidade de isolados anaeróbios arquivados pode ser realizado periodicamente (o CLSI recomenda que esse teste seja anual), seguindo-se um protocolo de vigilância para detecção de alterações nos padrões de resistência, seja pelo laboratório ou por um laboratório de referência.

Diferentemente da situação em que estão envolvidos microrganismos anaeróbios, todos os isolados iniciais do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, *Mycobacterium tuberculosis complex*) devem ser submetidos ao teste de suscetibilidade a fármacos antituberculose primários. Se houver evidências clínicas de falha terapêutica ou falha das culturas em apresentarem conversão negativa após 3 meses, é necessário repetir o teste (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003c). Existem diretrizes que orientam o teste de algumas espécies de micobactérias não tuberculosas de crescimento lento (complexo *Mycobacterium avium, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium marinum*), bem como de micobactérias de crescimento rápido (grupo de *Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium abscessus, Mycobacterium mucogenicum*, grupo de *Mycobacterium smegmatis*). De modo semelhante, existem recomendações para realização de testes de suscetibilidade para actinomicetos aeróbios (espécies de *Nocardia, Actinomadura* spp., *Rhodococcus* spp., *Gordona* spp., *Tsukamurella* spp., *Streptomyces* spp.). Em geral, o teste de micobactérias não tuberculosas e de actinomicetos aeróbios envolve variações do método de diluição em caldo, sendo possível utilizar sistemas comerciais para testar algumas espécies. Como os fármacos testados variam de acordo com as espécies e há variações metodológicas, é necessário consultar o documento M24-A do CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003c) para se obter mais detalhes. Deve ser enfatizado que algumas dessas espécies podem existir na forma de colonizadoras temporárias do trato respiratório ou podem ser isoladas como contaminantes. Por isso, recomenda-se intensamente que sejam adotados os critérios de avaliação de importância clínica antes de se proceder ao teste de suscetibilidade, conforme destaca o documento M24-A do CLSI.

Embora uma situação semelhante ocorra com relação aos fungos (ou seja, tanto as leveduras quanto os bolores podem existir como colonizadores temporários ou contaminantes), o aumento do número de pacientes imunocomprometidos observado nas últimas décadas foi acompanhado pelo aumento da prevalência das infecções fúngicas sistêmicas. Além disso, foram desenvolvidos diversos agentes antifúngicos e começou a haver certo grau de resistência, em particular nas leveduras (especialmente de espécies de *Candida*), tanto contra agentes antifúngicos mais antigos quanto aos agentes mais novos (p. ex., derivados de azol). Ambos os procedimentos, de diluição em caldo e difusão em disco, foram padronizados para algumas leveduras (primariamente espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*) e antifúngicos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002c, 2004). Atualmente, os padrões de teste ainda não foram validados para fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum* ou *Blastomyces dermatitidis*. De fato, quando se trata de leveduras, existem diretrizes interpretativas apenas para espécies de *Candida* e para os fármacos fluconazol, itraconazol e flucitosina. A relevância clínica das demais combinações de espécie-fármaco permanece desconhecida (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002c). Procedimentos de diluição em caldo com utilização de conídeos ou esporangiósporos de alguns bolores, como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus, Pseudoallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002b), foram padronizados. No entanto, os pontos interpretativos de ruptura ainda não foram disponibilizados e falta estabelecer a relevância clínica da associação entre as espécies de bolores e suas respectivas CIMs para determinados fármacos em particular. Até o momento, o CLSI recomenda que se determinem os valores de CIM das espécies de bolores para uso como ferramenta auxiliar

de supervisão de infecções invasivas causadas por fungos filamentosos, nos casos em que a utilidade dos fármacos azol é incerta, ou que se estabeleçam antibiogramas para esses fungos em uma instituição particular (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002c).

Seleção de antibióticos para o teste

A escolha dos agentes antimicrobianos para o teste é complicada pela expansão do espectro e do número de antibióticos disponíveis, bem como pela lista crescente de fenótipos resistentes que estão sendo identificados entre as bactérias patogênicas. Testar todos os agentes disponíveis não é prático nem garantido. A seleção dos agentes a serem testados é uma iniciativa do comitê de farmácia e terapia de cada instituição, com o intuito de coordenar os antibióticos a serem testados e relatados junto àqueles que constam no formulário. Essa coordenação é importante por inúmeros motivos. Em primeiro lugar, a maioria dos laboratórios utiliza painéis de microdiluição comercialmente preparados para testes de suscetibilidade. Os fabricantes oferecem uma variedade de configurações de painel projetadas para corresponder ao máximo aos agentes constantes nos formulários hospitalares. Mesmo assim, com frequência são encontradas disparidades entre os agentes dos painéis e aqueles contidos nos formulários hospitalares. É possível que o laboratório precise testar mais de um painel para um patógeno em particular, ou pague determinado preço por um painel personalizado. Em muitos casos, são testados mais agentes do que a quantidade disponível no formulário e, assim, o laboratório é obrigado a omitir o relato de alguns deles. Em segundo lugar, nem sempre é necessário relatar os resultados do teste de suscetibilidade para múltiplas representações de uma mesma classe de espectro (p. ex., cefotaxime, ceftizoxime e ceftriaxone), pois os resultados de um agente representativo usualmente podem ser generalizados para a classe inteira. Isso é válido até mesmo diante da disponibilidade de mais de um agente no formulário. Em terceiro lugar, como diversos fabricantes de sistemas comerciais de teste de suscetibilidade antimicrobiana devem submeter seus dados ao FDA para validação da acurácia de seus sistemas em relação a quaisquer antibióticos recém-aprovados, muitas vezes há um atraso entre a aprovação do agente para uso clínico e sua incorporação ao teste de suscetibilidade comercial. Dessa forma, um novo agente antimicrobiano pode ser aprovado para o formulário de uma instituição antes de o laboratório se tornar capaz de testar sua atividade *in vitro*.

Ambos os padrões do CLSI, para diluição e difusão em disco (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a, 2003b), e também o suplemento informativo anual (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005), listam os agentes antimicrobianos que devem ser considerados para o teste das Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa, Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae, S. pneumoniae* e outras *Streptococcus* spp. No suplemento informativo mais recente (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005), são feitas recomendações à parte para *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Os fármacos são listados em quatro grupos: o grupo A contém fármacos recomendados para serem testados e relatados contra todos os isolados; o grupo B contém os agentes sugeridos para serem testados contra todos os isolados, mas que podem ser relatados apenas em determinadas circunstâncias (p. ex., quando o isolado é resistente aos fármacos do grupo A); o grupo C abrange os agentes suplementares ou alternativos que podem ser testados e relatados em instituições onde são abrigadas cepas resistentes, para tratamento de organismos incomuns, ou para uso como ferramentas epidemiológicas por profissionais atuantes no controle de infecções. Por fim, o grupo D contém agentes que devem ser testados e relatados somente quando isolados a partir da urina.

Junto a cada um desses grupos de antibióticos, o número de fármacos listados é maior do que a quantidade de fármacos que realmente precisam ser testados (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a, 2003b, 2005). Nos quadros das tabelas, os antibióticos que usualmente apresentam resultados interpretativos e eficácia clínica semelhantes são agrupados juntos. Isso implica que os resultados dos testes de um dado antibiótico com frequência podem ser generalizados para outros fármacos pertencentes ao mesmo grupo (ainda que nem sempre). Além disso, se um agente for listado com outro agente e ambos estiverem separados por um "ou", isso significa que há uma resistência cruzada ou suscetibilidade idênticas entre ambos. Exemplificando: os agentes mezlocilina, ticarcilina e piparacilina são listados juntos para o teste primário de *P. aeruginosa*. Como em geral recomenda-se que as penicilinas ativas contra *Pseudomonas* não sejam utilizadas de forma isolada (Gribble, 1983) e tendo-se em vista que pacientes com doenças graves parecem não apresentar diferenças significativas em termos de resultados obtidos com regimes à base de diferentes penicilinas adicionadas de um aminoglicosídeo, percebe-se que as diferenças de grau de atividade das penicilinas ativas contra *Pseudomonas in vitro* não têm importância clínica. Além disso, a seleção de uma penicilina ativa contra *Pseudomonas* para inclusão no formulário de uma instituição (e consequentemente para testes *in vitro*) pode se basear na lista de indicações aprovadas para uso, bem como nos custos de aquisição e administração envolvidos, em relação aos demais fármacos da mesma classe. Em contrapartida, embora as cefalosporinas de primeira geração – cefalotina e cefazolina – estejam listadas juntas no grupo A (para Enterobacteriaceae), a resistência e suscetibilidade a um agente não é preditiva para todas as demais cefalosporinas de primeira geração. Se por um lado a resistência à cefalosporina é preditiva da resistência a outras cefalosporinas de primeira geração (cefadroxil, cefalexina e cefalina), por outro não é preditiva da resistência à cefazolina (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).

Com relação aos β-lactâmicos, é importante testar a penicilina contra estafilococos e estreptococos, a ampicilina contra enterococos e Enterobacteriaceae, e a oxacilina contra estafilococos. Testar as cefalosporinas é mais problemático. Além da já mencionada questão referente às cefalosporinas de primeira geração, ainda se discute quais cefalosporinas de segunda geração (caso exista alguma) devem ser testadas contra as espécies de Enterobacteriaceae. O CLSI lista as cefalosporinas de segunda geração cefamandol, cefonicid e cefuroxime, bem como as cefamicinas (também consideradas de segunda geração) cefmetazol, cefotetan e cefoxitina, no grupo B (para serem testadas e relatadas de modo seletivo), para serem consideradas nos casos em que o isolado for resistente às cefalosporinas de primeira geração. A seleção depende do fármaco (se houver algum) escolhido pelo comitê de farmácia e terapia da instituição para integrar o formulário, bem como de suas indicações de uso. Se, por um lado, uma ou mais cefalosporinas de segunda geração forem disponibilizadas na instituição apenas para profilaxia perioperatória, é possível que não seja necessário realizar o teste de rotina para esses agentes. Por outro lado, se a cefoxitina for utilizada na instituição para tratamento de infecções anaeróbias, pode então ser uma medida útil testar esses fármacos contra quaisquer espécies de Enterobacteriaceae eventualmente presentes em uma infecção aeróbia-anaeróbia mista.

O teste das cefamicinas pode ter utilidade adicional em uma situação em que as cefalosporinas de amplo espectro ou de terceira geração forem inúteis, quando um isolado de Enterobacteriaceae apresenta β-lactamase de espectro estendido (BLEE). Essas enzimas – mutantes das β-lactamases TEM e SHV – conferem resistência às cefalosporinas e monobactâmicos (aztreonam), mas não às cefamicinas (cefmetazol, cefoxitina, cefotetan) nem aos carbapenêmicos (imipinem, meropenem, ertapenem). Atualmente, nos Estados Unidos, elas são encontradas em Enterobacteriaceae, sobretudo em *Klebsiella* spp., e na *Escherichia coli*. No entanto, também foram descritas em outras espécies na Europa, incluindo-se *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Proteus mirabilis*, bem como em *Salmonella* spp. na Europa, América Latina e região oeste do Pacífico (Sturenburg, 2003b). A detecção dessas BLEEs pode ser uma tarefa problemática, pois o isolado pode se mostrar suscetível às cefalosporinas nos testes de rotina. Para identificar esses isolados, é necessário realizar uma triagem com pontos de ruptura de CIM específicos para cefalosporinas de terceira geração ou aztreonam, ou com tamanhos de zona de difusão em disco para esses mesmos agentes antimicrobianos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005), aliada à realização de testes confirmatórios que empreguem combinações de cefalosporinas de terceira geração com e sem inibidores de β-lactamase. O teste para detecção de BLEEs em *Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, E. coli* e *P. mirabilis* é considerado com base na instituição, conforme a prevalência, considerações terapêuticas e aspectos relativos ao controle de infecções da instituição em particular (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Diversos sistemas automatizados

de testes de suscetibilidade possuem testes que detectam BLEEs, apesar de alguns sistemas terem como fatores limitantes as dificuldades para identificação de certos fenótipos de BLEE (p. ex., cefotaximase ou fenótipos de ceftazidimase) e uma alta proporção de resultados "indeterminados" que requerem testes adicionais (Sanders, 2000; Leverstein-van Hall, 2002; Livermore, 2002; Sturenburg, 2003a).

À parte a questão das BLEEs, os agentes cefoperazone, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone e ceftazidime apresentam apenas variações discretas da atividade contra as espécies de Enterobacteriaceae. Assim, ainda que mais de um desses compostos possa constar no formulário, apenas um deve ser considerado para os testes contra os isolados de interesse. Cefoperazone e ceftazidime são cefalosporinas de terceira geração que possuem boa atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*. Como há relatos de BLEEs com atividade preferencial contra ceftazidime, além das β-lactamases que comprovadamente apresentam atividade preferencial contra cefoperazone, pode ser útil para algumas instituições adotar a política de limitar os testes desses agentes contra isolados de *P. aeruginosa*, a fim de se evitar sua seleção na emergência de cepas de Enterobacteriaceae com esses fenótipos de β-lactamase.

Para os enterococos, testar isolados quanto à resistência à vancomicina tem se tornado uma necessidade para muitas instituições, uma vez que o número de isolados enterocócicos resistentes continua aumentando. Em 2002, 27,5% dos isolados envolvidos em infecções de UTI nos hospitais integrantes da National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) eram enterococos vancomicina-resistentes (EVR) (NNIS, 2003). No passado, alguns sistemas automatizados apresentaram dificuldades para detectar todos os fenótipos de resistência à vancomicina, de modo que vários laboratórios adotaram métodos alternativos (difusão em disco, triagem em ágar ou E-teste) a serem utilizados na triagem para detecção de EVR (Kohner, 1997; Endtz, 1998). Embora tenham sido introduzidos alguns avanços e a detecção de muitos fenótipos resistentes seja bastante satisfatória, alguns sistemas ainda apresentam dificuldades para detectar certos fenótipos, como as cepas *vanC* (d'Azevedo, 2001; Garcia-Garrote, 2000; van Den Braak, 2001; Fahr, 2003). Felizmente, a importância clínica desse baixo nível de resistência intrínseca à vancomicina – encontrado em *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* – permanece desconhecida e, portanto, conclui-se que seja insignificante. Além disso, triagens para detecção de um alto nível de resistência à gentamicina e estreptomicina devem ser realizadas para todos os isolados enterocócicos obtidos a partir de sítios estéreis. Os clínicos devem ser informados de que a terapia combinada com penicilina ou ampicilina acrescida de um aminoglicosídeo é indicada para casos graves de infecção enterocócica. Assim como ocorreu em relação à vancomicina, a introdução de aprimoramentos conferiu uma significativa acurácia à detecção de alto nível de resistência. Entretanto, alguns métodos são melhores e cada sistema possui peculiaridades, com melhor acurácia na utilização de um fármaco e não de outro (Garcia-Garrote, 2000; d'Azevedo, 2001; Fahr, 2003; Murdoch, 2003). Se um laboratório pretende utilizar um sistema automatizado, é importante familiarizar-se com os pontos fracos desse sistema, de modo a poder instituir métodos alternativos que garantam a acurácia. Para isolados do sangue ou do LCE, o CLSI recomenda o teste de enterococos quanto à produção de β-lactamase, conforme descrito anteriormente. Além disso, não devem ser relatados resultados de suscetibilidade para aminoglicosídeos (exceto em concentrações de alto nível), cefalosporinas, clindamicina e trimetoprim-sulfametoxazol, pois os isolados podem apresentar suscetibilidade *in vitro*, enquanto os agentes são clinicamente ineficazes. Proibições similares também existem para espécies de *Salmonella e Shigella* (aminoglicosídeos, cefalosporinas de primeira e segunda gerações), bem como para espécies de *Staphylococcus* oxacilina-resistentes (todos β-lactâmicos e combinações de β-lactâmicos/inibidores de β-lactamases).

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. transformou-se em um problema significativo nos Estados Unidos, com resistência de 57,1% dos isolados de *S. aureus* (SAMR, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes) e de 89,1% dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) envolvidos nas infecções nosocomiais de UTI relatadas à NNIS em 2002 (NNIS, 2003). O CLSI classifica a oxacilina (substituta da meticilina) no grupo A, como fármaco a ser testado e relatado para todos os isolados de *Staphylococcus* spp. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Mais comumente, a resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. se deve à produção de uma proteína de ligação à penicilina (PBP-2a) alterada, mediada pelo gene *mecA*. Isso ocorre, ainda que com menos frequência o fenótipo se deva à hiperprodução de β-lactamase ou à produção de uma PBP intrínseca alterada. Isolados que possuem o gene *mecA* podem expressá-lo de forma heterogênea ou homogênea. Enquanto os isolados que expressam o gene de forma homogênea são facilmente detectados pela maioria dos métodos de teste disponíveis, aqueles que expressam esse gene de forma heterogênea são mais problemáticos. Esses isolados podem se mostrar suscetíveis nos testes de diluição, incluindo-se os sistemas comerciais automatizados, fornecendo valores de CIM na faixa de suscetibilidade ou na faixa limítrofe, além de também poderem ser equivocadamente classificados (Sakoulas, 2001; Swenson, 2001; Felten, 2002). O documento M100-S15 do CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005) descreve um teste de triagem de oxacilina-sal em ágar para *S. aureus* e um teste de difusão em disco de cefoxitina destinado ao uso para *S. aureus* ou SCN. Os testes que detectam o gene *mecA* ou PBP-2a são considerados os mais acurados entre aqueles disponíveis (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Existem dois testes de látex aprovados pelo FDA, que detectam PBP-2a: o MRSA-Screen (Denka-Seiken Co., Ltd., Tóquio, Japão) e o teste de aglutinação de látex para PBP 2' (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido). Há também uma sonda de DNA aprovada pelo FDA – Velogene Rapid MRSA Identification Assay (Remel, Lenexa, KS). Para SCN, que possuem pontos de ruptura de CIM e diâmetros de difusão em disco diferentes para oxacilina ante o *S. aureus*, foi demonstrado que o teste de difusão em disco com cefoxitina apresenta praticamente a mesma sensibilidade que o teste de diluição em caldo, porém sua especificidade é maior (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Em alguns estudos, sistemas de diluição comerciais também apresentaram reduzida especificidade e menor sensibilidade relativa para detecção de SCN resistentes à meticilina (Horstkotte, 2002, 2004; Ligozzi, 2002). Existem menos opções de testes para SCN do que para *S. aureus*, uma vez que a triagem de oxacilina-sal em ágar não pode ser utilizada para SCN e o MRSA-Screen (Denka-Seiken Co., Tóquio, Japão) não foi aprovado pelo FDA para SCN. Embora o teste de aglutinação de látex para PBP 2' (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) seja aprovado pelo FDA para SCN, não há na literatura nenhum trabalho que tenha avaliado seu desempenho.

O isolamento de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (SAVI) e, mais recentemente, a identificação de vários isolados resistentes à vancomicina nos Estados Unidos (SAVR) aumentaram a importância do teste de suscetibilidade para *S. aureus* contra a vancomicina (Tenover, 2004). Enquanto o método da microdiluição em caldo descrito no documento M7-A6 do CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a) detecta corretamente a resistência à vancomicina do isolado de SAVR, Tenover et al. (2004) constataram que o segundo SAVR não havia sido identificado como resistente à vancomicina pelos sistemas automatizados de teste de suscetibilidade nos quais fora avaliado. Por conseguinte, o CLSI recomenda que, ao se usar um sistema automatizado de teste de suscetibilidade ou o método da diluição em ágar, uma placa de ágar de triagem com 6 μg/mL de vancomicina também seja inoculada com o isolado de *S. aureus* em questão, a fim de se garantir a detecção de SAVI ou de SAVR (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Similarmente, o método da difusão em disco de vancomicina não detecta SAVI, e poderá ser difícil detectar SAVR utilizando-se esse método. Por isso, as placas de ágar de triagem com vancomicina também são recomendadas para casos em que o laboratório opta pela utilização da metodologia da difusão em disco para testar a suscetibilidade (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Por fim, recomenda-se que qualquer isolado de *S. aureus* com CIM acima do ponto de ruptura de suscetibilidade (p. ex., > 4 μg/mL) à vancomicina seja enviado a um laboratório de referência para ser submetido a testes de confirmação.

Diante das elevadas taxas de resistência à penicilina em *S. aureus* observadas em todo o mundo (aproximadamente 20% [Jacobs, 2003]), e com as crescentes taxas de resistência a outros fármacos, torna-se necessário testar a suscetibilidade desse patógeno sempre que ele for isolado a partir de sítios corporais estéreis. Para tanto, pode ser feita uma triagem pelo método da difusão em disco de oxacilina. Trata-se

de um teste acurado para a classificação de isolados como sendo suscetíveis, desde que o tamanho da zona ultrapasse 20 mm. Entretanto, tamanhos de zona inferiores a esse valor também podem ser obtidos com isolados suscetíveis, intermediários ou resistentes, por isso é necessário realizar o teste de CIM quando o tamanho da zona for inferior a 19 mm. Considerar outros agentes para teste depende da localização no corpo a partir de onde foi feito o isolamento. Por exemplo, para isolados do LCE, o CLSI recomenda que se realizem testes de diluição em caldo para penicilina, cefotaxime ou ceftriaxone, meropenem e vancomicina, uma vez que não existem padrões interpretativos de difusão em disco de cefalosporinas ou carbapenêmicos para *S. pneumoniae* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Também é preciso notar que os padrões interpretativos para cefalosporinas são diferentes dependendo do sítio corporal a partir de onde *S. pneumoniae* foi isolado (meningite *vs* não meningite). Desse modo, as interpretações e relatos variam de acordo com a fonte. O CLSI recomenda que sejam relatadas apenas as interpretações de meningite para isolados oriundos do sistema nervoso central, bem como as interpretações de meningite e não meningite para todos os demais isolados. No caso de infecções sem risco de morte, os agentes a serem considerados para teste e relato são penicilina, eritromicina (que prediz a suscetibilidade a outros macrolídeos) e trimetoprim-sulfametoxazol, pelos métodos da diluição em caldo e difusão em disco. Como existem padrões interpretativos de difusão em disco para esses fármacos, esse teste pode ser utilizado.

Para outros estreptococos que não *S. pneumoniae*, os fármacos a serem testados e o método requerido dependem da espécie/complexo envolvidos. Para *S. pyogenes* (grupo A de Lancefield) ou *Streptococcus agalactiae* (grupo B), é desnecessário realizar o teste de suscetibilidade ao fármaco de escolha primária para tratamento (penicilina), pois não existem relatos de cepas resistentes. O mesmo é válido se a vancomicina for utilizada no tratamento de infecções causadas por essas espécies. Caso o paciente seja alérgico à penicilina e outro fármaco (p. ex., macrolídeo) seja considerado para o tratamento, é possível testar a eritromicina e, assim, prever o grau de suscetibilidade aos macrolídeos. O CLSI recomenda que se testem a eritromicina e a clindamicina para mulheres grávidas que tenham sido colonizadas por estreptococos do grupo B e sejam alérgicas à penicilina (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Isolados resistentes à eritromicina e suscetíveis à clindamicina devem ser testados quanto à resistência "induzida" à clindamicina mediada pelo gene *erm* (gene da resistência a macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B), empregando-se o "teste de aproximação da zona D". Nesse teste, os discos de eritromicina e clindamicina estão bastante próximos entre si (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005) (Fig. 57.3). Esse tipo de resistência induzida foi descrito para diversos cocos Gram-positivos, incluindo-se os estafilococos. Algumas instituições começaram a testar isolados estafilocócicos quanto a esse tipo de resistência em determinadas situações ou rotineiramente (Fiebelkorn, 2003; Jorgensen, 2004). A prevalência desse tipo de resistência entre várias espécies Gram-positivas pode variar de uma instituição a outra. Uma estratégia razoável e lógica consiste em fiscalizar a prevalência da resistência induzida à clindamicina em cocos Gram-positivos em uma determinada instituição, com o intuito de se estabelecer e implementar uma política mais custo-efetiva de testes (Schreckenberger, 2004).

Para estreptococos viridans, um isolado oriundo de um sítio corporal estéril que esteja implicado em uma infecção grave (p. ex., endocardite) deve ser testado quanto à suscetibilidade à penicilina (Quinn, 1988). Como não existem padrões interpretativos para o método da difusão em disco utilizando-se essa combinação organismo-agente, o teste deve ser feito pelo método da CIM (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). O teste de suscetibilidade também é garantido, pois alguns estreptococos viridans podem exibir uma relativa resistência às cefalosporinas de terceira geração (Wilcox, 1993). A vancomicina é recomendada como alternativa aos fármacos β-lactâmicos para terapia contra estreptococos viridans. Contudo, como não há relatos de cepas resistentes, é desnecessário fazer o teste para vancomicina. Para fins de identificação, todavia, pode ser uma medida razoável avaliar a vancomicina, pois a detecção de resistência associada ao isolado indicaria que ele não é um estreptococo viridans, sendo mais provavelmente um membro de um gênero intrinsecamente vancomicina-resistente, como *Leuconostoc* ou *Pediococcus*.

Figura 57.3 Indução em disco ou teste "D". O isolado de *Staphylococcus aureus* à esquerda apresenta resistência à eritromicina (E), mas é suscetível à clindamicina (CC). O isolado de *Staphylococcus aureus* à direita mostra resistência induzida à clindamicina com embotamento da zona de inibição em torno do disco de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina.

No caso de algumas espécies, o teste de detecção de β-lactamase pode atender a diversos propósitos. Nas infecções sem risco de morte, por exemplo, o teste da β-lactamase é capaz de predizer a suscetibilidade de *H. influenza* à ampicilina ou amoxicilina, e é razoável testar apenas a β-lactamase. A prevalência de *H. influenza* β-lactamase positivo é de aproximadamente 30% nos Estados Unidos, enquanto as cepas β-lactamase negativas e ampicilina-resistentes (BLNAR) – não detectadas pelo teste de β-lactamase – são raras (Jacobs, 2003). Considerando-se que o teste de suscetibilidade para *H. influenzae* requer meio especial (HTM), isso simplifica o teste e pode resultar em economia de tempo e dinheiro. Se a incidência de BLNAR for alta em uma determinada área, é possível fazer testes de difusão em disco ou de diluição para ampicilina em meio HTM. Esse tipo de teste pode ser necessário para isolados provenientes de infecções graves, como a meningite, para os quais o CLSI recomenda que sejam relatados apenas os resultados de suscetibilidade para penicilina, uma cefalosporina de terceira geração, cloranfenicol e meropenem (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005).

O teste de β-lactamase costumava ser recomendado para isolados de *N. gonorrhoeae*. No entanto, como nem a penicilina nem a ampicilina são utilizadas no tratamento da gonorreia, esse teste tornou-se desnecessário, ainda que possa ser útil apenas para fins de epidemiologia. Pela primeira vez, os padrões interpretativos de CIM para *N. meningitides* foram incluídos no documento M100-S15 do CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Nos EUA, uma pesquisa sobre os microrganismos isolados a partir de casos de doença meningocócica, realizada em 1997 pelos Centers for Disease Control, não encontrou nenhum isolado resistente à penicilina ($n = 121$), embora três isolados tenham sido classificados como de resistência intermediária e outros três, resistentes à rifampina – um fármaco comumente utilizado na quimioprofilaxia contra exposições (Rosenstein, 2000). Os autores desse relato sugeriram que, embora a baixa prevalência da resistência ao antibiótico nesse patógeno não garanta a eficácia do teste de suscetibilidade de rotina nos Estados Unidos, esse teste deveria ser considerado para isolados oriundos de pacientes cuja resposta à terapia é inadequada.

Em contrapartida, a resistência aos agentes antimicrobianos entre as bactérias anaeróbias tem crescido nos últimos anos. No grupo de *B. fragilis*, por exemplo, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. e *Clostridium* spp. têm apresentado uma resistência cada vez maior aos β-lactâmicos e à clindamicina (Falagas, 2000; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). Entretanto, tais tendências não se limitam apenas a essas espécies ou agentes. O CLSI sugeriu agrupamentos (primários e suplementares) antibióticos para testes que dependam tanto das espécies quanto da presença ou ausência de β-lactamase no isolado (para grupo de anaeróbios Gram-negativos não *B. fragilis*). Para o grupo *B. fragilis* e outros anaeróbios Gram-

negativos β-lactamase positivos, o grupo primário inclui uma combinação β-lactâmico/β-lactamase, cefoxitina ou cefotetan, um carbapenêmico e metronidazol (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). Para os isolados β-lactamase negativos, ampicilina ou penicilina, clindamicina e metronidazol constituem o grupo primário a ser testado. *Clostridium* spp. (exceto *Clostridium perfringens*) apresentam os mesmos agrupamentos de espécies Gram-negativas β-lactamase positivas, a não ser pelo fato de também ser possível testar a clindamicina. *C. perfringens*, cocos Gram-positivos anaeróbios e outros bacilos Gram-positivos possuem agrupamentos idênticos àqueles dos isolados Gram-negativos β-lactamase negativos. Em uma determinada instituição, a realização de testes pode ser limitada pela natureza exigente do teste de diluição em ágar, que deve ser feito para todas as espécies (exceto do grupo de *B. fragilis*), e talvez seja necessário encaminhar os isolados a um laboratório de referência.

Para o MTBC, todos os isolados iniciais devem ser submetidos ao teste de suscetibilidade aos fármacos antituberculose primários (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003c). Se o paciente falhar em responder à terapia, ou se as culturas falharem quanto a se tornarem negativas decorridos 3 meses do início do tratamento, também será necessário repetir o teste. Os resultados devem ser disponibilizados quanto antes, e recomenda-se que os laboratórios os forneçam aos médicos em até 28 dias contados a partir da data do recebimento da amostra inicial (Bird, 1996). Vários métodos comerciais rápidos, à base de caldo, que apresentam correlação com o método mais lento de referência de proporção de ágar, são disponibilizados para uso e aprovados pelo FDA (com exceção de certos fármacos). Um exemplo é o método não radiométrico automatizado BACTEC MGIT 960 (Scarpano, 2004). O painel completo de fármacos primários inclui a isoniazida em duas concentrações (crítica e alta), rifampina, etambutol e pirazinamida. Alguns laboratórios testam apenas a concentração crítica de isoniazida, rifampina e etambutol, com base nos seguintes fatores: (1) a população atendida; (2) a prevalência da resistência ao fármaco; (3) os fármacos utilizados na comunidade e (4) a disponibilidade do teste para os fármacos secundários requeridos, caso seja detectada resistência à rifampina ou a qualquer um dos dois fármacos primários (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003c).

Seleção de antibióticos para o relatório

A escolha dos antibióticos a serem relatados para um isolado deve considerar, além dos resultados do teste em si, diversos fatores. Por exemplo, fármacos ineficazes no tratamento de infecções que envolvem o sistema nervoso central (p. ex., clindamicina, macrolídeos, tetraciclinas, fluoroquinolonas e a maioria das cefalosporinas de primeira e segunda gerações) não devem ser relatados pata isolados oriundos do LCE (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Fármacos cujo uso é indicado apenas para infecções do trato urinário (p. ex., nitrofurantoína) não devem ser relatados para isolados provenientes de escarro. Esse tipo de proibição é relativamente simples e por si só evidente. Existem outras considerações mais complicadas a serem observadas para o relato dos antibióticos. Muitos laboratórios utilizam relatos "em cascata" para incentivar os médicos a usarem sobretudo antibióticos igualmente efetivos e mais econômicos, em vez daquele "mais moderno" ou que está sendo alvo de intensa promoção comercial, a fim de reduzirem as despesas institucionais com fármacos. As cefalosporinas de segunda ou terceira geração, por exemplo, serão relatadas apenas se o isolado for resistente às cefalosporinas de primeira geração. De modo similar, há instituições que exigem a aprovação de médicos infectologistas (ou outros profissionais "guardiães") antes de admitir o uso de certos antibióticos. Essa é uma medida que requer gastos ou, ainda mais importante, o controle dos fenótipos de resistência junto à instituição. Foi demonstrado por estudos prospectivos (Projeto ICARE: *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* – Epidemiologia da Resistência Antimicrobiana na Terapia Intensiva) que o uso frequente de vancomicina e de cefalosporinas de terceira geração está associado ao aumento da prevalência de EVRs em UTIs. Tais estudos também demonstraram que essa prevalência pode ser reduzida mediante restrição ao uso de vancomicina (Fridkin, 2001, 2002). Por fim, as instituições podem tentar influenciar o uso de antibióticos não pela limitação dos antimicrobianos a serem relatados, mas publicando dados referentes aos custos dos agentes individuais, seja aliando estes a um relatório de suscetibilidade ou apresentando-os em formato separado que possa ser consultado pelos médicos (tópico discutido na próxima seção). Qualquer uma dessas estratégias de relato pode envolver certo grau de resistência por parte dos prestadores, de modo que uma consulta cuidadosa e a cooperação do laboratório com a equipe médica, infectologistas e comitê de farmácia e terapia da instituição são importantes para se estabelecer uma política local de relatórios.

Relatórios de suscetibilidade antimicrobiana cumulativos

Como as suscetibilidades variam de forma considerável dependendo da localização geográfica, demografia dos pacientes e padrões de uso de antibióticos em uma determinada instituição, é responsabilidade do laboratório de microbiologia compilar e publicar um relatório cumulativo de suscetibilidade antimicrobiana (antibiograma) dos patógenos isolados na instituição, pelo menos uma vez ao ano. Os relatórios, usualmente publicados como tabelas em um pequeno cartão de bolso, devem listar os patógenos mais significativos isolados na instituição, bem como o percentual de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos constantes no formulário da instituição. Esses relatórios são utilizados pelos médicos para orientar a terapia empírica até a disponibilização dos dados específicos de suscetibilidade. Além disso, os dados desse relatório podem ser utilizados pela equipe de controle de infecções para detecção de padrões de resistência emergentes e no planejamento de medidas de contenção de surtos de espécies resistentes. A farmácia também pode utilizar esses dados para identificar a necessidade de incluir novos antimicrobianos no formulário, determinar quando alguns antibióticos perderam a eficácia e monitorar os padrões de prescrição (Critchley, 2004). Além disso, a inclusão de dados sobre custos no antibiograma permite que a instituição tente incentivar os médicos a usar fármacos mais econômicos, contudo ainda eficazes, visando a diminuir os gastos farmacêuticos.

O National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002a) orienta os laboratórios quanto à preparação de antibiogramas e fornece sugestões referentes à escolha, validação e apresentação dos dados, bem como considerações importantes acerca das limitações desses dados e um exemplo de antibiograma. Por meio da adoção das diretrizes do CLSI e do fornecimento de dados atualizados em tempo hábil, os laboratórios podem auxiliar na supervisão adequada dos pacientes e no controle de infecções, bem como na difícil tarefa da farmácia de controlar a resistência e supervisionar o uso de antibióticos na instituição. Para tanto, devem ser cumpridos os padrões estabelecidos pelo CLSI para compilação de antibiogramas, atualização anual e distribuição anual para as devidas equipes médicas de controle de infecções. Para avaliar se os laboratórios de microbiologia de instituições médicas localizadas nos Estados Unidos estavam se saindo bem no cumprimento desses padrões, Ernst et al. (2004) pesquisaram 494 estabelecimentos médicos e constataram que, enquanto a maioria (95%) compilava antibiogramas, apenas 60% atendia a todos os três padrões. Cerca de 3/4 dos laboratórios atualizavam os antibiogramas a cada ano, sendo que uma proporção um pouco menor publicava e distribuía o antibiograma para as equipes médica e de controle de infecções. Aqueles capazes de cumprir os três padrões eram, na maioria dos casos, estabelecimentos maiores que prestavam atendimento no local, exerciam função de laboratório referencial e contavam com maior número de funcionários que trabalhavam no laboratório.

Testes bactericidas

Existem três categorias principais de testes bactericidas: (1) determinação da concentração mínima de agente antimicrobiano necessária para destruir o microrganismo, também conhecida como concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração letal mínima (CLM); (2) determinação da taxa de destruição (taxa de tempo de destruição ou curva de destruição) e (3) determinação da maior diluição do soro do paciente requerida para matar um microrganismo, também conhecida como título sérico bactericida (TSB) ou título sérico letal (TSL). A adoção de qualquer um desses testes é influenciada pelas indicações, metodologia e interpretação dos resultados.

Concentração bactericida ou letal mínima

Há um consenso geral de que a determinação da CBM deve fazer parte da investigação inicial de um novo agente antimicrobiano. Entretanto, nem todos concordam quanto ao teste ser indicado para uso clínico com isolados de estreptococos oriundos de pacientes com endocardite ou osteomielite, bem como isolados de Enterobacteriaceae ou *Pseudomonas* de pacientes com meningite. Em parte, a controvérsia decorre das variáveis biológicas e técnicas que afetam os resultados das determinações de CBM (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999b). Para determinar a CBM ou CLM, o agente antimicrobiano submetido a diluições seriadas (em escala logarítmica) em caldo é inoculado com uma suspensão padronizada do organismo testado, conforme descrito para a determinação da CIM. Após incubação a 35°C durante 24 horas, os tubos sem crescimento visível são subcultivados em meio ágar livre de antibióticos. A CBM ou CLM é definida como sendo a menor concentração do agente antimicrobiano com atividade bactericida ou letal sobre pelo menos 99,9% do inóculo original. Entre as variáveis biológicas do teste, estão: (1) a persistência do fenômeno em que uma pequena quantidade (em geral < 0,1%) do inóculo de bactérias ("persistentes") sobrevive à exposição ao antibiótico, mas continua se mostrando suscetível ao ser novamente testada com o mesmo antibiótico (em geral, um agente ativo contra a parede celular); (2) o efeito paradoxal, em que a proporção de células sobreviventes aumenta com a concentração de antibiótico, que de novo é observado com maior frequência diante de antibióticos ativos contra a parede celular e (3) a tolerância (um fenômeno interpretado de modo bastante errado). Considera-se que tanto os "persistentes" como o efeito paradoxal estejam associados ao retardo da taxa de crescimento das bactérias por ação do antibiótico, que resulta em diminuição do efeito de destruição (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999b). Organismos tolerantes, em termos estritamente definidos, são aqueles em que a resposta bacteriostático-bacteriolítica a antibióticos é alterada na direção da bacterióstase (Handwerger, 1985). Entretanto, a tolerância também foi definida como sendo uma proporção CBM:CIM ≥ 32, apesar dos numerosos problemas técnicos que influenciam os resultados de CBM e das variações de procedimento na determinação das CBMs (Sherris, 1986). Conforme apontado por Sherris (1986), a CBM é definida pela menor concentração de antibiótico capaz de fazer que no máximo 10,1% dos sobreviventes estejam na porção menos acurada da curva de destruição (i. e., 18-24 horas). O número de sobreviventes após uma incubação de um dia para o outro, em presença de antibiótico ativo contra a parede celular, quando o inóculo está na fase estacionária, é invariavelmente maior do que na fase logarítmica (Handwerger, 1985; Sherris, 1986). O problema técnico que mais frequentemente resulta em uma maior proporção de bactérias na fase estacionária é o uso de culturas mantidas em crescimento por mais de 8 horas (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999b). Artefatos técnicos adicionais incluem sobrevivência de bactérias no condensado formado acima do menisco do caldo que contém antibiótico, volume da subcultura, transporte de antibióticos em subculturas e falta de reprodutibilidade do teste. Partindo-se do princípio de que é possível controlar esses problemas, a determinação de um ponto final (CBM) pode ser feita com base nos critérios de rejeição publicados por Pearson et al. (1980). Todavia, como a tolerância é definida por uma taxa retardada de destruição, o método mais confiável para sua detecção é um estudo simplificado de tempo-destruição do organismo, comparando-se a quantidade de bactérias que permanecem viáveis após 5 a 6 horas de incubação em presença de uma concentração de antibióticos equivalente a 4 a 8 vezes a CIM, com a quantidade de bactérias presentes nas leituras de 2 horas e de marco-zero (Handwerger, 1985; Sherris, 1986).

Considerando-se todos os problemas biológicos e técnicos associados ao teste bactericida e à definição da tolerância, não surpreende que seja tão difícil interpretar os estudos clínicos publicados sobre infecções causadas por organismos supostamente "tolerantes". Isso é válido especialmente para as infecções por estafilococos, em que as variáveis técnicas produzem consequências importantes (Handwerger, 1985). Por esses motivos, a maioria dos laboratórios não determina as CBMs dos antibióticos ativos contra parede celular para estafilococos.

Existem dados oriundos de estudos sobre endocardite estreptocócica experimentalmente induzida em animais, sugerindo que a penicilina pode ser menos efetiva contra infecções causadas por cepas tolerantes do que contra aquelas produzidas por cepas não tolerantes (Handwerger, 1985; Wilson, 1985). Todavia, há pouca informação acerca da importância clínica dessas cepas (Wilson, 1985). Handwerger e Tomasz (Handwerger, 1985) especulam que as bactérias não tolerantes podem manifestar uma resposta fenotipicamente tolerante nas lesões endocárdicas, devido a sua elevada densidade, atividade metabólica reduzida e taxa de crescimento lento em vegetações. Como algumas cepas de estreptococos viridans são resistentes (CIM ≥ 4 μg/mL) à penicilina, certamente torna-se necessário determinar a CIM para estreptococos viridans isolados de pacientes com endocardite ou outras infecções que envolvam risco de morte. Considerando-se que os pacientes com endocardite causada por estreptococos viridans tolerantes podem correr maior risco de morte, bem como requerer 4 a 6 semanas de terapia com penicilina e aminoglicosídeo (Wilson, 1985), talvez seja razoável determinar a CBM dessas cepas.

Estudos de taxa de destruição

A determinação da taxa de destruição promovida por uma antibiótico constitui o melhor método para determinar tanto a tolerância quanto a sinergia (ou antagonismo) de dois ou mais antibióticos. Além disso, a atividade bactericida, em vez da atividade bacteriostática, parece ser um requisito para a terapia contra meningite bacteriana (Sande, 1981). No caso da meningite por bacilos Gram-negativos (exceto *H. influenzae*), as CBMs das cefalosporinas podem apresentar fraca correlação com o resultado, contrastando com os resultados dos estudos de taxa tempo-destruição de 6 horas (Eng, 1987). Dessa forma, os estudos de tempo-destruição de agentes antimicrobianos, sejam isolados ou combinados, podem ser mais preditivos do resultado do que as CBMs nos casos em que a terapia bactericida se faz necessária para a cura do paciente (Bayer, 1985; Drake, 1985; Eng, 1987). Os resultados dos estudos de combinação com adoção do método de tempo-destruição também apresentam melhor correlação com os resultados dos estudos de combinação que utilizam modelos experimentais de infecção em animais, em comparação aos resultados desses mesmos estudos obtidos pelo método do tabuleiro de damas (*checkerboard*) (Bayer, 1985). Mais uma vez, talvez isso ocorra porque o ponto final do método do tabuleiro de damas é determinado em 18 a 24 horas, o qual corresponde à extremidade menos acurada da curva de destruição (Sherris, 1986). Nos estudos de taxa de destruição, são feitas culturas quantitativas a intervalos variados (p. ex., 0, 4, 8, 12 e 24 horas) após a inoculação do meio que contém antibiótico. A atividade bactericida é definida como uma destruição de 99,9% do inóculo final, determinada pela detecção de uma redução mínima de 3 $\log_{10}$ do número de CFU/mL na curva plotada de tempo-destruição (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999b). Quando os agentes antimicrobianos são testados em combinação, costuma-se definir a sinergia pela redução mínima de 2 $\log_{10}$ do número de CFU/mL entre a combinação e seu constituinte mais ativo, considerando-se que ao menos um dos constituintes não afeta a curva de crescimento do organismo testado quando utilizado isoladamente. No caso dos enterococos, essa exigência não impõe dificuldades, pois as concentrações clinicamente viáveis de penicilinas ou aminoglicosídeos não são bactericidas. Entretanto, esse requerimento pode acarretar problemas em testes de outros microrganismos, que podem ser suscetíveis a cada agente antimicrobiano integrante da combinação. Em último caso, é possível afirmar que há sinergia apenas diante de uma redução mínima de 2 $\log_{10}$ do número de CFU/mL entre a combinação dois a dois de cada antimicrobiano presente em concentrações equivalentes a 1/4 de suas respectivas CBMs, em comparação ao constituinte mais ativo isoladamente em concentração equivalente à metade de sua CBM (Hallander, 1982).

Assim como nas determinações de CBM, o transporte de agentes antimicrobianos para as subculturas quantitativas é problemático. Sua solução requer a inativação de qualquer agente antimicrobiano eventualmente presente, ou que as amostras removidas para subcultura sejam suficientemente diluídas para que, se possível, esses efeitos de transporte sejam eliminados. É possível determinar se houve

transporte, em particular diante de concentrações de teste equivalentes a pelo menos 16 vezes a CIM, aplicando-se alíquotas de 10 a 100 μL de uma subcultura diluída em faixas ao longo de uma superfície de ágar e, após um período de absorção de 20 minutos, aplicando-se o organismo testado em faixas por toda a superfície de ágar para se observar se o crescimento é inibido no local onde foi feita a aplicação inicial de uma faixa após uma incubação de 24 horas (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999b). Outro problema que pode complicar a interpretação dos estudos de destruição-tempo é a repetição do crescimento entre 6 a 8 horas e 24 horas de incubação do teste. Nesses casos, convém determinar se houve inativação antimicrobiana ou se a incubação prolongada selecionou uma subpopulação resistente. Pela determinação da CIM à 0 hora e às 24 horas contra uma cepa de referência da American Type Culture Collection (ATCC), é possível inferir se houve inativação do antibiótico, caso a CIM seja no momento zero acentuadamente maior do que em 24 horas (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999b).

Teste bactericida sorológico

O principal objetivo do teste bactericida sorológico consiste em determinar a atividade de um ou mais agentes antimicrobianos presentes no soro contra um organismo isolado do paciente. Pela introdução de várias modificações, é possível determinar a atividade bactericida em relação à CBM (título bactericida sérico), a taxa ao longo do tempo (taxa bactericida sérica) ou a magnitude e a duração da atividade bactericida (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999a). Na prática, o pico e os níveis basais dos títulos bactericidas séricos podem ser mais facilmente determinados. Para tanto, é obtida uma amostra de soro do paciente no momento previsto em que são atingidos os níveis de pico e/ou basais dos agentes antimicrobianos administrados ao paciente. Em seguida, a amostra de soro é diluída em caldo, *pool* de soros humanos ou em uma mistura de ambos que seja suplementada com cátions (quando se testam aminoglicosídeos ou fluoroquinolonas contra *P. aeruginosa*). Uma suspensão padronizada do organismo é então adicionada às diluições seriadas do soro, e os tubos são incubados de um dia para o outro a 35°C. O título inibitório sérico corresponde à maior diluição do soro que inibe visivelmente o crescimento do organismo. Subculturas podem ser feitas a partir de cada tubo que contém soro diluído sem crescimento aparente, a fim de se determinar a maior diluição de soro com atividade bactericida para teste do organismo.

Embora haja muita controvérsia acerca do valor clínico do teste bactericida sorológico, deveria ser evidente que todos os aspectos técnicos envolvidos no teste bactericida também estão envolvidos nesse teste. Além disso, o teste bactericida sorológico envolve duas variáveis extras: (1) o tempo de coleta do sangue e (2) o tipo de diluente (i. é., caldo, soro ou uma combinação de ambos) utilizado no teste. Mais uma vez, devido às variações metodológicas e às variáveis técnicas que afetam esses testes, pode ser difícil estabelecer uma correlação entre títulos bactericidas específicos e o resultado da terapia.

Referências bibliográficas

Baker CN, Stocker SA, Culver DM, Thornsberry C: Comparison of the E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29:533.

Barenfanger J, Drake C, Kacich G: Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 1999; 37:1415.

Este interessante estudo demonstra os potenciais benefícios da rápida identificação e do teste de suscetibilidade contra isolados bacterianos, utilizando sistemas comerciais de suscetibilidade. Discute-se os potenciais benefícios para o resultado do paciente, duração da internação e custos hospitalares.

Bates DW, Goldman L, Lee TH: Contaminant blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results. JAMA 1991; 265:365.

Bayer AS, Lam K: Efficacy of vancomycin plus rifampin in experimental aortic valve endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: in vitro–in vivo correlations. J Infect Dis 1985; 151:157.

Bird BR, Denniston MM, Huebner RE, Good RC: Changing practices in mycobacteriology: a follow-up survey of state and territorial public health laboratories. J Clin Microbiol 1996; 34:554.

Critchley IA, Karlowsky JA: Optimal use of antibiotic resistance surveillance systems. Clin Micrbiol Infec 2004; 10:502–511.

D'Azevedo PA, Dias CA, Goncalves ALS, et al: Evaluation of an automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. Diag Microbiol Infect Dis 2001; 40:157.

Doern GV, Vautour R, Gaudet M, et al: Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J Clin Microbiol 1994; 32:1757.

Este interessante estudo demonstra os potenciais benefícios da rápida identificação e do teste de suscetibilidade contra isolados bacterianos, utilizando sistemas comerciais de suscetibilidade. Discute-se os potenciais benefícios para o resultado do paciente, duração da internação e custos hospitalares.

Drake TA, Sande MA: Studies of the chemotherapy of endocarditis: correlation of in vitro, animal model, and clinical studies. Rev Infect Dis 1985; 5(Suppl 2):S345.

Endtz HP, van Den Braak N, van Blekum A, et al: Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. J Clin Microbiol 1998; 36:592.

Eng RHK, Chjerubin CE, Pechere J-C, Beam TR: Treatment failures of cefotaxime and latamoxef in meningitis caused by *Enterobacter* and *Serratia* spp. J Antimicrob Chemother 1987; 20:903.

Ernst EJ, Diekema DJ, Bootsmiller BJ, et al: Are United States hospitals following national guidelines for the analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility data? Diag Microbiol Infec Dis 2004; 49:141.

Fahr AM, Eigner U, Armbrust M, et al: Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix Automated Microbiology System for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 2003; 41:1135.

Falagas ME, Siakavellas E: *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 2000; 15:1.

Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I: Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-Screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 2002; 40:2766.

Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH: Practical disk diffusion method for detection inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2003; 41:4740.

Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, et al: The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on the prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 US adult intensive care units. Ann Intern Med 2001; 135:175.

Fridkin SK, Lawton R, Edwards JR, et al: Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 2002; 8:702.

Estas duas referências demonstram a utilidade do teste de suscetibilidade antibiótica e do monitoramento da suscetibilidade antibiótica cumulativa para a modificação dos padrões de prática, bem como o efeito que a modificação dos padrões de uso de antibióticos pode exercer na redução da prevalência de um patógeno virulento.

Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E: Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptiblity testing of enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38:2108.

Gerrado SH, Citron DM, Claros MC, Goldstein EJC: Comparison of E-test to broth microdilution method for testing *Streptococcus pneumoniae* susceptibility to levofloxacin and three macrolides. J Clin Microbiol 1996; 40; 2413.

Gribble MJ, Chow AW, Naiman SL, et al: Prospective randomized trial of piperacillin monotherapy versus carboxypenicillin-aminoglycoside combination regimens in the empirical treatment of serious bacterial infections. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24:388.

Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, et al: Synergism between amingoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22:743.

Handwerger S, Tomasz A: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev Infect Dis 1985; 7:368.

Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rohde H, et al: Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the VITEK 2 System. J Clin Microbiol 2002; 40:3291.

Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rohde H, et al: Evaluation of the BD PHOENIX automated microbiology system for detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42:5041.

Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, et al: The Alexander project 1998–2000: susceptibility of pathogens from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 2003; 52:229.

Jones RN: Method preferences and test accuracy of antimicrobial susceptibility testing: updates from the College of American Pathologists microbiology surveys. Arch Pathol Lab Med 2001; 125:1285.

Uma descrição dos tipos de teste de suscetibilidade realizados por laboratórios participantes, os sistemas empregados e suas respectivas acurácias contra testes de proficiência isolados específicos. São destacados os potenciais erros de relato laboratoriais.

Jorgensen JH, Crawford SSA, McElmeel ML, Fiebelkorn KR: Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. J Clin Microbiol 2004; 42:1800.

Kohner PC, Patel R, Uhl JR, et al: Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated vitek methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to vancomycin. J Clin Microbiol 1997; 35:3258.

Leverstein-van Hall M, Fluit AC, Paauw A, et al: Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in

multiresistant *Esherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol 2002; 40:3703.

Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, et al: Evaluation of the VITEK 2 System for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant Gram-positive cocci. J Clin Microbiol 2002; 40:1681.

Livermore DM, Struelens M, Amorim J, et al: Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. J Antimicrob Chemother 2002; 49:289.

Matsen JM: Means to facilitate physician acceptance and use of rapid test results. Diagn Microbiol Infect Dis 1985; 3:S73.

Mouton JW: Breakpoints: current practice and future perspectives. Int J Antimicrob Agents 2002; 19:323.

Discussão interessante sobre o conceito e a lógica por trás do ponto de ruptura antibiótico. É discutida a distinção entre ponto de ruptura microbiológico e ponto de ruptura clínico. São feitas recomendações para melhoria da acurácia e utilidade do ponto de ruptura.

Murdoch DR, Mirrett S, Harrell LJ, et al: Comparison of Microscan broth dilution, Synergy Quad plate agar dilution, and disk diffusion screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* species. J Clin Microbiol 2003; 41: 2703.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methodology for the Serum Batericidal Test; Approved Guideline. CLSI Document M21-A. Wayne, PA, CLSI, 1999a.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Determining Bactericidal Activity of Anitmicrobial Agents. Approved Guidelines. CLSI Document M26-A. Wayne, PA, CLSI, 1999b.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptiblity Test Data; Approved Guideline. CLSI Document M39-A. Wayne, PA, CLSI, 2002a.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI Document M38-A. Wayne, PA, CLSI, 2002b.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, 2nd ed. CLSI Document M27-A2. Wayne, PA, 2002c.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 6th ed. CLSI Document M7-A6. Wayne, PA, CLSI, 2003a.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, 8th ed. CLSI Document M2-A8, Wayne, PA, CLSI, 2003b.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Susceptiblity Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. CLSI Document M24-A. Wayne, PA, CLSI, 2003c.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard, 6th ed. CLSI Document M11-A6. Wayne, PA, CLSI, 2004.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th Informational Supplement. CLSI Document M100-S15. Wayne, PA, CLSI, 2005.

Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, et al: Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. Clin Infect Dis 2000; 30:870.

Estudo importante que demonstra os padrões de suscetibilidade em modificação de um gênero de bactérias anaeróbicas no decorrer do tempo, a correlação do tratamento antibiótico apropriado com o resultado do paciente e a importância do teste de suscetibilidade na orientação do tratamento.

NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992 through June 2003. Am J Infect Control 2003; 31:481.

Pearson RD, Steigbigel RT, Davis HY, Chapman SW: Method for reliable determination of minimum lethal antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18:699.

Quinn JP, Divincenzo CA, Lucks DA, et al: Serious infections due to penicillin-resistant strains of viridans streptococci with altered penicillin-binding proteins. J Infect Dis 1988; 157:764.

Rosenstein NE, Stocker SA, Popvic T, et al: Antimicrobial reistance of *Neisseria meningitidis* in the United States, 1997. The Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Team. Clin Infect Dis 2000; 30: 212.

Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39:3946.

Sande MA: Antibiotic therapy of bacterial meningitis: lessons we've learned. Am J Med 1981; 71:507.

Sanders CC, Peyret M, Smith Moland E, et al: Ability of the VITEK 2 Advanced Expert System to identify β-lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2000; 38:570.

Scarpano C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P: Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 System for testing susceptibility for *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TM method. J Clin Microbiol 2004; 42:1109.

Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL: Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. J Clin Microbiol 2004; 42:2777.

Sherris JC: Problems in in vitro determination of antibiotic tolerance. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30:633.

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al: National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends for 1997–2000. Clin Infect Dis 2002; 35:S126.

Sturenburg E, Mack D: Extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003a; 47:273.

Sturenburg E, Sobottka I, Feucht HH, et al: Comparison of BDPhoenix and VITEK2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-spectrum beta-lactamase detection in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2003b; 45:29.

Swenson JM, Williams PP, Killgore G, et al: Performance of eight methods, including two new rapid methods for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 2001; 39:3785.

Tenover FC, Swenson JM, O'Hara CM, Stocker SA: Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci, J Clin Microbiol 1995; 33:1524.

Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 275.

Van Den Braak N, Goessens W, van Belkum A, et al: Accuracy of the VITEK 2 system to detect glycopeptide resistance in enterococcci. J Clin Microbiol 2001; 39:351.

Vincent P, Izard D, Lebrun T, et al: Intaret cliniques des resultats rapides de bacteriologie ou de l'infection nosocomiales: comparaison avec les methodes traditionelles. Presse Med 1985; 14:1697.

Wilcox MH, Winstanely TG, Douglas CWI, et al: Susceptibility of alpha-hemolytic streptococci causing endocarditis to benzylpenicillin and ten cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1993; 32:63.

Wilson WR, Geraci JE: Treatment of streptococcal infective endocarditis. Am J Med 1985; 75(Suppl 6B):128.

CAPÍTULO 58

Infecções por espiroquetas

P. Rocco LaSala MD, Michael B. Smith MD

Treponema	1207
Treponemíases clássicas	1207
Diagnóstico laboratorial das treponematoses	1209
Tratamento das treponematoses	1211
Outras treponemíases	1211
Leptospira	1211
Borrelia	1212
Doença de Lyme	1212
Febre recidivante	1217
Febre por mordedura de rato	1218
Anaerobiospirillum succiniciproducens	1218
Agentes causadores de espiroquetose intestinal	1218
Referências bibliográficas	1219

PONTOS-CHAVE

- Embora existam algumas exceções e variações, as doenças humanas causadas por espiroquetas estão tipicamente associadas a uma história natural, com manifestações clínicas sequenciais que refletem três fenômenos gerais: (a) proliferação de microrganismos iniciais no sítio de inoculação; (b) espiroquetemia com disseminação sistêmica; (c) persistência de um pequeno número de micróbios em vários sítios.
- Se por um lado há casos em que é possível detectar diretamente as espiroquetas causadoras de doença humana (cultura microbiológica, microscopia, amplificação genômica etc.), por outro, é mais frequente estabelecer o diagnóstico com base na demonstração de uma resposta sorológica do paciente ao agente agressor.
- A sífilis venérea é uma doença sexualmente transmissível e causada pela espiroqueta *Treponema pallidum* (subespécie *pallidum*).
- Nos estágios iniciais da doença, a sífilis venérea pode ser diagnosticada por meio da visualização direta por microscopia.
- A detecção sorológica da sífilis – sem dúvida o modo mais comum de diagnóstico – engloba métodos semiquantitativos, que determinam a concentração de anticorpos dirigidos contra várias lipoproteínas, e métodos qualitativos, que medem a concentração de anticorpos dirigidos contra antígenos treponema-específicos.
- Framboesia (bouba), sífilis endêmica (bejel) e pinta não são doenças sexualmente transmissíveis, sendo endêmicas em diversas regiões tropicais e do Oriente Médio. Os agentes causadores são, respectivamente, *T. pallidum* (subespécie *pertenue*), *T. pallidum* (subespécie *endemicum*) e *T. carateum*.
- O provável diagnóstico das treponematoses endêmicas por vezes pode ser estabelecido com base em dados clínicos e epidemiológicos. Entretanto, assim como para a sífilis venérea, foi demonstrado que as técnicas sorológicas e de microscopia direta podem ser úteis.
- A doença mais comumente transmitida por carrapatos na América do Norte e na Europa – a doença de Lyme – é causada por *Borrelia garinii* e *Borrelia afzelii*.
- Quando se trata da doença de Lyme, as principais manifestações clínicas são eritema migratório (doença localizada de fase inicial), neuroborreliose (doença disseminada de fase inicial ou doença de estágio tardio) e/ou artrite de Lyme (doença de estágio tardio).
- Como nenhum teste laboratorial isolado apresenta desempenho satisfatório em todos os possíveis cenários clínicos, o diagnóstico da doença de Lyme deve se basear em uma combinação de (a) características clínico-epidemiológicas; (b) resposta sorológica do paciente (medida por ELISA/IFA e imunoblot); (c) evidências moleculares; ou (d) resultados de cultura.
- A febre recidivante epidêmica transmitida por piolhos apresenta distribuição mundial e é causada por *Borrelia recurrentis*.
- A febre recidivante epidêmica, transmitida por carrapatos, apresenta distribuição geográfica restrita e é causada por várias espécies de *Borrelia*, incluindo *Borrelia hermsii* e *Borrelia turicatae*.
- O início agudo com febre alta e sintomas constitucionais, bem como os ciclos subsequentes de evanescência e recrudescência, são observados com frequência em ambas as formas de febre recidivante.
- O diagnóstico da febre recidivante é mais frequentemente estabelecido por meio da demonstração das espiroquetas em esfregaços de sangue periférico corados pela técnica de Giemsa.
- Uma das doenças zoonóticas mais comuns e de ocorrência mundial – a leptospirose – é causada por diversas variantes sorológicas de diferentes espécies do gênero *Leptospira*.
- Embora a leptospirose frequentemente seja uma condição subclínica ou branda e semelhante à gripe, uma pequena proporção dos pacientes desenvolve sintomas constitucionais além de doença gastrintestinal/hepática, meningite, insuficiência renal e/ou miocardite (também denominada doença de Weil).
- Enquanto *Leptospira* spp. pode ser cultivada *in vitro*, o diagnóstico é comumente estabelecido por meio da demonstração da soroconversão.
- *Brachyspira aalborgi* e *Brachyspira pilosicoli* estão presentes e foram isoladas a partir do cólon de indivíduos com diarreia, cuja etiologia, no entanto, não havia sido firmemente estabelecida. A demonstração das espiroquetas ao longo das margens constituídas de células epiteliais colônicas por microscopia de rotina para imuno-histoquímica ou hibridização *in situ* de biópsias é mais utilizada do que as culturas e os ensaios de amplificação genômica.

As espiroquetas são bactérias delgadas que apresentam forma espiral, cujas hélices realizam uma ou mais rotações completas. São Gram-negativas, contudo, somente podem ser visualizadas por microscopia de campo escuro ou de fase, em cortes de tecido preparados por técnicas de impregnação com prata e coloração imuno-histoquímica. Realizam movimentos semelhantes ao de um saca-rolhas, possibilitados por organelas similares a flagelos, denominadas fibrilas periplásmicas ou filamentos axiais, que ficam presas próximo aos polos da bactéria. Apesar de existirem muitas espécies comensais e não patogênicas de espiroquetas, a doença humana é limitada a infecções produzidas por espécies de três gêneros: *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*. Bem distintas do ponto de vista epidemiológico, as espiroquetas pertencentes a esses gêneros apresentam numerosas similaridades patogênicas e, consequentemente, clínicas em termos de aquisição por seres humanos (Schmid, 1989). Além disso, bactérias espiroqueta-símile, como *Spirillum minor* e *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, foram implicadas como doenças humanas. Embora as espécies de *Brachyspira* tenham sido associadas a síndromes gastrintestinais, a atribuição da causa dessas condições a essas bactérias ainda não é universalmente aceita.

Treponema

O gênero *Treponema* contém duas espécies causadoras de doença em seres humanos. *Treponema pallidum* está dividido em três subespécies, cada uma das quais constitui um agente etiológico de uma entidade clínica distinta: *pallidum*, *pertenue* e *endemicum*. Essas subespécies são agentes etiológicos, respectivamente, da sífilis venérea, framboesia e sífilis endêmica (bejel). A pinta é causada pela segunda espécie patogênica: *Treponema carateum*.

Treponemíases clássicas

Sífilis

Descrição

T. pallidum (subespécie *pallidum*), o agente etiológico da sífilis venérea, é uma espiroqueta delgada (0,2 μm), medindo 6 a 20 μm de comprimento e com 10 a 13 espirais. A espiroqueta realiza movimentos semelhantes aos de um saca-rolhas, com uma flexão central ondulante. É destruída de forma imediata por calor, frio, dessecação, desinfetantes e alterações osmóticas.

Epidemiologia

O homem é o único reservatório natural de *T. pallidum* (subespécie *pallidum*). A transmissão se dá pelo contato direto com as lesões ativas, primariamente por meio do contato sexual. A probabilidade de um indivíduo infectado transmitir a doença a seu parceiro é de aproximadamente 30 a 50% (Larsen, 1995). Alternativamente, a transmissão vertical através da placenta – o segundo modo de infecção mais comum – pode ocorrer quando uma mulher com infecção latente engravida ou se uma mulher grávida for infectada (Wicher, 2001). Ainda que bem menos frequente, a infecção pode ser transmitida por contato não sexual com as lesões ativas, transfusão de produtos do sangue frescos oriundos de indivíduo infectado (os organismos não sobrevivem por mais de 24 a 48 horas sob as condições de armazenamento do banco de sangue), picada de agulha acidental ou manuseio de amostras no laboratório.

A incidência da sífilis venérea nos Estados Unidos sofreu uma queda dramática em decorrência do advento da penicilina, após a II Guerra Mundial. A incidência dessa doença permaneceu em níveis estáveis até a década de 1980, quando sua prevalência aumentou provavelmente em virtude da associação entre a intensificação do uso de drogas e a promiscuidade sexual em certas populações. Enquanto a prevalência global da sífilis continua bastante variável (Gerbase, 1998; Peeling, 2004), nos Estados Unidos observou-se um declínio contínuo das taxas de infecção entre mulheres em idade fértil ao longo da década de 1990. Esse declínio ocorreu em paralelo a uma diminuição comparável da incidência de sífilis (Centers for Disease Control and Prevention, 2003, 2004a). Apesar do estabelecimento do National Plan to Eliminate Syphilis (Plano Nacional para Eliminação da Sífilis) nos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, 1999), a incidência da doença entre homens homossexuais continua a aumentar (Centers for Disease Control and Prevention, 2003).

Patogênese e patologia

T. pallidum (subespécie *pallidum*) penetra a membrana mucosa intacta ou ganha acesso aos tecidos através da pele esfolada. Em seguida, multiplica-se no sítio de entrada e entra nos sistemas linfático e circulatório, a partir dos quais se dissemina por todo o corpo. Em animais de laboratório, foram produzidas infecções com no mínimo quatro espiroquetas (Cumberland, 1949). As lesões clínicas aparecem quando se forma uma massa crítica de organismos localmente ($\approx 10^7$ espiroquetas). Portanto, o período de incubação está diretamente relacionado ao tamanho do inóculo inicial e pode variar de 3 dias a 3 meses (Magnuson, 1956).

A resposta imunológica ao *T. pallidum* (subespécie *pallidum*) é influenciada pela estrutura da bactéria. A membrana externa consiste em uma bicamada fosfolipídica contendo alguns antígenos proteicos demonstráveis. O mais importante desses antígenos, em termos de resposta imune do hospedeiro, é a lipoproteína localizada junto ao espaço periplásmico (Chamberlain, 1989; Cox, 1992; Salazar, 2002). A bactéria parece ser capaz de se autorrevestir com proteínas do hospedeiro. O efeito líquido é o retardo da resposta humoral e consequente perda de sua efetividade, uma vez que as espiroquetas são encontradas em locais extravasculares no momento da produção de anticorpos. Além disso, foi demonstrado em modelos de experimentação animal que a resposta imune celular sofre modulação negativa na sífilis, mesmo diante da resposta humoral inefetiva (Fitzgerald, 1992).

Uma resposta imune retardada e enfraquecida permite que o *T. pallidum* (subespécie *pallidum*) se dissemine e produza uma infecção crônica. O curso da sífilis pode ser dividido em estágios previsíveis. O primeiro estágio é o desenvolvimento de um cancro e ocorre em média após 3 semanas de infecção, ainda que nem todos os pacientes desenvolvam uma lesão primária. Em certos casos, por sua natureza indolor, a lesão passa desapercebida. Cicatrizando em 2 a 8 semanas, o cancro dá lugar ao estágio secundário. Observado em média após 6 semanas (intervalo de 2 a 12 semanas) da inoculação, esse estágio é caracterizado pela ampla disseminação via circulação sanguínea, bem como pelo desenvolvimento de envolvimento mucocutâneo e de órgãos acompanhado da manifestação de sintomas constitucionais. O estágio secundário é finalizado e a infecção, então, entra em um período de latência, em que o paciente não apresenta nenhuma manifestação da infecção. Os primeiros 4 anos do período de latência constituem a fase inicial, em que pode haver recidivas. A maioria dos casos de recidiva ocorre no primeiro ano do período, após o qual começa a fase de latência tardia, quando não há recidivas. Decorridos 10 a 25 anos do término do primeiro estágio, 1/3 dos pacientes não tratados desenvolve sífilis terciária, que constitui a manifestação mais séria e afeta o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central (SNC).

Seja qual for o órgão envolvido ou o estágio da doença, a característica histológica marcante da sífilis é uma endarterite obliterativa, que apresenta uma concêntrica proliferação endotelial e fibroblástica associada a um infiltrado de células mononucleares rica em plasmócitos. A endarterite resulta da ligação das espiroquetas às células endoteliais mediada por moléculas de fibronectina fixas à superfície bacteriana (Thomas, 1986). É possível demonstrar a presença dos treponemas nos tecidos ao se utilizarem as técnicas de impregnação com prata e coloração por imuno-histoquímica. Com a evolução da doença, tanto a infiltração de plasmócitos quanto a concentração de treponemas diminuem de intensidade.

A recente elucidação da sequência genômica completa de *T. pallidum* (subespécie *pallidum*) pode fornecer uma noção acerca da patogênese desse organismo (Fraser, 1998). Por exemplo, os pesquisadores já são capazes de constatar a ausência de diversas vias enzimáticas em particular, que são tipicamente encontradas em outras bactérias patogênicas cultiváveis. Um achado particularmente interessante foi uma série de genes duplicados, denominados repetições de *T. pallidum* (*tprA-tprL*), codificadores de proteínas de membrana homólogas que podem comprometer os mecanismos de variabilidade antigênica e escape imunológico (Centurion-Lara, 1999). Seus papéis como tal, bem como a localização celular putativa, contudo, permanecem vagos (Hazlett, 2001). Mesmo assim, como até agora foram atribuídas ou extrapoladas funções para apenas cerca de 2/3 das proteínas codificadas pelos 1.041 quadros de leitura abertos (Singh, 1999), ainda resta muito trabalho a ser feito.

Manifestações clínicas

A sífilis é uma infecção crônica com múltiplas expressões, relacionadas sobretudo ao estágio em que se manifestam. O cancro primário é por característica ulcerado, com bordas salientes e firmes, uma base lisa e uma notável ausência de exsudação e de dor. Embora os cancros em geral sejam únicos, até 1/3 dos pacientes pode apresentar múltiplos cancros. Pacientes com infecção prévia podem apresentar lesões atípicas, como uma pequena pápula, ou talvez nem mesmo desenvolvam uma lesão. Alguns pacientes apresentam linfadenopatia regional, em que os linfonodos se tornam moderadamente aumentados, com aspecto semelhante a uma borracha e sem supuração.

A disseminação dessa infecção primária resulta no estágio secundário, quando os pacientes apresentam sinais e sintomas de doença sistêmica. Mais de 90% dos indivíduos com a doença desenvolvem erupções que inicialmente surgem no tronco e nos membros (embora possa haver envolvimento de qualquer superfície corporal) como pequenas máculas, e progridem para pápulas e, às vezes, pústulas no decorrer de algumas semanas. O aparecimento das erupções nas palmas das mãos e nas solas dos pés é um evento típico. O alargamento e a coalescência das pápulas produzem placas pálidas de condilomas planos. Aproximadamente o mesmo percentual (90%) de pacientes

apresenta linfadenopatia generalizada, sendo que 3/4 desenvolvem febre, mal-estar, anorexia, artralgia, faringite e perda de peso. Placas mucosas são observadas em até 1/3 dos casos. Cerca de 40% dos pacientes desenvolvem sintomas do SNC, embora 1 a 2% apresentem meningite asséptica (Lukehart, 1988). O restante apresenta dor de cabeça e meningismo, uveíte, perda auditiva neurossensorial e envolvimento do nervo craniano.

A destruição tecidual que ocorre na sífilis torna-se evidente em 10 a 25 anos após a infecção primária. A sífilis cardiovascular resulta do enfraquecimento da túnica média e produz um aneurisma na aorta ascendente, com insuficiência da válvula aórtica e estreitamento dos óstios da artéria coronária. As gomas sifilíticas (i. e., áreas de necrose gomatosa), cujo tamanho varia de microscópico ao de grandes tumores, em geral envolvem a pele, o sistema esquelético e os tecidos mucocutâneos, todavia podem afetar qualquer órgão. Tanto a sífilis cardiovascular como as gomas se tornaram bem menos frequentes após o advento do tratamento antibiótico. Em contraste, como os antibióticos muitas vezes são administrados em doses insuficientes para atravessar a barreira hematoencefálica em concentrações bactericidas, ainda ocorrem casos de neurossífilis com certa frequência (Mohr, 1976; Greene, 1980). Essa manifestação da sífilis é classificada como meningovascular ou parenquimatosa, embora seja comum haver certo grau de sobreposição.

A sífilis meningovascular ocorre em 5 a 10 anos após a infecção inicial e se apresenta clinicamente como convulsões, derrame e afasia. Pequenos infartos múltiplos, em virtude da característica endarterite no SNC, constituem a etiologia dessa variante. A neurossífilis parenquimatosa, que ocorre em 15 a 30 anos após a infecção inicial, é um processo degenerativo com perda de neurônios e de tratos mielinizados, e consequentes manifestações neurológicas e psiquiátricas complexas, que incluem paresia geral, tabes dorsal e anormalidades pupilares. Alguns pacientes não apresentam nenhum sinal ou sintoma clínico, contudo exibem anomalias no líquido cerebrospinal (LCE), como pleocitose, aumento da concentração proteica, reatividade no teste do Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), ou anticorpos contra *T. pallidum*, indicativos de infecção no SNC. Os pacientes foram descritos como tendo "neurossífilis assintomática" (Tramont, 2000).

A sífilis congênita também possui duas apresentações clínicas distintas: uma forma inicial infantil e uma forma tardia que ocorre após um período de latência de 5 a 30 anos. Apesar de não ser mais aceita a teoria tradicional de que a infecção do feto ocorre apenas no segundo trimestre da gestação, a sífilis congênita é mais frequentemente uma causa de aborto precoce do que de aborto tardio (Harter, 1976; Blanc, 1981). A funisite necrotizante (ou inflamação do cordão umbilical) é característica da sífilis congênita, embora esteja tipicamente presente somente em casos mais graves. Na forma infantil, uma erupção difusa com formação de crosta na pele e osteocondrite, além de periostite são características. Entretanto, recém-nascidos afetados podem ser assintomáticos (Dorfman, 1990; Ikeda, 1990). Também há fibrose difusa no fígado (fígado lobado) e nos pulmões (pneumonia alba). Após um período de latência, a forma tardia se manifesta na infância ou na fase adulta, por meio de uma variedade de sinais e sintomas. Entretanto, é clássico observar a tríade constituída por ceratite intersticial, dentes de Hutchinson e surdez do oitavo nervo. Também observa-se com frequência periostite, tíbias em sabre e deformidade do nariz em sela.

A sífilis e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) são comumente observadas no mesmo paciente, pois ambas compartilham fatores de risco em comum. Alguns estudos examinaram essa associação e demonstraram que não há diferenças de estágio, quanto à apresentação clínica, entre pacientes com sífilis e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) concomitante e aqueles sem AIDS (Hutchinson, 1991; Gourevitch, 1993). Ainda é discutido se a AIDS exerce algum efeito sobre o curso clínico da sífilis primária e secundária. Certos especialistas mencionam uma predileção pela infecção que se manifesta por meio de erupções atípicas e mais severas, sintomas constitucionais mais fortes e um curso mais maligno em pacientes com AIDS (Tramont, 2000; Collis, 2001). Outros, contudo, inclusive um estudo prospectivo, apontam a existência de poucas diferenças em termos de manifestações clínicas entre pacientes com e sem AIDS (Hutchinson, 1991; Musher, 1990; Rolfs, 1997). Além disso, apesar de ter sido proposto que pacientes com AIDS e sífilis ao mesmo tempo são mais propensos ao desenvolvimento de neurossífilis – além de desenvolvê-la mais rapidamente – do que os pacientes sem AIDS (Johns, 1987; Musher, 1990), trata-se de uma questão ainda contestada. Isso ocorre em virtude (a) das deficiências dos atuais critérios adotados para o diagnóstico da neurossífilis (Collis, 2001) e (b) da aparente falta de correlação entre a invasão do SNC pelos treponemas e o *status* da infecção pelo HIV (Lukehart, 1988). Um recente estudo prospectivo com o envolvimento de multicentros revelou ser mais provável que o teste de LCE sem treponemas continue positivo após a terapia de indivíduos infectados pelo HIV, em comparação aos pacientes não infectados pelo vírus (Marra, 2004). Entretanto, ainda falta demonstrar se essa evidência laboratorial de falha terapêutica de fato reflete uma potencial recidiva clínica ou é apenas uma peculiaridade imunológica exclusiva dessa população de pacientes. Ainda assim, pacientes com AIDS realmente apresentam maior incidência de envolvimento ocular, sendo que a uveíte anterior representa a manifestação mais comum da infecção por *T. pallidum* (Tramont, 2000).

Framboesia

A framboesia (também denominada framboesia tropical, pian, parangi, paru, buba e bouba) é uma doença crônica causada por *T. pallidum* (subespécie *pertenue*). Essa doença aflige os habitantes das regiões tropicais desde a antiguidade e é prevalente nas áreas rurais dos países tropicais em que chove intensamente. Após um declínio durante os anos 1950, em decorrência de amplas campanhas de controle das treponematoses, a incidência da framboesia voltou a aumentar em algumas áreas (Engelkens, 1991a; Antal, 2002).

Ela é contraída durante a infância, antes dos 15 anos de idade, por contato direto. Eventuais rupturas na pele permitem a entrada dos treponemas. As lesões iniciais geralmente aparecem, em média, após 3 semanas e não se desenvolvem durante vários meses. Uma ou mais pápulas surgem, com maior frequência nos membros inferiores, e ulceram ou evoluem para lesões papilomatosas. Numerosos treponemas são encontrados nessas lesões. A resolução frequentemente ocorre de forma espontânea, contudo podem haver recaídas que são precedidas de mal-estar, febre e linfadenopatia generalizada. Em seguida, é comum aparecerem lesões cutâneas disseminadas. A maioria dos pacientes entra em um período de latência, em que não há manifestação de sinais ou sintomas clínicos evidentes. Na maioria dos casos, a doença não exibe novas manifestações. Entretanto, cerca de 10% dos pacientes desenvolvem uma framboesia tardia, que está associada ao aparecimento de lesões destrutivas irreversíveis nos ossos, nas cartilagens, nos tecidos moles e na pele (Engelkens, 1991a; Antal, 2002). Há relatos da ocorrência de lesões cardiovasculares e no SNC similares àquelas observadas na sífilis (Roman, 1986).

Sífilis endêmica

A sífilis endêmica (bejel) é uma infecção crônica não venérea decorrente da infecção por *T. pallidum* (subespécie *endemicum*). Trata-se de uma doença antiga e, embora não seja tão disseminada quanto era no passado, ainda ocorre no Oriente Médio e na África, em regiões de clima quente e seco. Na África saheliana, a prevalência da doença tem aumentado (Engelkens, 1991b).

O bejel é transmitido por meio do contato direto com as lesões ativas e com dedos e utensílios (utilizados para comer ou beber) contaminados. Nas áreas afetadas, é comum a população viver sob condições de superlotação e falta de higiene. Crianças com 2 a 15 anos de idade são primariamente infectadas, embora a doença possa ocorrer entre adultos pertencentes à mesma família. Adultos que não contraíram a doença durante a infância podem ser infectados por seus filhos.

O inóculo é pequeno e as lesões primárias da sífilis endêmica em fase inicial, mais frequentes na mucosa orofaríngea, por vezes não são aparentes. As manifestações clínicas iniciais da doença com frequência pertencem ao estágio secundário, apresentando placas mucosas, condiloma plano, estomatite angular, linfadenopatia generalizada e osteoperiostite dolorosa. Na sequência, há um período de latência cuja duração é variável. O estágio tardio é caracterizado por destruição tecidual da pele, dos ossos e das cartilagens, com predileção pelo nariz e palato (conhecida como gangosa) e, às vezes, envolvimento laríngeo.

Pinta

A pinta (carate, mal de pinto, azul) é causada pela infecção com *T. carateum*. A doença é endêmica nas áreas rurais dos países tropicais

das Américas Central e do Sul, e recentemente, voltou a ocorrer no México e na Colômbia – dois países onde havia sido erradicada na década de 1950 (Engelkens, 1991). Crianças com menos de 5 anos de idade são primariamente infectadas. Acredita-se que a inoculação se dá pela pele ou por contato com membranas mucosas, sem ser venérea. É difícil caracterizar a patogênese da doença, uma vez que, diferente das demais treponematoses patogênicas para o homem, não há nenhum modelo de experimentação animal disponível e o treponema não pode ser mantido em cultura.

Embora seja semelhante a outras treponemíases que apresentam estágios inicial e tardio, na pinta os estágios se sobrepõem com frequência. Após algumas semanas ou alguns meses, uma pápula ou placa primária se desenvolve no sítio de inoculação, acompanhada ou não de linfadenopatia localizada. A lesão primária finda e, meses ou anos mais tarde, aparecem lesões secundárias disseminadas (ou píntides) que parecem placas psoriformes escamosas, persistem durante longos períodos ou somem e reaparecem. Na pinta tardia, as lesões apresentam hipopigmentação e atrofia cutânea ou hiperceratose que podem persistir ao longo de toda a vida do paciente. A pele parece ser o único órgão afetado por essa doença (Antal, 2002).

Diagnóstico laboratorial das treponematoses

Como os agentes etiológicos das treponematoses humanas não podem ser isolados por meio de métodos de cultivo de rotina, sua detecção é feita pela visualização direta dos organismos em material oriundo das lesões, ou indiretamente, com a utilização de métodos imunológicos. Cada estágio das treponematoses requer uma modalidade de teste particular. Nos estágios iniciais, quando as lesões estão presentes, utiliza-se microscopia direta. Nos estágios posteriores, são empregados testes sorológicos. Testes não treponêmico inespecíficos são utilizados para fins de confirmação. É importante notar que nenhum desses testes laboratoriais habitualmente utilizados é capaz de distinguir as espécies intimamente relacionadas das subespécies de treponemas patogênicos, sendo que a diferenciação deve ter base clínica e epidemiológica.

Microscopia de campo escuro

Quando é possível obter amostras diretamente das lesões, como na sífilis primária, secundária ou congênita inicial (cancros, placas mucosas ou condiloma plano), a lesão deve ser limpa com água estéril (sem sabão nem antisséptico) e, então, delicadamente raspada. Aplica-se pressão, de modo a provocar o acúmulo de exsudato na lesão. Uma gota de líquido é transferida para uma lâmina e coberta com uma lamínula. A amostra deve ser examinada imediatamente, pois é necessário visualizar a motilidade para estabelecer a identificação definitiva. Como são delgados, os treponemas não podem ser visualizados por microscopia de luz convencional. Isso requer microscopia de campo escuro, em que um condensador faz os raios luminosos incidirem sobre os treponemas em ângulo oblíquo. Em consequência, os treponemas refletem a luz incidente e são vistos como objetos brilhantes contra um fundo escuro. O exame em campo escuro pode resultar positivo várias semanas antes da obtenção de um teste sorológico positivo, e apresentar uma sensibilidade de 80% no diagnóstico da sífilis (Larsen, 1995). Em virtude da possibilidade de confusão com os treponemas comensais existentes na boca, o uso dessa técnica não é recomendado para avaliação de lesões orais. Além disso, existem três espécies de *Treponema* que habitam normalmente a região genital (*Treponema phagedensis, Treponema refringens* e *Treponema minutum*) e podem ser confundidos com *T. pallidum* ao exame em campo escuro. A limpeza cuidadosa da área é importante para reduzir a probabilidade de ocorrência da confusão.

Microscopia de fluorescência

Anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) específicos para *T. pallidum* podem ser utilizados para detecção direta de treponemas nas lesões, evidenciando a necessidade de observar a motilidade das bactérias. O teste é aplicável ao exame de amostra de líquido tecidual transferida para uma lâmina, seca e fixada (anticorpo fluorescente direto [AFD-TP]), ou de cortes de tecido parafinizados (teste tecidual de anticorpo fluorescente direto [AFDT-TP]). Atualmente, existem anticorpos monoclonais comercializados que podem ser utilizados nos testes, substituindo os anticorpos policlonais absorvidos de Reiter utilizados no passado e menos específicos, que eram obtidos de coelhos e seres humanos sifilíticos. Quando empregados para examinar líquidos oriundos de lesões frescas, tanto o AFD-TP como o AFDT-TP apresentam uma sensibilidade aproximada de 100%, em comparação ao método de Stiener de impregnação com prata, para casos de sífilis congênita (Larsen, 1995). Como esses testes são específicos para treponemas patogênicos, são preferidos para o exame de lesões orais.

Microscopia de imuno-histoquímica

De modo semelhante aos princípios da microscopia de fluorescência, anticorpos mono e policlonais específicos para espiroquetas, treponemas ou *T. pallidum* têm sido utilizados pelos patologistas para detecção desses organismos em tecidos parafinizados (Guarner, 2000; Hoang, 2004). Em contraste com a imunofluorescência, todavia, a imuno-histoquímica dispensa o uso de microscópios de fluorescência caros. Com essa técnica, os anticorpos antitreponema ligados às espiroquetas presentes nos cortes teciduais são detectados após uma série de reações imunológicas, que tipicamente envolvem um conjugado antiglobulina biotinilado espécie-específico seguido da adição de um complexo estreptavidina enzima-conjugado. Após a interação da enzima com o substrato cromogênico apropriado, os organismos (quando presentes) são evidenciados contra um fundo claro de contracoloração. Isso permite detectar facilmente bactérias raras e confere capacidade de localização histológica. Há relatos de que esse procedimento apresenta melhor sensibilidade e especificidade quando comparado à técnica de impregnação com prata para detecção de treponemas. No entanto, depende bastante da fonte de anticorpos primários.

Testes sorológicos não treponêmicos

Os ensaios não treponêmicos identificam a presença de anticorpos dirigidos contra as lipoproteínas oriundas de células danificadas e contra a cardiolipina dos treponemas. Por isso, são ensaios inespecíficos para *Treponema*. Eles são empregados na triagem da doença, bem como no monitoramento de seu curso após o tratamento. Os testes padrão incluem lâmina de reagina VDRL, cartão circular de reagina plasmática rápida (RPR), reagina sérica não aquecida (USR, *unheated serum reagin*) e soro não aquecido com vermelho de toluidina (TRUST, *toluidine red unheated serum*). Um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) também foi aprovado para uso pela United States Food and Drug Administration (FDA), embora ainda não seja considerado um teste padrão (Larsen, 1998). Todos os testes utilizam um antígeno fosfolipídico (cardiolipina) enriquecido com lecitina e colesterol em uma partícula coloidal. A floculação constitui o ponto final dos testes padrão, enquanto valores de absorbância são calculados por espectrofotometria no ELISA. Amostras de soro, em vez de plasma, são preferíveis para todos os testes, sendo que no VDRL o soro precisa ser aquecido para eliminação de reações inespecíficas. A adição de cloreto de colina à RPR e USR elimina a necessidade de aquecer a amostra. As reações antígeno-anticorpo no VDRL e USR são avaliadas ao microscópio, sob aumento de 100 vezes, sendo que a adição de carvão à RPR e de corante ao TRUST torna as reações macroscopicamente visíveis.

Os anticorpos detectados por esses testes em geral se desenvolvem em 1 a 4 semanas após o aparecimento do cancro primário. O momento em que as amostras são coletadas durante o estágio primário, portanto, pode afetar a sensibilidade. Os títulos aumentam, permanecem elevados durante o primeiro ano e, então, declinam gradualmente. O teste sofre uma reversão espontânea e se torna negativo em 25% dos pacientes. Eles podem fornecer resultados falso-negativos e falso-positivos. Os resultados falso-negativos estão associados a títulos elevados de anticorpos (fenômeno prozona), que podem ser observados sobretudo na sífilis secundária. Essa situação pode ser resolvida se a amostra for diluída antes da realização do teste. Resultados falso-positivos ocorrem temporariamente em casos de doença aguda, como na hepatite ou em outras infecções virais e na gravidez. Os resultados podem ser crônicos diante de doenças do tecido conjuntivo (Larsen, 1995).

Testes padrão positivos são titulados pela repetição dos testes utilizando amostras diluídas 2 vezes. Todavia, esse aspecto constitui um dos principais inconvenientes do ELISA em formato provisório. Embora

esse teste permita analisar muitas amostras em um determinado intervalo de tempo (*throughput*), a análise semiquantitativa com o emprego de diluições seriadas ainda não foi adequadamente avaliada para uso no ELISA. Os títulos considerados nos testes padrão são utilizados para determinar a eficácia do tratamento. Um tratamento adequado é evidenciado por diminuições do título equivalentes a 4 vezes aos 12 meses na fase inicial da sífilis, e de 4 e 8 vezes, respectivamente, em 6 e 12 meses na sífilis tardia (Romanowski, 1991). Pacientes tratados na fase inicial da sífilis são mais propensos a reverterem para negatividade do que aqueles tratados na fase tardia da doença (Fiumara, 1980; Brown, 1985).

A triagem de certas populações para detecção de sífilis requer o uso de amostras ou testes especiais. Por exemplo, na triagem para sífilis congênita, uma amostra de soro materno é melhor do que as amostras de sangue de cordão umbilical ou de sangue neonatal utilizadas no passado (United States Public Health Service, 1968). O soro neonatal ocasionalmente pode ser submetido a testes semiquantitativos, entretanto apenas para comparação de títulos com o soro materno. Quando os títulos do soro neonatal são consideravelmente mais altos, é possível admitir que a fonte de anticorpos neonatais provavelmente não resulta apenas da difusão transplacentária. Outro exemplo consiste no diagnóstico de neurossífilis, que requer um resultado positivo em teste sorológico treponêmico, além de um VDRL positivo com LCE ou detecção de alguma anormalidade no LCE (p. ex., elevada contagem de leucócitos sanguíneos ou altos níveis proteicos) (Centers for Disease Control and Prevention, 2002). O VDRL é bastante específico, ainda que insensível, para o diagnóstico de neurossífilis. Esse teste pode resultar negativo em 22 a 69% dos pacientes com neurossífilis ativa, enquanto sua sensibilidade em casos de neurossífilis inativa pode chegar a 10% (MacLean, 1996). Apesar disso, nenhum outro teste não treponêmico é útil para detectar essa complicação tardia da sífilis e os testes treponêmicos apresentam falta de especificidade e fornecem resultados falso-positivos associados à transudação de anticorpos através da barreira hematoencefálica.

Há vários relatos de resultados aberrantes de testes não treponêmicos para pacientes coinfectados por HIV e sífilis, incluindo soroconversão retardada. Entretanto, a sífilis soronegativa não parece ser prevalente entre pacientes com AIDS (Flores, 1995). A taxa de resultados falso-positivos é discretamente maior para pacientes com AIDS (4% *vs* 1% em pacientes sem AIDS). Contudo, existe ao menos um estudo associando a taxa aumentada de positividade ao uso abusivo de drogas endovenosas, em vez da própria infecção com HIV (Flores, 1995; Larsen, 1995; Hernandez-Aguado, 1998). Resultados falso-negativos também ocorrem entre pacientes sifilíticos com AIDS, em decorrência da exagerada resposta de anticorpos não treponêmicos apresentada por alguns pacientes, com o consequente efeito prozona (Gourevitch, 1993). Além disso, como já mencionado, os títulos de anticorpo não treponêmicos não declinam (a conhecida "soroconversão") em alguns pacientes sifilíticos com AIDS mesmo quando submetidos à terapia. Para certos pesquisadores, isso está mais relacionado ao estágio no qual o tratamento é iniciado do que à infecção pelo HIV, pois esse fenômeno também foi descrito para pacientes sem AIDS (Larsen, 1995).

Testes sorológicos treponêmicos

Esses testes detectam a presença de anticorpos dirigidos contra os antígenos de treponemas e são empregados para confirmar resultados positivos fornecidos por testes não treponêmicos de triagem. Também são utilizados na confirmação da infecção em casos de resultado negativo em teste não treponêmico durante as fases de doença tardia ou latente, que podem ocorrer em 30% dos pacientes com sífilis terciária (Larsen, 1995). O teste de absorção de anticorpo treponêmico fluorescente (FTA-ABS, *fluorescent treponemal antibody absorption test*), um dos dois testes treponêmicos padrão, consiste em um teste de anticorpo fluorescente indireto. Envolve a adição de soro de paciente aquecido, e adsorvido com antígenos do treponema de Reiter não patogênico para eliminação de anticorpos com reatividade cruzada, a uma lâmina contendo *T. pallidum* (subespécie *pallidum*) (cepa de Nichols) fixado. Em seguida, são adicionados anticorpos antiglobulina humana marcados com FITC. A observação de treponemas visíveis por microscopia de fluorescência indica a presença de anticorpos contra espécies de treponema patogênicas no soro do paciente. O segundo teste, que é preferido por muitos laboratórios dada a relativa simplicidade de sua execução, é o teste de micro-hemaglutinação com *T. pallidum* (MHA-TP, *microhemaglutination-T. pallidum test*). Soro adsorvido é adicionado a hemácias de carneiro previamente sensibilizadas com sonicado de *T. pallidum* (cepa de Nichols) em uma bandeja de microtitulação. A aglutinação das hemácias será produzida pelo soro contendo anticorpos. Em geral, MHA-TP e FTA-ABS são equivalentes, exceto quanto ao estágio primário da sífilis, em que o FTA-ABS apresenta maior sensibilidade (Hart, 1980; Augenbraun, 1998). As sensibilidades e especificidades dos diversos testes sorológicos treponêmicos e não treponêmicos estão resumidas na Tabela 58.1 (Larsen, 1995).

Anticorpos específicos para treponemas são formados na sífilis primária e podem ser detectados ao longo de toda a vida do paciente, independentemente de terapia, ainda que existam exceções. Pacientes com AIDS apresentam maior tendência à reversão para soronegatividade após o tratamento (Haas, 1990). O FTA-ABS comumente é o primeiro teste a resultar positivo, seguido do MHA-TP e, logo depois, dos testes não treponêmicos. Esses últimos não são utilizados para fins de triagem no cenário clínico, pois cerca de 1% da população pode apresentar resultados falso-positivos. Resultados falso-positivos de FTA-ABS foram relatados para idosos, indivíduos com doenças do tecido conjuntivo e pacientes infectados por organismos correlatos, como *Borrelia* (Larsen, 1995).

Assim como para os testes sorológicos não treponêmicos, ELISAs que utilizam antígenos específicos de *Treponema* também passaram a ser disponibilizados para uso em laboratórios. Mais uma vez, esses testes têm como vantagem um formato mais acessível a um grande volume de testes e a uma interpretação mais objetiva. A sensibilidade e especificidade de vários produtos comercializados são comparáveis àquelas do FTA-ABS e do MHA-TP (Lefevre, 1990; Norgard, 1993). Tais testes são utilizados como de triagem em ambientes específicos, como na triagem de doadores de sangue e, aliado a um teste não treponêmico, em laboratórios com grande volume de análises que atendem a uma população de alta prevalência (Reisner, 1997; Aberle-Grasse, 1999). Também são disponibilizados testes de imunoensaio enzimático (EIA, *enzyme immunoassay*) com o emprego de antígenos não treponêmicos e formatos específicos para IgM, que podem ser utilizados, respectivamente, para fins de triagem e diagnóstico de sífilis congênita (Stoll, 1993; Hooper, 1994; Larsen, 1998).

Testes moleculares, como o de *Western blot* e o de reação em cadeia da polimerase (PCR), estão disponíveis em alguns laboratórios de referência. O *Western blot* foi recomendado para o diagnóstico da sífilis congênita (Larsen, 1995). O uso do PCR tem sido defendido para o diagnóstico de neurossífilis, particularmente em pacientes com AIDS, embora nenhum estudo tenha demonstrado as vantagens associadas ao seu uso em relação aos métodos atualmente utilizados (Marra, 1996). Em virtude da atual falta de padronização do projeto inicial, técnicas de extração do DNA e método de detecção de *amplicon*, é provável que o PCR permaneça à parte do arsenal diagnóstico ao menos em um futuro imediato (Wicher, 1999).

Tabela 58.1 Sensibilidades dos testes sorológicos para sífilis nos diferentes estágios da doença

	Estágio da sífilis (% de sensibilidade)			
Teste	**Primário**	**Secundário**	**Latente**	**Tardio**
VDRL	78 (74 a 87)	100	95 (88 a 100)	71 (37 a 94)
RPR	86 (77 a 100)	100	98 (95 a 100)	73
FTA-ABS	84 (70 a 100)	100	100	96
MHA-TP	76 (69 a 90)	100	97 (97 a 100)	94

Os números entre parênteses representam as faixas de sensibilidade dos estudos realizados pelo Centers for Disease Control and Prevention.

FTA-ABS = teste de absorção do anticorpo treponêmico fluorescente; MHA-TP = teste de micro-hemaglutinação com *Treponema pallidum*; RPR = reagina plasmática rápida; VDRL = Venereal Disease Research Laboratory.

Fonte: dados obtidos de Larsen, AS; Steiner, BM; Rudolph, AH: laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8:1.

Tratamento das treponematoses

As subespécies de *T. pallidum* e *T. carateum* são uniformemente suscetíveis à penicilina e outros antibióticos β-lactâmicos. O tratamento da sífilis primária e secundária e da sífilis latente em fase inicial consiste na administração de uma única injeção intramuscular de penicilina G benzatina. Framboesia, pinta e sífilis endêmica são tratadas com o mesmo antibiótico, porém em doses menores (Engelkens, 1991a, 1991b). Contatos domésticos com pacientes nos últimos três estágios da doença também requerem tratamento. Para pacientes alérgicos à penicilina, são utilizadas doxiciclina ou tetraciclina. Os antibióticos macrolídeos deixaram de ser recomendados, pois foi demonstrado que sua eficácia é inferior a 90% (Schroeter, 1972). Uma notável piora do curso clínico – denominada reação de Jarisch-Herxheimer – pode ser observada em pacientes submetidos ao tratamento de sífilis venérea, embora os sintomas com frequência não sejam tão severos quanto aqueles observados no tratamento da febre recidivante por espiroquetas (Griffin, 1998). No caso da sífilis tardia ou da sífilis de duração desconhecida, são administradas doses múltiplas de penicilina G benzatina. O estágio da doença não afeta o tratamento para framboesia, pinta ou sífilis endêmica (Engelkens, 1991a, 1991b). Uma alta dose de penicilina G aquosa é administrada via endovenosa para tratamento de neurossífilis e sífilis congênita. Para pacientes coinfectados pelo HIV e *T. pallidum*, as atuais diretrizes estabelecidas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) não recomendam introduzir nenhuma alteração na terapia (Centers for Disease Control and Prevention, 2002). De fato, estudos prospectivos falharam em demonstrar os benefícios proporcionados por terapias "aprimoradas" ou alternativas em casos de sífilis em fase inicial e neurossífilis, respectivamente, entre indivíduos infectados com HIV (Rolfs, 1997; Marra, 2000). Por outro lado, algumas autoridades sugerem que, diante da propensão ao desenvolvimento de neurossífilis mesmo com o tratamento da sífilis primária, os pacientes com AIDS devem ser tratados com doses mais altas de penicilina (Musher, 1991; Tramont, 2000).

Outras treponemíases

Descrição

Numerosas espiroquetas pertencentes ao grupo molecular de treponemas (TRE)-1, antigamente referidas como espiroquetas orais patógeno-relacionadas (PROS, *pathogen-related oral spirochetes*) e várias espécies de *Treponema* (p. ex., *Treponema denticola* e *Treponema socranskii*), têm sido isoladas cada vez mais frequentemente e em números maiores a partir da gengiva de pacientes com gengivite ulcerativa e periodontite crônica, em comparação aos pacientes com gengiva sadia (Riviere, 1995, 1996; Loesche, 2001). Embora a princípio se pensasse que esses organismos eram semelhantes ao *T. pallidum*, com base na observação da imunorreatividade cruzada e das propriedades invasivas *in vitro*, esses patógenos putativos na verdade são geneticamente heterogêneos – apresentam uma ligação distante com *T. pallidum* – e podem ser induzidos a expressar antígenos de superfície que exibem reatividade cruzada (Choi, 1996; Riviere, 1999).

Patogênese

Ainda não foi estabelecida uma relação causal definitiva entre as espiroquetas e essas doenças. Entretanto, sua presença em número significativo, mais comumente nos tecidos adoecidos do que naqueles sadios, sugere ao menos a existência de uma associação com gengivite/periodontite. Como existem inúmeras bactérias distintas não treponêmicas (p. ex., *Prevotella, Actinobacillus, Porphyromonas* etc.) que também foram associadas a essas manifestações clínicas, atualmente é discutido se a culpabilidade pertence aos organismos virulentos específicos existentes entre elas ou se está relacionada à diversidade global dos organismos contidos na biopelícula da placa (Loesche, 2001).

Diagnóstico

Assim como as espécies comensais de *Treponema* encontradas na área genital, há outras espécies de *Treponema* que podem ser cultivadas sob condições estritamente anaeróbias, utilizando uma variedade de meios e caldos enriquecidos não empregados na rotina (Choi, 1996; Riviere, 1999). Outras espécies, incluindo a maioria daquelas associadas à doença periodontal, ainda não foram cultivadas *in vitro* (Loesche, 2001). A detecção desses organismos tem sido feita com anticorpos monoclonais dirigidos contra *T. pallidum*, com o qual reagem de maneira cruzada. Mais recentemente, outros investigadores empregaram uma variedade de ferramentas de amplificação genética para tentar identificá-los e caracterizá-los (Paster, 2001; Hutter, 2003). Essas "expedições moleculares" são conduzidas utilizando-se iniciadores cujos alvos são sequências bacterianas conservadas, bem como PCR (para amplificar genes de rRNA) ou PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) (para amplificar o próprio rRNA). Os produtos resultantes, então, podem ser clonados em *Escherichia coli* e sequenciados para estabelecer as relações filogenéticas.

Tratamento

Há anos, o objetivo primário do tratamento consiste em reduzir a carga bacteriana global por meio da remoção da biopelícula de placa, tanto acima como embaixo da linha gengival, por meio de manipulações físicas (p. ex., debridamento cirúrgico). Recentemente, a adição de vários regimes antimicrobianos, incluindo antibióticos sistêmicos e agentes de aplicação local, tem se mostrado um adjunto potencialmente benéfico (Loesche, 2001).

Leptospira

Descrição

O gênero *Leptospira* é composto por 18 espécies genômicas, muitas das quais possuem cepas patogênicas e não patogênicas, além de mais de 260 sorovariantes (Perolat, 1998; Brenner, 1999). Antigamente, *Leptospira* compreendia três espécies: *Leptospira interrogans* (patogênica), *Leptospira biflexa* (não patogênica) e *Leptospira parva* (não patogênica). Essa divisão era baseada em propriedades bioquímicas. No entanto, tornou-se evidente que tais propriedades, além da patogenicidade e antigenicidade, não eram consistentemente preditivas da proximidade genética (Levett, 2001). As *leptospiras* são firmemente enroladas e possuem extremidades em forma de gancho. Medem 0,1 μm de largura por 6 a 20 μm de comprimento e realizam movimentos giratórios. São organismos que sobrevivem em água fresca e alcalina, mas são mortos sob condições de pH ácido, água salgada e ressecamento.

Epidemiologia

A leptospirose é, talvez, a zoonose global mais amplamente disseminada. Embora tenha sido identificada há quase 100 anos, ainda é considerada uma doença emergente importante. As sorovariantes individuais apresentam preferências geográficas, além de nichos ecológicos particulares. O organismo é transportado por diversos roedores, bem como animais selvagens e domésticos. Entretanto, o rato é um de seus reservatórios mais frequentes e constitui importante fonte de infecção humana. Um modo comum de infecção é o contato com a urina ou água contaminada e a entrada da bactéria via cortes ou superfícies mucosas. Indivíduos sujeitos à exposição ocupacional (mineiros, agricultores e trabalhadores do campo, veterinários, pescadores e trabalhadores de esgoto) ou recreacional (acampar nas proximidades ou nadar em águas infectadas) correm maior risco de contrair a infecção. Nos Estados Unidos, a incidência é de 40 a 120 casos/ano, contudo acredita-se que nem todos os casos de doença sejam relatados (Farr, 1995).

Patologia e patogênese

Após entrarem na circulação, os organismos disseminam-se amplamente, atingindo inclusive o SNC e os olhos. O dano ao endotélio nos tecidos infectados resulta em isquemia local e hemorragia. Também pode haver dano hepatocelular e dano tubular renal. O fígado pode exibir uma cor amarelo-esverdeada característica, porém as alterações histológicas são inespecíficas e incluem degeneração em balão, corpos acidófilos, regeneração e colestase. Além disso, é possível encontrar leptospiras em cerca de 25% dos casos (Dooley, 1976). O rim apresenta nefrite intersticial crônica, necrose dos túbulos proximais e cilindros granulares ou hialinos, sendo encontradas *leptospiras* intratubulares em aproximadamente 65% dos casos (Arean, 1962). As manifestações pulmonares incluem congestão e edema, hemorragia alveolar, efusão pleural e formação ocasional de membrana hialina (Arean, 1962; Ramachandran, 1977). Miocardite, meningite/encefalite e miosite também podem ser observadas (Arean, 1962). Os mecanismos

envolvidos no dano endotelial, hepático e renal são desconhecidos, mas é possível que sejam imunologicamente mediados.

Curso clínico

Em geral, a infecção por *leptospiras* manifesta-se como uma doença branda, semelhante à gripe (forma anictérica), ou pode ser subclínica e jamais reconhecida. A minoria dos pacientes desenvolve uma forma mais severa, caracterizada por icterícia, que está associada a uma taxa de fatalidade de 5 a 10% (forma ictérica ou doença de Weil). A leptospirose é bifásica, tendo início após um período de incubação de 2 a 20 dias, com aparecimento abrupto de calafrios, febre, dor de cabeça, mialgia, dor nas costas, dor abdominal, anorexia, náusea e vômitos. Durante essa fase – denominada fase bacterêmica – ocorre ampla disseminação da bactéria. A fase bacterêmica dura 4 a 7 dias e é seguida de uma curta remissão, que persiste por vários dias e é sucedida pela fase imunológica, caracterizada pelo aparecimento de anticorpos contra o organismo, meningite, uveíte, erupções cutâneas e dano renal e hepático. O aparecimento de erupções pré-tibiais foi associado à infecção pela sorovariante *autumnalis* (febre de Fort Bragg). Em muitos casos, a fase imunológica é branda e dura apenas 1 a 3 dias. Cerca de metade dos pacientes apresentam sinais clínicos de meningite e pleocitose no LCE durante a segunda semana de doença. No pequeno percentual de pacientes que desenvolvem a doença de Weil, as duas fases convergem para um quadro de febre alta persistente, icterícia e sangramento, que é seguido de insuficiência renal oligúrica, choque e miocardite. A taxa de mortalidade relatada para a doença de Weil é de 5 a 10% (Edwards, 1960; Arean, 1962; Levett, 2001).

Diagnóstico laboratorial

As *leptospiras* podem ser isoladas a partir do LCE, do sangue e dos tecidos no início da fase bacterêmica (nos primeiros 10 dias), bem como a partir da urina durante a fase imunológica (da segunda semana até 30 dias). O cultivo das bactérias requer meio semissólido (meio de Fletcher ou meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris [EMJH]) e incubação no escuro por 4 a 6 semanas, à 25 a 30°C. Amostras de urina devem ser alcalinizadas, a menos que sejam cultivadas imediatamente. As *leptospiras* crescem 1 a 3 cm abaixo da superfície do meio e podem formar um disco de crescimento linear. O material oriundo dessa região deve ser examinado por microscopia de campo escuro semanalmente, para observação das características *leptospiras* giratórias com extremidades em gancho. Os antígenos leptospirais, detectados diretamente em amostras clínicas (p. ex., ELISA, radioimunoensaio, captura imunomagnética) ou em amostras de tecido processadas (p. ex., imunofluorescência, imuno-histoquímica), também têm sido utilizados no diagnóstico da leptospirose com graus de sucesso variáveis.

A maioria dos casos, no entanto, é diagnosticada sorologicamente. Anticorpos aglutinantes aparecem na primeira semana de doença, atingem o pico em 3 a 4 semanas e podem persistir durante vários anos. Os anticorpos são detectados por métodos sorológicos, empregando antígenos bacterianos em testes de aglutinação macro ou microscópica, teste de hemaglutinação ou EIA. O teste de aglutinação microscópica, que emprega antígenos de bactérias vivas, foi estabelecido como método sorológico de referência, porém é utilizado primariamente em pesquisa. Recentemente, um EIA com vareta medidora de nível modificado para detecção de anticorpos *Leptospira*-específicos passou a ser utilizado com sucesso em cenários com instalações laboratoriais mínimas (Gussenhoven, 1997; Yersin, 1999). Métodos moleculares, incluindo técnicas de hibridização e PCR, também têm sido empregados na detecção de DNA leptospiral em pacientes infectados (Vinetz,1996; Levett, 2001).

Tratamento

A leptospirose severa requer administração endovenosa de penicilina G aquosa ou ampicilina. A forma menos severa da doença pode ser tratada com administração oral de ampicilina, amoxicilina ou doxiciclina. A profilaxia com doxiciclina confere proteção a indivíduos sujeitos a um alto grau de exposição ambiental (Farr, 1995). A imunização de animais domésticos de criação e de estimação reduziu o perigo de infecção da população de alto risco (p. ex., veterinários e agricultores) a partir desses animais. Entretanto, o risco não pode ser totalmente eliminado, pois há relatos de infecção de animais imunizados, com transmissão da doença a seres humanos (Feigin, 1973).

Borrelia

O gênero *Borrelia* contém várias espécies patogênicas e não patogênicas originárias de dois clados: o grupo da borreliose de Lyme (também denominado *Borrelia burgdorferi sensu lato* [*sl*]) e o grupo da febre recidivante. O primeiro foi dividido em várias genoespécies por meio de análise molecular, sendo que três delas foram envolvidas em doenças humanas: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*ss*), *Borrelia garinii* e *Borrelia afzelii*. O grupo da febre recidivante contém uma variedade de espécies que podem ser isoladas de carrapatos argasídeos (moles) (p. ex., *Borrelia hermsii* e *Borrelia turicatae*), carrapatos ixodídeos (duros) (p. ex., *Borrelia lonestari e Borrelia miyamotoi*) e piolhos parasitas do corpo humano (*Borrelia recurrentis*). Morfologicamente similares aos treponemas, os membros do gênero *Borrelia* são bactérias helicoidais, com dimensões variáveis de 5 a 30 μm de comprimento por 0,2 a 0,5 μm de largura. São ativamente móveis, possuem 7 a 22 flagelos periplásmicos (filamentos axiais) e se multiplicam por fissão binária. Por outro lado, diferente das espécies de *Treponema*, o *Borrelia* exibe uma ampla variedade de proteínas imunogênicas na superfície da membrana externa, sendo que diversas espécies podem ser cultivadas em/sobre meios artificiais. Além disso, as complexidades do genoma de *Borrelia*, com seu cromossomo linear de 910 kb e 21 plasmídeos circulares, tornam esse gênero consideravelmente mais complexo do que o gênero *Treponema* (Porcella, 2001).

As próximas seções descrevem as duas principais formas de doença clínica da borreliose humana, cada qual transmitida por um vetor. Como tais, essas entidades devem ser frequentemente consideradas – de ambos os pontos de vista, epidemiológico e clínico – junto a outros agentes infecciosos transmitidos pelos mesmos carrapatos-vetores, como os agentes flavivírus da encefalite transmitida por carrapato, diversas bactérias das famílias *Rickettsiaceae*, *Ehrlichiaceae* e *Francisellaceae*, bem como o protista *Babesia microti* – todos transmitidos por carrapatos ixodídeos. Informações relativas a essas e outras doenças transmitidas por vetores são fornecidas em várias seções deste livro.

Doença de Lyme

Sendo a doença transmitida por carrapatos mais comum na América do Norte e na Europa atualmente (Wang, 1999), a doença de Lyme (borreliose de Lyme) foi assim nomeada na década de 1970, após uma epidemia de artrite oligoarticular que envolveu várias comunidades ao leste de Connecticut, EUA. Dessas comunidades, a mais afetada foi a cidade de Old Lyme (Steere, 1977a, 1977b). Uma investigação epidemiológica logo estabeleceu a associação entre a doença de Lyme (então referida como artrite de Lyme) e o carrapato duro *Ixodes scapularis* (antigo *Ixodes dammini*) (Steere, 1978). Em 4 anos, Burgdorfer et al. (1982): (1) haviam isolado organismos de uma nova espécie de espiroquetas a partir de um carrapato ixodídeo coletado em Nova Iorque, EUA; (2) reproduziram as lesões dérmicas primárias características da doença de Lyme em modelos experimentais, utilizando coelhos em que carrapatos se alimentavam; (3) demonstraram a sororreatividade aos antígenos dessa nova espiroqueta, tanto em modelo experimental de coelhos quanto no soro humano de casos convalescentes. As variações "imunológicas" contemporâneas dos postulados de Kock foram, então, satisfeitas (Fredricks, 1996). Os organismos implicados foram subsequentemente reconhecidos como membros do gênero *Borrelia* e denominados *B. burgdorferi* em homenagem a seu descobridor. Em retrospecto, diferentes aspectos da doença inflamatória multissistêmica que agora são comumente conhecidos como doença de Lyme haviam sido reconhecidos e descritos tanto na Europa (Afzelius, 1910; Bannwarth, 1941) quanto nos Estados Unidos (Scrimenti, 1970), antes da epidemia ocorrida em Connecticut. Mesmo assim, o atual corpo de conhecimentos referentes à borreliose de Lyme pode ser atribuído em grande parte ao estabelecimento e identificação de sua etiologia infecciosa suscitados pela epidemia ocorrida em New England, EUA.

Epidemiologia e patogênese

Um total de 11 genoespécies distintas de *Borrelia* oriundas do grupo da borreliose de Lyme foram filogeneticamente caracterizadas, sendo que três delas são patógenos humanos bem estabelecidos. *B. burgdorferi ss* causa doença de Lyme na América do Norte, Europa e Ásia,

enquanto *B. garinii* e *B. afzelii* causam doenças similares, apenas discretamente diferentes, na Europa e Ásia (van Dam, 2002). Embora outras espécies de *Borrelia* tenham sido isoladas de pacientes com doenças ocasionalmente semelhantes à doença de Lyme, seu impacto relativo sobre a carga global da doença permanece indeterminado.

As distribuições geográficas de *B. burgdorferi sl* e a consequente prevalência regional da doença de Lyme resultam de complexos ciclos enzoóticos envolvendo um ou mais carrapatos-vetores do complexo *Ixodes ricinus*, vários animais-reservatório e hospedeiros incidentais. A variabilidade sazonal do início da doença com frequência é paralela ao ciclo de vida e a períodos de caça dos carrapatos ixodídeos (Falco, 1999). Nos Estados Unidos, *B. burgdorferi ss* é endêmico nas regiões nordeste, centro-oeste superior e noroeste, em que a incidência anual da doença de Lyme focalmente excede 100 casos/população de 100.000 indivíduos. O número global de casos relatados, no entanto, é consideravelmente menor na região noroeste do que nos outros dois focos endêmicos (Centers for Disease Control and Prevention, 2004b). A discrepância é parcialmente atribuível aos distintos ciclos enzoóticos dessas regiões. No noroeste, a perpetuação de *B. burgdorferi ss* na natureza envolve a participação de carrapatos *Ixodes spinipaltis*, que não se alimentam no homem e sim no principal reservatório de espiroquetas – o rato da floresta (*woodrat*) de pata escura. Os carrapatos adquirem e transmitem a infecção entre hospedeiros-reservatórios suscetíveis e infectados. Contudo, o carrapato de pata negra ocidental (*Ixodes pacificus*), que se alimenta primariamente em répteis e seres humanos, em certas ocasiões é infectado ao ceder a suas preferências e se alimentar em ratos da floresta. Uma potencial consequência desse evento é a infecção humana. Mesmo assim, dada a pouca frequência desse tipo de concessão por parte de *I. pacificus*, a incidência geral da doença de Lyme permanece bastante baixa na região. Em contraste, o principal vetor nas regiões centro-oeste e nordeste – *I. scapularis* (carrapato de pata negra ou carrapato do veado) – alimenta-se de forma promíscua tanto no homem quanto no principal reservatório de espiroquetas (o camundongo de pata branca). Isso resulta na profícua transmissão para seres humanos e numa incidência extremamente alta da doença, que ultrapassa 1.000 casos/população de 100.000 indivíduos em certas comunidades (Shapiro, 2000; Steere, 2001). Os carrapatos-vetores mais importantes encontrados na Europa e na Ásia são *I. ricinus* (carrapato do carneiro) e *I. persulcatus*, respectivamente, enquanto os principais animais-reservatório de *B. afzelii* e *B. garinii* são pequenos roedores, ratazanas e/ou diversas espécies de aves (Fukunaga, 1995; Wang, 1999; Parola, 2001).

Existem numerosos fatores distintos que contribuem para a dinâmica da transmissão de *B. burgdorferi sl*. Densidades de vetores e taxas de incidência elevadas, abundância e infectividade de hospedeiros-reservatório e maior probabilidade de exposição humana são todos fatores que aumentam o risco de contrair a doença de Lyme (Parola, 2001). Além disso, a amplificação de *Borrelia* em hospedeiros mortos-terminais que não são reservatórios também pode influenciar a incidência regional da doença. Essa situação foi postulada para o caso da região nordeste dos Estados Unidos, na qual elevadas densidades populacionais de veados de cauda branca são associadas a taxas extremamente altas de infecção humana (Steere, 2000). Outra variável de transmissão importante está relacionada à natureza e duração da fixação do vetor durante a alimentação. O ciclo de vida do carrapato duro consiste em três estágios de desenvolvimento, sendo que cada um garante apenas uma única alimentação à base de sangue antes da transição para o próximo estágio (ou oviposição, como no caso do adulto). Como *B. burgdorferi sl* não transmitida verticalmente de forma eficaz em *Ixodes* spp., as larvas adquirem as espiroquetas ao se alimentarem em um hospedeiro infectado (Shapiro, 2000; Scoles, 2001). A forma larval, consequentemente, não atua como vetor direto na infecção humana com frequência (Patterson, 2003). Logo após se alimentar de sangue, a larva muda e se transforma em ninfa. Ambas as formas de ninfa e adulto são capazes de se alimentar e transmitir a infecção ao homem, contudo as ninfas são consideravelmente menores e tendem mais a não serem percebidas enquanto estão fixas ao hospedeiro. Como a transmissão de *Borrelia* a um hospedeiro suscetível parece ser intensificada por períodos de alimentação mais prolongados (Piesman, 1987; Sood, 1997), é quase certo que a ninfa seja o vetor primário da transmissão humana (Falco, 1999; Nadelman, 2001).

Assim como em *T. pallidum*, a sequência genômica de *B. burgdorferi sl* foi totalmente caracterizada (Fraser, 1997) e revelou a existência de certo número de "hiatos" biossintéticos, além de algumas lipoproteínas aparentemente importantes. As últimas englobam um grupo de proteínas de superfície externas (Osp, *outer surface proteins*), A-E, que são codificadas por plasmídeos, expressas diferencialmente nos ambientes de vetores e mamíferos, e altamente imunoestimulantes (de Silva, 1997; Porcella, 2001). Do mesmo modo, a lipoproteína VIsE é dotada de extensiva capacidade de variação antigênica e há pouco também foi detectada em *B. burgdorferi* (Zhang, 1998; Porcella, 2001). A diversidade de sintomas observada na borreliose de Lyme provavelmente se deve aos efeitos diretos da disseminação das espiroquetas, bem como à extensão da resposta imune do hospedeiro (Sigal, 1997; Whooten, 2001). Diversos modelos de borreliose de Lyme experimental foram desenvolvidos, sendo que alguns possuem utilidade na investigação da dinâmica da disseminação de *Borrelia* (p. ex., a localização junto ao coração, à pele e às articulações), além das interações celulares específicas (p. ex., com glicosaminoglicanas e plasminogênio do hospedeiro) (Steere, 2000; Sigal, 1997). O modelo murino é particularmente valioso para revelar os detalhes das respostas imunológicas associadas à doença de Lyme (Whooten, 2001). A escassez de organismos cultiváveis ou de material genômico junto às lesões de longa duração e a resistência da doença ao tratamento (como na artrite de Lyme), contudo, sugerem um mecanismo patogênico diferente da lesão direta por espiroquetas. Foram postulados eventos autoimunes, uma vez que foi estabelecida a existência de uma associação entre a artrite de Lyme e o HLA-DR4. Além disso, essa hipótese foi substanciada pelo relato recente de um possível autoantígeno candidato – o antígeno de função leucocitária-1 (Gross, 1998; Steere, 2004).

Manifestações clínicas

Analogamente à sífilis, a progressão clínica da borreliose de Lyme foi dividida em três estágios gerais: (1) uma fase inicial localizada, em que há desenvolvimento de uma lesão primária nas adjacências do sítio de inoculação; (2) uma fase inicial disseminada, quando as espiroquetas se espalham ao nível sistêmico e produzem uma variedade de manifestações cardíacas, neurológicas e/ou dermatológicas; (3) uma fase tardia, que pode ser anunciada por outro fenômeno neurológico e/ou dermatológico, além da doença reumática. Mesmo assim, como há sobreposição de sintomas durante as fases inicial disseminada e tardia da infecção persistente, alguns investigadores se abstêm de adotar esse sistema de estadiamento e, em vez disso, preferem apenas incorporar a duração da doença às considerações diagnósticas e terapêuticas (Kaiser, 1998; Nadelman, 1998). Também foi relatado que a soroconversão assintomática ou a doença subclínica afetam até 7% dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas (Steere, 2003). Dada a diversidade dos sintomas, a borreliose de Lyme, tal como a sífilis, foi apropriadamente rotulada como "a grande imitadora".

O estágio mais precoce inicia-se a grosso modo 1 semana após a mordida de um carrapato infectado, quando a maioria dos pacientes apresenta desenvolvimento de erupções cutâneas típicas, descritivamente denominadas eritema migratório, próximo ao sítio de inoculação (a exata proporção de pacientes com eritema migratório depende da definição do caso ou dos critérios de inclusão do estudo). A lesão começa como uma mácula ou pápula avermelhada e indolor, que subsequentemente se expande e se transforma em uma placa eritematosa medindo até 70 cm (Nadelman, 1996). O eritema migratório em geral é indolor e às vezes apresenta uma área central pálida (que lhe confere aparência de "alvo" ou "centro de mira"), podendo ser acompanhado de sintomas inespecíficos como febre, fadiga, dor de cabeça e mialgia, bem como linfadenopatia regional (Nadelman, 1996; Smith, 2002). A análise histológica revela a existência de uma dermatite perivascular superficial, constituída de linfócitos, macrófagos e plasmócitos abundantes, sendo que às vezes é possível visualizar os organismos em cortes teciduais preparados pelas técnicas de impregnação com prata ou imuno-histoquímica (Duray, 1997). Diferente das lesões sifilíticas, a vasculite não constitui um achado histológico típico de eritema migratório.

A disseminação de *Borrelia* prenuncia o segundo estágio da doença clínica, em que muitos sistemas orgânicos podem ser afetados. O aparecimento de lesões secundárias menores de eritema migratório em múltiplos sítios representa um dos sinais mais comuns da disse-

minação inicial (Shapiro, 2000). Nos Estados Unidos, as manifestações neurológicas (neuroborreliose) afetam até 15% dos pacientes, que apresentam sintomas de paralisia do nervo craniano (em geral, envolvendo o nervo facial), meningite linfocítica e uma variedade de neuropatias periféricas (p. ex., radiculite dolorosa) (Steere, 2001; Halperin, 2002). Essas manifestações são referidas como "síndrome de Bannwarth" em alguns países europeus (Kaiser, 1998). Um tanto mais raro, o envolvimento cardíaco em forma de bloqueio atrioventricular temporário ou miocardite também foi relatado em cerca de 5% dos pacientes com doença de Lyme (Steere, 2001). Outros sítios potencialmente afetados incluem o sistema musculoesquelético (p. ex., fadiga, mal-estar), fígado (p. ex., hepatite suave e temporária) e olhos (p. ex., conjuntivite, neurorretinite) (Lesser, 1995; Steere, 2000).

Nos Estados Unidos, a artrite é a manifestação mais comum da doença de Lyme não tratada em estágio tardio. Essa artrite é bem desenvolvida em mais da metade dos pacientes não tratados (Steere, 2000). Tipicamente mono ou oligoarticular em extensão, com frequência afeta articulações grandes (p. ex., joelho) (Steere, 1977a, 2001). Os sintomas de dor e inchaço surgem de forma aguda decorridas várias semanas ou meses da inoculação das espiroquetas e podem durar alguns dias ou meses (em média 1 semana) (Steere, 1977b). Talvez como resultado de autoimunidade ou infecção persistente, muitos pacientes continuam a apresentar recidivas de artrite migratória intermitente seguidas de períodos prolongados sem doença (Nadelman, 1998). Ao contrário, as manifestações associadas ao estágio tardio da borreliose de Lyme persistente, em pacientes europeus, com frequência envolvem órgãos neurológicos ou cutâneos. No primeiro caso, pode haver sobreposição clínica com a neuroborreliose disseminada, sendo que as manifestações incluem meningite linfocítica crônica e neuropatias periféricas (p. ex., polineurite sensorial, paresias etc.). Além disso, foram observadas manifestações do SNC, como mielite e distúrbios de marcha espásticos-atáxicos, bem como disfunção cognitiva de curta duração (Kaiser, 1998; Halperin, 2002). Na Europa, um fenômeno dermatológico crônico conhecido como acrodermatite atrófica crônica também foi associado à borreliose de Lyme em fase tardia. Conforme indica o nome, as lesões aparecem nas mãos e nos punhos, cotovelos e pés. Essas lesões por vezes são simétricas e se caracterizam histologicamente por infiltrações linfomononucleares e (em menor grau) granulocíticas, acompanhadas de um progressivo adelgaçamento epidérmico, hiperceratose e atrofia dérmica (Aberer, 1991; Duray, 1997). Outras manifestações dermatológicas de longa duração, bem estabelecidas ou controversas, são linfocitoma por *Borrelia*, linfoma de células B cutâneo, morfeia e líquen escleroso e atrófico (Duray, 1997; McGinley-Smith, 2003).

As variações das manifestações clínicas, em particular durante o estágio tardio da doença de Lyme, foram parcialmente atribuídas a traços inerentes aos próprios organismos, sejam específicos da genoespécie ou da cepa. *B. afzelii* (antigo grupo VS461), por exemplo, foi desproporcionalmente isolada a partir de lesões de eritema migratório e acrodermatite crônica atrófica na Europa, em comparação a outras genoespécies de *Borrelia* (van Dam, 1993; Balmelli, 1995; Wang, 1999). Em contraste, *B. garinii* está envolvido mais frequentemente em casos de neuroborreliose na Europa (Balmelli, 1995; Wang, 1999). Além disso, um estudo recente conduzido nos Estados Unidos demonstrou que subtipos moleculares particulares de *B. burgdorferi ss* podem estar associados a propriedades invasivas, que na maioria das vezes levam à espiroquetemia (Wormser, 1999). Algumas observações adicionais corroboram a noção de que certas cepas de *Borrelia* podem causar doenças clínicas distintivas: (1) respostas sorológicas entre pacientes com sintomas clínicos particulares podem ser preferencialmente dirigidas a antígenos de fontes específicas de *Borrelia*; (2) algumas genospécies parecem apresentar diferentes propriedades *in vitro* (Dressler, 1994; Norman, 1996; Wang, 1999).

Na vasta maioria dos pacientes, as manifestações clínicas da doença de Lyme respondem à terapia antibiótica apropriada (Shadick, 1999; Seltzer, 2000; Wormser, 2000). Mesmo assim, um pequeno subgrupo continua apresentando sintomas subjetivos persistentes, como dor musculoesquelética, fadiga, déficits neurocognitivos etc., apesar do tratamento – uma condição que tem sido varialvemente denominada "síndrome pós-doença de Lyme", "doença de Lyme crônica" ou "borreliose resistente ao tratamento" (Klempner, 2002). Até o momento, estudos prospectivos demonstraram que a terapia antibiótica, quando comparada ao placebo, produz poucos benefícios em termos de redução dos sintomas dessa síndrome, enquanto o isolamento de *Borrelia* ou a amplificação de seus genes continua sendo quase que de maneira uniforme malsucedida (Klempner, 2002). Ademais, estudos de caso controlados retrospectivos ilustram o fato de que a frequência de sinais objetivos entre pacientes com "doença de Lyme crônica" é similar ao observado em controles compatíveis sem história de doença de Lyme (Shadick, 1999; Seltzer, 2000). Assim como em relação aos diagnósticos similarmente obscuros de fibromialgia e síndrome da fadiga crônica com os quais foi comparada (Steere, 2002), ainda há muito o que aprender sobre a patogênese, o diagnóstico e a supervisão da "doença de Lyme crônica".

Nos últimos anos, foram publicados diversos relatos documentando o aparecimento de lesões similares às do eritema migratório em pacientes que viviam na região sul dos Estados Unidos. Ocasionalmente referidas como doenças de erupções cutâneas associadas ao carrapato do Sul (STARI, *southern tick-associated rash illness*), as lesões são precedidas pela mordida do carrapato estrela solitária (*Amblyomma americanum*) e, até o presente, ainda não forneceram nenhum isolado de *B. burgdorferi ss* (Kirkland, 1997; James, 2001). Em vez disso, tentou-se implicar um novo agente – *B. lonestari* sp. nov. – pertencente ao grupo da febre recidivante (Varela, 2004). Como *B. burgdorferi ss* ocorre naturalmente nessa área geográfica (Oliver, 2003), futuros trabalhos epidemiológicos deverão determinar os detalhes e a extensão da doença causada por cada um desses organismos nessa região.

Diagnóstico laboratorial

Criada para fins de vigilância, a mais nova definição de caso do CDC para a doença de Lyme enfatiza os achados clínicos e o exame físico – o desenvolvimento de eritema migratório diagnosticado pelo médico em um paciente possivelmente exposto a carrapatos é considerado diagnóstico (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). A confirmação laboratorial torna-se necessária apenas diante de sinais objetivos e menos específicos do que aqueles esperados para as fases posteriores do curso da doença (p. ex., artrite, neurite craniana, defeitos de condução cardíaca etc.). Outros especialistas defendem que os testes laboratoriais – em particular as metodologias indiretas, como os testes sorológicos – não devem ser realizados como modalidades diagnósticas autônomas, devendo ser utilizados como ferramentas auxiliares para confirmação ou exclusão de suspeitas clínicas (Luger, 1990; Tugwell, 1997; Brown, 1999). Relatos que destacam os conceitos de probabilidade pré-teste baseados em fatores epidemiológicos e clínicos, bem como de taxas de probabilidade e valores preditivos de testes, demonstram perfeitamente a futilidade e o custo elevado desse tipo de abordagem autônoma (Seltzer, 1996; Tugwell, 1997; Nichol, 1998). De fato, o teste de detecção da doença de Lyme destinado a pacientes que apresentam apenas sintomas inespecíficos, como fadiga, dor de cabeça ou mialgia (i. e., quando a probabilidade pré-teste é igual a 0,2), mesmo em áreas endêmicas e com a utilização de ensaios laboratoriais acurados, podem gerar mais resultados falso-positivos do que falso-negativos (Tugwell, 1997). Exacerbada pela ansiedade disseminada entre o público e por uma compreensão geral equivocada da parte de muitos profissionais da saúde, a atual confusão diagnóstica em torno da borreliose de Lyme talvez possa ser melhor abordada por meio de um olhar mais atento para as indicações e limitações dos testes laboratoriais.

Cultura

A cultura costuma ser o "padrão-ouro" dos testes diagnósticos para doenças infecciosas, cujo agente causativo também não coloniza o corpo humano. Contudo, embora o cultivo de *Borrelia* spp. seja prontamente viável e não tão demorado quanto o de outros microrganismos patogênicos (Reed, 2002), a maioria dos laboratórios diagnósticos clínicos e comerciais não oferece essa alternativa de teste. Foi demonstrado que várias modificações do meio Barber-Stoenner-Kelly à base de caldo não só sustentam o crescimento de *Borrelia* spp. como também são úteis para recuperá-las a partir de tecidos de biópsia oriundos das lesões de eritema migratório, bem como de volumosas coleções de plasma durante a fase inicial aguda da doença (Nadelman, 1996; Steere, 1998; Wormser, 2001). Dada a especificidade do isolamento do organismo e a ausência de anticorpos mensuráveis na maioria dos pacientes infectados por *B. burgdorferi sl* durante a fase inicial da doen-

ça clínica, a cultura parece ser uma modalidade diagnóstica bastante prática. Entretanto, a confiabilidade da microscopia de campo escuro ou dos anticorpos fluorescentes para detecção e identificação de culturas positivas, o custo elevado dos meios e reagentes, as amplas faixas de sensibilidade descritas (sem dúvida resultantes da variabilidade da quantidade de tecido/sangue cultivados, bem como do tempo de coleta das amostras) e a necessidade de submeter o paciente a procedimentos invasivos (p. ex., biópsia tecidual) talvez sejam todos fatores que contribuem para a falta de popularidade geral desse teste fora da área de pesquisa. De modo significativo, a recuperação de *Borrelia* a partir do LCE, líquido sinovial ou outras amostras coletadas além da fase inicial da doença é tão frequentemente mal-sucedida quanto de pouca utilidade diagnóstica. Por esse motivo, testes adicionais para detecção de borreliose de Lyme constituem adjuntos importantes.

Testes sorológicos

A detecção de produção de anticorpos *Borrelia*-específicos durante a doença de Lyme pode ser feita por meio da utilização de uma variedade de metodologias que expressam resultados em termos de imunoglobulinas (Ig) totais ou IgG ou IgM classe-específicas. Os ensaios de anticorpos fluorescentes (IFA), que tipicamente utilizam antígenos em forma de *B. burgdorferi ss* integral fixada em lâminas de vidro, foram populares na década de 1980. Contudo, esses testes foram substituídos em grande parte pelo ELISA mais automatizado e menos subjetivo. Esse ensaio emprega antígenos produzidos por recombinação ou derivados de extratos parcialmente purificados de organismos de *Borrelia*.

Como ocorre com todas as respostas sorológicas a etiologias infecciosas, uma multitude de variáveis potencialmente afeta o desempenho dos ensaios desenvolvidos para detectá-las. Resultados falso-negativos e falso-positivos podem consequentemente servir apenas para confundir as impressões clínicas. No início do curso da doença de Lyme, a ausência de anticorpos (ou níveis abaixo do limite de detecção) pode gerar resultados sorológicos falso-negativos. Talvez possa parecer que essa questão poderia ser parcialmente contornado por ensaios de detecção específica de IgM, pois a produção de IgM precede o desenvolvimento de uma resposta à base de IgG (Shapiro, 2000; Reed, 2002). Mesmo assim, as sensibilidades relatadas dos ELISAs para detecção de IgM e IgG durante a fase aguda da doença foram significativamente baixas, ainda que variáveis. Com o tempo, à medida que a doença progride e os pacientes sofrem soroconversão, a sensibilidade do teste aumenta (Engstrom, 1995; Brown, 1999; Liang, 1999). As especificidades do IFA e do ELISA também podem ser adversamente afetadas pela presença de anticorpos com reatividade cruzada dirigidos a uma variedade de microrganismos e proteínas derivadas do hospedeiro. Alguns desses organismos incluem espiroquetas patogênicas (p. ex., integrantes do grupo de febre recidivante de *Borrelia* e treponemas), outras bactérias (p. ex., *Helicobacter pylori*) e vírus (p. ex., Epstein-Barr), bem como antígenos antinucleares encontrados em distúrbios autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (Brown, 1999; Reed, 2002). A imunização prévia com a subunidade OspA da vacina contra a doença de Lyme também pode acarretar resultados falso-positivos de ELISA e IFA, uma vez que essa lipoproteína é tipicamente um componente antigênico integral desses testes (Steere, 1998).

Fatores adicionais que também contribuem para as limitações do teste são a composição do antígeno contido no ensaio em particular (que até o presente é mal padronizado), o nível de controle de qualidade junto ao estabelecimento onde o teste é realizado, os níveis interpretativos em que são estabelecidos os valores positivos e negativos (e indeterminados) de densidade óptica ou índices, a cepa bacteriana particular responsável pela infecção, a resposta imune individual do paciente e/ou o método de comparação adotado (i. e., se o paciente de fato está com doença de Lyme).

Em uma tentativa de aumentar a acurácia do teste sorológico como um todo, o CDC propôs o uso de um algoritmo de duas camadas em que todos os resultados positivos e indeterminados obtidos por ELISA ou IFA são subsequentemente testados por meio de outra metodologia – o *Western blot* (Centers for Disease Control and Prevention, 1995). Nesse ensaio, proteínas extraídas de *B. burgdorferi ss* de baixa passagem são quantitativamente padronizadas e, então, separadas por eletroforese de acordo com o tamanho e a carga. Após a transferência para um substrato de membrana, os soros controle e teste (além de uma painel de anticorpos monoclonais para referência e calibração) são incubados com proteínas de *Borrelia*. As imunoglobulinas inespecíficas são removidas por lavagem, enquanto os anticorpos específicos para *Borrelia* se ligam e são subsequentemente detectados com auxílio de um conjugado ligado à enzima. Essa técnica tem a capacidade de detectar e analisar anticorpos contra proteínas particulares. A interpretação dos resultados é algo subjetivo e os critérios que definem a positividade apresentam certo grau de variação. As recomendações do CDC são: positividade do blot de IgM quando duas das seguintes bandas estiverem presentes: 24 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) e 41 kDa (flagelina); positividade do *blot* de IgG se cinco das seguintes bandas estiverem presentes: 18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (flagelina), 45 kDa, 58 kDa, 66 kDa e 93 kDa (Centers for Disease Control and Prevention, 1995). Na teoria, essa abordagem fornece um teste de primeira rodada altamente sensível que deve detectar a maioria dos casos de doença de Lyme, seguido de um ensaio de alta especificidade, que deve excluir resultados falso-positivos da rodada anterior (Dressler, 1993; Ledue, 1996). Contudo, na realidade, o alto grau de variabilidade inter e intralaboratorial e a sensibilidade inferior à ideal apresentadas nos estudos de ELISA e IFA, além das amplas faixas de desempenho relatadas para o *Western blot*, sugerem que esse pode não ser o caso (Engstrom, 1995; Aguero-Rosenfeld, 1996; Ledue, 1996; Bakken, 1997). Não obstante, foi relatado que o uso do algoritmo melhorou o desempenho geral do teste, mais uma vez com a ressalva de que o *imunoblot* também pode ser significativamente influenciado pelo estágio da doença em que o teste é realizado (Engstrom, 1995; Johnson, 1996). Um discreto desvio em relação a esse algoritmo – o uso do teste de *Western blot* apenas para soros com resultados indeterminados na primeira rodada – foi defendido pelo American College of Physicians (1997), podendo ser um pouco mais sensível do que a recomendação do CDC para detecção de pacientes com doença de Lyme (identificados pela definição de casos de vigilância) em áreas endêmicas (Trevejo, 1999). Do mesmo modo, formatos mais modernos de ELISA, com a utilização de antígenos recombinantes, podem finalmente servir para aumentar a acurácia ainda mais (Gomes-Solecki, 2000; Bacon, 2003).

Picos de títulos de anticorpo em geral atingem o platô entre 7 e 30 dias após o desenvolvimento de eritema migratório, com o grau de reatividade (i. e., número de bandas no *Western blot* ou leitura de densidade óptica ao ELISA) por vezes sendo maior em pacientes com disseminação precoce (Aguero-Rosenfeld, 1996). Após 30 dias, a maioria dos pacientes com doença de Lyme terá desenvolvido uma resposta de IgG, sendo que eles não devem ser testados apenas com ensaios para detecção de IgM (Centers for Disease Control and Prevention, 1995). Diversos relatos sugerem que a intervenção terapêutica no início do curso da doença pode eliminar a resposta de anticorpos e levar à doença de Lyme "soronegativa" (Aguero-Rosenfeld, 1996; Ledue, 1996; Dattwyler, 1988). Embora um estudo retrospectivo europeu tenha demonstrado que o tratamento não produziu efeitos estatisticamente significativos sobre a sororreatividade final, os autores observaram a existência de uma tendência à incidência de uma soropositividade e títulos mais altos entre os pacientes que não foram tratados com antibióticos (Plorer, 1993). Por fim, como IgG e IgM podem ser detectadas durante muitos anos após a erradicação bem-sucedida das espiroquetas, parece não haver nenhuma utilidade em monitorar os níveis de anticorpos durante a fase de convalescência, para determinação da atividade da doença e resposta à terapia ou para avaliar a positividade de IgM como forma de estabelecer o momento da infecção (Hilton, 1997; Kalish, 2001).

Certo número de técnicas imunológicas de base laboratorial foram avaliadas quanto ao potencial uso no diagnóstico da doença de Lyme. Vários relatos indicaram que anticorpos *Borrelia*-específicos detectados por IFA, ELISA e/ou *Western blot* em amostras de LCE e líquido sinovial podem ser úteis para confirmação de casos de neuroborreliose e artrite de Lyme, respectivamente, em particular se comparados aos níveis séricos (Cruz, 1991; Hansen, 1991). No entanto, até 1999 nenhum kit comercial foi liberado para esse tipo de uso pelo US-FDA (Brown, 1999). Outra metodologia que se mostrou promissora na identificação de casos de doença de Lyme "soronegativos" – o ensaio de proliferação de células T – provavelmente era complexo e insensível demais para se tornar amplamente interessante aos laboratórios

diagnósticos (Dressler, 1991). Uma estratégia recentemente desenvolvida – utilizando precipitação e dissociação de IgM *Borrelia*-específica de imunocomplexos circulantes antes da captura em fase sólida e quantificação – mostrou-se promissora (Brunner, 2001). Por fim, foi descrito um ensaio de captura de antígenos presentes em amostras de LCE ou urina (Coyle, 1995; Klempner, 2001), todavia esse teste atualmente não é recomendado para fins diagnósticos antes que sejam realizados mais estudos de validação (Tugwell, 1997).

Testes moleculares

Há uma intensa busca por metodologias de teste alternativas para borreliose de Lyme, dada a baixa sensibilidade dos ensaios de cultura e sorológicos. No início dos anos 1990, pesquisadores lançaram suas hipóteses acerca das técnicas de amplificação genômica, que eram relativamente modernas para o arsenal disponível naquela época. Desde então, várias modificações da técnica de PCR, empregando diversos alvos genéticos e métodos de detecção de *amplicon*, foram aplicadas a uma variedade de tipos de amostra na procura por ácidos nucleicos de *Borrelia*.

As amostras a partir das quais não foi possível isolar *B. burgdorferi* prontamente constituíram o foco primário das investigações iniciais sobre a utilidade da PCR. Estudos envolvendo análise por PCR de amostras de aspirado articular provenientes de pacientes com artrite de Lyme apresentaram excelentes taxas de sensibilidade e especificidade quando vários conjuntos de iniciadores foram utilizados (Nocton, 1994; Dumler, 2001). Depois que os resultados foram comparados com informações clínicas, tornou-se evidente que (1) a detecção dos ácidos nucleicos de *Borrelia* estava mais frequentemente associada a uma história de terapia antimicrobiana inadequada ou ausente e (2) a positividade da PCR desaparecia após a instituição do tratamento adequado (Nocton, 1994). Novas investigações sobre a discrepância de desempenho dos conjuntos de iniciadores para DNA genômico (p. ex., genes de rRNA) *vs* DNA derivado de plasmídeo (p. ex., *OspA* e *OspB*) revelaram que esse último está presente em maior quantidade junto aos espaços articulares na artrite de Lyme (Persing, 1994). O fenômeno, denominado "desequilíbrio alvo", parece ser único ao *milieu* de espiroquetas inflamatório do líquido sinovial na artrite de Lyme e provavelmente contribui para a maior sensibilidade observada nos testes que têm o gene *OspA* como alvo (Lebech, 2002). Em contraste, estudos de amplificação utilizando amostras de LCE de pacientes com neuroborreliose aguda ou crônica apresentaram apenas uma moderada melhora da sensibilidade em relação à cultura (Nocton, 1996; Dumler, 2001). Sendo em parte o resultado dos critérios de inclusão adotados pelo estudo, também é provável que as faixas extremamente amplas de sensibilidade relatadas se devam aos números muito baixos de cópias genômicas de *Borrelia* (i. e., níveis próximos aos limites inferiores de detecção) no LCE de pacientes afetados (Schmidt, 1997). Como regra geral, amplificações bem-sucedidas são mais frequentes durante os estágios iniciais da doença neurológica (Lebech, 2002).

O PCR, do mesmo modo, tem sido aplicado a amostras coletadas durante os estágios primário e inicial disseminado da borreliose de Lyme. A detecção de ácidos nucleicos em amostras de tecido oriundas das lesões de eritema migratório tem sido realizada com sucesso. Esse tipo de abordagem pode resultar em melhora tanto da sensibilidade como do tempo de resposta relativamente às culturas (Dumler, 2001). Tentativas de testar amostras de sangue e plasma foram igualmente realizadas, contudo as análises foram limitadas pela presença frequente da substâncias inibitórias, bem como pelo momento de coleta das amostras (Schmidt, 1997). Os relatos iniciais referentes ao teste de urina por PCR foram encorajadores, contudo não foi possível reproduzi-los de modo consistente (Brettschneider, 1998; Lebech, 2002). Além disso, a detecção de material genético de *Borrelia* extraído diretamente de carrapatos-vetores ixodídeos pode ser útil do ponto de vista epidemiológico, porém não servem de base para o diagnóstico nem supervisão dos pacientes que forneceram os carrapatos (Sood, 1997; Dumler, 2001).

Com o tempo, os avanços tecnológicos e o desenvolvimento do conhecimento continuarão sendo úteis para novos e criativos usos da PCR, além do simples diagnóstico. Exemplificando, essa técnica tem sido prontamente utilizada aliada ao polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) e sequenciamento de DNA para subclassificação de isolados de *Borrelia* para fins taxonômicos (Wang, 1999). O uso de sondas de hibridização interna marcadas junto ao vaso reativo resultou na capacidade de detectar e quantificar produtos de amplificação em tempo real. Embora ainda não sejam tipicamente executados nos laboratórios diagnósticos, esses ensaios quantitativos forneceram indícios sobre a dinâmica da transmissão e da patogênese de *Borrelia* (Pahl, 1999; Wang, 2002). Em contraste com os casos de infecção pelo HIV ou vírus da hepatite C, o monitoramento das respostas terapêuticas por PCR não está firmemente estabelecido como sendo benéfico para o diagnóstico da doença de Lyme (Schmidt, 1997). Entretanto, as relações existentes entre o material genético de *Borrelia* presente nas articulações afetadas pela artrite de Lyme, a terapia antibiótica e o resultado sintomático sugerem que esse benefício pode ser futuro (Nocton, 1994; Steere, 2004).

Como ocorre com a maioria das técnicas de amplificação, o uso da PCR no diagnóstico da doença de Lyme é limitado por muitos fatores, como inibidores de polimerase, baixos níveis de alvo, potencial de contaminação, iniciadores escolhidos e método de detecção do *amplicon*. Seja qual for a aplicação, a sensibilidade e especificidade dos testes moleculares são imperfeitas. Do mesmo modo, resultados negativos isolados jamais devem ser utilizados para excluir um diagnóstico, enquanto resultados positivos fora de contexto não devem servir para confirmar um diagnóstico. Interpretações errôneas como essas podem ter consequências lamentáveis caso não sejam solucionadas com rapidez (Patel, 2000; Molloy, 2001). Significativamente, como a maioria dos pacientes com manifestações tardias da doença de Lyme apresentarão evidências de soronegatividade no momento da manifestação (correspondendo, assim, à definição de caso do CDC), é provável que os estudos de PCR tenham maior utilidade no início da doença, antes da produção da resposta sorológica. De importância fundamental é a correlação dos dados laboratoriais com a impressão clínica, independentemente de esses dados serem derivados de métodos sorológicos ou moleculares.

Tratamento e prevenção

A Infectious Disease Society of America (IDSA) publicou recentemente um conjunto de diretrizes para a supervisão de pacientes com suspeita ou borreliose de Lyme comprovada (Wormser, 2000). Em resumo, um corpo significativo de evidências em forma de estudos randômicos, prospectivos e duplo-cegos demonstrou de maneira consistente que um curso de 2 a 3 semanas de doxiciclina ou ampicilina oral é altamente eficaz no tratamento da doença de Lyme inicial e sem complicações. A cefuroxime é igualmente efetiva, porém não é recomendada para a terapia de primeira linha em virtude do custo elevado. Para pacientes incapazes de tolerar qualquer um desses regimes ou, nos casos em que tais regimes são contraindicados, a terapia com macrolídeo pode ser uma alternativa aceitável. Cursos de tratamento estendidos desse regime oral padrão também são considerados efetivos para a maioria dos pacientes com artrite de Lyme, na ausência de manifestações neurológicas. Todavia, a terapia parenteral com ceftriaxona (ou penicilina) pode ser adotada para casos de recidiva da artrite. Esse mesmo regime endovenoso também é recomendado para pacientes com bloqueio cardíaco de terceiro grau e/ou neuroborreliose. Notavelmente, a maioria das triagens terapêuticas prospectivas (nas quais se baseiam as recomendações da IDSA) apresenta pontos finais bem definidos em termos de respostas clínicas (i. e., desaparecimento dos sintomas), em vez da erradicação da *Borrelia*.

Um aspecto mais arduamente contestado diz respeito ao uso da terapia antibiótica profilática após o reconhecimento e a remoção de um carrapato que esteja se alimentando no paciente. Estudos prospectivos recentes empregando regimes orais de 10 dias de profilaxia antimicrobiana falharam em estabelecer qualquer benefício em relação ao placebo (Warshafsky, 1996). Alguns fatores que tornam essa questão ainda mais confusa são: (1) a taxa de sucesso extremamente baixa da transmissão de *Borrelia* para seres humanos (1 a 3%), mesmo em áreas hiperendêmicas, onde as taxas de infecção de carrapatos podem ultrapassar 50% (Shapiro, 1992; Nadelman, 2001); (2) a frequência com que as mordidas de carrapato passam desapercebidas entre os pacientes com doença de Lyme (até 75% dos pacientes) (Nadelman, 1996); (3) a inacurácia da identificação das espécies de carrapato e das estimativas do tempo de alimentação realizadas por não entomólogos (Falco, 1998); (4) os potenciais custos do uso disseminado de antibióticos (p. ex., aspectos financeiros, efeitos colaterais imprevistos, resis-

tência bacteriana). Uma investigação mais recente demonstrou que uma única dose de 200 mg de doxiciclina administrada após a remoção de um carrapato *I. scapularis* promoveu redução significativa da incidência de desenvolvimento subsequente de eritema migratório (Nadelman, 2001). Mais uma vez, as interpretações do estudo foram diversas (Bellovin, 2001; Leenders, 2001; Shapiro, 2001).

As estratégias de prevenção à doença de Lyme primária que geralmente são aceitas incluem intervenções que diminuem a probabilidade e a duração da fixação e da alimentação do vetor. O uso de repelentes de insetos, acaricidas e barreiras de roupas, como calça comprida e blusas de mangas longas, bem como "catar carrapatos" diariamente, são medidas que possuem cada qual um valor teórico, quando não comprovado, na redução do número de casos humanos de doenças transmitidas por carrapatos ixodídeos (Poland, 2001; Haves, 2003). A estratégia preventiva mais amplamente aceita e integralmente testada – a vacinação humana – deixou de ser comercializada (Hitt, 2002). Foi demonstrado que essa vacina de subunidades contendo um antígeno recombinante OspA transformado em lipídeo reduz significativamente a incidência da borreliose de Lyme após um esquema de imunização de três etapas (Steere, 1998). Por causa do fracasso de vendas e, talvez, de um temor infundado de complicações, o produto foi retirado do mercado em 2002.

Febre recidivante

A febre recidivante pode ser dividida em duas entidades distintas com base em aspectos microbiológicos e epidemiológicos. A febre recidivante transmitida pelo piolho (FRTP) epidêmica ocorre no mundo inteiro, refletindo a distribuição ubíqua de seu vetor, *Pediculus humanus* (Johnson, 2000). Enquanto a doença foi amplamente erradicada na maioria dos países desenvolvidos, certo número de ocorrências persistem em localidades do leste da África e na América do Sul (Sundnes, 1993; Raoult, 1999). Seres humanos constituem o único reservatório conhecido do agente causador da doença, *B. recurrentis*. A transmissão bem-sucedida, portanto, dispensa a alimentação do vetor em indivíduos infectados. Em vez disso, quando um piolho infectado é esmagado, hospedeiros suscetíveis são expostos e infectados via hemolinfa contaminada (Johnson, 2000).

A febre recidivante transmitida pelo carrapato (FRTC) endêmica possui uma distribuição geográfica discretamente menor, que ocorre em paralelo à distribuição de seus vetores de transmissão primária – os carrapatos argasídeos do gênero *Ornithodoros*. As áreas da América do Norte em que a doença é endêmica são a região noroeste do Pacífico, regiões norte e central das Montanhas Rochosas e partes da cordilheira californiana de Sierra, EUA (hábitat de *Ornithodoros hermsi*), bem como as áridas regiões planas do México, Texas e Novo México (hábitats de *Ornithodoros turicata*) (Dworkin, 2002). Também há registros bem documentados da doença em partes da África e Europa (Parola, 2001). No passado, *Borrelia* spp. causadoras de FRTC eram consideradas altamente específicas do carrapato-vetor, sendo denominadas em homenagem às espécies de *Ornithodoros* a partir das quais foram isoladas (Davis, 1942). Assim, *B. hermsii* e *B. turicatae* estão associadas a *O. hermsi* e *O. turicata*, respectivamente. Entretanto, esse conceito foi posto à prova por relatos recentes que demonstraram a presença de ácidos nucleicos de *Borrelia* do grupo da febre recidivante em diversas espécies de carrapatos *Ixodes*, muitas das quais capturadas em regiões endêmicas da doença de Lyme (Fukungaga, 1995; Scoles, 2001; Fraenkel, 2002). Além disso, como (1) é altamente provável haver reatividade sorológica cruzada entre organismos pertencentes aos dois clados de borreliose (Schwan, 1996) e (2) por ter sido demonstrado que espiroquetas análogas aos organismos causadores da febre recidivante produzem a doença em locais antes considerados não endêmicos para FRTC (Breitschwerdt, 1994), as implicações clínicas e diagnósticas desses relatos sem dúvida estimularão novas pesquisas sobre os agentes da febre recidivante.

A dinâmica da transmissão e, portanto, os fatores epidemiológicos associados à FRTC são consideravelmente diferentes daqueles associados à doença de Lyme. Os carrapatos argasídeos possuem hábitos alimentares noturnos e passam bem menos tempo se alimentando do que os carrapatos ixodídeos (Parola, 2001). Todavia, como abrigam *Borrelia* em suas secreções salivares, os carrapatos moles conseguem inocular as espiroquetas em questão de minutos, enquanto se alimentam (Dworkin, 2002). Embora os carrapatos *Ornithodoros* possam transmitir *Borrelia* verticalmente (transmissão transovariana) e manter a bactéria na natureza por períodos prolongados, vários hospedeiros mamíferos também contribuem para a persistência das espiroquetas (Dworkin, 2002). Os casos humanos são frequentes em pequenas aglomerações, após a exposição dos indivíduos ao vetor, ao dormirem em cabanas rústicas, habitações rurais raramente ocupadas (*O. hermsi*) ou cavernas (*O. turicata*) (Rawlings, 1995; Dworkin, 1998).

Os aspectos clínicos da FRTP e da FRTC são semelhantes. Após um período aproximado de 7 dias de incubação, os pacientes infectados apresentam febre alta (38,9 a 40°C) de início agudo acompanhada de sintomas inespecíficos, como dor de cabeça, mal-estar, artralgia e fadiga (Southern, 1969; Dworkin, 1998). Manifestações hemorrágicas mínimas são comuns e podem estar relacionadas a uma trombocitopenia temporária. Uma hepatoesplenomegalia é identificada mais frequentemente em pacientes com FRTP (Southern, 1969). O envolvimento neurológico – que se manifesta como meningite, paralisia do sétimo nervo, mielite e encefalite – tem sido relatado em todos os casos (Cadavid, 1998). Quase tão repentinamente como surgem, os sintomas desaparecem após 3 a 6 dias na maioria dos pacientes e voltam somente após 1 semana (Johnson, 2000). Episódios similares de recorrência sintomática podem se repetir por até 13 vezes, contudo tipicamente se resolvem após 2 a 3 episódios de recaída (Southern, 1969). Considera-se que essas ondas de recrudescência se devem à extraordinária habilidade do organismo de variar sua constituição antigênica de proteínas de superfície sob pressão imunológica seletiva e, assim, expandir e contrair numericamente sua população, à medida que novos anticorpos são produzidos (Rich, 2001; Dworkin, 2002). Sem tratamento, a FRTP parece estar associada a uma maior taxa de mortalidade do que sua contraparte transmitida pelo carrapato, no entanto os efeitos contribuintes de outros fatores (p. ex., fome, guerras) que muitas vezes acompanham a FRTP podem obscurecer comparações diretas (Dworkin, 2002). Mesmo assim, há relatos de casos autolimitados provavelmente de FRTC (Rawlings, 1995; Dworkin, 1998).

O exame microscópico de amostras de sangue periférico obtidas durante episódios febris tem sido a abordagem laboratorial tradicional para o diagnóstico da febre recidivante. Os organismos de *Borrelia* podem ser visualizados em preparações a fresco com utilização da técnica de campo escuro, ou em esfregaços fixados e corados por Wright-Giemsa, laranja de acridina ou anticorpos fluorescentes específicos. A microscopia tem como defeitos: (1) a necessidade de haver uma carga sanguínea de espiroquetas bastante alta, ainda que isso seja evidenciado pela coleta de amostras durante os períodos febris; (2) inexperiência do observador ou falta de familiaridade com o diferencial clínico; (3) incapacidade de identificar a *Borrelia* causadora ao nível de espécie. É possível cultivar espiroquetas, ainda que seja uma atividade difícil e raramente realizada no cenário clínico. A demonstração da resposta sorológica por meio do uso de técnicas de IFA, ELISA e *Western blot* tem sido associada a níveis variáveis de sucesso. O grau de variabilidade antigênica de *Borrelia* pode limitar a sensibilidade do ensaio sorológico, enquanto a reatividade cruzada com outras espiroquetas, em particular aquelas pertencentes ao grupo da borreliose de Lyme, pode afetar a especificidade. Testes mais modernos, que empregam uma proteína recombinante de 34 kDa (GlpQ), parecem ser mais específicos para detecção de espiroquetas causadoras de febre recidivante (Porcella, 2000; Schwan, 1996). No momento, os métodos moleculares (p. ex., PCR) exercem pouco ou nenhum papel no diagnóstico de rotina da febre recidivante. Entretanto, dado ao extremo poder de discriminação de cepas e/ou espécies que possuem (Wormser, 1999; Bunikis, 2004), essas técnicas poderão futuramente ser parte vital da elucidação da etiologia da borreliose em regiões onde são encontradas espiroquetas causadoras tanto da febre recidivante como da doença de Lyme.

O tratamento bem-sucedido da FRTP pode ser conseguido pela administração de uma única dose oral de tetraciclina ou eritromicina. Para casos de FRTC, o tratamento indicado é a terapia com qualquer um desses agentes durante 5 a 10 dias (Johnson, 2000). A administração parenteral de β-lactâmico pode ser considerada para casos de meningite ou encefalite (Cadavid, 1998). Seja qual for o antibiótico utilizado, é comum haver manifestação dos sintomas da reação de Jarisch-Herxheimer, que podem ser particularmente severos na

variante da doença transmitida pelo carrapato. Essa reação comumente ocorre em poucas horas após o início da terapia com antibióticos, sendo tipificada por uma elevação da temperatura corporal (0,5 a 1°C) acompanhada de rigidez, hipotensão sistêmica e leucopenia. Como em outras síndromes choque-símiles, o mecanismo proposto para a reação de Jarisch-Herxheimer envolve uma "tempestade" de citocinas, em que o fator de necrose tumoral-α, interleucina-6 e interleucina-8 atuam como componentes principais (Griffin, 1998).

As estratégias preventivas para FRTC incluem a construção de chalés ou cabanas à prova de roedores, a fim de evitar a imigração e colonização por carrapatos moles; aplicação de inseticidas nas adjacências dessas habitações; uso tópico de repelentes enquanto estiver dormindo; além de evitar totalmente permanecer de um dia a outro em locais que sabidamente constituem hábitats de *Ornithodoros*. A prevenção da FRTP pode ser conseguida por meio de uma boa higiene pessoal e pela prática de remoção de piolhos (Johnson, 2000). Atualmente, não há nenhuma vacina disponível.

Febre por mordedura de rato

Descrição

Spirillum minus é uma bactéria Gram-negativa, firmemente espiralada, que mede 2 a 5 μm de comprimento por 0,5 μm de largura. Possui tufos bipolares de flagelos e está mais proximamente relacionada às espécies de *Neisseria* do que aos membros da família *Spirochaetaceae*.

Epidemiologia

A infecção humana por *S. minus* que resulta em febre recidivante é denominada sodoku. A maioria dos casos foi descrita no Japão, embora possam ocorrer no mundo todo. Essa bactéria integra a flora respiratória dos ratos e é transmitida pela mordida desse animal. Não há relatos indicando que a ingestão oral constitua fonte de infecção humana. A doença é bastante rara nos Estados Unidos. Funcionários de laboratórios de pesquisa e viajantes internacionais representam os grupos de risco da infecção (Anderson, 1983; Signorini, 2002).

Patogênese e patologia

A patogênese de *S. minus* é pouco compreendida. A disseminação a partir da mordida original ocorre logo após a inoculação. Nas poucas descrições pós-morte de casos fatais, foram observados necrose epitelial e infiltração mononuclear na derme no sítio de mordida original; infiltrado perivascular de células mononucleares na derme a partir do sítio de erupções; hiperplasia de linfonodos; além de hemorragia e necrose no fígado, no baço, nos rins, no miocárdio e nas meninges (Washburn, 1995).

Curso clínico

A ferida produzida pela mordida a princípio cicatriza. No entanto, decorridos 1 a 4 dias, pode haver aparecimento de uma lesão endurecida com potencial ulcerativo no sítio da mordida. Os períodos febris são recorrentes, intercalados por períodos de 3 a 7 dias sem febre. A febre pode ser acompanhada de mialgia, dor de cabeça e vômitos. Metade dos pacientes desenvolve erupções maculares que podem formar placas amplas (Taber, 1979). A resolução comumente se dá em 3 a 8 semanas, contudo recidivas e complicações (p. ex., endocardite, meningite, miocardite e nefrite) podem ocorrer (Washburn, 1995). Na era pré-antibiótica, a mortalidade associada aos casos não tratados era de 6 a 10% (Washburn, 1995).

Diagnóstico laboratorial

S. minus pode ser propagado apenas em camundongos ou cobaias, por inoculação intraperitoneal. A demonstração dos organismos pode ser feita por meio da coloração de amostras de exsudato oriundas da lesão ou dos linfonodos com a utilização da técnica de Wright-Giemsa, ou pela visualização por microscopia de campo escuro. Não existem testes sorológicos disponíveis. Contudo, até 50% dos pacientes pode apresentar resultados falso-positivos em testes não treponêmicos para detecção de sífilis (Taber, 1979).

Tratamento

A administração endovenosa de penicilina G constitui a terapia de escolha. Pacientes alérgicos à penicilina são tratados com tetraciclina.

Anaerobiospirillum succiniciproducens

Descrição

Anaerobiospirillum succiniciproducens é uma bactéria Gram-negativa, espiralada, que mede 0,6 a 0,8 μm de largura por 4 a 8 μm de comprimento. Realiza movimentos em forma de um saca-rolhas e possui flagelos bipolares multitricosos. Tal como *Spirillum* spp., os membros do gênero *Anaerobiospirillum* não são espiroquetas verdadeiras. Em vez disso, são mais proximamente relacionados ao gênero *Aeromonas* do que aos gêneros *Treponema* e *Borrelia*.

Epidemiologia

As bactérias anaeróbias podem fazer parte da flora normal de gatos e cães saudáveis, contudo recentemente também foram demonstrados em associação à ileocolite felina severa (De Cock, 2004). Embora tenha sido sugerida a existência de associação entre uma doença humana similar e a exposição a esses animais, a associação não foi estabelecida de forma definitiva (Malnick, 1990; Goddard, 1998). *A. succiniciproducens* foi associada à doença diarreica em pacientes normais e à septicemia em pacientes com doença predisponente. Foi postulado que o trato gastrintestinal desses pacientes constitui a porta de entrada dos organismos para o sistema circulatório (McNeil, 1987; Tee, 1998). Embora seja baixa, a incidência da infecção tem aumentado, talvez principalmente como resultado da melhor detecção propiciada pelo aprimoramento da técnica de cultura (Goddard, 1998).

Curso clínico

Pacientes com gastroenterite apresentam dor abdominal, vômitos e diarreia por um período de 3 a 7 dias. Aqueles que não possuem doença subjacente se recuperam sem desenvolver complicações (Malnick, 1990). Há relatos de detecção de septicemia em pacientes com doenças subjacentes, como alcoolismo, aterosclerose, malignidade, diabetes melito e gengivite (Goddard, 1998; Pienaar, 2003). Aproximadamente 1/3 dos casos com septicemia são fatais.

Diagnóstico laboratorial

A. succiniciproducens cresce bem em sistemas de cultura de sangue automatizados (Tee, 1998); 2 a 3 dias após o subcultivo em ágar chocolate ou ágar sangue, surgem colônias úmidas e disseminantes que medem aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro. Entre as reações bioquímicas úteis para fins de identificação, estão negatividade para catalase, indol e oxidase; produção de ácido succínico e ácido acético a partir de glicose, demonstrada por cromatografia a gás-líquida; ausência de crescimento a 25 ou 42°C. Malnick et al. (1990) desenvolveram um meio seletivo.

Tratamento

Em decorrência da natureza incomum dessa infecção, não há nenhuma terapia ideal estabelecida para seu tratamento. *In vitro*, a maioria dos isolados testados é suscetível à carbenicilina, cefoxitina, cloranfenicol e metronidazol, bem como resistente à vancomicina e clindamicina. Entretanto, esses testes são limitados e ainda precisam ser padronizados (Shlaes, 1982; McNeil, 1987).

Agentes causadores de espiroquetose intestinal

Descrição

Duas espécies de espiroquetas, *Brachyspira aalborgi* e *Brachyspira pilosicoli* (antigamente designadas como membros do gênero *Serpulina*), foram encontradas no cólon de seres humanos. Esses organismos são Gram-negativos, medem 0,2 a 0,4 μm de diâmetro e 4 a 8 μm de comprimento. Existem 4 a 6 flagelos presentes ao nível subterminal de cada extremidade, próximos das terminações pontudas da bactéria.

Epidemiologia e curso clínico

B. pilosicoli e também *Brachyspira hyodysenteriae* causam espiroquetose intestinal suína, que é uma doença diarreica observada em porcos jovens. Por outro lado, cepas relacionadas a essas espécies foram isoladas de cães, pássaros e outros animais (Korner, 2003). Ainda é preciso descobrir se esses animais atuam como reservatórios da infecção humana. Em contraste, *B. aalborgi* foi nomeado após ter sido isolado

do cólon de um paciente (Hovind-Hougen, 1982), mas não é tão bem caracterizado de uma forma geral. A associação existente entre as espiroquetas intestinais e a doença ainda não está firmemente estabelecida, uma vez que foram identificadas bactérias em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Foi demonstrada uma prevalência maior entre homens homossexuais do que em outras populações (Teglbjaerg, 1990). Diarreia, dor abdominal, sangramento retal e produção de secreções foram atribuídos à presença das espiroquetas intestinais (Teglbjaerg, 1990). Além disso, *B. pilosicoli* foi isolado a partir do sangue de pacientes criticamente doentes e imunocomprometidos, embora sua importância clínica permaneça desconhecida (Trott, 1997; Kanavaki, 2002).

Patologia e patogênese

As espiroquetas são facilmente observadas em amostras de biópsia, como uma "franja" azul-escura na superfície das células epiteliais colônicas. As células globosas continuam preservadas. A técnica da impregnação com prata demonstra nitidamente os organismos. As células epiteliais parecem normais e não há inflamação aumentada na lâmina própria. A microscopia eletrônica revela que as bactérias se fixam à superfície das células epiteliais colônicas, orientando-se perpendicularmente para o lume (Teglbjaerg, 1990). A invasão de macrófagos epiteliais e de mucosa foi observada em pacientes sintomáticos e assintomáticos (Teglbjaerg, 1990). A patogênese ainda não foi estabelecida.

Diagnóstico laboratorial

As espiroquetas podem ser detectadas nas fezes por microscopia de campo escuro, bem como cultivadas a partir desse material ou de amostras de biópsia em ágar soja tripticase contendo 5 a 10% de sangue de cavalo ou de cabra. A adição de espectinomicina e polimixina B confere seletividade ao meio (Teglbjaerg, 1990). No meio incubado sob condições anaeróbias, desenvolvem-se pontos de colônias fracamente β-hemolíticas em um período de 3 dias a 4 semanas, dependendo da cepa. Ensaios de hibridização *in situ* fluorescente e técnicas de amplificação seguidas de análise RFLP foram empregadas para detecção e/ou identificação de espiroquetas a partir de amostras de tecido de biópsia (Calderaro, 2003; Jensen, 2004). Além disso, a amplificação de genes de *Brachyspira* oriundos do DNA extraído diretamente das fezes de animais infectados também foi utilizada com sucesso (Atyeo, 1998).

Tratamento

Apesar de terem sido publicadas as suscetibilidade antimicrobianas de *Brachyspira* spp., ainda não foram descritos testes padronizados para um número considerável de isolados (Karlsson, 2003). Há relatos de pacientes apresentando sintomas e espiroquetose intestinal que responderam ao tratamento com metronidazol (Teglbjaerg, 1990).

Referências bibliográficas

Aberer E, Klade H, Hobisch G: A clinical, histological, and immunohistochemical comparison of acrodermatitis chronica atrophicans and morphea. Am J Dermatopathol 1991; 13:334.

Aberle-Grasse J, Olton SL, Notari E, et al: Predictive value of past and current screening tests for syphilis in blood donors: changing from a rapid plasma reagin test to an automated specific treponemal test for screening. Transfusion 1999; 39:206.

Afzelius A: Verhanlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch Dermatol Syphilis 1910; 101:405.

Aguero-Rosenfeld ME, Shoop E, Johnson RC: Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol 1996; 33:419.

American College of Physicians: Guidelines for laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1997; 127:1106.

Anderson LC, Leary SL, Manning PJ: Rat-bite fever in animal research laboratory personnel. Lab Anim Sci 1983; 33:292.

Antal GM, Lukehart SA, Meheus AZ: The endemic treponematoses. Microbes Infect 2002; 4:83.

Extensa revisão que fornece descrições dos agentes causadores e dos principais mecanismos patogênicos, bem como as opções diagnósticas e de tratamento. Sua representação de cada doença clínica e respectivos impactos sobre as várias populações humanas, todavia, é extraordinária.

Arean VM: The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). Am J Pathol 1962; 40:393.

Atyeo RF, Oxberry SL, Combs BG, Hampson DJ: Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochetosis. Lett Appl Microbiol 1998; 26:126.

Augenbraun M, Roits R, Johnson R, et al: Treponemal specific tests for the serodiagnosis of syphilis. Sex Transm Dis 1998; 25:549.

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, et al: Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorben assay using recombinant VlsE1 peptide antigens of *Borrelia burgorferi* compared with 2-tiered testing using whole cell lysates. J Infect Dis 2003; 187:1187.

Bakken LL, Callister SM, Wand PJ, et al: Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 participants in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American Pathologists Proficiency Testing Program. J Clin Microbiol 1997; 35:537.

Balmelli T, Piffaretti JC: Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Res Microbiol 1995; 146:329.

Bannwarth A: Chronische lymphocytäre Meningitis, entzundliche polyneuritis und 'rheumatismus.' Arch Psychiatr Nervenkr 1941; 113:284.

Bellovin SM: Correspondence. N Engl J Med 2001; 345:1349.

Blanc WA: Pathology of the placenta, membranes, and umbilical cord in bacterial, fungal, and viral infections in man. *In* Naeye RL, Kissane JM, Kaufman N (eds): International Academy of Pathology Monograph. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1981, p 67.

Breitschwerdt EB, Nicholson WL, Kiehl AR, et al: Natural infections with *Borrelia* spirochetes in two dogs from Florida. J Clin Microbiol 1994; 32:352.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, et al: Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int J Syst Bacteriol 1999; 49:839.

Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, et al: Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. J Clin Microbiol 1998; 36:2658.

Brown SL, Hansen SLH, Langone JJ: Role of serology in the diagnosis of Lyme disease. JAMA 1999; 281:62.

Explora as características de desempenho das técnicas sorológicas no diagnóstico da doença de Lyme e demonstra o papel a ser exercido pelos fatores epidemiológicos e clínicos corroborantes.

Brown ST, Zaidi A, Larsen SA, et al: Serological response to syphilis treatment. JAMA 1985; 253:1296.

Brunner M, Sigal LH: Use of serum immune complexes in a new test that accurately confirms early Lyme disease and active infection with *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 2001; 39:3213.

Bunikis J, Tsao J, Farmpo U, et al: Typing of *Borrelia* relapsing fever group strains. Emerg Infect Dis 2004; 10:1661.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, et al: Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? Science 1982; 216:1317.

Cadavid D, Barbour AG: Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in human and experimental animals. Clin Infect Dis 1998; 26:151.

Calderaro A, Villanacci V, Conter M, et al: Rapid detection and identification of *Brachyspira aalborgi* from rectal biopsies and faeces of a patient. Res Microbiol 2003; 154:145.

Centers for Disease Control and Prevention: Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. JAMA 1995; 274:937.

Centers for Disease Control and Prevention: Case definitions for public health surveillance. MMWR 1997; 46(RR-10):20.

Centers for Disease Control and Prevention: The National plan to eliminate syphilis from the United States. 1999. Disponível em: http://www.cdc.gov/stopsyphilis/Plan.pdf.

Centers for Disease Control and Prevention: Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR Recomm Rep 2002; 51(RR-6):1.

Desenvolvidas como ferramenta para guiar a terapia de muitas doenças sexualmente transmissíveis, estas recomendações também incluem muitas considerações diagnósticas valiosas para uma variedade de manifestações.

Centers for Disease Control and Prevention: Primary and secondary syphilis – United States, 2002. MMWR 2003; 52:1117.

Centers for Disease Control and Prevention: Congenital syphilis – United States, 2002. MMWR 2004a; 53:716.

Centers for Disease Control and Prevention: Lyme disease – United States, 2001–2002. MMWR 2004b; 53:365.

Centurion-Lara A, Castro C, Barret L, et al: *Treponema pallidum* major sheath protein homolog Tpr K is a target of opsonic antibody and the protective immune response. J Exp Med 1999; 189:647.

Chamberlain NR, Brandt ME, Erwin AL, et al: Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. Infect Immun 1989; 57:2872.

Choi BK, Wyss C, Gobel UB: Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. J Clin Microbiol 1996; 34:1922.

Collis TK, Celum CL: The clinical manifestations and treatment of sexually transmitted diseases in human immunodeficiency virus-positive men. Clin Infect Dis 2001; 32:611.

Coyle PK, Schutzer SE, Deng Z, et al: Detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antigen in antibody-negative cerebrospinal fluid in neurologic Lyme disease. Neurology 1995; 45:2010.

Cox DL, Chang P, McDowall AW, et al: The outer-membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. Infect Immun 1992; 60:1076.

Cruz M, Hansen K, Ernerudh J, et al: Lyme arthritis: oligoclonal anti-*Borrelia burgdorferi* IgG antibodies occur in joint fluid and serum. Scand J Immunol 1991;33:61.

Cumberland MC, Turner TB: Rate of multiplication of *Treponema pallidum* in normal and immune rabbits. Am J Syphilis 1949; 33:201.

Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, et al: Seronegative Lyme disease: dissociation of specific T- and B- lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. N Engl J Med 1988; 319:1441.

Davis GE: Species unity or plurality of the relapsing fever spirochetes. *In* Moulton FR (ed.): A Symposium on

Relapsing Fever in the Americas. Washington, DC, American Association for the Advancement of Science, 1942.

De Cock HE, Marks SL, Stacy BA, et al: Ileocolitis associated with *Anaerobiospirillum* in cats. J Clin Microbiol 2004; 42:2752.

De Silva AM, Fikrig E: Arthropod- and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. J Clin Invest 1997; 99:377.

Dooley JR, Ishak KG: Leptospirosis. *In* Binford CC, Conner DH (eds): Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases, vol I. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1976, p 101.

Dorfman DH, Glaser JH: Congenital syphilis presenting in infants after the newborn period. N Engl J Med 1990; 323:1299.

Dressler F, Ackerman R, Steere AC: Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. J Infect Dis 1994; 169:313.

Dressler F, Whalen JA, Reinhart BN, et al: Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J Infect Dis 1993; 167:392.

Dressler F, Yoshinari NH, Steere AC: The T-cell proliferation assay in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1991; 115:533.

Dumler JS: Molecular diagnosis of Lyme disease: review and meta-analysis. Mol Diagn 2001; 6:1.

Cumpre, de maneira bem-sucedida, o feito de reunir uma multitude de dados moleculares diversos para ilustrar as características gerais de desempenho e a utilidade dos ensaios de amplificação para diferentes amostras clínicas.

Duray PH, Chandler FW: Lyme disease. *In* Conner DH, Chandler FW, Schwartz DA, et al (eds): Pathology of Infectious Diseases. Stamford, CT, Appleton & Lange, 1997, p 635.

Dworkin MS, Anderson DE Jr, Schwan TG, et al: Tick-borne relapsing fever in the northwestern United States and southwestern Canada. Clin Infect Dis 1998; 26:122.

Dworkin MS, Schwan TG, Anderson DE: Tick-borne relapsing fever in North America. Med Clin North Am 2002; 86:417.

Revisão instrutiva sobre a febre recorrente endêmica, que fornece uma descrição das espiroquetas causadoras; dos fatores epidemiológicos, ecológicos do carrapato vetor e patogênicos; e das manifestações clínicas da febre recorrente. As técnicas de diagnóstico laboratorial, o tratamento e os aspectos referentes à prevenção são igualmente destacados.

Edwards GA, Olmm BM: Human leptospirosis. Medicine 1960; 39:117.

Engelkens HJ, Judanarson J, Orange AP, et al: Endemic treponematoses. Part I: Yaws. Int J Dermatol 1991a; 30:77.

Engelkens HJ, Niemel PL, van der Sluis JJ, et al: Endemic treponematoses. Part II: Pinta and endemic syphilis. Int J Dermatol 1991b; 30:231.

Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC: Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol 1995; 33:419.

Falco RC, Fish D, D'Amico V: Accuracy of tick identification in a Lyme disease endemic area. JAMA 1998; 280:602.

Falco RC, McKenna DF, Daniels TJ, et al: Temporal relation between *Ixodes scapularis* abundance and risk for Lyme disease associated with erythema migrans. Am J Epidemiol 1999; 149:771.

Farr RW: Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995; 21:1.

Feigin RD, et al: Human leptospirosis from immunized dogs. Ann Intern Med 1973; 79:777.

Fitzgerald TJ: The TH_1/TH_2 switch in syphilitic infection: is it detrimental? Infect Immun 1992; 60:3475.

Fiumara NJ: Treatment of primary and secondary syphilis. Serological response. JAMA 1980; 243:2500.

Flores JL: Syphilis: A tale of twisted treponemes. West J Med 1995; 163:552.

Fraenkel CJ, Garpmo U, Berglund J: Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 2002; 40:3308.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, et al: Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997; 390:580.

Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al: Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science 1998; 281:375.

Fredricks DN, Relman DA: Sequence-based identifications of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. Clin Microbiol Rev 1996; 9:18.

Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y, et al: Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int J Syst Bacteriol 1995; 45:804.

Gerbase AC, Rowley TR, Heymann DHL, Berkley SFB, Plot P: Global prevalence and incidences estimates of selected curable STD. Sex Transm Infect 1998;11(Suppl 1):S12.

Goddard WW, Bennett SA, Parkinson C: *Anaerobiospirillum succiniciproducens* septicaemia: important aspects of diagnosis and mangement. J Infect 1998; 37:68.

Gomes-Solecki MJC, Dunn JJ, Luft BJ, et al: Recombinant chimeric *Borrelia* proteins for diagnosis of Lyme disease. J Clin Microbiol 2000; 38:2530.

Gourevitch MN, Selwyn PA, Devanay K, et al: Effects of HIV infection on the serologic manifestations and response to treatment of syphilis in intravenous drug users. Ann Intern Med 1993; 118:350.

Greene BM, Miller NR, Bynum TE: Failure of penicillin G benzathine in the treatment of neurosyphilis. Arch Intern Med 1980; 140:1117.

Gross DM, Forsthumber T, Tary-Lehmann M, et al: Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. Science 1998; 281:703.

Guarner J, Southwick K, Greer P, et al: Testing umbilical cords for funisitis due to *Treponema pallidum* infection, Bolivia. Emerg Infect Dis 2000; 6:487.

Gussenhoven GC, van der Hoorn MAWG, Goris MGA, et al: Leptodipstick, a dipstick assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J Clin Microbiol 1997; 35:92.

Haas JS, Bolan G, Larsen SA, et al: Sensitivity of treponemal tests for detecting prior treated syphilis during human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis 1990; 162:862.

Halperin JJ: Nervous system Lyme disease. Vector Borne Zoonotic Dis 2002; 2:241.

Hansen K, Lebech AM: Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulin. Ann Neurol 1991;30:197.

Hart G: Screening to control infectious diseases: evaluation of control programs for gonorrhea and syphilis. Rev Infect Dis 1980; 2:701.

Harter C, Bernischke K: Fetal syphilis in the first trimester. Am J Obstet Gynecol 1976; 124:705.

Hayes EB, Piesman J: How can we prevent Lyme disease? N Engl J Med 2003; 348:2424.

Hazlett KRO, Sellati TJ, Nguyen TT, et al: The TprK protein of *Treponema pallidum* is periplasmic and is not a target of opsonic antibody or protective immunity. J Exp Med 2001; 193:1015.

Hernandez-Aguado I, Bolumar F, Moreno R, et al: False positive tests for syphilis associated with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus infection among intravenous drug abusers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:784.

Hilton E, Tramontanno A, DeVoti J, Sood SK: Temporal study of immunoglobulin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1997; 35:774.

Hitt E: Poor sales trigger vaccine withdrawal. Nat Med 2002; 8:311.

Hoang MP, High WA, Molberg KH: Secondary syphilis: a histologic and immunohistochemical evaluation. J Cutan Pathol 2004; 31:595.

Hooper NE, Malloy DC, Passen S: Evaluation of a *Treponema pallidum* enzyme immunoassay as a screening test for syphilis. Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1:477.

Hovind-Hougen K, Birch-Andersen A, Henrik-Neilsen R, et al: Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. J Clin Microbiol 1982; 16:1127.

Hutchinson CM, Rompalo AM, Reochart CA, et al: Characteristics of syphilis in patients attending Baltimore STD clinics – multiple high risk subgroups and interchange with human immunodeficiency virus infection. Arch Intern Med 1991; 151:511.

Hutter G, Schlagenhauf U, Valenza G, et al: Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evalution of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. Microbiology 2003; 149:67.

Ikeda MK, Jenson HB: Evaluation and treatment of congenital syphilis. J Pediatr 1990; 117:843.

James AM, Liveris D, Wormser GP, et al: *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. J Infect Dis 2001; 183:1810.

Jensen TK, Teglbjaerg PS, Lindboe CF, Boye M: Demonstration of *Brachyspira aalborgi* lineages 2 and 3 in human colonic biopsies with intestinal spirochaetosis by specific fluorescent in situ hybridization. J Med Microbiol 2004; 53:341.

Johns DR, Tierney M, Felsenstein D: Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus. N Engl J Med 1987; 316:1569.

Johnson BJ, Robbins KE, Bailey RE, et al: Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using flagella-based ELISA and immunoblotting. J Infect Dis 1996; 174:346.

Johnson WD, Golightly LM: *Borrelia* species (relapsing fever). *In* Mandell J, Bennett J, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000, p 2502.

Kaiser R: Neuroborreliosis. J Neurol 1998; 245:247.

Kalish RA, McHugh G, Granquist J, et al: Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10–20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001; 33:780.

Kanavaki S, Mantadakis E, Thomakos N, et al: *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* spirochetemia in an immunocompromised patient. Infection 2002; 30:175.

Karlsson M, Fellstrom C, Gunnarsson A, et al: Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. J Clin Microbiol 2003; 41:2596.

Klempner MS: Controlled trials of antibiotic treatment in patients with post-treatment chronic Lyme disease. Vector Borne Zoonotic Dis 2002; 2:255.

Klempner MS, Schmid CH, Hu L et al: Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. Am J Med 2001; 110:217.

Kirkland KB, Klimko TB, Meriwether RA, et al: Erythema migrans-like rash illness at a camp in North Carolina. Arch Intern Med 1997; 157:2635.

Korner M, Gebbers JO: Clinical significance of human intestinal spirochetosis – a morphologic approach. Infection 2003: 5:341.

Enfoca uma compilação de evidências que atribui traços patogênicos a organismos outrora associados à espiroquetose intestinal.

Larsen SA, Johnson RE: Diagnostic tests. *In*: Larson SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ (eds): A Manual of Tests for Syphilis, 9ed. Washington DC, American Public Health Association, 1998, p 1.

Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH: Laboratory diagnosis and interpretion of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8:1.

Lebech AM: Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. Acta Pathol Microl Immunol Scand Suppl 2002; 105:1.

Ledue TB, Collins MF, Craig WY: New laboratory guidelines for serologic diagnosis of Lyme disease: evaluation of the two-test protocol. J Clin Microbiol 1996; 34:2343.

Leenders ACAP: Correspondence. N Engl J Med 2001; 345:1349.

Lefevre J, Bertrand CMA, Bauriaud R: Evaluation of the Captia enzyme immunoassays for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. J Clin Microbiol 1990; 28:1704.

Lesser RL: Ocular manifestations of Lyme disease. Am J Med 1995; 24:60S.

Levett PN: Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14:296.

Revisão abrangente, ainda que concisa, dos aspectos históricos, epidemiológicos, clínicos e diagnósticos da leptospirose.

Liang FT, Steere AC, Marques AR, et al: Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an

immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. J Clin Microbiol 1999; 37:3990.
Loesche WJ, Grossman NS: Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. Clin Microbiol Rev 2001; 14:727.
Luger SW, Krauss E: Serologic tests for Lyme disease. Interlaboratory variability. Arch Intern Med 1990; 150:761.
Lukehart S, Hook EW, Baker-Zander SH, et al: Invasion of the central nervous system by *Treponema pallidum*. Implications for diagnosis and therapy. Ann Intern Med 1988; 109:855.
McGinley-Smith DE, Tsao SS: Dermatoses from ticks. J Am Acad Dermatol 2003; 49:363.
MacLean S, Luger A: Finding neurosyphilis without the Venereal Disease Research Laboratory Test. Sex Transm Dis 1996; 23:392.
McNeil MM, Martone WJ, Dowell VR Jr: Bacteremia with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Rev Infect Dis 1987; 9:737.
Magnuson HJ, Thomas SW, Olansky S, et al: Inoculation syphilis in human volunteers. Medicine (Baltimore) 1956; 35:33.
Malnick H, Williams K, Phil-Eboise J, et al: Description of a medium for isolating *Anaerobiospirillum* sp., a possible cause of zoonotic disease from diarrheal feces and blood of humans and use of the medium in a survey of human canine and feline feces. J Clin Microbiol 1990; 28:1380.
Marra CM, Boutin P, McArthur JC, et al: A pilot study evaluating ceftriaxone and penicillin G as treatment agents for neurosyphilis in human immunodeficiency virus-infected individuals. Clin Infect Dis 2000; 30:540.
Marra CM, Gary DW, Kuypers J, et al: Diagnosis of neurosyphilis in patients infected with human immunodeficiency virus type I. J Infect Dis 1996; 174:219.
Marra CM, Maxwell CL, Tantalo L, et al: Normalization of cerebrospinal fluid abnormalities after neurosyphilis therapy: does HIV status matter? Clin Infect Dis 2004; 38:1001.
Mohr JA, Griffits W, Jackson R, et al: Neurosyphilis and penicillin levels in cerebrospinal fluid. JAMA 1976; 236:2208.
Molloy PJ, Persing DH, Berardi VP: False positive results of PCR testing for Lyme disease. Clin Infect Dis 2001; 33:412.
Musher DM: Syphilis, neurosyphilis, penicillin, and AIDS. J Infect Dis 1991; 163:1201.
Musher DM, Hamill RJ, Baughn RE: Effect of human immunodeficiency virus (HIV) on the course of syphilis and on the response to treatment. Ann Intern Med 1990; 113:872.
Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, et al: Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after *Ixodes scapularis* tick bite. N Engl J Med 2001; 345:79.
Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, et al: The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. Am J Med 1996; 100:502.
Nadelman RB, Wormser GP: Lyme borreliosis. Lancet 1998; 352:557.
Nichol G, Dennis DT, Steere AC, et al: Test-treatment strategies for patients suspected of having Lyme disease: a cost effective analysis. Ann Intern Med 1998; 128:37.
Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ, et al: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. J Infect Dis 1996; 174:623.
Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, et al: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. N Engl J Med 1994; 330:229.
Norgard MV: Clinical and diagnostic issues of acquired and congenital syphilis encompassed in the current syphilis epidemic. Curr Opin Infect Dis 1993; 6:9.
Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii* Western blots (immunoblots). J Clin Microbiol 1996; 34:1732.
Oliver JH, Lin T, Gao L, et al: An enzootic transmission cycle of Lyme borreliosis spirochetes in the southeastern United States. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:11642.
Pahl A, Kuhlbrandt U, Brune K, et al: Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. J Clin Microbiol 1999; 37:1958.
Parola P, Raoult D: Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis 2001; 32:897.
Paster BJ, Boshces SK, Galvin JL, et al: Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 2001; 183:3770.
Patel R, Grogg KL, Edwards WD, et al: Death from inappropriate therapy for Lyme disease. Clin Infect Dis 2000; 31:1107.
Patterson FC, Winn WC: Practical identification of hard ticks in the parasitology laboratory. Pathol Case Rev 2003; 8:187.
Peeling RW, Mabey DCW: Syphilis. Nat Rev Microbiol 2004; 2:448.
Perolat P, Chappel RJ, Adler B, et al: *Leptospira fainei* sp. nov. isolated from pigs in Australia. Int J Syst Bacteriol 1998; 48:851.
Persing DH, Rutledge BJ, Rys PN, et al: Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. J Infect Dis 1994; 169:668.
Pienaar C, Kruger AJ, Venter EC, Pitout JD: *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bacteraemia. J Clin Pathol 2003; 56:316.
Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ, et al: Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. J Clin Microbiol 1987; 25:557.
Plorer A, Sepp N, Schmutzhard E, et al: Effects of adequate versus inadequate treatment of cutaneous manifestations of Lyme borreliosis on the incidence of late complications and late serological status. J Invest Dermatol 1993; 100:103.
Poland GA: Prevention of Lyme disease: a concise review of the evidence. Mayo Clin Proc 2001; 76:713.
Porcella SP, Raffel SJ, Schrumpf ME, et al: Serodiagnosis of louse-borne relapsing fever with glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) from *Borrelia recurrentis*. J Clin Microbiol 2000; 38:3561.
Porcella SF, Schwan TG: *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. J Clin Invest 2001; 107:651.
Ramachandran S, Perera MVF: Cardiac and pulmonary involvement in leptospirosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1977; 71:56.
Raoult D, Birtles RJ, Montoya M, et al : Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. Clin Infect Dis 1999 29:434.
Rawlings JA: An overview of tick-borne relapsing fever with emphasis on outbreaks in Texas. Tex Med 1995; 91:56.
Reed KD: Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. J Clin Microbiol 2002; 40:319.
Reisner BS, Mann L, Tholcken C, et al: Use of the *Treponema pallidum* specific Captia Syphilis IgG assay in conjunction with the rapid plasma reagin test to test for syphilis. J Clin Microbiol 1997; 35:1141.
Rich SM, Sawyer SA, Barbour AG: Antigen polymorphism in *Borrelia hermsii*, a clonal pathogenic bacterium. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:15038.
Riviere GR, Smith KS, Carranza N, et al: Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. J Periodontol 1995; 66:829.
Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, et al: Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. J Periodontol 1996; 67:109.
Riviere GR, Smith KS, Willis SG, Riviere KH: Phenotypic and genotypic heterogeneity among cultivable pathogen-related oral spirochetes and *Treponema vincentii*. J Clin Microbiol 1999;37:3676.
Rolfs RT, Joesoef MR, Hendershot EF, et al: A randomized trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. The syphilis and HIV study group. N Engl J Med 1997; 337:307.
Roman GC, Roman LN: Occurrence of congenital, cardiovascular, visceral, neurologic, and neuro-opthalmologic complications in late yaws: a theme for future research. Rev Infect Dis 1986; 8:760.
Romanowski M, Sutherland R, Fick GH, et al: Serologic response to treatment of infectious syphilis. Ann Intern Med 1991; 114:1005.
Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD: The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. Microbes Infect 2002; 4:1133.
Schmid GP: Epidemiology and clinical similarities of human spirochetal diseases. Rev Infect Dis 1989;11(Suppl 6):S1460.
Revisão abrangente, ainda que concisa, dos aspectos históricos, epidemiológicos, clínicos e diagnósticos da leptospirose.
Schmidt BL: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin Microbiol Rev 1997; 10:185.
Schroeter AL, Lucas JA, Price EV, et al: Treatment for early syphilis and reactivity of serologic tests. JAMA 1972; 221:471.
Schwan TG, Schrumpf ME, Hinnebusch BJ, et al: GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1996; 34:2483.
Scoles GA, Papero M, Beati L, Fish D: A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. Vector Borne Zoonotic Dis 2001; 1:21.
Scrimenti RJ: Erythema chronicum migrans. Arch Dermatol 1970;102:104.
Seltzer EG, Gerber MA, Cartter ML, et al: Long-term outcomes of persons with Lyme disease. JAMA 2000; 283:609.
Seltzer EG, Shapiro ED: Misdiagnosis of Lyme disease: when not to order serologic tests. Pediatr Infect Dis J 1996; 15:762.
Shadick NA, Phillips CB, Sangha O, et al: Musculoskeletal and neurologic outcomes in patients with previously treated Lyme disease. Ann Intern Med 1999; 133:919.
Shapiro ED: Doxycycline for tick bites – not for everyone. N Engl J Med 2001; 345:133.
Shapiro ED, Gerber MA: Lyme disease. Clin Infect Dis 2000; 31:533.
Shapiro ED, Gerber MA, Holabird NB, et al: A controlled trial of antimicrobial prophylaxis for Lyme disease after deer-tick bites. N Engl J Med 1992; 327:1769.
Shlaes DM, Dul MJ, Lerner PI: *Anaerobiospirillum* bacteremia. Ann Intern Med 1982; 97:63.
Sigal LH: Lyme disease: a review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 1997; 15:63.
Signorini L, Colombini P, Cristini F, et al: Inappropriate footwear and rat-bite fever in an international traveler. J Trav Med 2002; 9:275.
Singh AE, Romanowski B: Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. Clin Microbiol Rev 1999; 12:187.
Smith RP, Schoen RT, Rahn DW, et al: Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease patients with microbiologically confirmed erythema migrans. Ann Intern Med 2002; 136:421.
Sood SK, Salzman MB, Johnson BJB, et al: Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. J Infect Dis 1997; 175:996.
Southern PMJ, Sanford JP: Relapsing fever: a clinical and microbiological review. Medicine 1969; 48:129.
Steere AC: *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis). *In* Mandell J, Bennett J, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000, p 2504.
Steere AC: A 58-year old man with a diagnosis of chronic Lyme disease. JAMA 2002; 288:1002.
Steere AC: Lyme disease. N Engl J Med 2001; 345:115.
Steere AC, Broderick TF, Malawista SE: Erythema chronicum migrans Lyme arthritis. Epidemiologic evidence for a tick vector. Am J Epidemiol 1978; 108:312.
Steere AC, Glickstein L: Elucidation of Lyme arthritis. Nat Rev Immunol 2004; 4:143.
Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, et al: Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. Ann Intern Med 1977a; 86:685.
Steere AC, Malawista SE, Syndman DR, et al: Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children

and adults in three Connecticut communities. Arthritis Rheum 1977b; 20:7.
Steere AC, Sikand VK, Meurice F, et al: Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. N Engl J Med 1998; 339:209.
Steere AC, Sikand VK, Schoen RT, Nowakowski J: Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*. Clin Infect Dis 2003; 37:528.
Stoll BJ, Lee FK, Larsen S, et al: Clinical and serologic evaluation of neonates for congenital syphilis: a continuing diagnostic dilemma. J Infect Dis 1993; 167:1093.
Sundnes KO, Haimanot AT: Epidemic of louse-borne relapsing fever in Ethiopia. Lancet 1993; 342:1213.
Taber LH, Feigin RD: Spirochetal infections. Pediatr Clin North Am 1979; 26:377.
Tee W, Korman TM, Waters MJ, et al: Three cases of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bacteremia confirmed by 16s rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 1998; 36:1209.
Teglbjaerg PS: Intestinal spirochetosis. Curr Top Pathol 1990; 81:247.
Thomas DD, Baseman JB, Alderete JF, et al: Enhanced levels of attachment of fibronectin-primed *Treponema pallidum* to extracellular matrix. Infect Immun 1986; 52:736–741.
Tramont EC: *Treponema pallidum* (syphilis). *In:* Mandell J, Bennett J, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5 ed. New York, Churchill Livingstone, 2000, p 2474.
Trevejo RT, Krause PJ, Sikand VK, et al: Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. J Infect Dis 1999; 179:931.
Trott DJ, Jensen NS, Saint Girons I, et al: Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. J Clin Microbiol 1997; 35:482.
Tugwell P, Dennis DT, Weinstein A, et al: Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1997; 127:1109.
Explora as características de desempenho das técnicas sorológicas no diagnóstico da doença de Lyme e demonstra o papel a ser exercido pelos fatores epidemiológicos e clínicos corroborantes.
United States Public Health Service: Syphilis, a synopsis. Publication No. 1660. Washington, DC, US Government Printing Office, 1968.
Varela AS, Luttrell MP, Howerth EW, et al: First culture isolation of *Borrelia lonestari*, putative agent of southern-tick associated rash illness. J Clin Microbiol 2004; 42:1163.
Van Dam AP: Diversity of *Ixodes*-borne *Borrelia* species – clinical, pathogenetic, and diagnostic implications and impact on vaccine development. Vector Borne Zoonotic Dis 2002; 2:249.
Van Dam AP, Kuiper H, Vos K, et al: Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis 1993; 17:708.
Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, et al: Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med 1996; 125:794.
Wang G: Direct detection methods for Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assays. Vector Borne Zoonotic Dis 2002; 2:223.
Wang G, van Dam AP, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999; 12:633.
Warshafsky S, Nowakowski J, Nadelman RB, et al: Efficacy of antibiotic prophylaxis for prevention of Lyme disease. J Gen Intern Med 1996; 11:329.
Washburn RG: *Spirillum minus* (rat bite fever). *In:* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Disease, 4 ed. New York, Churchill Livingstone, 1995, p 2155.
Whooten RM, Weis JJ: Host–pathogen interactions promoting inflammatory Lyme arthritis: use of mouse models for dissection of disease purposes. Curr Opin Microbiol 2001; 4:274.
Wicher K, Horowitz HW, Wicher V: Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. Microbes Infect 1999; 1:1035.
Wicher V, Wicher K: Pathogenesis of maternal–fetal syphilis revisited. Clin Infect Dis 2001; 33:354.
Wormser GP, Bittker S, Cooper D, et al: Yield of large-volume blood cultures in patients with early Lyme disease. J Infect Dis 2001; 184:1070.
Wormser GP, Liveris D, Nowakowski J, et al: Association of species subtypes of *Borrelia burgdorferi* with hematogenous dissemination in early Lyme disease. J Infect Dis 1999; 180:720.
Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, et al: Practice guidelines for the treatment of Lyme Disease. Clin Infect Dis 2000; 31(Suppl 1):S1.
Yersin C, Bovet P, Smits H, et al: Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. Trop Med Int Health 1999; 4:38.
Zhang JR, Norris SJ: Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. Infect Immunol 1998; 66:3698.

CAPÍTULO 59

Micobactérias

Gail L. Woods MD

Complexo *Mycobacterium tuberculosis* 1223
- *Mycobacterium tuberculosis* 1223
- *Mycobacterium bovis* 1225
- *Mycobacterium africanum* 1225
- *Mycobacterium canettii* 1225

Micobactérias não tuberculosas 1225
- Complexo *Mycobacterium avium* 1225
- *Mycobacterium kansasii* 1226
- *Mycobacterium xenopi* 1226
- *Mycobacterium simiae* 1226
- *Mycobacterium marinum* 1226
- *Mycobacterium haemophilum* 1226
- *Mycobacterium ulcerans* 1226
- Micobactérias de crescimento rápido 1227
- *Mycobacterium leprae* 1227

Teste cutâneo 1228

Diagnóstico laboratorial 1228
- Amostras 1228
- Colorações microbianas 1229
- Métodos de cultura 1230
- Testes de identificação de micobactérias 1232
- Teste de suscetibilidade 1232

Tratamento 1233

Prevenção 1233
- *Mycobacterium tuberculosis* 1233
- Complexo *Mycobacterium avium* 1234

Referências bibliográficas 1234

PONTOS-CHAVE

- O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é a única micobactéria transmissível de um indivíduo a outro e, por isso, tem importância na área de saúde pública.
- O teste cutâneo de Mantoux é útil para identificar indivíduos com tuberculose infecciosa latente.
- Para detecção ótima de micobactérias em amostras clínicas, os laboratórios devem utilizar coloração à base de fluorocromos e meios de cultura líquidos e sólidos.
- Os testes de amplificação de ácido nucleico proporcionam detecção direta do complexo *M. tuberculosis* em amostras oriundas do trato respiratório.
- O teste de suscetibilidade aos agentes antituberculose primários (isoniazida, rifampina, etambutol e pirazinamida) deve ser realizado em todos os isolados iniciais do complexo *M. tuberculosis*.
- As infecções causadas por micobactérias não tuberculosas são adquiridas do ambiente (p. ex., água).
- As micobactérias não tuberculosas mais comumente detectadas nos laboratórios clínicos são: o complexo *Mycobacterium avium*, que causa doença pulmonar e, em pacientes imunocomprometidos, doença disseminada; as micobactérias de crescimento rápido, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* e do grupo da *Mycobacterium fortuitum*, causas mais frequentes de infecções cutâneas e de tecidos moles; *Mycobacterium kansasii*, que causa infecção pulmonar; e *Mycobacterium marinum*, que causa infecções na pele e nos tecidos moles.

As micobactérias são organismos aeróbios, sem motilidade, álcool-acidorresistentes e com formato levemente encurvado ou de bacilos retilíneos. Possuem ácidos micólicos de alto peso molecular (60 a 90 carbonos) na parede celular que, mediante pirólise, liberam ácidos de cadeia longa saturada e reta C_{22}–C_{26}. As proporções de guanina mais citosina de seu conteúdo de base de DNA estão na faixa de 62 a 70 mol%.

Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum e *Mycobacterium canettii* são os patógenos humanos que constituem o complexo *M. tuberculosis* (MTBC, *M. tuberculosis complex*). Esses organismos – os "bacilos tuberculiformes" – são os agentes etiológicos da tuberculose humana. Outras micobactérias que não as do MTBC têm sido denominadas "atípicas" por diferirem dos bacilos tuberculiformes. No entanto, os termos "micobactérias não tuberculosas" e "micobactérias bacilo tuberculiforme-distintas" são preferencialmente adotados, pois esses organismos não são atípicos e apenas apresentam características diversas daquelas de *M. tuberculosis*.

Em 1957, Runyon propôs que as micobactérias não tuberculosas (MNT) fossem divididas em quatro grupos, com base na pigmentação da colônia e na taxa de crescimento em meio de cultura sólido (Tab. 59.1) (Runyon, 1959). Esse sistema de classificação, contudo, apresenta limitações. *Mycobacterium kansasii*, por exemplo, usualmente é um fotocromógeno e, em raras ocasiões, não cromogênico ou escotocromogênico. Os membros do complexo *Mycobacterium avium* (MAC, *Mycobacterium avium complex*) são não cromogênicos no esquema de Runyon, entretanto, outros isolados produzem colônias levemente pigmentadas que potencialmente conduzem à classificação errônea como escotocromógenos. *Mycobacterium szulgai* é escotocromógeno a 37°C e fotocromógeno a 25°C. Além disso, quando um meio de cultura líquido é utilizado para cultivo de micobactérias, segundo as recomendações atualmente vigentes (ver adiante), as taxas de crescimento utilizadas por Runyon para classificação não se aplicam. *Mycobacterium leprae*, a única das micobactérias que ainda não foi cultivada *in vitro*, é discutida à parte.

Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis

Atualmente, a tuberculose é um problema global. Em todo o mundo, as estimativas anuais apontam de 8 a 10 milhões de casos novos de tuberculose e de 2 a 3 milhões de mortes decorrentes dessa doença. Em uma área considerável do globo, a tuberculose constitui a principal causa de morte promovida por qualquer agente infeccioso, sendo responsável direta por cerca de 7% de todos os casos de morte e por 26% de todos os casos de morte evitáveis (Murray, 1990; Snider, 1994).

Nos Estados Unidos, a tuberculose era a principal causa de morte por volta do século XX. Consequentemente, a mortalidade diminuiu, a princípio, por causa dos esforços da saúde pública no sentido de internar pacientes tuberculosos em casas de saúde para melhorar suas nutrições e ventilação. Em uma fase posterior, isso também foi motivado pela disponibilização de fármacos antituberculose. Entre os anos de 1953 (quando a tuberculose passou a ser notificável em nível nacional) e 1984, a incidência da doença diminuiu de modo estável, por volta de 5 a 6% a cada ano (Rieder, 1989). Em 1984 e 1985, a taxa de declínio diminuiu dramaticamente e, em seguida, essa tendência decrescente sofreu uma reversão. No período de 1985 a 1992, o núme-

Tabela 59.1 Classificação de Runyon das micobactérias não tuberculosas

Classificação	Descrição das colônias
Fotocromógenas	Sem pigmentação, a menos que sejam expostas à luz (idealmente durante o início do crescimento e mediante boa aeração da superfície)
Escotocromógenas	Pigmentadas quando crescem no escuro e sob iluminação
Não fotocromógenas	Sem pigmentação quando crescem no escuro ou sob iluminação
De crescimento rápido	Crescem em meio sólido em ≤ 7 dias

ro de casos de tuberculose relatados aos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) sofreu um aumento aproximado de 20%, ou seja, foram relatados 51.000 casos a mais do que o número esperado se o declínio até então observado tivesse se mantido (Centers for Disease Control and Prevention, 1993). Dentre as áreas metropolitanas, a que sofreu o maior aumento do número de casos foi a cidade de Nova York, EUA. Os fatores que contribuíram para o número de casos excessivo foram a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a deterioração da infraestrutura de saúde pública, e o aumento do número de casos entre moradores de rua, trabalhadores imigrantes e residentes de estabelecimentos de prestação de assistência a longo prazo (p. ex., prisões e casas de repouso) (Ellner, 1993). Além do ressurgimento da tuberculose nos Estados Unidos, outra preocupação importante foi a tuberculose multifármacos-resistente (MDR-TB, *multidrug-resistant tuberculosis*), definida como uma doença causada por *M. tuberculosis* resistente a dois ou mais agentes antimicrobianos primários utilizados nos Estados Unidos para tratamento da tuberculose (ver adiante, em "Tratamento"). Desde 1992, a incidência da tuberculose tem diminuído a cada ano, e a MDR-TB se tornou incomum (Centers for Disease Control and Prevention, 1998, 2004). Apesar desse declínio geral, taxas elevadas continuam a ser relatadas entre indivíduos estrangeiros, sobretudo mexicanos, filipinos, vietnamitas, indianos e chineses, que corresponderam a 53% do total de casos de tuberculose relatados em 2003, e entre as minorias raciais/étnicas, em especial na população negra não hispânica.

M. tuberculosis é transmitido sobretudo via inalação de resíduos secos de pequenas gotículas (1–10 μm de diâmetro) infectadas, mas também pela inoculação direta na pele esfolada, um incidente mais provável de acontecer no manuseio de tecidos infectados por patologistas ou por outros funcionários do laboratório clínico. A fonte de infecção mais importante é o indivíduo não diagnosticado, que apresenta doença pulmonar cavitária (e positividade ao exame do esfregaço de escarro). O risco de doença pulmonar ativa é baixo depois que a pessoa se expõe ao organismo, contudo, aumenta sob condições de estresse ou em ambientes confinados, nos quais ocorrem repetidas exposições ao organismo. Uma parte significativa daqueles que são infectados por *M. tuberculosis* não desenvolve doença ativa. O risco de desenvolvimento de doença ao longo da vida é de 5 a 10% para indivíduos imunocompetentes. Em contraste, no caso de indivíduos infectados tanto pelo *M. tuberculosis* quanto pelo HIV, o risco de desenvolver tuberculose é de 7 a 10% ao ano.

As estruturas, antígenos e mecanismos especificamente responsáveis pela virulência de *M. tuberculosis* permanecem desconhecidos, mas o fator de cordão e os sulfatídeos têm sido associados à habilidade das cepas virulentas de promover a doença. *In vitro*, o fator de cordão é responsável pelo aspecto morfológico das células de *M. tuberculosis* – cordões em serpentina de bacilos dispostos paralelamente e próximos entre si. Esse padrão de crescimento está correlacionado com a presença de tre-halose 6,6'-dimicolato nos bacilos. Quando esse glicolipídeo é injetado em camundongos, inibe a migração neutrofílica, desencadeia a formação de granulomas e estimula a proteção contra infecção virulenta. Seu papel específico na patogênese da tuberculose humana, entretanto, permanece desconhecido. Os sulfatídeos são glicolipídeos periféricos que inibem a fusão dos lisossomos secundários aos fagossomos contendo bacilos junto aos macrófagos, possivelmente promovendo a sobrevida intracelular do organismo.

A resposta usual do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis* é a ativação do sistema imune celular. Durante a infecção primária (inicial), os bacilos inalados viajam para os espaços alveolares, onde são ingeridos por macrófagos residentes. Esses macrófagos são incapazes de matar as micobactérias, que se multiplicam no meio intracelular durante os primeiros dias subsequentes à infecção. Os macrófagos infectados pelas micobactérias migram para os linfonodos traqueobronquiais regionais e apresentam o(s) antígeno(s) sensível(is), as células T imunocompetentes, ou eles entram nos linfáticos e na circulação sanguínea, para em seguida retornarem aos pulmões (principalmente para os ápices) e a órgãos distantes, como linfonodos, rins, áreas epifisárias de ossos longos, corpos vertebrais e meninges, nos quais os bacilos continuam a se multiplicar até que a resposta imune celular seja ativada.

As células T imunocompetentes migram dos linfonodos regionais para o sítio de infecção no pulmão. Essas células secretam citocinas quimiotáticas, inibidoras de migração e mitógenas, que estimulam o recrutamento de monócitos e linfócitos sanguíneos, a divisão de macrófagos e linfócitos e a ativação de macrófagos. Os macrófagos ativados apresentam atividade microbiana aumentada e produzem citocinas, como interleucina-1, o interferon-γ e fator de necrose tumoral, que estimula ou regula outros componentes do sistema imune, propriedades que ajudam a controlar a infecção. As citocinas e as enzimas líticas liberadas pelos macrófagos também contribuem para a destruição concomitante do tecido local. Com o tempo, a população de células T ativadas diminui e é substituída por células T de memória imunes com tempo de sobrevida longo, que protegem contra a reinfecção por *M. tuberculosis* e proporcionam proteção cruzada contra a infecção por outras micobactérias. Apesar da limitação de novos eventos de multiplicação micobacteriana em focos primários e metastáticos por ação de macrófagos ativados e células T de memória, um foco de infecção persiste indefinidamente no pulmão (com mais frequência no ápice, onde a tensão de oxigênio é alta) e, de forma menos frequente, em sítios distantes. Portanto, esses focos quiescentes apresentam potencial de reativação da doença durante os períodos de imunossupressão.

O foco primário da infecção pulmonar – denominado lesão de Gohn – usualmente está localizado em posição subjacente à pleura, na porção inferior dos lobos superiores ou na parte superior dos lobos inferiores de um dos pulmões, correspondentes às áreas do órgão que recebem maior fluxo de volume de ar inspirado. As lesões (tubérculos) são áreas bem circunscritas (1–2 cm de diâmetro) de consolidação branco-acinzentada, cujos centros variam de moles a necróticos. Tubérculos de aspecto semelhante são encontrados caracteristicamente nos linfonodos traqueobronquiais regionais e, aliados à lesão pulmonar primária, constituem o complexo de Gohn. Em nível microscópico, os tubérculos são compostos por granulomas caseosos ou não caseosos bem circunscritos, sendo que a coloração acidorresistente de cortes desse material permite visualizar os organismos. Com o passar do tempo, essas lesões são substituídas por um tecido fibroso hialino e eventualmente calcificam. As lesões da tuberculose miliar são áreas de consolidação branco-amareladas pequenas (diâmetro igual a 1 mm ou mais), evidentes e sem a caseação grosseira que histologicamente se assemelha a tubérculos. A habilidade de formar granulomas depende da imunocompetência do hospedeiro. Indivíduos infectados pelo HIV, por exemplo, podem apresentar uma extensa necrose sem formação de granulomas, muitos neutrófilos, microabscessos e uma profusão de bacilos acidorresistentes (BAR).

Nos Estados Unidos, a tuberculose pulmonar corresponde a cerca de 85% dos casos de doença ativa. As manifestações da doença pulmonar variam. A apresentação clínica pode ser insidiosa e com início gradual da manifestação de sintomas constitucionais ao longo de vários meses; pode ser catarral, com tosse insistente frequentemente atribuída a um resfriado mal curado ou a uma bronquite duradoura; em forma de pneumonia ou "gripe-símile", com febre alta, dores crônicas e agudas, tosse; hemoptoica, com formação inicial aguda de escarro contendo estrias de sangue; ou pleurítica. A tuberculose extrapulmonar pode ser localizada, todavia, mais frequentemente, envolve múltiplos órgãos com ou sem infecção pulmonar concomitante. A tuberculose multiorgânica, historicamente uma doença de bebês e crianças pequenas, agora predomina entre idosos e indivíduos imunocomprometidos, sobretudo naqueles infectados pelo HIV e pela *M. tuberculosis* (Chaisson, 1987; Kim, 1990).

Mycobacterium bovis

A *M. bovis* pode ser transmitida do gado para seres humanos por meio da ingestão de leite cru contaminado ou pela exposição respiratória ao gado infectado vivo ou a suas carcaças; de um indivíduo a outro, via exposição respiratória; do homem ao gado, via exposição à urina de indivíduos com infecção no trato urinário causada por *M. bovis*; e de um gado a outro, provavelmente por secreções respiratórias. A *M. bovis* também pode ser transmitida ao gado a partir de animais-reservatório, tais como o gambá de cauda em escova, na Nova Zelândia, e o texugo, na Suíça e na Grã-Bretanha (Grange, 1987).

No período de 1900-1930, o *M. bovis* foi responsável por 6 a 30% dos casos de tuberculose registrados nos Estados Unidos e no Reino Unido (Karlson, 1970; Grange, 1987). O declínio das taxas de tuberculose humana por essa micobactéria se deveu à pasteurização do leite e aos programas de inspeção de gado. Desde 1950, o *M. bovis* foi responsável por menos de 1% dos casos de tuberculose humana na América do Norte. A maioria das infecções é extrapulmonar, com envolvimento de linfonodos cervicais e mesentéricos, intestinos, ossos e rins. De modo inusitado, a infecção pode ocorrer subsequentemente à instilação intravesical do bacilo de Calmette-Guérin (BCG) quando do tratamento do carcinoma de bexiga superficial (Centers for Disease Control and Prevention, 1985; Kristjansson, 1993).

Mycobacterium africanum

A *M. africanum*, o bacilo da tuberculose "africana", foi isolada de seres humanos pela primeira vez no oeste da África (Castets, 1968). Os modos de transmissão, a patogênese e as manifestações clínicas da doença causada por *M. africanum* são idênticos àqueles associados ao *M. tuberculosis*. Embora o organismo tenha sido isolado originalmente de indivíduos na África, é difícil avaliar a prevalência da infecção ao redor do mundo, pois a infecção pode não ser identificada corretamente em muitos laboratórios. Sua identificação requer métodos de tipagem molecular sofisticados, como *spoligotyping* (oligotipagem com espaçador), que geralmente estão disponíveis apenas em laboratórios de pesquisa ou de referência (Mostowy, 2004). Recentemente, dos cinco isolados de MTBC encontrados na Califórnia identificados como *M. africanum*, dois eram oriundos de pacientes que não viviam na África nem apresentavam nenhuma conexão conhecida com um caso-fonte originário da África (Desmond, 2004).

Mycobacterium canettii

A *M. canettii* é a cepa lisa de *M. tuberculosis*. Assim como este, *M. canettii* é positivo para niacina e nitrato, no entanto cresce mais rápido do que a *M. tuberculosis* e produz colônias tipicamente visíveis em meio sólido, em cerca de 6 dias. O primeiro isolado humano foi obtido em 1993, a partir do linfonodo cervical de uma criança somali (van Soolingen, 1997). *M. canettii* também foi isolado de um paciente com AIDS e com tuberculose mesentérica, que vivia na Suíça quando recebeu o diagnóstico, mas que havia trabalhado por vários anos na África (Pfyffer, 1998).

Micobactérias não tuberculosas

Em geral, pouco se sabe a respeito dos antígenos associados à virulência das MNT. Entretanto, é provável que tais antígenos sejam responsáveis pela persistência dos organismos junto ao sistema de monócitos-macrófagos do hospedeiro. A resposta imune à infecção causada por essas micobactérias também é pouco compreendida. Em decorrência das técnicas moleculares atuais, mais de 100 espécies de micobactérias já foram identificadas. As próximas seções abordam potenciais patógenos selecionados. Alguns são micobactérias raras vezes encontradas e as respectivas infecções às quais foram associadas estão listadas na Tabela 59.2 (DeChairo, 1973; Cianciulli, 1974; Schroder, 1977; Edwards, 1978; Weitzman, 1981; Casimir, 1982; Blacklock, 1983; Tsukamura, 1983; Davison, 1988; Wallace, 1988; Neeley, 1989; Coyle, 1992; Wald, 1992; Henriques, 1993; Butler, 1994; Maschek, 1994; Smith, 2000; Piersimoni, 2004). Uma descrição mais extensa das micobactérias mais recentemente descritas e das isoladas com pouca frequência pode ser encontrada na excelente revisão de Tortoli (2003). *Mycobacterium gordonae* – o "bacilo da água de torneira" – é um contaminante laboratorial comum e raramente causa doenças aos humanos (Weinberger, 1992).

Tabela 59.2 Micobactérias pouco frequentemente recuperadas ou causadoras de doenças em seres humanos

Espécies de *Mycobacterium*	Infecções associadas
Micobactérias de crescimento lento	
M. asiaticum	Doença pulmonar
M. celatum	Doença pulmonar, doença disseminada em indivíduos imunocomprometidos
M. conspicuum	Doença disseminada em indivíduos imunocomprometidos
M. flavescens	Doença pulmonar
M. genavense	Doença disseminada em indivíduos imunocomprometidos
M. interjectum	Linfadenite
M. lentiflavum	Doença pulmonar, linfadenite
M. malmoense	Doença pulmonar
M. scrofulaceum	Doença pulmonar, doença disseminada, linfadenite e raramente conjuntivite, osteomielite, hepatite granulomatosa
M. shimoidei	Doença pulmonar
Complexo de *M. terrae**	Tenossinovite, doença pulmonar
M. thermoresistabile	Doença pulmonar, infecção cutânea
M. triplex	Doença pulmonar, linfadenite
Micobactérias de crescimento rápido	
M. goodii	Osteomielite traumática, doença pulmonar
M. mageritense	Feridas cirúrgicas, doença pulmonar, sepse associada ao cateterismo
M. neoaurum	Infecção associada ao cateterismo
M. peregrinum	Feridas pós-traumáticas e/ou osteomielite
M. smegmatis	Infecções de tecidos moles após traumatismo ou cirurgia
M. wolinskyii	Feridas cirúrgicas ou traumáticas, osteomielite

* Inclui *M. terrae, M. nonchromogenucum, M. triviale.*

Complexo *Mycobacterium avium*

A *M. avium* e a *Mycobacterium intracellulare* apresentam características de crescimento e reações bioquímicas similares que muitas vezes não são distinguidas em laboratórios de microbiologia clínica. Os isolados de ambas as espécies são referidos como MAC. Os bacilos MAC são ubíquos no ambiente. Foram isolados a partir da água, do solo, dos alimentos, da poeira doméstica e de vários animais, contudo as fontes ambientais específicas responsáveis pela infecção humana são desconhecidas (Inderlied, 1993; Falkinham, 1996). A porta de entrada mais provável é o trato gastrintestinal, contudo a transmissão via trato respiratório também é possível. A partir dos sítios de colonização, os organismos entram na circulação sanguínea e infectam diversos órgãos, sobretudo aqueles do sistema de monócitos-macrófagos. Antes da epidemia da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), o MAC era a segunda micobactéria mais frequentemente isolada nos Estados Unidos, seguida pela *M. tuberculosis*. O percentual de isolados de MAC, então, aumentou, igualou-se ou mesmo ultrapassou o número de isolados de *M. tuberculosis* em algumas partes do país.

Durante muitos anos, a doença pulmonar causada pelo MAC ocorria mais frequentemente entre homens idosos brancos com doença pulmonar crônica subjacente ou que haviam sido submetidos à gastrectomia. No entanto, a partir da metade até o final da década de 1980, essa infecção tornou-se mais comum em indivíduos sem fatores predisponentes, sobretudo mulheres de idade mais avançada (Prince, 1989; Dhillon, 2000). O MAC disseminado ocorre de modo quase exclusivo em indivíduos imunossuprimidos, especialmente naqueles com AIDS em estágio avançado. Nos Estados Unidos, o MAC foi a causa mais

comum de infecção bacteriana sistêmica em pacientes com AIDS no final dos anos 1980 e no início da década de 1990 (Horsburg, 1991a). Os números de casos desse tipo, todavia, diminuíram com a ampla disponibilização da terapia antirretroviral altamente ativa (Centers for Disease Control and Prevention, 1999). O principal fator de risco para MAC disseminada entre pacientes com AIDS é o grau de disfunção imunológica, indicado pela contagem de linfócitos T $CD4^+$, sendo que a doença é rara em indivíduos cujas contagens de linfócitos T $CD4^+$ está acima de 50/μL.

As manifestações da doença causada pelo MAC dependem do sítio e do alcance da infecção. A infecção pulmonar pode ser assintomática, ou pode estar presente como bronquiectasia ou imitar a tuberculose. A doença disseminada em indivíduos não aidéticos manifesta-se por meio de febre, perda de peso, dor óssea, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas. Em indivíduos com AIDS, é mais comum haver febre persistente, perda de peso e diarreia, embora anorexia, fraqueza, linfadenopatia ou hepatomegalia também possam ocorrer (Inderlied, 1993). As anormalidades laboratoriais significativas são anemia e níveis elevados de fosfatase alcalina. Na maioria das vezes, as crianças são atacadas por linfadenite cervical causada por MAC, contudo, os adultos também podem ser atacados. Outras manifestações da infecção por MAC são sinovite, doenças do trato geniturinário, lesões cutâneas, infecção profunda nas mãos, osteomielite, meningite, úlceras no cólon e pericardite (Wolinsky, 1979; Woods, 1987; Inderlied, 1993).

Os achados histológicos das lesões produzidas pelo MAC são variáveis. Podem ser observados granulomas caseosos com BAR, indistinguíveis dos da tuberculose; fibrose intersticial pulmonar com pneumonia em organização; vasculite granulomatosa necrotizante semelhante à granulomatose de Wegener; e, sobretudo em pacientes com AIDS, agregados de macrófagos espumosos contendo muitos BAR intracelulares.

Mycobacterium kansasii

A *M. kansasii*, descrita pela primeira vez como o "bacilo amarelo", representava 3% das micobactérias isoladas nos Estados Unidos em 1979 e 1980; as maiores quantidades registradas foram relatadas na Califórnia, no Texas, na Louisiana, no Illinois e na Flórida (Buhler, 1953; Good, 1982). O reservatório natural de *M. kansasii* é desconhecido; entretanto, essa micobactéria tem sido isolada de amostras de água (Falkinham, 1996). A doença pulmonar é mais comum entre homens da faixa etária de 50 a 60 anos, que vivem em áreas urbanas e estão associados a certos grupos ocupacionais (mineiros, soldadores, jateadores de areia, pintores), bem como entre indivíduos com pneumoconioses e doença pulmonar obstrutiva crônica. A doença disseminada em geral ataca indivíduos com comprometimento da imunidade celular.

A manifestação mais comum da doença causada por *M. kansasii* é o aparecimento de lesões pulmonares cavitárias crônicas, usualmente envolvendo os lobos superiores. As manifestações extrapulmonares incluem linfadenite cervical em crianças, doença cutânea, envolvimento musculoesquelético (síndrome do túnel do carpo, sinovite, artrite, tendinite e fasciite ou osteomielite), doença disseminada, doença isolada do trato geniturinário e pericardite.

Os achados histológicos das lesões produzidas por *M. kansasii* variam e incluem granulomas caseosos ou não caseosos e, especialmente em lesões cutâneas, necrose ou focos de inflamação aguda e crônica sem granulomas bem definidos. É comum encontrar BAR nos tecidos pulmonares e nos de linfonodos, porém são observados menos frequentemente em demais tecidos.

Mycobacterium xenopi

A *M. xenopi* foi isolada pela primeira vez de um sapo, em 1957, e foi reconhecida como patógeno humano em 1965 (Costrini, 1981). Foi cultivada a partir de água encanada quente e fria, geradores hospitalares e tanques de armazenamento, entre outras fontes ambientais. Na Grã-Bretanha, a *M. xenopi* é encontrada mais frequentemente em áreas costeiras do que em áreas interioranas, e as aves são um possível reservatório natural. A maioria dos relatos de infecções pulmonares causadas pela *M. xenopi* tem sido comunicada por parte da Europa e da Grã-Bretanha; é uma causa pouco comum de doenças micobacterianas nos Estados Unidos. Apenas adultos apresentaram a doença, sendo a maioria do sexo masculino. A maioria dos indivíduos afetados apresenta dano pulmonar preexistente ou outra condição predisponente, como malignidade extrapulmonar, alcoolismo, diabetes melito ou terapia imunossupressora. A doença pulmonar pode ser crônica, subaguda ou aguda; os sintomas são indistinguíveis daqueles associados à doença causada por *M. kansasii*. Infecções extrapulmonares focais (osteomielite, artrite, linfadenite) e doença disseminada são incomuns, no entanto esta última foi registrada em indivíduos com AIDS (Tecson-Tumang, 1984).

Mycobacterium simiae

A *M. simiae* foi isolada pela primeira vez de macacos da Índia em 1965 (Karassova, 1965). O organismo é encontrado em macacos e tem sido isolado a partir da água de torneira em hospitais. Sendo um patógeno humano pouco comum, a *M. simiae* foi associada à doença pulmonar crônica, à osteomielite e à doença disseminada.

Mycobacterium marinum

A *M. marinum* foi reconhecida como patógeno humano em 1951 (Norden, 1951). A infecção humana é normalmente adquirida via traumatismo na pele, durante o contato com água contaminada fresca e não clorada ou salgada, entretanto pode ser adquirida via trauma não associado ao contato com água ou por meio de contato com água na ausência de traumatismo prévio. Uma única lesão papulonodular costuma aparecer em 2 a 3 semanas após a inoculação, mais comumente no cotovelo, joelho, pé, dedo do pé ou da mão, e muitas vezes se torna verrucosa ou ulcerada. Ocasionalmente, há formação de um abscesso no sítio da inoculação, bem como desenvolvimento e progressão de vários nódulos secundários ao nível central dos vasos linfáticos, de modo semelhante à esporotricose (ver Cap. 60). Em indivíduos imunocomprometidos, as lesões cutâneas podem tornar-se disseminadas. As manifestações extracutâneas incomuns relatadas são: sinovite, osteomielite e lesões oculares e laríngeas (Woods, 1987).

A histologia das lesões cutâneas varia de acordo com o estágio da infecção. No início, os agregados neutrofílicos são circundados por histiócitos. Mais tarde, são observados linfócitos, histiócitos epitelioides, eventuais células de Langhans gigantes e focos de necrose fibrinoide. Nas lesões com duração superior a seis meses, são encontrados agregados de linfócitos na derme. As colorações para BAR usualmente são negativas, contudo é possível vê-los junto aos histiócitos.

Mycobacterium haemophilum

A *M. haemophilum* foi descrita pela primeira vez em 1978, no entanto, é bastante provável que fosse um BAR não cultivável identificado em úlceras cutâneas nos anos de 1972 e 1974 (Lomwardias, 1972; Feldman, 1974; Sompolinsky, 1978). Trata-se de um organismo único entre as micobactérias quanto à necessidade de hemoglobina ou hemina para desenvolvimento. As infecções humanas causadas por *M. haemophilum* são incomuns e geralmente observadas em indivíduos com uma imunodeficiência subjacente, como linfoma, imunossupressão exógena pós-transplantação de órgão ou AIDS. Contudo, poucos relatos de casos de linfadenite em crianças sadias têm sido relatados (Centers for Disease Control and Prevention, 1991). A doença manifesta-se, em geral, pelo aparecimento de múltiplos nódulos cutâneos, úlceras ou inchaços dolorosos, que, de forma geral, envolvem os membros e, por vezes, se transformam em abscessos e fístulas abertas com escoamento de material purulento. Em nível microscópico, as lesões apresentam focos de necrose sem caseação, que são cercadas por um infiltrado inflamatório polimorfonuclear com algumas células de Langhans gigantes eventuais na camada inferior da derme. Os BAR aparecem isolados ou em pequenas quantidades, muitas vezes junto às células.

Mycobacterium ulcerans

A *M. ulcerans* é endêmica nas regiões do Zaire, Uganda, Nigéria, Gana, Camarões, Malásia, Nova Guiné, Guiana, México e Austrália, que estão localizadas entre as latitudes 25°N e 38°S. Em todas as áreas

endêmicas, a doença é discretamente mais comum entre os homens. O reservatório natural e a via comum de transmissão de *M. ulcerans* aos seres humanos são desconhecidos.

Os epônimos para a doença causada por *M. ulcerans* são úlcera de Bairnsdale (na região da Austrália, onde a doença foi reconhecida pela primeira vez) e úlcera de Buruli ou doença de Buruli (com a região de Uganda apresentando o maior número de casos relatados). A doença começa com o aparecimento de um ou, raramente, múltiplos furúnculos indolores ou caroços subcutâneos em uma área exposta, com mais frequência na perna, que possivelmente era um sítio de traumatismo anterior. Depois de várias semanas, o caroço ulcera e podem aparecer nódulos e úlceras satélites. Os linfonodos geralmente não aumentam de tamanho, sendo que os indivíduos atacados não apresentam nem febre nem sintomas sistêmicos, a menos que as lesões sejam infectadas por bactérias de forma secundária.

Micobactérias de crescimento rápido

As micobactérias de crescimento rápido mais comumente encontradas são *Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae* e do grupo da *Mycobacterium fortuitum*. A *Mycobacterium mucogenicum* e a *Mycobacterium immunogenum* são isoladas de amostras clínicas com menor frequência. As infecções causadas por esses organismos são listadas na Tabela 59.3. As micobactérias de crescimento rápido menos frequentemente isoladas e as respectivas infecções a que têm sido associadas constam da Tabela 59.2. Essas micobactérias são cultivadas a partir do solo, da água fresca de lagos e rios, da água do mar, da água de esgoto hospitalar, da água potável, do leite não processado e da poeira. As infecções cutâneas e de tecidos moles produzidas pelas micobactérias de crescimento rápido normalmente são subsequentes a uma lesão penetrante (trauma ou procedimento cirúrgico) com possível contaminação por solo ou água. Os surtos têm sido associados à administração de vacinas contra difteria-pertussis-tétano-pólio, a injeções de histamina, à administração de lidocaína com auxílio de injetor à jato, a hemodialisadores contaminados, a heteroenxertos de válvulas suínas contaminadas, ao uso de pedilúvios em salões de pedicure e à lipoaspiração (Wallace, 1983; Brown-Elliott, 2002).

A doença cutânea primária causada por micobactérias de crescimento rápido manifesta-se como celulite localizada, abscessos drenantes ou nódulos minimamente sensíveis. Caracteristicamente, as lesões desenvolvem-se em um período de 3 semanas a 12 meses (mais frequentemente 4 a 6 semanas) após a produção da lesão penetrante em indivíduos com um sistema imune intacto. A osteomielite é uma complicação ocasional, sobretudo após a punção de feridas localizadas nos pés. As infecções pós-operatórias são caracterizadas por uma lesão que não cicatriza ou pela ruptura de uma ferida já cicatrizada com produção de drenagem serosa em indivíduo com sintomas sistêmicos mínimos. Eles, por sua vez, em geral desenvolvem-se em 3 semanas a 3 meses após a realização do procedimento, principalmente em casos de esternotomia mediana, mamoplastia de aumento ou inserção de cateter percutâneo. A doença disseminada, que normalmente ocorre em adultos imunocomprometidos (sobretudo pela terapia com corticosteroides), manifesta-se com o aparecimento de múltiplos abscessos recorrentes na pele e nos tecidos moles. A ausência de uma fonte primária de infecção é evidente. A doença pulmonar crônica é observada com maior frequência em pacientes com fibrose cística subjacente ou bronquiectasia, sendo usualmente causada por *M. abscessus* e, de modo característico, assemelhando-se à doença produzida por *M. kansasii* ou MAC, exceto pela cavitação pouco comum. Uma endocardite envolvendo uma válvula protética usualmente se manifesta em 4 a 12 semanas após a cirurgia. Em raras ocasiões, as micobactérias de crescimento rápido causam ceratite e ulceração corneal após o trauma, ou linfadenite cervical. O excelente artigo de Brown-Elliott e Wallace (2002) fornece uma descrição mais completa da doença causada por esses organismos.

As lesões produzidas pelas micobactérias de crescimento rápido são histologicamente caracterizadas por necrose com caseação mínima e infiltração inflamatória mista, composta por neutrófilos e granulomas contendo corpo estranho ou células de Langhans gigantes. Macrófagos contendo estrias lipídicas são vistos ocasionalmente. Agregados extracelulares de BAR são encontrados junto aos agregados neutrofílicos em menos de 1/3 dos casos. No tecido pulmonar, os macrófagos espumosos são frequentes, em um padrão semelhante ao da pneumonia lipoide.

Tabela 59.3 Infecções causadas pelas micobactérias de crescimento rápido mais comumente encontradas

Infecção	Espécies de *Mycobacterium*	Fatores de risco
Na pele/tecidos moles	*M. fortuitum, M. chelonae, M. abscessus, M. mucogenicum, M. immunogenum*	Traumatismo, cirurgia, uso de banheiras de hidromassagem em salões de manicure/pedicure (*M. fortuitum*)
Osteomielite	*M. fortuitum*	Traumatismo, cirurgia
Pneumonia	*M. abscessus, M. fortuitum* (raramente)	Fibrose cística, bronquiectasia, vômito crônico
Pneumonite por hipersensibilidade	*M. immunogenum, M. chelonae*	Trabalho em metalúrgicas e exposição ao óleo aerossolizado
Doença disseminada	*M. chelonae, M. abscessus*	Esteroides, transplante de órgão, doença vascular colágena, insuficiência renal crônica, comprometimento da imunidade mediada por células, leucemia, linfoma
Endocardite de prótese valvular	*M. chelonae*	Válvula contaminada
Infecções de córnea	*M. chelonae, M. fortuitum, M. immunogenum*	Traumatismo
Infecções associadas a cateteres	Todas as 5 espécies	Cateter interno, imunossupressão

Mycobacterium leprae

A *Mycobacterium leprae* é o agente etiológico da lepra (também denominada doença de Hansen). Embora não pertença ao MTBC e, portanto, possa ser considerada uma "micobactéria não tuberculosa", é discutida à parte por ser única entre as micobactérias, em virtude do fato de ainda não ter sido cultivada. Os modelos experimentais da infecção em animais são o do coxim plantar murino e o do tatu de nove bandas.

Em algum momento, a *M. leprae* foi identificada quase no mundo inteiro. Estima-se que, em todo o planeta, 10 a 15 milhões de indivíduos estejam com lepra. Aproximadamente 62% desse total é encontrado na Ásia e 34%, na África (Binford, 1982). Nos Estados Unidos, cerca de 6 mil indivíduos têm lepra, na maioria imigrantes e alguns casos de indígenas adoecidos nos estados costeiros do Golfo, na Califórnia e no Havaí (Neill, 1985).

A lepra ataca sobretudo seres humanos, contudo é também uma infecção natural entre tatus selvagens nos estados de Louisiana e do Texas, EUA, sendo que casos espontâneos têm sido descritos em macacos mangabeis (Hastings, 1988). O mecanismo de transmissão da *M. leprae* é desconhecido; no entanto, a teoria proferida sobre isso é a disseminação por contato pessoa-a-pessoa via aerosolização de organismos a partir do nariz de um indivíduo com lepra ativa (ver adiante) que, então, entrariam em contato com a mucosa nasal de outro indivíduo. Também pode haver transmissão por meio da pele intacta ou por feridas penetrantes, como aquelas produzidas por espinhos ou picada de artrópodos. O leite materno produzido por mulheres lactantes com doenças leproides contém bacilos que podem ser transmitidos aos bebês. A transmissão de *M. leprae* por via transplacentária também é possível. Casos de lepra humana desenvolvidos após o contato com tatus têm sido relatados (Lumpkin, 1983). Além disso, a descoberta de uma doença similar à lepra de ocorrência natural entre tatus, bem como a ocorrência de casos esporádicos de lepra envolvendo indivíduos que comprovadamente não tiveram contato conhecido com a lepra humana, sugerem que fontes não humanas da *M. leprae* podem existir (Blake, 1987).

A maioria das pessoas resiste efetivamente à infecção por *M. leprae*. A resistência depende de uma resposta imune mediada por célula efetiva contra os antígenos de *M. leprae*, assim como ocorre na lepra tuberculoide. Em indivíduos que carecem de imunidade mediada por célula específica a tais antígenos, os bacilos se multiplicam junto aos

macrófagos e eventualmente produzem lepra lepromatosa de ampla disseminação. O defeito na imunidade celular, que pode envolver a função de linfócitos T ou a interação dessas células com os macrófagos, aparentemente é específico para os antígenos de *M. leprae*, e não um defeito generalizado.

As lesões da lepra desenvolvem-se após um período de incubação de 2 a 5 anos e variam quanto ao aspecto, dependendo da resposta imune do hospedeiro. A lepra sempre compromete os nervos periféricos, quase sempre envolve a pele e com frequência atinge as membranas mucosas. Os três sinais cardinais da doença são as lesões cutâneas, áreas cutâneas anestesiadas e ampliação dos nervos periféricos.

O sistema destacado por Ridley e Jopling (apresentado a seguir) é utilizado mais frequentemente para classificar o espectro das formas clínicas e histopatológicas da lepra (Ridley, 1964). A lepra indeterminada, o indício mais inicial da doença, é caracterizada pelo aparecimento de uma ou algumas manchas hipopigmentadas na pele apresentando perda sensitiva local mínima. Em cerca de 75% dos casos, a doença é curada espontaneamente. Nos demais casos, a doença progride, por vezes após um longo período.

Os tipos polares da lepra – lepra lepromatosa, a forma anérgica de ampla disseminação da doença, e a lepra tuberculoide, a forma localizada – são clinicamente estáveis. A lepra lepromatosa caracteriza-se pelo aparecimento de lesões cutâneas, que variam do comprometimento generalizado e difuso da pele até nódulos disseminados e simetricamente distribuídos (denominados lepromas) repletos de organismos. As lesões, em geral, envolvem as partes mais frias da superfície corporal – o terço anterior dos olhos, a mucosa nasal e os troncos nervosos periféricos superficiais. Na doença avançada, as lesões são acompanhadas de uma perda sensorial consequente ao comprometimento das fibras nervosas dérmicas. Microscopicamente, as lesões apresentam histiócitos espumosos contendo numerosos BAR; poucos ou nenhum linfócito; inflamação intraneural mínima; e grande número de BAR nos nervos, no perineuro, nas paredes vasculares sanguíneas e nos músculos eretores. Na lepra tuberculoide, há desenvolvimento de uma ou algumas manchas ou placas anestesiadas e bem delimitadas, por vezes acompanhadas do aumento do tamanho de um nervo próximo às lesões cutâneas. Histologicamente, as lesões apresentam granulomas não caseosos nos nervos e na derme, os quais se estendem até envolver a camada basal da epiderme. São observados poucos ou nenhum BAR. A lepra limítrofe, uma condição clinicamente instável, inclui os tipos de doença intermediários entre as formas polares. Pode revelar traços mais semelhantes à doença tuberculoide (um processo denominado *upgrading*) ou traços mais parecidos com a doença lepromatosa (*downgrading*).

Teste cutâneo

O teste cutâneo da tuberculina é útil para identificar indivíduos infectados por MTBC, mas não diferencia a doença ativa da infecção. Indivíduos infectados por MTBC desenvolvem uma reação de hipersensibilidade contra as proteínas dos bacilos e são essas proteínas que constituem o reagente empregado no teste cutâneo – o derivado proteico purificado (PPD, *purified protein derivative*). O método recomendado de teste cutâneo é o teste de Mantoux, que consiste na injeção intracutânea de 0,1 mL de PPD-S (5 unidades de tuberculina) de potência intermediária. A reação é interpretada após 48 a 72 horas, medindo-se o diâmetro da enduração em milímetros (Huebner, 1993). Uma enduração medindo 5 mm ou mais é para um resultado positivo para indivíduos infectados por HIV, para aqueles que tiveram contato íntimo recente com alguém que teve tuberculose infecciosa, e para indivíduos com achados radiológicos compatíveis com uma tuberculose antiga já curada. Uma reação medindo 10 mm ou mais é considerada positiva para indivíduos que não atendem aos critérios mencionados, mas que apresentam outros fatores de risco para tuberculose. Incluídos nesse grupo estão os estrangeiros originários de países com alta prevalência de tuberculose (tais como os da Ásia, da África ou da América Latina); usuários de drogas injetáveis; populações de baixa renda, com acesso precário ao atendimento médico, sobretudo minorias raciais ou étnicas; internos de estabelecimentos de prestação de assistência de longa duração; e indivíduos que apresentam condição médica associada a um risco aumentado de tuberculose (p. ex., silicose; gastrectomia; desvio jejunoileal; peso corporal no mínimo 10% abaixo do peso ideal; insuficiência renal crônica; diabetes melito; terapia com doses altas de corticosteroides ou com outros fármacos imunossupressores; e malignidades). Uma reação medindo 15 mm ou mais é positiva para todos os demais indivíduos. É difícil interpretar os resultados de uma pessoa imunizada pelo BCG.

As reações de PPD falso-positivas originam-se da infecção por micobactérias não tuberculosas. As reações falso-negativas podem ser devidas ao uso de uma técnica precária ou ao armazenamento inadequado do reagente. Se o teste é administrado de forma correta, é incomum haver reações falso-negativas na população relativamente sadia. Contudo, até 20% dos indivíduos com tuberculose comprovada podem apresentar resultados falso-negativos na primeira vez em que são testados. A maioria dessas reações falso-negativas é atribuída a doenças gerais e reverte para o resultado positivo decorridas 2 a 3 semanas de terapia, quando a saúde é restaurada. Reações falso-negativas contra a tuberculina também podem ser causadas por fatores que produzem um estado geral de anergia, tais como desnutrição proteica, infecção viral concomitante, sarcoidose, malignidades (especialmente linfomas), terapia imunossupressora ou à base de corticosteroides e infecção por HIV.

O teste de Mantoux em geral permanece positivo contanto que bacilos viáveis persistam em focos tranquilos. Entretanto, com o aumento da idade, a reação pode enfraquecer e atingir níveis abaixo dos valores considerados positivos. Esse fenômeno é mais frequente entre indivíduos com mais de 55 anos de idade. Nesses casos, a reação será reforçada (ou se tornará positiva) se o teste for repetido em até 1 semana após a realização do primeiro teste – uma reação denominada efeito de reforço.

Os reagentes do teste cutâneo preparados a partir de micobactérias não tuberculosas incluem PPD-A (*M. avium*), PPD-B (*M. intracellulare*), PPD-F (*M. fortuitum*), PPD-G (*Mycobacterium scrofulaceum*) e PPD-Y (*M. kansasii*). Nos Estados Unidos, houve um tempo em que esses reagentes eram disponibilizados pelo CDC. Entretanto, esse serviço foi interrompido porque os antígenos não eram padronizados e as reações cutâneas eram de difícil interpretação.

Diagnóstico laboratorial

Amostras

As amostras recomendadas para o diagnóstico das infecções micobacterianas estão listadas na Tabela 59.4. As amostras de sítios contaminados, tais como como escarro e outras secreções respiratórias, secreções gástricas, urina e fezes, devem ser descontaminadas antes da inoculação no meio de cultura, a fim de evitar o supercrescimento da flora normal e, consequentemente, o mascaramento da presença de micobactérias, cujo crescimento é mais lento. A concentração da amostra após a descontaminação aumenta a sensibilidade de esfregaços e culturas. Amostras provenientes de sítios corporais normalmente estéreis (p. ex., sangue, líquido cerebrospinal [LCE], líquidos pleural e peritoneal, tecidos) podem ser inoculadas de forma direta, sem descontaminação.

O processamento e a inoculação de amostras para culturas de micobactérias devem ser realizados no interior de uma cabine de segurança biológica. O procedimento com *N*-acetil-L-cisteína (NALC)-hidróxido de sódio (Fig. 59.1) é o método mais comum utilizado em laboratório clínico para liquefazer, descontaminar e concentrar amostras destinadas à detecção de micobactérias. As amostras potencialmente contaminadas devem ser mantidas sob refrigeração, caso não seja possível processá-las de imediato. Antes de proceder às etapas delineadas na Figura 59.1, algumas amostras necessitam de manipulação adicional. Embora as amostras obtidas por lavagem gástrica devam ser processadas imediatamente, nos casos em que não for possível evitar atrasos, deve ser adicionado hidróxido de sódio a 10% até que o pH da amostra (determinado com papel medidor de pH) seja neutralizado. Se mais de 10 mL de secreções gástricas forem coletadas, a amostra é centrifugada a 3.000–3.600 x *g* durante 20 a 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante é decantado, e o sedimento é processado, conforme ilustrado na Figura 59.1. Para amostras de fezes, 1 a 2 g de uma amostra sólida ou 5 mL de uma amostra liquefeita são depositados em um tubo de centrífuga de 50 mL e água destilada, filtrada e estéril é adicionada até chegar a um volume de 10 mL. A suspensão é agitada em vórtex, filtrada em gaze e,

Tabela 59.4 Doenças micobacterianas e amostras para diagnóstico

Doença	Espécies de micobactérias comuns	Amostras
Pneumonia	*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, complexo *M. avium*, *M. abscessus*	Escarro (obtido no início da manhã, por uma expectoração profunda, em 3 dias consecutivos), líquido de BAL, tecido pulmonar, líquido pleural, conteúdo gástrico
Disseminada	*M. tuberculosis*, complexo *M. avium*	Sangue, medula óssea, tecido afetado
Linfadenite	*M. tuberculosis*, complexo *M. avium*	Aspirado ou biópsia de linfonodos
Pele, tecido mole	*M. fortuitum, M. abscessus, M. chelonae, M. marinum, M. haemophilum*	Aspirado ou biópsia de lesões
	M. leprae	Esfregaço de secreção nasal e de cortes de pele; biópsia de lesão
Musculoesquelética	*M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii*	Líquido articular, sinóvia, osso
Meningite	*M. tuberculosis*	Líquido cerebrospinal
Abscesso cerebral	*M. tuberculosis*	Material de abscessos
Geniturinária	*M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG	Urina (colhida no início da manhã), tecido afetado: rim, bexiga (BCG de *M. bovis*), endométrio, trompa de Falópio, próstata, vesículas seminais, epidídimo
Gastrintestinal	*M. tuberculosis*, *M. bovis*, complexo *M. avium*	Tecido, fezes
Peritonite	*M. tuberculosis*	Biópsia e líquido peritoneais
Hepatite	*M. tuberculosis*, complexo *M. avium*	Tecido hepático
Pericardite	*M. tuberculosis*	Pericárdio, tecido pericardial
Infecções associadas a cateteres	Micobactérias de crescimento rápido	Sangue

BAL = lavado broncoalveolar; BCG = bacilo de Calmette-Guérin.

Fonte: modificado com permissão de Woods, GL: Mycobacteria. In Woods, GL; Gutierrez, Y (eds): Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993, p. 378.

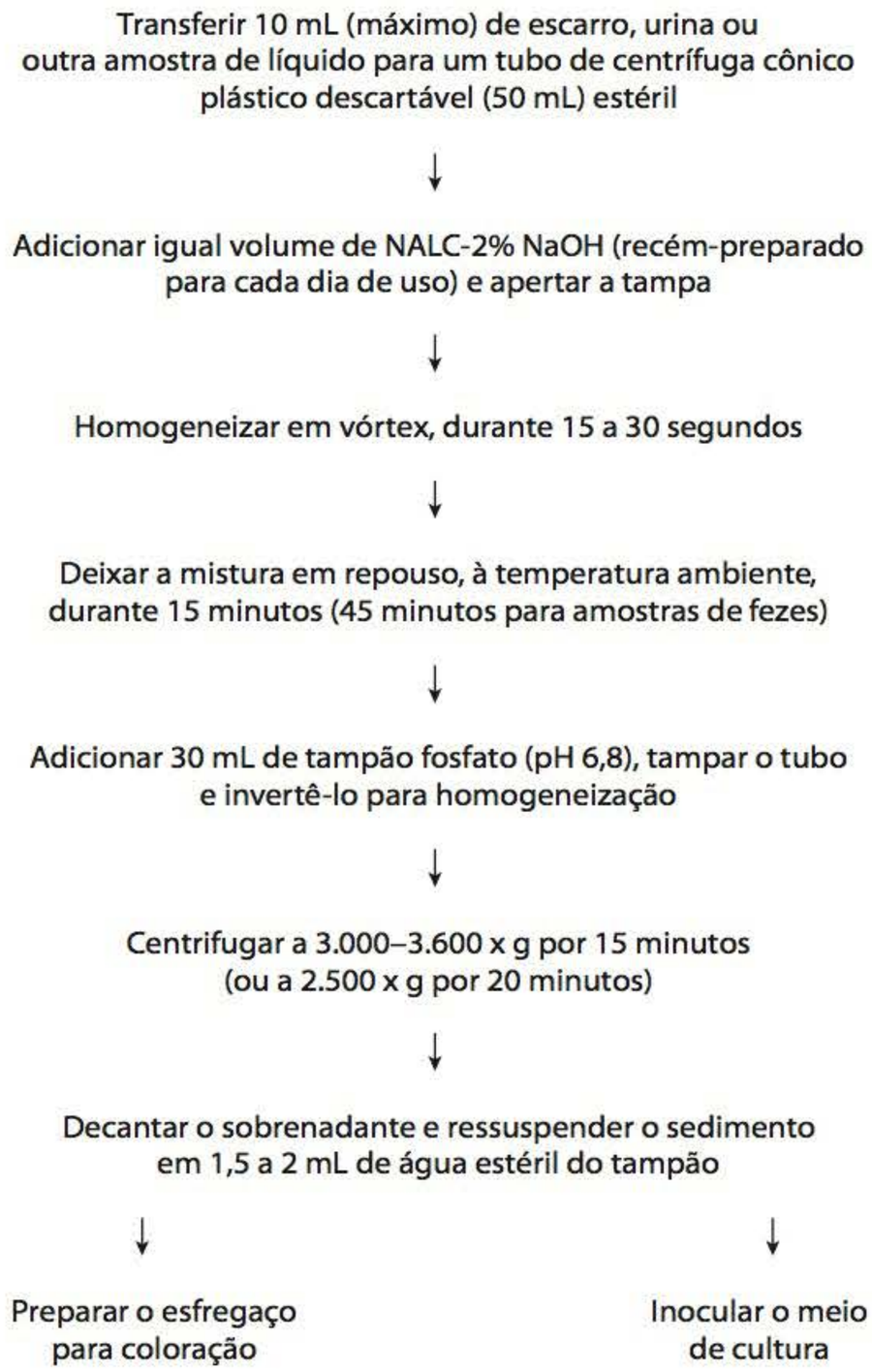


Figura 59.1 Protocolo de descontaminação, utilizando *N*-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio a 2%, e de concentração de amostras para detecção de micobactérias por esfregaço e cultura.

então, processada conforme descrito. As amostras de urina são distribuídas em 2 a 4 tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugadas a 3.000–3.600 x *g* durante 30 minutos. O sobrenadante é decantado e cerca de 2 mL de sedimento são deixados em cada tubo. Os tubos são homogeneizados em vórtex, os sedimentos são combinados e, se houver necessidade, adiciona-se água destilada até chegar a um volume de 10 mL. Em seguida, é feita a descontaminação, conforme descrito na Figura 59.1.

Colorações microbianas

Em esfregaços corados pela coloração Gram, a maioria das micobactérias aparece como bacilos Gram-positivos delgados fracamente corados. Contudo, alguns bacilos às vezes não captam nem o cristal violeta nem a safranina e são vistos como "Gram-neutros" ou "Gram-fantasmas" (Fig. 59.2). Imagens fantasmas de bacilos podem ser observadas em macrófagos em esfregaços corados com coloração de Wright ou de Papanicolaou. De forma geral, com exceção do sangue, as amostras coletadas de indivíduos com suspeita de infecção micobacteriana devem ser examinadas microscopicamente para detecção dos organismos. Todavia, para melhorar a relação custo-benefício, muitos laboratórios não preparam esfregaços de amostras em que raramente são encontrados BAR (p. ex., LCE, urina e medula óssea). Para preparar um esfregaço, 2 a 3 gotas de sedimento concentrado são espalhadas de modo uniforme sobre uma lâmina de microscopia que, em seguida, é fixada a 80°C por 15 minutos, ou por 1 a 2 horas a 65 a 70°C em placa quente elétrica.

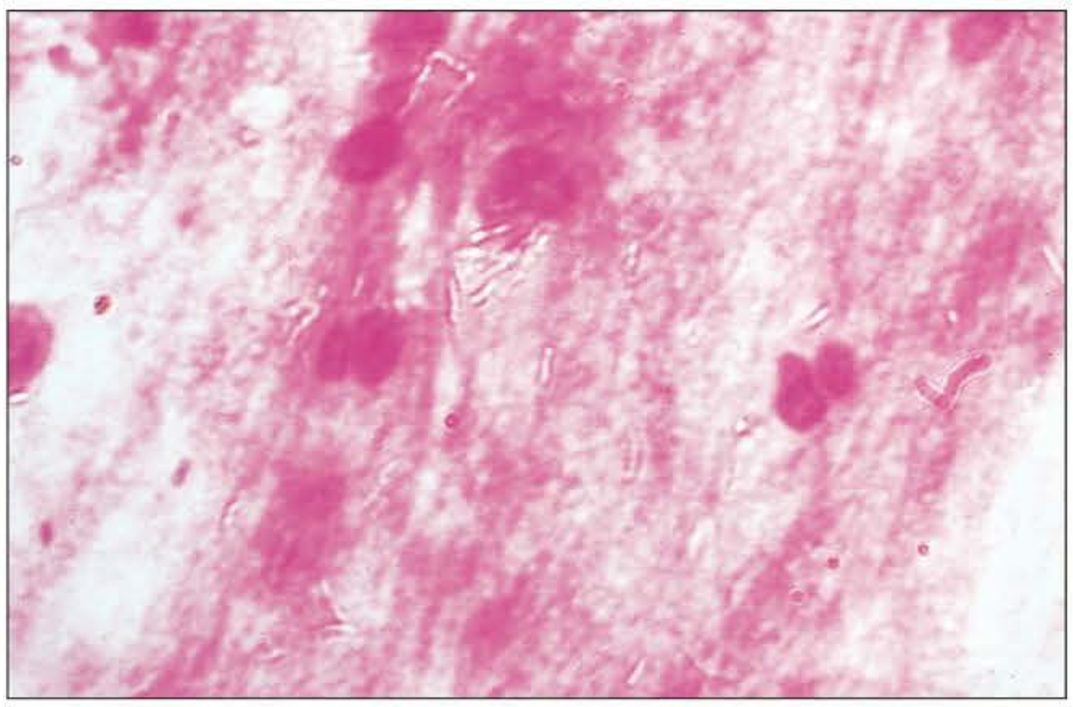


Figura 59.2 Esfregaço de uma amostra de escarro corada por coloração de Gram, mostrando "células fantasmas" (a cultura micobacteriana resultou no crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*: coloração de Gram, x 400).

Existem dois tipos de coloração que detectam BAR: a de carbol fucsina (a clássica coloração de Ziehl-Neelsen, que requer aquecimento, e a coloração à frio de Kinyoun) e a preferencial, a dos fluorocromos (auramina-rodamina e auramina-O), que são mais sensíveis. Os esfregaços corados pela coloração de carbol fucsina são examinados sob aumento de 800 a 1.000 × (óleo de imersão). Esfregaços corados com corantes fluorocromos são examinados sob menores aumentos (250 × e 400 ×), que permitem visualizar mais campos em menor tempo. As células de algumas micobactérias de crescimento rápido são fracamente coradas por fluorocromos corantes, podendo não ser detectadas. Por isso, diante da suspeita de que essas micobactérias sejam os patógenos de interesse (p. ex., em infecções de feridas pós-cirúrgicas), é razoável repetir a coloração de esfregaços fluorescentes negativos utilizando corante carbol fucsina. Os resultados são relatados após a observação de 100 campos, e devem incluir uma declaração indicando se o esfregaço foi preparado diretamente a partir da amostra ou depois da descontaminação e da concentração. A Tabela 59.5 mostra as diretrizes para relato de resultados de esfregaços corados para detecção de BAR (Kent, 1985).

Nos esfregaços corados com carbol fucsina, os BAR normalmente aparecem como hastes de cor púrpura a avermelhada levemente curvadas (1 a 10 μm de comprimento por 0,2 a 0,6 μm de largura), que muitas vezes exibem frisos ou faixas (Fig. 59.3) e também podem ter aspecto cocoide ou filamentoso. De uma forma geral, a aparência dos BAR não permite identificar a espécie. Entretanto, as células de algumas espécies apresentam características que podem ter utilidade diagnóstica. A formação de "cordões" em esfregaços de caldo de cultura é uma característica típica (embora não seja diagnóstica) de *M. tuberculosis*. As células *M. kansasii* com frequência são vistas como bacilos em barras cruzadas (Fig. 59.4), maiores do que as da *M. tuberculosis* e semelhantes a um "cajado de pastor". As células do MAC são normalmente pleiomórficas, às vezes cocobacilares, e positivas para coloração com ácido periódico de Schiff (PAS, *periodic-acid-Schiff*). As células de *M. marinum* são caracteristicamente mais longas e amplas do que as células da *M. tuberculosis* e, com frequência, apresentam bandas cruzadas. As células de *M. leprae* coram-se mais fracamente do que as células da maioria das demais micobactérias.

Normalmente, a especificidade das colorações por BAR é de 99% ou mais, enquanto a sensibilidade é da ordem de 25 a 75% (Strumpf, 1979; Murray, 1980; Rickman, 1980). Resultados falso-positivos (coloração positiva, cultura negativa) podem ser produzidos pela presença de organismos inviáveis, como pode acontecer com pacientes submetidos à terapia antituberculose após descontaminação prolongada, diante de destruição de micobactérias, assim como de bactérias contaminantes, ou em casos de contaminação cruzada durante o procedimento de coloração. Os fatores que influenciam a sensibilidade dos resultados do exame de esfregaços são: (1) população de pacientes (indivíduos com lesões cavitárias são mais propensos do que aqueles sem esse tipo de lesão a apresentarem positividade em esfregaços de escarro); (2) tipo de amostra (amostras respiratórias são mais propensas à positividade do que outros tipos de amostra); (3) número de amostras examinadas; (4) número de BAR presentes na amostra (para um resultado positivo, são necessários entre 5.000 e 10.000 organismos/mL de amostra); (5) espécies presentes na amostra (amostras contendo *M. tuberculosis* ou *M. kansasii* tendem mais à positividade do que aquelas que contêm outras micobactérias); (6) grau de experiência do examinador; e (7) corante utilizado. Os corantes fluorocromos são mais sensíveis e fáceis de interpretar do que o corante carbol fucsina e são recomendados por especialistas do CDC (Tenover, 1993). O CDC também sugere que, no caso de amostras respiratórias, os resultados do exame de esfregaços corados sejam relatados dentro de 24 horas após o recebimento da amostra, o que significa processá-las durante 7 dias por semana.

Tabela 59.5 Diretrizes para reportar a detecção de bacilos acidorresistentes em esfregaços

Nº de BAR com corante carbol fucsina (1.000×)	Nº de BAR com corantes fluorocromos (450×)	Relato
0	0	Ausência de BAR
1–2/300 C (3 varreduras)	1–2/70 C (1,5 varreduras)	Duvidoso; repetir
1–9/100 C	2–18/50 C (1 varredura)	1+
1–9/10 C	4–36/10 C	2+
1–9/C	4–36/C	3+
> 9/C	> 36/C	4+

BAR = bacilos acidorresistentes; C = campo; varredura = varredura em toda a extensão do esfregaço.

Fonte: modificado com permissão de Kent, PT; Kubica, GP: Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta, GA, Department of Health and Human Services, 1985.

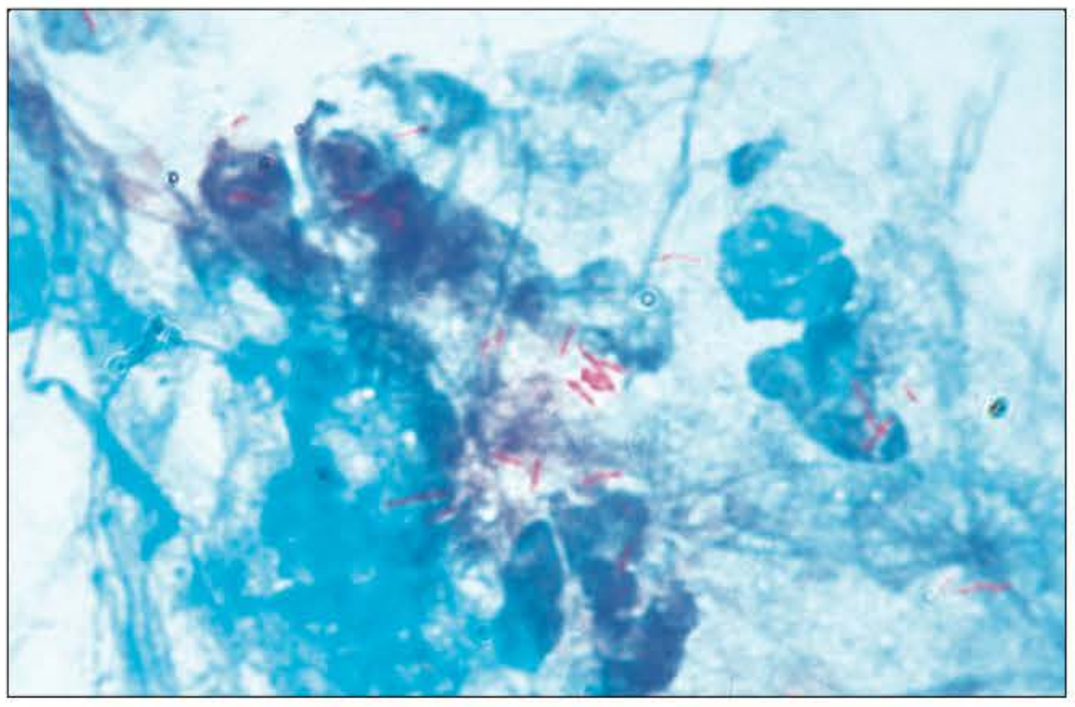


Figura 59.3 Esfregaço de amostra de escarro mostrando bacilos acidorresistentes (*Mycobacterium tuberculosis*; Kinyoun, x 400).

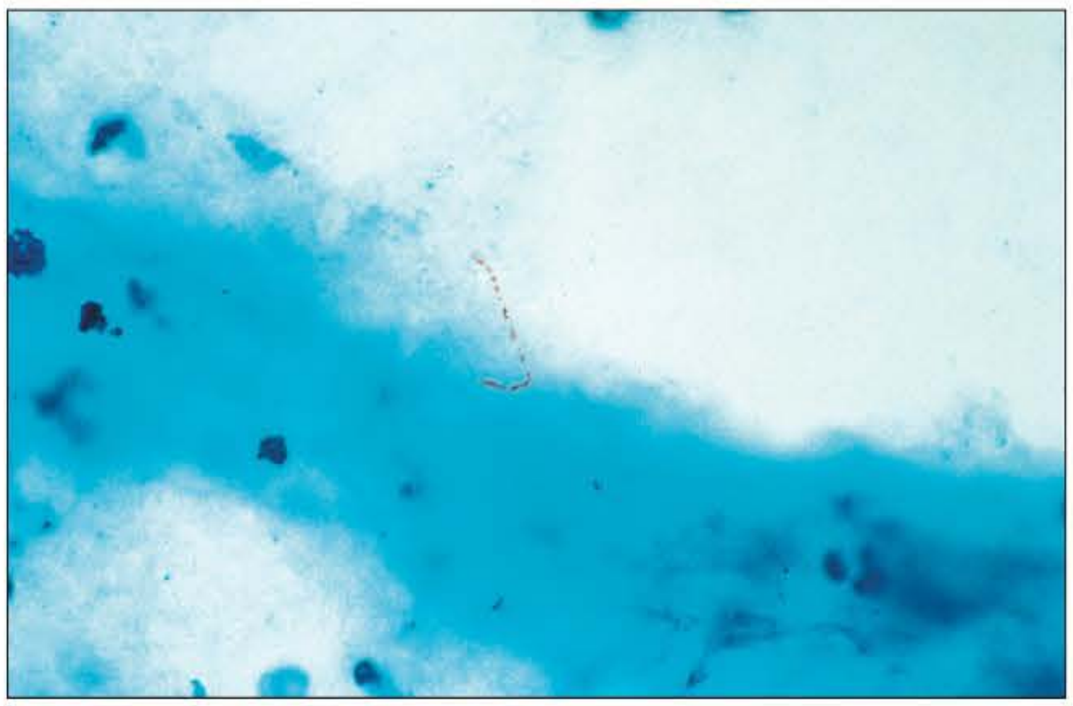


Figura 59.4 Esfregaço de um aspirado oriundo de linfonodo cervical aumentado, mostrando grandes bacilos acidorresistentes em barras cruzadas (*Mycobacterium kansasii*; Kinyoun, x 400). (cortesia de Vick J. Schnadig, M.D., Departamento de Patologia, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX.)

Métodos de cultura

Para obtenção do isolamento ótimo de micobactérias a partir de amostras clínicas, os especialistas do CDC recomendam inocular tanto um caldo quanto um meio de cultura sólido, e utilizar o sistema de cultura para detectar o crescimento micobacteriano em um período médio de 14 dias (Tenover, 1993). Em geral, o caldo é mais sensível do que o meio de cultura sólido e detecta mais rapidamente o crescimento das micobactérias (Stager, 1991; Anargyros, 1990; Abe, 1992). Os sistemas à base de caldo atualmente disponíveis são o sistema radiométrico BACTEC 460TB (BD Biosciences), SEPTI-CHEK AFB (BD Biosciences), BBL Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT; BD Biosciences), ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems) e BacT/Alert MB (Organon Teknika).

Dois tipos de meios de cultura sólidos são utilizados para culturas de micobactérias: à base de ovo (Löwenstein-Jensen) e à base de ágar (Middlebrook 7H10, 7H11 e 7H11 seletivo). Esses meios são disponibilizados em tubos com tampa de rosca e frascos, e os meios à base de ágar também são disponibilizados em placas de Petri. Em relação ao meios fornecidos em tubos com tampa rosqueada, os meios em frasco são preferíveis por questões de segurança e por fornecerem uma superfície de área maior para o crescimento micobacteriano. As amostras oriundas de lesões cutâneas devem ser inoculadas em meios à base de ovo ou de ágar e, para garantir a recuperação de *M. haemophilum* (ver adiante), também devem ser plaqueadas em meio de ágar chocolate, meio ágar Columbia contendo 5% de sangue de carneiro, meio ágar Mueller-Hinton com suplementação de Fildes, ou em meio Löwenstein-Jensen contendo citrato de amônio férrico a 2%. Para isolar *Mycobacterium genavense* (a partir de amostras ou subculturas de meio líquido em meio sólido), o meio sólido deve ser completado com micobactina J. Todas as culturas devem ser incubadas a 37°C sob atmosfera contendo 5 a 10% de CO_2, e os meios de cultura em tubos devem ser incubados em posição inclinada e com a tampa afrouxada no mínimo por 1 semana, a fim de garantir uma distribuição uniforme do inóculo sobre a superfície. Para amostras originárias de sítios cutâneos, um segundo conjunto de culturas deve ser inoculado e incubado a 30°C, pois algumas micobactérias causadoras de lesões cutâneas – *M. marinum, M. haemophilum, M. chelonae e M. ulcerans* – apresentam crescimento ótimo em temperaturas mais baixas. Todas as culturas devem ser examinadas semanalmente durante um período mínimo de 6 semanas.

A principal vantagem da cultura em meio sólido é que ela permite visualizar a morfologia e a pigmentação das colônias, que são características úteis ao diagnóstico, em especial para distinção das colônias de *M. tuberculosis* daquelas com MNT. A aparência da colônia e as características de crescimento das micobactérias mais comumente encontradas são destacadas na Tabela 59.6. As desvantagens associadas ao uso de meios sólidos comuns são o tempo prolongado de crescimento micobacteriano (as colônias muitas vezes não são visíveis nos meios sólidos contidos em tubos por 3 a 4 semanas ou mais) e a baixa sensibilidade. A inoculação de placas contendo ágar Middlebrook, as quais, em seguida, são examinadas por meio de microscópio, permite detectar as colônias mais rapidamente (Welch, 1993). No entanto, como se trata de um procedimento trabalhoso, seu uso é proibido em muitos laboratórios clínicos.

O sistema radiométrico semiautomatizado BACTEC TB460 emprega meios de caldo (um para sangue [13A] e outro destinado ao cultivo de todos os outros tipos de amostra [12B]) contendo substrato de ácido palmítico marcado com ^{14}C. Cada amostra é inoculada em um frasco, e uma mistura de antibióticos é adicionada a todos os tipos de amostra, exceto nas amostras de sangue. Os frascos são incubados sob atmosfera ambiente a 37°C por um período de 5 a 6 semanas. Para garantir a recuperação de *M. genavense*, culturas de sangue (em especial do sangue coletado de pacientes com AIDS) devem ser incubadas por 8 a 10 semanas. Os bacilos multiplicam-se no caldo e utilizam o substrato marcado, liberando $^{14}CO_2$ no espaço anterior, acima do caldo. As garrafas são manualmente carregadas no BACTEC TB460, que quantifica a concentração de $^{14}CO_2$ e calcula um índice de crescimento (IC). Um IC maior que 10 sugere a presença de micobactérias, e, quando o IC atinge 50 a 100, é feito um esfregaço com amostra de caldo corada para detecção de BAR. Frascos contendo BAR são subcultivados em meio sólido e podem ser realizados testes diretos (discutidos na próxima seção) para identificação dos organismos. Culturas de sangue de pacientes aidéticos positivas para micobactérias

Tabela 59.6 Morfologia das colônias e características de crescimento de micobactérias comumente isoladas em laboratório clínico

Espécies de *Mycobacterium*	Morfologia da colônia	Pigmento	Velocidade de crescimento (semanas)	Comentários
Micobactérias de crescimento lento				
M. tuberculosis	Rugosa	N (castanho-amarelado)	3–6	Em geral, positiva para niacina e nitrato
M. bovis	Rugosa; delgada ou transparente ao LJ	N (incolor a castanho-amarelado)	4–6	Em geral, negativa para niacina e nitrato; resistente à PZA
Complexo de *M. avium*	Lisa; pequena, delgada, transparente ou ampla, opaca, abobadada; ± rugosa	N	3–6	As colônias de alguns isolados tornam-se levemente pigmentadas após a incubação prolongada; cresce a 42°C
M. kansasii	Rugosa, ± lisa, cristais de β-caroteno	F	3–6	Poucas cepas são N ou E
M. gordonae	Lisa	E	3–6	Contaminante comum em laboratórios; poucas cepas são N
M. marinum	Enrugada, brilhante; lisa, hemisférica; (raramente) rugosa e seca	F	2	Crescimento ótimo a 30–33°C
M. xenopi	Lisa, extensões filamentosas ("ninho de passarinho")	E	3–6	Cresce a 42°C
M. simiae	Lisa	F (±N)	3–6	A produção de pigmento frequentemente requer exposição prolongada à luz
M. haemophilum	Rugosa, ± lisa	N	3–6	Crescimento ótimo a 20–32°C; requer hemina para crescer
M. malmoense	Lisa, disgônica	Incolor	2–3	
Complexo de *M. terrae*	Lisa (*M. terrae*), rugosa (*M. triviale*), intermediária (*M. nonchromogenicum*)	N	3–6	
M. scrofulaceum	Lisa, globoide	E	2–3	
M. szulgai	Lisa ou rugosa	E (37°C); F (25°C)	3–6	
Micobactérias de crescimento rápido				
M. abscessus	Lisa; ± rugosa, enrugada	N	< 1	
Grupo de *M. fortuitum*	Enrugada	N	< 1	Filamentos ramificados frequentemente estão presentes na periferia das colônias
M. chelonae	Lisa	N	< 1	
M. mucogenicum	Lisa, usualmente mucoide	N	< 1	

N = não cromogênico; F = fotocromogênico; E = escotocromogênico; PZA = pirazinamida.

devem ser subcultivadas em ágar Middlebrook 7H11 contendo micobactina J com o intuito de isolar *M. genavense*, caso as subculturas iniciais feitas a partir do caldo não tenham apresentado crescimento. Alternativamente, o caldo positivo deve ser enviado a um laboratório de referência que esteja preparado para realizar os devidos testes.

O SEPTIC-CHEK AFB é um sistema de cultura micobacteriana bifásico, que consiste em uma pá fechada contendo caldo e meio ágar, de modo semelhante ao sistema de cultura de sangue bifásico descrito no Capítulo 63. O caldo é inoculado com a amostra, a pá é presa ao topo da garrafada, e o sistema é invertido para permitir que o caldo flua sobre o meio ágar. O sistema é incubado por 6 a 8 semanas a 35 a 37°C, sob atmosfera contendo 5 a 7% de CO_2. A intervalos regulares, o sistema é invertido para que o caldo seja subcultivado no meio sólido contido na pá. A sensibilidade desse sistema é similar à sensibilidade do BACTEC TB460 (D'Amaro, 1991; Isenberg, 1991; Abe, 1992). Por outro lado, o tempo para detecção do crescimento é maior do que o do BACTEC TB460, ainda que seja mais rápido do que no meio sólido convencional.

O sistema MGIT consiste de 4 mL de caldo 7H9 modificado e de um indicador fluorescente imerso em silicone no fundo de um tubo de vidro (16 x 100 mm). Os tubos são inoculados com a amostra, uma mistura antibiótica para inibir o crescimento de bactérias contaminantes e um enriquecedor de crescimento micobacteriano são adicionados, e os tubos são tampados e incubados a 37°C por até 8 semanas. Para detectar o crescimento micobacteriano, os tubos são manualmente posicionados no topo de um transiluminador UV (365 nm) ou na frente de uma lâmpada de Wood. O crescimento é indicado pelo aparecimento de uma forte fluorescência no sensor (uma cor alaranjada brilhante no fundo do tubo e no menisco). Alternativamente, os tubos podem ser incubados no aparelho BACTEC TB460, que é totalmente automatizado e que monitora os tubos de modo contínuo para detecção de fluorescência e sinais de positividade. O MGIT é tão sensível quanto o BACTEC TB460 em termos de recuperação de micobactérias, no entanto o tempo médio de detecção de crescimento é poucos dias mais demorado no MGIT (Cornfield, 1997; Pfyffer, 1997b; Hanna, 1999).

Além do BACTEC MGIT 960, também são comercializados outros três sistemas totalmente automatizados de monitoramento contínuo de crescimento e detecção de micobactérias: BACTEC 9000MB system (BD Biosciences) (Pfyffer, 1997a; Zanetti, 1997), MB/BacT system (Organon Teknika) (Rohner, 1997; Brunello, 1999) e ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems) (Tholcken, 1997; Woods, 1997). Em cada um desses sistemas, garrafas são incubadas no respectivo aparelho, então são monitoradas quanto às alterações na produção ou na produção e no consumo de diversos gases, indicando crescimento de micobactérias ou outros organismos. Em geral, esses sistemas apresentam desempenho comparável ao do BACTEC TB460, contando ainda com as vantagens de serem totalmente automatizados (portanto, menos trabalhosos) e não radiométricos.

Testes de identificação de micobactérias

A identificação das micobactérias tem sido tradicionalmente baseada no grau de velocidade de crescimento em meio sólido, morfologia das colônias, pigmentação das colônias com e sem exposição à luz, e resultados de testes bioquímicos (detalhados em outra seção [Kent, 1985]). Os resultados dos testes bioquímicos, contudo, usualmente permanecem indisponíveis por várias semanas e até por meses após o aparecimento das colônias em meio sólido, sendo recomendados métodos mais rápidos para fins de identificação sobretudo de MTBC (Tenover, 1993). Além disso, ao nível de espécie, o teste bioquímico com frequência fornece identificações equivocadas.

Atualmente, o método mais rápido de diagnóstico de tuberculose pulmonar emprega o teste de amplificação de ácido nucleico para detecção direta de MTBC em amostras clínicas (Piersimoni, 2003). Esses testes, entretanto, não diferenciam as espécies do MTBC. Dois testes de amplificação de ácido nucleico para testar amostras respiratórias são disponibilizados mundialmente: Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (GenProbe, Inc.) e AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test (Roche Diagnostic Systems, Inc.). O BDProbeTec ET System (BD Biosciences) encontra-se disponível somente fora dos Estados Unidos. O ensaio AMPLICOR foi liberado pelo Food and Drug Administration (FDA) apenas para testes de detecção de BAR em esfregaços positivos de amostras respiratórias. O teste Gen-Probe é aprovado para testar esfregaços positivos e negativos de amostras respiratórias. Dados sugerem que os testes de amplificação de ácido nucleico podem ser úteis em casos de pacientes com esfregaço negativo para BAR que apresentem risco elevado de desenvolver tuberculose (p. ex., indivíduos infectados com HIV e prisioneiros encarcerados em instituições correcionais), permitindo que o diagnóstico e o início do tratamento sejam mais rápidos (Gamboa, 1998; Bergmann, 1999). A sensibilidade dos testes de amplificação de ácido nucleico em geral é discretamente menor para amostras não respiratórias, contudo esses testes podem ser úteis para o diagnóstico de alguns casos de tuberculose extrapulmonar, em especial quando o esfregaço é positivo para BAR.

O teste BACTEC TB NAP (para-nitro-α-acetil-amino-β-hidroxipropiofenona) diferencia os membros do MTBC das MNT dentro de 4 a 5 dias após a detecção de BAR em um frasco de BACTEC 12B (Gross, 1985). Um volume de caldo proveniente do frasco 12B positivo é injetado em duas novas garrafas contendo meio 12B, uma com e a outra sem NAP. Um aumento do IC na garrafa sem NAP e a ausência de aumento do IC na garrafa com NAP indicam que o isolado pertence ao MTBC, pois somente as espécies desse complexo são suscetíveis e, consequentemente, inibidas pelo NAP. Esse teste, contudo, não diferencia as espécies do MTBC.

As sondas de DNA quimioluminescentes permitem a identificação de algumas espécies ou de complexos de espécies de micobactérias dentro de 1 a 2 horas após a ocorrência de níveis de crescimento suficientes (em meio sólido ou líquido) (Evans, 1992; Goto, 1992; Lebrun, 1992; Reisner, 1994). Correntemente, são disponibilizadas sondas comerciais específicas para MTBC, MAC, *M. avium, M. intracellulare, M. gordonae* e *M. kansasii*. O teste requer aparelhagem mínima (i. e., medidor de luminescência, sonicador e placa de aquecimento). Entre as desvantagens associadas às sondas, estão a falha em identificar alguns isolados de MAC, especialmente em testes de crescimento a partir de meio líquido, os resultados falso-positivos com a sonda para MAC, ao testar alíquotas de culturas de caldo, e os raros resultados falso-positivos com a sonda para MTBC (Bull, 1992; Lebrun, 1992; Butler, 1994).

A cromatografia líquida de alto desempenho permite a identificação de colônias de micobactérias em meio sólido ou crescimento em meio líquido em um período de 2 a 4 horas. O método de identificação mais sofisticado é o sequenciamento das regiões hipervariáveis de genes de RNA ribossômico 16S (Patel, 2000; Cloud, 2002; Hall, 2003). Ambas as técnicas, que são tecnicamente mais complexas e requerem equipamentos caros, são realizadas predominantemente em laboratórios de pesquisa e em grandes laboratórios de referência.

Teste de suscetibilidade

Atualmente, existem diretrizes padronizadas para o teste de suscetibilidade micobacteriana (Clinical and Laboratory Standards Institute, antigo National Committee for Clinical and Laboratory Standards, 2003). O teste para MTBC pode ser realizado em colônias isoladas, ou em uma cultura de caldo positiva (teste indireto) ou com amostras de escarro cujo esfregaço apresentou positividade para BAR (teste direto). A proporção de ágar constitui o método padrão de teste de suscetibilidade de MTBC a agentes antituberculose. Nesse método, os isolados que apresentam mais de 1% de resistência a uma única concentração de fármaco são considerados resistentes a esse fármaco. Entretanto, como o tempo de resposta mínimo dos resultados é de 21 dias após a inoculação das placas, recomenda-se utilizar um sistema à base de líquido aprovado pelo FDA que seja capaz de fornecer resultados equivalentes aos do teste de proporção de ágar (Tenover, 1993; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Com os atuais sistemas à base de líquido disponíveis, os resultados em geral ficam prontos em 5 a 7 dias após a inoculação das garrafas (Bergmann, 1998, 2000; Scarparo, 2004).

O teste de suscetibilidade pode ser realizado com isolados de importância clínica do grupo das MNT (Wallace, 1997; Clinical and Laboratory Standards Institute). Entretanto, no caso de algumas espécies, pode existir pouca correlação entre os resultados do teste de suscetibilidade e a resposta clínica à terapia farmacológica. Para isolados

de micobactérias de crescimento rápido, recomenda-se fazer o teste de microdiluição em caldo com amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina (ou minociclina), imipinem (apenas para *M. fortuitum*), sulfametoxazol (ou trimetoprin-sulfametoxazol) e tobramicina (apenas para *M. chelonae*) (Woods, 1999; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). A diluição em caldo (seja a macro ou a microdiluição) deve ser utilizada apenas para testar a suscetibilidade de isolados de MAC à claritromicina (os resultados referentes à claritromicina predizem os resultados para azitromicina) (Inderlied, 1997; Wallace, 1997; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Os isolados de *M. kansasii*, a princípio, devem ser submetidos somente ao teste de suscetibilidade à rifampina. A *M. kansasii* suscetível à rifampina deve ser testada contra rifabutina, etambutol, estreptomicina, claritromicina, amicacina, ciprofloxacina e sulfametoxazol (ou trimetoprin-sulfametoxazol).

Tratamento

Os isolados iniciais de MTBC provenientes de todos os pacientes com tuberculose devem ser testados quanto à suscetibilidade aos agentes antituberculose primários isoniazida, rifampina, pirazinamida e etambutol. O teste de suscetibilidade deve ser repetido se o paciente continuar a produzir culturas de escarro positivas após 3 meses de terapia (Tenover, 1993). Caso o isolado seja resistente apenas à rifampina ou a dois ou mais agentes primários, também deve ser avaliada a suscetibilidade aos fármacos secundários (estreptomicina, etionamida, canamicina, capreomicina, ofloxacina e rifabutina). O regime quimioterápico geralmente recomendado para tratamento da tuberculose (Tab. 59.7) deve ser iniciado antes da disponibilização dos resultados do teste de suscetibilidade. Por outro lado, o tratamento deve ser alterado com base nesses resultados, caso seja constatado que o isolado é resistente. As medicações devem ser administradas por meio da terapia diretamente observada. Os regimes comumente utilizados no tratamento de infecções causadas pela maioria das MNT mais frequentes também estão listados na Tabela 59.7 (Wolinsky, 1979; Wallace, 1983, 1994, 1997; Inderlied, 1993; Brown-Elliot, 2002). Para muitas MNT, a duração ideal da terapia é desconhecida, no entanto os intervalos indicados na Tabela 59.6 têm sido bem-sucedidos em certos casos.

Tabela 59.7 Tratamento de infecções produzidas por micobactérias patogênicas de ocorrência comum

Espécies de *Mycobacterium*	Cirurgia	Agentes antimicrobianos terapêuticos	Duração (meses)
*M. tuberculosis**	–	INH, RIF, EMB, e PZA	6
Complexo de *M. avium*	±	CLARI (ou AZITHRO), RIF (ou RBT) e EMB	Até a cultura negativar 12
Pulmonar			
Disseminado	–	CLARI (ou AZITHRO) e EMB, ± RBT	Por toda a vida
Linfadenite	+	–	
M. kansasii	–	INH, RIF e EMB	18
M. marinum	±	CLARI, DOX, SXT, ou RIF e EMB	1–2, após a resolução clínica (mínimo 3)
Grupo de *M. fortuitum*†	±	AMK, CFX, IMI, SXT, QUIN‡, LNZ	1–2, após a resolução clínica
M. chelonae†	±	CLARI, TOBRA, IMI, GATI (ou MOXI)	1–2, após a resolução clínica
M. abscessus†	±	CLARI, AMK, IMI, CFX, GATI (ou MOXI)	1–2, após a resolução clínica

(–) = não indicado; (±) = pode ser indicado; (+) = definitivamente indicado; AZITHRO = azitromicina; CLARI = claritromicina; DOX = doxiciclina; EMB = etambutol; GATI = gatofloxacina; IMI = imipenem; INH = isoniazida; LNZ = linezolida; MOXI = moxifloxacina; PZA = pirazinamida; QUIN = quinolona; RBT = rifabutina; RIF = rifampina; SXT = trimetoprim-sulfametoxazol.

* A pirazinamida é administrada apenas durante os primeiros 2 meses; o etambutol pode ser suspendido, caso o isolado seja suscetível à isoniazida e à rifampina. Esse regime destina-se somente a isolados fármaco-sensíveis. † O regime é baseado nos resultados do teste de suscetibilidade. A doença grave é tratada com uma terapia de combinação de dois ou três fármacos. ‡A maioria dos isolados é suscetível à ciprofloxacina, à levofloxacina, à gatifloxacina e à moxifloxacina.

Prevenção

Mycobacterium tuberculosis

Foram descritas quatro estratégias gerais de controle da tuberculose (Centers for Disease Control and Prevention, 1988). A mais importante é a identificação precoce e o tratamento adequado de indivíduos com tuberculose infecciosa. Em poucas semanas, essa medida torna não contagioso o indivíduo infectado e consequentemente resulta em cura. A segunda estratégia requer a identificação e o tratamento de indivíduos com tuberculose não infecciosa: doença extrapulmonar, doença pulmonar primária em crianças, doença pulmonar bacteriologicamente não confirmada e infecção por *M. tuberculosis* que ainda não tenha produzido a doença (i. e., positividade no teste cutâneo positivo ou no Quantiferon Gold, radiografia torácica normal, ausência de sintomas).

A terceira estratégia envolve a criação de um ambiente seguro em situações em que o alto risco de transmissão da infecção seja alto: salas de autópsia, cubículos de indução de expectoração, áreas de espera clínica torácica, instituições de correção, certos abrigos para moradores de rua e laboratórios de micobacteriologia. Para tanto, é preciso tratar de diversos aspectos (Segal-Maurer, 1994). Recintos que abrigam pacientes infectados ou onde amostras potencialmente infecciosas são manuseadas devem permanecer sob pressão negativa. Além disso, o ar que provavelmente esteja contaminado por núcleos de gotículas infecciosas deve ser removido com auxílio de exaustor. Recomenda-se adotar um sistema de ventilação de passagem única (mais efetivo com a instalação de saídas de suprimento de ar à altura do teto e de entradas próximas ao chão) e pelo menos seis trocas de ar/hora (12 trocas/hora em salas de autópsia). Medidas preventivas universais devem ser adotadas ao manusear todas as amostras, sendo que tanto as amostras como as culturas devem ser manipuladas dentro de uma cabine de segurança biológica de classe II devidamente certificada. Além disso, é necessário utilizar um respirador que filtre partículas de 1 a 5 μm de diâmetro, e a equipe de funcionários deve ser treinada em um programa respiratório; a máscara cirúrgica padrão não é adequada.

A quarta estratégia consiste na vacinação com BCG, uma vacina atenuada que foi derivada de uma cepa de *M. bovis* por Calmette e Guérin na França. A eficácia da vacina BCG na prevenção da tuberculose é controversa, porém uma metanálise da literatura sugeriu que essa vacina reduz o risco de tuberculose em 50% (Colditz, 1994). Nos Estados Unidos, a vacina BCG é recomendada apenas para bebês e crianças com resultado negativo nos testes cutâneos de tuberculina e que pertençam a grupos seletos da população (Centers for Disease Control and Prevention, 1988): (1) indivíduos que estão sujeitos à exposição íntima e prolongada de alto risco à tuberculose pulmonar e não podem ser removidos da fonte de exposição, bem como para aqueles aos quais não é possível instituir a terapia preventiva de longa duração; (2) aqueles que ficam expostos de modo contínuo a indivíduos com tuberculose causada por cepas resistentes à isoniazida e rifampina; e (3) indivíduos pertencentes a grupos cujas taxas de novas infecções sejam superiores a 1% ao ano, e para os quais programas usuais de vigilância e tratamento têm sido empreendidos mas não são viáveis. A vacina BCG não é recomendada para profissionais da área de saúde nos Estados Unidos. A atual recomendação destinada à proteção desses trabalhadores é a vigilância adequada, que inclua a realização periódica de testes cutâneos de tuberculina ou de testes Quantiferon Gold (ao menos uma vez por ano, e mais frequentemente para os grupos de alto risco) e a terapia preventiva com isoniazida para indivíduos recentemente convertidos de negativos a positivos no teste cutâneo de tuberculina, e para aqueles com positividade no teste cutâneo de tuberculina que mantenham contato próximo com indivíduos com tuberculose ou com certas condições médicas, tais como diabetes, insuficiência renal ou imunossupressão associada à terapia ou à doença (Centers for Disease Control and Prevention, 1988).

A vacina BCG não deve ser administrada em indivíduos imunocomprometidos, devendo ser dada com cautela àqueles que correm

risco de serem infectados pelo HIV. A disseminação de *M. bovis* em pacientes com AIDS e de linfadenite causada por *M. bovis* em bebês sintomáticos infectados pelo HIV foram observadas após a vacinação com BCG (Centers for Disease Control and Prevention, 1986). Entretanto, não há relatos de disseminação de *M. bovis* em pacientes assintomáticos infectados pelo HIV. Em populações nas quais o risco de contrair tuberculose é alto, a Organização Mundial da Saúde recomenda que a vacina BCG seja administrada a crianças infectadas pelo HIV ao nascerem ou logo depois disso. Essa vacina não deve ser aplicada em crianças com infecção por HIV sintomática ou, em populações com baixo risco de desenvolvimento de tuberculose, em indivíduos comprovadamente infectados ou com suspeita de infecção pelo HIV (World Health Organization, 1987).

Complexo *Mycobacterium avium*

A disseminação do MAC em pacientes com AIDS está associada a uma considerável morbidade e ao encurtamento da duração da sobrevida (Horsburgh, 1991b; Nightingale, 1992). Portanto, a prevenção da doença é desejável. Como o MAC está amplamente distribuído no ambiente, a abordagem preventiva mais razoável é a quimioprofilaxia. Geralmente, o United States Public Health Service (Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos) e a Infectious Diseases Society of America (Sociedade de Doenças Infecciosas da América) recomendam a profilaxia com claritromicina ou azitromicina para pacientes aidéticos com contagens de células T $CD4^+$ inferiores a 50 células/μL (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Caso nenhum desses fármacos possa ser tolerado, a rifabutina é um agente profilático alternativo contra a doença causada por MAC.

Referências bibliográficas

Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al: Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1992; 30:878–881.

Anargyros P, Astill DSJ, Lim ISL: Comparison of improved BACTEC and Lowenstein–Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol 1990; 28:1288–1291.

Bergmann, JS, Fish G, Woods GL: Evaluation of the BBL MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) AST SIRE system for antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to 4 primary antituberculous drugs. Arch Pathol Lab Med 2000; 124:82–86.

Bergmann, JS, Woods GL: Evaluation of the ESP culture system II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary antituberculous drugs. J Clin Microbiol 1998; 36:2940–2943.

Bergmann JS, Yuoh G, Fish G, Woods GL: Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe amplified mycobacterium direct test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. J Clin Microbiol 1999; 37:1419–1425.

Binford CH, Meyers WM, Walsh GP: Leprosy. JAMA 1982; 247:2283–2292.

Blacklock ZM, Dawson DJ, Kane DW, McEvoy D: *Mycobacterium asiaticum* as a potential pulmonary pathogen for humans: a clinical and bacteriologic review of five cases. Am Rev Respir Dis 1983; 127:241–244.

Blake LA, West BC, Lary CH, et al: Environmental nonhuman sources of leprosy. Rev Infect Dis, 1987; 9:562–567.

Blanche S, LeDeist F, Fischer A: Longitudinal study of 18 children with perinatal LAV/HTLV III infection: attempt at prognostic evaluation. J Pediatr 1986; 109:965–970.

Brown-Elliott AB, Wallace RJ Jr: Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2002; 15:716–746.

Excelente revisão da taxonomia de micobactérias de crescimento rápido. Também inclui uma discussão sobre os testes laboratoriais para identificação e os padrões de suscetibilidade antimicrobiana.

Brunello F, Favari F, Fontana R: Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. J Clin Microbiol 1999; 37:1206–1209.

Buhler VB, Pollak A: Human infection with atypical acid-fast organisms. Am J Clin Pathol 1953; 23:363–374.

Bull TJ, Shanson DC: Rapid misdiagnosis by *Mycobacterium avium-intracellulare* masquerading as tuberculosis in PCR/DNA probe tests. Lancet 1992; 340:1360.

Butler WR, O'Connor SP, Yakrus MA, et al: Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum.* J Clin Microbiol 1994; 32:536.

Casimir MT, Fainstein V, Papadopolous N: Cavitary lung infection caused by *Mycobacterium flavescens.* South Med J 1982; 75:253.

Castets M, Boisvert H, Grumback F, et al: Les bacilles tuberculeux de type africaine. Rev Tuberc Pneumol 1968; 32:179.

Centers for Disease Control and Prevention: Disseminated *Mycobacterium bovis* infection from BCG vaccination of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Morbid Mortal Wkly Rev 1985; 34:227.

Centers for Disease Control and Prevention: Use of BCG vaccines in the control of tuberculosis: a joint statement by the ACIP and the Advisory Committee for the Elimination of Tuberculosis. Morbid Mortal Wkly Rev 1988; 37:663.

Centers for Disease Control and Prevention: *Mycobacterium haemophilum* infection – New York City Metropolitan Area, 1990–1991. Morbid Mortal Wkly Rev 1991; 40:636.

Centers for Disease Control and Prevention: Summary of notifiable diseases, United States, 1992. Morbid Mortal Wkly Rev 1993; 41:59.

Centers for Disease Control and Prevention: USPHS/IDSA guidelines for prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Morbid Mortal Wkly Rev 1997; 46(RR-12):1.

Centers for Disease Control and Prevention: Tuberculosis morbidity – United States, 1997. Morbid Mortal Wkly Rev 1998; 47:253.

Centers for Disease Control and Prevention: Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992–1997. Morbid Mortal Wkly Rev 1999; 48(SS-2):1.

Centers for Disease Control and Prevention: Trends in Tuberculosis – United States, 1998–2003. Morbid Mortal Wkly Rev 2004; 53:209–14.

Chaisson RE, Schecter GF, Theuer CP, et al: Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: clinical features, response to therapy, and survival. Am Rev Respir Dis 1987; 136:570.

Cianciulli FD: The radish bacillus (*Mycobacterium terrae*): saprophyte or pathogen? Am Rev Respir Dis 1974; 109:138.

Clinical and Laboratory Standards. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard M24-A. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, et al: Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. J Clin Microbiol 2002; 40:400–406.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al: Efficacy of BCG vaccine in prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. JAMA 1994; 271:698.

Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, et al: Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture system. J Clin Microbiol 1997; 35:2068.

Costrini AM, Mahler DA, Gross WM, et al: Clinical and roentgenographic features of nosocomial pulmonary disease due to *Mycobacterium xenopi.* Am Rev Respir Dis 1981; 123:104.

Coyle MB, Carlson LC, Wallis CK, et al: Laboratory aspects of '*Mycobacterium genavense,*' proposed species isolated from AIDS patients. J Clin Microbiol 1992; 30:3206.

D'Amato RF, Isenberg HD, Hochstein L, et al: Evaluation of the Roche Septi-Chek AFB system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1991; 29:2906.

Davison MB, McCormack JG, Blacklock ZM, et al: Bacteremia caused by *Mycobacterium neoaurum.* J Clin Microbiol 1988; 26:762.

DeChairo DC, Kittredge D, Meyers A, et al: Septic arthritis due to *Mycobacterium triviale.* Am Rev Respir Dis 1973; 108:1224.

Desmond E, Ahmed AT, Probert WS, et al: *Mycobacterium africanum* cases, California. Emerg Infect Dis 2004; 10:921–923.

Dhillon SS, Watanakunakorn C: Lady Windermere syndrome: middle lobe bronchiectasis and *Mycobacterium avium* complex infection due to voluntary cough suppression. Clin Infect Dis 2000; 30:572.

Edwards MS, Huber TW, Baker CJ: *Mycobacterium terrae* synovitis and osteomyelitis. Am Rev Respir Dis 1978; 117:161.

Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, et al: Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. J Infect Dis 1993; 168:537.

Evans KD, Nakasone AS, Sutherland PA, et al: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* directly from primary BACTEC cultures by using acridinium-ester-labeled DNA probes. J Clin Microbiol 1992; 30:2427.

Falkinham JO, III: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996; 9:177.

Revisão aprofundada sobre a epidemiologia das micobactérias não tuberculosas mais comumente encontradas, tais como complexo M. avium, M. kansasii e M. marinum, bem como M. simiae e M. xenopi.

Feldman RA, Hershfield E: Mycobacterial skin infection by an unidentified species. A report of 29 patients. Ann Intern Med 1974; 80:445.

Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al: Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:684.

Good RC, Snider DE Jr: Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States. J Infect Dis 1982; 146:829.

Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al: Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium-intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol 1992; 30:2473.

Grange JM, Collins CH: Bovine tubercle bacilli and disease in animals and man. Epidemiol Infect 1987; 92:221.

Gross WM, Hawkins JE: Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis,* and other mycobacteria. J Clin Microbiol 1985; 21:565.

Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, et al: Evaluation of the MicroSeq System for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 2003; 41:1447–1453.

Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al: Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 System for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1999; 37:748.

Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, et al: Leprosy. Clin Microbiol Rev 1988; 1:330.

Henriques B, Hoffner SE, Petrini B, et al: Infection with *Mycobacterium malmoense* in Sweden: report of 221 cases. Clin Infect Dis 1993; 18:596.

Horsburgh CR Jr: *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1991a; 324:1332.

Horsburgh CR Jr, Havlik JA, Illis DA, et al: Survival of patients with acquired immune deficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy. Am Rev Respir Dis 1991b; 144:557.

Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr: The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17:968.

Inderlied CB: Microbiology and minimum inhibitory concentration testing for *Mycobacterium avium* complex prophylaxis. Am J Med 1997; 102:2.

Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM: The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 1993; 6:266.

Isenberg HD, D'Amato RF, Heifets L, et al: Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. J Clin Microbiol 1991; 29:1719.

Karassova V, Weiszfeiler J, Krasznay E: Occurrence of atypical mycobacteria in macacus rhesus. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1965; 12:275.

Karlson AG, Carr DT: Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis.* Ann Intern Med 1970; 73:979.

Kent PT, Kubica GP: Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA, Department of Health and Human Services, 1985.

Kim JH, Langston AA, Gallis HA: Miliary tuberculosis: epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and outcome. Rev Infect Dis 1990; 12:583.

Kristjansson M, Green P, Manning HL, et al: Molecular confirmation of bacillus Calmette–Guérin as the cause of pulmonary infection following urinary tract instillation. Clin Infect Dis 1993; 17:228.

Lebrun L, Espinasse R, Poveda JD, et al: Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1992; 30:2476.

Lomwardias S, Madge GE: Chaetoconidium and atypical acid-fast bacilli in skin ulcers. Arch Dermatol 1972; 106:875.

Lumpkin LR III, Cox GF, Wolf JE: Leprosy in five armadillo handlers. J Am Acad Dermatol 1983; 9:899.

Maschek H, Georgii A, Schmidt RE, et al: *Mycobacterium genavense* autopsy findings in three patients. Am J Clin Pathol 1994; 101:95.

Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, et al: Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. J Clin Microbiol 2004; 42:3594–3599.

Murray CJ, Styblo K, Rouillon A: Tuberculosis in developing countries: burden, intervention, and cost. Bull Int Union Tuberc Lung 1990; 65:6.

Murray PR, Elmore C, Krogstad D: The acid-fast stain: a specific and predictive test for mycobacterial disease. Ann Intern Med 1980; 92:512.

Diretrizes para testes de suscetibilidade ao complexo M. tuberculosis, micobactérias de crescimento rápido e micobactérias de crescimento lento selecionadas, incluindo M. avium, M. kansasii e M. marinum.

Neeley SP, Denning DW: Cutaneous *Mycobacterium thermoresistible* infection in a heart transplant recipient. Rev Infect Dis 1989; 11:608.

Neill MA, Hightower AW, Broome CV: Leprosy in the United States, 1971–1981. J Infect Dis 1985; 152:1064.

Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al: Incidence of *Mycobacterium avium–intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. J Infect Dis 1992; 165:1082.

Norden A, Linell F: A new type of pathogenic *Mycobacterium.* Nature 1951; 168:826.

Patel JB, Leonard DGB, Pan X, et al: Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. J Clin Microbiol 2000; 38:246–251.

Pfyffer GE, Auchenthaler ER, van Embden JD, *et al*: *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg Infect Dis 1998; 4:631.

Pfyffer GE, Cieslak C, Welscher HM, et al: Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid culture systems. J Clin Microbiol 1997a; 35:2229.

Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al: Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 1997b; 35:364.

Piersimoni C, Goteri G, Nista D, et al: *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphdenitis. J Clin Microbiol 2004; 42:3894–3897.

Piersimoni C, Scarparo C: Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 2003; 41:5355–5365.

Revisão excelente sobre testes comerciais de amplificação do ácido nucleico para detecção direta do complexo M. tuberculosis em amostras clínicas.

Prince DS: Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. N Engl J Med 1989; 321:863.

Reisner BS, Gatson AM, Woods GL: Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii,* and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. J Clin Microbiol 1994; 32:2995.

Rickman TW, Moyer NP: Increased sensitivity of acid-fast smears. J Clin Microbiol 1980; 11:618.

Ridley DS, Jopling WH: Classification of leprosy according to immunity: a five group system. Int J Lepr 1964; 34:255.

Rieder HL, Cauthen GM, Kelly GD, et al: Tuberculosis in the United States. JAMA 1989; 262:385.

Rohner P, Ninet B, Metral C, et al: Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:3127.

Runyon EH: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am 1959; 43:273.

Descrição clássica de diferentes grupos de micobactérias não tuberculosas.

Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P: Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. J Clin Microbiol 2004; 42:1109–14.

Schroder KH, Juhlin I: *Mycobacterium malmoense* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1977; 27:241.

Segal-Maurer S, Kalkut GE: Environmental control of tuberculosis: continuing controversy. Clin Infect Dis 1994; 19:299.

Smith DS, Lindholm-Levy P, Huitt GA, et al: *Mycobacterium terrae:* Case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. Clin Infect Dis 2000; 30:444.

Snider DE Jr, La Montagne JR: The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. J Infect Dis 1994; 169: 1189.

Sompolinsky D, Lagziel A, Naveh D, et al: *Mycobacterium haemophilium* sp. nov., a new pathogen of humans. Int J Sys Bacteriol 1978; 28:67.

Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, et al: Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. J Clin Microbiol 1991; 29:154.

Strumpf IJ, Tsang AY, Sayre JW: Re-evaluation of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1979; 119:599.

Tecson-Tumang FT, Bright JL: *Mycobacterium xenopi* and the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med, 1984; 100:461–46.

Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol 1993; 31:767.

Tholcken CA, Huang S, Woods GL: Evaluation of the ESP culture system II for recovery of mycobacteria from blood specimens collected in isolation tubes. J Clin Microbiol 1997; 35:2681.

Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev 2003; 16:319–354.

Excelente discussão sobre as espécies mais recentemente descritas de micobactérias de crescimento lento e rápido. Inclui informações sobre epidemiologia, manifestações clínicas, características fenotípicas e suscetibilidade antimicrobiana.

Tsukamura M, Kita N, Otsuka W, et al: A study of the taxonomy of the *Mycobacterium nonchromogenicum* complex and report of six cases of lung infection due to *Mycobacterium nonchromogenicum*. Microbiol Immunol 1983; 27:219.

Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, *et al:* A novel pathogenic taxon of *M. tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol 1997; 47:1236.

Wald A, Coyle MB, Carlson LC, et al: Infection with a fastidious mycobacterium resembling *Mycobacterium simiae* in seven patients with AIDS. Ann Intern Med 1992; 117:586.

Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, et al: Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. Clin Infect Dis 1994; 18:736.

Wallace RJ Jr, Glassroth J, Griffith DE, et al: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156:S1.

Excelente revisão sobre o diagnóstico laboratorial e tratamento das micobactérias não tuberculosas comumente encontradas, entre as quais complexo M. avium, M. kansasii, M. marinum e micobactérias de crescimento rápido.

Wallace RJ Jr, Nash DR, Tsukamura M, et al: Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. J Infect Dis 1988; 158:52.

Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox VA, et al: Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. Rev Infect Dis 1983; 5:657.

Weinberger M, Berg SL, Feuerstein IM, et al: Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. Clin Infect Dis 1992; 14:1229.

Weitzman I, Osadczyi D, Corrado ML, et al: *Mycobacterium thermoresistible*: a new pathogen for humans. J Clin Microbiol 1981; 14:593.

Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, et al: Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. J Clin Microbiol 1993; 31:2178.

Wolinsky E: Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis 1979; 119:107.

Woods GL: Mycobacteria. *In* Woods GL, Gutierrez Y (eds): Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993, p 378.

Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, *et al*: Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. J Clin Microbiol 1999; 37:1676–1682.

Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T: Clinical evaluation of Difco ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35:121.

Woods GL, Washington JA II: Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. Rev Infect Dis 1987; 9:275.

World Health Organization: Special Programme on AIDS and Expanded Programme on Immunization – joint statement: consultation on human immunodeficiency virus (HIV) and routine childhood immunization. Wkly Epidemiol Rep 1987; 62:297.

Zanetti S, Ardito F, Sechi L, et al: Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. J Clin Microbiol 1997; 35:2072.

CAPÍTULO 60

Doenças micóticas

Peter C. Iwen, Ph.D.

Nomenclatura, taxonomia e morfologia dos fungos 1237
Introdução 1237
A colônia fúngica 1237
Estrutura de leveduras e hifas 1238
Pigmento das hifas 1239
Estruturas reprodutivas 1239
Dimorfismo 1241
Técnicas diagnósticas 1242
Segurança no laboratório 1242
Coleta e transporte de amostras 1242
Exame direto 1242
Isolamento em cultura 1244
Taxa de crescimento 1245
Temperatura de crescimento 1245
Identificação morfológica 1245
Identificação bioquímica 1246
Identificação sorológica 1247
Identificação molecular 1247
Testes de suscetibilidade 1248
Candidíase, criptococose e outras infecções causadas por leveduras 1248
O gênero *Candida* 1248
O gênero *Cryptococcus* 1250
O gênero *Malassezia* 1251
Outras leveduras e patógenos similares 1252
Micoses causadas por fungos dimórficos 1252
O gênero *Histoplasma* 1252
O gênero *Blastomyces* 1254
O gênero *Coccidioides* 1255
O gênero *Sporothrix* 1256
Outros fungos dimórficos 1257
Dermatofitoses 1257
Micoses causadas por fungos dematiáceos 1259
Zigomicose 1261
Aspergilose, fusariose e outras micoses causadas por fungos hialinos 1262
O gênero *Aspergillus* 1262
O gênero *Fusarium* 1264
O gênero *Scedosporium* 1265
Outros fungos hialinos septados 1265
Pneumonia por *Pneumocystis* 1265
Prototecose 1266
Referências bibliográficas 1267

PONTOS-CHAVE

- Fungos patogênicos oportunistas emergiram como causas comuns de doença invasiva no hospedeiro comprometido.
- O exame histopatológico de tecido profundo é o padrão ideal para a detecção rápida e o reconhecimento de patógenos fúngicos que causam infecção invasiva.
- Os métodos micromorfológicos e fenotípicos continuam a ser os principais mecanismos para a identificação de patógenos fúngicos em cultura, embora técnicas moleculares tenham começado a mostrar-se promissoras nessa área.
- *Candida albicans* continua a ser a espécie de fungo mais comum causadora de doença humana, mas outras espécies estão se disseminando rapidamente mundo afora como causas de doenças invasivas e tendem a desenvolver com mais rapidez resistência aos tratamentos antifúngicos considerados padrão.
- Fungos dimórficos patogênicos verdadeiros são causas frequentes de infecção leve em pessoas que vivem em áreas endêmicas; no entanto, a doença invasiva, seja recorrente ou primária, está se tornando mais comum em hospedeiros imunocomprometidos.
- A introdução recente de novos agentes antifúngicos e a progressão da resistência entre fungos e leveduras aumentaram a importância do desenvolvimento e da padronização de testes para se verificar a suscetibilidade antifúngica.

Micologia clínica é a ciência voltada para o estudo dos fungos e sua relação com doenças humanas, abrangendo leveduras unicelulares e fungos filamentosos, agentes de infecções cutâneas superficiais (micoses cutâneas) e doença visceral profunda disseminada (micoses sistêmicas), além dos fungos patogênicos estabelecidos historicamente (fungos verdadeiros) e os saprófitas elevados ao *status* de patógenos pelas terapias e doenças modernas (patógenos oportunistas). Terapias modernas como a quimioterapia em altas doses para tratar o câncer, o transplante de órgãos sólidos e infecções imunossupressoras como a síndrome da imunodeficiência adquirida permitiram que os fungos emergissem como causas importantes de doença humana (Wingard, 1995; Ponton, 2000; Blumberg, 2001; Fleming, 2002; Stevens, 2002; Clark, 2004). Embora a disciplina de micologia clínica ainda não faça parte da profissão médica, os patologistas, que evoluíram com a patologia cirúrgica, passaram a ter um entendimento geral do reconhecimento de patógenos fúngicos (Steinbach, 2003a). Em termos gerais, a ausência generalizada de educação nessa área é um problema, pois a identificação da maioria dos fungos é obtida mais pela observação humana habilidosa do que por máquinas. A contrapartida macroscópica da amostra cirúrgica é a morfologia das colônias do fungo isolado em meio ágar; como na anatomia patológica, a análise definitiva do problema tem de aguardar a observação microscópica.

O objetivo deste capítulo é apresentar os fundamentos da micologia clínica, com ênfase nas questões práticas e nos patógenos fúngicos encontrados regularmente no laboratório. Para uma revisão dos muitos patógenos fúngicos emergentes relatados na literatura, o leitor deve consultar os vários textos de referência com informação disponível sobre fungos saprófitas incomuns que, cada vez mais, estão implicados como agentes etiológicos em pacientes gravemente comprometidos (De Hoog, 2000; Ponton, 2000). Chandler e Kaplan (Chandler, 1987a) publicaram um atlas abrangente da histopatologia das doenças fúngicas. Por fim, apesar de não incluídas no reino dos fungos, as infecções causadas por algas aclorófilas são discutidas neste capítulo, porque as características das algas e das doenças que elas acarretam lembram mais as dos fungos que as de outros agentes infecciosos.

Como este capítulo trata especificamente de micoses fúngicas, outros tipos de doenças fúngicas não serão comentados. Há revisões excelentes sobre essas outras doenças, inclusive sobre respostas alérgicas não invasivas aos fungos (Schubert, 2004; Thakar, 2004), intoxicação pela ingestão de fungos venenosos (intoxicação por cogumelos ou micetismo) (McPartland, 1997; Broussard, 2001) e de toxinas fúngicas (micotoxicoses) (Bennett, 2003).

Nomenclatura, taxonomia e morfologia dos fungos

Introdução

A primeira barreira para o micologista principiante é a nomenclatura e sua aplicação, a taxonomia. Os membros do reino dos fungos (*Eumycota*) são células eucaróticas que têm a capacidade de reproduzir-se tanto por métodos sexuados quanto assexuados. São classificados em filos de acordo com a natureza de suas estruturas reprodutivas ou ausência delas (Guarro, 1999). Os fungos reconhecidos por suas estruturas reprodutivas (fungos perfeitos) classificam-se em zigomicetos, ascomicetos ou basidiomicetos, com base no tipo de estrutura reprodutiva produzida. Os que não possuem estruturas reprodutivas sexuadas reconhecidas são classificados no filo Deuteromicetos, também conhecidos como fungos imperfeitos, com base em suas estruturas reprodutivas assexuadas. Uma vez reconhecida a fase sexuada (denominada teleomorfa) de um deuteromiceto, o organismo é reclassificado em algum de outros filos. No entanto, na prática, o antigo nome familiar da fase assexuada imperfeita, a anamorfa, é mantido. Por exemplo, poucas pessoas conhecem *Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis* e *Cryptococcus neoformans* por seus respectivos nomes teleomórficos, *Ajellomyces capsulatus, Ajellomyces dermatitidis* e *Filobasidiella neoformans*, respectivamente. Em contrapartida, a fase sexuada *Pseudallescheria boydii* e sua fase assexuada *Scedosporium apiospermum* são ambas termos reconhecidos, usados na prática comum. Em geral, usa-se o nome anamórfico (assexuado) para descrever uma espécie de fungo no laboratório, embora existam muitas exceções a essa regra.

Grande parte da taxonomia dos fungos tem relação com detalhes estruturais, pois tanto a classificação quanto a identificação dependem muito da morfologia. Um glossário de termos importantes usados na micologia clínica é fornecido na Tabela 60.1. Neste capítulo, usamos uma abordagem conceitual simplificada para reconhecer os patógenos mais comumente encontrados no laboratório clínico. Com finalidades práticas, algumas características gerais mostradas na Tabela 60.2 servem como base para a identificação de fungos no laboratório.

À medida que os micologistas aprendem mais sobre os fungos, há uma reclassificação desses organismos com base regular. A influência de técnicas moleculares na caracterização taxonômica dos fungos tem tido grande impacto não apenas na reclassificação dos patógenos fúngicos, como também no reconhecimento de patógenos não previamente relatados como causadores de doenças humanas (De Hoog, 2000; Bastola, 2004).

A colônia fúngica

São reconhecidas duas formas morfológicas de fungos: leveduras e mofos. Leveduras são organismos unicelulares que em geral reproduzem-se de forma assexuada por brotamento, produzindo uma célula-filha. A massa de colônias de leveduras é uma coleção de organismos individuais distintos que, à observação macroscópica, lembra colônias de bactérias na superfície do ágar. As colônias de leveduras em geral são lisas, com margem regular. Quando amontoadas e maciças, como costumam ser as de *Candida albicans*, podem lembrar as de estafilococos. As leveduras produzem catalase, de modo que o micologista incauto que não fizer uma coloração de Gram ou preparação a fresco pode confundir uma colônia de levedura com a de bactéria e dar um resultado completamente errado. A presença de pseudo-hifas é uma característica de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. As pseudo-hifas de levedura em geral são visíveis macroscopicamente como extensões filamentosas das margens da colônia, conhecidas coloquialmente como "podócitos" (Fig. 60.1).

Contrariamente às leveduras, os mofos são fungos filamentosos multicelulares. A natureza filamentosa dos mofos confere às colônias uma aparência lanosa, felpuda ou aveludada, às vezes pontilhada com um aspecto granular ou pulverulento, produzido pela formação de estruturas reprodutivas assexuadas (Fig. 60.2). Outras vezes, a colônia pode ter um aspecto glabro (liso).

A distinção entre mofos e leveduras não está firmemente estabelecida. Algumas leveduras também desenvolvem um componente filamentoso visualmente macroscópico. Espécies de *Trichosporon* são leveduras que desenvolvem tais extensões filamentosas, enquanto *Exophiala jeanselmei* é uma levedura dematiácea que desenvolve um micélio à medida que amadurece. O último exemplo são os fungos dimórficos, que exibem uma forma de mofo em algumas condições e uma forma diferente de mofo em outras circunstâncias. Os fungos dimórficos mais importantes são patógenos sistêmicos que se comportam como mofos no ambiente e em meios de ágar a 25–30°C. Em contrapartida, a forma tecidual é uma levedura (como *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *Sporothrix schenckii*) ou, no caso de *Coccidioides immitis*, uma estrutura semelhante à levedura denominada esférula. Quando cultivada *in vitro* a 37°C, a forma tecidual é reproduzida por esses fungos. Outros agentes menos comuns ou alardeados como tais também exibem dimorfismo. Por exemplo,

Tabela 60.1 Glossário dos termos de uso comum na micologia clínica

Termo	Definição
Micélio aéreo	Hifas produzidas acima da superfície do ágar
Anamorfa	Forma assexuada da esporulação fúngica (estado imperfeito)
Artroconídio	Conídio derivado da fragmentação de hifas especializadas
Ascocarpo (ascoma)	Estrutura frutificante que contém ascos (existem vários tipos)
Ascósporo	Esporo sexuado contido dentro de um asco
Asco	Estrutura em forma de bolsa que contém ascosporos
Basidiósporo	Esporo sexuado formado sobre o crescimento externo de um basídio
Basídio	Estrutura que contém basidiósporos, por exemplo, cogumelo
Blastoconídio	Esporo assexuado, formado pelo brotamento da célula de levedura
Clamidósporo	Estrutura de parede espessa em repouso ou de sobrevivência (também chamada clamidoconídio)
Cleistotécio	Ascocarpo fechado, composto por camadas de hifas (ascósporos liberados por ruptura)
Colarete	Estrutura em forma de funil no ápice de uma fiálide
Columela	Uma extensão do esporangióforo na base do esporângio
Célula conidiógena	Célula que produz conídios
Conidióforo	Estrutura especializada da hifa que contém os conídios
Conídio	Estrutura reprodutiva sexuada, formada de muitas maneiras que não envolvem clivagem
Dematiáceo	Pigmentado em cor escura
Glabra	Lisa, com referência à morfologia da colônia
Hifa	Unidade vegetativa de um mofo
Intercalar	Surgido dentro de uma hifa
Macroconídio	Maior dos dois tipos de conídio produzidos por um mofo
Microconídio	Menor dos dois tipos de conídio produzidos por um mofo
Mofo	Fungo filamentoso que se reproduz de forma sexuada ou assexuada
Micélio	Massa de hifas que forma o talo de um mofo
Peritécio	Ascocarpo fechado com um poro na parte superior, pelo qual os ascósporos são liberados
Fiálide	Célula com abertura pela qual os conídios são produzidos (esterigmata)
Pseudo-hifa	Células de levedura conectadas (blastoconídios), lembrando uma hifa, mas com áreas de constrição entre células adjacentes
Septo	Parede cruzada em uma hifa
Esporangióforo	Haste que apóia o esporângio
Esporangiósporo	Esporo assexuado, produzido dentro de um esporângio
Esporângio	Estrutura em forma de bolsa, na qual os esporangiósporos assexuados se desenvolvem
Teleomorfa	Forma sexuada de uma esporulação fúngica (estado perfeito)
Terminal	Surgido na parte final de uma hifa
Micélio vegetativo	Hifas produzidas na superfície ou que se estendem para o ágar
Vesícula	Célula aumentada ou intumescida, em geral na extremidade de um conidióforo ou esporangióforo que pode estar dentro das hifas
Levedura	Fungo unicelular que se reproduz por brotamento ou fissão

Tabela 60.2 Características úteis para a identificação de fungos

Característica	Exemplos
Tipo de crescimento macroscópico	Colônias de organismos unicelulares (levedura) Colônias de organismos filamentosos (mofos)
Morfologia da levedura	Brotamento Brotamento com pseudo-hifas Levedura redonda com cápsulas Brotamento de levedura com colaretes
Morfologia das estruturas filamentosas	Hifas verdadeiras septadas Hifas verdadeiras não septadas (ou esparsamente septadas)
Pigmento das hifas	Hialinas (transparentes ou não pigmentadas) Dematiáceas (escuras)
Morfologia das estruturas reprodutivas assexuadas	Conídios Esporos
Morfologia das estruturas reprodutivas sexuadas (raramente demonstradas)	Ascósporos Cleistotécio Peritécio
Taxa de crescimento	Lento (mais de 10 dias) Médio (4 – 10 dias) Rápido (menos de 4 dias)
Inibição pela ciclo-heximida	Muitos fungos saprobióticos
Temperatura ideal de crescimento (valor ocasional)	25–30°C 35–37°C 40–42°C 50–58°C
Testes bioquímicos	Assimilação Fermentação Degradação enzimática (p. ex., urease) Crescimento facilitado
Conversão de mofo em levedura	Suplantada pelos testes com sonda de DNA na maioria dos laboratórios
Detecção imunológica de antígenos ou anticorpos	*Cryptococcus, Histoplasma, Coccidioides, Blastomyces, Aspergillus*
Características moleculares do DNA	*Histoplasma, Coccidioides, Blastomyces*

Figura 60.1 As extensões filamentosas da periferia de colônias de *Candida albicans* são conhecidas coloquialmente como podócitos.

o *Penicillium marneffei*, um membro distintivo cujo gênero é bastante disperso, cresce como um mofo nos meios de laboratório a 25–30°C, mas uma forma semelhante à levedura é encontrada em tecidos humanos. Os corpos esclerótico encontrados nos tecidos de pacientes com cromoblastomicose são uma forma vegetativa entre um mofo e uma levedura dos fungos dematiáceos que surge como mofos quando cresce em meios sólidos à temperatura ambiente. O dimorfismo reverso é

Figura 60.2 A superfície esverdeada e pulverulenta das colônias de *Aspergillus fumigatus* superpõe-se com as massas brancas do micélio. Colônias bacterianas adjacentes contrastam com o fungo filamentoso (ágar-sangue de carneiro).

exemplificado por *Malassezia furfur*, que produz tanto leveduras quanto hifas nas lesões cutâneas da pitiríase versicolor. Em laboratório, a forma de hifa raramente é vista, a menos que sejam fornecidas condições de cultura especiais (Marcon, 1992).

Estrutura de leveduras e hifas

A morfologia do fungo é uma característica importante para a identificação de leveduras e mofos. A estrutura filamentosa de um mofo é conhecida como hifa, e uma massa de hifas denomina-se micélio. O micélio que cresce na superfície ou dentro do ágar é conhecido como micélio vegetativo, enquanto extensões filamentosas acima da colônia denominam-se micélios aéreos. As hifas verdadeiras podem ter paredes cruzadas que contêm poros para comunicação através delas ou são completas, dividindo-se em múltiplas células. As hifas que têm paredes cruzadas chamam-se septadas, enquanto as outras são conhecidas como não septadas. Alguns fungos que têm hifas septadas também têm hifas não septadas ou septadas especializadas (conidióforos) que contêm estruturas reprodutivas assexuadas. Em contrapartida, alguns fungos chamados não septados têm paredes cruzadas ocasionais e talvez devessem ser mais bem designados como esparsamente septados. Portanto, é importante avaliar o micélio como um todo.

A largura das hifas e o ângulo de ramificação são indícios importantes para a identidade fúngica. Os zigomicetos, como *Rhizopus* spp., têm hifas largas semelhantes a cintas e ramificam-se predominantemente em ângulos retos (Fig. 60.3), embora fungos hialinos como *Aspergillus* spp. tenham hifas estreitas e ramifiquem-se em ângulos agudos (ramificação dicotômica) (Fig. 60.4). A designação de um fungo como *Aspergillus* com base na morfologia em um esfregaço ou corte de tecido é, na verdade, apenas uma afirmação a respeito desse grupo de patógenos. É melhor simplificar para descrever as características das hifas.

As leveduras reproduzem-se de forma assexuada, mediante a formação de blastoconídios, em que uma célula-filha em geral surge em uma extremidade de uma célula da levedura e aumenta até formar uma célula de levedura. Tal processo também é conhecido em sentido mais genérico como brotamento. Se uma série de células-filhas não se desprender completamente das células originárias, é produzida uma pseudo-hifa. As pseudo-hifas são distinguidas das hifas verdadeiras pela presença de uma constrição na junção de células adjacentes e pela restrição no tamanho da célula-filha ao da célula parental (Fig. 60.5). Em contrapartida, as paredes das hifas verdadeiras são paralelas, sem constrições.

C. albicans e algumas cepas de *Candida tropicalis* podem produzir pseudo-hifas com o aspecto de hifas verdadeiras, dependendo das condições de crescimento, e a diferenciação entre *Candida* e mofos hialinos como *Aspergillus* em cortes de tecidos às vezes pode ser problemática. Em contrapartida, *Cryptococcus* spp. produzem apenas brotos de leveduras e raramente pseudo-hifas rudimentares ou primitivas, mas não hifas verdadeiras.

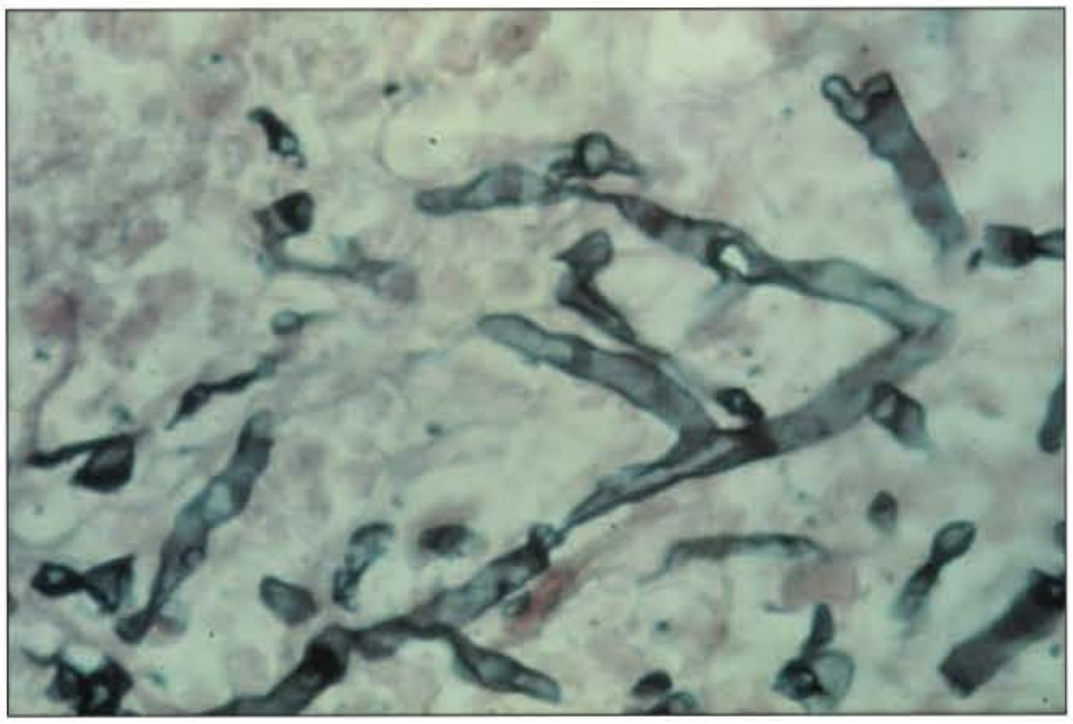


Figura 60.3 Hifas largas não septadas, características de um zigomiceto em tecido pulmonar (metenamina de prata de Gomori; × 400).

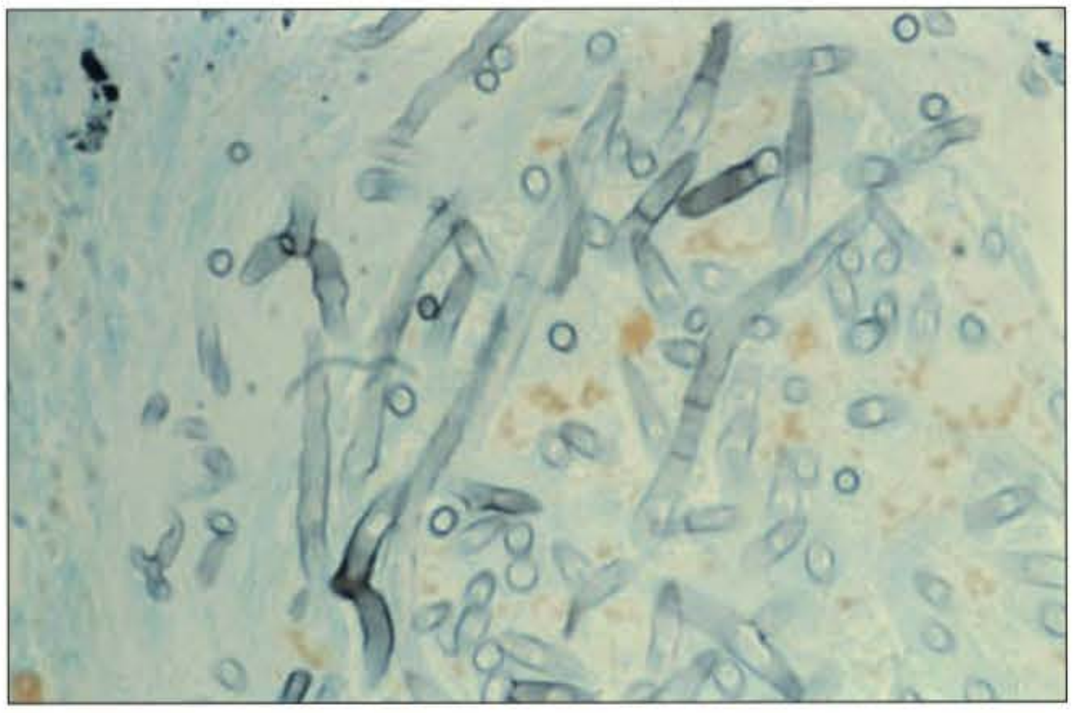


Figura 60.4 Hifas estreitas ramificadas e septadas, características de um mofo hialino em tecido (metenamina de prata de Gomori; × 400).

Pigmento das hifas

Algumas hifas de mofos podem ser caracterizadas pela produção de um pigmento escuro. As hifas dos fungos dematiáceos contêm um pigmento melanina que confere uma coloração marrom às hifas em preparações microscópicas e faz com que as colônias de fungos pareçam verde-escuras, marrons ou pretas. Corantes superpostos em esfregaços corados, preparações a fresco ou cortes histológicos podem obscurecer parcialmente a cor, que pode ser mais óbvia em preparações não coradas. Os fungos cuja pigmentação das hifas não é escura são conhecidos como hialinos (transparentes ou incolores), termo que não reflete completamente o aspecto da espécie de fungo, pois em alguns casos uma pigmentação clara pode produzir colônias coloridas, e as estruturas reprodutivas assexuadas de alguns mofos hialinos podem ter pigmentos verdes, marrons ou negros, que conferem uma cor à superfície da colônia, mantendo uma coloração leve. Em contrapartida, tanto a frente (obverso) quanto o verso (reverso) de colônias dematiáceas em geral demonstram o pigmento escuro.

Estruturas reprodutivas

O meio primário de identificação dos fungos classificados como mofos é pela caracterização de estruturas reprodutivas assexuadas. Para leveduras, os estudos fenotípicos são a pedra fundamental na identificação com estruturas reprodutivas assexuadas que servem como indícios auxiliares no processo de identificação. As duas principais estruturas assexuadas são esporos (que também podem estar presentes como estruturas sexuadas) e conídios. Esporos assexuados (denominados esporoangiósporos) são produzidos por clivagem dentro de uma estrutura denominada esporângio (Fig. 60.6). Os conídios são muito mais diversos e formam-se por diferenciação a partir de uma extremidade ou lado de uma hifa fértil, como um conidióforo, ou por diferenciação de hifas. Infelizmente, o uso intercambiável dos termos conídio e esporo na literatura tem causado confusão. Esporulação e esporos costumam ser usados como termos gerais para a reprodução assexuada, e o termo "esporo" às vezes é usado quando "conídio" seria mais apropriado.

O principal meio de reprodução assexuada das leveduras é a formação de blastoconídios, isto é, brotamento. Um broto surge como um amolecimento da parede celular da célula-mãe, seguindo-se a expansão da parede celular e a migração do núcleo e do citoplasma para a área intumescida. Um septo sela o limite entre a célula-filha e a parental (Fig. 60.7). Se não ocorrer separação, surge uma pseudo-hifa, como dito antes.

As partes do micélio vegetativo que se diferenciam em conídios são conhecidas como células conidiógenas. Hifas especializadas que sustentam os conídios são denominadas conidióforos, que podem ser as próprias células conidiógenas que surgem do micélio vegetativo ou podem ser uma hifa de sustentação. Em *Aspergillus* spp., o conidióforo, que é septado, aumenta de tamanho em uma de suas extremidades até formar uma vesícula intumescida (Fig. 60.8). As células conidiógenas, agora denominadas fiálides (antigamente esterigmata), surgem da vesícula para manter as cadeias de conídios. Algumas espécies de

Figura 60.5 Cadeias de brotos de leveduras alongados de *Candida albicans* produzindo pseudo-hifas, observadas no escarro (coloração de Gram; × 1.000).

Aspergillus produzem uma fileira de fiálides, que ocorrem como uma fileira de células estéreis denominadas métulas, com os conídios que surgem das fiálides distais. Os zigomicetos produzem estruturas chamadas esporangióforos, que mantêm o esporângio e seus esporangiósporos inclusos nele (Fig. 60.6). Uma extensão do ápice do esporangióforo no esporângio denomina-se columela.

A conidiogênese tálica é um processo em que o conídio não se desenvolve até que se forme um septo entre o conídio e a célula parental. O conídio origina-se do todo da célula parental. Os patógenos humanos mais importantes que exibem conidiogênese tálica são os dermatófitos e o fungo dematiáceo *C. immitis*. À medida que a conidiogênese progride nos *Coccidioides*, são produzidos conídios em forma de barril denominados artroconídios, que se fragmentam com facilidade e disseminam-se com dificuldade, resultando no alto grau de infectividade demonstrado por esse importante patógeno humano (Fig. 60.9). Os conídios tálicos dos dermatófitos são separados por tamanho em dois tipos: grandes macroconídios septados (Fig. 60.10) e pequenos microconídios unicelulares, que são estruturas mais simples (Fig. 60.11).

O outro tipo de conidiogênese denomina-se conidiogênese blástica, em que o protoplasma da célula conidiogênica é expelido ou explode para formar um conídio. A forma de conidiogênese blástica mais simples é o processo de brotamento, pelo qual muitas leveduras, inclusive as *Candida* spp., desenvolvem-se. Como no caso dos conídios tálicos, os blastoconídios dividem-se em dois tipos, dependendo do envolvimento ou não de toda a parede celular no processo. Outra divisão da conidiogênese blástica é feita entre as espécies em que a parede externa não participa do processo (denominado conidiogênese enteroblástica). Nos fungos enteroblásticos, foram reconhecidas células conidiogênicas fialídicas e anelídicas. Fiálides são células conidiogênicas que em geral têm um colarete nos ápices, produzido quando a extremidade libera o

Figura 60.6 Esporangióforos de *Rhizopus* spp. sustentando esporângios que contêm esporangiósporos. Os rizoides surgem das hifas, perto da origem dos esporangióforos (azul algodão de lactofenol; × 100).

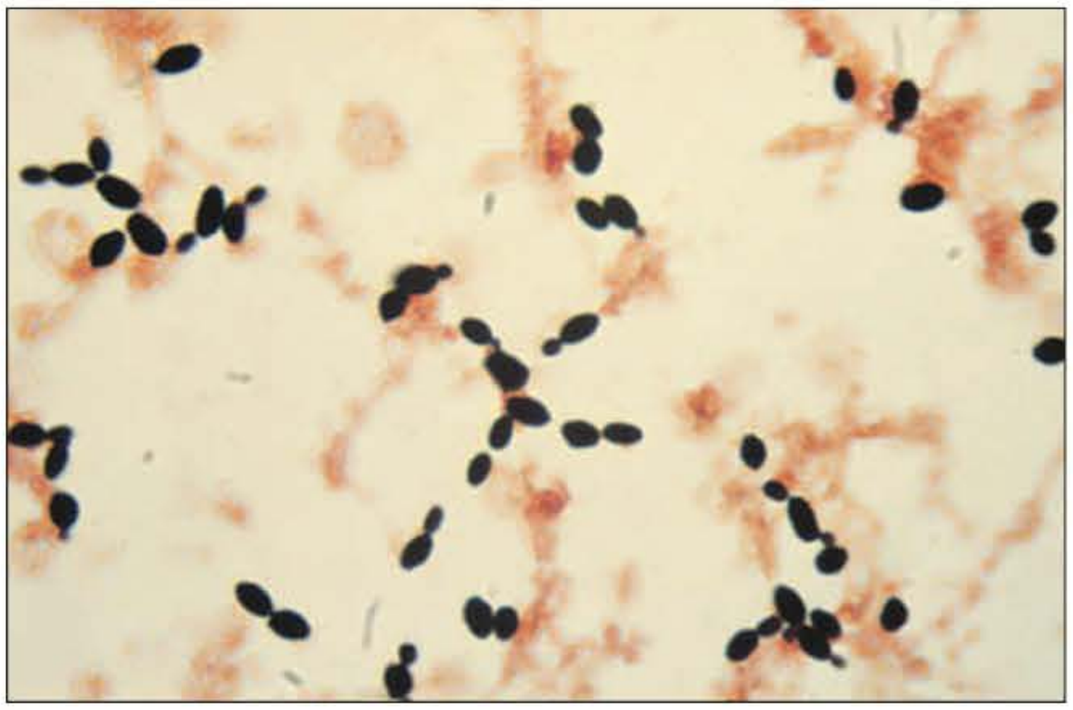


Figura 60.7 Células de leveduras em brotamento e em não brotamento, detectadas em uma amostra de hemocultura em frasco (coloração de Gram; × 1.000).

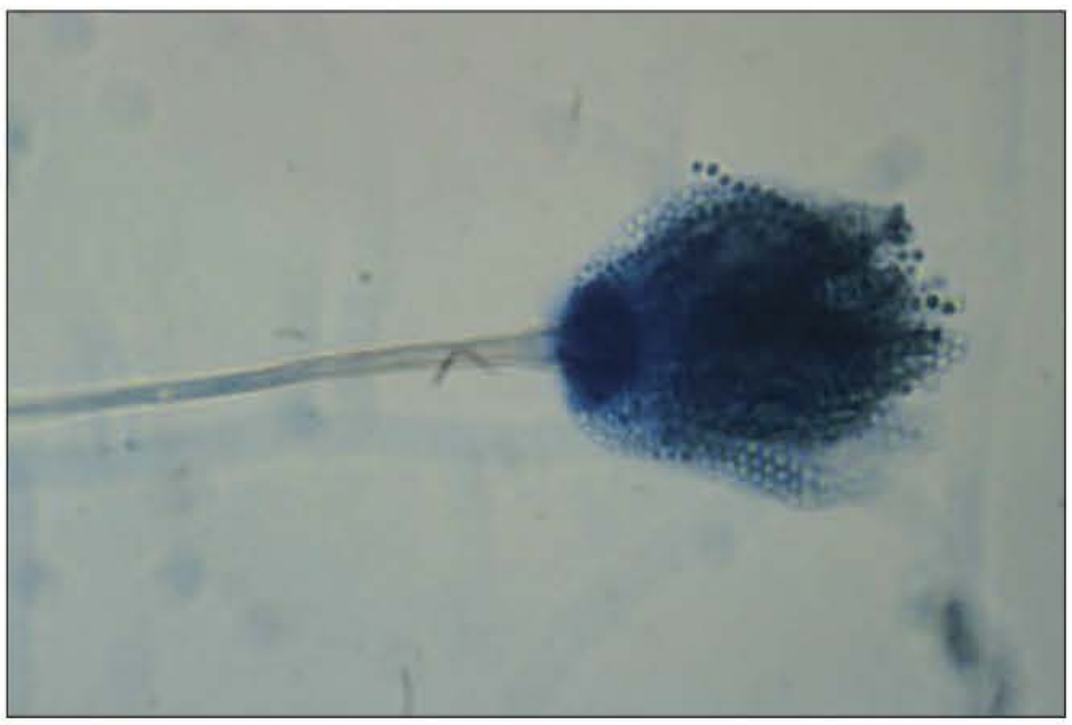


Figura 60.8 Cabeça frutificante de *Aspergillus fumigatus*. O conidióforo está intumescido na extremidade, formando uma vesícula, e fiálides surgem da metade superior da vesícula, com cadeias de conídios presentes que se alinham paralelas ao eixo longitudinal do conidióforo (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Figura 60.9 Artroconídios de *Coccidioides immitis*. Os artroconídios alternantes em forma de barril estão separados por células disjuntoras vazias, de parede fina, dentro de partes das hifas (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Figura 60.10 Macroconídios de *Epidermophyton floccosum*. Os típicos macroconídios de extremidade romba ocorrem em agregados ao longo das hifas, com ausência de microconídios (azul de lactofenol com algodão; × 400).

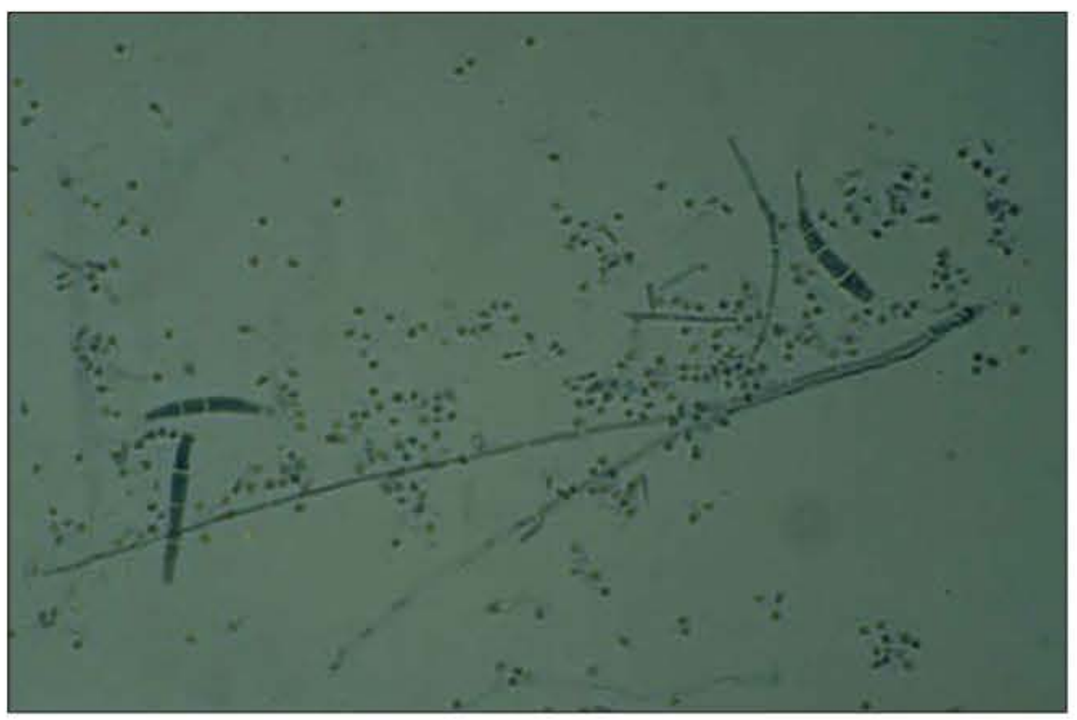


Figura 60.11 Microconídios alongados de *Trichophyton mentagrophytes* alinhados ao longo da superfície das hifas (azul anilina de lactofenol; × 400).

primeiro conídio. O colarete pode ser uma estrutura distinta, em forma de frasco, conforme se observa em *Phialophora* spp., ou uma estrutura imperceptível, como se vê em *Aspergillus* spp. Em contrapartida, anelídeos são células conidiogênicas que se rompem, deixando um anel distinto de material celular na base do conídio, quando este se separa do anelídeo. A formação de conídios sequenciais na base empurra a célula mais velha para a extremidade da cadeia e deixa uma série de anéis ou anelações no ápice do anelídeo, proporcionando um registro de eventos passados, como os anéis de uma árvore. Embora importantes para a identificação microscópica de alguns mofos, pode ser difícil visualizar os finos detalhes dessas estruturas à microscopia óptica.

A diferenciação das várias estruturas dos conídios é a chave para a identificação correta de muitos isolados fúngicos. Em alguns casos, os aspectos morfológicos pertinentes são discernidos com facilidade; no

entanto, como na patologia cirúrgica, o padrão de reconhecimento é um recurso indispensável para a identificação dos patógenos esaprófitas mais comuns. Também é importante ressaltar os aspectos proeminentes de toda a preparação morfológica sem um foco primário em estruturas periféricas ou aberrantes, assim como é importante para o patologista cirúrgico apreciar o padrão tecidual sem distrair-se com uma célula atípica ocasional. O desenvolvimento das estruturas dos conídios de *Aspergillus* ou *Paecilomyces*, por exemplo, pode lembrar o das estruturas de *Penicillium*, de modo que o observador não pode distrair-se e pensar que há dois fungos. Ao mesmo tempo, a possibilidade de uma cultura mista não deve ser esquecida. Os micologistas precisam usar a objetiva de menor aumento na observação inicial, todavia os detalhes dos subgrupos celulares observados em menor aumento devem ser estudados com objetiva de maior aumento.

A arte refinada do diagnóstico micológico assenta-se na apreciação e na diferenciação dos detalhes celulares e, em algumas circunstâncias, a tarefa requer muita sutileza e experiência considerável. Às vezes, o isolado precisa ser induzido a produzir as estruturas diagnósticas necessárias mediante a escolha de meios adequados (Tab. 60.3). Em geral, meios enriquecidos favorecem a propagação de micélios vegetativos, enquanto estruturas reprodutivas assexuadas são estimuladas por meios basais (de inanição). A subcultura em ágar-água ou ágar com flocos de batata é uma técnica geral para estimular o desenvolvimento de estruturas de conídios. As cores das colônias de *Aspergillus* são mais bem estudadas em ágar de Czapek–Dox, enquanto o *Trichophyton rubrum* é estimulado a produzir pigmento vermelho em ágar com flocos de batata ou maisena com 1% de glicose.

A experiência também é importante para determinar se uma subcultura precisa ser incubada por muito tempo para que se formem estruturas diagnósticas. Estruturas em forma de raízes (rizoides) que se desenvolvem a partir das hifas de alguns zigomicetos são aspectos importantes na diferenciação, mas não podem ser detectadas se a observação terminar prematuramente. É preciso admitir que algumas das técnicas necessárias para se completar a diferenciação são deficientes ou estão além do alcance da maioria dos laboratórios clínicos. Por exemplo, o patógeno dematiáceo *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* produz conídios blásticos com fiálides e anelídeos. Entretanto, a presença de anelídeos não foi reconhecida quando se estudou o mofo à microscopia óptica, e esse microrganismo foi classificado uma vez como *Phialophora dermatitidis*. O reconhecimento de que o isolado formava anelídeos levou à sua classificação em outro gênero, *Exophiala*, que continha tanto fiálides como anelídeos. Todavia, o gênero *Wangiella* continua a ser sugerido, pois as fiálides não reproduzem colaretes óbvios, o que constitui o aspecto predominante desse gênero. Subsequentemente, continua a haver desacordo quanto ao fato de essa espécie pertencer ao gênero *Exophiala* ou ao *Wangiella* (McGinnis, 1999).

As estruturas reprodutivas sexuadas têm valor ocasional no laboratório de micologia clínica para a identificação de patógenos e saprófitas comuns. Uma variedade de estruturas sexuadas pode ser produzida, embora sejam encontradas com baixa frequência *in vitro*. As duas estruturas com mais probabilidade de serem demonstradas no laboratório são os ascos desnudos de *Saccharomyces cerevisiae* e o cleistotécio de *P. boydii* (a fase sexuada de *S. apiospermum*), *Aspergillus nidulans* e o grupo *Aspergillus glaucus*. Os ascos desnudos de *Saccharomyces* lembram células ovais em que um dos quatro ascósporos haploides individuais está contido (Fig. 60.12). A formação do ascósporo em *Saccharomyces* spp. pode ser estimulada pela incubação em certos meios com ágar, como o ágar-suco V-8, mas tal esforço em geral não é necessário, pois sistemas comerciais para a identificação de leveduras podem identificar prontamente o isolado. Os ascósporos podem ser visualizados em preparações a fresco, mas são detectados de maneira mais confiável quando se usa coloração álcool-acidorresistente Um cleistotécio é um corpo sexuado frutificante (ascocarpo) em que os ascosporos estão contidos inteiramente e só podem ser liberados mediante a ruptura da parede do cleistotécio (Fig. 60.13). A parede é composta por uma única camada ou camadas múltiplas de hifas hialinas especializadas. Um peritécio é similar a um cleistotécio, mas contém uma abertura no ápice da estrutura em forma de pera.

Embora as estruturas reprodutivas assexuadas e raramente sexuadas sejam necessárias para a identificação do fungo, em especial mofos, alguns isolados recusam-se a produzir essas estruturas diagnósticas. Em termos morfológicos, as colônias consistem apenas em hifas vegetativas e aéreas, sendo descritas subsequentemente como hifas estéreis ou micélios estéreis. A identificação em tal contexto requer métodos moleculares especializados que não estão disponíveis na maioria dos laboratórios diagnósticos de rotina (Yeo, 2002; Iwen, 2003).

Tabela 60.3 Meios para a identificação e o isolamento de fungos

Meio	Função principal
Para ascósporo, ágar V-8	Desenvolvimento de ascósporo
Ágar com semente de ave (negra)	Demonstração de melanina em *Cryptococcus neoformans*
Ágar com infusão de cérebro e coração mais sangue	Facilita a recuperação de fungos dimórficos
Ágar de Christensen com ureia	Diferenciação de *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*
CHROMagar	Mistura cromogênica para identificar espécies de leveduras
Ágar com maisena e Tween 80	Visualizar a morfologia de leveduras
Ágar de Czapek-Dox	Identificar espécies de *Aspergillus*
Ágar com batata e 1% de glicose	Desenvolvimento do pigmento de *T. rubrum* e morfologia de mofos
Ágar com flocos de batata	Desenvolvimento do pigmento de *T. rubrum* e morfologia de mofos
Ágar de Sabouraud com glicose	Meio geral para o crescimento de fungos (formulação tradicional ou modificação de Emmon)
Ágar SAB com ciclo-heximida	Meio seletivo para inibir fungos saprófitas (antibacterianos como o cloranfenicol ou gentamicina também incluídos)
Cultura em lâmina (vários tipos de ágar)	Estudo da estrutura microscópica e sua origem
Meios de ágar para *Trichophyton*	Diferenciação das espécies de *Trichophyton*

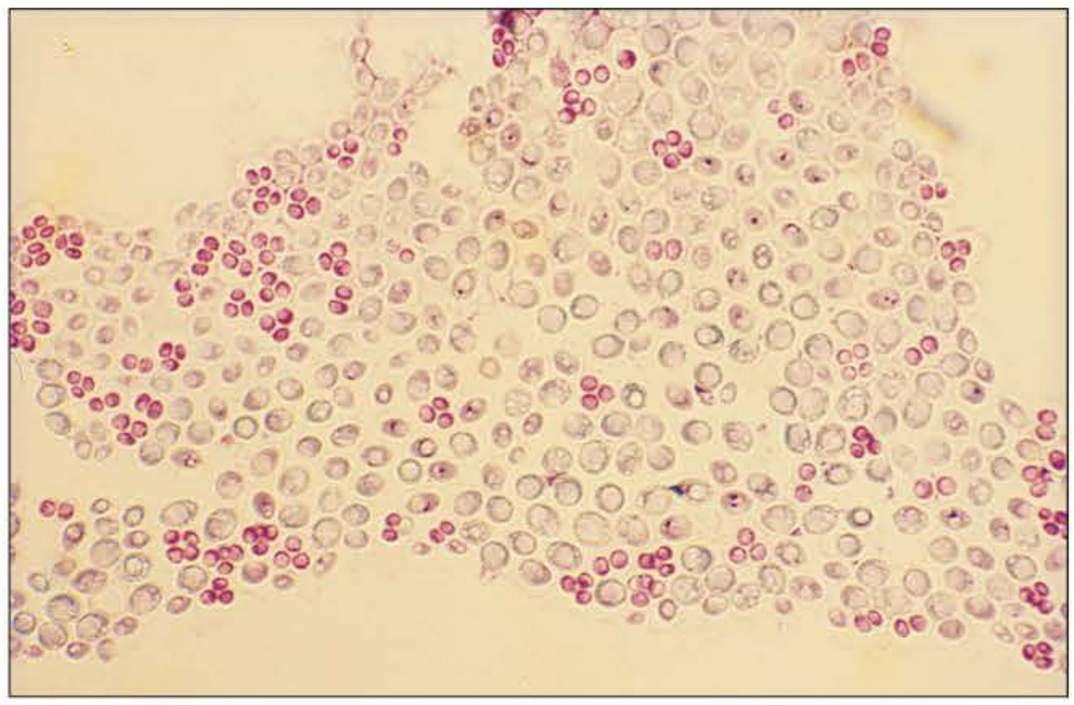


Figura 60.12 Os ascósporos de *Saccharomyces cerevisiae* estão contidos em ascos desnudos. Os ascósporos foram corados em vermelho por corante ácido-rápido (coloração de Ziehl–Neelsen; ×1.000).

Dimorfismo

A demonstração de dimorfismo é a abordagem tradicional para a identificação definitiva de um grupo importante de patógenos sistêmicos. Na maioria dos laboratórios, o isolado inicial é a fase de mofo, porque as placas de cultura em geral são incubadas a 25–30°C. A conversão à fase tecidual é conseguida incubando-se uma subcultura a 37°C. A transição da morfologia de mofo para a de levedura pode ocorrer de maneira relutante, muitas vezes com formas de hifas intercaladas com células de levedura. Alguns isolados podem nunca ser convertidos com sucesso. Um

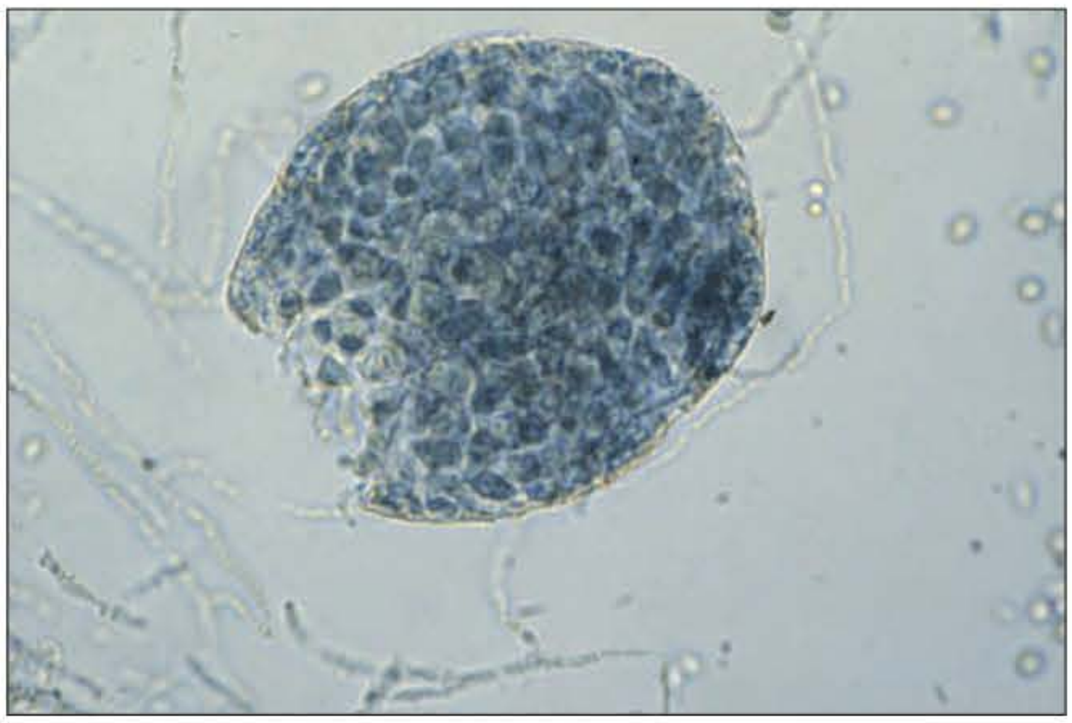


Figura 60.13 Cleistotécio de *Pseudallescheria boydii*. Essa estrutura reprodutiva sexuada é referida especificamente como um asco que contém ascósporos (azul de lactofenol com algodão; × 400).

meio rico, como o ágar com infusão de cérebro e coração mais sangue suplementar, deve ser incluído, em particular quando se trabalha com *H. capsulatum*. Tem-se recomendado ágar com infusão de cérebro e coração ou ágar com hemoglobina e cisteína para a conversão ótima de *B. dermatitidis*. Foram descritos meios para a conversão de *C. immitis*, mas não são usados com frequência. De forma semelhante, a inoculação de animais é feita com pouca frequência em laboratórios clínicos. A introdução de sondas moleculares simplificou de forma considerável a tarefa da identificação definitiva desses fungos e eliminou a necessidade de demonstrar ambas as fases dos fungos dimórficos (Reiss, 2000). Testes de hibridização do ácido nucleico para esses três patógenos dimórficos são comercializados como GEN-PROBE, Inc. (San Diego, CA). A demonstração da fase característica de levedura ou similar em tecido é forte indício do diagnóstico de um fungo dimórfico, porém a cultura do patógeno com identificação ainda é necessária para confirmar a doença.

Técnicas diagnósticas

Segurança no laboratório

A inoculação de amostras e as manipulações de colônias de mofos devem ser feitas em uma cabine de segurança biológica, para prevenir a disseminação dos conídios e esporos de fungos altamente móveis. Também é necessária muita atenção ao limpar as superfícies tanto da cabine de segurança biológica como da incubadora. Cabines de segurança separadas para o estudo de mofos isolados podem minimizar a contaminação de outras amostras clínicas.

O maior perigo para o pessoal do laboratório vem da manipulação de culturas de mofos dos patógenos dimórficos *C. immitis* e *H. capsulatum*. Ambos esses isolados são classificados como patógenos do grupo 3 de risco, exigindo práticas de biossegurança do nível 3, instalações para a propagação e a manipulação de culturas, bem como para o processamento de solo e outros materiais ambientais conhecidos ou propensos a conter conídios infecciosos (Department of Health and Human Services, 1999). Kwon-Chung e Bennett (Kwon-Chung, 1992) recomendam a inoculação em tubos com tampa rosqueada ante a suspeita da presença desses patógenos. Infelizmente, na maioria das áreas dos EUA, o diagnóstico não pode ser conhecido antes do isolamento do patógeno. A placa pode ser inundada com solução de formaldeído a 4% (formalina a 10%) e deixada à temperatura ambiente por várias horas ou uma noite para esterilizar a cultura antes do exame microscópico. Obviamente, tal processo é irreversível, de modo que é melhor ter colônias crescendo em outras placas ou tubos como reserva.

É válido notar que a fase tecidual de patógenos dimórficos não é infecciosa por via aerógena, de modo que existe pouco ou nenhum risco de manipular amostras de tecidos de pacientes com histoplasmose ou coccidioidomicose. Uma exceção possível a essa regra pode ocorrer se *C. immitis* crescer em sua fase de mofo dentro de uma cavidade pulmonar que esteja conectada à árvore brônquica.

Coleta e transporte de amostras

A amostra correta a ser submetida ao laboratório de micologia depende da apresentação clínica e do sistema orgânico acometido. Um resumo das principais categorias de doenças causadas por fungos, junto às espécies sugeridas, é apresentado na Tabela 60.4.

Leveduras, principalmente de *Candida* spp., às vezes podem ser recuperadas de amostras obtidas com *swabs*, em especial de lesões purulentas. Os *swabs* podem ser usados para a obtenção de amostras de lesões orais ou vaginais sugestivas de candidíase e ser adequados para colher amostras de pacientes com otite externa crônica, em que grandes números de conídios de *Aspergillus* em geral estão presentes. Mesmo assim, os *swabs* definitivamente são recursos inferiores para a coleta de amostras na maioria das áreas das doenças infecciosas. Um problema particular deles é que suas fibras podem ser confundidas com elementos de hifas no exame direto de amostras clínicas. Uma prática firme, mas flexível, de rejeitar *swabs* na maioria dos casos de cultura fúngica deve ser acompanhada por esforços educacionais constantes e persistentes.

As melhores amostras para diagnóstico micológico são raspados, material colhido por curetagem, aspirados e biópsias de lesões. Pelos infectados com fungos dermatofíticos (p. ex., *Microsporum canis*) fluorescem à luz ultravioleta de longo comprimento de onda (lâmpada de Wood) e podem ser selecionados especificamente para exame. As lesões cutâneas da dermatofitose (tinha cutânea) caracterizam-se por uma borda ativa que avança com cicatrização central, de modo que podem ser colhidos raspados da margem do processo. Pelos, unhas e raspados de pele devem ser enviados para o laboratório em um recipiente limpo e seco. As amostras de biópsias devem ser enviadas em um recipiente estéril com solução fisiológica ou um meio de transporte também estéril, para evitar ressecamento da amostra. A maioria das amostras pode ser manipulada como qualquer outra que fosse obtida para fins de observação e cultura bacteriana.

Exame direto

A maioria das amostras clínicas pode ser examinada diretamente em busca da presença de um patógeno fúngico, embora resultados negativos não sejam sensíveis o bastante para excluir a presença de um fungo. São empregadas múltiplas técnicas para o exame direto do material clínico. É importante lembrar que a manipulação do material da amostra pode tornar o material inaceitável para cultura, de maneira que, nos casos em que se pretende fazer cultura, as amostras precisam ser separadas antes desse tipo de exame.

Montagem a fresco

O método mais simples de exame direto de uma amostra é a observação de uma suspensão colocada em lâmina e coberta com lamínula sob iluminação de baixa intensidade. No caso de amostras secas e viscosas, é necessário acrescentar um agente umidificador, como solução fisiológica, antes da observação. No caso de amostras que contêm restos teciduais e células, como secreções vaginais, unhas e raspados de pele, pode-se usar uma solução de hidróxido de potássio (KOH) para dissolver o material de tecido, para tornar os elementos fúngicos mais visíveis (Tab. 60.5).

Coloração de Gram

O corante biológico de uso comum é particularmente útil para a detecção de leveduras. A maioria delas é parcial ou completamente Gram-positiva e, em geral, diferenciada das bactérias por seu tamanho maior e pela presença de células em brotamento (Fig. 60.5). As hifas de mofos podem ser Gram-positivas ou Gram-negativas a essa coloração, mas coram-se de forma menos confiável que as células de leveduras e passam facilmente despercebidas em amostras clínicas submetidas a esse método.

Corantes de Giemsa ou Wright

Ante suspeita de histoplasmose, esses corantes hematológicos são úteis para demonstrar as células de leveduras dentro de macrófagos.

Preparações com nanquim

A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* pode ser demonstrada pela coloração negativa mediante o uso de partículas de nanquim, sendo estas especialmente evidentes ao examinar-se líquido cerebrospinal infectado (Tab. 60.6). À microscopia óptica, a cápsula aparece como um

Tabela 60.4 Síndromes clínicas principais e patógenos comumente associados

Apresentação clínica/sistema orgânico	Grupo de pacientes	Patógeno(s) provável(is)	Amostra(s)
Infecção de pele, pelos ou unhas	Todos	Dermatófitos *Candida* *Malassezia*	Raspados de pele Pelos Unha cortada
Tecidos subcutâneos	Todos	*Coccidioides immitis* *Blastomyces dermatitidis* *Sporothrix schenckii*	Biópsia da lesão
	Paciente com micetoma	*Scedosporium apiospermum* *Madurella* *Nocardia** *Streptomyces** *Actinomadura**	
Pneumonia primária	Todos	*Histoplasma capsulatum* *Blastomyces dermatitidis* *Cryptococcus neoformans*	Escarro Lavado broncoalveolar Biópsia transbrônquica Biópsia cirúrgica de pulmão
	Imunodeficientes	*Aspergillus* *Fusarium* Zygomycetes *Scedosporium apiospermum* *Pneumocystis jiroveci*	
Infecção gastrintestinal	Imunodeficientes	*Candida* *Aspergillus* Zigomicetos	Raspados Material de curetagens Biópsia da lesão
Infecção do trato urinário	Todos	*Candida*	Urina
Endocardite	Todos	*Candida* *Fusarium*	Sangue
Meningite	Imunodeficientes	*Cryptococcus neoformans* *Candida*	Líquido cerebrospinal
Encefalite e abscesso cerebral	Imunodeficientes	Zigomicetos *Aspergillus* *Nocardia asteroides** *Cladophialophora bantiana*	Biópsia cerebral
Osteomielite	Todos	*Coccidioides immitis* *Blastomyces dermatitidis* *Cryptococcus neoformans*	Biópsia óssea
Ceratite	Todos	*Aspergillus* *Fusarium*	Raspado
Otite externa	Todos	*Aspergillus*	Raspado *Swab*
Sinusite	Todos	*Aspergillus* *Fusarium* Mofos dematiáceos	Biópsia Material de curetagens
Feridas de queimaduras		*Aspergillus* Zigomicetos *Fusarium* *Scedosporium apiospermum*	Biópsia de pele
Vaginite	Todos	*Candida*	Secreções vaginais
Infecção de cateter intravenoso	Cateter permanente	*Candida* *Malassezia furfur* (neonatos)	Extremidade do cateter Sangue
Infecção disseminada	Todos	*Histoplasma capsulatum* *Blastomyces dermatitidis* *Coccidioides immitis*	Sangue Biópsia tecidual
	Imunodeficientes	*Candida* Zigomicetos *Aspergillus* *Fusarium* *Scedosporium apiospermum* *Cryptococcus neoformans* Potencialmente qualquer fungo	Sangue Biópsia tecidual

* Patógenos bacterianos.

Tabela 60.5 Preparação de KOH

1. Colocar uma gota de KOH (hidróxido de potássio) a 10% em uma lâmina de microscopia (de vidro) limpa.
2. Imergir uma alíquota da amostra na gota de KOH sobre a lâmina.
3. Aquecer levemente a mistura, passando a lâmina sobre a chama de um bico de Bunsen várias vezes. Não deixar a mistura ferver.
4. Cobrir a lâmina com lamínula e examinar sob aumentos de 100 × e 400 × com pouca luz. Pode ser preciso aquecer mais amostras excessivamente viscosas.
5. Também se pode usar KOH como meio simples de montagem, sem aquecer.

(O acréscimo de anilina azul de lactofenol ou calcoflúor branco ao KOH aumenta a visibilidade dos elementos fúngicos.)

espaço claro em torno da célula fúngica, com as partículas de nanquim saindo da margem à medida que ocorre um movimento browniano (Fig. 60.14). Quando são demonstradas células de leveduras em brotamento ao longo da cápsula no líquido cerebrospinal (LCE) de pacientes infectados, a especificidade do diagnóstico de meningite estreptocócica está assegurada. Outros fungos potencialmente encapsulados, como *Rhodotorula* spp. ou outras espécies de criptococos, são patógenos infrequentes e podem ser excluídos da consideração prática em tal circunstância. Embora as cápsulas geralmente sejam grandes ao exame direto das amostras, o isolamento do patógeno em meio com ágar em geral caracteriza-se pela produção de uma cápsula muito diminuída, que não é tão óbvia. Infelizmente, algumas cepas de *C. neoformans* são pouco encapsuladas e, portanto, a sensibilidade do teste com nanquim em geral é positiva em menos de 50% dos pacientes que não estão infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Contudo, a detecção direta de antígeno na lesão ou em soro, empregando-se a aglutinação no látex ou a técnica do imunoensaio enzimático, aumentou a sensibilidade para quase 100%. Essas técnicas praticamente substituíram o uso da tinta nanquim como método de diagnóstico direto, embora o nanquim ainda seja útil quando o teste do antígeno não está imediatamente disponível e para o exame de cápsulas em células de colônias isoladas que sugiram *C. neoformans*. O teste com nanquim parece ter maior sensibilidade em pacientes infectados pelo HIV, talvez por causa do maior número de células de levedura presentes (Chuck, 1989).

Corantes histoquímicos

O exame patológico cirúrgico de material de biópsia é uma prática comum para a identificação de infecções fúngicas suspeitas. Vários corantes provaram ser úteis para o reconhecimento de elementos fúngicos em tecido e para mostrar a resposta imunológica à infecção. O método do ácido periódico de Schiff (PAS) é útil para demonstrar detalhes internos. A técnica da metenamina de prata de Gomori (GMS) é considerada uma das melhores colorações para demonstrar fungos, porque proporciona alto contraste com coloração mínima do fundo, o que permite a demonstração de elementos fúngicos presentes esparsamente na amostra. A melhor utilização da coloração com hematoxilina e eosina (H&E) é para o estudo da reação do hospedeiro e a determinação quanto a um fungo ser hialino (incolor) ou dematiáceo (naturalmente pigmentado). Quando se combina GMS com H&E como contracorante, é possível estudar a morfologia detalhada tanto do tecido como do fungo (Swisher, 1982). Outros corantes mais especializados incluem a mucicarmina de Mayer para a demonstração da cápsula mucoide de *C. neoformans* e o de Fontana-Masson para a demonstração de melanina ou substâncias semelhantes a ela nos agentes levemente pigmentados da feoifomicose. Um livro de Chandler e Kaplan (Chandler, 1987a) fornece mais detalhes sobre o uso de corantes para detecção de fungos em tecidos.

Tabela 60.6 Preparação de nanquim para a identificação presuntiva de *Cryptococcus neoformans*

1. Centrifugar o líquido cerebrospinal por 10 minutos, no mínimo.
2. Colocar uma gota de nanquim em uma lâmina de microscopia (de vidro) limpa.
3. Misturá-la com uma gota de sedimento obtida do líquido agitado e cobrir com lamínula.
4. Procurar leveduras encapsuladas sob aumento de 400 ×.

(Colônias que crescem no ágar também podem ser misturadas diretamente com nanquim em uma lâmina, para confirmar a presença de cápsulas.)

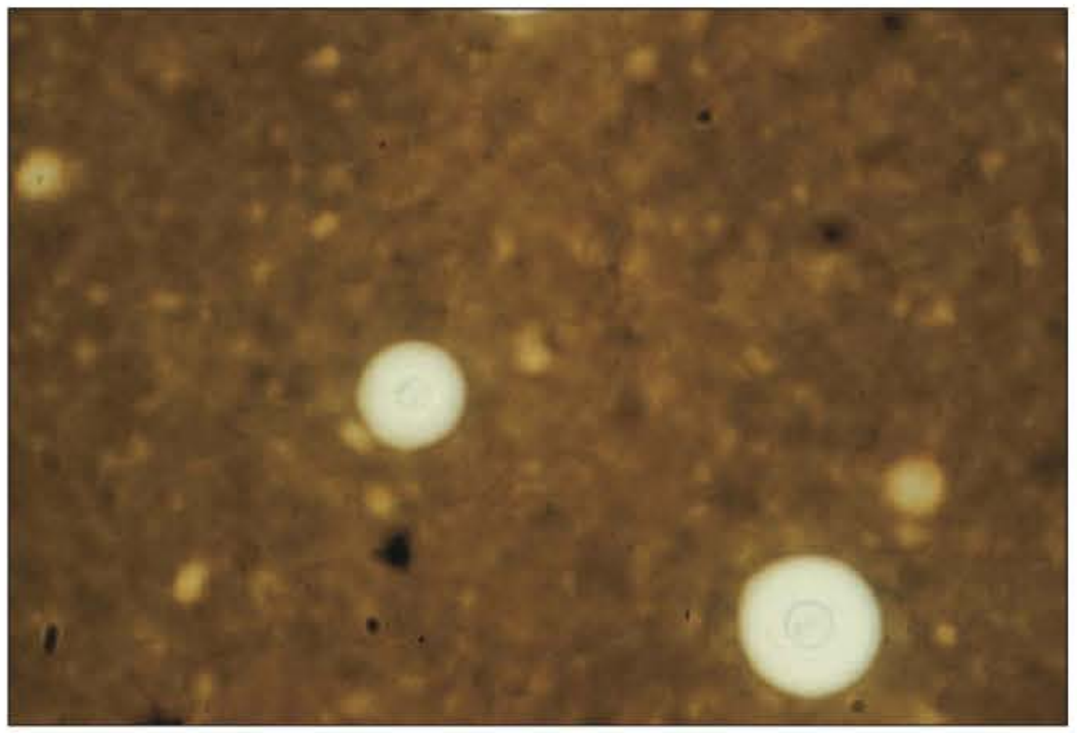


Figura 60.14 Preparação, em nanquim, de líquido cerebrospinal com *Cryptococcus neoformans*. Essa levedura produz uma cápsula polissacarídica arredondada característica de células de levedura em brotamento (× 400).

Corante calcoflúor branco

Esse composto de fluorocromo, um clareador usado nas indústrias têxteis e de papel, liga-se à quitina nas paredes das células fúngicas e fluoresce na cor branca (Fig. 60.15) ou verde-maçã (dependendo da combinação de filtro usada) quando exposto à luz ultravioleta de onda curta de um microscópio de fluorescência (Tab. 60.7) (Hageage, 1984). O calcoflúor branco também pode ser misturado com hidróxido de potássio para clarear a amostra e facilitar a observação de fungos. Como de fato, com relação a todos os corantes fluorescentes, é preciso cuidado ao se interpretarem os resultados, pois também pode ocorrer a coloração inespecífica de substâncias que lembram elementos fúngicos.

Isolamento em cultura

Seleção dos *meios*

Todas as amostras devem ser inoculadas em um meio com o propósito geral de crescimento fúngico (Tab. 60.3). O meio tradicional usado é o ágar de Sabouraud com glicose, que tem um pH de 5,5 a 5,6

Figura 60.15 Coloração com calcoflúor branco de *Candida albicans* em cultura. Quando observadas ao microscópio de fluorescência, as paredes quitinosas do fungo fluorescem. São mostrados tubos de germinação, produzidos após a incubação da levedura em soro (cortesia do Dr. Brian Harrington, CDC Public Health Image Library).

Tabela 60.7 Coloração com calcoflúor branco

1. Colocar a amostra em uma lâmina de microscopia (de vidro) limpa.
2. Misturá-la com o reagente calcoflúor branco.
3. Ao microscópio de fluorescência, examinar a preparação em busca de elementos fúngicos sob aumento de 100–400× (é normal ver um branco-azulado sobre fundo escuro).

(O calcoflúor branco pode ser substituído por anilina azul de lactofenol ao se estudar a morfologia microscópica de isolados de cultura.)

e foi designado para o isolamento de fungos dermatofíticos. A modificação de Emmons para esse meio, com menos glicose e pH de 6,8 a 7, é mais amplamente usada na micologia clínica como meio geral de crescimento por sua ampla aplicação para a cultura de fungos. Ágar inibitório de mofo e ágar com batata e glicose também são usados como meios de isolamento gerais em laboratório. Rinaldi (1982) descreveu uma modificação simplificada do ágar com batata e glicose, em que se usa uma preparação de flocos de batata disponível em supermercados. É mais fácil de preparar que o meio tradicional baseado em batata e funciona de forma equivalente. O ágar com flocos de batata é vantajoso para mofos, porque as estruturas reprodutivas assexuadas de utilidade diagnóstica desenvolvem-se mais rapidamente nesse ágar do que no meio de Sabouraud com dextrose.

No caso de amostras de locais não estéreis ou provavelmente contaminados, recomenda-se a inoculação em ágar não seletivo e também em ágar seletivo. Os meios de ágar seletivos mais comuns empregam ciclo-heximida para inibir fungos saprófitas e um agente antibacteriano (em geral cloranfenicol ou gentamicina) para inibir bactérias. No caso de amostras de tecidos, especialmente quando um fungo dimórfico poderia ser o agente etiológico, pode-se acrescentar um ágar enriquecido, como infusão de cérebro e coração com sangue e suplementado com antibióticos.

O acréscimo recente para cultivo de leveduras a partir de amostras clínicas é o meio seletivo e diferencial denominado CHROMagar *Candida,* que usa uma mistura cromogênica que permite o isolamento seletivo de leveduras e simultaneamente identifica colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Esse meio provou ser útil para detectar culturas mistas de *Candida* spp. dentro de uma única amostra (Pfaller, 1996).

Inoculação e incubação

O processamento de amostras clínicas para a detecção de fungos requer manipulação cuidadosa, porque alguns processos de uso comum para preparar amostras para culturas bacterianas, por exemplo, trituração em homogeneizador, pode ser muito prejudicial para o organismo fúngico. A inoculação de raspados ou material de curetagens sobre a superfície do ágar e em múltiplos pontos dela é uma técnica confiável para cultura. O tecido deve ser picado ou macerado, sendo os fragmentos posteriormente inoculados da mesma forma.

Placas ou tubos devem ser incubados em ar ambiente a 25–30°C. Uma incubadora com temperatura controlada é essencial. Não é necessário incubar placas paralelas ou tubos a 37°C para recuperação da fase de levedura de fungos dimórficos, porque isso acrescenta pouco aos resultados. A maioria dos fungos cresce em um período de incubação de duas semanas e, entre os fungos comumente isolados, apenas os dimórficos como *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* são frequentemente detectados após 14 dias de incubação. As recomendações gerais em termos de tempo de incubação são 7 dias para detectar a presença de leveduras na boca, na garganta ou na vagina; 21 dias para detectar patógenos fúngicos em tecidos e líquidos corporais estéreis que não o sangue, e até 28 dias para amostras respiratórias, da medula óssea, de sangue e aquelas em que se suspeita de um fungo dimórfico. Em geral, todas as outras amostras devem ser incubadas por até 14 dias. As placas devem ser examinadas pelo menos duas vezes durante a primeira semana, quando os isolados de crescimento rápido podem aparecer, e depois pelo menos uma vez por semana.

Hemoculturas

A recuperação de fungos em sangue requer atenção especial e pode ser conseguida inoculando-se meios em forma de caldo, com o uso de um sistema bifásico, ou pela técnica de lise por centrifugação (Isolator, Wampole, Cranbury, NJ). O sistema Isolator consiste em um tubo que contém uma solução que lisa eritrócitos e leucócitos (Cockerill, 1996, Reimer, 1997). Depois que o sangue é posto no tubo a vácuo, o conteúdo lisado, incluindo-se quaisquer micróbios, é centrifugado até formar um *pellet*, que é removido e colocado na superfície de placas de ágar. O sistema Isolator provou ser especialmente valioso para a detecção de *H. capsulatum* no sangue. Embora seja considerado o método mais sensível para detecção de fungemia, o sistema Isolator é um pouco mais suscetível a contaminação, seja pela manipulação durante o processamento ou por esporos existentes no ar que vão para a placa de ágar (Reimer, 1997). Como uma alta porcentagem de fungemias é causada por leveduras, o desenvolvimento de métodos automatizados contínuos tornou-se a pedra fundamental para detecção, incluindo-se o sistema BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, MD) ou o BacT-Alert (Organon Teknika, Durham, NC). Como as leveduras são organismos anaeróbios, são empregados frascos de cultura aeróbia para sua detecção. Existem frascos com meio específico para lise, mas muitos laboratórios têm tido sucesso usando os frascos-padrão de hemocultura para detecção de fungos. Os métodos moleculares provaram ser úteis para a identificação de espécies de fungos diretamente a partir de frascos de hemocultura (Iwen, 2004). Esses métodos mostram aplicabilidade como potencial rápido e técnicas confiáveis para a identificação de fungos.

Taxa de crescimento

A taxa de crescimento de isolados fúngicos fornece um indício útil em termos de possibilidades diagnósticas. Em geral, os fungos patogênicos dimórficos e dematiáceos crescem mais devagar, levando-se uma semana ou mais para que as colônias apareçam. O significado do crescimento rápido de colônias de mofos que surgem após uma incubação prolongada em meios micológicos deve ser questionado como possíveis contaminantes. No entanto, há muitas exceções a essa generalização, e a equipe do laboratório precisa estar certa de que fungos como *C. immitis*, um patógeno clássico, podem crescer rapidamente em outros meios que não para fungos. São necessários protocolos sobre como manipular o crescimento de fungos em culturas bacterianas, para evitar a exposição desnecessária do pessoal do laboratório a patógenos fúngicos altamente infecciosos que possam ser encontrados.

Temperatura de crescimento

O crescimento a uma temperatura elevada é ocasionalmente um recurso diferencial útil para a identificação de fungos. A maioria dos mofos cresce melhor a 25–30°C. Contudo, a maioria das leveduras cresce bem a 35–37°C e em geral é recuperada primeiro em placas de ágar enriquecido com sangue no laboratório de bacteriologia. Em alguns casos, o crescimento de um fungo a temperaturas elevadas é útil para a diferenciação de espécies.

Identificação morfológica

Alguns dos estudos morfológicos necessários para a identificação de isolados fúngicos podem ser realizados com colônias das placas de isolamento originais, mas costuma ser necessário transferir porções de colônias para meios novos e diferentes (subculturas), para a demonstração de estruturas diagnósticas. Na Tabela 60.3, há uma descrição de alguns dos meios comuns usados para a identificação de espécies de fungos. Um dos meios mais comumente utilizados é o ágar de maisena suplementado com Tween 80 (CM-T80), para a visualização da morfologia de leveduras. O reconhecimento de pseudo-hifas com clamidoconídios sobre esse meio é confirmatório de *C. albicans*. Outros aspectos morfológicos podem ajudar a caracterizar a levedura em grupos, para auxiliar na separação em espécies. Embora testes bioquímicos sejam importantes para identificar isolados de leveduras, o exame morfológico proporciona uma verificação importante em termos de informação bioquímica, especialmente se for usado um sistema de identificação comercial.

Morfologia das leveduras

O teste do tubo de germinação é uma etapa inicial importante na identificação de isolados de levedura. Esses tubos, que são extensões digitiformes alongadas de uma célula de levedura, são os primórdios de uma hifa verdadeira (Fig. 60.16). Tal estrutura pode ser identificada a partir de pseudo-hifas pela ausência de uma constrição na junção do tubo de germinação com a célula da levedura e pelas paredes celulares paralelas no tubo germinativo. Tubos de germinação verdadeiros são formados tanto por *C. albicans* quanto por *C. dubliniensis*, após crescimento em soro a 37°C por não mais que 4 horas. Em muitos laboratórios com pessoal bem treinado, o tubo de germinação em combinação com resultados da morfologia em ágar CM-T80 é considerado confirmatório para a identificação de *C. albicans*/*C. dubliniensis*.

O teste tradicional do tubo de germinação envolve a inoculação de um tubo de soro (Tab. 60.8). Após a observação do isolado em tubos de germinação a 37°C, a incubação prossegue para o estudo subsequente da morfologia da hifa e da formação de clamidioconídios a 25–30°C. Portanto, toda a informação necessária pode ser obtida com um único procedimento. O ágar com maisena pode ser substituído, mas, qualquer que seja o meio utilizado, as condições de incubação precisam ser cuidadosamente controladas e o teste monitorado com controles, para que sejam alcançados bons resultados. A técnica tradicional de Dalmau para a demonstração de clamidioconídios em ágar com maisena está detalhada na Tabela 60.9 (McGinnis, 1980).

Morfologia dos mofos

O método mais simples para exame de mofos é a montagem em fita de celofane, usando-se uma fita transparente que é corada com anilina azul de lactofenoal (algodão) (LPAB). Caso não sejam observadas estruturas diagnósticas, a incubação pode continuar, e o processo ser repetido. O método tradicional para observar a morfologia de mofos consiste em fragmentar o micélio com agulhas de inoculação e examinar as hifas fragmentadas com o corante LPAB.

Ocasionalmente, pode ser necessário fazer uma cultura em lâmina para preservar estruturas de conídios facilmente rompidas em suas relações originais. A abordagem clássica envolve o corte de quadrados de um meio de ágar apropriado (geralmente Sabouraud com glicose ou ágar com glicose e batata), que são suspensos em uma lâmina apoiada por bastões de vidro em uma placa de Petri em que se acrescenta água estéril para manter a umidade.

Caso se suspeite de um isolado de mofo como sendo um fungo dimórfico (p. ex., crescimento em meio que contém ciclo-heximida), não se deve fazer cultura em lâmina e só se deve examinar um teste com fita de celofane ou preparação fragmentada após a preparação ter sido vedada em uma cabine de segurança certificada para isso. A anilina azul de lactofenol é fungicida, mas passar esmalte de unha sobre a lamínula antes da observação confere proteção adicional. Uma alternativa é inundar a cultura com formalina a 10% (solução de formaldeído a 4%) e incubá-la à temperatura ambiente por uma noite antes de manipular o mofo.

Identificação bioquímica

Testes bioquímicos são a base dos esquemas de identificação de leveduras e são ocasionalmente úteis para a identificação de mofos. Vários testes rápidos para a identificação presuntiva de leveduras são mencionados na Tabela 60.10.

A caracterização bioquímica de leveduras pode ser conseguida pelo estudo da fermentação ou padrões de assimilação. O teste da assimilação, que é usado mais extensamente no laboratório, avalia a capacidade de um isolado usar um carboidrato como única fonte de carbono necessária para o crescimento ou de nitrato como única fonte de nitrogênio. O método auxanográfico de Wickerham usa um meio basal em que um carboidrato particular ou nitrato serve como nutriente. O crescimento da levedura ocorre na extremidade terminal de um teste positivo. Esse método incômodo de referência não é detalhado, porque foi substituído na maioria dos laboratórios por um de cinco sistemas comerciais de identificação: API 20C (BioMérieux, Hazelwood, MO), Vitek Systems (BioMérieux, Hazelwood, MO), MicroScan (Dade Behring MicroScan, Sacramento, CA), UniYeastTek System (Remel Laboratories, Lenexa, KS) e RapID Yeast Plus System (Innovative Diagnostics Systems, Norcross, GA). Todos os cinco sistemas funcionam bem, de acordo com relatos na literatura e os testes de proficiência do College of American Pathologists (Dooley, 1994; Fenn, 1994; Riddle, 1994; Crist, 1996; Bernal, 1998; Espinel-Ingroff, 1998; Ramani, 1998). Como não se conhece um sistema sequer que tenha 100% de acurácia para a identificação de espécies de leveduras, em geral considera-se uma combinação de métodos.

Além dos estudos de fermentação e assimilação, a estimulação do crescimento por compostos bioquímicos é um teste secundário na diferenciação de certas espécies de *Trichophyton* (Weitzman, 1983).

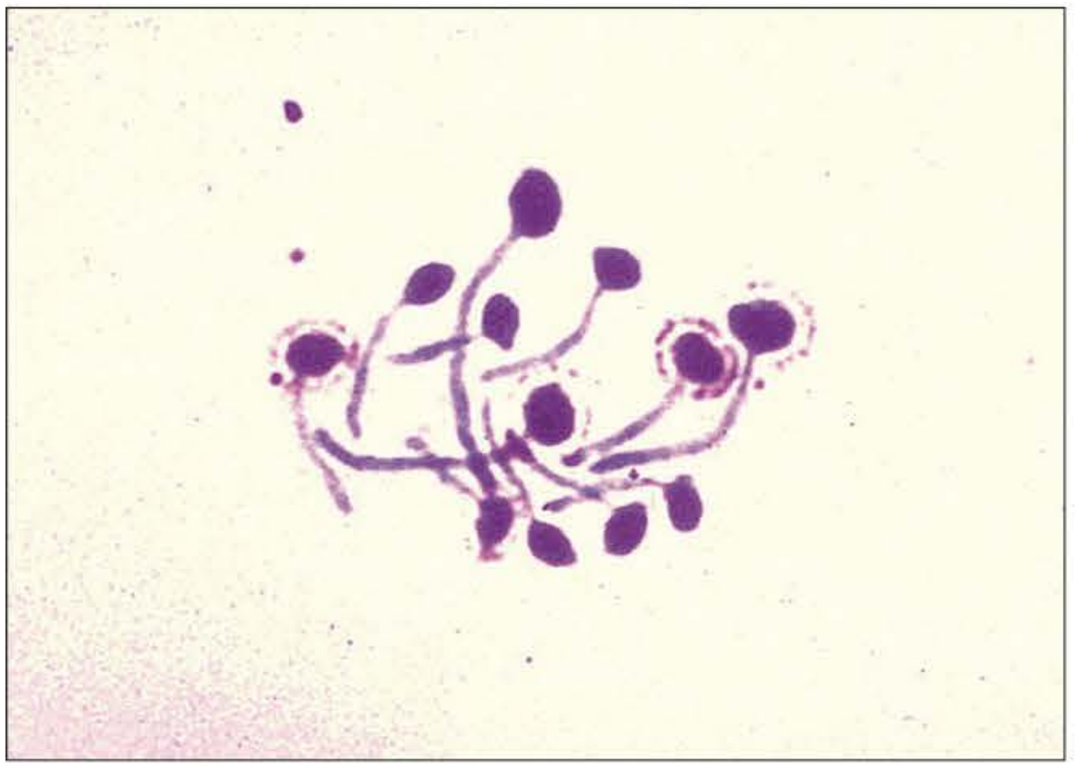


Figura 60.16 Tubos de germinação estendidos das células de *Candida albicans*. Não há constrição na junção da célula de levedura com o tubo germinativo. As paredes do tubo germinativo são paralelas. O soro humano foi incubado por 2 horas a 37°C (coloração de Gram; ×400).

Tabela 60.8 Teste do tubo de germinação com soro

1. Transferir assepticamente várias colônias de leveduras para um tubo de teste de 12 × 75 mm que contenha aproximadamente 0,5 mL de soro (humano, fetal de bezerro, bovino ou de coelho).
2. Incubar o tubo a 37°C por 2 a 4 horas.
3. Colocar uma gota da mistura em uma lâmina de microscopia (de vidro) limpa e cobrir com lamínula.
4. Examinar os tubos em busca de germinação sob aumento de 400× e pouca luz.

Tabela 60.9 Teste para a morfologia de leveduras

1. Fazer um inóculo leve de levedura sobre uma parte de ágar com maisena que contenha Tween 80.
2. Cobrir com lamínula a área inoculada.
3. Incubar a 25–30°C por 24–72 horas.
4. Observar a morfologia das estruturas sob aumento de 100× e 400× com pouca luz.

Tabela 60.10 Teste rápido para a identificação presuntiva de levedura após a formação de colônias

Característica	Organismo provável
Produção de urease	*Cryptococcus neoformans*
Germinação em tubo	*Candida albicans*
Presença de pseudo-hifas	Espécies de *Candida*
Presença de clamidósporos	*Candida albicans*
Necessidade de lipídeo para crescimento	*Malassezia furfur*
Pigmentação vermelha da colônia	Espécies de *Rhodotorula*
Formação de ascósporo	*Saccharomyces cerevisiae*
Assimilação de trealose	*Candida glabrata*

A inclusão de inositol e tiamina em várias combinações de meios de ágar (para *Trichophyton*) permite avaliar as propriedades estimulantes do crescimento. O ponto terminal do teste, crescimento relativo em comparação com um meio basal, é subjetivo, e controles tanto positivos como negativos devem ser incluídos.

O teste para produção de urease por criptococos é de utilidade geral no laboratório clínico para diferenciá-los de *Candida* spp., particularmente em amostras respiratórias (Canteros, 1996). *C. neoformans* é um patógeno pulmonar e sistêmico, enquanto *Candida* spp. são habitantes frequentes das vias respiratórias superiores, mas causas incomuns de pneumonia primária. A urease pode ser produzida por outras espécies não patogênicas de *Cryptococcus*, por espécies de *Rhodotorula* e por alguns isolados de *Trichosporon beigelii* e *C. krusei*. A produção de urease pode ser testada por inoculação do isolado de levedura em ágar inclinado de Christensen com ureia ou em caldo de ureia. A alcalinização do meio após produção de NH_3 por organismos que desdobram a ureia é detectada por inclusão de um indicador de pH no sistema. As colônias com pseudo-hifas (podócitos) visíveis à observação macroscópica ou que crescem em ágar que contém ciclo-heximida não precisam ser testadas, porque os criptococos não produzem pseudo-hifas *in vitro* e não crescem na presença de ciclo-heximida.

Os testes bioquímicos também desempenham um papel auxiliar na identificação de mofos dermatofíticos. A produção de urease em quatro dias ajuda a diferenciar *Trichophyton mentagrophytes* (urease-positivo) de *T. rubrum* (urease-negativo). O isolado deve ser subcultivado em ágar incinado de Christensen com ureia e incubado a 25–30°C por pelo menos 3 dias. Uma reação positiva é forte indício da produção de urease, evidenciada pela alcalinização do meio.

Se os testes bioquímicos são o coração dos sistemas de identificação de leveduras, a confirmação da identificação pelo exame da morfologia da levedura em meio de ágar é sua alma. Ao usar-se a observação morfológica como forma de verificação, é possível evitar erros desastrosos que ocorreriam se fossem utilizados sistemas automatizados ou preparados previamente.

Identificação sorológica

Existem testes sorológicos para a detecção tanto de antígenos como de anticorpos para selecionar patógenos fúngicos (Hamilton, 1998, McLintock, 2004). Os testes para anticorpos provaram ser úteis para o diagnóstico e o tratamento de pacientes imunocompetentes com histoplasmose e coccidioidomicose. Com a disponibilidade de reagentes comerciais bem padronizados, têm sido usados tanto testes de fixação do complemento como de imunodifusão. O teste sorodiagnóstico de anticorpos para outros patógenos fúngicos não teve muita aceitação, por causa de suas baixas sensibilidade e especificidade. Além disso, a impossibilidade de pacientes imunocomprometidos montarem uma resposta humoral torna o teste de anticorpos menos útil nesse tipo de paciente.

Em contrapartida, mostrou-se que testes para detectar antígenos antifúngicos ou subprodutos metabólicos no soro ou em outros líquidos corporais são mais úteis para o diagnóstico e o tratamento de doença fúngica. Um dos testes de detecção de antígeno mais amplamente utilizados é o do antígeno criptocócico para o diagnóstico de infecção criptocócica (de Repentigny, 1992). A cápsula polissacarídica do *C. neoformans* dissolve-se no soro e no LCE, o que pode ser detectado pelo teste de algutinação no látex à venda no comércio, fabricado por várias empresas, ou o imunoensaio enzimático. O título de polissacarídeo criptocócico no LCE também é útil para monitorar a terapia com o tempo.

A detecção de antígenos para o diagnóstico de histoplasmose provou ser útil quando se usa soro, urina ou líquido de lavado broncoalveolar (Wheat, 2002, 2003a). O teste do antígeno tem um papel especial no diagnóstico de histoplasmose pulmonar aguda disseminada e difusa. Como um teste de triagem, o antígeno específico de *H. capsulatum* foi detectado na urina de 90% dos pacientes com infecção disseminada e 80% daqueles com histoplasmose pulmonar aguda (Wheat, 2003b).

Recentemente, um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) comercial (Platelia *Aspergillus* ELISA; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para a detecção de antigenemia por galactomanano, tornou-se disponível para o diagnóstico rápido de aspergilose invasiva (Herbrecht, 2002). Mostrou-se que esse teste pode ser útil quando são testadas múltiplas amostras de soro de pacientes de alto risco, mas diversas variáveis foram agora relatadas como variáveis que afetam o resultado do teste (Walsh, 2004b). O tratamento com piperacilina-tazobactam ou amoxicilina-clavulanato pode causar resultados positivos falsos para o galactomanano. Além disso, resultados positivos falsos são mais comuns em crianças que em adultos.

Testes cutâneos têm sido usados para o estudo epeidemiológico de algumas infecções, porém sua utilidade é limitada com finalidades diagnósticas.

Identificação molecular

As técnicas moleculares para avaliação de fungos avançaram bastante desde meados da década de 1990 (Reiss, 2000; Chen, 2002). Na micologia, ensaios de ácido nucleico foram usados em estudos que envolvem filogenética, tipagem epidemiológica, regulação da expressão gênica, identificação a partir de cultura e detecção direta/identificação a partir de material clínico (Iwen, 2003). Uma das maiores necessidades da medicina clínica é desenvolver métodos de detecção e identificação rápidas que possam ter aplicação direta em amostras clínicas. Tal necessidade baseia-se não apenas na impossibilidade dos testes laboratoriais atuais de fornecer um resultado em pouco tempo, mas também no fato de que as infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos costumam surgir subitamente, progredir com rapidez e em geral são fatais, a menos que o tratamento seja instituído logo no começo do problema.

O objetivo inicial de qualquer ensaio molecular é definir os *loci* genéticos dentro do genoma para uso como alvos moleculares. Numerosas áreas dentro do genoma fúngico foram avaliadas, com a maioria do trabalho atual usando áreas em sequência dentro do complexo gênico do DNA ribossômico (DNAr) como a região-alvo (Tab. 60.11) (Iwen, 2003). Essa seção do genoma inclui as áreas relativamente conservadas dos genes 18S, 5,8S e 28S e as áreas em sequência variável do DNA das regiões espaçadoras internas intervenientes transcritas (ITS), denominadas ITS1 e ITS2. Todos os três genes dentro do complexo DNAr e as regiões ITS1 e ITS2 foram usados em estudos sobre a avaliação molecular dos fungos. A homologia de sequência dentro do DNAr de genes e diferenças dentro das regiões espaçadoras são a base genética para a organização dos fungos nos grupos taxonômicos (Bastola, 2004). A maioria dos ensaios moleculares desenvolvidos atualmente usa uma região de domínio variável do gene 18S, ou uma ou ambas as regiões ITS como alvos moleculares (Iwen, 2002).

Tabela 60.11 Alvos genômicos utilizados para a detecção e a identificação de patógenos fúngicos

Gene-alvo	Espécies de fungo
Actina	*Candida albicans*
Proteinase alcalina	*Aspergillus fumigatus*
Quitina sintetase	Espécies de dermatófitos
Citocromo b	*Candida albicans*
Diidrofolato redutase	*Pneumocystis jiroveci (carinii)*
Proteína do choque térmico	*Candida albicans*
Proteína de ligação da IgE	Espécies de *Aspergillus*
rRNA mitocondrial	*Pneumocystis jiroveci*
Aspartato proteinase secretora	*Candida albicans*
Timidilato sintase	*Pneumocystis jiroveci*
Complexo DNAr (gene 5S)	*Candida albicans, Pneumocystis jiroveci*
Complexo DNAr (gene 18S)	Múltiplas
Complexo DNAr (gene 28S)	*Aspergillus fumigatus, Candida albicans*
Complexo DNAr (regiões IGS)	*Aspergillus fumigatus*
Complexo DNAr (regiões ITS)	Múltiplas

IGS = região espaçadora intergênica; ITS = região espaçadora interna transcrita.

Fonte: modificado com permissão de Iwen PC: Molecular detection and typing of fungal pathogens. Clin Lab Med, 2003; 23: 781–799.

Os ensaios moleculares disponíveis no comércio para testar fungos e a maioria dos métodos de amplificação de "fabricação interna" são usados apenas para confirmação da cultura. Os testes com sonda não ampliados liberados pelo GenProbe (Accuprobe, San Diego, CA) tiveram êxito na identificação de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. immitis* a partir de culturas. Mais recentemente, foram desenvolvidos ensaios de amplificação mediante o uso de uma variedade de métodos de identificação para identificar fungos a partir de culturas (Iwen, 2003). Tais métodos incluem a análise direta da sequência do DNA amplificado, iniciadores específicos do gênero ou da espécie, sondagem do *amplicon* específico do gênero ou da espécie, análise do polimorfismo do fragmento de restrição do DNAr, eletroforese capilar automatizada, imunoensaios enzimáticos por hibridização e eletroforese por resolução com microchip.

A abordagem por amplificação molecular também foi aplicada com sucesso à detecção do DNA fúngico diretamente a partir de amostras clínicas (Iwen, 2003). Muito da pesquisa atual nessa área centraliza-se na detecção de *Pneumocystis* (*carinii*) *jiroveci* em amostras respiratórias e na detecção/identificação de espécies de *Candida* e *Aspergillus* a partir de amostras de sangue e respiratórias (Chen, 2002). Outras amostras clínicas, como tecido profundo, dermatológicas e de líquidos oculares, também tiveram algum sucesso quando testadas diretamente quanto à presença de DNA fúngico.

Embora a maioria dos testes moleculares tenha sido centrada no uso da metodologia convencional da reação em cadeia da polimerase (PCR), também têm sido aplicadas muitas abordagens modificadas desse procedimento. Algumas dessas abordagens incluem ensaios como a PCR múltiplex e a *nested*-PCR para aumentar a sensibilidade do teste (Shin, 1999). Na PCR múltiplex, mais de uma sequência-alvo é amplificada, incluindo-se múltiplos pares de iniciadores na reação. Com a PCR aninhada, usa-se um segundo conjunto de iniciadores internos com relação ao conjunto original para reamplificar o DNA-alvo pela utilização do *amplicon* a partir da primeira PCR como molde.

A última revolução nos testes moleculares envolve o uso de PCR de ciclo rápido em tempo real. A plataforma de teste nessa metodologia abrange um ciclo térmico combinado com monitoração da fluorescência do produto amplificado durante o teste. A capacidade não apenas de detectar e identificar um patógeno fúngico rapidamente, mas também de quantificar o DNA fúngico em uma amostra, acrescenta aplicabilidade a essa tecnologia. Têm sido usados dois instrumentos comercialmente disponíveis: o GeneAmp 5700 (com sua versão atualizada, o Prism 7700) da Applied Biosystems, que usa sondas TaqMan marcadas com fluorescência, e o LightCycler da Roche Applied Science, que usa a técnica de transferência por sonda da energia de ressonância da fluorescência (FRET) para avaliar fungos com resultados promissores (Loeffler, 2000; Guiver, 2001).

Testes de suscetibilidade

Durante muitos anos, dispunha-se de alguns agentes quimioterápicos antifúngicos, com a anfotericina B, sendo particularmente o único agente efetivo contra a maioria dos patógenos sistêmicos. Embora esse agente antifúngico potente fosse frequentemente tóxico, a resistência à terapia era rara. A introdução recente de novos agentes antifúngicos e o desenvolvimento subsequente de resistência entre mofos e leveduras patogênicos deram novo ímpeto ao desenvolvimento e à padronização de testes de laboratório para orientar a quimioterapia antifúngica (Ellis, 2002; Pfaller, 2002, 2004; Hajjeh, 2004). O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antigamente National Committee for Clinical Laboratory Standards) desenvolveu métodos de referência para macro e microdiluição em caldo para testes de suscetibilidade antifúngica de leveduras (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002b) e mofos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002a) (Espinel-Ingroff, 2002, CLSI, 2002a, CLSI, 2002b). O documento CLSI M27-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002b) foi aprovado para teste com espécies de *Candida* e *C. neoformans*. O método CLSI M38-A (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002a) foi desenvolvido para teste de suscetibilidade *in vitro* dos fungos filamentosos de crescimento rápido mais comuns que podem causar doenças invasivas, como espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* e a forma de micélio de *Sporothrix schenckii*. Não foram estabelecidos pontos de ruptura interpretativos para avaliar os testes *in vitro* de mofos.

Como ambos os métodos de referência levam tempo para serem realizados, foram avaliadas alternativas simplificadas desses métodos, de forma a se incluir o teste E pelo método em ágar com gradiente de concentração inibitória mínima (MIC) (AB Biodisk, Piscataway, NJ) e o método Sensititre Yeast One (TREK Diagnostics Systems, Cleveland, Ohio). Demonstrou-se que ambos os métodos são confiáveis para testar mofos e leveduras com relação aos agentes antifúngicos considerados padrão (Espinel-Ingroff, 2002, 2003, 2004; Maxwell, 2003; Pfaller, 2003a, 2003b; Castro, 2004). A placa Yeast One foi liberada pela FDA para testar espécies de *Candida* com fluconazol, itraconazol e flucitosina no laboratório clínico. Demonstrou-se que ambos os métodos são confiáveis para teste com caspofungina, posaconazol, ravuconazol e voriconazol (Espinel-Ingroff, 2002; Maxwell, 2003; Pfaller, 2003c; Castro, 2004).

Embora os testes de suscetibilidade de todos os isolados fúngicos não sejam recomendados, eles podem ser indicados nas seguintes situações: (1) como parte de pesquisas periódicas que estabelecem antibiogramas para isolados em uma instituição; (2) para ajudar no tratamento da candidíase orofaríngea refratária em pacientes com aparente falha terapêutica e (3) para ajudar no tratamento da candidíase invasiva, quando o uso de agentes antifúngicos à base de azóis é incerto. São necessários futuros estudos para determinar a relação entre a MIC e a resposta do paciente à terapia, antes que os testes rotineiros de suscetibilidade antifúngica tenham utilidade clínica (Rex, 2001; Patterson, 2002).

Candidíase, criptococose e outras infecções causadas por leveduras

O gênero *Candida*

As espécies de *Candida* constituem as leveduras patogênicas mais importantes (Pfaller, 1998). Com o aumento do uso de terapias imunossupressoras, de antibióticos de amplo espectro e o envelhecimento da população, as leveduras assumiram um lugar importante entre os patógenos nosocomiais (Pfaller, 2004). As espécies de *Candida* são agora a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea adquiridas em hospitais nos EUA, com a *C. albicans* sendo responsável por mais de 50% das infecções, seguida pela *C. glabrata* e as espécies menos comuns *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* (Pfaller, 2002).

Fatores de risco

As infecções por *Candida* são limitadas em termos de extensão e gravidade se o hospedeiro for normal. Como as espécies desse gênero fazem parte da microbiota normal do trato gastrintestinal, de mucosas e da pele, as infecções ocorrem por questão de oportunidade. Por exemplo, o uso de terapia antibacteriana de amplo espectro rompe o equilíbrio da microbiota colonizadora nas mucosas da cavidade oral e do trato gastrintestinal, ao eliminar a população bacteriana competitiva predominante. Em alguns locais, como o sistema genital feminino, a causa de uma alteração no equilíbrio da microbiota normal pode não ser óbvia. Em locais cutâneos, como a virilha, o excesso de umidade predispõe a uma infecção individual por *Candida*.

Desenvolve-se doença grave e invasiva quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas. Diabetes, doenças ou terapias imunossupressoras e neutropenia decorrente de doença (p. ex., síndrome da imunodeficiência adquirida) ou tratamento com quimioterapia em altas doses são fatores de risco comuns. As infecções da corrente sanguínea, inclusive a endocardite fúngica, são promovidas pelo uso prolongado de cateteres vasculares, como é prática comum no tratamento de pacientes hospitalizados (Kojic, 2004).

Doenças clínicas

Embora a *C. albicans* seja sem dúvida o patógeno mais comum do gênero *Candida*, a frequência de outras espécies aumentou (Wingard, 1995; Pfaller, 2004). Diversos relatos descrevem infecções invasivas causadas por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* (Weems, 1992; Minari, 2001; Redding, 2002; Hawkins, 2003).

Infelizmente, isolados de *Candida* spp. estão desenvolvendo resistência aos antibióticos imidazólicos (p. ex., cetoconazol, fluconazol ou itraconazol). Em particular, as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* são

intrinsecamente mais resistentes a essa classe de agentes antifúngicos do que a *C. albicans* (Pfaller, 2002, 2003b). A *C. lusitaniae*, um patógeno isolado com pouca frequência, tende a desenvolver resistência à anfotericina *in vivo* (Hawkins, 2003).

Doença cutânea

A doença cutânea é a infecção mais frequente causada por espécies de *Candida*, manifestando-se tipicamente como lesões eritematosas da pele, às vezes acompanhadas por um exsudato cremoso branco ou descamação (Vazquez, 2002). Condições de umidade predispõem à infecção, como o exantema das fraldas em lactentes ou a infecção das dobras/pregas cutâneas em adultos (intertrigo). Locais comuns são a virilha (uma forma de prurido do jóquei), entre dedos e artelhos, sob as mamas femininas e as axilas. Trabalhadores que precisam ficar com as mãos imersas em água por muito tempo correm risco particular de infecções na pele das mãos, nas unhas (onicomicose) ou no leito ungueal (paroníquia). Uma doença cutânea crônica é uma manifestação incomum de infecção por *Candida* em pacientes com problemas na imunidade celular (Kirkpatrick, 2001).

Candidíase oral

A candidíase oral geralmente manifesta-se por meio de placas cremosas brancas sobre a mucosa bucal eritematosa (aftas) (Akpan, 2002). Os sintomas em geral são mínimos, mas infecções maciças podem resultar em disfagia. Fissuras nos cantos da boca são comuns e podem ser a queixa primária. A candidíase oral é uma infecção inicial comum em pacientes infectados pelo HIV (Narani, 2001). Candidíase oral e infecção por *Pneumocystis* foram os dois primeiros indícios da presença da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Candidíase gastrintestinal

Ocorre candidíase gastrintestinal mais frequentemente na forma de esofagite e, menos comumente, como gastrite (Bonacini, 2001). Lesões erosivas da parte distal do esôfago e do estômago resultam em dor subesternal, agravada à deglutição. Placas brancas recobrem as lesões quando vistas à endoscopia. O diagnóstico diferencial inclui infecção com o vírus do herpes simples, e os dois processos podem coexistir. Embora as espécies de *Candida* sejam parte frequente da microbiota do trato gastrintestinal inferior, o significado do achado de leveduras nas fezes é incerto. A verdadeira infecção invasiva do trato gastrintestinal inferior é menos comum do que a doença do trato gastrintestinal superior, embora a proliferação de *Candida* spp. nas fezes possa acompanhar a terapia antimicrobiana.

Candidíase vaginal

A candidíase vaginal aflige mulheres pós-puberais. As condições predisponentes incluem diabetes, terapia antimicrobiana, gravidez e atividade sexual (Vazques, 2002). Queimação e prurido vaginais, dispareunia e um corrimento clássico semelhante a um coalho estão associados a uma infecção que pode ser aguda ou crônica e difícil de erradicar.

Infecções do trato urinário

É difícil diagnosticar infecções do trato urinário porque as espécies de *Candida* costumam ser recuperadas da urina em decorrência de contaminação vaginal ou colonização da bexiga em pacientes com cateteres de demora, especialmente quando estão sendo administrados antibióticos sistêmicos (Sobel, 2001). A infecção grave do trato urinário superior, inclusive necrose das papilas renais, é uma complicação séria e ocorre particularmente em pacientes com uropatia obstrutiva. Culturas quantitativas não parecem úteis para avaliar o significado de espécies de *Candida* no trato urinário.

Candidíase invasiva

Essa costuma ser a denominação dada a infecções causadas por *Candida* que não as cutâneas ou de mucosas. A maioria das infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* resultam de invasão da corrente sanguínea e disseminação hematogênica do organismo. Define-se candidemia como o isolamento de *Candida* spp. em pelo menos uma amostra de sangue cultivada. Pode ocorrer disseminação hematogênica de *Candida* spp. para um ou mais órgãos. Infecções não hematogênicas de um único órgão profundo (também denominadas candidíases disseminadas ou profundas) por *Candida* não são comuns e podem representar a disseminação hematogênica para um único órgão, onde as manifestações de doença são observadas. Infecções invasivas localizadas primárias são mais frequentes após cirurgia abdominal, em que há perfuração do intestino levando à contaminação da cavidade peritoneal com *Candida*. Outras formas de infecção profunda incluem a endoftalmite, a meningite, a osteomielite, a hepatite e, raramente, a pneumonia. A endocardite fúngica como resultado de infecção da corrente sanguínea é mais frequentemente causada por espécies de *Candida*. Os fatores de risco para essa infecção incluem cirurgia para implantação de próteses valvares, cardiopatia valvular preexistente, cateteres intravenosos, antibióticos de amplo espectro, abuso de drogas intravenosas e imunossupressão. Para uma revisão das infecções profundas causadas por *Candida*, consultar Filler e Kullberg (Filler, 2002).

Patologia da infecção por Candida

A resposta histológica à infecção por *Candida* é comumente purulenta, lembrando as lesões de infecções bacterianas. É comum a presença de abscessos. Às vezes, a resposta às infecções por *Candida* é granulomatosa. No tecido, podem estar presentes leveduras em brotamento, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Quando predominam pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, é preciso diferenciar a levedura de mofos patogênicos invasivos, como *Aspergillus*. A invasão vascular, como ocorre com *Aspergillus* ou zigomicetos, é incomum nas infecções por leveduras. Em geral, a levedura pode ser demonstrada em cortes corados por H&E, mas pode ser mais facilmente reconhecida em cortes corados com metenamina de prata ou ácido periódico de Schiff.

Diagnóstico laboratorial

As amostras para cultura devem ser obtidas dos órgãos acometidos e de lesões em que possam ser visualizadas. Sistemas modernos de monitoração contínua de hemoculturas detectam a maioria dos isolados de significado clínico (Reimer, 1997). Amostras de tecido, raspados ou *swabs* da boca ou da vagina devem ser inoculados em meios de isolamento primários com e sem ciclo-heximida. A presença de extensões filamentosas das margens da colônia (podócitos) é uma indicação macroscópica de que estão sendo produzidas pseudo-hifas (Fig. 60.1). *C. glabrata* (antigamente *Torulopsis glabrata*) e *Cryptococcus* spp. não formam pseudo-hifas *in vitro*, e algumas outras espécies de *Candida*, como *C. lusitaniae* e *C. guillermondii*, podem não formar muitas pseudo-hifas.

A extensão da avaliação micológica depende do contexto clínico e do tipo de amostra. É comum isolar espécies de *Candida* dos tratos respiratório e urinário, porém a interpretação de tal achado é difícil. A identificação completa de isolados desses locais só deve ser feita após consulta ao clínico responsável.

Um relato preliminar de *C. albicans*/*C. dubliniensis* pode ser feito se o teste em tubo de germinação for positivo (Fig. 60.16). Ao estudar-se a morfologia de uma levedura com uso de ágar com maisena para confirmar a presença de clamidoconídios, a identificação de *C. albicans* em geral pode ser conseguida com uma única placa de ágar em 24 a 48 horas; ocasionalmente, são necessárias até 72 horas para a cultura ser completada (Fig. 60.17). Como tanto a *C. albicans* como a *C. dubliniensis* são positivas ao teste do tubo de germinação e as duas espécies têm alto grau de similaridade fenotípica, é difícil distingui-las. Mostrou-se que métodos moleculares são úteis com tal finalidade, porém a maioria dos laboratórios não tem condições de realizar um teste desse nível (Borst, 2003; Ellepola, 2003). Foi relatado que a impossibilidade de crescer a 42°C, a produção abundante de clamidoconídios e o padrão de assimilação de açúcar podem ser usados para distinguir essas duas espécies (Sancak, 2003). Caso não sejam demonstrados tubos de germinação e clamidoconídios, a identificação preliminar ou presuntiva de espécies de *Candida* pode ser feita se pseudo-hifas estiverem presentes e não houver artroconídios. A identificação completa requer testes de assimilação, mas observações morfológicas auxiliares são essenciais (Tab. 60.10). Um procedimento para teste rápido de assimilação com trealose foi aprovado recentemente pelo CLSI (documento M35-A) para a identificação de *C. glabrata*, espécie que emergiu como causa comum de doença invasiva com resistência conhecida à terapia antifúngica-padrão (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002c). No momento, testes imunológicos não podem ser recomendados para o diagnóstico de candidíase.

Figura 60.17 Clamidoconídios produzidos por *Candida albicans*. Essas estruturas reprodutivas assexuadas de parede espessa que ocorrem mais comumente nas extremidades de pseudo-hifas são características dessa espécie (exame em placa de ágar com maisena; × 400).

O gênero *Cryptococcus*

O patógeno primário desse gênero é o *C. neoformans*. Existem duas variedades da espécie: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* (Kwon-Chung, 1992). A última variante é encontrada predominantemente nos trópicos e subtrópicos, estando associada às árvores de eucalipto, enquanto a variante *neoformans* é encontrada em todo o mundo em dejetos de pombos ou solo contaminado com excreta de aves. Ambas as variantes possuem dois sorotipos, mas a determinação da reação sorológica só tem interesse epidemiológico. O estágio sexuado de *C. neoformans* é um basidiomiceto, *Filobasidiella neoformans*, porém o teleomorfo não é isolado em laboratórios clínicos. Ocasionalmente, outros criptococos são isolados de locais não estéreis, mas raramente estão implicados em doença humana, se é que isso acontece. A fonte ambiental primária do *C. neoformans* são os dejetos de pombos ou, menos comumente, de outras espécies de aves. O solo contaminado por guano de aves também pode abrigar o fungo.

Fatores de risco

A terapia ou doença imunossupressora é um fator de risco para a criptococose (Kwon-Chung, 2000; Perfect, 2002; Vilchez, 2002). Antes do aparecimento da infecção pelo HIV, 30 a 50% dos pacientes com infecção criptocócica não tinham anormalidades imunológicas detectáveis. Os fatores de risco para pacientes que não estão infectados pelo HIV incluem neoplasia, diabetes, terapia imunossupressora ou doenças imunológicas. A criptococose é agora uma das doenças que definem a AIDS, que se tornou o fator de risco mais importante. Felizmente, a incidência dessa infecção oportunista parece estar diminuindo entre os pacientes com AIDS (Samuel, 2002).

Doença clínica

A criptococose primária em geral ocorre nos pulmões, após inalação do fungo. A doença pode permanecer localizada ou disseminar-se por via hematogênica para outros tecidos, mais frequentemente para o sistema nervoso central. A gravidade da doença depende do sistema imune do hospedeiro, sendo a doença grave mais frequente em pacientes comprometidos imunologicamente.

Trato respiratório

A infecção criptocócica no trato respiratório exibe uma variedade de apresentações. Pacientes imunologicamente competentes podem não exibir sintomas, apesar da presença de criptococos no trato respiratório inferior. A infecção pode ser difusa ou localizada, incluindo-se a presença de lesões em forma de moeda, que em geral não se calcificam. Pacientes imunocomprometidos podem ter infecção extensa, geralmente acompanhada por outros agentes infecciosos, em particular *Pneumocystis* (*carinii*) *jiroveci* ou citomegalovírus. Semanas após a documentação de uma infecção pulmonar, pode surgir a doença extrapulmonar.

Lesões cutâneas

As lesões cutâneas em geral resultam de disseminação hematogênica do trato respiratório em pacientes imunocomprometidos (Thomas, 2001). Elas se apresentam como pápulas únicas ou múltiplas, que aumentam de tamanho e ulceram, produzindo um exsudato fino que contém a levedura. A manifestação cutânea primária da doença é rara, mas também pode ser relatada em indivíduos imunocompetentes (Revenga, 2002).

Infecção articular e óssea

Pode ocorrer infecção óssea e articular, em geral como resultado de disseminação a partir do trato respiratório (Liu, 1998). Surgem lesões osteolíticas com formação de abscessos no tecido mole adjacente, produzindo um exsudato fino que contém grande número de criptococos. Menos comumente, os espaços articulares são acometidos.

Infecção do sistema nervoso central

A infecção do sistema nervoso central (meningite criptocócica) constitui os focos mais frequentes e sérios de infecção criptocócica disseminada (Perfect, 2002; Collazos, 2003). O início da doença pode ser agudo, mas a manifestação é tipicamente insidiosa, e a progressão é lenta. Cefaleia e alterações no estado mental e na personalidade costumam dominar o quadro clínico. A meningite basilar, o acometimento de nervos cranianos e a invasão do córtex subjacente resultam em hidrocefalia e diminuição da acuidade visual. A febre, se presente, em geral é baixa, e as manifestações típicas de irritação meníngea aguda, como rigidez do pescoço e sinais de Kernig e Brudzinski, costumam estar ausentes.

Patologia da infecção criptocócica

A resposta histológica depende do grau de encapsulamento da cepa infectante. Mais comumente, há pouca ou nenhuma resposta inflamatória, que corresponde aos exsudatos finos vistos no exame clínico. Em vez disso, as células do tecido normal são separadas por grandes números de criptococos encapsulados. Quando o LCE é examinado, as únicas células presentes podem ser as leveduras, podendo ser interpretadas erroneamente como células mononucleares do hospedeiro se não houver suspeita clínica de infecção. Grandes cápsulas podem ser vistas em preparações positivas com nanquim. Pseudo-hifas curtas e rudimentares de *C. neoformans* são raras em cortes de tecido. Cepas pouco encapsuladas de *C. neoformans* eliciam uma resposta inflamatória granulomatosa, e as células das leveduras são encontradas predominantemente no citoplasma de macrófagos, podendo ser confundidas com as de *B. dermatitidis* ou mesmo esférulas de *C. immitis*. A diferenciação em cortes teciduais pode ser conseguida corando-se o mucopolissacarídeo criptocócico com mucina ou demonstrando-se o pigmento melanina com o corante de Fontana-Masson. Combinações desse último corante e vários outros para mucopolissacarídeos, como a mucicarmina ou o azul alciano, têm sido usados com vantagem, porém não costumam ser necessários (Lazcano, 1993). O tamanho variável (3 a 10 μm) e a natureza definitivamente arredondada da levedura *in vivo* são indícios para a identificação correta, quaisquer que sejam o grau de encapsulamento e a resposta histológica.

Diagnóstico laboratorial

Criptococos possíveis devem ser sempre identificados até o nível de espécie. Os indícios da presença desse fungo são o bom crescimento em placas com ágar-sangue incubadas no laboratório de bacteriologia a 35–37°C, o aspecto mucoide das colônias (Fig. 60.18), células de levedura arredondadas e preparações a fresco para microscopia ou coradas e a ausência de crescimento em meios que contenham ciclo-heximida. A identificação presuntiva pode ser obtida rapidamente examinando-se uma preparação de nanquim em busca de cápsulas (Fig. 60.14) e (Tab. 60.6) ou fazendo-se um teste rápido de urease, ou ambos. As cápsulas podem estar diminuídas se o isolamento tiver sido feito em meios com ágar. A subcultura dos isolados pode restaurar a cápsula mucoide. A identificação definitiva é conseguida por meio de testes bioquímicos.

O antígeno polissacarídico do *C. neoformans* pode ser detectado no LCE e em soro, por aglutinação no látex ou imunoensaio enzimático. A sensibilidade desse teste ultrapassa 90%, mas a sensibilidade e a especificidade dos kits comerciais variam muito. A frequência de resul-

Figura 60.18 As colônias de *Cryptococcus neoformans* em geral parecem mucoides no primeiro isolamento. Algumas cepas são pouco encapsuladas e não têm aspecto mucoide (ágar Sabouraud com glicose).

tados errôneos pode ser reduzida pelo tratamento das amostras de soro com pronase. Reações positivas falsas parecem ser menos comuns em pacientes infectados pelo HIV, talvez por causa do grande número de organismos presentes. É prática tradicional titular os resultados positivos, para avaliar-se o prognóstico e como base para acompanhar os efeitos do tratamento. Grandes quantidades de antígeno e a persistência do antígeno após a terapia são sinais de prognóstico ruim em pacientes que não estão infectados pelo HIV. Em contrapartida, não se demonstrou que esses parâmetros são uniformemente úteis em pacientes com AIDS, atualmente o maior grupo de risco. A estimativa do nível sérico de antígeno parece ser um teste mais sensível em pacientes infectados pelo HIV do que o feito com LCE. Ainda assim, a sensibilidade ótima deve ser testada tanto no soro como no LCE. Em alguns relatos, o isolamento de *C. neoformans* de um local fora do sistema nervoso central foi associado a um prognóstico ruim em pacientes infectados pelo HIV. Um teste negativo no LCE com nanquim é um bom sinal prognóstico em pacientes não infectados pelo HIV, mas não tem a mesma implicação nos pacientes com AIDS.

O gênero *Malassezia*

As duas espécies mais importantes do gênero *Malassezia* são *M. furfur* e *M. pachydermatis*. A primeira é o patógeno mais comum de humanos, e a segunda, isolada inicialmente de rinocerontes indianos, foi recuperada de muitos animais, notavelmente das orelhas de cães e apenas ocasionalmente de humanos. *M. furfur* antigamente denominava-se *Pityrosporum ovale* ou *Pityrosporum orbiculare*, dependendo da morfologia da levedura.

Fatores de risco

A *M. furfur* é encontrada como parte da microbiota normal da pele em mais de 90% dos indivíduos, e a doença pode ocorrer em indivíduos normais. A infecção sistêmica ocorre primariamente em neonatos e está associada à hiperalimentação intravenosa com soluções de lipídeos. Embora a *M. furfur* não esteja ordinariamente presente na pele de lactentes sadios, a levedura foi recuperada da pele de 37% dos lactentes em unidades de tratamento intensivo. Os fatores de risco para infecção por *M. pachydermatis* em humanos são semelhantes.

Doenças clínicas

A infecção causada por *M. furfur* pode variar de uma lesão assintomática na epiderme de indivíduos normais a doença sistêmica no hospedeiro imunocomprometido.

Pitiríase versicolor

A pitiríase (tinha) versicolor é uma infecção comum da epiderme em pacientes imunologicamente normais, resultando em hiper ou hipopigmentação da pele, mais frequentemente no tronco e na parte superior dos braços. Máculas castanho-claras são a apresentação mais comum, porém lesões despigmentadas são mais óbvias em pessoas de pele escura e podem ser acentuadas por bronzeadores nos indivíduos de pele clara. Os efeitos da doença são puramente estéticos, mas podem ser consideravelmente problemáticos. As lesões hipopigmentadas precisam ser diferenciadas do vitiligo. A terapia consiste na aplicação tópica de cremes ou loções fungicidas.

Infecções sistêmicas

Ocorre infecção sistêmica quase invariavelmente em lactentes que receberam infusões intravasculares de lipídeos. A solução lipídica diluída mantém o crescimento de *M. furfur* ao fornecer os ácidos graxos de cadeia longa também encontrados na pele e que têm de ser fornecidos no laboratório para isolamento da levedura. Os lactentes infectados costumam estar assintomáticos, mas podem ter febre, leucocitose e trombocitopenia. A pneumonia é a manifestação sistêmica mais comum da doença, provavelmente resultando de êmbolos provenientes de cateteres intravenosos infectados. A retirada do cateter infectado é terapêutica.

Patologia da infecção por Malassezia

O diagnóstico de pitiríase versicolor em geral é feito ao exame clínico ou demonstrando-se a levedura e formas curtas de hifas (de aspecto similar a espaguete com almôndegas) em preparações de KOH feitas com raspados de pele (Fig. 60.19). O acréscimo de calcoflúor branco ou outro corante fúngico facilita a detecção, porque as células fúngicas são pequenas e de difícil visualização quando não coradas. Quando biopsiadas, é possível observar hiperceratose, acantose e infiltrados mononucleares. Pouco se sabe a respeito da patologia da infecção sistêmica por *M. furfur*, porque não costumam ser realizadas biópsias, e a infecção letal é incomum. Nos raros casos fatais, foram descritos vasculite, infartos sépticos e inflamação granulomatosa em muitos órgãos, inclusive pulmões, fígado e rins.

Diagnóstico laboratorial

Raramente é solicitada cultura para *M. furfur* em casos de doença cutânea, sendo feita em geral a observação direta da levedura em preparações de KOH pelo médico no consultório. Essa levedura deve ser vista em hemoculturas e extremidades de cateteres intravenosos de neonatos. Antes da inoculação, acrescenta-se uma gota de azeite de oliva esterilizado à superfície de um meio de ágar adequado, como o de Sabouraud com glicose ou ágar-sangue de carneiro. Em 2 a 3 dias, colônias castanho-claras, em geral com aspecto ressecado, surgem na camada de óleo. Um indício inicial da presença desse patógeno é a ausência de crescimento na ausência de óleo ou a estimulação do crescimento pela presença de uma camada de óleo (Fig. 60.20). *M. pachydermatis* não depende de ácidos graxos de cadeia longa para crescimento.

A identificação do isolado pode ser confirmada pelo exame microscópico das células de levedura, que medem 3 a 7 μm. O processo de brotamento em *Malassezia* é incomum, porque ele ocorre como no processo enteroblástico com a formação de fiálides. O broto tem base larga, e os colaretes das fiálides podem ser observados ao microscópio óptico como um anel escuro distinto que separa a célula-mãe das células-filhas.

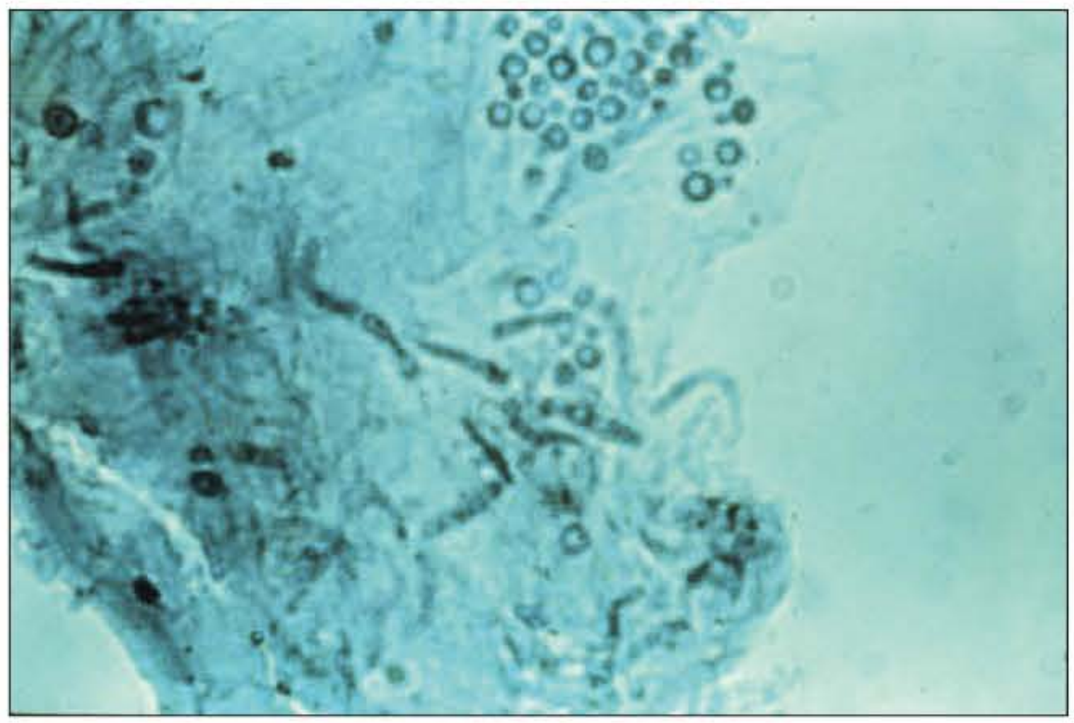


Figura 60.19 Raspados de pele de uma lesão de pitiríase versicolor. A levedura e as formas curtas de hifas (com aspecto de espaguete com almôndegas) são características de *Malassezia furfur* (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Outras leveduras e patógenos similares

Blastoschizomyces capitatus (antigamente *Trichosporon capitatum*) é uma causa rara de infecção disseminada que lembra a candidíase (Martino, 2004). Um fungo morfologicamente semelhante, *Geotrichum candidum*, também é uma causa rara de doença pulmonar ou disseminada (Schiemann, 1998). *Geotrichum* e *Trichosporon* produzem colônias lisas, semelhantes às de leveduras, que mais tarde desenvolvem micélios aéreos, como um novo pelo em crescimento em uma cabeça calva (Fig. 60.21). Ambas as espécies produzem artroconídios, sem as células disjuntoras vistas no *C. immitis*. *Saccharomyces cerevisiae* (Ponton, 2000), espécies de *Rhodotorula* (Anatoliotaki, 2003) e de *Hansenula* (Ma, 2000) são leveduras saprófitas, mas raramente causam doença. A demonstração da levedura nos tecidos ou o isolamento em múltiplas amostras, mesmo de locais estéreis, é necessária para documentar o papel da levedura incomum em um processo infeccioso. *S. cerevisiae* é uma levedura de padeiros e talvez mais bem conhecida pelos estudantes de micologia por seus efeitos salutares sobre o malte e os soluços.

Figura 60.20 O crescimento abundante de *Malassezia furfur* é evidente em uma placa que foi coberta com óleo antes da aplicação do inóculo. Não há crescimento em outra placa sem óleo (ágar Sabouraud com glicose).

Figura 60.21 Um micélio aéreo surge da colônia de *Geotrichum candidum* (ágar Sabouraud com glicose).

Micoses causadas por fungos dimórficos

Os fungos termicamente dimórficos são os organismos mais patogênicos encontrados em um laboratório de micologia clínica. Nos EUA, os patógenos dimórficos mais importantes são *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Sporothrix schenckii*. *Sporothrix* está amplamente distribuído em todo o mundo, enquanto os outros organismos são encontrados predominantemente na América do Norte, onde têm distribuição geográfica distinta (Fig. 60.22). A doença epidêmica é mais comum com *Histoplasma* e *Coccidioides*, e menos comum com *Sporothrix* e *Blastomyces*. A fase tecidual de *Coccidioides* é uma estrutura única denominada esférula, enquanto outros gêneros produzem uma fase de levedura *in vivo* que também pode crescer como levedura *in vitro* quando incubados a 37°C.

O gênero *Histoplasma*

O *H. capsulatum* é subdividido em duas variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum* (antes conhecido como *H. capsulatum*) e *H. capsulatum* var. *duboisii*. Ambos esses patógenos fúngicos são geograficamente restritos, e a aquisição da infecção não se sobrepõe na maioria dos casos. Nos EUA, o *H. capsulatum* var. *capsulatum* é encontrado primariamente ao longo dos rios Ohio, Mississippi e St. Lawrence, mas pode ter distribuição mundial. Já o *H. capsulatum* var. *duboisii* está limitado à África Equatorial e é associado à doença conhecida como histoplasmose africana. As características distintivas da fase tecidual podem ser observadas para distinguir esses dois patógenos, no entanto, a ausência de viagem para áreas endêmicas na África em geral pode excluir a infecção com a variedade *duboisii*.

Fatores de risco

O fator de risco primário para se adquirir a infecção é viver em alguma das regiões endêmicas dos EUA. Em algumas áreas, mais de 90% da população reagem positivamente ao teste cutâneo com histoplasmina. O crescimento de *H. capsulatum* no solo é estimulado pelo guano de aves, embora o fungo não infecte a ave. Uma vez crescendo no solo, o fungo esporula e produz conídios que, durante atividades que geram aerossóis, podem ser inalados para os pulmões. Uma história clássica de um paciente com histoplasmose pulmonar aguda é a limpeza recente de um galinheiro. A histoplasmose adquirida ocupacionalmente foi relatada, levando o US Department of Health and Human Services a elaborar um documento que delineia as medidas para proteger os trabalhadores em risco (Department of Health and Human Services, 1997). A doença aguda epidêmica ocorreu em indivíduos de férias em áreas onde esse fungo é endêmico. Por exemplo, houve 221 casos entre estudantes de 37 colégios em 18 estados que tinham passado por Acapulco, no México, em março de 2001 (Centers for Disease Control and Prevention, 2001a). A maioria desses pacientes tinha visitado um ponto que era fonte comum, havendo assim exposição a esporos. Ocorre histoplasmose pulmonar crônica primariamente em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, enquanto a infecção disseminada ocorre em pacientes com déficits imunológicos, especialmente do sistema imune celular. A infecção pelo HIV tornou-se um importante fator de risco para infecção disseminada fatal.

Doenças clínicas

A magnitude da exposição e a condição imune do hospedeiro influenciam as manifestações clínicas de doença. A exposição de um hospedeiro normal a baixas concentrações no ambiente é tipicamente assintomática. Uma maioria de adultos que vivem em áreas endêmicas é soropositiva, mas não tem evidência clínica de infecção.

Infecção pulmonar aguda

Indivíduos expostos a grandes números de conídios podem desenvolver uma síndrome semelhante à gripe, com febre alta, calafrios, fadiga, tosse e dor torácica pleurítica ou retroesternal. Os indivíduos mais gravemente acometidos podem ficar doentes por várias semanas, mas em geral a resolução é completa, sem terapia antifúngica no hospedeiro normal. Se tiver ocorrido inflamação granulomatosa focal, a calcificação do foco tipicamente deixa uma lesão bem circunscrita em forma de moeda, que pode ser vista na radiografia de tórax.

Mediastinite granulomatosa e fibrosante

Esses tipos de manifestações envolvem os linfonodos do mediastino, que podem obstruir as vias respiratórias, a veia cava superior, os vasos pulmonares ou o esôfago. Podem formar-se fístulas dentro dos linfonodos e estruturas mediastínicas adjacentes. A doença fibrosante é uma reação que ocorre no mediastino em indivíduos predispostos a uma resposta excessiva aos antígenos de *Histoplasma*. Acredita-se que tanto a doença granulomatosa quanto a fibrosante progridam de forma independente.

Histoplasmose pulmonar crônica

Essa doença debilitante ocorre primariamente em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, sendo a maioria homens de

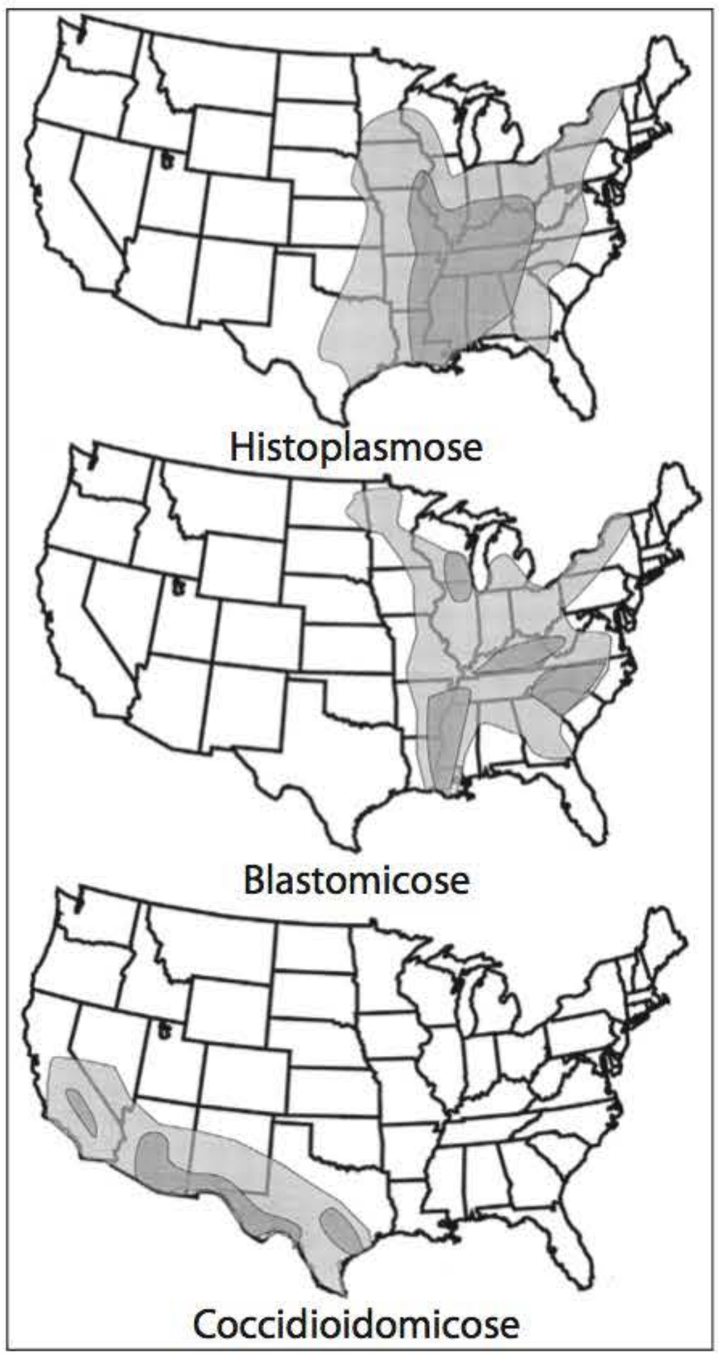


Figura 60.22 Distribuição geográfica de infecções causadas por fungos dimórficos nos EUA. Estão ilustradas as áreas de maior endemicidade (escuras) e de menor endemicidade (mais claras). Casos esporádicos também podem ocorrer em outras áreas fora das zonas endêmicas.

meia-idade. Ocorrem calcificação e cavitação, que pode simular tuberculose pulmonar crônica e neoplasia pulmonar.

Histoplasmose disseminada

Pode ocorrer disseminação de leveduras pelo sistema reticuloendotelial, como parte da histoplasmose pulmonar aguda, resultando em granulomas cicatrizados, especialmente no baço. Em termos clínicos, ocorre infecção disseminada em duas classes de pacientes. O primeiro grupo consiste em indivíduos nos extremos das faixas etárias, que não tiveram uma condição imunossupressora reconhecida, mas têm o sistema imune incompletamente desenvolvido ou diminuído pela idade por motivos ainda não bem entendidos. O segundo grupo é o de pacientes com doenças ou terapias imunossupressoras reconhecidas. Antes da década de 1980, as doenças eram predominantemente neoplasias; nos tempos mais recentes, a infecção pelo HIV tornou-se o fator de risco mais comum (McKinsey, 1998). A progressão da doença pode ser rápida ou insidiosa.

A infecção do sistema reticuloendotelial pode resultar em linfadenopatia, hepatoesplenomegalia ou trombocitopenia (Wheat, 2003b). A destruição do córtex suprarrenal pelo processo granulomatoso pode ser suficientemente extensa para causar insuficiência hormonal. A infecção do sistema nervoso central pode manifestar-se como meningite crônica, granulomas cerebrais ou ambos. A infecção endovascular inclui endocardite com grandes vegetações volumosas. Qualquer parte do trato gastrintestinal pode ser afetada, e as lesões ulceradas podem sugerir uma neoplasia à observação macroscópica. A característica marcante da doença é a úlcera orofaríngea, que pode causar rouquidão, disfagia ou uma lesão dolorosa na língua ou na gengiva. Em pacientes com infecção pelo HIV, os sintomas de histoplasmose disseminada podem lembrar aqueles causados por vírus, incluindo-se febre, linfadenopatia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, perda de peso e fadiga (McKinsey, 1998).

Lesões cutâneas solitárias são raras, mas podem seguir-se à introdução direta do fungo na derme.

Patologia da histoplasmose

Como um patógeno intracelular facultativo, o *H. capsulatum* é encontrado predominantemente em macrófagos. As lesões patológicas consistem em coleções de macrófagos infectados, granulomas não caseosos ou caseosos. As lesões histopatológicas são semelhantes às causadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A levedura intracelular costuma ser bem demonstrada pela coloração por H&E (Fig. 60.23). As técnicas com ácido periódico de Schiff e metenamina de prata são mais sensíveis, e o corante de prata é essencial para a demonstração de células antigas de levedura em granulomas cicatrizados. Essa levedura, presumivelmente não viável por muito tempo, pode ter a morfologia aumentada e distorcida. O diagnóstico diferencial das formas de levedura inclui as pequenas formas de *B. dermatitidis*, *Penicillium marneffei*, espécies de *Leishmania* ou *Candida*, em especial *C. glabrata*. O diagnóstico apropriado em geral é sugerido pelo tamanho maior das células de levedura de *Candida* (que não *C. glabrata*) ou pela apresentação clínica. A levedura de *H. capsulatum* em granulomas caseosos é distintiva o suficiente para fornecer um diagnóstico presuntivo, mas é preciso diferenciar de apresentações granulomatosas incomuns de *P.* (*carinii*) *jiroveci*.

Diagnóstico laboratorial

A forma de levedura no tecido pode ser demonstrada histologicamente ou em preparações de secreções respiratórias, líquidos, sangue periférico, medula óssea ou impressões teciduais. Preparações a fresco e calcoflúor branco podem ser usados, porém a morfologia tanto do tecido quanto das células de levedura é mais bem vista com a coloração de Giemsa, porque os detalhes da morfologia nuclear podem ser avaliados. As células de levedura medem 3 a 5 μm de diâmetro, têm um único núcleo e brotam com um colo estreito.

Caso se suspeite de infecção disseminada, devem ser feitas hemoculturas para *Histoplasma*. A técnica Isolator parece ser a mais sensível para recuperar a fase de levedura do sangue. Outras amostras clínicas devem ser inoculadas em ágar enriquecido, como infusão de cérebro e coração suplementada com sangue de carneiro, incubada a 25 a 30°C.

As colônias de *H. capsulatum* em geral surgem após incubação por 10 a 14 dias, mas ocasionalmente requerem incubação por até 4 semanas. No meio de isolamento primário a 25–30°C, são felpudas, e sua cor varia do branco ao castanho-escuro. As formas assexuadas diagnósticas incluem microconídios e macroconídios. Os microconídios, que são produzidos primeiro, lembram as estruturas produzidas por *B. dermatitidis*. Os macroconídios mais característicos têm projeções encrespadas da periferia dos conídios, uma configuração conhecida como tuberculada (Fig. 60.24). Os macroconídios do saprófita *Sepedonium* podem ser confundidos com *Histoplasma*, razão pela qual é importante a diferenciação entre esses dois fungos. O aspecto macroscópico das colônias, a taxa de crescimento, o crescimento de *H. capsulatum* nos meios que contêm ciclo-heximida, a presença de formas de levedura no tecido e a história clínica em geral são suficientes para distinguir esses fungos. A identificação final é conseguida mais frequentemente pelo teste com a sonda de hibridização de ácido nucleico. A conversão do mofo para a fase de levedura também confirma a identificação, todavia isso em geral é extremamente difícil e foi suplantado na maioria dos laboratórios clínicos pelas técnicas moleculares (Accuprobe, GenProbe, San Diego, CA). O teste de exoantígeno é outro método de identificação possível, mas também é raramente usado, se o for.

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* (i. e., imunodifusão e fixação de complemento) têm várias limitações (Wheat, 2003a). São necessárias 2 a 6 semanas após exposição para a produção de anticorpos, o que diminui o valor desse teste para o diagnóstico de histoplasmose aguda. Assim que os pacientes são infectados com *H. capsulatum*, os níveis de anticorpos permanecem detectáveis por muitos anos. Os anticorpos de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* apresentam reação cruzada. Além disso, os pacientes com disfunção imune podem não produzir níveis detectáveis de anticorpos. Já a detecção de antígeno mostrou-se útil para o diagnóstico de histoplasmose. A sensibilidade da detecção do antígeno urinário para o diagnóstico é maior em pacientes com doença disseminada (até 92%) ou histoplasmose (75 a 80%) (Wheat, 2002, 2003a, 2003b). A detecção de antígeno também é útil para se acompanhar o efeito da terapia sobre a carga fúngica; concentrações de antígeno na urina ou no soro que não caem durante a terapia são sugestivas de falha no tratamento. Além

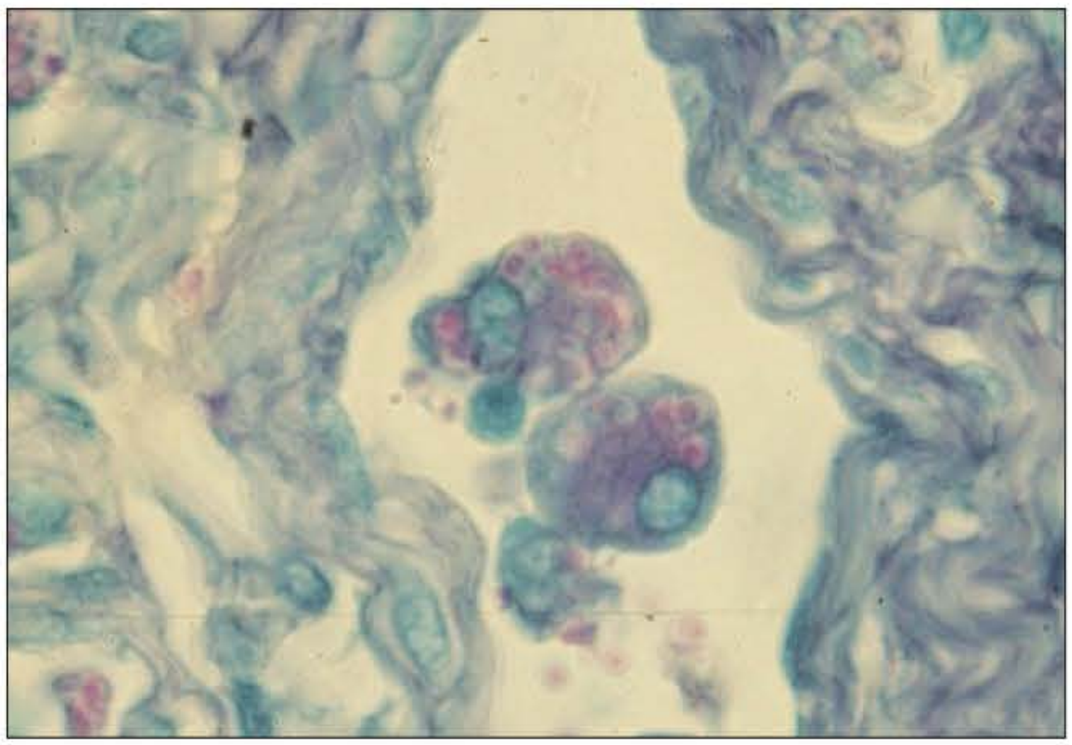


Figura 60.23 Células de *Histoplasma capsulatum* em macrófagos. A presença intracelular de células pequenas arredondadas ou ovais semelhantes a leveduras no tecido é uma descoberta patológica característica na histoplasmose (hematoxilina e eosina; × 1.000).

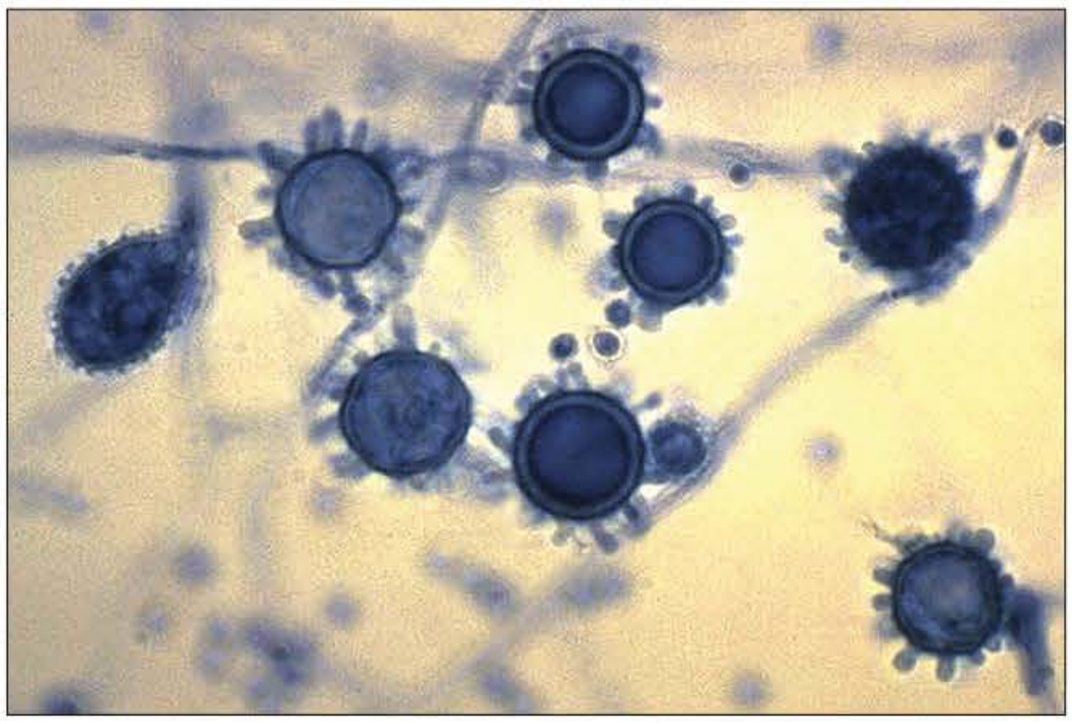


Figura 60.24 Macroconídios tuberculados com microconídios de *Histoplasma capsulatum* em cultura. Essas estruturas são características da forma ambiental de mofo desse fungo dimórfico (azul de lactofenol com algodão; × 400; CDC Public Health Image Library).

disso, um aumento nos níveis de antígeno em um indivíduo tratado previamente sugere recidiva da doença.

O teste cutâneo com antígeno histoplasmina foi útil para estudos epidemiológicos, porém nunca deve ser usado para o diagnóstico. Não apenas a alta frequência de testes positivos em áreas endêmicas dificulta a interpretação, como o teste cutâneo pode fazer que um indivíduo torne-se soropositivo, confundindo ainda mais a situação.

O gênero *Blastomyces*

B. dermatitidis é a única espécie do gênero *Blastomyces*, embora a diferença nas taxas de conversão da levedura entre isolados norte-americanos e africanos sugira uma taxonomia diferente (Gueho, 1997). As áreas endêmicas desse patógeno são o solo do leste dos EUA, principalmente nas adjacências das bacias dos rios Mississippi e Ohio, o noroeste dos Grandes Lagos no Canadá e regiões da África. No entanto, relatos recentes sugerem que a área endêmica de blastomicose pode ser maior do que a originalmente descrita, de acordo com os relatos da doença em pacientes provenientes de áreas previamente não endêmicas no Colorado e em Nebraska (Centers for Disease Control and Prevention, 1999a; DeGroote, 2000; Veligandla, 2002).

Fatores de risco

A maioria dos casos de blastomicose (também conhecida como blastomicose norte-americana) é esporádica, em geral não sendo encontrada uma fonte ambiental. Ocorrem pequenos surtos, e o fungo tem sido isolado do solo dos locais onde eles acontecem (Klein, 1986). Não há fatores de risco específicos reconhecidos para a blastomicose, embora tenha sido descrita infecção grave e disseminada em pacientes imunocomprometidos. Pacientes infectados pelo HIV que residem em áreas endêmicas correm risco particular de adquirir a infecção (Pappas, 2002).

Doenças clínicas

Como a maioria dos outros fungos dimórficos endêmicos, o portal de entrada é através do trato respiratório, onde a infecção pode ser assintomática, transitória ou insidiosamente progressiva (Bradsher, 2003). A blastomicose pulmonar crônica com febre baixa, perda de peso e infiltrados pulmonares localizados pode sugerir doença neoplásica, para a qual podem ser feitos estudos diagnósticos, incluindo-se o lavado broncoalveolar, a aspiração do pulmão com agulha fina ou a biópsia pulmonar cirúrgica (Lemos, 2002). A disseminação da levedura a partir do pulmão resulta mais comumente em infecção esquelética ou cutânea. O sistema nervoso central e o geniturinário são acometidos com menos frequência. As lesões cutâneas em geral são hipertróficas ou ulcerativas, podendo ser localmente destrutivas e confundidas com o carcinoma espinocelular da pele (Bradsher, 1997). Também ocorre acometimento secundário da pele sobre lesões ósseas. Não é rara a demora no diagnóstico, em especial quando os pacientes não têm antecedentes de exposição em área endêmica (Veligandla, 2002).

Patologia da blastomicose

A resposta histológica característica ao *B. dermatitidis* é uma mistura de inflamação aguda com formação de microabscesso e inflamação granulomatosa. Nas lesões cutâneas, é característica a hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme sobrejacente à inflamação. As células de levedura são encontradas mais frequentemente nos microabscessos ou dentro de células gigantes multinucleadas, em geral podendo ser demonstradas em cortes teciduais corados por H&E, porém os organismos podem ser visíveis mais prontamente quando corados com ácido periódico de Schiff ou metenamina de prata. As células de levedura de parede espessa medem 8 a 15 μm de diâmetro e mantêm uma base larga durante o processo de brotamento. Uma separação artefatual entre o citoplasma e a parede da célula em preparações fixadas com formalina pode dar a aparência de uma parede dupla. Embora seja preciso diferenciar as células de levedura que não estão em brotamento daquelas de *C. neoformans* e das esférulas em desenvolvimento de *C. immitis*, o diagnóstico de blastomicose em geral pode ser feito pela observação das formas características da levedura nos tecidos por um patologista experiente (Bradsher, 2003).

Identificação laboratorial

A demonstração direta das células de levedura pode ser realizada em cortes teciduais ou preparações a fresco de líquidos aspirados e impressões de tecido. A coloração com calcoflúor branco pode facilitar a detecção da levedura. O crescimento é um pouco mais rápido do que o de *Histoplasma*; colônias felpudas brancas a amarelas, que em geral não podem ser distinguidas das de *H. capsulatum*, costumam aparecer em 1 a 2 semanas. Os microconídios lembram os de *H. capsulatum* (Fig. 60.25), mas não há formação de macroconídios. Um mofo saprófita, *Chrysosporium*, lembra *Blastomyces*, porém não desenvolve uma fase de levedura e não cresce nos meios que contêm ciclo-heximida. Pode ocorrer conversão para a fase de levedura nos meios rotineiros de ágar que contêm hemoglobina e cisteína usados especificamente com essa finalidade, incubados a 37°C (Fig. 60.26). Mais uma vez, a demonstração da forma em levedura no tecido serve como um substituto razoável para evidenciar o dimorfismo no laboratório. O teste com sonda de ácido nucleico em material de colônia é o método preferido para se confirmar a identificação na maioria dos laboratórios (Accuprobe, GenProbe, San Diego, CA). Uma publicação recente sobre um protocolo de hibridização *in situ* para a identificação de organismos semelhantes a leveduras em cortes de tecido mediante uso de oligonucleotídeos fúngicos específicos e pancomplementares ao DNAr 18S e 28S mostrou sensibilidade de 90% e especificidade de 97% para a detecção do DNA de *B. dermatitidis* (Hayden, 2001).

Embora o teste de fixação de complemento tenha sido usado como teste sorológico para o diagnóstico de blastomicose, ele tem limitações

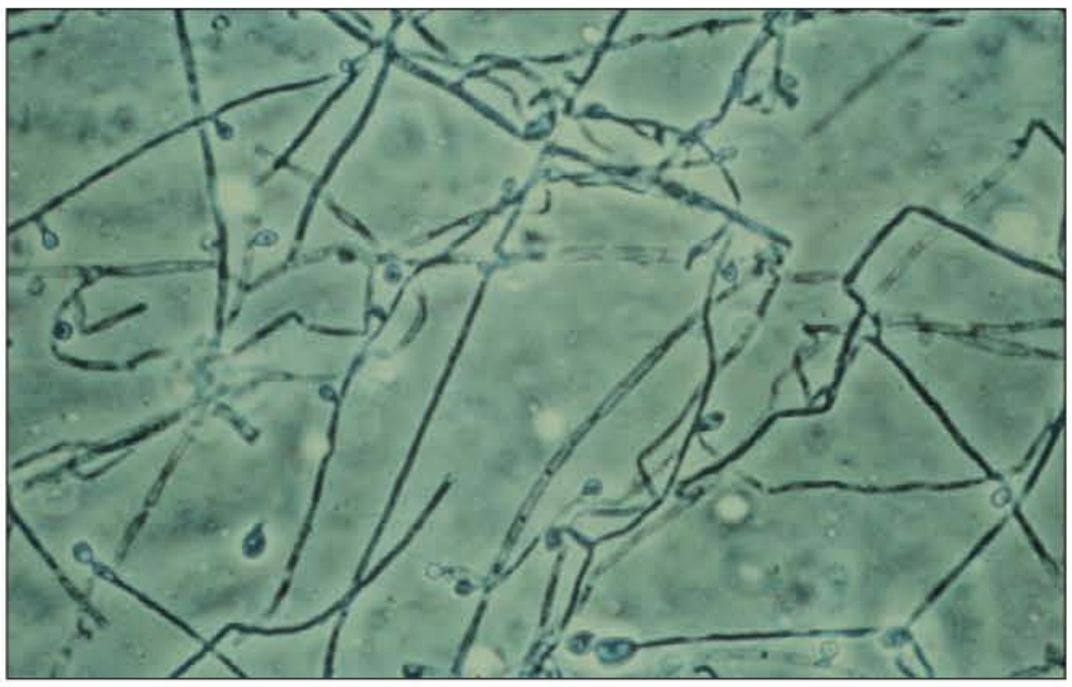


Figura 60.25 Forma de mofo de *Blastomyces dermatitidis* em cultura. O aspecto de pirulito do conídio em um conidióforo é característico do mofo ambiental desse fungo dimórfico (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Figura 60.26 Células de levedura em brotamento de *Blastomyces dermatitidis* em cultura. Quando as culturas são incubadas a 37°C, são detectadas leveduras grandes, de base larga, em brotamento, com contorno duplo, todas características da fase de levedura desse fungo dimórfico (azul de lactofenol com algodão; × 400).

consideráveis e só deve ser usado como adjunto à cultura do fungo. Também se dispõe de um teste para o antígeno do *Blastomyces*, similar ao do antígeno de *Histoplasma*, em um laboratório de referência, porém ainda não há dados sobre sua utilidade e confiabilidade.

O gênero *Coccidioides*

Até recentemente, *C. immitis* era considerado o único agente etiológico da coccidioidomicose. Estudos filogenéticos de Fisher et al. mostraram a existência de duas formas geneticamente distintas de *C. immitis:* uma denominada Califórnia (*C. immitis*) e a outra denominada não Califórnia (*Coccidioides posadasii*) (Fisher, 2002). Embora haja uma grande diferença no genótipo dessas duas espécies, as diferenças fenotípicas são mínimas, o que contraria a separação das espécies (Cox, 2004). Os organismos coccidioides são fungos do solo encontrados no sul da Califórnia e em outras áreas do sudoeste dos EUA (em especial no sul do Arizona, no sul do Novo México e no oeste do Texas), no norte do México e nas Américas Central e do Sul (especialmente na Venezuela) (Kirkland, 1996). No Arizona, houve, com os anos, um aumento dramático no número de casos, com uma taxa desproporcional de infecção que ocorreu em pessoas após os 65 anos de idade e naquelas com infecção pelo HIV (Centers for Disease Control and Prevention, 1996, 2003; Leake, 2000).

Outro aspecto interessante desses agentes é a classificação recente, pelo US Department of Health and Human Services, do *C. immitis* e do *C. posadasii* como agentes selecionados de bioterrorismo (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Department of Health and Human Services, 2002a). Essa designação sugere que tais patógenos poderiam ser usados como armas biológicas potenciais e estabelece regulamentações federais estritas a serem seguidas por indivíduos que tenham e transportem esses agentes, além da exigência de que as infecções confirmadas sejam relatadas (Deresinski, 2003). Têm sido questionadas a lógica e a justificativa de SE classificar os coccidioides dessa forma devido à carga imposta sobre os laboratórios que fazem o diagnóstico (Fierer, 2002).

Fatores de risco

A residência em uma área endêmica é o fator de risco primário para o desenvolvimento de infecção, pois os artroconídios da fase de mofo estão no solo e disseminam-se com facilidade pelo ar (Chiller, 2003; Crum, 2004). Um exemplo clássico de coccidioidomicose epidêmica ocorreu em um grupo de pessoas que faziam uma escavação arqueológica no Dinosaur National Monument, no nordeste de Utah, em 2001. Dez trabalhadores desse grupo desenvolveram coccidioidomicose durante uma escavação, e oito precisaram ser hospitalizados (Petersen, 2004). Outro surto da doença ocorreu em indivíduos que trabalharam no World Championship of Model Airplane Flying (Campeonato Mundial de Aeromodelismo) em Kern County, na Califórnia, em outubro de 2001. Esse surto ilustra a importância de cooperação da comunidade internacional quanto à avaliação epidemiológica, pois equipes de competição de mais de 30 países foram potencialmente envolvidas no surto (Centers for Disease Control and Prevention, 2001b).

Há indícios de que fatores genéticos influenciam a frequência de infecção grave e disseminada, mas a natureza dessa associação não está completamente entendida (Cox, 2004). A infecção disseminada é mais comum em pessoas negras e filipinas do que nas brancas. Asiáticos, norte-americanos nativos e mexicanos também parecem correr maior risco. Mulheres adultas desenvolvem eritema nodoso mais comumente do que homens em resposta à infecção primária por coccidioides, mas a infecção disseminada é mais comum em homens adultos do que em mulheres. Infecção ou doença imunossupressora são fatores de risco importantes para a infecção disseminada nos pacientes infectados pelo HIV, que correm risco particular de terem a doença disseminada (Woods, 2000).

Doenças clínicas

A coccidioidomicose primária é mais frequentemente assintomática, conforme indicado pela alta prevalência de resultados positivos nos testes cutâneos para antígenos dos coccidioides em áreas endêmicas. Em geral, a doença sintomática manifesta-se por febre com tosse ou dor torácica, ou ambas, e pode simular pneumonia bacteriana clinicamente (Chiller, 2003). O eritema nodoso e o eritema multiforme, que podem acompanhar a infecção primária, são bons sinais prognósticos. Nódulos pulmonares solitários podem persistir como consequência da infecção pulmonar primária.

A infecção disseminada afeta mais comumente a pele, o sistema esquelético e as meninges. As lesões cutâneas incluem pápulas, úlceras, fístulas de drenagem e abscessos subcutâneos. A artrite resulta mais frequentemente do acometimento de ossos adjacentes. A meningite pode ser aguda, porém é mais comum ser indolente e crônica.

Patologia da coccidioidomicose

A resposta tecidual ao *C. immitis* é granulomatosa, com ou sem caseação. As esférulas em desenvolvimento são encontradas tipicamente em macrófagos e células gigantes multinucleadas (Fig. 60.27). Os endosporos dentro das esférulas medem 2 a 5 μm (Fig. 60.28). As esférulas têm até 200 μm de diâmetro, e o tamanho daquelas em desenvolvimento varia muito. O diagnóstico diferencial de esférulas em desenvolvimento inclui primordialmente formas não em brotamento de *B. dermatitidis* ou *C. neoformans*. É preciso diferenciar as esférulas das formas fúngicas na adiaspiromicose e na rinosporidiose, ambas infecções incomuns nos EUA.

Diagnóstico laboratorial

Como ocorre com outros fungos dimórficos, a possibilidade de infecção deve ser bem investigada. É possível demonstrar as esférulas em escarro e líquido de lavado broncoalveolar, mas a sensibilidade do exame direto dessas estruturas em geral é baixa. A coloração com calcoflúor branco após a digestão da amostra com KOH pode aumentar a sensibilidade. Caso haja doença cavitária, pode haver hifas nas amostras clínicas, embora isso seja raro. Em contraste com outros pa-

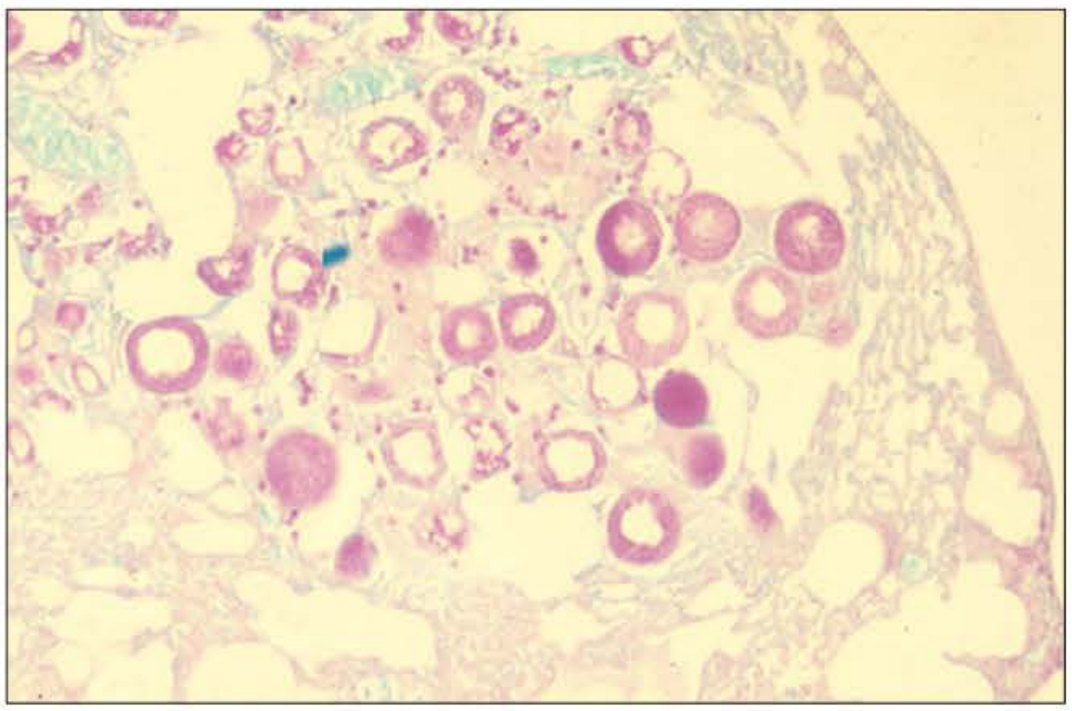


Figura 60.27 Esférulas de *Coccidioides immitis* em tecido. A observação dessas estruturas grandes em tecido é diagnóstica de coccidioidomicose (hematoxilina e eosina; × 100).

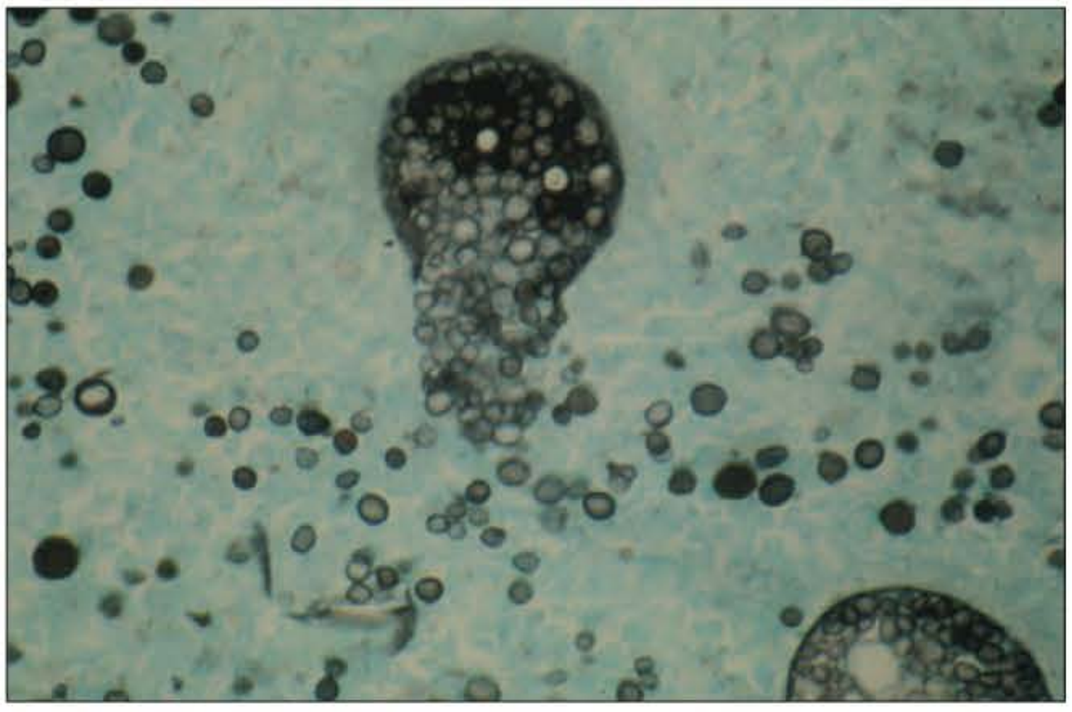


Figura 60.28 Esférulas de *Coccidioides immitis* em tecido, mostrando a liberação do endósporo. Na maturidade, a esférula se rompe e libera endósporos que, por sua vez, amadurecem e tornam-se esférulas. Quando observados no tecido, esses endósporos imaturos podem ser confundidos com outras leveduras menores (metenamina-prata de Gomori; × 1.000).

tógenos dimórficos, em tal circunstância há possibilidade de comunicabilidade de artroconídios diretamente a partir da amostra.

O *C. immitis* cresce rapidamente (em menos de uma semana) em meios com ou sem ciclo-heximida e pode surgir até em placas de ágar-sangue no laboratório de bacteriologia. Os conídios dos coccidioides são altamente infecciosos e facilmente transmitidos por aerossóis. A infecção em trabalhadores de laboratórios é uma grande preocupação, de modo que as culturas inoculadas devem ser manipuladas com todo o cuidado em uma cabine de segurança. Nos EUA, o National Institutes of Health classificaram o *C. immitis* (com *H. capsulatum*) como agente biológico do grupo 3 de risco: agentes associados a doenças humanas sérias ou letais, para as quais pode não haver intervenções preventivas ou terapêuticas (Department of Health and Human Services, 1999). A manipulação de amostras que reconhecida ou provavelmente contenham esse organismo requer restrição de biossegurança do nível 3 (Department of Health and Human Services, 2002a, 2002b). Se esse organismo tiver sido inoculado em placas de Petri, elas devem ser tampadas com cuidado para evitar disseminação acidental. O aspecto das colônias de coccidioides é extremamente variável, indo de avelulado ou algodonado a granular ou pulverulento. A morfologia da colônia pode mudar à medida que as colônias e artroconídios se desenvolvem. A maioria dos isolados é branca, mas é possível observar uma variedade de cores, e algumas cepas podem produzir um pigmento difusível. Em geral, as culturas ficam acinzentadas com o tempo. Ante a suspeita de *C. immitis*, alguns micologistas preferem esterilizar a cultura antes de examinar as colônias, inundando o recipiente com formalina a 10% e deixando-o em incubação por uma noite. Nos casos em que se suspeita de coccidioides, devem ser usados frascos com tampa de rosca, em vez de placas. A conversão da forma de mofo para a tecidual não é comum, pois em geral requer caldo sintético especializado para ocorrer. A diferenciação entre *C. immitis* e *C. posadasii* não costuma estar disponível nos laboratórios clínicos, portanto relata-se o resultado como sendo *C. immitis*.

A alternância dos artroconídios em forma de barril com células vazias desunidas é distintiva de *C. immitis* (Fig. 60.9), mas é preciso diferenciá-lo de outros organismos que produzem artroconídios, como *Trichosporon*, *Geotrichum* e alguns membros da família *Gymnoascaceae*. A confirmação da identificação é conseguida mais comumente pelo teste da sonda de hibridização do ácido nucleico.

Em contraste com a histoplasmose e a blastomicose, a análise sorológica com o teste de fixação de complemento é útil para avaliar a extensão e o prognóstico da coccidioidomicose (Pappagianis, 1990). Entre as técnicas sorológicas disponíveis, a fixação do complemento foi a mais estudada. Anticorpos são detectados cerca de 2 a 6 semanas após a infecção. O nível do título é uma indicação da probabilidade de doença disseminada, e títulos elevados indicam prognóstico desfavorável. O teste cutâneo não confunde o diagnóstico ao produzir soroconversão, como na histoplasmose, mas a alta prevalência de positividade diminui sua utilidade. Pacientes com infecção disseminada podem demonstrar anergia ao teste cutâneo com antígeno.

O gênero *Sporothrix*

O único patógeno conhecido desse gênero é o *Sporothrix schenckii*, do qual há duas variedades: *S. schenckii* var. *schenckii* e *S. schenckii* var. *luriei*. A última difere da primeira apenas pela morfologia no tecido do hospedeiro, produzindo células (em brotamento) grandes e geralmente septadas. Apenas três casos de *S. schenckii* var. *luriei* foram relatados na literatura, nenhum nos EUA (Padhye, 1992). O *S. schenckii* var. *schenckii* (daqui em diante mencionado como *S. schenckii*) é um fungo dimórfico presente no solo do mundo inteiro, bem como em plantas e vegetação em decomposição (Bustamante, 2001), tendo sido associado a inúmeros surtos, um deles especialmente importante, ocorrido entre floricultores e trabalhadores de creches/berçários e silviculturas que manipularam musgo esfagno contaminado em Wisconsin (Centers for Disease Control and Prevention, 1988). Embora considerado um fungo dimórfico endêmico, o *S. schenckii* exibe diferenças epidemiológicas que o distinguem dos outros fungos dimórficos endêmicos clássicos (De Araujo, 2001). A forma de entrada do fungo geralmente é por meio da implantação atraumática (*vs.* inalação), a doença causada em geral é uma infecção subcutânea localizada (*vs.* pulmonar), e a incidência de infecção sistêmica é rara.

Fatores de risco

Embora o *S. schenckii* seja comum na vegetação em todo o mundo, não parece ser um patógeno para vegetais. As epidemias foram causadas pela exposição a produtos vegetais, como musgo esfagno usado em jardinagem (Coles, 1992). Ocorreu uma epidemia incomum entre membros de um grupo colegial na Flórida, que construíram um muro com tijolos embalados em palha contaminada enquanto consumiam quantidades abundantes de cerveja (Sanders, 1971). O único fator predisponente identificado com alguma frequência é o consumo de álcool. É interessante o fato de que o estereótipo de paciente em risco de esporotricose é o "jardineiro alcoólatra de rosas".

Doenças clínicas

A forma clínica devastadora predominante de esporotricose é o acometimento dos tecidos cutâneos e subcutâneos. Uma pápula no portal de entrada pode ulcerar e disseminar o patógeno através de linfáticos regionais, resultando em uma série de lesões que progridem até o membro acometido (conhecida como esporotricose linfocutânea). A disseminação para estruturas osteoarticulares e vísceras é incomum e parece ocorrer com maior frequência em pacientes com antecedentes de abuso de álcool ou imunossupressão, em especial aqueles com AIDS (Kauffman, 2000).

Patologia da esporotricose

As respostas histológicas ao *Sporothrix* e ao *Blastomyces* são semelhantes. A inflamação granulomatosa pode ser acompanhada por

pequenas coleções de neutrófilos polimorfonucleares. Na pele, é comum a hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme. As células de levedura de *S. schenckii* são pleomórficas, arredondadas ou alongadas, lembrando cigarros, mas raramente são vistas no tecido. Uma reação tecidual ao fungo pode resultar em material eosinofílico que se irradia, com até 10 μm de espessura, em torno da célula de levedura, o que é conhecido como fenômeno de Splendore-Hoeppli. A reação tecidual distintiva é incomum e não específica da esporotricose. O diagnóstico diferencial das lesões cutâneas inclui infecções micobacterianas, em especial pelo *Mycobacterium marinum* (granuloma do nadador de piscina), nos EUA, e leishmaniose cutânea, nos trópicos.

Diagnóstico laboratorial

A amostra preferida é um aspirado, material de curetagem ou biópsia da lesão cutânea. O *S. schenckii* cresce bem em meios de isolamento primário com ciclo-heximida incubado a 25–30°C. As colônias, que podem ser úmidas ou lisas (glabras), em geral são claras no início, escurecendo com o tempo. O *S. schenckii* produz dois tipos de conídio: um hialino de parede fina, disposto em forma de roseta em torno do ápice de um conidióforo, e outro escuro, de parede espessa, séssil, aderido diretamente às hifas. Os microconídios de parede fina surgem nos conidióforos em ângulos retos a partir das hifas. Podem estar dispostos de forma simpódica em torno de uma vesícula expandida na extremidade do conidióforo, produzindo um arranjo descrito como um flósculo (Fig. 60.29). Estruturas similares são produzidas por espécies de *Acremonium*, raramente relatadas como causadoras de doenças humanas, e por um saprófita isolado incomum, o *Ophiostoma stenoceras*. Esses mofos são diferenciados de *Sporothrix* pela impossibilidade de crescer em meios com ciclo-heximida e pela ausência da fase de levedura. A conversão da fase de mofo à de levedura é obtida incubando-se o isolado a 37°C a uma atmosfera com 5% de CO_2 em meio enriquecido, como ágar com infusão de cérebro e coração suplementado com sangue de carneiro, ou ágar-chocolate.

Foram descritos testes cutâneos e ensaios sorológicos para o diagnóstico de esporotricose, mas eles não estão disponíveis com facilidade.

Outros fungos dimórficos

O *H. capsulatum* var. *duboisii* causa doenças cutâneas e sistêmicas na África. As leveduras são maiores do que as de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, e as paredes são mais espessas, lembrando as células de *B. dermatitidis*, mas sem os brotos de base larga. O *Paracoccidioides brasiliensis*, que está restrito ao solo nas Américas Central e do Sul, causa infecções cutâneas, pulmonares e disseminadas, denominadas forma coletiva paracoccidioidomicoses (Mann, 1996). As células de levedura características da fase tecidual do *Paracoccidioides* têm múltiplos brotos periféricos, conferindo-lhe uma aparência que tem sido comparada com a do leme de um barco. O *Penicillium marneffei* é a quarta causa mais comum de infecção oportunista disseminada em pacientes com AIDS na Tailândia, no sul da China e em outras partes do Sudeste Asiático, onde é endêmico (Duong, 1996). A fonte ambiental desse fungo ainda é desconhecida, mas relatos recentes sugerem que ratos de bambu podem ter algum papel na epidemiologia da infecção causada por ele (Chariyalertsak, 1996). Essa espécie é única entre os penicílios por ser dimórfica, produzindo nos tecidos células semelhantes a leveduras que são ovais ou cilíndricas e podem ter paredes cruzadas (Cooper, 2000).

Dermatofitoses

Os fungos dermatofíticos são causas comuns e importantes de morbidade humana (Howard, 1999; Hainer, 2003). Em geral, as infecções são leves, e raramente os fungos a elas associados causam doenças invasivas (Chastain, 2001). São reconhecidos três gêneros como causadores de dermatofitose: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Outros mofos, como espécies de *Acremonium*, *Fusarium* e *Scopulariopsis*, têm causado infecções das unhas (onicomicoses) (Gupta, 2004). Como grupo, os fungos dermatofíticos estão distribuídos pelo mundo, mas espécies individuais podem ter uma distribuição geográfica mais restrita. Os dermatófitos também podem ser encontrados em associação estrita a humanos (antropofílicos), a animais (zoofílicos) ou ao solo (geofílicos).

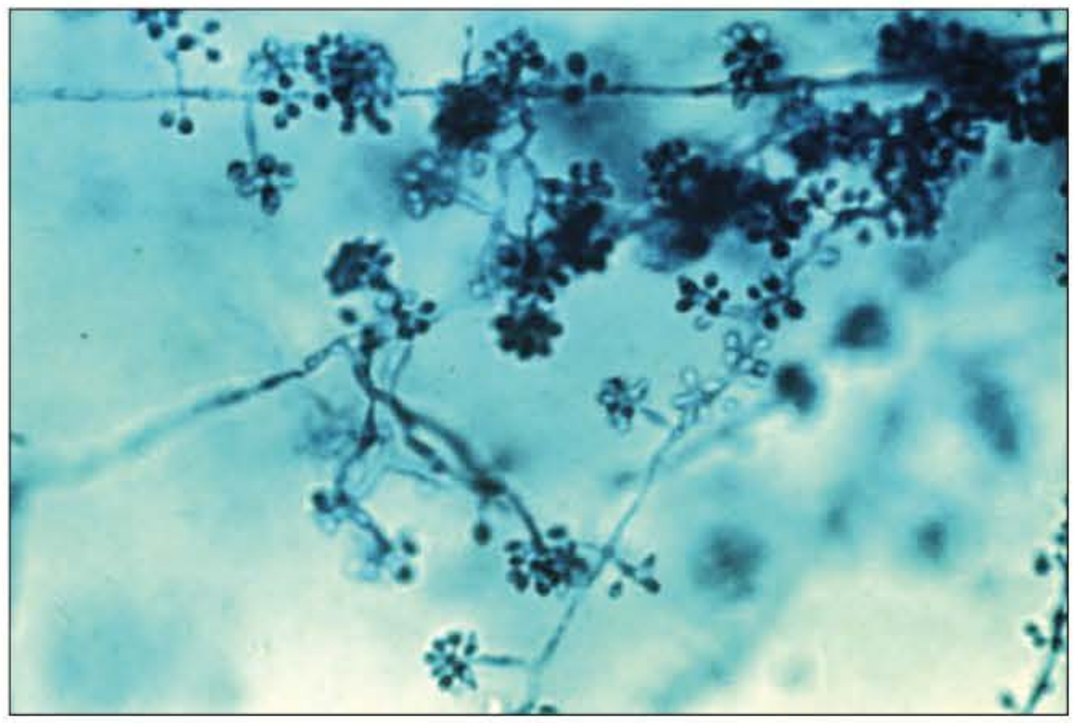


Figura 60.29 Os conídios simpodiais de *Sporothrix schenckii* surgem em aglomerados nas extremidades dos conidióforos laterais (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Fatores de risco

As infecções por dermatófitos (tinhas) resultam do contato com a fonte relevante do fungo, o que também pode servir de indício para o diagnóstico. Por exemplo, a infecção da face em fazendeiros que se encostam em suas vacas ao ordenhá-las é caracteristicamente causada por *Trichophyton verrucosum*, um dermatófito zoofílico encontrado em bovinos. A importância da variação geográfica nos patógenos dermatofíticos é ilustrada por um estudo de uma epidemia de infecção fúngica cutânea entre tropas norte-americanas durante a Guerra do Vietnã (Allen, 1973). A maioria das infecções foi causada por uma variante fortemente esporulante de *T. mentagrophytes*, que não havia sido reconhecida nos EUA. Os distúrbios cutâneos causados pelos fungos dermatofíticos também passaram a ser reconhecidos com maior frequência em atletas praticantes de esportes que exigem contato direto entre eles, como lutas (Kohl, 2000; Adams, 2002; Nenoff, 2002).

Doenças clínicas

Os dermatófitos causam infecção da epiderme, dos pelos e das unhas (Rinaldi, 2000). Em geral, a infecção é conhecida como tinha, nome derivado da natureza avançada serpiginosa das lesões (especialmente evidentes na pele). A terminologia clínica usa o termo "tinha" originário do latim (*tinea*) seguido pelo nome da parte envolvida, como: tinha da cabeça ou capilar (escalpo), tinha da barba, tinha corporal (tronco e membros), tinha do pé (ou podálica), tinha crural (virilha) e tinha ungueal (unhas, também conhecida como onicomicose). Com exceções ocasionais, o *Epidermophyton floccosum* infecta apenas a pele, as espécies *Microsporum* infectam o escalpo e a pele, enquanto as espécies *Trichophyton* infectam a pele, o escalpo e as unhas. O *Trichophyton tonsurans* é a causa mais comum de tinha capilar nos EUA. O *M. canis* é uma causa comum de infecção do escalpo, particularmente em crianças (Aly, 2000; Gupta, 2000). Quando ocorre infecção profunda do escalpo, observa-se um processo inflamatório profundo denominado quérion; *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum* são particularmente associados à formação de quérion. *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *M. canis* são encontrados comumente na tinha corporal e na tinha podálica. As lesões causadas pelo *T. rubrum* costumam ser crônicas e intratáveis, enquanto o *E. floccosum* é uma causa comum de tinha crural.

Diagnóstico laboratorial

O tratamento das infecções dermatofíticas não é voltado para a identificação específica do isolado, de modo que a demonstração de hifas em raspados cutâneos (em preparações com KOH) costuma ser a única técnica diagnóstica realizada antes do início da terapia (Fig. 60.30). O tamanho e a morfologia das hifas sugerem o envolvimento de dermatófitos na infecção. A confirmação da espécie é útil para corroborar que as hifas, de fato, pertencem a um fungo dermatofítico, para avaliar a fonte provável da infecção e a alta probabilidade de infecções crônicas recidivantes (especialmente quando se identifica *T. rubrum*). Raspados cutâneos, unhas e pelos podem ser examinados

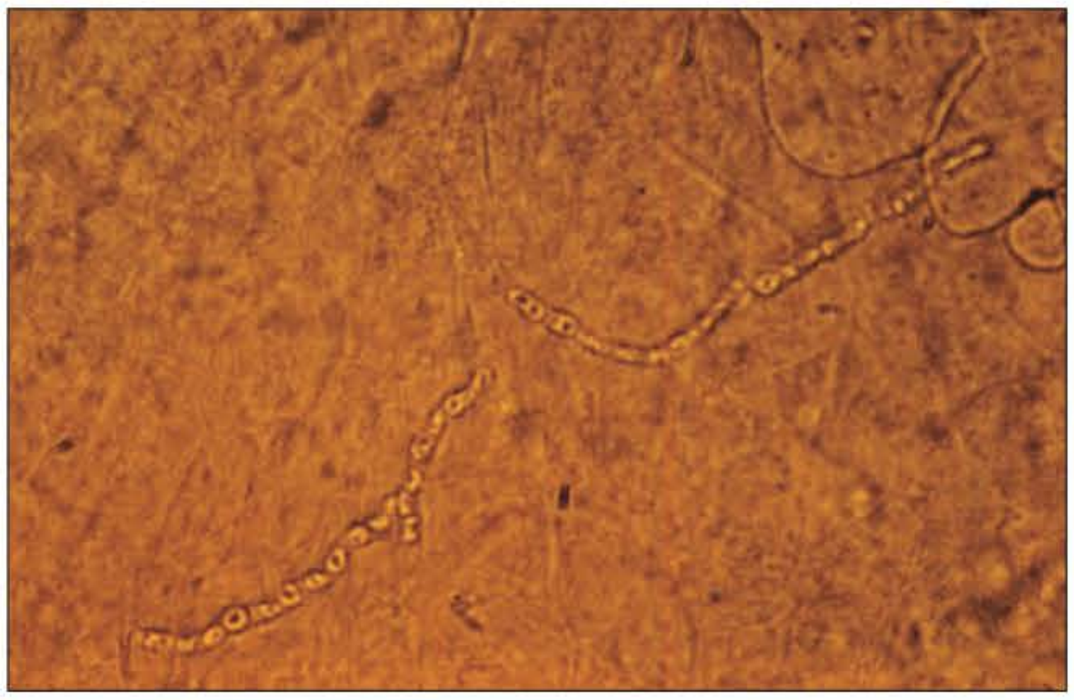


Figura 60.30 Hifas de um dermatófito demonstradas em um raspado da margem de uma lesão de tinha. A presença de hifas com segmentação fina nesse contexto clínico estabelece o diagnóstico de dermatofitose, mas não define a etiologia específica (preparação de KOH; × 400).

Figura 60.31 Uma colônia branca felpuda de *Microsporum canis* (à esquerda) com o pigmento amarelo-limão característico, que também pode ser visto do lado oposto da colônia (à direita) (ágar Sabouraud com glicose e ciclo-heximida).

em preparações de KOH, que podem incorporar calcoflúor branco para facilitar a detecção de hifas. É preciso cuidado ao ler-se esse tipo de preparação, porque fragmentos de tecido, fibras e cristais de colesterol podem ser confundidos com hifas pelo observador inexperiente.

Quando se suspeita de uma infecção capilar, os pelos infectados devem ser removidos para análise. Fungos como *Microsporum audouinii*, *M. canis* ou *M. ferrugineum* fazem os pelos fluorescerem sob luz ultravioleta de onda longa (lâmpada de Wood). Nos EUA, a causa mais provável da tinha capilar devida a um fungo fluorescente é *M. canis*, porque as outras duas espécies são incomuns. O exame microscópico do pelo infectado por um observador experiente pode sugerir o agente etiológico, com base no aspecto e na localização dos artroconídios. Na colonização por ectotrix, como ocorre na infecção por *M. canis* e *M. audouinii*, os artroconídios são externos à haste do pelo. A invasão por endotrix, como se vê na infecção por *T. tonsurans*, caracteriza-se por artroconídios dentro da haste do pelo. Na infecção fávica, hifas, bolhas de ar ou túneis e gotículas de gordura estão presentes na área intrapilar.

Pelos infectados, raspados de unha ou das margens de lesões cutâneas devem ser enviados ao laboratório em um recipiente limpo e seco ou colocados na superfície de um meio de isolamento primário pelo laboratório. O ágar de Sabouraud com glicose foi designado para a recuperação de fungos dermatofíticos e também é efetivo para isolar *Candida* spp., em especial *C. albicans*, que pode causar infecções similares na pele e nas unhas. Os dermatófitos não são inibidos pela ciclo-heximida, que inibe muitos fungos saprófitas. Todos os fungos dermatofíticos têm hifas hialinas septadas e produzem macroconídios e/ou microconídios em várias combinações. Artroconídios e clamidoconídios também podem ser produzidos, mas a morfologia dos macroconídios, e especialmente a dos microconídios, são mais importantes para a identificação. Os estágios sexuados de muitos dermatófitos foram identificados, mas não são encontrados no laboratório clínico. Usa-se uma combinação de aspectos micromorfológicos e alguns testes fenotípicos para diferenciar os dermatófitos (Caddell, 2002).

As espécies de *Microsporum* produzem macroconídios característicos, que constituem as estruturas diagnósticas mais importantes. Em alguns casos, também são produzidos microconídios, não tão úteis em termos diagnósticos. O *M. audouinii*, um agente antropofílico clássico da tinha, em geral não produz estruturas diagnósticas, o que dificulta sua identificação. O *M. canis*, a espécie zoonótica mais frequentemente isolada desse gênero, produz um pigmento amarelo-limão característico em cultura (Fig. 60.31), que se intensifica pelo crescimento em ágar com flocos de batata. Os macroconídios dessa espécie estão ilustrados na Figura 60.32. Os macroconídios do *M. gypseum*, a espécie geofílica isolada mais comum, estão ilustrados na Figura 60.33.

O gênero *Trichophyton* inclui os fungos dermatofíticos isolados mais comumente: *T. rubrum* (Fig. 60.34), *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*

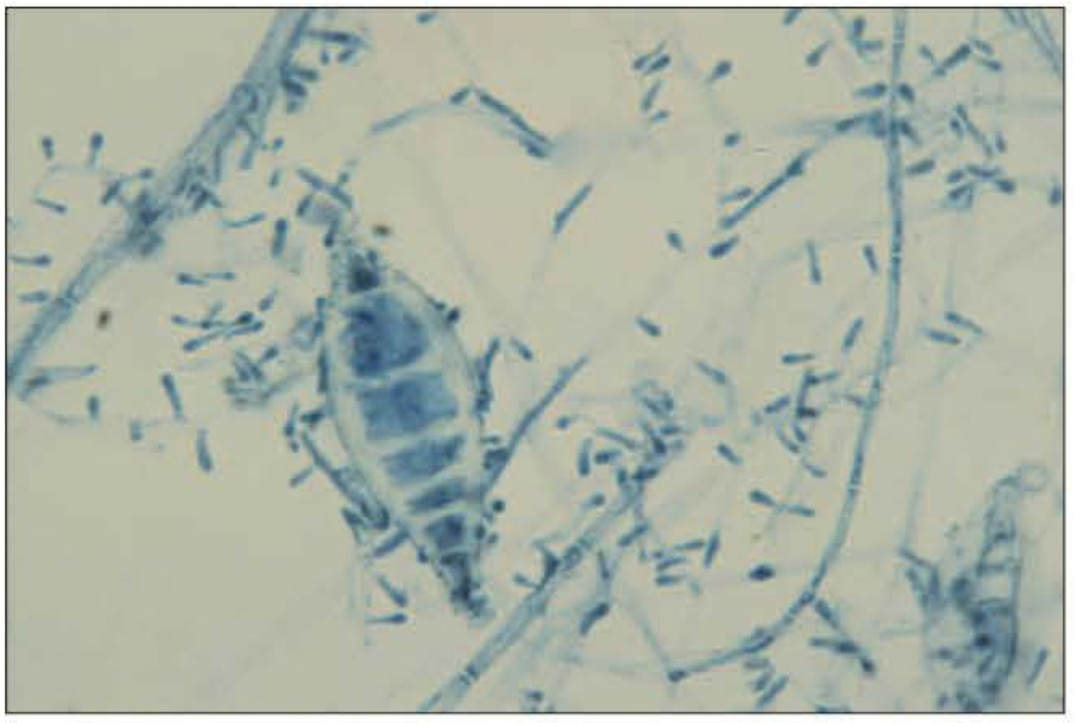


Figura 60.32 Macroconídios afilados em forma de fuso com parede espessa e rugosos de *Microsporum canis*, com hifas finas e septadas (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Figura 60.33 Macroconídios lisos de parede espessa de *Microsporum gypseum* (azul de lactofenol com algodão; × 400).

(Figs. 60.11 e 60.35) e *T. tonsurans* (Fig. 60.36). As colônias podem ter um aspecto felpudo, granular ou, menos comumente, glabro. Podem ser produzidos macroconídios, que são úteis para identificação, em especial no caso de cepas que produzem colônias pulverulentas, mas infelizmente eles costumam estar ausentes. É mais comum a formação de microconídios. Quando presentes, os macroconídios têm paredes finas, são lisos e contêm números variáveis de septos. A interpretação da morfologia microscópica de alguns isolados pode ser difícil, porque é comum haver

Figura 60.34 Colônias brancas felpudas de *Trichophyton rubrum* com pigmento vermelho difusível, que também pode ser visto do lado oposto da colônia (ágar com dextrose e batata).

Figura 60.35 Colônia branca felpuda com pregas radiais de *Trichophyton mentagrophytes* (ágar Sabouraud-dextrose com ciclo-heximida).

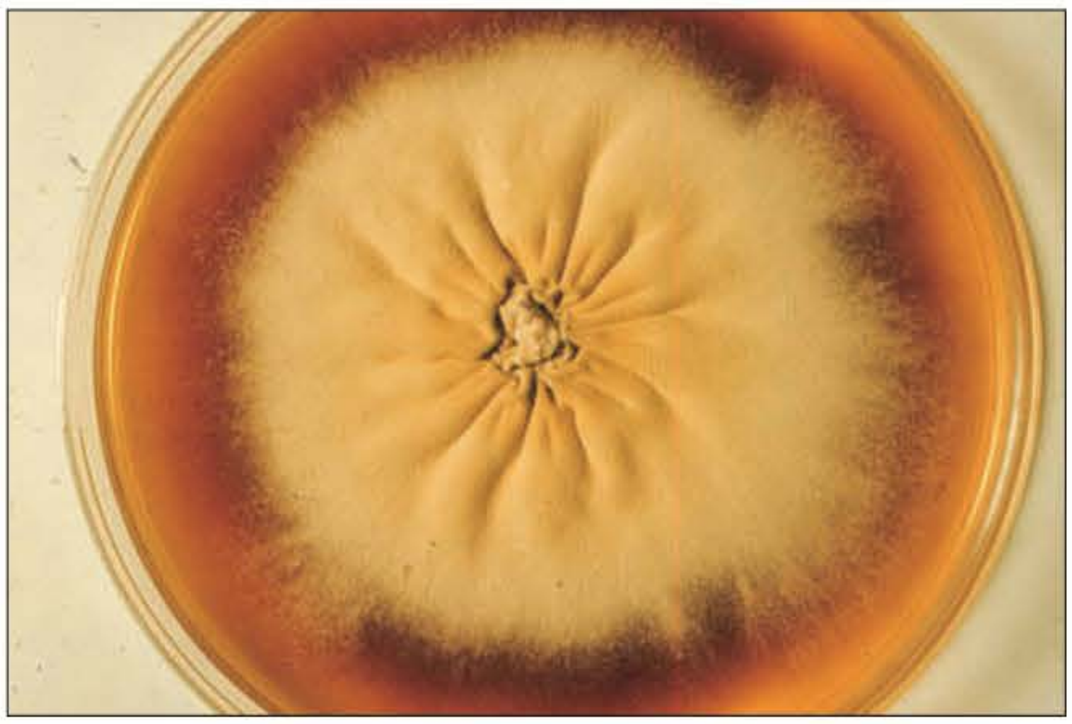


Figura 60.36 Uma colônia plana que mostra coloração amarelo-pálida com pigmentação vermelho-acastanhada na periferia, característica de *Trichophyton tonsurans*. Os sulcos radiais do talo, como se vê, também são comuns (ágar Sabouraud-dextrose com ciclo-heximida).

sobreposição. Para ajudar nessa questão, são úteis outros testes. Em particular, os tipos de ágar para *Trichophyton* são úteis na caracterização das necessidades nutricionais entre membros do gênero. Foram descritos sete meios, porém os quatro primeiros são os mais úteis para identificação. Combinados, tais meios permitem a avaliação da dependência de inositol, tiamina ou ambos os compostos em conjunto.

Meio	Constituintes	Interpretação do crescimento estimulado
T1	Ágar basal	Para comparar com outras formulações
T2	Inositol	Estimulado apenas pelo inositol
T3	Inositol + tiamina	Estimulado apenas quando ambos os compostos estão presentes
T4	Tiamina	Estimulado apenas pela tiamina

A diferenciação entre *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* também é facilitada por vários testes não morfológicos. Um pigmento difusível pode ser produzido por ambas as espécies, mas o pigmento intensamente vermelho do *T. rubrum* é acentuado pela cultura em ágar com flocos de batata ou ágar com maisena e 1% de glicose. A produção de urease em 3 a 5 dias pelo *T. mentagrophytes*, mas não pelo *T. rubrum*, também ajuda a diferenciar essas duas espécies. Por fim, o teste da penetração no pelo pode ser empregado como teste diferencial. O *T. mentagrophytes* produz defeitos em forma de cunha nos pelos *in vitro*, enquanto o *T. rubrum* cresce fora dos pelos, sem penetração. O uso de abordagens morfológicas e não morfológicas proporciona a identificação mais acurada dos isolados.

O único patógeno do gênero *Epidermophyton* é o *E. floccosum*, um fungo antropofílico que é uma causa importante de tinha crural e, menos comumente, tinha do pé. As colônias, inicialmente castanho-amareladas, cinzentas ou cáqui, tornam-se aveludadas e pregueadas à medida que amadurecem (Fig. 60.37). O *E. floccosum* não produz microconídios, mas macroconídios distintos fornecem os indícios para a identificação (Fig. 60.10). Tais estruturas têm paredes externas lisas, com até quatro paredes cruzadas e formato de clava, além de tendência a "flocular", de onde vem a denominação da espécie.

Embora o exame de estruturas micromorfológicas e a comparação dos resultados com testes fenotípicos em geral sejam confiáveis para a identificação das espécies de dermatófitos, recentemente também foram iniciadas abordagens moleculares para estudo desses fungos (Iwen, 2002; Kac, 2000). Tais estudos conduziram não apenas a aplicações diagnósticas (Makimura, 2001), como também a avaliações filogenéticas (Graser, 2000a, 2000b) e epidemiológicas (Kac, 2000).

Micoses causadas por fungos dematiáceos

Os mofos dematiáceos (também conhecidos como mofos pretos) são um grupo complexo e fascinante de fungos, que se caracterizam pela formação de um pigmento escuro, devido à produção de melanina nas paredes celulares de hifas ou conídios ou ambos (Brandt, 2003). Esses fungos são saprófitas do solo e de plantas, considerados historicamente causas raras de doença em humanos, mas agora tidos como patógenos fúngicos emergentes (Silveira, 2001).

Doenças clínicas

O espectro clínico das doenças causadas por esses fungos inclui o micetoma micótico e a cromoblastomicose, predominantemente em

Figura 60.37 A textura de camurça e a cor verde-amarelada são características de *Epidermophyton floccosum* (ágar Sabouraud-dextrose com ciclo-heximida).

hospedeiros com sistemas imunes normais, e a feoifomicose, mais comum em pacientes imunocomprometidos (Rinaldi, 1996; McGinnis, 2003; Sanche, 2003). Essas doenças costumam ser diagnosticadas com base em um quadro histológico único do fungo no tecido, seguindo-se seu isolamento em cultura e a avaliação morfológica das estruturas reprodutivas. A classificação de mofos pretos sofreu diversas alterações com o passar dos anos, o que aumenta a dificuldade de identificar o agente etiológico (McGinnis, 1999; 2003). Caso queira uma descrição morfológica abrangente dos fungos dematiáceos, o leitor deve consultar o livro de Sigler (2003). Embora uma descrição detalhada dos aspectos clínicos e micológicos das doenças causadas por esses fungos esteja além do âmbito deste capítulo, apresentaremos uma descrição sucinta dos principais tipos de doenças causadas por eles.

Os mofos dematiáceos, como *Stachybotrys chartarum*, apesar de geralmente não associados a doença invasiva, têm sido associados a uma condição conhecida como "síndrome da edificação difícil", ainda que tal associação tenha sido questionada (Miller, 2003). Para uma revisão desse assunto, consultar o texto de Kuhn e Ghannoum (Kuhn, 2003).

Micetoma

O micetoma é uma infecção granulomatosa crônica localizada dos tecidos cutâneos e subcutâneos, com a formação de um trajeto fistuloso e envolvimento frequente dos ossos contíguos. Na maioria dos casos, a doença limita-se às mãos e aos pés (também sendo conhecida como "pé maduro") de indivíduos como fazendeiros, camponeses e outros que ficam em contato com materiais contaminados do solo. Bactérias classificadas como actinomicetos aeróbicos (micetoma actinomicótico) e fungos filamentosos (micetoma eumicótico) podem causar micetomas.

Figura 60.38 A imagem mostra grânulos de vários tamanhos do fungo *Madurella grisea*, compostos por massas negras de hifas (CDC Public Health Image Library).

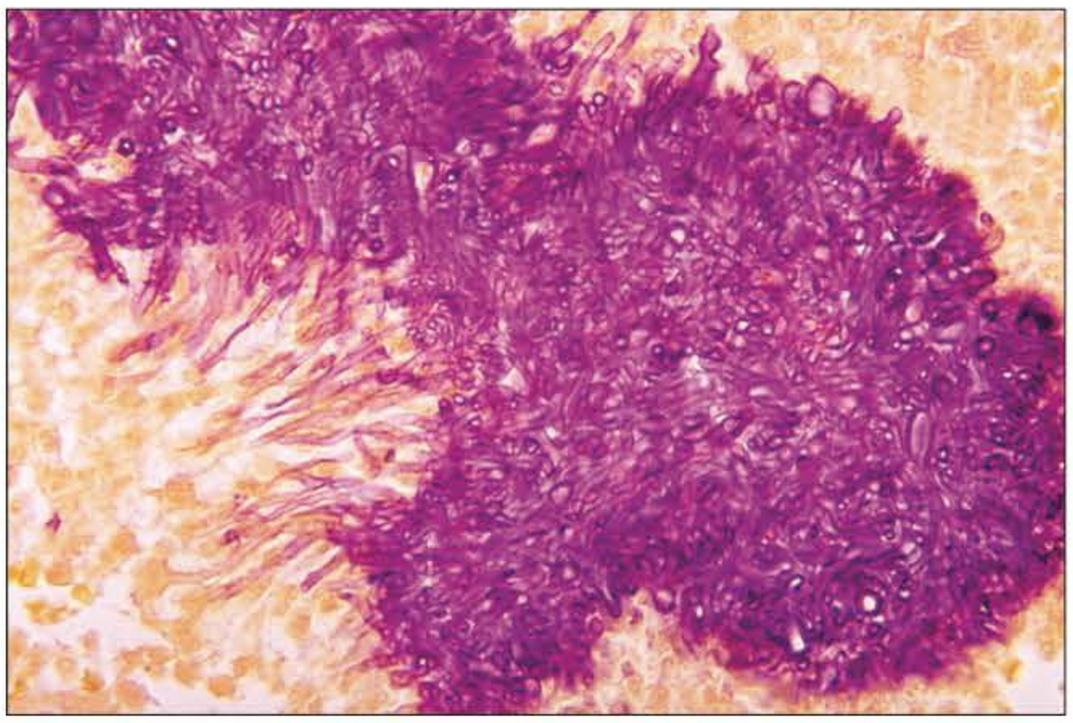


Figura 60.39 Aspecto histológico do "micetoma de grãos negros" devido à *Madurella mycetomatis* (coloração de Gridley, × 1.000) (cortesia do Dr. Libero Ajello, CDC Public Health Image Library).

Além disso, patógenos fúngicos hialinos (não pigmentados) também podem causar essa doença. Para uma revisão sobre o micetoma actinomicótico, ver o artigo escrito por McNeil e Brown (McNeil, 1994). O micetoma ocorre após uma lesão traumática com algum objeto contaminado como uma farpa, um espinho ou qualquer item penetrante. A doença clínica caracteriza-se pela formação de uma lesão necrótica no local da inoculação. Embora sejam conhecidas mais de 25 espécies de fungos causadores dessa doença, os agentes causais mais comuns do micetoma eumicótico são *Madurella mycetomatis*, *Scedosporium apiospermum*, *Leptosphaeria senagalensis* e *Madurella grisea* (Bustamante, 2003; Ahmed, 2004). O *S. apiospermum* (teleomorfo, *Pseudallescheria boydii*, discutido em detalhes mais adiante, com as hialoifomicoses) é considerado a causa mais comum dessa doença nos EUA, porém a espécie fúngica não produz pigmentação escura dentro do tecido e, portanto, não é considerada um fungo dematiáceo.

Pode-se chegar a um diagnóstico definitivo de micetoma mediante a demonstração dos esclerócios (também conhecidos como grãos ou grânulos) em um biópsia de tecido, em exsudatos drenados de um trajeto fistuloso ou em material aspirado de uma fístula fechada (Fig. 60.38). À microscopia, esses grãos são compostos por hifas septadas largas, com 2 a 5 μm de diâmetro (Fig. 60.39). No caso dos fungos dematiáceos, esses grãos estão associados a um pigmento escuro e em geral são denominados grãos negros, enquanto os esclerócios dos fungos não dematiáceos consistem em hifas não pigmentadas, denominadas grãos brancos. A identificação do agente etiológico requer cultura em meios-padrão para fungos, como o ágar de Sabouraud com glicose, a qual pode levar 4 semanas ou mais para crescer, por causa do crescimento lento dessa espécie (Fig. 60.40). Uma vez isolada, essa espécie de fungo é identificada, usando-se a morfologia macroscópica da colônia e a pigmentação associada à observação de perto das características micromorfológicas das estruturas reprodutivas após esporulação (Fig. 60.41). Nos casos em que não ocorre esporulação, testes fisiológicos, como aqueles em que são utilizados carboidrato e nitrato, podem ajudar na identificação. Também foram desenvolvidas várias técnicas moleculares usando-se uma variedade de alvos para ajudar na identificação do agente etiológico (Iwen, 2002).

Cromoblastomicose

A cromoblastomicose (cromomicose) é uma infecção crônica da pele e de tecidos moles, que se caracteriza pela presença de estruturas fúngicas muriformes denominadas corpúsculos escleróticos dentro dos tecidos infectados. A doença é distinguida pela formação de uma placa verrucosa ou nódulo indolor no local da inoculação, com áreas de cicatrização da lesão evidentes e a formação de materiais de escara. Os agentes etiológicos mais comuns são os mofos negros *Fonsecaea pedrosi*, *Phialophora verrucosa* e *Cladophialophora carrionii*, embora numerosas outras espécies também possam estar envolvidas (Baddley, 2003a). O

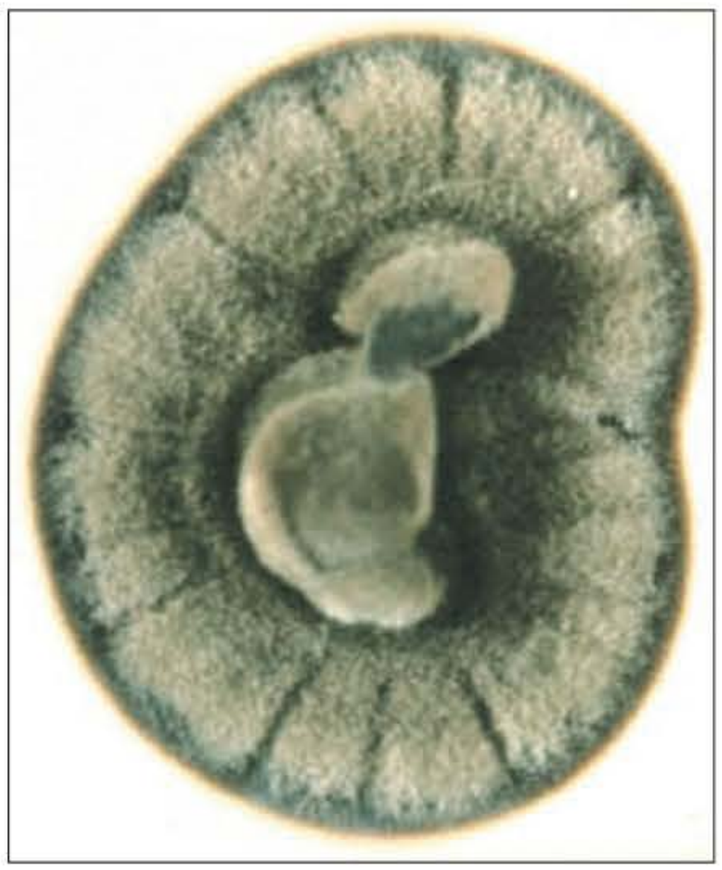


Figura 60.40 Destaque de um fungo dematiáceo que cresceu em ágar Sabouraud-dextrose.

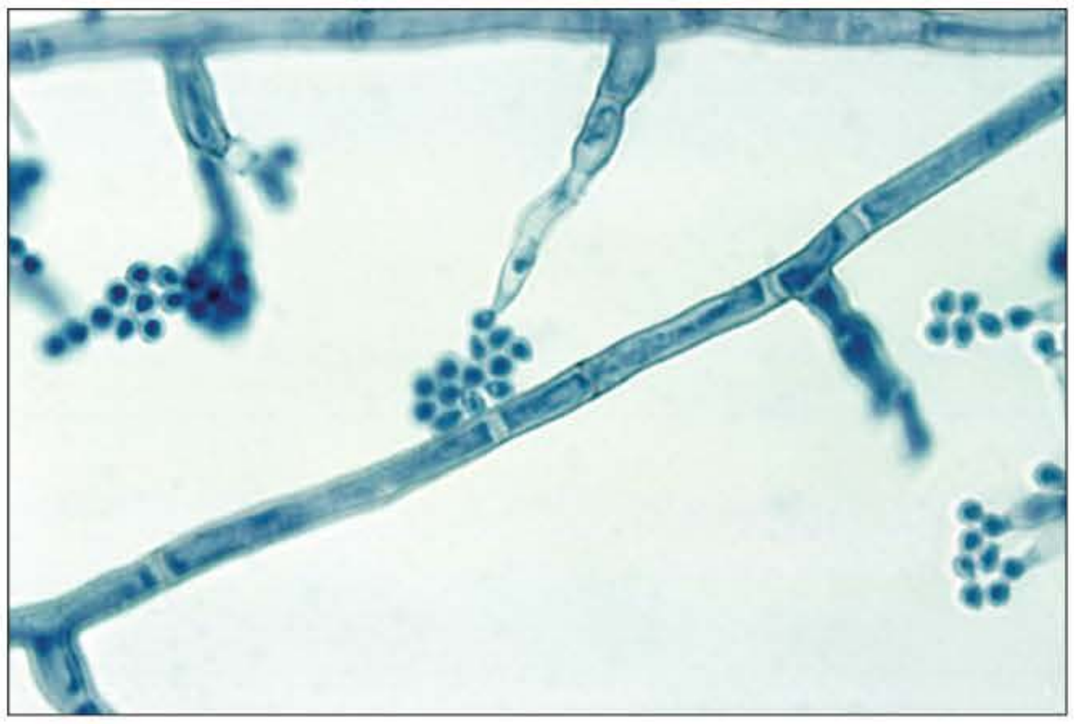


Figura 60.41 A imagem mostra fiálides com conídios terminais de *Madurella mycetomatis* (azul de lactofenol com algodão) (cortesia da Dra. Lucille K. George, CDC Public Health Image Library).

aspecto distintivo é a presença de células arredondadas, não de hifas, marrons (corpúsculos escleróticos) nos tecidos. Tais estruturas, que se dividem produzindo um plano septal, são diagnósticas da entidade, mas não fornecem um indício para a identificação da espécie de mofo. Mais uma vez, a cultura e o reconhecimento dos aspectos morfológicos do isolado são necessários para identificar-se a espécie infectante.

Feoifomicose

Feoifomicose (da palavra grega *phaeo*, que significa "escuro") foi o termo proposto originalmente por Ajello et al. em 1974, para designar uma entidade histopatológica que abrange todas as infecções "causadas por fungos que se desenvolvem em tecidos, na forma de elementos miceliais septados dematiáceos de parede escura" (Ajello, 1974). Com o passar dos anos, a feoifomicose passou a ser reconhecida mais como uma causa de doenças subcutâneas e sistêmicas que se caracterizam pela formação de hifas septadas e pigmentadas nos tecidos. Embora tanto a cromoblastomicose como o micetoma eumicótico sejam causados por fungos dematiáceos, distinguem-se da feoifomicose pelo surgimento de corpúsculos escleróticos e grânulos micóticos nos tecidos, respectivamente.

A feoifomicose varia de uma lesão cutânea indolente, provavelmente resultante da inoculação direta de fungos no local, a uma infecção destrutiva devastadora, quase sempre fatal. A forma subcutânea da doença caracteriza-se pela formação de um nódulo ou cisto subcutâneo assintomático solitário, geralmente em um indivíduo imunocompetente, mas isso também pode ocorrer em receptores de transplante (Clancy, 2000). Os fungos dematiáceos mais comuns associados a essa condição são *Exophiala jeanselmei*, *Wangilla dermatitidis* e espécies de *Phialophora* (Perfect, 2003). A doença pode tornar-se crônica, com alteração clínica observável por anos. Já a feoifomicose sistêmica emergiu como uma infecção mais comum, especialmente em indivíduos com neutropenia induzida por quimioterapia. Em uma revisão de 101 casos de feoifomicose primária do sistema nervoso central de 1966 a 2002, o *Cladophialophora bantiana* foi responsável por 48% dos casos, sem dúvida a espécie mais comum responsável por doença cerebral (Revankar, 2004). A espécie mais comum seguinte foi *Ramichloridium mackenzei* (13% dos casos). É interessante o fato de que mais da metade desses casos ocorreu em indivíduos sem imunodeficiência conhecida subjacente. Em outra revisão de 72 casos de feoifomicose disseminada, foi relatada a leucemia como a condição subjacente mais comum, e o patógeno mais comum foi *Scedosporium prolificans* (42%), seguido por *Bipolaris spicifera* (8,3%) e *Wangiella dermatitidis* (*Exophiala dermatitidis*) (7%) (Revankar, 2002). Em termos globais, a mortalidade foi de 79%. Na maioria dos casos de feoifomicose, o diagnóstico pode ser difícil, pois muitos dos agentes etiológicos em geral são considerados contaminantes quando isolados da cultura. Nos tecidos, a presença de formas de hifas irregularmente intumescidas e septadas com estruturas semelhantes a leveduras que se coram com um corante Masson-Fontana específico para melanina é presuntiva do diagnóstico de feoifomicose.

Zigomicose

Os zigomicetos são causas importantes de infecção fúngica invasiva em hospedeiros imunocomprometidos (Eucker, 2001; Freifeld, 2004; Pagano, 2004). As *Rhizopus* spp. são os organismos mais comuns isolados de pacientes com zigomicose. *Rhizopus* (*oryzae*) *arrhizus* e *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* são as espécies causadoras da maioria dos casos (Ribes, 2000). Outras espécies menos comuns incluem *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Cunninghamella bertholletiae* e *Rhizomucor pusillus* (Iwen, 2005). As doenças invasivas causadas por esses fungos têm sido chamadas historicamente mucormicose e ficomicose, mas zigomicose é o termo mais frequente, usado como o mais adequado para relacionar as doenças com a classificação taxonômica (Freifeld, 2004).

Fatores de risco

Diabetes, uso de esteroides, neutropenia, prematuridade, transplante de células-tronco ou de órgão sólido e uso de deferoxamina são fatores de risco bem descritos para o desenvolvimento de zigomicose (Freifeld, 2004). Em geral, a maioria dessas condições está associada ao comprometimento da função imune normal dos leucócitos. Há muito tempo, a cetoacidose diabética foi reconhecida como principal fator de risco para o desenvolvimento de zigomicose em humanos. Mostrou-se que o soro cetoacidótico estimula o crescimento de *Rhizopus* (Artis, 1982).

Doenças clínicas

Uma das duas apresentações clínicas mais comuns da zigomicose é a doença rinocerebral (também chamada zigomicose sino-orbitária ou craniofacial). A infecção começa como uma sinusite indiferenciada, mas as hifas rompem-se rapidamente através das paredes finas dos seios nasais e estendem-se até a órbita, adiante até a pele da face e de volta para a cavidade craniana. O fator de risco típico para esse tipo de infecção é o diabetes melito, estando a maioria dos pacientes em cetoacidose quando a infecção se desenvolve. A doença rinocerebral pode progredir rapidamente, em geral resultando na morte. Pode ocorrer trombose da artéria carótida.

A segunda apresentação mais comum da zigomicose é a doença pulmonar, que pode ser seguida por disseminação hematogênica. A infecção começa como uma pneumonia indiferenciada, que pode ser complicada por hemoptise e cavitação. A infecção disseminada é comum, com desfecho quase sempre fatal. Os fatores de risco para a infecção pulmonar são neutropenia e imunossupressão, em particular por malignidade hematológica (Pagano, 2004).

Uma apresentação menos comum da zigomicose é a infecção da pele e de tecidos moles (Alsuwaida, 2002; Oh, 2002). As hifas podem alcançar a pele por via hematogênica, por extensão direta de um foco profundo ou pela introdução a partir de fora. A fita adesiva contaminada foi relatada como uma fonte de doença cutânea primária no paciente comprometido (Alsuwaida, 2002). Outros casos raros de zigomicose incluem o acometimento primário do trato gastrintestinal, do coração ou dos rins (Freifeld, 2004).

Patologia da zigomicose

A histopatologia é dominada por necrose do tecido, qualquer que seja o local da infecção. A propensão desses mofos para invadiras paredes de artérias e veias, acarretando trombose, resulta em necrose coagulativa extensa (Chandler, 1987b). As hifas surgem como tiras de hifas largas em geral torcidas e colapsadas, com uma largura variável de 5 a 20 μm (Fig. 60.3). Os septos são esparsos e em geral não observados no tecido, mas uma cobertura das paredes exteriores das hifas colapsadas pode ser confundida com septos. Segmentos intumescidos de hifas e hifas cortadas em sentido transversal podem ser interpretados indevidamente como células de levedura. Há tendência a ocorrerem ramificações em ângulos retos em um padrão casual. Essas características das hifas, aliadas às propriedades angioinvasivas desses fungos, são altamente sugestivas de uma zigomicose. Uma comparação dos aspectos histológicos dos zigomicetos com outras hifas não pigmentadas no tecido é fornecida na Tabela 60.12. As hifas desses mofos em geral coram-se melhor com H&E do que com o método da metenamina de prata.

Tabela 60.12 Aspectos histopatológicos dos zigomicetos em comparação com outros fungos que ocorrem como hifas não pigmentadas em tecido

Característica	Zigomicetos*	*Aspergillus*†	*Fusarium*
Características das hifas			
Largura (μm)	Variável (5 a 10)	Consistente (3 a 6)	Consistente (3 a 8)
Padrão de ramificação	Casual	Dicotômico	Ângulo reto
Frequência da septação	Rara	Alta	Alta
Estruturas reprodutivas no tecido	Ausentes	Podem estar presentes em áreas infectadas que se comunicam com o ar	Clamidoconídios às vezes presentes
Angioinvasiva	Sim	Sim	Sim

Em todos os casos, um diagnóstico definitivo da espécie requer isolamento e identificação do fungo em meios sintéticos.

* Os *Entomophthorales* estão incluídos nesse grupo com fragmentos de hifas no tecido, geralmente cobertos por material eosinofílico amorfo de Splendore-Hoeppli e ausência de angioinvasividade notada.

† Devido à degeneração de hifas ou à resposta imune do hospedeiro ou a ambas, as hifas das espécies de *Aspergillus* podem exibir formas morfológicas atípicas que podem causar problemas no diagnóstico diferencial.

Fonte: modificado com permissão de Freifeld AG, Iwen PC: Zygomycosis. Semin Respir Crit Care Med 2004; 25: 221–231.

Diagnóstico laboratorial

Os zigomicetos costumam ser considerados contaminantes comuns dentro do laboratório de micologia, mas as implicações clínicas potenciais dos isolados devem ser cuidadosamente investigadas, antes que eles sejam considerados saprófitas. A colaboração entre o patologista e o pessoal do laboratório é importante, porque a demonstração de hifas no tecido revela que um mofo isolado estava presente *in vivo* e não é um contaminante ambiental. As hifas largas, esparsamente septadas, podem ser demonstradas em cortes de tecido ou esfregaços por impressão de tecido, usando-se o corante calcoflúor branco. O tecido deve ser picado ou macerado, em vez de homogeneizado, após o que é inoculado na superfície de um ágar de isolamento primário. Os zigomicetos são inibidos pela ciclo-heximida, de modo que um meio fúngico não seletivo deve ser incluído ao serem feitas culturas fúngicas.

Os zigomicetos crescem rapidamente (em 48 a 72 horas) e produzem hifas aéreas em abundância, que alcançam também rapidamente a tampa da placa de Petri, sendo conhecidas coloquialmente como "levantadoras de tampa". As colônias caracterizam-se como lanosas, inicialmente brancas, tornando-se cinzentas a negras à medida que os esporos se desenvolvem (Fig. 60.42). As *Rhizopus* spp. produzem esporangiosporos não ramificados que sustentam os esporângios (60 a 350 μm), com uma columela elipsoide e contendo esporangiosporos. Os esporangiosporos são ovais e frequentemente possuem um pigmento marrom (Fig. 60.6). Um aspecto diagnóstico importante no *Rhizopus* é a presença de estruturas hialinas a acastanhadas semelhantes a raízes, denominadas rizoides, que se desenvolvem no ponto onde os esporangióforos surgem. Em contraste com as *Rhizopus*, os rizoides das espécies de *Absidia* surgem dos estolhons entre conidióforos. Os esporangióforos têm formato de pera, em vez de serem redondos, e um colarete é visível em torno da columela quando o esporângio se desintegra. As espécies de *Mucor* não produzem rizoides, os conidióforos em geral são mais ramificados do que os de outros zigomicetos, e não ocorre crescimento acima de 37°C. O *Rhizomucor*, um intermediário morfológico entre *Rhizopus* e *Mucor*, tem rizoides rudimentares e conidióforos ramificados, crescendo a temperaturas tão altas como 58°C. As *Mucor* spp. já foram consideradas a segunda causa mais reconhecida de zigomicose, mas esse não é mais o caso, pois o *Mucor corymbifera* foi colocado no gênero *Absidia* como *A. corymbifera*, e o *Mucor pusillus* foi reclassificado no gênero *Rhizomucor*, como *Rh. pusillus*. As *Mucor* spp. estão agora em um distante terceiro lugar como causas de zigomicose, bem atrás das espécies de *Rhizopus* e *A. corymbifera* em ocorrência (Ribes, 2000). Embora os gêneros dos zigomicetos possam ser prontamente reconhecidos, alguns laboratórios de micologia

Figura 60.42 Uma colônia cinza felpuda de *Rhizopus* spp. preenche o espaço dentro da placa de Petri (levantadora de tampa) (ágar de Sabouraud com glicose).

têm a capacidade de identificar espécies, o que requer estudos de cruzamento (para a produção de zigosporos) ou análise molecular com uso de mecanismos de comparação de sequência (Weitzman, 1995; Yeo, 2002).

Aspergilose, fusariose e outras micoses causadas por fungos hialinos

Esse grande grupo de fungos saprófitas, frequentemente encontrados no laboratório clínico, contém alguns dos mofos patogênicos mais importantes, classificados coletivamente como hialinos, porque produzem hifas não pigmentadas, e a doença denomina-se hialoifomicose. O número de espécies dentro desse grupo capazes de causar doenças humanas é grande e continua a expandir-se, à medida que as terapias imunossupressoras tornam-se mais comuns. Como está além do âmbito deste capítulo discutir a gama completa de organismos envolvidos, o leitor deve consultar um atlas sobre fungos de interesse clínico para obter mais detalhes sobre a variedade de espécies que causam hialoifomicose (De Hoog, 2000). Sem dúvida, os mofos hialinos mais reconhecidos como causadores de doença humana são classificados como Eurotiales (*Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Penicillium*), Microascales (*Scedosporium* e *Scopulariopsis*) e Hypocreales (*Cylindrocarpon*, *Fusarium* e *Trichoderma*). Nesta seção, vamos considerar em detalhes os mofos hialinos *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., mais comumente associados a doenças humanas invasivas.

O gênero *Aspergillus*

Aspergilose é o termo usado para descrever a infecção causada por espécies do gênero *Aspergillus*. Esse grupo de organismos tem a capacidade de produzir um amplo espectro de infecções, inclusive micotoxicoses, manifestações alérgicas e infecção superficial no hospedeiro normal, infecção localizada não invasiva em hospedeiros com dano tecidual ou obstrução por corpo estranho e infecção invasiva no hospedeiro comprometido (Bodey, 1989). As revisões de Etzel (2002) e Judson (2004) são recomendadas para mais informação sobre a intoxicação pela ingestão da toxina de *Aspergillus* e as manifestações alérgicas associadas à exposição a esporos de *Aspergillus*, respectivamente.

O *Aspergillus fumigatus* é considerado a espécie mais comum associada a doenças humanas, seguida pelo *Aspergillus flavus*, embora em algumas instituições o *A. flavus* tenha emergido como a espécie detectada mais comumente (Bodey, 1989; Iwen, 1993). A terceira espécie mais comum é o *Aspergillus niger* ou *Aspergillus terreus* (Iwen, 1998a, Perfect, 2001; Marr, 2002a). A resistência do *A. terreus* à anfotericina B torna o tratamento da doença invasiva causada por essa espécie particularmente desafiador (Iwen, 1998a; Sutton, 1999; Baddley, 2003b; Steinbach, 2004). Outras espécies raras de *Aspergillus* também foram associadas a doenças invasivas (Iwen, 1998b; Marr, 2002a).

Fatores de risco

Os hifomicetos (Hyphomycetes) são fungos onipresentes aos quais todos nós estamos expostos regularmente. São residentes na vegeta-

ção de todos os tipos e onipresentes no ambiente. Infecções nosocomiais não são raras, e os hospitais foram ligados a inúmeros casos na literatura (Iwen, 1994; Warnock, 2001). A engenharia do controle de infecção, por meio do projeto das instalações para proteger pacientes de alto risco contra a exposição a esporos, foi criada para proporcionar um ambiente mais seguro para os pacientes (Noskin, 2001).

Os fatores de risco mais importantes para a aspergilose invasiva são: doença imunossupressora, quimioterapia em alta dose com ou sem transplante e transplante de órgão sólido (Denning, 1998a, 1998b; Fishman, 2002; Marr, 2002b; Ergin, 2003). A neutropenia é um fator de risco proeminente e predisponente para a doença, mas também pode ocorrer doença invasiva séria em indivíduos que não estão imunossuprimidos por quimioterapia ou malignidade (Denning, 2004), embora a doença invasiva em indivíduos completamente normais seja rara. A infecção de ferida é um problema em pacientes com queimaduras extensas e indivíduos expostos a materiais contaminados com conídios, situação que lembra os zigomicetos (Holzheimer, 2002). Podem ocorrer bolas de fungo no pulmão de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia ou cavidades antigas causadas por tuberculose (Judson, 2004).

Doenças clínicas

O espectro de doenças invasivas causadas por espécies de *Aspergillus* é amplo. Esses fungos têm baixa patogenicidade em humanos e raramente causam doença no indivíduo imunologicamente competente. No entanto, pacientes imunocomprometidos correm risco de ter doença invasiva, especialmente aqueles com granulocitopenia ou doença do enxerto *versus* hospedeiro e os submetidos a terapia imunossupressora ou que estejam recebendo tratamento com corticosteroides (Kontoyiannis, 2002). Como os esporos de *Aspergillus* são normais no ambiente, o local primário mais comum de infecção é o trato respiratório inferior e, em menor extensão, os seios paranasais.

Infecções oculares

A ceratomicose em geral segue-se a um traumatismo ocular, especialmente em pacientes que foram tratados com esteroides tópicos. Dor e embaçamento visual seguem-se ao episódio traumático e, se ele não for tratado, a infecção pode estender-se para a câmara anterior. Pode ser necessária a enucleação do olho se o processo não for interrompido. Uma revisão de Thomas sobre as perspectivas atuais quanto às micoses oftálmicas descreve em mais detalhes os aspectos clínicos associados às doenças que acometem a órbita e o olho (Thomas, 2003).

Infecções óticas

A otomicose é uma infecção da orelha externa, em geral causada por *A. niger* ou *A. fumigatus*. Dor, queda da audição e secreção são acompanhadas por uma excrescência felpuda verde ou negra no canal auditivo. A extensão além da orelha externa é rara, mas pode ocorrer em pacientes imunossuprimidos (Vennewald, 2003).

Infecção sinusal

A sinusite fúngica pode ser classificada em quatro categorias primárias: doença invasiva fulminante aguda, doença invasiva indolente crônica, bola de fungo e doença alérgica (Morpeth, 1996). A disseminação do fungo a partir do seio para tecidos adjacentes (doença invasiva aguda ou crônica) em geral depende das respostas imunológicas do hospedeiro e da presença de cetoacidose metabólica, embora a infecção invasiva também tenha sido relatada em indivíduos aparentemente sadios (Parikh, 2004; Sivak-Callcott, 2004). Muitas espécies diferentes de *Aspergillus* têm estado envolvidas em doença invasiva, com o *A. flavus* sendo a espécie mais comum em alguns relatos (Iwen, 1997).

Infecção cutânea

As espécies de *Aspergillus* podem infectar a pele após disseminação a partir de outro local, geralmente pulmonar, em pacientes infectados pelo HIV ou imunocomprometidos, ou a infecção pode ser um caso primário após exposição direta a uma fonte cutânea (Arikan, 1998; van Burik, 1998). Os fatores de risco reconhecidos incluem imunossupressão, mas fatores locais que anulam os mecanismos de defesa da pele também são importantes, como pode ocorrer com feridas de queimaduras e cirúrgicas, especialmente se houver curativos oclusivos. É difícil tratar a disseminação para a pele a partir de outra fonte primária, e ela frequentemente resulta em morte.

Infecção pulmonar primária

A aspergilose pulmonar primária é a infecção por mofo mais comum em pacientes imunocomprometidos, especialmente naqueles com malignidades hematológicas tratados com quimioterapia intensiva (Herbrecht, 2004). Em geral, a doença pulmonar invasiva aguda está associada a pessoas gravemente imunocomprometidas, mas também foram descritas doenças menos invasivas e não invasivas que afetam os pulmões, como aspergilomas (bolas de fungo), aspergilose pulmonar necrotizante crônica, aspergilose semi-invasiva, aspergilose pulmonar invasiva crônica, aspergilose pulmonar sintomática e pseudotuberculose por *Aspergillus*. A predileção do *Aspergillus* por invadir vasos sanguíneos acarreta infarto e hemorragia nos pulmões e pode causar disseminação hematogênica para outros órgãos (Saubani, 2002).

Disseminação da infecção

A disseminação a partir do pulmão ou de outros locais pode envolver qualquer sistema orgânico. A propensão de hifas para invadir estruturas vasculares e causar trombose leva a infartos e abscessos em múltiplos órgãos. Órgãos únicos ou múltiplos, inclusive o cérebro, a pele, os rins, a pleura, o coração, o esôfago, o fígado ou qualquer outro local, podem ser envolvidos (Denning, 1998a).

Patologia da aspergilose

O aspecto histológico da infecção por *Aspergillus* é similar ao observado em outras infecções por mofos hialinos, e a diferenciação entre gêneros e espécies em geral não é possível, exceto em casos incomuns, nos quais ocorreu esporulação dentro da cavidade tecidual. A reação tecidual pode ser granulomatosa, porém mais comumente é dominada por neutrófilos polimorfonucleares, a menos que o paciente esteja gravemente neutropênico. Invasão vascular, trombose e infarto em geral são aspectos proeminentes. As hifas são delgadas (2 a 5 μm), septadas, ramificam-se em ângulos agudos (dicotômicas) (Fig. 60.4) e em geral coram-se bem com H&E, mas a morfologia pode ser mais bem demonstrada com as técnicas com ácido periódico de Schiff ou metenamina de prata. O aspecto histológico dos aspergilos e zigomicetos pode ser diferenciado com base no tamanho, nas características das hifas e na presença de septações (Tab. 60.12).

Quando o processo patológico é uma bola de fungo, as hifas podem corar-se mal com corantes histopatológicos. Hifas em uma cavidade que esteja em contato com o ar, como os pulmões ou seios da face, podem desenvolver cabeças frutificantes, evento que permite a identificação como *Aspergillus* (Fig. 60.43). Os conidióforos, que não são septados e podem ser mais largos do que as hifas vegetativas, não devem ser confundidos com zigomicetos. Células de Hulle de parede espessa e cleistotécios foram descritos *in vivo*. Quando o paciente é imunocompetente, e a resposta histológica é granulomatosa, as hifas podem estar fragmentadas e confinadas ao citoplasma de macrófagos e células gigantes multinucleadas. A resposta granulomatosa ao *Aspergillus* no

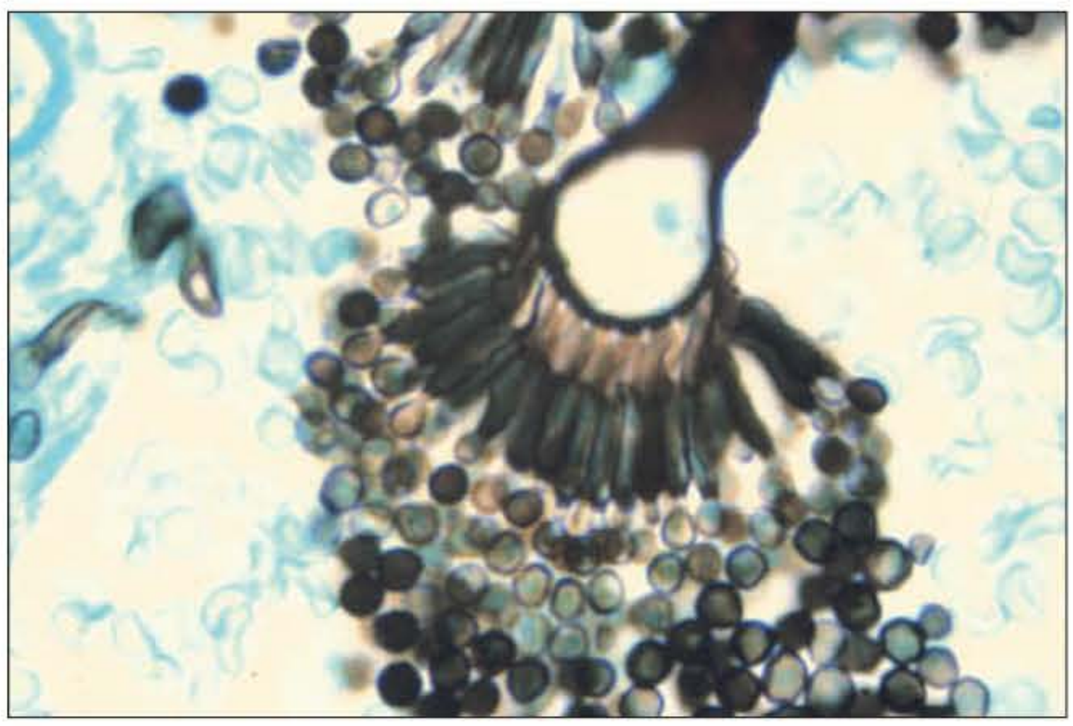


Figura 60.43 Uma cabeça frutificante de *Aspergillus* é demonstrada dentro de um micetoma pulmonar (bola de fungo). As fiálides e os conídios estão bem demonstrados. Embora as hifas de *Aspergillus* não sejam etiologicamente diagnósticas, a demonstração da cabeça frutificante documenta a presença desse gênero (hematoxilina e eosina; ×400).

pulmão pode ser confundida com granulomatose broncogênica, geralmente em pacientes que têm doença alérgica (Nagata, 1990).

Diagnóstico laboratorial

Os aspergilos são fungos saprófitas, mas nunca devem ser excluídos como contaminantes sem consulta ao médico que cuida do paciente. O isolamento de um local estéril ou o isolamento repetido de amostras respiratórias sugere significado clínico. As hifas podem ser demonstradas diretamente em amostras clínicas submetidas a preparações de impressão ou úmidas. O calcoflúor branco é útil para demonstrar o mofo em amostras. É importante obter tecido, líquido, raspados ou material de curetagem para exame. O tecido deve ser picado ou macerado e inoculado diretamente na superfície do meio de isolamento. Esses mofos crescem rapidamente, porém a maioria é inibida parcial ou completamente pela ciclo-heximida. As colônias de muitos desses mofos têm conídios abundantes. Para se evitar que a contaminação do funcionário e de outras culturas, as colônias devem ser manipuladas com cuidado em uma cabine de segurança biológica cujas superfícies devem ser desinfetadas com uma solução fungicida imediatamente depois de terem sido usadas. A manutenção dos mofos isolados em sacos plásticos enquanto a incubação prossegue também reduz a probabilidade de contaminação de outras culturas.

A identificação de espécies de *Aspergillus* é feita pelo estudo das estruturas reprodutivas e do aspecto macroscópico da cultura. É preciso dar muita atenção aos detalhes da cabeça dos conídios para a identificação da sobreposição (Klich, 2002). O *A. fumigatus* é um mofo comum isolado em laboratórios de micologia. O fungo cresce rapidamente, produzindo colônias com aspecto felpudo. O desenvolvimento de cabeças frutificantes confere uma aparência azul-esverdeada à colônia (Fig. 60.2). O exame da colônia com um microscópio de dissecção revela os conidióforos com suas vesículas expandidas como pequenos globos que se projetam acima do micélio vegetativo. O conidióforo é liso, relativamente curto (300–500 μm) e expandido em uma vesícula com formato de frasco. As fiálides desenvolvem-se em uma única fileira (unisseriadas) e, mais comumente, o fazem apenas nos terços superiores da vesícula, paralelas ao eixo do conidióforo (Fig. 60.8). Os conídios são enrugados (equinulados) e com formato redondo a ovalado.

O segundo patógeno mais importante do gênero *Aspergillus* é o *A. flavus*, cujas colônias crescem rapidamente e têm um aspecto aveludado amarelo a verde assim que as cabeças frutificantes se desenvolvem (Fig. 60.44). O conidióforo é longo (400 a 700 μm), terminando em uma vesícula que pode ser elíptica ou arredondada. Ocorre uma fileira única ou dupla (bisseriada) de fiálides sobre a vesícula inteira ou nos três quartos superiores (Fig. 60.45). Os conídios redondos a ovais surgem amarelo-esverdeados em massa e medem 3 a 4,5 μm.

Pode-se diferenciar o *A. terreus* de outras espécies pela produção de uma colônia cor de canela com características microscópicas que incluem conidióforos curtos (< 250 μm) e fiálides bisseriadas.

Embora o padrão ideal para o diagnóstico de aspergilose invasiva seja uma cultura positiva a partir de tecido estéril, com evidência histológica de invasão micelial, a necessidade de técnicas invasivas para obter-se a amostra, o tempo prolongado necessário para a cultura e a rapidez com que os aspergilos podem disseminar-se tornam o diagnóstico problemático. Foram desenvolvidos métodos não baseados em cultura para o diagnóstico de aspergilose (Wheat, 2003c). Recentemente, foi liberado pela FDA um ensaio sorológico (Platelia Aspergillus ELISA; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França com o uso de ELISA duplo-sanduíche para detecção de antigenemia ao galactomanano, visando-se ao diagnóstico rápido de aspergilose invasiva. A sensibilidade do teste variou de menos de 50 a 95%, e a especificidade de menos de 70 a 100%, sugerindo que não irá substituir a avaliação microbiológica e clínica cuidadosa (Herbrecht, 2002). As variáveis que afetam o desempenho desse ensaio incluem a terapia antimicrobiana (piperacilina-tazobactam e amoxicilina-clavulanato podem causar um resultado positivo falso) e a idade (resultados positivos falsos são mais comuns em crianças que em adultos) (Walsh, 2004a).

Também foram desenvolvidos métodos moleculares, não apenas para confirmação da cultura de espécies de *Aspergillus* (Henry, 2000; de Aguirre, 2004), mas também para a detecção direta do DNA fúngico em material clínico (Iwen, 2002). Os resultados mostraram-se promissores, mas é preciso ainda muito trabalho antes que esses ensaios estejam disponíveis no comércio.

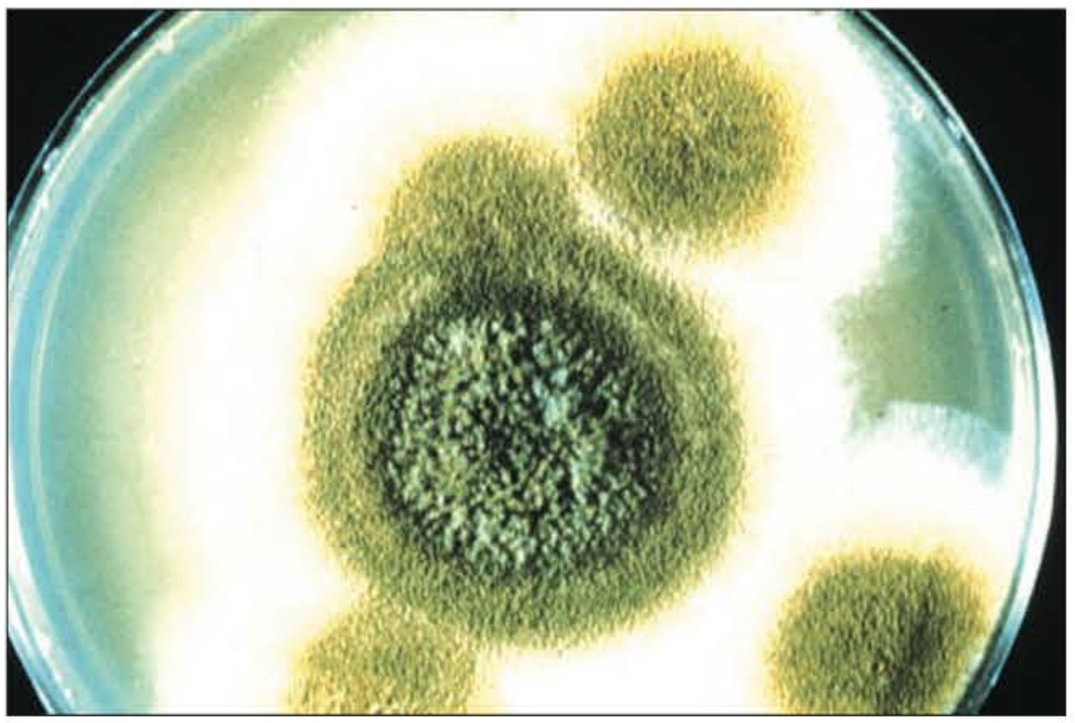


Figura 60.44 Colônias com áreas granulares produzidas por cabeças frutificantes de *Aspergillus flavus*. O desenvolvimento de coloração amarela ou verde dentro de colônias brancas é característico (ágar de Sabouraud com glicose).

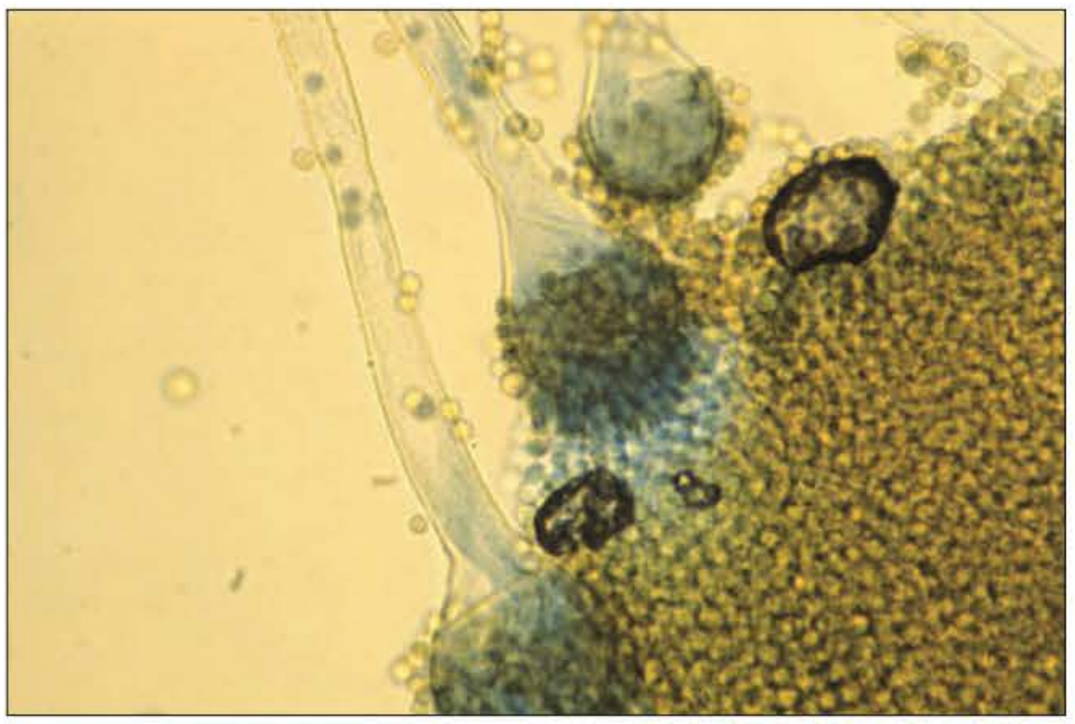


Figura 60.45 A cabeça frutificante de *Aspergillus flavus* é unisseriada e bisseriada. As fiálides estendem-se em torno da maior parte da vesícula, com um aspecto rugoso (espinhoso) do conidióforo presente (azul de lactofenol com algodão; × 400).

O gênero *Fusarium*

As espécies de *Fusarium* foram implicadas em inúmeras doenças infecciosas, inclusive ceratomicose (Thomas, 2003), feridas de queimaduras (Latenser, 2003) e doença invasiva em pacientes imunocomprometidos (Sampathkumar, 2001; Jensen, 2004; Lionakis, 2004; Nucci, 2004), sendo agora consideradas os segundos mofos patogênicos mais comuns causadores de doenças invasivas (Dignani, 2004). O quadro histopatológico é praticamente idêntico ao observado na aspergilose invasiva (angioinvasiva e aguda, com hifas segmentadas e ramificadas). No entanto, a fungemia com hemoculturas positivas é comum na fusariose disseminada, embora ocorra raramente na aspergilose (Lionakis, 2004).

As colônias de *Fusarium* desenvolvem-se rapidamente, produzindo um micélio aéreo felpudo, em geral cor-de-rosa, lavanda ou salmão. Podem ser vistos pigmentos difusíveis em ágar circundante. Fiálides simples ou ramificadas desenvolvem-se diretamente a partir das hifas, sem um conidióforo separado. Podem ser produzidos microconídios ovais curtos, mas a estrutura distintiva é um macroconídio em forma de canoa ou crescente, que pode ter um ou mais septos (Fig. 60.46). As espécies frequentemente implicadas em infecção humana incluem *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme*, porém o reconhecimento das espécies, embora importante com finalidades epidemiológicas, não tem impacto sobre as decisões terapêuticas. É difícil identificar espécies no laboratório de microbiologia, em geral

Figura 60.46 Conídios em forma de canoa de espécies de *Fusarium*. Os conídios são septados (azul de lactofenol com algodão; × 400).

Figura 60.47 Uma colônia em desenvolvimento de *Scedosporium apiospermum*, com a coloração acinzentada característica (ágar de Sabouraud com glicose).

sendo necessário um laboratório de referência com experiência no reconhecimento dos detalhes sutis das estruturas reprodutivas. Além disso, a tecnologia molecular que usa áreas de sequência dentro do DNA ribossômico do complexo gênico mostrou-se promissora para a identificação rápida e acurada das espécies de *Fusarium* (Hennequin, 1999; Iwen, 2002).

O gênero *Scedosporium*

Os dois membros do gênero associados a infecções sistêmicas são: *S. apiospermum* (a teleomorfa *Pseudallescheria boydii*, conhecida previamente como *Allescheria boydii* e *Petriellidium boydii*) e *Scedosporium* (*inflatum*) *prolificans* (Steinbach, 2003b). Esses fungos são mofos saprófitas onipresentes encontrados no solo e na vegetação caída. O *S. prolificans* é uma causa incomum de infecção disseminada (Grosbell, 1999); enquanto o *S. apiospermum*, embora associado mais frequentemente a infecções subcutâneas (micetomas), é uma causa mais comum de doença invasiva no paciente imunocomprometido (Nesky, 2000; Castiglioni, 2002; Nonaka, 2002; Nucci, 2003). O *P. boydii* é a fase sexuada desse patógeno, enquanto o *S. apiospermum* é a fase assexuada, imperfeita. O mofo cresce rapidamente no meio de isolamento, produzindo uma colônia felpuda que desenvolve uma cor castanho-acinzentada a cinza-escura ("cor de camundongo") após incubação por vários dias. A cultura escurece ainda mais se a incubação continuar (Fig. 60.47). Esse mofo pode crescer em meios que contenham até 8 mg/mL de ciclo-heximida. A fase assexuada caracteriza-se por aglomerados isolados ou pequenos de aneloconídios em um conidióforo reto ou ramificado que pode desenvolver-se na parte terminal ou lateral das hifas vegetativas. Os conídios são castanho-claros e ovais, com morfologia semelhante à de esperma (Fig. 60.48). Na fase sexuada, cleistotécios marrons (asco) contêm ascósporos (Fig. 60.13). Os cleistotécios, encontrados mais facilmente nas margens da colônia, desenvolvem-se melhor nos meios com deficiência nutricional, como ágar com maisena, ágar com suco V-8 ou ágar com batata (flocos de batata) e glicose. Em termos estritos, o isolado deve ser considerado *P. boydii*, se forem demonstrados cleistotécios, e *S. apiospermum*, se as únicas estruturas diagnósticas observadas forem conídios assexuados.

Outros fungos hialinos septados

Há uma longa lista de fungos hialinos que são saprófitas ambientais de baixa virulência e em geral não estão associados a doença clínica quando isolados no laboratório de micologia (Walsh, 2004b). Conforme dito antes, qualquer mofo pode ser patogênico nas condições favoráveis a isso. Na maioria dos casos, as defesas do hospedeiro estão comprometidas de alguma forma ou o fungo é introduzido no corpo por traumatismo ou manipulações médicas. O aumento do número de relatos de casos confirma que fungos saprófitas causam infecções de tecidos profundos e órgãos sistêmicos (Hilmarsdottir, 2000; Rodriguez-Villalobos, 2003; Schinabeck, 2003; Hall, 2004). A demonstração de hifas em tecidos é extremamente importante para documentar a patogenicidade desses

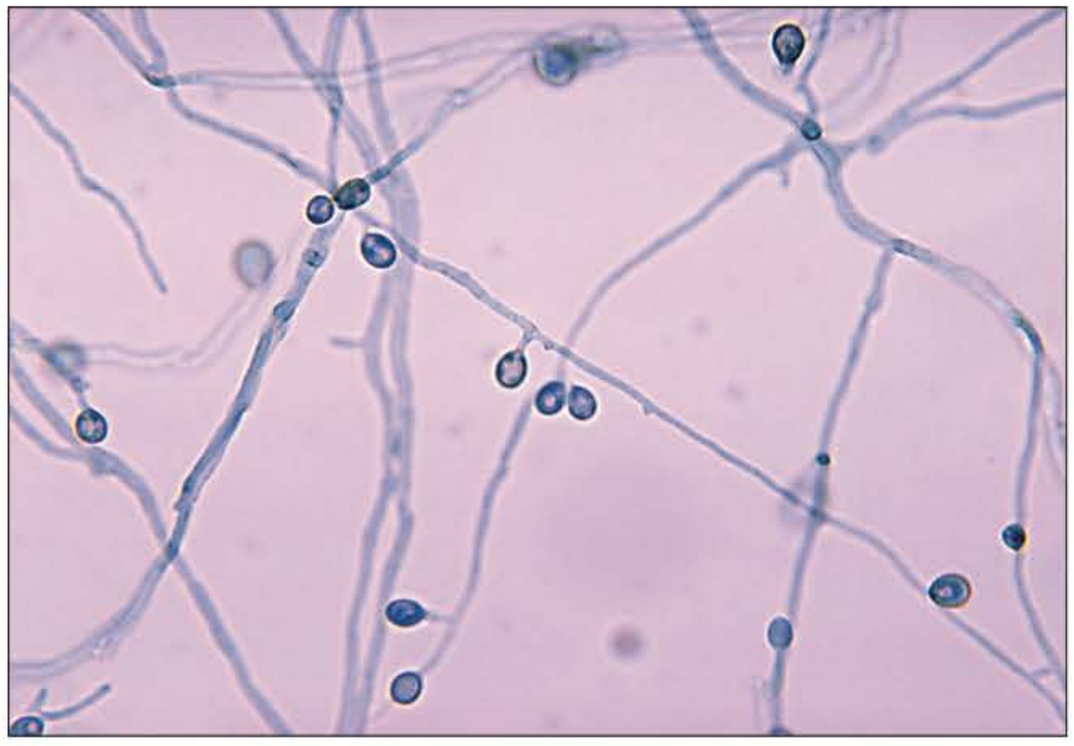


Figura 60.48 Os microconídios em forma de girino ou de espermatozoides de *Scedosporium apiospermum* justificam o nome desse organismo (azul de lactofenol com algodão; × 400).

saprófitas isolados, sendo necessária a cultura para o reconhecimento das espécies. Os métodos moleculares estão se tornando mais úteis para a identificação desses patógenos incomuns (Iwen, 2000).

Pneumonia por *Pneumocystis*

A posição taxonômica do *P.* (*carinii*) *jiroveci* sofreu alterações com o passar dos anos. Originalmente, ele foi descrito como um protozoário com as formas morfológicas identificadas como trofozoítos, cistos e esporozoítos. Tal hipótese continuou predominante até que Edman et al., mediante análise do DNA, relataram a semelhança desse organismo com os fungos (Edman, 1988). Mais recentemente, mostrou-se que ele tem sequências de DNA muito diferentes quando identificado a partir de hospedeiros mamíferos diferentes. Para resolver isso, em 1994, o Pneumocystis Working Group propôs o nome de *P. carinii* f. sp. *hominis* como uma forma especial do organismo causador de pneumonia (PCP) em humanos (Pneumocystis Working Group, 1994). Subsequentemente, em 2001, o International Workshop on Opportunistic Protists começou o processo para renomear a espécie como *P. jiroveci* (pronuncia-se "iee rou vét zee") (Frenkel, 1999; Stringer, 2002). Embora controvertido (Hughes, 2003), o nome passou a ter ampla aceitação como o do "micróbio que causa PCP em humanos". O acrônimo PCP agora refere-se à pneumonia por *Pneumocystis*.

Fatores de risco

O *Pneumocystis jiroveci* (*Pneumocystis* humano) é um patógeno capaz de causar um amplo espectro de apresentações clínicas. Foi reconhecido pela primeira vez em surtos de doença pulmonar (denominada "pneumonia intersticial de células plasmáticas") entre lactentes

desnutridos no Leste Europeu durante e após a II Guerra Mundial (Cushion, 2003). Mais recentemente, tornou-se uma causa importante de pneumonia potencialmente fatal em 60 a 80% dos adultos infectados pelo HIV na América e na Europa ocidental e, subsequentemente, uma das doenças que definem a AIDS (Centers for Disease Control and Prevention, 1999b). Embora considerado um problema sério nessa população de pacientes, a incidência da doença em pessoas com AIDS caiu para menos de 10% dos pacientes, graças à disponibilidade da terapia antirretroviral altamente ativa, ao maior uso da profilaxia anti-PCP e a uma conscientização maior a respeito da infecção (Wolff, 2003). A doença também deve ser considerada em qualquer paciente imunossuprimido que apresente febre, sintomas respiratórios ou infiltrado à radiografia de tórax (Dei-Cas, 2000). Inicialmente, acreditava-se que a doença clínica devia-se à reativação de infecção infantil latente em casos de imunossupressão, mas estudos mostraram agora que o organismo pode ser transmitido entre humanos por via aerógena (Nevez, 2003; Totet, 2003). Em indivíduos com comprometimento do sistema imune (p. ex., infecção pelo HIV, esquemas quimioterápicos, transplante de órgão), pode ocorrer uma pneumonia potencialmente grave e fatal. A doença disseminada também pode ocorrer via espalhamento linfático ou hematogênico, porém isso é incomum. Embora rara, a infecção foi documentada em pacientes sem uma doença predisponente (Al Soub, 2004).

Doenças clínicas

A pneumonia é a manifestação mais comum de infecção pelo *P. jiroveci* (Wilkin, 1999). O início pode ser agudo ou insidioso. Adultos sintomáticos costumam apresentar-se com dispneia, tosse improdutiva, impossibilidade de respirar profundamente e sudorese noturna. O aspecto radiológico clássico da PCP é um sombreado fino, bilateral, intersticial e peri-hilar, mas pode haver outros quadros radiográficos (Barry, 2001). Em geral, os infiltrados radiográficos são muito mais extensos do que sugeridos pela intensidade dos sintomas. A infecção concomitante com outros agentes, em particular citomegalovírus ou *C. neoformans*, é comum. A infecção costuma ser fatal se não for tratada. Os locais extrapulmonares mais comuns de infecção são a tireoide, o fígado, a medula óssea, linfonodos e o baço (Wazir, 2004).

Patologia da pneumonia por Pneumocystis

O diagnóstico definitivo de PCP requer a demonstração de cistos ou trofozoítos em amostras clínicas (Fig. 60.49). Em termos históricos, isso exigia uma biópsia pulmonar com tórax aberto, por causa do baixo número de organismos presentes em outras amostras respiratórias e da falta de testes diagnósticos sensíveis. Embora a biópsia pulmonar aberta ainda seja considerada um dos exames mais sensíveis para detectar essa doença, outras amostras, como escarro induzido e lavado broncoalveolar, provaram ser confiáveis para o diagnóstico (Rodriguez, 2004). As descobertas histopatológicas clássicas de PCP em cortes de pulmão corados com H&E são o alargamento dos septos alveolares, com infiltrado de células mononucleares, e um exsudato espumoso dentro dos espaços alveolares (às vezes referido como exsudato em favo de mel) (Woods, 2003). Tal exsudato consiste em cistos e trofozoítos agregados. A forma encistada de *P. jiroveci* pode ser ilustrada no tecido usando-se o corante metenamima de prata. Os cistos, que medem 5 a 6 μm de diâmetro, coram-se de marrom a preto e têm uma morfologia com formato característico de taça ou crescente. Os cistos de Pneumocystis não formam brotos, aspecto que pode ser usado para distingui-lo de outros fungos encontrados em tecidos.

Diagnóstico laboratorial

O *P. jiroveci* tem sido cultivado em culturas de células, mas não se conseguiu a manutenção de subculturas seriadas. O padrão para o diagnóstico é a coloração do líquido do lavado broncoalveolar com um anticorpo monoclonal imunofluorescente direcionado contra os epítopos de superfície para cistos e trofozoítos de *Pneumocystis* (Cushion, 2003). O ciclo biológico do *P. jiroveci* envolve o desenvolvimento de esporozoítos dentro de um cisto, após o que os esporozoítos são liberados. Em pacientes com infecção pelo HIV, são produzidos números suficientes de organismos, de modo que a análise do escarro induzido com solução fisiológica e obtido por um terapeuta respiratório experiente pode levar ao diagnóstico. Entretanto, a experiência com escarro variou em diferentes centros, sendo a produção muito baixa em pacientes com outras doenças subjacentes que não pelo HIV. O advento dos anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína para detectar *P. jiroveci* em amostras clínicas provou ser um método específico e sensível de identificação (Fig. 60.50) (Kovacs, 2001). A técnica de imunofluorescência foi mais sensível em colorações histoquímicas em alguns relatos, mas sem dúvida a habilidade e os cuidados dos observadores desempenham um papel importante na sensibilidade comparativa das técnicas (Cushion, 2003). É preciso notar que os cistos de *P. jiroveci* ocasionalmente podem ser encontrados em preparações coradas pelo Gram, embora essa técnica não seja muito sensível para detectá-los.

Recentemente, foram avaliados ensaios com a PCR mas estes continuam sendo predominantemente recursos de pesquisa (Cushion, 2003), úteis especialmente para testar amostras com baixa carga de organismos, como escarro induzido, em particular como alternativa para pacientes em que a broncoscopia seja contraindicada. Uma variedade de alvos genéticos, como os espaçadores internos transcritos do complexo RNAr, o RNAr mitocondrial e os principais genes das glicoproteínas de superfície, provaram ser úteis (Iwen, 2002).

Prototecose

A prototecose é uma infecção causada por algas aclorófilas do gênero *Prototheca* (Thiele, 2002; Kantrow, 2003; Leimann, 2004). A maio-

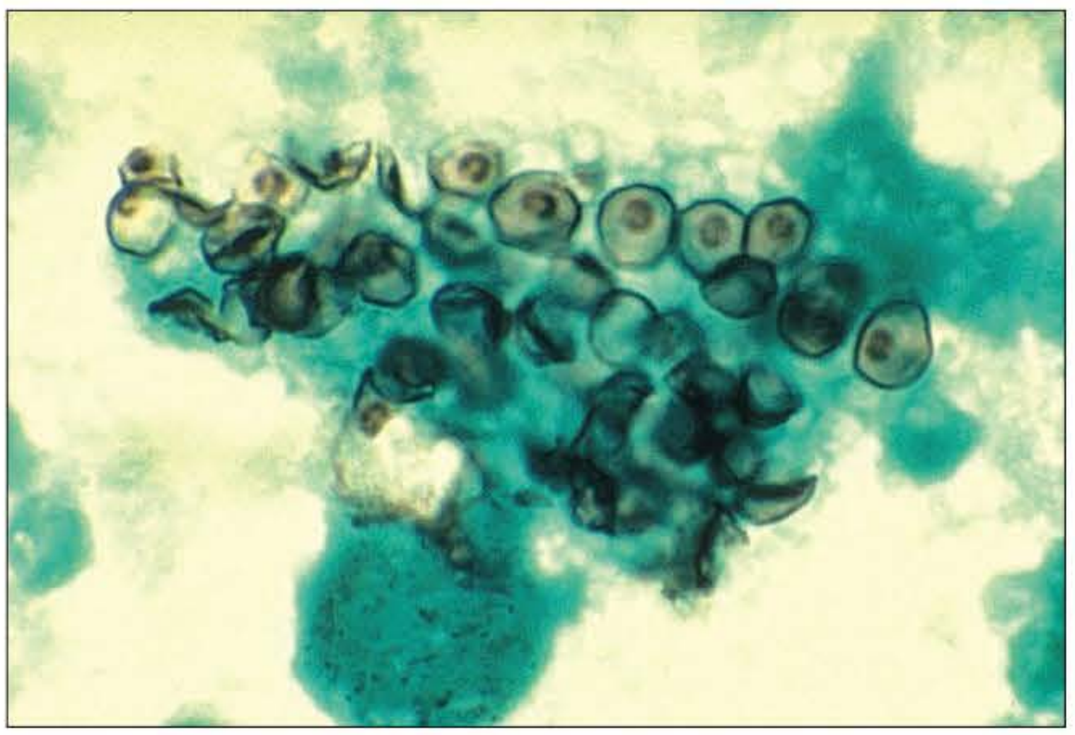


Figura 60.49 Cistos de *Pneumocystis jiroveci* em um esfregaço de lavado broncoalveolar (metenamina-prata, × 400) (cortesia do Dr. Russell K. Brynes, CDC Public Health Image Library).

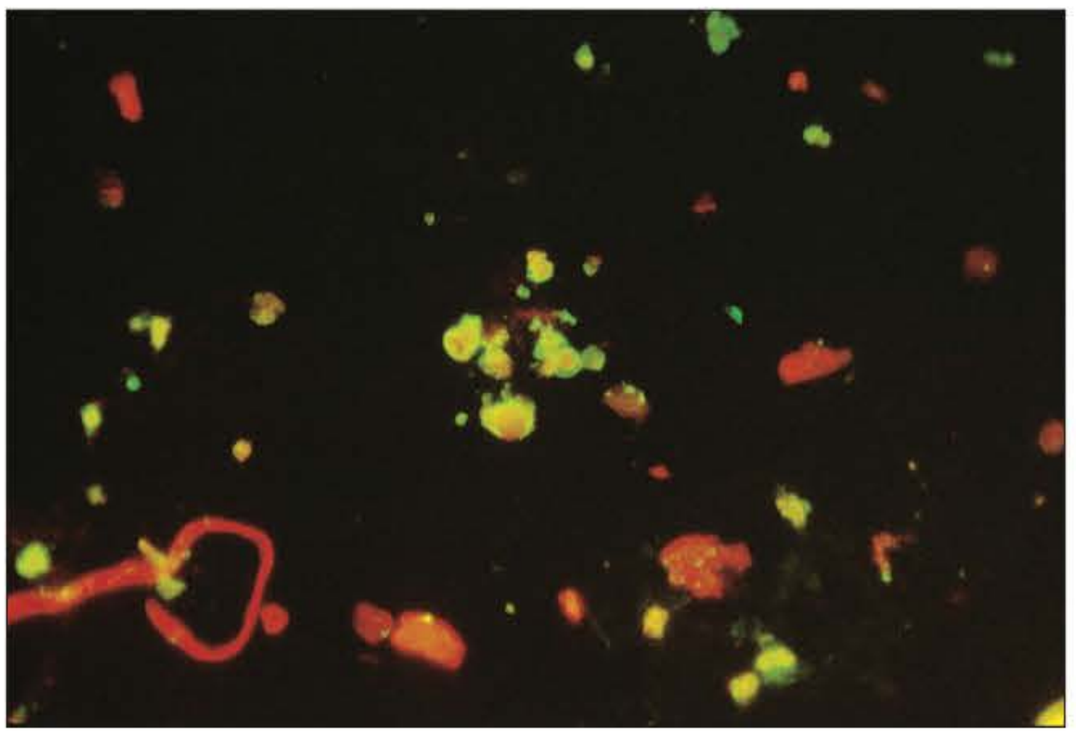


Figura 60.50 Microscopia de imunofluorescência mostrando a presença de *Pneumocystis jiroveci* (× 560) (cortesia de Lois Norman, CDC Public Health Image Library).

ria das infecções humanas é causada por *Prototheca wickerhamii*, mas casos raros também foram causados por *Prototheca zopfii* (Lass-Florl, 2004). Embora essas espécies sejam classificadas como algas, estão incluídas neste capítulo devido à semelhança das infecções que acarretam com as doenças fúngicas. As prototecas são encontradas em água doce e do mar, sendo provável que tenham acesso ao corpo através de ferimentos superficiais. Alguns pacientes são imunocompetentes, mas doenças subjacentes sérias, como o diabetes melito, ou terapias imunossupressoras em geral predispõem os pacientes à infecção por esses patógenos. Outros pacientes receberam injeções de corticosteroides no local da infecção ou tiveram infecção musculoesquelética, em particular com envolvimento dos tendões. As infecções comumente atingem a pele e o tecido subcutâneo, com acometimento subsequente dos tendões subjacentes.

As algas crescem prontamente em meios para isolamento de fungos que não contenham ciclo-heximida, e as colônias lembram as de espécies de *Candida* (Fig. 60.51). As células das algas têm um aspecto característico, em que múltiplas células-filhas (esporangiosporos) desenvolvem-se dentro da célula-mãe (esporângio), lembrando uma esférula (Chandler, 1978). Essas estruturas também podem ser demonstradas em cortes histológicos, nos quais precisam ser diferenciadas dos fungos dimórficos (Fig. 60.52). Podem ser vistas em preparações com H&E e bem coradas pelos métodos do ácido periódico de Schiff ou da metenamina de prata. As espécies do gênero *Prototheca* estão incluídas nos dados de sistemas comerciais de identificação, como o API 20C (BioMérieux, Hazelwood, MO) e o Vitek (BioMérieux, Hazelwood, MO).

Figura 60.51 As colônias de *Prototheca wickerhamii* são semelhantes a leveduras (ágar de Sabouraud com glicose).

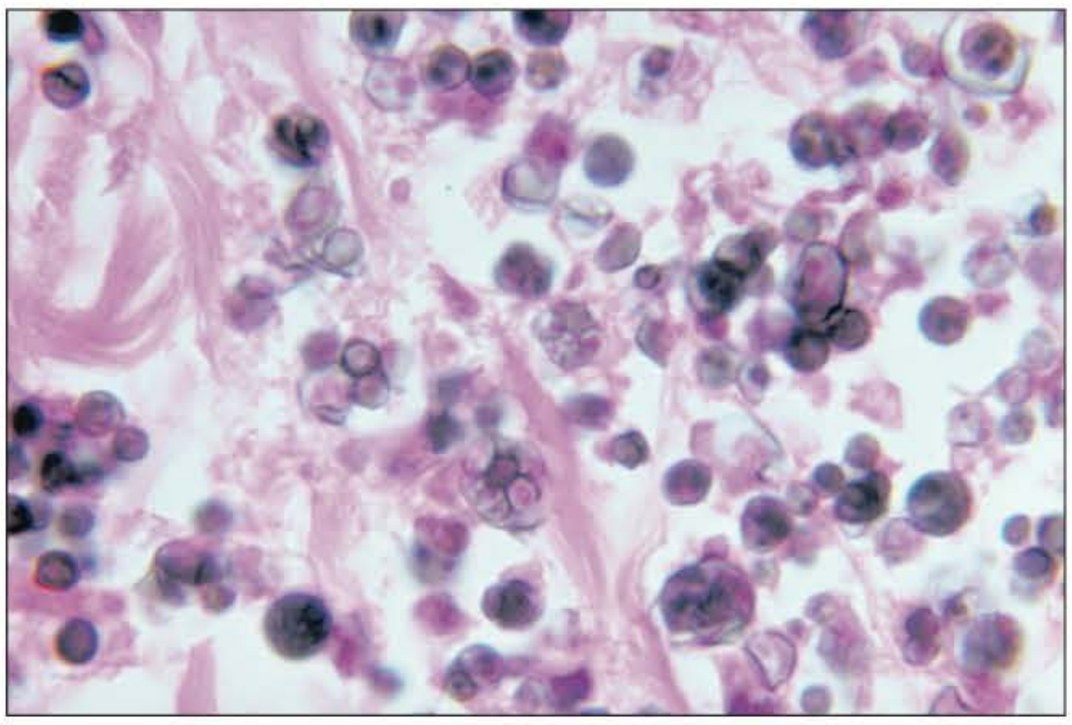


Figura 60.52 Alterações histopatológicas na prototecose da pele e da mucosa do nariz devido a *Prototheca wickerhamii*. A septação das células de algas leva a múltiplos corpúsculos intracelulares e estruturas conhecidas como mórulas (cortesia do Dr. William Kaplan, CDC Public Health Image Library).

Referências bibliográficas

Adams BB: Dermatologic disorders of the athlete. Sports Med 2002; 32:309–321.

Ahmed AO, van Leeuwen W, Fahal A, et al: Mycetoma caused by *Madurella mycetomatis*: a neglected infectious burden. Lancet Infect Dis 2004; 4:566–574.

Ajello L, George L, Steigbigel R: A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. Mycologia 1974; 66:190–198.

Akpan A, Morgan R: Oral candidiasis. Postgrad Med J 2002; 78:455–459.

Allen AM, Taplin D: Epidemic *Trichophyton mentagrophytes* infections in servicemen. Source of infection, role of environment, host factors, and susceptibility. JAMA 1973; 226:864.

Al Soub H, Taha RY, El Deeb Y, et al: *Pneumocystis carinii* pneumonia in a patient without a predisposing illness: case report and review. Scand J Infect Dis 2004; 36:618–621.

Alsuwaida K: Primary cutaneous mucormycosis complicating the use of adhesive tape to secure the endotracheal tube. Can J Anaesth 2002; 49:880–882.

Aly R, Hay RJ, Del Palacio A, Galimberti R: Epidemiology of tinea capitis. Med Mycol 2000; 38 (Suppl 1):183–188.

Anatoliotaki M, Mantadakis E, Galanakis E, Samonis G: *Rhodotorula* species fungemia: a threat to the immunocompromised host. Clin Lab 2003; 49:49–55.

Arikan S, Uzun O, Cetinkaya Y, et al: Primary cutaneous aspergillosis in human immunodeficiency virus-infected patients: two cases and review. Clin Infect Dis 1998; 27:641–643.

Artis WM, Fountain JA, Delcher HK, Jones HE: A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: transferrin and iron availability. Diabetes 1982; 31:1109–1114.

Baddley JW, Dismukes WE: Chromoblastomycosis. *In* Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (eds): Clinical Mycology. New York, Oxford University Press, 2003a, pp 399–404.

Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA: Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. J Clin Microbiol 2003b; 41:5525–5529.

Barry SM, Johnson MA: *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. HIV Med 2001; 2:123–132.

Bastola DR, Otu HH, Doukas SE, et al: Utilization of the relative complexity measure to construct a phylogenetic tree for fungi. Mycol Res 2004; 108:117–125.

Bennett JW, Klich M: Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003; 16:497–516.

Bernal S, Martin Mazuelos E, Chavez M, et al: Evaluation of the new API *Candida* system for identification of the most clinically important yeast species. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32:217–221.

Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, et al: Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. Clin Infect Dis 2001; 33:177–186.

Bodey GP, Vartivarian: Aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8:413–437.

Bonacini M: Medical management of benign esophageal disease in patients with human immunodeficiency virus infection. Dig Liver Dis 2001; 33:294–300.

Borst A, Theelen B, Reinders E, et al: Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. J Clin Microbiol 2003; 41:1357–1362.

Bradsher RW: Clinical features of blastomycosis. Semin Respir Infect 1997; 12:229–234.

Bradsher RW, Chapman SW, Pappas PG: Blastomycosis. Infect Dis Clin North Am 2003; 17:21–40.

Brandt ME, Warnock DW: Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. J Chemother 2003; 15 Suppl 2:36–47.

Broussard BN, Aggarwal A, Lacey SR, et al: Mushroom poisoning: from diarrhea to liver transplantation. Am J Gastroenterol 2001; 96:3195–3198.

Bustamante B, Campos PE: Endemic sporotrichosis. Curr Opin Infect Dis 2001; 14:145–149.

Bustamante B, Campos PE: Eumycetoma. *In* Dismukes WE, Pappas P, Sobel JD (eds): Clinical Mycology. New York, Oxford University Press, 2003, pp 390–398.

Caddell JR: Differentiating the dermatophytes. Clin Lab Sci 2002;15:13–15.

Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G: A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia 1996; 136:21–23.

Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, et al: *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2002; 81:333–348.

Castro C, Serrano MC, Flores B, et al: Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with a modified CLSI M38-A method to determine the activity of voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. J Clin Microbiol 2004; 42:4358–4360.

Centers for Disease Control and Prevention: Epidemiologic notes and reports multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers, 1988. Morb Mortal Wkly Rep 1988; 37:652–653.

Centers for Disease Control and Prevention: Coccidioidomycosis: Arizona, 1990–1995. Morb Mortal Wkly Rep 1996; 45:1069–1073.

Centers for Disease Control and Prevention: Blastomycosis acquired occupationally during prairie dog relocation – Colorado, 1998. Morb Mortal Wkly Rep 1999a; 48:98–100.

Centers for Disease Control and Prevention: CDC surveillance summaries, surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992–1997. Morb Mortal Wkly Rep 1999b; 48:1–22.

Centers for Disease Control and Prevention: Outbreak of acute respiratory febrile illness among college students – Acapulco, Mexico, March 2001. Morb Mortal Wkly Rep 2001a; 50:261.

Centers for Disease Control and Prevention: Coccidioidomycosis among persons attending the world championship of model airplane flying: Kern County, California, October 2001. Morb Mortal Wkly Rep 2001b; 50:1106–1107.

Centers for Disease Control and Prevention: Laboratory security and emergency response guide for laboratories working with select agents. Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51:1–6.

Centers for Disease Control and Prevention: Increase in coccidioidomycosis – Arizona, 1998–2001. Morb Mortal Wkly Rep 2003; 52:109–112.

Chandler FW, Kaplan W: Pathologic Diagnosis of Fungal Infections. Chicago, IL, ASCP Press, 1987a.

Este atlas fornece uma base prática para o diagnóstico patológico de doenças causadas por fungos, actinomicetos e algas.

Chandler FW, Kaplan W, Callaway CS: Differentiation between *Prototheca* and morphologically similar green algae in tissue. Arch Pathol Lab Med 1978; 102:353–356.

Chandler FW, Watts JC: Zygomycosis. *In* Chandler FW, Watts JC (eds): Pathologic Diagnosis of Fungal Infections, vol 1. Chicago, IL, American Society of Clinical Pathologists, 1987b, pp 85–96.

Chariyalertsak S, Vanittanakom P, Nelson KE, et al: *Rhizomys sumatrensis* and *Cannomys badius*, new natural animal hosts of *Penicillium marneffei*. J Med Vet Mycol 1996; 34:105–110.

Chastain MA, Reed RJ, Pankey GA: Deep dermatophytosis: report of 2 cases and review of the literature. Cutis 2001; 67:457–462.

Chen SC, Halliday CL, Meyer W: A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. Med Mycol 2002; 40:333–357.

Chiller TM, Galgiani JN, Stevens DA: Coccidioidomycosis. Infect Dis Clin North Am 2003; 17:41–57.

Chuck SL, Sande MA: Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1989; 321:794.

Clancy CJ, Wingard JR, Hong Nguyen M: Subcutaneous phaeohyphomycosis in transplant recipients: review of the literature and demonstration of in vitro synergy between antifungal agents. Med Mycol 2000; 38:169–175.

Clark R, Powers R, White R, et al: Nosocomial infection in the NICU: a medical complication or unavoidable problem? J Perinatol 2004; 24:382–388.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard (M38-A). Wayne, PA, CLSI, 2002a.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard (M27-A2) (ed 2nd). Wayne, PA, CLSI, 2002b.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast; Approved Guideline (M35-A). Wayne, PA, CLSI, 2002c.

Cockerill FRI, Torgerson CA, Reed GS, et al: Clinical comparison of Difco ESP, Wampole Isolator, and Becton Dickinson Septi-Chek aerobic blood culturing systems. J Clin Microbiol 1996; 34:20–24.

Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR, et al: A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. Am J Epidemiol 1992; 136:475–487.

Collazos J: Opportunistic infections of the CNS in patients with AIDS: diagnosis and management. CNS Drugs 2003; 17:869–887.

Cooper CR, Jr., Haycocks NG: *Penicillium marneffei*: an insurgent species among the penicillia. J Eukaryot Microbiol 2000; 47:24–28.

Cox RA, Magee DM: Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. Clin Microbiol Rev 2004; 17:804–839.

Crist AE, Jr., Johnson LM, Burke PJ: Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. J Clin Microbiol 1996; 34:2408–2410.

Crum NF, Lederman ER, Stafford CM, et al: Coccidioidomycosis: a descriptive survey of a reemerging disease. Clinical characteristics and current controversies. Medicine (Baltimore) 2004; 83:149–175.

Cushion MT: Pneumocystis. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorganesen JH, et al. (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003, vol 2, pp 1712–1725.

De Aguirre L, Hurst SF, Choi JS, et al: Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-enzyme immunoassay. J Clin Microbiol, 2004; 42:3495–350.

De Araujo T, Marques AC, Kerdel F: Sporotrichosis. Int J Dermatol 2001; 40:737–742.

DeGroote MA, Bjerke R, Smith H, Rhodes III LC: Expanding epidemiology of blastomycosis: clinical features and investigation of 2 cases in Colorado. Clin Infect Dis 2000; 30:582–584.

De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ: Atlas of Clinical Fungi. Utrecht, Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

Dei-Cas E: *Pneumocystis* infections: the iceberg? Med Mycol 2000; 38 (Suppl 1):23–32.

Denning DW: Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998a; 26:781–803.

Denning DW: Aspergillosis in 'nonimmunocompromised' critically ill patients. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170:580–581.

Denning DW, Marinus A, Cohen J, et al: An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. J Infect 1998b; 37:173–180.

Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H: Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. Clin Infect Dis 2003; 37 (Suppl):S265–S280.

Department of Health and Human Services: Histoplasmosis: protecting workers at risk. Washington, DC, CDC, 1997.

Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (ed 4th). Washington, DC, US Government Printing Office, 1999.

Department of Health and Human Services: Possession, use, and transfer of select agents and toxins. 42 CFR, Part 73. Washington, DC, Federal Register, 240:76886–76905, 2002a.

Department of Health and Human Services: NIH Guidelines for research involving recombinant DNA Molecules. Washington, DC, Federal Register, 66FR 57970:Appendix B, 2002b.

De Repentigny L: Serodiagnosis of candidiasis, aspergillosis, and cryptococcosis. Clin Infect Dis 1992; 14 (Suppl 1):S11–S22.

Deresinski S: *Coccidioides immitis* as a potential bioweapon. Semin Respir Infect 2003; 18:216–219.

Dignani MC, Anaissie E: Human fusariosis. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (Suppl 1):67–75.

Dooley DP, Beckius ML, Jeffrey BS: Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek yeast biochemical card. J Clin Microbiol 1994; 32:2889–2892.

Duong TA: Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. Clin Infect Dis 1996; 23:125–130.

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al: Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 1988; 334:519–522.

Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ: Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. Oral Microbiol Immunol 2003; 18:379–388.

Ellis M: Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. Mol Immunol 2002; 38:947–957.

Ergin F, Arslan H, Azap A, et al: Invasive aspergillosis in solid-organ transplantation: report of eight cases and review of the literature. Transpl Int 2003; 16:280–286.

Espinel-Ingroff A: Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). J Clin Microbiol 2003; 41:403–409.

Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, et al: Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the CLSI M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. J Clin Microbiol 2004; 42:718–721.

Espinel-Ingroff A, Rezusta A: E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with CLSI broth microdilution method. J Clin Microbiol 2002; 40:2101–2107.

Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, et al: Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. J Clin Microbiol 1998; 36:883–886.

Etzel RA: Mycotoxins. JAMA 2002; 287:425–427.

Eucker J, Sezer O, Graf B, Possinger K: Mucormycoses. Mycoses 2001; 44:253–260.

Fenn JP, Segal H, Barland B, et al: Comparison of updated Vitek yeast biochemical card and API 20C yeast identification systems. J Clin Microbiol 1994; 32:1184–1187.

Fierer J, Kirkland T: Questioning CDC's 'Select Agent' criteria. Science 2002; 295:43.

Filler SG, Kullberg BJ: Deep-seated candidal infections. *In* Calderone RA (ed): *Candida* and Candidiasis. Washington, DC, ASM Press, 2002, pp 341–348.

Fisher MC, Koenig G, White TJ, Taylor JW: Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia 2002; 94:73–84.

Fishman JA: Overview: fungal infections in the transplant patient. Transpl Infect Dis 2002; 4 (Suppl 3):3–11.

Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ: Emerging and less common fungal pathogens. Infect Dis Clin North Am 2002; 16:915–933.

Freifeld AG, Iwen PC: Zygomycosis. Sem Resp Care Med 2004; 25:221–231.

Frenkel JK: *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease: a critical historical overview (with a Latin redescription of *Pneumocystis jiroveci* of humans in conformance with the International Code of Botanical Nomenclature). J. Eucaryot Microbiol 1999; 46:89S–92S.

Graser Y, Kuijpers AF, El Fari M, et al: Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. Med Mycol 2000a; 38:143–153.

Graser Y, Kuijpers AF, Presber W, deHoog GS: Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. J Clin Microbiol 2000b; 38:3329–3336.

Grosbell IB, Morris ML, Gallo JH, et al: Clinical, pathologic and epidemiologic features of infection with *Scedosporium prolificans*: four cases and review. Clin Microbiol Infect 1999; 5:672–686.

Guarro J, GeneJ, Stchigel AM: Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev 1999; 12:454–500.

Uma revisão atualizada de nosso entendimento atual a respeito da sistemática dos fungos patogênicos e oportunistas.

Gueho E, Leclerc MC, de Hoog GS, Dupont B: Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. Mycoses 1997; 40:69–81.

Guiver M, Levi K, Oppenheim BA: Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. J Clin Pathol 2001; 54:362–366.

Gupta AK, Ryder JE, Summerbell RC: Onychomycosis: classification and diagnosis. J Drugs Dermatol 2004; 3:51–56.

Gupta AK, Summerbell RC: Tinea capitis. Med Mycol 2000; 38:255–287.

Hageage GJ, Harrington B: Use of calcofluor white in clinical mycology. Laboratory Medicine 1984; 15:109.

Hainer BL: Dermatophyte infections. Am Fam Physician 2003; 67:101–108.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al: Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol 2004; 42:1519–1527.

Hall VC, Goyal S, Davis MD, Walsh JS: Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus:* report of three cases and review of the literature. Int J Dermatol 2004; 43:648–653.

Hamilton AJ: Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffei; current status and future trends. Med Mycol 1998; 36:351–664.

Hawkins JL, Baddour LM: *Candida lusitaniae* infections in the era of fluconazole availability. Clin Infect Dis 2003; 36:14–18.

Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV: In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. Diagn Mol Pathol 2001; 10:15–23.

Hennequin C, Abachin E, Symoens F, et al: Identification of *Fusarium* species involved in human infection by 28S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 1999; 37:3586–3589.

Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH: Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol 2000; 38:1510–1515.

Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al: *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. J Clin Oncol 2002; 20:1898–1906.

Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Letscher-Bru V, Canuet M: Invasive pulmonary aspergillosis. Pulmon Fungal Infect 2004; 25:191–202.

Hilmarsdottir I, Thorsteinsson SB, Asmundsson P, et al: Cutaneous infection caused by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant patient: treatment with voriconazole. Scand J Infect Dis 2000; 32:331–332.

Holzheimer RG, Dralle H: Management of mycoses in surgical patients – review of the literature. Eur J Med Res 2002; 7:200–226.

Howard RM, Frieden IJ: Dermatophyte infections in children. Adv Pediatr Infect Dis 1999; 14:73–107.

Hughes WT: *Pneumocystis carinii* vs. *Pneumocystis jiroveci*: another misnomer (response to Stringer *et al.*). Emerg Infect Dis 2003; 9:276–277.

Iwen PC: Molecular detection and typing of fungal pathogens. Clin Lab Med 2003; 23:781–799.

Artigo que fornece uma visão global da base dos ensaios moleculares em micologia, usados na pesquisa clínica para fins diagnósticos e epidemiológicos.

Iwen PC, Davis JC, Reed EC, et al: Airborne fungal spore monitoring in a protective environment during hospital construction, and correlation with an outbreak of invasive aspergillosis. Infect Control Hosp Epidemiol 1994; 15:303–306.

Iwen PC, Freifeld AG, Bruening TA, Hinrichs SH: Use of a panfungal PCR assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system. J Clin Microbiol 2004; 42:2292–2293.

Iwen PC, Freifeld AG, Sigler L, et al: Molecular identification of *Rhizomucor pusillus* as a cause of sinus-orbital zygomycosis in a patient with acute myelogenous leukemia. J Clin Microbiol 2005; 43:5819–5821.

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME: Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002; 40:87–109.

Iwen PC, Reed EC, Armitage JO, et al: Nosocomial invasive aspergillosis in lymphoma patients treated with bone marrow or peripheral stem cell transplants. J Clin Microbiol 1993; 14:131–139.

Iwen PC, Rupp ME, Bishop MR, et al: Disseminated aspergillosis caused by *Aspergillus ustus* in a patient following allogeneic peripheral stem cell transplantation. J Clin Microbiol 1998b; 36:3713–3717.

Iwen PC, Rupp ME, Hinrichs SH: Invasive mold sinusitis: 17 cases in immunocompromised patients and review of the literature. Clin Infect Dis 1997; 24:1178–1184.

Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, et al: Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. Clin Infect Dis 1998a; 26:1092–1097.

Iwen PC, Sigler L, Tarantolo S, et al: Pulmonary infection caused by *Gymnascella hyalinospora* in a patient with acute myelogenous leukemia. J Clin Microbiol 2000; 38:375–381.

Jensen TG, Gahrn-Hansen B, Arendrup M, Bruun B: *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect 2004; 10:499–501.

Judson MA: Noninvasive *Aspergillus* pulmonary disease. Semin Respir Critical Care Med 2004; 25:203–219.

Kac G: Molecular approaches to the study of dermatophytes. Med Mycol 2000; 38:329–336.

Kantrow SM, Boyd AS: Protothecosis. Dermatol Clin 2003; 21:249–255.

Kauffman CA, Hajjeh R, Chapman SW, Group MS: Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. Clin Infect Dis 2000; 30:684–687.

Kirkland T, Fierer J: Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. Emerg Infect Dis 1996; 2:192–199.

Kirkpatrick CH: Chronic mucocutaneous candidiasis. Pediatr Infect Dis J 2001; 20:197–206.

Klein BS, Vergeront JM, Weeks RJ, et al: Isolation of *Blastomyces dermatitidis* in soil associated with a large outbreak of blastomycosis in Wisconsin. N Engl J Med 1986; 314:529–534.

Klich MA: Identification of Common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

Kohl TD, Lisney M: Tinea gladiatorum: wrestling's emerging foe. Sports Med 2000; 29:439–447.

Kojic EM, Darouiche RO: *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004; 17:255–267.

Kontoyiannis DP, Bodey GP: Invasive aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:161–172.

Kovacs JA, Gill VG, Meshnick S, Masur H: New insights into transmission, diagnosis and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA 2001; 286:2450–2460.

Kuhn DM, Ghannoum MA: Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. Clin Microbiol Rev 2003; 16:144–172.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE: Medical Mycology. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1992.

Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, et al: Cryptococcosis: clinical and biological aspects. Med Mycol 2000; 38 (Suppl 1):205–213.

Lass-Florl C, Fille M, Gunsilius E, et al: Disseminated infection with *Prototheca zopfii* after unrelated stem cell transplantation for leukemia. J Clin Microbiol 2004; 42:4907–4908.

Latenser BA: *Fusarium* infections in burn patients: a case report and review of the literature. J Burn Care Rehabil 2003; 24:285–288.

Lazcano O, Speights VO, Jr, Strickler JG, et al: Combined histochemical stains in the differential diagnosis of *Cryptococcus neoformans.* Mod Pathol 1993; 6:80–84.

Leake JA, Mosley DG, England B, et al: Risk factors for acute symptomatic coccidioidomycosis among elderly persons in Arizona, 1996–1997. J Infect Dis 2000; 181:1435–1440.

Leimann BC, Monteiro PC, Lazera M, et al: Protothecosis. Med Mycol 2004; 42:95–106.

Lemos LB, Baliga M, Guo M: Blastomycosis: the great pretender can also be an opportunist. Initial clinical diagnosis and underlying diseases in 123 patients. Ann Diagn Pathol 2002; 6:194–203.

Lionakis MS, Kontoyiannis DP: *Fusarium* infections in critically ill patients. Pulmon Fungal Infect 2004; 25:159–170.

Liu PY: Cryptococcal osteomyelitis: case report and review. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30:33–35.

Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al: Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. J Clin Microbiol 2000; 38:586–590.

Ma JS, Chen PY, Chen CH, Chi CS: Neonatal fungemia caused by *Hansenula anomala*: a case report. J Microbiol Immunol Infect, 2000; 33:267–27.

McGinnis MR: Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York, Academic Press, 1980.

McGinnis MR, Padhye AA: Fungi causing eumycotic mycetoma. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorganesen JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC, ASM Press, 2003, pp 1148–1856.

McGinnis MR, Sigler L: Some medically important fungi and their common synonyms and names of uncertain application. Clin Infect Dis 1999; 29:728–730.

McKinsey DS: Histoplasmosis in AIDS: advances in management. AIDS Patient Care STDs 1998; 12:775–781.

McLintock LA, Jones BL: Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. Br J Haematol 2004; 126:289–297.

McNeil MM, Brown JM: The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev 1994; 7:357–417.

McPartland JM, Vilgalys RJ, Cubeta MA: Mushroom poisoning. Am Fam Physician 1997; 55:1797–1812.

Makimura K: Species identification system for dermatophytes based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2001; 42:61–67.

Mann BJ, Baylis BW, Urbanski SJ, et al: Paracoccidioidomycosis: case report and review. Clin Infect Dis 1996; 23:1026–1032.

Marcon MJ, Powell DA: Human infections due to *Malassezia* spp. Clin Microbiol Rev 1992; 5:101–119.

Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al: Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2002b; 34:909–917.

Uma avaliação da incidência e dos riscos das infecções por bolores em um extenso banco de dados de receptores de transplantes de células-tronco hematopoéticas com ênfase nos fungos patógenos emergentes.

Marr KA, Patterson T, Denning D: Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. Infect Dis Clin North Am 2002a; 16:875–894.

Martino R, Salavert M, Parody R, et al: *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. Clin Infect Dis 2004; 38:335–341.

Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, et al: Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. J Clin Microbiol 2003; 41:1087–1090.

Miller JD, Rand TG, Jarvis BB: *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? Med Mycol 2003; 41:271–291.

Minari A, Hachem R, Raad I: *Candida lusitaniae*: a cause of breakthrough fungemia in cancer patients. Clin Infect Dis 2001; 32:186–190.

Morpeth JE, Rupp NT, Dolen WK, et al: Fungal sinusitis; an update. Ann Allergy Asthma Immun 1996; 76:128–13.

Nagata N, Sueishi K, Tanaka K, Iwata Y: Pulmonary aspergillosis with bronchocentric granulomas. Am J Surg Pathol 1990; 14:485–488.

Narani N, Epstein JB: Classifications of oral lesions in HIV infection. J Clin Periodontol 2001; 28:137–145.

Nenoff P, Handrick W, Haustein UF: Sports-induced infections – an overview. Wien Med Wochenschr 2002; 152:574–577.

Nesky MA, McDougal EC, Peacock Jr JE: *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. Clin Infect Dis 2000; 31:673–677.

Nevez G, Totet A, Jounieaux V, et al: *Pneumocystis jiroveci* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. J Clin Microbiol 2003; 41:181–186.

Nonaka D, Yfantis H, Southall P, Sun CC: Pseudallescheriasis as an aggressive opportunistic infection in a bone marrow transplant recipient. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:207–209.

Noskin GA, Peterson LR: Engineering infection control through facility design. Emerg Infect Dis 2001; 7:354–357.

Nucci M: Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and Zygomycetes in transplant recipients. Curr Opin Infect Dis 2003; 16:607–612.

Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, et al: *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2004; 38:1237–1242.

Oh D, Notrica D: Primary cutaneous mucormycosis in infants and neonates: case report and review of the literature. J Pediatri Surg 2002; 37:1607–1611.

Padhye AA, Kaufman L, Durry E, et al: Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. J Clin Microbiol 1992; 30:2492–2494.

Pagano L, Offidani M, Fianchi L, et al: Mucormycosis in hematologic patients. Haematologica 2004; 89:207–214.

Pappagianis D, Zimmer BL: Serology of coccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev 1990; 3:247–268.

Pappas PG, Dismukes WE: Blastomycosis: Gilchrist's disease revisited. Curr Clin Top Infect Dis 2002; 22:61–77.

Parikh SL, Venkatraman G, DelGaudio JM: Invasive fungal sinusitis: a 15-year review from a single institution. Am J Rhinol 2004; 18:75–81.

Patterson TF: Fungal susceptibility testing: where are we now? Transpl Infect Dis 2002; 4 Suppl 3:38–45.

Perfect JR, Casadevall A: Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am 2002; 16:837–874.

Perfect JR, Cox GM, Lee JY, et al: The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33:1824–1833.

Perfect JR, Schell WA, Cox GM: Phaeohyphomycoses. *In* Dismukes WE, Pappas P, Sobel JD (eds): Clinical Mycology. New York, Oxford University Press, 2003, pp 271–282.

Petersen LR, Marshall SL, Barton-Dickson C, et al: Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. Emerg Infect Dis 2004; 10:637–642.

Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, et al: In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. J Clin Microbiol 2003a; 41:1126–1129.

Pfaller MA, Diekema DJ: Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbio 2004; 142:4419–4431.

Minirrevisão sobre agentes fúngicos selecionados emergentes e menos comuns de micoses oportunistas, com ênfase no que se sabe quanto a sua suscetibilidade e sua resistência aos agentes antifúngicos novos e estabelecidos.

Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, et al: Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. J Clin Microbiol 2003b; 41:1875–1880.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al: Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. J Clin Microbiol 2002; 40:852–856.

Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al: In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. J Clin Microbiol 2003c; 41:78–83.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S: Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol 1996; 34:58–61.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. J Clin Microbiol 1998; 36:1886–1889.

Pneumocystis Working Group: Nomenclature of *Pneumocystis*. Eukaryot Microbiol 1994; 41:1215–1225.

Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, et al: Emerging pathogens. Med Mycol 2000; 38 (Suppl 1):225–236.

Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, et al: Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. J Clin Microbiol 1998; 36:3396–3398.

Redding SW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, et al: *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. J Clin Microbiol 2002; 40:1879–1881.

Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP: Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10:444–465.

Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Med Mycol 2000; 38 (Suppl 1):147–159.

Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, et al: Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin Infect Dis 2002; 34:467–476.

Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG: Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. Clin Infect Dis 2004; 38:206–216.

Revenga F, Paricio JF, Merino FJ, et al: Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host: case report and review of the literature. Dermatology 2002; 204:145–149.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al: Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001; 14:643–658.

Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ: Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev 2000; 13:236–301.

Revisão que explora a diversidade dos zigomicetos e as manifestações das doenças causadas por eles, bem como a taxonomia e sua relação com outros patógenos fúngicos.

Riddle DL, Giger O, Miller L, et al: Clinical comparison of the Baxter MicroScan Yeast Identification Panel and the Vitek Yeast Biochemical Card. Am J Clin Pathol 1994; 101:438–442.

Rinaldi MG: Use of potato flakes agar in clinical mycology. J Clin Microbiol 1982; 15:1159.

Rinaldi MG: Phaeohyphomycosis. Dermatol Clin 1996; 14:17–53.

Rinaldi MG: Dermatophytosis: epidemiological and microbiological update. J Am Acad Dermatol 2000; 43:S120–S124.

Rodriguez M, Fishman JA: Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2004; 17:770–782.

Rodriguez-Villalobos H, Georgala A, Beguin H, et al: Disseminated infection due to *Cylindrocarpon (Fusarium) lichenicola* in a neutropenic patient with acute leukaemia: report of a case and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:62–65.

Sampathkumar P, Paya CV: *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. Clin Infect Dis 2001; 32:1237–1240.

Samuel R, Bettiker RL, Suh B: AIDS related opportunistic infections, going but not gone. Arch Pharm Res 2002; 25:215–228.

Sancak B, Rex JH, Paetznick V, et al: Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. J Clin Microbiol 2003; 41:489–491.

Sanche SE, Sutton DA, Rinaldi MG: Dematiaceous fungi. *In* Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MS (eds): Clinical Mycology. New York, Churchill Livingstone, 2003, pp 325–351.

Sanders E: Cutaneous sporotrichosis. Beer, bricks, and bumps. Arch Intern Med 1971; 127:482–483.

Saubani AO, Chandrasekar PH: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Chest 2002; 121:1988–1999.

Schiemann R, Glasmacher A, Bailly E, et al: *Geotrichum capitatum* septicaemia in neutropenic patients: case report and review of the literature. Mycoses 1998; 41:113–116.

Schinabeck MK, Ghannoum MA: Human hyalohyphomycoses: a review of human infections due to *Acremonium* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., and *Scopulariopsis* spp. J Chemother 2003; 15 (Suppl 2):5–15.

Schubert MS: Allergic fungal sinusitis. Otolaryngol Clin North Am 2004; 37:301–326.

Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ: Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5′ exonuclease assay using fluorescent DNA probes. J Clin Microbiol 1999; 37:165–170.

Sigler L: Miscellaneous opportunistic fungi: Microascaceae and other Sacomycetes, Hyphomycetes, Coelomycetes, and Basidiomycetes. *In* Howard DH (ed): Fungi Pathogenic for Humans and Animals, 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 2003, pp 637–676.

Silveira F, Nucci M: Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. Curr Opin Infect Dis 2001; 14:679–684.

Sivak-Callcott JA, Livesley N, Nugent RA, et al: Localised invasive sino-orbital aspergillosis: characteristic features. Br J Ophthalmol 2004; 88:681–687.

Sobel JD, Lundstrom T: Management of candiduria. Curr Urol Rep 2001; 2:321–325.

Steinbach WJ, Benjamin DK, Jr., Kontoyiannis DP, et al: Infections due to *Aspergillus terreus:* a multicenter retrospective analysis of 83 cases. Clin Infect Dis 2004; 39:192–198.

Steinbach WJ, Mitchell TG, Schell WA, et al: Status of medical mycology education. Med Mycol 2003a; 41:457–467.

Steinbach WJ, Perfect JR: *Scedosporium* species infections and treatments. J Chemother 2003b; 15 Suppl 2:16–27.

Stevens DA: Diagnosis of fungal infections: current status. J Antimicrob Chemother 2002; 49 (Suppl 1):11–19.

Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE: A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002; 8:891–896.

Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, et al: In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. J Clin Microbiol 1999; 37:2343–2345.

Swisher BL, Chandler FW: Grocott-Gomori methenamine silver method for detecting fungi: practical considerations. Lab Med 1982; 13:568.

Thakar A, Sarkar C, Khiwakar M, et al: Allergic fungal sinusitis: expanding the clinicopathologic spectrum. Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 130:209–216.

Thiele D, Bergmann A: Protothecosis in human medicine. Int J Hyg Environ Health 2002; 204:297–302.

Thomas I, Schwartz RA: Cutaneous manifestations of systemic cryptococcosis in immunosuppressed patients. J Med 2001; 32:259–266.

Thomas PA: Current perspectives on ophthalmic mycoses. Clin Microbiol Rev 2003; 16:730–797.

Revisão abrangente sobre as infecções micóticas da órbita e dos tecidos oculares externos adjacentes.

Totet A, Pautard JC, Raccurt C, et al: Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jiroveci* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. J Clin Microbiol 2003; 41:1173–1180.

Van Burik JA, Colven R, Spach DH: Cutaneous aspergillosis. J Clin Microbiol 1998; 36:3115–3121.

Vazquez JA, Sobel JD: Mucosal candidiasis. Infect Dis Clin North Am 2002; 16:793–820.

Veligandla SR, Hinrichs SH, Rupp ME, et al: Delayed diagnosis of osseous blastomycosis in two patients following environmental exposure in nonendemic areas. Am J Clin Pathol 2002; 118:536–541.

Vennewald I, Schonlebe J, Klemm E: Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. Mycoses 2003; 46:12–18.

Vilchez RA, Fung J, Kusne S: Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. Am J Transplant 2002; 2:575–580.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, et al: Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 2004b; 10(Suppl 1):48–66.

Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, et al: Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin–tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug–antigen interaction. J Clin Microbiol 2004a; 42:4744–4748.

Warnock DW, Hajjeh RA, Lasker BA: Epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. Curr Infect Dis Rep 2001; 3:507–516.

Wazir JF, Ansari NA: *Pneumocystis carinii* infection. Update and review. Arch Pathol Lab Med 2004; 128:1023–1027.

Weems JJ, Jr.: *Candida parapsilosis:* epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 1992; 14:756–766.

Weitzman I, Salkin IF, Rosenthal SA: Evaluation of *Trichophyton* agars for identification of *Trichophyton soudanense*. J Clin Microbiol 1983; 18:203–205.

Weitzman I, Whittier S, McKitrich JC, Della-Latta P: Zygospores: the last word in identification of rare or atypical zygomycetes isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1995; 33:781–783.

Wheat LJ: Current diagnosis of histoplasmosis. Trends Microbiol 2003a; 11:488–494.

Wheat LJ: Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. Transpl Infect Dis 2003c; 5:158–166.

Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P: Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43:29–37.

Wheat LJ, Kauffman CA: Histoplasmosis. Infect Dis Clin North Am 2003b; 17:1–19.

Revisão clínica atualizada sobre a histoplasmose, enfocando-se seu reconhecimento, seu diagnóstico e seu tratamento.

Wilkin A, Feinberg J: *Pneumocystis carinii* pneumonia: a clinical review. Am Fam Physician 1999; 60:1699–1708.

Wingard JR: Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995; 20:115–125.

Wolff AJ, O'Donnell AE: HIV-related pulmonary infections: a review of the recent literature. Curr Opin Pulmon Med 2003; 9:210–214.

Woods CW, McRill C, Plikaytis BD, et al: Coccidioidomycosis in human immunodeficiency virus-infected persons in Arizona, 1994–1997; incidence, risk factors, and prevention. J Infect Dis 2000; 181:1498–1434.

Woods GL, Schnadig VJ: Histopathology of fungal infections. *In* Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds): Clinical Mycology. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone, 2003, pp 80–95.

Yeo SF, Wong B: Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2002; 15:465–484.

CAPÍTULO 61

Parasitologia médica

Thomas R. Fritsche, M.D., Ph.D., Rangaraj Selvarangan, B.V.Sc., Ph.D.

Métodos laboratoriais 1273
- Exame de sangue 1274
- Exame de amostras de fezes 1275
- Exame de amostras urogenitais e outras (escarro, aspirados, biópsias) 1278
- Técnicas de cultura de parasitas 1279
- Métodos imunodiagnósticos 1279
- Métodos diagnósticos moleculares 1281
- Controle de qualidade, melhoria de qualidade e segurança 1281

Protozoários sanguíneos e tissulares 1282
- Malária 1282
- Babesiose 1289
- Hemoflagelados 1289
- *Toxoplasma gondii* 1291
- Amebas de vida livre oportunistas 1292

Protozoários intestinais e urogenitais 1293
- Amebas e *Blastocystis hominis* 1294
- Flagelados 1298
- Ciliados 1299
- Coccídeos 1299
- Microsporídios 1302

Helmintos intestinais 1302
- Nematódeos 1303
- Cestódeos 1307
- Trematódeos 1309

Helmintos tissulares 1313
- Nematódeos 1313
- Cestódeos 1317
- Trematódeos 1317

Artrópodes importantes do ponto de vista clínico 1317
- Características biológicas 1318
- Mecanismos de lesão 1318
- Abordagens laboratoriais para identificação de artrópodes 1319
- Insetos 1319
- Aracnídeos 1321
- Classes de menor importância clínica 1322
- Milípedes 1322

Infecções parasitárias e hospedeiro imunocomprometido 1323

Referências bibliográficas 1325

PONTOS-CHAVE

- O diagnóstico acurado de infecções parasitárias usualmente depende do exame macro e microscópico de amostras coletadas e preservadas de modo adequado. Esfregaços de sangue espessos e delgados são úteis para a detecção e a caracterização de microrganismos encontrados no sangue. Amostras de fezes podem ser frescas ou colocadas em fixadores como a formalina e o álcool polivinílico (PVA, *polyvinyl alcohol*).
- Métodos imunodiagnósticos para a parasitologia incluem a detecção de anticorpos e antígenos. Os imunoensaios enzimáticos estabelecidos incluem testes de antígenos para *Plasmodium* spp. no sangue e no soro; *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *Entamoeba histolytica* nas fezes; *Trichomonas vaginalis* em *swabs* vaginais. Ensaios de fluorescência direta também são úteis para a identificação de microrganismos em amostras primárias.
- Métodos de diagnóstico molecular vêm surgindo e têm como base técnicas de amplificação que oferecem altos níveis de sensibilidade e especificidade, tanto para o diagnóstico quanto para a monitoração de doenças parasitárias.
- O diagnóstico de malária deve ser considerado no diagnóstico diferencial de febre inexplicada com história de viagem em regiões endêmicas. Esfregaços de sangue espessos e delgados são complementares para a detecção e identificação do *Plasmodium* spp. com base nos vários estágios do desenvolvimento, na presença de pigmento malárico e no pontilhado observado nos eritrócitos infectados.
- Outras infecções protozoárias incluem a babesiose e a tripanossomíase no sangue, a leishmaniose (causando as formas cutânea, mucocutânea e visceral da doença) e a toxoplasmose, frequentemente afetando o sistema nervoso central após infecção congênita e os pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).
- Amebas são ingeridas como cistos, acarretando infecção do cólon e passagem de cistos e trofozoítos nas fezes. As doenças resultantes são disenteria amebiana, colite amebiana e abscessos hepáticos. O diagnóstico é estabelecido pelo exame microscópico de fezes e pela realização de testes sorológicos de anticorpos no soro.
- Os flagelados incluem a *Giardia lamblia*, a qual causa diarreia em virtude da ingestão de água contaminada e é diagnosticada pela identificação de trofozoítos ou cistos nas fezes. O *Trichomonas vaginalis* pode ser detectado em lâminas para exame a fresco de material vaginal pelo seu movimento característico.
- Os coccídios (*Isospora*, *Cryptosporidium* e *Cyclospora*) e os microsporídios podem causar diarreia prolongada em indivíduos imunodeprimidos (p. ex., pacientes com AIDS).
- Os helmintos intestinais incluem nematódeos, cestoides e trematoides. Esses organismos, quando adultos, instalam-se no trato gastrintestinal ou em outras localizações (fígado, pulmões, sangue). O conhecimento de seus ciclos de vida e da zoogeografia com hospedeiros intermediários é crítico para o estabelecimento do estágio parasitário da suposta infecção. Ovos, larvas e formas adultas (de 1 mm a mais de 10 metros de comprimento, dependendo da espécie) podem ser recuperados nas fezes, na urina ou no escarro.
- Os helmintos tissulares incluem, entre outros, filárias (larvas encontradas no sangue e também na biópsia de pele), *Trichinella* (no músculo), *Strongyloides* (infecção disseminada) e hidatidose (grandes lesões císticas no fígado ou nos pulmões).
- Artrópodes podem causar doença por meio de invasão tissular direta, injeção de veneno, vesiculação, perda sanguínea, transmissão de agentes infecciosos, reações de hipersensibilidade e manifestações psicológicas. As características necessárias para a identificação podem ser mantidas pela preservação dos organismos em álcool (carrapatos, ácaros, moscas, piolhos), pela desidratação (formas aladas) após eles serem mortos com fumaça de solventes orgânicos ou com água quente (larvas) e subsequente armazenamento em álcool.

O estudo da parasitologia ganhou uma nova importância em um mundo cada vez menor pelo rápido movimento das pessoas, especialmente dos viajantes e migrantes de áreas endêmicas de doenças parasitárias, e pela emergência ou pelo reaparecimento de agentes patogênicos em indivíduos imunodeprimidos por várias razões. As doenças parasitárias humanas e de animais domésticos representam uma tremenda carga

sobre os recursos da saúde e afetam de modo adverso o desenvolvimento social e econômico em muitos países. Embora os tipos de organismos classificados como parasitas representem um grande grupo, o número daqueles que infectam humanos é mais limitado e é composto principalmente por protozoários, helmintos e artrópodes (Tab. 61.1).

Os médicos nos Estados Unidos e em outros lugares deparam-se cada vez mais com problemas incomuns de diagnóstico associados a infecções parasitárias. Da mesma forma, os técnicos de laboratório são desafiados pelo desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico rápido e acurado de parasitas, como *Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium hominis, Cyclospora cayetanensis, Toxoplasma gondii* e microsporídios em hospedeiros imunocompetentes ou imunodeprimidos. O reaparecimento mundial da malária e de outras doenças parasitárias também exigiu que os técnicos de laboratório aumentassem a perícia na identificação de protozoários e helmintos sanguíneos, intestinais e tissulares.

Depois de o diagnóstico ser estabelecido, problemas adicionais podem ser encontrados no tratamento dessas doenças em razão da falta de terapias eficazes ou da emergência de resistência à terapia tradicional. Muitos parasitas requerem vetores artrópodes para a sua transmissão e a aplicação irregular de esforços de controle de vetores acarretou, em algumas situações, a emergência da resistência a inseticidas. O enorme ressurgimento da malária em muitas áreas ocorreu por causa do relaxamento nos esforços de controle e da emergência de parasitas resistentes a fármacos e mosquitos resistentes a inseticidas. A esquistossomose disseminou-se para muitas novas áreas em virtude de um aumento da irrigação como consequência do crescimento populacional e da necessidade de expansão da produção agrícola.

Por causa da natureza crônica e do período de latência em geral longo (tempo entre a infecção e a manifestação dos estágios clínicos que permitem o diagnóstico) de muitas doenças parasitárias, os médicos podem não as considerar no diagnóstico diferencial, exceto quando o paciente fornece informações voluntariamente ou quando um questionário específico é feito sobre antecedentes de viagem ou outra possível exposição. A malária é uma doença parasitária que, com frequência, se manifesta como uma doença febril aguda e pode ter consequências letais, a menos que seja considerada no diagnóstico diferencial e um antecedente de viagem para uma área endêmica seja evocado.

Foram realizadas várias estimativas das taxas de prevalência e de mortalidade de infecções parasitárias com uma base mundial (Tab. 61.2). Contudo, a incidência real de infecções parasitárias observada nos Estados Unidos é desconhecida porque a maioria das infecções não é notificada aos serviços de saúde pública. Os parasitas relatados com mais frequência por laboratórios públicos são *Giardia lamblia*, outros protozoários intestinais e nematódeos intestinais (7,2, 10 e 3,5%, respectivamente), mas outros, incluindo *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e microsporídios, provavelmente ocorrem com mais frequência, mas são subdiagnosticados (Kappus, 1994).

Este capítulo fornece uma visão geral das abordagens utilizadas pelos técnicos de laboratório para identificar protozoários e helmintos parasitas humanos. A análise de espécies individuais de parasitas é focada nas informações clínicas e biológicas essenciais necessárias para ajudar no diagnóstico e no tratamento. Para uma análise mais detalhada de parasitas específicos, existem vários textos excelentes disponíveis (Beaver, 1984; Warren, 1990; Lane, 1993; Guerrant, 1999; Garcia, 1999, 2001; Markell, 1999; Strickland, 2000; Cook, 2002; Mullen, 2002; entre outros). Atlas de parasitologia também são fontes importantes para qualquer técnico de laboratório que realiza exames parasitológicos e devem estar disponíveis para consulta imediata (Spencer, 1982; Brooke, 1984; Ash, 1987, 1997; Sun, 1988; Peters, 1989; Isenberg, 2004; Murray, 2003). Vários textos abordam especificamente aspectos patológicos de infecções parasitárias (Marcial-Rojas, 1971; Binford, 1976; Sun, 1982; Von Lichtenberg, 1991; Woods, 1993; Orihel, 1995; Connor, 1997; Gutierrez, 2000). Infecções parasitárias que são problemáticas em pacientes imunocomprometidos também foram revistas (Walzer, 1989).

Métodos laboratoriais

Numerosos métodos foram descritos para a recuperação e a identificação de parasitas em amostras, alguns dos quais são úteis para a detecção de várias espécies, enquanto outros detectam apenas uma de-

Tabela 61.1 Sumário dos parasitas humanos mais comumente encontrados e seus locais primários de infecção

Sub-reino Protozoa	Sub-reino Metazoa
Filo Sarcomastigophora	**Filo Platyhelminthes (platelmintos)**
Subfilo Sarcodina (amebas)	Classe Cestoda (tênias)
Entamoeba histolytica (I)*	*Diphyllobothrium* spp. (I)*
E. dispar (I)	*Dipylidium caninum* (I)*
E. hartmanni (I)	*Echinococcus granulosus* (F)*
E. coli (I)	*E. multilocularis* (F)*
Iodamoeba butschlii (I)	*Hymenolepis nana* (I)*
Endolimax nana (I)	*H. diminuta* (I)*
Naegleria fowleri (T, C)*	*Taenia saginata* (I)*
Acanthamoeba spp. (T, C, O)*	*T. solium* (I, T)*
Balamuthia mandrillaris (T, C)*	Classe Trematoda (trematódeos)
Blastocystis hominis (I)	*Clonorchis sinensis* (F)
Subfilo Mastigophora (flagelados)	*Fasciola hepatica* (F)*
Giardia lamblia (I)*	*Fasciolopsis buski* (I)
Dientamoeba fragilis (I)*	*Heterophyes heterophyes* (I)
Chilomastix mesnili (I)	*Metagonimus yokagawai* (I)
Retortamonas intestinalis (I)	*Nanophyetus salmincola* (I)*
Enteromonas hominis (I)	*Opisthorchis viverrini* (F)
Trichomonas hominis (I)	*Paragonimus* spp. (P)*
T. vaginalis (V)*	*Schistosoma haematobium* (S)
Leishmania tropica (T)	*S. japonicum* (S)
L. major (T)	*S. mekongi* (S)
L. aethiopica (T)	*S. mansoni* (S)
L. mexicana (T)*	**Filo Nematoda (nematelmintos)**
L. braziliensis (T)	Classe Adenophorea (afasmídios)
L. donovani (T)	*Trichinella spiralis* (T, I)*
Trypanosoma gambiense (S, C)	*Trichuris trichiura* (I)*
T. rhodesiense (S, C)	*Capillaria philippinensis* (I)
T. cruzi (S, T)*	Classe Secernentea (fasmídios)
Filo Ciliophora (ciliados)	*Enterobius vermicularis* (I)*
Balantidium coli (I)*	*Ascaris lumbricoides* (I)*
Filo Apicomplexa (apicomplexos)	*Ancylostoma duodenale* (I)
Classe Sporozoea	*Necator americanus* (I)*
Subclasse Piroplasma	*Strongyloides stercoralis* (I)
Babesia spp. (S)*	*Trichostrongylus* spp. (I)*
Subclasse Coccidia	*Anisakis* spp. (I)*
Plasmodium falciparum (S)	*Wuchereria bancrofti* (T, S)
P. malariae (S)	*Brugia malayi* (T, S)
P. ovale (S)	*Loa loa* (T, S)
P. vivax (S)	*Onchocerca volvulus* (T)
Cryptosporidium parvum (I)*	*Mansonella perstans* (T, S)
Cyclospora cayetanensis (I)*	*M. ozzardi* (T, S)
Isospora belli (I)*	*M. streptocerca* (T)
Toxoplasma gondii (T)*	*Dracunculus medinensis* (T)
Filo Microspora (microsporídios)	*Angiostrongylus cantonensis* (T)
Encephalitozoon spp. (O, F, T)*	*A. costaricensis* (T)
E. intestinalis (I, T)*	
Enterocytozoon bieneusi (I)*	

*Parasita patogênico que ocorre naturalmente nos Estados Unidos.

S = sangue; C = líquido cerebrospinal; O = olho; F = fígado; I = intestino; P = pulmão; T = tecido; V = vagina.

Fonte: adaptado de Murray PR, Barron EJ, Pfaller M, et al: Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington DC, ASM Press, 1995.

Tabela 61.2 Prevalência estimada de infecções parasitárias no mundo

Doença	População estimada envolvida	Número de mortes anuais
Por protozoário		
Amebíase	Até 10% da população mundial	40.000 a 110.000
Tripanossomíase africana	100.000 novos casos/ano	5.000
Tripanossomíase americana	24 milhões	60.000
Giardíase	200 milhões	
Leishmaniose	1,2 milhão	
Malária	400 a 490 milhões	2,2 a 2,5 milhões
Por helminto		
Ascaridíase	1,3 bilhão	1.550
Cestodíase	65 milhões	
Clonorquíase/opistorquíase	13,5 milhões	
Dracunculíase	<100.000	
Fasciolopsíase	10 milhões	
Filariose linfática	128 milhões	
Ancilostomíase	1,3 bilhão	
Oncocercose	17,7 milhões	
Paragonimíase	2,1 milhões	
Esquistossomose	150 milhões	500.000 a 1 milhão
Estrongiloidíase	35 milhões	
Tricoestrongiloidíase	5,5 milhões	
Tricuríase	900 milhões	

Adaptado de Markell EK, John DT, Krotoski WA: Markell and Voge's Medical Parasitology, 8th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1999.

terminada espécie. É preferível para o laboratório oferecer um número limitado de procedimentos realizados de maneira competente do que oferecer uma grande variedade de exames não realizados com frequência que podem se revelar problemáticos. A análise de amostras de fezes e sangue representa a maior parte das solicitações médicas para avaliação parasitológica. Várias amostras adicionais são enviadas aos laboratórios com menos frequência, incluindo amostras urogenitais, de escarro, de aspirados e de biópsia. Conforme informações mais novas sobre certos parasitas considerados emergentes tornam-se disponíveis, o laboratório pode ter de desenvolver e utilizar métodos adicionais altamente específicos ou deve encontrar laboratórios de referência nos quais esses exames são realizados.

Os tipos de amostras coletadas para avaliação laboratorial dependem da espécie e do estágio do parasita suspeito. O conhecimento do ciclo de vida do parasita ajuda na determinação do tipo, do número e da frequência de amostras necessárias para o diagnóstico. Métodos imunológicos e moleculares para o diagnóstico de doenças parasitárias também são úteis em muitas situações e podem ser os únicos métodos disponíveis em determinadas circunstâncias. Descrições completas de procedimentos laboratoriais gerais e específicos para a recuperação e a identificação de parasitas citados neste texto podem ser encontradas em várias fontes que o leitor poderá consultar (Beaver, 1984; Ash, 1987; Balows, 1988; Price, 1994; Garcia, 1999, 2001, 2003; Isenberg, 2004; Murray, 2003).

A familiaridade com a calibração e o uso do micrômetro ocular é necessária para qualquer laboratório que realize exame parasitológico (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). A mensuração do tamanho de trofozoítos, cistos de protozoários e de ovos e larvas de helmintos é, com frequência, necessária para uma identificação acurada. A diferenciação entre amebas patogênicas e não patogênicas (especificamente *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba harmanni*) só pode ser feita com segurança pela mensuração cuidadosa do tamanho. De modo similar, ovos de *Diphyllobothrium* spp., *Paragonimus westermani* e *Fasciola/Fasciolopsis* podem ser prontamente diferenciados com base em mensurações acuradas (Smith, 1979; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Exame de sangue

Parasitas que podem ser detectados em amostras de sangue incluem agentes da malária (*Plasmodium* spp.), babesiose (*Babesia* spp.), tripanossomíase (*Trypanosoma* spp.), leishmaniose (*Leishmania donovani*) e filaríase (*Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, Loa loa* e *Mansonella* spp.). As técnicas mais importantes que devem ser realizadas no laboratório clínico para auxiliar o diagnóstico de parasitas sanguíneos são a preparação, a coloração e o exame de esfregaços de sangue espesso e delgado. Outras técnicas utilizadas menos frequentemente incluem o esfregaço do creme leucocitário (*buffy coat*) e as várias técnicas de concentração reservadas para a recuperação de microfilárias (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Esfregaços de sangue espesso e delgado

O exame de esfregaços de sangue corados de modo permanente é necessário para a identificação da maioria dos parasitas sanguíneos. Essas lâminas são preparadas da mesma maneira que as para a avaliação hematológica diferencial. O sangue é espalhado sobre a lâmina em uma fina camada, mantendo os elementos celulares intactos e não sobrepostos. A integridade da membrana das células sanguíneas é importante para determinar a natureza intra ou extracelular da infecção. No esfregaço espesso, o sangue é concentrado em uma pequena área, de modo que haja muitas camadas celulares profundas. Durante a coloração, os eritrócitos são desemoglobinizados e somente os núcleos de leucócitos, plaquetas e parasitas (quando presentes) são visíveis. O esfregaço espesso é preferido para o diagnóstico porque ele contém entre 16 e 30 vezes mais sangue por campo que o esfregaço delgado e, assim, aumenta as chances de detecção da parasitemia leve e diminui o tempo necessário para a realização de um exame confiável. A mesma quantidade de sangue examinada em um esfregaço espesso em 5 minutos, utilizando uma objetiva de 100x em objetiva de imersão, exige pelo menos 30 minutos quando examinada em um esfregaço delgado. Embora os esfregaços espessos aumentem a probabilidade de detecção de uma infecção, a identificação da espécie, em geral, é realizada pelo exame de esfregaços delgados, porque a morfologia é geralmente mais definitiva, em especial para parasitas causadores da malária. Para o exame de rotina, devem ser preparados tanto esfregaços espessos quanto delgados.

Preparação de lâminas

O sangue para exame pode ser obtido por meio da punção, digital, auricular ou venosa. O sangue da punção digital deve fluir livremente para prevenir a diluição com líquido tissular e não deve ser contaminado com desinfetante alcoólico, permitindo que ele seque antes da realização da punção. Quando obtido pela punção venosa, a primeira gota de sangue (sem anticoagulante) da agulha é utilizada para a preparação de lâminas no local da coleta. O uso de anticoagulantes é desaconselhado quando houver suspeita de malária, porque eles podem provocar distorção dos parasitas e interferir na coloração. Entretanto, na prática, o sangue usualmente é encaminhado ao laboratório em um anticoagulante, o que pode ser o único método prático para garantir que esfregaços de alta qualidade possam ser preparados. O sangue anticoagulado com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) é preferido nesses casos e deve ser transportado para o laboratório em um período de uma hora para prevenir a deterioração da morfologia do organismo. Anticoagulantes não interferem na coloração de microfilárias.

Tanto os esfregaços espessos quanto os delgados devem ser preparados em lâminas limpas e sem gordura. Esfregaços espessos são preparados pela colocação de várias pequenas gotas de sangue em uma área de 1,5 cm e deve-se permitir que o sangue seque em temperatura ambiente, usualmente durante a noite. Um esfregaço espesso adequado deve ser delgado o suficiente para que se possa ler um jornal através dele. Se for muito espesso, o esfregaço pode descolar da lâmina. O calor excessivo pode fixar eritrócitos e impedir a desemoglobinização.

Coloração

O sangue começa a perder a sua afinidade pelo corante em, aproximadamente, 3 dias e esfregaços espessos mais velhos não desemoglobinizam bem. Os melhores resultados de coloração são obtidos utilizando o corante de Giemsa, pois a cromatina da célula do hospedeiro e do parasita cora de forma intensa enquanto a hemoglobina nos eritrócitos

colore de uma cor vermelho pálido. É a única coloração que permite a visualização do ponteado eritrocitário que ocorre na infecção causada por certos agentes da malária. A coloração de Wright pode ser utilizada para esses esfregaços, mas ela colora os parasitas de modo inferior à coloração de Giemsa e colore os eritrócitos, produzindo um fundo confuso. Como a coloração de Wright incorpora o álcool como fixador, esfregaços espessos devem ser lisados em água antes da coloração.

O método de coloração de Giemsa requer uma atenção um pouco maior na preparação de reagentes e no protocolo de coloração que o método de Wright, o qual é frequentemente automatizado. De modo geral, o corante de Giemsa fresco deve ser preparado todos os dias, diluindo a solução armazenada em água tamponada com fosfato. Para obter reações de coloração adequadas, incluindo o aparecimento do pontilhado de Schüffner, a água tamponada deve ser mantida em um pH entre 6,8 e 7,2. Cada lote novo de corante de Giemsa deve ser checado para se determinar o tempo de coloração e a diluição ideais, pois existe alguma variação de um lote a outro (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Exame de esfregaço

Tanto o esfregaço espesso quanto o delgado são examinados de forma integral com uma objetiva de menor aumento (10x) para a detecção de microfilárias, as quais raramente ocorrem em grande número. Em particular, a borda serrilhada do esfregaço delgado deve ser examinada, uma vez que as microfilárias, em geral, são levadas para lá durante a preparação. O exame utilizando um aumento de 50x em objetiva de imersão pode ser utilizado para a análise de esfregaços de sangue em busca de protozoários, embora o exame detalhado utilizando um aumento de 100x (objetiva de imersão) ainda seja necessário para detectar parasitas menores, como *Plasmodium* spp., *Babesia* spp. e leishmanias. Mais uma vez, o exame da borda serrilhada é importante porque os eritrócitos são levados para essa região em uma camada única de células, permitindo a avaliação detalhada de sua morfologia e a presença de protozoários intracelulares. Um microscopista experiente deve examinar pelo menos 100 campos sob objetiva de imersão (o que exige aproximadamente 5 minutos) em um esfregaço espesso e 200 campos (o que requer pelo menos 15 minutos) em um esfregaço delgado utilizando a objetiva 100x antes de emitir um resultado negativo (Ash, 1987).

Técnicas de concentração

Várias técnicas especiais foram descritas para a concentração de parasitas sanguíneos, especificamente leishmanias, tripanossomas e microfilárias. Os detalhes delas podem ser encontrados em outros textos (Beaver, 1984; Ash, 1987; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000; Garcia, 2001, 1999; Isenberg, 2004).

A preparação de esfregaços de creme leucocitário – que a maioria dos laboratórios clínicos consegue realizar com os recursos existentes – é útil na detecção de *L. donovani*, tripanossomas e microfilárias. Após a centrifugação de uma amostra de sangue anticoagulada, a camada de células entre o plasma e os eritrócitos concentrados é coletada e utilizada para o preparo de esfregaços de sangue para coloração ou para a preparação de lâmina para exame a fresco para a detecção de organismos móveis (Ash, 1987; Strickland, 2000).

Para a detecção de microfilárias, a concentração de Knott ou a filtração por membrana é útil, particularmente quando a densidade de microfilárias no sangue periférico for muito baixa. Na técnica de Knott, o sangue anticoagulado é lisado com formalina a 2% e centrifugado para concentrar as microfilárias no sedimento, o qual pode então ser examinado a fresco ou corado com corante de Giemsa ou hematoxilina. Na filtração por membrana, o sangue é lisado e passado através de um filtro de membrana de 5 μm. A seguir, ele é corado com hematoxilina para revelar qualquer microfilária (Ash, 1987; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

O uso do fluorocromo laranja acridina e centrífuga de microematócrito (QBC, *blood parasite detection method*, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) permite a detecção de parasitas sanguíneos e parece ser uma técnica mais sensível do que os esfregaços de sangue espessos e delgados. Contudo, os laboratórios que lidam com poucos casos de malária podem ter dificuldade na interpretação dos resultados por esse método e são aconselhados a aperfeiçoar o desempenho nas técnicas tradicionais de esfregaços de sangue (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Exame de amostras de fezes

A presença de parasitas intestinais é identificada, principalmente, pelo exame direto de fezes utilizando a técnica a fresco, as técnicas de concentração, os esfregaços com coloração permanente e, com menos frequência, a cultura. Métodos de imunoensaio mais novos, utilizando anticorpos reagentes específicos para a espécie, tornaram-se populares para a detecção de antígenos de *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *E. histolytica*. Os estágios de helmintos comumente identificados incluem ovos e larvas, embora vermes intactos ou porções deles possam ser observadas às vezes. Infecções por protozoários intestinais são diagnosticadas pela detecção de trofozoítos, cistos ou oocistos. Os métodos de rotina para identificação de ovos e parasitas (*O&P examination*) devem incluir procedimentos que permitam recuperar ambos, protozoários e helmintos, com o uso de procedimentos especiais limitados a solicitações específicas. No mínimo, os laboratórios que realizam exames parasitológicos devem ser capazes de realizar um exame direto de fezes frescas, um procedimento de concentração e um método de coloração permanente. Muitas infecções por protozoários não serão diagnosticadas se não for realizada uma coloração permanente (Garcia, 1979, 1997, 2003; Price, 1994; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Coleta, manipulação e preservação de amostras

A recuperação e a subsequente identificação de parasitas de amostras fecais requerem uma coleta e uma manipulação adequadas. Amostras velhas, mal conservadas ou contaminadas têm pouco valor. Amostras não devem ser coletadas durante uma semana depois de o paciente ter ingerido qualquer material que deixe resíduo cristalino, como compostos antidiarreicos não absorvíveis, antiácidos, bismuto, bário ou antimaláricos. Laxantes oleosos (p. ex., óleo mineral) também podem interferir no exame. O uso de antibióticos ou de meio de contraste pode diminuir o número de organismos, especialmente protozoários, no trato intestinal por várias semanas (Ash, 1987; Garcia, 2003).

Podem ser enviadas ao laboratório amostras frescas ou em conservantes adequados. Todas as amostras frescas devem ser examinadas em 1 hora, e as amostras líquidas devem ser examinadas em 30 minutos ou colocadas de imediato em conservantes para assegurar o melhor resultado. O método garante que trofozoítos frágeis de protozoários não sejam destruídos inadvertidamente. Amostras que não possam ser processadas de imediato devem ser mantidas em temperatura ambiente ou refrigeradas e não devem ser colocadas em uma incubadora porque isso apenas acelera a desintegração de parasitas.

Amostras podem ser coletadas diretamente em caixas de papelão limpas e secas ou fazendo com que o paciente evacue sobre um papel de cera e transferindo uma porção para um recipiente. Amostras diarreicas podem também ser coletadas em uma comadre limpa. Os recipientes devem possuir abas que fecham hermeticamente e devem ser colocados em um saco plástico antes de serem enviadas para o laboratório. A introdução inadvertida de urina ou de água do vaso sanitário na amostra pode destruir de imediato trofozoítos de protozoários e, assim, deve ser evitada. Além disso, a contaminação com água ou sujeira pode introduzir por acidente organismos livres cuja diferenciação dos parasitas pode ser difícil.

Kits compostos por frascos de preservativos adequados para a realização de exames diretos, procedimentos de concentração e preparação de esfregaços corados são comercializados por várias empresas a um custo reduzido. Alíquotas de fezes frescas devem ser imediatamente colocadas nesses frascos e homogeneizadas. Esses kits são particularmente úteis para pacientes impossibilitados de coletar uma amostra fresca no horário adequado ou para aqueles que devem coletar várias amostras ao longo de vários dias. Com a técnica de dois frascos, uma porção da amostra é fixada em três partes de formalina tamponada a 5 ou 10% e outra porção, em três partes do fixador PVA. Outros sistemas de preservação disponíveis incluem mertiolato-iodo-formalina (MIF, *merthiolate-iodine-formalin*) e acetato de sódio-formalina (SAF, *sodium acetate-formalin*) (Tab. 61.3). O SAF apresenta a vantagem de poder ser utilizado para colorações permanentes, assim como para exame a fresco e procedimentos de concentração, e ele não contém

Tabela 61.3 Fixadores e técnicas de exame de fezes

Fixador	Técnica de exame		
	Exame a fresco	Procedimento de concentração	Esfregaço corado permanentemente
Nenhum (fezes frescas)	Sim	Sim	Sim
Formalina 10%	Sim	Sim	Não
Líquido de Schaudinn	Não	Não	Sim
Álcool polivinílico (PVA)	Não	Não*	Sim
PVA modificado†	Não	Não*	Sim
Mertiolate-iodo-formalina (MIF)	Sim	Sim	Não‡
Acetato de sódio-formalina (SAF)	Sim	Sim	Sim

* Embora técnicas de concentração utilizando PVA tenham sido descritas, elas não são amplamente utilizadas por causa de problemas com recuperação de alguns organismos. † Sulfato de cobre ou sulfato de zinco substitui o cloreto de mercúrio. ‡ Esfregaços preparados de amostras preservadas com MIF podem ser corados com IV policromo.

mercúrio, o qual está presente nos fixadores de Schaudinn ou PVA. Além de ser tóxico, o mercúrio tem apresentado problemas de descarte em um número cada vez maior de estados. Contudo, a qualidade das colorações permanentes que utilizam SAF não é tão boa quanto as colorações com fixadores PVA ou de Schaudinn. O uso de PBA com sulfato de zinco e outros novos produtos comerciais vem se popularizando e pode ser indicado quando compostos contendo cloreto de mercúrio não podem ser utilizados (Garcia, 1993, 1997, 2001; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

O exame de três amostras coletadas em dias alternados é considerado o mínimo necessário para se realizar uma avaliação adequada de ovos e parasitas (Garcia, 2003; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Esse procedimento garante um intervalo ideal para a recuperação dos parasitas que sabidamente liberam formas que servem para o diagnóstico de maneira intermitente, em especial *G. lamblia* e *Strongyloides stercoralis*. A sensibilidade na detecção desses parasitas, assim como da *E. histolytica*, pode ser aumentada com o uso da purgação. Entretanto, o laboratório deve ser notificado antes do início da purgação para ter pessoal disponível para o processamento. Amostras devem ser coletadas em recipientes separados e enviadas ao laboratório minutos após a coleta. Purgativos salinos (p. ex., sulfato de sódio ou fosfossoda tamponada) são recomendados.

Exame macroscópico

Amostras fecais devem ser examinadas macroscopicamente: consistência (fezes formadas, moles, frouxas, aquosas) e presença de muco, sangue, formas larvárias ou adultas de parasitas e proglotes. Trofozoítos de protozoários mais provavelmente são encontrados em amostras aquosas ou pastosas, enquanto cistos predominam em amostras formadas ou moles. Helmintos ou seus ovos podem ser encontrados em qualquer tipo de amostra fecal. A maioria dos parasitas é distribuída de forma uniforme nas fezes como resultado da mistura realizada pelo ceco, embora alguns ovos (em especial, de esquistossoma) possam entrar na corrente fecal na parte distal do cólon e no reto, sendo distribuídas de maneira heterogênea, como pode ocorrer com ovos de *Enterobius vermicularis* e de *Taenia* spp. Trofozoítos de protozoários podem ser mais numerosos na porção final das fezes evacuadas e devem ser pesquisados especificamente no muco (Garcia, 2003).

Exame microscópico

Amostras podem ser examinadas microscopicamente: exame a fresco de material fresco ou preservado, exame a fresco de concentrados ou colorações permanentes. Cada procedimento apresenta vantagens e limitações específicas. O exame a fresco direto de fezes frescas em solução salina permite a detecção e a observação de trofozoítos móveis de protozoários e larvas de helmintos. Montagens diretas de fezes preservadas permite a detecção de parasitas que não são bem concentradas. Procedimentos de concentração aumentam a capacidade do examinador de detectar cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos, mas eles são insatisfatórios para a detecção de trofozoítos de protozoários. Colorações permanentes são úteis para a detecção e o exame morfológico de trofozoítos e cistos de protozoários.

As circunstâncias nas quais cada procedimento é realizado variam dependendo do tipo de amostra (fezes formadas, moles, frouxas ou aquosas). Geralmente, uma amostra de fezes frescas moles, frouxas ou aquosas deve ser submetida aos três procedimentos (Garcia, 2003). Amostras aquosas podem ser concentradas por centrifugação simples e não por concentração por flutuação ou com formalina-acetato de etila. O exame a fresco pode ser omitido quando a amostra é colocada em preservativos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). No mínimo, amostras de fezes formadas devem ser examinadas por um procedimento de concentração, embora tenha sido demonstrado um melhor resultado quando uma coloração permanente é adicionada à avaliação (Garcia, 1979, 2001).

Exame a fresco

O exame a fresco é um dos exames parasitológicos mais fáceis de serem realizados, embora a interpretação adequada requeira exame atento e experiência no uso do microscópio. O exame é mais útil quando amostras frescas, em especial as fezes líquidas ou os aspirados duodenais, são examinadas em busca de trofozoítos ou larvas de helmintos móveis. Uma pequena quantidade de fezes é misturada com uma gota de solução salina a 0,85% e coberta com uma lamínula. A preparação deve ser suficientemente densa, de modo que a página de um jornal possa ser lida através dela.

O exame da lâmina é realizado sistematicamente com uma objetiva de menor aumento (10×), com o diafragma do microscópio fechado para aumentar o contraste. Objetos suspeitos e aqueles que são refráteis (p. ex., cistos de protozoários) devem ser então examinados com uma objetiva de maior aumento (40×). A detecção da motilidade de amebas com movimento lento exige que um objeto seja examinado por pelo menos 15 segundos. Na ausência de objetos suspeitos, até um terço da preparação deve ser examinado utilizando uma objetiva de 40×. A objetiva de imersão usualmente não é utilizada, exceto se a lâmina tiver sido selada com um esmalte de unha ou vaspar (mistura de 50:50 de vaselina e parafina).

Uma segunda preparação pode ser feita de modo idêntico, exceto pelo fato de ser adicionada uma gota de solução de Lugol 1:5 ou de uma preparação equivalente no lugar da solução salina. O uso de solução pura de Lugol ou Gram provoca aglomeração de material e não é recomendado. O iodo é útil para aumentar a visibilidade de estruturas nucleares em cistos de protozoários e para a detecção de inclusões de glicogênio. Entretanto, as limitações incluem a perda da motilidade dos trofozoítos, a refratividade dos cistos, e a dificuldade no reconhecimento de corpos cromatoides.

Técnicas de concentração

Procedimentos de concentração, os quais podem ser realizados em amostras frescas ou preservadas (Tab. 61.3), são mais sensíveis que o exame a fresco para a detecção de cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos, porque eles diminuem a quantidade de material de fundo nas preparações e, na maioria das circunstâncias, concentram realmente os organismos. Embora vários métodos e modificações tenham sido descritos, alguns são úteis apenas para parasitas específicos (Melvin, 1982; Ash, 1987; Garcia, 2001, 1999; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Para o uso de rotina, deve ser selecionado um método que permita a detecção confiável de cistos de protozoários e ovos de helmintos. Os métodos de concentração são baseados nos princípios de sedimentação ou flutuação. Na sedimentação, os parasitas mais pesados depositam-se no fundo como resultado da força da gravidade ou da centrifugação. Na flutuação, os cistos e os ovos de parasitas mais leves vão para a superfície de uma solução com uma densidade específica alta. Os dois procedimentos de concentração mais amplamente utilizados nos Estados Unidos são a técnica de flutuação centrífuga com sulfato de zinco de Faust e a de sedimentação com formalina éter de Ritchie (ou suas modificações). Na prática, o etil acetato substitiuiu o éter no último método por causa dos perigos associados à manipulação dessa substância e resultados comparáveis são obtidos (Truant, 1981).

A concentração com formalina-acetato de etila é uma técnica de sedimentação bifásica que é eficiente na recuperação da maioria dos cistos de protozoários e dos ovos e das larvas de helmintos, incluindo os ovos operculados, e é moderadamente eficaz para os ovos de esquistossoma. Uma menor distorção dos cistos de protozoários ocorre com essa técnica do que com a flutuação com sulfato de zinco. No entanto, os ovos de *Hymenolepis nana* podem passar despercebidos e a concentração dos cistos de *G. lamblia* e *Iodamoeba bütschlii* pode não ser muito boa. Para a concentração adequada de oocistos de coccídios e esporos de microsporídios, deve-se prestar atenção à velocidade e ao tempo de centrifugação (Isenberg, 2004; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Apesar desses problemas, a técnica é amplamente utilizada tanto pela sua simplicidade quanto pela sua adequação para a maioria das situações laboratoriais.

Com o método de flutuação com sulfato de zinco, a amostra de fezes frescas é processada utilizando sulfato de zinco a uma densidade específica de 1,18 e as fezes formalizadas são processadas com uma solução de densidade específica de 1,20. Elementos parasitários são recuperados a partir da película que se forma na superfície da solução após centrifugação. Esse método produz uma preparação mais limpa do que aquela obtida com a técnica de concentração em formalina-acetato de etila, mas não é confiável para a recuperação de larvas de nematódeos, ovos inférteis de *Ascaris* e ovos da maioria dos trematódeos e tênias. Problemas de recuperação também ocorrem com amostras de fezes que contêm quantidade excessiva de gordura. O uso de amostras de fezes "formalinizadas" em vez de fezes frescas ajuda a limpar a amostra e previne a abertura de opérculos e a distorção dos parasitas (Bartlett, 1978).

Colorações permanentes

O uso de preparações de lâminas coradas fornece um registro permanente de uma amostra do paciente e permite a revisão por consultantes se surgirem dificuldades na identificação. Dos métodos descritos para o estudo de amostras fecais, somente o de coloração permanente é destinado para análise utilizando objetiva de imersão (100x). A coloração permanente é mais útil para a detecção de trofozoítos e cistos de protozoários, os quais podem ser reconhecidos quando preparações diretas e concentradas são negativas. Embora, em geral, não sejam úteis para a detecção de ovos e larvas de helmintos, as colorações permanentes são inerentemente mais sensíveis para a detecção de infecções por protozoários e o seu uso foi recomendado para toda amostra de fezes submetida à pesquisa de ovos e parasitas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Foram descritas várias técnicas de coloração e modificações, as quais apresentam vantagens e desvantagens. A coloração tricrômica de Wheatley e a coloração com hematoxilina férrica são métodos genéricos que permitem a detecção de amebas e flagelados. Infelizmente, a detecção da maioria dos coccídios e microsporídios que infectam humanos exige o uso de colorações especiais. Podem surgir problemas técnicos na realização de qualquer procedimento de coloração, a maioria estando relacionada à idade da amostra, ao preparo e à fixação adequados do esfregaço, e à qualidade dos reagentes. Lâminas de controle positivo de qualidade de coloração conhecida devem ser realizadas com cada grupo de lâminas coradas. Isso é particularmente verdadeiro na realização de colorações mais específicas para coccídios e microsporídios. Corantes menos utilizados, como IV policrômico para uso com amostras preservadas em MIF e clorazol negro E para uso com amostras frescas, não serão aqui analisados. Detalhes podem ser encontrados em outros textos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005; Garcia, 2001).

Coloração tricrômica de Wheatley

Nos Estados Unidos, a variação Wheatley do método tricrômico continua a ter uma aceitação disseminada por causa da simplicidade, da confiabilidade e da relação custo/benefício dessa técnica. Detalhes sobre o procedimento estão disponíveis em inúmeras fontes (Melvin, 1982; Price, 1994; Isenberg, 2004; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Amostras adequadas incluem aquelas que foram fixadas com fixador de Schaudinn ou fixadores de PVA; amostras preservadas em SAF ou MIF podem ser coradas com a coloração tricrômica, mas os resultados são menos satisfatórios.

Coloração de hematoxilina férrica

As colorações de hematoxilina férrica são tecnicamente mais difíceis de serem realizadas do que a coloração tricrômica, mas os resultados, em geral, são superiores em razão da maior definição das características nucleares e citoplasmáticas chaves (Price, 1994). Uma coloração de hematoxilina férrica modificada que pode se revelar útil incorpora carbolfucsina, permitindo a coloração concomitante de organismos acidorresistentes como *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora* (Palmer, 1991; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Amostras fixadas com fixadores de Schaudinn, PVA ou SAF podem ser coradas com hematoxilina férrica (a coloração preferida para SAF).

Colorações acidorresistentes modificadas

Oocistos de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora* são difíceis de serem reconhecidos em esfregaços coloridos pela coloração tricrômica ou com hematoxilina férrica, mas a sua presença pode ser detectada usando uma técnica de coloração acidorresistente como o método modificado de Kinyoun, método modificado acidorresistente com dimetil sulfóxido (DMSO) ou auramina-O (Ma, 1983; Bronsdon, 1984; Current, 1991; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Colorações acidorresistentes são sensíveis e têm uma boa relação custo/benefício para a detecção desses protozoários, mas elas pecam pela falta de especificidade. Deve ser dada uma grande atenção aos critérios morfológicos definidos ao se utilizar essas colorações e o uso de material de controle positivo é obrigatório. Para laboratórios nos quais o *Cryptosporidium* é encontrado com pouca frequência, recomenda-se o uso de reagentes de imunoensaio que são altamente específicos e sensíveis, disponíveis no comércio. Amostras de fezes, escarro, secreção biliar e outras frescas, fixadas com formalina ou com SAF, podem ser utilizadas com corantes acidorresistentes.

Colorações para microsporídios

Microsporídios (especificamente *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis*, além de algumas outras espécies) foram implicados como agentes comuns de doença diarreica, em especial em pacientes imunocomprometidos, embora sua detecção tenha sido problemática. Embora a biópsia e a microscopia eletrônica sejam os pilares em seu diagnóstico, procedimentos de coloração que podem ser realizados no laboratório clínico foram descritos. Uma coloração tricrômica modificada utilizando uma maior concentração (10 vezes) do cromótropo 2R, combinada com um aumento do tempo de coloração, foi aceita como um teste específico para a identificação de microsporídios (Weber, 1992, 1994; Murray, 2003). Métodos de coloração fluorescente utilizando agentes branqueadores ópticos (p. ex., Uvitek-2B e Calcofluor white) também são úteis para a investigação rápida e sensível desses esporos nas fezes e em outras amostras (van Gool, 1993; DeGirolami, 1995; Didier, 1995; Luna, 1995). O pequeno tamanho (entre 1,5 e 3 μm) desses organismos torna a sua detecção difícil, e esses estudos não devem ser realizados sem materiais de controle adequados para comparação.

Técnicas adicionais para o exame de parasitas entéricos

Técnica de fita de celulose para *Enterobius*

A fêmea do *Enterobius vermicularis* migra do ceco para a pele perianal, na qual ela deposita ovos típicos que são totalmente embrionados. Os ovos ou, às vezes, os vermes adultos podem ser detectados pelo exame da fita de celofane adesiva transparente ou pelos kits de coleta comerciais que são pressionados sobre a pele perianal. Ovos ou vermes adultos raramente são observados nas fezes, as quais são consideradas amostras inadequadas para a detecção desse parasita. Amostras devem ser coletadas tarde da noite quando os vermes são mais ativos ou deve ser a primeira coisa a ser realizada pela manhã, antes do banho ou da evacuação. Várias amostras coletadas em diferentes dias devem ser examinadas antes de a infecção ser descartada.

Estudos de ovos

A estimativa da carga de vermes ocasionalmente é solicitada para auxiliar a avaliação da eficácia terapêutica ou acompanhar a taxa de reinfecção por nematódeos intestinais (*Ascaris*, *Trichiuris* e ancilostomatídeo) ou, às vezes, esquistossomo. Os procedimentos incluem o

método de esfregaço direto de Beaver, a contagem de ovos com diluição de Stoll, o esfregaço espesso de Kato e várias modificações (Beaver, 1984; Ash, 1987; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). As grandes variações no resultado são inerentes quando esses exames são realizados e o nível de contagem de ovos indicando importância clínica varia de acordo com a espécie infectante, a idade do indivíduo e o estado nutricional (Beaver, 1984).

Métodos de incubação de ovos foram utilizados na análise da esquistossomíase para detectar a sua presença em infecções leves e determinar a sua viabilidade. Os ovos de esquistossoma, que são totalmente embrionados quando eliminados, contêm um miracídio emerge várias horas após os ovos terem sido colocados em água desclorada. Na prática, a amostra de urina ou de fezes é misturada em aproximadamente 10 volumes de água, sendo então colocada em um frasco com braço lateral ou num Erlenmeyer. Com exceção do braço lateral ou do topo do frasco, o restante é coberto com papel de alumínio e a unidade é colocada sob uma lâmpada de mesa. Os miracídios que saíram dos ovos são positivamente fototrópicos e se agrupam próximo à fonte de luz. Quando presentes, os ovos podem ser examinados diretamente pelo exame do movimento dos cílios no interior das células excretoras (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Cultura e técnicas de recuperação de nematódeos

Várias técnicas de cultura (coprocultura) auxiliam a detecção e a identificação de determinadas infecções por nematódeos, incluindo a cultura em tira de papel filtro de Harada-Mori, cultura em papel filtro/inclinada e cultura em carvão (Beaver, 1984; Ash, 1987; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). A diferenciação de ancilostomatídeos e estrongiloides com base na morfologia é difícil, enquanto as larvas em estágio infectante são mais prontamente identificadas. Essas técnicas de cultura podem se revelar úteis na recuperação de larvas de *Strongyloides*, as quais podem estar presentes em pequena quantidade, e para diferenciá-las dos ancilostomídeos. Em todos os métodos de cultura, as fezes são incubadas em um ambiente úmido para estimular a eclosão dos ovos. Nas técnicas de cultura de Harada-Mori e de papel filtro/inclinada, as larvas migram das fezes para a fase aquosa, onde podem ser detectadas de imediato. Na cultura em carvão, as larvas migram primeiramente para uma gaze umedecida que, então, é colocada na água para permitir a precipitação das larvas.

A técnica do funil de Baermann é um método sensível e confiável para a recuperação de *Strongyloides* e outras larvas de nematódeos a partir de uma amostra de fezes. Nesse exame, as fezes são colocadas em várias camadas de gaze no alto de uma malha metálica que é suspensa em um funil. A base do funil é pinçada e adiciona-se água até o nível da gaze. As larvas migram ativamente através da gaze e precipitam na base do funil, onde podem ser coletadas para exame. A recuperação de larvas pode ser melhor do que nas técnicas de cultura, pelo fato de uma maior quantidade de fezes ser examinada. Na infecção latente por *Strongyloides*, na qual poucas larvas são eliminadas, vários exames ao longo de uma semana podem ser necessários para possibilitar a identificação da infecção (Ash, 1987; Garcia, 2003).

Objetos semelhantes a parasitas entéricos

Uma grande variedade de objetos que se assemelham muito a vários estágios do ciclo de vida de parasitas pode ser observada nas fezes e em outras amostras enviadas para a pesquisa de ovos e parasitas. Uma diferenciação cuidadosa desses objetos de parasitas reais é necessária para prevenir o tratamento inadequado ou desnecessário. Células sanguíneas, macrófagos e células epiteliais escamosas e colunares podem se assemelhar a amebas; fungos e grânulos de amido podem se assemelhar a cistos de protozoários; pólens e conídios fúngicos podem se assemelhar a ovos de helmintos; fibras vegetais podem se assemelhar a larvas de nematódeos; e pedaços de vegetais ou pele de vegetais podem se assemelhar a vermes adultos ou proglotes (Tab. 61.4). Exemplos de artefatos e pseudoparasitas podem ser revistos em outros textos (Ash, 1997; Garcia, 2001; Isenberg, 2004; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Tabela 61.4 Objetos recuperáveis a partir das fezes, que se assemelham a parasitas entéricos

Tipo de artefato	Semelhança
Neutrófilos	Cistos de *Entamoeba histolytica*
Macrófagos	Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*
Células epiteliais colunares	Trofozoítos de ameba
Células epiteliais escamosas	Trofozoítos de ameba
Fungos	Cistos de protozoário (especialmente *Endolimax nana*)
Conídeos	Ovos de helminto
Esporos de fungos	Ovos de helminto
Células vegetais	Cistos de protozoário, ovos de helminto
Pelos vegetais	Larvas de nematódeo
Grãos de pólen	Ovos de helminto (*Ascaris* ou *Taenia*)
Diatomáceas	Ovos de helminto
Grânulos de amido, glóbulos de gordura, bolhas de ar, muco	Cistos de protozoário
Ovo de ácaros ingeridos	Ovos de helminto
Ovos de nematódeos vegetais ingeridos	Ovos de helminto
Larvas de nematódeos vegetais ingeridos	Larvas de nematódeos

Adaptado de Isenberg HE (ed.): Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vols 1 and 2, 2nd ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2004.

Exame de amostras urogenitais e outras (escarro, aspirados, biópsias)

Amostras de secreções vaginais e uretrais, secreções prostáticas ou urina podem ser enviadas ao laboratório para a detecção de *Trichomonas vaginalis*. O método mais rápido e econômico é a preparação de várias lâminas para exame a fresco, utilizando uma gota da amostra (a urina deve ser centrifugada) diluída com uma gota de soro fisiológico, a qual é coberta com uma lamínula. A lâmina é examinada com uma objetiva de menor aumento (10x), com redução da iluminação para trofozoítos móveis, os quais apresentam um movimento irregular. O exame com objetiva de maior aumento pode revelar o flagelo pulsátil e a membrana ondulante, característica da espécie. Quando necessário, o uso de técnicas de cultura, anticorpos fluorescentes e sonda de DNA aumenta a sensibilidade (Briselden, 1994). A demonstração da resistência ao fármaco imidazol exige a realização de cultura (Meri, 2000).

Alguns parasitas protozoários e helmintos podem ser detectados no escarro e a técnica adequada de exame depende do organismo suspeito. Em geral, a técnica requerida para a detecção de um parasita de seu local usual de infecção é aplicada para o escarro e, mais comumente, envolve o exame a fresco. Quando há suspeita de ameba, colorações permanentes devem ser realizadas. As colorações acidorresistentes ou com anticorpo específico são adequadas para o *Cryptosporidium*, enquanto a coloração tricrômica modificada ou com fluorocromo deve ser utilizada para a detecção de esporos de microsporídios. Técnicas de identificação de *Pneumocystis jiroveci* (antigamente denominado *Pneumocystis carinii*) são descritas em outros textos.

O exame de aspirados requer o uso de colorações adequadas para o organismo implicado. Além dos métodos utilizados para escarro, a coloração de Giemsa é, com frequência, adequada ao se pesquisar a presença de protozoários, especialmente os hemoflagelados. Material de biópsia deve ser submetido ao exame histológico de rotina depois de serem preparados *imprints* para coloração de Giemsa ou outro corante permanente adequado. A cultura para leishmanias e tripanossomas também pode ser realizada em tecidos e pode ser importante para se demonstrar a presença dessas infecções. Para a inspeção de microfilárias, biópsias de pele para a pesquisa de *Onchocerca* ou *Mansonella* devem ser divididas em soro fisiológico, o qual deve ser examinado após um intervalo de 30 a 60 minutos. A biópsia de músculo para a pesquisa de larvas de *Trichinella spiralis* pode ser examinada comprimindo a amostra fresca entre duas lâminas de vidro ou o material pode ser encaminhado para a realização do exame histológico de rotina. Da mesma maneira, biópsias retais ou vesicais podem ser examinadas em busca de ovos de esquistossoma.

Técnicas de cultura de parasitas

Métodos de cultura foram descritos para uma ampla variedade de parasitas protozoários, mas poucos laboratórios os realizam por causa das poucas solicitações e da infamiliaridade com os mesmos. Quando uma solicitação de cultura é feita, em geral é para a pesquisa de *T. vaginalis*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *E. histolytica*, *Acanthamoeba* spp. ou *Naegleria fowleri*. Além disso, laboratórios de virologia ocasionalmente recebem solicitações de cultura para *T. gondii*. Os métodos são revistos em outros textos (Ash, 1987; Fritsche, 1989a; Garcia, 2001; Isenberg, 2004; Murray, 2003; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Métodos imunodiagnósticos

Várias metodologias imunodiagnósticas estão disponíveis para a identificação de antígenos de parasitas ou de anticorpos produzidos em resposta à infecção parasitária. Alguns dos sinais são amplificados enquanto outros são métodos de detecção direta. Em geral, os métodos laboratoriais utilizados são o imunoensaio enzimático (EIA, *enzyme immunoassay*), o ensaio por imunofluorescência (IF, *immunofluorescence assay*), a pesquisa de anticorpo por fluorescência direta, o Western blot, o radioimunoensaio e a imunodifusão, entre outros.

Detecção de antígeno

Métodos de detecção de antígeno estão disponíveis comercialmente para várias doenças parasitárias, incluindo amebíase, criptosporidíase, giardíase, malária e tricomoníase (Tab. 61.5), e esses métodos podem ser úteis para a investigação inicial ou naqueles casos em que os exames tradicionais são negativos, mas cujo índice de suspeita clínica permanece alto. Esses exames apresentam a vantagem de detectar infecção atual e também podem ser realizados por outra pessoa que não um morfologista experiente (Wilson, 1995).

A detecção de antígeno em amostras de fezes é usualmente realizada utilizando imunoensaios fecais. Alguns estudos publicados sugeriram que esses ensaios apresentam boa sensibilidade e especificidade quando comparados com o exame de rotina de pesquisa de ovos e parasitas (Aldeen, 1995; Kehl, 1995; Zimmerman, 1995; Maraha, 2000; Hanson, 2001; Garcia, 2003). Esses imunoensaios são de fácil utilização, rápidos, permitem o processamento em lote e não exigem microscopistas experientes. Considerando-se a falta anual de técnicos e de indivíduos com treinamento especializado em parasitologia, o uso de imunoensaio parece ser uma alternativa atrativa. No entanto, laboratórios que usam imunoensaios rápidos devem ter consciência dos problemas possíveis com resultados falso-positivos e devem monitorar com atenção o desempenho do teste. Atualmente, são comercializados imunoensaios fecais para os protozoários *G. lamblia*, *C. parvum/C. hominis*, *E. histolytica* e o grupo da *E. histolytica/E. dispar*. Também estão disponíveis testes de detecção de antígeno utilizando sangue ou soro para *Plasmodium* spp. e *W. bancrofti*. Um teste de aglutinação do látex para o antígeno do *T. vaginalis* em *swabs* vaginais também foi introduzido recentemente. Estão sendo desenvolvidos outros kits comerciais para a detecção de *Dientamoeba fragilis* e microsporídios. Imunoensaios estão disponíveis em três formatos: EIA, fluorescência direta e fluxo lateral (imunocromatografia). Amostras de fezes frescas ou preservadas são adequadas para a maioria dos kits para detecção de antígeno (Fedorko, 2000). Embora cada kit possua características operacionais próprias, a maioria geralmente apresenta um desempenho comparável (Garcia, 2000, 2003; Katanik, 2001).

Métodos de detecção rápida de antígeno para malária detectam a proteína II rica em histidina (HRP-II) e/ou a lactato desidrogenase do parasita (pLDH) no sangue periférico. Os testes de HRP-II são específicos para *Plasmodium falciparum* enquanto os testes de pLDH detectam as quatro espécies de *Plasmodium* spp. A sensibilidade desses ensaios é comparável ou inferior ao exame microscópico tradicional, mas apresentam sensibilidade superior a 90%. Até o momento, esses testes não foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para diagnóstico clínico da malária nos Estados Unidos.

A detecção de antígenos do *T. vaginalis* em amostras vaginais também pode ser realizada utilizando testes rápidos antígeno. Esses exames podem ser utilizados para a detecção rápida de infecção por *T. vaginalis* no ambiente clínico e podem substituir o exame a fresco, o

Tabela 61.5 Ensaios de detecção baseados em antígenos de parasitas

Analisado	Sistema de teste	Fabricante/ distribuidor	Formato
Cryptosporidium spp.	Xpect® Cryptosporidium	Remel	Cartucho
	Cryptosporidium	Wampole	EIA
	Crypto Cel	CeLLabs	IF
	ProSpecT Cryptosporidium	Remel	EIA
	Cryptosporidium TEST	TechLab	EIA
	Crypto CELISA	CeLLabs	EIA
	PARA-TECT® Cryptosporidium	Medical Chemical Co.	EIA
Giardia lamblia	ProSpecT Giardia Rapid Assay	Remel	Cartucho
	Giardia Cel	CeLLabs	IF
	Xpect® GIARDIA	Remel	Cartucho
	ProSpecT® Giardia	Remel	EIA
	PARA-TECT® Giardia	Medical Chemical Co.	EIA
	GIARDIA II	TechLab	EIA
	GiardEIA®	Antibodies	EIA
	Giardia CELISA	CeLLabs	EIA
	Giardia	Wampole	EIA
Entamoeba histolytica	*E. histolytica*	Wampole	EIA
	Entamoeba CELISA PATH	CeLLabs	EIA
	E. histolytica II	TechLab	EIA
Cryptosporidium/ Giardia	Xpect Giardia/ Cryptosporidium	Remel	Cartucho
	Immunocard STAT Cryptosporidium/Giardia	Meridian Bioscience	Cartucho
	MERIFLUOR Cryptosporidium/Giardia	Meridian Bioscience	IF
	Crypto Giardia IFD	IVD Research Inc	IF
	Crypto/Giardia Cel	CeLLabs	IF
	PARA-TECT® Cryptosporidium/Giardia DFA	Medical Chemical Co.	IF
	ColorPAC® Giardia/Cryptosporidium	Becton Dickinson	Cartucho
	ProSpecT Giardia/Cryptosporidium	Remel	EIA
Combinação de *G. lamblia*, *C. parvum* e *E. histolytica/ dispar*	Biosite Triage Parasite Panel	Biosite Diagnostics	Cartucho
Plasmodium spp.	NOW Malaria test	Binax	Cartucho
	OptiMAL	Flow	Vareta medidora de nível
	Paracheck Pf	Orchid	Cartucho
	Rapimal MT Pf	CeLLabs	Vareta medidora de nível
Wuchereria bancrofti	NOW Filariasis	Binax	Cartucho
	Filariasis -CELISA	CeLLabs	EIA
Trichomonas vaginalis	Light Diagnostic *T. Vaginalis*	Chemicon	IFD
	OSOM Trichomonas Rapid Test	Genzyme	Vareta medidora de nível
	XenoStrip-Tv®	Xenotope Diagnostics	Cartucho

Cartucho, cartucho de fluxo lateral; IFD, imunofluorescência direta; EIA, ensaio imunoenzimático; vareta medidora de nível, imunoensaio enzimático da vareta medidora de nível; IF, imunofluorescência.

qual geralmente apresenta menor sensibilidade, dependendo da capacitação do pessoal que realiza a análise microscópica. Miller et al. demonstraram que o teste rápido de antígeno para *T. vaginalis* apresenta sensibilidade comparável ao de cultura (Miller, 2003).

A maioria dos imunoensaios enzimáticos está disponível sob o formato de *microwells* (poços aglomerados). O antígeno de amostras de fezes frescas congeladas preservadas em formalina 10% é adequado para testes com essa metodologia. Amostras concentradas ou em PVA não são adequadas para testes com kits de EIA. O antígeno do parasita é capturado por anticorpos imobilizados revestidos em *microwells* e detectado por um anticorpo secundário conjugado à enzima que é capaz de produzir uma reação colorida após a adição do substrato. Embora os poços coloridos possam ser lidos visualmente ou com o uso de espectrometria, essa parece ser a opção preferida por causa de resultados ambíguos ocasionais obtidos com alguns kits (Kehl, 1995). Em geral, testes de EIA apresentam boa sensibilidade e especificidade. Garcia et al. avaliaram nove kits de imunoensaio para detecção de *G. lamblia* e *Cryptosporidium* spp. em comparação com um teste de fluorescência direta de referência, que visualiza o parasita diretamente na amostra, e observaram que todos os kits apresentam alta sensibilidade, variando de 94 a 99%, e uma especificidade de 100% (Garcia, 1997, 2003). Entretanto, artigos publicados sugeriram a ocorrência de problemas ocasionais com alguns kits de EIA que podem produzir resultados falso-positivos e que levaram ao seu *recall* (Doing, 1999). Por essa razão, um forte programa de controle de qualidade e a participação de programas de teste de proficiência são necessários para garantir a alta qualidade dos resultados dos testes. A epidemiologia local das infecções parasitárias pode ajudar a determinar a necessidade de exames confirmatórios adicionais. A consulta ao serviço de saúde pública local pode ajudar na identificação de quais infecções são observadas localmente. Além disso, para algumas doenças como a giardíase, o exame de duas amostras por EIA ou a microscopia podem ser necessários para a obtenção de uma sensibilidade diagnóstica superior a 90% (Hanson, 2001).

Testes de fluxo lateral representam um tipo popular de imunoensaio por causa da facilidade de sua utilização e do tempo mínimo necessário para a sua realização. Esses kits podem ser armazenados convenientemente em temperatura ambiente e podem ser utilizados no processamento em grupo ou em lote. O antígeno do parasita na amostra migra por meio da membrana e liga-se a anticorpos de captura específicos. O uso de um segundo reagente resulta no desenvolvimento de uma reação colorida. Esses kits também possuem um controle interno para garantir que os conjugados do corante coloidal utilizados no ensaio estejam intactos e que o fluxo capilar adequado ocorreu. Para garantir a migração completa da amostra, somente o sobrenadante de uma amostra bem misturada de fezes é utilizado, embora algumas amostras possam ser liquefeitas antes dos testes. Qualquer cor visível na zona reagente do teste (usualmente uma banda) é interpretada como positiva. Alguns estudos demonstraram que os testes de fluxo lateral são menos sensíveis que os EIAs com *microwells* (Pillai, 1999; Johnston, 2003). Nessa situação, pode ser necessário realizar outras pesquisas de ovos e parasitas se os sintomas do paciente persistirem.

O teste de fluorescência direta permite a visualização direta dos parasitas na amostra de fezes utilizando anticorpos conjugados a corantes fluorescentes. Esses ensaios são de fácil realização e interpretação, permitindo a investigação rápida de lâminas em comparação com algumas das colorações tradicionais utilizadas na parasitologia (Zimmerman, 1995; Garcia, 2001, 2003). Um microscópio fluorescente é necessário para o procedimento, o que é um fator limitante em alguns laboratórios. Atualmente, existem kits para a detecção de cistos de *G. lamblia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Amostras fixadas de fezes podem ser utilizadas nesse procedimento (formalina 10%, SAF ou ECOFIX; Fedorko, 2000). Embora amostras de fezes frescas possam ser testadas diretamente, a sensibilidade do ensaio pode ser aumentada realizando o teste com fezes centrifugadas (500 *g* durante 10 minutos). Às vezes, bactérias e fungos fluorescentes podem ser observados, mas eles são imediatamente diferenciados da *Giardia* e do *Cryptosporidium* com base em seu tamanho e sua forma. As bordas dos poços devem ser examinadas com cuidado para se evitar que infecções leves passem despercebidas. Considerando o recente reconhecimento de outras espécies de *Cryptosporidium* spp. que podem infectar os humanos, estudos relacionando a especificidade de vários imunoensaios são necessários para se determinar a sensibilidade real na detecção da infecção por *Cryptosoporidium* (Graczyk, 1996; Coupe, 2005).

Diagnóstico sorológico

A Tabela 61.6 apresenta um resumo de testes sorológicos realizados por serviços públicos, hospitais ou laboratórios comerciais para detectar a reatividade imunológica a doenças parasitárias. Historicamente, os exames sorológicos para doenças parasitárias eram considerados de baixa sensibilidade e especificidade, principalmente por causa da natureza antigênica complexa dos parasitas e da possibilidade de reação cruzada entre espécies relacionadas. A introdução de novas metodologias de testes combinada com o uso de componentes antigênicos mais bem definidos tem fornecido resultados mais acurados com melhores valores preditivos. Muitos desses testes mais novos usam EIA ou immunoblot (Western blot), embora a imunofluorescência indireta, a hemaglutinação indireta, a fixação de complemento e a floculação de bentonita sejam métodos ainda populares.

O diagnóstico sorológico de infecção parasitária é utilizado como um adjuvante para as modalidades diagnósticas visuais ou em situações especiais em que a identificação do parasita em si, de seu antígeno ou do ácido nucleico do tecido do hospedeiro ou da excreção não é possível. Infecções parasitárias, como a toxoplasmose e a toxocaríase, localizam-se em tecidos profundos e não podem ser imediatamente diagnosticadas pelos meios morfológicos. Outras infecções, como a cisticercose e a equinococose, desenvolvem-se em órgãos, em que estudos invasivos que podem ser necessários não são recomendados na avaliação inicial do paciente. Outras condições como a filaríase, a esquistossomose e a estrongiloidíase podem permanecer subclínicas por causa da infecção leve ou da avaliação inicial ser realizada durante o período pré-sintomático. Outras circunstâncias nas quais a avaliação sorológica pode se revelar útil são o diagnóstico de amebíase e triquinose extraintestinal. Os estágios crônicos da tripanossomíase também são preferivelmente diagnosticados pela sorologia. Estudos sorológicos também ajudam no diagnóstico de infecções ocultas, como larva migrans, cisticercose e filaríase visceral. Finalmente, estudos sorológicos servem como uma ferramenta poderosa para a compreensão da epidemiologia de doenças como esquistossomose, toxoplasmose, amebíase, doença de Chagas, malária e babesiose. Níveis altos de anticorpo são úteis para propósitos diagnósticos quando eles ocorrem em um paciente sem exposição prévia ao parasita ou história recente de viagem para uma área endêmica. Infelizmente, níveis positivos de anticorpo em uma pessoa que vive em

Tabela 61.6 Ensaios sorológicos para parasitas disponíveis em laboratórios de referência

Doença	Organismo	Tipo de amostra	Ensaio
Amebíase	*Entamoeba histolytica*	Soro	EIA, ID, IHA
Babesiose	*Babesia microti*, *Babesia* sp. WA1	Soro	IF
Chagas	*Trypanosoma cruzi*	Soro	IF, EIA, FC
Cisticercose	*Taenia solium*	Soro, LCE	EIA, IB
Equinococose	*Echinococcus granulosus*	Soro	EIA, IB, IHA, IF
Fasciolíase	*Fasciola hepatica*	Soro	EIA, IB
Filaríase	*Wuchereria bancrofti*	Soro	EIA
Leishmaniose	*Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*	Soro	IF, EIA, FC
Malária	*Plasmodium* spp.	Soro	IF
Paragonimíase	*Paragonimus westermani*	Soro	EIA, IB
Esquistossomose	*Schistosoma* spp.	Soro	EIA, IB
Estrongiloidose	*Strongyloides stercoralis*	Soro	EIA
Toxoplasmose	*Toxoplasma gondii*	LCE, soro	IF, EIA
Triquinelose	*Trichinella spiralis*	Soro	EIA, FB

FB: floculação de bentonita; FC, fixação de complemento; EIA, imunoensaio enzimático; IB, *immunoblot*; ID, imunodifusão; IHA, hemaglutinação indireta.

uma área endêmica com frequência não ajudam no diagnóstico clínico. A detecção de anticorpos, em especial de IgG, indica evidência de infecção, mas pode não ser capaz de diferenciar um processo ativo de uma exposição passada. Em algumas doenças parasitárias, os níveis de anticorpos podem diminuir lentamente após a terapia bem-sucedida ou a autocura. Exames sorológicos para doenças parasitárias, em geral, avaliam o nível de IgG, exceto no caso de toxoplasmose e babesiose, em que os níveis de anticorpos específicos IgM e IgA podem ser úteis para se determinar a idade da infecção (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004).

Como exames sorológicos para doenças parasitárias não são com frequência solicitados, amostras são geralmente enviadas para laboratórios de saúde pública (Centers for Disease Control and Prevention [CDC]) ou de referência privados. Alguns dos exames mais solicitados, em especial aqueles existentes sob a forma de kits comerciais, com frequência estão disponíveis localmente, incluindo os para toxoplasmose, amebíase e triquinose.

Muitos desses ensaios são desenvolvidos *in-house* e, por essa razão, não apresentam correlação com os padrões universais. Os critérios de interpretação são estabelecidos pelos fabricantes de reagentes ou pelo centro que realiza o teste e, frequentemente, esses testes variam de instituição a instituição. Quem solicitar esses tipos de testes deve questionar sobre as características do desempenho, incluindo a sensibilidade e a especificidade, e deve estar consciente de que podem ocorrer reações cruzadas. Por exemplo, sabe-se que testes de anticorpos para doença de Chagas podem reagir de forma cruzada com anticorpos produzidos em resposta a infecções por *Leishmania*. No entanto, a reatividade ao antígeno homólogo é mais elevada e esse teste é útil no diagnóstico de estágios crônicos da doença quando a parasitemia é, em geral, baixa. Usualmente, a sorologia para a doença de Chagas apresenta uma boa correlação com os métodos diagnósticos moleculares (Weinberg, 2001). É bem sabido que helmintos parasitas reagem de forma cruzada em ensaios sorológicos que utilizam preparações brutas de antígeno por causa das similaridades filogenéticas e, consequentemente, antigênicas.

Vários fatores que podem influenciar o desempenho de ensaios sorológicos incluem a manifestação da doença, o formato do teste, os reagentes utilizados e a viabilidade do parasita, para mencionar apenas alguns. Na amebíase, a sensibilidade do teste aumenta em pacientes com amebíase invasiva, mas ela pode ser baixa na amebíase intestinal com invasão tissular mínima e nula em portadores assintomáticos. O formato do ensaio sorológico também pode determinar a sensibilidade, como no diagnóstico da toxoplasmose (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). O imunoensaio enzimático ligado à enzima (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) para IgM é sabidamente mais sensível e específico que a pesquisa de IgM por imunofluorescência na detecção de toxoplasmose recém-adquirida e congênita. A hemaglutinação indireta foi o primeiro teste para o diagnóstico sorológico da amebíase. A sensibilidade do ensaio também depende do tipo de antígeno do parasita utilizado. Por exemplo, a sensibilidade da leishmaniose cutânea pode ser aumentada com o uso de antígenos de amastigotos no lugar de antígenos de promastigotos na imunofluorescência. Ensaios sorológicos também são afetados pela viabilidade do parasita. Cistos hidáticos pulmonares e cistos mortos ou calcificados são menos frequentemente detectados que cistos hepáticos ativos.

Métodos diagnósticos moleculares

Métodos diagnósticos utilizando as técnicas de amplificação de DNA e de onda de ácido nucleico têm sido descritos para a maioria das doenças parasitárias comuns e oferecem altos níveis de sensibilidade e especificidade (Weiss, 1995; Wilson, 1995). Para maiores detalhes sobre esse tópico, o leitor deve consultar uma publicação recente (Persing, 2004). Os métodos moleculares oferecem algumas vantagens únicas como, por exemplo, resultados rápidos (automatizados), alta sensibilidade e especificidade e capacidade de detectar e diferenciar variantes da espécie, todos independentes da condição imune do paciente, uma característica potencialmente limitante nos ensaios sorológicos. Entretanto, as técnicas moleculares apresentam propensão à contaminação cruzada se não forem seguidas de forma rígida as precauções adequadas para o processamento.

Embora a maioria desses procedimentos permaneça sendo uma ferramenta para laboratórios de pesquisa e não esteja disponível rotineiramente, vários ensaios de reação de cadeia de polimerase (PCR) foram desenvolvidos para parasitas, como *Plasmodium* spp., *Babesia* spp., *T. gondii*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *T. vaginalis* (Tab. 61.7). Alguns desses ensaios estão disponíveis no formato *real-time*, no qual a cinética da reação de amplificação do ácido nucleico é registrada e analisada por algoritmos computadorizados que permitem a detecção de *amplicons*. Na última década, vários métodos de PCR *real-time* foram desenvolvidos para o diagnóstico clínico de algumas doenças parasitárias (Tab. 61.7). A introdução dessa tecnologia permitiu a detecção rápida e evitou o medo de contaminação cruzada em virtude das etapas envolvidas na análise pós-amplificação. A PCR também apresenta a oportunidade para monitorar o sucesso da terapia antiparasitária (Lee, 2002; Bossolasco, 2003) ou detectar a reativação após terapia (Costa, 2000). Pelo fato de a natureza inata dos métodos moleculares ser genotípica, os ensaios de PCR têm a capacidade de detectar acuradamente até o nível da espécie, dependendo do gene que for visado pelo exame (Vallejo, 1999; Mahboudi, 2002). Até o momento, o equipamento e os outros recursos necessários, incluindo o pessoal treinado em biologia molecular, permanecem fora do alcance da maioria dos laboratórios comerciais por causa das limitações fiscais. Embora existam vários kits diagnósticos disponíveis no comércio para a detecção de patógenos virais ou bacterianos, somente um kit foi aprovado para a pesquisa de parasitas. O kit aprovado é para *T. vaginalis* (Briselden, 1994). Métodos moleculares podem ter uma grande importância na identificação de vetores e contribuem para a prevenção de doenças por meio de programas de controle focados nesses vetores (Weiss, 1995).

Controle de qualidade, melhoria de qualidade e segurança

Um programa de controle de qualidade para o setor de parasitologia de um laboratório é similar ao dos outros setores e cobre todos os aspectos essenciais da operação, incluindo, entre outros, um manual de procedimento completo bem redigido que é revisto anualmente; as diretivas para a manutenção de amostras e os registros de resultados; o programa de controle de qualidade total com a supervisão técnica adequada e a revisão; e a participação em um programa aprovado para testes de proficiência. Os laboratórios também devem focar a atenção na satisfação do cliente, utilizando várias medidas disponíveis, e participar da abordagem em equipe para a identificação de problemas e a geração de soluções como parte de um processo contínuo de melhoria da qualidade.

O desempenho dos indivíduos responsáveis pelo setor de parasitologia deve ser monitorado periodicamente com amostras desconhecidas

Tabela 61.7 PCR em tempo real para detecção de parasitas

Parasita	Alvo	Tipo de amostra	Referência
Leishmania spp.	rDNA	Sangue total	Bossolasco, 2003
Plasmodium spp.	rDNA	Sangue total	Lee, 2002, de Monbrison 2003; Farcas, 2004; Perandin, 2004
Toxoplasma gondii	rDNA e gene B1	Líquido amniótico, sangue, líquido cerebrospinal, tecido	Costa, 2000, 2001; Lin, 2000; Kupferschmidt, 2001; Buchbinder, 2003; Reischl, 2003
Entamoeba histolytica	rDNA	Fezes	Blessmann, 2002; Verweij, 2004
Giardia lamblia	rDNA	Fezes	Verweij, 2004
Cryptosporidium spp.	rDNA	Fezes	Fontaine, 2002; Coupe, 2005
Cyclospora spp.	rDNA	Fezes	Varma, 2003
Trichomonas vaginalis	Gene da β-tubulina	Amostras vaginais	Hardick, 2003

internas e externas e avaliações da competência devem ser atualizadas, em especial para aqueles laboratórios que encontram resultados positivos com pouca frequência. Vários materiais de referência devem estar disponíveis para uso imediato no laboratório, incluindo lâminas positivas e amostras fecais, atlas impressos e atlas de lâminas.

Amostras não preservadas para exame parasitológico devem ser consideradas potencialmente infectantes e todas as amostras de sangue e de líquidos corporais devem ser manipuladas de acordo com as precauções universais definida pela Final Rule on Blood-borne Pathogens, da Occupational Safety and Health Administration, publicada no Federal Register. Além dos patógenos virais hematogênicos, os parasitas da malária e hemoflagelados também podem permanecer infectantes. Vários parasitas podem permanecer infectantes em amostras de fezes frescas, incluindo cistos de protozoários entéricos, ovos de *Taenia solium*, *E. vermicularis* e *H. nana*, e larvas de *S. stercoralis*. *T. trichiura*, *Ascaris lumbricoides* e ancilostomatídeo podem permanecer infectantes em amostras mais velhas, e ovos de *Ascaris* podem sobreviver e embrionar em formalina a 5%. Amostras fecais também podem conter patógenos como *Salmonella*, *Shigella* ou vírus. A observância rigorosa das técnicas de manipulação adequada da amostra e de descarte é essencial. A atenção pessoal à lavagem das mãos também é necessária. O uso de etil acetato no lugar de éter na realização de técnicas de concentração é fortemente recomendado para a defesa contra a possibilidade de explosão (Truant, 1981; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Protozoários sanguíneos e tissulares

Malária

A malária (do italiano *mal' aria*, que significa "ar ruim") é uma infecção aguda, algumas vezes crônica, da corrente sanguínea, caracterizada clinicamente por febre, anemia e esplenomegalia, e é causada por parasitas apicomplexos do genêro *Plasmodium*. As características clínicas que definem uma crise de malária são, por ordem, calafrios com tremores, febre (até 40°C ou mais) e sudorese excessiva generalizada, seguido por desaparecimento da febre. A crise dura entre 6 e 10 horas e é iniciada pela ruptura sincrônica de eritrócitos, com liberação de novas formas infecciosas no estágio sanguíneo, conhecidas como merozoítos. A doença, em geral, ocorre entre 45°N e 40°S (Organização Mundial da Saúde, 1987) e é disseminada exclusivamente por fêmeas do mosquito *Anopheles*. As quatro espécies de plasmódios que causam a malária humana são *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. A infecção pelo *Plasmodium falciparum* ocorre principalmente em áreas tropicais de todo o mundo, enquanto que a infecção por *P. vivax* ocorre em zonas tropicais e temperadas. O *P. malariae* também ocorre no mundo inteiro, mas em uma extensão muito menor que o *P. falciparum* ou o *P. vivax*. O *P. ovale* é o menos frequente, com a maioria dos casos sendo adquirida no oeste africano, na Índia e na América do Sul.

Como a malária *falciparum* é potencialmente letal, a sua presença deve ser considerada no diagnóstico diferencial de febre inexplicada e a história de viagem para áreas endêmicas sempre deve ser investigada. Em uma época de aumento de viagens internacionais, o risco de adquirir malária não é insignificante e a disseminação rápida de cepas resistentes a fármacos apresenta problemas particulares ao se considerar a profilaxia ou a terapia adequada.

A avaliação laboratorial de pacientes com suspeita de malária continua a depender do exame, no momento adequado, de esfregaços de sangue espessos e delgados para demonstrar a presença de parasitas intraeritrocitários. Embora essas técnicas sejam diretas, a sua execução pode ser problemática. A identificação confiável de organismos requer um treinamento contínuo para manter a perícia e, por essa razão, os laboratórios que raramente realizam esses exames podem optar por encaminhar as amostras para laboratórios de referência desde que o momento para o processamento e a obtenção dos resultados seja adequado.

Métodos laboratoriais mais avançados, incluindo a coloração com acridina laranja (ver em "Métodos laboratoriais") ou a detecção de DNA específico do parasita (Lanat, 1989; Weiss, 1995; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005), apresentam uma maior sensibilidade e especificidade, mas eles geralmente não são adequados ou não estão disponíveis em laboratórios menores. O desenvolvimento recente de ensaios de imunocaptura para a detecção da lactato desidrogenase específica de *Plasmodium* ou HRP-II parece prover um alto grau de sensibilidade e de especificidade no diagnóstico da malária. Várias versões desses testes, configurados como métodos de "fita reagente", são especialmente promissoras em situações em que a facilidade de realização é crítica e os serviços laboratoriais usuais disponíveis não existem (Palmer, 1998; Piper, 1999; Marx, 2005).

Ciclo de vida

Os parasitas da malária passam por uma fase sexuada (esporogonia) em mosquitos *Anopheles*, que resulta na produção de esporozoítos infectantes, e uma fase assexuada (esquizogonia) nos humanos, que resulta na produção de esquizontes e merozoítos (Fig. 61.1). Na corrente sanguínea, alguns merozoítos acabam se diferenciando em gametócitos (gametogonia), os quais, quando ingeridos pela fêmea do *Anopheles*, amadurecem nos microgametas masculinos e nos macrogametas femininos. A fusão do microgameta e do macrogameta resulta na formação do oocineto móvel, o qual migra para o exterior da parede do estômago e forma um oocisto. No oocisto, numerosos esporozoítos fusiformes são formados. O oocisto maduro rompe na cavidade corporal, liberando os esporozoítos, os quais migram pelos tecidos até as glândulas salivares, a partir das quais eles são injetados no hospedeiro vertebrado quando o mosquito se alimenta. O tempo necessário para o desenvolvimento no mosquito varia de 8 a 21 dias.

Os esporozoítos injetados no hospedeiro vertebrado atingem as células parenquimatosas hepáticas em minutos e iniciam a fase proliferativa, conhecida como esquizogonia exoeritrocítica. A liberação de merozoítos dos esquizontes hepáticos rompidos inicia a infecção sanguínea ou a esquizogonia eritrocítica e, finalmente, os sintomas clínicos da malária. O *P. vivax* e o *P. ovale* diferem do *P. falciparum* e do *P. malariae* porque recaídas verdadeiras da doença causada pelas primeiras espécies podem ocorrer semanas a meses após crises anteriores. Isso ocorre em razão da nova esquizogonia exoeritrocítica e eritrocítica de esporozoítos hepáticos latentes, os quais são conhecidos como hipnozoítos (Krotoski, 1982). Recorrências da doença devida ao *P. falciparum* ou ao *P. malariae*, denominadas recrudescências, ocorrem em virtude do aumento da quantidade de formas sanguíneas persistentes em níveis detectáveis clinicamente, e não por causa da persistência de formas do estágio hepático. As células hepáticas são infectadas apenas pelos esporozoítos do mosquito. Portanto, a infecção por *P. vivax* ou *P. ovale* adquirida por transfusão não apresenta recaída.

Os merozoítos liberados dos hepatócitos infectados contaminam subsequentemente os eritrócitos. Após a amplificação de parasitas na corrente sanguínea por um período de tempo e o desenvolvimento de sincronia de seu aparecimento, ocorrem crises clínicas de malária. O *P. vivax* e o *P. ovale* infectam primeiro eritrócitos jovens, enquanto que o *P. malariae* infecta eritrócitos mais velhos e o *P. falciparum* infecta eritrócitos de todas as idades.

Estágios morfológicos observados em eritrócitos incluem trofozoítos (formas em crescimento), esquizontes (formas em divisão) e gametócitos (formas sexuadas) (Figs. 61.2 a 61.5). Os trofozoítos mais jovens apresentam uma forma globosa com um vacúolo central, uma massa vermelha de cromatina e um citoplasma azul. Em esfregaços de sangue corados, trofozoítos jovens assemelham-se a anéis de sinete e geralmente são designados como anéis ou formas em anel. Trofozoítos em crescimento além do estágio de anel retêm uma única massa de cromatina, mas apresentam citoplasma mais abundante, o qual pode ter um aspecto compacto ou ameboide (irregular). Trofozoítos maduros ainda apresentam apenas uma massa de cromatina, mas uma maior quantidade de citoplasma que preenche parcialmente o eritrócito. O pigmento hemozoína (hematina), um produto de degradação da hemoglobina, é característico de todos os eritrócitos que contêm formas maduras de parasitas da malária, mas não é evidente nas formas em anel. Esquizontes imaturos apresentam duas ou mais massas de cromatina e citoplasma não dividido, enquanto esquizontes maduros apresentam citoplasma e cromatina completamente divididos, de modo que merozoítos individuais são evidentes. O esquizonte maduro rompe o eritrócito, liberando os merozoítos e iniciando um novo ciclo de infecção. O ciclo eritrocítico leva cerca de 48 horas (forma terçã) para infecções por *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. vivax*, e 72 horas (forma quartã) para infecções por *P. malariae*. Em algum ponto durante a infecção, uma subpopu-

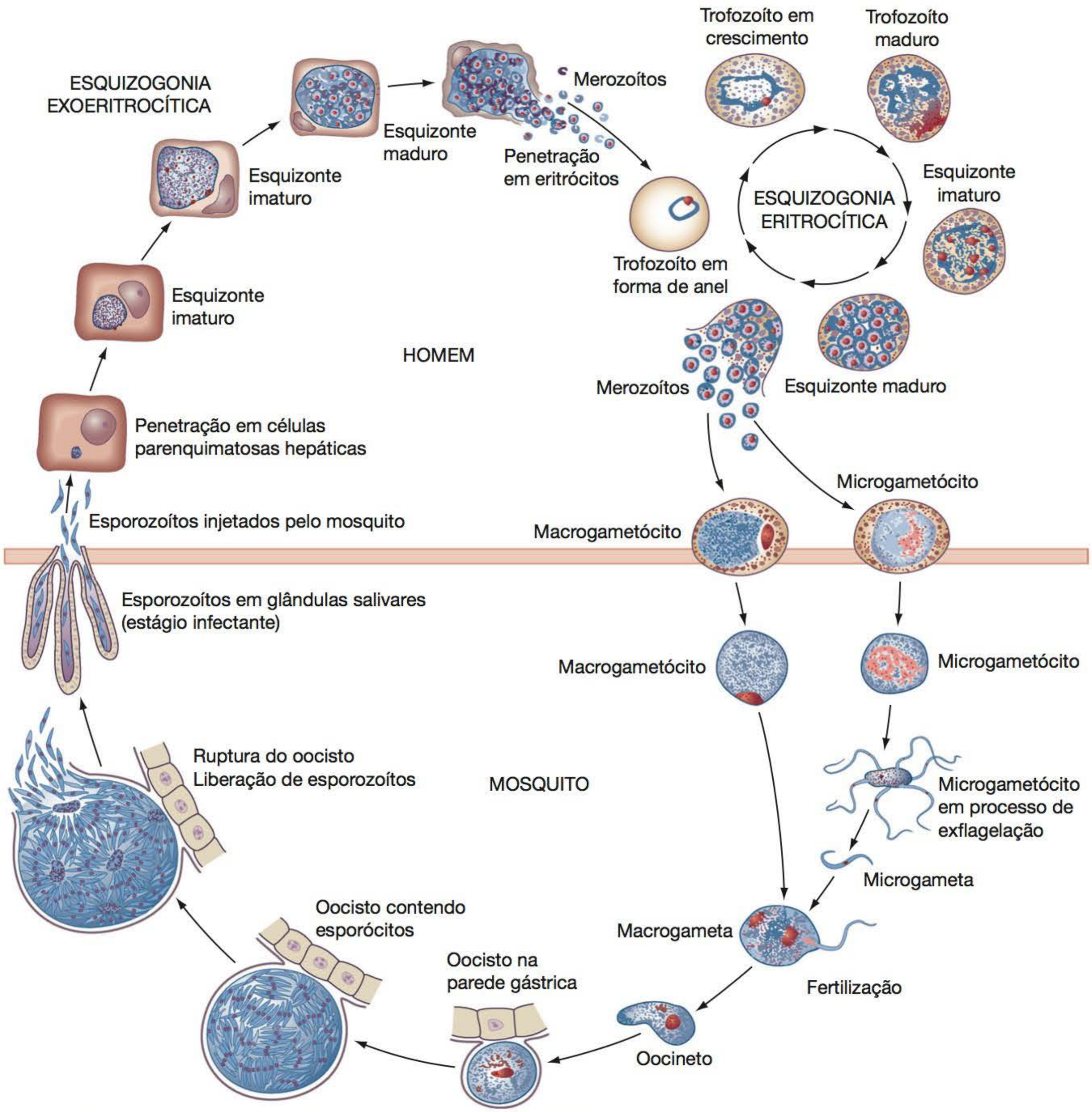


Figura 61.1 Ciclo de vida de parasitas da malária. (Cortesia do Centers for Disease Control, Parasitology Training Branch, Atlanta, GA.)

lação de merozoítos evolui para gametócitos. Aqueles do *P. vivax*, do *P. malariae* e do *P. ovale* são arredondados, enquanto que os do *P. falciparum* são alongados (em forma de salsicha). Os macrogametócitos (fêmeas) caracteristicamente apresentam uma massa compacta de cromatina, enquanto que os microgametócitos (machos) apresentam uma cromatina mais dispersa. Os gametócitos em desenvolvimento são mais compactos que os trofozoítos em crescimento.

Epidemiologia

A transmissão endêmica da malária requer um reservatório de infecção, um mosquito vetor adequado e um hospedeiro susceptível. O controle da malária é direcionado para a eliminação dos hospedeiros do mosquito, o tratamento dos casos ativos e a profilaxia das pessoas susceptíveis. Entretanto, o aparecimento de mosquitos resistentes aos inseticidas, o desenvolvimento de resistência à profilaxia e à terapia pelo *P. falciparum* e, recentemente, pelo o *P. vivax* (Murphy, 1993), e a falta de fundos adequados tornam o controle difícil em muitas áreas.

Indivíduos da raça negra com traço falciforme são menos susceptíveis à malária causada pelo *P. falciparum*, e indivíduos que não apresentam certos determinantes do grupo sanguíneo Duffy são protegidos contra infecções por *P. vivax* (Miller, 1976). A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi associada à proteção contra a malária, mas as evidências são menos impressionantes que as de outras anormalidades genéticas.

A malária induzida pela transfusão pode ocorrer quando doadores de sangue apresentam a malária subclínica e ela pode ser fatal para o receptor. Similarmente, a malária congênita pode ocorrer em crianças nascidas de mães de áreas endêmicas. A criança adquire a infecção ao nascimento, como resultado da ruptura de vasos sanguíneos placentários, acarretando uma transfusão materno-fetal. Não é esperada a recorrência da malária transfusional ou da malária congênita porque a esquizogonia exoeritrocítica não ocorre. O número de casos de malária notificados nos Estados Unidos aumentou de 151 em

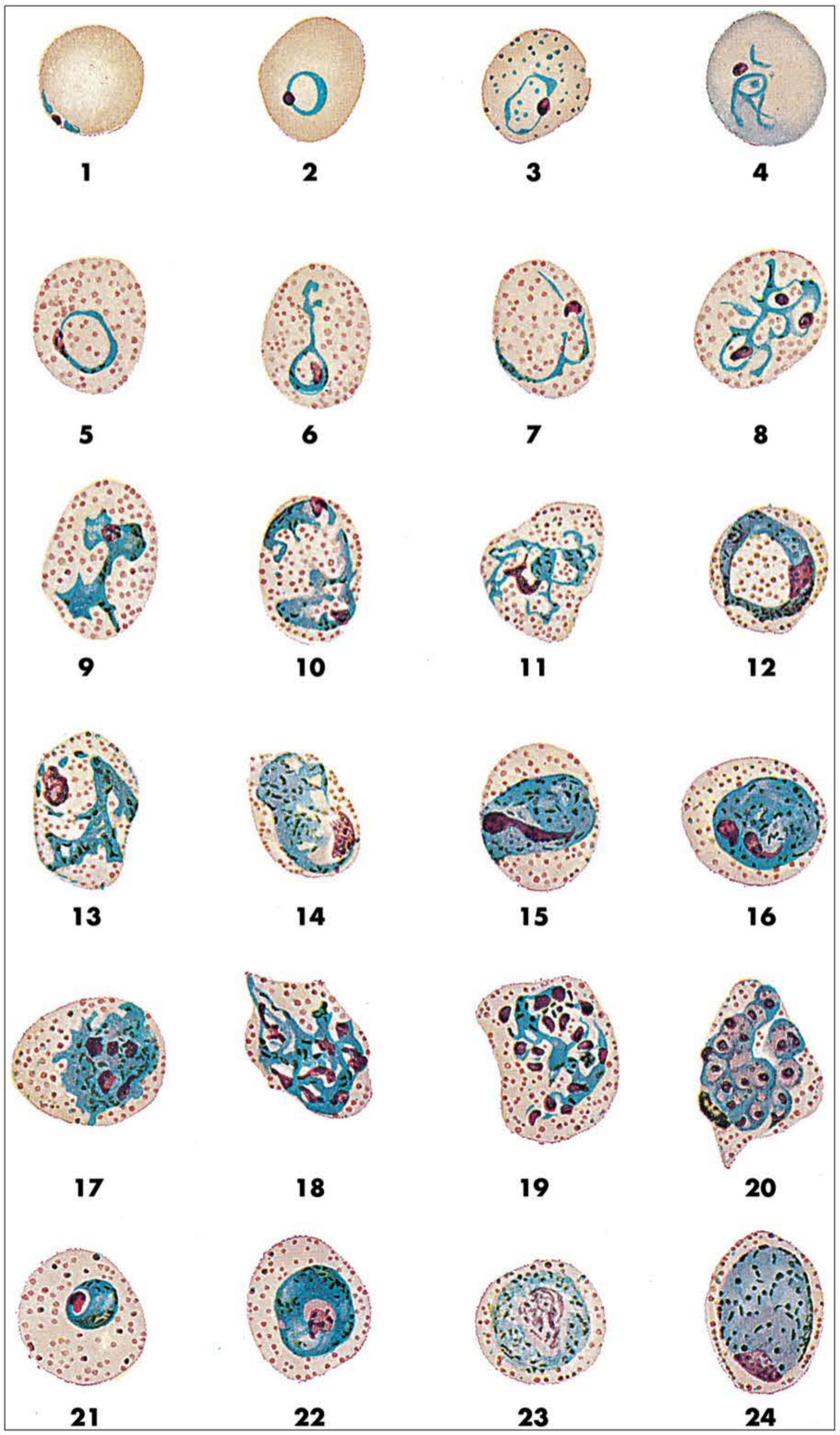


Figura 61.2 *Plasmodium vivax*. *1*, Eritrócito de tamanho normal com trofozoíto marginal em forma de anel. *2*, Forma de anel em sinete de trofozoíto no macrócito. *3*, Trofozoíto em forma de anel um pouco mais velho no eritrócito, apresentando pontilhado basófilo. *4*, Eritrócito policromatófilo contendo parasita terçã jovem com pseudópodos. *5*, Trofozoíto em forma de anel, apresentando pigmento no citoplasma de uma célula aumentada de volume, contendo pontilhado de Schüffner. Esse pontilhado não aparece em todas as células que contêm *Plasmodium vivax* em crescimento e formas mais velhas, mas ele pode ser observado em qualquer estágio da forma em anel bem jovem em diante. *6* e *7*, Formas de trofozoíto médio muito tênues. *8*, Três trofozoítos ameboides com citoplasma fundido. *9* a *13*, Trofozoítos ameboides mais velhos em processo de desenvolvimento. *10*, Dois trofozoítos ameboides em uma célula. *14*, Trofozoíto maduro. *15*, Trofozoíto maduro com cromatina aparentemente em processo de divisão. *16 a 19*, Esquizontes apresentando etapas progressivas de divisão (esquizontes pré-segmentados). *20*, Esquizonte maduro. *21* e *22*, Gametócitos em desenvolvimento. *23*, Microgametócito maduro. *24*, Macrogametócito maduro. (De Wilcox A: Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. Bulletin No. 180, National Institute of Health, 1942).

1970 para 1.838 em 1980, mas caiu para 1.411 em 1993 (Centers for Disease Control and Prevention, 1988, 1993). As espécies causadoras da infecção em 1987 foram o *P. vivax* (44%), *P. falciparum* (43%), *P. malariae* (4%), *P. ovale* (3%) e indeterminada (6%). O intervalo entre a chegada aos Estados Unidos e o início da doença foi inferior a um mês para 25% dos casos causados pelo *P. vivax* e 80% dos casos causados pelo *P. falciparum*. Somente 3% dos pacientes adoeceu mais de 1 ano após a sua chegada. Cidadãos norte-americanos adquiriram a infecção na África (63%), na Ásia (18%), no hemisfério ocidental (14%) e na Oceania (4%).

Doença clínica

A maioria dos pacientes que desenvolve a infecção pelo *P. falciparum* se torna sintomática nos 30 dias que sucedem a exposição, enquanto que, com outras espécies de *Plasmodium*, pode haver um retardo de até 6 meses ou mais. Os sintomas comuns iniciais da malária incluem febre e calafrios, com frequência associados à esplenomegalia. Nos estágios iniciais da doença, os episódios febris ocorrem irregularmente, mas acabam se tornando mais sincrônicos, assumindo a periodicidade terçã (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*) ou quartã (*P. malariae*). Pacientes com malária que desenvolvem anemia podem apresentar outras manifestações, incluindo

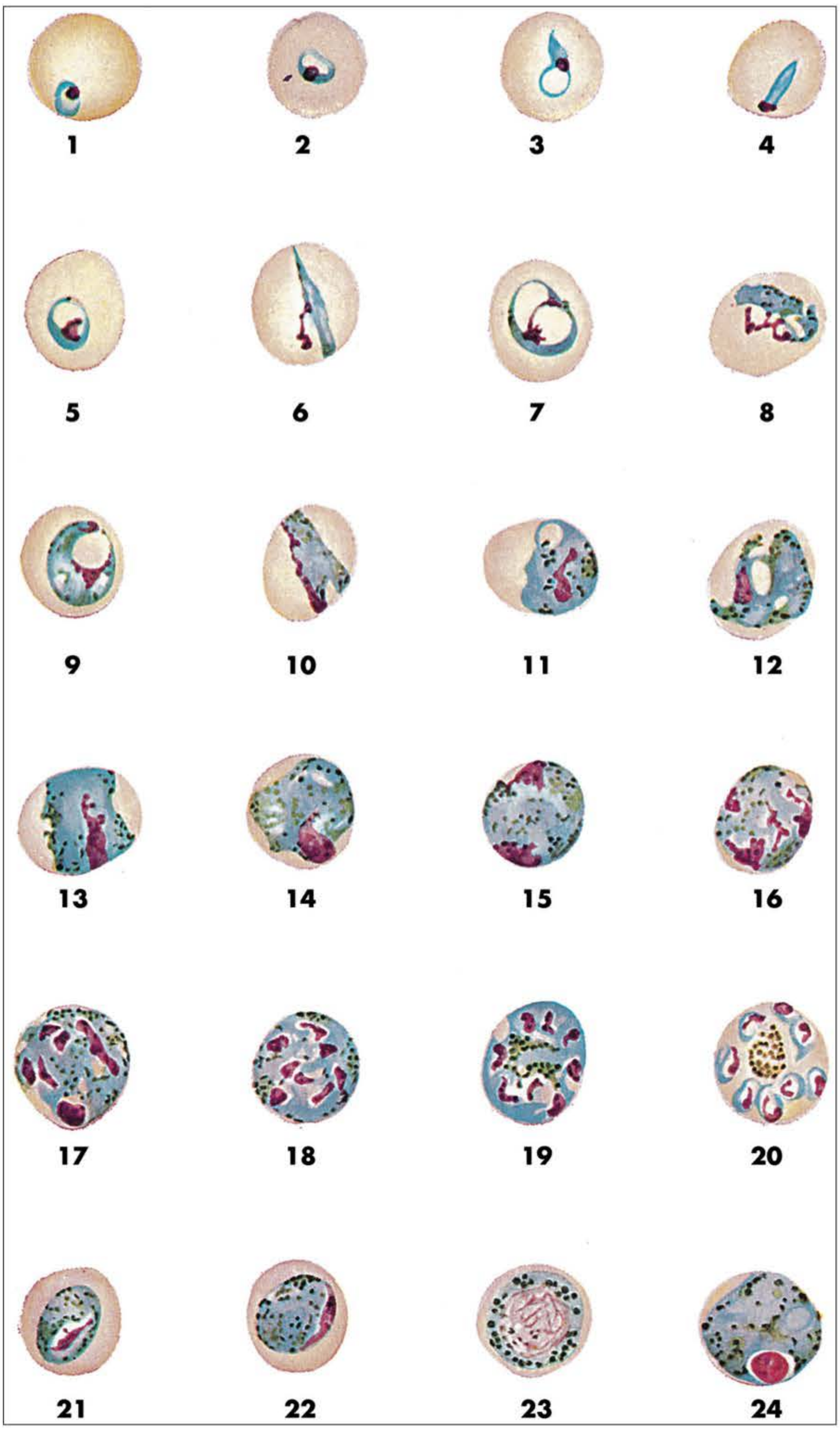


Figura 61.3 *Plasmodium malariae*. *1*, Trofozoíto em forma de anel jovem, associado à malária quartã. *2–4*, Formas trofozoítos jovens do parasita, mostrando o aumento gradual da cromatina e do citoplasma. *5*, Trofozoíto em forma de anel em desenvolvimento – cromatina alongada e um pouco de pigmento evidente. *7–12*, Algumas das possíveis formas exibidas pelo trofozoíto causador da malária quartã.*13* e *14*, Trofozoítos maduros – um deles em forma de bastonete. *15–19*, Fases do desenvolvimento do esquizonte (esquizontes pré-segmentados) 20, Esquizonte maduro. *21*, Microgametócito imaturo. 22, Macrogametócito imaturo. *23*, Microgametócito maduro. 24, Macrogametócito maduro. (De Wilcox A: Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. Bulletin No. 180, National Institute of Health, 1942.)

diarreia, dor abdominal, cefaleia e mialgias. A malária por *P. falciparum* pode causar parasitemia elevada (50%), o que pode levar à hemólise severa com hemoglobinúria e anemia grave. Os eritrócitos infectados pelos trofozoítos em crescimento e pelos esquizontes de *P. falciparum* são sequestrados nos pequenos vasos do corpo e podem causar oclusão deles, causando sintomas relacionados à obstrução capilar e à anóxia tissular. O envolvimento encefálico é conhecido como malária cerebral. Quando isso ocorre, o paciente apresenta desorientação, progredindo para delíro, coma e, frequentemente, morte. A exsanguíneo transfusão pode salvar a vida nas infecções graves por *P. falciparum* (Nielson, 1979; Powell, 2002).

A evolução da malária não tratada depende da espécie envolvida. A maioria dos casos fatais de malária é devida ao *P. falciparum*. Em casos não fatais, os paroxismos febris tornam-se menos graves ao longo do tempo e a doença desaparece gradualmente. Pacientes com infecção por *P. vivax* ou *P. ovale* podem apresentar recaídas após muitos meses ou, às vezes, anos. Indivíduos com infecção por *P. falciparum* ou *P. malariae* podem apresentar períodos assintomáticos, mas apresentam recrudescências esporádicas em virtude da persistência de um baixo grau de parasitemia. Recaídas e recrudescências podem estar associadas a alterações no mecanismo

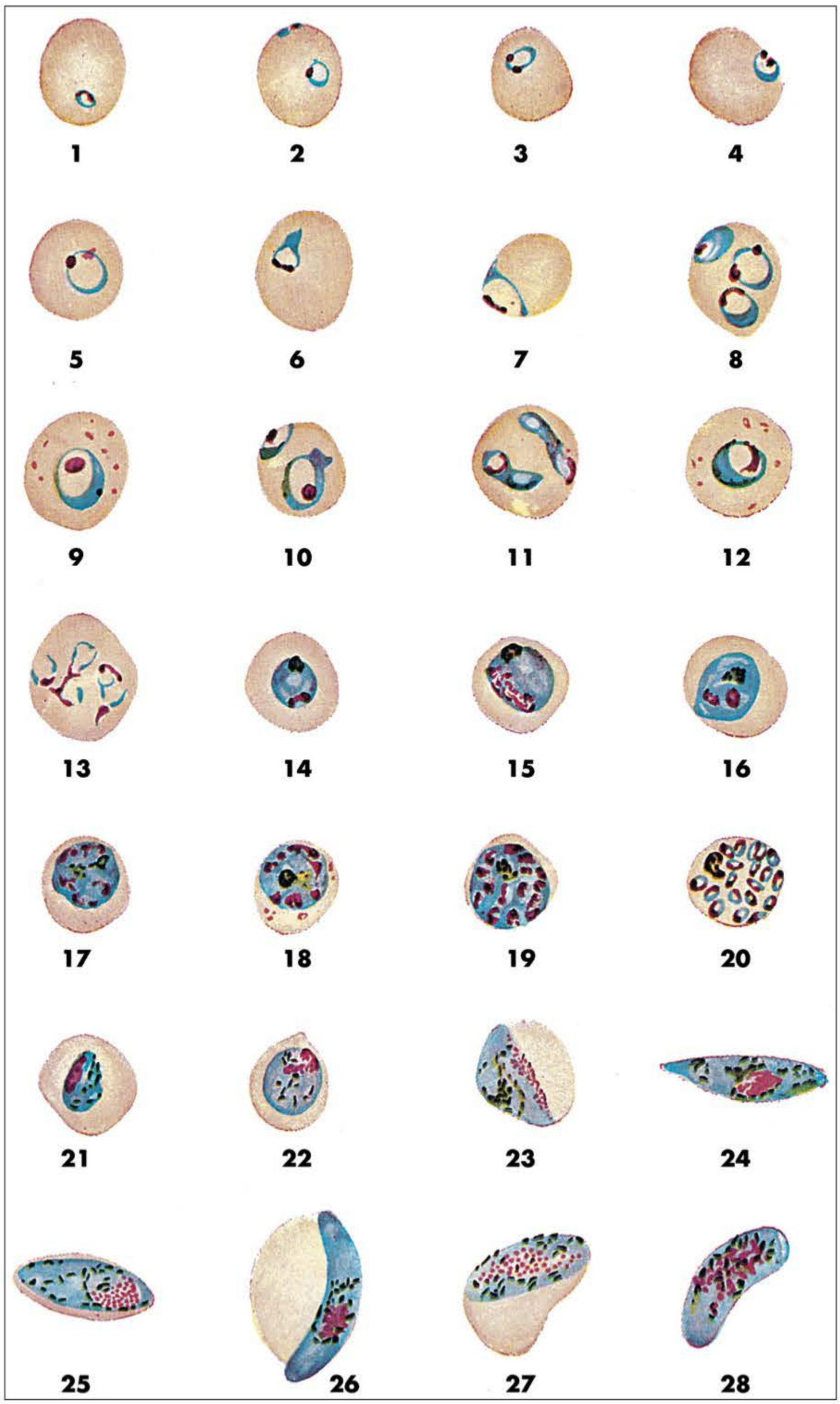


Figura 61.4 *Plasmodium falciparum*. *1*, Forma trofozoíto bastante jovem. *2*, Infecção dupla de uma única célula por trofozoítos jovens – um com "forma marginal" e o outro com forma de "anel com sinete". *3* e *4*, Trofozoítos jovens mostrando pontos de cromatina dupla. *5–7*, Formas trofozoítos em desenvolvimento. *8*, Três trofozoítos médios dentro de uma célula. *9*, Trofozoíto com pigmento no interior de uma célula contendo granulações de Maurer. *10* e *11*, Dois trofozoítos em cada duas células, mostrando as variações de forma que o parasita pode apresentar. *12*, Trofozoíto quase maduro com dispersão de pigmentos por todo o citoplasma. Granulações de Maurer na célula. *13*, "Formas delgadas", estivo-outonais. *14*, Trofozoíto maduro com agregação de pigmentos. *15*, Parasita em processo de divisão inicial da cromatina. *16–19*, Várias fases do desenvolvimento do esquizonte (esquizontes pré-segmentados). *20*, Esquizonte maduro. *21–24*, Formas sucessivas no desenvolvimento do gametócito – usualmente não encontradas na circulação periférica. *25*, Macrogametócito imaturo. *26*, Macrogametócito maduro. *27*, Microgametócito imaturo. *28*, Microgametócito maduro. (Cortesia do National Institute of Health, USPHS.)

de defesa do hospedeiro ou a possíveis alterações antigênicas nos organismos infectantes.

Esfregaços de sangue periférico revelam a presença de leucócitos que contêm pigmento da malária. O aumento da contagem de reticulócitos é comum e está associado ao rápido *turnover* eritrocitário. A presença de plaquetas com volume muito aumentado também pode ser observada em esfregaços de sangue periférico e ocorre em consequência de seu rápido *turnover* secundário ao sequestro esplênico. Infecções maláricas podem interferir em certos exames sorológicos, produzindo resultados falso-positivos, em especial em exames para sífilis.

A terapia e a profilaxia da malária tornaram-se tópicos altamente complexos por causa do surgimento disseminado da resistência do *P. falciparum* à cloroquina e a outros antimaláricos e, em menor grau, da resistência do *P. vivax* à cloroquina. Além disso, indivíduos que contraíram malária por *P. vivax* ou *P. ovale* ou que passaram um longo tempo em áreas altamente endêmicas necessitam de tratamento com primaquina para erradicar os hipnozoítos hepáticos e prevenir a recaída. O uso de primaquina pode ser perigoso em pacientes com deficiência de G6PD e pode ser necessária a investigação de pacientes de risco antes de iniciar a terapia.

Diagnóstico

A malária deve ser incluída no diagnóstico diferencial de febre em pacientes com história de viagem ou residência em áreas endêmicas,

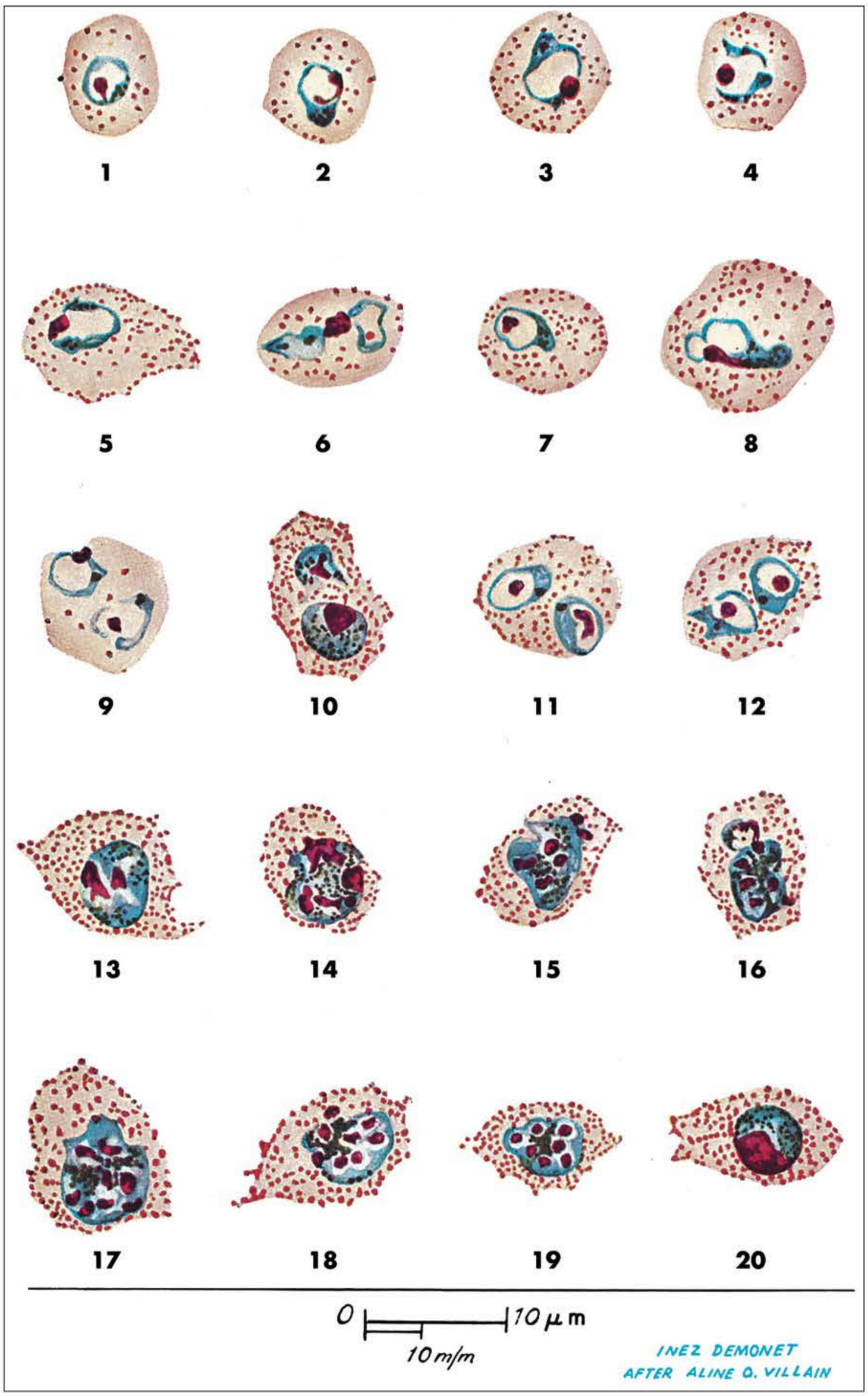


Figura 61.5 *Plasmodium ovale*. *1*, Trofozoíto em forma de anel. *2–5*, Trofozoítos em forma de anel mais velhos. *6–8*, Trofozoítos ameboides mais velhos. 9, *11* e *12*, Células duplamente infectadas, trofozoítos. *10*, Células duplamente infectadas, gametócitos jovens. *13*, Primeiro estágio do esquizonte. *14–19*, Esquizontes, estágios progressivos. *20*, Gametócito maduro. Tradução livre da legenda que acompanha a prancha original em *Guide pratique d'examen microscopique du sang appliqué au diagnostic du paludisme*, de Georges Villain. Reproduzido com permissão de *Biologie Medicale* supplement, 1935. (Cortesia de Aimee Wilcox, National Institutes of Health Bulletin No. 180, USPHS.)

vício em drogas ou transfusão sanguínea. O diagnóstico, em geral, é estabelecido pela demonstração da presença de parasitas em esfregaços de sangue espesso e delgado. Idealmente, amostras de sangue devem ser coletadas um pouco antes do próximo pico febril previsto ou no início de um episódio febril. Algumas vezes podem ser necessárias amostras coletadas com intervalo de várias horas para demonstrar a presença da infecção ou para a identificação da espécie, pois o número e os estágios morfológicos dos parasitas variam durante o ciclo. O exame cuidadoso de esfregaços espessos deve revelar a presença dos parasitas em quase todos os pacientes com malária sintomática.

A identificação de parasitas maláricos em esfregaços de sangue delgado exige uma abordagem sistemática. Existem três fatores importantes a serem considerados: presença de eritrócitos infectados, presença de parasitas e estágios observados. A Tabela 61.8 resume as características diagnósticas das espécies, as quais são ilustradas nas Figuras 61.2 a 61.5. O eritrócito infectado pelo *P. vivax* ou pelo *P. ovale* frequentemente apresenta aumento de volume em comparação com células adjacentes não infectadas, enquanto que o *P. malariae* e o *P. falciparum, em* geral, são observados em eritrócitos com tamanho normal. Vinte por cento ou mais dos eritrócitos infectados pelo *P. ovale* são, com frequência, ovais ou fimbriados (com projeções irregulares das margens celulares), enquanto que menos de 6% dos eritrócitos infectados pelo *P. vivax* são ovais. O pontilhado de Schüffner, numerosos grânulos pequenos uniformemente rosas no interior do eritrócito, é, em geral, observado em células infectadas pelo *P. vivax* e *P. ovale*, embora ele possa não ser evidente em células infectadas por formas iniciais em anel ou em lâmi-

Tabela 61.8 Comparação de espécies de *Plasmodium* que afetam humanos

Espécies	Aparência do tamanho do eritrócito	Pontilhado de Schüffner	Citoplasma do parasita	Aparência do pigmento do parasita	Número de merozoítos	Estágios encontrados no sangue circulante
Plasmodium vivax	Aumentado. Tamanho máximo (atingido em trofozoítos e esquizontes maduros) pode ser de 1–2 vezes o diâmetro normal do eritrócito	+ Em todos os estágios, excetuando as formas em anel iniciais	Irregular, ameboide em trofozoítos. Apresenta uma aparência "espalhada"	Marrom dourado, imperceptível	12–24; média de 16	Todos os estágios. Uma ampla faixa de estágios pode ser observada em qualquer esfregaço de sangue
Plasmodium malariae	Normal	– (Pontilhados de Ziemann são raramente observados)	Trofozoítos arredondados compactos com citoplasma denso. Trofozoítos em forma de faixa são ocasionalmente observados	Marrom escuro, grosseiro, perceptível	6–12; média de 8; esquizontes tipo "roseta" são ocasionalmente observados	Todos os estágios. Usualmente, não é observada uma ampla variedade de estágios. De modo geral, existem relativamente poucos anéis ou gametócitos
Plasmodium ovale	Aumentado. O tamanho máximo pode ser de 1 1/4–1 1/2 vezes o diâmetro normal do eritrócito. Aproximadamente 20% ou mais dos eritrócitos infectados são ovais e/ou fimbriados (a borda apresenta projeções irregulares)	+ Em todos os estágios, excetuando as formas em anel iniciais	Trofozoítos arredondados compactos. Ocasionalmente, levemente ameboides. Trofozoítos em crescimento apresentam uma grande massa de cromatina	Marrom escuro, perceptível	6–14; média de 8	Todos os estágios
Plasmodium falciparum	Normal. Eritrócitos infectados de forma múltipla são comuns	– (Pontilhados de Maurer são ocasionalmente observados)	Anéis jovens são pequenos, delicados, frequentemente com pontos duplos de cromatina. Gametócitos apresentam uma forma de "lua crescente" ou são alongados	Preto; grosseiro e perceptível nos gametócitos	6–32; média de 20–24	Anéis e/ou gametócitos. Outros estágios desenvolvem-se nos vasos sanguíneos de órgãos internos, mas não são observados no sangue periférico, exceto em infecções graves

Fonte: com permissão de Smith JW, Melvin DM, Orihel TC et al.: Diagnostic Parasitology - Blood and Tissue Parasites. Chicago, IL, American Society of Clinical Pathologists, 1976.

nas que não foram coradas no pH adequado (ver "Métodos laboratoriais"). A presença do pontilhado de Schüffner é útil porque ele não é observado na infecção por *P. malariae* ou *P. falciparum*.

Na medida em que os trofozoítos crescem nas células infectadas, a quantidade de hemoglobina nos eritrócitos diminui e o pigmento hemozoína acumula. A quantidade e o aspecto do pigmento variam entre as espécies. As formas em anel de todos os parasitas podem ter um aspecto similar e, se apenas formas em anel forem observadas ocasionalmente, as espécies podem não ser identificáveis. Formas jovens em anel do *P. falciparum* são menores do que as das outras espécies (1/6 do diâmetro do eritrócito em comparação com um terço do diâmetro para as das outras espécies). Anéis de *P. falciparum* que crescem apresentam um tamanho similar aos das outras espécies. Trofozoítos que parecem repousar sobre a superfície do eritrócito ou que parecem protrusos são denominados *appliqués* ou *accolés* e são mais observados nas infecções por *P. falciparum*. A presença de células duplamente infectadas e com pontos duplos de cromatina em trofozoítos em forma de anel ocorre mais nas infecções por *P. falciparum*, mas pode ocorrer com outras espécies.

Trofozoítos em crescimento de *P. vivax* apresentam formas irregulares e são denominados ameboides. Os do *P. malariae* e do *P. ovale* permanecem compactos. Trofozoítos maduros e esquizontes do *P. falciparum* geralmente são sequestrados nos leitos capilares em consequência da citoaderência às células endoteliais e não são observados no sangue periférico, exceto em infecções graves. Quando esquizontes são identificados no sangue periférico, a determinação do número de merozoítos é útil na identificação das várias espécies. Os gametócitos do *P. falciparum* são prontamente identificados pela sua forma característica tipo "linguiça". Os gametócitos do *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* apresentam uma forma similar e sua diferenciação é difícil, embora as características dos eritrócitos infectados possam auxiliar a identificação.

As variedades dos estágios desenvolvimentais no sangue periférico ajudam no diagnóstico. Na infecção por *P. falciparum*, as formas em anel predominam e a observação de numerosas formas em anel com estágios mais maduros é uma evidência de infecção por *P. falciparum*. Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, vários estágios dos parasitas são observados, com uma certa predominância de um estágio dependendo da fase do ciclo.

Esfregaços espessos são preferíveis para a detecção de infecções maláricas porque uma maior quantidade de sangue é examinada (ver "Métodos laboratoriais"). As formas em anel frequentemente apresentam um aspecto pontilhado, em vez de anéis completos, e a presença de cromatina vermelha e citoplasma azul é necessária para identificá-las como parasitas. O pontilhado de Schüffner pode ser uma característica identificadora útil e pode ser reconhecido em torno de trofozoítos em crescimento como um halo rosa em vez de grânulos distintos em esfregaços delgados de sangue. O caráter ameboide dos trofozoítos do *P. vivax* não é tão evidente em esfregaços espessos, mas o número de merozoítos em esquizontes maduros é útil. Macro e microgametócitos, em geral, não podem ser diferenciados. A forma distinta do tipo "linguiça" dos gametócitos do *P. falciparum* ainda é evidente, embora eles possam ser mais atarracados do que em esfregaços delgados. Gametócitos de outras espécies podem ser detectados e são facilmente diferenciados dos núcleos das células hospedeiras pela presença do pigmento hemozoína refrativo.

Ocasionalmente, ocorrem infecções mistas (cerca de 5% dos casos), mas deve-se ter cautela ao se estabelecer esse tipo de diagnóstico, exceto quando existem evidências definitivas de duas populações distintas de parasitas. As infecções mistas mais comuns são as por *P. falciparum* e *P. vivax*. A presença de gametócitos de *P. falciparum* em um indivíduo obviamente infectado por *P. vivax* é diagnóstica.

Existem múltiplos artefatos que podem ser confundidos com parasitas maláricos em esfregaços espessos e delgados de sangue. O artefato mais comum em esfregaços delgados são as plaquetas superpostas aos eritrócitos. Essas plaquetas devem ser prontamente identificadas porque elas não apresentam uma forma de anel verdadeira, não exibem diferenciação da cromatina e do citoplasma e não contêm pigmento. Agregados de bactérias ou plaquetas podem ser confundidos com esquizontes. Algumas vezes, massas de plaquetas fundidas podem se assemelhar a gametócitos do *P. falciparum*, mas elas não apresentam a coloração diferencial do pigmento. Corante precipitado ou bactérias, fungos ou esporos contaminantes também podem ser confundidos com esses parasitas.

Exames sorológicos espécie-específicos para a malária são particularmente úteis para a investigação epidemiológica e para a identificação de doadores de sangue infectados. Entretanto, esses testes não diferenciam de modo confiável a infecção atual da infecção prévia. O CDC disponibilizou testes de imunofluorescência sensíveis e específicos utilizando antígenos das quatro espécies humanas (Wilson, 1995). Ensaios para a detecção direta de antígenos maláricos no sangue são particularmente promissores (ver "Métodos laboratoriais").

Babesiose

Como os parasitas maláricos, os agentes etiológicos da babesiose ou da piroplasmose são protozoários apicomplexos encontrados em todo o mundo e que infectam os eritrócitos, produzindo, com frequência, uma doença febril de gravidade variável. Diferentemente da malária, a babesiose é transmitida por carrapatos e é observada em várias espécies animais que servem de reservatórios (Krause, 2002).

As infecções humanas nos Estados Unidos ocorrem predominantemente nos estados do nordeste e meio-oeste nos quais o parasita de roedores *Babesia microti* é responsável pela infecção (Homer, 2000). Em geral, o vetor é o carrapato *Ixodes scapularis*. Estudos recentes implicaram uma outra espécie de *Babesia*, ainda não nominada (conhecida como WA1), como responsável pela doença no oeste dos Estados Unidos. Acredita-se que esse parasita, associado à doença nos estados de Washington e Califórnia, seja transmitido pelo carrapato *Ixodes pacificus* (Quick, 1993; Persing, 1995). Na Europa, o parasita canino *Babesia divergens*, transmitido pelo *Ixodes ricinus*, infecta humanos e um relato recente de infecção similar à causada pela *B. divergens* no estado de Washington expandiu a faixa de casos humanos conhecidos (Herwaldt, 2004).

O espectro da babesiose varia de uma infecção latente subclínica a uma doença hemolítica fulminante. Mortes têm sido relatadas, especialmente em indivíduos esplenectomizados ou imunocomprometidos. Indivíduos imunocompetentes podem apresentar sintomas similares aos da malária, incluindo febre, calafrios, mal-estar e anemia, embora sem periodicidade reconhecível. A investigação de uma epidemia causada pela *B. microti* na ilha de Nantucket, na Nova Inglaterra, mostrou que alguns pacientes sintomáticos portavam o parasita há meses e outros apresentavam evidências sorológicas de infecção sem história de doença clínica (Ruebush, 1980). Outras evidências vêm surgindo, indicando que infecções crônicas subclínicas podem não ser incomuns (Persing, 1995).

O parasita *Babesia* multiplica-se nos eritrócitos por esquizogonia, mas não produz gametócitos. Embora os trofozoítos de muitas espécies possuam uma forma piriforme em algum ponto de seu desenvolvimento, os da *B. microti*, em geral, aparecem como delicadas formas em anel que podem ser facilmente confundidas com as dos parasitas maláricos, em especial do *P. falciparum* (Fig. 61.6A) (Healy, 1980; Homer, 2000). Trofozoítos da *Babesia* podem ser diferenciados dos trofozoítos dos parasitas maláricos pela presença de múltiplos anéis em uma célula que podem formar uma tétrade (cruz de Malta) e pela ausência de trofozoítos grandes em crescimento e gametócitos. Além disso, células infectadas pela *Babesia* não apresentam o pigmento hemozoína, o qual está presente nas células infectadas por *Plasmodium*. A história de residência ou viagem em áreas endêmicas ou de uma recente picada de carrapato pode sugerir infecção por *Babesia*. O CDC disponibilizou exames sorológicos (imunofluorescência) para *B. microti* e WA1 em serviços de saúde pública. Exames sorológicos para malária são negativos na babesiose, embora pacientes com malária possam apresentar reação cruzada em exames sorológicos para *Babesia* (Wilson, 1995).

Hemoflagelados

Os hemoflagelados de humanos e animais são membros da ordem *Cinetoplastida* e são caracterizados pela presença de uma grande mitocôndria conhecida como cinetoplasto, a qual contém DNA suficiente para ser observado na microscopia de luz quando corados com corante de Giemsa. Dois gêneros importantes na doença humana são o *Trypanosoma* e a *Leishmania*. Membros de ambos os gêneros são transmitidos por vetores artrópodes e apresentam hospedeiros animais como reservatórios.

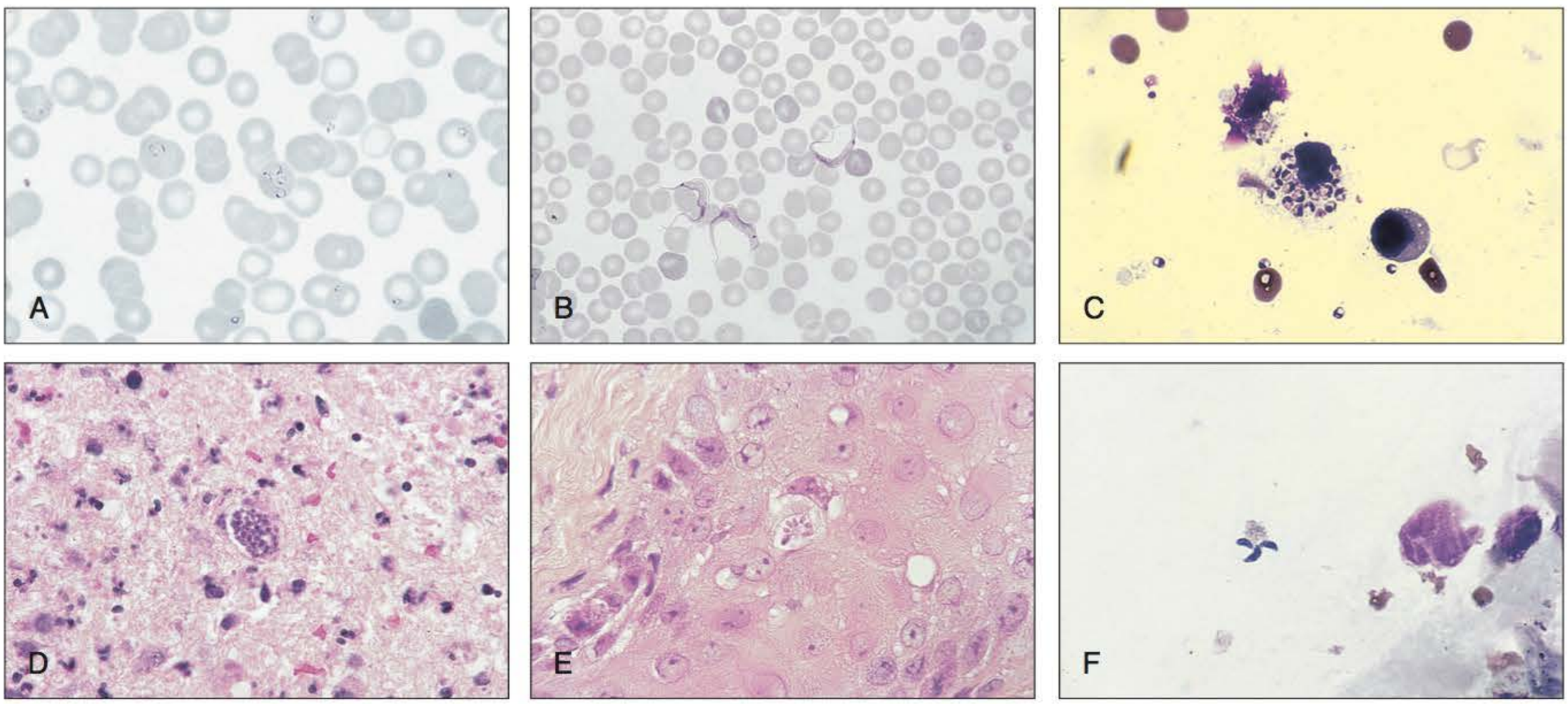


Figura 61.6 *A*, Infecção humana por *Babesia microti*; observe a alta parasitemia e os múltiplos eritrócitos infectados (objetiva de imersão). *B*, *Trypanosoma* sp. em esfregaço de sangue corado; observe o núcleo, o cinetoplasto e a membrana ondulante (objetiva de imersão). *C*, Amastigotas de *Leishmania mexicana* em esfregaço por impressão de lesão da coxa; coloração de Giemsa (objetiva de imersão). *D*, Pseudocisto de *Toxoplasma gondii* em tecido cerebral (hematoxilina-eosina; objetiva de imersão). *E*, Roseta cutânea de taquizoítos de *T. gondii* em um paciente imunocomprometido (hematoxilina-eosina; objetiva de imersão). *F*, Taquizoítos de *T. gondii* recuperados de uma amostra de lavado broncoalveolar de um indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana (coloração de Giemsa; objetiva de imersão).

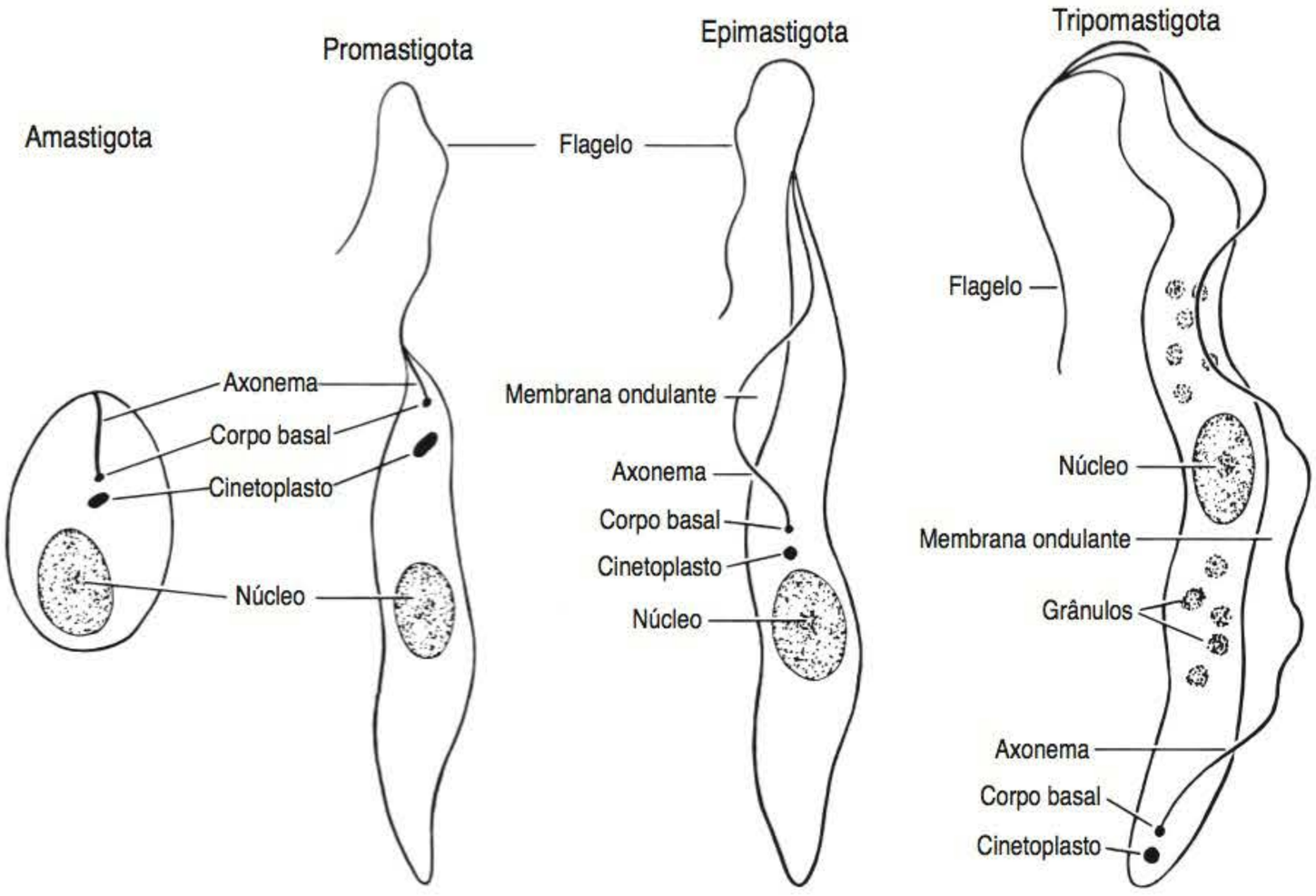


Figura 61.7 Morfologia de hemoflagelados.

Os cinetoplastídeos assumem diferentes formas dependendo da sua presença em hospedeiros vertebrados, incluindo humanos, ou de seus insetos vetores (Fig. 61.7). O estágio de amastigota é esférico, com 2 a 5 μm de diâmetro, e apresenta um núcleo e um cinetoplasto. Por definição, não existe um flagelo externo, mas um axonema (porção intracelular do flagelo) é aparente no âmbito ultraestrutural. Amastigotas podem ser encontrados em hospedeiros humanos ou animais infectados por *T. cruzi* ou *Leishmania* spp., nos quais eles se multiplicam exclusivamente no interior das células. A forma promastigota é um organismo alongado e fino com um núcleo central, um cinetoplasto e um axonema localizados anteriormente, e um flagelo livre que se estende a partir da extremidade anterior. Esse estágio ocorre nos insetos vetores da *Leishmania* e é o estágio detectado na cultura. A forma epimastigota é similar à promastigota, mas o cinetoplasto encontra-se mais próximo do núcleo e apresenta uma pequena membrana ondulante que se torna um flagelo livre. Todas as espécies de *Trypanosoma* que infectam humanos apresentam um estágio epimastigota no inseto vetor ou na cultura. Na forma tripomastigota, o cinetoplasto encontra-se na extremidade posterior e o flagelo forma uma membrana ondulante que se estende ao longo da célula, emergindo como um flagelo livre na extremidade anterior. A forma tripomastigota ocorre predominantemente na corrente sanguínea de hospedeiros mamíferos infectados pelos vários *Trypanosoma* spp. Os estágios infecciosos observados nos insetos vetores apropriados após transformação da forma epimastigoda são conhecidos como tripomastigotas metacíclicos.

Trypanosoma

Infecções por tripanossomas incluem aquelas causadas pelo *Trypanosoma brucei* (tripanossomíase africana ou do Velho Mundo) e *T. cruzi* (tripanossomíase americana ou do Novo Mundo ou doença de Chagas). Ambas têm uma grande importância em áreas endêmicas, mas são raramente observadas nos Estados Unidos. Uma terceira espécie, *Trypanosoma rangeli*, foi descrita em humanos nas Américas, mas não causa doença clínica. Na corrente sanguínea, tripomastigotas do grupo *T. brucei* (Fig. 61.6B) apresentam até 30 μm de comprimento com curvas graciosas e um pequeno cinetoplasto. As formas tripomastigotas do *T. cruzi* são menores (20 μm) e possuem uma forma em S e C em esfregaços de sangue corados e apresentam um cinetoplasto maior.

Na África equatorial, parasitas do grupo *T. brucei* infectam animais e humanos e são transmitidos pela picada da mosca tsé-tsé do gênero *Glossina*. A multiplicação dos organismos no local da picada, em geral, produz um cancro transitório. A tripanossomíase da África Oriental é causada pelo *T. brucei rhodesiense*, o qual apresenta alguns reservatórios animais. A doença é caracterizada por uma doença febril aguda rapidamente progressiva com linfadenopatia. Os pacientes morrem antes do envolvimento do sistema nervoso central (SNC) ser proeminente.

A infecção na África Ocidental é causada pelo *T. brucei gambiense*, o qual é responsável pela doença do sono africana clássica. A doença apresenta uma evolução mais crônica que começa com febre intermitente, sudorese noturna e mal-estar. A linfadenopatia, especialmente de linfonodos cervicais (sinal de Winterbottom), pode ser pronunciada. O envolvimento do SNC torna-se proeminente ao longo do tempo. Ocorre progressão da sonolência, confusão mental e fadiga, levando a estupor, coma e, finalmente, morte. O principal reservatório dessa doença são os seres humanos (Organização Mundial da Saúde, 1986).

A suspeita do diagnóstico se baseia na história geográfica e nos achados clínicos. Os pacientes apresentam um alto nível de imunoglobulina M (IgM) no sangue e no líquido cerebrospinal (LCE). Ocorre pleocitose com 50 a 500 células mononucleares por microlitro no LCE. O diagnóstico é estabelecido pela demonstração de parasitas em esfregaços espessos e delgados de sangue periférico, esfregaços de creme leucocitário, aspirados de linfonodos ou de medula óssea ou em centrifugado de LCE corado com Giemsa (Van Meirvenne, 1985; Cattand, 1988; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). A cultura ou a inoculação em animal também pode ser útil, quando disponível.

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é causada pelo *T. cruzi*. Na sua forma mais silvestre, o parasita ocorre nos Estados Unidos, América Central e na maior parte da América do Sul. Infecções humanas são comuns em partes do México, da América Central e da América do Sul, onde elas são transmitidas por insetos da família *Reduviidae*. Os gêneros e as espécies envolvidos na transmissão variam de um país a outro e entre diferentes nichos ecológicos. Alguns deles são responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre em reservatórios animais, enquanto outros se adaptam à vida doméstica na qual eles infestam casas mal construídas, usualmente em áreas rurais. No momento da alimentação, o inseto defeca. As fezes do inseto contêm tripomastigotas infectantes que, como resultado do ato de coçar, entram no corpo no local da picada ou pela mucosa oral ou conjuntival intacta. As formas infectantes entram ativamente nas células tissulares vizinhas, nas quais eles se transformam em amastigotas que se dividem. Quando a célula infectada é cheia de amastigotas, a transformação em tripomastigotas ocorre, seguida pela ruptura celular. As formas tripomastigotas são liberadas no sangue periférico e atingem tecidos distantes, nos quais elas podem começar novamente o ciclo reprodutivo.

A doença de Chagas pode causar infecções agudas ou crônicas. A doença aguda é mais comum em crianças com menos de 5 anos de idade e é caracterizada por mal-estar, calafrios, febre, hepatoesplenomegalia e miocardite. O edema do tecido periorbitário (sinal de Romaña) pode estar presente se a inoculação dos organismos ocorrer na face. O edema de tecidos em outros locais após a picada de um inseto infectado é denominado chagoma. Em indivíduos mais velhos, a evolução aguda é mais leve ou frequentemente assintomática. Em ambos

os casos, o paciente permanece infectado por toda a vida. As manifestações crônicas da infecção, incluindo o megaesôfago, o megacólon e as alterações do sistema de condução cardíaco, estão relacionadas à destruição de células efetoras do sistema parassimpático por autoanticorpos. A infecção pode ser transmitida por transfusão sanguínea e infecções quiescentes podem ser exacerbadas pela imunossupressão.

O diagnóstico no estágio agudo é estabelecido pela demonstração da presença do parasita em esfregaços espessos e delgados de sangue, em esfregaços de creme leucocitário, e em aspirados de chagomas ou de linfonodos aumentados de volume. Amostras de aspirados, sangue e biópsia também podem ser submetidas à cultura, utilizando o meio Novy-MacNeal-Nicolle (Ash, 1987; Visvesvara, 2004b; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000; Garcia, 2001). Em áreas endêmicas, o xenodiagnóstico (exame do conteúdo intestinal de insetos criados em laboratório que se alimentaram de um paciente) pode ser utilizado. No estágio crônico, o diagnóstico sorológico é o método de escolha. Estão disponíveis testes de imunoensaio enzimático, imunofluorescência e fixação de complemento, embora eles não consigam diferenciar entre a doença aguda e a crônica. Podem ocorrer reações cruzadas em pacientes com leishmaniose.

Leishmania

A leishmaniose é uma doença do sistema reticuloendotelial causada por protozoário cinetoplastida do gênero *Leishmania*. Todas as espécies que infectam humanos possuem reservatórios animais e são transmitidas por mosquitos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Os parasitas assumem a forma amastigota em hospedeiros mamíferos e a forma promastigota em insetos vetores. Espécies de *Leishmania* não podem ser diferenciadas pelo exame de formas amastigotas ou promastigotas. A leishmaniose pode assumir muitas formas clínicas diferentes. As mais conhecidas são as formas de doença cutânea, mucocutânea e visceral. A forma e a gravidade da doença variam de acordo com a espécie infectante, com a condição imune do hospedeiro e com a exposição prévia (Peters, 1987; Cook, 2002).

Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea do Velho Mundo ocorre no sul da Europa, no norte e no leste da África, no Oriente Médio, no Irã, no Afeganistão, na Índia e no sul da Rússia. As infecções são causadas por *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, embora *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* também possam produzir lesões cutâneas. A *L. tropica* produz a úlcera seca ou urbana, a qual é mais persistente que a úlcera úmida ou rural produzida pela *L. major*. Úlceras causadas por essas espécies, em geral, localizam-se em áreas expostas do corpo e cicatrizam de modo espontâneo. A infecção produz uma imunidade duradoura. A *L. tropica* pode se tornar viscerotrópica, como foi recentemente demonstrado em militares que participaram da operação Tempestade no Deserto (Magill, 1993). A *L. aethiopica* causa uma infecção cutânea mais agressiva, que em alguns indivíduos pode produzir lesões mucosas ou leishmaniose cutânea difusa. Esta última é caracterizada por múltiplos nódulos cutâneos que se assemelham à hanseníase lepromatosa.

A leishmaniose cutânea do Novo Mundo é causada por muitas espécies, incluindo *Leishmania mexicana, Leishmania braziliensis, Leishmania amazonensis, Leishmania venezuelensis, Leishmania garnhami, Leishmania pifanoi, Leishmania peruviana, Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis*. As lesões produzidas pela *L. mexicana* frequentemente envolvem os lobos auriculares (úlcera dos chicleros), são autolimitadas e não afetam as mucosas. No entanto, a *L. mexicana* e a *L. amazonensis* podem produzir lesões cutâneas difusas similares às produzidas pela *L. aethiopica*. Existe um foco de leishmaniose cutânea no sul do Texas, onde infecções são causadas por uma ou mais espécies (Gustafson, 1985). A *L. peruviana*, encontrada nas encostas ocidentais dos Andes peruanos, causa uma infecção denominada uta, uma lesão cutânea benigna que ocorre predominantemente em crianças. A *L. peruviana* é adquirida em casa, onde os principais reservatórios são cães domésticos. Essa situação epidemiológica contrasta com outras leishmanioses cutâneas, as quais são geralmente adquiridas em florestas e têm como reservatórios animais selvagens.

Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea é causada principalmente pela *L. braziliensis* e às vezes por outras espécies, produzindo lesões cutâneas típicas que, em geral, são mais agressivas, duram mais tempo e, com frequência, disseminam-se para membranas mucosas, em especial nas áreas nasal, oral ou faríngea. Nesses locais, elas podem produzir lesões desfigurantes secundárias a erosões de tecidos moles e cartilagem. A *L. braziliensis* é observada no México, na América Central e na América do Sul.

Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral do Velho Mundo ocorre esporadicamente em uma ampla área geográfica e é causada pela *L. donovani* ou pela *L. infantum*. A *L. donovani* predomina na África, na Índia e na Ásia, e a *L. infantum* predomina na região mediterrânea e no Oriente Médio, embora ocorram áreas de sobreposição de ambas. A leishmaniose visceral do Novo Mundo é causada pela *L. chagasi* e ocorre esporadicamente na América Central e na América do Sul. Em algumas ocasiões, certas espécies que causam doença cutânea também foram responsáveis pela doença visceral, como foi demonstrado recentemente em algumas tropas que participaram do conflito *Operation Desert Storm* (Magill, 1993). Em algumas áreas, seres humanos podem servir de reservatório, embora vários animais, incluindo cães e gatos, assumam esse papel.

A infecção, em geral, é benigna e, com frequência, subclínica, embora algumas pessoas, em especial crianças jovens e indivíduos desnutridos, apresentem envolvimento visceral marcante, especialmente do fígado, do baço, da medula óssea e dos linfonodos. A infecção é denominada calazar na Índia, em referência ao escurecimento da pele. A leishmaniose visceral também é uma infecção oportunista em indivíduos com infecção concomitante pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, nessas circunstâncais, a resposta à terapia é ruim (Medrano, 1992; Strickland, 2000).

Diagnóstico da leishmaniose

O diagnóstico geralmente é estabelecido pela visualização de formas amastigotas em esfregaços, *imprints* ou biópsias ou pelo crescimento de promastigotas em cultura. Na leishmaniose cutânea, a borda da lesão mais ativa deve ser biopsiada e a biópsia fresca deve ser utilizada para a realização de *imprints*. Um esfregaço também deve ser preparado, realizando uma incisão de 2 a 3 mm na borda da úlcera e recuperando pequenas quantidades de tecido da superfície cortada com um bisturi. Tanto o *imprint* quanto o esfregaço devem ser submetidos à coloração de Giemsa. Amostras que podem ser examinadas quando existe suspeita de leishmaniose visceral incluem esfregaços da creme leucocitário, aspirados de linfonodos e medula óssea e biópsias do baço e do fígado (Garcia, 2001).

Uma cultura é desejável porque ela é mais sensível e permite a determinação da espécie ou da subespécie, uma prática que pode ajudar na conduta clínica. Amostras de biópsia ou aspirado coletadas com técnica asséptica são submetidas à cultura em meio de Novy-MacNeal-Nicolle ou no meio Schneider *Drosophila* suplementado com soro fetal de bezerro (Visvesvara, 2004b). Geralmente, culturas começam a mostrar promastigotas em 2 a 5 dias, mas devem ser mantidas por 4 semanas.

Amastigotas encontradas em *imprints*, esfregaços e cortes de tecidos são reconhecidas por seu tamanho (2–4 μm), presença de um citoplasma delicado, um núcleo e um cinetoplasto (Fig. 61.6C). Em cortes de tecido, elas podem parecer menores por causa do seu encolhimento durante a fixação. Amastigostas devem ser diferenciadas de outros organismos intracelulares, incluindo leveduras de *Histoplasma capsulatum* e trofozoítos de *T. gondii*. A *Leishmania* spp. apresenta um cinetoplasto e não possui uma parede celular. Em contraste, o *Histoplasma* não possui cinetoplasto e a célula cora com ácido periódico de Schiff (PAS) e metenamina de prata. De acordo com um estudo (Weigle, 1987), a sensibilidade de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina é de 14%; a de *imprints*, 19%; a de culturas, 58%; e todos os métodos combinados, 67%.

Toxoplasma gondii

O *T. gondii* é um protozoário parasita do filo *Apicomplexa* que apresenta uma distribuição mundial afetando humanos, animais domésticos e selvagens, em especial os carnívoros. A infecção em indivíduos imunocompetentes geralmente é assintomática ou leve. Contudo, pessoas com imunocomprometimento podem apresentar complicações graves. A infecção intrauterina pode causar infecção congênita grave com sequelas ou tendo como consequência um concepto natimorto (Remington, 2005).

O estágio sexual do ciclo de vida do parasita coccidiano é completado no epitélio intestinal de gatos e outros felinos, os quais servem exclusivamente como hospedeiros definitivos. Durante esse ciclo enteroepitelial, ocorre a esquizogonia assexuada e a gametogonia sexuada, levando ao desenvolvimento de oocistos imaturos que são eliminados nas fezes. Oocistos maduros amadurecem e passam para o estágio infectante (o qual contém 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada) no meio ambiente em 2 a 21 dias. A ingestão de oocistos infectantes pode levar à infecção de uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados susceptíveis nos quais trofozoítos que crescem ativamente (taquizoítos) podem infectar qualquer célula nucleada. A proliferação de taquizoítos acarreta morte celular e lesão no hospedeiro durante a infecção aguda. Após o desenvolvimento da imunidade, os organismos formam cistos tissulares que podem conter centenas ou milhares de bradizoítos que crescem de forma lenta. A presença de cistos tissulares é característica das infecções crônicas. Todos os estágios do ciclo de vida ocorrem em felinos, mas somente os estágios de trofozoíto e de cisto ocorrem em humanos e outros hospedeiros intermediários.

Os humanos adquirem a infecção por *T. gondii* pela ingestão de carne malcozida, especialmente de carneiro ou porco, que contém cistos tissulares, ou pela ingestão de oocistos infectantes em material infectado por fezes de gato. Ocorreram epidemias em virtude da inalação de poeira contaminada em um estábulo fechado (Teutch, 1979) e da ingestão de água contaminada ou leite de cabra não pasteurizado (Benenson, 1982; Sacks, 1982). A transmissão pela via sanguínea e pelo transplante de órgão também pode ocorrer.

A maioria das infecções agudas é assintomática ou simula outras doenças infecciosas nas quais a febre e a linfadenopatia são proeminentes. A infecção congênita pode ocorrer quando a mãe desenvolve uma infecção aguda durante a gestação. O risco de infecção para o neonato não está relacionado com a presença ou a ausência de sintomas na mãe, mas a gravidade da infecção depende do estágio da gestação quando ela é adquirida. Podem ocorrer morte intrauterina, microcefalia ou hidrocefalia com calcificações intracranianas se a infecção for adquirida na primeira metade da gestação. Infecções na segunda metade da gestação geralmente são assintomáticas ao nascimento, embora o neonato possa apresentar febre, hepatoesplenomegalia e icterícia. A coriorretinite, o retardo psicomotor e os distúrbios convulsivos podem aparecer meses ou anos após (Remington, 2005).

Em indivíduos imunodeprimidos, em especial aqueles com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), infecções pelo *T. gondii* usualmente se manifestam com envolvimento do SNC (Luft, 1988). Outras manifestações clínicas e patológicas possíveis incluem pneumonite, miocardite, retinite, pancreatite e orquite (Luft, 1989; Schnapp, 1992). A toxoplasmose pode ser difícil de ser diagnosticada clinicamente e é, com frequência, descoberta na autópsia (Gutierrez, 2000). Essas infecções, de modo geral, resultam da reativação de uma infecção latente, adquirida meses ou anos antes, mas, às vezes, é resultante de uma infecção primária.

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser estabelecido pelo exame de tecido, sangue ou líquidos corporais (Wilson, 2003). A demonstração de taquizoítos em cistos tissulares é definitiva, mas isso pode ser difícil em cortes corados com hematoxilina-eosina. Quando disponíveis, métodos de imunofluorescência ou de imunoperoxidase podem ser úteis. A coloração de Giemsa é boa para corar esfregaços de líquidos corporais e *imprints* de tecidos. Organismos podem ser demonstrados pela inoculação adequada de material em cultura de tecido ou em camundongo não infectado. A recuperação de culturas virais de rotina também foi descrita, mas ela requer uma incubação prolongada (Shepp, 1985). O isolamento de organismos do sangue ou de um líquido corporal é evidência de infecção aguda, enquanto que a recuperação de tecidos pode refletir uma infecção crônica. Em esfregaços, os taquizoítos apresentam uma forma em lua crescente ou oval, mensurando aproximadamente 3 × 7 μm. Os cistos medem até 30 μm de diâmetro e, em geral, são esféricos, exceto nas fibras musculares, nas quais eles apresentam um aspecto alongado (Figs. 61.6D, E e F).

A técnica de PCR é altamente sensível e específica na detecção da encefalite por toxoplasma, doença disseminada e infecção intrauterina (Cazenave, 1991; Grover, 1990; Parmley, 1992; Weiss, 1995). No entanto, esses procedimentos não estão amplamente disponíveis e exigem um controle de qualidade rigoroso para evitar resultados falso-positivos.

A sorologia permanece sendo a principal abordagem para o estabelecimento do diagnóstico da toxoplasmose (Wilson, 2003; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004). O teste de coloração de Sabin-Feldman e o de imunofluorescência são padrões com os quais os outros métodos são comparados, embora o primeiro seja realizado em poucos centros. Muitos testes de imunoensaio enzimáticos estão disponíveis no comércio e em geral fornecem resultados similares aos de imunofluorescência. Os anticorpos aparecem em 1 a 2 semanas e os níveis atingem o pico em 6 a 8 semanas. Testes para anticorpo IgM específico são especialmente úteis para o diagnóstico de infecção congênita e aguda, mas é de extrema importância que se conheça as limitações do teste, especificamente a ocorrência de reações falso-positivas. A persistência de anticorpo IgM específico, algumas vezes por um ano ou mais, também é problemática e deve ser interpretada concomitantemente com a pesquisa do anticorpo IgG. Como muitas pessoas apresentam infecções assintomáticas, o baixo título de IgG tem pouca importância. Títulos em pacientes com infecções oculares crônicas também podem ser baixos. Pacientes imunocomprometidos como aqueles com AIDS que apresentam infecção ativa pelo *Toxoplasma* quase sempre apresentam anticorpos IgG específicos preexistentes, embora os títulos possam estar baixos, e a atividade da IgM é observada com pouca frequência. A interpretação dos títulos de IgG e IgM varia segundo a metodologia utilizada e o fabricante. O laboratório que realiza o teste deve fornecer os critérios de interpretação necessários (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004).

Amebas de vida livre oportunistas

Amebas dos gêneros *Naegleria, Acanthamoeba* e *Balamuthia* habitam o solo, a água e os outros substratos ambientais, nos quais se alimentam de outros microrganismos, especialmente bactérias e leveduras. Todos os três gêneros foram associados a infecções oportunistas do SNC e a *Acanthamoeba* causa ceratite (Martinez, 1985; Marciano-Cabral, 1988; Ubelaker, 1991; Kilvington, 1994; Visvesvara, 2003).

A meningoencefalite amebiana primária, causada pelo ameboflagelado *Naegleria fowleri*, afeta tipicamente crianças e adultos jovens que nadaram ou mergulharam em lagos ou piscinas de água fresca e quente. O ameboflagelado entra no encéfalo pela placa cribiforme e pelos bulbos olfatórios e atinge os lobos frontais, nos quais ele produz uma meningoencefalite hemorrágica aguda que é, em geral, fatal em 1 semana a partir do início dos sintomas. A doença apresenta um prognóstico extremamente ruim apesar da intervenção terapêutica vigorosa. Em geral, o diagnóstico é estabelecido na autópsia pela observação da presença de trofozoítos (cistos raramente são vistos) em cortes de tecidos (Fig. 61.8A). O diagnóstico *antemortem* é feito, às vezes, pela identificação de trofozoítos no LCE por meio de exame a fresco direto, preparações coradas ou cultura. Os trofozoítos medem de 10 a 35 μm, apresentam cariossomos centrais grandes e redondos e, quando expostos à água destilada morna, convertem-se em formas flageladas em 1 a 2 horas. Os cistos são esféricos, mensurando entre 7 e 15 μm de diâmetro. Usualmente, a cultura é realizada em placas de ágar sem nutrientes (ágar 1,5%, cloreto de sódio 0,5%, pH entre 6.6 e 7.0) semeadas com uma camada de *Escherichia coli* viva ou morta pelo calor (Visvesvara, 2003). As amebas ingerem as bactérias, deixando traços na camada bacteriana, a qual pode ser observada por meio da magnificação de menor aumento utilizando luz reduzida (Fig. 61.8B).

A meningoencefalite amebiana granulomatosa pode ser causada por várias espécies de *Acanthamoeba*, incluindo *Acanthamoeba castellani, Acanthamoeba culbertsoni, Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba astronyxis*, entre outras (Marciano-Cabral, 2003). Trata-se geralmente de uma infecção oportunista subaguda ou crônica em indivíduos com doença crônica, debilitados e imunodeprimidos, levando à morte semanas a meses após o início dos sintomas. Acredita-se que a infecção se dissemine pela via hematógena dos focos primários na pele, na faringe e no trato respiratório. Infecções sistêmicas ocorrem em indivíduos com AIDS e podem causar lesões cutâneas ulceradas, abscessos subcutâneos ou nódulos eritematosos (Fig. 61.8C) (Tan, 1993). A exposição à água fresca não é necessária porque os cistos da *Acanthamoeba* são transportados pelo ar e podem ser recuperados na orofaringe e nas vias nasais (Wang, 1967; Lawande, 1979). A reação tissular patológica é granulomatosa, com trofozoítos predominando no tecido viável e

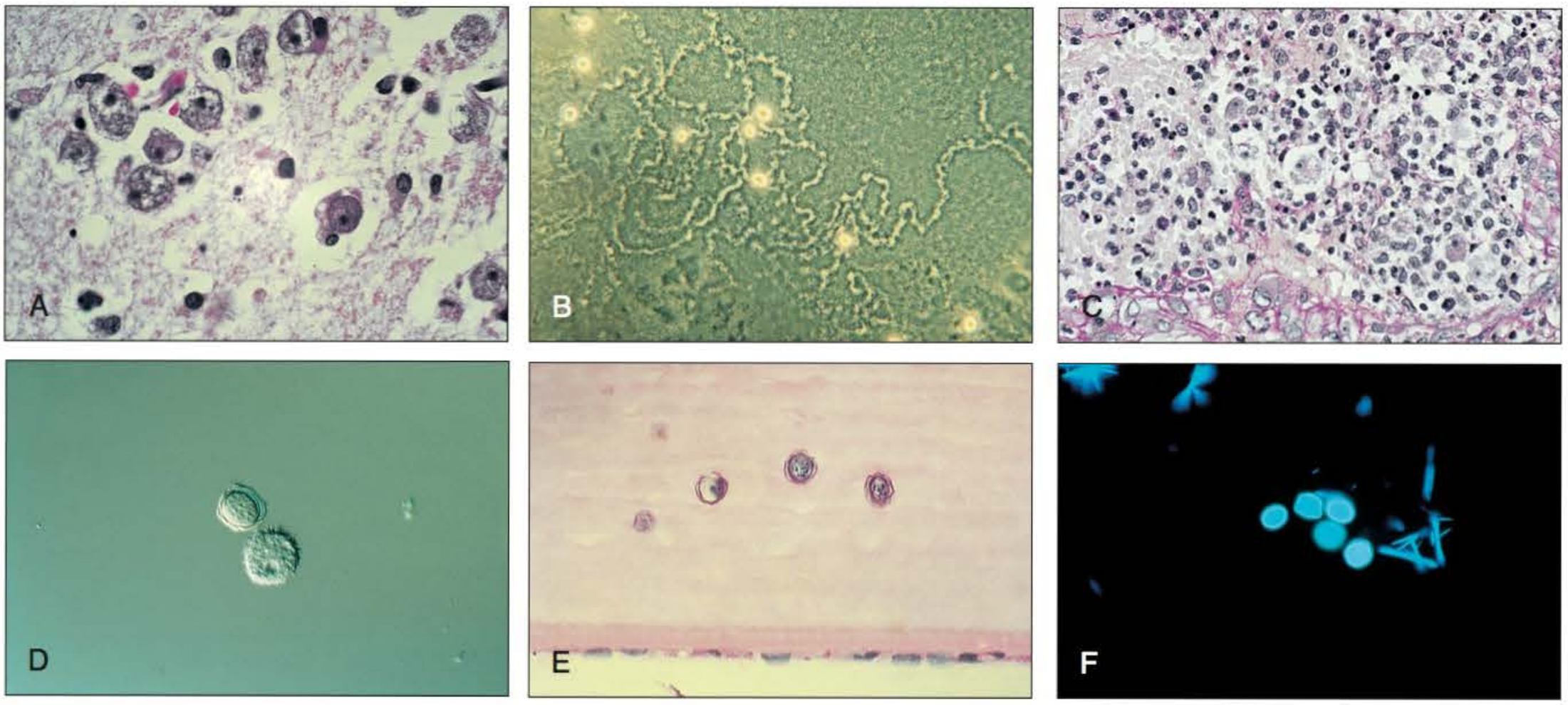


Figura 61.8 *A*, Trofozoítos de *Naegleria fowleri* na meningoencefalite amebiana primária (hematoxilina-eosina; objetiva de imersão). *B*, Cultura de *Acanthamoeba* sp. apresentando rastros deixados por trofozoítos móveis em um leito de *Escherichia coli* (microscopia de contraste de fase; x 100). *C*, Trofozoítos de *Acanthamoeba* sp. em uma lesão cutânea em um indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana (coloração de Giemsa; objetiva de imersão). *D*, Trofozoíto e cisto de *Acanthamoeba* sp. (microscopia de contraste por interferência diferencial; x 400). *E*, Cistos com parede dupla de *Acanthamoeba* spp. no estroma corneano (hematoxilina-eosina; objetiva de imersão). *F*, Cistos de *Acanthamoeba* spp. corados com calcoflúor branco (microscopia com epifluorescência; x 400).

cistos predominando nas áreas de necrose. O diagnóstico geralmente é estabelecido na autópsia, mas organismos podem ser reconhecidos em biópsias encefálicas ou recuperados utilizando a técnica de cultura descrita para *Naegleria*. Trofozoítos de *Acanthamoeba* são um pouco maiores que os de *Naegleria*, medindo entre 15 e 45 μm, e apresentam projeções filamentosas do tipo agulha. Os cistos medem de 10 a 25 μm e apresentam parede dupla, apresentando uma parede externa enrugada (ectocisto) e uma parede interna poligonal, estrelada ou redonda (endocisto) (Fig. 61.8D). A identificação da espécie é problemática e reflete a incerteza quanto à validade das 18 ou mais espécies descritas. O uso de técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase pode ser útil na diferenciação de espécies e o CDC disponibilizou essas técnicas (Visvesvara, 2003).

A meningoencefalite amebiana granulomatosa também pode ser causada pelas amebas leptomixidas, em particular a *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara, 1993). Morfologicamente, a *Balamuthia* não pode ser diferenciada da *Acanthamoeba* pela histologia de rotina, embora diferenças possam ser detectadas em âmbito ultraestrutural. Esses organismos são antigenicamente distintos e podem ser identificados por meio de ensaios de imunofluorescência ou imunoperoxidase, utilizando antisoros específicos monoclonais ou policlonais (Visvesvara, 2003). A *Balamuthia* não cresce em placas de ágar utilizadas para *Naegleria* e *Acanthamoeba*, mas foi recuperada em cultura de tecido, utilizando linhagens celulares de mamíferos.

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção dolorosa da córnea, cada vez mais reconhecida e que ocorre mais provavelmente em indivíduos que usam lentes de contato diárias ou de uso prolongado ou que sofreram traumatismos corneanos (Anuran, 1987; Kilvington, 1994; Marciano-Cabral, 2003). A desinfecção incompleta ou infrequente e o uso de soro fisiológico feito em casa são fatores de risco conhecidos para adquirir a infecção (Stehr-Green, 1990). A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de um infiltrado paracentral em anel do estroma corneano, o qual evolui para ulceração e possível perfuração com perda do olho. A infecção pode ser confundida com a ceratite fúngica, bacteriana ou herpética, mas ela é caracteristicamente refratária aos antimicrobianos em geral utilizados. A ceratoplastia tem sido utilizada rotineiramente no tratamento dessa doença, embora avanços recentes da terapia clínica tenham sido descritos (Varga, 1993). O diagnóstico, em geral, é estabelecido pela demonstração da presença de trofozoítos ou cistos amebianos em raspados ou biópsias da córnea (Fig. 61.8E). Várias colorações permanentes podem ser utilizadas, incluindo Giemsa, PAS e tricrômica. O uso do fluorocromo Calcofluor branco é útil no reconhecimento de cistos amebianos (Fig. 61.8F) (Marines, 1987). Culturas (descritas anteriormente) aumentam a sensibilidade.

Protozoários intestinais e urogenitais

Grupos de protozoários que habitam o trato intestinal nos seres humanos incluem amebas, flagelados, ciliados, coccídios e microsporídios, embora nem todos sejam patogênicos. Em uma revisão de amostras de fezes enviadas a laboratórios do serviço público, *G. lamblia* estava presente em 7,2%, *E. histolytica* em 0,9%, *D. fragilis* em 0,5% e *Cryptosporidium* spp. em 0,2% das amostras. Protozoários não patogênicos foram observados em cerca de 10,7% das amostras (Kappus, 1994). A maioria das infecções intestinais é adquirida pela contaminação orofecal, seja diretamente (manipuladores de alimentos) ou indiretamente (água contaminada).

Para a maioria dos técnicos de laboratório, a identificação de protozoários intestinais é um dos aspectos mais difíceis da parasitologia. Os parasitas protozoários são pequenos e as espécies patogênicas devem ser diferenciadas das espécies não patogênicas e das células inflamatórias, células epiteliais, leveduras, pólens e de outros objetos que podem causar confusão. Existem algumas características que ajudam a identificar protozoários intestinais. O tamanho é útil (Fig. 61.9) e um micrômetro ocular adequadamente calibrado deve estar disponível. A diferenciação de amebas dos flagelados em exames a fresco é relativamente fácil por causa dos pseudópodos típicos observados nas amebas, enquanto os flagelados se movem de modo mais rápido e de uma maneira analogamente designada como movimentação de "folha em queda", "dardo" ou "acrobática".

A quantidade e o tamanho dos núcleos e o padrão de distribuição da cromatina, mais bem observados em preparações com colorações permanentes, também são úteis. As características citoplasmáticas incluem fibrilas e outras estruturas especiais típicas dos flagelados, materiais ingeridos em trofozoítos amebianos, massas de glicogênio e corpúsculos cromatoides em cistos amebianos. Os flagelados geralmente são alongados ou cônicos, com um ou mais núcleos em uma das extremidades.

Quando examinadas por qualquer método, tanto as características nucleares quanto as citoplasmáticas devem ser avaliadas em vários organismos para completar a identificação. Ao relatar a presença de duas ou mais espécies em uma amostra, o observador deve ser capaz de definir populações distintas de organismos, para impedir a confusão com um organismo ocasional com uma aparência atípica.

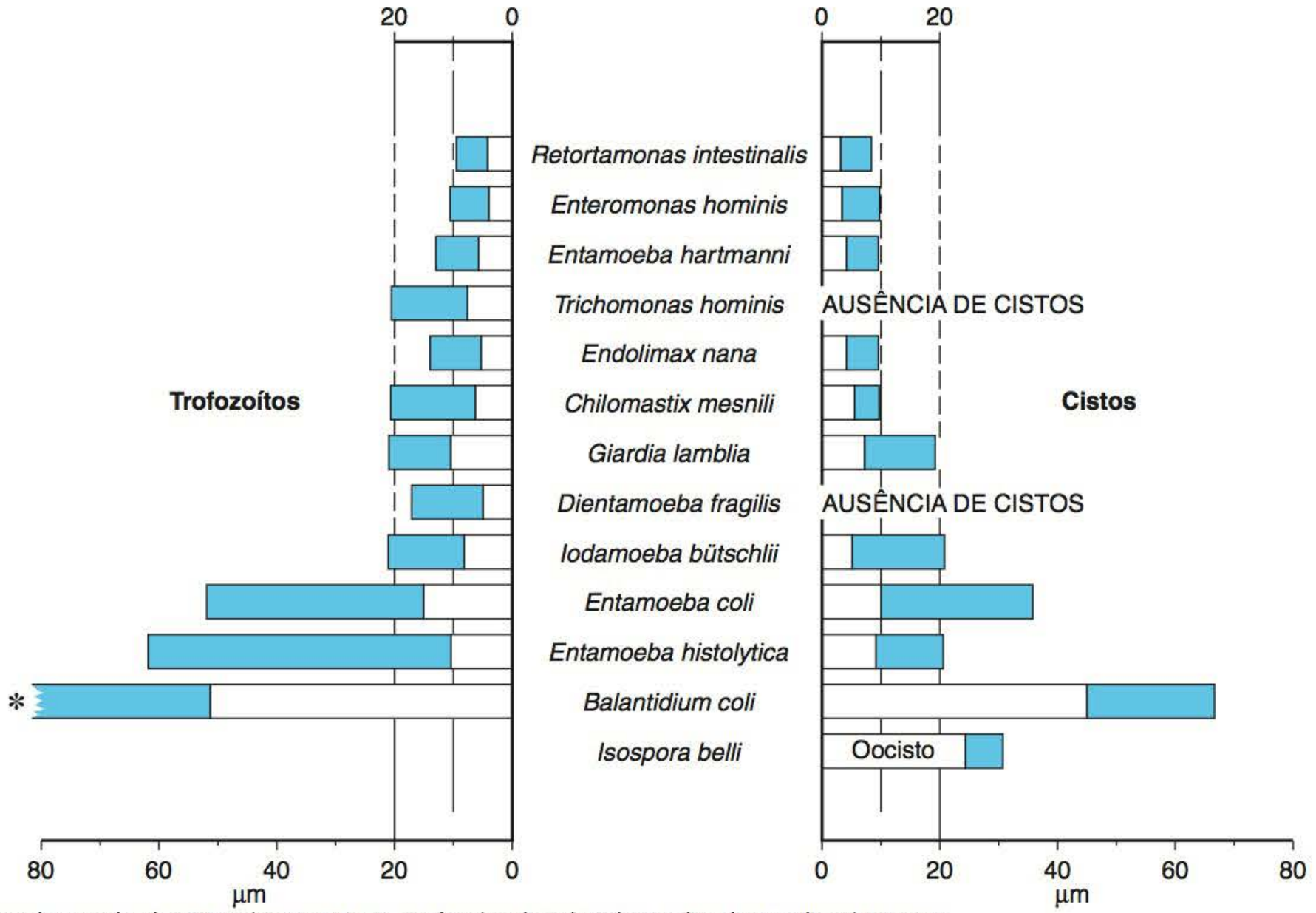


Figura 61.9 Faixas de tamanho de protozoários intestinais. (Trofozoítos de *Balantidium coli* podem medir até 200 µm.)

Os trofozoítos predominam em fezes líquidas, mas eles degeneram em uma hora após a evacuação, exceto se forem colocados em conservantes. Os cistos predominam em fezes formadas e são mais resistentes à degeneração. Ambas as formas podem ser observadas no exame direto a fresco de fezes frescas. A formalina não preserva bem os trofozoítos e eles podem não ser detectados a não ser que sejam preparados esfregaços com colorações permanentes. A identificação definitiva deve ser feita pelo exame de lâminas de material com coloração permanente.

Amebas e *Blastocystis hominis*

Três gêneros de amebas podem habitar o trato intestinal humano: *Entamoeba, Endolimax* e *Iodamoeba*. Os cistos são ingeridos e desencistam no intestino delgado. Os trofozoítos resultantes proliferam por divisão binária na luz do cólon. Tanto os cistos quanto os trofozoítos podem ser eliminados nas fezes, mas somente os cistos maduros são infectantes. A *E. histolytica* é a única espécie de ameba capaz de invadir tecidos e causar doença.

O gênero *Entamoeba*, caracterizado pela presença de cromatina na membrana nuclear, inclui a *E. histolytica*, o agente etiológico da amebíase; a *E. dispar*, uma espécie não patogênica morfologicamente idêntica à *E. histolytica*; a *E. hartmanni* e a *Entamoeba coli*, as quais são espécies comensais observadas com frequência; e a *Entamoeba polecki*, a qual é ocasionalmente observada em indivíduos que têm contato com porcos (Fig. 61.10) (Levin, 1970; Gay, 1985). A *Entamoeba gingivalis*, a qual não apresenta um estágio de cisto conhecido, pode habitar a cavidade oral de indivíduos com má higiene oral (Dao, 1983). A *E. polecki* e a *E. gingivalis* são raramente observadas e não serão descritas com mais detalhes. A *Endolimax nana* e a *Iodamoeba bütschlii* são espécies não patogênicas. A *Dientamoeba fragilis* é reconhecida atualmente como um flagelado, mas ela não apresenta flagelo externo. Ela é analisada com os flagelados no texto, porém, pode ser encontrada junto com as amebas em tabelas e ilustrações porque ela é morfologicamente similar (Murray, 2003).

Entamoeba histolytica

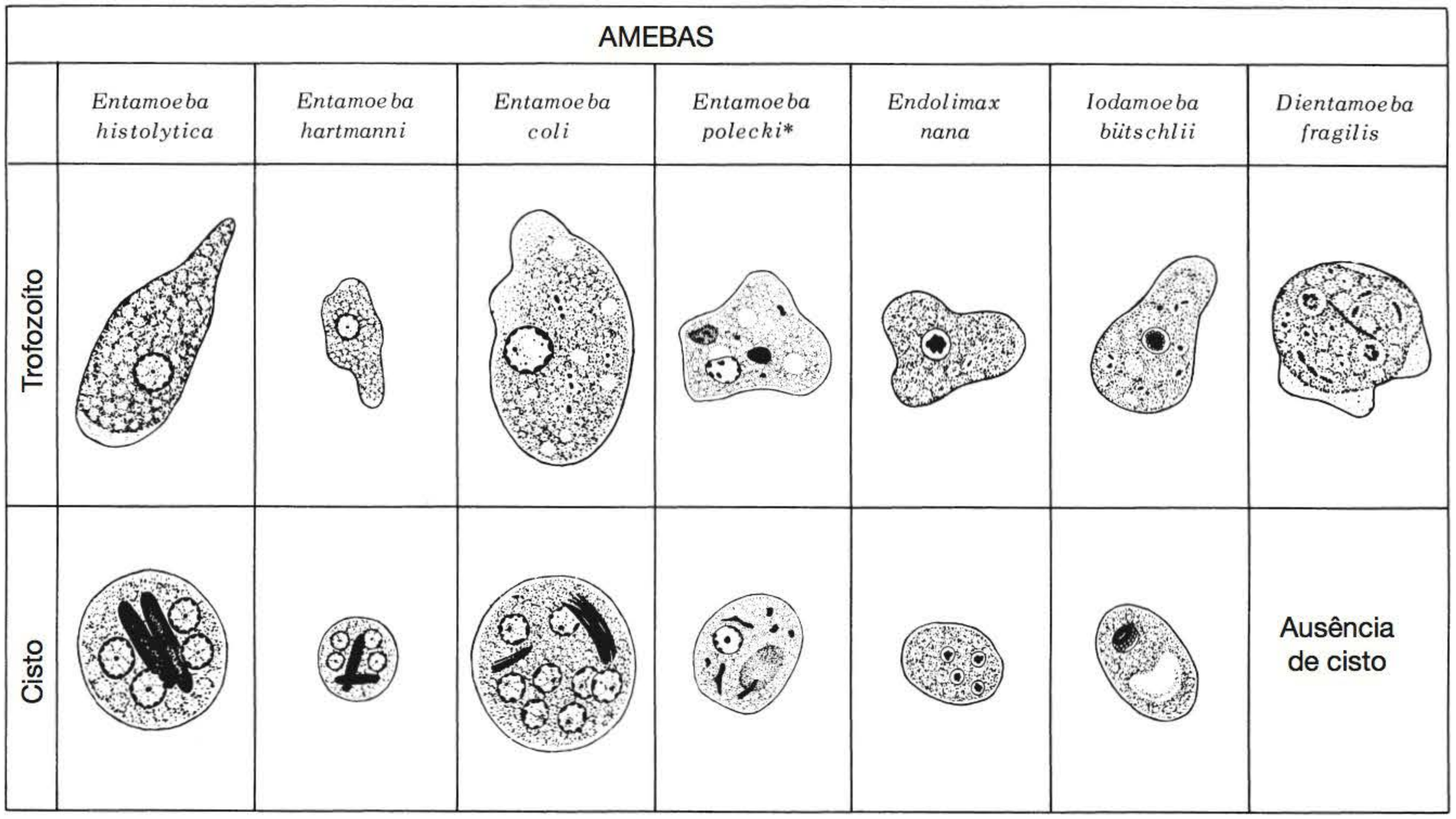
A *E. histolytica* pode causar várias doenças clínicas, mais comumente a disenteria amebiana, a colite amebiana e os abscessos hepáticos (Beaver, 1984; Ravdin, 1988; Strickland, 2000). Os mecanismos gerais de defesa do hospedeiro, o contato prévio com o parasita, a dieta e a cepa de *E. histolytica* influenciam na gravidade da infecção. A análise do padrão da isozima (zimodemo) demonstrou que somente certas cepas podem causar doença invasiva e que a maioria das infecções permanece não detectada (Bruckner, 1992; Murray, 2003). Foram identificadas diferenças genéticas e bioquímicas entre as cepas invasivas e não invasivas e foi proposto que as cepas não patogênicas fossem denominadas *Entamoeba dispar* (Diamond, 1993).

A disenteria amebiana, pouco frequente nos Estados Unidos, é uma doença aguda caracterizada por uma diarreia sanguinolenta acompanhada de cólicas abdominais. Ocorre invasão da mucosa intestinal, produzindo ulceração que pode levar à perfuração e à peritonite. A forma mais comum da doença observada nos Estados Unidos é a colite amebiana, a qual pode simular a colite ulcerativa e as outras formas de doença intestinal inflamatória. Os sintomas, em geral, são menos graves do que os da disenteria amebiana, mas podem incluir diarreia não sanguinolenta, constipação, cólicas abdominais e perda de peso. Pequenas ulcerações mucosas puntiformes podem ocorrer e expandir para a submucosa, formando úlceras em forma de frasco. Todo o cólon pode ser envolvido ou apenas uma porção do mesmo, mais comumente o ceco, o retossigmoide ou o cólon ascendente.

O abscesso amebiano hepático é a forma mais comum de amebíase extraintestinal, ocorrendo em cerca de 5% dos pacientes com uma história de amebíase intestinal. Os sintomas incluem febre e dor no quadrante superior direito do abdômen. Esses abscessos hepáticos geralmente são diagnosticados por exames radiológicos, ultrassonografia e exames sorológicos. Amebas estão presentes nas fezes em menos de 50% dos pacientes no momento em que o abscesso hepático se manifesta. A hepatite amebiana, caracterizada por uma hepatomegalia dolorosa em uma pessoa com amebíase intestinal, pode ocorrer em alguns casos. A sua patogênese é mal conhecida. Raramente, ocorre a formação de abscessos amebianos em outros órgãos (p. ex., pulmões, cérebro ou pele) pela disseminação hematogênica a partir do intestino ou pela disseminação contígua de um abscesso hepático. Massas de tecido granulomatoso, conhecidas como amebomas, podem se formar em resposta à presença de amebas, que podem causar no intestino uma lesão em "anel de guardanapo", que pode ser confundida com um carcinoma.

Epidemiologia

A maioria das infecções por *E. histolytica* é adquirida pela ingestão de alimentos ou água contaminados, embora uma epidemia tenha sido causada por um aparelho de irrigação colônica contaminado (Is-



*Rara, provavelmente de origem animal

Figura 61.10 Amebas encontradas em amostras de fezes humanas. (A *Dientamoeba fragilis* é um flagelado.)

tre, 1982). A identificação incorreta de células inflamatórias, de outras epidemias e de resíduos fecais como *E. histolytica* resultou em falsas epidemias de amebíase (Krogstad, 1978; Centers for Disease Control and Prevention, 1985). Embora a *E. histolytica* seja um parasita endêmico nos Estados Unidos, muitos indivíduos adquirem a infecção ao viajar para o exterior ou ao morar em outros países.

Diagnóstico

O exame de uma série de amostras de fezes deve ser suficiente para o diagnóstico da amebíase intestinal na maioria dos casos. Quando o paciente tiver sido submetido a uma antibioticoterapia ou tiver utilizado um meio de contraste, a infecção amebiana pode ser mascarada durante algum tempo. Aspirados de abscesso hepático podem ser examinados ao microscópio para a detecção de trofozoítos. O último material aspirado é o que apresenta maior probabilidade de conter trofozoítos e pode ser examinado através da microscopia direta ou de lâminas coradas permanentemente. Quando existe tecido disponível, os cortes podem revelar organismos que coram de forma proeminente com PAS (Fig. 61.11C).

Culturas (Diamond, 1988; Visvesvara, 2004a; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005) não são amplamente utilizadas para diagnóstico. No entanto, elas podem ser úteis na pesquisa e são essenciais para a determinação da patogenicidade baseada nos zimodemos. Existem, no comércio, métodos de detecção de antígeno por imunoensaio enzimático específicos, sensíveis e capazes de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. (Tab. 61.5) (Garcia, 2003; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). O uso de técnicas de amplificação por PCR e sondas de DNA também é útil na diferenciação da *E. histolytica* da *E. dispar* (Samuelson, 1989; Bendall, 1993; Weiss, 1995), mas, até o momento, essas técnicas não estão disponíveis comercialmente.

Exames sorológicos (Tab. 61.6) são os mais úteis para o diagnóstico de infecções extraintestinais porque aproximadamente 95% dos pacientes com abscesso amebiano hepático são soropositivos. A porcentagem diminui para 70% para pacientes com infecção intestinal ativa e para 10% para portadores assintomáticos. Títulos detectáveis podem persistir por meses ou anos após um tratamento bem-sucedido (Rosenblatt, 1995; Wilson, 1995).

Trofozoítos de *E. histolytica* variam de 10 a 60 μm de diâmetro, com as formas comensais apresentando geralmente um diâmetro aproximado de 15 a 20 μm e as formas invasivas apresentado uma dimensão máxima superior a 20 μm (Tab. 61.9; Figs. 61.9 a 61.12). No exame a fresco, os trofozotítos podem apresentar uma motilidade progressiva por causa dos pseudópodes hialinos rapidamente formados que revelam uma nítida demarcação entre o endoplasma e o ectoplasma; os núcleos não corados não são visíveis. Na doença invasiva, alguns trofozoítos podem conter eritrócitos ingeridos (Fig. 61.11C), uma característica diagnóstica da infecção por *E. histolytica*. Em preparações coradas, a cromatina nuclear periférica é homogeneamente distribuída ao longo da membrana nuclear como pequenos grânulos. O cariossoma é pequeno e, com frequência, de localização central, com fibrilas finas, as quais, em geral, não são visíveis, ligadas à membrana nuclear. Ocorrem variações na estrutura nuclear, com alguns cariossomas localizados fora do centro e a cromatina periférica distribuída irregularmente. A única característica que é patognomônica da *E. histolytica* é a fagocitose de eritrócitos, a qual ocorre com pouca frequência com outras espécies. O citoplasma é finamente granulado e, em organismos invasivos, não há inclusões ou há apenas inclusões de eritrócitos. Organismos não invasivos podem conter bactérias ingeridas. Em organismos em degeneração, o citoplasma pode se tornar vacuolado e os núcleos podem apresentar um agregado anormal de cromatina.

Os cistos de *E. histolytica* são esféricos e medem entre 10 e 20 μm (usualmente, entre 12 e 15 μm) de diâmetro (Tab. 61.10; Figs. 61.9, 61.10 e 61.12). O estágio arredondado de pré-cisto apresenta um único núcleo, mas não apresenta uma parede cística retrátil. Conforme ele amadurece, o cisto desenvolve quatro núcleos, cada um com um diâmetro aproximado de um sexto do diâmetro original. Os núcleos do cisto assemelham-se aos dos trofozoítos, mas seu tamanho é menor, o que os torna menos úteis como uma característica diferenciadora. O citoplasma do cisto pode conter vacúolos de glicogênio e corpúsculos cromatoides com extremidades arredondadas. A quantidade e o tamanho dos núcleos e a presença de corpúsculos cromatoides são critérios diagnósticos importantes para a identificação de cistos.

Tabela 61.9 Morfologia de trofozoítos de amebas intestinais

Espécie	Tamanho (em diâmetro ou comprimento)	Motilidade	Número de núcleos‡	Cromatina periférica	Cromatina cariossômica	Aparência do citoplasma	Inclusões
Entamoeba histolytica/E. dispar	10–60 µm; faixa usual de 15–20 µm para a forma comensal*; mais de 20 µm para a forma invasiva†	Progressiva, com pseudópodos digitiformes hialinos	1 Não visível em preparações não coradas	Grânulos finos; usualmente distribuídos homogeneamente e com tamanho uniforme	Pequena, discreta; usualmente central, mas às vezes pode ser excêntrica	Finamente granulado	Eritrócitos ocasionalmente nas formas invasivas. Formas não invasivas contêm bactérias
Entamoeba hartmanni	5–12 µm; faixa usual de 8–10 µm	Usualmente não progressiva, mas pode ser ocasionalmente progressiva	1 Não visível em preparações não coradas	Similar a *E. histolytica*	Pequena, discreta, frequentemente excêntrica	Finamente granulado	Bactérias
Entamoeba coli	15–50 µm; faixa usual de 20–25 µm	Lenta, não progressiva, com pseudópodos rombudos	1 Frequentemente visível em preparações não coradas	Grânulos grosseiros, tamanho e distribuição irregulares	Grande, discreta, usualmente excêntrica	Grosseiro, frequentemente vacuolado	Bactérias, fungos e outros materiais
Endolimax nana	6–12 µm; faixa usual de 8–10 µm	Lenta, geralmente não progressiva, com pseudópodos rombudos	1 Visível ocasionalmente em preparações não coradas	Nenhuma	Grande e com forma irregular	Granulado, vacuolado	Bactérias
Iodamoeba bütschlii	8–20 µm; faixa usual de 12–15 µm	Lenta, geralmente não progressiva	1 Usualmente não visível em preparações não coradas	Nenhuma	Grande, usualmente central. Circundada por grânulos refrativos acromáticos. Esses grânulos frequentemente não são distintos, mesmo em lâminas coradas	Granulado grosseiramente, vacuolado	Bactérias, fungos e outros materiais
Dientamoeba fragilis§	5 a 15 µm; faixa usual de 9 a 12 µm	Os pseudópodos são angulosos, serrilhados ou com lobulação larga, e hialinos, quase transparentes	2 (Em aproximadamente 20% dos organismos, somente 1 núcleo está presente.) Os núcleos são invisíveis em preparações não coradas	Nenhuma	Grande aglomerado de 4–8 grânulos	Finamente granulado, vacuolado	Bactérias

* Usualmente encontrada em casos assintomáticos ou crônicos; pode conter bactérias. † Usualmente encontrada em casos agudos; frequentemente contém eritrócitos. ‡ A visibilidade é para material não fixado. Algumas vezes, núcleos podem ser visíveis em material fixado.§ Um flagelado (ver texto).

Fonte: adaptado de Brooke MM, Melvin DM: Morphology of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Man. USDHEW PHS Publication nº. 1966, 1969.

Os laboratórios que não utilizam métodos imunológicos ou moleculares para diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar* e que se baseiam exclusivamente na análise morfológica devem utilizar um formato de relatório que leve em consideração as diferentes tecnologias. Por isso, um relatório de "*E. histolytica/E. dispar*" deve ser o mais adequado nessas circunstâncias.

Amebas não patogênicas

A equipe do laboratório deve ser capaz de diferenciar as amebas intestinais não patogênicas ou comensais de *E. histolytica/E. dispar* e *D. fragilis* (um flagelado), as quais são potencialmente patogênicas. As características de identificação, mais bem visualizadas em cortes de tecido corados permanentemente, são resumidas nas Tabelas 61.9 (acima) e 61.10 (p. 1301) e nas Figuras 61.9, 61.10 e 61.12. A identificação de trofozoítos baseia-se no tamanho e nas características nucleares e citoplasmáticas; a identificação de cistos baseia-se no tamanho, na quantidade e nas características dos núcleos, e na presença de corpúsculos cromatoides e massas de glicogênio.

A *E. hartmanni* apresenta características morfológicas semelhantes às da *E. histolytica*, exceto pelo fato de os trofozoítos apresentarem um diâmetro máximo de 12 µm e os cistos um de 10 µm além de possuírem, em geral, apenas um núcleo. Historicamente, a *E. hartmanni* foi denominada a pequena raça da *E. histolytica*. A diferenciação exige a mensuração rigorosa de uma amostra representativa de organismos com um micrômetro ocular calibrado de modo adequado.

A *Entamoeba coli*, uma ameba comum que habita o intestino, pode ser difícil de ser diferenciada da *E. histolytica*. O citoplasma cora um pouco mais fortemente do que o citoplasma da *E. histolytica* e é mais vacuolado, contendo numerosas bactérias, leveduras e outros materiais ingeridos. Embora as características nucleares sejam diferentes das da *E. histolytica* (Fig. 61.12), pode ocorrer uma sobreposição importante, em especial em amostras que não foram preservadas imediatamente. Cistos maduros de *E. coli* contêm oito núcleos, embora cistos ocasionais possam conter 16 ou mais. Cistos imaturos, os quais não são comuns, contêm quatro núcleos maiores (um quarto do diâmetro do cisto) que os núcleos da *E. histolytica* (um sexto do diâmetro do cisto) e podem conter glicogênio. A distribuição da cromatina periférica e dos cariossomas não deve ser enfatizada na identificação de cistos de *Entamoeba*. Quando presentes, corpúsculos cromatoides apresentam uma forma irregular com extremidades pontiagudas e não extremidades arredondadas como observadas na *E. histolytica*.

A *Endolimax nana* é a menor ameba a infectar humanos. Frequentemente, os trofozoítos apresentam núcleos atípicos que con-

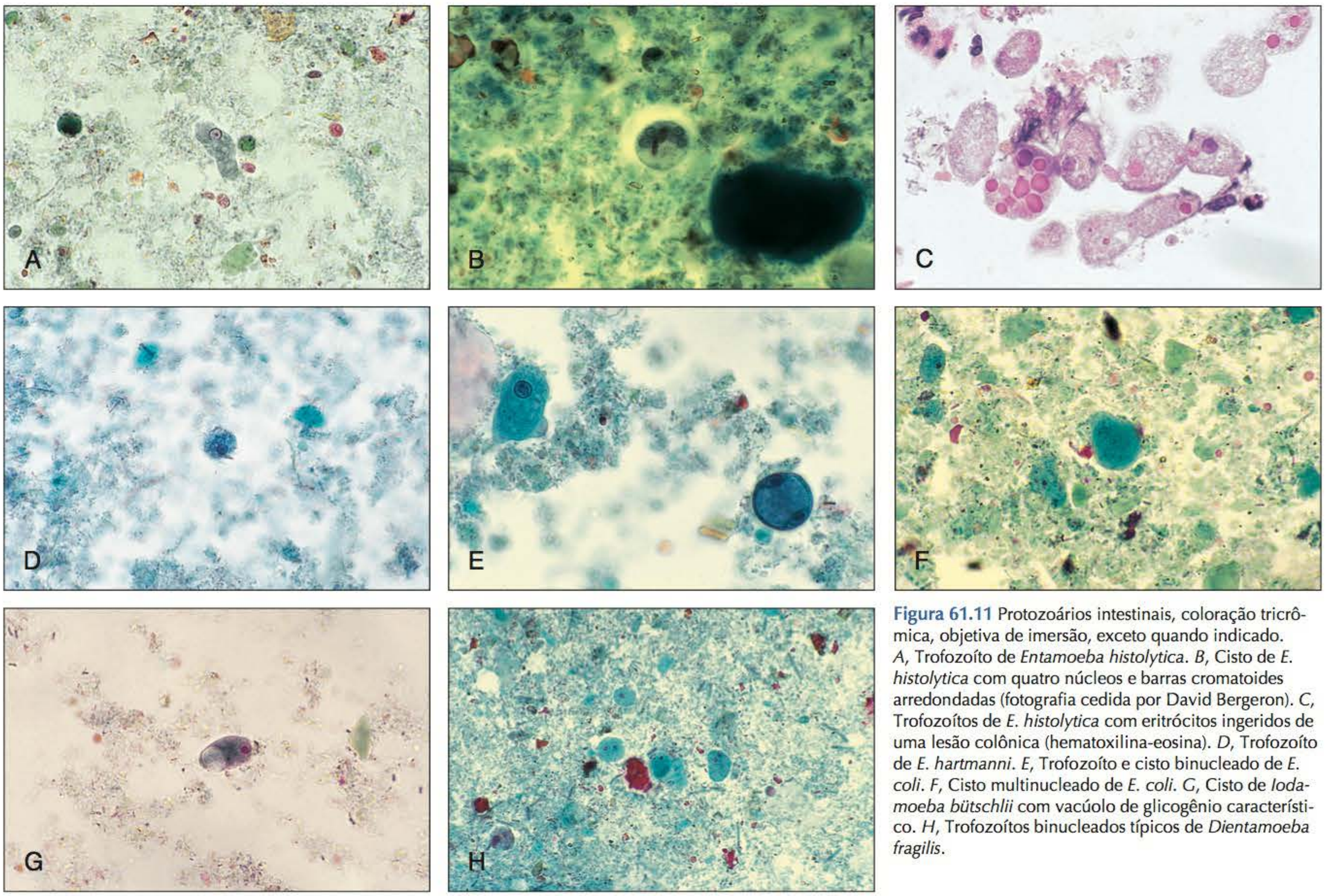


Figura 61.11 Protozoários intestinais, coloração tricrômica, objetiva de imersão, exceto quando indicado. *A*, Trofozoíto de *Entamoeba histolytica*. *B*, Cisto de *E. histolytica* com quatro núcleos e barras cromatoides arredondadas (fotografia cedida por David Bergeron). *C*, Trofozoítos de *E. histolytica* com eritrócitos ingeridos de uma lesão colônica (hematoxilina-eosina). *D*, Trofozoíto de *E. hartmanni*. *E*, Trofozoíto e cisto binucleado de *E. coli*. *F*, Cisto multinucleado de *E. coli*. *G*, Cisto de *Iodamoeba bütschlii* com vacúolo de glicogênio característico. *H*, Trofozoítos binucleados típicos de *Dientamoeba fragilis*.

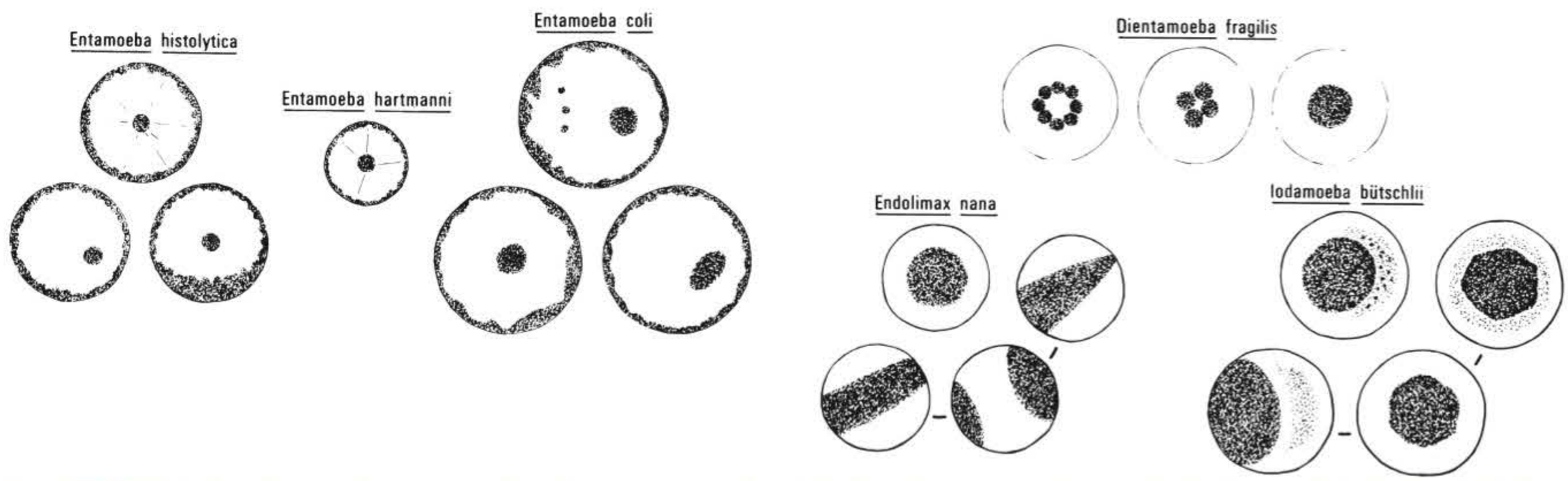


Figura 61.12 Núcleos de amebas. Este desenho mostra alguns dos vários aspectos dos núcleos de amebas em preparações coradas. (A *Dientamoeba fragilis* é um flagelado, ver texto.)

têm uma massa de cromatina triangular, uma faixa de cromatina através do núcleo ou duas massas discretas de cromatina em lados opostos da membrana nuclear (Fig. 61.12). Um halo transparente ou um espaço de cariolinfa circunda o cariossoma e estende-se até a membrana nuclear. As formas nucleares atípicas podem ser úteis na diferenciação da *E. nana* da *I. bütschlii*, a qual apresenta uma aparência similar, mas é maior. Cistos de *Endolimax* em geral contêm quatro núcelos, embora uma quantidade menor possa ser observada. Quando presente, o glicogênio apresenta uma distribuição difusa no citoplasma em vez de uma massa discreta. Cistos são facilmente diferenciados dos cistos de outras amebas, mas podem ser confundidos com *Blastocystis hominis*. No entanto, os núcleos do *B. hominis* não apresentam os halos que são tipicamente observados nos cistos de *E. nana*.

Os núcleos de trofozoítos e cistos de *I. bütschlii* apresentam um cariossoma grande e localizado centralmente, com frequência circundado por grânulos acromáticos que podem não ser distintos, mas aparecem apenas como um espaço de cariolinfa lamacento ou um halo. Em alguns núcleos, o halo é transparente, sem evidência de grânulos acromáticos, tornando o organismo indiferenciável da *E. nana*. Cistos de *I. bütschlii* contêm um único núcleo, no qual o cariossoma é geralmente excêntrico com uma crescente vizinha de grânulos acromáticos (ver Figs. 61.9, 61.10 e 61.12). O cisto é caracterizado por um vacúolo de glicogênio proeminente que cora de marrom avermelhado no exame a fresco corado com iodo. Essa é a razão do nome do organismo. O glicogênio é dissolvido por fixadores aquosos e pode não ser demonstrável em material que foi armazenado.

Blastocystis hominis

O *B. hominis* é um protozoário amebiforme que habita o intestino grosso e é frequentemente observado em amostras de fezes de indivíduos assintomáticos. Alguns estudos relacionaram infecções maciças à doença intestinal sintomática, embora isso permaneça sendo controverso (Markell, 1986; Sheehan, 1986; Miller, 1988; Zierdt, 1991; Stenzel, 1996). O *Blastocystis* pode assumir três formas: vacuolada, a mais comumente observada; ameboide; ou granular. A forma vacuolada, também conhecida como forma vacuolar central, em geral é esférica e de tamanho variável (5 a 20 μm), com uma área central clara e dois a quatro núcleos periféricos (Figs. 61.13A e 61.14G). Formas ameboides com formas bizarras podem predominar em infecções maciças. A presença de *Blastocystis* deve ser relatada, especialmente quando eles forem numerosos (5 ou mais por campo 400×) (Sheehan, 1986; Stenzel, 1996).

Flagelados

Dientamoeba fragilis

A *D. fragilis* é um patógeno ameboide que infecta o cólon e foi associado à doença diarreica, especialmente em crianças jovens (Yang, 1977; Spencer, 1979; Turner, 1985; Preiss, 1991; Johnson, 2004). Embora apresente uma aparência similar à das amebas, a *Dientamoeba* foi classificada como um flagelado com base em detalhes ultraestruturais e similaridades antigênicas. Além disso, não foi descrito o estágio de cisto. Por causa da similaridade da *Dientamoeba* às amebas na microscopia de luz, essa espécie foi tradicionalmente incluída em tabelas e ilustrações relativas às amebas (ver Tab. 61.9, Figs. 61.9, 61.10, 61.11H e 61.12).

Os sintomas da infecção por *D. fragilis* incluem a diarreia e a distensão abdominal. Evidências recentes sugerem que a diantamebíase é uma causa mais frequente de diarreia do que se supunha anteriormente; em um estudo, 4,3% dos pacientes apresentavam esse organismo (Spencer, 1979; Murray, 2003). Cerca de 25% dos indivíduos infectados por esse parasita apresentam doença sintomática. Em contraste com a amebíase, essa infecção, em geral, não está associada a outros protozoários fecais, mas apresenta uma associação entre 10 e 20 vezes superior à esperada com a enterobíase (analisada a seguir). Essa associação e algumas evidências experimentais sugerem que a infecção por *D. fragilis* pode disseminar-se pela ingestão de ovos de *Enterobius* infectados por *D. fragilis* (Burrows, 1956; Johnson, 2004). A infecção por *D. fragilis* pode passar despercebida, exceto quando lâminas com coloração permanente são examinadas. Múltiplas amostras podem ser necessárias porque a eliminação varia de um dia para outro. Na preparação de esfregaços, a última porção da amostra de fezes evacuadas deve ser examinada porque a quantidade de parasitas tende a ser maior. Cerca de 2/3 a 4/5 dos organismos apresentam dois núcleos que consistem em um agrupamento de quatro ou oito grânulos cariossômicos, os quais podem parecer com um grande cariossoma irregular (Fig. 61.12). A *D. fragilis* uninucleada pode ser confundida com trofozoítos de *E. nana* ou *I. bütschlii*. O citoplasma é finamente granular e, com frequência, contém bactérias ingeridas. Os trofozoítos são delicados e podem passar despercebidos, de modo que as lâminas coradas devem ser examinadas com atenção. Foi descrito um método de imunofluorescência que pode ajudar na detecção desse parasita, mas ele não está disponível comercialmente (Chan, 1993).

Giardia lamblia

A *Giardia lamblia* é um protozoário intestinal patogênico que causa doença endêmica e epidêmica em todo o mundo e, nos Estados Unidos, é especialmente problemática para viajantes, campistas, funcionários de creches e homens homossexuais (Wolfe, 1992). Ela com frequência causa doença em indivíduos que ingerem água contaminada e uma quantidade de grandes epidemias devidas à água foram descritas em locais como Aspen, Colorado; Leningrado, Rússia; e Roma, Nova York (Craun, 1986). Protozoários patogênicos não são mortos pelas concentrações usuais de cloro em suprimentos municipais de água e, a não ser que o suprimento de água seja filtrado, eles podem servir como fonte de infecção, como ocorreu na epidemia em Roma, Nova York.

Trofozoítos da *G. lamblia* multiplicam-se no intestino delgado e fixam-se à mucosa por meio de um disco de sucção côncavo ventral. A infecção pode ser assintomática ou pode causar doença, variando de uma diarreia leve com queixas intestinais vagas até uma síndrome de má absorção com diarreia e esteatorreia, similar ao espru. A patogênese não é totalmente conhecida, embora a ruptura da integridade da borda em escova, com consequente deficiência de dissacaridase, possa ocorrer em virtude de efeitos diretos ou indiretos da presença de organismos (Wolfe, 1992). A giardíase deve ser considerada em qualquer paciente que apresentar diarreia com duração superior a 10 dias.

O diagnóstico é estabelecido pela demonstração de trofozoítos e/ou cistos de *Giardia* em amostras de fezes. Os trofozoítos predominam nas fezes diarreicas, enquanto é mais provável a detecção dos cistos infectantes em fezes formadas. A eliminação de organismos varia de um dia a outro e, por essa razão, o exame de múltiplas amostras, coletadas em dias diferentes, pode ser necessário. O exame a fresco é útil para a demonstração de trofozoítos, com a chamada motilidade de "folha em queda", em uma amostra diarreica ou de aspirado. Cistos podem ser observados no exame a fresco e com técnicas de concentração, e ambos, trofozóitos e cistos, podem se manisfestar em lâminas coradas permanentemente. Tanto a presença de trofozoítos quanto de cistos pode ser demonstrada em amostras de fezes e aspirados do intestino delgado, ou amostras do chamado teste da corda (*string test*) podem ser necessários. Nessas situações, o laboratório deve ser prevenido com antecedência, de modo que haja pessoal disponível para a realização do exame a fresco imediatamente após a chegada da amostra.

Muitos métodos de detecção de antígeno baseados na imunofluorescência ou no imunoensaio enzimático estão disponíveis no comércio (Garcia, 2001, 2003; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Parece que eles apresentam uma boa sensibilidade e especificidade e podem detectar algumas infecções não identificadas no exame morfológico de fezes. Eles também podem ser particularmente úteis em investigações epidemiológicas, mas não podem substituir o exame morfológico tradicional da amostra para detectar outros parasitas patogênicos.

Quando vistos em uma dimensão mais ampla, trofozoítos de *Giardia* são piriformes com uma extremidade posterior cônica e apresentam dois núcleos que lhes conferem um aspecto de face sorridente com olhos proeminentes (Tab. 61.11; Figs. 61.13B e 61.14C a E). Quando vistos lateralmente, a extremidade anterior do organismo é mais espessa e apresenta uma conização posterior. O disco de sucção representa 1/2 a 3/4 anteriores da superfície ventral. Os flagelos (4 laterais, 2 ventrais e 2 caudais) geralmente não são evidentes no exame a fresco ou nas preparações coradas. Os cistos são ovais e, em geral, possuem quatro núcleos. Abaixo dos núcleos, encontram-se corpúsculos médios corados fortemente que cruzam fibrilas longitudinais, conferindo as características internas distintas. O citoplasma, em geral, encontra-se retraído da parede do cisto.

Chilomatix mesnili

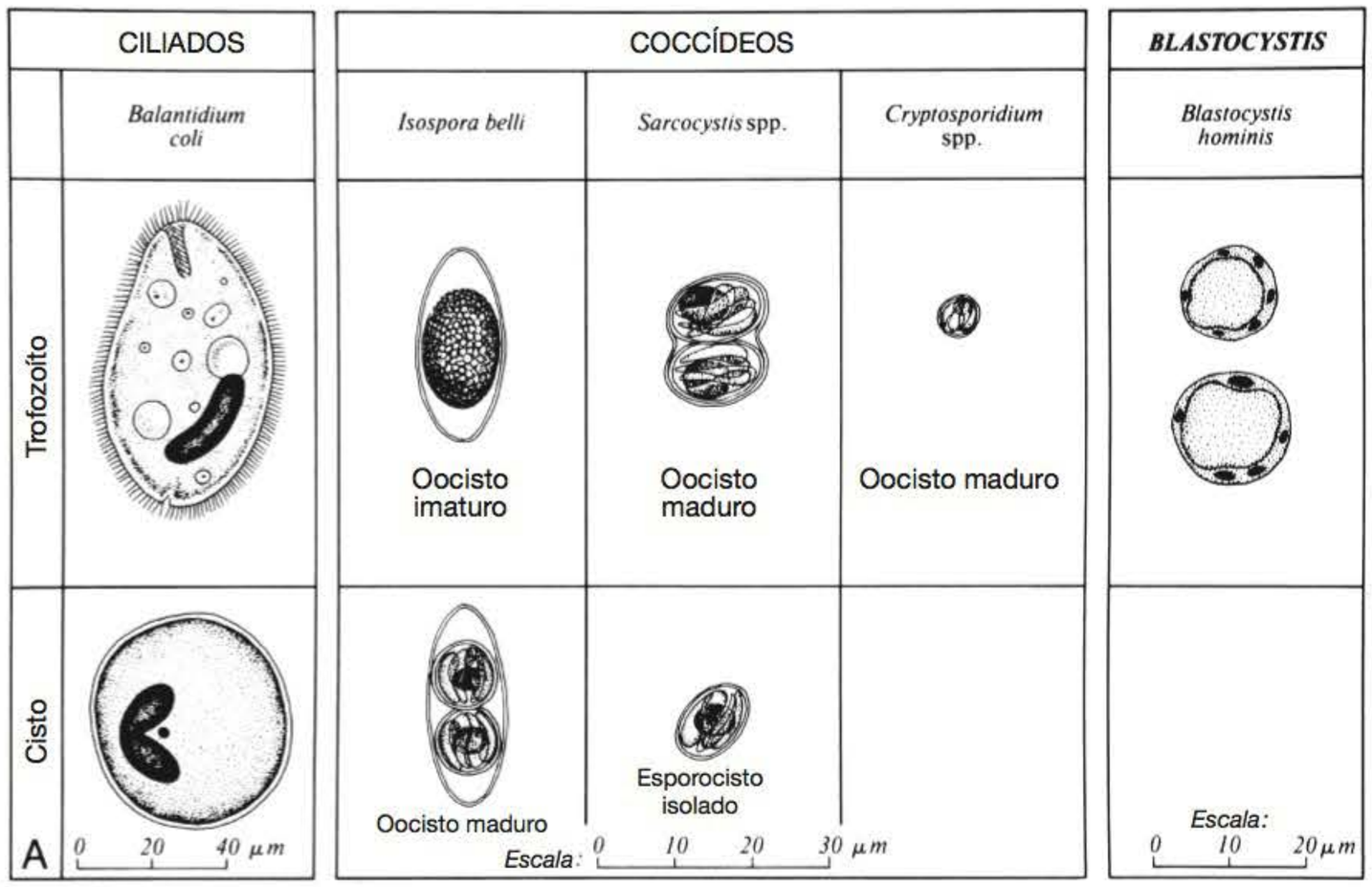
O *Chilomatix mesnili* (Tab. 61.11, Figs. 61.13B e 61.14F) é um flagelado intestinal não patogênico para humanos e que deve ser diferenciado de trofozoítos de amebas e *Giardia* em esfregaços corados. A localização constante do único núcleo em uma extremidade do organismo e a conização da extremidade oposta ao núcleo são úteis. Quando múltiplos organismos são examinados, o citostoma e o sulco espiral são visíveis em alguns deles. Os três flagelos externos geralmente não são visíveis em preparações coradas ou fixadas com formalina. Os cistos em forma de limão contêm várias fibras citostomais curvadas com um aspecto de alfinete de segurança.

Pentatrichomonas hominis

O *Pentatrichomonas hominis*, anteriormente denominado *Trichomonas hominis* (Tab. 61.11, Fig. 61.13B), é um flagelado intestinal não patogênico que pode ser confundido com *E. hartmanni* ou pequenos trofozoítos de *E. histolytica*. Ele não cora particularmente bem e com frequência é distorcido em esfregaços com coloração permanente. Pode ser necessário examinar vários organismos em preparações coradas para se demonstrar o núcleo único similar ao da *Entamoeba*, a membrana ondulante e a costa associada, e os flagelos. Um objeto tipo bastão proeminente, o axóstilo, atravessa o organismo e projeta-se na extremidade posterior. Nenhum estágio de cisto foi descrito.

Trichomonas vaginalis

O *Trichomonas vaginalis* é uma causa comum de vaginite, caracterizada por inflamação, prurido, secreção vaginal e, às vezes, disúria. A infecção é disseminada pela relação sexual, com frequência por homens que apre-



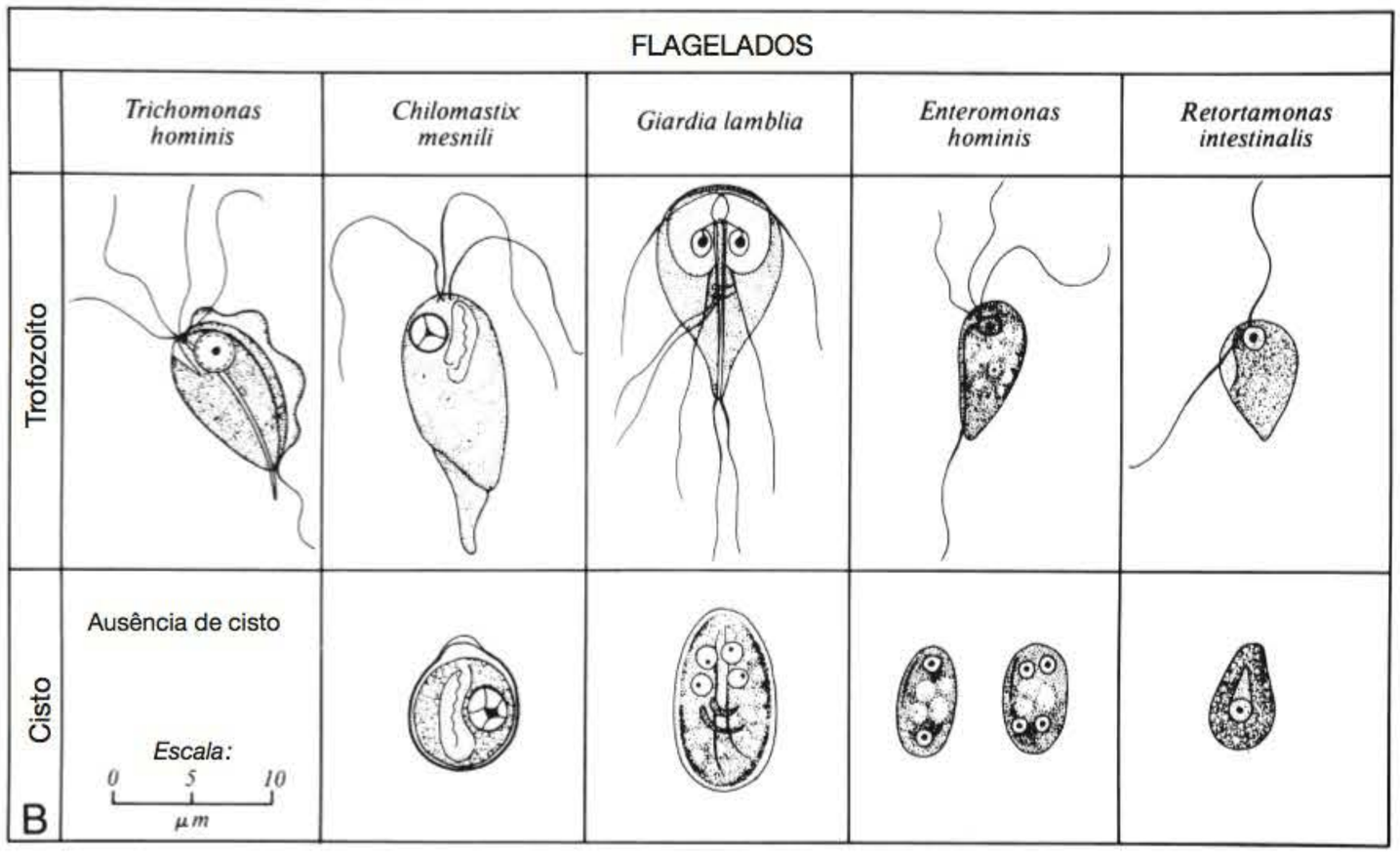


Figura 61.13 *A*, Ciliados, *Coccidia* e *Blastocystis* spp encontrados em amostras de fezes humanas. *B*, Flagelados encontrados em amostras de fezes humanas. (Adaptado de Brooke MM, Melvin DM: Morphology of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Man. Publication nº [CDC] 848116. Washington, DC, United States Department of Health and Human Services, 1984.)

sentam uma infecção assintomática. Ocasionalmente, homens podem apresentar prostatite ou uretrite sintomáticas. Infecções por *T. vaginalis*, em geral, são diagnosticadas no consultório por meio do exame a fresco de secreção vaginal, líquido prostático ou sedimentos de urina recém-coletada. Morfologicamente, o *T. vaginalis* assemelha-se ao *P. hominis*, mas é maior (até 23 μm) e a membrana ondulante estende-se apenas ao longo da metade do corpo. Por causa da diferença de hábitat, em geral não é necessário diferenciar esses organismos morfologicamente.

O exame a fresco pode não ser sensível e o uso de cultura ou de imunoensaios disponíveis no comércio é recomendado quando a infecção não for identificada de imediato (Garcia, 2001; Murray, 2003). Culturas, incluindo o uso de um sistema conveniente de "bolsa", apresentam uma sensibilidade de aproximadamente 90% (Krieger, 1988; Schmid, 1989; Beal, 1992; Levi, 1997), assim como as técnicas de imunofluorescência e de imunoensaio enzimático que utilizam anticorpos monoclonais (Krieger, 1988; Lisi, 1988; Wilson, 1995). Esfregaços ginecológicos para a realização de Papanicolaou podem revelar, às vezes, a presença de *T. vaginalis*, mas a sua sensibilidade e sua especificidade são ruins.

Outros flagelados

O *Enteromonas hominis* e o *Retortamonas intestinalis* são pequenos flagelados intestinais não patogênicos observados com pouca frequência. No entanto, quando presentes, eles podem ocorrer em grande quantidade. As características morfológicas são revistas na Tabela 61.11 (ver também Fig. 61.13B). O *Trichomonas tenax* é ocasionalmente identificado em material da cavidade oral, mas ele não causa doença.

Ciliados

Balantidium coli

O ciliado *Balantidium coli* (Figs. 61.13A e 61.14H) pode causar uma síndrome disenteriforme com ulcerações colônicas similares às da amebíase, mas não produz abscesso hepático ou outras lesões sistêmicas. A infecção humana, rara nos Estados Unidos, é, em geral, adquirida de porcos, os quais são infectados. O *B. coli* é o maior protozoário que infecta humanos. Os trofozoítos apresentam o maior diâmetro entre 40 μm e mais de 200 μm (a maioria medindo entre 50 e 100 mm) e são cobertos de modo uniforme por cílios que são um pouco mais longos na extremidade anterior adjacente ao citostoma. Ele possui um grande macronúcleo, o qual é imediatamente visto em preparações coradas, e um micronúcleo menor, o qual é pouco visível. Numerosos vacúolos alimentares e vacúolos contráteis estão presentes no citoplasma. Os cistos são arredondados, com um comprimento de 50 a 70 mm. Os cílios podem ser observados em cistos mais jovens e as características nucleares são similares às dos trofozoítos. Amostras de fezes que foram contaminadas com água estagnada podem conter ciliados livres, os quais usualmente podem ser distinguidos do *B. coli* pelas diferenças no padrão ciliar.

Coccídios

Os coccídios compreendem um grande grupo de parasitas apicomplexos que apresentam um estágio sexuado no trato intestinal de animais invertebrados e vertebrados. Algumas espécies também se desenvolvem

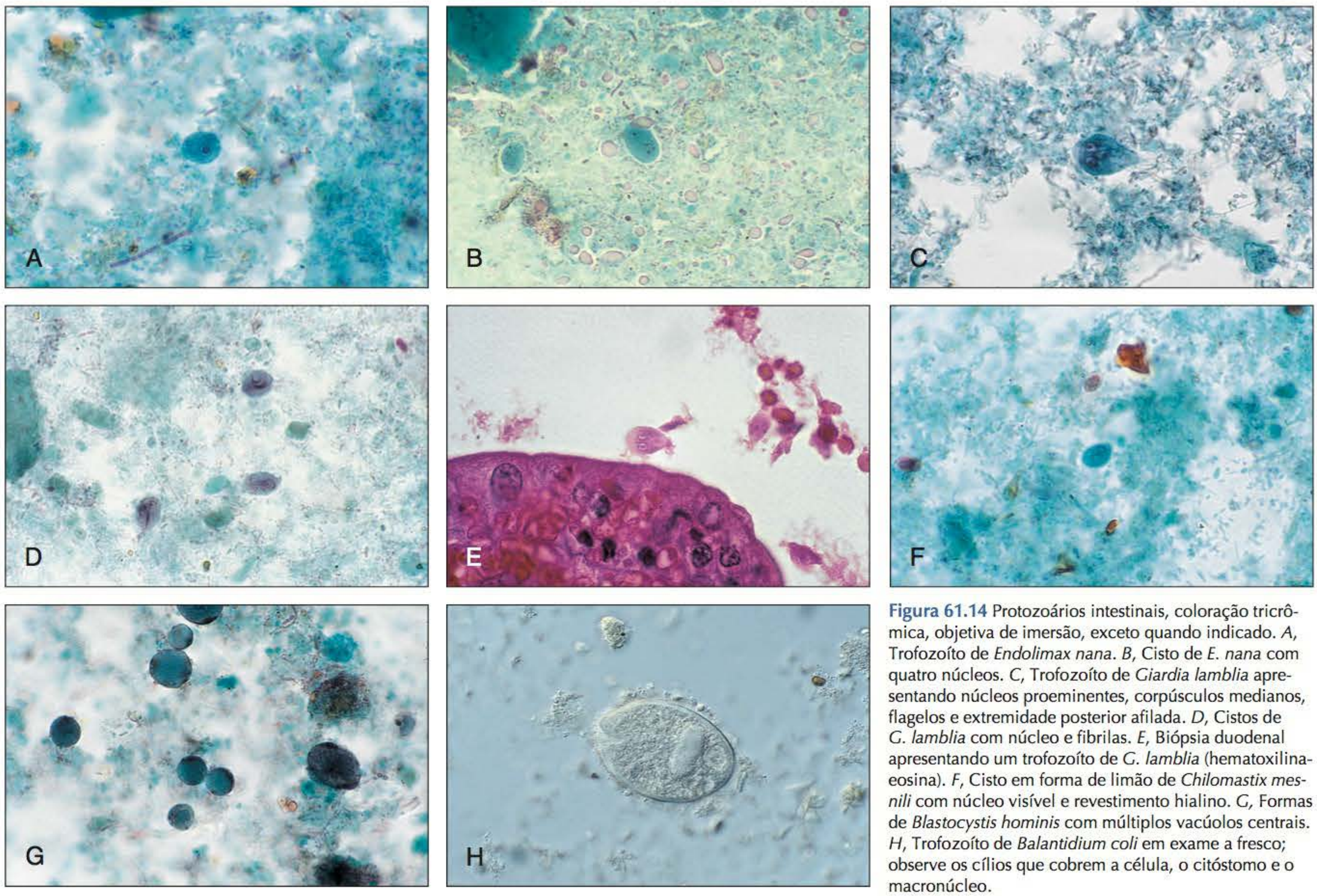


Figura 61.14 Protozoários intestinais, coloração tricrômica, objetiva de imersão, exceto quando indicado. *A*, Trofozoíto de *Endolimax nana*. *B*, Cisto de *E. nana* com quatro núcleos. *C*, Trofozoíto de *Giardia lamblia* apresentando núcleos proeminentes, corpúsculos medianos, flagelos e extremidade posterior afilada. *D*, Cistos de *G. lamblia* com núcleo e fibrilas. *E*, Biópsia duodenal apresentando um trofozoíto de *G. lamblia* (hematoxilina-eosina). *F*, Cisto em forma de limão de *Chilomastix mesnili* com núcleo visível e revestimento hialino. *G*, Formas de *Blastocystis hominis* com múltiplos vacúolos centrais. *H*, Trofozoíto de *Balantidium coli* em exame a fresco; observe os cílios que cobrem a célula, o citóstomo e o macronúcleo.

de forma assexuada em locais extraintestinais (tecidos do hospedeiro). Os gêneros que infectam o intestino dos humanos, como *Isospora, Sarcocystis, Cryptosporidium* e *Cyclospora*, geralmente produzem uma doença diarreica autolimitada em indivíduos imunocompetentes. A diarreia prolongada grave pode ocorrer em indivíduos imunodeprimidos após infecção por *Isospora*, *Cryptosporidium* e *Cyclospora*.

Isospora belli

A *Isospora belli* apresenta desenvolvimento assexuado e sexuado no citoplasma de células epiteliais do intestino delgado (Fig. 61.15A). O desenvolvimento sexuado resulta na produção de oocistos, os quais são eliminados nas fezes e evoluem para o estágio infectante no meio ambiente. Infecções humanas causam diarreia e má absorção, mas geralmente são autolimitadas. Em pacientes com AIDS ou outros distúrbios imunossupressivos, a doença pode persistir por meses ou anos e contribuir para a morte (DeHovitz, 1986; Mannheimer, 1994; Murray, 2003). O diagnóstico é estabelecido pela identificação de oocistos não esporulados medindo 12 × 30 μm em amostras de fezes, usualmente no exame a fresco ou em preparações de concentração (Fig. 61.15B). Quando a amostra não fixada é deixada na temperatura ambiente por 24 a 48 horas, a esporulação ocorre. O oocisto infectante contém dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (Fig. 61.13A). Os oocistos, como os do *Cryptostoporidium*, são corados pela técnica de coloração acidorresistente.

Sarcocystis species

Sarcocystis spp. são coccídios que tipicamente possuem dois hospedeiros, nos quais a fase sexuada ocorre na mucosa intestinal de animais carnívoros e a fase extraintestinal assexuada ocorre nos músculos e nos tecidos de vários hospedeiros intermediários. Os humanos podem servir como hospedeiros definitivos ou intermediários, dependendo da espécie de *Sarcocystis*. A infecção intestinal por *Sarcocystis hominis* e *Sarcocystis suihominis* é adquirida pela ingestão de carne bovina ou suína crua ou malcozida, respectivamente, que contém cistos tissulares (sarcocistos). A infecção, em geral, é assintomática, mas alguns pacientes, às vezes, apresentam diarreia transitória, dor abdominal ou anorexia. A infecção intestinal é autolimitada porque a multiplicação assexuada ocorre no hospedeiro intermediário e não se repete no hospedeiro definitivo. A produção de oocistos é limitada pelo número de organismos ingeridos sob a forma de sarcocistos. O diagnóstico é estabelecido pela detecção de esporocistos esporulados medindo 25 × 33 μm nas fezes (Fig. 61.13A). Cada esporocisto maduro contém quatro esporozoítos. A parede do oocisto é fina e frequentemente indetectável ou já está rompida, liberando os dois esporocistos. Essas formas, mais bem visualizadas no exame a fresco ou nos esfregaços com coloração acidorresistente, parecem maiores que os oocistos do *Cryptosporidium*. Colorações tricrômicas têm pouca utilidade na detecção desses parasitas. Os humanos também servem como hospedeiros intermediários de várias espécies não nomeadas de *Sarcocystis* (conhecidas coletivamente como *Sarcocystis lindemanni*). Nesse caso, os cistos são encontrados em músculos esqueléticos e no músculo cardíaco (Beaver, 1979; Strickland, 2000).

Cryptosporidium species

Cryptosporidium spp. utilizam um único hospedeiro em seu ciclo de vida. No entanto, eles podem infectar humanos (predominantemente o *C. hominis* e o *C. parvum*) e uma ampla variedade de animais, incluindo bovinos e ovinos (Coupe, 2005). Os parasitas desenvolvem-se na borda em escova de células epiteliais do intestino delgado e grosso e, às vezes, disseminam-se para outros locais (p. ex., vesícula biliar, pâncreas e trato respiratório) (Figs. 61.13A e 61.15C e D). O *Cryptosporidium* é uma causa comum de diarreia aguda autolimitada em indivíduos normais, em especial em crianças que ficam em creches. A epidemiologia da criptosporidiose é similar à da giardíase. Uma das grandes epidemias conhecidas de infecção transmitida pela água ocorreu em Milwaukee, Wisconsin, em 1993. Nessa epidemia, cerca de 400.000 indivíduos adoeceram por causa de água contaminada pela drenagem de fazendas após chuvas intensas (MacKenzie, 1994). Assim como os cistos de *Giardia*, os oocistos de *Cryptosporidium* são refratá-

Tabela 61.10 Morfologia de cistos de amebas intestinais

Espécie	Tamanho	Forma	Número de núcleos	Cromatina periférica	Cromatina cariossômica	Corpúsculos cromatoides citoplasmáticos	Glicogênio
Entamoeba histolytica/ E. dispar	10–20 µm; faixa usual de 12–15 µm	Geralmente esférica	4 no cisto maduro. Ocasionalmente, são observados cistos com 1 ou 2	Cromatina periférica presente. Grânulos finos uniformes distribuídos homogeneamente	Pequena, discreta, usualmente central	Presentes. Barras alongadas com extremidades arredondadas	Usualmente difuso. Massa concentrada frequentemente presente em cistos jovens. Cora-se de marrom avermelhado com iodo
Entamoeba hartmanni	5–10 µm; faixa usual de 6–8 µm	Geralmente esférica	4 no cisto maduro. Frequentemente, são observados cistos com 1 ou 2	Similar a *E. histolytica*	Similar a *E. histolytica*	Presentes. Barras alongadas com extremidades arredondadas	Similar a *E. histolytica*
Entamoeba coli	10–35 µm; faixa usual de 15–25 µm	Geralmente esférica Ocasionalmente oval, triangular ou vista com outra forma	8 no cisto maduro. Ocasionalmente, são observados cistos com 16 ou mais núcleos. Cistos imaturos com 2 ou mais núcleos são ocasionalmente observados	Cromatina periférica presente. Grânulos grosseiros com tamanho e distribuição irregulares, mas frequentemente mais uniformes que nos trofozoítos	Grande, discreta, usualmente excêntrica, mas ocasionalmente central	Presentes. Usualmente do tipo espícula com extremidade ponti-aguda	Usualmente difuso. A massa concentrada é bem definida em cistos jovens. Cora-se de marrom avermelhado com iodo
Endolimax nana	5–10 µm; faixa usual de 6–8 µm	Esférica, ovoide ou elipsoidal	4 no cisto maduro. Cistos imaturos com menos de 4 são raramente observados	Nenhuma	Grande, geralmente de localização central	Ocasionalmente, grânulos ou pequenas massas ovais são observados, mas os corpúsculos observados em *Entamoeba* não estão presentes	Usualmente difuso, mas ocasionalmente é uma massa bem definida em cistos imaturos. Cora-se de marrom avermelhado com iodo
Iodamoeba bütschlii	5–20 µm; faixa usual de 10–12 µm	Ovoide, elipsoidal, triangular ou com outra forma	1 no cisto maduro	Nenhuma	Grande, usualmente excêntrica. Grânulos refrativos acromáticos em um lado do cariossoma	Grânulos ocasionalmente presentes, mas os corpúsculos observados em *Entamoeba* não estão presentes	Massa compacta bem definida. Cora-se de marrom escuro com iodo

Fonte: adaptado de Brooke MM, Melvin DM: Morphology of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Man. USDHEW PHS Publication nº 1966, 1969.

rios à quantidade de cloro usual da água potável e, a menos que o suprimento de água da comunidade de uma fonte superficial seja filtrado, podem ocorrer epidemias. Em pacientes com AIDS, o *Cryptosporidium* pode causar diarreia secretora crônica que pode durar meses a anos e pode contribuir para a morte. O período de incubação leva cerca de 8 dias e, em indivíduos previamente saudáveis, a doença dura entre 9 e 23 dias. Pacientes podem apresentar mal-estar, febre, anorexia, cólicas abdominais e diarreia (Current, 1991; Mannheimer, 1994).

O diagnóstico é estabelecido pelo exame de fezes. Vários métodos de concentração, incluindo a sedimentação com formalina-acetato de etila e a flutuação em açúcar de Sheather, funcionam bem (Garcia, 2001; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). A disponibilidade do método de formalina-acetato de etila torna essa técnica atrativa, embora a velocidade de centrifugação e o tempo devam ser aumentados para maximizar a recuperação (Isenberg, 2004; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Um esfregaço do sedimento é preparado e corado com coloração acidorresistente ou com reagente imunofluorescente. Vários métodos de coloração acidorresistente, incluindo auramina-O, foram avaliados, mas um método a frio de Kinyoun modificado é o mais utilizado. Os oocistos esféricos medem entre 4 e 6 µm de diâmetro e, quando corados pelo método modificado de Kinyoun, apresentam cor violeta-escuro, embora haja alguma heterogeneidade da intensidade de coloração e variabilidade na porcentagem de cistos que coram positivamente. Lâminas de controle positivas devem ser utilizadas em cada processamento.

Reagentes comerciais imunofluorescentes ou de imunoensaio enzimático, que apresentam uma boa sensibilidade e especificidade (Garcia, 2003; Murray, 2003; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005), são especialmente bons para laboratórios em que o diagnóstico de *Cryptosporidium* é infrequente e existe falta de experiência na interpretação de colorações acidorresistentes.

A necessidade do exame de amostras de fezes para *Cryptosporidium* depende da população servida e dos objetivos, dos interesses e das capacidades de cada laboratório. Alguns laboratórios realizam o exame para *Cryptosporidium* somente com solicitação específica e outros avaliam todas as amostras de pacientes imunocomprometidos.

Cyclospora cayetanensis

A *Cyclospora cayetanensis* é um parasita coccídio recentemente descrito e que é responsável por uma doença diarreica em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos (Ortega, 1994; Murray, 2003). O parasita foi recuperado em pacientes de vários países, incluindo os Estados Unidos, e foi inicialmente descrito como uma alga azul-esverdeada, um corpúsculo semelhante à cianobactéria, ou um corpúsculo semelhante a um coccídio, entre outros (Ortega, 1993; Shields, 2003). A infecção causa uma doença semelhante a um resfriado com náusea, vômito, perda de peso e diarreia aquosa explosiva que dura de 1 a 3 semanas. Os oocistos eliminados nas fezes não são esporulados, aparecendo como esferas não refrativas com 8 a 10 µm de diâmetro, que contêm um aglomerado de glóbulos refrativos ao microscópio de luz, envolvidos por uma membrana. A esporulação exige entre 1 e 2 semanas para ocorrer, após a qual o oocisto maduro contém 2 esporocistos, cada um com 2 esporozoítos. Em esfregaços corados com coloração tricrômica, os oocistos aparecem como objetos claros, arredondados

Tabela 61.11 Morfologia de flagelados intestinais

Espécie	Tamanho (comprimento)	Forma	Motilidade	Número de núcleos	Números de flagelos*	Outras características
Trofozoítos						
Pentatrichomonas hominis†	8–20 µm; faixa usual de 11–12 µm	Piriforme	Rápida, espasmódica	1 Não visível em preparação não corada	3–5 anteriores; 1 posterior	Membrana ondulante que se estende ao longo de todo o corpo
Chilomastix mesnili	6–24 µm; faixa usual de 10–15 µm	Piriforme	Rija, rotativa	1 Não visível em preparação não corada	3 anteriores; 1 no citóstomo	Citóstomo proeminente que se estende entre 1/3 e 1/2. Sulco espiral através da superfície ventral
Giardia lamblia	10–20 µm; faixa usual de 12–15 µm	Piriforme	"Folha caindo"	2 Não visível em preparação não corada	4 laterais; 2 ventrais; 3 caudais	Disco de sucção ocupando entre 1/2 e 3/4 da superfície ventral
Enteromonas hominis	4–10 µm; faixa usual de 8–9 µm	Oval	Espasmódica	1 Não visível em preparação não corada	3 anteriores; 1 posterior	Um lado do corpo é achatado. O flagelo posterior estende-se livremente, posterior ou lateralmente
Retortamonas intestinalis	4–9 µm; faixa usual de 6–7 µm	Piriforme ou oval	Espasmódica	1 Não visível em preparação não corada	1 anterior; 1 posterior	Citóstomo proeminente que se estende aproximadamente até a metade do comprimento do corpo
Espécie	**Tamanho**	**Forma**		**Número de núcleos**		**Outras características**
Cistos						
Chilomastix mesnili	6–10 µm; faixa usual de 8–9 µm	Em forma de limão, com uma saliência hialina anterior ou "mamilo"		1 Não visível em preparação não corada		Citóstomo com fibrilas de suporte. Usualmente visível em preparações coradas
Giardia lamblia	8–13 µm; faixa usual de 11–12 µm	Oval ou elipsoidal		Usualmente 4. Não distintos em preparações não coradas. Geralmente localizados em uma extremidade		Fibrilas ou flagelos longitudinais no cisto. O citoplasma frequentemente retrai de uma porção da parede celular
Enteromonas hominis	4–10 µm; faixa usual de 6–8 µm	Alongada ou oval		1–4, geralmente 2 localizados em extremidades opostas do cisto. Não visível em preparação não corada		Assemelha-se ao cisto de *E. nana*. Fibrilas ou flagelos geralmente não são observados
Retortamonas intestinalis	4–9 µm; faixa usual de 4–7 µm	Piriforme ou levemente em forma de limão		1 Não visível em preparação não corada		Assemelha-se ao cisto de *Chilomastix*. A sombra do citóstomo com fibrilas de suporte se estende acima do núcleo

* Não é uma característica prática para a identificação de espécies em exames de fezes de rotina. † O *Pentatrichomonas hominis* não possui uma forma de cisto.

Fonte: adaptado de Brooke MM, Melvin DM: Morphology of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Man. USDHEW PHS Publication No. 1966, 1969.

e um pouco enrugados. Na autofluorescência, os oocistos apresentam um brilho verde a azul intenso sob epifluorescência ultravioleta e coloração acidorresistente, utilizando técnicas de coloração acidorresistente modificada ou de auramina-O. Eles devem ser diferenciados dos oocistos de *Cryptosporidium*, os quais coram de maneira idêntica, mas são menores (entre 4 e 6 mm) (Fig. 61.15E).

Microsporídios

Os microsporídios são parasitas protozoários intracelulares obrigatórios, produtores de esporos e do filo *Microsporo*; eles infectam vários animais, incluindo os humanos (Shadduck, 1989; Franzen, 1999). São patógenos sérios em hospedeiros imunocomprometidos, em especial aqueles com AIDS. Nesses indivíduos, eles são responsáveis por uma grande porcentagem (até 30% em alguns estudos) de doença diarreica sem explicação (Curry, 1993). O *Enterocytozoon bieneusi* e o *Encephalitozoon intestinalis*, duas espécies mais implicadas na infecção intestinal humana, podem causar, em pacientes com AIDS, diarreia prolongada e perda de peso, similares às causadas pelo *Cryptosporidium*. O *E. intestinalis* também pode causar doença disseminada (Cali, 1993; Wilson, 1995; Murray, 2003).

Os organismos multiplicam-se intracelularmente (merogonia) e formam esporos resistentes (esporogonia), que acabam rompendo a célula hospedeira e infectam as células adjacentes, e são eliminados do corpo. O esporo contém um túbulo polar tipo bobina, o qual é expulso à força sob estímulos ambientais adequados e penetra na membrana da célula receptora. O esporoplasma do parasita é injetado através do túbulo no citoplasma da célula hospedeira, em que ocorre a multiplicação. Hospedeiros reservatórios não foram identificados. Ocasionalmente, pacientes foram infectados por outros gêneros de microsporídio, incluindo o *Encephalitozoon* (hepatite, infecções oftálmicas, doenças do SNC), *Nosema* (infecções disseminadas) e *Pleitosphora* (miosites) (Shadduck, 1989; Curry, 1993), entre outros (Franzen, 1999).

Até recentemente, o diagnóstico exigia o exame de tecidos submetidos à microscopia de luz de rotina (Figs. 61.15F e G) e eletrônica. O desenvolvimento de um método de coloração tricrômica para o exame de amostras de fezes para esporos foi um avanço importante na detecção de infecções (Weber, 1992). Com esse método, os pequenos esporos elípticos (entre 1,5 e 3 mm) coram de vermelho contra um fundo verde pálido e alguns apresentam uma faixa cruzada no meio de seu corpo (Fig. 61.15H). Modificações desse método foram descritas. A coloração com fluorocromo (p. ex., Uvitex 2B e Calcofluor branco) parece ser mais sensível na detecção de esporos e pode ser útil na investigação inicial de amostras (Van Gool, 1993; DeGirolami, 1995; Luna, 1995). O pequeno tamanho dos esporos torna a detecção por qualquer método um desafio (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005).

Helmintos intestinais

Os helmintos intestinais aqui analisados incluem os nematódeos, os cestódeos e os trematódeos que, quando adultos, habitam o trato gastrintestinal ou outros locais (fígado, pulmões ou sangue) e produzem ovos que são eliminados do corpo humano pelo trato intestinal. O tamanho dos helmintos adultos varia de 1 mm a mais de 10 metros de comprimento; o tamanho dos ovos varia de 25 a 150 µm (Fig. 61.16).

É fundamental uma compreensão do ciclo de vida dos helmintos e da zoogeografia, conhecendo quais estágios do parasita podem estar presentes em uma suposta infecção, quais órgãos ou tecidos podem estar envolvidos e quando estágios diagnósticos podem ser esperados após

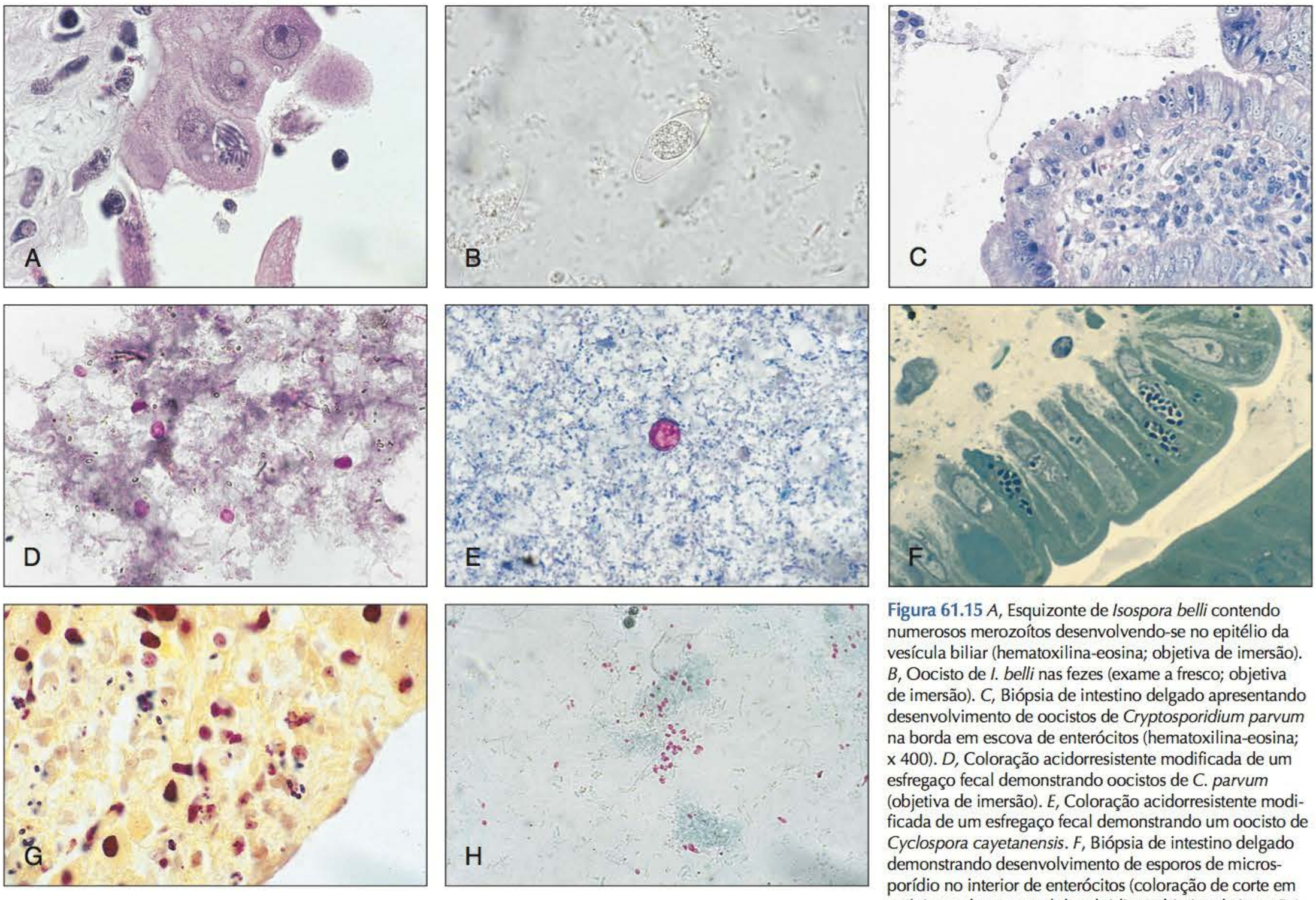


Figura 61.15 *A*, Esquizonte de *Isospora belli* contendo numerosos merozoítos desenvolvendo-se no epitélio da vesícula biliar (hematoxilina-eosina; objetiva de imersão). *B*, Oocisto de *I. belli* nas fezes (exame a fresco; objetiva de imersão). *C*, Biópsia de intestino delgado apresentando desenvolvimento de oocistos de *Cryptosporidium parvum* na borda em escova de enterócitos (hematoxilina-eosina; x 400). *D*, Coloração acidorresistente modificada de um esfregaço fecal demonstrando oocistos de *C. parvum* (objetiva de imersão). *E*, Coloração acidorresistente modificada de um esfregaço fecal demonstrando um oocisto de *Cyclospora cayetanensis*. *F*, Biópsia de intestino delgado demonstrando desenvolvimento de esporos de microsporídio no interior de enterócitos (coloração de corte em epóxi corado com azul de toluidina; objetiva de imersão). *G*, Esporos de microsporídio no parênquima hepático em um indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana (coloração de Brown e Brenn; objetiva de imersão). *H*, Numerosos esporos de microsporídios nas fezes corados com a coloração tricrômica modificada (objetiva de imersão).

a exposição. Embora o diagnóstico geralmente dependa do achado ou da identificação de um estágio desenvolvimental adequado (ovo, larva ou forma adulta), algumas infecções parasitárias podem ser diagnosticadas principalmente por meio de bases clínicas e/ou de evidências sorológicas.

Certas espécies apresentam ciclos desenvolvimentais nos quais estágios infectantes podem ser transmitidos de forma direta de pessoa a pessoa (*Enterobius* e *H. nana*). Em outras (*Trichiurus, Ascaris* e *Trichostrongylus*), um período adicional de maturação fora do hospedeiro é necessário antes do ovo ou da larva do parasita se tornar infectante. A ingestão de estágios infectantes também pode ocorrer incidentalmente junto com vetores do parasita (*Dipylidium, Hymenolepis*), plantas (*Fasciolopsis, Fasciola*) ou tecidos animais (*Trichinella, Taenia, Diphyllobothrium, Clonorchis, Opisthorchis, Paragonimus, Heterophyes, Metagonimus* e *Nanophyetus*). Em alguns casos, estágios larvais do parasita podem penetrar diretamente a pele (ancilostomídeos, *Strongyloides* e esquitossomas).

A recuperação e a identificação de ovos e larvas de helmintos nas fezes, na urina ou no escarro exigem uma abordagem sistemática e um treinamento adequado dos indivíduos que realizam a avaliação. O tamanho dos ovos e das larvas é uma característica especialmente importante e com frequência requer o uso de um micrômetro ocular calibrado de modo adequado. As características externas dos ovos a serem observadas são a forma, espessura da parede e presença ou ausência de cobertura mamilada, opérculo, ombros do opérculo, nódulo abopercular, tampões polares ou espinhos. O desenvolvimento do ovo (embrionado, não embrionado) e a presença ou ausência de ganchos, que são característicos dos cestódeos, também devem ser observados. O examinador também deve possuir a capacidade de avaliar a grande variedade de artefatos detectados nas fezes humanas que podem simular ovos e larvas de parasitas (Tab. 61.4).

Nematódeos

Enterobius vermicularis

A enterobíase, ou oxiuríase, é a infecção helmíntica mais comum em crianças de todos os níveis sociais nos Estados Unidos. Embora se trate primariamente de um parasita de crianças jovens, a maturação rápida dos ovos permite que ele seja transmitido de criança a criança e de criança a adulto, tanto no ambiente familiar quanto em ambientes coletivos. Vermes machos e fêmeas habitam primariamente o ceco e as áreas adjacentes. As fêmeas medem até 13 mm de comprimento e apresentam uma extremidade posterior pontiaguda que dá origem ao seu nome popular em inglês (*pinworm*, verme alfinete). Ambos os sexos possuem asas laterais proeminentes que são observadas em cortes cruzados e bulbo esofágico proeminente (Figs. 61.17A a C).

Embora os machos sejam raramente observados, as fêmeas podem ser encontradas na superfície de amostras de fezes ou na pele perianal, em especial à noite, quando os ovos são depositados. Os ovos são incolores, ovoides com um lado achatado, e medem entre 20 e 40 µm de largura e entre 50 e 60 µm de comprimento (Fig. 61.17B). Eles se tornam infectantes em horas e, quando ingeridos, completam o desenvolvimento até o estágio adulto grávido em 1 mês (período pré-detecção).

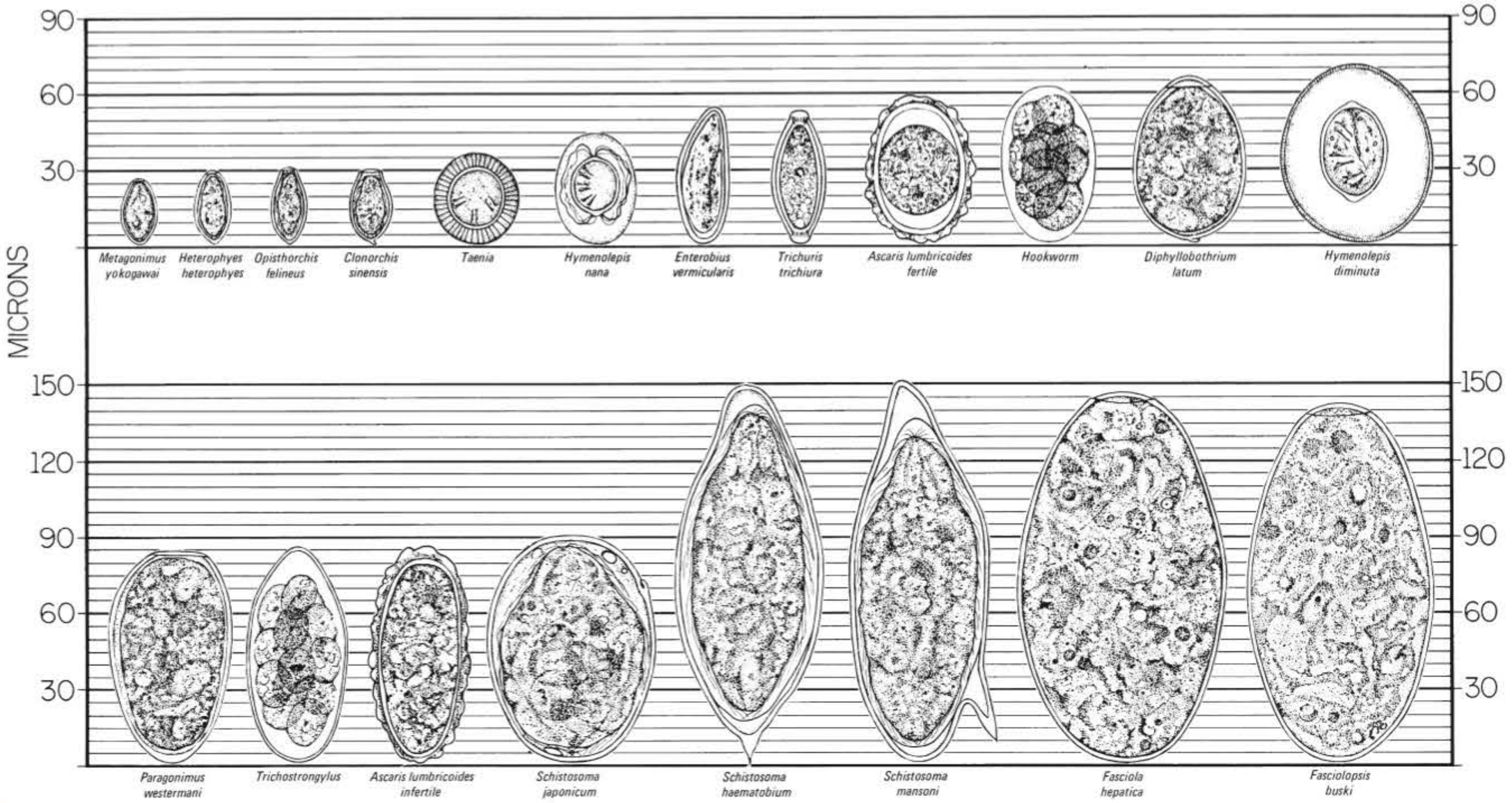


Figura 61.16 Tamanhos relativos de ovos de helmintos. (Cortesia do Centers for Disease Control, Parasitology Training Branch, Atlanta, GA.)

Embora a infecção possa ser assintomática, as crianças em geral apresentam prurido anal, irritabilidade e perda de sono. A enterobíase deve ser descartada precocemente na avaliação da enurese. Vermes adultos também podem migrar para locais não usuais (p. ex., vagina, tubas uterinas ou cavidade peritoneal). A morte dos vermes nesses locais pode provocar reações inflamatórias granulomatosas (Symmers, 1950; Garcia, 2003).

A recuperação de ovos ou, menos comumente, de formas adultas na pele perianal é, em geral, realizada utilizando a técnica de fita adesiva após a criança dormir ou como a primeira coisa realizada pela manhã (Ash, 1987; Garcia, 2001). Apenas 5 a 10% dos casos são detectados por meio do exame de fezes de rotina. O diagnóstico pode exigir o exame de várias amostras coletadas em dias diferentes antes que os ovos possam ser detectados (Sadun, 1956).

Trichuris trichiura

A triquiuríase é comum em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Os vermes adultos são encontrados no intestino grosso, especialmente no ceco. Contudo, em infecções maciças, eles podem ser encontrados em todo o cólon e no reto. Os machos e as fêmeas medem até 50 mm de comprimento e permanecem fixados na mucosa intestinal pela extremidade anterior longa e fina, enquanto a extremidade posterior mais larga permanece pendendo livre na luz. As fêmeas apresentam uma forma alongada, enquanto que os machos apresentam uma cauda espiralada (Fig. 61.17D). O *Trichuris* apresenta um ciclo de vida direto, no qual os ovos não embrionados são eliminados nas fezes e exigem várias semanas em condições de solo adequadas para amadurecerem até o estágio infectante. Quando ovos embrionados são ingeridos, as larvas são liberadas e amadurecem até a forma adulta no cólon, no qual elas se fixam e sobrevivem por até 10 anos.

Infecções leves em geral são assintomáticas, mas quando uma grande quantidade (mais de 300 vermes) está presente, a diarreia ou os sintomas de disenteria podem ocorrer em associação com a desidratação e a anemia (Beaver, 1984; Strickland, 2000). O prolapso retal, uma complicação potencialmente letal, pode ocorrer em crianças com infecção maciça (Cooper, 1988).

O diagnóstico é estabelecido pela observação de ovos típicos no exame a fresco de fezes ou pelas técnicas de concentração. Os ovos apresentam uma forma de barril com tampões refrativos em ambas as extremidades e, em geral, medem entre 50 e 55 μm de comprimento e entre 22 e 24 μm de largura (Fig. 61.17E). Ocasionalmente, humanos podem ser infectados pelo *Trichuris vulpis* (triquiuríase canina) que possui ovos maiores, mais largos e com forma mais semelhante a um barril que os do *Trichuris trichiura*. Técnicas de quantificação de ovos podem ser solicitadas para a avaliação da intensidade da infecção, da eficácia terapêutica e da taxa de reaquisição de parasitas.

Capillaria philippinensis

Esse parasita, normalmente encontrado em aves que se alimentam de peixe, infecta humanos que ingerem peixe cru ou malcozido que contém larvas infectantes. Embora tenha sido descrito de início em indivíduos das Filipinas e mais tarde da Tailândia, casos ocasionais foram relatados em outros locais da Ásia, do Oriente Médio e da América do Sul (Cross, 1992; Murray, 2003). Os parasitas podem causar diarreia crônica e indivíduos infectados podem eliminar ovos, larvas e mesmo vermes adultos nas fezes. Os ovos são semelhantes aos do *Trichuris*, embora eles meçam entre 36 e 45 μm de comprimento e 21 μm de largura; apresentem carapaças espessas e estriadas radialmente; e tampões mucoides, os quais são imperceptíveis.

Ascaris lumbricoides

É o maior nematódeo que infecta o trato intestinal dos humanos e é provavelmente o verme intestinal mais comum, infectando cerca de 1,3 bilhão de indivíduos no mundo inteiro (Markell, 1999). A infecção ocorre em especial em áreas com pouco ou nenhum saneamento e, como o *Trichuris*, é especialmente comum em crianças, as quais também são mais propensas a apresentar infecções maciças.

O *Ascaris* adulto vive principalmente no duodeno e na porção proximal do jejuno. As fêmeas medem até 35 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro. O macho é um pouco menor e apresenta uma cauda curvada ventralmente, ao contrário da fêmea (Fig. 61.17F). Tanto os vermes adultos quanto os imaturos podem ser identificados pela presença de três lábios proeminentes na extremidade anterior.

As fêmeas produzem aproximadamente 200.000 ovos por dia, os quais não são embrionados quando eliminados e necessitam de 4 a 6 semanas em um ambiente satisfatório para se tornarem infectantes. Após a ingestão, os ovos eclodem no intestino e as larvas penetram na mucosa para ter acesso à corrente sanguínea. Eles são transportados para os pulmões e amadurecem brevemente no leito capilar alveolar antes de entrarem nos alvéolos. Os mecanismos de limpeza respiratória movem as larvas para a epiglote, na qual elas são deglutidas e crescem até a forma adulta no intestino delgado. O

Figura 61.17 Exame direto com iluminação de campo brilhante, exceto quando indicado. *A*, Ancilostomídeo macho adulto, *Enterobius vermicularis*, com extremidade posterior curvada; observe o bulbo esofágico proeminente (× 4). *B*, Numerosos ovos de *E. vermicularis* vistos em uma preparação com fita de celofane (× 400). *C*, *Enterobius vermicularis* adulto no apêndice; observe as asas laterais características (× 100). *D*, *Trichiuris trichiura* adulto; observe as fêmeas com cauda reta e os machos com cauda enrolada. *E*. Ovos de *T. trichiura* (× 400). *F*, Fêmea e macho adultos de *Ascaris lumbricoides*, a grande lombriga humana. G, Ovo fértil não embrionado de *A. lumbricoides* (× 400). *H*, Ovo infértil e decorticado de *A. lumbricoides* (× 400). (*D* e *F* de *A Pictorial Presentation of Parasites: a Cooperative Collection*, preparado e/ou editado por H. Zaiman.)

desenvolvimento do ovo embrionado até a forma adulta leva aproximadamente 2 meses.

Os sintomas da ascaridíase variam de uma infecção assintomática até uma doença grave. A migração de uma grande quantidade de larvas através dos pulmões pode causar pneumonite por *Ascaris* ou síndrome de Löffler, caracterizada por infiltrado pulmonar moteado difuso e bronquite leve associada à eosinofilia periférica. A síndrome é rara e, em geral, ocorre em indivíduos que foram expostos previamente a antígenos do *Ascaris*.

A presença de poucos vermes no intestino nem sempre é percebida, enquanto infecções maciças podem produzir graus variados de dor abdominal e diarreia. Também pode ocorrer obstrução intestinal por uma massa de vermes, especialmente em crianças. Mesmo um pequeno número de vermes é motivo de preocupação por causa de sua capacidade de invadir sítios ectópicos (p. ex., ducto biliar comum, fígado, apêndice e estômago). A febre ou a terapia medicamentosa pode estimular a migração. Em áreas endêmicas, anti-helmínticos são com frequência prescritos antes do uso de anestésicos em cirurgias eletivas.

A infecção é diagnosticada pela identificação de ovos nas fezes ou pela recuperação de um verme adulto eliminado nas fezes ou no vômito. O grande número de ovos produzidos diariamente torna a detecção de um único verme provável. Uma contagem inferior a 20 ovos por lâmina (2 mg de fezes) indica infecção leve e uma contagem superior a 100 ovos por lâmina indica infecção maciça.

Ovos férteis de *Ascaris* são redondos a levemente ovais com uma carapaça espessa e uma camada externa amarelo-acastanhada, irregular e mamilada. Os ovos que perderam a camada mamilada são denominados descorticados e podem se assemelhar superficialmente a ovos de ancilostomídeos. Eles são eliminados não embrionados e medem cerca de 55 a 75 µm de comprimento e 35 a 50 µm de largura (Figs. 61.17G e H). Uma fêmea que não acasalou pode produzir ovos não fertilizados, os quais são grandes e mais alongados (até 90 µm de comprimento) e com uma carapaça mais fina com formações mamilares irregulares. Esses ovos são cheios de glóbulos de gordura de tamanho variado.

Trichostrongylus spp.

A doença humana causada pelo *Trichostrongylus* spp. representa uma infecção zoonótica porque esses parasitas infectam principalmente grandes herbívoros (p. ex., ovinos, bovinos e caprinos). Várias espécies podem infectar humanos, incluindo *Trichostrongylus colubriformis, Trichostrongylus orientalis, Trichostrongylus axei* e *Trichostrongylus brevis*, os quais são encontrados em muitas partes do mundo. Os vermes adultos habitam o intestino delgado e produzem ovos que amadurecem fora do corpo. As larvas emergem e rastejam no solo e nas plantas, tornando-se disponíveis para serem ingeridas pelos hospedeiros definitivos. Ao contrário dos ancilostomídeos, eles não invadem a pele diretamente e o seu ciclo de vida não envolve uma fase migratória através dos pulmões. De modo geral, as infecções são leves e assintomáticas, mas infecções maciças podem causar dor abdominal e diarreia, usualmente com eosinofilia. Os ovos assemelham-se aos do ancilostomídeos, mas são mais longos e mais estreitos, medindo entre 79 e 98 µm de comprimento e entre 40 e 50 µm de largura, sendo levemente coniformes em uma extremidade.

Ancilostomídeos

Os ancilostomídeos, os quais estão entre os helmintos mais comuns que infectam os humanos, ocorrem em regiões tropicais e subtropicais e em algumas áreas temperadas. O *Necator americanus* é encontrado nos Estados Unidos e em outras áreas do mundo e com frequência se sobrepõe na distribuição do *Ancylostoma duodenale*, o qual não ocorre nos Estados Unidos.

Figura 61.18 *A*, Ovo de ancilostomídeo (*Ancylostoma duodenale* ou *Necator americanus*) (× 400). *B*, Ovo de *Heterodera* sp., um grupo de nematódeos vegetais encontrados ocasionalmente como artefatos em fezes humanas após ingestão de vegetais infectados (× 400). *C*, Infecção maciça por *Strongyloides stercoralis* na mucosa duodenal; observe a presença de fêmeas adultas, ovos e larvas (hematoxilina-eosina; × 100). *D*, Larva rabditoide não infecciosa de *S. stercoralis* (coloração de iodo; × 100). *E*, *Trichinella spiralis*, corte transverso de uma larva no músculo gastrocnêmio (hematoxilina-eosina; × 100). *F*, Múltiplas larvas de *T. spiralis* em carne de urso (preparação a fresco de músculo comprimido; × 100). *G*, *Pseudoterranova* sp. regurgitada após ingestão de peixe (× 4). *H*, *Anisakis* sp., corte transverso de larva encontrada no intestino delgado após cirurgia de obstrução aguda (hematoxilina-eosina; × 400).

As fêmeas adultas medem até 12 mm de comprimento e os machos um pouco menos. Os machos são mais prontamente identificados pela sua bolsa copuladora em forma de leque na extremidade posterior. A extremidade anterior dos ancilostomídeos é modificada em uma cápsula bucal que contém dentes ou placas cortantes. Ambos os sexos fixam-se à mucosa do intestino delgado, na qual eles podem permanecer por até 18 anos (Beaver, 1988; Garcia, 2001).

Os ovos são eliminados nas fezes e desenvolvem-se rapidamente, dependendo das condições prevalentes. Larvas rabditiformes são liberadas e desenvolvem-se até o estágio filariforme infectante em cerca de 7 dias. Em contato com um hospedeiro apropriado, as larvas penetram a pele, conseguem entrar na circulação do hospedeiro, vão até os pulmões e movem-se até a árvore traqueobrônquica para serem deglutidas. Na maturação no intestino delgado, a postura de ovos começa. Embora o ciclo de vida de ambas as espécies seja similar, o *Ancilostoma* pode amadurecer diretamente para o estágio adulto no intestino quando larvas infectantes são ingeridas.

Os ancilostomídeos podem produzir doença na pele, no local da penetração das larvas. Essa condição é caracterizada por inflamação, hiperemia e formação de vesículas, junto com um prurido intenso. A migração de uma grande quantidade de larvas através dos pulmões pode produzir a síndrome de Löffler, descrita anteriormente para o *Ascaris*. Dependendo da carga de vermes, a infecção intestinal pode causar gastroenterite com dor abdominal, diarreia e náusea. Contudo, os ancilostomídeos são mais conhecidos por sua capacidade de produzir perda sanguínea crônica com anemia ferropriva secundária. Cada *A. duodenale* adulto pode causar a perda de 0,15 a 0,25 mL de sangue por dia, em comparação com 0,03 mL para cada *N. americanus*. O desenvolvimento das crianças pode ser severamente afetado por infecções crônicas. A perda sanguínea e o número de ancilostomídeos presente estão correlacionados com o número de ovos por grama de fezes, o que pode ajudar a determinar quando iniciar a terapia em indivíduos que habitam áreas endêmicas (Layrisse, 1964a, 1964b; Cook, 2002).

O diagnóstico é estabelecido pela observação dos ovos com carapaça fina, característicos nas fezes. Os ovos são parcialmente embrionados quando eliminados e medem entre 58 e 76 μm de comprimento e entre 36 e 40 μm de largura (Fig. 61.18A). Ovos embrionados ou larvas rabditiformes livres podem ser encontradas em amostras não preservadas que não são examinadas imediatamente. Ancilostomídeos rabditiformes podem ser diferenciados do *S. stercoralis* porque os primeiros apresentam uma câmara bucal mais longa e um primórdio genital imperceptível (Fig. 61.19). A maturação contínua das larvas resulta no surgimento de larvas filariformes infectantes, as quais apresentam uma extremidade posterior pontiaguda e um esôfago que mede cerca de um quarto do comprimento da larva. Pode ser necessário diferenciar ovos de ancilostomídeos de ovos de *Trichostrongylus* spp. (os quais são mais longos e mais pontiagudos) e de ovos de nematódeos parasitas de plantas, em especial o *Heterodera* spp. (os quais são mais longos, possuem extremidades arredondadas e são com frequência assimétricos) (Fig. 61.18B).

Embora os ancilostomídeos adultos possam ser diferenciados baseando-se na sua parte bucal e na bursa copuladora em machos, os ovos dos ancilostomídeos humanos são indiferenciáveis. No exame a fresco, a contagem de ovos inferior a cinco ovos por lamínula indica infecção leve que pouco provavel causar anemia, enquanto que mais de 25 ovos indicam infecção maciça que pode estar associada a sintomas.

Strongyloides stercoralis

A estrongiloidíase ocorre em muitas áreas tropicais e subtropicais, mas a infecção também ocorre em zonas temperadas e, historicamente, foi endêmica em áreas do sudeste dos Estados Unidos. As fêmeas adultas possuem um comprimento de 2 a 3 mm e vivem enterradas na mucosa do duodeno, no qual elas reproduzem por partenogênese

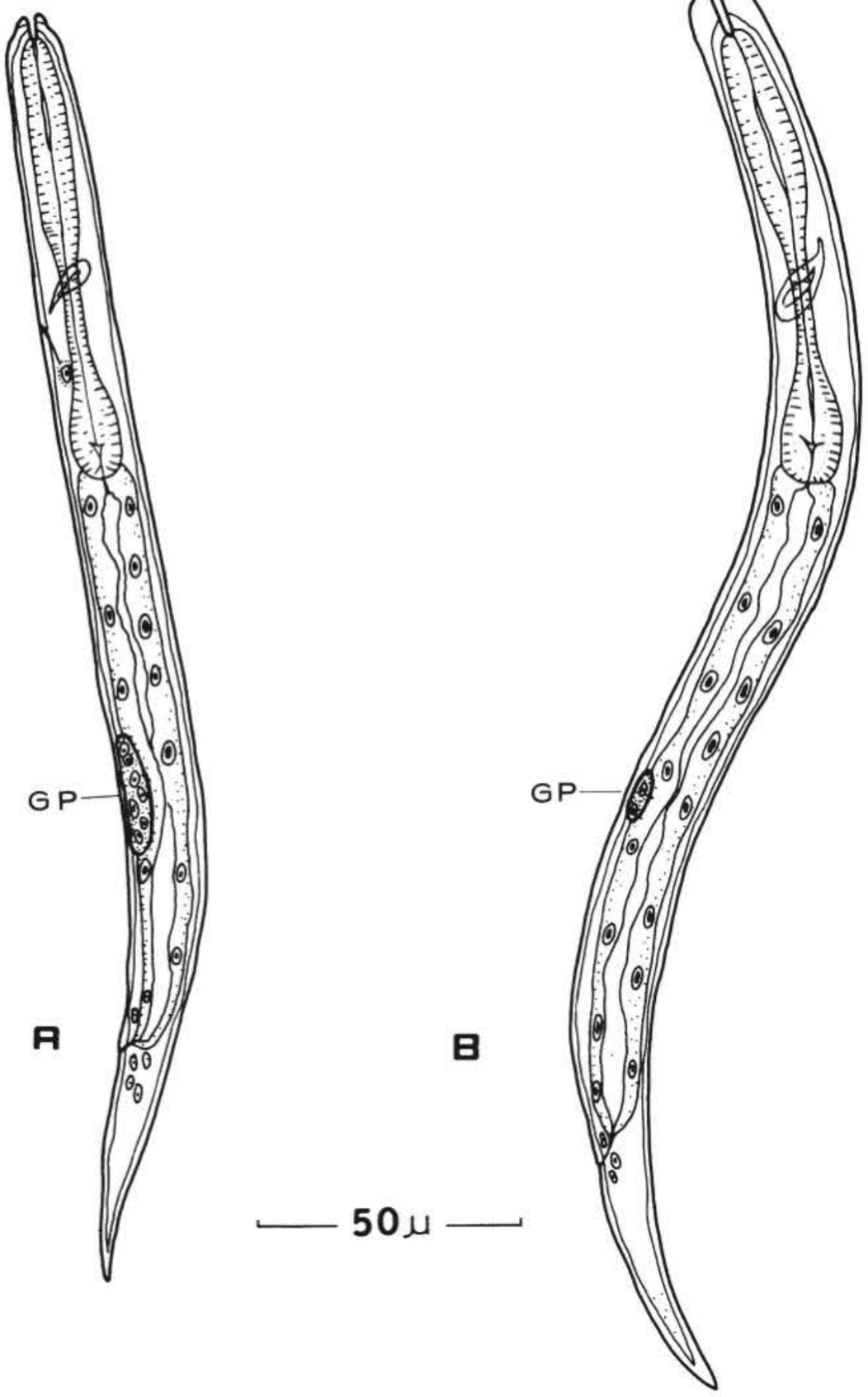


Figura 61.19 Larvas de ancilostomídeo e *Strongyloides stercoralis*. *A*, larva rabditoide de *S. stercoralis* em fezes humanas. Observe o pequeno tamanho da cavidade bucal e o grande primórdio genital (GP). *B*, Larva rabditoide de ancilostomídeo observada em algumas situações nas fezes deixadas por pelo menos 2 horas em temperatura ambiente. A cavidade bucal é mais longa e o primórdio genital é menor.

(Fig. 61.18C). Os parasitas machos não ocorrem na fase vertebrada do ciclo. Os ovos eclodem principalmente no intestino delgado, liberando o primeiro estágio ou larvas rabditoides, as quais são então eliminadas nas fezes (ovos quase nunca são encontrados). Nesse ciclo direto, as larvas rabditoides metamorfoseiam-se em larvas filariformes infectantes do terceiro estágio no solo. Essas larvas infectantes penetram imediatamente a pele de indivíduos expostos e migram pelo sistema circulatório para os pulmões e, a seguir, movem-se até a árvore brônquica e são deglutidas. O desenvolvimento até o estágio adulto é então completado no intestino delgado. Em condições de solo adequadas de alta umidade, um ciclo indireto pode surgir transitoriamente. Nele, as larvas recém-depositadas evoluem para uma geração livre, consistindo em machos e fêmeas reprodutores. Ovos produzidos por essa geração transformam-se em larvas filariformes que mais uma vez são infectantes para humanos. Uma terceira variação do ciclo de vida do *Strongyloides* envolve a autoinfecção, na qual a maturação para o estágio filariforme é completada no trato intestinal, com subsequente invasão da mucosa intestinal ou da pele perianal.

A apresentação da doença é variável e pode depender da cepa adquirida (Genta, 1989). A migração inicial de larvas filariformes pode produzir irritação, hiperemia e prurido no local de entrada, enquanto a migração tardia através dos pulmões pode produzir a síndrome de Löffler (Purtilo, 1974). A presença de sintomas intestinais está relacionada à intensidade da infecção. O indivíduo afetado pode apresentar sintomas de úlcera péptica, dor abdominal e diarreia. Uma síndrome de má absorção foi relatada com a infecção crônica.

A capacidade de autoinfecção pelo parasita pode acarretar a persistência da infecção por décadas, como foi observado em tropas aliadas que foram mantidas prisioneiras no sudeste asiático durante a Segunda Guerra Mundial (Gill, 1979). Em pacientes saudáveis, a autoinfecção pode produzir a larva currens (lesões urticariformes lineares). Em pacientes imunocomprometidos, alcoolistas ou desnutridos, a autoinfecção pode causar uma síndrome de hiperinfecção potencialmente letal em virtude da rápida multiplicação do parasita (Maayen, 1987; Genta, 1992). A pneumonia grave é, com frequência, uma manifestação inicial da hiperinfecção, seguida por diarreia intensa, enterite e septicemia. O *Strongyloides* deve ser investigado em pacientes que viveram em áreas endêmicas antes de eles serem submetidos à terapia imunossupressora (Strickland, 2000).

O diagnóstico é estabelecido pela recuperação e pela identificação de larvas rabditiformes em amostras de fezes, embora o exame de ovos e parasitas nem sempre revele a sua presença (Fig. 61.18D) (Pelletier, 1988; Genta, 1989; Garcia, 2001). Larvas rabditiformes de *Strongyloides* devem ser diferenciadas das larvas de ancilostomídeos e são caracterizadas pela presença de uma cavidade bucal curta e um primórdio genital proeminente (Fig. 61.19). Larvas filariformes de *Strongyloides* apresentam uma cauda entalhada e um esôfago com um comprimento que equivale aproximadamente à metade do comprimento do corpo. Cada estágio das larvas é logo observado em exame a fresco com soro fisiológico, com magnificação de menor aumento. Quando larvas filariformes infectantes são detectadas em uma amostra recém-eliminada, o diagnóstico de superinfecção é garantido (Eveland, 1975).

O exame de aspirados duodenais ou de amostras do teste da corda pode ser útil em casos suspeitos nos quais os exames de fezes de rotina não são positivos. O método de concentração com funil de Baermann ou uma das técnicas de coprocultura (ver em "Métodos laboratoriais") também podem demonstrar a infecção (Ash, 1987; Genta, 1989; Garcia, 1999; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). Larvas podem ser encontradas no escarro ou em outras amostras pulmonares, especialmente na síndrome de hiperinfecção. Exames sorológicos são úteis quando a infecção é suspeitada, mas não pode ser demonstrada por outros métodos. O imunoensaio enzimático e outros testes apresentam uma boa sensibilidade e especificidade, embora possam ocorrer reações cruzadas com a filaríase e algumas outras infecções por nematódeos. De modo geral, esses testes não fazem a diferenciação entre uma infecção passada e uma infecção atual, mas podem ser úteis na monitoração da terapia (Wilson, 1995).

Anisaquíase

Ver adiante em "Helmintos tissulares".

Cestódeos

Os cestódeos são platelmintos tipo fita que, quando adultos, habitam o trato intestinal de vertebrados e, quando larvas, habitam os tecidos ou as cavidades corporais de vários hospedeiros intermediários. Eles fixam-se à mucosa intestinal por meio de um escólex, ou órgão de fixação, na extremidade anterior, que pode apresentar ventosas, sulcos (bótrios) ou um rostelo com ganchos, dependendo da espécie. O corpo do verme é constituído por um pescoço que cresce ativamente e uma série de proglotes que sofrem desenvolvimento sequencial pelos estágios imaturo, maduro e, por último, grávido na extremidade posterior. Cada proglote apresenta um conjunto completo de gônadas masculinas e femininas e é capaz de produzir ovos férteis. Os ovos da maioria dos cestódeos que infectam humanos (o *Diphyllobothrium* é uma exceção) podem ser logo diferenciados dos ovos de outros helmintos pela presença de um embrião com seis ganchos em cada ovo. Dependendo da espécie, os ovos são liberados diretamente na corrente fecal ou eliminados nas proglotes intactas. Em algumas espécies, não é incomum que grandes porções do corpo sejam eliminadas ou que proglotes migrem ativamente para fora do ânus. As grandes espécies de *Taenia* e *Diphyllobothrium* podem crescer até um comprimento de 7,5 metros ou mais e podem viver até 20 anos.

Larvas de cestódeos evoluem para o estágio infectante em hospedeiros invertebrados ou vertebrados, dependendo da espécie, e completam o seu ciclo de vida quando ingeridas por um hospedeiro definitivo. Larvas de várias espécies podem infectar humanos, causando cisticercose, hidatidose, esparganose e cenurose. Essas condições são analisadas mais detalhadamente a seguir, em "Helmintos tissulares".

Taenia saginata

Os humanos são os únicos hospedeiros definitivos da *Taenia saginata*, a tênia bovina. Embora ele ocorra no mundo inteiro, o verme é especialmente comum no Oriente Médio, na África, na Europa, na Ásia e na América Latina. Ele ocorre com pouca frequência nos Estados Unidos. Cisticercos larvais (*Cysticercus bovis*) desenvolvem-se nos tecidos de bovinos que pastam em terra contaminada de dejetos humanos. Quando humanos ingerem carne bovina crua ou incompletamente cozida, o cisticerco transforma-se em um adulto reprodutor no intestino delgado em 2 ou 3 meses. Os sintomas são raros, mas podem incluir desconforto abdominal e diarreia. Ao contrário da *T. solium*, os ovos da *T. saginata* não são infectantes para humanos e sua ingestão não causa cisticercose.

O diagnóstico é estabelecido pela detecção de ovos nas fezes, utilizando técnicas diretas ou de concentração, ou nas pregas perianais, utilizando a técnica da fita de celofane. Os ovos são esféricos e medem entre 31 e 43 μm de diâmetro (Fig. 61.20A). A carapaça é espessa, estriada radialmente e contém um embrião com seis ganchos. Ovos de todas as espécies de *Taenia* são indiferenciáveis e devem ser relatados apenas como ovos de *Taenia*.

A identificação da espécie pode ser feita pela recuperação das proglotes ou, mais raramente, do escólex. As proglotes de tênias apresentam uma protrusão lateral característica conhecida como poro genital. A injeção cuidadosa de nanquim pelo poro genital, utilizando uma agulha e uma seringa de injeção de tuberculina, pode acarretar o delineamento do útero. O útero grávido da *T. saginata* apresenta de 15 a 20 ramos laterais, enquanto que o da *T. solium* apresenta de 7 a 13 ramos laterais (Figs. 61.20B e 61.21). As proglotes também podem ser clarificadas durante a noite em glicerol ou coradas com carmim ou hematoxilina utilizando procedimentos publicados (Ash, 1987). Quando recuperado, o escólex da *T. saginata* pode ser identificado pela presença de quatro ventosas e pela ausência de ganchos na coroa ou no rostelo.

Taenia solium

A *Taenia solium*, tênia do porco, é mais comum na Europa, em especial na Europa Oriental, na América Latina, na China, no Paquistão e na Índia. Ela é encontrada ocasionalmente nos Estados Unidos, em geral em imigrantes recentes. A infecção pela tênia adulta é adquirida pela ingestão de carne de porco crua ou incompletamente cozida, contendo cisticercos (*Cysticercus cellulosae)*. Quando presentes, os sintomas são idênticos aos da infecção por *T. saginata*. Mais importante, a ingestão acidental de ovos de *T. solium*, seja de uma tênia adulta ou de alimentos contaminados, pode causar cisticercose (Schantz, 1992). Mais detalhes sobre a cisticercose podem ser encontrados adiante, em "Helmintos tissulares".

Os procedimentos utilizados para o diagnóstico de infecção intestinal por *T. solium* são indênticos aos utilizados para infecções por *T. saginata*, embora certas diferenças morfológicas sejam aparentes. O escólex da *T. solium* apresenta quatro ventosas e, ao contrário da *T. saginata*, possui um rostelo armado de duas filas de ganchos. Proglotes grávidas possuem de 7 a 13 ramos uterinos laterais (Fig. 61.21).

Hymenolepis nana

A *H. nana*, conhecida como tênia anã, apresenta uma distribuição mundial e é a espécie de cestódeo mais frequentemente recuperada nos Estados Unidos. Trata-se de um parasita comum no camundongo e é o menor dentre os que infectam o ser humano, medindo até 4 cm de comprimento. O escólex possui um rostelo armado e as proglotes apresentam poros genitais localizados no mesmo lado do corpo (Figs. 61.20C e 61.21). O ciclo de vida pode ser direto, pela ingestão de

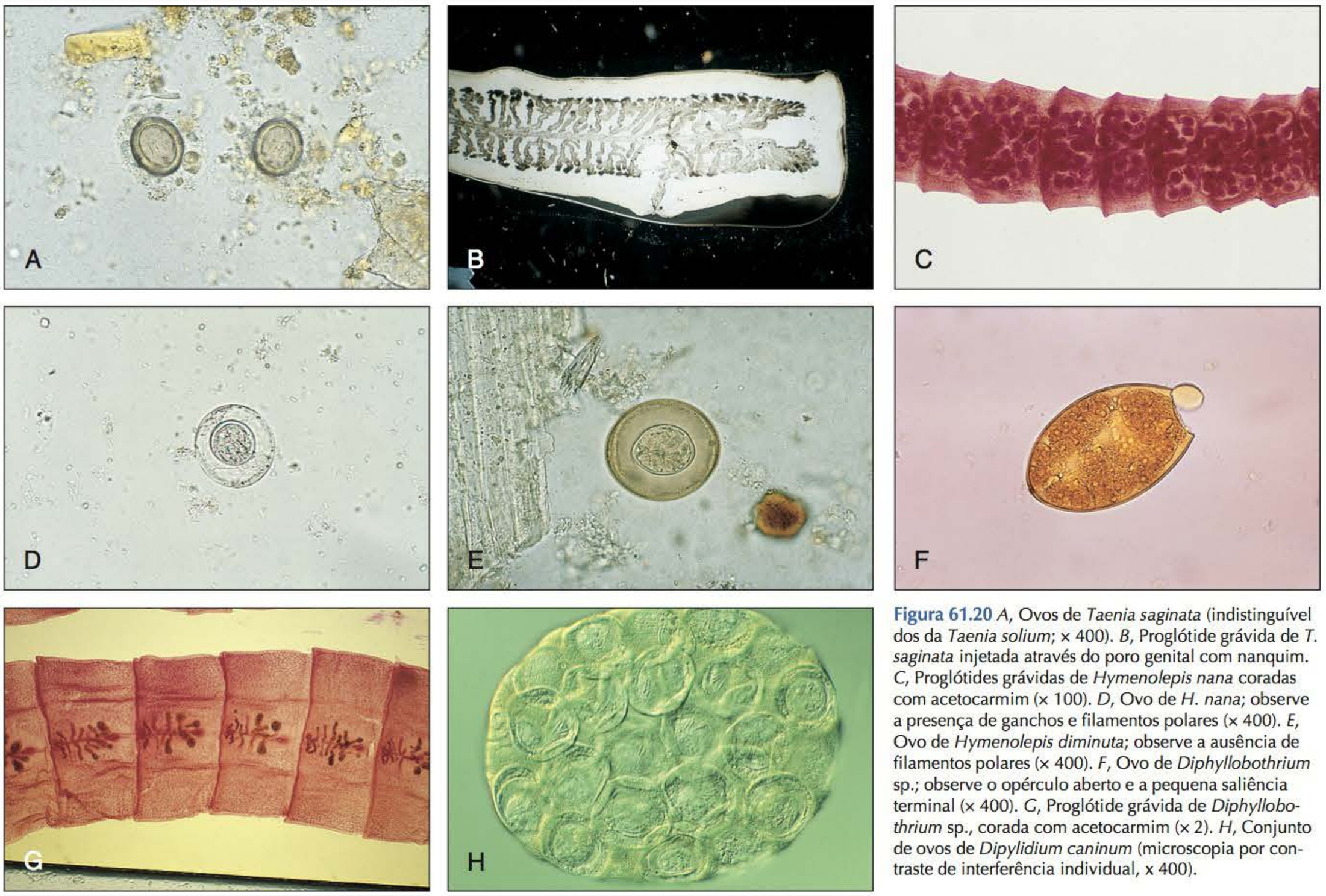


Figura 61.20 *A*, Ovos de *Taenia saginata* (indistinguível dos da *Taenia solium*; × 400). *B*, Proglótide grávida de *T. saginata* injetada através do poro genital com nanquim. *C*, Proglótides grávidas de *Hymenolepis nana* coradas com acetocarmim (× 100). *D*, Ovo de *H. nana*; observe a presença de ganchos e filamentos polares (× 400). *E*, Ovo de *Hymenolepis diminuta*; observe a ausência de filamentos polares (× 400). *F*, Ovo de *Diphyllobothrium* sp.; observe o opérculo aberto e a pequena saliência terminal (× 400). *G*, Proglótide grávida de *Diphyllobothrium* sp., corada com acetocarmim (× 2). *H*, Conjunto de ovos de *Dipylidium caninum* (microscopia por contraste de interferência individual, x 400).

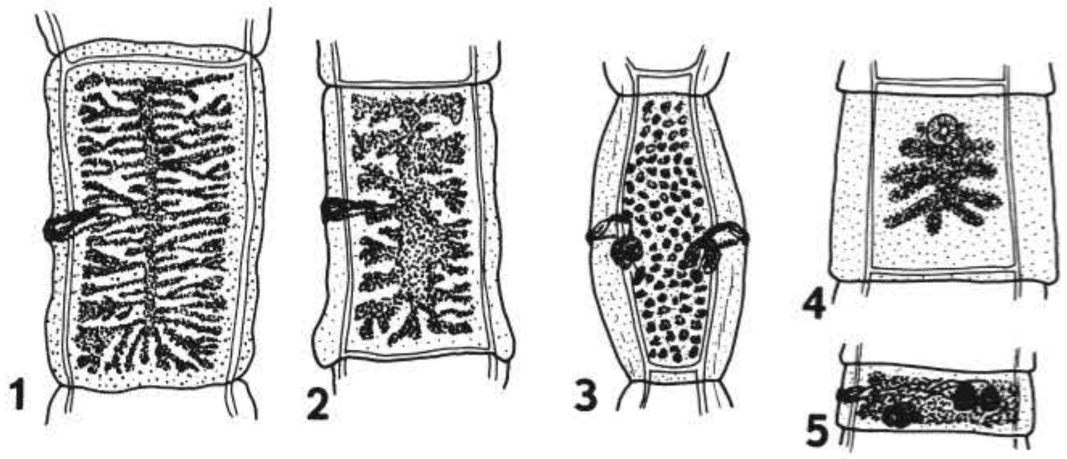


Figura 61.21 Proglótides grávidas de diferentes tênias humanas. *1, Taenia saginata. 2, Taenia solium. 3, Dipylidium caninum. 4, Diphyllobothrium latum. 5, Hymenolepis* spp.

ovos infectantes, ou indireto, pela ingestão de hospedeiros intermediários, em geral besouros de cereais ("carunchos") que contêm larvas cisticercoides. Na primeira situação, os ovos podem ser transmitidos diretamente de pessoa a pessoa, em geral entre crianças, ou ingeridos em alimentos, em especial produtos que contêm grãos que são contaminados por fezes de roedores.

Os ovos eclodem no intestino e os embriões penetram na mucosa, na qual eles se transformam em larvas cisticercoides. Posteriormente, eles emergem e fixam-se na parede intestinal para completar o seu desenvolvimento até se transformarem em tênias adultas em 2 ou 3 semanas. A ingestão de besouros de cereais contendo larvas cisticercoides ocorre com menos frequência. A autoinfecção interna pode ocorrer em alguns indivíduos nos quais os ovos eclodem pouco depois de serem liberados pelo verme e invadem rapidamente a parede intestinal sem deixarem o corpo. Acredita-se que esse mecanismo seja responsável pelos casos ocasionais de infecção maciça.

A infecção sintomática, caracterizada por dor abdominal, diarreia, anorexia e irritabilidade, pode ocorrer em pacientes com uma grande quantidade de vermes. O diagnóstico é feito pela recuperação de ovos de forma oval, com carapaça fina e incolores, os quais medem entre 30 e 47 μm de diâmetro (Fig. 61.20D). Eles contêm um embrião com seis ganchos localizado centralmente (oncosfera), o qual é separado da carapaça externa por um espaço claro. O embrião apresenta dois espessamentos polares, a partir dos quais emergem filamentos e eles estendem-se para o espaço claro entre o embrião e a carapaça externa. Ocasionalmente, o corpo intacto pode ser recuperado quando as fezes são examinadas com atenção.

Hymenolepis diminuta

A tênia do rato, *Hymenolepis diminuta*, apresenta uma distribuição cosmopolita e ocasionalmente infecta humanos. No entanto, as infecções são raras por causa da necessidade obrigatória de um hospedeiro intermediário artrópode, no qual as larvas cisticercoides se desenvolvem. A infecção humana, em geral, ocorre após a ingestão acidental de besouros infectados que contaminam produtos que contêm grãos ou cereais. A tênia adulta se desenvolve no intestino delgado, no qual ela pode atingir um comprimento de até 60 cm. Assim como as proglotes da *H. nana*, todas as proglotes da *H. diminuta* apresentam poros genitais em um lado. Porém, ao contrário da *H. nana*, o escólex não possui um rostelo armado. As infecções comumente são assintomáticas por causa do pequeno número de vermes que pode infectar um indivíduo, apesar de terem sido relatados sintomas intestinais. O diagnóstico é estabelecido pela observação de ovos amarelo-acastanhados, com carapaça espessa e um pouco ovoides, que medem entre 70 e 85 μm de comprimento e entre 60 e 80 μm de largura nas fezes (Fig. 61.20E). Os ovos são mais facilmente confundidos com os de *H. nana*, mas ao contrário dos ovos dessa espécie, eles não possuem filamentos polares.

Diphyllobothrium spp.

Humanos podem ser infectados por uma das várias espécies da tênia do peixe, *Diphyllobothrium*, a qual, em geral, infecta mamíferos piscívoros e, possivelmente, aves (Curtis, 1991; Connor, 1997). Esses parasitas são bem distribuídos nas zonas temperadas, em especial no norte da Europa, na Escandinávia, na antiga União Soviética e no Japão. Infecções também ocorrem no Canadá. Nos Estados Unidos, elas ocorrem em estados do centro-norte, estados da costa do Pacífico e Alasca. Embora o *Diphyllobothrium latum* seja a espécie mais comum que sabidamente infecta humanos, a diferenciação não pode ser feita baseando-se na morfologia do ovo.

O parasita habita o intestino delgado, no qual ele pode atingir um comprimento de 10 metros ou mais e pode persistir durante anos. Os ovos não embrionados são eliminados nas fezes e devem atingir uma corrente de água fresca ou um lago para continuar o desenvolvimento. Após várias semanas de desenvolvimento embrionário, uma forma larvária ciliada, o coracídio com seis ganchos, eclode e é ingerida por um copépode, um tipo de zooplâncton. O coracídio evolui para um estágio de larva procercoide, a qual é infectante para o segundo hospedeiro intermediário, um peixe. No peixe, a larva procercoide migra para os tecidos e evolui para a forma de larva plerocercoide. Larvas plerocercoides podem passar inalteradas pela cadeia alimentar e podem acumular-se em um peixe maior. Humanos adquirem essas larvas pela ingestão de peixe cru ou incompletamente cozido, que passou pelo menos parte de sua vida em água fresca.

Vermes adultos amadurecem e iniciam a produção de ovos em cerca de 1 mês. A infecção pode ser assintomática com a eliminação de uma parte do corpo sendo a queixa inicial. Outros pacientes podem apresentar um grau variável de desconforto abdominal e diarreia. Raramente, ocorre obstrução intestinal. Em áreas endêmicas do norte da Europa, uma pequena porcentagem de pacientes desenvolve deficiência de vitamina B_{12} e anemia megaloblástica.

O diagnóstico é estabelecido pela observação de ovos operculados ovoides marrons nas fezes, usando técnicas padrões de recuperação. Os ovos medem de 58 a 76 μm por 40 a 51 μm e, além do opérculo, eles possuem uma pequena projeção arredondada tipo maçaneta na extremidade abopercular (Fig. 61.20F). A presença do opérculo é única entre os cestódeos que infectam humanos e deve-se tomar cuidado para que esses ovos não sejam confundidos com os de trematódeos, especialmente do *Paragonimus* ou do *Nanophyetus*. A identificação do gênero é possível quando o corpo ou todo o verme é eliminado. O escólex é alongado e apresenta um par de sulcos longitudinais, os quais substituem as ventosas usuais. Proglotes grávidas são mais largas do que longas e apresentam poros genitais localizados no meio do ventre, adjacentes a um útero em forma de roseta localizado centralmente (Figs. 61.20G e 61.21).

Dipylidium caninum

O *Dipylidium caninum* é uma tênia comum que infecta cães e gatos na maior parte do mundo e contamina com frequência os seres humanos, especialmente crianças. No ciclo de vida usual, ovos da tênia são ingeridos por larvas de pulgas, as quais infestam áreas frequentadas por cães e gatos. As larvas cisticercoides persistem, enquanto a mosca sofre metamorfose para o estágio adulto. A ingestão acidental da mosca adulta contendo o cisticercoide infectante causa infecção. As crianças apresentam o maior risco de infecção por causa de seu contato íntimo com animais domésticos. Vermes amadurecem no intestino delgado e atingem até 70 cm de comprimento. As infecções produzem poucos sintomas e, em geral, causam preocupação apenas quando ocorre a detecção de proglotes que se movem ativamente.

A detecção baseia-se na identificação dos ovos característicos, dos agrupamentos de ovos ou das proglotes nas fezes. Ovos esféricos, cada um contendo um embrião com seis ganchos, medem entre 24 e 40 μm de diâmetro e podem estar isolados ou agrupados (Fig. 61.20H). O escólex é um pouco alongado com quatro ventosas e um rostelo retrátil pequeno. As proglótides apresentam uma forma em barril e dois poros genitais, um em cada margem lateral (Fig. 61.21).

Trematódeos

Os trematódeos são helmintos achatados (platelmintos) que incluem tanto formas hermafroditas (trematódeos intestinais, hepáticos e pulmonares) quanto sexuadas diferenciadas (trematódeos sanguíneos ou esquistossomas). Todas as espécies que infectam os humanos são caracterizadas pela presença de uma ventosa oral, por meio da qual se abre o trato digestivo, e uma ventosa ventral utilizada para fixação. Os adultos apresentam um comprimento que varia de 1 mm (*Metagonimus*) a 70 mm (*Fasciola gigantica*).

Os ovos atingem o meio ambiente ao serem eliminados nas fezes, no escarro ou na urina, dependendo da espécie. Os trematódeos hermafroditas produzem ovos operculados, os quais não são embrionados (excetuando-se o *Clonorchis* e o *Opisthorcis*). Os ovos do esquistossoma não são operculados e cada um contém uma larva madura ao ser eliminado. As larvas dos trematódeos, ou miracídios, são ciliadas e capazes de penetrar nos tecidos de um molusco hospedeiro. Cada espécie de trematódeo utiliza uma espécie particular de caramujo como primeiro hospedeiro intermediário. Um processo complexo de multiplicação assexuada no interior do caramujo resulta na produção de numerosas larvas que se movem livremente na água, denominadas cercárias. As cercárias do esquistossoma são capazes de penetrar diretamente a pele humana e causar a doença denominada esquistossomose. As larvas dos trematódeos hermafroditas encistam na vegetação aquática ou invadem os tecidos dos segundos hospedeiros intermediários (p. ex., peixes ou caranguejos), dependendo da espécie. A ingestão dessas larvas encistadas, conhecidas como metacercárias, resulta em infecção humana.

Infecções humanas por trematódeos ocorrem em muitas regiões tropicais e subtropicais. A sua presença depende da falta de saneamento básico, da disponibilidade de hospedeiros intermediários adequados e, no caso das espécies hermafroditas, dos hábitos dietéticos associados à ingestão de metacercárias infectantes. Algumas dessas doenças, especialmente a esquistossomose, estão se disseminando por causa do aumento do uso da irrigação em áreas endêmicas. Os sintomas variam de acordo com o número de vermes que parasitam o hospedeiro em um determinado momento, com os tecidos e os órgãos envolvidos e com a resposta do hospedeiro. Muitas infecções são assintomáticas.

O diagnóstico da infecção por trematódeo é estabelecido pela recuperação e pela identificação de ovos característicos nas fezes, no escarro e, ocasionalmente, nos tecidos. Exames a fresco e métodos de concentração com formalina-acetato de etila são os mais úteis para a recuperação desses ovos, enquanto que métodos de flutuação com sulfato de zinco são menos satisfatórios.

Fasciolopsis buski

Esse trematódeo intestinal é a maior espécie que infecta humanos, apresentando um comprimento de 20 a 75 m e uma largura de 8 a 20 mm. Ele ocorre em muitas partes da China, sudeste asiático e Índia e é frequentemente encontrado em porcos, os quais servem como reservatório natural. A infecção é adquirida pela ingestão de metacercárias infectantes presentes em plantas aquáticas comestíveis quanto, por exemplo, castanha de água. Os vermes fixam-se à parede do duodeno e do jejuno, na qual eles amadurecem e atingem a forma adulta, que começa a produzir ovos em aproximadamente 3 meses. Podem ocorrer sintomas, incluindo diarreia, dor epigástrica e náusea, quando a quantidade de vermes é suficiente para produzir ulceração da mucosa superficial. A eosinofilia pode estar presente, mesmo em indivíduos assintomáticos.

O diagnóstico é estabelecido pela detecção de ovos grandes (130 a 140 μm por 80 a 85 μm), marrons, ovais e com carapaça fina (Fig. 61.22A). O opérculo pode ser imperceptível e os ovos são eliminados não embrionados. A diferenciação dos ovos de *Fasciola* em geral não é possível, embora essas infecções possam ser diferenciadas com base na história geográfica e nos sintomas. Ovos de trematódeos equinostomas, que ocasionalmente infectam seres humanos, são semelhantes, porém menores (Beaver, 1984).

Heterophyes e Metagonimus

Esses gêneros incluem várias espécies de vermes intestinais pequenos (de 1 a 3 mm de comprimento) que infectam humanos. O *Heterophys heterophyes* e o *Metagonimus yokogawa* são parasitas comuns na Ásia, mas, juntamente com outras espécies, também são encontrados em outras partes do mundo. Infecções são adquiridas pela ingestão de metacercárias presentes na carne crua ou malcozida de peixes de água fresca. Embora a sua importância clínica seja menor, a infecção por esses vermes pode causar diarreia e dor abdominal. As infecções são autolimitadas porque os vermes possuem um período de vida de apenas alguns meses.

O diagnóstico é estabelecido pelo achado de ovos operculados embrionados, que medem entre 20 e 30 μm de comprimento e entre 15 e 17 μm de largura (Fig. 61.22B). A diferenciação desses ovos dos de *Clonorchis* e *Opisthorchis* é difícil, embora o opérculo esteja localizado mais profundamente no *Opisthorchis*. Contudo, essa diferenciação pode ser importante por razões médicas.

Nanophyetus salmincola

O *Nanophyetus salmincola* é um pequeno trematódeo intestinal (de 0,8 a 1,1 mm), que foi descrito em humanos em áreas do extremo oriente da Sibéria e da costa pacífica noroeste dos Estados Unidos (Eastburn, 1987; Fritsche, 1989b). Esses vermes são adquiridos pela ingestão de trutas ou salmões defumados em casa, crus ou malcozidos, que contêm metacercárias infectantes. A ocorrência de sintomas está relacionada com o número de vermes presentes e pode incluir dor abdominal e diarreia, com ou sem eosinofilia. Os ovos, medindo de 60 a 80 μm por 34 a 50 μm, são bem ovoides, operculados e apresentam uma coloração marrom amarelada (Eastburn, 1987). Eles apresentam um espessamen-

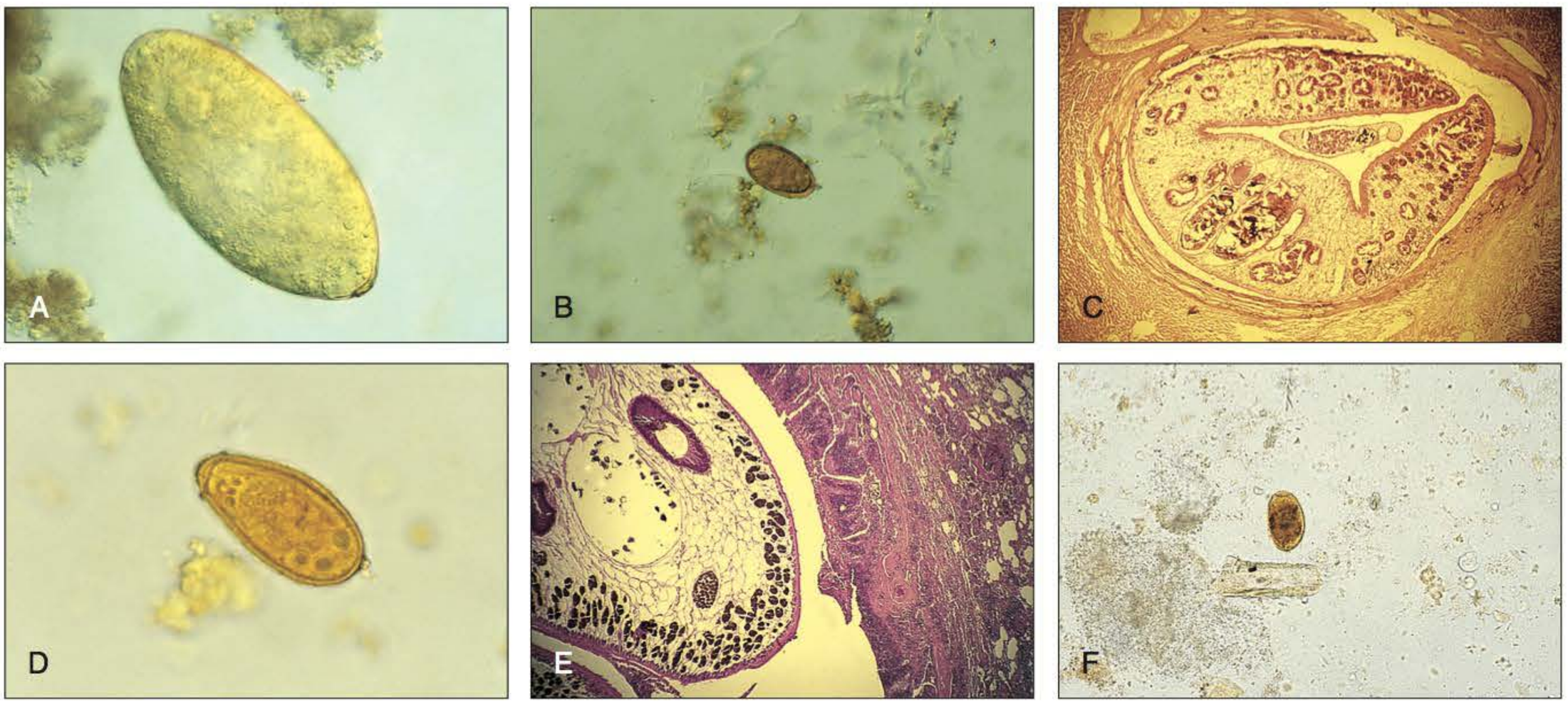


Figura 61.22 *A*, Ovos de *Fasciolopsis buski*, indistinguível dos ovos de *Fasciola hepatica*, nas fezes (× 400). *B*, Ovo de *Heterophyes* sp. nas fezes (× 400). *C*, *Clonorchis sinensis* adulto no ducto biliar (hematoxilina-eosina; × 100). *D*, Ovo de *C. sinensis* nas fezes (× 1.000). *E*, Par de *Paragonimus* sp. adulto no tecido pulmonar com reação inflamatória circunvizinha (hematoxilina-eosina; × 10). *F*, Ovo de *Paragonimus* sp. nas fezes; observe o opérculo proeminente (× 100).

to da carapaça na extremidade abopercular, o qual deve ser diferenciado da protuberância observada nos ovos de *Diphyllobothrium*. Esse trematódeo é vetor de uma riquétsia, que produz uma infecção altamente letal em cães, conhecida como "doença do envenamento por salmão".

Fasciola hepatica

Bovinos, ovinos e caprinos em muitas partes do mundo são infectados pelo trematódeo hepático *Fasciola hepatica* e, menos comumente, pela espécie *Fasciola gigantica*. Parasitas adultos habitam a árvore biliar e produzem ovos que são eliminados nas fezes. Cercárias que são eliminadas pelo caramujo que serve de hospedeiro intermediário encistam na vegetação aquática, na qual metacercárias infectantes se tornam, então, disponíveis para hospedeiros herbívoros. Em geral, os humanos adquirem a infecção ao consumir agrião. Após serem ingeridas, as larvas penetram a parede intestinal e migram pela cavidade peritoneal até o fígado. Elas escavam através da cápsula e do parênquima, indo residir no interior dos ductos biliares, nos quais a postura de ovos é iniciada em cerca de 2 meses. A migração das larvas através do fígado provoca uma reação inflamatória dolorosa do tecido e, posteriormente, dos ductos biliares, os quais acabam fibrosando. As manifestações clínicas incluem cólica, icterícia obstrutiva, dor abdominal, colelitíase e eosinofilia.

O diagnóstico é estabelecido pela detecção de ovos nas fezes. Os ovos não embrionados, operculados, de coloração marrom amarelada e medindo de 130 a 150 μm por 63 a 90 μm não podem ser facilmente diferenciado dos ovos de *Fasciolopsis* (Fig. 61.22A). Falsas infecções, as quais ocorrem pela ingestão de fígado bovino ou ovino, são diagnosticadas pela obtenção de uma boa história e da realização de exames de fezes de acompanhamento para se observar a eliminação de ovos.

Clonorchis sinensis e *Opisthorchis viverrini*

O *Clonorchis sinensis*, trematódeo hepático oriental, e uma espécie intimamente relacionada, o *Opisthorchis viverrini*, habitam o sistema biliar de humanos e outros animais piscívoros, incluindo cães e gatos. O *C. sinensis* ocorre principalmente na China, em Taiwan, na Coreia, no Japão e no Vietnã, enquanto que o *O. viverrini* é encontrado principalmente no sudeste asiático, em especial no norte da Tailândia. Sabe-se também que ocorrem infecções humanas pelo *Opisthorchis felineus* na Europa e pelo *Amphimerus pseudofelineus* (ou *Opisthorchis guayaquilensis*) no Equador.

Todos esses parasitas são adquiridos pela ingestão de metacercárias infectantes presentes em peixes de água fresca, crus ou malcozidos. As larvas migram até o ducto comum e os ductos biliares hepáticos, nos quais vivem por até 20 anos e atingem até 25 mm de comprimento (Fig. 61.22C). Elas produzem pequenos ovos que são eliminados na bile e, posteriormente, nas fezes.

De modo geral, as infecções são assintomáticas, embora uma grande quantidade de vermes e infecções repetidas possa causar inflamação dos ductos biliares e subsequente hiperplasia, fibrose e cirrose hepática. O desenvolvimento de colangiocarcinoma foi relacionado epidemiologicamente a infecções de longa duração.

O diagnóstico é estabelecido pela recuperação de pequenos ovos embrionados, operculados e marrons nas fezes (Fig. 61.22D). Os ovos do *Clonorchis* não podem ser prontamente diferenciados dos ovos do *Opisthorchis*. Ambos medem de 25 a 35 mm por 12 a 20 mm e apresentam um opérculo proeminente e uma pequena proeminência na extremidade abopercular. Esses ovos são difíceis de serem diferenciados dos do grupo *Heterophyes/Metagonimus*, embora essas espécies não apresentem um opérculo proeminente ou uma protuberância na extremidade abopercular. Quando a identificação específica não for possível, o relatório do laboratório deve refletir isso (i. e., deve declarar a presença de "ovos de *Clonorchis/Opisthorchis/Heterophyes/Metagonius*").

Paragonimus spp.

Várias espécies de *Paragonimus* podem parasitar os pulmões de gatos, cães e outros carnívoros, incluindo humanos. O *Paragonimus westermani* é problemático em muitas áreas da Ásia, enquanto que nas Américas Central e do Sul várias espécies foram implicadas, incluindo o *Paragonimus mexicanus*, o *Paragonimus caliensis* e o *Paragonimus ecuadoriensis*. O *Paragonimus kellicotti* foi implicado ocasionalmente em casos na América do Norte e outras espécies foram descritas na África (Pachucki, 1984; Mariano, 1986; Strickland, 2000; Cook, 2002).

Os vermes adultos medem até 12 mm por 6 mm e são frequentemente observados em pares no parênquima pulmonar, no qual eles residem em uma cápsula fibrótica produzida pelo hospedeiro (Fig. 61.22E). A cápsula comunica-se com os brônquios, por meio dos quais os ovos são eliminados, sendo expelidos no escarro ou nas fezes. Embora um caramujo específico sirva de primeiro hospedeiro intermediário, os caranguejos e os lagostins de água fresca servem de segundos intermediários para as metacercárias infectantes. A ingestão de crustáceos não cozidos ou marinados pode causar infecção. As larvas são liberadas no estômago e migram, pela parede intestinal, para a cavidade peritoneal e acabam alcançando os pulmões após penetrarem o diafragma. A maturação leva aproximadamente entre 5 e 6 semanas e os vermes podem viver muitos anos.

Quando presentes, os sintomas podem ser causados pela migração de larvas pelos tecidos ou por adultos estabelecidos nos pulmões. Não é raro que vermes se desenvolvam em locais ectópicos, incluindo o peritôneo, os tecidos subcutâneos e o encéfalo. O início da infecção pulmonar geralmente está associado à febre, aos calafrios e ao aparecimento da eosinofilia. Após o seu estabelecimento, os sintomas incluem tosse crônica com produção abundante de muco e episódios de hemoptise. A radiografia pode revelar sombras nodulares, calcificações e infiltrados irregulares. Os ovos que permanecem nos tecidos pulmonares ou em sítios ectópicos podem causar reação granulomatosa extensa.

O diagnóstico é estabelecido pela detecção de ovos típicos nas fezes, no escarro ou, ocasionalmente, nos tecidos. Ovos de diferentes espécies de *Paragonimus* não podem ser diferenciados de imediato e a identificiação específica pode ser inferida a partir da área de origem. Os ovos não embrionados operculados medem de 80 a 120 mm por 45 a 70 mm e apresentam uma carapaça moderadamente espessa e de coloração marrom amarelada (Fig. 61.22F). O opérculo é achatado e, em geral, se destaca do resto da carapaça pelos "ombros" proeminentes. A extremidade abopercular apresenta um pequeno espessamento, mas não apresenta protuberância. Embora eles se assemelhem, os ovos de *Paragonimus* podem ser diferenciados dos de *Diphyllobothrium* e de *Fasciola/Fasciolopsis* pelo seu tamanho.

Schistosoma spp.

A esquistossomose, ou bilharziose, está entre as doenças parasitárias mais importantes no mundo, afetando entre 200 e 300 milhões de indivíduos. Trematódeos adultos (machos e fêmeas) habitam as veias do mesentério ou da bexiga. As espécies mais importantes que afetam os humanos são *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma intercalatum*. Outras espécies infectam os humanos menos frequentemente.

Esquistossomas fêmeas adultas são finas, medindo até 26 mm por 0,5 mm. O macho, mais curto, envolve a fêmea, utilizando as margens laterais do corpo (canal ginecóforo) para ajudar na transferência do esperma. Quando examinados *in situ*, os esquistossomas são com frequência observados copulando. Em suas localizações preferidas, os trematódeos sanguíneos provocam pouca ou nenhuma reação inflamatória. Os ovos são depositados nas vênulas menores que conseguem acomodar a fêmea, nas quais eles provocam uma forte resposta granulomatosa, que resulta na extrusão do ovo para o interior da luz intestinal ou da bexiga. A patologia está relacionada principalmente aos locais de deposição de ovos, à quantidade depositada e à reação do hospedeiro aos antígenos dos ovos.

Os ovos são totalmente embrionados quando eliminados e logo eclodem quando depositados em água fresca. Os miracídios penetram em uma espécie apropriada de caramujo que serve de hospedeiro, nos quais eles sofrem transformação e ampla multiplicação assexuada. Após cerca de 4 semanas, um grande número de cercárias com cauda em forma de garfo emerge do molusco. As cercárias nadam ativamente por horas e logo penetram a pele dos hospedeiros suscetíveis, incluindo os humanos. Após a penetração, as cercárias, agora denominadas esquistossômulos, entram na circulação e passam pelos pulmões antes de atingir os vasos mesentéricos e portais.

Os sintomas da esquistossomose são decorrentes principalmente da penetração de cercárias (dermatite cercarial), do início da postura de ovos (esquistossomose aguda ou febre de Katayama) e da complicação do estágio final da proliferação e da reparação tissular (esquistossomose crônica). Em questão de horas após a penetração cercarial, um *rash* papular

associado ao prurido pode ocorrer. Trata-se de um fenômeno de sensibilização resultante da exposição prévia a antígenos cercariais. A forma mais grave de dermatite ocorre em indivíduos que são expostos várias vezes a cercárias de esquistossomas não humanos (principalmente aviários). A dermatite cercarial (prurido do nadador) ocorre no mundo inteiro e é uma entidade reconhecida nos Estados Unidos (Hoeffler, 1974).

O início da postura de ovos por vermes maduros de 5 a 7 semanas após a infecção pode resultar na esquistossomose aguda ou na febre de Katayama, uma síndrome semelhante à doença do soro que ocorre nas infecções primárias maciças, especialmente nas causadas pelo *S. japonicum*. Acredita-se que o desafio antigênico ao hospedeiro resulte na formação de complexos imunes (Boros, 1989).

A infecção crônica resulta na deposição contínua de ovos, muitos dos quais permanecem no corpo. Os granulomas produzidos em torno desses ovos no intestino e na bexiga são gradualmente substituídos por colágeno, resultando na fibrose e na formação de cicatrizes. Os ovos retidos no fígado podem induzir fibrose *pipestem* (em forma de cachimbo), com obstrução do fluxo sanguíneo portal. Às vezes, ovos são depositados em outros locais, como a medula espinal, os pulmões ou o encéfalo (Cook, 2002).

O diagnóstico é estabelecido pela demonstração da presença de ovos nas fezes ou na urina pelo exame a fresco ou por métodos de concentração com formalina-acetato de etila. A concentração com sulfato de zinco não é satisfatória para a recuperação dos ovos pesados de esquistossoma. Ovos também podem ser detectados em biópsias retais, vesicais e, às vezes, hepáticas, por meio de preparações por esmagamento ou de cortes histológicos (Fig. 61.23). Métodos de eclosão de ovos podem ser solicitados para se determinar a viabilidade ou, menos comumente, para se detectar as infecções leves. Fezes misturadas com água destilada são colocadas em um frasco que é coberto com papel alumínio para proteger contra a luz, apenas com a porção superior do frasco exposta a uma luz intensa. Os miracídios, quando presentes, nadam ativamente em direção à luz e podem ser detectados com o auxílio de uma lupa.

Testes sorológicos podem ser úteis para a investigação de pessoas que viajaram para áreas endêmicas ou aquelas com exames de fezes ou de urina negativos que apresentam risco de infecção, ou ainda para a monitoração da resposta terapêutica. Embora não estejam disponíveis de maneira disseminada, um número limitado de laboratórios e o CDC fornecem esses testes. Geralmente, os antígenos utilizados nos testes sorológicos variam, assim como a metodologia utilizada. O CDC utiliza o teste de triagem do ensaio de Falcon em ensaio imunossorvente ligado à enzima cinético (FAST-ELISA). Soros positivos ao teste de investigação são avaliados mais detalhadamente pelo método de *immunoblot* para aumentar a especificidade (Wilson, 1995).

Schistosoma mansoni

O *S. mansoni* ocorre na África, em especial nas áreas tropicais e no delta do Nilo, no sul da África, em Madagascar, no Brasil, na Venezuela, no Suriname e em certas ilhas do Caribe, incluindo Porto Rico. O *S. mansoni* adulto vive principalmente na veia porta e na distribuição da veia mesentérica inferior. A postura inicial de ovo no intestino grosso pode produzir dor abdominal e disenteria, com presença abundante de sangue e muco nas fezes. Nesse momento, ovos podem ser detectados nas fezes. A infecção crônica pode acarretar fibrose hepática e hipertensão porta, dependendo da quantidade de vermes presentes. Durante esse estágio, pode ser mais difícil encontrar ovos nas fezes.

Os ovos, medindo de 116 a 180 mm por 45 a 58 mm, são ovais, com uma espícula lateral grande característica que emerge da sua lateral, próxima a uma das extremidades (Figs. 61.23A e B). Quando a espícula não é visível, o ovo pode ser rodado, batendo delicadamente na lamínula. O movimento do miracídio no interior do ovo pode ser evidente no material não fixado quando a larva é viável. Técnicas de concentração podem ser necessárias para detectar ovos porque indivíduos com exposição limitada ou com infecção crônica podem eliminar poucos deles.

Schistosoma japonicum

O *S. japonicum*, que ocorre na China, no sudeste asiático e nas Filipinas, pode causar uma doença clinicamente similar à causada pelo *S. mansoni*, mas que é com frequência mais grave porque mais (até 10 vezes) ovos são produzidos pelo *S. japonicum*. A doença foi praticamente eliminada do Japão, embora ainda existam reservatórios animais. Vermes adultos vivem principalmente na distribuição da veia mesentérica superior e os ovos logo atingem o fígado, induzindo a fibrose e a hipertensão porta como uma complicação comum da infecção crônica. O menor tamanho dos ovos predispõe os mesmos à disseminação, em especial para o cérebro e a medula espinal. Os ovos são bem ovais, medindo de 75 a 90 μm por 60 a 68 μm e apresentam uma espícula lateral imperceptível, a qual pode ser difícil de ser demonstrada (Figs. 61.23C e D).

Schistosoma mekongi

Essa espécie ocorre em humanos e reservatórios animais, em países ao longo do rio Mekong, especialmente o Camboja e o Laos (Bruce,

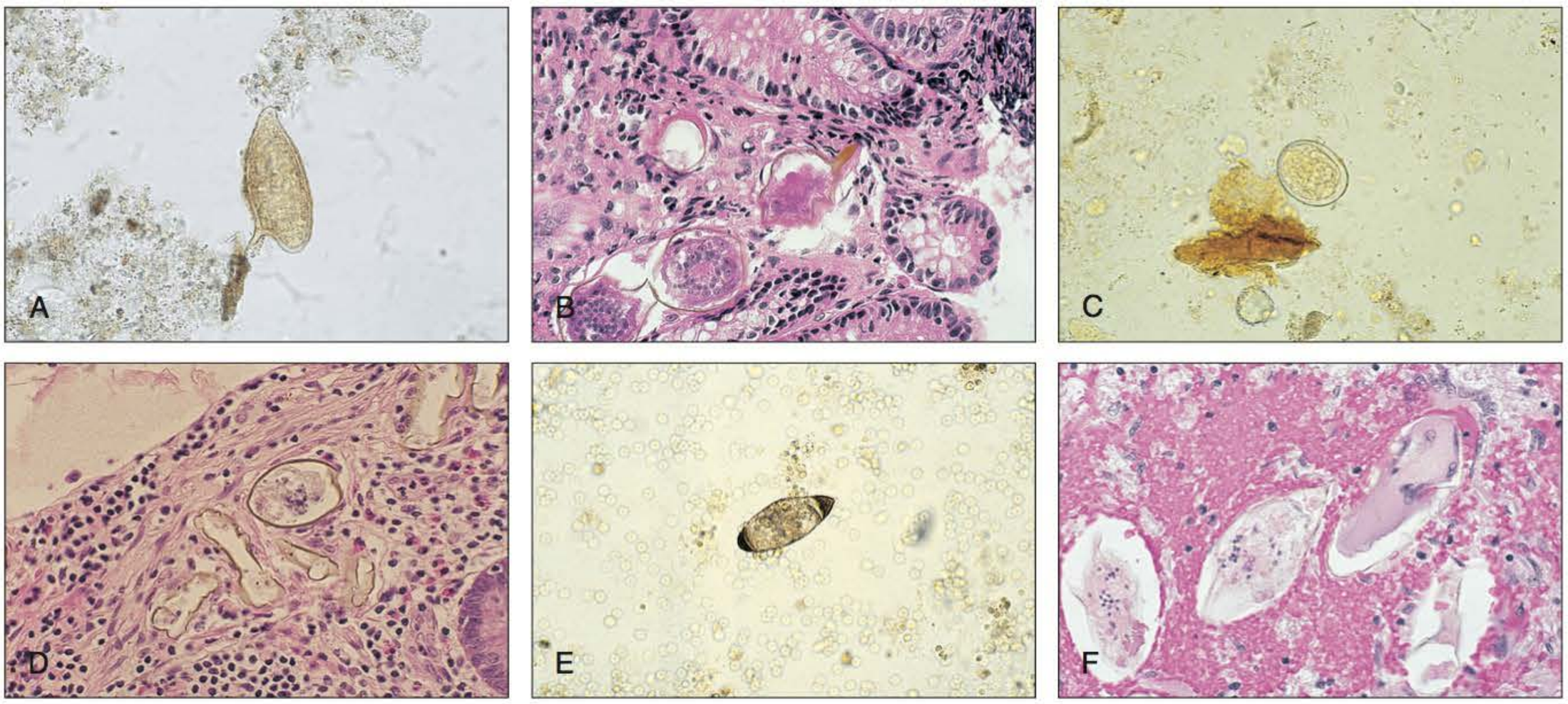


Figura 61.23 *A*, Ovo de *Schistosoma mansoni*; observe a espícula lateral proeminente (× 400). *B*, Ovos de *S. mansoni* em uma biópsia intestinal; observe a presença da espícula lateral (hematoxilina-eosina; × 400). *C*, Ovo de *Schistosoma japonicum*; observe a presença da pequena espícula lateral (× 400). *D*, Ovos de *S. japonicum* em uma biópsia de intestino delgado (hematoxilina-eosina; × 400). *E*, Ovo de *Schistosoma haematobium* encontrado no sedimento urinário; observe a presença de uma espícula terminal (x 400). *F*, Ovos de *S. haematobium* observados em um granuloma vulvar; observe a presença de uma espícula terminal (hematoxilina-eosina; × 400).

1980). Ele é similar ao *S. japonicum*, mas é diferenciado do mesmo por várias características biológicas e por seus ovos serem menores (60 a 70 μm por 52 a 61 μm), os quais, excetuando o fator tamanho, são indistinguíveis dos ovos do *S. japonicum*.

Schistosoma haematobium

A esquistossomose urinária ocorre em muitas partes da África, do Oriente Médio e de Madagascar. O parasita migra através das veias hemorroidárias para os plexos venosos da bexiga, da próstata, do útero e da vagina. Um dos sintomas mais precoces e comuns de infecção é a hematúria, especialmente no final da micção. A infecção crônica pode causar dor pélvica e cólica vesical, com aumento da vontade de urinar. O acúmulo de ovos nos tecidos pode resultar em hipertrofia do urotélio, metaplasia escamosa e fibrose acentuada, a qual pode evoluir para a obstrução e, por fim, a insuficiência renal. A esquistossomose urinária também foi associada ao carcinoma vesical de células escamosas (Badawi, 1992).

Ovos são recuperados da urina por meio do exame do sedimento centrifugado. Eles são alongados, medindo de 112 a 180 μm por 40 a 70 μm, e apresentam uma espícula terminal característica (Figs. 61.23E e F). Ocasionalmente, eles podem ser detectados nas fezes ou na biópsia retal.

Schistosoma intercalatum

Essa espécie ocorre em muitas partes da África Central e Ocidental e produz esquistossomose intestinal. Os ovos apresentam uma espícula terminal e assemelham-se aos do *S. haematobium*, mas eles ocorrem principalmente nas fezes e são maiores (140 a 240 μm por 50 a 85 μm).

Helmintos tissulares

Nematódeos

Filaria

Nematódeos filariásicos são parasitas comuns de animais vertebrados transmitidos por artrópodes. Vermes adultos (machos e fêmeas) são longos e finos, medindo até 100 mm de comprimento, e sabe-se que eles habitam em vários tecidos, incluindo tecidos subcutâneos, linfáticos, vasos sanguíneos, cavidades peritoneal e pleural, coração e encéfalo. Todas as espécies produzem larvas denominadas microfilárias, as quais podem ser recuperadas do sangue ou da pele, dependendo das espécies. As microfilárias de algumas espécies circulam no sangue com uma periodicidade bem definida (diurna ou noturna), enquanto outras espécies não. As microfilárias prosseguem seu desenvolvimento apenas no vetor artrópode adequado, em geral um mosquito ou uma mosca, no qual elas amadurecem até o estágio infectante. Essas larvas são, então, depositadas nos tecidos de um hospedeiro definitivo quando o vetor suga o sangue novamente.

O diagnóstico de filaríase usualmente é estabelecido pela identificação de microfilárias no sangue ou na pele, porque as formas adultas são com frequência sequestradas nos tecidos. O uso de esfregaços espessos de sangue periférico corados pelo método de Giemsa ou de hematoxilina é rotina, embora procedimentos mais sensíveis, como filtro de membrana, concentração de Knott ou lise por saponina, também possam ser necessários (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). Microfilárias em movimento podem ser observadas em exame a fresco de sangue ou de líquido tissular.

A identificação da espécie é importante porque a patogenicidade varia. As principais características que são utilizadas para identificação de microfilárias incluem a presença ou a ausência de uma bainha e as suas características de coloração, a forma da cauda, a distribuição dos núcleos celulares, o tamanho do espaço cefálico e o aspecto de sua coluna nuclear. Como microfilárias de *Wuchereria* e *Brugia* geralmente apresentam uma periodicidade noturna, o sangue de pacientes suspeitos de estarem infectados por essas filárias deve ser coletado entre as 10 e as 14 horas. O *Loa loa* apresenta periodicidade diurna, de modo que o sangue deve ser coletado de preferência em torno das 12h. A *Mansonella ozzardi* e a *Mansonella perstans* são caracteristicamente não periódicas. Microfilárias da *Mansonella streptocerca* e da *Onchocerca volvulus* estão presentes na pele e são detectadas ao exame de biópsia de fragmento de pele ou de biópsia obtida por punção.

Testes sorológicos para o diagnóstico da filaríase linfática podem ser úteis em determinados pacientes, especialmente naqueles que não são originários de áreas endêmicas. Entretanto, esses métodos têm uma capacidade limitada de distinguir entre a exposição passada e a infecção atual, e a infecção por outro nematódeo pode resultar na produção de anticorpos que reagem de maneira cruzada. Testes de detecção de antígeno também podem ser úteis no diagnóstico da filaríase linfática, mas geralmente não estão disponíveis (Wilson, 1995).

Wuchereria bancrofti

Essa espécie, responsável pela filaríase bancroftiana, é a que mais comumente infecta humanos. As áreas endêmicas incluem as regiões central e norte da África, a Índia, o sudeste asiático, certas ilhas do Pacífico Sul e porções das Américas Central e do Sul e das Índias Ocidentais. Vermes adultos habitam o sistema linfático, no qual a infecção crônica e a reinfecção causam linfadenopatia e linfangite, podendo evoluir para o linfedema e a fibrose obstrutiva (Fig. 61.24A). O envolvimento severo das extremidades inferiores e da genitália pode causar elefantíase.

Na maioria das áreas, microfilárias circulam no sangue periférico com uma periodicidade noturna que corresponde às atividades alimentares dos vetores usuais, os mosquitos *Culex, Aedes* e *Anopheles*. Infecções que ocorrem no Pacífico Sul são essencialmente sem periodicidade. As microfilárias são embainhadas, embora isso possa nem sempre ser evidente na coloração de Giemsa. A cauda é pontiaguda e não apresenta núcleos na ponta. O espaço cefálico não é mais largo do que longo e os núcleos na coluna nuclear são distintos (Figs. 61.24B e 61.25). Procedimentos de concentração podem ser necessários para a recuperação porque microfilárias podem estar presentes em pequena quantidade.

Brugia malayi

Essa espécie produz uma doença similar à causada pela *W. bancrofti*, embora ela, em geral, seja mais leve e, com mais frequência, envolva os linfáticos das extremidades superiores. O parasita ocorre em especial na Índia, no sudeste asiático, na Coreia, nas Filipinas e no Japão. Infecções humanas relacionadas a espécies zoonóticas são observadas periodicamente nos Estados Unidos.

As microfilárias circulam no sangue e são primariamente periódicas. A bainha da microfilária da *Brugia malayi* cora bem com o corante de Giemsa. A cauda apresenta um aumento de volume na ponta e possui dois núcleos solitários localizados além da extremidade da coluna nuclear (denominados núcleos subterminais e terminais). O espaço cefálico pode ser muito mais longo do que largo (Figs. 61.24C e 61.25). A *Brugia timori* é uma espécie distinta que ocorre na extremidade oriental do arquipélago indonésio, especialmente nas ilhas de Timor e Flores. As microfilárias são similares às da *B. malayi*, embora sejam um pouco maiores.

Loa loa

Conhecido como verme ocular africano, o *Loa loa* vive em tecidos subcutâneos. Os nematódeos migram continuamente, produzindo reações inflamatórias locais transitórias (entre 2 e 3 dias), conhecidas como Calabar ou edema fugaz. Seu surgimento ocasional na conjuntiva permite que eles sejam removidos cirurgicamente. A loíase ocorre em especial nas regiões oeste e central da África, nas quais moscas do veado do gênero *Chrysops* servem de vetores.

O parasita causa uma intensa eosinofília e foi ocasionalmente observado nos Estados Unidos em indivíduos com uma história de viagem à África. As microfilárias, que circulam no sangue com periodicidade diurna, são embainhadas, embora a bainha não core com corante de Giemsa. Os núcleos da cauda estendem-se até a ponta arredondada. A coluna nuclear é distinta e o espaço cefálico é curto (Figs. 61.24D e 61.25; National Committee for Clinical and Laboratory Standards, 2000; Garcia, 2001).

Onchocerca volvulus

A oncocerquíase é a principal causa de cegueira em áreas endêmicas, as quais incluem a região central da África, a América Central (o México e a Guatemala) e o norte da América do Sul. Os vetores são moscas negras do gênero *Simulium*. Vermes adultos vivem em nódulos fibrosos duros nos tecidos subcutâneos e mais profundos que podem atingir até 40 mm de diâmetro (Fig. 61.24E). Os nódulos tendem a ocorrer na metade superior do corpo em pacientes da América

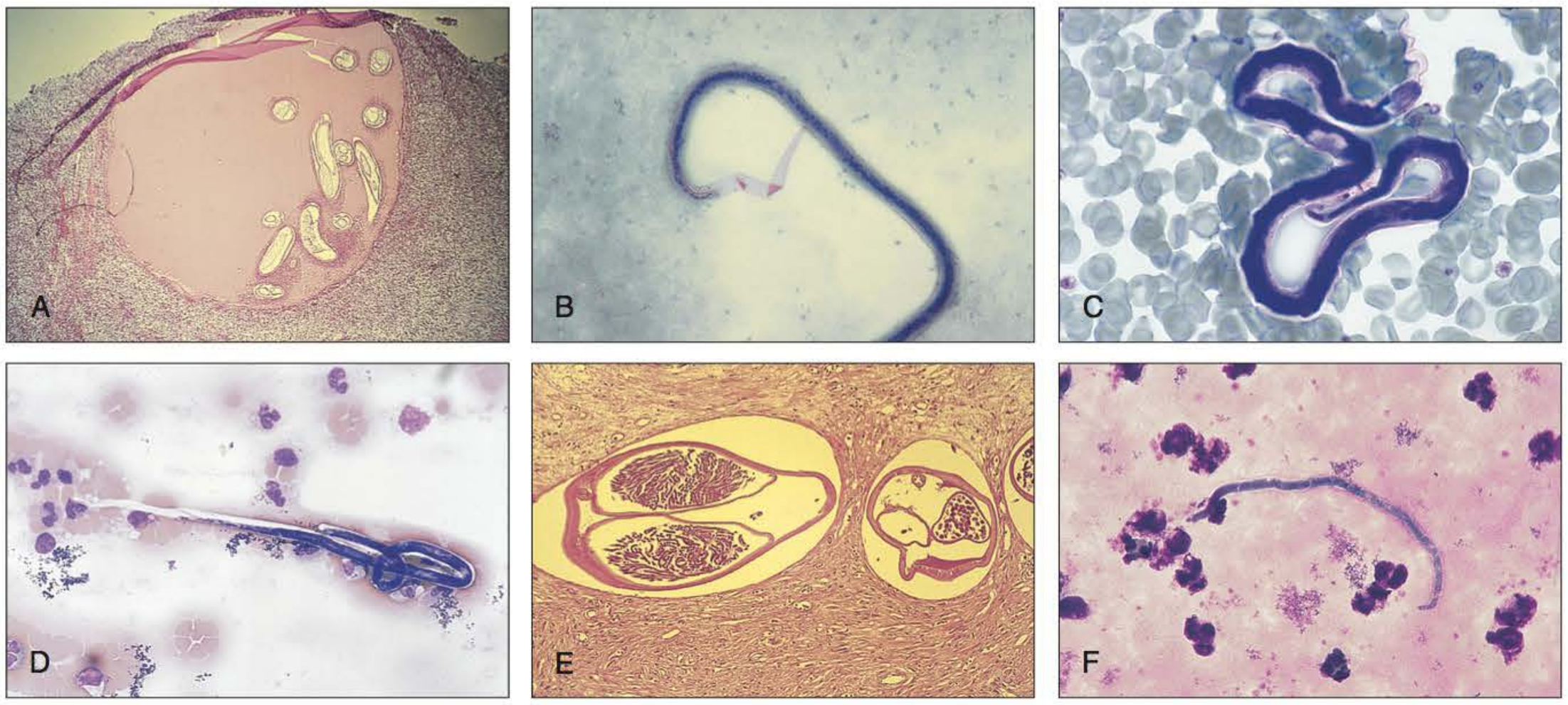


Figura 61.24 *A*, *Wurchereria bancrofti*, corte transverso de um adulto em um linfonodo humano; observe a extensa reação inflamatória (hematoxilina-eosina; × 100). *B*, Microfilária embainhada de *W. bancrofti*; os núcleos celulares não se estendem até a ponta da cauda (coloração de Giemsa; × 1.000). *C*, Microfilária embainhada de *Brugia malayi*; dois núcleos solitários são observados na ponta da cauda (coloração de Giemsa; × 1.000). *D*, Microfilária embainhada de *Loa loa*; os núcleos celulares estendem-se até a ponta da cauda (coloração de Giemsa; × 1.000). *E*, *Onchocerca volvulus*, corte transverso de um adulto em um nódulo cutâneo (hematoxilina-eosina; × 100). *F*, Microfilária desembainhada de *Mansonella perstans*; os núcleos celulares estendem-se até a ponta da cauda (coloração de Giemsa; × 1.000).

Central e na metade inferior naqueles da África. Vermes adultos produzem microfilárias que migram continuamente pela pele. Complicações ocorrem em virtude das atividades migratórias das microfilárias, resultando em várias formas de dermatite. O movimento de microfilárias pela superfície do olho pode causar ceratite, opacidade corneana e lesão das câmaras anterior e posterior e da íris, causando, em consequência, cegueira com infecções de repetição ao longo do tempo.

O diagnóstico é estabelecido pela detecção das microfilárias típicas em biópsias incisionais de pele, de preferência da região escapular ou da crista ilíaca, quando o material é colocado em soro fisiológico. Alternativamente, o líquido coletado de pele escarificada ou os aspirados de nódulos podem ser examinados (Beaver, 1984; Garcia, 2001). Microfilárias em preparações coradas não apresentam bainha e núcleos na ponta da cauda (Fig. 61.25).

Mansonella spp.

Várias espécies de *Mansonella* infectam humanos, mas todas são vistas como causadoras de pouca patologia. No entanto, as microfilárias devem ser diferenciadas das espécies de filárias realmente patogênicas. A *M. ozzardi* é encontrada nas Américas Central e do Sul e em algumas áreas do Caribe. Parasitas adultos residem nos tecidos subcutâneos. A *M. perstans* ocorre em muitas áreas da África tropical e, esporadicamente, na América do Sul. Acredita-se que as formas adultas habitem antes as cavidades corporais e os mesentérios. Microfilárias de ambas as espécies não possuem bainha e circulam no sangue periférico sem evidência de periodicidade. A microfilária da *M. ozzardi* apresenta uma cauda fina e pontiaguda, sem núcleos, enquanto a cauda da *M. perstans* é larga e arredondada, com núcleos que se estendem até a ponta (Figs. 61.24F e 61.25). A *M. streptocerca*, a qual é encontrada na África tropical, pode ser confundida com a *O. volvulus* porque as formas adulta e de microfilária ocorrem na pele e nos tecidos subcutâneos. Além disso, essa espécie pode causar dermatite. Microfilárias dessa espécie, que podem ser recuperadas em biópsia incisional de pele, não possuem bainhas e apresentam um gancho na cauda com os núcleos estendendo-se até a ponta. Todas as espécies de *Mansonella* são transmitidas por mosquitos do gênero *Culicoides*.

Filárias zoonóticas

Certos nematódeos filariásicos dos gêneros *Dirofilaria* e *Brugia*, que parasitam naturalmente mamíferos selvagens e domésticos, infectam humanos de modo esporádico. A *Dirofilaria immitis*, conhecida como verme do coração canino, é bem distribuída e infecções humanas estão bem documentadas. O estágio larval transmitido pelo mosquito migra para o lado direito do coração. Quando o verme morre, é enviado para uma pequena artéria pulmonar, produzindo um nódulo granulomatoso que aparece como uma lesão do tipo moeda na radiografia torácica. O diagnóstico geralmente é estabelecido pelo exame histológico do nódulo.

Outras espécies de *Dirofilaria*, incluindo *Dirofilaria tenuis*, *Dirofilaria repens* e *Dirofilaria ursi*, causam a formação de nódulos subcutâneos em humanos, mas não produzem microfilárias. Esses nódulos foram descritos em muitos locais do corpo, incluindo a face, a conjuntiva e as mamas, e, em geral, são removidos com cirurgia. O exame histológico com frequência revela uma reação inflamatória mista proeminente em torno de um verme morto. Os critérios para identificação da filária zoonótica em cortes de tecido podem ser encontrados em outros textos (Orihel, 1995; Connor, 1997; Gutierrez, 2000).

Outros

Dracunculus medinensis

Vermes adultos de Guiné vivem nos tecidos subcutâneos e tornam-se clinicamente evidentes quando a fêmea migra para a superfície cutânea e produz uma vesícula, em geral nas extremidades inferiores. Quando a extremidade é imersa na água, a vesícula rompe, liberando uma grande quantidade de larvas móveis da fêmea na água. Um zooplâncton específico (i. e., copépodes) ingere as larvas, as quais amadurecem até o estágio infectante e são transmitidas de volta aos humanos quando copépodes são deglutidos acidentalmente ao ingerirem água.

A doença é endêmica em áreas da África, do Oriente Médio e da Ásia, e pode ser responsável por cicatrizes cutâneas desfigurantes e infecções bacterianas secundárias mais graves. Em anos recentes, foram realizados amplos esforços de controle para erradicar esse parasita (Centers for Disease Control and Prevention, 1992; Cairncross, 2002).

O diagnóstico é estabelecido pela detecção do verme fêmea emergindo na superfície cutânea e das larvas no líquido secretado. O verme pode ser gentilmente extraído ao longo de alguns dias, mas deve-se ter cuidado para não lesá-lo durante a remoção. Se o verme morrer na pele, reações inflamatórias pronunciadas e infecções bacterianas secundárias podem incapacitar o indivíduo afetado.

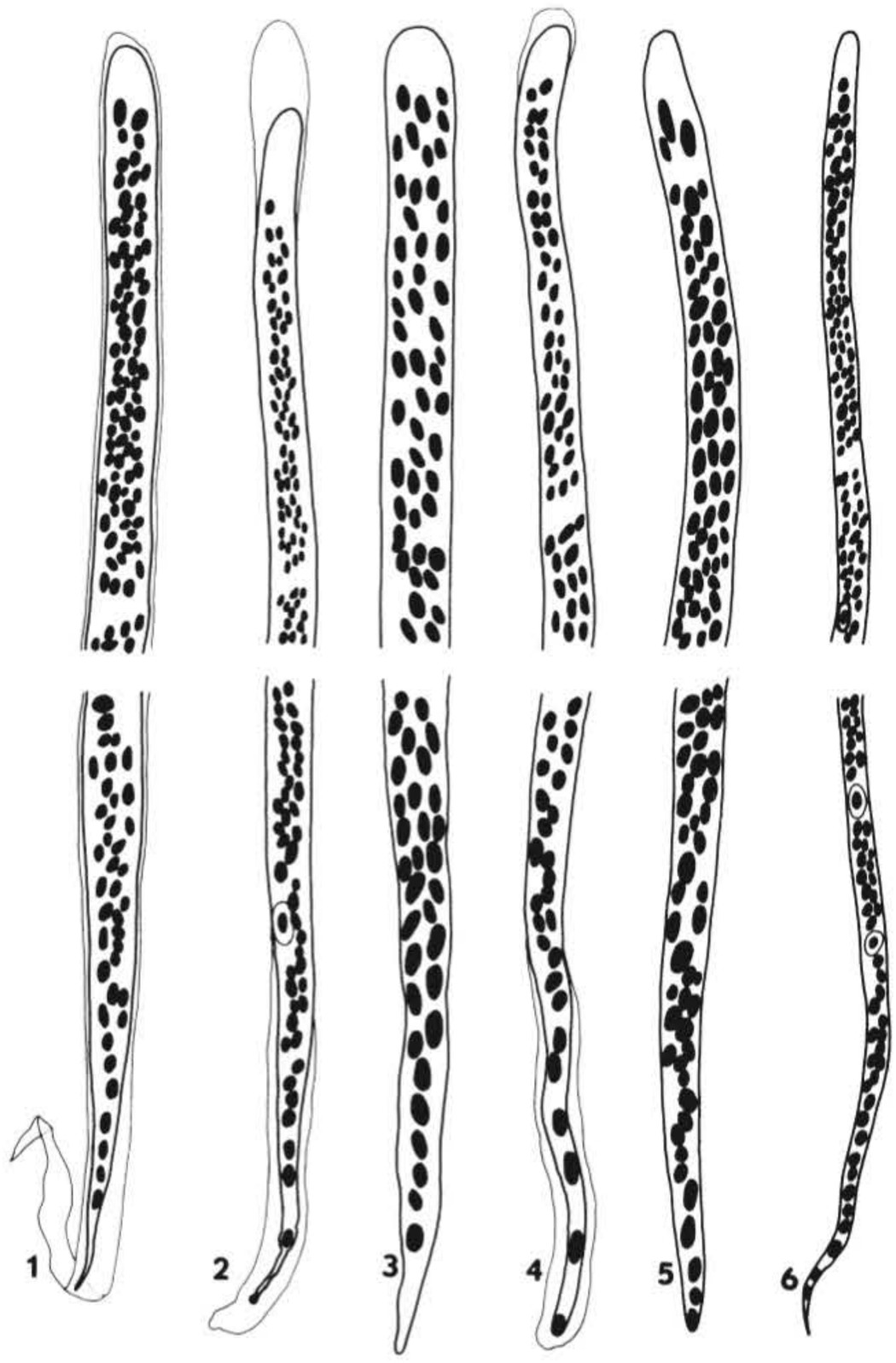


Figura 61.25 Extremidades anterior e posterior de microfilárias mais encontradas em humanos. *1, Wuchereria bancrofti. 2, Brugia malayi. 3, Onchocerca volvulus. 4, Loa loa. 5, Mansonella perstans. 6. Mansonella ozzardi.* Todos são desenhos de câmara lúcida.

Angiostrongylus cantonensis e *Angiostrongylus costaricensis*

A meningoencefalite eosinofílica humana, causada pelo *Angiostrongylus cantonensis*, ocorre em epidemias e esporadicamente em muitas áreas do Pacífico Sul, do sudeste asiático e de Taiwan. O parasita maduro é, em geral, encontrado em artérias pulmonares de ratos. As larvas migram até a traqueia e são eliminadas nas fezes. Elas desenvolvem-se até o estágio infectante em lesmas ou caracóis da terra e, quando consumidos pelo roedor hospedeiro usual, migram pelo encéfalo antes de amadurecerem nas artérias pulmonares. Humanos adquirem a infecção consumindo grandes caracóis comestíveis, camarões ou caranguejos crus ou não completamente cozidos, os quais podem servir como hospedeiros de transporte, ou vegetais contaminados com moluscos infectados. Em humanos, larvas do *A. cantonensis* migram para o sistema nervoso central, produzindo uma meningite em geral não fatal com uma alta eosinofilia no LCE (Alicata, 1991). O diagnóstico é estabelecido tanto pela clínica quanto pela anamnese, embora às vezes larvas tenham sido recuperadas do LCE (Kubersky, 1979; Strickland, 2000; Cook, 2002).

O *Angiostrongylus costaricencis* ocorre amplamente nas Américas Central e do Sul (Loria-Cortez, 1980). O parasita, responsável pela forma intestinal de angiostrongilíase, em geral reside nas artérias mesentéricas do íleo e do ceco de roedores. A infecção humana ocorre na mesma localização anatômica, mas com frequência produz inflamação granulomatosa e sintomas de abdômen agudo. O diagnóstico é estabelecido pelo exame histológico de peças cirúrgicas e a detecção de formas adultas ou de ovos no tecido (Strickland, 2000).

Trichinella spiralis

A triquinose humana ocorre em todo o mundo, embora a sua incidência nos Estados Unidos tenha apresentado uma diminuição constante, com menos de 100 casos relatados anualmente. Os humanos adquirem a infecção pela ingestão de carne de porco crua ou malcozida, produtos suínos ou, menos comumente, carne de urso contendo larvas infectantes. Vermes ingeridos amadurecem no intestino delgado, no qual fêmeas grávidas produzem novas larvas por 2 ou 3 semanas. Posteriormente, as larvas entram nos linfáticos e nas vênulas e atingem a circulação geral. Elas invadem primeiro a musculatura esquelética, na qual elas se desenvolvem mais e encapsulam. Durante as fases de migração e encapsulação, o indivíduo pode apresentar febre, dor muscular, dificuldade respiratória, edema periorbitário e eosinofilia, dependendo da dose inoculada. Após os parasitas encistarem, os sintomas são poucos. Larvas encistadas podem permanecer viáveis por vários anos, embora elas possam acabar calcificando.

O diagnóstico em geral é estabelecido baseando-se na anamnese e nos sintomas clínicos e é confirmado pela demonstração de cistos de *Trichinella* na biópsia de músculo esquelético, particularmente do gastrocnêmio ou do deltoide (Figs. 61.18E e F). Testes indiretos incluem a creatina fosfoquinase, a qual está com frequência elevada, e a detecção de anticorpos pela floculação de bentonita ou pelo imunoensaio enzimático. Desses últimos, a creatina fosfoquinase é mais específica e o imunoensaio enzimático é mais sensível (Wilson, 1995).

Larva Migrans

A larva migrans é causada pelo movimento errante prolongado de larvas de certas espécies de ancilostomídeos, ascarídeos e *Strongyloides*, os quais normalmente infectam animais selvagens e domésticos, por meio de tecidos corporais. A síndrome varia conforme a espécie envolvida, a quantidade de vermes e os tecidos parasitados.

A larva migrans cutânea é produzida por vermes do gato ou do cão do gênero *Ancylostoma* que se movimentam de forma errante na pele, os quais a penetram, mas não conseguem amadurecer segundo o padrão normal. Trilhas serpiginosas, eritematosas e pruriginosas são aparentes na pele em áreas que entraram em contato com o solo. Isso é particularmente problemático em climas úmidos mais quentes, em que ovos e larvas desses vermes sobrevivem por mais tempo. Algumas espécies de *Strongyloides* que parasitam animais selvagens podem causar uma dermatite similar (Beaver, 1984).

A larva migrans visceral é produzida pela movimentação aleatória da *Toxocara canis* (ascarídeo canino) e, em um menor grau, pela *Toxocara cati* do gato doméstico. Crianças geralmente são contaminadas após ingestão acidental ou intencional de terra contaminada por fezes de cão ou gato. Após a eclosão, as larvas são incapazes de completar seu ciclo usual e, em vez disso, começam uma migração prolongada pelos vários tecidos e órgãos. As crianças podem apresentar déficit de crescimento, febre, hepatomegalia, pneumonite, hipereosinofilia e hipergamaglobulinemia. Uma reação inflamatória na retina por causa da larva migrans ocular pode simular um retinoblastoma, um tumor maligno. O diagnóstico diferencial deve ser feito. O diagnóstico de larva migrans visceral é, em geral, estabelecido com base na clínica, pois o parasita nem sempre é recuperado. Testes sorológicos podem ser úteis na confirmação de um diagnóstico presuntivo e o procedimento atualmente recomendado é um imunoensaio enzimático que utiliza antígenos excretórios-secretórios do estágio larval (Wilson, 1995; Garcia, 2001).

Uma síndrome similar à larva migrans visceral também pode ser causada por espécies de *Gnathostoma*, que infectam o estômago de vários mamíferos. Infecções humanas são mais comuns no sudeste asiático, mas foram descritas no México e no Equador. Esses parasitas usam um copépode como primeiro hospedeiro intermediário e peixes e anfíbios como hospedeiros secundários. Vários répteis, pássaros e mamíferos podem servir como hospedeiros paratênicos (transportadores). As larvas podem migrar pelos tecidos subcutâneos, causando edemas transitórios, e para tecidos mais profundos, e podem acabar invadindo o SNC. A ocorrência de lesões migratórias e a história de consumo de peixe cru podem ajudar no estabelecimento de um diagnóstico clínico.

Capillaria hepatica

Embora seja normalmente um parasita comum de roedores, essa espécie às vezes causa doença humana, especialmente em crianças, nas quais ele pode simular a *larva migrans* visceral, a hepatite, o absces-

so hepático amebiano e outras doenças. No hospedeiro usual roedor, ovos são ingeridos e as larvas resultantes migram para o fígado, no qual elas amadurecem e depositam ovos diretamente no parênquima. Quando o fígado é consumido pelo predador, os ovos são eliminados nas fezes e contaminam o solo. As crianças apresentam um risco particular de ingerir os ovos no caso de comerem terra. Em áreas endêmicas, o diagnóstico é estabelecido pelo exame de biópsias hepáticas ou de tecido obtido na autópsia. Os ovos são imediatamente reconhecidos nos materiais de biópsia por apresentarem paredes estriadas espessas e tampões nas extremidades.

Anisakis, Pseudoterranova e *Eustrongylides* spp.

Embora o peixe cru seja considerado uma iguaria, sua ingestão fez aumentar o número de casos descritos de infecções por nematódeos de peixe. O *Anisakis* e o *Pseudoterranova* são parasitas gastrintestinais comuns de mamíferos marinhos e os estágios infectantes são encontrados em vários peixes de água salgada, salmão e lula que servem de hospedeiros intermediários. Pequenos crustáceos semelhantes ao camarão (*krill*) servem como primeiro hospedeiro intermediário. Quando ingeridas, essas larvas podem penetrar a parede do estômago ou do intestino delgado, causando dor abdominal aguda. A anisaquíase pode ser diagnosticada de modo presuntivo, baseando-se em uma anamnese adequada e em achados clínicos, e a condição pode ser confirmada pela recuperação de um verme intacto na endoscopia ou pela presença de um granuloma eosinofílico que contém um nematódeo identificável em uma peça cirúrgica. Parece que espécies de *Anisakis* são mais propensas a causarem doença invasiva, enquanto *Pseudoterranova* spp. tendem a ser expelidos intactos com a tosse ou vômito (Figs. 61.18G e H) (Sakanari, 1989). O nível larval das espécies de *Anisakis* é difícil de ser identificado (Binford, 1976).

Um pequeno número de infecções por *Eustrongyloides* spp. foi descrito em indivíduos que consumiram vairão cru ou sushi preparado em casa. Esses parasitas geralmente infectam aves que consomem peixe. No entanto, em humanos, as larvas vermelho brilhante invadem a cavidade abdominal e exigem sua remoção cirúrgica (Wittner, 1989).

Cestódeos

Várias espécies de cestódeos infectam os humanos em seus estágios larvais e podem produzir doenças graves. Os mais encontrados são prontamente diferenciados e apresentam padrões únicos de transmissão. Quando observados em cortes de tecido, os estágios larval e adulto dos cestódeos contêm corpúsculos laminados basófilos conhecidos como corpúsculos calcáreos, os quais são um auxílio importante para o seu reconhecimento.

Cisticercose

A infecção humana pelo estágio larval da tênia do porco, *T. solium*, é encontrada no mundo inteiro e ocorre após a ingestão não intencional de ovos de uma tênia adulta. A doença é prevalente no México e no resto da América Latina, da Europa, da África, da Índia e da Ásia. A maioria dos casos nos Estados Unidos é originária de áreas altamente endêmicas, embora, em anos recentes, a quantidade de casos adquiridos em âmbito local tenha aumentado (Richards, 1985; Carabin, 2005).

Ovos podem ser ingeridos por acidente com alimentos ou água contaminados e, posteriormente, eclodem no trato gastrintestinal. Embriões penetram na mucosa intestinal e disseminam-se pela corrente sanguínea para locais distantes, em especial a musculatura esquelética e também o coração, o cérebro ou os olhos, nos quais os sintomas de infecção e inflamação podem se tornar aparentes. Crises convulsivas são uma complicação comum em áreas endêmicas e são frequentemente o sintoma inicial (Fig. 61.26A).

O diagnóstico é, em geral, estabelecido por meio do quadro clínico em áreas endêmicas, mas pode ser muito mais difícil de ser feito em áreas não endêmicas. O uso da tomografia computadorizada é muito útil, mas normalmente essa técnica não está disponível na maioria das áreas endêmicas. Radiografias são úteis no reconhecimento da presença de cistos calcificados, mas não no reconhecimento de infecções recentes. A recuperação de um cisticerco intacto na cirurgia confirma o diagnóstico. O cisticerco é um saco oval, cheio de líquido, que contém um único escólex invertido, que mede 5 μm ou mais de diâmetro (Fig. 61.26B).

Entre os ensaios sorológicos, o ensaio de *immunoblot* para glicoproteína disponibilizado pelo CDC apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, superando vários imunoensaios enzimáticos com os quais ele foi comparado (Diaz, 1992). Infelizmente, esses ensaios não distinguem infecções ativas de infecções inativas e, por consequência, não são úteis na monitoração da resposta terapêutica.

No caso de cisticercose em alguém de uma área não endêmica e sem uma história de viagem adequada, deve-se investigar a exposição acidental a indivíduos envolvidos na preparação de alimentos ou a possibilidade de infecção por uma espécie diferente de *Taenia* (Schantz, 1992).

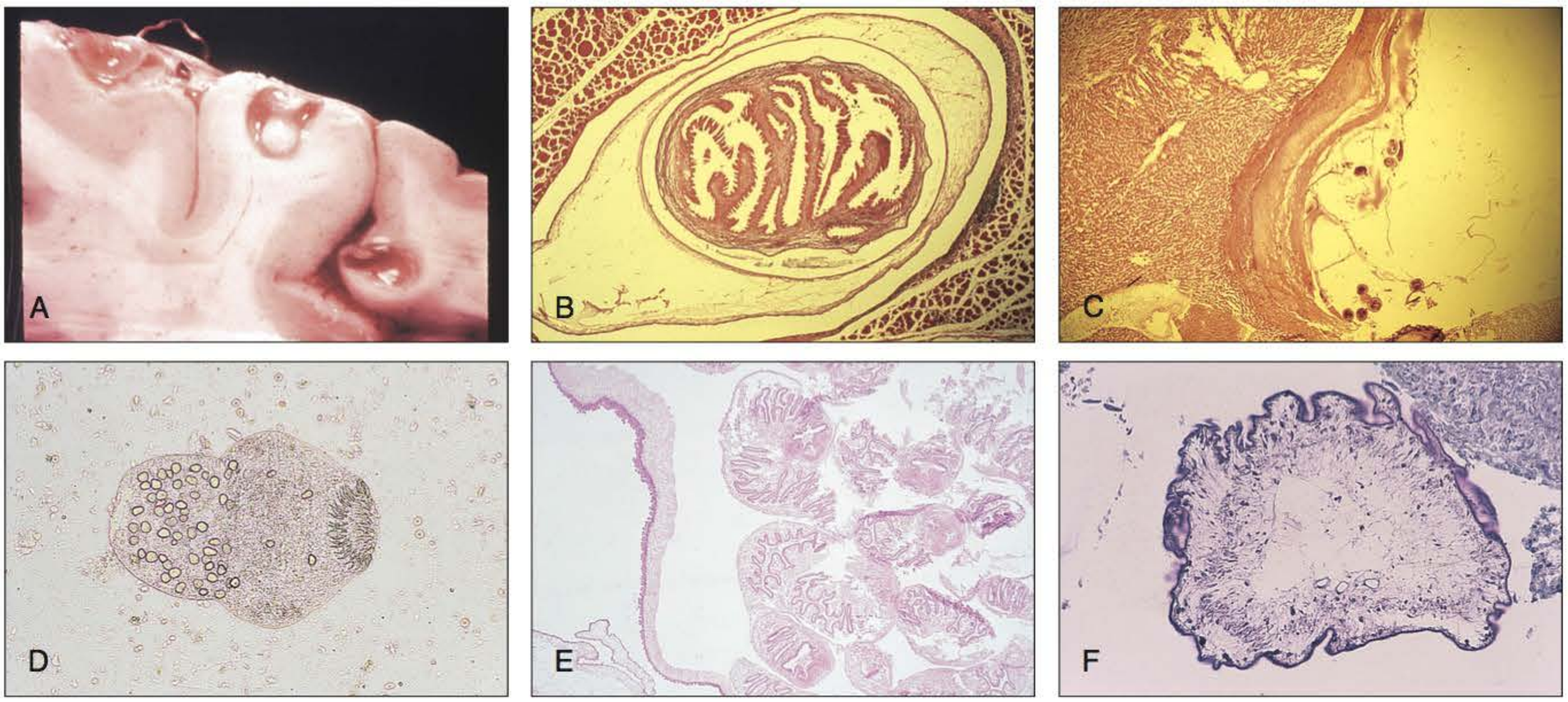


Figura 61.26 *A*, Neurocisticercose. (Fotografia de *A Pictorial Presentation of Parasites: a Cooperative Collection* preparado e/ou editado por H. Zaiman.) *B*, Cisticerco de *Taenia solium* no músculo (hematoxilina-eosina; × 10). *C*, Cisto hidático no fígado; observe a presença de protoescólex, uma membrana germinal fina, uma membrana laminada espessa e a reação fibrótica do hospedeiro (× 10). *D*, Protoescólex encontrado no líquido aspirado de um cisto hidático hepático; observe os ganchos do rostelo e os corpúsculos calcários (× 400). *E*, infecção humana com uma larva cenuro; observe a fina membrana vesical e os numerosos protoescóleces em desenvolvimento (× 10). (Cortesia do Dr. Heike Duebner.) *F*, Larva de *Spirometra* spp. encontrada em uma lesão retro-orbitária (coloração de Giemsa; × 100).

Hidatidose

A infecção humana por estágios larvais de tênia do gênero *Echinococcus* pode assumir uma das três formas a seguir: doença hidática unilocular causada pelo *Echinococcus granulosus*, doença hidática multilocular ou alveolar causada pelo *Echinococcus multilocularis* e doença hidática policística causada pelo *Echinococcus vogeli* (Thompson, 1995). Canídeos são hospedeiros definitivos dessas tênias minúsculas. O que lhes falta em tamanho é compensado em quantidade, com centenas ou milhares de vermes produzindo uma grande quantidade de ovos em um hospedeiro. Os ovos são eliminados nas fezes e ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os quais incluem ovelhas, gado, porcos, roedores e outros animais herbívoros. Os humanos, especialmente as crianças, são infectados após a ingestão acidental de ovos do meio ambiente.

Os ovos eclodem no intestino e os embriões penetram a parede intestinal e, em seguida, entram na corrente sanguínea. Embora a maioria das hidátides se desenvolva no fígado, algumas se disseminam para outros locais. O desenvolvimento dos cistos é lento e podem ser necessários muitos anos para que um cisto de 10 a 15 cm de diâmetro seja formado. Nos hospedeiros secundários usuais, os cistos contêm numerosos protoescólex, os quais proliferam de uma membrana germinativa.

O *E. granulosus*, a espécie mais importante que produz doença humana, é comum em muitas áreas de criação de ovinos e bovinos no mundo, incluindo os Estados Unidos, onde cães são os hospedeiros definitivos usuais. A hidátida unilocular desenvolve-se como cisto único no fígado e secundariamente nos pulmões ou em outras localizações. Os cistos são cheios de líquido transparente e contêm cápsulas prolígeras e numerosos protoescólex, os quais podem estar presentes aos milhares (Figs. 61.26C e D). Nos humanos, os sintomas são os de uma lesão expansiva de crescimento lento, embora infecções do SNC se tornem aparentes mais cedo em outros locais. O diagnóstico é sugerido baseado na apresentação clínica e na anamnese, além do uso de radiografia, tomografia computadorizada e ultrassonografia. Testes sorológicos são muito úteis na confirmação de um diagnóstico e geralmente envolvem um teste de investigação (imunoensaio enzimático ou hemaglutinação indireta) seguido, quando positivo, por um ensaio confirmatório, como *immunoblot* ou difusão em gel (Wilson, 1995). A sensibilidade varia de 60 a 90%, dependendo das características do caso. Reações falso-positivas podem ocorrer na cisticercose, embora a apresentação da doença deva impedir a confusão. A aspiração do conteúdo do cisto é potencialmente perigosa porque o derrame do conteúdo pode acarretar a disseminação da doença ou o choque anafilático. No entanto, se for realizada uma aspiração, o conteúdo do cisto, em geral, revela areia hidática, uma mistura de protoescólex, cápsulas prolígeras desintegradas, pequenos ganchos e corpúsculos calcáreos.

O *E. multilocularis* produz doença hidática multilocular ou alveolar no norte da Europa e da Rússia, e no Alasca, no Canadá e nos estados do terço norte dos Estados Unidos. Hospedeiros intermediários incluem vários gêneros de pequenos roedores; raposas, lobos e cães são hospedeiros definitivos. A infecção humana ocorre no fígado, no qual a hidátide desenvolve como um cisto invasivo que se insinua no tecido em um padrão alveolar. Embora a membrana germinativa prolifere no fígado humano, os protoescólex não conseguem se desenvolver. O quadro patológico lembra o carcinoma hepático. Ensaios sorológicos que utilizam antígenos do *E. granulosus* são úteis no diagnóstico dessa doença. O uso diferencial de antígenos de ambos os parasitas é promissor no que diz respeito à discriminação entre as duas doenças (Wilson, 1995).

O *E. vogeli* produz um cisto hidático policístico em humanos. Ele é invasivo, mas, ao contrário do *E. multilocularis*, produz cápsulas polígênicas e protoescólex. A doença é limitada à América Latina, na qual os roedores, especialmente a paca, e os cães-vinagre (*bush dogs*) completam o ciclo de vida (D'Alessandro, 1979). Na América do Sul, a doença hidática policística também pode ser causada pelo *Echinococcus oligarthus*, um parasita de felinos e roedores. Essa espécie é morfologicamente semelhante ao *E. vogeli* e casos foram identificados de modo errôneo no passado (D'Alessandro, 1995).

Esparganose

A esparganose é causada por cestódeos larvais do gênero *Spirometra*, os quais estão intimamente relacionados ao *Diphyllobothrium* spp. Formas adultas em geral parasitam cães e gatos e seus parentes na Ásia (*Spirometra mansoni*) e na América do Norte (*Spirometra mansonoides*). Os ciclos de vida são similares aos do *Diphyllobothrium*: copépodes servem de primeiro hospedeiro intermediário para as larvas procercoides e peixes servem como segundo hospedeiro intermediária para larvas plerocercoides. Humanos tornam-se infectados por essas formas larvais (espargano) por meio da ingestão de copépodes ao consumirem água ou ingerirem peixe cru ou incompletamente cozido. O uso de sapos e cobras como "cataplasmas" também pode resultar na transferência de larvas para o hospedeiro humano. A esparganose geralmente se manifesta como um edema subcutâneo localizado ou migratório associado a um eritema e dor. Infecções encefálicas podem ocorrer. A exploração pode revelar um verme delicado, fino, de cor marfim com um comprimento de poucos a vários centímetros. Cortes transversos demonstram um tegumento espesso com pregas profundas e parênquima com feixes musculares proeminentes. Não há cavidade corporal observável, como nos nematódeos, e os corpúsculos calcáreos são numerosos (Fig. 61.26F) (Orihel, 1995; Gutierrez, 2000).

Cenurose

Tênias intestinais de gatos e cães (principalmente *Taenia multiceps* e *Taenia serialis*) produzem um estágio larval conhecido como cenuro em hospedeiros intermediários. Esse estágio consiste em um grande saco transparente (até 10 cm) contendo numerosos escólex originários de uma membrana germinativa que invaginam para o interior do cisto cheio de líquido (Fig. 61.26E). Os hospedeiros intermediários usuais da *T. multiceps* são os ovinos; os da *T. serialis* são roedores, lebres e coelhos, embora humanos se prestem a esse papel pela ingestão acidental de ovos originários de gatos e cães domésticos. Como os cisticercos, os cenuros podem se desenvolver em qualquer órgão, produzindo uma doença similar. O diagnóstico geralmente é estabelecido pelo exame de cistos excisados ou pela sua demonstração em cortes de tecido. A presença de múltiplos escólex invaginados em um único cisto diferencia o cenuro de outros cestódeos larvais.

Trematódeos

Todos os trematódeos que habitam o fígado, os pulmões e o sangue e que amadurecem no ser humano produzem ovos que, em geral, são eliminados nas fezes, na urina ou no escarro. Por causa de sua localização extraintestinal, essas fascíolas e seus ovos podem ser encontrados em tecidos incidentalmente ou associados a sintomas.

Formas adultas de *F. hepatica, C. sinensis* e *O. viverrini* podem ser encontradas nos tecidos hepáticos e biliares e, às vezes, em localizações ectópicas. A presença de ovos típicos livres nos tecidos ou no interior do útero do helminto com frequência permite uma identificação definitiva. A forma adulta do *Paragonimus* spp. habita principalmente os pulmões, mas pode ser encontrada em locais ectópicos como o encéfalo e o tecido subcutâneo, nos quais ela produz abscessos, com frequência associados a um grande número de ovos. Esquistossomas adultos habitam os vasos sanguíneos, principalmente na distribuição da veia mesentérica inferior (*S. mansoni*), da veia mesentérica superior (*S. japonicum* e *S. mekongi*) e do plexo vesical (*S. haematobium*). Embora as formas adultas nem sempre sejam encontradas em cortes de tecido, ovos podem ser observados em grande quantidade nos tecidos do intestino, do fígado e da bexiga (Figs. 61.23B, D e F). Os ovos também podem se disseminar pela corrente sanguínea para outros locais, incluindo o cérebro, a medula espinal, os pulmões, o coração, os rins e o baço. Os ovos do *S. japonicum* apresentam uma propensão particular a disseminar por causa do seu menor tamanho e da grande quantidade geralmente produzida. A identificação dos ovos depende do reconhecimento de seus tamanhos e suas características morfológicas típicas em tecidos adequados.

Artrópodes importantes do ponto de vista clínico

Os artrópodes representam um grande e diverso grupo de organismos, sendo que alguns poucos têm importância clínica ou econômica. No entanto, aqueles que são importantes são causas significativas de morbidade e mortalidade em humanos e seus animais domésticos, e são responsáveis por graves perdas econômicas para a agricultura. Embora eles talvez sejam mais bem conhecidos entre os clínicos por sua capacidade de transmitir vários agentes infecciosos, incluindo

vírus, bactérias (riquétsia, espiroquetas etc.), protozoários e certos helmintos, os artrópodes também causam doença grave por invasão tissular direta, envenenamento, vesicação, perda sanguínea e reações alérgicas. O medo exagerado de artrópodes (entomofobia) e as ilusões de infestação (parasitose ilusória) não são neuroses incomuns, as quais podem ser incapacitantes para alguns indivíduos. Espécies direta ou indiretamente responsáveis por doenças humanas incluem representantes de todas as classes principais de artrópodes (Tab. 61.12).

Nesta seção, é apresentada uma abordagem que o laboratório clínico pode utilizar ao avaliar amostras clínicas contendo artrópodes, seguida por uma breve análise de cada um dos grupos de artrópodes que apresentam importância médica. Vários textos e guias gerais e especializados estão disponíveis e oferecem uma cobertura mais completa da área da entomologia médica (Beaver, 1984; Garcia, 2001; Goddard, 2002; Lane, 1993; Mullen, 2002; National Communicable Disease Center, 1969; Strickland, 2000).

Características biológicas

Artrópodes são caracterizados por um corpo segmentado e simétrico bilateralmente, vários pares de apêndices articulados e um exoesqueleto rígido de quitina que é trocado repetidas vezes durante o crescimento. O desenvolvimento vai do ovo à forma adulta por meio de uma metamorfose gradual (ovo, ninfa e forma adulta) ou completa (ovo, larva, pupa e forma adulta). Percevejos, barbeiros, piolhos e baratas são exemplos de insetos que sofrem metamorfose gradual. Moscas, mosquitos, pulgas, formigas, abelhas, vespas e besouros sofrem metamorfose completa: seres larvais vermiformes entram em fase pupal para tornarem-se adultos. Aracnídeos sofrem alterações desenvolvimentais mais semelhantes ao processo de metamorfose gradual. Os estágios larvais dos artrópodes que sofrem metamorfose completa frequentemente são mais difíceis de serem identificados pelos técnicos de laboratório e as amostras devem ser encaminhadas para um especialista.

Mecanismos de lesão

Invasão tissular direta

A invasão de tecidos superficiais (denominada infestação) pode ocorrer por uma variedade de artrópodes, dos quais a escabiose, o bicho-do-pé e algumas larvas de dípteros são os mais comuns, A invasão de tecidos mais profundos e cavidades do corpo (denominada infecção) ocorre principalmente por larvas de dípteros e, às vezes, por larvas de pentastomídeos. A invasão tissular por larvas de dípteros é denominada miíase e pode ocorre em tecidos vivos ou desvitalizados, dependendo da espécie envolvida.

Envenenamento

Muitos artrópodes são capazes de injetar saliva ou veneno com suas presas ou ferrões. Para a maioria dos indivíduos, esses compostos causam apenas uma reação tissular local. Contudo, podem ocorrer reações potencialmente letais como a anafilaxia, com frequência em decorrência de uma sensibilização prévia a uma determinada toxina. Picadas de himenópteros (formigas, abelhas e vespas) e de escorpiões estão entre os principais ofensores (Reisman, 1994). As picadas ou as mordidas de certos artrópodes, especialmente centípedes, mosquitos, mosquito pólvora, moscas, percevejos, barbeiros, *assasin bugs*, piolhos, pulgas, carrapatos e ácaros, também podem ser tóxicas, causando reações locais ou sistêmicas. Quase todas as aranhas são venenosas, mas apenas poucos grupos (viúva negra, violinista e certas tarântulas) apresentam riscos de saúde significativos para os humanos. Uma causa menos comum, porém reconhecida, de envenenamento é a exposição de pelos urticantes de certas lagartas e larvas de besouros.

Vesicação

Algumas das maiores centopeias tropicais são capazes de liberar uma substância química vesicante (que provoca a formação de vesículas) de glândulas localizadas em cada segmento do corpo. Esses compostos são particularmente irritantes quando atingem a conjuntiva. Besouros vesicantes são assim denominados por sua capacidade de expelir líquidos vesicantes (cantaridina, o ingrediente ativo do afrodisíaco *Spanish fly*) do seu corpo quando manipulados.

Tabela 61.12 Classificação dos artrópodes de importância médica

Classe *Insecta* (insetos)
Ordem *Anoplura* (piolhos)
Ordem *Siphonaptera* (pulgas)
Ordem *Dictyoptera* (baratas)
Ordem *Hemiptera* (percevejos, barbeiros)
Ordem *Hymenoptera* (formigas, vespas, abelhas)
Ordem *Coleoptera* (besouros)
Ordem *Lepidoptera* (mariposas, borboletas, lagartas)
Ordem *Diptera* (moscas, mosquitos)
Classe *Arachnida* (aracnídeos)
Subclasse *Scorpiones* (escorpiões)
Subclasse *Araneae* (aranhas)
Subclasse *Acari* (carrapatos, ácaros, bicho-do-pé)
Classe *Diplopoda* (milípedes)
Classe *Chilopoda* (centopeias)
Classe *Crustacea* (crustáceos)
Ordem *Copepoda* (copépodes)
Ordem *Decapoda* (caranguejos, camarão de água doce)
Classe *Pentastomida* (vermes em forma de língua)

Perda sanguínea

Artrópodes responsáveis por produzir irritação ou perda sanguínea importante em humanos e animais domésticos incluem percevejos, barbeiros, piolhos, pulgas, moscas, mosquitos, mosquito pólvora, carrapatos e ácaros. Embora essas atividades sejam às vezes potencialmente letais, a transmissão concomitante de agentes infecciosos pode ser.

Transmissão de agentes infecciosos

Muitos artrópodes têm um papel na transmissão mecânica ou biológica de agentes infecciosos. A mosca comum, *Musca domestica*, pode ser responsável pela transmissão mecânica de agentes da disenteria bacilar, da cólera, do tifo, da diarreia viral, da disenteria amebiana, da giardíase, da oxiuríase e da teníase. Os mecanismos envolvidos na transmissão biológica de agentes infecciosos variam da amplificação única do organismo no vetor artrópode às alterações mais complexas do ciclo de vida do parasita envolvido. Carrapatos e ácaros estão envolvidos na transmissão de certas bactérias (*Rickettsia, Ehrlichia,* espiroquetas, entre outras), protozoários (*Babesia*) e vírus. Entre os insetos, os piolhos estão envolvidos na transmissão de bactérias (*Rickettsia*, *Bartonella* e *Borrelia*); os barbeiros transmitem tripanossomas; as pulgas transmitem os agentes da peste, do tifo e da tênia canina; e os dípteros transmitem arbovírus, parasitas maláricos, tripanossomas, leishmanias, filárias e bactérias.

Reações de hipersensibilidade

A maioria das reações graves a mordidas e picadas de artrópodes resulta de hipersensibilidades alérgicas. Picadas de himenópteros sozinhas são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas a artrópodos e usualmente são decorrentes da hipersensibilidade após a exposição repetida ao veneno (Reisman, 1994). Alergias também podem ser exacerbadas após a exposição à saliva, ao excremento e às partes corporais de ácaros, carrapatos, piolhos, percevejos, lagartas, mariposas e borboletas. A asma e a rinite alérgica também podem ocorrer em resposta à presença de uma grande variedade de ácaros animais, domésticos e da poeira no meio ambiente (Frazier, 1980).

Manifestações psicológicas

A entomofobia refere-se a um medo irracional ou excessivo de ver ou tocar artrópodes. Embora esse medo às vezes possa resultar no comprometimento das atividades normais de um indivíduo, ele raramente se torna incapacitante. A parasitose ilusória é um distúrbio emocional mais grave no qual o indivíduo está convencido de que está infectado por parasitas ou artrópodes, apesar das evidências objetivas contrárias. Na medida em que a ilusão evolui, o indivíduo

pode relatar perda de emprego, divórcio, uso repetido de serviços de dedetização e mudanças de uma casa a outra. Visitas a profissionais da saúde geralmente são numerosas, embora insatisfatórias. O problema pode se originar na casa ou no ambiente de trabalho e ser transferível de um a outro. A ilusão pode ser tão convincente que outros membros da família e amigos podem acreditar nela ou adquiri-la. O paciente pode encaminhar ao laboratório numerosas amostras, como pele, tecido, gaze, cabelo e muco. Cabe ao pessoal do laboratório examinar esses materiais para descartar uma infestação verdadeira. O início misterioso de irritação e prurido pode ocorrer por causa de picadas de ácaros, piolhos, pulgas ou percevejos não reconhecidos ou de insetos e ácaros em busca de um ninho abandonado de roedores ou aves em uma área de habitação humana. Antes de descartar essas causas, eles devem ser pesquisados e sua presença deve ser descartada (Lynch, 1993; Murray, 2004).

Abordagens laboratoriais para identificação de artrópodes

Amostras de artrópodes são frequentemente enviadas para o laboratório clínico por médicos e pacientes na esperança de que eles possam ser identificados com acurácia. Contudo, poucos laboratoristas recebem mais do que uma exposição breve de entomologia durante o treinamento. De qualquer maneira, os laboratoristas devem ter acesso a textos e chaves dicotômicas que devem permitir uma identificação limitada dos grupos clinicamente importantes mais encontrados, em especial ectoparasitas (pulgas, piolhos, ácaros e carrapatos). Mais importante é a capacidade das equipes laboratoriais de reconhecer as situações raras para as quais um parecer técnico externo deve ser aventado. Isso está relacionado especificamente às ocasiões em que decisões clínicas importantes relativas à terapia e ao prognóstico estiverem sendo feitas. Laboratórios do serviço público (municipal ou estadual) com frequência possuem pessoal capacitado ou conhecem indivíduos treinados em entomologia médica em instituições educacionais regionais, museus ou outros serviços públicos ou privados, incluindo o CDC.

Amostras enviadas ao laboratório são frequentemente de organismos intactos, raspados de pele, tecidos, escarro, urina ou fezes. Objetos inanimados, incluindo alimentos, água, vestimentas, roupas de cama e tapetes, entre outros, também podem ser enviados. Não é incomum que pacientes enviem artrópodes recuperados do vaso sanitário após a micção ou a defecação. Na maioria dos casos, a presença desses organismos é uma coincidência e não está relacionada à infecção.

Matar e preservar artrópodes de modo adequado é importante para preservar as características necessárias para a identificação. Artrópodes não alados, pequenos, em especial ectoparasitas (piolhos, pulgas, carrapatos e ácaros), formas larvais (lagartas de vários insetos), aranhas e escorpiões devem ser colocados diretamente em álcool etílico a 70 ou 80%. A melhor maneira de matar formas larvais grandes é a imersão em água quente (não fervente) para estender seus corpos e prevenir a contração antes da imersão em álcool. Tecidos grudados ou outros resíduos devem ser delicadamente removidos ou eliminados com água antes da preservação. As formas menores (ácaros, pequenos carrapatos, pulgas e moscas) podem ser preparadas com lâminas permanentes.

Os insetos alados, especialmente mosquitos e moscas adultos, devem ser mortos pela exposição à emanação de etil acetato ou clorofórmio e preservados secos para reterem as informações taxonômicas contidas no corpo e nas escamas das asas. Esses artrópodes em geral são presos com um alfinete e secos. Em seguida, são armazenados em caixas herméticas protegidas com naftaleno ou diclorobenzeno. Mais detalhes sobre a coleta, a preservação e a preparação de artrópodes para exame são encontrados em outros textos (Beaver, 1984; Steyskal, 1993; Lane, 1993; Garcia, 2001).

Insetos

Os insetos representam mais de 90% das espécies artrópodes descritas, embora poucos sejam responsáveis por doenças humanas. Membros dessa classe são diferenciados dos outros artrópodes por possuírem um corpo dividido em três partes (cabeça, tórax e abdômen); um par de antenas; três pares de pernas; e um, dois ou nenhum par de asas. Essa é a única classe de artrópodes com capacidade de voar.

Piolhos sugadores

Piolhos sugadores são insetos não alados, achatados no sentido dorsoventral, que possuem presas características nas extremidades de cada perna que permitem a sua fixação em pelos do corpo ou em vestimentas (Figs. 61.27A e B). Todas as espécies sugam sangue intermitentemente e podem causar dermatite inexplicada. Ovos, conhecidos como lêndeas, são depositados nos pelos ou nas vestimentas, dependendo da espécie. Embora nomeados por seu local de fixação primária, eles nem sempre permanecem confinados àquele local. O piolho da cabeça, *Pediculus capitis*, e o piolho do corpo, *Pediculus humanus*, são indistinguíveis para o não especialista. Eles são mais longos do que largos e atingem um comprimento de até 3 mm. As diferenças biológicas são aparentes. Somente o *P. humanus* transmite os causadores do tifo epidêmico, da febre da trincheira e da febre recorrente (Kim, 1986). Infestações por ambas as espécies ocorrem entre pessoas que vivem em condições de aglomeração e que têm poucas oportunidades para se banhar e lavar roupas. Crianças em idade escolar apresentam um risco particular de adquirir piolho da cabeça por meio do compartilhamento de bonés, vestimentas e pentes (Orkin, 1985). Lêndeas do piolho da cabeça são depositadas principalmente nas hastes dos pelos e as do piolho do corpo são depositadas nas vestimentas. Como fragmentos de pelo, caspa, laquê e infecções fúngicas podem ser confundidos com lêndeas, a diferenciação é importante. Tipicamente, as lêndeas possuem 1 mm de comprimento e, quando não fixadas, apresentam opérculos intactos (Fig. 61.27C). A transmissão ocorre pelo compartilhamento de vestimentas e roupas de cama infectadas, pois o piolho do corpo tende a depositar os seus ovos em grupos, em especial ao longo de costuras ou cós. O piolho pubiano, *Phtirus pubis*, é diferente dos outros. Ele é mais redondo (medindo até 2 mm de diâmetro), com um abdômen semelhante ao do caranguejo e o primeiro par de pernas significativamente menor e mais fino que os outros pares (Fig. 61.27B). O piolho pubiano e as suas lêndeas são encontrados nos pelos púbicos, mas podem se estender para os pelos do tronco, das axilas e da face. A transmissão ocorre principalmente durante a relação sexual.

Pulgas

Pulgas são ectoparasitas pequenos (entre 1 e 2 mm), comprimidos lateralmente, não alados, capazes de sugarem sangue (Fig. 61.27D). Suas pernas musculosas e longas são adaptadas para saltarem longas distâncias. Todas as pulgas que atacam humanos são parasitas de outros mamíferos ou aves domésticas, e incluem as que sugam sangue (muitas espécies) e as que penetram em tecidos (bicho-do-pé). Infestações ocorrem pela exposição a animais domésticos. Em sua maioria as espécies pestilentas são a pulga do cão (*Ctenocephalides canis*), a do gato *(Ctenocephalides felis*) e a humana (*Pulex irritans*). Alguns indivíduos tornam-se altamente sensibilizados pelas picadas de pulga, enquanto outros não são afetados. Pulgas do cão e do gato também são hospedeiros intermediários usuais do *Diphyllobothrium caninum* e, com menos frequência, da *H. diminuta* e da *H. nana.* Como as larvas dessas espécies em geral se desenvolvem na cama de um animal ou em tapetes ou móveis, a erradicação pode exigir a fumigação e a limpeza desses objetos. A pulga do rato oriental, *Xenopsylla cheopis*, é uma espécie muito importante porque ela transmite o bacilo da peste e o agente do tifo murino. Embora normalmente parasite várias espécies de rato, essa pulga logo ataca os humanos quando o hospedeiro roedor morre. A *Tunga penetrans* (bicho de pé) que invade tecidos é encontrada nas Américas Central e do Sul e em regiões da África tropical. A fêmea fixa-se e se incrusta na pele, em especial entre os pododáctilos e sob as unhas dos dedos dos pés, onde ela cresce e atinge o tamanho de uma pequena ervilha. Após os ovos serem depositados, a pulga morre, causando uma resposta inflamatória e, possivelmente, uma infecção bacteriana secundária. A tungíase é diagnosticada pela identificação da porção escura do abdômen da pulga (apresentando espiráculos), protruindo da superfície cutânea de uma lesão ampliada (Beaver, 1984; Lane, 1993; Goddard, 2002).

Baratas

As baratas adaptaram-se ao *hábitat* humano, compartilhando nossa alimentação, nosso abrigo e nosso calor. Embora elas sejam primariamente pragas incômodas, as baratas são portadoras potenciais de patógenos fecais em virtude de sua capacidade de se mover de modo

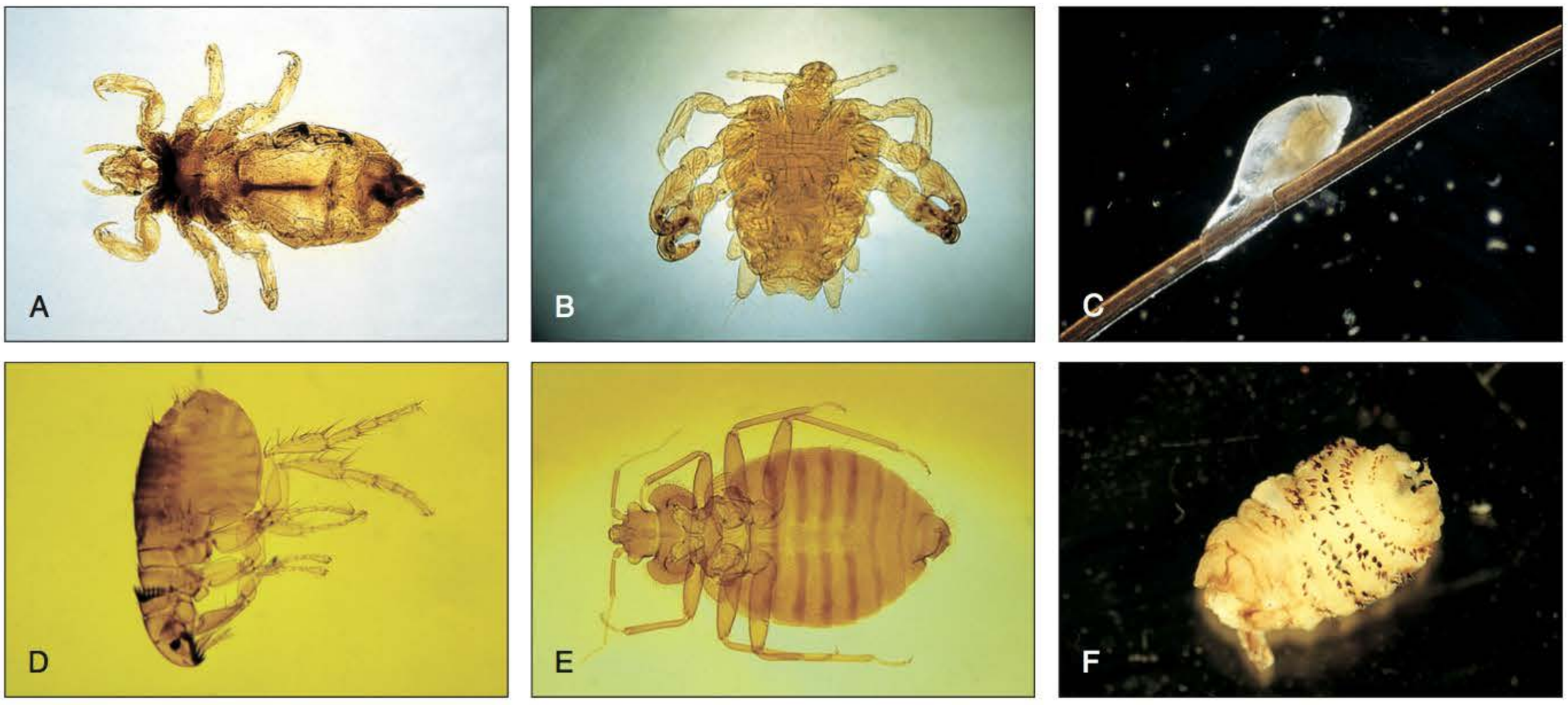


Figura 61.27 Insetos importantes do ponto de vista médico. *A*, *Pediculus capitis*, o piolho. *B*, *Phthirus pubis*, o "chato". *C*, Ovo vazio de *P. capitis*. *D*, *Ctenocephalides canis*, a pulga comum do cão; observe as patas posteriores potentes. *E*, *Cimex lectularius*, o percevejo comum. *F*, Larva de *Dermatobia hominis*, a berne humana; observe os dois ganchos esclerosados na extremidade anterior e as numerosas espinhas corporais (× 10). (*A*, *B* e *E* com permissão da ASM Press.)

rápido dos esgotos para as áreas de preparação de alimentos. Além de transmitirem bactérias patogênicas, elas também podem disseminar vírus da hepatite e da poliomielite; protozoários, incluindo a *E. histolytica*; e várias espécies de nematódeos entéricos. Alguns indivíduos podem desenvolver alergias e asma após a exposição a excrementos, resíduos de pele ou partes do corpo das baratas (Goddard, 2002).

Percevejos e barbeiros

Percevejos (família *Cimicidae*) e barbeiros (família *Reduviidae*) são insetos sugadores de sangue que apresentam uma probóscide longa e estreita que é dobrada sob o corpo quando não utilizada. Percevejos (*Cimex lectularius* e *Cimex hemipterus*) são insetos de cor marrom avermelhada, achatados no sentido dorsoventral, não alados, que medem cerca de 5 mm de comprimento (Fig. 61.27E). Eles apresentam uma distribuição cosmopolita e atacam a maioria dos mamíferos, alimentando-se principalmente à noite. Durante o dia, eles escondem-se sob colchões, papéis de parede soltos e assoalhos. Embora sejam considerados como não transmissores de doenças, as picadas de percevejos podem causar vesículas ou bolhas dolorosas, dependendo da sensibilidade do indivíduo à sua saliva.

Os barbeiros (*Triatoma, Rhodnius* e *Panstrongylus*) apresentam uma cabeça coniforme sobre um pescoço estreito e um abdômen alargado no meio. Esses insetos são pretos ou marrons e alguns apresentam marcas laranjas e pretas no abdômen. Eles medem, em média, entre 1 e 3 cm de comprimento e, ao contrário dos percevejos, apresentam asas bem desenvolvidas para o vôo. Como os percevejos, os barbeiros alimentam-se de modo relativamente indolor nos vertebrados e produzem reações cutâneas similares. No México e nas Américas Central e do Sul, eles transmitem o agente da doença de Chagas, *T. cruzi*, nas fezes, as quais são secundariamente inoculadas na pele pelo hospedeiro humano durante o ato de se coçar (Goddard, 2002; Lane, 1993).

Abelhas, vespas e formigas

Himenópteros são insetos sociais que defendem prontamente seus ninhos quando perturbados. Nas fêmeas não reprodutoras, o ovipositor é transformado em um ferrão capaz de injetar veneno para ser utilizado na captura de presas ou para a defensa. O veneno de abelhas, vespas, vespões e jaquetas amarelas causa apenas edema e desconforto transitórios na maioria dos indivíduos, mas pode ser responsável por reações sistêmicas, incluindo anafilaxia, em outros que foram previamente sensibilizados (Reisman, 1994). Todos os anos, nos Estados Unidos, até 100 pessoas morrem por causa da picada de himenópteros. Atualmente, a abelha africanizada está presente na América do Norte após a sua introdução no Brasil em 1956. Essas abelhas, que são provocadas de forma mais fácil que as outras abelhas melíferas, apresentam um comportamento de ataque maciço. Muitas espécies de formigas são problemáticas para os humanos por causa da sua capacidade de morder e alguns grupos, como as formigas colhedeiras e de fogo, são capazes de ferroadas dolorosas.

Besouros

Embora os besouros talvez sejam mais bem conhecidos como pragas agrícolas, algumas espécies podem causar mordidas dolorosas e outras, especialmente besouros vesicantes, podem liberar líquidos vesicantes (cantaridina) que causam dermatite ou formam vesículas. As larvas de determinados besouros de despensa apresentam pelos urticantes que podem ser responsáveis por dermatite ou, quando ingeridas, irritação do trato gastrintestinal. As formas larvais e adultas de besouros de despensa ou de grãos também podem servir como hospedeiros intermediários para as tênias de roedores e humanas *H. diminuta* e *H. nana*.

Mariposas e borboletas

Certas larvas (lagartas) de lepidópteros possuem pelos urticantes ou espinhas capazes de injetar veneno quando manipuladas. Embora a maior parte dos efeitos dessas toxinas permaneça sendo restrita à pele, foram descritos efeitos sistêmicos, incluindo choque e paralisia (Goddard, 2002). É sabido que as formas adultas das mariposas de tufo e cigana possuem escamas e pelos urticantes que podem causar dermatite, irritação ocular ou irritação do trato respiratório, especialmente entre indivíduos que trabalham na silvicultura (Shama, 1982).

Moscas e mosquitos

Os dípteros são caracterizados pela presença de um único par de asas membranosas. Entre os artrópodes, eles são responsáveis pelo maior compartilhamento de doenças humanas pelo ato de sugar sangue, pela transmissão biológica ou mecânica de agentes infecciosos e pela invasão tissular direta por formas larvais (miíase). Picadas de várias moscas e mosquitos frequentemente causam irritação local em virtude da sensibilidade à saliva e, em alguns indivíduos, causam reações sistêmicas. Além do ato de sugar sangue, os ataques repetidos em si podem ser nocivos tanto do ponto de vista físico quanto psicológico. Algumas espécies sugadoras de sangue também são responsáveis pela transmissão de patógenos humanos importantes, incluindo os agentes da malária, da filaríase e das doenças arbovirais por mosquitos; a oncocerquíase pela mosca negra; a loíase pela mosca do veado; a

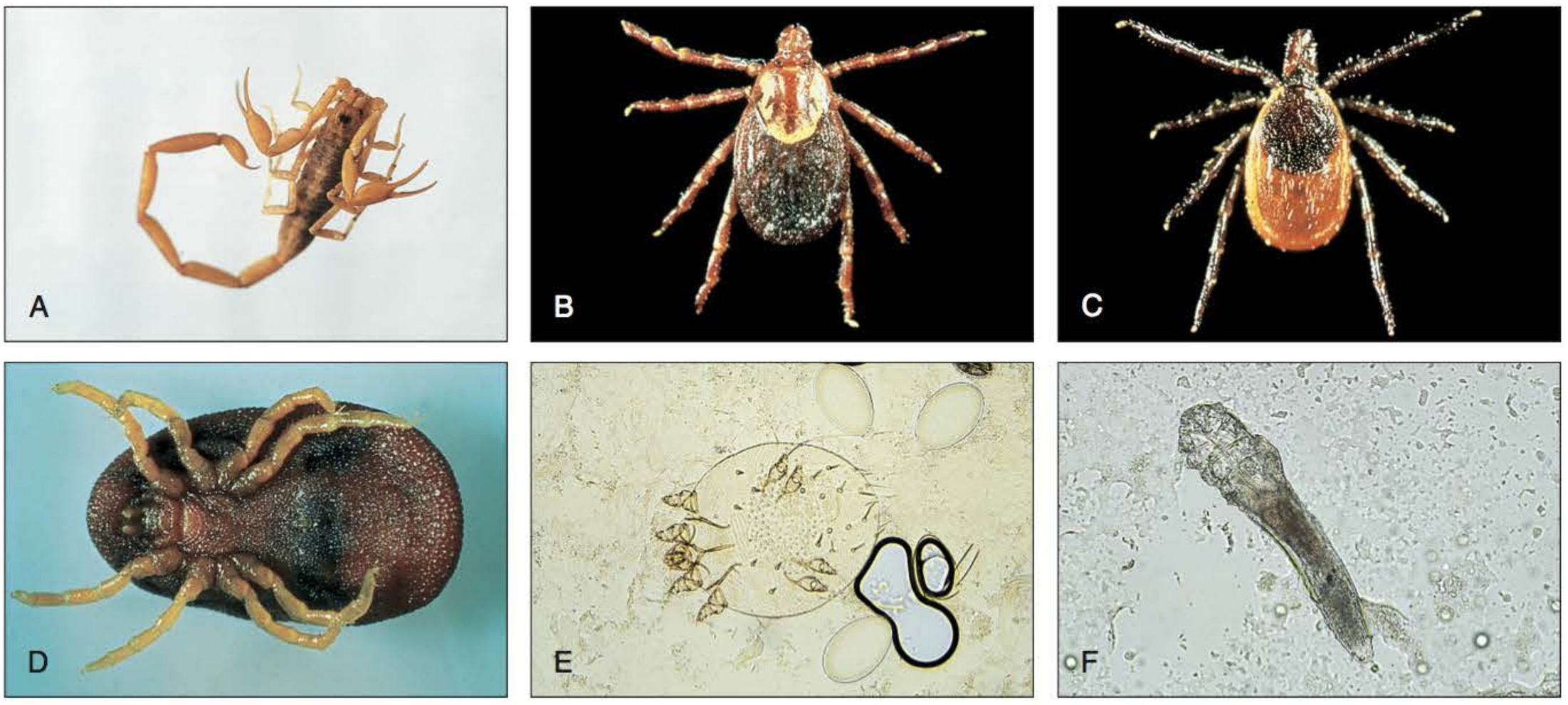


Figura 61.28 Aracnídeos importantes do ponto de vista médico. *A*, Escorpião; observe as garras em pinça direcionadas para frente e o ferrão na ponta da cauda. *B*, Fêmea adulta sem ingurgitamento de *Dermacentor variabilis* (carrapato do cão). *C*, Fêmea adulta sem engorjamento de *Ixodes scapularis* (carrapato de pata preta ou do veado). *D*, *Ornithodoros* sp. (carrapato mole) adulto sem engorjamento, visão ventral. *E*, *Sarcoptes scabiei* (sarna) adulto; observe a presença de ovos adjacentes em raspados de pele. *F*, *Demodex folliculorum* (ácaro do folículo) adulto. (*A* com permissão da ASM Press; *B* e *C* com permissão de Northwest Infectious Disease Consultants; *E* com permissão do *New England Journal of Medicine* 1994; 331:1777.)

leishmaniose e a bartonelose pela mosca da areia; e a tripanossomíase africana pela mosca tsé-tsé. Outros agentes virais, bacterianos e parasitários logo são transmitidos de forma mecânica por moscas que não picam, como moscas domésticas, moscas da carne e moscas varejeiras, as quais podem contaminar facilmente alimentos humanos.

A míiase ocorre de modo acidental, facultativo ou obrigatório. A mosca doméstica, *Musca domestica*, não tem exigências para se desenvolver no tecido de mamíferos, podendo ser encontrada ocasionalmente em tecido morto ou sob aparelhos gessados. Esse tipo de miíase acidental não é incomum, mas nem sempre tem importância do ponto de vista clínico. A miíase facultativa é, com mais frequência, causada por moscas varejeiras e moscas da carne, as quais, em geral, se alimentam de tecidos mortos, mas podem se mover para tecidos viáveis adjacentes. A miíase obrigatória é causada por certas espécies que se desenvolvem apenas em tecidos vivos. A berne humana, *Dermatobia hominis*, desenvolve-se em lesões subcutâneas semelhantes a furúnculos, com a extremidade posterior do verme aparecendo na superfície cutânea (Fig. 61.27F). Essa espécie é mais encontrada em indivíduos que passaram um tempo na América Central ou do Sul ou, com menos frequência, na África. É incomum que seus ovos sejam transportados mecanicamente para o hospedeiro por outros insetos voadores, em geral mosquitos. A mosca tumbu (*Cordylobia anthropophaga*), encontrada na África subsaariana, também causa um tipo de miíase furunculoide. Os ovos dessa espécie usualmente são postos no solo ou em roupas penduradas no varal e, ao contato com a pele, as larvas penetram com rapidez. A miíase obrigatória mais grave é causada pela bicheira do Velho Mundo, *Chrysomya bezziana*, e pela bicheira do Novo Mundo, *Cochliomyia hominivorax*. Essas espécies depositam os seus ovos diretamente no seu hospedeiro (gado), de modo geral em feridas ou próximo das narinas. As larvas alimentam-se ativamente e se movem pelos tecidos vivos. Infecções humanas podem ser destrutivas quando as larvas invadem os olhos, o nariz ou a boca. Outras espécies também podem ser responsáveis pela miíase obrigatória traumática em humanos (Lane, 1993).

Aracnídeos

Os aracnídeos importantes do ponto de vista médico incluem escorpiões, aranhas, carrapatos e ácaros. Escorpiões e aranhas apresentam dois segmentos corporais, o cefalotórax e o abdômen, enquanto os carrapatos e os ácaros apresentam apenas um. Nas formas de ninfa ou adulta, os membros do grupo possuem quatro pares de pernas. As formas larvais de carrapatos e ácaros possuem três pares de pernas. Nenhum deles possui antenas, mandíbulas e asas. Os escorpiões e as aranhas são mais bem conhecidos por sua capacidade de injetarem venenos, enquanto que os carrapatos e os ácaros são mais bem conhecidos como vetores de patógenos virais, bacterianos e protozoários.

Escorpiões

Ao contrário de outros aracnídeos, os escorpiões possuem um par de garras anteriores em pinça que lhes confere um aspecto de caranguejo e uma cauda segmenda com um ferrão bulboso na ponta (Fig. 61.28A). Eles são predadores na natureza e paralisam a vítima com veneno do ferrão, o qual também pode ser utilizado com objetivo de defesa. A toxicidade para os humanos varia de acordo com a espécie. Muitos causam apenas uma reação similar à causada por uma picada de abelha, mas alguns são mortais, causando mais de 1.000 mortes por ano. Espécies venenosas ocorrem no hemisfério ocidental, na Europa, na África e no Oriente Médio (Beaver, 1984; Goddard, 2002).

Aranhas

As aranhas não possuem cauda com um ferrão. Em vez disso, elas possuem quelíceras tipo leque entre suas partes bucais, por meio das quais o veneno pode ser liberado. Embora a maioria das aranhas seja venenosa, poucas apresentam quelíceras capazes de penetrar a pele humana. A maioria das mordidas de aranha causa apenas irritação e dor transitórias. As aranhas do tipo viúva (gênero *Lactrodectus*) representam um grupo responsável pelo aracnidismo sistêmico por intermédio da ação de uma potente neurotoxina capaz de produzir fraqueza, mialgia, paralisia, convulsões e, às vezes, morte. As taxas de mortalidade publicadas variam de menos de 1 a 6%. Cinco espécies intimamente relacionadas ocorrem nos Estados Unidos; a viúva negra (*Lactrodectus mactans*) é a mais disseminada. Fêmeas dessa espécie apresentam uma cor preta brilhante, com uma marca característica em forma de ampulheta de cor vermelha ou laranja na parte inferior do abdômen, e têm pernas que medem de 3 a 4 cm. Elas vivem em locais protegidos, como depósitos de madeira, porões e áreas externas de construções (Strickland, 2000).

As aranhas violino (gênero *Loxosceles*) são responsáveis pelo aracnidismo necrótico ou loxoscelismo. Nos Estados Unidos, a aranha reclusa marrom ou violino (*Loxosceles reclusa*) é a mais frequentemente envolvida, embora outras espécies estejam presentes. Essa espécie possui um comprimento de 1 a 2 cm, cor bronzeada ou marrom escuro, e

uma marca em forma de violino com a base orientada para frente do dorso do cefalotórax. Quando presentes em casas, elas são reclusas, preferindo áreas calmas, como armários, porões e debaixo de varandas. A sua mordida é indolor e passa despercebida por várias horas até que a área se torna vermelha, edemaciada e dolosa. O veneno é dermonecrótico e hemolítico, produzindo necrose cutânea e desprendimento da pele envolvida durante vários dias. A lesão resultante pode ser difícil de cicatrizar e está sujeita a infecções secundárias. Reações sistêmicas como a hemólise e a insuficiência renal aguda são raras. Outros gêneros de aranhas também foram implicados na produção do aracnidismo necrótico (Fisher, 1994).

Carrapatos

Ao contrário das aranhas e dos escorpiões, os carrapatos apresentam um fusão do cefalotórax e do abdômen e um hipóstomo com dentes característicos para a alimentação. O desenvolvimento do carrapato progride em quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto. Após a eclosão, uma refeição de sangue é necessária para a progressão para o estágio subsequente. De modo geral, os humanos adquirem carrapatos em áreas de grama ou mato em íntima proximidade com os hospedeiros animais usuais. Todas as espécies são parasitas obrigatoriamente sugadores de sangue e são importantes vetores de patógenos virais, bacterianos e protozoários para humanos e animais domésticos. A sua atividade alimentar também pode poduzir lesão tissular local e perda de sangue, em especial em animais de corte e selvagens, ou paralisia por carrapato, uma síndrome causada por uma neurotoxina secretada pelas glândulas salivares do carrapato que produz paralisia flácida ascendente e toxemia. Os sintomas podem simular os da síndrome de Guillain-Barré, a poliomielite ou o botulismo. A remoção do carrapato grudado em geral causa o desaparecimento dos sintomas em horas ou dias.

As espécies que afetam os humanos incluem as das famílias *Ixodidae* (carrapatos duros) e *Argasidae* (carrapatos moles). Os carrapatos duros possuem partes bucais direcionadas para frente e uma placa esclerosada, ou escudo, no dorso. O escudo cobre todo o dorso no macho e apenas a porção anterior na fêmea, permitindo que o corpo inche durante a ingestão de sangue (Figs. 61.28B e C). Carrapatos da família *Argasidae* apresentam um corpo mole coriáceo, não possuem escudo e suas partes bucais são direcionadas ventralmente, não sendo visíveis quando o inseto é visto de cima (Fig. 61.28D). Carrapatos não congestos de sangue em geral apresentam um comprimento de 2 a 5 mm, o qual pode aumentar várias vezes após a ingestão de sangue. Carrapatos duros congestos podem simular carrapatos moles. Por essa razão, deve-se ter cuidado em sua identificação (Sonenshine, 1991, 1993).

A maioria dos carrapatos encontrada se movendo ou encravada na pele é de carrapatos duros. Carrapatos moles tendem a se alimentar apenas brevemente e, em geral, à noite. Espécies importantes de carrapatos duros da América do Norte incluem o *Dermacentor variabilis* (carrapato americano do cão), *Dermacentor andersoni* (carrapato da madeira das Montanhas Rochosas), *Amblyomma americanum* (carrapato estrela solitária), *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato marrom do cão), *Ixodes scapularis* (carrapato de pernas pretas ou do veado) e *Ixodes pacificus* (carrapato ocidental de pernas pretas ou do veado). Os carrapatos *Dermacentor* e *Amblyomma* são denominados carrapatos ornados por apresentarem marcas brancas no escudo. As outras espécies são carrapatos inominados.

Carrapatos *Dermacentor* transmitem a febre maculosa das Montanhas Rochosas e, possivelmente, a tularemia, a febre Q e a febre do carrapato do Colorado. Carrapatos *Ixodes* são vetores da doença de Lyme, da babesiose e da ehrlichiose e, em outras partes do mundo, esses carrapatos são responsáveis pela transmissão de certos arbovírus. Carrapatos *Amblyomma* são capazes de transmitir a febre maculosa das Montanhas Rochosas, assim como a tularemia e, possivelmente, a doença de Lyme. Todos esses gêneros são capazes de causar a paralisia por carrapato. Carrapatos *Rhipicephalus* foram implicados na transmissão da febre maculosa das Montanhas Rochosas e da ehrlichiose na América do Norte, e da febre botonosa na região mediterrânea. Carrapatos moles do gênero *Ornithodoros* ocorrem em muitas partes do mundo, incluindo os Estados Unidos, e são importantes vetores de espiroquetas causadoras da febre recorrente (*Borrelia recurrents* e formas relacionadas) (Spach, 1993; Murray, 2003).

Ácaros

Os ácaros são aracnídeos que possuem um tamanho microscópico (em geral, menores que 1 mm) e são distribuídos amplamente no meio ambiente. Espécies importantes do ponto de vista clínico podem atacar humanos diretamente, servir como vetores de doenças infecciosas ou causar alergias à poeira. Os humanos são infestados pelo *Demodex folliculorum* e pelo *Demodex brevis*, os ácaros dos folículos, e pelo *Sarcoptes scabiei*, a sarna. Os ácaros dos folículos são parasitas minúsculos (entre 0,1 e 0,4 mm), alongados com pernas atarracadas que podem ser recobertos por folículos pilosos e glândulas sebáceas (Fig. 61.28F). Eles são achados acidentais comuns em preparações histológicas de pele. Embora a sua presença tenha sido associada a várias condições cutâneas, também são comumente encontrados em indivíduos saudáveis, o que torna a sua importância difícil de ser avaliada (Burns, 1992).

O *Sarcoptes scabiei* apresenta uma maior importância médica por causa de sua capacidade de criar túneis serpiginosos pelas camadas superiores da epiderme. Transmitido pelo contato pessoal, esse ácaro é encontrado principalmente nos espaços interdigitais e nas superfícies flexoras dos punhos e antebraços e, com menos frequência, em outras áreas, incluindo as mamas, as nádegas e a genitália externa. A inflamação e o prurido intenso são decorrentes da atividade de tunelização e da deposição de ovos e excrementos. As manifestações clínicas variam, dependendo do grau de sensibilização ao parasita e a seus produtos. As lesões são infectadas secundariamente. Uma dermatite generalizada que ocorre em presença de milhares de ácaros, em geral em indivíduos idosos ou imunocomprometidos, é conhecida como escabiose crostosa ou norueguesa.

O diagnóstico é estabelecido pela colocação de raspados cutâneos coletados de áreas tunelizadas em hidróxido de potássio a 20% ou óleo mineral para a desobstrução e exame ao microscópio. A detecção de ovos, larvas com 6 pernas e ninfas ou adultos com 8 pernas é diagnóstica, mas pode ser difícil (Figs. 61.28E e 61.29). O diagnóstico de escabiose em um ambiente institucional ou escolar pode resultar em uma pseudoepidemia, na qual numerosos indivíduos apresentam prurido sem evidências da doença. Deve-se ter cuidado para se diagnosticar adequadamente a doença, para se identificar casos reais e diferenciá-los de casos de parasitose ilusória (Orkin, 1985; Lynch, 1993).

Algumas espécies de ácaros animais podem atacar humanos em busca de sangue, seja sob a forma larval ou adulta, quando os hospedeiros normais (mamíferos ou aves) não estão disponíveis. Formas larvais de bicho-do-pé (família *Trombiculidae*) são problemáticas em muitas partes do mundo porque a sua saliva pode produzir grandes reações inflamatórias com prurido intenso. Frequentemente de cor vermelha, essas pequenas larvas com seis pernas em geral se fixam à pele em áreas nas quais a vestimenta é justa (p. ex., tornozelos, cintura, axilas e punhos). Em partes da Ásia e da Austrália, ácaros trombiculídeos são vetores da transmissão do agente do tifo rural (Lane, 1993).

Certos ácaros não mordedores têm um papel na rinite alérgica, na asma e em algumas condições cutâneas. As secreções, as excreções e as partes do corpo do *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus* são alérgenos potentes que podem ocorrer em grande quantidade no ambiente doméstico (Frazier, 1980). Os testes de rotina por um alergologista pode identificar os agentes ofensores.

Classes de menor importância clínica

Milípedes

Os milípedes são artrópodes semelhantes a vermes com numerosos segmentos corporais aparentes, cada um com dois pares de pernas, que são comumente encontrados sobre ou sob vegetações em decomposição. Embora eles não possuam partes bucais capazes de produzir mordidas sérias, muitas espécies produzem secreções vesicantes em glândulas localizadas em cada segmento do corpo. Quando manipulados de maneira brusca, as espécies tropicais maiores são capazes de expelir esses líquidos a uma distância de vários centímetros. A exposição da pele ou das membranas mucosas a esses líquidos pode produzir uma sensação de queimação e a formação de vesículas.

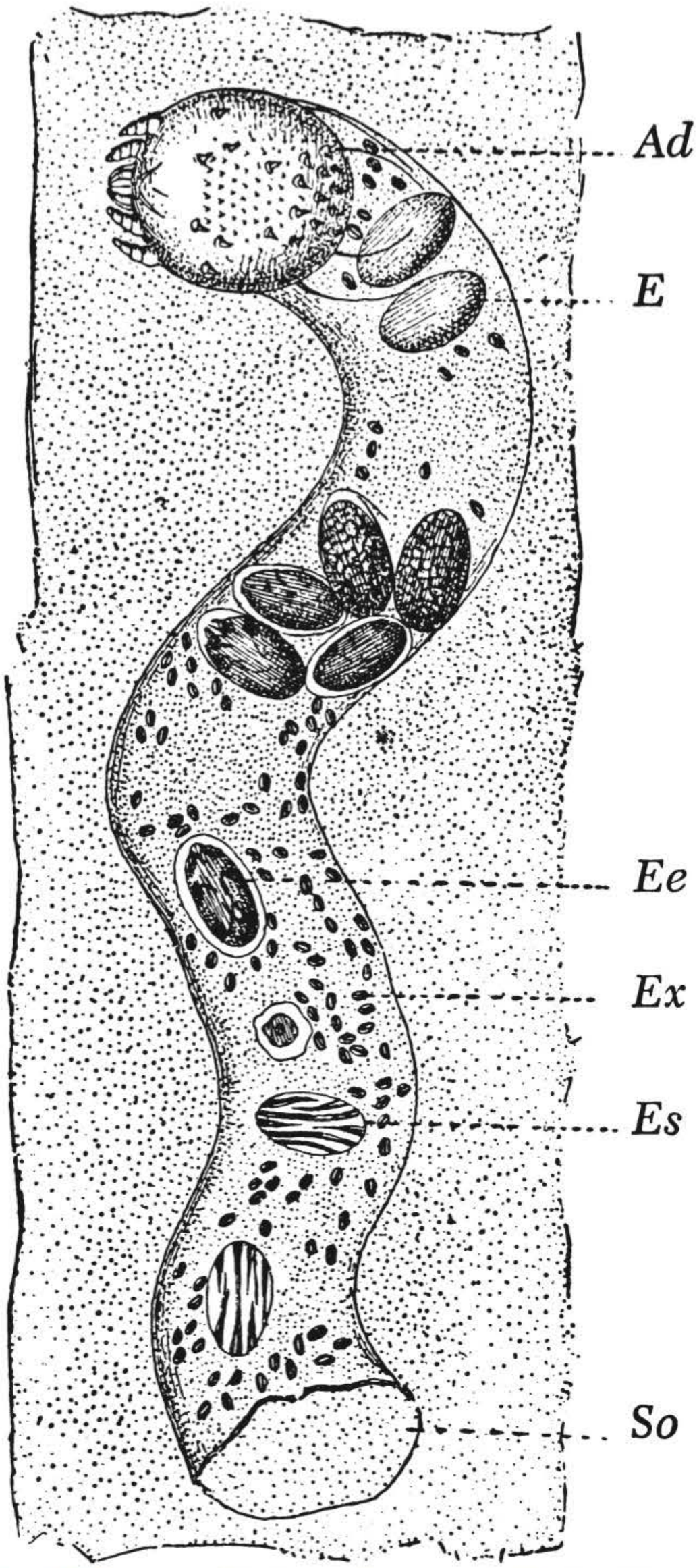


Figura 61.29 *Sarcoptes scabiei*. Diagrama de uma escavação subcutânea. (Ad = fêmea adulta; E = ovos; Ee = ovo embrionado; Ex = excremento; Es = casca de ovo; So = orifício cutâneo.)

Centopeias

As centopeias são mais achatadas que os milípedes, apresentam apenas um par de pernas por segmento corporal e possuem longas antenas. Elas se movem rapidamente e podem produzir uma picada dolorosa por meio de pinças direcionadas para frente, que são modificações do primeiro par de pernas. Embora raramente sejam responsáveis por lesões graves em humanos, as espécies maiores (entre 26 e 45 cm), encontradas no sul dos Estados Unidos e em regiões tropicais, são capazes de penetrar a pele humana quando manipuladas, produzindo uma picada dolorosa, com sensação de queimação e reação tissular local. Embora possam ocorrer reações sistêmicas em indivíduos que foram sensibilizados previamente, as mortes são raras (Goddard, 2002).

Crustáceos

Os crustáceos de importância médica são principalmente as espécies que servem de hospedeiros para estágios larvais de vários helmintos diferentes. Vários gêneros de caranguejos e lagostins são hospedeiros intermediários para metacercárias de várias espécies de fascíolas pulmonares (*Paragonimus* spp.) encontradas em todo o mundo. Copépodes são zooplânctons microscópicos comuns e certas espécies servem como primeiro hospedeiro intermediário para os nematódeos *D. medinensis* e *Gnasthostoma spinigerum* e para os cestódeos dos gêneros *Diphyllobothrium* e *Spirometra*.

Pentastomídeos

Pentastomídeos, ou vermes em forma de "língua" (*tongue worms*), são artrópodes com afinidade incerta devido à falta de características morfológicas. O estágio adulto corresponde a organismos análogos aos vermes que vivem nas passagens nasais de certos répteis, aves e mamíferos predadores. Os estágios larvais assemelham-se aos ácaros e residem em roedores, herbívoros e peixes de água fresca. Infecções hepáticas e pulmonares em humanos por estágios larvais foram descritas na Ásia e na África. Estágios adultos foram recuperados da nasofaringe de indivíduos do Oriente Médio e da África, onde eles são responsáveis por uma condição obstrutiva conhecida como *halzoun* (Beaver, 1984; Strickland, 2000).

Infecções parasitárias e hospedeiro imunocomprometido

Hospedeiros imunocomprometidos são hospedeiros que apresentam anormalidades do sistema imune humoral ou celular resultante de doenças, terapias ou anormalidades congênitas. A desnutrição grave também pode comprometer as defesas do hospedeiro. Em muitas situações, as anormalidades predisponentes do hospedeiro são primariamente do sistema imune celular (células T) e resultam de AIDS, malignidades, quimioterapia, imunossupressão para transplante, terapia à base de corticosteroides ou uma combinação desses fatores. Na giardíase, o defeito imune predisponente afeta a imunidade humoral. Na babesiose, o defeito está relacionado à esplenectomia.

Com a epidemia mundial de infecção pelo HIV e a AIDS sendo particularmente grave em países subdesenvolvidos com uma alta incidência de infecções parasitárias (p. ex., malária, esquistossomose, ascaridíase, amebíase e filaríase), é uma sorte que essas infecções não causem doença particularmente grave em pacientes com AIDS. No entanto, como comorbidades, a sua contribuição nos gastos com a saúde é enorme.

Algumas infecções parasitárias (p. ex., criptosporidiose, toxoplasmose e estrongiloidíase) são mais graves em pacientes imunocomprometidos, mas existem diferenças. Por exemplo, enquanto a criptosporidiose e a toxoplasmose são particularmente problemáticas em pacientes com AIDS, a estrongiloidíase não é um problema maior nessa população, mas é um problema em receptores de transplante e em pacientes que se recuperam de uma quimioterapia antineoplásica.

A Tabela 61.13 apresenta uma lista de infecções parasitárias que são mais graves e/ou frequentes em pacientes imunocomprometidos. As manifestações clínicas podem ser diferentes daquelas observadas na população geral, como foi observada na seção de comentários.

Tabela 61.13 Infecções parasitárias em hospedeiros comprometidos

Infecção	Anormalidades predisponentes do hospedeiro	Comentários	Referências
Protozoário intestinal			
Criptosporidiose	AIDS (especialmente $CD4^+$ <200/μL), transplante, quimioterapia antitumoral	Diarreia grave prolongada (até 17 litros/dia). Pode haver envolvimento extraintestinal, incluindo pâncreas, trato biliar e pulmões. Terapia disponível limitada, não curativa.	Wittner, 1993; Thielman, 1998
Isosporíase	AIDS, transplante, quimioterapia antitumoral	Diarreia grave prolongada. Envolvimento extraintestinal de linfonodos regionais pode ser observado. Terapia efetiva disponível.	Wittner, 1993; Thielman, 1998
Ciclosporíase	AIDS, provavelmente outra imunossupressão	Diarreia grave prolongada clinicamente similar à causada pela criptosporidiose e pela isosporíase. Responde ao sulfametoxazol-trimetoprima	Wittner, 1993; Thielman, 1998
Microsporidiose	AIDS, outra imunossupressão grave	Várias síndromes: 1. Doença multissistêmica 2. Enterite com diarreia grave (mais frequente) 3. Infecção ocular 4. Hepatobiliar com granulomas, necrose hepática ou colangite 5. Doença muscular esquelética O exame do sedimento urinário com coloração adequada pode permitir o diagnóstico de síndromes não entéricas e alguns casos de doença entérica	Wittner, 1993; Thielman, 1998
Giardíase	Imunodeficiência variável comum, agamaglobulinemia ligada ao X	Diarreia prolongada com má absorção. A AIDS *não* é uma condição predisponente.	Thielman, 1998
Protozoário de sangue e tecido			
Encefalite amébica granulomatosa	AIDS e outras condições de imunocomprometimento	Usualmente causada por amebas do gênero *Acanthamoeba* ou *Balamuthia*. Produz infecção subaguda ou crônica do sistema nervoso central, mas pode ser aguda com disseminação em hospedeiros gravemente imunodeprimidos	Martinez, 1997
Toxoplasmose	AIDS com $CD4^+$ usualmente <100/μL e outros estados de imunocomprometimento. Transplante cardíaco, doador soropositivo e receptor soronegativo	Usualmente, decorre da reativação de cistos de infecções prévias. Frequentemente, é uma doença disseminada com envolvimento de múltiplos órgãos ou com lesões multifocais do SNC. Pode causar pneumonia que se assemelha àquela causada pelo *Pneumocystis jiroveci*. Pode causar coriorretinite. Pode ocorrer após transplante de medula óssea, mas geralmente é leve. O transplante cardíaco com doador soropositivo e receptor soronegativo pode levar a uma toxoplasmose grave, frequentemente fatal	McCabe, 1993
Leishmaniose	AIDS, outra imunossupressão	Influência limitada sobre a leishmaniose cutânea. Aumento da susceptibilidade à leishmaniose visceral, mas não da gravidade da doença. A recaída é mais provável após tratamento	Herwaldt, 1999
Tripanossomíase americana (doença de Chagas)	AIDS, linfoma linfoblástico, transplante cardíaco, outra imunossupressão	Na AIDS, o sistema nervoso central é frequentemente envolvido, miocardite, lesões cutâneas.	Mileno, 1998; Markell, 1999
Babesiose	Esplenectomia	Comumente, é uma infecção subclínica em indivíduos com defesa intacta. Pacientes esplenectomizados geralmente desenvolvem doença clinicamente evidente que pode ser fatal	Mileno, 1998; Markell, 1999
Helminto			
Estrongiloidíase	Imunossupressão para transplante ou pela quimioterapia antitumoral, corticosteroides suprarrenais ou linfoma. A AIDS não é um fator predisponente maior.	Por causa da autoinfecção endógena, pode ocorrer hiperinfecção ou infecção disseminada que se manifesta como pneumonia ou enteropatia grave. A sepse causada por organismos Gram-negativos ou a meningite produzida por bactérias Gram-negativas pode ocorrer devido à translocação de bactérias por meio das larvas invasoras. A estrongiloidíase deve ser investigada antes do tratamento imunossupressivo em pacientes oriundos de áreas altamente endêmicas	Mileno, 1998; Markell, 1999
Artrópode			
Escabiose	Malignidades, imunossupressão para transplante, terapia antineoplásica	A AIDS pode facilitar a ocorrência da escabiose "norueguesa" ou crostosa, com lesões crostosas espessas. Algumas vezes, o paciente apresenta prurido intenso. O paciente encontra-se infestado por numerosos ácaros e, por essa razão, é altamente contagioso. Frequentemente, ele é menos responsivo à terapia	Mileno, 1998; Markell, 1999

AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida; SNC = sistema nervoso central.

Referências bibliográficas

Aldeen WE, Hale D, Robison AJ, et al: Evaluation of a commercially available ELISA assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 21:77.

Alicata JE: The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. Parasitol Today 1991; 7:151.

Anuran JD, Starr MB, Jakobiec FA: *Acanthamoeba* keratitis: a review of the literature. Cornea 1987; 6:2.

Ash LR, Orihel TC: Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago, IL, ASCP Press, 1987.

Ash LR, Orihel TC: Atlas of Human Parasitology, 4th ed. Chicago, IL, ASCP Press, 1997.

Badawi AF, Mostafa MH, O'Connor PJ: Involvement of alkylating agents in schistosome-associated bladder cancer: The possible basic mechanisms of induction. Cancer Lett 1992; 63:171.

Balows A, Hausler WJ Jr, Ohashi M, Turano A: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice, Vol 1. Bacterial, Mycotic and Parasitic Diseases. New York, Springer-Verlag, 1988.

Bartlett MS, Harper K, Smith N, et al: Comparative evaluation of a modified zinc sulfate flotation technique. J Clin Microbiol 1978; 7:524.

Beal C, Goldsmith M, Kotby M, et al: The plastic envelope method, a simplified technique for culture diagnosis of trichomoniasis. J Clin Microbiol 1992; 30:2265.

Beaver PC: Light long-lasting *Necator* infection in a volunteer. Am J Trop Med Hyg 1988; 39:369.

Beaver PC, Gadgil RK, Morera P: *Sarcocystis* in man: a review and report of five cases. Am J Trop Med Hyg 1979; 28:819.

Beaver PC, Jung RC, Cupp EW: Clinical Parasitology, 9th ed. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1984.

Bendall RP, Chiodini PL: New diagnostic methods for parasitic infections. Curr Opin Infect Dis 1993; 6:318.

Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, et al: Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. N Engl J Med 1982; 307:666.

Binford CH, Connor DH: Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1976.

Blessmann, J, Buss H, Nu PA, et al: Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. J Clin Microbiol 2002; 40:4413.

Boros DL: Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. Clin Microbiol Rev 1989; 2:250.

Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, et al: Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2003; 41:5080.

Briselden AM, Hillier SL: Evaluation of Affirm VP Microbial Identification Test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1994; 32:148.

Bronsdon MA: Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocyst in stool specimens. J Clin Microbiol 1984; 19:952.

Brooke MM, Melvin DM: Morphology of diagnostic stages of intestinal parasites of man (Publication No. [CDC] 848116). Washington, DC, United States Department of Health and Human Services, 1984.

Bruce JI, Sornmani S: The Mekong schistosome. Malacological Review, Suppl. 2. Whitmore Lake, MI, 1980.

Bruckner DA: Amebiasis. Clin Microbiol Rev 1992; 5:356.

Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC: Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;45:269.

Burns DA: Follicle mites and their role in disease. Clin Exp Dermatol 1992; 17:152.

Burrows RB, Swerdlow MA: *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. Am J Trop Med Hyg 1956; 5:258.

Cairncross S, Muller R, Zagaria N: Dracunculiasis (Guinea worm disease) and the eradication inititative. Clin Microbiol Rev 2002; 15:223.

Cali A, Kotler DP, Orenstein JM: *Septata intestinalis* N.G. N.Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Eukaryot Microbiol 1993; 40:101.

Carabin H, Budke CM, Cowan LD, Willingham AL III, Torgerson PR: Methods for assessing the burden of parasitic zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. Trends Parasitol 2005; 21:327.

Cattand P, Miezan BT, de Raadt P: Human African trypanosomiasis: Use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. Bull WHO 1988; 66:83.

Cazenave J, Cheyrou A, Blouin P, et al: Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. J Clin Pathol 1991; 44:1037.

Centers for Disease Control and Prevention: Pseudooutbreak of intestinal amebiasis, California. Morbid Mortal Wkly Rev 1985; 34:125.

Centers for Disease Control and Prevention: Malaria surveillance. Annual Summary. 1987, Issued November 1988.

Centers for Disease Control and Prevention: Surveillance for dracunculiasis. Morbid Mortal Wkly Rev 1992; 41:1.

Centers for Disease Control and Prevention: Summary of notifiable diseases, United States, 1993. Morbid Mortal Wkly Rev 1993; 42:1.

Chan FT, Guan MX, MacKenzie AMR: Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. J Clin Microbiol 1993; 31:1710.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; approved guideline. CLSI Document M28-A2. Wayne, PA, CLSI, 2005.

Este documento de consenso contém uma apresentação detalhada e atualizada das amostras gastrintestinais para detecção de infecções parasíticas, incluindo o uso de imunoensaios e características dos testes.

Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, et al: Pathology of Infectious Diseases. Stamford, CT, Appleton & Lange, 1997.

Cook GC (ed): Manson's Tropical Diseases, 21st ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 2002.

Cooper ES, Bundy DAP: *Trichuris* is not trivial. Parasitol Today 1988; 4:301.

Costa JM, Ernault P, Gautier E, et al: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. Prenat Diagn 2001; 21:85.

Costa JM, Pautas C, Ernault P, et al: Real-time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. J Clin Microbiol 2000; 38:2929.

Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F: Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 2005; 43:1017.

Craun G: Waterborne giardiasis in the United States 1965–1984. Lancet 1986; 2:513–514.

Cross JH: Intestinal capillariasis. Clin Microbiol Rev 1992; 5:120.

Current WL, Garcia LS: Cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev 1991; 4:325.

Curry A, Caning E: Human microsporidiosis. J Infect 1993; 27:229.

Curtis MA, Bylund G: Diphyllobothriasis: fish tapeworm disease in the circumpolar north. Arctic Med Res 1991; 50:18.

D'Alessandro A, Ramirez LE, Chapadeiro E, et al: Second recorded case of human infection by *Echinococcus oligarthrus*. Am J Trop Med Hyg 1995; 52:29.

D'Alessandro A, Rausch RL, Cuello C, et al: *Echinococcus vogeli* in man, with a review of polycystic hydatid disease in Columbia and neighboring countries. Am J Trop Med Hyg 1979; 28:303.

Dao AH, Robinson DP, Wong SW: Frequency of *Entamoeba gingivalis* in human gingival scrapings. Am J Clin Pathol 1983; 80:380.

DeGirolami PC, Ezratty CR, Desai G, et al: Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B stains. J Clin Microbiol 1995; 33:805.

DeHovitz JA, Pape JW, Boncy J, et al: Isosporiasis in AIDS. N Engl J Med 1986; 315:87.

De Monbrison F, Angei C, Staal A, et al: Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97:387.

Diamond LS: Cultivation of *Entamoeba histolytica* in vitro. *In* Ravdin JI (ed): Amebiasis: Human Infection by *Entamoeba histolytica*. New York, John Wiley & Sons, 1988, p 27.

Diamond LS, Clark CG: A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 1993; 40:340.

Diaz JF, Verastegui M, Gilman RH, et al: Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. Am J Trop Med Hyg 1992; 46:610.

Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, et al: Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol 1995; 33:3138.

Doing KM, Hamm JL, Jellison JA, et al: False-positive results obtained with the Alexon ProSpecT *Cryptosporidium* enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1999; 37:1582.

Eastburn RL, Fritsche TR, Terhune CA Jr: Human intestinal infection with *Nanophyetus salmincola* from salmonid fishes. Am J Trop Med Hyg 1987; 36:586.

Eveland LK, Kenney M, Yermakov V: Laboratory diagnosis of autoinfection in strongyloidiasis. Am J Clin Pathol 1975; 63:421.

Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, et al: Evaluation of the RealArt Malaria LC real time PCR assay for malaria diagnosis. J Clin Microbiol 2004; 42:636.

Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA, et al: Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of Giardia lamblia in stool specimens preserved in ECOFIX. J Clin Microbiol 2000; 38:2781.

Fisher RG: Necrotic arachnidism. West J Med 1994; 160:570.

Fontaine M, Guillot E: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiol Lett 2002; 214:13.

Franzen C, Müller A: Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999; 12:243.

As espécies de microsporídios que conhecidamente infectam seres humanos têm se multiplicado rapidamente. A presente revisão enfoca as espécies conhecidas que foram estudadas utilizando técnicas filogenéticas moleculares e tradicionais.

Frazier CA, Brown PA: Insects and Allergy and What to Do About Them. Norman, OK, University of Oklahoma Press, 1980.

Fritsche TR: Pathogenic protozoa: an overview of in vitro cultivation and susceptibility to chemotherapeutic agents. Clin Lab Med 1989a; 9:287.

Fritsche TR, Eastburn RL, Wiggins LH, et al: Praziquantel for treatment of human *Nanophyetus salmincola* (*Troglotrema salmincola*) infection. J Infect Dis 1989b; 160:896.

Garcia LS: Practical Guide to Diagnostic Parasitology. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999.

Garcia LS: Diagnostic Medical Parasitology, 4th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2001.

Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA: A comparison of the formalin-ether concentration and trichrome-stained smear methods for the recovery and identification of intestinal protozoa. Am J Med Technol 1979; 45:932.

Garcia LS, Shimizu RY: Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:1526.

Garcia LS. Shimizu RY: Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. J Clin Microbiol 2000; 38:1267.

Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, et al: Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. J Clin Microbiol 1993; 31:307.

Garcia LS, Smith JW, Fritsche TR: Selection and use of laboratory procedures for diagnosis of parasitic infections of the gastrointestinal tract. CUMITECH 30A. Washington, DC, ASM Press, 2003.

Este artigo revisa aspectos clínicos da seleção de testes laboratoriais para o diagnóstico de parasitas gastrintestinais e limitações inerentes aos testes específicos.

Gay JD, Abell TL, Thompson JH Jr, et al: *Entamoeba polecki* infection in southeast Asian refugees: multiple cases of a rarely reported parasite. Mayo Clin Proc 1985; 60:523.

Genta RM: Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. Clin Microbiol Rev 1992; 5:345.

Genta RM, Walzer PD: Strongyloidiasis. *In* Walzer PD, Genta RM (eds): Parasitic Infections in the Compromised Host. New York, Marcel Dekker 1989; pp 463–525.

Gill GV, Bell DR: *Strongyloides stercoralis* infection in former Far East prisoners of war. Br Med J 1979; 2:572.

Goddard J: Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance, 4th ed. Boca Raton, FL, CRC Press, 2002.

Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R: Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of Cryptosporidium oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. Am J Trop Med Hyg 1996; 54:274.

Grover CM, Thulliez P, Remington JS, et al: Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J Clin Microbiol 1990; 28:2297.

Guerrant RL, Walker DH, Weller PF (eds): Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone, 1999.

Gustafson RL, Reed CM, McGreevy PB, et al: Human cutaneous leishmaniasis acquired in Texas. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:58.

Gutierrez Y: Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations, 2nd ed. New York, Oxford University Press, 2000.

Hanson KL Cartwright CP: Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbiol 2001; 39:474.

Hardick J, Yang S, Lin S, et al: Use of the Roche LightCycler instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. J Clin Microbiol 2003; 41:5619.

Healy GR, Rubush TK: Morphology of *Babesia microti* in human blood smears. Am J Clin Pathol 1980; 73:107.

Herwaldt BL: Leishmaniasis. Lancet 1999; 335:1191.

Herwaldt BL, de Bruyn G, Pieniazek NJ, et al: *Babesia divergens*-like infection, Washington State. Emerg Infect Dis 2004; 10:622.

Hoeffler DF: Cercarial dermatitis, its etiology, epidemiology, and clinical aspects. JAMA 1974; 29:225.

Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR III, et al: Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13:451.

Este artigo revisa as espécies causadoras de babesiose mais comuns, bem como os aspectos clínicos da doença e modalidades diagnósticas, incluindo estudos moleculares que auxiliam o diagnóstico e a epidemiologia.

Isenberg HE 2nd ed: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vols 1 and 2. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2004.

Istre GR, Kreiss K, Hopkins RS, et al: An outbreak of amebiasis spread by colonic irrigation at a chiropractic clinic. N Engl J Med 1982; 307:339.

Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG: Emerging from obscurity: biological, clinical and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol Rev 2004; 17:553.

Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, et al: Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol 2003 41:623.

Kappus KD, Lundgren RG, Juranek DD, et al: Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. Am J Trop Med Hyg 1994; 50:705.

Katanik MT, Schneider SK, Rosenblatt JE, et al: Evaluation of ColorPAC *Giardia*/*Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia*/*Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. J Clin Microbiol 2001 39:4523.

Kehl KS, Cicirello H, Havens PL: Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. J Clin Microbiol 1995 33:416.

Kilvington S, White DG: *Acanthamoeba*: biology, ecology and human disease. Rev Med Microbiol 1994; 5:12.

Kim KC, Pratt HD, Stojanovich CJ: The Sucking Lice of North America. University Park, PA, Pennsylvania State University Press, 1986.

Krause PJ: Babesiosis. Med Clin North Am 2002; 86:361.

Krieger JN, Tam MR, Stevens CE, et al: Diagnosis of trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. JAMA 1988; 259:1223.

Krogstad DJ, Spencer HC, Healy GR, et al: Amebiasis: epidemologic studies in the United States. Ann Intern Med 1978; 88:89.

Krotoski WA, Garnham PCC, Krotoski DM, et al: Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. Am J Trop Med Hyg 1982; 31:24.

Kubersky T, Bert RD, Briley JM, et al: Recovery of *Angiostrongylus cantonensis* from cerebrospinal fluid of a child with eosinophilic meningitis. J Clin Microbiol 1979; 9:629.

Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, et al: Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. Clin Microbiol Infect 2001 7:120.

Lanar DE, McLaughlin GL, Wirth DF, et al: Comparison of thick films, in vitro culture and DNA hybridization probes for detecting *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg 1989; 40:3.

Lane RP, Crosskey RW: Medical Insects and Arthropods. London, Chapman & Hall, 1993.

Lawande RV, Abraham SN, John I, et al: Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan period in Zaria. Am Soc Clin Pathol 1979; 71:201.

Layrisse M, Blumenfeld N, Carbonell L, et al: Intestinal absorption tests and biopsy of the jejunum in subjects with heavy hookworm infection. Am J Trop Med Hyg 1964a; 13:297.

Layrisse M, Roche M: The relationship between anemia and hookworm infection. Results of surveys of rural Venezuelan population. Am J Hyg 1964b; 79:279.

Lee MA, Tan CH, Aw LT, et al: Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. J Clin Microbiol 2002; 40:4343.

Levi MH, torres J, Pina C, Klein RS: Comparison of the InPouch TV culture system and Diamond's modified medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1997; 35:3308.

Levin RL, Armstrong DE: Human infection with *Entamoeba polecki*. Am J Clin Pathol 1970; 54:611.

Lin MH, Chen TC, Kuo TT, et al: Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 2000; 38:4121.

Lisi PJ, Dondero RS, Kwiatkoski D, et al: Monoclonal--antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1988; 26:1684.

Loria-Cortez R, LoboSanahuja JF: Clinical abdominal angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Am J Trop Med Hyg 1980; 29:538.

Luft BJ: *Toxoplasma gondii*. *In* Walzer PD, Genta RM (eds): Parasitic Infections in the Compromised Host. New York, Marcel Dekker, 1989, p 179.

Luft BJ, Remingon JS: Toxoplasmic encephalitis. J Infect Dis 1988; 157:1.

Luna VA, Stewart BK, Bergeron DL, et al: Use of the fluorochrome calcofluor white in the screening of stool specimens for spores of microsporidia. Am J Clin Pathol 1995; 103:656.

Lynch PJ: Delusions of parasitosis. Semin Dermatol 1993; 12:39.

Os delírios de parasitose constituem um processo psiquiátrico complexo e comum, que sobrecarrega todos os envolvidos na assistência prestada ao paciente. Este artigo apresenta uma visão geral da síndrome e das estratégias de supervisão.

Ma P, Soave R: Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. J Infect Dis 1983; 147:824.

Maayen S, Wormser GP, Widernorn J, et al: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with acquired immune deficiency syndrome. Am J Med 1987; 83:945.

McCabe R, Chirurgi V: Issues in toxoplasmosis. Infect Dis Clin North Am 1993; 7:587.

MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through public water supply. N Engl J Med 1994; 331:161.

Apresentação de um estudo epidemiológico detalhado sobre o maior surto de criptosporidiose até então registrado.

Magill AJ, Grogl M, Gasser RA, et al: Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. N Engl J Med 1993; 328:1384.

Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, et al: Differentiation of old and new world leishmania species at complex and species levels by PCR. Scand J Infect Dis 2002; 34:756.

Mannheimer SB, Soave R: Protozoal infections in patients with AIDS. Cryptosporidiosis, isosporiasis, cyclosporiasis, and microsporidiosis. Infect Dis Clin North Am 1994; 8:483.

Maraha B, Buiting AG: Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:485.

Marcial-Rojas RA: Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases with Clinical Correlation. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1971.

Marciano-Cabral F: Biology of *Naegleria* spp. Microbiol Rev 1988; 52:114.

Marciano-Cabral F, Cabral G: *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16:273.

Mariano EG, Borja SR, Vruno MJ: A human infection with *Paragonimus kellicotti* (lung fluke) in the United States. Am J Clin Pathol 1986; 86:685.

Marines HM, Osato MS, Font RL: The value of calcofluor white in the diagnosis of mycotic and *Acanthamoeba* infections of the eye and ocular adnexa. Ophthalmology 1987; 94:23.

Markell EK, John DT, Krotowski WA: Markell and Voge's Medical Parasitology, 8th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1999.

Markell EK, Udkow MP: *Blastocystis hominis*: Pathogen or fellow traveler? Am J Trop Med Hyg 1986; 35:1023.

Martinez AJ, Visvesvara GS: Free living amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol 1997; 7:583.

Martinez AJ: Free-living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. Boca Raton, FL, CRC Press, 1985.

Marx A, Pewsner D, Egger M, et al: Meta-analysis: accuracy of rapid tests for malaria in travelers returning from endemic areas. Ann Intern Med 2005; 142:836.

O uso de métodos de imunocromatografia com "vareta medidora de nível" para detecção rápida das infecções da malária está se tornando mais popular. O presente artigo revisa 21 estudos publicados sobre os diversos métodos de investigação existentes, seu papel clínico no diagnóstico e suas limitações.

Medrano FJ, HernandezQuero J, Jimenez E, et al: Visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? AIDS 1992; 6:1499.

Melvin DM, Brooke MM: Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites, 3rd ed. (DHEW Publication [CDC] 828282). Atlanta, GA, Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

Meri T, Sakari Jokiranta T, Suhonen, L, et al: Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. J Clin Microbiol 2000; 38:763.

Mileno MD, Bia FJ: The compromised traveler. Infect Dis Clin North Am 1998; 12:369.

Miller GA, Klausner JD, Coates TJ, et al: Assessment of a rapid antigen detection system for *Trichomonas vaginalis* infection. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:1157.

Miller LH, Manson SJ, Clyde DF, et al: The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks, the Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med 1976; 295:302.

Miller RA, Minshew BH: *Blastocystis hominis*: an organism in search of a disease. Rev Infect Dis 1988; 10:930.

Mullen G, Durden L: Medical and Veterinary Entomology, London, Academic Press, 2002.

Murphy GS, Basri H, Purnomo, et al: *Vivax malaria* resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. Lancet 1993; 341:96.

Murray WJ, Ash LR: Delusional parasitosis. Clin Microbiol Newslet 2004; 26:73.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al: Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Laboratory diagnosis of blood borne parasitic diseases; approved guideline. NCCLS Document M15-A. Wayne, PA, NCCLS, 2000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Clinical use and interpretation of serologic tests for *Toxoplasma gondii*: approved guideline M36-A. Wayne, PA, NCCLS, 2004.

Esta diretriz de consenso apresenta, de maneira organizada, a seleção, interpretação e limitações dos métodos sorológicos atualmente empregados no diagnóstico da toxoplasmose.

National Communicable Disease Center: Pictorial Keys: Arthropods, Reptiles, Birds, and Mammals of Public Health Significance. Atlanta, GA, Communicable Disease Center, 1969.

Nielson RL, Kohler RB, Chin W, et al: The use of exchange transfusions. A potentially useful adjunct in the treatment of fulminant falciparum malaria. Am J Med Sci 1979; 277:325.

Orihel TC, Ash LR: Parasites in Human Tissues. Chicago, IL, ASCP Press, 1995.

Orkin M, Maibach HI: Cutaneous Infestations and Insect Bites. New York, Marcel Dekker, 1985.

Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR: A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. J Parasitol 1994; 80:625.

Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, et al: *Cyclospora* species a new protozoan pathogen of humans. N Engl J Med 1993; 328:1308.

Pachucki CT, Levandowski RA, Brown VA, et al: American paragonimiasis treated with praziquantel. N Engl J Med 1984; 311:582.

Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, et al: Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. J Clin Microbiol 1998; 36:203.

Palmer J: Modified iron hematoxylin/Kinyoun stain (letter). Clin Microbiol Newslett 1991; 13:39.

Parmley SF, Goebel FD, Remington JS: Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:3000.

Pelletier LL Jr, Baker CB, Gam AA, et al: Diagnosis and evaluation of treatment of chronic strongyloidiasis in ex-prisoners of war. J Infect Dis 1988; 157:573.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, et al: Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. J Clin Microbiol 2004; 42:1214.

Persing DH, Herwaldt BL, Glaser C, et al: Infection with a *Babesia*-like organism in northern California. N Engl J Med 1995; 332:298.

Persing DH, Tenover FC, Versalovic, J, et al (eds): Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. Washington, DC, American Society for Microbiology 2004.

Contém vários capítulos que fornecem uma visão geral conveniente do status do uso dos métodos moleculares no diagnóstico das infecções parasíticas.

Peters W, Gilles HM: A Colour Atlas of Tropical Medicine and Parasitology, 3rd ed. London, Wolfe Medical, 1989.

Peters W, Killick-Kendrick R: The Leishmaniases in Biology and Medicine. London, Academic Press, 1987.

Pillai DR, Kain KC: Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica–E. dispar* and *Giardia lamblia* coproantigen. J Clin Microbiol 1999; 37:3017.

Piper RC, LeBras J, Wentworth L, et al: Immuno-capture diagnostic assays for malaria utilizing *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). Am J Trop Med Hyg 1999; 60:109.

Powell VI, Grima K: Exchange transfusion for malaria and *Babesia* infection. Transfus Med Rev 2002; 16:239.

Preiss U, Ockert G, Boremme S, et al: On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1991; 35:27.

Price DL: Procedure Manual for the Diagnosis of Intestinal Parasites. Boca Raton, FL, CRC Press, 1994.

Purtilo DT, Meyers WM, Connor DH: Fatal strongyloidiasis in immunosuppressed patients. Am J Med 1974; 56:358.

Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW, et al: Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? Ann Intern Med 1993; 119:284.

Ravdin JI (ed): Amebiasis: Human Infection by *Entamoeba histolytica*. New York, John Wiley & Sons, 1988.

Reischl U, Bretagne S, Kruger D, et al: Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect Dis 2003 3:7.

Reisman RE: Insect stings. N Engl J Med 1994; 331:523.

Remington JS, Klein JO, Baker C et al (eds): Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 6th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 2005.

Richards FO, Schantz PM, RuizTiben E, et al: Cysticercosis in Los Angeles County. JAMA 1985; 254:444.

Rosenblatt JE, Sloan LM, Bestrom JE: Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection in serum of antibodies to *Entamoeba histolytica*. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 22:275.

Ruebush TK: Human babesiosis in North America. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:149.

Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF: Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. JAMA 1982; 248:1728.

Sadun EH, Melvin DM: The probability of detecting infections with *Enterobius vermicularis* by successive examination. J Pediatr 1956; 48:438.

Sakanari JA, McKerrow JH: Anisakiasis. Clin Microbiol Rev 1989; 2:278.

Samuelson J, Acuma-Soto R, Reed S, et al: DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 1989; 27:672.

Schantz PM, Moore AC, Munoz JL, et al: Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City. N Engl J Med 1992; 327:692.

Schmid GP, Matherny LC, Zaidi AA, et al: Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions. J Clin Microbiol 1989; 27:1230.

Schnapp LM, Geaghan SM, Campagna A, et al: *Toxoplasma gondii* pneumonitis in patients infected with the human immunodeficiency virus. Arch Intern Med 1992; 152:1073.

Shadduck JA, Greeley E: Microsporidia and human infections. Clin Microbiol Rev 1989; 2:158.

Shama SK, Etkind PH, Odell TM, et al: Gypsy-moth-caterpillar dermatitis. N Engl J Med 1982; 306:1300.

Sheehan DJ, Raucher BG, McKitriak JC: Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. J Clin Microbiol 1986; 24:548.

Shepp DH, Hackman RC, Conley FK, et al: *Toxoplasma gondii* reactivation identified by detection of parasitemia in tissue culture. Ann Intern Med 1985; 103:218.

Shields JM, Olson BH: *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. Int J Parasitol 2003; 33:371.

Descreve a recente emergência de Cyclospora que, de um obscuro parasita coccidiano de animais, se tornou um sério patógeno de seres humanos.

Smith JW: Identification of fecal parasites in the special parasitology survey of the College of American Pathologists. Am J Clin Pathol 1979; 72(Suppl):371.

Sonenshine DE: Biology of Ticks, Vol 1. New York, Oxford University Press, 1991.

Sonenshine DE: Biology of Ticks, Vol 2. New York, Oxford University Press, 1993.

Spach DH, Liles WC, Campbell GL, et al: Tickborne diseases in the United States. N Engl J Med 1993; 329:936.

Spencer FM, Monroe LS: The Color Atlas of Intestinal Parasites, 2nd ed. Springfield, IL, Charles C Thomas, 1982.

Spencer MJ, Garcia LS, Chapin MR: *Dientamoeba fragilis*, an intestinal pathogen in children. Am J Dis Child 1979; 133:390.

Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GS: The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. Am J Ophthalmol 1990; 107:331.

Stenzel DJ, Boreham PFL: *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev 1996; 9:563.

Steyskal GC, Murphy WL, Hoover EM: Insects and Mites: Techniques for Collection and Preservation. USDA Misc Publ No 1443, 1987.

Strickland GT (ed): Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 2000.

Sun TE: Pathology and Clinical Features of Parasitic Diseases. New York, Masson 1982.

Sun TE: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Parasitology. New York, Igaku-Shoin, 1988.

Symmers WC Sr: Pathology of oxyuriasis, with special reference to granulomas due to the presence of *Oxyuris vermicularis* (*Enterobius vermicularis*) and its ova in tissues. Arch Pathol 1950; 50:475.

Tan B, WeldonLime CM, Rhone DP, et al: *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med 1993; 117:1043.

Teutch SM, Juranek DD, Sulzer A, et al: Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. N Engl J Med 1979; 300:695.

Thielman NM, Guerrant RL: Persistent diarrhea in the returned traveler. Infect Dis Clin North Am 1998; 12:489.

Thompson RCA, Lymbery AJ (eds): *Echinococcus* and Hydatid Disease. Wallingford, Oxfordshire, CAB International, 1995.

Truant AL, Elliott SH, Kelly MT, et al: Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. J Clin Microbiol 1981; 13:882.

Turner JA: Giardiasis and infections with *Dientamoeba fragilis*. Pediatr Clin North Am 1985; 32:865.

Ubelaker HE: *Acanthamoeba* spp: 'opportunistic pathogens'. Trans Am Microsc Soc 1991; 110:289.

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, et al: Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop 1999; 72:203.

Van Gool T, Snijders F, Reis P, et al: Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescent technique. J Clin Pathol 1993; 46:694.

Van Meirvenne N, le Ray D: Diagnoses of African and American trypanosomiases. Br Med Bull 1985; 41:156.

Varga JH, Wolf TC, Jensen HG, et al: Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin, and polyhexamethylene biguanide. Am J Ophthalmol 1993; 115:466.

Varma M, Hester JD, Schaefer III FW, et al: Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. J Microbiol Methods 2003; 53:27.

Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, et al: Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42:1220.

Visvesvara GS: Pathogenic and opportunistic free-living amebae. *In* Murray PR, Barron EJ, Joregenson JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press 2003, p 1981.

Visvesvara GS: Parasite culture: *Entamoeba histolytica*. *In* Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2004a p 9.9.1.1.

Visvesvara GS: Parasite culture: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. *In* Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed Washington, DC, American Society for Microbiology, 2004b p 9.9.5.1.

Visvesvara GS, Schuster FL, Marinez AJ: *Balamuthia mandrillaris* N.G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. J Eukaryot Microbiol 1993; 40:504.

Von Lichtenberg F: Pathology of Infectious Diseases. New York, Raven Press, 1991.

Walzer PD, Genta RM: Parasitic Infections in the Compromised Host. New York, Marcel Dekker, 1989.

Wang SS, Feldman HA: Isolation of *Hartmanella* species from human throats. N Engl J Med 1967; 277:1174.

Warren KS, Mahmoud AAF (eds): Tropical and Geographical Medicine, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1990.

Weber R, Bryan RT, Owen RL, et al: Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. N Engl J Med 1992; 326:161.

Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL: Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 1994; 7:426.

Weigle KA, Davalos M, Heredia P, et al: Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg 1987; 36:489.

Weinberg GA: Laboratory diagnosis of ehrlichiosis and babesiosis. Pediatr Infect Dis J 2001; 20:435.

Weiss JB: DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995; 8:113.

World Health Organization: The Epidemiology and Control of African Trypanosomiasis. WHO Tech Rep Ser No 739. Geneva, WHO, 1986.

World Health Organization: The Biology of Malaria Parasites. WHO Tech Rep Ser No 743. Geneva, WHO, 1987.

Willson R, Harrington R, Stewart B, et al: Human immunodeficiency virus 1 associated necrotizing cholangitis caused by infection with *Septata intestinalis*. Gastroenterology 1995; 108:247.

Wilson M, Jones JL, McAuley JB: *Toxoplasma*. *In* Murray PR, Barron EJ, Joregenson JH, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press 2003, p 1970.

Wilson M, Schantz P, Pieniazek N: Diagnosis of parasitic infections: Immunologic and molecular methods. *In* Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington, DC, ASM Press, 1995, p 1159.

Wittner M, Tanowitz HB, Weiss LM: Parasitic infections in AIDS patients. Infect Dis Clin North Am 1993; 7:569.

Wittner M, Turner JW, Jacquette G, et al: Eustrongylidiasis – a parasitic infection acquired by eating sushi. N Engl J Med 1989; 320:1124.

Wolfe MS: Giardiasis. Clin Microbiol Rev 1992; 5:93.

Woods GLY, Gutierrez DH, Walker DT, et al: Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993.

Yang J, Scholten T: *Dientamoeba fragilis*: a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission, and diagnosis. Am J Trop Med Hyg 1977; 26:16.

Zierdt CH: *Blastocystis hominis* past and future. Clin Microbiol Rev 1991; 4:61.

Zimmerman SK Needham CA: Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor Cryptosporidium/Giardia Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT Giardia EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbiol 1995 33:1942.

CAPÍTULO 62

Patologia molecular das doenças infecciosas

Michael A. Pfaller MD

Aplicações de métodos moleculares na microbiologia clínica 1330

Detecção de patógenos sem amplificação de alvo 1330

Sondas de ácido nucleico para identificação de culturas 1332

Amplificação de ácido nucleico para diagnóstico 1333
- Diagnóstico de infecção viral 1334
- Detecção de patógenos bacterianos 1336
- Detecção de fungos 1337
- Detecção de parasitas 1338
- Identificação de culturas 1338
- Detecção de resistência antimicrobiana 1338

Epidemiologia molecular 1340
- Métodos de tipagem molecular DNA-dependentes 1340
- Tipagem molecular DNA-independente 1342

Padronização, controle de qualidade e teste de proficiência de métodos diagnósticos moleculares 1343

Referências bibliográficas 1344

PONTOS-CHAVE

- Os métodos de diagnóstico molecular continuam sendo mais valiosos para caracterização de agentes infecciosos cujas detecção e identificação por meio dos métodos convencionais são difíceis ou impossíveis.
- Quando combinadas à moderna sorologia, a citometria de fluxo e as ferramentas poderosas, tais como a microscopia eletrônica e a espectroscopia de massa, as técnicas moleculares têm melhorado notavelmente nossa capacidade de realizar detecções rápidas (com fornecimento de resultados no mesmo dia) e acuradas de diversos patógenos emergentes (novos) e reemergentes, bem como de patógenos comumente encontrados na prática médica.
- Os métodos diagnósticos moleculares estão se tornando mais práticos e custo-efetivos, enquanto os benefícios proporcionados aos pacientes estão sendo mais amplamente reconhecidos. Entretanto, ainda constitui uma tecnologia cara e que requer equipe de funcionários habilitados, além de estar associada a questões problemáticas referentes a reembolso.
- A tecnologia da hibridização *in situ* emprega corantes fluorescentes associados a sondas de ácido nucleico para produzir uma "coloração filogenética". Esta, por sua vez, permite detecção e identificação simultâneas de um organismo, ao mesmo tempo em que é preservada a morfologia e localização espacial desse organismo em um tecido ou material clínico.
- O desenvolvimento comercial da reação em cadeia da polimerase (PCR) concentrou-se principalmente nos sistemas de detecção e quantificação de infecções virais específicas, detecção de *Mycobacterium tuberculosis* e dos principais agentes causadores das doenças sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*).
- A adaptabilidade da PCR em tempo real expandiu o número de patógenos detectáveis pelos sistemas comerciais, incluindo patógenos farmacorresistentes (*Staphylococcus aureus* meticilina-resistente e enterococos vancomicina-resistentes), bem como patógenos emergentes e reemergentes selecionados.
- Um teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT, *nucleic acid amplification test*) recém-proposto deve ser validado por meio da comparação com uma cultura sensível e ao menos uma PCR ou outro NAAT já validado, cujo alvo seja um gene diferente ou uma sequência diferente de um mesmo gene.
- Ao selecionar um ensaio de detecção de carga viral, além do desempenho do ensaio, recomenda-se considerar o *throughput* de amostra e requerimentos de volume, limite de detecção, facilidade de execução, espaço de trabalho ocupado pelo equipamento e custos de disponibilização dos reagentes.
- Quando aplicada em casos de infecção viral do sistema nervoso central e de infecções agudas do trato respiratório em crianças, foi demonstrado que a PCR multiplex aumenta o rendimento diagnóstico, reduz terapias antimicrobianas inadequadas, promove terapias mais focadas e patógeno-específicas, facilita a implementação de medidas preventivas de controle da infecção e contribui para a melhora global do resultado do paciente.
- A disponibilização de técnicas de sequenciamento aprimoradas, bancos de dados mais amplos e confiáveis, e de kits e *softwares* mais prontamente disponíveis faz da análise sequencial do rRNA 16S uma alternativa competitiva às técnicas de identificação microbiana de rotina utilizadas para certos grupos de organismos.

Os enormes avanços ocorridos na biotecnologia, na segunda metade da década de 1990 e no início dos anos 2000, resultaram no desenvolvimento e refinamento de um notável conjunto de técnicas modernas, que atualmente são aplicadas no diagnóstico de doenças infecciosas (Tab. 62.1). Entre essas técnicas, as principais são as ferramentas de biologia molecular, que são utilizadas regularmente em laboratórios clínicos no mundo inteiro para diagnóstico de doenças, orientação de terapias antimicrobianas e controle hospitalar epidemiológico e de infecções (Pfaller, 2001; Wolk, 2001; Raoult, 2004).

Os métodos de diagnóstico molecular continuam sendo mais valiosos para a caracterização de agentes infecciosos cujas detecção e identificação utilizando os métodos convencionais são difíceis ou mesmo impossíveis. De modo semelhante, quando combinadas à moderna sorologia, citometria de fluxo e ferramentas poderosas, tais como a microscopia eletrônica e a espectroscopia de massa, as técnicas moleculares têm melhorado notavelmente nossa capacidade de realizar detecções rápidas (com fornecimento de resultados no mesmo dia) e acuradas de diversos patógenos emergentes (novos) e reemergentes, bem como de patógenos comumente encontrados na prática médica (Alvarez-Barrientos, 2000; Houpikian, 2002; Mezzasoma, 2002; Hazelton, 2003; Cockerill, 2004; Raoult, 2004). Os princípios dessas técnicas, sendo relevantes para o dignóstico laboratorial, são abordados em outros capítulos do livro. Este capítulo trata das aplicações práticas dessas abordagens modernas para diagnóstico e supervisão de doenças infecciosas.

O diagnóstico molecular de doenças infecciosas baseia-se em grande parte nos ácidos nucleicos e requer isolamento desse material a partir dos microrganismos e materiais clínicos, bem como o uso de enzimas de restrição (endonucleases), eletroforese em gel e técnicas de hibridização de ácidos nucleicos. Cada vez mais, as técnicas mais modernas de amplificação de ácido nucleico estão sendo aplicadas à análise do material clínico (Wolk, 2001). Novas plataformas, como o PCR em tempo real, combinam a amplificação de ácido nucleico e a detecção

Tabela 62.1 Técnicas modernas utilizadas no diagnóstico de doenças infecciosas

I. Detecção direta

A. Detecção molecular
   1. Sondas de ácido nucleico
      a. Hibridização em fase líquida
      b. Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)
   2. Amplificação de alvo
   3. Amplificação de sinal

B. Microarranjos de DNA

C. Citometria de fluxo

D. Microscopia eletrônica (ME)

II. Sorologia moderna

A. Microarranjos de antígeno

B. Antígenos sintéticos

III. Identificação molecular e teste de resistência antimicrobiana

A. Sequenciamento de ácido nucleico

B. Microarranjos de DNA
   1. Identificação de gênero, espécie e cepa
   2. Genes de resistência
   3. Mutação genética
   4. Análise de expressão gênica

C. Tipagem de epidemiologia molecular

D. Espectrometria de massa

por fluorescência do produto de amplificação em um único sistema fechado, resultando em uma forma altamente flexível, rápida e acurada de diagnosticar um espectro de doenças infecciosas que continua sendo ampliado (Cockerill, 2004). A análise de sequência de DNA tornou-se altamente automatizada e agora também é prática para ser usada em laboratórios diagnósticos e de referência maiores, na identificação de um vasto número de microrganismos cultiváveis ou não cultiváveis (Aman, 1994; Wilson, 1994; Clarridge, 2004). A tecnologia de arranjo molecular passou por um refinamento e, atualmente, está começando a atingir seu considerável potencial para caracterização de microrganismos em laboratórios clínicos (Boriskin, 2004; Stöver, 2004; Zhou, 2004).

Uma importante consideração relativa à aplicação mais ampla das técnicas moleculares é o custo (Pfaller, 2001). Na área de diagnóstico de doenças infecciosas, um resultado melhorado de paciente, o custo reduzido de agentes antimicrobianos e a duração da internação hospitalar constituem fatores que podem superar os custos laboratoriais mais elevados. Embora seja difícil quantificar, atualmente existem alguns exemplos excelentes dos efeitos positivos e custo-efetivos das aplicações diagnósticas dos métodos moleculares (Shrestha, 2003a; Clarridge, 2004; Diekema, 2004; Scheuermann, 2004). No caso das doenças transmissíveis, os custos podem ser justificados por medidas aprimoradas de controle da infecção com o intuito de proteger pacientes e profissionais da saúde (Cockerill, 2004). A epidemiologia molecular pode fornecer uma contribuição real para a detecção e o controle da disseminação nosocomial de infecções, com potencial de reduzir as taxas de infecção nosocomial e a necessidade de utilizar agentes antimicrobianos caros no tratamento de organismos resistentes (Hacek, 1999; Pfaller, 2001). Notavelmente, os métodos de diagnóstico molecular estão se tornando mais práticos e custo-efetivos, enquanto os benefícios em termos de assistência ao paciente estão sendo cada vez mais reconhecidos. Todavia, ainda se trata de uma tecnologia cara, que requer funcionários habilitados e que está associada a questões problemáticas relativas ao reembolso (Kant, 1995; Ross, 1999). Por causa desses aspectos, a necessidade de um estabelecimento de implantar testes de diagnóstico molecular para doenças infecciosas deve ser avaliada de modo crítico pelos serviços clínico e laboratorial envolvidos (Pfaller, 2001; Cockerill, 2004). Em muitos casos, a supervisão da solicitação de teste e o uso prudente de um laboratório de referência podem ser as opções mais viáveis.

Aplicações de métodos moleculares na microbiologia clínica

O uso de métodos moleculares para identificação e detecção direta de microrganismos na microbiologia clínica está se tornando cada vez mais prático, e hoje diversos produtos já estão comercialmente disponíveis (Tabs. 62.2 e 62.3). As sondas de ácido nucleico são empregadas para detecção direta de organismos no material clínico ou para identificação de organismos previamente isolados (Tab. 62.2). Técnicas baseadas na amplificação também podem ser utilizadas para detecção, quantificação e identificação, bem como para definir características selecionadas (p. ex., genes codificadores de resistência a antibióticos) dos organismos (ver Tabs. 62.3 a 62.7). Por fim, os métodos moleculares constituem um meio poderoso de caracterizar organismos (até o nível de subespécies) em investigações epidemiológicas (ver Tab. 62.8).

Detecção de patógenos sem amplificação de alvo

A detecção de microrganismos patogênicos diretamente nas amostras utilizando sondas de ácido nucleico foi extensivamente investigada por meio de uma variedade de formatos de hibridização e geração de sinal (Juretschko, 2004; Li, 2004). O desenvolvimento de um produto comercial tem se concentrado no diagnóstico direto das doenças sexualmente transmissíveis e na detecção de patógenos respiratórios empregando hibridização em solução-fase e sondas marcadas com éster de acridínio, embora atualmente esteja sendo disponibilizado um número crescente de sondas para detecção de organismos no material clínico por hibridização *in situ* com fluorescência (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) (Tab. 62.2).

O diagnóstico direto com uso de sonda é rápido e isento dos problemas de contaminação associados à amplificação do alvo, além de ser menos suscetível à inibição do que muitos procedimentos de amplificação. Uma limitação da técnica de hibridização com sonda padrão é a necessidade de haver 10^4 ou mais cópias de ácido nucleico-alvo para detecção. Para algumas aplicações, seria valioso um método conveniente, rápido, que não se baseasse em cultura e apresentasse esse nível de sensibilidade. As estratégias de amplificação de sinal chegam a detectar números de cópias de genes tão baixos quanto 500/μL (Shah, 1994; Murphy, 1999). Entretanto, até mesmo os formatos mais sofisticados de amplificação de sinal atualmente não parecem corresponder à sensibilidade analítica dos métodos-alvo à base de amplificação, que podem detectar menos de 50 cópias de genes/μL (Erali, 1999).

Nos diagnósticos de doenças infecciosas, parece improvável que a hibridização com sonda à base de membrana (*Southern blot*, *slot/dot blot*) venha a ser uma ferramenta significativa no laboratório clínico. O formato baseado em membrana talvez seja mais aplicável ao processamento de lotes de grandes números de amostras para fins de pesquisa. A classificação dos genótipos do papilomavírus humano (HPV) e a detecção confiável desse vírus em amostras diagnósticas tornaram-se possíveis, a princípio, graças ao desenvolvimento dos ensaios utilizando sonda de DNA à base de membrana. Foi descrita uma variedade de sondas integrais genômicas e de oligonucleotídeos para os tipos mais comuns de HPV (p. ex., tipos 16 e 18, comumente associados ao carcinoma cervical uterino, e os tipos 6 e 11, associados à doença benigna). Além disso, têm sido utilizadas identificações tanto isotópicas quanto não isotópicas (Angel, 1992; Lorinez, 1992; Faulkner-Jones, 1993; Scheuermann, 2004). Essa abordagem foi em grande parte substituída pelo ensaio de captura híbrida (HCA, *hybrid capture assay*) e pela PCR aliada ao sequenciamento (Scheuermann, 2004). Os formatos de *slot/dot blot* também foram investigados quanto à utilidade no diagnóstico da toxoplasmose cerebral e da malária falcípara, entre outras doenças, mas não foram utilizados em nenhum nível nos laboratórios clínicos.

Uma abordagem direta que vem se tornando cada vez mais útil para visualização de microrganismos em materiais clínicos é a FISH (Jansen, 2000; Kempf, 2000; Hayden, 2001a, 2001b, 2002; Juretschko, 2004). A tecnologia da FISH emprega corantes fluorescentes incorporados a sondas de ácido nucleico para produzir uma "coloração filogenética", permitindo detectar e identificar simultaneamente um organismo, ao mesmo tempo em que são preservadas a sua morfologia e localização espacial no tecido ou material clínico (Juretschko, 2004). A FISH é reconhecida como

Tabela 62.2 Método de sonda de ácido nucleico selecionado para detecção e identificação de patógenos bacterianos, fúngicos e virais

Organismo(s)	Tipo(s) de amostra	Método(s)
Bactérias		
Campylobacter spp.	Cultura de fezes	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Chlamydia trachomatis	*Swab* cervical e uretral; urina	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente, captura híbrida
Enterobacteriaceae	Sangue	FISH
Haemophilus influenzae	LCE ou cultura de *swab* de garganta	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Klebsiella pneumoniae	Cultura sanguínea	FISH
Listeria monocytogenes	Isolado cultivado	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Complexo *Mycobacterium tuberculosis*	Cultura de amostra respiratória	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Complexo *M. avium*	Cultura de amostra respiratória	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
M. gordonae	Cultura de amostra respiratória	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
M. kansasii	Cultura de amostra respiratória	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Neisseria gonorrhoeae	*Swab* ou cultura cervical ou uretral	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente, captura híbrida
Pseudomonas aeruginosa	Cultura sanguínea	FISH
Staphylococcus aureus	Cultura sanguínea	FISH com sondas PNA
S. aureus meticilina-resistente	Organismo cultivado	Sonda de ciclagem colorimétrica *mecA*-específica
Streptococcus spp.	Cultura sanguínea	FISH
S. pyogenes	*Swab* de garganta	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Fungos		
Candida albicans	Cultura sanguínea	FISH com sondas PNA
Coccidioides immitis	Isolado cultivado	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Blastomyces dermatitidis	Isolado cultivado	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Histoplasma capsulatum	Isolado cultivado	Hibridização em solução-fase, sonda quimioluminescente
Virus		
Citomegalovírus	Sangue total, CBS	Captura híbrida, hibridização *in situ*
Vírus da hepatite B	Sangue	DNA de cadeia ramificada
Vírus da hepatite C	Sangue	DNA de cadeia ramificada
Vírus do herpes simples	Líquido das vesículas	Captura híbrida
Vírus da imunodeficiência humana	Sangue	DNA de cadeia ramificada
Papilomavírus humano	*Swab* ou amostra de biópsia cervical	Captura híbrida, hibridização *in situ*
Vírus Epstein-Barr	LCE	Hibridização *in situ*

A lista não inclui todos.

LCE = líquido cerebrospinal; FISH = hibridização *in situ* com fluorescência; PNA = ácido peptídeo-nucleico; CBS = células brancas sanguíneas.

um método rápido, custo-efetivo e confiável tanto para detecção quanto para identificação de uma ampla variedade de espécies de bactérias, vírus, fungos e protozoários de importância clínica (Tab. 62.2) (Hogardt, 2000; Jansen, 2000; Kempf, 2000; Hayden, 2001a, 2001b, 2002; Oliveira, 2002, 2003; Chapin, 2003; Juretschko, 2004; Wilson, 2005). Sondas específicas individuais para cada patógeno podem ser derivadas a partir da análise das sequências de rDNA 16S e/ou 18S e, em seguida, utilizadas em um "esfregaço direto final" para detecção e identificação dos patógenos antes da cultura (Juretschko, 2004). Além disso, a FISH pode ser utilizada para identificar organismos de crescimento lento e fastidiosos, que, talvez, dificilmente sejam diferenciados pelos ensaios bioquímicos. A FISH pode ser acoplada à microscopia confocal, citometria de fluxo ou métodos imunológicos para fornecer uma caracterização detalhada dos microrganismos (Juretschko, 2004). O recente desenvolvimento das sondas de ácido nucleico peptídico (PNA, *peptide nucleic acid*) tem fornecido reagentes para uso na FISH que exibem características de hibridização favoráveis (altos níveis de especificidade, forte afinidade e cinética rápida) e possuem maior capacidade de penetrar a parede celular hidrofóbica dos organismos após a preparação de um esfregaço padrão (Stender, 1999; Oliveira, 2002; Juretschko, 2004). Essa tecnologia rápida, sensível e específica se ajusta facilmente ao fluxo de trabalho padrão do laboratório de microbiologia clínica, devendo se mostrar comprovadamente cada vez mais valiosa conforme novos reagentes forem sendo disponibilizados.

Os sistemas de sonda comerciais empregam a hibridização em solução-fase com identificação não isotópica. Aqueles que dispensam o uso de amplificação de sinal serão considerados primeiramente. Os produtos PACE2 marcados com éster de acridínio (Gen-Probe) e detecção de quimioluminescência talvez sejam os mais amplamente utilizados. Os ensaios da Gen-Probe não utilizam sondas radiomarcadas e isso permite que o tempo de prateleira seja prolongado. Além disso, a formatação do produto é relativamente de fácil utilização pelo usuário, podendo ser empregada tanto para números pequenos quanto para números significativos de amostras.

Os ensaios de hibridização com sonda de ácido nucleico têm como alvo processos infecciosos em que há patógenos em concentração suficiente para permitir que os métodos de amostragem atualmente utilizados consigam obter um número adequado de organismos para detecção pelos ensaios, sem necessidade de realizar amplificação. Atualmente, já existem no mercado sondas Gen-Probe (marcadas com éster de acridínio) para detecção de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo β-hemolítico do grupo A) em *swabs* de garganta, bem como para detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em *swabs* cervicais e uretrais (Tab. 62.2). Uma única amostra pode ser utilizada para detecção de ambos, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. A confiabilidade do kit Gen-Probe para detecção de *C. trachomatis* em amostras clínicas foi comparativamente avaliada em relação a cultura celular, métodos imunológicos e métodos de amplificação de alvo. Em contraste com a cultura, os métodos imunológico e molecular foram independentes da viabilidade do patógeno. Em uma comparação direta, o método PACE2 Gen-Probe mostrou-se mais sensível do que o imunoensaio enzimático (EIA) para clamidiazima, porém, menos sensível do que um ensaio comercial de amplificação de alvo (AMP-CT, Gen-Probe) (Wylie, 1998). O ensaio Gen-Probe para *N. gonorrhoeae* foi avaliado em diversos estudos e a opinião geral é a de que se trata de um método mais útil quando é difícil otimizar as culturas (Koumans, 1998). O fato de os ensaios para detecção de gonococo e clamídia poderem ser realizados com uma única coleta por *swab* representa uma vantagem significativa e torna esses testes mais viáveis, sobretudo em estabelecimentos com alto fluxo de pacientes ambulatoriais (Koumans, 1998; Li, 2004). É preciso notar que as culturas de *Chlamydia* e gonococos continuam sendo um requisito para fins de medicina legal (Koumans, 1998).

Os ensaios de cadeia de DNA ramificada (bDNA, *branched DNA*; Bayer) e de captura híbrida (HCA; Digene) constituem estratégias de testes diagnósticos que utilizam sondas e incorporam a amplificação de sinal (Wolk, 2001). Foram descritos HCAs para detecção de HPV, vírus do herpes simples (HSV) e citomegalovírus (CMV) (Scheuermann, 2004). Foi relatado que os HCAs são mais sensíveis do que as culturas para detecção de HSV e CMV. A introdução de modificações no ensaio de detecção de HPV tem melhorado a sensibilidade do teste (Poljak, 1999). O sistema HCA, contudo, ainda é menos sensível do que a amplificação de ácido nucleico-alvo (Cope, 1997; Cullen, 1997; Barrett-Muir, 1998; Poljak, 1999).

As sondas de cadeia ramificada de DNA (bDNA; Bayer) foram desenvolvidas para detecção e quantificação do vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV) (Urdea, 1991; Heerman, 1999), ví-

Tabela 62.3 Sistemas de amplificação de ácido nucleico para diagnóstico de doenças infecciosas

Organismo	Tipo(s) de amostra	Tecnologia de amplificação	Detecção do amplicon
Bacillus anthracis	Amostras humanas e oriundas do meio ambiente	PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Bordetella pertussis	Amostras respiratórias	PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Chlamydia trachomatis	*Swabs* cervicais e uretrais; urina	PCR*	Sonda de captura de microtitulador
		NASBA†	Sonda de oligonucleotídeo fixada em pérola magnética
		TMA‡	Sonda de éster de acridínio
		SDA¶	Sonda de captura de micropoço
Neisseria gonorrhoeae	*Swabs* cervicais e uretrais	PCR*	Sonda de captura de micropoço
		SDA¶	Sonda de captura de microtitulador
Mycobacterium tuberculosis	Respiratória	PCR*	Sonda de captura de micropoço
		TMA‡	Sonda de éster de acridínio
		SDA¶	Sonda de captura de micropoço
S. aureus meticilina-resistente	*Swab* nasal	PCR em tempo real‖	Sonda-guia molecular (fluorescência)
Enterococos vancomicina-resistentes (*van*A & B)	Fezes, *swab* retal	PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Citomegalovírus	Sangue, LCE	PCR*	Sonda de captura de microtitulador
		NASBA†	Sonda de oligonucleotídeo fixa em pérola magnética
Vírus Epstein-Barr	LCE	PCR*	Sonda de captura de microtitulador
Vírus da hepatite B	Sangue	PCR*	Sonda de captura de microtitulador
Vírus da hepatite C	Sangue	RT-PCR*	Sonda de captura de microtitulador
		NASBA†	Sonda de oligonucleotídeo fixa em pérola magnética
		TMA§	Sonda de éster de acridínio
Vírus da imunodeficiência humana	Sangue	RT-PCR*	Sonda de captura de microtitulador
		NASBA†	Sonda de oligonucleotídeo fixa em pérola magnética
Papilomavírus humano	*Swab* e biópsia cervical	PCR*	Linha-sonda
		HCA**	Captura híbrida quimioluminescente
Vírus do herpes simples	LCE, pele (vesícula), trato genital	PCR*	Sonda de captura de microtitulador
		PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Enterovírus	LCE	PCR*	Sonda de captura de microtitulador
		PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Vírus varicela-zóster	Lesão cutânea	PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Vírus da varíola	Lesão cutânea	PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Vírus West Nile	LCE	PCR em tempo real*	Sondas de FRET
Coronavírus da SARS	Respiratória	PCR em tempo real*	Sondas de FRET

Esta tabela contém exemplos de sistemas disponíveis, sem a pretensão de incluir todos os sistemas existentes.

* Roche, Indianapolis, IN. † BioMérieux, St Louis, MO. ‡ Gen-Probe, San Diego, CA. § Bayer, Tarrytown, NY. ¶ Becton Dickinson, Cockeysville, MD. ‖ Infectio Diagnostic Sainte-Foy, Quebec. ** Digene, Silver Spring, MD.

LCE = líquido cerebrospinal; FRET = transferência de energia de ressonância de fluorescência; HCA = ensaio de captura híbrida; LCR = reação em cadeia da ligase; NASBA = amplificação baseada em fita de ácido nucleico; PCR = reação em cadeia da polimerase; SDA = amplificação por deslocamento de fita; TMA = amplificação mediada por transcrição.

rus da imunodeficiência humana (HIV) (Murphy, 1999) e para detecção do gene *mec*A, associado à resistência à oxacilina em estafilococos (Kolbert, 1998). Esse ensaio de hibridização com sonda é apresentado em formato similar a um EIA. Os ácidos nucleicos liberados pelos organismos são capturados em uma superfície sólida por múltiplas sondas de captura. As sondas-alvo hibridizam-se tanto ao ácido nucleico microbiano quanto ao multímero amplificador de sinal bDNA. Sondas enzimaticamente marcadas estão ligadas ao bDNA, e a detecção se dá por meio de um processo de quimioluminescência, no qual a luz é emitida de modo proporcional à quantidade original de alvo presente (Wolk, 2001). O limite de detecção de ácido nucleico-alvo não é tão baixo quanto os níveis que podem ser obtidos com a amplificação do alvo (Zaaijer, 1994; Yen-Lieberman, 1996; Lunel, 1999). Os resultados quantitativos que abrangem uma ampla faixa de concentrações de alvo podem ser úteis para determinação da carga viral, do prognóstico e no monitoramento da resposta à terapia em diversas infecções virais (Yen-Lieberman, 1996; Heerman, 1999; Lunel, 1999).

A reação em cadeia da ligase (LCR, *ligase chain reaction*; Abbott), amplificação da replicase Q-beta (Gene-Trak), tecnologia *Invader* (ThirdWave Technologies) e tecnologia *Cycling Probe* (Velogene) constituem tecnologias de amplificação com sondas, nas quais o produto final da reação é uma versão amplificada dos componentes originais utilizados na detecção do alvo (Wolk, 2001). A tecnologia *Cycling Probe* consiste em uma reação isotérmica rápida que tem sido empregada para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* (Beggs, 1996), *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SAMR) (Bekkaoui, 1999) e enterococos vancomicina-resistentes (EVR) (Modrusan, 1999). Essa tecnologia é mais útil na identificação de organismos que foram mantidos cultivados do que na detecção direta desses organismos em amostras clínicas.

Sondas de ácido nucleico para identificação de culturas

As sondas de DNA atualmente possuem um papel estabelecido na identificação de culturas de certo número de microrganismos (Tab. 62.2). A identificação de culturas pela hibridização com sonda não é limitada pela necessidade de detectar quantidades mínimas de ácido nucleico. A identificação baseada em sondas é mais vantajosa do que os métodos não moleculares no caso dos organismos de crescimento lento, como as micobactérias, ou de organismos para os quais não existem sistemas comerciais de identificação. Outro papel importante das sondas moleculares é a identificação direta de microrganismos em amostras de cultura de sangue, orientada pela morfologia do organismo demonstrada por coloração de Gram (Jansen, 2000; Kempf, 2000; Chapin, 2003; Oliveira, 2003; Lindholm, 2004; Wilson, 2005). Embora a identificação por hibridização com sonda seja mais cara do

que a identificação que utiliza os métodos convencionais, um método rápido (concluído em 1 hora, no caso de cultura positiva) e acurado de identificação direta de patógenos a partir de culturas positivas pode melhorar bastante a supervisão da terapia antibiótica, bem como reduzir o uso inadequado de agentes antimicrobianos.

A identificação de micobactérias cultivadas por meio dos métodos convencionais é lenta e demorada. No mercado, atualmente são disponibilizadas sondas marcadas com éster de acridínio (Gen-Probe) para identificação do complexo de *M. tuberculosis*, complexo de *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium kansasii*. O uso dessas sondas possibilita a identificação a partir de culturas em 1 dia útil, e com especificidade e sensibilidade (99% e 95,5%, respectivamente) excelentes (Goto, 1991; Walton, 1991; Richter, 1999; Scarparo, 2001; Li, 2004). Ocasionalmente, cepas de *M. tuberculosis* podem falhar em reagir com a sonda do complexo de *M. tuberculosis*, e parece haver uma subespécie de *M. kansasii* que falha em reagir com a sonda de *M. kansasii* (Badak, 1999; Niemann, 1999).

Também existem sondas disponíveis para identificação a partir de culturas de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Cryptococcus neoformans* (Stockman, 1993). Avaliações apontam uma especificidade de 100% e uma sensibilidade maior ou igual a 97% para todas as espécies, exceto *B. dermatitidis* (87,8%). Com a repetição dos testes, notou-se uma melhora da sensibilidade (97,3% para *B. dermatitidis* e 100% para as demais espécies). Há pouco tempo, uma sonda de FISH PNA específica para *Candida albicans*, disponibilizada no mercado, mostrou-se útil para diferenciar leveduras de *C. albicans* de leveduras de outros organismos presentes em alíquotas coletadas diretamente de garrafas positivas de cultura sanguínea (Oliveira, 2001; Wilson, 2005).

O sistema de sondas para *N. gonorrhoeae* Gen-Probe foi utilizado na identificação de *N. gonorrhoeae* cultivada, adicionalmente à sua aplicação direta no exame de amostras clínicas (Young, 1993; Koumans, 1998). A sonda de *N. gonorrhoeae* (AccuProbe) compara-se de modo favorável a um sistema rápido de utilização de carboidratos comerciais (Quadferm, BioMérieux) e a um sistema de coaglutinação (Phadeback Monoclone GC test) para identificação de *N. gonorrhoeae* cultivada. Atualmente, existem sondas de ácido nucleico marcadas com éster de acridínio disponíveis para identificação de diversas bactérias cultivadas, entre as quais *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes* e *Haemophilus influenzae* (Tab. 62.2). Essas sondas têm sido utilizadas para identificar organismos coletados por centrifugação a partir de culturas de sangue positivas (Davis, 1991; Lindholm, 2004). A identificação é de fácil execução e os resultados são disponibilizados em cerca de 30 minutos.

A tecnologia FISH também foi empregada na identificação rápida de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como de *C. albicans*, diretamente a partir de culturas sanguíneas positivas (Jansen, 2000; Kempf, 2000; Oliveira, 2001, 2003; Chapin, 2003; Wilson, 2005). Tanto as sondas de ácido nucleico quanto as sondas PNA que têm como alvo o rRNA 16S (rRNA 18S para *C. albicans*) foram utilizadas e demonstraram sensibilidade e especificidade (97 a 100%) satisfatórias em 2,5 horas de cultura sanguínea positiva. A escolha das sondas foi orientada pela morfologia Gram dos organismos no caldo de cultura sanguínea. Os resultados da FISH não foram afetados pelo tipo de sistema de cultura de sangue nem pela formulação do caldo (p. ex., meio lítico, meio contendo resina ou carvão). Essa abordagem propiciou uma economia de tempo de 26 a 46 horas, em comparação aos métodos laboratoriais convencionais utilizados para identificação. Provavelmente, os custos da FISH (cerca de U$ 20/amostra de cultura de sangue positiva) podem ser justificados pela quantia que poderia ser economizada evitando-se terapias antimicrobianas desnecessárias e, talvez, pela redução do tempo de internação hospitalar (Kempf, 2000). Além disso, a redução de tratamentos antimicrobianos desnecessários exerce impacto favorável no perfil de suscetibilidade antimicrobiana de patógenos nosocomiais e, assim, beneficia um número ainda maior de pacientes.

Amplificação de ácido nucleico para diagnóstico

A amplificação de ácido nucleico tem o potencial de sobrepujar a principal limitação da hibridização com sonda diagnóstica, amplificando seletivamente alvos específicos presentes em concentrações baixas em relação aos níveis detectados. A PCR (Roche Molecular Systems) foi a primeira técnica de amplificação a ser desenvolvida e continua sendo a mais amplamente investigada e aplicada. As tecnologias de amplificação mais novas – amplificação baseada em fita de ácido nucleico (NASBA, *nucleic acid strand-based amplification*; BioMérieux), amplificação de deslocamento de fita (SDA, *strand displacement amplification*; Becton Dickinson) e amplificação mediada por transcrição (TMA, *transcription-mediated amplification*; Gen-Probe) – constituem a base dos sistemas adicionais atualmente disponíveis (Wolk, 2001).

Diversas modificações da PCR convencional foram desenvolvidas na tentativa de expandir e aprimorar essa tecnologia (Wolk, 2001). A PCR multiplex emprega múltiplos conjuntos de iniciadores e pode ser utilizada para identificar múltiplos organismos, ou múltiplos alvos, em uma única mistura reativa (Tab. 62.4). A *nested*-PCR (PCR em ninho) emprega etapas sequenciais de amplificação para aumentar a sensibilidade da PCR. A transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) é utilizada na detecção de RNA com auxílio de uma enzima que apresenta atividade

Tabela 62.4 Aplicações da PCR multiplex no diagnóstico de doenças infecciosas

Manifestação(ões) clínica(s)	Amostra(s)	Patógenos-alvo
Meningite, encefalite e/ou meningoencefalite	LCE	HSV, CMV, EBV, HHV-6 e EV EBV; *Toxoplasma gondii*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*
Infecções envolvendo o trato respiratório superior e inferior	*Swabs* de garganta, nariz e nasofaríngeo (NF); aspirados NF e endotraqueal; lavado broncoalveolar	Influenza, parainfluenza, RSV, adenovírus e *Mycobacterium pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *M. pneumoniae* e adenovírus
Doença diarreica	Fezes, água	*Shigella* e *Escherichia coli* causadora de diarreia *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, *G. lamblia* e *Cryptosporidium parvum*
Infecção genital	*Swabs* e raspados genitais	HSV, *Haemophilus ducreyi* e *Treponema pallidum* HPV, HSV e *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*
Ceratoconjuntivite	*Swabs* conjuntivais e corneais	Adenovírus, HSV e *C. trachomatis*
Erupções cutâneas vesiculares	Líquido das vesículas	HSV e VZV
Estado imunológico comprometido	Sangue	HIV-1 e -2, HTLV-1 e -2
Malária	Sangue	*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*

CMV = citomegalovírus; EBV = vírus Epstein-Barr; EV = enterovírus; RSV = vírus sincicial respiratório; HHV-6 = herpesvírus humano-6; HIV = vírus da imunodeficiência humana; HPV = papiloma vírus humano; HSV = vírus do herpes simples; HTLV = vírus linfotrófico da célula T humana.

Fonte: parcialmente adaptado de Elnifro et al. (2000). A lista não inclui todas as aplicações.

de transcriptase reversa para criar um DNA complementar (cDNA) a partir do RNA-alvo. Esse cDNA, então, pode ser amplificado por PCR. A PCR quantitativa emprega um padrão interno e é utilizada para avaliar a quantidade de micróbios presente em uma amostra de paciente.

Talvez, o avanço mais recente ocorrido na tecnologia da PCR seja o uso da amplificação de ácido nucleico de ciclo rápido (uma PCR realizada em 30 minutos, em contraposição à PCR convencional, que demora horas ou dias) acoplada à detecção simultânea do amplicon fluorescente e realizada em um único sistema fechado, conhecido como PCR em tempo real (Wolk, 2001; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003; Cockerill, 2004). A PCR em tempo real minimiza o risco de contaminação cruzada do amplicon, além de ser uma plataforma de PCR bastante flexível, rápida e sensível (Tab. 62.5). Os protocolos de PCR em tempo real acoplam as determinações da curva de fusão (temperatura dependente de sequência em que metade das fitas se tornam separadas em solução) a sondas fluorescentes internas específicas, para garantir uma hibridização e identificação do produto mais específicas (Wolk, 2001). Existe uma variedade de formatos de sondas internas, incluindo sondas de hibridização, como as sondas de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*), sondas de hidrólise que utilizam a química Taqman (Applied Biosystems) e as sondas-guia moleculares (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003; Wolk, 2001). A PCR-RT pode ser realizada como um ensaio qualitativo altamente sensível ou ser utilizada como forma de quantificar o conteúdo de ácido nucleico patógeno-específico da amostra. Notavelmente, os ensaios de PCR quantitativos em tempo real com frequência fornecem intervalos lineares mais amplos do que aqueles fornecidos pela PCR quantitativa convencional (Wolk, 2001). Atualmente, existem vários equipamentos de PCR em tempo real com alto nível de automatização. Tais equipamentos incluem sistemas ópticos que excitam e detectam emissões fluorescentes em uma variedade de comprimentos de onda, além de potencialmente acelerarem os resultados das reações de PCR e aprimorarem a capacidade do PCR multiplex (Wolk, 2001). Os sistemas disponíveis incluem o equipamento LightCycler (Roche), o ABI Prism (Applied Biosystems), o equipamento SmartCycler (Cepheid) e o aparelho iCycler (Bio-Rad) (Wolk, 2001; Cockerill, 2004).

O desenvolvimento do PCR como produto comercial enfocou primariamente os sistemas existentes para detecção e quantificação de infecções virais específicas (HCV, HBV, HIV, CMV, EBV), bem como a detecção do complexo de *M. tuberculosis* e dos principais agentes de doenças sexualmente transmissíveis (*C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*) (Tab. 62.3). A adaptabilidade da PCR em tempo real expandiu o número de patógenos detectáveis pelos sistemas comerciais, incluindo os patógenos farmacorresistentes SAMR e EVR (Cockerill, 2004; Diekema, 2004; Sakai, 2004; Warren, 2004), bem como outros patógenos emergentes e reemergentes selecionados (Cockerill, 2004; Raoult, 2004). Os produtos comerciais são planejados visando à aceitabilidade do usuário, prevenção de contaminação, padronização de reagentes e condições, e ao potencial de automação. Foi relatado certo número de estudos que compararam dois ou mais métodos de amplificação (Griffith, 1997; Schepetiuk, 1997; Stary, 1998; Brown, 1999; Van Dyck, 2001; Klein, 2004; Koenig, 2004), sendo que nenhum dos métodos mais modernos (NASBA, TMA, SDA) apresentou um nível de sensibilidade maior do que o da PCR. Alguns fatores a serem considerados na escolha do sistema podem ser a gama de produtos disponíveis, a conveniência individual aos funcionários que trabalham no laboratório e o custo. É provavelmente mais prático para um laboratório escolher uma única plataforma de amplificação que seja capaz de fornecer toda a gama de testes necessários. A habilidade de alguns fabricantes de PCR em tempo real de fornecer reagentes para analitos específicos (RAE) para uso em seus equipamentos torna os ensaios mais facilmente adaptáveis para muitos laboratórios de microbiologia clínica (Cockerill, 2004).

No momento, os métodos moleculares exercem um papel estabelecido no diagnóstico molecular e na supervisão de certo número de infecções virais, bem como na garantia da segurança dos produtos do sangue (Roth, 1999; Smith, 2004). Esses métodos também são considerados essenciais à identificação de potenciais agentes de bioterrorismo por meio da Laboratory Response Network, bem como ao diagnóstico de doenças infecciosas emergentes (novas) ou reemergentes (Cockerill, 2004). No caso de diversos patógenos bacterianos, a avaliação do papel dos métodos moleculares em relação à cultura ou aos métodos imunológicos pode ser uma tarefa difícil (Hall, 2004a; Hayden, 2004; Ieven, 2004). Na maioria dos estudos, há certa quantidade de amostras que resultam positivas quando analisadas por ensaios baseados em amplificação, mas que resultam negativas quando são avaliadas por cultura ou pelos métodos imunológicos. A classificação dos resultados desses testes como falso-positivos por amplificação ou falso-negativos por cultura/detecção de antígeno tem implicações significativas para fins de cálculo da sensibilidade e especificidade do ensaio baseado em amplificação, bem como para julgar o mérito relativo dessas diferentes abordagens de diagnóstico laboratorial. Diversos pesquisadores tentaram resolver esse problema utilizando a técnica da análise discrepante. O valor e as limitações da análise discrepante permanecem controversos: seus proponentes a consideram a mais prática das abordagens disponíveis (Schachter, 1998), enquanto seus oponentes acreditam que o processo tende a distorcer os resultados em favor dos ensaios à base de amplificação (Hagdu, 1996; Miller, 1998). Somando-se a essas questões, existem preocupações expressas por outros pesquisadores, referentes à qualidade altamente variável de numerosos estudos publicados (Koumans, 1998). O uso de um padrão-ouro expandido ou de uma bateria de testes independentes em vez de um teste de referência absoluto (análise de classe latente) foi a prática sugerida como possível solução para esse dilema (Ieven, 2004). De modo ideal, um teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) recém-proposto deve ser validado por comparação com uma cultura sensível, ou pelo menos com um ensaio de PCR já validado ou outro NAAT que tenha como alvo um gene diferente ou uma sequência distinta de um mesmo gene (Ieven, 2004).

Tabela 62.5 Vantagens da PCR em tempo real

1. Rápida (30–40 min)
2. Sistema fechado
   Amplificação e detecção simultâneas
   Limita o risco de contaminação
3. Quantitativa
4. Detecção por fluorescência (não à base de gel)
5. Flexível
6. Padronização aprimorada
   Disponibilidade de kits
   Reagentes analito-específicos (ASRs)

Diagnóstico de infecção viral

A identificação do HCV tornou-se possível graças ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular. Portanto, não surpreende que a PCR e outros métodos moleculares exerçam papel importante em seu diagnóstico (Tab. 62.3). A sorologia permite detectar infecções prévias por HCV, mas não permite diferenciar uma infecção atual dos casos de pacientes que eliminaram o vírus espontaneamente. Como o HCV é um vírus de RNA, a transcrição reversa em cDNA constitui uma etapa preliminar essencial à amplificação por PCR. Foi descrita uma variedade de ensaios de PCR "de fabricação interna", utilizando transcriptase reversa e DNA polimerase (Fiebelkorn, 2004). A Roche Diagnostics comercializa um produto (Amplicor RT-PCR) em que a transcrição reversa e a amplificação são realizadas pela mesma enzima – a Tth, de *Thermus thermophilus* –, sendo que esse processo já foi automatizado (COBAS Amplicor System) (Poljak, 1997; Pfaller, 2004a). A detecção do vírus por métodos moleculares confirma casos de infecção vigente e possui um papel estabelecido no diagnóstico clínico da infecção por HCV, bem como no monitoramento da resposta à terapia (Fiebelkorn, 2004).

No diagnóstico da infecção por HIV, anticorpos vírus-específico são detectados por meio de testes sorológicos. Como é impossível prever a depuração espontânea do HIV, a detecção inequívoca desses anticorpos em geral é aceita como evidência de infecção em andamento. No caso de recém-nascidos, a detecção dos anticorpos pode refletir a transferência transplacentária de anticorpos maternos e pode ser necessário um período prolongado de acompanhamento (de até 18

meses) para confirmação da infecção utilizando apenas métodos sorológicos. A detecção do vírus por métodos moleculares tem papel na resolução do estado desses bebês, bem como na supervisão de pacientes cujo soro resulta repetidamente indeterminado nos testes sorológicos. O HIV ocorre no sangue tanto como vírus de RNA quanto na forma de DNA pró-viral incorporado ao genoma de células mononucleares do sangue periférico. A transcriptase reversa é desnecessária à detecção do DNA pró-viral, contudo, é requerida para detecção ou quantificação de HIV de RNA na forma livre. Relatos afirmam que o Amplicor Monitor assay (Roche) é mais sensível do que a detecção de HIV por bDNA (Bayer) ou NASBA (BioMérieux) (Bootman, 1999), sendo que níveis de detecção mínimos de até 20 cópias de HIV RNA/mL de plasma podem ser obtidos utilizando protocolos específicos de extração de RNA (Fisher, 1999; Murphy, 2000; Pfaller, 2004a).

A PCR também foi extensivamente estudada quanto à utilidade no diagnóstico da infecção por CMV em receptores de transplante. Atualmente, existem sistemas disponíveis no comércio para detecção por PCR (Long, 1998; Razonable, 2002; Pang, 2003; Smith, 2004), HCA (Mazzuli, 1999) e NASBA (Aono, 1998; Diaz-Mitoma, 2003). Os problemas referentes ao diagnóstico da doença causada pelo CMV diferem daqueles associados ao diagnóstico das infecções por HCV e HIV, em que os vírus são ubíquos e, por isso, sua detecção no sangue utilizando qualquer método não confirma por si só a doença clínica (Razonable, 2002). No diagnóstico do CMV, o desafio consiste em distinguir os pacientes imunocomprometidos já acometidos ou que podem vir a desenvolver a doença associada ao CMV daqueles nos quais a infecção por esse vírus não é clinicamente significativa (Patel, 1995; Pellegrin, 2000; Razonable, 2002). Por esses motivos, o CMV estava entre os primeiros vírus para cuja quantificação o PCR foi investigado (Gerna, 1994; Boeckh, 1998; Caliendo, 2000; Diaz-Mitoma, 2003; Pang, 2003). A detecção do mRNA do CMV (utilizando NASBA), que representa uma evidência de transcrição ativa do genoma viral, também foi utilizada para diagnosticar a doença produzida pelo CMV e a resposta ao tratamento. Contudo, essa técnica não se mostrou tão útil quanto às determinações da carga viral por PCR ou HCA (Patel, 1995; Blok, 2000; Pelligrin, 2000; Diaz-Mitoma, 2003).

A quantificação do vírus por métodos moleculares, atualmente, é reconhecida como sendo significativa para o diagnóstico e supervisão das infecções por HBV, HCV, HIV, CMV e EBV (Kimura, 1999; Murphy, 2000; Jabs, 2001; Diaz-Mitoma, 2003; Maurmann, 2003; Pang, 2003; Fiebelkorn, 2004). Além da PCR quantitativa convencional, também têm sido utilizados métodos de bDNA, HCA, TMA e PCR em tempo real.

A quantificação da carga viral de HCV é importante no prognóstico da doença e no monitoramento da terapia (Fiebelkorn, 2004). Os métodos mais amplamente estudados são os ensaios de PCR-RT (Roche Monitor) e bDNA (Bayer) (Hawkins, 1997; Jacob, 1997; Lu, 1998; Fiebelkorn, 2004). Entretanto, também foram descritos NASBA (BioMérieux), TMA (Bayer) e a nova PCR em tempo real (Lunel, 1999; Martel, 1999; Kleiber, 2000; Sawyer, 2000). A variedade e o ritmo de desenvolvimento dos sistemas tornam difícil fazer afirmações definitivas acerca dos valores relativos dos diversos sistemas existentes. Aspectos importantes a serem considerados incluem a faixa dinâmica (o intervalo de concentrações de genomas virais em que o método é mais acurado e reproduzível) dos sistemas disponíveis, a variação da capacidade desses sistemas de detectar e quantificar os diferentes genótipos de HCV, e as dificuldades para o desenvolvimento de padrões de calibração adequados. Atualmente, cerca de 80% dos laboratórios que participam do programa de teste de proficiência da amplificação de ácido nucleico do College of American Pathologists (CAP) realizam a RT-PCR para detecção de HCV RNA utilizando kits Roche Amplicor HCV (Fiebelkorn, 2004).

A quantificação da carga viral de HIV no plasma constitui um marcador biológico útil para avaliar o prognóstico da doença e a resposta à terapia antirretroviral (Ledergerber, 1999). As abordagens técnicas e os problemas associados à quantificação do HIV RNA em geral são similares àqueles previamente observados no caso do HCV (Garcia-Lerma, 1998; Erali, 1999; Triques, 1999; Murphy, 2000). Uma comparação multicentro entre RT-PCR (Roche), NASBA (BioMérieux/Organon Teknika) e bDNA (Bayer) constatou que os resultados dos três ensaios estavam altamente correlacionados. Entretanto, como as diferenças de medidas de RNA obtidas entre os ensaios variaram de um paciente a outro, os autores do estudo recomendaram que esses métodos não fossem utilizados de modo intercambiável no monitoramento dos pacientes (Murphy, 2000). Além do desempenho do ensaio, foi sugerido que o *throughput* de amostras e os requerimentos de volume, limite de detecção, facilidade de execução, espaço de trabalho ocupado pelo equipamento e custos de disponibilização de reagentes fossem todos considerados na seleção do ensaio de determinação da carga viral (Murphy, 2000).

A amplificação de ácido nucleico, em especial a PCR em tempo real, tem sido empregada no diagnóstico de uma variedade de outras infecções virais, incluindo enterovírus (Rotbart, 1994; Pozo, 1998; Landry, 2003), HSV (Tremblay, 1997; Smith, 2004), vírus JC (Garcia de Viedma, 1999), parvovírus (Jordan, 1998), VZV (Scheuermann, 2004), vírus da varíola (Cockerill, 2004), vírus West Nile (Cockerill, 2004) e coronavírus da SARS (Cockerill, 2004; Drosten, 2004), entre outros (Tabs. 62.3 e 62.6). Os métodos baseados na amplificação estão ganhando importância no diagnóstico e na supervisão de infecções virais, conforme o número de infecções sensíveis a agentes antivirais específicos continua a aumentar, e particularmente em situações críticas, como na infecção do sistema nervoso central (Read, 1997; Cockerill, 2004; Smith, 2004). Dadas as manifestações clínicas semelhantes de certo número de infecções virais, existem diversas situações em que a PCR multiplex pode ser utilizada de forma racional e efetiva para melhorar o rendimento do diagnóstico e simplificar as operações diárias do laboratório (Tab. 62.4) (Elnifro, 2000; Gruteke, 2004). A maior aplicação da PCR multiplex tem sido no diagnóstico de meningite, encefalite e meningoencefalite virais (Elnifro, 2000), bem como de infecções agudas no trato respiratório de crianças (Gruteke, 2004). Quando aplicada a tais cenários, foi demonstrado que a PCR multiplex aumenta o rendimento diagnóstico, reduz a instituição de terapias

Tabela 62.6 Patógenos microbianos de importância clínica analisados com testes não comerciais à base de amplificação de ácido nucleico

Organismo(s)	Tipo(s) de amostra	Indicação(ões) clínica(s)
Ehrlichia spp.	Sangue	Erliquiose granulocítica e monocítica humana
Chlamydophila pneumoniae	Respiratória	Pneumonia atípica
Legionella pneumophila	Respiratória	Pneumonia atípica
Mycoplasma influenzae	Respiratória	Pneumonia atípica
Haemophilus influenzae	LCE	Meningite
Neisseria meningitidis	LCE	Meningite
Streptococcus pneumoniae	LCE	Meningite
Staphylococcus aureus	*Swab* nasal	Detecção pré-operatória do estado de portador
Helicobacter pylori	Suco gástrico, fezes	Úlcera péptica
Vírus JC	LCE	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
Parvovírus B19	Líquido amniótico Soro	Hidropsia fetal Anemia
Adenovírus	Urina, tecidos, sangue	Pacientes imunocomprometidos e receptores de transplante
Herpesvírus humano 8	Efusões linfomatosas	Linfoma de efusão primária
Metapneumovírus humano	Respiratória	Doença respiratória aguda
Astrovírus e calicivírus	Fezes	Diarreia
Aspergillus spp.	Respiratória e sangue	Aspergilose invasiva
Candida spp.	Sangue	Candidíase hematógena
Cryptosporidium spp.	Fezes	Diarreia
Plasmodium spp.	Sangue	Malária
Toxoplasma gondii	Sangue, LCE, líquido amniótico	Infecção congênita; toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos

Todos os testes empregam a reação em cadeia da polimerase ou a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa. Esta lista não inclui todos os patógenos testados.

LCE = líquido cerebrospinal.

antimicrobianas inadequadas, promove terapias patógeno-específicas mais direcionadas, facilita a implementação de medidas preventivas de controle da infecção e contribui para a melhora geral do resultado do paciente (Elnifro, 2000; Cockerill, 2004; Gruteke, 2004; Smith, 2004).

Detecção de patógenos bacterianos

Atualmente, existem diversos ensaios comerciais de amplificação para detecção do complexo de *M. tuberculosis* (MTBC) em amostras respiratórias e não respiratórias. Tais ensaios incluem PCR (Roche), TMA (Gen-Probe) e SDA (Becton Dickinson) (Tab. 62.3). Em geral, a sensibilidade desses ensaios é excelente (95-100%) para amostras com esfregaços positivos para detecção de bacilos acidorresistentes (BAR), contudo, é menor (50-90%) no caso das amostras com esfregaços negativos (Ieven, 1997; Piersimoni, 1998, 2002; Pfyffer, 1999; Tortoli, 1999; Watterson, 2000; Woods, 2001; Dowdy, 2003; Hall, 2004a; Kivihya-Ndugga, 2004; Sloutsky, 2004; Thwaites, 2004).

Os métodos de PCR realizados internamente, que utilizam vários procedimentos de preparo de amostras e alvos a serem amplificados, estão associados à falta de padronização, conforme ilustrado por Noordhoek et al. (1994). Esses pesquisadores registraram a ocorrência de variações significativas na habilidade dos laboratórios de detectar corretamente o MTBC em amostras cegas. Para os laboratórios clínicos, é provável que os problemas decorrentes da padronização precária sejam minimizados pelo uso de ensaios comerciais dotados de controle central de qualidade de reagentes e procedimentos operacionais padronizados. De forma geral, os ensaios de amplificação de ácido nucleico para detecção do MTBC são mais sensíveis do que o esfregaço para detecção de BAR, porém, menos sensíveis do que as culturas (Cloud, 2004; Kivihya-Ndugga, 2004; Thwaites, 2004). Ao mesmo tempo, dois sistemas comerciais – Amplicor MTB ([PCR], Roche) e o teste direto de *Mycobacterium tuberculosis* amplificado (AMTDT, *amplified Mycobacterium tuberculosis direct test* [TMA], Gen-Probe) tiveram o uso aprovado pelo Food and Drug Adminstration (FDA) para amostras com esfregaços de amostras oriundas do trato respiratório positivos para BAR. Além disso, o AMTDT foi aprovado para uso no caso de amostras respiratórias com esfregaços negativos. Alguns estudos compararam dois ou mais métodos baseados na amplificação (Piersimoni, 1998, 2002; Brown, 1999; Tortoli, 1999; Cleary, 2003). Entretanto, nenhum deles foi suficientemente abrangente para permitir que se chegasse a uma conclusão firme acerca dos méritos relativos de todos os sistemas. Em geral, a sensibilidade e especificidade de todos os sistemas comerciais são comparáveis (Watterson, 2000). A sensibilidade de todos esses sistemas é menor, relativamente ao método da cultura, quando são testadas amostras obtidas após o início da terapia antituberculose (Sloutsky, 2004; Thwaites, 2004) e na aplicação para análise de amostras não respiratórias, como o líquido cerebrospinal (LCE) (Woods, 2001; Piersimoni, 2002; Cloud, 2004; Thwaites, 2004). Foi demonstrado que a inibição inespecífica da amplificação afeta todos os sistemas de modo mais ou menos equivalente (Carpentier, 1995; Lumb, 1999; Piersimoni, 2002). Uma vantagem do ensaio BD ProbeTec ET (Becton Dickinson), de detecção direta do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* baseada no SDA, é a inclusão de controle interno de amplificação. Esse controle é projetado para detectar a presença de substâncias inibitórias e, assim, minimiza relatos de resultados de teste falso-negativos (Piersimoni, 2002). No teste de amostras clínicas, o PCR em tempo real com BAR mostrou-se comparável em termos de sensibilidade e especificidade à PCR convencional (Amplicor, Roche) e ao TMA (AMTD) (Lachnik, 2002; Cleary, 2003; Lemaitre, 2004). As potenciais vantagens em favor da PCR em tempo real são a maior rapidez com que os resultados são fornecidos (1,5 h *vs* 3 h) e a redução da suscetibilidade aos inibidores de amplificação.

A cultura continua exercendo papel central no diagnóstico da tuberculose, pois os ensaios de amplificação existentes não detectam todas as amostras com culturas positivas, havendo necessidade de isolar o organismo para realizar o teste de suscetibilidade (bem como o teste epidemiológico, quando indicado). Atualmente, os testes de amplificação são incapazes de substituir o esfregaço para detecção de BAR, pois este é utilizado na determinação do nível de infectividade dos pacientes (pacientes com esfregaços positivos são bem mais infecciosos do que os pacientes com esfregaço negativo) e na avaliação da resposta inicial à terapia. Falta um contexto similarmente rico no qual fosse possível interpretar os métodos baseados na amplificação. Além disso, os métodos de amplificação respondem a uma pergunta bem mais específica (o MTBC está presente?) do que aquela respondida pelos esfregaços (existem BAR presentes?). Dessa forma, esses métodos de amplificação podem deixar escapar indícios importantes para o diagnóstico de uma doença infecciosa específica. No momento, o papel dos ensaios de amplificação permanece sendo complementar ao papel da microscopia e da cultura no diagnóstico da tuberculose, bem como de outras infecções micobacterianas (Watterson, 2000).

Os métodos de amplificação são altamente específicos na distinção entre MTBC e outras micobactérias (MOTT) em amostras com esfregaços positivos para detecção de BAR (Piersimoni, 2002; Cleary, 2003; Sloutsky, 2004). Isso permite iniciar uma terapia apropriada e instituir procedimentos de controle da infecção (Watterson, 2000; Dowdy, 2003). Entretanto, a relação custo-efetividade continua representando um importante obstáculo ao uso dos testes de amplificação molecular para diagnóstico da tuberculose (Watterson, 2000; Dowdy, 2003). Sem dúvida, nenhum sistema de assistência à saúde poderia acomodar o uso desses métodos para cada amostra (Cantanzaro, 2000; Watterson, 2000). Além disso, a supervisão do paciente nem sempre é influenciada pelo resultado do teste, sugerindo que o uso desses ensaios deve ser reservado para situações em que a supervisão clínica seja auxiliada pela inclusão de um teste molecular (Cantanzaro, 2000; Watterson, 2000). Um estudo recente constatou que o uso de testes de amplificação de ácido nucleico (especificamente o Gen-Probe TMA) para amostras com esfregaço positivo para BAR não é custo-efetivo na maioria dos hospitais (Dowdy, 2003). Os autores advertem que vários fatores devem ser considerados ao estimar a relação custo-efetividade, como o número de amostras com esfregaço positivo processadas anualmente, a prevalência relativa de *M. tuberculosis* nessas amostras, bem como o custo marginal diário do isolamento respiratório. O teste molecular tende a ser custo-efetivo principalmente nos laboratórios que processam numerosas amostras e, por isso, pode ser melhor utilizado em laboratórios centralizados de referência.

Talvez, o impacto mais significativo do diagnóstico molecular rápido da tuberculose (TB) possa ocorrer quando esse teste é aplicado aos casos com suspeita de TB cujas amostras produzam esfregaços negativos (American Thoracic Society Workshop, 1997; Cantanzaro, 2000; Dowdy, 2003). Embora pacientes com esfregaços positivos sejam comprovadamente infecciosos, estão surgindo evidências de casos de pacientes com TB, que produzem esfregaços negativos e culturas positivas, que também podem ser infecciosos (Sepkowitz, 1996). Dessa forma, o teste de rotina à base de amplificação de amostras com esfregaços negativos poderia exercer papel bastante importante nos esforços de prevenção da doença, ao identificar esses indivíduos dias ou semanas antes de os resultados das culturas serem disponibilizados (Dowdy, 2003). Cinquenta a noventa por cento das amostras esfrega-ço-negativas e cultura-positivas resultaram positivas nos diversos testes à base de amplificação para detecção do MTBC (Watterson, 2000). Diante desse fato, foi demonstrado que o teste molecular pode ser utilizado na análise de amostras com esfregaços negativos com altos valores preditivos positivos e negativos, quando combinado ao julgamento clínico para identificação de pacientes sob risco de desenvolver TB (Cantanzaro, 2000). Ainda é necessário estabelecer a relação custo-justificativa para essa estratégia (Dowdy, 2003).

A amplificação de ácido nucleico também foi aplicada a outros patógenos bacterianos do trato respiratório (Cockerill, 2004; Ieven, 2004). *Legionella pneumophila* é um patógeno fastidioso, para o qual um diagnóstico rápido pode ter importância fundamental. Um ensaio de PCR convencional comercialmente disponível (Legionella Enviro-Amp system, Perkin Elmer) pode ter aplicações na detecção rápida de *Legionella* em amostras de lavado broncoalveolar (BAL) (Weir, 1998). Todavia, a PCR em tempo real mostrou-se altamente sensível e específica para detecção de *L. pneumophila*, fornecendo resultados em 1 a 2 horas e, assim, acelerando bastante a triagem das amostras clínicas (Hayden, 2001b; Rantakokko-Jalava, 2001). De modo similar, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* impõem dificuldades particulares ao laboratório de diagnóstico, as quais podem ser efetivamente solucionadas utilizando PCR (Ieven, 1997, 2004; Farrell, 1999b; Grondahl, 1999; Cockerill, 2004).

Foram desenvolvidos ensaios de PCR multiplex capazes de detectar e discriminar uma ampla variedade de potenciais patógenos respiratórios (bacterianos e virais), e que representam uma promessa para o futuro (Tab. 62.4) (Grondahl, 1999; Elnifro, 2000; Gruteke, 2004).

O diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis também constitui uma área importante para o desenvolvimento e a aplicação dos ensaios de amplificação. A *N. gonorrhoeae* cresce rapidamente em meios ágar convencionais apropriados, sendo que sua cultura apresenta alta sensibilidade e especificidade sob condições ótimas (Koumans, 1998). Entretanto, como a *N. gonorrhoeae* é fastidiosa, a coleta e o transporte adequados, bem como as condições de cultura, constituem fatores críticos que talvez não sejam facilmente alcançados em cada situação em particular. A cultura de *C. trachomatis* também é exigente e requer instalações apropriadas para cultura de tecidos. Dessa forma, métodos de detecção de antígeno de *Chlamydia* alternativos à cultura têm sido amplamente utilizados.

Quase todos os métodos de amplificação têm sido aplicados à detecção de *C. trachomatis* em amostras genitais (Schepetiuk, 1997; Stary, 1998; Morre, 1998; Pasternack, 1999; Vincelette, 1999; Van Dyck, 2001; Hall, 2004a; Koenig, 2004). Em geral, as avaliações já publicadas indicam que os métodos baseados na amplificação são específicos e mais sensíveis do que a cultura celular ou os métodos imunológicos (Schepetiuk, 1997; Stary, 1998; Wylie, 1998; Vincelette, 1999; Van Dyck, 2001; Hall, 2004a). Em um estudo multicentros sobre o teste de PCR automatizado COBAS Amplicor CT/NG (Roche), a sensibilidade e especificidade variaram de acordo com o tipo de amostra (Vincelette, 1999). O teste apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 98,5% no teste de amostras obtidas por *swab* de uretra masculina. Para amostras obtidas por *swab* endocervical, a sensibilidade foi de 96,5% e a especificidade, de 99,4%. Para amostras de urina, a sensibilidade variou de 94,4 a 95,1% e a especificidade, de 99,8 a 100%. O desempenho dos ensaios de amplificação para amostras de urina pode facilitar a triagem para detecção da infecção por *C. trachomatis*, dada a facilidade da obtenção da amostra de urina em comparação aos métodos de amostragem mais invasivos. Diversas comparações dos vários métodos de amplificação para *C. trachomatis* foram relatadas (Schepetiuk, 1997; Stary, 1998; Pasternack, 1999; Van Dyck, 2001; Koenig, 2004). Van Dyck *et al.* (2001) compararam o desempenho da PCR (Roche), DAS (Becton Dickinson) e LCR (Abbott) quanto à detecção de *C. trachomatis* em 396 amostras de *swab* endocervical (50 delas com cultura positiva). Esses pesquisadores relataram sensibilidades e especificidades de 98, 94 e 90%, bem como de 98, 100 e 98,6%, respectivamente. Um recente estudo comparativo de SDA e PCR em tempo real encontrou uma concordância geral de 91,2% (Koenig, 2004). Notavelmente, os resultados de SDA com pontuação MOTA (*method-other-than-acceleration*, outro método que não o da aceleração) entre 2.000 e 9.999 (indeterminada) não foram reproduzíveis e tenderam a apresentar resultados falso-positivos de PCR e cultura. Os dados disponíveis sugerem que pode ser esperado um desempenho comparável de vários sistemas utilizados na detecção de *C. trachomatis*, advertindo que os resultados "indeterminados" (p. ex., escores MOTA entre 2.000 e 9.999) devem ser submetidos à repetição dos testes ou à realização de testes confirmatórios.

É possível utilizar uma única amostra para detectar ambos, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, utilizando PCR (Roche), SDA (Becton Dickinson) ou TMB (Gen-Probe) (Vincelette, 1999; Koenig, 2004; Van Dyck, 2001). Todos esses métodos foram descritos como sendo mais sensíveis do que a cultura (88,9–95,2% *vs* 69,8%, respectivamente) na detecção de *N. gonorrhoeae* em amostras cervicais (Kehl, 1998; Van Dyck, 2001). Assim como para *C. trachomatis*, resultados falso-positivos para *N. gonorrhoeae* também foram relatados para amostras com escores MOTA baixos (2.000 a 9.999) determinados por SDA, sugerindo a necessidade de realizar testes confirmatórios (Koenig, 2004). Esses achados, aliados à potencial geração de resultados falso-positivos pelo Amplicor PCR (Roche) em presença de *Neisseria subflava*, enfatizam uma contínua necessidade de refinamento dessas tecnologias (Farrell, 1999a).

A PCR também foi aplicada e rendeu excelentes resultados na detecção de agentes causadores de meningite bacteriana (Bryant, 2004; Parent du Châtelet, 2005; Robbins, 2005), *Escherichia coli* e *Shigella* spp. enteropatogênicas (Aranda, 2004), bem como agentes de bioterrorismo (p. ex., *Bacillus anthracis*) (Bode, 2004; Cockerill, 2004). A aplicação da PCR em tempo real para detecção de *S. aureus* em amostras de *swab* nasal mostrou-se um método rápido, acurado e custo-efetivo de identificação de indivíduos portadores desse organismo para intervenção pré-operatória (Shrestha, 2003a). Similarmente, a PCR em tempo real tem se mostrado útil para a detecção de SAMR e EVR, importantes patógenos nosocomiais (Diekema, 2004; Warren, 2004). A detecção precoce e acurada de indivíduos portadores de SAMR e EVR é necessária à focalização do isolamento e para as estratégias preventivas. A aplicação da PCR em tempo real para detecção de transporte (*swab* retal ou fezes) de EVR (PCR *vanA* e *vanB*), em um hospital universitário, reduziu o tempo médio de detecção dos organismos em pacientes hospitalizados de 3,4 dias para 1,3 dia, além de ter possibilitado o isolamento mais precoce de pacientes portadores de EVR e a liberação mais rápida dos pacientes sob tratamento prolongado e nos centros de reabilitação (Diekema, 2004).

Foram descritos ensaios de PCR capazes de amplificar genes de RNA ribossômico (rRNA, rDNA) a partir de essencialmente qualquer bactéria e de uma ampla gama de amostras clínicas. Esses ensaios agora são regularmente aplicados na microbiologia clínica e para casos de doenças infecciosas (Clarridge, 2004; Tang, 1998). Foi demonstrado que o rápido sequenciamento dos produtos amplificados e a comparação dos dados da sequência obtida às sequências existentes em um banco de dados de DNA constituem uma ferramenta poderosa para identificação de uma ampla variedade de microrganismos (Tang, 1998; Goldenberger, 1997; Hall, 2003a, 2003b, 2004a; Clarridge, 2004). Essa abordagem também se mostrou útil para a detecção e identificação de patógenos previamente não reconhecidos ou não cultivados (Fredericks, 1996; Clarridge, 2004; Cockerill, 2004). A PCR de gama ampla, aliada à tecnologia de arranjo molecular, aumenta ainda mais as capacidades da microbiologia molecular diagnóstica (Belgrader, 1998; Marshall, 1998; Clarridge, 2004; Kolbert, 2004; Maiwald, 2004; Stöver, 2004).

Detecção de fungos

A infecção fúngica invasiva constitui um problema importante que afeta o mundo inteiro (Lin, 2001b; Marr, 2002; Pfaller, 2004b; Walsh, 2004). Infecções graves com risco de vida estão sendo descritas com um conjunto cada vez maior de patógenos, incluindo as espécies conhecidamente oportunistas *C. albicans, C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (Pfaller, 2004b; Walsh, 2004). A infecção fúngica sistêmica é difícil de diagnosticar no devido tempo e isso pode contribuir para a elevada mortalidade associada (Yeo, 2002).

A PCR foi estudada de forma mais detalhada para o diagnóstico de candidemia e aspergilose invasiva (Bougnoux, 1999; Latge, 1999; Yeo, 2002; Kawazu, 2004; Musher, 2004). As amostras clínicas incluem soro ou sangue total (*Candida* e *Aspergillus*), e amostras respiratórias (escarro ou BAL) para detecção de aspergilose (Yeo, 2002; Kawazu, 2004; Musher, 2004). As sequências-alvo variam amplamente, contudo, é mais comum incluírem genes ribossômicos (rRNA 18S) ou regiões espaçadoras transcritas internas (ITS, *internal transcribed spacer*) (Iwen, 2002; Yeo, 2002). As sensibilidades variam em uma faixa de 78 a 100% para candidíase, e de 33 a 100% em pacientes com aspergilose invasiva comprovada (Yeo, 2002). As especificidades variam sobretudo na PCR para aspergilose, em que os resultados falso-positivos possivelmente obtidos quando o BAL é testado se devem à presença temporária de conídias no trato respiratório. Talvez, seja preferível utilizar soro ou plasma a amostras respiratórias, pois a contaminação com conídias é bem menos provável. Recentemente, demonstrou-se que a combinação da PCR quantitativa ao teste de detecção do antígeno galactomanose utilizando amostras de BAL resulta na melhora da sensibilidade e da especificidade, quando se compara ao observado em cada teste isolado, no diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva (Musher, 2004). Do mesmo modo, o teste de detecção de antígeno e a PCR em tempo real utilizando soro mostraram-se úteis na triagem semanal da aspergilose invasiva em pacientes com distúrbios hematológicos (Kawazu, 2004).

Como no caso das bactérias, a combinação da PCR de gama ampla para amplificação de um produto (p. ex., rDNA 18S) oriundo de todos ou da maioria dos fungos mais comumente associados à infecção humana é uma estratégia potencialmente importante (Van Burik, 1998; Yeo, 2002). Foi demonstrado que a amplificação seguida de análise com endonuclease de restrição, sequenciamento ou hibridização a uma

série de sondas espécie- ou gênero-específicas constituem alternativas viáveis em uma tentativa de ampliar o diagnóstico das infecções fúngicas (Van Burik, 1998; Chemaly, 2004). No momento, embora relatos promissores continuem a surgir (Lin, 2001a), a PCR para diagnóstico de infecção fúngica invasiva não é utilizada extensivamente no cenário clínico. Além disso, não foi demonstrado de modo convincente que a PCR pode compensar as limitações da cultura no diagnóstico rápido de infecções fúngicas invasivas em hospedeiros imunocomprometidos. A PCR em tempo real e as plataformas de microarranjo acopladas à detecção de antígenos fúngicos provavelmente serão necessárias para causar um impacto significativo sobre esse problema diagnóstico.

Detecção de parasitas

Em laboratórios clínicos, o diagnóstico da infecção por numerosos protozoários parasitas depende do exame microscópico de fezes, tecidos, sangue ou esfregaços de medula óssea. No caso de *Giardia lamblia, Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium parvum*, a detecção do antígeno nas fezes representa uma alternativa. O exame microscópico das amostras consome tempo, requer habilidade considerável e apresenta sensibilidade limitada para amostras que contêm poucos organismos (Petri, 2004). Do mesmo modo, a cultura é um método impraticável para a maioria das infecções parasíticas, em razão da grande variedade de potenciais patógenos e às condições altamente especializadas requeridas por cada tipo de organismo (Visvesvara, 2002). Dadas as limitações dos métodos convencionais, poderia parecer que a parasitologia oferece uma oportunidade ainda melhor de introduzir as técnicas de diagnóstico molecular, se comparada às demais áreas da microbiologia, nas quais os métodos convencionais são bem mais produtivos (Petri, 2004). Apesar desses aspectos, além do fato de que o conhecimento parasitológico vem declinando em muitos laboratórios clínicos localizados na América do Norte, o teste molecular para doenças parasitárias tem se desenvolvido de forma lenta. Para ser prático, o teste molecular parasitológico deve ser simples e custo-efetivo, bem como capaz de detectar múltiplos parasitas distintos em uma dada amostra (Petri, 2004). Essas demandas, aliadas à percepção de que o mercado existente para esses testes é pequeno fora dos países pouco desenvolvidos, têm conspirado para limitar o desenvolvimento nessa área.

Notavelmente, a aplicação da PCR pode melhorar a detecção de protozoários parasitas no material clínico. A amplificação por PCR de pequenas subunidades de rRNA de *Plasmodium* revelou-se mais sensível do que o exame microscópico de esfregaços de sangue por microscopistas experientes no diagnóstico da malária falcípara, bem como no monitoramento da resposta ao tratamento (Ciceron, 1999; Moody, 2002). A amplificação por PCR em tempo real de uma subunidade do gene de rRNA 18S mostrou-se sensível e específica na detecção de quatro espécies de *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*) no sangue (Rougemont, 2004). A quantificação do número de parasitas por OCR em tempo real revelou um rápido declínio da parasitemia em resposta à terapia, paralelamente ao que foi observado por microscopia (Rougemont, 2004). Resultados similarmente encorajadores foram obtidos na detecção de *Babesia* spp. no sangue e de parasitas *Leishmania* na medula óssea e no sangue (Krause, 1996; Katakura, 1998; Cascio, 2002). A detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de líquido amniótico pode facilitar o rápido diagnóstico de um caso de toxoplasmose congênita (Gratzl, 1998; Costa, 2001). Esse método foi aplicado a amostras de LCE para diagnóstico de toxoplasmose cerebral em pacientes HIV-positivos (Julander, 2001), bem como a amostras de sangue para detecção precoce da reativação de *T. gondii* em receptores de transplante de células-tronco (Chandrasekar, 2005; Martino, 2005). Também foi descrita a aplicação da PCR na detecção de parasitas intestinais, incluindo *Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia* e microsporídios (Haque, 1998; Morgan, 1998; Franzen, 1999; Ghosh, 2000; O'Connor, 2004). Embora ainda não haja sistemas de amplificação comerciais disponíveis para diagnóstico de doenças parasitárias, espera-se que os métodos moleculares substituam gradualmente o diagnóstico morfológico, com consequente melhora dos resultados do paciente à medida que as doenças parasitárias vão sendo diagnosticadas com acurácia e sensibilidade e, em seguida, devidamente tratadas (Petri, 2004).

Identificação de culturas

A sensibilidade dos métodos baseados na amplificação facilita a sua aplicação na detecção direta de genomas patógeno-específicos em material clínico. Contudo, esses métodos também são valiosos para a identificação de micróbios cultivados. Uma reação de amplificação espécie-específica pode identificar uma única espécie de particular importância, como MTBC (Shrestha, 2003b). Alternativamente, uma reação de amplificação pode ser planejada para ter um alvo gênero-específico ou "universal", sendo possível empregar a digestão com endonuclease de restrição, hibridização com múltiplas sondas ou determinação de sequência de amplicon para identificar e discriminar uma variedade de espécies (Watterson, 2000; Tortoli, 2001; Hall, 2003a, 2003b, 2004b; Clarridge, 2004). A identificação de culturas por amplificação, a princípio, aplicava-se principalmente às micobactérias de crescimento lento (Hall, 2003a; Tortoli, 2001; Watterson, 2000), no entanto, também possui aplicações para outros patógenos não usuais (Hall, 2003b, 2004b; Clarridge, 2004). Uma escolha lógica e conveniente para um laboratório que utiliza a amplificação para detecção direta é empregar a mesma tecnologia para identificação de culturas sempre que possível (Clarridge, 2004).

A amplificação espécie-específica tem sido aplicada na identificação rápida de culturas de *M. tuberculosis, M. avium* e *M. intracellulare* (Tortoli, 1998; Ninet, 1999; Watterson, 2000; Shrestha, 2003b). A aplicação dessas abordagens a frascos BACTEC positivos com leituras de baixo índice de crescimento pode reduzir em 2 ou 3 dias o tempo necessário para confirmação do diagnóstico de tuberculose. Como ocorre no caso de outras bactérias, o sequenciamento dos genes de rRNA 16S pode ser utilizado para identificar com segurança espécies de micobactéria (Watterson, 2000). A amplificação da região espaçadora ribossômica 16S-23S com subsequente hibridização por meio da ligação de sondas a uma tira de *nylon* (INNO LiPA, Innogenetics) constitui o fundamento do método à base de kit comercial para identificação de nove espécies distintas de micobactéria (Watterson, 2000; Tortoli, 2001). Outra opção é o ensaio de PCR com enzima de restrição (PRA, *PCR restriction enzyme assay*), no qual uma parte do gene *hsp 65* é amplificada e subsequentemente digerida em duas digestões isoladas, realizadas por enzimas de restrição, com os fragmentos sendo analisados por eletroforese em gel de agarose (Watterson, 2000). Essa abordagem foi empregada na identificação de 34 espécies e subespécies de micobactérias (Devallois, 1997). Foi relatado que a PCR multiplex permite diferenciar entre MTBC, *M. avium* e outras micobactérias com uma única reação de PCR (Cormican, 1995; Kulski, 1995).

A PCR multiplex também foi aplicada na confirmação rápida da toxogenicidade de isolados de *E. coli* verocitotoxigênicos (Paton, 1998; Aranda, 2004). A amplificação e a análise da sequência do gene de rRNA 16S mostrou-se bastante útil para identificar cepas mal descritas, raramente isoladas ou que exibem fenótipo aberrante (Tang, 1998; Clarridge, 2004). Em seu estado atual, a análise da sequência de rRNA 16S permite uma identificação bacteriana mais robusta, reproduzível e acurada do que aquela proporcionada pelo teste fenotípico. A disponibilização de técnicas de sequenciamento aprimoradas, bancos de dados maiores e mais confiáveis, bem como de kits e *softwares* mais prontamente acessíveis fazem dessa tecnologia uma alternativa mais competitiva às técnicas de identificação microbiana de rotina para alguns grupos de organismos (Clarridge, 2004). Considerações técnicas e de custo (na faixa de U$ 38-144/isolado) limitam o uso disseminado da análise da sequência do gene de rRNA 16S. O acoplamento da PCR de gama ampla à análise de microarranjo de amplicon pode tornar essa tecnologia mais amplamente aplicável nos laboratórios de microbiologia no futuro (Troesch, 1999; Stöver, 2004).

Detecção de resistência antimicrobiana

A resistência dos micróbios aos agentes antimicrobianos constitui um dos principais problemas de saúde pública da década atual. Os métodos moleculares têm contribuído de maneira substancial para nossa compreensão acerca da genética e da disseminação dos determinantes da resistência antimicrobiana. Esses métodos também têm o potencial de contribuir para a detecção imediata da resistência no cenário clínico (Tab. 62.7) (Bergeron, 1998; Fluit, 2001; Diekema, 2004;

Tabela 62.7 Aplicação de métodos moleculares para detecção de resistência antimicrobiana

Organismo(s)	Agente(s) antimicrobiano(s)	Gene(s)	Método de detecção
Estafilococos	Meticilina ou oxacilina	*mec*A	PCR, sonda, DNA
	Aminoglicosídeos	*aac*(6′)-Ie+*aph*(2′)	PCR, sonda
	Macrolídeos	*erm*, *mef*, *msr*	PCR, sonda
	Fluoroquinolonas	Mutações pontuais em *gyr*A, *grl*A	PCR e sequenciamento
	Mupirocina	*mup*A	PCR
	Vancomicina	*van*A	PCR
Enterococos	Vancomicina	*van*A, -B, -C, -D, -E, -G	PCR, sonda
	Aminoglicosídeos	*aac*, *aph*, *ant*	PCR, sonda
Streptococcus pneumoniae	β-lactâmicos	*phbl*A, -2V, -2X	PCR
	Fluoroquinolonas	Mutações pontuais em *gyr*A e -B, *par*C e -E	PCR e sequenciamento
	Macrolídeos	erm, mef	PCR
Enterobacteriaceae	β-lactâmicos	bla_{TEM}, bla_{SHV}	PCR, sonda, sequenciamento
	Fluoroquinolonas	Mutações pontuais em *gyr*A e -B, *par*C e -E	PCR e sequenciamento
	Aminoglicosídeos	*ant*, *aac*	Sonda, PCR
Mycobacterium tuberculosis	Rifamicinas	Mutações pontuais em *rpo*B	PCR and SSCP; PCR e sequenciamento
	Isoniazida	Mutações pontuais em *kat*G, *inh*A e *ahp*C	PCR e sequenciamento
	Etambutol	Mutações pontuais em *emb*B	PCR and SSCP
	Estreptomicina	Mutações pontuais em *rps* and *rrs*	PCR e sequenciamento
Helicobacter pylori	Macrolídeos	Mutações pontuais em rDNA 23S	PCR e linha-sonda (LiPA) ou sequenciamento
Neisseria gonorrhoeae	Fluoroquinolonas	Mutações pontuais em *gyr*A e *par*C	PCR e sequenciamento
Candida albicans	Azol	Mutação em *erg*11; superexpressão de ERG11, MDR1, CRD1 e –2	PCR e sequenciamento; RT-PCR quantitativa; *Northern blot*
	Equinocandinas	Mutações pontuais nos genes FKS	PCR e sequenciamento
	Flucitosina	Mutações pontuais no gene da uracil fosforribosil transferase	PCR e sequenciamento
Herpesvírus	Aciclovir e fármacos correlatos	Mutações ou deleções no gene *TK* (timidina quinase)	PCR e sequenciamento
	Foscarnet	Mutações pontuais no gene da DNA polimerase	PCR e sequenciamento
HIV	Nucleosídeos inibidores da TR	Mutações pontuais no gene *TR*	PCR e sequenciamento; PCR e LiPA
	Inibidores de protease	Mutações pontuais no gene *PROT*	PCR e sequenciamento

SSCP = polimorfismo conformacional de fita única; TK = tirosina quinase; TR = transcriptase reversa; PROT = protease.

Tenover, 2004). O teste de suscetibilidade antimicrobiana convencional padronizado depende do crescimento e requer uma cultura pura de patógenos de, no mínimo, 18 a 24 horas antes da disponibilização do resultado. Sistemas automatizados rápidos, como o VITEK, podem fornecer resultados em algumas horas quando se trata de alguns organismos. No entanto, esses sistemas podem ser menos capazes de detectar mecanismos de resistência que requeiram um período de indução na presença de antibiótico antes da expressão da resistência.

No caso da resistência de estafilococos à meticilina/oxacilina, a resistência pode ser expressa de forma bastante heterogênea, em particular no caso dos estafilococos coagulase-negativos, de modo que talvez seja difícil detectar uma resistência antimicrobiana clinicamente relevante por meio dos testes de suscetibilidade padronizados. Por causa dessas dificuldades, a detecção molecular do gene *mecA* é considerada o método de referência contra o qual os demais métodos fenotípicos são comparados. Sondas de PCR, bDNA e de ciclagem foram extensivamente investigadas para fins de aplicação na detecção rápida da resistência estafilocócica à meticilina (Vannuffel, 1995; Marshall, 1997; Kolbert, 1998; Ramotar, 1998; Bekkaoui, 1999; Diekema, 2004; Tenover, 2004; Warren, 2004). Já está sendo comercializado um ensaio de PCR em tempo real para detecção rápida de SAMR, diretamente a partir de amostras de *swab* nasal (IDI-MRSA, Infectio Diagnostic). Esse ensaio fornece resultados em 1,5 horas, com uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 94%, em comparação aos métodos à base de cultura (Warren, 2004). A aplicação dessa estratégia de teste deve propiciar o uso mais eficiente e efetivo das fontes de controle de infecção para controlar SAMR em estabelecimentos de assistência à saúde (Diekema, 2004; Warren, 2004).

A detecção de resistência a fármacos é especialmente problemática em patógenos de crescimento lento, como *M. tuberculosis*, nos quais pode haver um intervalo de semanas entre a submissão da amostra e o relato final de suscetibilidade antimicrobiana. Durante muitos anos, esse retardo não era considerado um problema significativo, pois a incidência de tuberculose estava declinando e a resistência antimicrobiana era uma ocorrência incomum. Os testes de suscetibilidade eram realizados primariamente para confirmação da suscetibilidade e monitoramento da emergência de resistência. Desde o final da década de 1980, a orientação laboratorial no devido tempo para fins de terapia da tuberculose tornou-se essencial por numerosos motivos (Watterson, 2000). Estes incluem o ressurgimento da tuberculose ao âmbito global (inclusive em muitos países desenvolvidos); a emergência e disseminação da resistência antimicrobiana no MTBC; e a emergência de uma população substancial de indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), nos quais a tuberculose pode evoluir rapidamente para a morte na ausência de terapia adequada. Além do aprimoramento da detecção de MTBC, foram desenvolvidos métodos rápidos fenotípicos e genotípicos para auxiliar na triagem de mutações promotoras de resistência a fármacos (Watterson, 2000). A amplificação por PCR de sequências de DNA a partir dos genes *rpo*B (resistência à rifampina) e *kat*G, *inh*A e *ahp*C (resistência à isoniazida), seguida da detecção de mutações associadas à resistência por sequenciamento ou polimorfismo conformacional de fita única, apresenta alta sensibilidade para detecção de resistência à rifampina (> 96%) e isoniazida (87%) (Tab. 62.7) (Telenti, 1997; Tenover, 2004). O ensaio INNO LiPA Rif. TB (Innogenetics) emprega as tecnologias de amplificação e hibridização de linha-sonda para simultaneamente identificar MTBC e triar mutações determinantes de resistência à rifampina diretamente em amostras respiratórias esfregaço-positivas e isolados cultivados (Rossau, 1997). Sugeriu-se uma aplicação semelhante para a PCR acoplada aos microarranjos de DNA de alta densidade (Troesch, 1999; Fluit, 2001). O reconhecimento rápido de cepas resistentes do MTBC a agentes antimicrobianos é importante para a prevenção da disseminação da infecção produzida por essas cepas em pacientes suscetíveis e em profissionais da área de saúde.

Os métodos moleculares são aplicáveis à detecção de farmacorresistência em um espectro de organismos que vai além do MTBC e do SAMR (Tab. 62.7) (Tenover, 2004; Fluit, 2001). Há relatos de detecção de resistência enterocócica à vancomicina, resistência pneumocócica à penicilina, resistência gonocócica à fluoroquinolona e presença de TEM β-lactamases em bacilos Gram-negativos (Jones, 1997; Bergeron, 1998; Cockerill, 1999; Fluit, 2001; O'Neill, 1999; Diekema, 2004;

Grim, 2004; Tenover, 2004; Zhou, 2004). A detecção rápida de patógenos com resistência específica pode se mostrar bastante custo-efetiva. Foi demonstrado que o uso da PCR em tempo real para detecção de EVR reduz em quase 2 dias a duração da internação dos pacientes submetidos à assistência de longa duração, propiciando uma economia anual estimada em U$ 205.000,00 (Diekema, 2004).

A detecção da resistência a agentes antivirais está adquirindo importância crescente, uma vez que a resistência a fármacos passou a ser considerada uma barreira significativa à quimioterapia efetiva de numerosas infecções virais. A detecção fenotípica de farmacorresistência no HIV é uma tarefa complexa e demorada, portanto, impraticável na maioria das situações clínicas (Petropoulos, 2004). Mutações específicas afetando o gene codificador da transcriptase reversa (TR) do HIV-1 e o gene da protease estão associadas à resistência aos agentes antirretrovirais, e são imediatamente detectadas por uma variedade de métodos moleculares (Caliendo, 2004). Em seguida à transcrição reversa e à PCR de amplificação de todo o gene codificador de protease e da maior parte do gene da transcriptase reversa, os produtos amplificados podem ser analisados por meio de um entre vários métodos, incluindo sequenciamento automatizado, hibridização de DNA empregando microarranjos de alta densidade e hibridização reversa por ensaio de sondas em linhas paralelas (LiPA, *line probe assay*) (Caliendo, 2004). O LiPA comercialmente disponível é projetado para detectar mutações associadas à resistência em códons pré-selecionados nos genes *RT* e de protease (Caliendo, 2004). Embora esse método facilite a detecção mais rápida de mutações associadas à resistência, não fornece informações sobre toda a sequência genética-alvo e, assim, talvez não seja ideal para todas as mutações significativas (Puchhammer-Stockl, 1999; Caliendo, 2004). Os ensaios genotípicos requerem, além da detecção de mutações determinantes de resistência, a interpretação de como tais mutações alteram a suscetibilidade do HIV-1 aos fármacos. Dadas as complexidades desse processo, é importante que tanto os aspectos técnicos como os aspectos interpretativos do teste sejam padronizados.

Os métodos moleculares para detecção de resistência podem ser aplicados diretamente às amostras clínicas e, portanto, podem ser apropriados para as bactérias de crescimento lento, em particular nas situações clínicas urgentes, bem como para a detecção de resistência em vírus (Tenover, 2004). Além disso, esses métodos são aplicáveis a organismos inviáveis e podem reduzir o risco biológico associado à manipulação de patógenos viáveis, como *M. tuberculosis*. Os métodos moleculares também podem conferir vantagens particulares em relação aos mecanismos de resistência que são expressos somente após um período de indução prolongado, uma vez que os métodos fenotípicos nem sempre são suficientemente confiáveis ou realizados no devido tempo nesses casos. Apesar das numerosas vantagens, é improvável que os métodos moleculares venham a substituir a detecção fenotípica da resistência na maioria das situações clínicas, em um futuro próximo.

Os métodos moleculares para detecção de resistência antimicrobiana são limitados em diversos aspectos (Bergeron, 1998; Fluit, 2001). Primeiro, a ausência de um gene determinante de resistência conhecido não exclui a possibilidade de haver resistência determinada por outro mecanismo. Em termos práticos, a detecção molecular de resistência antimicrobiana baseia-se na detecção de genes individuais bem caracterizados em um gênero ou espécie em que sua ocorrência é esperada. Os métodos moleculares específicos para um mecanismo de resistência não irão detectar novos mecanismos emergentes de resistência. Além disso, é improvável que esses métodos se apliquem à detecção da expressão de genes de resistência em espécies onde o gene não tenha sido previamente observado. Ademais, o número já significativo de mutações pontuais ou genes determinantes de resistência, bem como a natureza bastante trabalhosa dos atuais métodos de amplificação impedem qualquer tipo de "inspeção molecular" para detecção de resistência. Em contraste, o teste de suscetibilidade de base fenotípica possibilita realizar uma "inspeção" prática para detecção dos mecanismos de resistência por meio do teste simultâneo de diversas classes de agentes antimicrobianos contra um dado patógeno. A tecnologia do microarranjo de DNA acoplada às técnicas de amplificação automatizadas tem o potencial de tratar dessa questão (Grim, 2004; Zhou, 2004). Entretanto, o desenvolvimento de microarranjos contendo uma ampla gama de marcadores de resistência aplicáveis a diversas espécies representa um desafio considerável, que requer um conhecimento bem mais amplo sobre os mecanismos de resistência do que o disponível no momento (Fluit, 2001). Uma segunda limitação está associada ao fato de a presença de um gene determinante de resistência antimicrobiana não necessariamente resultar na expressão de um fenótipo de resistência. A *E. coli*, por exemplo, possui um gene cromossômico codificador de β-lactamase análoga do AmpC que, no entanto, quase nunca se expressa, e declarar um isolado clínico como sendo "resistente" a agentes β-lactâmicos com base na detecção molecular do gene AmpC impediria o uso de diversos agentes de eficácia comprovada. Em princípio, essa limitação pode ser transposta se os ensaios de detecção de mRNA forem utilizados preferencialmente para detecção de genes cromossômicos. De fato, trata-se de uma área de investigação ativa em que os perfis de expressão genética são utilizados para detectar a farmacorresistência e determinar os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos, bem como para descobrir novos alvos para os fármacos (Sturtevant, 2000; Frade, 2004; Hutter, 2004; Karababa, 2004). Parece que, no momento, os métodos moleculares para detecção de resistência antimicrobiana continuarão servindo como ferramentas de investigação, descoberta e desenvolvimento de fármacos, e para laboratórios de referência que conduzem estudos de monitoramento dos mecanismos de resistência, bem como estudos sobre o desempenho dos métodos fenotípicos.

Epidemiologia molecular

Atualmente, há uma considerável variedade de ferramentas moleculares para uso epidemiológico (Tab. 62.8) e, em particular, têm proliferado os métodos baseados na amplificação (Hanage, 2004; Mathema, 2004; Rademaker, 2004; Soll, 2004). Uma exaustiva consideração dos méritos relativos dessas abordagens foge ao escopo deste capítulo. É importante enfatizar que nenhuma técnica é universalmente aplicável, e a escolha de uma aplicação em particular está relacionada à espécie estudada, ao foco da questão proposta e à conveniência da técnica (Soll, 2000, 2004). As técnicas de tipagem molecular são úteis para responder às questões referentes à clínica e ao controle da infecção, e não se limitam ao uso na pesquisa. Exemplificando, algumas dessas questões poderiam ser: o esclarecimento do significado de múltiplos isolados de *Staphylococcus epidermidis* oriundo de um determinado paciente e a predição da resposta ao interferon na infecção pelo vírus da hepatite C. Evidências moleculares da identidade entre isolados de *S. epidermidis* obtidas a partir de culturas em diferentes momentos sugerem que o isolado é clinicamente importante. Além disso, essas evidências também mostraram que os genótipos 1b e 1a de HCV parecem menos propensos a responder ao interferon do que os outros genótipos (Martinot-Peignoux, 1998; Vandelli, 1999). As técnicas moleculares são igualmente úteis para a detecção da emergência e disseminação das cepas de um organismo que apresenta padrões inusitados de farmacorresistência ou patogenicidade, determinação da eficácia dos procedimentos de controle da infecção e definição da fonte de surtos de infecção relacionada a alimentos ou produtos terapêuticos (Diekema, 2003).

Métodos de tipagem molecular DNA-dependentes

A literatura relacionada à tipagem molecular DNA-dependente – e particularmente à tipagem por amplificação – se transformou em uma confusão de acrônimos e variáveis sutis. Para impor alguma estrutura nessa área, é útil considerar dois aspectos relativos a cada método: a abordagem técnica (amplificação, enzima de restrição, sonda ou uma mistura de todos) e o princípio (uma foto instantânea arbitrária do cromossomo ou o enfoque nas sequências que evoluem rapidamente). Os métodos de tipagem à base de DNA fundamentam-se na divergência progressiva apresentada pela sequência de células bacterianas idênticas no decorrer de numerosas gerações de divisão celular. Quanto mais similares forem as sequências de dois organismos isolados de pacientes distintos, maior é a probabilidade de que eles tenham se originado a partir de uma fonte comum em um passado recente. O grau de divergência existente entre os organismos pode ser observado ao longo de toda a sequência cromossômica. O maior grau de resolução para esse tipo de abordagem necessitaria do sequenciamento de todo o cromossomo. Entretanto, isso não seria prático. Por isso, a maioria

Tabela 62.8 Métodos moleculares de tipagem epidemiológica de microrganismos

Método	Substrato	Principais características	Exemplos
Análise de plasmídeo	DNA plasmidial	Potencialmente instável, em razão da perda de plasmídeos. Pode ser intensificada pela digestão com endonuclease de restrição	*Staphylococcus aureus*, estreptococos coagulase-negativos, *Klebsiella, Serratia*, Enterobacteriaceae
Análise do DNA cromossômico por eletroforese convencional utilizando endonuclease de restrição	DNA cromossômico	Amplamente aplicável. Numerosas bandas. Não admite análise por computador	Enterococci, *S. aureus*, *Clostridium difficile*, *Candida* spp.
Eletroforese em gel de campo pulsado	DNA cromossômico	Aplicação ampla. Uso pouco frequente de enzimas de cortes de restrição para gerar grandes fragmentos de DNA (10-88 kb). Menor número de bandas. Excelente reprodutibilidade e poder discriminatório. Equipamentos caros	Estafilococos, enterococos, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas, Candida*
Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição genômico utilizando sonda de DNA	DNA cromossômico	Ampla aplicação. Processo envolvendo múltiplas etapas. Admite análise por computador. Inclui a análise IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* e ribotipagem	*M. tuberculosis*, *Candida* spp., Enterobacteriaceae, estafilococos, *Pseudomonas*
Métodos baseados na PCR: tipagem de espaçador por PCR de elemento repetitivo. Amplificação seletiva de fragmentos de restrição do genoma, tipagem baseada na sequência alélica de múltiplos *locus*	DNA cromossômico	Amplamente aplicável. Execução rápida e moderadamente fácil. Extratos brutos e pequenas quantidades de DNA são suficientes	Enterobacteriaceae, *Acinetobacter*, estafilococos, *M. tuberculosis*, vírus da hepatite C
Esquemas de hibridização genotípica com biblioteca de sondas: padrões de *dot blot* com sonda de múltiplos *locus*, padrões de oligonucleotídeo de alta densidade	DNA cromossômico	Resultados ambíguos, do tipo sim/não. Poder de discriminação inferior ao dos demais métodos. Acoplamento à tecnologia de *chip* de DNA	*Burkholderia cepacia*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*

Esta tabela contém apenas exemplos de métodos e aplicações disponíveis, sem a pretensão de incluir todos os métodos e aplicações existentes.

PCR = reação em cadeia da polimerase.

dos métodos desenvolvidos tenta identificar a variação de sequência em pontos aleatoriamente distribuídos por todo o cromossomo. Esse instantâneo fotográfico constitui a base do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP), da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, *pulsed field gel electrophoresis*) e da tipagem por amplificação com iniciadores arbitrários. A divergência sequencial não ocorre na mesma velocidade em todos os pontos do cromossomo. Elementos específicos do cromossomo são alterados mais rapidamente no que se refere à sequência nucleotídica ou ao número de cópias do elemento e à distribuição destas ao longo de toda a extensão cromossômica. Alguns exemplos de sequências que evoluem rapidamente são as sequências de inserção (SqI), transposons (Tn), sequências de repetição em tandem e integrons (In). Uma gama de métodos de tipagem explorou essas sequências altamente variáveis para estudar as relações existentes entre os micróbios. Alguns métodos utilizam uma combinação de digestão cromossômica integral seguida de sondagem para detecção de sequências de cópias múltiplas. As variáveis críticas a serem consideradas em relação à escolha de um método de tipagem para uma aplicação em particular são sua reprodutibilidade (tanto intra como interlaboratorial), poder de discriminação, velocidade, conveniência e custo (Soll, 2000). Cada vez mais, a inspeção visual e a avaliação qualitativa dos padrões de formação de bandas produzidos por uma grande parte desses métodos de tipagem estão sendo complementadas pelo uso da análise quantitativa mais computadorizada. Além disso, estão surgindo estudos sobre os méritos relativos dos sistemas analíticos disponíveis (Gerner-Smidt, 1998; Olive, 1999; Soll, 2000, 2004; Barrett, 2004). A habilidade de transferir rapidamente imagens digitalizadas dos padrões de formação de banda para um laboratório central, com o potencial de fornecer uma comparação rápida das cepas, bem como a adoção de convenções relativas à designação dos tipos são fatores considerados capazes de aumentar significativamente o poder dessas técnicas para fins de rastreamento da evolução e da disseminação de cepas específicas aos âmbitos nacional e internacional. Existem dificuldades consideráveis a serem enfrentadas em termos de padronização dos métodos de tipagem molecular (van Belkum, 1998).

A análise de RFLP padrão com cortes enzimáticos frequentes pode gerar um número bastante significativo de bandas na eletroforese em gel. O método tem sido útil na tipagem de uma ampla variedade de organismos. Bingen *et al.* (1991), por exemplo, utilizaram RFLP para demonstrar que os isolados de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina encontrados em um hospital francês não representavam a disseminação de uma única cepa resistente. Como a complexidade dos padrões de formação de banda dificulta a análise, esse método foi em grande medida substituído.

Uma solução para a complexidade dos padrões consiste em identificar e analisar apenas um subgrupo de bandas contendo uma sequência específica que está presente em múltiplas cópias no genoma. Isso se torna possível quando as bandas de DNA são transferidas do gel de eletroforese para uma membrana (*Southern blotting*) e por meio da subsequente adição de sondas de DNA a essa membrana. A sequência de cópias múltiplas em geral mais aplicável é o gene de rRNA. Esse processo – conhecido como ribotipagem – tem sido empregado no estudo das relações existentes entre as cepas de numerosas espécies. Além disso, estudos comparativos do valor da ribotipagem em relação aos métodos de tipagem tradicionais foram descritos para algumas espécies. Já está sendo comercializado um sistema rápido e totalmente automatizado que atua na ribotipagem com interpretação assistida por computador (Riboprinter, Qualicon, Wilmington, DE) (Pfaller, 2004c). Relatos indicam que o Riboprinter é mais discriminatório do que a PCR arbitrariamente condicionada para *Salmonella enterica* (Hilton, 1998). Todavia, em uma comparação do Riboprinter com a PFGE para tipagem de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, esta última foi mais discriminatória (Pfaller, 1996). Foi sugerido que o Riboprinter pode ser útil como ferramenta de tipagem de primeira linha, porém, as cepas aparentemente indistinguíveis pela ribotipagem podem ser classificadas em grupos diferentes com auxílio da PFGE (Pfaller, 2001, 2004c).

As sondas que se hibridizam a sequências de múltiplas cópias, exceto rRNA 16S, são utilizadas de modo similar. Entre as mais estudadas dessas aplicações, está o uso de uma sonda para a sequência de inserção IS6110 destinada à tipagem do MTBC. Esse método é relativamente lento e apresenta limitado poder discriminatório para as cepas do MTBC com poucas cópias da sequência IS6110 (Yuen, 1993). O método já está bem padronizado e se mostrou bastante informativo na definição da epidemiologia da tuberculose (van Embden, 1993; Bradford, 1998). Mais recentemente, foi descrito certo número de diferentes métodos de tipagem para MTBC destinados a complementar

ou substituir a tipagem de IS6110. A adição de sondas aos produtos de digestão de RFLP com sequências de múltiplas cópias polimórficas ricas em GC (PGRS, *polymorphic GC-rich sequences*) pode ser empregada na complementação da tipagem de IS6110 para cepas com baixo número de cópias de IS6110 (Bradford, 1998).

A PFGE permite obter um número de bandas adequado (10-20 bandas) para a análise da maioria dos organismos (Allardet-Servent, 1989; Goering, 2004). A PFGE emprega enzimas de restrição para cortar o DNA nas sequências pouco frequentes, produzindo um número limitado de fragmentos de DNA grandes. Essa abordagem requer forças de cisalhamento que evitam quebras aleatórias do cromossomo bacteriano durante a preparação do DNA para digestão. Para tanto, a bactéria é imersa em tampões de agarose antes da digestão da parede celular. Também é necessário utilizar um sistema de eletroforese capaz de separar fragmentos de DNA bastante grandes. Para que seja possível separar esses fragmentos, altera-se periodicamente a direção do campo elétrico operante na câmara eletroforética. A PFGE permite separar cromossomos inteiros, de modo que para as leveduras (organismos eucariontes) torna-se possível gerar um cariótipo sem digestão por enzima de restrição. Há quem considere a PFGE o método mais amplamente aceito e aplicável para tipagem molecular. Foram propostos alguns princípios para a interpretação dos géis de PFGE, sendo que para diversos organismos este é de fato o método-padrão de tipagem molecular contra o qual os demais métodos são comparados (Tenover, 1995; Goering, 2004). Suas principais limitações são a velocidade relativamente lenta e o custo. Todavia, foram obtidos progressos no sentido de desenvolver protocolos rápidos para sua execução (Matushek, 1996; Goering, 2004). A PFGE é aplicável ao estudo da epidemiologia de muitos patógenos, incluindo SAMR (van Belkum, 1998), *E. faecium* vancomicina-resistente (Fridkin, 1998), *S. pneumoniae* penicilina-resistente (Rudolph, 1998), *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamase de espectro estendido (Liu, 1998), *E. coli* O157 (Grif, 1998), *Stenotrophomonas maltophilia* (Sader, 1994), e *Candida* spp., para as quais é possível utilizar cariotipagem ou análise de RFLP (Cormican, 1996).

A amplificação do DNA por PCR aplica-se à tipagem molecular de diversas formas (Hanage, 2004; Mathema, 2004; Rademaker, 2004). Uma das vantagens proporcionadas pelas estratégias de tipagem com PCR é a necessidade de utilizar apenas pequenas quantidades de DNA. Além disso, o DNA-modelo pode ser uma preparação bruta. Em geral, esse tipo de preparação não é utilizado nos sistemas de enzima de restrição. Em seu aspecto mais simples, a tipagem baseada em PCR envolve o uso de um ou mais iniciadores genéricos sob condições não rigorosas, o que resulta na amplificação de múltiplos fragmentos de tamanhos variados. O número e o tamanho dos fragmentos amplificados dependem da sequência do genoma microbiano, sendo que um padrão de formação de bandas tipo-específico é revelado por eletroforese em gel (NiRiain, 1994; Rademaker, 2004). Esse método (ou suas variações) – denominado como amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD, *random amplification of polymorphic DNA*) ou *fingerprinting* de amplificação de DNA (DAF, *DNA amplification fingerprinting*) – possui ampla aplicabilidade a uma variedade de patógenos contemporâneos, tais como *Enterobacter cloacae* e *Neisseria meningitidis* (NiRiain, 1994; Woods, 1994; Bart, 1998; Rademaker, 2004). A reprodutibilidade dos padrões de formação de bandas utilizando iniciadores genéricos e sob condições não rigorosas pode ser problemática. Bandas fracas podem aparecer e desaparecer de uma corrida a outra. Entretanto, alguns grupos parecem ter vencido essas dificuldades (Bart, 1998). De uma forma geral, essas técnicas podem ser mais aplicáveis à caracterização rápida e preliminar de um pequeno número de cepas junto a uma dada instituição.

Há também uma variedade de aplicações emergentes da PCR para tipagem bacteriana, que exploram a diversidade de sequências repetitivas, tais como as sequências enterobacterianas de consenso intergênico repetitivas (ERIC-PCR, *enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR*) e as sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (REPS, *repetitive extragenic palindromic sequences*). Essas abordagens se mostraram valiosas para a tipagem de *Acinetobacter* spp. e muitas espécies Gram-negativas distintas (Vila, 1996). A PCR também tem sido utilizada combinada à digestão com endonuclease de restrição do DNA cromossômico integral como tipagem por polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP, *amplified fragment length polymorphism*) (Ahmed, 2004). Nessa abordagem, há amplificação de um subconjunto de fragmentos gerados por digestão do DNA cromossômico por cortes enzimáticos frequentes. No caso da *E. coli*, o uso de iniciadores marcados com fluorescência, o dimensionamento preciso dos fragmentos em um sequenciador de DNA automatizado e a disponibilidade da sequência genômica completa para *E. coli* K-12 resultaram em um método de tipagem altamente sofisticado (Arnold, 1999). O conhecimento da sequência genômica inteira da cepa Rd de *H. influenzae* foi igualmente explorado com o intuito de desenvolver um método de tipagem por PCR que fosse baseado no número variável de sequências de repetição em tandem (VNTRs, *variable number tandem repeat sequences*) (van Belkum, 1997; Mathema, 2004). A espoligotipagem do MTBC constitui outro método importante de tipagem por PCR, que se baseia na amplificação de sequências espaçadoras não repetitivas localizadas entre pequenas unidades repetitivas (Sola, 1998).

A PCR também é utilizada para amplificar regiões do genoma microbiano que se desenvolvem rapidamente, de modo a possibilitar a avaliação do grau de ligação por meio da avaliação dos produtos quanto à variação da sequência. Os sítios-alvo incluem as regiões espaçadoras existentes entre os genes de rRNA em *A. fumigatus* e o gene da coagulase de *S. aureus* (Hookey, 1998; Radford, 1998). A variação da sequência pode ser investigada por meio da avaliação dos padrões de formação de banda produzidos na digestão do produto amplificado por ação de enzimas de restrição ou pelo sequenciamento do produto da PCR. Métodos de tipagem similares se mostraram valiosos para a tipagem de vírus. A tipagem do HCV é de particular interesse, pois o genótipo viral é significativo para a predição da provável resposta à terapia com interferon-α. A genotipagem do HCV se baseia mais frequentemente na detecção da variação da sequência na região conservada 5' não traduzida do genoma por RFLP, hibridização a sondas genótipo-específicas (Line Probe Assay, Innogenetics), sequenciamento ou polimorfismo de comprimento de fragmento de clivagem (Murphy, 1994; Davidson, 1995; Stuyver, 1996; Seme, 1997; Sreevatsan, 1998). É reconhecido o potencial de haver classificações erradas de algumas cepas, quando a distinção é feita com base na diferença de um único nucleotídeo, sendo que para alguns subtipos também pode ser necessário determinar a sequência na região do core (Seme, 1997). Já foi relatado o sequenciamento direto do produto da PCR obtido com o kit Roche Amplicor, sendo que esta pode ser uma abordagem custo-efetiva para determinar o genótipo do HCV (Holland, 1998). Abordagens similares foram aplicadas à tipagem do HIV e outros vírus (Peltola, 1998).

Os perfis de plasmídeo são agora bem menos amplamente empregados na tipagem molecular do que já foram no passado, embora os estudos sobre DNA plasmidial continuem sendo importantes para a definição da epidemiologia da disseminação dos mecanismos de resistência antimicrobiana. O estudo dos perfis plasmidiais aliado à tipagem baseada em DNA cromossômico revelou que, em certos casos, a disseminação nosocomial de cepas resistentes a agentes antimicrobianos pode refletir a disseminação simultânea de cepas que abrigam um plasmídeo e de um plasmídeo de resistência entre cepas distintas (Liu, 1998).

Tipagem molecular DNA-independente

Vários métodos de tipagem não baseados em ácido nucleico foram aplicados aos estudos epidemiológicos. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas é utilizada para diversas bactérias, contudo, não mais de forma ampla (Mulligan, 1988). A eletroforese de enzimas codificadas por múltiplos lócus (MLEE, *multilocus enzyme electrophoresis*) baseia-se na mobilidade eletroforética de certo número de enzimas informativas. As variações na mobilidade das enzimas constituem a base da tipagem. A MLEE é tecnicamente trabalhosa e pode ser considerada uma forma de examinar as relações existentes entre os organismos em uma escala temporal evolucionária mais longa do que aquela abrangida pela inspeção visual dos padrões de formação de banda em muitos dos métodos de tipagem à base de DNA. O estudo da mobilidade eletroforética das enzimas informativas pode ser substituído pela determinação da sequência dos fragmentos amplificados a partir dos genes codificadores das enzimas corresponden-

tes – uma técnica conhecida como tipagem de sequência de múltiplos lócus (Vogel, 1998; Hanage, 2004). Com o uso da análise assistida por computador dos padrões de formação de bandas obtidos por meio dos métodos de tipagem ou dos dados da sequência de DNA, é possível definir os graus de relação existentes entre os organismos ao longo de uma escala temporal evolutiva mais longa, de forma semelhante à MLEE (Bart, 1998; Arnold, 1999; Hanage, 2004).

Padronização, controle de qualidade e teste de proficiência de métodos diagnósticos moleculares

Assim como para toda a patologia diagnóstica, a qualidade dos resultados começa com a adequação da solicitação do teste, além da qualidade da coleta e do transporte da amostra. O laboratório deve fornecer aos clínicos as diretrizes que determinam quais tipos de amostra podem ser submetidos, como essas amostras devem ser coletadas e armazenadas, e a janela temporal na qual o material deve ser entregue ao laboratório (ver Caps. 1 e 63).

No laboratório, a primeira etapa do teste de qualidade consiste na validação adequada de um teste em particular, antes de sua introdução para uso diagnóstico. Uma vez que este teste esteja em uso, é preciso continuar a prestar atenção nos procedimentos, com o intuito de preservar os padrões de qualidade. Esses aspectos foram tratados de forma abrangente em publicações da Association for Molecular Pathology, 1999, e do Clinical and Laboratory Standards Institute (antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Problemas podem surgir em diversos âmbitos. O projeto do teste talvez não abranja toda a gama de diversidade genética do táxon-alvo (classificação errônea do subtipo 2c como 2b de HCV [Seme, 1997]) ou apresente sobreposição de características de táxons relacionados (resultado falso-positivo para MTBC em pacientes com infecção pulmonar por *M. kansasii* e *M. avium* [Jorgensen, 1999]). Os problemas de projeto podem não ser reconhecidos e o desempenho do teste pode ser superestimado em avaliações que não empregam testes de referência adequados (Koumans, 1998). Relatos antigos da falta de concordância interlaboratorial com relação ao teste de amostras cegas para detecção de MTBC e HCV por PCR (Zaaijer, 1993; Noordhoek, 1994) sugeriram que os laboratórios diagnósticos apresentam problemas operacionais. Em um estudo, quatro dos 15 laboratórios avaliados relataram um ou mais resultados falso-positivos obtidos por PCR interna para detecção de toxoplasmose (Pelloux, 1998). Problemas similares foram relatados para a detecção de enterovírus (Muir, 1999). O potencial de melhorar a concordância interlaboratorial por meio da padronização de reagentes e protocolos é enfatizado em um relato de desempenho significativamente mais satisfatório de um ensaio de PCR para *C. trachomatis*, em que esses fatores foram levados em consideração (Mahony, 1994). E o maior uso de sistemas comerciais utilizando reagentes padronizados e análises automatizadas tem reduzido ainda mais esses problemas.

O preparo da amostra representa um aspecto fundamental, em que se procura alcançar o equilíbrio entre a simplicidade da preparação (objetivando a praticidade e a redução do riscos de contaminação) e a perfeição (a fim de garantir a liberação de ácidos nucleicos e a remoção de substâncias inibitórias). Controles devem ser posicionados para detectar contaminações (p. ex., testes em duplicata, múltiplos controles negativos) e monitorar a degradação do alvo ou a presença de inibidores (controle positivo nos limites de detecção, padrão interno para amplificação) (DuBois, 2004). É essencial que os controles negativos sejam numericamente adequados e processados por meio do mesmo procedimento utilizado no preparo da amostra. Uma porção de uma amostra anterior que tenha resultado negativa é conveniente para essa finalidade.

A seleção dos controles e padrões é particularmente problemática quando o agente infeccioso alvo apresenta alta diversidade (HIV e HCV), e também diante da necessidade de resultados quantitativos (DuBois, 2004). A complexidade desses aspectos é evidenciada em relatos sobre sistemas comerciais utilizados para quantificação de HCV que talvez não detectem os genótipos 2 e 3 com tanta eficácia quanto detectam o genótipo 1 (Hawkins, 1997). Essa complexidade também fica evidente nas diferenças de eficiência de hibridização de DNA clonado e de DNA derivado de vírion observadas nos ensaios de quantificação de DNA de HBV (Heerman, 1999). Existe uma avaliação detalhada dos parâmetros que afetam o resultado dos ensaios para quantificação de RNA de HIV, sendo que em geral uma grande parte dos princípios identificados é aplicável (Lew, 1998).

Para garantir que os reagentes sejam de alta qualidade e isentos de contaminação, convém comprar tampões preparados em locais afastados. Nesse caso, o fabricante é responsável pelo fornecimento de dados sobre a qualidade analítica dos reagentes. Pode ser adequado realizar uma avaliação da qualidade funcional em relação a lotes anteriores.

A contaminação representa um problema considerável para diversos laboratórios que utilizam a PCR diagnóstica. Estudos interlaboratoriais demonstraram que amostras negativas podem fornecer resultados positivos em alguns laboratórios, para os quais a transferência de amplicons constitui a explicação mais provável. Nitidamente, o relato de resultados falso-positivos de detecção de HCV, HIV ou MTBC produz consequências substanciais para a assistência prestada ao paciente. A base da prevenção à transferência na maioria dos laboratórios, nesse ponto, consiste na separação física das áreas destinadas ao ajuste da reação de PCR e à análise do produto de PCR sob fluxo de trabalho estritamente unidirecional (Mitchell, 2004). A automatização da PCR também pode ajudar a prevenir a transferência do amplicon (Wilke, 1995), sendo que a maioria dos fabricantes de kits diagnósticos moleculares já desenvolveu (ou está em processo de desenvolvimento) sistemas automatizados ou semiautomatizados para minimizar o potencial de erro humano. A obtenção de resultados falso-positivos parece ser pouco comum quando se usa sistemas de teste comerciais automatizados (Vincelette, 1999).

Além da prevenção de transferência, existem métodos preventivos disponíveis para a amplificação de produtos de PCR contaminantes. Os dois principais métodos são aqueles que utilizam isopsoraleno para modificar amplicons a um estado não amplificável, e aqueles que utilizam uracil DNA glicosilase para degradar amplicons antes da amplificação (Rys, 1993). Seja qual for o sistema utilizado, é preciso determinar o impacto da técnica sobre o limite de detecção da PCR. É igualmente importante demonstrar a efetividade da medida, em razão do encarecimento do procedimento.

Realizar checagens funcionais a cada novo lote de enzima constitui uma verificação adequada da produção e do procedimento de entrega. No caso da DNA polimerase, pode ser conveniente fazer a comparação com o lote novo de enzimas, utilizando amostras que estejam no limite de detecção. Para as endonucleases de restrição, recomenda-se a digestão do DNA do fago γ. A reprodutibilidade dos resultados, no caso de muitas técnicas moleculares, é criticamente dependente do controle preciso da temperatura e da distribuição acurada do reagente. O aspecto mais essencial para garantia da qualidade consiste na aquisição de um equipamento de alta qualidade. Recomenda-se monitorar a temperatura e o desempenho de cada poço duas ou mais vezes ao ano (Kopp, 1994). As pipetas devem ser calibradas duas vezes ao ano.

A prestação de um serviço laboratorial de qualidade não termina com a geração do resultado. A transmissão de resultados no tempo devido constitui um elemento essencial. As diretrizes referentes à interpretação do resultado são particularmente importantes quando se trata dos novos métodos, uma vez que os clínicos podem não estar familiarizados com as limitações desses métodos. A orientação para limitar corretamente a utilização dos testes tem importância financeira, considerando os aspectos envolvidos referentes ao reembolso. Somente há pouco tempo, a Health Care Financing Administration atribuiu códigos de pagamento destinados à detecção e identificação de um número limitado de patógenos específicos (Association for Molecular Pathology, 1999). Além disso, a extensão em que se dará o reembolso desses testes não é totalmente conhecida. Considerando o desempenho apresentado no passado, é improvável que o nível de reembolso venha a cobrir integralmente os custos de teste em todos os casos.

A participação de programas de teste de proficiência obviamente representa um aspecto importante e necessário para a manutenção da qualidade de diversos serviços de diagnóstico molecular em laboratórios de microbiologia (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004; Versalovic, 2004). O teste de proficiência para métodos molecu-

lares utilizados na detecção e identificação de agentes infecciosos é disponibilizado para vários organismos diferentes. O College of American Pathologists (CAP) fornece módulos de teste para métodos de detecção e identificação à base de sondas de ácido nucleico para *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (CAP Survey HC5); identificação de culturas de micobactérias (CAP Survey E); e detecção baseada em amplificação de uma variedade de organismos, incluindo HIV, HCV, CMV, MTBC, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *Borrelia burgdorferi* (CAP Survey ID).

Referências bibliográficas

Ahmed N, Alam M, Rao KR, et al: Molecular genotyping of a large, multicentric collection of tubercle bacilli indicates geographical partitioning of strain variation and has implications for global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2004; 42:3240–3247.

Allardet-Servent A, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, et al: Use of low frequency cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigation of nosocomial bacterial infections. J Clin Microbiol 1989; 27:2057–2061.

Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, et al: Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 2000; 13:167–195.

Amann R, Ludwig W, Schleifer KH: Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. ASM News 1994, 60:360–365.

American Thoracic Society Workshop: Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:1804–1814.

Angel S, Maero E, Blanco JC. et al: Early diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis in AIDS patients by dot blot hybridization analysis. J Clin Microbiol 1992; 30:3286–3287.

Aono T, Kondo K, Miyoshi H: Monitoring of human cytomegalovirus infections in pediatric bone marrow transplant recipients by nucleic acid sequence-based amplification. J Infect Dis 1998; 178:1244–1249.

Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA: Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol 2004; 42:5849–5853.

Arnold C, Metherell L, Willshaw G, et al: Predictive fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli:* high-resolution typing method with phylogenetic significance. J Clin Microbiol 1999; 37:1274–1279.

Association for Molecular Pathology: Association for Molecular Pathology Statement. Recommendations for in-house development and operation of molecular diagnostic tests. Am J Clin Pathol 1999; 111:449–462.

Trata-se de um documento-chave para aqueles laboratórios que desejam estabelecer uma seção de diagnóstico molecular utilizando ensaios "de fabricação interna".

Badak FZ, Goksel S, Sertoz R: Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. J Clin Microbiol 1999; 37:1602–1605.

Barrett TJ, Ribot E, Swaminathan B: Molecular subtyping for epidemiology: issues in comparability of patterns and interpretation of data. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 259–266.

Barrett-Muir WY, Aitken C, Templeton K, et al: Evaluation of the Murex hybrid capture cytomegalovirus DNA assay versus plasma PCR and shell vial assay for diagnosis of human cytomegalovirus viremia in immunocompromised patients. J Clin Microbiol 1998; 36:2554–2556.

Bart A, Schuurman IGA, Achtman M, et al: Randomly amplified polymorphic DNA genotyping of serogroup A meningococci yields results similar to those obtained by multilocus enzyme electrophoresis and reveals new genotypes. J Clin Microbiol 1998; 36:1746–1749.

Beggs ML, Cave MD, Marlowe C, et al: Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. J Clin Microbiol 1996; 34:2985–2989.

Bekkaoui F, McNevin JP, Leung CH, et al: Rapid detection of the *mec*A gene in methicillin resistant staphylococci using a colorimetric cycling probe technology. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34:83–90.

Belgrader P, Bennett W, Hadley D: Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. Clin Chem 1998; 44:2191–2194.

Bergeron MG, Ouellette M: Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 1998; 36:2169–2172.

Bingen EH, Denamur E, Lambert-Zechovsky NY, Elion J: Evidence for the genetic unrelatedness or nosocomial vancomycin resistant *Enterococcus faecium* strains in a pediatric hospital. J Clin Microbiol 1991; 29:1888–1892.

Blok MJ, Lautenschlager I, Goossens VJ, et al: Diagnostic implications of human cytomegalovirus immediate early-1 and pp67 mRNA detection in whole-blood samples from liver transplant patients using nucleic acid sequence-based amplication. J Clin Microbiol 2000; 38:4485–4491.

Bode E, Hurtle W, Norwood D: Real-time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. J Clin Microbiol 2004; 42:5825–5831.

Boeckh M, Boivin G: Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical application. Clin Microbiol Rev 1998; 11:533–554.

Bootman J, Heath AB, Hughes P, Holmes H: An international collaborative study on the detection of an HIV-1 genotype B field isolate by nucleic acid amplification techniques. J Virol Methods 1999; 78:21–34.

Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, et al: DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. J Clin Microbiol 2004; 42:5811–5818.

Bougnoux M, Dupont C, Mateo J: Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. J Clin Microbiol 1999; 37:925–930.

Bradford WZ, Koehler J, El-Haji H: Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* across the San Francisco bay area. J Infect Dis 1998; 177:1104–1107.

Brown TJ, Power EGM, French GL: Evaluation of three commercial detection systems for *Mycobacterium tuberculosis* where clinical diagnosis is difficult. J Clin Pathol 1999; 52:193–197.

Bryant PA, Li HY, Zaia A, et al: Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. J Clin Microbiol 2004; 42:2919–2925.

Caliendo AM, St George K, Kao SY, et al: Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of prototype Amplicor CMV Monitor test int ransplant recipients. J Clin Microbiol 2000; 38:2122–2127.

Caliendo AM, Yen-Lieberman B: Viral genotyping. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 489–499.

Cantanzaro A, Perry S, Clarridge JE, et al: The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. JAMA 2000; 283:639–645.

Excelente discussão de considerações que são essenciais para estabelecer serviços de testes moleculares para detecção de doenças infecciosas.

Carpentier E, Drouillard B, Dailloux M, et al: Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. J Clin Microbiol 1995; 33:3106–3110.

Cascio A, Calattini S, Colomba C, et al: Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Pediatrics 2002; 109:E27.

Chandrasekar PH: Real-time polymerase chain reaction for early diagnosis of toxoplasmosis in stem cell transplant recipients: ready for prime time? Clin Infect Dis 2005; 40:79–81.

Chapin K, Musgnug M: Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2003; 41:4324–4327.

Chemaly RF, Procop GW: Molecular detection and characterization of fungal pathogens. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 551–559.

Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M: Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. J Clin Microbiol 1999; 37:35–38.

Clarridge JE III: Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004; 17:840–862.

A mais recente revisão sobre as vantagens e desvantagens de utilizar sequenciamento genético na identificação de bactérias.

Cleary TJ, Roudel G, Casillas O, Miller N: Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe. J Clin Microbiol 2003; 41:4783–4786.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Quantitative molecular methods for infectious diseases. Approved Guideline. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003, MM6-A.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Proficiency testing for molecular methods. Proposed Guideline. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004, MM14-P.

Cloud JL, Shutt C, Aldous W, Woods G: Evaluation of a modified Gen-Probe Amplified Direct Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organism in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2004; 42:5341–5344.

Cockerill FR III: Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:199–212.

Cockerill FR III, Smith TF: Response of the clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. J Clin Microbiol 2004; 42:2359–2365.

Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH: Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:2262–2265.

Cormican M, Glennon M, NiRiain U, Flynn J: Multiplex PCR for identification of mycobacterial isolates. J Clin Pathol 1995; 48:203–205.

Cormican MG, Hollis RJ, Pfaller MA: DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata*. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 25:83–87.

Costa JM, Ernault P, Gautier E, Bretagne S: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. Prenatal Diagn 2001; 21:85–88.

Cullen AP, Long CD, Lorincz AT: Rapid detection and typing of herpes simplex virus DNA in clinical specimens by the hybrid capture II signal amplification probe test. J Clin Microbiol 1997; 35:2275–2278.

Davidson FP, Simmonds JC, Ferguson LM: Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5′ non-coding region. J Gen Virol 1995; 76:1197–1204.

Davis TE, Fuller DD: Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe. J Clin Microbiol 1991; 29:2193–2196.

Devallois A, Goh KS, Rastogi N: Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997; 35:2969–2973.

Diaz-Mitoma F, Leger C, Miller H, et al: Comparison of DNA amplification, mRNA amplification, and DNA hybridization techniques for detection of cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients. J Clin Microbiol 2003; 41:5159–5166.

Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardotter B, Pfaller MA: Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need. J Clin Microbiol 2004; 42:2879–2883.

Minirrevisão discutindo os potenciais (e reais) benefícios da detecção "em tempo real" de genes de resistência em bactérias e amostras clínicas.

Diekema DJ, Pfaller MA: Infection control epidemiology and clinical microbiology. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003, pp 129–138.

Dowdy DW, Maters A, Parrish N, et al: Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. J Clin Microbiol 2003; 41:948–953.

Drosten C, Doerr HW, Lim W, et al: SARS molecular detection external quality assurance. Emerg Infect Dis 2004; 10:2200–2203.

DuBois DB, Brown JT: Laboratory controls and standards. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 697–703.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE: Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev 2000; 13:559–570.

Erali M, Hillyard DR: Evaluation of the ultrasensitive Roche Amplicor HIV-1 monitor assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA. J Clin Microbiol 1999; 37:792–795.

Farrell DJ: Evaluation of Amplicor *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol 1999a; 37:386–390.

Farrell DJ, Daggard G, Mukkur TK: Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its applications in diagnosis of pertussis in non-metropolitan Southeast Queensland, Australia. J Clin Microbiol 1999b; 37:606–610.

Faulkner-Jones BE, Tabrizi SN, Borg AJ: Detection of human papillomavirus DNA and mRNA using synthetic, type specific oligonucleotide probes. J Virol Methods 1993; 41:277–296.

Fiebelkorn KR, Nolte FS: RNA virus detection. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 441–474.

Fischer M, Huber W, Kallivroussis A: Highly sensitive methods for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma, cells and tissues. J Clin Microbiol 1999; 37:1260–1264.

Fluit AD, Visser MR, Schmitz F-J: Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001; 14:836–871.

Revisão mais aprofundada dos métodos de determinação dos genótipos de resistência antimicrobiana.

Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA: Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. J Clin Microbiol 2004; 42:2085–2093.

Franzen C, Muller A: Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999; 12:243–285.

Fredericks DN, Relman DA: Sequence based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. Clin Microbiol Rev 1996; 9:18–33.

Fridkin SK, Yokoe DS, Whitney CG, et al: Epidemiology of a dominant clonal strain of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at separate hospitals in Boston, Massachusetts. J Clin Microbiol 1998; 36:965–970.

Garcia de Viedma D, Alonso R, Miralles P, et al: Dual qualitative-quantitative nested PCR for detection of JC virus in cerebrospinal fluid: high potential for evaluation and monitoring of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy. J Clin Microbiol 1999; 37:724–728.

Garcia-Lerma JG, Yamamoto S, Gomez-Cano M: Measurement of human immunodeficiency virus type-1 plasma virus load based on reverse transcriptase (RT) activity: evidence of variabilities in levels of virion-associated RT. J Infect Dis 1998; 177:1221–1229.

Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A: Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. J Clin Microbiol 1994; 32:2709–2717.

Gerner-Smidt P, Graves LM, Hunter S, Swaminathan B: Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns: comparative evaluation of two commercial software packages. J Clin Microbiol 1998; 36:1318–1323.

Ghosh S, Debnath A, Sil A, et al: PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. Mol Cell Probes 2000; 14:181–189.

Goering RV: Pulsed-field gel electrophoresis. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 185–196.

Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, et al: Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. J Clin Microbiol 1997; 35:2733–2739.

Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al: Evaluation of acridinium ester labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol 1991; 29:2473–2476.

Gratzl R, Hayde M, Kohlhauser C: Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:853–858.

Grif K, Karch H, Schneider C: Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32:165–176.

Griffith BP, Rigsby MO, Garner RB, et al: Comparison of Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum and plasma subjected to freeze–thaw cycles. J Clin Microbiol 1997; 35:3288–3291.

Grimm V, Ezaki S, Susa M, et al: Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. J Clin Microbiol 2004; 42:3766–3774.

Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, et al: Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by a single tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. J Clin Microbiol 1999; 37:1–7.

Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, et al: Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children. J Clin Microbiol 2004; 42:5592–5603.

Hacek DM, Suriano T, Noskin GA, et al: Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. Am J Clin Pathol 1999; 111:647–654.

Hadgu A: The discrepancy in discrepant analysis. Lancet 1996; 348:592–593.

Hall GS, Katanik M, Tuohy M, Sholtis M: Use of commercial amplification tests in the clinical microbiology laboratory: test selection and quality assurance. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004a, pp 27–36.

Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD: Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 2003a; 41:1447–1453.

Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD: Experience with the MicroSeq D2 large-subuit riobosmal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. J Clin Microbiol 2003b; 41:5099–5102.

Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD: Experince with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2004b; 42:622–626.

Hanage WP, Feil EJ, Brueggemann AB, Spratt BG: Mutilocus sequence typing: a strain characterization, population biology, and patterns of evoluntionary descent. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 235–243.

Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr: Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36:449–452.

Hawkins A, Davidson F, Simmonds P: Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2, and 3 by quantiplex HCV RNA assay and versions 1 and 2, Roche Monitor assay and an in house limiting dilution method. J Clin Microbiol 1997; 35:187–192.

Hayden RT: In vitro nucleic acid amplification techniques. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 43–69.

Hayden RT, Qian X, Procop GD, et al: In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. Diagn Mol Pathol 2002; 11:119–126.

Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV: In situ hybridization for the identification of yeast-like organisms in tissue section. Diagn Mol Pathol 2001a; 10:15–23.

Hayden RT, Uhl JR, Qian X, et al: Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol 2001b; 39:2618–2626.

Hazelton PR, Gelderblom HR: Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. Emerg Infect Dis 2003; 9:294–303.

Heerman KH, Gerlich WH, Chudy M, et al, and the Eurohep Pathobiology Group: Quantitative detection of Hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. J Clin Microbiol 1999; 37:68–73.

Hilton AC, Penn CW: Comparison of ribotyping and arbitrarily primed PCR for molecular typing of *Salmonella enterica* and relationships between strains on the basis of these molecular markers. J Appl Microbiol 1998; 85:933–940.

Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, et al: Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2000; 38:818–825.

Holland J, Bastian I, Ratcliff RM: Hepatitis C genotyping by direct sequencing of the product from the Roche Amplicor test: methodology and application to a South Australian population. Pathology 1998; 30:192–195.

Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J Clin Microbiol 1998; 36:1083–1089.

Houpikian P, Raoult D: Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. Emerg Infect Dis 2002; 8:122–131.

Excelente visão geral da "mistura" de tecnologias novas e antigas em um laboratório de microbiologia diagnóstica.

Hutter B, Schaab C, Albrecht S, et al: Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expressing profiling. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:2838–2844.

Ieven M, Goossens H: Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Rev 1997; 10:242–256.

Ieven M, Loens K, Goossens H: Detection and characterization of bacterial pathogens by nucleic acid amplification: state-of-the-Art review. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 323–348.

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME: Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002; 40:87–109.

Jabs WJ, Hennig H, Kittel M, et al: Normalized quantification by real-time PCR of Epstein–Barr virus load in patients at risk for past transplant lymphoproliferative disorders. J Clin Microbiol 2001; 39:564–569.

Jacob S, Baudy D, Jones E: Comparison of quantitative HCV RNA assays in chronic hepatitis C. Am J Clin Pathol 1997; 107:362–367.

Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J, et al: Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labelled oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 2000; 38:814–817.

Jones RN, Marshall SA, Pfaller MA: Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results and laboratory testing accuracy. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29:95–102.

Jordan J, Tiangco B, Kiss J, Koch W: Human parvovirus B19; prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. Vox Sang 1998; 75:97–102.

Jorgensen JH, Salinas JR, Paxson R, et al: False-positive Gen-Probe direct *Mycobacterium tuberculosis* amplification test results for patients with pulmonary *M. kansasii* and *M. avium* infections. J Clin Microbiol 1999, 37:175–178.

Julander I, Martin C, Lappalainen M, et al: Polymerase chain reaction for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in cerebrospinal fluid in HIV-positive patients. Scand J Infect Dis 2001; 33:538–541.

Juretschko S, Buccat AM, Fritsche TR: Applications of fluorescence in situ hybridization in diagnostic microbiology. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 3–18.

Kant JA: Molecular diagnostics, reimbursement and other selected financial issues. Diagn Mol Pathol 1995; 4:79–81.

Karababa M, Coste AT, Rognon B, et al: Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:3064–3079.

Katakura K, Kawazu S, Naya T: Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. J Clin Microbiol 1998; 36:2173–2177.

Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, et al: Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1–3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. J Clin Microbiol 2004; 42:2733–2741.

Kehl SC, Georgakas K, Swain GR: Evaluation of Abbott LCx assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical swab specimens from females. J Clin Microbiol 1998; 36:3549–3551.

Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB: Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000; 38:830–838.

Kimura H, Morita M, Yabuta Y: Quantitative analysis of Epstein–Barr virus load by using a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 1999; 37:132–136.

Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, et al: Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 2004; 42:1012–1015.

Kleiber J, Walter T, Habershausen G, et al: Performance characteristics of a quantitative, homogeneous TaqMan RT-PCR test for HCV RNA. J Mol Diagn 2000; 2:158–166.

Klein RS, El Khoury J: Emerging viral pathogens. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 529–542.

Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG: Direct comparison of the BD ProbeTec ET System with in-house LightCycler PCR assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisserria gonorrhoeae* from clinical specimens. J Clin Microbiol 2004; 42:5751–5756.

Kolbert CP, Arruda J, Varga-Delmore P: Branched-DNA assay for detection of the *mec*A gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci. J Clin Microbiol 1998; 36:2640–2644.

Kolbert CP, Rys PN, Hopkins M, et al: 16S ribosomal DNA sequence in analysis for identification of bacteria in a clinical microbiology laboratory. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 361–378.

Kopp DW, Sansieri CA, Mifflin TE: Routine monitoring of temperatures inside thermal cycler blocks for quality control. Clin Chem 1994, 40:2117–2119.

Koumans EH, Johnson RE, Knapp JS, St. Louis ME: Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nonculture tests; a performance review with clinical and public health considerations. Clin Infect Dis 1998; 27:1171–1180.

Krause PJ, Telford D III, Spielman A: Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. J Clin Microbiol 1996; 34:2791–2794.

Kulski J, Khinsoe C, Payle T, Christiansen K: Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids in AIDS patients. J Clin Microbiol 1995, 33:668–674.

Lachnik J, Ackermann B, Bohrssen A, et al: Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 2002; 40:3364–3373.

Landry ML, Garner R, Ferguson D: Comparison of the NucliSens Basic Kit (nucleic acid sequence-based amplification) and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. J Clin Microbiol 2003; 41:5006–5010.

Latge JP: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12:310–350.

Ledergerber B, Egger M, Opravil M: Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: A prospective cohort study. Lancet 1999; 353:863–868.

Lemaitre N, Armand S, Vachee A, et al: Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. J Clin Microbiol 2004; 42:4307–4309.

Lew J, Reichelderfer P, Fowler M: Determination of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Reassessment of parameters affecting assay outcome. J Clin Microbiol 1998; 36:1471–1479.

Li J, Hanna BA: DNA probes for culture confirmation and direct detection of bacterial infections: a review of technology. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 19–26.

Lin MT, Lu HC, Chen WL: Improving efficacy of antifungal therapy by polymerase chain reaction-based strategy among febrile patients with neutropenia and cancer. Clin Infect Dis 2001a; 33:1621–1627.

Lin S, Schranz J, Teutsch S: Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 2001b; 32:358–366.

Lindholm L, Sarkkienen H: Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. J Clin Microbiol 2004; 42:5609–5613.

Liu PYF, Tung JC, Ke SC, Chen SL: Molecular epidemiology of extended spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. J Clin Microbiol 1998; 36:2759–2762.

Long CM, Drew L, Miner R, et al: Detection of cytomegalovirus in plasma and cerebrospinal fluid specimens from human immunodeficiency virus infected patients by the Amplicor CMV test. J Clin Microbiol 1998; 36:2434–2438.

Lorinez AT: Diagnosis of human papillomavirus infection by the new generation of molecular DNA assays. Clin Immunol Newslett 1992, 12:8.

Lu RH, Hwang SJ, Chan CY, et al: Quantitative measurement of serum HCV RNA in patients with chronic hepatitis C: comparison between Amplicor HCV monitor system and branched DNA signal amplification assay. J Clin Lab Anal 1998; 12:121–125.

Lumb R, Davies K, Dawson D, et al: Multicenter evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* ligase chain reaction assay. J Clin Microbiol 1999; 37:3102–3107.

Lunel F, Cresta P, Vitour D: Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA and monitor assays. Hepatology 1999; 29:528–535.

Mahony JB, Luinstra KE, Waner J, et al: Interlaboratory agreement study of a double set of PCR plasmid primers for detection of *Chlamydia trachomatis* in a variety of genitourinary specimens. J Clin Microbiol 1994; 32:87–91.

Maiwald M: Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp pp 379–390.

Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al: Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoetic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2002; 34:909–917.

Marshall A, Hodgson J: DNA chips: An array of possibilities. Nature Biotechnol 1998; 16:27–31

Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN: *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 30:205–214.

Martel M, Gomez J, Esteban JL: High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. J Clin Microbiol 1999; 37:327–332.

Martino R, Bretagne S, Einsele H, et al: Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. Clin Infect Dis 2005; 40:67–78.

Martinot-Peignoux M, Boyer N, Pouteau M: Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. J Hepatol 1998; 29:214–223.

Mathema B, Kreisworth BN: Genotyping bacteria by using variable-number tandem repeats. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 223–233.

Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK: Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1996; 34:2598–2600.

Maurmann S, Fricke L, Wagner H-J, et al: Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein–Barr virus reactivation in healthy carriers. J Clin Microbiol 2003; 41:5419–5428.

Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, et al: Multicenter comparison of the Digene Hybrid Capture CMV DNA Assay (Version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. J Clin Microbiol 1999; 37:958–963.

Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, DiCristina M, et al: Antigen microaarays for serodiangosis of infectious diseases. Clin Chem 2002; 48:121–130.

Miller WC: Can we do better than discrepant analysis for new diagnostic test evaluation? Clin Infect Dis 1998; 27:1186–1193.

Mitchell PS, Germer JJ, Patel R: Nucleic acid amplification methods: laboratory design and operations. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 85–93.

Modrusan Z, Marlowe C, Wheeler D, et al: Detection of vancomycin resistant genes *van*A and *van*B by cycling probe technology. Mol Cell Probes 1999; 13:223–231.

Moody A: Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002; 15:66–78.

Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, et al: Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: Clinical trial. J Clin Microbiol 1998; 36:995–998.

Morre SA, Sillekens PT, Jacobs M: Monitoring of *Chlamydia trachomatis* infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence based amplification. Mol Pathol 1998; 51:149–154.

Muir P, Ras A, Klaper PE: Multicenter quality assessment of PCR methods for detection of enteroviruses. J Clin Microbiol 1999; 37:1409–1414.

Mulligan ME, Peterson LE, Kwok RYY, et al: Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and

polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile.* J Clin Microbiol 1988; 26:41–46.

Murphy DG, Cote L, Fauvel M, et al: Multicenter comparison of Roche COBAS AMPLICOR MONITOR version 1.5, Organon Teknika NucliSens QT with Extractor, and Bayer Quantiplex version 3.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol 2000; 38:4034–4041.

Murphy D, Gonin P, Fauvel M: Reproducibility and performance of the second-generation branched-DNA assay in routine quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol 1999; 37:812–814.

Murphy D, Willems B, Delage G: Use of the 5′ noncoding region for genotyping hepatitis C virus. J Infect Dis 1994; 169:473–475.

Musher B, Fredricks D, Leisenring W, et al: *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol 2004; 42:5517–5522.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Molecular diagnostic methods for infectious disease. Approved Guideline. Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995, MM3-A.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S: Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. J Clin Microbial 1999; 37:409–412.

Ninet B, Rohner P, Metral C, Auckenthaler R: Assessment of use of the COBAS Amplicor system with BACTEC 12B cultures for rapid detection of frequently identified mycobacteria. J Clin Microbiol 1999; 37:782–784.

NiRiain U, Cormican M, Flynn J, et al: PCR based fingerprinting of *Enterobacter cloacae.* J Hosp Infect 1994; 27:237–240.

Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G: Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32:277–284.

O'Connor RM, Mackay MR, Ward H: Molecular approaches for detection, species identification, and genotyping of *Cryptosporidium. In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 583–601.

O'Neill AM, Gillespie SH, Whitting GC: Detection of penicillin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* by pbp2b PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1999; 37:157–160.

Olive DM, Bean P: Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37:1661–1669.

Oliveira K, Brecher SM, Durbin A, et al: Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol 2003; 41:889–891.

Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, et al: Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 2001; 39:4138–4141.

Oliveira K, Procop GW, Wilson D, et al: Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 2002; 40:247–251.

Pang XL, Chui L, Fenton J, et al: Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS Amplicor CMV Monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation. J Clin Microbiol 2003; 41:3167–3174.

Parent du Châtelet I, Traore Y, Gessner BD, et al: Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. Clin Infect Dis 2005; 40:17–25.

Estudo recente que demonstra o valor da multiplex-PCR para o diagnóstico da meningite bacteriana.

Pasternack R, Vuorinen P, Miettinen A: Comparison of a transcription-mediated amplification assay and polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18:142–144.

Patel R, Smith TF, Espy M, et al: A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. J Infect Dis 1995; 171:1010–1014.

Paton AW, Paton JC: Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA enterohaemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. J Clin Microbiol 1998; 36:598–602.

Pellegrin I, Garrigue I, Ekouevi D, et al: New molecular assay to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. J Infect Dis 2000; 182:36–42.

Pelloux H, Guy E, Angelici MC: A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii,* involving 15 teams. FEMS Microbiol Lett 1998; 165:231–237.

Peltola H, Leinikki P: Rubella gene sequencing as a clinician's tool. Lancet 1998; 352:1799–1800.

Petri WA Jr: Overview of the development, utility, and future of molecular diagnostics for parsitic disease. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 579–582.

Petropoulos CJ: Phenotypic testing of human immunodeficiency virus type 1 drug susceptibility. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 501–528.

Pfaller MA: Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. Emerg Infect Dis 2001; 7:312–318.

Pfaller MA, Caliendo AM, Versalovic J: Molecular biology. *In* Isenberg HD (ed.): Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. Washington, DC, ASM Press, 2004a, pp 12.1.1–12.6.1.

Pfaller MA, Diekema DJ: Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus.* J Clin Microbiol 2004b; 42:4419–4431.

Pfaller MA, Hollis RJ: Automated ribotyping. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004c, pp 245–258.

Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ: Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 25:1–8.

Pfyffer GE, Funke-Kissling P, Rundler E, Weber R: Performance characteristics of the BDProbeTec system for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1999; 37:137–140.

Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C: Comparative evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semi-automated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:3601–3604.

Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, et al: Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 2002; 40:4138–4142.

Poljak M, Brencic A, Vince A, Marin IJ: Comparative evaluation of first and second generation Digene hybrid capture assays of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. J Clin Microbiol 1999; 37:796–797.

Poljak M, Seme K, Koren S: Evaluation of the automated COBAS AMPLICOR hepatitis C virus PCR system. J Clin Microbiol 1997; 35:2983–2984.

Pozo F, Casas I, Tenorio A, et al: Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:1741–1745.

Puchhammer-Stockl E, Schmied B, Mandl CW, et al: Comparison of line probe assay (LIPA) and sequence analysis for detection of HIV-1 drug resistance. J Med Virol 1999; 57:283–289.

Rademaker JLW, Savelkoul P: PCR amplification-based microbial typing. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 197–221.

Radford SA, Johnson EM, Leeming JP: Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. J Clin Microbiol 1998; 36:1294–1299.

Ramotar K, Bobrowska M, Jessamine P, Toye B: Detection of methicillin resistance in coagulase negative staphylococci initially reported as methicillin susceptible using automated methods. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30:267–273.

Rantakokko-Jalava K, Jalava J: Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. J Clin Microbiol 2001; 39:2904–2910.

Raoult D, Fournier PE, Drancourt M: What does the future hold for clinical microbiology? Nat Rev Microbiol 2004; 2:151–159.

Razonable RR, Paya CV, Smith TF: Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoetic stem cell and solid-organ transplant recipients. J Clin Microbiol 2002; 40:746–752.

Read SJ, Jeffery KJM, Bangham CRM: Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. J Clin Microbiol 1997; 35:691–696.

Richter E, Niemann S, Gerdes R, Hoffner S: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (Accuprobe) and molecular techniques. J Clin Microbiol 1999; 37:964–970.

Robbins JB, Schneerson R, Gotsclich EC: Surveillance for bacterial meningitis by means of polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 2005; 40:26–27.

Ross JS: Financial determinants of outcomes in molecular testing. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:1071–1075.

Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, et al: Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2093–2098.

Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S: Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. J Clin Microbiol 1994; 32:2590–2592.

Roth WK, Weber M, Seifried E: Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus and HIV-1 in the blood bank setting. Lancet 1999; 353:359–363.

Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al: Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol 2004; 42:5636–5643.

Rudolph KM, Parkinson AJ, Roberts MC: Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis and antibiogram of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B isolates from selected areas within the United States. J Clin Microbiol 1998; 36:2703–2707.

Rys PN, Persing DH: Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. J Clin Microbiol 1993; 31:2356–2360.

Sader H, Pignatari AC, Frei R, et al: Pulsed field gel electrophoresis of restriction-digested genomic DNA and antimicrobial susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* strains from Brazil, Switzerland and the USA. J Antimicrob Chemother 1994; 33:615–618.

Sakai H, Procop GW, Kobayashi N, et al: Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. J Clin Microbiol 2004; 42:5739–5744.

Sawyer L, Leung I, Friesenhahn M, et al: Clinical laboratory evaluation of a new sensitive and specific assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA in clinical specimens. J Hepatol 2000; 32(Suppl 2):116A.

Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, et al: Direct identification of mycobacteria from MB/BacT Alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. J Clin Microbiol 2001; 39:3222–3227.

Schachter J: Two different worlds we live in. Clin Infect Dis 1998; 27:1181- 1185.

Schepetiuk A, Kok T, Martin L, et al: Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine samples by nucleic acid tests: comparison with culture and enzyme immunoassay of genital swab specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:3355–3357.

Scheuermann RH, Domiati-Saad R, Rogers BB: DNA virus detection. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 429–440.

Seme K, Poljak M, Koren S: Mistyping of two Slovenian hepatitis C virus subtype 2c isolates as subtype 2b by two 5′ noncoding region genotyping methods. J Clin Microbiol 1997; 35:3369.

Sepkowitz KA: How contagious is tuberculosis? Clin Infect Dis 1996;23:954–962.

Shah JS, Liu J, Smith J: Novel ultrasensitive, Q-beta replicase amplified hybridization assay for detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 1994; 32:2718–2724.

Shrestha NK, Shermock KM, Gordon SM, et al: Predictive value and cost-effectiveness analysis of a rapid polymerase chain reaction for preoperative detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Infect Control Hosp Epidemiol 2003a; 24:327–333.

Exemplo de como a rápida detecção de um importante patógeno nosocomial pode melhorar o tratamento do paciente e minimizar a infecção nosocomial (além de economizar dinheiro).

Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, et al: Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003b; 41:5121–5126.

Sloutsky A, Han LL, Werner BG: Practical strategies for performance optimization of the enhanced Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol 2004; 42:1547–1551.

Smith TF, Espy MJ, Jones MF: Molecular virology: current and future trends. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 543–548.

Sola C, Horgen L, Maisetti J, et al: Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36:1122–1124.

Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13:332–370.

Soll DR, Lockhart SR, Pujol C: Laboratory procedures for epidemiological analysis of microorganisms. *In* Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al (eds), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003, pp 139–161.

Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM: Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. J Clin Microbiol 1998; 36:1895–1901.

Stary A, Schuh E, Kerschbaumer M, Gotz B, Lee H: Performance of transcription-mediated amplification and ligase chain reaction assays for detection in urogenital samples obtained by noninvasive methods. J Clin Microbiol 1998; 36:2666–2670.

Stender H, Mollerup TA, Lund K, et al: Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3:830–837.

Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts GD: Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. J Clin Microbiol 1993; 31:845–850.

Stöver AG, Jeffery E, Xu J, Persing DH: Hybridizaton array technology. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 619–639.

Sturtevant J: Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. Clin Microbiol Rev 2000; 13:408–427.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, et al: Second generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. J Clin Microbiol 1996; 34:2259–2266.

Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, et al: Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1998; 36:3674–3679.

Telenti A, Honore N, Bernasconi C: Genotypic assessment of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. J Clin Microbiol 1997; 35:719–723.

Tenover F, Arbeit RD, Goering RV: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33:2233–2239.

Tenover FC, Rasheed JK: Detection of antimicrobial resistance genes and mutations associated with antimicrobial resistance in microorganisms. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 391–406.

Thwaites GE, Caws M, Hong TT, et al: Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (Amplified Mycobacterium Direct Test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculous chemotherapy. J Clin Microbiol 2004; 42:996–1002.

Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT: Early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC cultures by ligase chain reaction. J Clin Microbiol 1998; 36:2791–2792.

Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, et al: Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2001; 39:1079–1084.

Tortoli E, Tronci M, Tosi CP: Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 33:173–179.

Tremblay C, Coutlee F, Weiss J, et al: Evaluation of a non-isotopic polymerase chain reaction assay for detection in clinical specimens of herpes simples virus type 2 DNA. Clin Diagn Virol 1997; 8:53–62.

Triques K, Coste J, Perret JL: Efficiencies of four versions of the Amplicor HIV-1 monitor test for quantification of different subtypes of human immunodeficiency virus type 1. J Clin Microbiol 1999; 37:110–116

Troesch A, Nguyen H, Miyada CG: *Mycobacterium* species identification and rifampicin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J Clin Microbiol 1999; 37:49–55.

Urdea MS, Horn T, Fultz T: Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. Nucl Acids Res Symp Series 1991; 24:197–200.

Van Belkum A, Melchers WJG, Ijsseldijk C, et al: Outbreak of amoxycillin-resistant *Haemophilus influenzae* type B: variable number of tandem repeats as novel molecular markers. J Clin Microbiol 1997; 35:1517–1520.

Van Belkum A, van Leeluwen W, Kaufmann ME, et al: Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. J Clin Microbiol 1998; 36:1653–1659.

Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA: Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:1169–1175.

Vandelli C, Renzo F, Braun HB: Prediction of successful outcome in a randomized controlled trial of the long-term efficacy of interferon alpha treatment for chronic hepatitis C. J Med Virol 1999; 58:26–34.

Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, et al: Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. J Clin Microbiol 2001; 39:1751–1756.

Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993, 31:406–409.

Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H: Specific detection of methicillin resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995; 33:2864–2867.

Versalovic J, Unger ER: External quality assessment and proficiency testing in diagnostic molecular microbiology. *In* Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Washington, DC, ASM Press, 2004, pp 691–696.

Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT: A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing *Acinetobacter calcoaceticus–A. baumannii* complex. J Med Microbiol 1996; 44:482–489.

Vincelette J, Schirm J, Bogard M: Multicenter evaluation of the fully automated COBAS amplicor PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 74–80.

Visvesvara GS, Garcia LS: Culture of protozoan parasites. Clin Microbiol Rev 2002; 15:327–328.

Vogel U, Morrrelli G, Zurth K: Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. J Clin Microbiol 1998; 36:2465–2470.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, et al: Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 2004; 10(Suppl 1):48–66.

Walton DT, Valesco M: Identification of *Mycobacterium gordonae* from culture by the Gen-Probe rapid diagnostic system: evaluation of 218 isolates and potential sources of false negative results. J Clin Microbiol 1991; 29:1850–1854.

Warren DK, Liao RS, Merz LR, et al: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2004; 42:5578–5581.

Watterson SA, Drobniewski FA: Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. J Clin Pathol 2000; 53:727–732.

Discussão abrangente sobre os métodos moleculares e outras tecnologias aplicadas ao diagnóstico das infecções por micobactérias.

Weir SC, Fischer SH, Stock F, Gill VJ: Detection of *Legionella* by PCR in respiratory specimens using a commercially available kit. Am J Clin Pathol 1998; 110:295–300.

Wilke WW, Sutton LD, Jones RN: Automation of polymerase chain reaction (PCR) tests as a mechanism to achieve acceptable contamination rates. Clin Chem 1995, 41:622–623.

Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, et al: Multicenter evaluation of *Candida albicans* peptide mucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43:2909–2912.

Wilson KH: Detection of culture-resistant bacterial pathogens by amplification and sequencing of ribosomal DNA. Clin Infect Dis 1994; 18:958–962.

Wolk D, Mitchell S, Patel R: Principles of molecular microbiology testing methods. Infect Dis Clin N Amer 2001; 15:1157–1204.

Woods GL, Bergmann JS, Williams-Bouyer N: Clinical evaluation of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in select nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 2001; 39:747–749.

Woods JP, Kersulyte D, Tolan RW Jr, et al: Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis to type disease and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated during a university outbreak. J Infect Dis 1994; 169:1384–1389.

Wylie JL, Moses S, Babcock R, et al: Comparative evaluation of Chlamydiazyme, PACE 2, and AMP-CT assays for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:3488–3491.

Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B: Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type I RNA in plasma by the AIDS clinical trials group virology laboratories. J Clin Microbiol 1996; 34:2695–2701.

Yeo SF, Wong B: Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2002; 15:465–484.

Excelente revisão sobre as abordagens bioquímicas e imunológicas moleculares para o rápido diagnóstico de micoses invasivas.

Young H, Moyes A: Comparative evaluation of Accuprobe culture identification test for *Neisseria gonorrhoeae* and other rapid methods. J Clin Microbiol 1993; 31:1996–1999.

Yuen LKW, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B: Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31:1615–1618.

Zaaijer HL, Cuypers HTM, Reesink HW, et al: Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. Lancet 1993; 341:722–724.

Zaaijer HL, ter Borg F, Cuypers HTM, et al: Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. J Clin Microbiol 1994; 32:2088–2091.

Zhou W, Du W, Cao H, et al: Detection of *gyr*A and *par*C mutations associated with ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* by use of oligonucleotide biochip technology. J Clin Microbiol 2004: 42:5819–5824.

CAPÍTULO 63

Coleta e manipulação de amostras para o diagnóstico de doenças infecciosas

Ann C. Croft MT(ASCP), Gail L. Woods MD

Princípios gerais 1350
Momento de coleta da amostra 1350
Volume da amostra 1350
Coleta da amostra 1350
Transporte da amostra 1350
Amostras inaceitáveis 1350
Precauções universais 1351
Encaminhamento para testes 1351
Sangue 1351
Líquidos corporais 1354
Líquido cerebrospinal 1354
Outros líquidos corporais 1355
Tecidos 1356
Olhos 1356
Amostras da conjuntiva 1356
Amostras da córnea 1357
Trato respiratório 1357
Amostras da nasofaringe 1357
Amostras da garganta 1357
Escarro e aspirados traqueais 1358
Amostras de broncoscopia 1359
Trato urinário 1360
Trato genital 1361
Secreções vaginais 1361
Amostras endocervicais e uretrais 1361
Vesículas 1362
Úlceras 1362
Fezes 1363
Vírus 1363
Patógenos bacterianos 1363
Parasitas 1364
Lesões cutâneas e subcutâneas 1365
Vesículas, bolhas e pústulas 1365
Úlceras cutâneas 1365
Infecções de feridas e abscessos 1366
Referências bibliográficas 1366

PONTOS-CHAVE

- Coletar amostras do local da infecção antes de iniciar a terapia.
- Coletar um volume adequado de amostra para teste, conforme o necessário.
- Submeter tecido, líquido ou aspirado a culturas bacterianas, fúngicas e virais, se possível, pois eles são sempre superiores a uma amostra obtida com *swab*.
- Usar os materiais de coleta e transporte necessários para preservar a integridade da amostra.
- Dar ordens claras e a fonte de informação.
- Providenciar rapidamente o transporte das amostras para o laboratório, não permitindo que fiquem nas áreas de coleta.

A coleta, o transporte e o processamento apropriados de uma amostra são etapas pré-analíticas cruciais para o diagnóstico acurado de doenças infecciosas. Neste capítulo, serão discutidas as orientações para manipulação das amostras. Em primeiro lugar, serão revistos os princípios gerais, seguindo-se a discussão dos tipos mais comuns de amostras submetidas a testes no laboratório clínico de microbiologia.

Princípios gerais

Momento de coleta da amostra

O ideal para a detecção do(s) patógeno(s) responsável(is) por uma doença infecciosa é que as amostras sejam coletadas quando houver maior probabilidade de se recuperar o agente suspeito. Por exemplo, a probabilidade de recuperar a maioria dos vírus é maior na fase aguda da doença. Para detectar bactérias, o ideal é coletar as amostras antes de começar a terapia antimicrobiana.

Volume da amostra

O volume da amostra colhida precisa ser adequado para a realização dos estudos microbiológicos solicitados. Se o laboratório receber um volume insuficiente, deve notificar o médico ou a enfermeira que solicitou o exame para que seja enviada outra amostra, ou então para que o médico priorize sua solicitação. Caso se use um *swab* para coletar uma amostra, um que tenha a extremidade de poliéster e a haste de plástico é aceitável para a maioria dos organismos. Deve-se evitar alginato de cálcio para coletar amostras para cultura viral, pois ele poderia inativar o vírus do herpes simples (HSV); o algodão pode ser tóxico para *Neisseria gonorrhoeae*, e hastes lanosas devem ser evitadas porque a lã pode ser tóxica para *Chlamydia trachomatis*. *Swabs* não são o ideal para a detecção de anaeróbios, micobactérias ou fungos, não devendo ser usados quando se suspeita da presença desses microrganismos. Uma amostra real de tecido ou líquido de aspirado é sempre superior a uma obtida com *swab* para a recuperação de organismos patogênicos.

Coleta da amostra

As amostras devem ser obtidas do local da infecção com contaminação mínima dos tecidos adjacentes e secreções orgânicas e, com exceção das fezes, devem ser coletadas em um recipiente estéril. Toda amostra deve ser rotulada com o nome e o número de identificação da pessoa de quem foi colhida, a fonte da amostra e a data e a hora em que foi obtida.

Transporte da amostra

Após a coleta, as amostras devem ser colocadas em um saco apropriado para risco biológico e transportadas para o laboratório o mais rapidamente possível. Se alguma demora for inevitável, amostras de urina, escarro e outras de origem respiratória, fezes e aquelas para detecção de *C. trachomatis* ou vírus devem ser refrigeradas, para evitar a proliferação da microbiota normal. Líquido cerebrospinal (LCE) e outros líquidos corporais, sangue e amostras coletadas para recuperação de *N. gonorrhoeae* devem ser mantidas à temperatura ambiente, porque a refrigeração afeta adversamente a recuperação dos patógenos potenciais dessas fontes.

Amostras inaceitáveis

Cada responsável por um laboratório deve estabelecer critérios para rejeitar amostras inaceitáveis para cultura. A maioria dos microbiologistas clínicos concorda que as seguintes amostras devem ser rejeitadas:

- qualquer amostra recebida em formalina;
- coleta de escarro de 24 horas;
- amostras em recipientes com vazamento;
- amostras inoculadas em placas de ágar que tenham secado ou estejam com o prazo de validade vencido;
- amostras contaminadas com bário, corantes químicos ou óleos químicos;
- extremidades de cateteres de Foley;
- amostras em duplicata (exceto hemoculturas) recebidas em um período de 24 horas;
- sangue em extremidade de cateteres de pacientes sem hemocultura positiva concomitante.

As seguintes amostras devem ser rejeitadas para cultura anaeróbica:

- lavados gástricos;
- urina que não seja de aspirado suprapúbico;
- fezes (exceto para recuperação de *Clostridium difficile* para estudos epidemiológicos ou para o diagnóstico de bactérias associadas à intoxicação alimentar [discutida adiante]);
- amostras orofaríngeas, exceto aquelas de tecidos profundos obtidas durante um procedimento cirúrgico;
- escarro;
- *swabs* de locais de ileostomia ou colostomia;
- amostras superficiais da pele.

Precauções universais

As precauções universais precisam ser seguidas durante a manipulação de qualquer amostra. Usam-se barreiras apropriadas para evitar exposição da pele e de mucosas às amostras. Luvas e um avental (jaleco, guarda-pó) devem ser usados o tempo todo, bem como máscara, óculos de proteção (ou trabalhar atrás de um escudo de plástico) e capa impermeável nas situações em que haja risco de o material espirrar ou lançar gotículas. O ideal é que todos os recipientes de amostras, ou pelo menos aqueles que contenham secreções respiratórias e os submetidos especificamente à detecção de micobactérias ou fungos, sejam abertos em uma cabine de segurança biológica. Amostras coletadas para o isolamento de vírus devem ser manipuladas em uma cabine de segurança biológica, para evitar contaminação de outras culturas celulares.

Encaminhamento para testes

Quando for necessário enviar amostras para um laboratório de referência, elas devem ser embaladas de acordo com as orientações adequadas para materiais perigosos (ver site IATA). As amostras precisam ser limitadas a não mais que 40 mL. Culturas de bactérias e fungos devem ser realizadas em meios sólidos em tubos. A tampa do recipiente primário (tubo ou frasco) deve ser vedada com fita à prova d'água, e ele deve ser introduzido em um segundo recipiente, circundado por material de embalagem suficiente para absorver todo o volume da cultura ou da amostra se houver vazamento ou ruptura do recipiente primário. Caso vários tubos primários sejam colocados em um segundo recipiente, é preciso embrulhá-los individualmente ou separá-los, para que não haja contato entre eles; também têm de ficar em uma segunda embalagem, que precisa ser à prova de vazamentos. O segundo recipiente deve ser tampado e colocado em um outro de envio, feito de fibra corrugada ou plástico rígido. Uma lista com os itens contidos deve ser colocada entre a embalagem secundária e o pacote externo. Os recipientes secundário e externo devem ser resistentes o suficiente para manter sua integridade às temperaturas e pressões atmosféricas às quais serão submetidos. Se uma amostra tiver de ser enviada em gelo seco (quando é considerada um material perigoso), isso precisa ser assinalado da seguinte maneira: "Gelo seco, amostra clínica congelada." O gelo seco deve ser colocado fora do segundo recipiente, com o material embalado de tal maneira que o recipiente não fique solto dentro do outro à medida que o gelo seco evapore. Todo material infeccioso enviado tem de estar rotulado com uma etiqueta oficial contendo o endereço e o conteúdo, além do nome e do telefone do responsável pelo envio.

Sangue

A detecção de patógenos hematogênicos é uma das funções mais importantes do laboratório de microbiologia. A hemocultura é essencial para identificar bactérias responsáveis por bacteriemia, sepse, infecções de valvas nativas e próteses valvares, tromboflebite supurativa, aneurismas micóticos e infecções de enxertos vasculares. As hemoculturas também são úteis para diagnosticar algumas infecções virais e infecções invasivas ou disseminadas causadas por certos fungos, em particular espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, espécies de *Fusarium* e *Histoplasma capsulatum*. Hemoparasitas são detectados ao exame macroscópico de esfregaços de sangue periférico. Em geral, o sangue deve ser coletado para cultura antes de se instituir a terapia antimicrobiana, quando há um dos seguintes sintomas ou uma combinação deles: febre (38°C ou mais), hipotermia (36°C ou menos), leucocitose (especialmente com desvio para a esquerda), granulocitopenia ou hipotensão.

Coleta da amostra

A detecção a tempo e a identificação acurada de organismos no sangue dependem da coleta, do transporte e do processamento apropriados da amostra. A técnica de flebotomia é inerente à detecção de qualquer microrganismo sanguíneo. Para minimizar a contaminação de amostras de sangue pela microbiota cutânea, o local da punção venosa deve ser preparado com um agente bactericida. Primeiro, a pele é limpa com álcool (isopropílico ou etílico a 70%) e então com uma solução de iodo a 1 a 2%, um iodóforo ou clorexidina. Para antissepsia máxima, deve-se deixar a área secar por um a dois minutos antes da punção da veia periférica escolhida.

Momento adequado para detecção de bacteriemia e fungemia

O momento ideal para retirar sangue para culturas quando se suspeita de bacteriemia ou fungemia é logo antes de um calafrio, mas como isso é imprevisível, na maioria das vezes o sangue para hemoculturas é coletado após o início de febre e calafrios. O sangue é retirado com uma agulha montada em seringa e, sem trocar-se a agulha, injetado diretamente nos frascos com meios de cultura ou em outro sistema de hemocultura (Krumholz, 1990). Os frascos inoculados são imediatamente invertidos várias vezes para misturar o sangue e, em seguida, transportados para o laboratório, à temperatura ambiente, o mais rápido possível. O sangue para hemocultura nunca deve ser refrigerado.

Volume da amostra

Em adultos com bacteriemia, o número de unidades formadoras de colônia (UFC, ou CFU, *colony-forming units*) por mililitro de sangue costuma ser baixo. Portanto, no caso de adultos, é altamente recomendável que a coleta de 20 a 30 mL de sangue por conjunto de cultura (Ilstrup, 1983; Washington, 1986; Towns, 2002; Cockerill, 2004). No caso de lactentes e crianças, a concentração de microrganismos no sangue é maior, sendo adequada uma coleta de 1 a 5 mL de sangue por cultura.

Número de amostras

As recomendações quanto ao número de amostras de sangue coletadas baseiam-se na natureza da bactéria: transitória, intermitente ou contínua. A bacteriemia transitória segue-se à manipulação de um foco de infecção (p. ex., um abscesso, um furúnculo ou uma celulite), à instrumentação de uma superfície mucosa contaminada (como ocorre durante procedimentos dentários, cistoscopia, cateterismo uretral, aborto por aspiração ou sigmoidoscopia) ou a um procedimento cirúrgico em local contaminado (como ressecção transuretral da próstata, histerectomia vaginal, ressecção do cólon e debridamento de queimaduras infectadas). Também ocorre bacteriemia transitória no início da evolução de muitas infecções sistêmicas e localizadas, como meningite, pneumonia, artrite piogênica e osteomielite. A maioria das bacteriemias intermitentes está associada a um abscesso não drenado, enquanto a bacteriemia contínua é a marca da infecção intravascular, como endocardite bacteriana, aneurisma micótico ou um cateter intravascular infectado. Também ocorre bacteriemia contínua durante as primeiras semanas da febre tifoide e da brucelose.

O número ideal de hemoculturas para detecção de bacteriemia em pacientes sem endocardite é motivo de controvérsia. A maioria das

autoridades no assunto concorda que duas ou três amostras de sangue de 20 mL obtidas em um período de 24 horas e distribuídas igualmente em frascos de hemocultura aeróbia e anaeróbia é suficiente para detectar a maioria das infecções sanguíneas. Um pesquisador demonstrou que um total de quatro amostras para hemocultura coletadas em 24 horas aumentou em até 20% o número de patógenos potenciais (Cockerill, 2004). O intervalo de tempo ideal entre as culturas é desconhecido, porém, foram sugeridos 30 a 60 minutos no caso dos dois primeiros conjuntos, obtendo-se mais um ou dois outros conjuntos no restante das 24 horas, se persistirem os sintomas de septicemia (Cockerill 2004). No entanto, se houver urgência para iniciar a terapia antimicrobiana, as amostras para cultura devem ser coletadas antes, de locais separados e dentro de poucos minutos.

Organismos como os estafilococos coagulase-negativos, estreptococos viridans, corinebactérias, espécies de *Bacillus* e de *Propionibacterium* são contaminantes frequentes de hemoculturas, mas também podem ser patógenos verdadeiros. A coleta de dois conjuntos de amostras de sangue para hemocultura por episódio febril ajuda a distinguir patógenos prováveis de contaminantes. Os últimos, em geral, estão presentes em apenas um frasco de um conjunto de culturas, enquanto os patógenos costumam ser recuperados de mais de um conjunto.

Recuperação de microrganismos

Fatores do hospedeiro como anticorpos, complemento, leucócitos fagocíticos e agentes antimicrobianos podem impedir a recuperação de microrganismos do sangue, razão pela qual têm sido empregadas várias abordagens para contrapor-se a esses fatores. A diluição da amostra de sangue em caldo, na proporção de 1:10, promove neutralização ótima da atividade bactericida do soro (Washington, 1986). Incorporar 0,02 a 0,05% de sulfonato de sódio polianetol no meio da hemocultura inibe a coagulação, a fagocitose e a ativação do complemento, além de inativar aminoglicosídeos. Os métodos que combatem os agentes antimicrobianos presentes incluem o acréscimo de penicilinases ao caldo para inativar penicilinas, o uso de resinas adsorventes de antibiótico ou do sistema de centrifugação para lise (descrito adiante, no tópico intitulado Hemoculturas manuais).

Sistemas de hemocultura

Dispõe-se de vários sistemas de hemocultura, cada um com suas vantagens e desvantagens (Wilson, 1996; Reimer, 1997). Os sistemas de detecção automatizados estão substituindo rapidamente os manuais, porém, muitos laboratórios menores ainda confiam nos métodos manuais. Tanto os sistemas automatizados como os manuais usam meios líquidos enriquecidos nutricionalmente, que são capazes de manter o crescimento da maioria das bactérias. Em termos tradicionais, são inoculados dois frascos, e um é ventilado para assegurar a recuperação de aeróbios. Ante o declínio nas bacteriemias por anaeróbios, tal prática de um frasco aeróbio e outro anaeróbico por conjunto foi questionada (Sharp, 1991; Murray, 1992). A inoculação rotineira de dois meios aeróbicos e apenas o uso seletivo de hemoculturas anaeróbias pode permitir a detecção de mais bacteriemias e fungemias.

Hemoculturas manuais

Os frascos de cultura são examinados diariamente, durante sete dias, em busca de evidência de crescimento, indicado por turbidez, hemólise, produção de gás, colônias discretas ou uma combinação de tudo isso. Quando o crescimento é aparente, faz-se a coloração de Gram de um esfregaço para exame microscópico e o caldo é subcultivado em meios de ágar apropriados. A subcultura rotineira de caldos negativos à observação macroscópica deve ser feita a partir do frasco ventilado, 6 a 18 horas após a inoculação. A subcultura rotineira do frasco anaeróbio é desnecessária. As vantagens das culturas convencionais do caldo são o baixo custo dos materiais e um baixo índice de contaminação. A principal desvantagem é o longo tempo do processo de exame rotineiro do frasco de subcultura.

Um sistema de hemocultura manual menos trabalhoso consiste em colocar um caldo em um frasco adaptado a uma câmara contendo ágar em uma placa. Para se fazer a subcultura desse sistema bifásico, o frasco é inclinado, permitindo que a mistura de sangue e caldo entre na câmara e flua sobre o ágar. As colônias no ágar são usadas para identificação e testes de suscetibilidade. Para a recuperação de bactérias aeróbias e facultativas e leveduras, esse sistema é comparável a outros ou ainda melhor do que eles (Murray, 1991). Entretanto, a produção de anaeróbios a partir de sistemas de caldo convencionais pode ser maior.

O sistema de hemocultura por centrifugação com lise consiste em um tubo contendo reagentes que inibem a cascata da coagulação e do complemento, provocam a lise das células sanguíneas e o amortecimento dos microrganismos durante a centrifugação. O sangue é acrescentado ao tubo, que é invertido várias vezes para evitar a coagulação, e transportado para o laboratório tão logo for possível. O ideal é que a amostra seja processada imediatamente, mas o processamento pode ser feito até 8 horas depois sem afetar adversamente a recuperação de microrganismos. Para processar a cultura, o tubo é centrifugado por 30 minutos a 3.000 × g, o sobrenadante é descartado e o sedimento é misturado em processador e colocado em placa de ágar. Também se dispõe de tubos menores para amostras de pequenos volumes, como de lactentes e crianças pequenas. As vantagens da centrifugação com lise incluem a recuperação excelente de *Staphylococcus aureus*, algumas Enterobacteriaceae e fungos (é o melhor sistema para recuperação de mofos, como *H. capsulatum*), a disponibilidade direta de colônias para identificação e testes de suscetibilidade, bem como a possibilidade de fazer culturas quantitativas. Além disso, esse sistema é flexível porque meios especiais podem ser inoculados para recuperar organismos com necessidades específicas de crescimento, como espécies de *Legionella* e micobactérias. Contudo, é um sistema trabalhoso, pouco propenso à recuperação de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou anaeróbios, e o risco de contaminação é maior.

Sistemas de hemocultura automatizados

Há vários sistemas automatizados de monitoração contínua de hemoculturas disponíveis comercialmente (Wilson, 1996). As vantagens de todos eles são a eliminação da necessidade de subcultura às cegas e o encurtamento do período habitual de incubação de sete a cinco dias (Woods, 1994; Reisner, 1999). Um de tais sistemas baseia-se na detecção colorimétrica do CO_2 produzido durante o crescimento microbiano (Thorpe, 1990). Um sensor de CO_2 é conectado ao fundo de cada tubo de cultura e separado do caldo por uma membrana impermeável à maioria dos íons, aos componentes do meio e ao sangue, mas livremente permeável ao CO_2. Os tubos inoculados são colocados em células no instrumento, o que proporciona uma oscilação contínua tanto dos frascos aeróbios como dos anaeróbios. Se houver bactérias, elas geram CO_2, que é liberado no caldo; o pH então diminui, fazendo que o sensor mude sua cor de verde para amarelo. As alterações de cor são monitoradas uma vez a cada 10 minutos por um detector colorimétrico. Os meios disponíveis para uso desse sistema incluem os aeróbios e anaeróbios rotineiros, que acomodam 5 a 10 mL de sangue; o Pedi-BacT, que acomoda 4 mL ou menos de sangue, e o FAN (*fastidious antibiotic neutralization*, ou seja, neutralização da exigência de antibiótico), que facilita a recuperação de fungos e bactérias de pacientes que estejam recebendo agentes antimicrobianos.

Um segundo sistema de monitoração contínua baseia-se na tecnologia fluorescente (Nolte, 1993). Ligado à base de cada frasco fica um sensor de CO_2 que é impermeável a íons, componentes do meio e ao sangue, mas livremente permeável ao CO_2. Se houver microrganismos presentes, eles liberam CO_2 no meio, que então se difunde para a matriz do sensor e gera íons de hidrogênio. A queda subsequente no pH aumenta a fluorescência do sensor, mudando o sinal transmitido para os componentes ópticos e eletrônicos do instrumento. O computador gera curvas de crescimento e os dados são analisados de acordo com algoritmos de crescimento. Os tubos inoculados são colocados em células individuais do instrumento, no qual tanto os aeróbios como os anaeróbios são movimentados. Os meios disponíveis são para aeróbios e anaeróbios em volumes baixos (5–7 mL de sangue) e elevados (8–10 mL de sangue), o Peds-Plus (0,5–5 mL de sangue) e o Myco F Lytic para recuperação de fungos e micobactérias (Waite, 1998).

Um terceiro sistema detecta o crescimento de organismos em caldo, medindo o consumo e/ou a produção de gás (Zwadyk, 1994). Cada tubo inoculado é adaptado a um conector descartável que contém uma agulha retraída, a qual penetra na tampa do tubo e se conecta à sonda sensora na parte superior do tubo. O sensor monitora as alterações dentro dessa parte em termos de consumo e/ou produção de

gases (CO_2, N_2 e H_2) pelos organismos em crescimento e cria dados apontados internamente no computador. Dois tipos básicos de meios estão disponíveis: aeróbios e anaeróbios, contendo 80 mL de caldo e com capacidade para 0,1 a 10 mL de sangue, e tubos aeróbios e anaeróbios EZ Draw (diretos), que contêm 40 mL de caldo e têm capacidade para 0,1 a 5 mL de sangue.

Detecção de organismos raros

A detecção de algumas bactérias requer incubação prolongada ou meios especiais. Por exemplo, quando se suspeita de brucelose, deve-se coletar sangue no início da doença, incubando as culturas por duas a três semanas, embora com os sistemas automatizados as brucelas em geral cresçam em menos de uma semana (Bannatyne, 1997). As infecções com espécies de *Borrelia*, exceto a *Borrelia burgdorferi* (o agente etiológico da doença de Lyme, diagnosticada mais comumente por sorologia), são diagnosticadas detectando-se os espiroquetas no sangue periférico durante períodos febris. Os organismos são visualizados em preparações a fresco, misturando-se uma gota de sangue com uma de citrato de sódio e examinando à microscopia de campo claro ou escuro e em esfregaços finos e espessos corados por Giemsa ou Wright, à microscopia óptica. Para isolar *Leptospira interrogans* do sangue, colocam-se algumas gotas de sangue fresco ou coletado com anticoagulante durante a primeira semana da doença em três ou quatro tubos contendo meio semissólido para cultura de leptospiras (meio de Fletcher ou meio de Ellinghausen-McCollough-Johnson-Harris).

Podem ser empregados dois métodos para recuperar micobactérias de amostras de sangue. Com a técnica da centrifugação e lise, prepara-se um concentrado, inocula-se o sedimento em meios sólidos e/ou líquidos e as culturas são incubadas por até oito semanas. Uma abordagem alternativa e talvez mais rápida é a inoculação direta no meio Myco F Lytic (com o crescimento monitorado pelos instrumentos BACTEC 9.000) ou no meio 13 A (monitorado pelo BACTEC 460TB).

Detecção e notificação de culturas positivas

Hemoculturas positivas contendo organismos aeróbios comumente isolados, em geral, são detectadas depois de 12 a 36 horas de incubação. O relatório inicial deverá consistir apenas em um registro da coloração de Gram. Os resultados da identificação e dos testes de suscetibilidade podem ser esperados para 24 a 48 horas depois da coloração de Gram. Culturas contendo anaeróbios geralmente não são detectadas antes de 48 a 72 horas, e os resultados da identificação e dos testes de suscetibilidade só estarão disponíveis após três a quatro dias. Organismos fastidiosos, como os do grupo HACEK (*Haemophilus/Actinobacillus/Cardiobacterium/Eikenella/Kingella*), podem não ser detectados antes de 3 a 5 dias.

Detecção de vírus

Amostras de sangue são úteis para diagnosticar infecções por um número limitado de vírus (Tab. 63.1). Em geral, a viremia ocorre durante o período de incubação ou nos primeiros dois dias após o início dos sintomas; portanto, o sangue deve ser coletado no início da doença. Uma exceção é a infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), detectada quase continuamente em células mononucleares do sangue periférico e não no plasma da maioria das pessoas soropositivas. Uma amostra de sangue por um período de 24 horas, colhida de uma veia periférica ou por cateter intravascular, é adequada para a detecção do vírus.

As necessidades da amostra diferem de acordo com o vírus (conforme exposto na Tab. 63.1). Todas as amostras de sangue devem ser transportadas para o laboratório o mais rapidamente possível. Se for inevitável uma demora no processamento, as amostras devem ser refrigeradas por uma noite a 4°C, exceto aquelas para detecção do RNA do HIV no plasma, que precisam ser processadas (i. e., plasma separado) até seis horas após a coleta. Os vírus detectados rotineiramente na maioria dos laboratórios clínicos de virologia, o citomegalovírus (CMV) e os enterovírus serão aqui discutidos. Para a detecção de outros vírus mencionados na Tabela 63.1, as amostras são enviadas para um laboratório de referência.

A detecção do CMV e dos enterovírus no sangue envolve a separação do componente mais provável de conter o vírus e a inoculação daquela fração em monocamadas de células que sustentam a replicação viral ou mediante a preparação de um esfregaço para coloração com anticorpos mononucleares. O CMV é detectado mais frequentemente em neutrófilos, mas pode estar em células mononucleares do sangue periférico; portanto, o ideal para a detecção é cultivar ou corar tanto neutrófilos quanto células mononucleares (Howell, 1979). Os enterovírus são recuperados igualmente bem de leucócitos, principalmente células mononucleares, e do soro (Prather, 1984).

Tabela 63.1 Exigências para amostras para detecção ótima de vírus encontrados no sangue

	Exigências para amostras de sangue		
Vírus	**Tipo coletado**	**Fração usada para detecção**	**Volume (mL)**
Citomegalovírus	Com anticoagulante*	Leucócitos	5–10
Enterovírus	Com ou sem anticoagulante*	Soro ou leucócitos	5–10
Vírus da imunodeficiência humana†	EDTA	Células mononucleares ou plasma	2–5
Herpesvírus-6 humano	Heparinizado	Células mononucleares	5–10
Parvovírus B19	Sem anticoagulante	Soro	5–10
Vírus transmitidos por artrópodes‡	Com ou sem anticoagulante	Leucócitos ou coágulo homogeneizado	5–10

* Pode-se usar heparina ou EDTA para citomegalovírus e heparina, citrato ou EDTA para enterovírus. † Para monitorar a carga viral de HIV em pacientes que estejam recebendo terapia antirretroviral. ‡ Inclui os vírus da encefalite equina do leste, do oeste e da Venezuela, a de St. Louis e a da Califórnia, a febre amarela, a dengue e a febre causada pelo carrapato do Colorado.
EDTA = ácido etilenodiaminotetracético.

Para separar leucócitos, é preciso coletar sangue com anticoagulantes. O anticoagulante usado (citrato ou heparina sódica são aceitáveis) baseia-se no sistema de separação dos leucócitos (existem vários disponíveis no comércio) (Woods, 1987a; Storch, 1994). Para separar soro, o sangue é coletado em um tubo sem anticoagulante e deixado coagular a 4°C. Quando se forma um coágulo firme, a amostra é centrifugada a 2.000 × g durante 10 minutos a 4°C, e o soro é removido assepticamente.

Monocamadas celulares inoculadas para isolamento do vírus são selecionadas com base no vírus que se espera estar presente. Para CMV, é recomendável inocular MRC-5 ou outras culturas de fibroblastos humanos. A incubação de monocamadas em meio de manutenção contendo dexametasona 10^{-5} M por um mínimo de 24 horas antes da inoculação aumenta a taxa de detecção do CMV e diminui o tempo de aparecimento de efeito citopático (Thiele, 1988). Para a recuperação de enterovírus, MRC-5 e células renais primárias de macaco devem ser inoculadas, e a taxa de isolamento pode aumentar inoculando-se também células renais *Buffalo green monkey* e do rabdomiossarcoma humano (Dagan, 1986). Amostras de soro são inoculadas, adsorvidas, incubadas e examinadas à procura do efeito citopático específico do vírus. Em suspensões de leucócitos, monocamadas celulares são inoculadas com 0,5 mL da amostra, 1 mL do meio de manutenção é acrescentado e as culturas de células são incubadas por uma noite. A suspensão de células então é removida, as monocamadas são lavadas com solução fisiológica estéril tamponada com fosfato e, em seguida, acrescenta-se 1,5 mL de meio de manutenção e as culturas são reincubadas.

Além da cultura celular convencional, deve-se fazer outra por centrifugação se for solicitada detecção de CMV no sangue (Woods, 1987b). Os métodos mais sensíveis para detectar CMV no sangue são o ensaio de antigenemia, realizado corando-se preparações de leucócitos com citosporina e anticorpos monoclonais contra a proteína da matriz viral (pp 65) (Van Der Bij, 1988; Brumback, 1997) e fazendo-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa (Herrmann, 2004; Kalpoe, 2004; Meyer-Koenig, 2004).

Detecção de parasitas

Amostras de sangue são úteis para o diagnóstico de malária, babesiose, tripanossomíase e algumas filarioses. As amostras devem ser coletadas em tubos com anticoagulante e transportadas imediatamente para o laboratório. Se for preciso enviar esfregaços para um laboratório de referência, eles devem ser fixados em álcool absoluto logo após terem sido feitos. As técnicas usadas no laboratório para detectar os parasitas supracitados são as mesmas, e serão comentadas aqui a partir da mais simples até a mais complicada.

A técnica mais simples para detectar parasitas em uma amostra de sangue é a montagem direta, preparada colocando-se uma gota de sangue em uma lâmina de vidro de microscopia, cobrindo-a com lamínula e examinando imediatamente. Montagens diretas são excelentes para o diagnóstico de tripanaossomíase ou filariose, porque é fácil ver os tripomastigotas e as microfilárias movimentando-se, em geral sob pequeno ou médio aumento. O diagnóstico definitivo é feito a partir de esfregaços corados.

O esfregaço fino, preparado como se faz para hematologia e corado de maneira semelhante, é a preparação padrão para determinar as espécies encontradas de *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma* e microfilárias. Os esfregaços finos para parasitologia são fixados e, em seguida, corados de preferência manualmente pelo Giemsa, embora a coloração hematológica automatizada seja adequada. Primeiro, os esfregaços são observados sob pequeno aumento para a detecção de microfilárias, que são grandes (medem entre 100 e 200μm) e vistas com facilidade, em geral nas margens laterais do esfregaço. Depois que são localizadas, elas devem ser estudadas sob imersão em óleo para serem identificadas (ver Cap. 61). Após a observação sob pequeno aumento, o esfregaço é examinado com uma objetiva seca de maior aumento, à procura de tripanossomos. Por fim, com objetivo de imersão, é feita uma varredura para encontrar e identificar *Plasmodium*, *Babesia* e *Trypanosoma*.

Esfregaços espessos são úteis para detectar todos os parasitas mencionados anteriormente, com seu diagnóstico sendo parte do trabalho mínimo de um laboratório. Coloca-se uma gota de sangue em uma lâmina de vidro de microscopia limpa e, com o canto de outra lâmina, espalha-se a gota delicadamente até cobrir cerca de 1 cm^2. Deixa-se a preparação secar e, sem fixá-la, cora-se com o Giemsa, permitindo que ocorra desemoglobinização.

Líquidos corporais

Líquido cerebrospinal

Colhe-se LCE para diagnosticar meningite e, com menor frequência, encefalite viral. A meningite infecciosa, uma emergência clínica que requer tratamento precoce para evitar a morte do paciente ou sequelas neurológicas sérias, pode ser uma síndrome clínica aguda, subaguda ou crônica, com base na duração dos sintomas (Tab. 63.2). Ocorre uma apresentação aguda em cerca de 10% dos casos, mais provavelmente causados por bactérias piogênicas. Quase todas as pessoas com meningite viral e cerca de 75% daquelas com meningite bacteriana têm uma apresentação subaguda, enquanto o restante apresenta-se com meningite crônica (os patógenos responsáveis estão relacionados na Tab. 63.2). Os enterovírus são os agentes mais comumente responsáveis pela meningite, devendo ser considerados primeiro no diagnóstico diferencial da doença em uma criança ou adolescente durante o final do verão e o início do outono. As bactérias piogênicas responsáveis pela meningite variam com a idade do indivíduo acometido (Tab. 63.3).

Tabela 63.2 Síndromes de meningite infecciosa

Síndrome	Início/duração	Patógenos prováveis
Aguda	< 24 horas	Bactérias piogênicas
Subaguda	1 a 7 dias	Enterovírus, bactérias piogênicas
Crônica	Persiste pelo menos por 4 semanas	*Mycobacterium tuberculosis* *Treponema pallidum* *Brucella* sp. *Leptospira interrogans* *Borrelia burgdorferi* *Cryptococcus neoformans* *Coccidioides immitis* *Histoplasma capsulatum* *Candida* sp.

Tabela 63.3 Causas bacterianas comuns de meningite aguda de acordo com a idade

Idade	Organismos
Neonatos a 3 meses	Estreptococos do grupo B *Escherichia coli* *Listeria monocytogenes** *Streptococcus pneumoniae*
4 meses a 6 anos†	*Streptococcus pneumoniae*
6 a 45 anos	*Neisseria meningitidis*
> 45 anos	*Streptococcus pneumoniae* *Listeria monocytogenes* Estreptococos do grupo B

* Pode causar meningite em indivíduos imunocomprometidos de todos os grupos etários.
† A incidência de meningite devida a *Haemophilus influenzae* do tipo b nos EUA declinou bastante em decorrência da vacinação.

Coleta e transporte da amostra

Em geral, o LCE é obtido por punção lombar da coluna vertebral, mas às vezes é aspirado dos ventrículos cerebrais ou coletado de uma derivação. Da mesma forma que quando se colhe sangue para cultura, a antissepsia cutânea cuidadosa é essencial para a coleta de LCE, que geralmente é enviado ao laboratório em três tubos. As sugestões para os testes feitos em cada tubo são: tubo 1, contagens celulares e diferenciais coradas; tubo 2, preparação de esfregaços para coloração de Gram ou outras e para cultura; tubo 3, testes para glicose e proteína e, se indicados, outros, como o antígeno criptocócico, teste sorológico para sífilis, outros estudos sorológicos e citologia. Os parâmetros do LCE normal e as alterações habituais que ocorrem durante a meningite causada por organismos diferentes são mostrados na Tabela 63.4.

O LCE deve ser transportado imediatamente para o laboratório e processado com a maior rapidez possível. Se for inevitável uma pequena demora no processamento, a amostra deve ser mantida à temperatura ambiente, a menos que tenha sido solicitada cultura viral, caso em que uma parte (de preferência 1 mL, mas não menos de 0,5 mL) pode ser refrigerada por pouco tempo. O processamento da amostra difere para bactérias, fungos, vírus e parasitas, sendo comentado separadamente para cada grupo de organismos.

Processamento de amostras para cultura bacteriana e fúngica

O processamento de LCE para cultura bacteriana rotineira inclui concentração (se for recebida uma amostra de 1 mL ou mais), preparação de um esfregaço por citocentrifugação para coloração de Gram e cultura. Concentra-se o líquido submetendo-o à centrifugação mínima de 1.500 × g por 15 minutos. O sobrenadante é decantado em um tubo estéril, deixando-se cerca de 0,5 mL de sedimento e líquido, que é bem mesclado em um misturador ou por aspiração forçada para cima e para baixo com uma pipeta estéril.

O diagnóstico de meningite bacteriana crônica tem pré-requisitos específicos porque o LCE é manipulado de forma diferente para cada entidade. Para diagnosticar brucelose, o LCE é processado conforme descrito anteriormente para cultura antibacteriana de rotina, mas os meios são incubados por duas a três semanas. Para leptospirose, a *Leptospira interrogans* pode ser cultivada a partir de LCE durante as primeiras semanas de doença. Meios especiais (mencionados anteriormente, para sangue) são inoculados com algumas gotas de LCE e incubados conforme delineado no Capítulo 56.

O diagnóstico de neurossífilis baseia-se nos seguintes achados no LCE: pleocitose, concentração elevada de proteína e um teste VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) positivo, atualmente o único método útil para detectar anticorpos contra o *Treponema pallidum* no LCE (ver Cap. 58), indicado apenas se a pessoa tiver um teste sérico

Tabela 63.4 Parâmetros normais e alterações no líquido cerebrospinal na meningite infecciosa

Condição	Leucócitos (células/μL)*	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
Normal	5 (linfócitos)	14–45	45–100 (2/3 soro)
Meningite			
Bacteriana aguda/subaguda	500 a 200 000 (PMNs)	↑	↓
Tuberculose bacteriana	200 a 2000	↑	↓
ou fúngica crônica	(linfócitos)	↑	↓
Enteroviral	200 a 2000 (PMNs no início; linfócitos depois)		Normal

↑ = aumento; ↓ = diminuição; PMNs = leucócitos polimorfonucleares

* O tipo de célula mencionado em geral predomina.

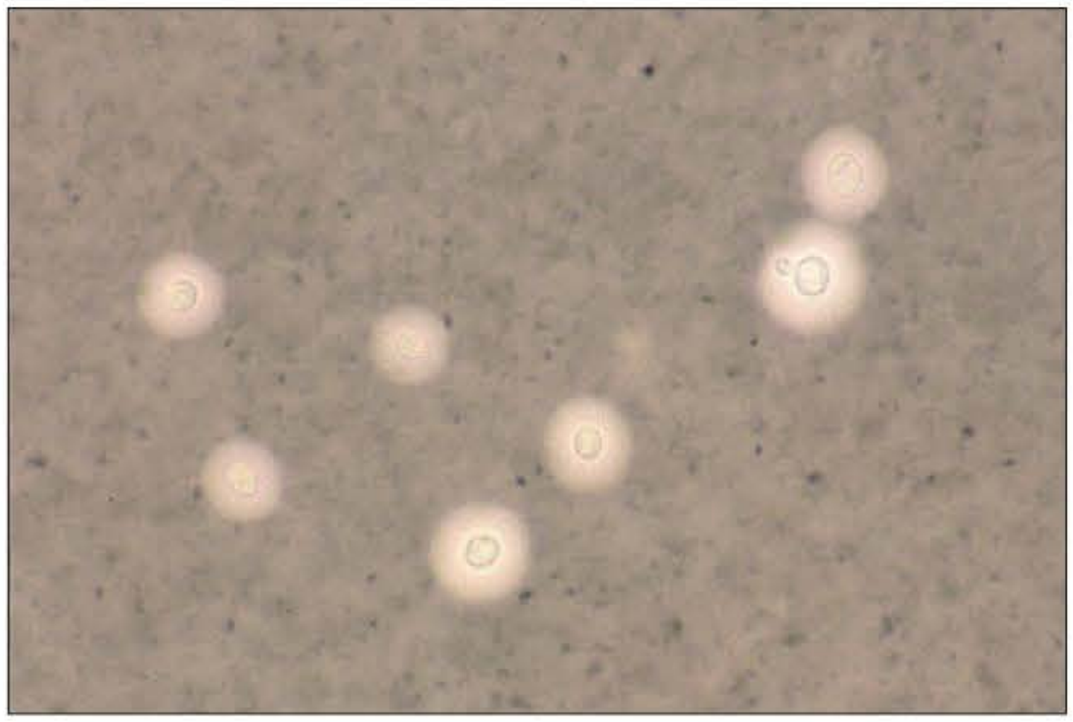


Figura 63.1 Preparação com nanquim de líquido cerebrospinal, mostrando formas de levedura encapsuladas de *Cryptococcus neoformans* (× 400).

positivo para sífilis (Albright, 1991a). A amostra deve ser refrigerada até ser testada. O acometimento do sistema nervoso central por *B. burgdorferi* (doença de Lyme) também é diagnosticado por sorologia, pela detecção de IgM e IgG específicas no LCE e no soro.

O processamento do LCE para detecção de micobactérias é indicado somente para amostras com pleocitose ou valores diminuídos de glicose ou elevados de proteína (Albright, 1991b). Para recuperação ótima, recomenda-se a cultura de pelo menos 5 mL. O líquido é centrifugado a 3.000–3.600 × g por 30 minutos, o sobrenadante é decantado e o sedimento é bem mesclado em um misturador, e usado para preparar esfregaços para coloração e inoculação em meios apropriados (ver Cap. 59). A amplificação do ácido nucleico, usando-se uma modificação de um ensaio comercial, pode ser útil para a detecção direta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* no LCE (Cloud, 2004).

O processamento do LCE para a detecção de fungos é similar ao descrito para a detecção de bactérias. Os organismos são concentrados por filtração ou centrifugação. Examina-se uma preparação citocentrifugada ou um esfregaço do sedimento corado por Gram e meios apropriados (como o ágar com infusão de cérebro e coração ou o ágar SABHI sem antibióticos) são inoculados para cultura.

Outros testes diagnósticos

Além dos esfregaços corados pelo Gram e da cultura bacteriana, pode-se usar o sobrenadante de uma amostra centrifugada ou o líquido original em testes de aglutinação no látex para a detecção de antígenos de estreptococos do grupo B, *S. pneumoniae*, alguns sorotipos de *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* (o antígeno capsular K1 tem reação cruzada com o de *N. meningitidis* do tipo B) e *H. influenzae* do tipo B. Esses testes em látex são mais úteis no diagnóstico da meningite tratada parcialmente (Bhisitkul, 1994; Maxson, 1994) e para confirmar um esfregaço positivo corado pelo Gram. O uso rotineiro dos testes com látex deve ser desestimulado porque, em comparação com esfregaços corados pelo Gram, sua sensibilidade não é significativamente maior e eles são muito caros (Kiska, 1995; Perkins, 1995).

Estão disponíveis testes rápidos para o diagnóstico da meningite causada por *C. neoformans*. Eles incluem preparação com nanquim, aglutinação no látex e ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Os dois últimos são específicos para o antígeno capsular. As leveduras encapsuladas de *C. neoformans* são visíveis no LCE misturado com nanquim (uma gota do sedimento de LCE com uma gota de nanquim, este último à venda em papelarias ou lojas de artigos para pintura artística e desenho) sobre uma lâmina de microscopia de vidro, coberta com lamínula e examinada sob grande aumento (Fig. 63.1). A sensibilidade da coloração com nanquim é baixa, exceto em pessoas infectadas pelo HIV; portanto, o teste da aglutinação no látex ou o ELISA para criptococos, ambos altamente específicos e com sensibilidade acima de 90%, são recomendados para o diagnóstico. Pode-se usar o sobrenadante de uma amostra centrifugada, ou LCE não centrifugado, nesses dois últimos testes. Ocorrem resultados falso-positivos nos testes de aglutinação no látex, em razão da presença de *Trichosporon asahii* ou da introdução de quantidades mínimas de condensação do ágar no líquido de teste. Para evitar o último problema, o teste no látex deve ser feito antes da cultura ou, melhor ainda, em uma amostra separada (Heelan, 1991).

Processamento de amostras para cultura viral e parasitologia

O processamento de LCE para o diagnóstico de infecções virais envolve cultura celular convencional (principalmente para detecção de enterovírus) ou testes sorológicos no caso de vírus que causam encefalite (equina do oeste, do leste e venezuelana, de St. Louis, japonesa, de La Crosse e do oeste do Nilo). Além disso, a PCR é um recurso útil para a detecção de enterovírus, HSV e ácido nucleico do CMV no LCE (Lakeman, 1995; Mitchell, 1997; Jacques, 2003; Lai, 2003). As linhagens celulares para isolamento de enterovírus foram discutidas anteriormente, no tópico sobre amostras de sangue.

Em alguns casos, o LCE é enviado para o laboratório para o diagnóstico da tripanossomíase africana (*Trypanosoma gambiense* e *Trypanosoma rhodesiense*) ou de infecção com amebas de vida livre (*Naegleria fowleri* e espécies de *Acanthamoeba*). Uma vez que a amostra é recebida no laboratório, deve ser processada imediatamente. Preparações a fresco são feitas diretamente a partir da amostra e do sedimento, primeiro agitando-se o tubo levemente (etapa necessária porque os parasitas em geral aderem à parede do tubo) e em seguida centrifugando-o a 250 × g por 10 minutos. As preparações são examinadas ao microscópio com o condensador em uma posição baixa, para permitir melhor visualização de trofozoítos ou, de preferência, por microscopia de contraste de fase.

São feitas culturas de amebas de vida livre a partir de LCE em placas de ágar sem nutrientes, cobertas por uma suspensão de *E. coli* ou *Enterobacter aerogenes*. O líquido é centrifugado a 250 × g por 10 minutos, o sobrenadante é removido com uma pipeta estéril e o sedimento é misturado com 0,5 mL de solução fisiológica e gotejado no centro da placa. A cultura é incubada a 37°C e examinada diariamente ao microscópio por 10 dias sob objetiva de 10 × em busca de amebas (Martinez, 1991).

Outros líquidos corporais

Colhe-se líquido das cavidades pericárdica, torácica ou peritoneal, ou de espaços articulares aspirando-se com agulha montada em seringa. Um volume de 1 a 5 mL é adequado para o isolamento da maioria das bactérias, mas para recuperação de micobactérias e fungos, em geral presentes em baixos números, o ideal é coletar 10 a 15 mL. Além disso, para diagnosticar a peritonite associada à diálise peritoneal ambulatorial crônica, a coleta de pelo menos 50 mL de líquido pode melhorar a recuperação do patógeno responsável (Dawson, 1985). Para transporte, o líquido é aspirado em um recipiente estéril e enviado imediatamente para o laboratório. Uma alternativa com relação ao líquido peritoneal é inoculá-lo diretamente em frascos de hemocultura

à beira do leito do paciente (Luce, 1988), mas submetê-lo a hemocultura dessa forma elimina a possibilidade de coloração direta pelo Gram e retarda a identificação e a determinação de suscetibilidade de quaisquer patógenos isolados.

Os enterovírus, primordialmente os vírus Coxsackie A e B, estão entre as causas mais comuns de pericardite infecciosa. Esses vírus podem ser detectados no líquido pericárdico mediante cultura convencional de células, porém, como não são recuperados em todos os casos, a coleta de lavados da garganta e fezes (mais prováveis de produzir o vírus), além de líquido pericárdico, é veementemente recomendada para seu isolamento de pessoas com suspeita de pericardite enteroviral. Outros vírus (HSV, varicela-zóster, CMV, Epstein-Barr, da hepatite B, da caxumba e influenza) são agentes infrequentes de pericardite e, em geral, não são detectados no líquido pericárdico.

Processamento da amostra para cultura bacteriana

O processamento do líquido de cavidades corporais para a detecção de bactérias envolve a preparação de um esfregaço para coloração de Gram e inoculação em meios apropriados para cultura. Conforme mencionado anteriomente, a amostra pode ser inoculada em frascos para hemocultura à beira do leito do paciente (embora isso não seja o ideal), ou ser processada no laboratório, onde o líquido é centrifugado a 1.500 a 2.500 × g por 20 a 30 minutos. O sobrenadante é removido, deixando-se cerca de 0,5 mL de líquido além do sedimento, que é bem misturado e então usado para o preparo de esfregaços e inoculação em meios de cultura. Uma alternativa é remover um pequeno volume de líquido não turvo nem viscoso (cerca de 0,1 mL) antes da centrifugação e usá-lo para preparar um esfregaço centrifugado.

Amostras de líquido submetidas à detecção de micobactérias são processadas conforme descrito anteriormente para o LCE. Líquidos para cultura de fungos devem ser concentrados por centrifugação, conforme descrito no caso de bactérias. O sobrenadante é removido, deixando-se 1,5 a 2 mL, onde o sedimento é bem misturado para subsequente preparo de um esfregaço a ser corado pelo Gram ou com calcoflúor branco. O ideal é inocular 0,5 a 1 mL desse sedimento em meio primário para crescimento de fungos (como no caso do LCE), porém, volumes menores são aceitáveis.

Exame parasitológico

Raramente são coletados líquidos corporais para a detecção de parasitas, porém, é possível encontrar *Entamoeba histolytica* na cavidade pericárdica, na pleural ou na peritoneal em decorrência da ruptura de um abscesso no fígado (que drene para alguma dessas cavidades) ou pulmonar (que drene para a cavidade pleural ou a pericárdica). Cistos hidáticos são diagnosticados com pouca frequência ao exame do líquido de alguma cavidade corporal, também em razão da ruptura de um cisto em uma víscera contígua à cavidade em questão. O líquido coletado, em geral, é transparente e contém areia hidática (ver Cap. 61), mas raramente pode estar turvo por causa de infecção bacteriana superposta. Em indivíduos com infecção por filárias, o exame de preparações a fresco de líquido de uma cavidade corporal pode demonstrar as microfilárias, mas isso é incomum; em pacientes com hiperinfecção por *Strongyloides*, podem ser detectadas larvas em líquidos de cavidades corporais.

Tecidos

Amostras de tecido obtidas cirurgicamente são retiradas a alto custo e com risco considerável para o paciente, por isso, é conveniente que o cirurgião obtenha uma quantidade de material adequada tanto para exame histopatológico como microbiológico. *Swabs* raramente prestam-se a essa finalidade. A histopatologia da lesão serve não apenas para diferenciar infecção de malignidade, como também para distinguir um processo supurativo de um granulomatoso. Em alguns casos, colorações especiais são úteis para estabelecer a etiologia do processo. Nas lesões crônicas, o diagnóstico diferencial inclui doenças causadas por actinomicetos, brucela, micobactérias e fungos, qualquer um desses microrganismos podendo estar presente apenas em pequeno número, o que enfatiza ainda mais a necessidade da obtenção de amostras adequadas para exame e cultura.

Coleta e processamento da amostra

O tecido obtido cirurgicamente deve ser colocado em um recipiente estéril, de boca larga e com tampa de rosca. Como regra geral, o tecido deve ser bisseccionado assepticamente por um cirurgião na sala de operação, e o material representativo do processo patológico deve ser submetido a exame histopatológico e microbiológico. A boa comunicação entre o histopatologista e o microbiologista é importante, em especial nos casos de febre de origem desconhecida para a qual se realiza uma laparotomia e obtêm-se múltiplas amostras de biópsia.

O tecido recebido no laboratório é picado em pequenos pedaços com tesoura e bisturi estéreis, colocado em um pequeno volume de caldo de cultura e então homogeneizado em um triturador (moedor) de tecido, gral ou pilão (almofariz) e soquete, de modo a fornecer uma suspensão a 20%, usada para inocular todos os meios de cultura necessários e então deixá-los sob refrigeração por pelo menos duas semanas antes de descartá-los.

Olhos

Amostras da conjuntiva

Raspados de conjuntiva ou amostras de *swabs* são coletados para se determinar o agente etiológico da conjuntivite. As bactérias são os agentes etiológicos mais comuns da conjuntivite infecciosa, sendo mais frequentemente implicados *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em adultos e *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *S. aureus* em crianças. O tracoma, causado por *C. trachomatis*, é uma causa de cegueira em todo o mundo, também podendo causar conjuntivite por inclusão em recém-nascidos e, menos comumente, em adultos. Vírus são responsáveis por cerca de 15 a 20% dos casos de conjuntivite infecciosa aguda e, nos EUA, a maioria das epidemias de conjuntivite viral é causada por adenovírus. Parasitas são causas raras de conjuntivite.

Coleta e processamento da amostra

São obtidas células conjuntivais da conjuntiva tarsal superior e inferior com um *swab* umedecido e caldo de cultura ou uma espátula estéril de platina. O ideal é preparar os esfregaços e, ante a suspeita de infecção bacteriana ou fúngica, inocular diretamente em meios de cultura cada amostra colhida individualmente. Se não forem possíveis a preparação direta de esfregaços e a inoculação nos meios, podem ser coletadas amostras com *swab*. Os esfregaços devem ser deixados secar ao ar e transportados para o laboratório imediatamente, já inoculados nos meios. Se tiver sido solicitada cultura viral, é colhida uma segunda amostra (*swab* ou raspado), colocada em meio de transporte viral e liberada prontamente para o laboratório, ou refrigerada por pouco tempo e depois transportada em gelo úmido. Um diagnóstico rápido pode ser fornecido por coloração imunofluorescente direta ou indireta de esfregaços de células conjuntivais com anticorpos específicos para o vírus, mas a cultura celular é o método mais sensível para detectar patógenos virais potenciais e sempre deve ser feita.

Para detectar *C. trachomatis*, um esfregaço preparado diretamente a partir de raspados conjuntivais pode ser corado com o Giemsa e examinado em busca de células epiteliais com inclusões intracitoplasmáticas basofílicas, diagnósticas de *C. trachomatis*, ou de preferência com anticorpos monoclonais, mais sensíveis e específicos que o corante de Giemsa. Para obter os melhores resultados com o teste direto do anticorpo fluorescente, deve-se usar o kit de coleta fornecido pelo fabricante (ver Cap. 55). Passa-se o *swab* com um movimento giratório pela superfície da lâmina de vidro fornecida, fixa-se o material e envia-se a lâmina imediatamente para o laboratório, onde ela é mantida à temperatura ambiente ou refrigerada por pouco tempo. As lâminas são coradas de acordo com as instruções do fabricante e examinadas ao microscópio de fluorescência em busca de corpúsculos elementares (ver Cap. 55). Amostras contendo menos de 10 células colunares ou metaplásicas descamativas são consideradas inadequadas e os resultados devem ser relatados como inconclusivos, com uma explicação, solicitando-se outra amostra. Cultura é o método de referência para a detecção de *C. trachomatis*, devendo ser realizada quando há forte suspeita do diagnóstico de conjuntivite causada por clamídia e o teste direto do anticorpo fluorescente é negativo.

Amostras da córnea

Amostras de raspados e biópsias da córnea são úteis para determinar o agente etiológico de ceratite, uma infecção que potencialmente pode acarretar perda da visão e requer atenção imediata. Bactérias são responsáveis por 65 a 90% dos casos de ceratite e, nos EUA, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Moraxella* são mais frequentemente implicadas.

Coleta e transporte da amostra

Os raspados de córnea são coletados com uma espátula de platina estéril e usados para preparar esfregaços por transferência direta para lâminas de microscopia de vidro e coloração, bem como inoculação nos meios apropriados para cultura. Caso tenha sido solicitada cultura viral, os raspados devem ser colocados diretamente em meios de transporte viral e enviados prontamente para o laboratório, ou refrigerados por pouco tempo e transportados em gelo úmido. Frequentemente, também é feita cultura concomitante da conjuntiva e das pálpebras dos olhos acometidos e dos ilesos, para se determinar a microbiota normal, útil para avaliar os resultados das culturas de córnea. Quando a cultura de raspados de uma úlcera de córnea suspeita é negativa, o oftalmologista pode obter uma amostra por ceratectomia superficial ou biópsia da córnea, abordagem especialmente útil para a detecção de fungos e *Acanthamoeba*.

Trato respiratório

Amostras da nasofaringe

Amostras de aspirados, lavados e *swabs* da nasofaringe são coletadas predominantemente para o diagnóstico de infecções respiratórias virais, mas também de sarampo, pneumonia por *C. trachomatis* em lactentes, difteria e coqueluche. Amostras do nariz também são usadas para identificar portadores de *S. aureus*.

Coleta, transporte e processamento da amostra

Aspirados e lavados nasofaríngeos são superiores aos *swabs* para a recuperação de vírus, mas *swabs* frequentemente são submetidos, por serem mais convenientes. Amostras de lavados ou *swabs* são coletadas para a detecção de *Bordetella pertussis*; uma amostra de *swab* é preferida para *C. trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* e *Corynebacterium diphtheriae*. Colhe-se um aspirado com um tubo de plástico (como um usado para alimentar lactentes prematuros) adaptado a uma seringa de 10 mL ou um cateter de aspiração com muco preso. Obtém-se um lavado com um bulbo de aspiração de borracha, instilando-se e retirando-se 3 a 7 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato. Para coletar células nasofaríngeas com um *swab*, remove-se todo o muco da cavidade nasal e, em seguida, insere-se um pequeno *swab* nasofaríngeo flexível ao longo do septo nasal até a faringe posterior, esfregando-o na mucosa várias vezes com movimento giratório.

Para detectar vírus, as amostras nasofaríngeas são colocadas em um meio de transporte apropriado, com ou sem antibióticos (como M4) e levadas de imediato para o laboratório ou guardadas por pouco tempo no refrigerador e embaladas em gelo para transporte, tão logo seja possível. Os métodos de detecção viral são discutidos em pormenores no Capítulo 54.

Para a detecção de *C. trachomatis*, colhe-se uma amostra nasofaríngea com um *swab* de ponta de poliéster, que pode ser usado para cultura ou preparação de um esfregaço para coloração direta de anticorpo fluorescente. Os métodos de detecção são discutidos no Capítulo 55. Para cultura de *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, o *swab* deve ser colocado em um meio de transporte apropriado (p. ex., 2-sacarose fosfato contendo agentes antimicrobianos ou M4) e transportado para o laboratório o mais rapidamente possível, ou refrigerado por pouco tempo.

Para detectar *B. pertussis*, a inoculação de amostras de lavados ou *swabs* (de preferência coletadas com um *swab* de alginato de cálcio) à beira do leito do paciente é ideal. Se isso não for possível, coloca-se a amostra em caldo casamino estéril e envia-se imediatamente para o laboratório, onde deve ser processada até 1 a 2 horas depois para cultura, que é o método mais sensível para cultura desse microrganismo. Caso seja preciso mandar a amostra para um laboratório de referência para cultura, o *swab* deve ser inoculado e deixado em um meio sólido de transporte como o de Regan-Lowe ou o de Jones-Kendrick, incubado a 37°C por 48 horas e então enviado à temperatura ambiente. O método de coloração direta de anticorpo fluorescente, que fornece um diagnóstico rápido mas está associado a resultados falsos tanto positivos como negativos (Friedman, 1988), pode ser realizado com um esfregaço preparado a partir de um *swab* ou lavado nasofaríngeo. Atualmente, o meio recomendado para cultura é o ágar de Regan-Lowe (composto por ágar de carvão Oxoid e 10% de sangue equino contendo cefalexina), em vetores do tradicional ágar de Bordet-Gengou (ágar com infusão de batata e 20% de sangue de carneiro). O método mais sensível para detectar *B. pertussis* é a PCR, para a qual a amostra nasofaríngea ideal é a colhida com um *swab* de Dacron (as fibras de alginato e alumínio na haste são inibitórias). Se a amostra tiver de ser transportada para um laboratório de referência para a realização da PCR, o *swab* deve ser enviado seco ou em solução fisiológica.

Para identificar portadores de *S. aureus*, são coletadas secreções nasais das narinas anteriores com um *swab* de ponta de poliéster, que é colocado em um sistema de transporte de tubo e levado imediatamente para o laboratório. A amostra é colocada em ágar com 5% de sangue de carneiro, um meio de ágar seletivo para organismos Gram-positivos (ágar com colistina e ácido nalidíxico ou álcool polietílico), ágar de sal manitol (meio seletivo para estafilococos e útil na diferenciação entre espécies coagulase-positivas e negativas) ou ágar BBL CHROMagar para *S. aureus* (Flayhart, 2004).

Amostras da garganta

É mais comum coletar amostras da garganta com *swab* para diagnosticar faringite causada por estreptococos do grupo A, mas os grupos C e G de Lancefield também têm sido implicados na faringite. Os *swabs* de garganta recebidos no laboratório clínico para cultura bacteriana de rotina devem ser avaliados apenas quanto a esses agentes. Amostras de lavados ou *swabs* da garganta são úteis para a detecção de vírus eliminados com as secreções orais, sem causar faringite (HSV, CMV ou enterovírus). Amostras de *swabs* da garganta também podem ser úteis para a determinação do agente etiológico da epiglotite, uma celulite rapidamente progressiva com o potencial de causar obstrução das vias respiratórias (quase sempre em razão da *H. influenzae* do tipo b, mas ocasionalmente *S.aureus* ou *S. pneumoniae*) e no diagnóstico de gonorreia, pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*, difteria e angina de Vincent.

Coleta e transporte da amostra

As amostras de *swabs* da garganta são coletadas abaixando-se a língua do paciente com um abaixador de língua, introduzindo-se o *swab* entre os pilares tonsilares e além da úvula, sem tocar as paredes laterais da cavidade bucal, e esfregando-o para trás e para a frente na faringe posterior. As amostras de *swab* coletadas para detecção de vírus devem ser colocadas em um meio de transporte viral e aquelas para detecção de bactérias, em um sistema de transporte de tubos contendo meio de Stuart modificado. Lavados da garganta para o diagnóstico de infecções virais são obtidos por gargarejo com 5 mL de meio de transporte viral contendo antibióticos. As amostras de lavado ou *swab* da garganta devem ser enviadas imediatamente para o laboratório, ou refrigeradas por pouco tempo se for inevitável algum atraso no envio.

Processamento da amostra

Para o diagnóstico de faringite estreptocócica do grupo A, a cultura é mais sensível. O uso de um meio seletivo aumenta a recuperação de *S. pyogenes*, ao inibir a proliferação da microbiota normal. No entanto, o crescimento de *S. pyogenes* em meios seletivos após 24 horas, em geral, é insuficiente para o teste, de modo que as placas devem ser reincubadas por mais um dia antes de se fazer o teste confirmatório. Para um diagnóstico rápido, uma sonda direta comercial é mais sensível e pode ser usada como substituta da cultura (Gerber, 2004). Outros testes rápidos para estreptococos do grupo A (há vários no comércio) são menos sensíveis (apenas 70% de sensibilidade); portanto, devem ser coletadas duas amostras da garganta com *swab* caso se pretenda usar algum desses testes. Se o teste direto for positivo, o segundo *swab* pode ser descartado, mas se o teste direto for negativo em crianças, será preciso fazer cultura confirmatória com o segundo *swab* (Bisno, 2002). No caso de adultos, como a incidência de infecção

estreptocócica é baixa e o risco de febre reumática é extremamente baixo, o diagnóstico de faringite estreptocócica do grupo A com base em um teste rápido e direto, sem confirmação de um resultado negativo por meio de cultura, é uma alternativa aceitável (Bisno, 2002).

Para determinar o agente etiológico da epiglotite, um médico deve coletar uma amostra com *swab* em um contexto no qual o paciente possa ser entubado imediatamente, se necessário. Para detectar *N. gonorrhoeae* na garganta, o *swab* com a amostra deve ser inoculado à beira do leito ou levado para o laboratório até no máximo 2 horas depois e inoculado o mais rapidamente possível em um meio seletivo, como o ágar modificado de Thayer-Martin. Se for inevitável alguma demora no processamento, o *swab* deve ser mantido à temperatura ambiente. Para o diagnóstico de difteria, são coletadas amostras com *swab* da nasofaringe e da garganta, levadas para o laboratório imediatamente. Se a equipe de funcionários do laboratório não tiver experiência na recuperação e na identificação de *C. diphteriae*, as amostras devem ser enviadas para um laboratório de referência em um meio de transporte semissólido (p. ex., o de Amies). Um meio diferencial inibitório contendo telurita, como o Tinsdale, é ótimo para cultura de *C. diphteriae*, mas tal meio é caro, tem meia-vida curta e é de difícil obtenção no comércio, razão pela qual raramente é usado nos laboratórios clínicos. O ágar-sangue com colistina e ácido naladíxico (CNA) é uma alternativa aceitável para o cultivo de *C. diphteriae*, porém, como não é um meio diferencial, é preciso avaliar todos os tipos de colônia difteroide para excluir *C. diphteriae* quando se suspeita desse agente. Além disso, uma placa de ágar-sangue de carneiro deve ser inoculada e examinada em busca de estreptococos do grupo A.

A angina de Vincent é uma tonsilite ulcerativa necrotizante aguda, que pode ser causada por *Fusobacterium necrophorum* e outros anaeróbios. Uma doença com essa apresentação clínica pode ser chamada angina de Vincent de forma presuntiva se forem vistos bacilos fusiformes Gram-negativos e espiroquetas em esfregaços preparados a partir de uma amostra obtida com *swab* da lesão ulcerada e corada pelo Gram. Culturas com material da área acometida em geral não são úteis porque muitas espécies de anaeróbios estão presentes na cavidade oral, mas deve-se coletar material para hemoculturas porque a doença costuma ser acompanhada por sepse.

Escarro e aspirados traqueais

Os estudos microbiológicos com amostras de escarro (expectorado e induzido) e aspirados traqueais são feitos principalmente para determinar os agentes etiológicos da pneumonia. As orientações para o diagnóstico de pneumonia adquirida na comunidade foram publicadas pela Infectious Diseases Society of America (Mandell, 2003). Os aspirados traqueais representam secreções do trato respiratório inferior coletadas com um sifão de Lukens, de pacientes submetidos a traqueostomias, os quais são colonizados rapidamente com bactérias Gram-negativas e outros patógenos nosocomiais e, como as bactérias que colonizam o trato respiratório não podem ser diferenciadas das que causam doença invasiva em culturas de aspirados traqueais, é difícil interpretar os resultados das culturas rotineiras. É preciso solicitar cultura para *Legionella*, micobactérias e fungos separadamente das culturas de rotina, pois cada um desses microrganismos requer meios especiais para seu cultivo.

Coleta e transporte da amostra

O ideal é coletar escarro expectorado no início da manhã, antes da primeira refeição. O indivíduo deve enxaguar a boca com água e então expectorar uma amostra, de preferência de 5 a 10 mL, resultante de uma tosse profunda. No caso de pessoas com tosse improdutiva, pode-se induzir uma amostra fazendo com que o indivíduo respire aerossóis de uma solução contendo cloreto de sódio a 15% e glicerina a 10% por cerca de 10 minutos, ou até que o reflexo da tosse seja iniciado. Amostras de escarro e aspirados traqueais devem ser enviadas imediatamente para o laboratório ou refrigeradas por pouco tempo, se for inevitável algum atraso.

Processamento da amostra

Ambos os tipos de amostra devem ser triados antes da cultura bacteriana de rotina, para se determinar se são representativos de secreções do trato respiratório inferior ou de saliva (Morris, 1993). Um esfregaço preparado com uma parte da amostra, consistindo em material purulento, é corado pelo Gram. Em geral, amostras com mais de 10 células epiteliais por campo de pequeno aumento para triagem (Fig. 63.2) são consideradas significativas em termos de contaminação com saliva e devem ser rejeitadas. Amostras com menos de 25 células epiteliais e mais de 25 neutrófilos por campo de pequeno aumento provavelmente são aceitáveis (Murray, 1975). O número de neutrófilos não costuma ser considerado quando se está determinando a qualidade da amostra, porque o indivíduo do qual a amostra foi obtida pode estar neutropênico. Em geral, não é necessário submeter amostras de escarro induzido e expectorado à triagem para detecção de *M. pneumoniae*, espécies de *Legionella* e micobactérias, para avaliar sua qualidade (Ingram, 1994; Havlik, 1995), mas os dados de um estudo sugerem que a triagem de amostras de escarro quanto à presença de neutrófilos é um método efetivo de avaliar a aceitabilidade do escarro para esfregaço micobacteriano e cultura (McCarter, 1996).

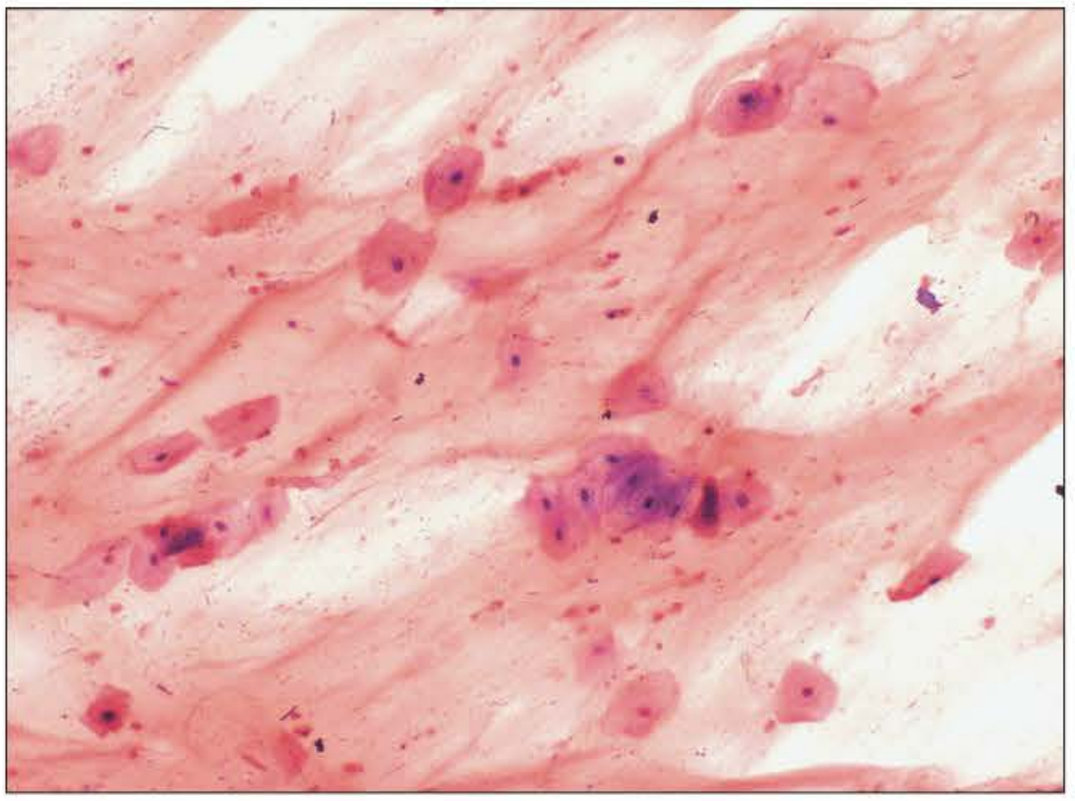


Figura 63.2 Coloração de Gram de uma amostra de escarro, demonstrando mais de 10 células epiteliais descamativas por campo de pequeno aumento, o que é inaceitável em cultura (×100).

Esfregaços corados pelo Gram, preparados a partir de amostras aceitáveis para cultura, são examinados sob imersão em óleo para se determinar a quantidade relativa de organismos. A quantidade de organismos (raros, poucos, moderada ou muitos) é estimada para cada tipo de bactéria (p. ex., cocos Gram-positivos em pares [Fig. 63.3], cadeias ou aglomerados; bacilos Gram-positivos, diplococos Gram-negativos e bastonetes Gram-negativos), notando-se ainda se são in-

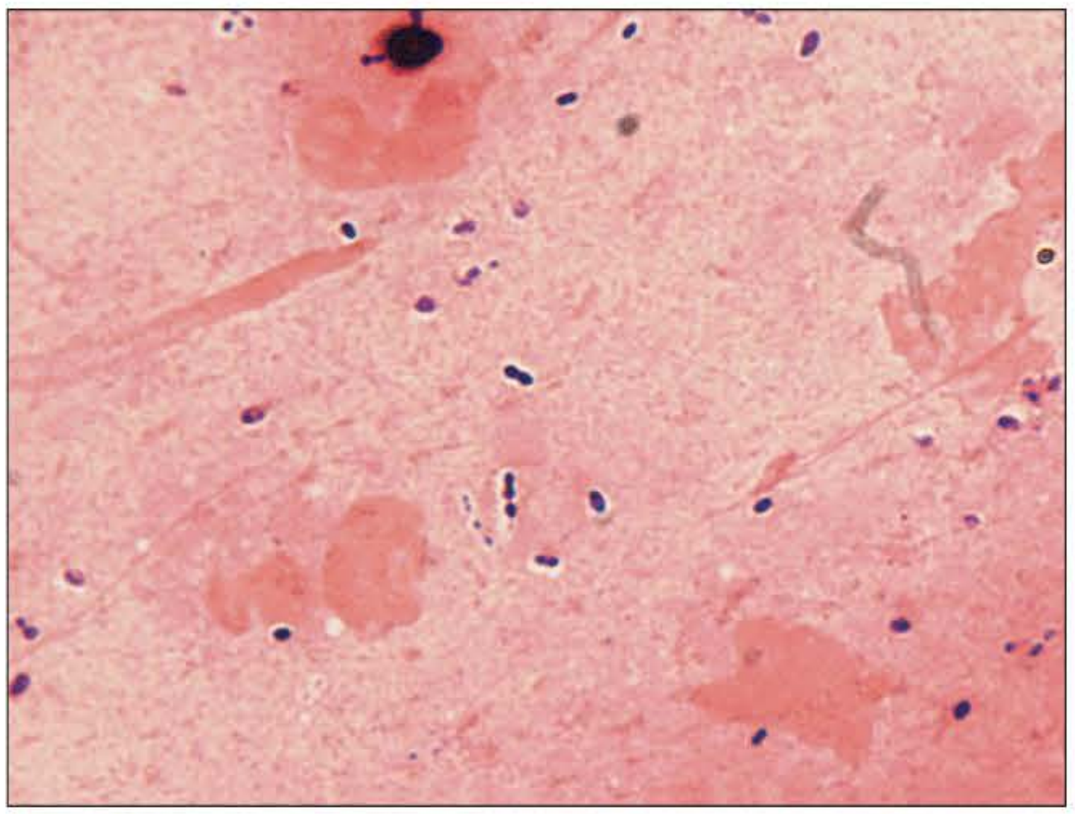


Figura 63.3 Coloração de Gram de uma amostra de escarro, mostrando diplococos Gram-positivos encapsulados, em forma de lanceta, consistentes com *Streptococcus pneumoniae* (×100).

tracelulares ou não. Os aspirados traqueais em que não são observados organismos à coloração de Gram provavelmente devem ser rejeitados (Gilligan, 1999). Algumas amostras aceitáveis contendo material purulento são inoculadas, conforme delineado no Capítulo 56. No caso de amostras de pessoas com fibrose cística, também é recomendável inocular um meio seletivo para *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*.

Quando se suspeita da doença dos legionários, são recomendáveis cultura para *Legionella* e um teste direto rápido (anticorpo fluorescente) com uma amostra respiratória ou antígeno de *Legionella* em uma amostra de urina. A coloração direta do anticorpo fluoresente, que pode proporcionar resultados em questão de horas, em vez dos 3 a 7 dias necessários para cultura, deve complementar, não substituir, a cultura. Também se pode solicitar a PCR, mas ela é consideravelmente mais dispendiosa que a cultura, o teste direto com anticorpo fluorescente (DFA) ou o teste com o antígeno urinário. A cultura é o mais sensível desses métodos e sempre deve ser feita. Várias gotas da amostra devem ser inoculadas em cada placa de ágar seletivo e não seletivo para levedura, tamponado com carvão. O uso do ágar seletivo inibe o crescimento da maioria da microbiota respiratória, porém, algumas cepas de *Legionella* são suscetíveis aos agentes inibitórios do meio, razão pela qual sempre deve ser incluída uma placa não seletiva.

O ideal para a detecção de micobactérias no escarro é coletar três amostras em 3 dias separados. O escarro e outras amostras respiratórias precisam ser descontaminados para evitar-se a proliferação da microbiota normal, que lentifica o crescimento das micobactérias. Esse processo e os métodos de detecção são discutidos no Capítulo 59. Todas as amostras submetidas a coloração, cultura e testes moleculares para micobactérias devem ser processadas em uma cabine de segurança biológica, de preferência em uma sala isolada com pressão atmosférica negativa (laboratório de nível 3).

Todas as amostras submetidas a cultura fúngica também devem ser manipuladas conforme descrito para micobactérias. A qualidade das amostras deve ser determinada por triagem com esfregaços corados pelo Gram (como descrito antes para bactérias). Amostras aceitáveis de escarro expectorado ou induzido e aspirados traqueais devem ser inoculadas em meios de cultura para recuperação de fungos. Em geral, devem ser usados meios para cultura de fungos enriquecidos ou não com sangue e aqueles contendo agentes antimicrobianos. Entretanto, ao escolher os meios, o responsável pelo laboratório também deve considerar o custo e os tipos de fungos geralmente encontrados na população de pacientes com que o laboratório lida.

Amostras de escarro induzido são úteis para o diagnóstico de pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci* (antigamente *Pneumocystis carinii*) em pessoas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Wolfson, 1990). Primeiro, examina-se um esfregaço corado pelo Gram feito com a amostra para determinar se ela é representativa de secreções do trato respiratório inferior. Amostras aceitáveis são tratadas com um agente mucolítico (como *N*-acetil-L-cisteína) e esfregaços são preparados e corados para a detecção de *P. jiroveci* (ver Cap. 60).

Amostras de broncoscopia

Amostras de líquido de lavado broncoalveolar e escovados protegidos são úteis para o diagnóstico de pneumonia bacteriana em pacientes ventilados que não tenham recebido terapia antimicrobiana e para a detecção de patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos com pneumonia (Baselski, 1994; Carroll, 2002). Os dados indicam que a cultura de amostras de líquido de lavado broncoalveolar também é útil para o diagnóstico de pneumonia bacteriana aguda (Baselski, 1994). Todas as amostras de broncoscopia devem ser inoculadas quantitativamente em placas para se determinar o significado dos patógenos potenciais recuperados. Apenas amostras de escovados protegidos são aceitáveis para cultura anaeróbica (Baselski, 1994). Para a cultura de espécies de *Legionella*, as amostras de escarro são preferíveis, porque as de lavado broncoalveolar são diluídas com solução fisiológica e podem conter pequenas quantidades do anestésico local utilizado, o que inibe o organismo.

Coleta e transporte da amostra

A amostra de escovado protegido é colhida com uma pequena escova que pega 0,001 a 0,01 mL de secreções em um cateter dentro de uma cânula dupla. A cânula externa tem uma tampa de polietilenoglicol que pode ser deslocada na extremidade. Para obter-se a amostra, a cânula é inserida na área desejada pelo broncoscópio, a cânula interna é empurrada para fora, deslocando a tampa protetora (hidrossolúvel) e a escova é estendida mais adiante, além da cânula interna. Assim que a amostra é obtida, a escova é puxada de volta para a cânula interna e ambas são empurradas para a cânula externa, para evitar contaminação da escova quando o cateter é removido. A escova então é colocada em 1 mL de solução fisiológica estéril ou caldo de cultura. A amostra deve ser transportada imediatamente para o laboratório e processada assim que seja possível. Se for inevitável alguma demora, a amostra deve ser guardada no refrigerador.

Para coletar líquido broncoalveolar, a extremidade do broncoscópio é colocada com cuidado no lúmen de uma via respiratória. Três ou quatro alíquotas de um volume de solução fisiológica (em geral > 140 mL) são injetadas através do lúmen, obtendo-se uma amostra estimada de 1 milhão de alvéolos. O volume total que retorna varia de acordo com o volume instilado, mas em geral é de 10 a 100 mL. O tempo de transporte para o laboratório deve ser mínimo (inferior a 30 minutos) e, uma vez lá, a amostra deve ser processada o mais rapidamente possível. Se for inevitável alguma demora, a amostra deve ser guardada no refrigerador.

Processamento da amostra

Para proteger a amostra obtida por escovado, o líquido em que a escova fica suspensa é agitado em um misturador e a suspensão resultante é usada para uma preparação com citospina e inoculação para cultura. Usando-se uma alça de inoculação calibrada de 0,01 mL, a suspensão é colocada riscando-se com cuidado meios apropriados para isolamento em placas. Contagens de colônias de mais de 1.000 CFU/mL de patógenos potenciais (o que corresponde a 10^6 organismos/mL da amostra original) parecem ter correlação com infecção (Baselski, 1994). A amostra broncoalveolar é inoculada em ágar usando-se uma alça de inoculação calibrada em 0,001 mL (conforme usada para culturas de urina, como descrito na seção subsequente). A presença de mais de 10.000 CFU/mL de líquido tem correlação com doença. A coloração de preparações centrifugadas do líquido corado pelo Gram é recomendada. A visualização de uma ou mais bactérias sem células epiteliais descamativas por campo de imersão em óleo é forte indício de pneumonia bacteriana aguda (Kahn, 1987; Baselski, 1994).

O processamento de amostras de lavado broncoalveolar para a detecção de vírus inclui exame microscópico direto e cultura celular convencional. O exame de preparações centrifugadas coradas pelo Papanicolaou permite a detecção de alterações citopáticas, sendo especialmente útil para o diagnóstico de pneumonia por CMV (Fig. 63.4) (Woods, 1990). Preparações de citospina também podem ser coradas com um corante ácido-rápido, com anticorpos específicos, como aqueles para detecção de espécies de *Legionella* ou *P. jiroveci*, ou com coran-

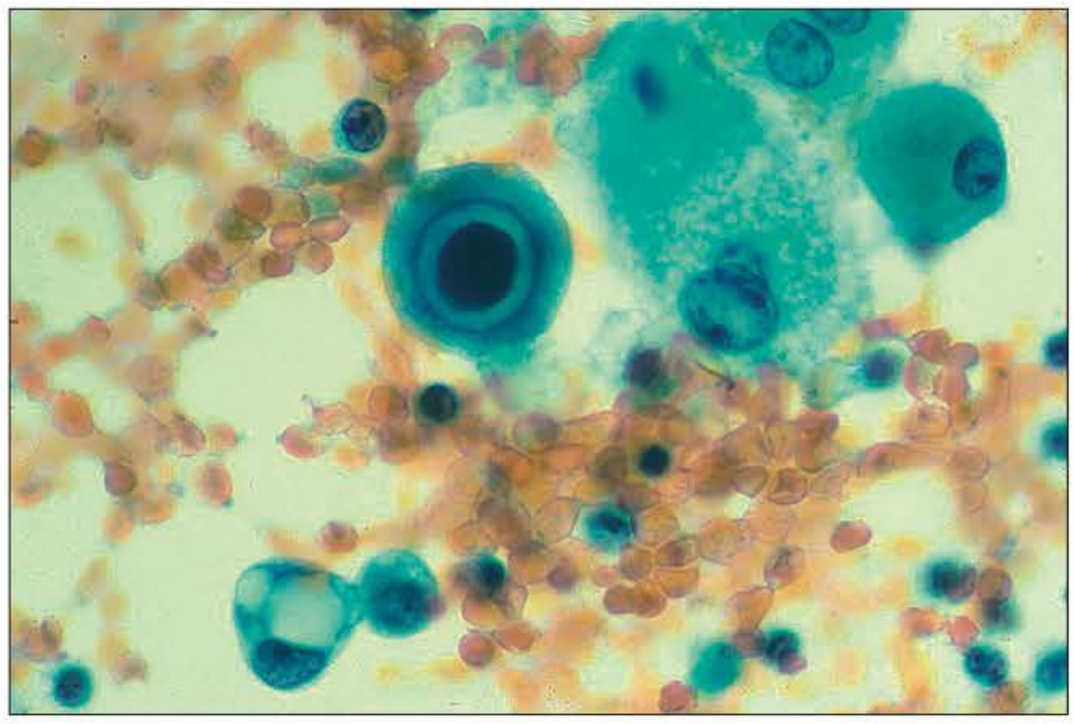


Figura 63.4 Preparação citológica de líquido obtido por lavado broncoalveolar, mostrando célula aumentada com inclusões intranucleares e intracitoplasmáticas, consistentes com citomegalovírus (Coloração de Papanicolaou, × 250). (Cortesia de Vicki J. Schnadig, MD, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX.)

tes inespecíficos para a detecção de *P. jiroveci* ou outros fungos (como prata, calcoflúor branco ou Giemsa). Para a detecção de micobactérias, a amostra deve ser descontaminada e manipulada conforme descrito no Capítulo 59. Para recuperar fungos, o sedimento de uma amostra centrifugada deve ser inoculado em um meio primário para fungos.

Trato urinário

O trato urinário acima da uretra é estéril em pessoas saudáveis, mas a uretra normalmente é colonizada com muitas bactérias diferentes, de modo que a coleta de amostras de urina por um método não invasivo (como jato médio) faz que sejam contaminadas durante a passagem pelas vias urinárias. Bactérias comensais são diferenciadas de patógenos potenciais por culturas quantitativas de urina, um procedimento inicialmente promovido por Kass (l956). Originalmente, o crescimento de 10^5 ou mais CFU de bactérias por mililitro de urina era considerado altamente indicativo de infecção, porém, tal critério foi modificado para situações diferentes. Por exemplo, em mulheres jovens sexualmente ativas com uma síndrome uretral aguda (disúria, frequência e urgência), apenas 10^2CFU/mL são consideradas significativas na presença de piúria concomitante (Stamm, 1982). Podem ocorrer infecções verdadeiras do trato urinário associadas a pouco menos que 10^5 CFU/mL em lactentes e crianças, homens e pessoas cateterizadas, recém-tratadas com agentes antimicrobianos, que bebem grande quantidade de líquidos (o que dilui a urina), tenham sintomas e piúria concomitante, obstrução urinária ou tenham adquirido nefrite por via hematogênica (em especial infecções devidas a leveduras e *S. aureus*) (Pezzlo, 1988; Baron, 1994). Consequentemente, a interpretação adequada dos resultados de uma urocultura requer comunicação entre os clínicos e a equipe do laboratório.

Coleta e transporte da amostra

Os métodos aceitáveis para a coleta de urina incluem jato médio (de preferência da primeira micção da manhã), cateterismo e aspiração suprapúbica. Em geral, amostras de urina de 24 horas devem ser rejeitadas, exceto quando é solicitada especificamente a detecção de *Schistosoma haematobium*. Mais comumente, colhe-se urina do jato médio. No caso de mulheres, antes, limpa-se a área periuretral e do períneo com uma compressa de gaze estéril embebida em sabão, com um movimento da frente para trás, enxaguando com compressas de gaze estéreis umedecidas e secando com outras compressas de gaze estéreis. No caso de homens, a limpeza da área genital pode não melhorar muito a detecção de bacteriúria e não ser necessária (Lipsky, 1984). Durante a micção, as mulheres devem afastar os lábios vulvares e os homens que não forem circuncisados devem retrair o prepúcio. Os primeiros mililitros de urina são eliminados em uma comadre ou similar, para descartar as bactérias que normalmente colonizam a uretra, colhendo-se uma parte do jato médio em um recipiente estéril de boca larga e com tampa que o deixe bem vedado.

O cateterismo é associado ao risco de induzir uma infecção nosocomial e, portanto, deve restringir-se a pessoas impossibilitadas de produzir uma amostra do jato médio, como aquelas com alteração do sensório ou incapazes de urinar por causa de problemas neurológicos ou urológicos. Com técnica asséptica estrita, o cateter é introduzido na uretra, os primeiros mililitros são descartados para eliminar os organismos que possam ter entrado na extremidade do cateter durante sua colocação e a parte média da amostra é obtida para cultura. A urina pode ser colhida com um cateter permanente aspirando-se com agulha de calibre 28 montada em seringa por meio de um conector de borracha entre o cateter e o tubo coletor, com o cuidado prévio de desinfetar o local da punção. Não se deve coletar urina de bolsas de cateteres, e as extremidades dos cateteres de Foley não devem ser aceitas para realização da cultura, pois quase sempre estão contaminadas com organismos uretrais.

A aspiração suprapúbica é usada principalmente em neonatos. O procedimento requer que a bexiga esteja cheia, a pele seja desinfetada e a punção seja feita acima da sínfise púbica, com uma agulha de calibre 22 montada em seringa, aspirando-se cerca de 10 mL de urina.

Todas as amostras de urina devem ser levadas imediatamente para o laboratório e processadas até 2 horas após a coleta. Se uma demora no transporte não puder ser evitada, as amostras devem ser refrigeradas por até 24 horas. Há no comércio kits para coleta contendo conservantes para manter a população bacteriana estável por 24 horas à temperatura ambiente, mas eles não têm qualquer vantagem com relação à refrigeração.

Processamento da amostra

A cultura bacteriana quantitativa de uma amostra de urina é feita por inoculação em meios apropriados (ver Cap. 56), com uma quantidade medida de urina, mais comumente com uma alça de plástico ou arame calibrada para liberar um volume conhecido. Usa-se uma alça calibrada em 0,001 mL para inocular todas as amostras de urina, exceto aquelas coletadas de mulheres em que se suspeita de síndrome uretral e aspirados suprapúbicos. As duas últimas são inoculadas com uma alça calibrada em 0,01 mL. A alça apropriada é introduzida verticalmente na amostra de urina bem misturada e a urina removida é espalhada sobre a superfície de uma placa de ágar, conforme ilustrado na Figura 63.5. Sem reinocular, a alça é inserida verticalmente mais uma vez na urina e a amostra retirada é inoculada em uma segunda placa.

Algumas bactérias não são detectadas pela urocultura de rotina e, quando se suspeita da presença desses patógenos, é preciso solicitar testes específicos. Por exemplo, a urina é uma amostra aceitável para a detecção de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* por amplificação do ácido nucleico. As instruções do fabricante para a coleta e o processamento de urina devem ser seguidas. *Leptospira interrogans* pode ser detectada na urina após a primeira semana de doença e por vários meses depois. A urina deve ser processada o mais rapidamente possível após a coleta, porque sua acidez prejudica os organismos. Uma ou duas gotas de urina não diluída e urina diluída a 1:10 em caldo de cultura são inoculadas em 5 mL de meio de Fletcher ou de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris contendo 5-fluorouracil. A cultura de urina para micobactérias foi discutida no Capítulo 59. Leveduras podem ser recuperadas da urina nos meios de rotina para cultura bacteriana, mas, se for solicitada especificamente cultura fúngica, o sedimento de uma amostra centrifugada de urina deve ser colocado em uma placa com meio como aquele inibitório de mofo ou ágar SABHI contendo agentes antibacterianos.

Quando amostras de urina são submetidas a cultura de vírus, isso deve ser realizado em meios líquidos contendo antibióticos (p. ex., penicilina, gentamicina e anfotericina B), ou os antibióticos devem ser acrescentados à amostra quando ela é recebida no laboratório, para minimizar a contaminação bacteriana de culturas celulares. As linhagens celulares são selecionadas para inoculação com base nos vírus mais comumente isolados – CMV, adenovírus e HSV.

Mais de metade das amostras de urina submetidas ao laboratório clínico para cultura não gera crescimento ou tem contagens bacte-

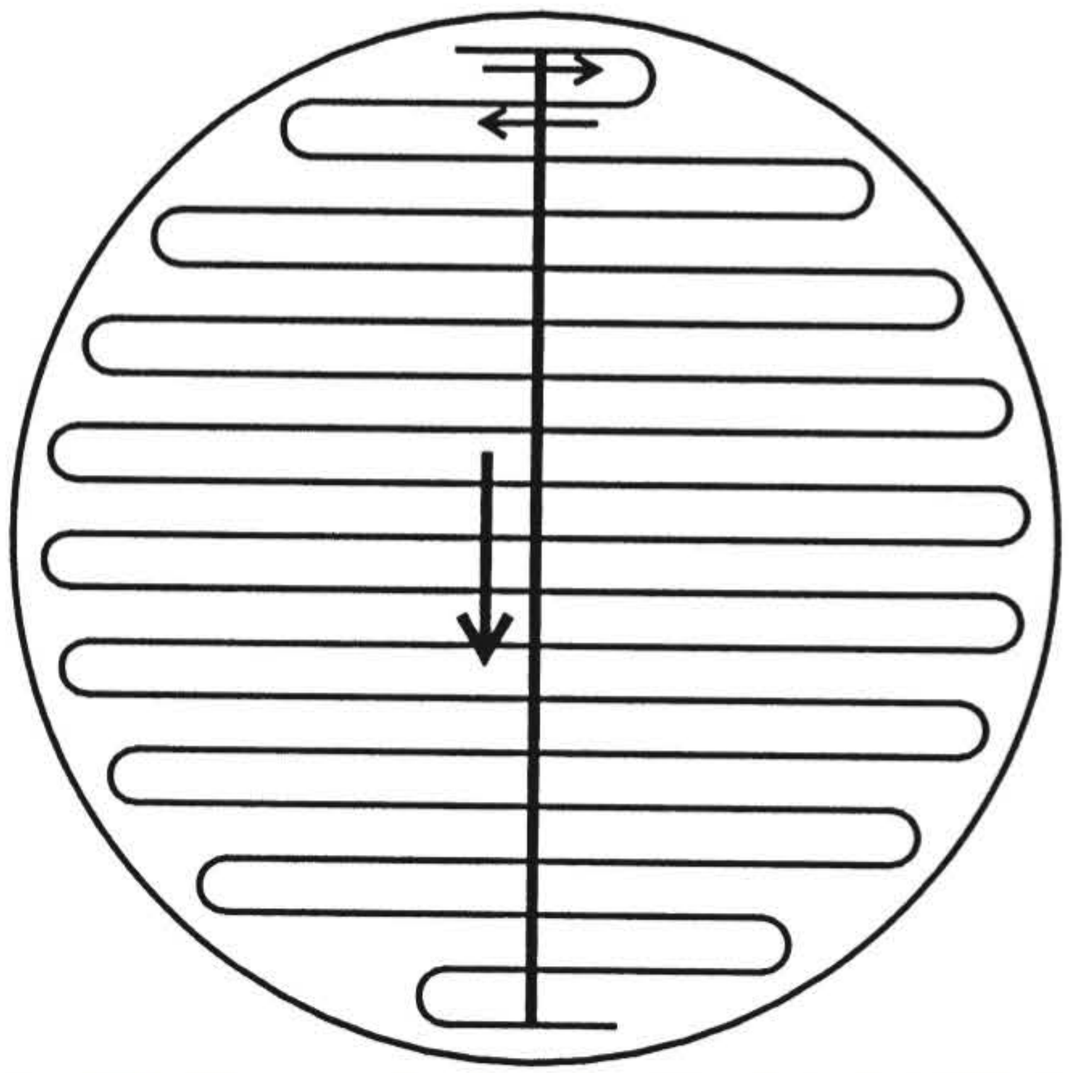


Figura 63.5 Técnica para inocular urina em placas de ágar. (Redesenhada de Woods GL, Gutierrez Y: Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993.)

rianas abaixo dos níveis considerados significativos; portanto, foram desenvolvidos testes de triagem que rapidamente identificam amostras cujas culturas resultam "negativas", em uma tentativa de fornecer resultados rápidos, eliminar amostras negativas e permitir mais tempo para amostras positivas, melhorando, assim, a eficiência e o custo. Os resultados da triagem da urina e os da cultura têm boa correlação quando 10^5 CFU/mL ou mais é a referência, mas a comparação é menos favorável na presença de baixas contagens de colônias (Pezzlo, 1988). Outras questões a considerar a respeito do uso de triagens de bacteriúria são a capacidade de detectar piúria e o custo. O último é especialmente importante quando se considera a automatização.

A triagem de amostras urinárias coradas pelo Gram é rápida e econômica. O achado de um ou mais organismos por campo de imersão em óleo em um esfregaço preparado a partir de uma amostra centrifugada tem boa correlação com bacteriúria de 10^5 CFU/mL ou mais (Rippin, 1995). Contudo, a sensibilidade da coloração de Gram diminui quando comparada a contagens baixas de colônia, e o exame de esfregaços é entediante e demorado. Testes de tira disponíveis no comércio que combinam a redutase do nitrato (uma enzima presente na maioria dos bacilos Gram-negativos que causam infecções do trato urinário) e a esterase dos leucócitos (enzima produzida por neutrófilos) são rápidos, de baixo custo e de simples realização, mas sua sensibilidade é muito baixa para serem usados como testes de triagem únicos para infecções do trato urinário (Pezzlo, 1988; Shaw, 1998; Semeniuk, 1999).

Há no comércio vários sistemas de triagem urinária. Um sistema de filtração colorimétrica fornece resultados rápidos e detecta mais de 90% de todas as amostras positivas (inclusive as que contêm neutrófilos e apenas 10^2 CFU/mL), mas podem dar resultados falso-negativos com enterococos e *P. aeruginosa* (Pezzlo, 1988; Shaw, 1997). A urina é forçada por um filtro de papel e então passa-se um corante pelo filtro. A intensidade da cor resultante, lida manualmente ou com um fotômetro, correlaciona-se com o número de partículas que aderem ao filtro.

Um sistema bioluminescente baseia-se na reação do trifosfato de adenosina (presente em todas as células vivas) com luciferina e luciferase, que produz luz medida por um luminômetro. Com a liberação seletiva do trifosfato de adenosina apenas de bactérias, pode-se estimar o número de CFU em uma amostra de urina. Essa técnica compara-se favoravelmente à cultura em um nível de 10^5 CFU/mL ou mais, todavia, como requer uma etapa de incubação, a disponibilização dos resultados demora algumas horas. Outro sistema combina a coloração e a análise de imagens de vídeo em uma triagem rápida. Esse método tem sensibilidade maior que 92% para contagens de colônias da ordem de 10^4 CFU/mL ou mais.

Trato genital

As amostras de locais genitais são submetidas à detecção de microrganismos responsáveis por várias síndromes clínicas, cada uma delas associada a certos patógenos e com apresentações clínicas distintas, requerendo coleta, transporte e procedimentos de testes específicos. Ao usar muitos desses testes, é preciso seguir as instruções do fabricante quanto aos dispositivos de coleta e transporte, para que detectem o patógeno responsável.

Secreções vaginais

As secreções vaginais são úteis para determinar o agente etiológico da vulvovaginite e da vaginose bacteriana (denominadas assim porque não são condições invasivas). Em mulheres pré-puberais, os patógenos mais comuns são *Gardnerella vaginalis* (em associação a anaeróbios como *Mobiluncus* spp.), espécies de *Candida* e *Trichomonas vaginalis*. Uma preparação a fresco montada é o teste diagnóstico mais valioso e pode ser feita pelo médico da paciente; não são necessárias culturas para o diagnóstico. Um *swab* da secreção é colocado em um tubo contendo cerca de 1 mL de solução fisiológica normal e levado para o laboratório. Retira-se o *swab* da solução fisiológica, pressionando-se firmemente sua extremidade várias vezes contra uma lâmina de microscopia de vidro para espremer o líquido e o material celular, cobre-se a lâmina com lamínula e examina-se ao microscópio sob pequeno e grande aumentos, procurando "indícios de células" (células epiteliais cobertas com bactérias cocobacilares pequenas) (Fig. 63.6) consistentes com o diagnóstico de vaginose inespecífica, pseudo-hifas

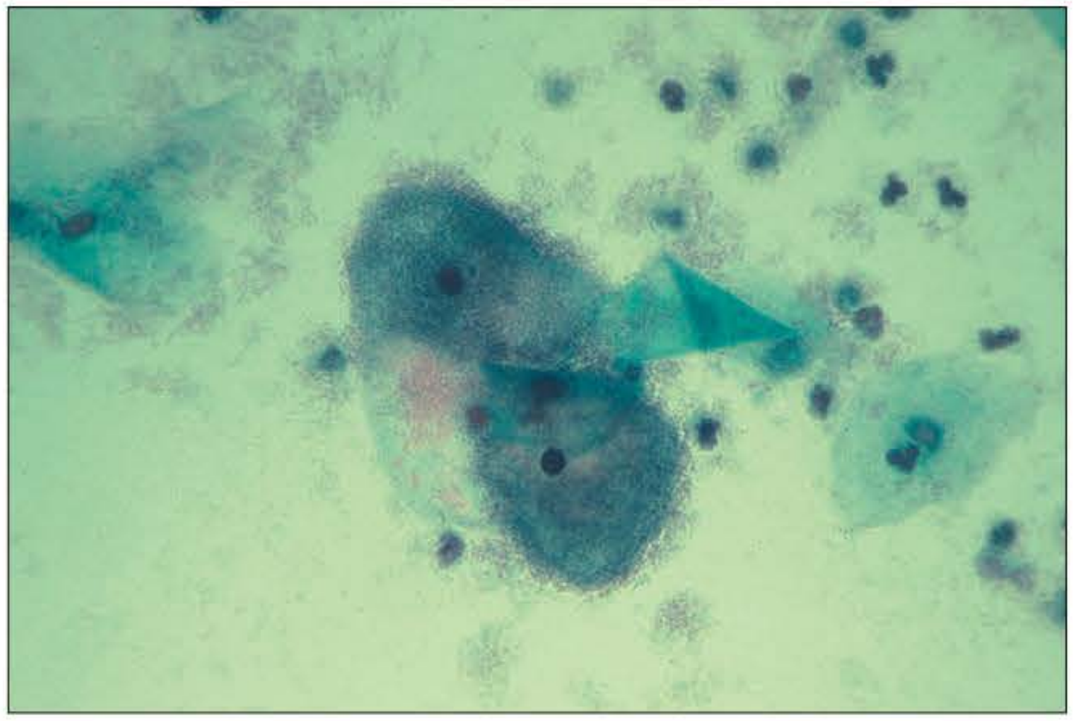


Figure 63.6 "Células indicativas" em um esfregaço de corrimento vaginal (Coloração de Papanicolaou, ×400). (Cortesia de Vicki J. Schnadig, MD, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX.)

sugestivas de candidíase vaginal, bem como tricômonas móveis. A detecção de todos os três patógenos também pode ser conseguida com um teste comercial de PCR para patógenos vaginais (Briselden, 1994). É indispensável usar os *swabs* e tubos de transporte fornecidos pelo fabricante do teste.

Outros testes diagnósticos úteis são o do pH vaginal e o "teste do cheiro". O pH vaginal geralmente é de cerca de 4,5 em mulheres com candidíase vaginal, mas acima disso naquelas com vaginose bacteriana ou tricomoníase. Um teste do cheiro positivo é determinado pela detecção de um odor pungente de peixe após o acréscimo de 10% de hidróxido de potássio a uma gota de corrimento vaginal colocada em uma lâmina ou no espéculo. Isso é associado predominantemente a vaginose bacteriana, mas em alguns casos ocorre na tricomoníase.

Amostras endocervicais e uretrais

São coletadas amostras endocervicais para determinar o(s) agente(s) etiológico(s) da cervicite e identificar mulheres assintomáticas infectadas com um organismo que causa doença sexualmente transmitida. As amostras endocervicais são obtidas depois de visualizar-se a cérvix com um espéculo umedecido apenas em água morna, porque os lubrificantes podem conter agentes antibacterianos. Se um esfregaço de Papanicolaou estiver indicado, a amostra para ele deve ser colhida primeiro.

As amostras para estudos microbiológicos em geral são coletadas com um *swab*. Conforme discutido anteriomente neste capítulo, é recomendável usar um *swab* com extremidade de poliéster. Caso seja usado um kit de teste que não empregue cultura para detectar o organismo, a amostra deve ser colhida com o *swab* fornecido ou especificado pelo fabricante. Antes de coletar as amostras para detecção de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*, é preciso remover todas as secreções e corrimentos do óstio cervical. Em seguida, insere-se o *swab* ou a escova 1 a 2 cm no canal endocervical (depois da junção escamocolunar), com movimentos giratórios firmes contra a parede por 10 a 30 segundos, retirando-o sem tocar a superfície da vagina para colocar no meio de transporte apropriado ou sistema de tubo usado para preparar uma lâmina para coloração direta de anticorpo fluorescente (para *C. trachomatis*) ou inocular imediatamente em ágar para recuperação de *N. gonorrhoeae*.

A manipulação da amostra varia com base no organismo observado. Para isolar *N. gonorrhoeae*, o ideal é a inoculação direta em meio de ágar seletivo como o de Thayer-Martin modificado, dentro de um recipiente ao qual se acrescenta um comprimido gerador de CO_2. Uma alternativa consiste em colocar a amostra de *swab* em um sistema de transporte de tubo e levar para o laboratório em duas horas. Se não puder ser evitada alguma demora, o *swab* deve ser deixado à temperatura ambiente, nunca refrigerado. Caso se use uma sonda de DNA ou amplificação do ácido nucleico para detectar *N. gonorrhoeae*, deve-se usar o kit de coleta do fabricante e seguir as instruções para armazenamento e transporte.

Para detectar *C. trachomatis*, podem ser usados métodos de cultura ou não (ver Cap. 55). Para cultura de clamídias, a amostra deve ser

transportada em meio M4, que contém antibióticos para inibir a proliferação de bactérias e fungos. Para manter a viabilidade da *Chlamydia*, a amostra deve ser levada para o laboratório imediatamente ou guardada no refrigerador, se não for possível seu envio imediato. No laboratório, ela deve ser processada o mais rapidamente possível. Caso seja inevitável alguma demora no processamento, as amostras devem ser guardadas no refrigerador se puderem ser processadas em 48 horas. Para detectar corpúsculos elementares de clamídia pela coloração com DFA, é preciso usar o kit de coleta fornecido pelo fabricante e seguir suas instruções. A amostra é espalhada sobre a lâmina de microscopia girando-se o *swab*, deixa-se secar e aplica-se o fixador. Para ensaio imunoenzimático, sondas de DNA e amplificação do ácido nucleico, deve-se usar o kit de coleta e sistema de transporte fornecido pelo fabricante, a menos que ele estabeleça especificamente que um sistema alternativo de transporte é aceitável. As orientações do fabricante sobre as condições de transporte, necessidades de armazenamento e tempo de processamento também precisam ser seguidas.

Para a melhor detecção de HSV, a cultura celular é recomendável. O *swab* com a amostra é colocado em meio de transporte viral como M4 e levado assim que possível para o laboratório. Se a liberação imediata não for viável, a amostra deve ser mantida no refrigerador. No caso de pacientes com lesões visíveis na cérvix, podem ser vistas alterações virais citopáticas em esfregaços preparados a partir de raspados da lesão básica. Os esfregaços são fixados imediatamente e corados pelo Wright ou pelo Giemsa (preparação de Tzanck), que não distinguem HSV do vírus varicela zóster, ou com um anticorpo monoclonal.

Acredita-se que a infecção do trato genital com o papilomavírus humano (HPV) seja a doença sexualmente transmissível mais comum nos EUA, e a infecção com um tipo de alto risco é o principal fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma cervical. Como não é possível cultivar o vírus *in vitro*, têm de ser usados outros métodos diagnósticos. As alterações do carcinoma espinocelular podem ser visualizadas em amostras de células esfoliadas (esfregaço de Papanaicolaou), mas técnicas moleculares (p. ex., hibridização do ácido nucleico com amplificação do sinal e PCR) são mais sensíveis. As instruções para a coleta e o transporte de amostras fornecidas pelos fabricantes de kits devem ser seguidas.

Para detectar *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em homens, deve-se obter uma amostra com *swab* uretral ou da primeira micção, dependendo do método empregado. O ideal é coletar amostras uretrais com *swab* pelo menos 2 horas após o paciente ter urinado. As amostras para *N. gonorrhoeae* são obtidas primeiro. As condições quanto ao tipo de *swab* e transporte da amostra são as mesmas descritas para amostras de *swab* endocervical, embora sejam usados *swabs* urogenitais menores. O *swab* é introduzido por 2 a 4 cm na uretra, girado em uma direção por 5 segundos, retirado e colocado no meio de transporte apropriado ou usado para preparar esfregaços para coloração direta de anticorpo fluorescente para detectar *C. trachomatis* ou para coloração de Gram para diagnosticar gonorreia (a detecção de diplococos Gram-negativos intracelulares em um esfregaço de corrimento uretral de homens sintomáticos fornece um diagnóstico presuntivo).

Vesículas

São obtidas amostras de lesões vesiculares genitais para confirmar infecção pelo HSV. O líquido da vesícula é aspirado com uma agulha de pequeno calibre montada em uma seringa para tuberculina. Se houver apenas uma pequena vesícula, ela é firmemente raspada em sua base com um *swab* de Dacron ou abaixador de língua, sem rompê-la em sua parte superior, para assegurar-se a coleta de células. Amostras do líquido da vesícula ou o *swab* devem ser colocados em um meio de transporte viral e processadas para cultura convencional de células. O HSV também pode ser detectado diretamente em amostras clínicas pela coloração direta de esfregaços, mas esses são menos sensíveis que a cultura e, se negativos, devem ser feitas culturas em seguida. Para fazer um esfregaço, as células coletadas com um abaixador de língua ou *swab* de Dacron são espalhadas em uma lâmina de microscopia e o material é fixado com acetona. O esfregaço pode ser corado pelos métodos de Papanicolaou, Wright ou Giemsa, para a detecção das alterações citopáticas típicas induzidas pelo HSV (o vírus varicela zóster tem um aspecto idêntico) (Fig. 63.7) ou com anticorpos monoclonais específicos.

Figura 63.7 Célula gigante multinucleada com inclusões intranucleares, consistente com o vírus do herpes simples, em um esfregaço de células endocervicais (Coloração de Papanicolaou, × 400). (Cortesia de Vicki J. Schnadig, MD, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX.)

Úlceras

O material de úlceras genitais é coletado para se identificar o patógeno responsável; HSV, *Haemophilus ducreyi*, *T. pallidum*, *C. trachomatis* (sorogrupos L_1, L_2 e L_3) e *Calymmatobacterium granulomatis* devem ser considerados no diagnóstico diferencial. A coleta, o transporte e o processamento do material de lesões ulcerativas para a detecção de HSV são idênticos ao protocolo discutido para as vesículas. Em geral, a sensibilidade dos testes diretos já descritos e a recuperação do vírus são menores nas lesões ulcerativas.

Caso se suspeite de *H. ducreyi*, colhe-se material da base da úlcera em dois *swabs* de algodão ou Dacron, usando-se um deles para inocular uma placa com ágar chocolate à beira do leito. Se isso não for possível, o *swab* deve ser levado para o laboratório em meio modificado de Stuart e mantido à temperatura ambiente até ser processado. Usa-se o segundo *swab* para preparar um esfregaço corado pelo Gram. A observação de pequenos cocobacilos Gram-negativos pleomórficos dispostos em grupos de cadeias que lembram espinha de peixe sugere *H. ducreyi*. No entanto, a cultura é mais sensível e necessária para confirmação.

Podem ser detectados espiroquetas de *T. pallidum* em lesões genitais ou outras, mas em geral a sífilis é diagnosticada por sorologia. Devem-se usar luvas ao examinar lesões suspeitas de sífilis e manipular amostras obtidas dessas lesões. Para coletar as amostras, limpa-se a superfície da lesão (se houver várias lesões, deve-se escolher a mais recente) com solução fisiológica e removem-se as crostas, se presentes. Provoca-se uma abrasão superficial na lesão até que ocorra um sangramento leve e pressiona-se delicadamente sua base, colhendo-se o exsudato transparente da subsuperfície ao tocar-se o líquido com uma lâmina de microscopia ou uma pipeta capilar e transferindo-o para uma lâmina de microscopia. Cobre-se a lâmina com lamínula e examina-se imediatamente em microscopia de campo escuro. Uma alternativa é aspirar material da lesão com uma agulha de calibre 26 inserida na base, após isso se aspira uma gota de solução fisiológica com a agulha. O material então é colocado em uma lâmina de microscopia, coberto com lamínula e examinado imediatamente em microscopia de campo escuro. Os espiroquetas do *T. pallidum* medem 10 a 13 μm de comprimento por cerca de 0,15 μm largura, apresentam um enrolamento apertado regular e são pontiagudos nas extremidades.

Os sorogrupos L_1, L_2 e L_3 de *C. trachomatis* podem ser detectados por cultura celular em uma biópsia da lesão ulcerada ou em material celular coletado ao se remover primeiro qualquer exsudato da lesão e então girar firmemente um *swab* (de haste de plástico) contra sua base. O transporte e o processamento da amostra são os mesmos discutidos para amostras de *swab* endocervical. Para a melhor detecção de *C. trachomatis*, o tecido sob a superfície de uma área de granulação ativa é biopsiado e levado imediatamente para o laboratório em um recipiente estéril seco ou contendo uma pequena quantidade de solução fisiológica estéril sem conservantes. São preparados esfregaços

com um pedaço esmagado de tecido e corados com Giemsa ou corante de Dieterle. O diagnóstico baseia-se no achado característico de *C. granulomatis* encapasulada dentro de macrófagos.

Fezes

Fezes e, em alguns casos, amostras coletadas com *swab* retal, são úteis para se determinar o agente etiológico de uma diarreia infecciosa ou intoxicação alimentar, confirmar o de botulismo e diagnosticar infecções causadas por adenovírus, enterovírus, alguns patógenos sexualmente transmissíveis, protozoários e helmintos intestinais, bem como, em algumas circunstâncias, helmintos dos tratos respiratório e biliar. A coleta, o transporte e o processamento dessas amostras são diferentes para vírus, bactérias e parasitas, sendo discutidos separadamente para cada grupo.

Vírus

Coleta e transporte da amostra

É preferível coletar fezes para a detecção de adenovírus, enterovírus e dos vírus responsáveis por gastroenterite. As amostras devem ser coletadas em um recipiente limpo com tampa bem vedada. Caso não seja possível obter fezes, insere-se um *swab* além do esfíncter anal, girando-o, retirando-o e colocando-o em meio de transporte M4. A amostra deve ser liberada imediatamente para o laboratório; caso contrário, deve ser refrigerada por pouco tempo e transportada em gelo úmido. Se tiver de ser encaminhada para um laboratório de referência, deve ser armazenada a –70°C e enviada em gelo seco.

Processamento da amostra

Recomenda-se cultura celular para detectar adenovírus e enterovírus, embora se disponha de um ELISA para a detecção de adenovírus. Os rotavírus são responsáveis pela maioria dos casos de gastroenterite viral. Mais comumente, detecta-se rotavírus pelo ELISA; também se dispõe de kits para aglutinação no látex, mas parecem ser menos sensíveis (Christensen, 1989). As amostras são processadas de acordo com as instruções do fabricante. O exame direto de amostras fecais à microscopia eletrônica é o método de referência para a detecção de rotavírus, sendo útil para detectar calicevírus, astrovírus e norovírus. Os norovírus também podem ser detectados pela PCR.

Patógenos bacterianos

Coleta e transporte

Fezes também são preferíveis para a detecção de bactérias responsáveis por diarreia infecciosa, mas uma amostra obtida com *swab* retal é uma alternativa aceitável. Culturas de fezes de pacientes que tenham sido hospitalizados por mais de 3 dias não são apropriadas. As amostras fecais devem ser coletadas em um recipiente limpo com tampa bem vedada e não devem estar contaminadas com urina, bário ou papel higiênico. Amostras de *swabs* retais, obtidas conforme descrito anteriormente para vírus, são colocadas em um sistema de transporte de tubo contendo meio de Stuart modificado. Ambos os tipos de amostra devem ser transportados imediatamente (até 2 horas após a coleta) para o laboratório e processadas tão logo seja possível, pois a queda no pH que ocorre à medida que as fezes esfriam pode inibir o crescimento de alguns patógenos, especialmente *Shigella*. Se for inevitável algum atraso no processamento ou se a amostra tiver de ser encaminhada para um laboratório de referência, será necessário enviar uma alíquota dela em meio de transporte como o Cary Blair. Para cultura de *C. difficile* ou teste de toxina, 20 a 50 mL de fezes líquidas devem ser colocados em um recipiente estéril. A amostra é aceitável por 2 dias, refrigerada ou congelada por uma semana.

Processamento da amostra

O processamento de amostras fecais ou *swabs* retais para a detecção de bactérias baseia-se no organismo ou grupo de organismos que se espera que estejam presentes. As amostras recebidas para cultura bacteriana "rotineira" devem ser processadas de modo a permitir a recuperação de *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* produtora de toxina semelhante à de *Shigella* (STEC), *Campylobacter jejuni/coli* e espécies de *Aeromonas*, inoculando-se placas com os meios diferenciais apropriados (ver Cap. 56). A prevalência de gastroenterite causada por *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* ou outras espécies de *Vibrio* ou *Plesiomonas shigelloides* é baixa na maioria dos EUA, razão pela qual necessidades específicas para sua detecção são mais efetivas com relação ao custo.

Para detectar STEC, inocula-se a amostra fecal em ágar de MacConkey contendo sorbitol (1% de D-sorbitol, em vez de lactose), um meio que diferencia isolados STEC, os quais não fermentam o sorbitol, de quase todas as outras *E. coli*, que são positivas para o sorbitol. Um método mais sensível que a cultura para a detecção de STEC é a de toxina nas fezes ou em filtrado fecal por imunoensaio enzimático ou PCR (Gavin, 2004; Pulz, 2003).

Quando o isolamento de *Y. enterocolitica* é solicitado, inocula-se ágar CIN e incuba-se à temperatura ambiente. O organismo também pode ser recuperado inoculando-se os meios tipicamente usados para cultura bacteriana "rotineira" (ver Cap. 56). Uma placa de MacConkey pode ser incubada à temperatura ambiente por 48 horas. As colônias de *Y. enterocolitica* são de cor púrpura e do tamanho da cabeça de um alfinete.

As espécies de *Vibrio* frequentemente crescem nos meios usados para cultura fecal "rotineira", porém, para que sua recuperação seja ótima, inocula-se a amostra em ágar com tiossulfato, citrato, sais biliares e sacarose (TCBS). *Plesiomonas shigelloides* também cresce nos meios usados para cultura fecal "rotineira", mas como até 30% dos isolados de *P. shigelloides* fermentam a lactose, suas colônias não aparecem distintas o suficiente para serem reconhecidas nesses meios, e a triagem para todas as colônias de *Plesiomonas* não é efetiva com relação ao custo. Por essa razão, a cultura de fezes ou amostras de *swab* fecal para *P. shigelloides* deve ser solicitada especificamente. O uso do meio seletivo e diferencial ágar de sais biliares verde-brilhantes com inositol foi sugerido, mas não é essencial.

Amostras de *swabs* retais submetidas à detecção de *C. trachomatis* são colocadas em meio de transporte e liberadas imediatamente para o laboratório, ou refrigeradas por pouco tempo. Amostras de *swab* retal coletadas para o diagnóstico de gonorreia são tratadas conforme discutido anteriormente, quando nos referimos às amostras endocervicais.

Amostras fecais ou conteúdo gástrico coletados de pessoas com intoxicação alimentar de curta incubação devem ser avaliadas quanto à presença de *S. aureus* e *Bacillus cereus*. O processamento inclui a preparação e o exame de esfregaços corados pelo Gram e cultura. Como ambos os organismos podem estar presentes normalmente nos alimentos, devem ser feitas culturas quantitativas. Prepara-se uma série de diluições (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} e 10^{-5}) da amostra em gelatina diluente tamponada, inoculando-se 0,1 mL da amostra não diluída e cada uma das diluições em placas com ágar-sangue contendo colistina-ácido nalaidíxico ou álcool feniletílico (seletivos para organismos Gram-positivos). Além disso, para demonstrar a produção de endosporos por *B. cereus*, mistura-se 1 mL da amostra original com 1 mL de etanol absoluto, deixando em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. São preparadas diluições da mistura conforme acabamos de descrever, colocando-se 1 mL de cada diluição e da mistura não diluída em placas com ágar-sangue de carneiro. Todas as placas são incubadas por 18 a 24 horas a 35 a 37°C em ar ambiente, e as colônias são contadas. A presença de 10^5 CFU ou mais de *S. aureus* ou *B. cereus* por grama de amostra tem significado potencial, especialmente se encontrados em amostras da maioria dos indivíduos acometidos. Testes para os agentes causadores de intoxicação alimentar bacteriana que acabamos de descrever normalmente são conduzidos em laboratórios de saúde pública e não em laboratórios clínicos.

É possível confirmar o diagnóstico clínico de botulismo de origem alimentar e o de lactentes ao detectar-se a toxina botulínica, *Clostridium botulinum* ou ambos nas fezes. O ideal é coletar 20 a 50 mL de fezes, 15 a 20 mL de soro e uma amostra do alimento suspeito. A maioria dos laboratórios clínicos não está bem equipada para processar amostras de pessoas com suspeita de botulismo. Nos EUA, quando se identifica um caso de botulismo, deve-se notificar aos CDC para assegurar o diagnóstico, o tratamento e a investigação apropriados de um potencial surto.

As doenças associadas ao *C. difficile*, como a colite pseudomembranosa e a diarreia associada a antibiótico, são causadas pelas toxinas produzidas pelo organismo e diagnosticadas detectando-se nas fezes a toxina A, B ou ambas. O método de referência para a

detecção da citotoxina é o ensaio com cultura celular. Para extrair a toxina, a amostra fecal é clareada por centrifugação a 2.000 × g por 20 minutos ou 10.000 × g por 10 minutos e filtrada em uma membrana de 0,45 μm. São preparadas diluições seriadas e inoculadas em monocamadas celulares, que são incubadas por 24 a 48 horas. Como alternativa, é possível detectar a toxina A ou ambas, A e B, em amostras fecais pelo ELISA, técnica que parece quase tão sensível quanto a cultura celular e fornece resultados em poucas horas (Whittier, 1993; Merz, 1994). No entanto, a sensibilidade dos ELISAs comerciais varia (Lyerly, 1998; Fedorko, 1999; Turgeon, 2003; Wilkins, 2003). Testes para detecção do antígeno da glutamato desidrogenase (GDH) também estão disponíveis no comércio (Wilkins, 2003) e, como a cultura bacteriana, não distinguem os isolados que produzem toxina daqueles que não o fazem. Entretanto, apesar disso, demonstrou-se que o antígeno comum, que tem um tempo de circulação de 15 a 45 minutos, é um teste de triagem útil em certas instituições. Amostras que dão resultados negativos não requerem testes adicionais, enquanto aquelas positivas para GDH devem ser testadas quanto à presença de toxinas.

Para estudos epidemiológicos, pode-se isolar o *C. difficile* de fezes ou *swabs* fecais colocados em um sistema de transporte anaeróbio. Como há muitas bactérias nas fezes, é preciso usar procedimentos selecionados para *C. difficile*. O meio mais efetivo para essa finalidade é o ágar de gema de ovo com ciclosserina, cefoxitina e frutose (CCFA), com ou sem sangue equino. O organismo cresce mais rapidamente e de forma exuberante nas formulações que contêm sangue equino. O meio é incubado de forma anaeróbia por 48 horas e as placas são examinadas em busca de colônias que tenham a periferia franjada e odor de "baia de equino". Como alternativa, pode-se isolar o *C. difficile* usando um procedimento de seleção de esporo em álcool, em que se mistura 1 mL da amostra original com 1 mL de etanol absoluto. Deixa-se a mistura em repouso por uma hora à temperatura ambiente, fazendo-se em seguida a subcultura em CCFA e incubação anaeróbia.

O *Clostridium perfringens* é uma causa de intoxicação alimentar de longa incubação (7-15 horas após o consumo do alimento contaminado). Ele também pode causar diarreia associada a antibiótico, tipicamente em pacientes idosos hospitalizados, e enterite necrotizante. Para diagnosticar intoxicação alimentar causada pelo *C. perfringens*, faz-se a cultura anaeróbia quantitativa de uma amostra fecal que tenha sido transportada em um sistema de transporte anaeróbio. Dilui-se matéria fecal tratada com etanol e não tratada, conforme descrito anteriormente para a detecção de bactérias associadas a intoxicação alimentar de curta incubação. As placas com ágar e álcool feniletílico são inoculadas e incubadas de forma anaeróbia por 48 horas. Uma contagem de esporos de 10^5 ou mais por grama de fezes pode ser significativa, em especial se demonstrada em amostras da maioria dos indivíduos acometidos. Como observado previamente, o teste para agentes de intoxicação alimentar é conduzido principalmente em laboratórios de saúde pública, e não nos laboratórios clínicos. A toxina pode ser detectada na amostra fecal original, mas esse teste costuma ser feito em laboratórios de referência. Critérios similares são usados para diagnosticar diarreia causada por *C. perfringens* durante antibioticoterapia.

Quanto à cultura micobacteriana, as amostras fecais em geral são submetidas ao isolamento do complexo *Mycobacterium avium* (principalmente em pacientes com AIDS), mas o *M. tuberculosis* e outras espécies do mesmo gênero também podem ser recuperados. O processamento da amostra (1–2 g de fezes formadas ou 5 mL de fezes líquidas) envolve a descontaminação e a concentração, o preparo de esfregaços e a inoculação em meios, conforme discutido no Capítulo 59.

Parasitas

A pedra fundamental do diagnóstico parasitológico no laboratório clínico é o exame de amostras de fezes em busca de protozoários e ovos ou larvas de helmintos parasitas. Os laboratórios que realizam tais exames devem ter instalações adequadas para manipular amostras de fezes e um bom microscópio com micrômetro calibrado para medir os organismos encontrados. A coloração de esfregaços fecais também é necessária para a identificação de protozoários intestinais.

Coleta e transporte da amostra

A amostra (geralmente obtida pelo próprio paciente) pode ser colhida em um recipiente limpo, seco e de boca larga. Uma parte da amostra é então dividida em alíquotas em dois frascos contendo conservantes, um deles com álcool polivinílico (PVA) modificado e o outro com formalina a 10%. Amostras fecais não devem ser coletadas de papel higiênico e também não devem estar contaminadas com urina, água, óleo mineral ou de rícino, compostos antidiarreicos ou meios de contraste radiológico. Uma vez colhida e preservada, a amostra deve ser levada para o laboratório da conveniência do paciente. O uso de fezes frescas é o ideal para exame em busca de trofozoítos de *E. hystolitica*; contudo, em geral é muito difícil transportar uma amostra fresca para o laboratório e fazer com que ela chegue às mãos do microbiologista em até 30 a 60 minutos após a coleta, o tempo máximo para visualizar trofozoítos móveis. Embora raramente seja possível fazer montagens úmidas com fezes frescas para ver trofozoítos móveis, geralmente eles podem ser identificados em preparações coradas, e o uso de amostras conservadas para exame minimiza a exposição do pessoal do laboratório a organismos vivos.

Há no comércio vários kits para a coleta e o transporte de amostras fecais, a maioria consistindo em dois frascos, um com fixador (formalina) para ovos de helmintos e cistos de protozoários, e o outro com PVA para a preparação de esfregaços para coloração. A quantidade necessária de amostras fecais para identificação de todos os indivíduos com protozoários ou helmintos intestinais ainda é uma questão sem resposta. Foi sugerido coletar no mínimo três amostras em dias diferentes para exame (Proctor, 1991), porém, alguns recomendam a coleta de apenas uma ou duas. Para contenção de custos, o clínico deve solicitar o exame de uma amostra apenas, porque cerca de 90% de todas as infecções são diagnosticados na primeira amostra (Montessori, 1987). Se não for detectado um parasita na primeira amostra, deve-se solicitar uma segunda ou terceira. Se duas ou mais amostras coletadas em dias diferentes forem recebidas pelo laboratório ao mesmo tempo, sugeriu-se misturá-las e examinar como se fossem uma só (Peters, 1988), mas tal prática é discutível. Exames de fezes para parasitas em pacientes hospitalizados por mais de 3 dias são impróprios (Siegel, 1990).

Processamento da amostra

O exame de amostras fecais para parasitas inclui a preparação de montagens úmidas de fezes frescas (i. e., aquelas que podem ser examinadas poucas horas após a coleta) em solução salina e coradas com iodo (solução de Lugol). A isso segue-se a concentração de cistos e ovos de helmintos, e por fim a preparação de esfregaços para coloração com tricromo. As preparações a fresco, se realizadas, devem ser feitas e examinadas antes da concentração e da coloração com tricromo. Mesmo que um parasita seja visto em uma montagem úmida, o exame de uma amostra concentrada é recomendado, porque não é raro que as amostras submetidas ao exame para detectar ovos e parasitas contenham múltiplos parasitas. Em particular, ovos de helmintos costumam ser visíveis apenas na amostra concentrada.

O esfregaço fecal padrão, que contém cerca de 2 mg de fezes, é feito a partir de uma amostra fecal fresca como segue: uma gota de solução fisiológica é colocada em uma lâmina de microscopia de vidro limpa; com um bastão especial, põe-se uma pequena quantidade de fezes e, com movimentos circulares, mistura-se com solução fisiológica (até dissolver bem a amostra) e cobre-se a mistura com uma lamínula de 22 mm^2. Um bom esfregaço úmido preparado dessa forma, se colocado em um papel com pouca pressão, deve permitir ler a impressão por meio do esfregaço. O esfregaço corado com iodo é preparado da mesma forma. A preparação com solução fisiológica e aquela com iodo podem ser feitas na mesma lâmina e ao mesmo tempo, misturando-se as fezes primeiro com solução fisiológica e depois com a solução de iodo. O esfregaço de solução fisiológica mostrará trofozoítos e cistos de protozoários, mais todos os ovos e larvas de helmintos. O esfregaço corado com iodo não mostra trofozoítos, porque eles são destruídos pelo iodo, a menos que a amostra tenha sido fixada previamente. A principal vantagem da coloração com iodo é permitir melhor visualização de algumas características morfológicas dos cistos. A solução fisiológica mostra movimento dos trofozoítos, o que é útil para sua identificação. Para preparar montagens úmidas a partir de material fixado com formalina, mistura-se bem o conteúdo e coloca-se uma gota diretamente na lâmina, mais uma de solução de iodo.

O exame do esfregaço de solução fisiológica é feito primeiro sob aumento médio (objetiva de 10×). Começando no canto superior esquerdo da lamínula, move-se a lâmina horizontalmente da direita para a esquerda. Repete-se a operação até que todos os 22 m^2 da lamínula tenham sido examinados. Todos os ovos ou larvas de helmintos e todos os cistos de protozoários devem ser observados. O exame com objetivo de grande aumento é feito em seguida, para a detecção e a identificação de protozoários, observando-se aleatoriamente por cerca de 5 a 10 minutos cada preparação.

A técnica de concentração, que pode ser feita com amostras frescas e fixadas, é particularmente útil porque permite a detecção de organismos presentes em pequenos números. O método ideal para a avaliação rotineira é a concentração em formalina com éter, que pode ser feita com segurança usando-se acetato etílico ou formalina Hemo-de, em vez de dietiléter. O esfregaço fecal corado de forma permanente para o diagnóstico de infecção com protozoários intestinais é considerado o padrão de boa prática na América do Norte pelos laboratórios clínicos. Esfregaços para coloração são preparados espalhando-se uma camada fina de fezes frescas bem misturadas ou conservadas em PVA pela metade da superfície de uma lâmina de microscopia com um aplicador de madeira achatado. Esfregaços de fezes frescas são fixados em solução de Schaudinn antes de secarem e serem corados. Certos parasitas intestinais – *Cryptosporidium*, microsporídios e *Cyclospora* – requerem colorações especiais para serem detectados, conforme discutido no Capítulo 61.

Lesões cutâneas e subcutâneas

Vesículas, bolhas e pústulas

Coleta e transporte da amostra

O líquido é a melhor amostra e pode ser coletado de uma vesícula ou bolha aspirando-se com agulha montada em seringa, retirando-se a agulha, tapando a seringa e levando-a para o laboratório. Se for desejada cultura viral, inocula-se uma parte do líquido no meio de transporte M4. Também é possível obter amostras de vesículas e bolhas rompendo-as e esfregando vigorosamente um *swab* em sua base, para ser submetido a exame. Amostras de pústulas são obtidas de forma semelhante com um *swab*, após remoção do material da crosta. Devem ser coletados no mínimo dois *swabs*, um para cultura e outro para a preparação de esfregaços para coloração. Todavia, caso seja solicitada a detecção de mais de um grupo de organismos (p. ex., vírus e bactérias, ou bactérias e fungos), o ideal é coletar pelo menos três amostras com *swab*. Ante a suspeita de infecção viral, deve-se preparar um esfregaço com a amostra colhida individualmente à beira do leito do paciente, passando-se toda a superfície do *swab* sobre uma lâmina de microscopia com um movimento giratório e deixando secar ao ar.

Todos os *swabs* para exame bacteriano ou fúngico podem ser colocados em sistemas de transporte de tubo contendo meio modificado de Stuart; se for solicitada cultura anaeróbia, coloca-se um *swab* em dispositivo de transporte anaeróbio. Amostras em esfregaços, líquidas e *swabs* devem ser levadas imediatamente para o laboratório.

Processamento da amostra

O processamento de amostras de vesículas ou pústulas para a detecção de vírus envolve cultura celular e, para o vírus varicela zóster, e possivelmente o HSV, o exame de esfregaços corados também é útil. Amostras para cultura são refrigeradas por pouco tempo até serem processadas. Amostras de *swabs* recebidas em meio de transporte viral são agitadas vigorosamente em um misturador, e então o *swab* é removido e descartado. O processamento de amostras para a detecção de bactérias e/ou fungos envolve a preparação de um esfregaço para coloração de Gram (no caso de bactérias) ou calcoflúor branco (no caso de fungos) e inoculação em meios apropriados para cultura, conforme discutidos nos Capítulos 56 e 60.

Úlceras cutâneas

Amostras de aspirados e *swabs* são coletadas de úlceras cutâneas para estudos microbiológicos. As lesões podem ser primárias (p. ex., aquelas causadas por vírus, *Bacillus anthracis*, *C. diphtheriae*, *Francisella tularensis*, *P. aeruginosa*, micobactérias ou fungos) ou úlceras de decúbito podem ser colonizadas secundariamente ou infectadas com bactérias aeróbias e anaeróbias.

A coleta, o transporte e o processamento de amostras obtidas com *swab* de úlceras cutâneas para a detecção de vírus são idênticos aos descritos anteriormente para vesículas e pústulas. A manipulação de amostras obtidas de úlceras cutâneas difere para bactérias e fungos, sendo discutida separadamente para cada um desses organismos que causam lesões primárias e para as bactérias associadas a úlceras crônicas.

O *B. anthracis* causa o antraz, uma doença rara nos EUA, limitada a pessoas que trabalham com lã crua importada e outros produtos de origem animal contaminados com esporos desse bacilo, bem como aquelas expostas aos esporos por algum ato de bioterrorismo. O antraz cutâneo começa como uma pápula indolor que se torna vesicular, em seguida hemorrágica, necrótica e coberta por uma escara. Para o diagnóstico ótimo, são coletadas duas amostras com *swab* do exsudato: uma para cultura e outra para a preparação de esfregaços corados pelo Gram e com anticorpos fluorescentes (o último deve se feito em um laboratório de referência). Em razão da natureza perigosa do *B. anthracis*, deve-se considerar o envio das amostras de pessoas com suspeita da doença para um laboratório de referência. Caso as amostras sejam processadas em um laboratório clínico, devem ser manipuladas em uma cabine de segurança biológica. O *swab* para cultura é inoculado em ágar-sangue de carneiro, que é incubado em ar ambiente.

O *C. diphteriae* é a causa da difteria cutânea, uma lesão ulcerativa coberta por uma camada de restos necróticos que lembram uma membrana. Para o diagnóstico ótimo, prepara-se um esfregaço corado com azul de metileno a partir de material coletado da margem da membrana, colhendo-se ainda duas amostras da membrana. Usa-se um *swab* para cultura bacteriana rotineira e o outro para inoculação em meios seletivos para *C. diphteriae* (p. ex., ágar com telurita e cisteína), se disponíveis.

A ectima gangrenosa é uma lesão cutânea ulcerativa que quase sempre ocorre durante bacteriemia com *P. aeruginosa*, mas raramente desenvolve-se durante bacteriemia com bacilos Gram-negativos. O ideal é coletar duas amostras com *swab* da base da úlcera, uma para preparar um esfregaço a ser corado pelo Gram e a outra para ser inoculada em meios de cultura.

O diagnóstico da forma ulceroglandular da tularemia requer a coleta de uma amostra com *swab* do material da base da úlcera. O *swab* é processado para cultura bacteriana de rotina e as placas são mantidas por um total de 7 dias, pois a *F. tularensis* é uma bactéria de crescimento lento, que produz colônias do tamanho de cabeças de alfinete em 3 a 5 dias no ágar chocolate, mas não cresce em ágar-sangue de carneiro. Os isolados suspeitos devem ser encaminhados imediatamente para o laboratório de saúde pública mais próximo, para identificação.

As micobactérias que podem ser isoladas de úlceras cutâneas incluem *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium ulcerans* e incomumente *M. tuberculosis*, complexo do *M. avium* e *Mycobacterium kansasii*. O exsudato aspirado com agulha montada em seringa ou uma amostra de tecido são ideais para a recuperação de micobactérias. Para transportar o aspirado, o material é expelido em um tubo estéril bem tampado, que é liberado imediatamente para o laboratório. Amostras de tecidos são colocadas em gaze umedecida estéril, em um recipiente também estéril bem fechado. Amostras de *swabs* não são aceitáveis para processamento para micobactérias, pois estas ficam aprisionadas nas fibras do *swab* e é difícil desalojá-las. As amostras devem ser refrigeradas por pouco tempo até serem processadas (ver Cap. 59).

Muitas bactérias aeróbias, facultativas e anaeróbias colonizam úlceras cutâneas crônicas. Para identificar os organismos responsáveis, culturas de tecidos profundos ou um aspirado profundo de material purulento, coletado com agulha montada em seringa, proporciona a informação bacteriológica mais útil. Para transportar pus aspirado, remove-se e descarta-se a agulha, veda-se a seringa e ela é levada imediatamente para o laboratório. Se houver demora no transporte, injeta-se uma parte do aspirado em um tubo de transporte anaeróbio com gel. Amostras de tecido são transportadas em frasco estéril com gaze estéril úmida para impedir o ressecamento do tecido. O pro-

cessamento da amostra envolve a preparação de um esfregaço para coloração de Gram e inoculação nos meios apropriados para cultura aeróbia e anaeróbica.

Um aspirado do exsudato da margem ativa de uma úlcera (transportado como descrito anteriormente para bactérias) ou uma amostra de tecido são ideais para a detecção de fungos. Uma amostra de *swab* do exsudato é subótima e sua coleta não deve ser estimulada. O processamento da amostra para a detecção de fungos envolve a preparação de um esfregaço para exame microscópico direto (preparação com hidróxido de potássio ou calcoflúor branco) e a inoculação em meios apropriados de cultura, como infusão de cérebro e coração, inibitórios de mofos ou ágar SABHI contendo antibióticos e ciclo-heximida.

Infecções de feridas e abscessos

O ideal é que o material purulento seja aspirado com uma agulha montada em seringa e transportado conforme descrito anteriormente para lesões ulcerativas. Caso não se possa obter um aspirado, amostras de *swab* do exsudato coletadas de uma parte profunda da lesão são aceitáveis. Para cultura bacteriana rotineira, o ideal é coletar dois *swabs*: um para a preparação de um esfregaço para coloração de Gram e outro para cultura. Para recuperar anaeróbios, é preciso coletar mais um *swab* e colocá-lo em um meio de transporte anaeróbico. Todas as amostras devem ser liberadas imediatamente para o laboratório e processadas assim que seja possível. Se for inevitável algum atraso no processamento, as amostras podem ser guardadas no refrigerador, exceto aquelas para recuperação de anaeróbios, que devem ser mantidas à temperatura ambiente.

Referências bibliográficas

Albright RE Jr, Christenson RH, Emlet JL, et al: Issues in cerebrospinal fluid management. CSF Venereal Disease Research Laboratory Testing. Am J Clin Pathol 1991a; 95:397.

Albright RE Jr, Graham CB III, Christenson RH, et al: Issues in cerebrospinal fluid management. Acid-fast bacillus smear and culture. Am J Clin Pathol 1991b; 95:418.

Bannatyne RM, Jackson MC, Memish S: Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. J Clin Microbiol 1997; 35:2673.

Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (eds): Microorganisms encountered in the urinary tract. *In* Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9th ed. St Louis, MO, CV Mosby, 1994.

Baselski VS, Wunderink RG: Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. Clin Microbiol Rev 1994; 7:533

Bhisitkul DM, Hogan AE, Tanz RR: The role of bacterial antigen detection tests in the diagnosis of bacterial meningitis. Pediatr Emerg Care 1994; 10:67.

Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney Jr. JM, et al: Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Clin Infect Dis 2002; 35:113–125.

Revisão das vantagens e limitações dos diferentes testes para o diagnóstico de faringite estreptocócica do grupo A. Também fornece orientações para o tratamento da faringite estreptocócica do grupo A.

Briselden AM, Hillier SL: Evaluation of Affirm VP microbial identification test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1994; 32:148–152.

Brumback BG, Bolejack SN, Morris MV, et al: Comparison of culture and the antigenemia assay for detection of cytomegalovirus in blood specimens submitted to a reference laboratory. J Clin Microbiol 1997; 35:1819.

Carroll KC: Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. J Clin Microbiol 2002; 40:3115–3120.

Revisão dos testes microbiológicos para o diagnóstico de infecções do trato respiratório inferior, incluindo bronquite aguda, pneumonia adquirida na comunidade e pneumonia nosocomial.

Christensen ML: Human viral gastroenteritis. Clin Microbiol Rev 1989; 2:51.

Cloud JL, Shutt C, Aldous W, et al: Evaluation of a modified Gen-Probe Amplified Direct Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2004; 42:5341.

Cockerill III FR, Wilson JW, Vetter EA, et al: Optimal testing parameters for blood cultures. Clin Infect Dis 2004; 38:1724–1730.

Fornece dados sobre os parâmetros ideais de teste para hemoculturas quando são usados sistemas automatizados para fazê-las.

Dagan R, Menegus MA: A combination of four cell types for rapid detection of enterovirus in clinical specimens. J Med Virol 1986; 19:219.

Dawson MS, Harford AM, Garner BK, et al: Total volume culture technique for the isolation of microorganisms from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with peritonitis. J Clin Microbiol 22:391, 1985.

Fedorko DP, Engler HD, O'Shaughnessy EM, et al: Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. J Clin Microbiol 1999; 37:3044.

Flayhart D, Lema C, Borek A, Carroll KC: Comparison of the bbl chromagar staph aureus Agar Medium to Conventional Media for Detection of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples. J Clin Microbiol 2004; 42:3566–3569.

Friedman RL: Pertussis: The disease and new diagnostic methods. Clin Microbiol Rev 1988; 1:365.

Gavin PJ, Peterson LR, Pasquariello AC, et al: Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT Shiga toxin *Escherichia coli* microplate assay for detection of Shiga toxin-producing *E. coli* in stool samples. J Clin Microbiol 2004; 42:1652–1656.

Gerber MA, Shulman ST: Rapid diagnosis of pharyngitis caused by group A streptococci. Clin Microbiol Rev 2004; 17:571–580.

Revisão em profundidade das vantagens e limitações dos testes rápidos para o diagnóstico de faringe estreptocócica do grupo A. Também discute as possíveis razões para resultados falso-positivos e falso-negativos, bem como a relação custo-eficácia do uso desses testes.

Gilligan PH: Endotracheal aspirates: to screen or not to screen, is that even the question? Clin Microbiol Newslett 1999; 21:44.

Havlik D, Woods GL: Screening sputum specimens submitted for mycobacterial culture. Lab Med 1995; 26:411.

Heelan JS, Corpus L, Kessimian N: False-positive reactions in the latex agglutination test for *Cryptococcus neoformans* antigen. J Clin Microbiol 1991; 29:1260.

Herrmann B, Larsson VC, Rubin CJ, et al: Comparison of a duplex quantitative real-time PCR assay and the COBAS Amplicor CMV Monitor test for detection of cytomegalovirus. J Clin Microbiol 2004; 42:1909–1914.

Howell CL, Miller MJ, Martin WJ: Comparison of rates of virus isolation from leukocyte populations separated from blood by conventional and Ficoll-Paque/Macrodex methods. J Clin Microbiol 1979; 10:533.

Ilstrup DM, Washington JA II: The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia. Diagn Microbiol Infect Dis 1983; 1:107.

Ingram JG, Plouffe JF: Danger of sputum purulence screen in culture of *Legionella* species. J Clin Microbiol 1994; 32:209.

Jacques J, Carquin J, Brodard V, et al: New reverse transcription-PCR assay for rapid and sensitive detection of Enterovirus genomes in cerebrospinal fluid specimens of patients with aseptic meningitis. J Clin Microbiol 2003; 41:5726–5728.

Kahn FW, Jones JM: Diagnosing bacterial respiratory infection by bronchoalveolar lavage. J Infect Dis 1987; 155:862.

Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD, et al: Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. J Clin Microbiol 2004; 42:1498–1504.

Kass EH: Asymptomatic infections of the urinary tract. Trans Assoc Am Physicians 1956; 69:56.

Kiska DL, Jones MC, Mangum ME, et al: Quality assurance study of bacterial antigen testing of cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1995; 33:1141.

Krumholz HM, Cummings S, York M: Blood culture phlebotomy: switching needles does not prevent contamination. Ann Intern Med 1990; 113:290.

Lai KK, Cook L, Wendt S, et al: Evaluation of real-time PCR versus PCR with liquid-phase hybridization for detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2003; 41:3133–3141.

Lakeman FD, Whitley RJ: Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Disease Collaborative Antiviral Study Group. J Infect Dis 1995; 171:857–863.

Lipsky BA, Innuni TS, Plorde JJ, et al: Is the clean-catch midstream void procedure necessary for obtaining urine culture specimens from men? Am J Med 1984; 76:257.

Luce E, Nakagawa D, Lovell J, et al: Improvement in the bacteriologic diagnosis of peritonitis with the use of blood culture media. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1982; 28:259.

Lyerly DM, Neville LH, Evans T, et al: Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B test. J Clin Microbiol 1998; 36:184.

McCarter YS, Robinson A: Quality evaluation of sputum specimens for mycobacterial culture. Am J Clin Pathol 1996; 105:769.

Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, et al: Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. Clin Infect Dis 2003; 37:1405–1433.

Orientações desenvolvidas pela Infectious Diseases Society of America para o tratamento de pneumonia adquirida na comunidade em adultos. Também fornece recomendações a respeito dos testes diagnósticos.

Martinez AJ, Visvesvara GS: Diagnosis of pathogenic free-living amebas. Clin Lab Med 1991; 11:861.

Maxson S, Lewno MJ, Schutze GE: Clinical usefulness of cerebrospinal fluid bacterial antigen studies. J Pediatr 1994; 125:235.

Merz CS, Kramer C, Forman M, et al: Comparison of four commercially available rapid enzyme immunoassays with cytotoxin assay for detection of *Clostridium difficile* toxin(s) from stool specimens. J Clin Microbiol 1994; 32:1142.

Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT: Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. Transplantation 2004; 77:1692–1698.

Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, et al: Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:2873–2877.

Montessori GA, Bischoff L: Searching for parasites in stool: Once is usually enough. Can Med Assoc J 1987; 137:702.

Morris AJ, Tanner DC, Reller LB: Rejection criteria for endotracheal aspirates from adults. J Clin Microbiol 1993; 31(5) 1027-1029.

Murray PR, Spizzo AW, Niles AC: Clinical comparison of the recoveries of bloodstream pathogens in Septi-Chek brain heart infusion broth with saponin, Septi-Chek tryptic soy broth, and the Isolator lysis-centrifugation system. J Clin Microbiol 1991; 29:901.

Murray PR, Traynor P, Hopson D: Clinical assessment of blood culture techniques: analysis of recovery of obligate and facultative anaerobes, strict aerobic bacteria, and fungi in aerobic and anaerobic blood culture bottles. J Clin Microbiol 1992; 30:1462.

Murray PR, Washington JA II: Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. Mayo Clin Proc 1975; 50:339.

Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, et al: Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). J Clin Microbiol 1993; 31:552.

Perkins MD, Mirrett S, Reller LB: Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J Clin Microbiol 1995; 33:1486.

Peters CS, Hernandez L, Sheffield N, et al: Cost containment of formalin-preserved stool specimens for ova and parasites from outpatients. J Clin Microbiol 1988; 26:1584.

Pezzlo M: Detection of urinary tract infections by rapid methods. Clin Microbiol Rev 1988; 1:268.

Prather SL, Dagan R, Jenista JA, et al: The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. J Med Virol 1984; 14:221.

Proctor EM: Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Lab Med 1991; 11:829.

Pulz M, Matussek A, Monazahian M, et al: Comparison of a Shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. J Clin Microbiol 2003; 41:4671–4675.

Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP: Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10:444.

Reisner BS, Woods GL: Times to detection of bacteria and yeasts in BACTEC 9240 blood culture bottles. J Clin Microbiol 1999; 37:2024–2026.

Rippin KP, Stinson WC, Eisenstadt J, Washington JA: Clinical evaluation of the slide centrifuge (Cytospin) Gram's stained smear for the detection of bacteriuria and comparison with the FiltraCheck-UTI and UTIscreen. Am J Clin Pathol 1995; 103:316–319.

Semeniuk H, Church D: Evaluation of the leukocyte esterase and nitrite urine dipstick screening tests for detection of bacteriuria in women with suspected uncomplicated urinary tract infections. J Clin Microbiol 1999; 37:3051–3052.

Sharp SE. Routine anaerobic blood cultures: still appropriate today? Clin Microbiol Newslett 1991; 13:179.

Shaw KN, McGowan KL: Evaluation of a rapid screening filter test for urinary tract infection in children. Pediatr Infect Dis J 1997; 16:283.

Shaw KN, McGowan KL, Gorelick MH, Schwartz JS: Screening for urinary tract infection in infants in the Emergency Department: Which test is best? Pediatrics 1998; 101(6):E1.

Siegel DL, Edelstein PH, Nachamkin I: Inappropriate testing for diarrheal diseases in the hospital. JAMA 1990; 263:979.

Stamm WE, Counts GW, Running KR, et al: Diagnosis of coliform infection in acute dysuric women. N Engl J Med 1982; 307:463.

Storch GA, Gaudreault-Keener M, Welby PC: Comparison of heparin and EDTA transport tubes for detection of cytomegalovirus in leukocytes by shell vial assay, pp65 antigenemia assay, and PCR. Clin Microbiol 1994; 32:2581.

Thiele GM, Woods GL: The effect of dexamethasone on detection of cytomegalovirus in tissue culture and by immunofluorescence. J Virol Methods 1988; 22:319.

Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. J Clin Microbiol 1990; 28:1608.

Towns ML, Reller LB: Diagnostic methods; current best practices and guidelines for isolation of bacteria and fungi in infective endocarditis. Infect Dis Clin North Am 2002; 16:363–376.

Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, et al: Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. J Clin Microbiol 2003; 41:667–670.

Van Der Bij W, Torensma R, van Son WJ, et al: Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. J Med Virol 1988; 25:179.

Waite R, Woods GL: Evaluation of BACTEC Myco/F lytic medium for recovery of mycobacteria and fungi from blood. J Clin Microbiol 1998; 36:1176.

Washington JA II, Ilstrup DM: Blood cultures: Issues and controversies. Rev Infect Dis 1986; 8:792.

Whittier S, Shapiro DS, Kelly WS, et al: Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diseases. J Clin Microbiol 1993; 31:2861.

Wilkins TD, Lyerly DM: *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003; 41:531–534.

Revisões dos testes atualmente disponíveis para o diagnóstico de doenças associadas ao C. difficile*, com ênfase nos ensaios imunossorventes ligados a enzima para detecção de toxina(s).*

Wilson ML: Continuously monitoring blood culture systems: an update. American Society of Clinical Pathologists (ASCP) Check Sample 1996; 39:129.

Wolfson JS, Waldron MA, Sierra LS: Blinded comparison of a direct immunofluorescent monoclonal antibody staining method and a Giemsa staining method for identification of *Pneumocystis carinii* in induced sputum and bronchoalveolar lavage specimens of patients infected with human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 1990; 28:2136.

Woods GL: Optimal protocol for processing high-volume and Peds Plus™ blood cultures by the BACTEC NR860™. Am J Clin Pathol 1994; 101:162.

Woods GL, Proffitt MR: Comparison of plasmagel with LeucoPREP™-Macrodex methods for separation of leukocytes for virus isolation. Diagn Microbiol Infect Dis 1987a; 8:123.

Woods GL, Thompson AB, Rennard SL, et al: Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens: spin amplification and staining with a monoclonal antibody to the early nuclear antigen for diagnosis of cytomegalovirus pneumonia. Chest 1990; 98:568.

Woods GL, Young A, Johnson A, et al: Detection of cytomegalovirus by 24-well plate centrifugation assay using a monoclonal antibody to an early nuclear antigen and by conventional cell culture. J Virol Methods 1987b; 18:207.

Zwadyk P, Pierson CL, Young C: Comparison of Difco ESP and Organon Teknika BacT/Alert continuous-monitoring blood culture systems. J Clin Microbiol 1994; 32:1273.

CAPÍTULO 64

Bioterrorismo: microbiologia

Judy A. Daly PhD

Agentes infecciosos como ferramentas de desastres em massa 1368
Guerra biológica *versus* bioterrorismo 1368
O conceito de "bioterrorismo" 1369
Ameaça de potenciais armas biológicas: depósitos e fontes 1370
A ameaça das armas biológicas 1370
Componentes 1370
Tipos de ataques bioterroristas 1370
Agentes de ataques bioterroristas 1370
Laboratory Response Network para bioterrorismo 1372
Classificação dos laboratórios integrantes da LRN 1372
A responsabilidade do laboratório clínico 1373
Diretrizes para expedição e manuseio de materiais infecciosos 1373
Potenciais agentes de bioterrorismo 1373
Bacillus anthracis 1373
Espécies de *Brucella* 1374
Burkholderia mallei e *Burkholderia pseudomallei* 1376
Coxiella burnetii 1378
Francisella tularensis 1380
Vírus desconhecidos 1382
Yersinia pestis 1384
Referências bibliográficas 1388

PONTOS-CHAVE

- Aceitar a natureza como reservatório e fonte constante de agentes infecciosos situa a prevenção ao bioterrorismo em um contexto mais apropriado de preparo contra agentes causadores de infecção.
- A *Laboratory Response Network* (LRN) consiste em um consórcio e uma parceria estabelecidos entre laboratórios que, de forma imediata e sustentada, fornecem testes laboratoriais e comunicação para dar apoio a emergências de saúde pública, particularmente na resposta aos atos de bioterrorismo.
- Os laboratórios clínicos (laboratórios-sentinela) exercem papel crítico na LRN: seu nível de alerta aumentado para a possibilidade de isolar agentes de bioterrorismo a partir de amostras de pacientes e encaminhamento de isolados suspeitos aos laboratórios de referência da saúde pública é crucial.
- Regulamentações nacionais, internacionais e comerciais determinam as regras para embalo adequado, documentação e expedição segura de mercadorias perigosas com o objetivo de proteger o público, os funcionários de companhias aéreas, os mensageiros e outros indivíduos que trabalham em empresas de expedição comerciais, bem como aqueles que manuseiam esses produtos no decorrer dos vários segmentos do processo de expedição.
- Com base na facilidade da transmissão, na severidade da morbidade, na mortalidade e na probabilidade de seu uso, os agentes biológicos podem ser classificados em 3 categorias (Tab. 64.3).
- Os laboratórios-sentinela são laboratórios clínicos que seguem as normas de biossegurança de nível 2 (BSL-2). Sua principal responsabilidade consiste em reconhecer e excluir ou encaminhar agentes suspeitos conforme as diretrizes-padrão estabelecidas para laboratórios-sentinela.

Agentes infecciosos como ferramentas de desastres em massa

Aceitar a natureza como reservatório e fonte constante de agentes infecciosos situa a prevenção ao bioterrorismo em um contexto mais apropriado de preparo contra agentes causadores de infecção. Por sua própria natureza, os agentes infecciosos são capazes de se disseminar rapidamente. Esforços conduzidos no passado e no presente pela Organização Mundial da Saúde, bem como por diversas agências norte-americanas, com o objetivo de fortalecer a prevenção global na defesa contra a ameaça das doenças infecciosas, representam uma parte integrante da prevenção ao bioterrorismo. Os agentes causadores de infecção sempre foram – e continuarão sendo em um futuro previsível – potenciais ferramentas de desastres em massa. Historicamente, os surtos de ataques (guerras) de espécies microbianas contra a espécie humana têm gerado um número consideravelmente maior de mortes que a própria guerra. São exemplos: a morte de 95% das populações nativas americanas pré-colombianas, em decorrência de doenças como varíola, sarampo, peste, febre tifoide e influenza; a morte de 25 milhões de europeus (1/4 da população) causada pela peste bubônica no século XIV; e a morte de 21 milhões de pessoas em consequência da pandemia de influenza ocorrida em 1918 e 1919 (Diamond, 1999). Avanços na área da saúde pública, no diagnóstico e nas intervenções farmacológicas se fazem necessários para garantir a proteção da população contra doenças infecciosas emergentes e reemergentes, incluindo aquelas relacionadas a potenciais eventos de bioterrorismo.

Guerra biológica *versus* bioterrorismo

É importante reconhecer que os agentes biológicos têm sido utilizados em guerras desde a antiguidade até hoje. O uso intencional de organismos vivos ou materiais infectados derivados desses organismos é uma realidade que tem atravessado os séculos em tempos de guerra e "paz", pela ação de exércitos, países, grupos e indivíduos (Christopher, 1997; Eitzen, 1997; Tucker, 1999; Beeching, 2002). O uso de catapultas durante a era medieval introduziu novas tecnologias à guerra biológica. Em 1346, as forças tártaras atacantes sofreram uma epidemia de peste durante o sítio à Kaffa. Utilizando catapultas, os tártaros lançaram os cadáveres de seus mortos dentro da cidade com o intuito de iniciar uma epidemia de peste. De fato, houve um surto da doença que foi sucedido pela rendição das forças de defesa e a conquista de Kaffa.

Em 1763, a introdução de uma doença específica – varíola – como arma nas guerras contra índios norte-americanos se transformou em um marco importante da história da guerra biológica. Isso foi feito entregando-se aos nativos americanos cobertores e um lenço contaminados com a varíola oriundos do hospital. Durante a I Guerra Mundial, a Alemanha foi acusada de causar cólera na Itália e, em 1915, peste em St. Petersburg.

O desenvolvimento da moderna era das armas biológicas teve início imediatamente antes e durante a II Guerra Mundial (Tab. 64.1). O programa Allied Biological Weapons (Armas Biológicas Aliadas), que consistia na pesquisa britânica sobre o antraz (e no desenvolvimento de uma arma de retaliação da II Guerra Mundial, à base de bolo de ração de gado com antraz), foi substituído por ampla pesquisa, desenvolvimento e capacidade de produção sediada nos Estados Unidos.

Esse programa ofensivo foi abandonado de forma unilateral em 1969, dando ímpeto à criação da Biological and Toxin Weapons Convention (Convenção sobre Armas Biológicas e Toxinas). Infelizmente, o número de países engajados na experimentação de armas biológicas cresceu de 4, em 1960, para 11, na década de 1990. Estima-se que ao menos 10 nações (e possivelmente 17) possuam agentes de guerra biológica.

O conceito de "bioterrorismo"

À medida que o cultivo de microrganismos se tornou mais fácil e a tecnologia foi barateada, grupos de dissidentes e organizações bem financiadas passaram a utilizar esses agentes para aterrorizar civis e, assim, atingir metas políticas. A Tabela 64.2 lista exemplos dessas tentativas.

Tabela 64.1 Cronologia das ações de biodefesa nos EUA

Décadas de 1910 e 1920	Armas químicas e biológicas foram utilizadas pela primeira vez em combate, dando origem aos esforços para banir seu uso.
1925	O uso de armas biológicas e químicas em guerras foi proibido pelo Protocolo de Genebra. Os Estados Unidos assinaram o documento, mas falharam em ratificar o acordo, que não contava com nenhuma provisão para fins de verificação e inspeção.
Décadas de 1950 a 1970	A União Soviética e os Estados Unidos construíram arsenais de armas biológicas e químicas. Pressões internacionais foram feitas para elaborar novos tratados com o objetivo de refrear esse tipo de armamento.
25 de novembro de 1969	O presidente Richard Nixon renunciou unilateralmente ao uso de armas biológicas na guerra pelos Estados Unidos, bem como restringiu as pesquisas a esforços voltados para imunização e segurança. Três meses mais tarde, ele estendeu a proibição oficial para incluir as toxinas. Foi criado o United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases (USARMIID), em Fort Detrick, MD, para conduzir pesquisas não classificadas na área de segurança contra potenciais agentes de bioterrorismo.
1972	Em 10 de abril de 1972, foi aberta uma convenção que tratava da proibição ao desenvolvimento, à produção e à estocagem de armas bacteriológicas (biológicas) e à base de toxinas, bem como da destruição desse armamento, para assinatura em Washington, Londres e Moscou.
1975	Em 22 de janeiro de 1975, o Congresso norte-americano ratificou a Biological and Toxin Weapons Convention (BWC), bem como o Protocolo de Genebra de 1925. A Convenção entrou em vigor em 26 de março de 1975 (atualmente, 143 Estados integram a Convenção, e há mais 18 assinaturas adicionais. O artigo VI da Convenção mostrou-se inadequado como mecanismo de ações dirigidas contra os casos de não cumprimento do acordo).
Década de 1980	As iniciativas de controle por parte das Forças Armadas não conseguiram refrear a proliferação das armas biológicas e químicas.
1984	Na Conferência sobre Desarmamento de Genebra, a administração do presidente Reagan apresentou um projeto de tratado para banir a produção e o armazenamento de armas químicas.
Década de 1990	As preocupações referentes à exposição às armas químicas e biológicas ocorridas durante a Guerra do Golfo Pérsico deram maior sustentação aos tratados internacionais.
13 de maio de 1991	Logo após a vitória dos aliados contra o Iraque, o presidente George Bush anunciou que os Estados Unidos renunciariam ao uso de armas químicas por qualquer motivo – e um tratado internacional que bania esse armamento produziu efeitos.
Abril de 1992	O presidente russo Boris Yeltsin declarou que o programa de armas biológicas da Rússia estava sendo suspenso.
Janeiro de 1993	O presidente George Bush assinou o Tratado de Armas Químicas na convenção que baniu a produção e o uso de armas químicas.
07 de janeiro de 1997	O Presidential Advisory Committee of Gulf War Veterans' Illnesses não encontrou evidências conclusivas relacionando a síndrome da Guerra do Golfo às armas químicas ou biológicas.
15 de abril de 1997	Novas regulamentações destinadas a limitar o acesso a substâncias químicas e patógenos com potencial de serem transformados em armas entraram em vigor com o Antiterrorism and Effective Death Penalty Act, de 1996.
29 de abril de 1997	A Chemical Weapons Convention (CWC) entrou em vigor. Essa convenção conta com mais de 160 assinaturas e 65 ratificações.
25 de julho de 2001	Os Estados Unidos rejeitaram um protocolo para fortalecer a Biological Weapons Convention (BWC), bem como toda a sua abordagem. Assim como na CWC, um forte protocolo relativo às bioarmas poderia ajudar a deter o uso desse armamento, que constitui ameaça bem pior que as armas químicas.
19 de novembro de 2001	Foi realizada a V BWC Review Conference.

Tabela 64.2 Exemplos de bioterrorismo

- O desertor bulgariano Georgi Markov foi assassinado em Londres, Reino Unido (1978), com pastilhas cheias de ricina e um dispositivo acionado por mola disfarçado em um guarda-chuva. Um dispositivo semelhante foi utilizado contra um segundo desertor, na mesma região, porém sem sucesso.
- Sverdlovsk, Rússia (1979): a liberação acidental de antraz a partir de instalações de bioarmamento soviéticas causou uma epidemia de antraz inalatório em que foram contabilizados pelo menos 77 casos e 60 mortos.
- Rajneeshee Cult (1984): um culto religioso indiano liderado por Rajneeshee conspirou para contaminar saladas de restaurantes em Dalles, OR, com *Salmonella typhimurium*. A motivação era incapacitar os eleitores, vencer as eleições locais e apoderar-se do controle político do condado. O incidente resultou em um grande surto de salmonelose na comunidade, envolvendo 751 pacientes e pelo menos 45 casos de hospitalização. O plano foi revelado quando o culto entrou em colapso e seus membros se transformaram em informantes.
- Aum Shinrikyo (1995): um culto apocalíptico da nova era, na busca por estabelecer um estado teocrático no Japão, tentou no mínimo 10 vezes usar antraz, toxina botulínica, agente da febre Q e vírus Ebola em forma de aerossol. Todas as tentativas com armas biológicas falharam. Foram conduzidos múltiplos ataques com as armas químicas Sarin e o cianeto de hidrogênio em Matsumato, Tóquio, além de campanhas de assassinato. O gás dos nervos (Sarin) matou 12 vítimas e feriu 5.500 pessoas no metrô de Tóquio.
- Texas (1997): contaminação intencional de bolinhos e rosquinhas com culturas de laboratório de *Shigella dysenteriae*. Como resultado, 45 funcionários de laboratório desenvolveram gastroenterite e houve 4 casos de internação.
- Grupo de indivíduos desconhecido (2001): disseminação intencional de esporos do antraz pelo sistema de correios dos EUA causou a morte de 5 pessoas, infecção de outras 22 e contaminação de vários edifícios do governo. As investigações sobre o ataque foram inconclusivas.

Apesar de não atingirem níveis de segurança nacional ou internacional, os ataques desse tipo produzem consequências significativas para a saúde pública e, portanto, requerem prontidão local. Uma vigilância ativa e a rápida resposta local atenderão à definição de prontidão contra o bioterrorismo – "pensar localmente, agir globalmente".

Nações e grupos de dissidentes têm acesso às habilidades necessárias para cultivar seletivamente alguns dos patógenos mais perigosos que existem e usá-los como agentes de terrorismo e guerra biológica (Henderson, 1998). O culto japonês Aum Shinrikyo, que liberou gás dos nervos (Sarin) no metrô de Tóquio, também planejava ataques de bioterrorismo (Daplan, 1996). Em seu poder, havia grandes quantidades de meios nutritivos, toxina botulínica e culturas de antraz, além das aeronaves equipadas com tanques de pulverização que levantaram voo. Membros desse grupo haviam viajado para o Zaire, em 1992, para obter amostras de vírus Ebola. O Aum Shinrikyo exemplifica uma organização bem financiada que tentou desenvolver a capacidade das armas biológicas. Acredita-se que organizações desse tipo sejam capazes de causar os piores danos, pois têm acesso ao conhecimento científico, aos agentes biológicos e, sobretudo, à tecnologia de disseminação.

É preocupante o *status* de uma das maiores e mais sofisticadas instalações outrora produtoras de armas biológicas da Rússia, conhecida como Vector, localizada em Koltsovo, Novosibirsk. Esse estabelecimento abrigava o vírus da varíola, além de trabalhar com os vírus Ebola, Marburg e da febre hemorrágica (p. ex., Machupo e Crimeia-Congo) (Henderson, 1998). Uma visita realizada em 1997 encontrou o local esvaziado pela metade e protegido por poucos vigias. Ainda não se sabe para onde fugiram os cientistas que lá trabalhavam. Há dúvidas de que esse seja o único sítio de armazenamento de varíola fora dos Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

A ameaça das armas biológicas

Componentes

Um sistema de armas biológicas é constituído por 4 componentes: carga útil, munições, sistema de distribuição e sistema de dispersão. A carga útil é o próprio agente biológico. A munição protege e transporta a carga útil, preservando sua potência durante a distribuição. O sistema de distribuição pode ser um míssil, um veículo (aeronave, barco, carro ou caminhão) ou um bombardeio de artilharia. O sistema de dispersão garante a disseminação da carga útil no sítio-alvo.

Para que uma arma biológica seja muito efetiva, é necessário otimizar certas condições. O agente biológico deve produzir o efeito desejado – de morte ou doença – de maneira consistente. Esse agente deve ser muito contagioso em um curto e previsível período de incubação, bem como infeccioso a baixas doses. A doença deve ser difícil identificar e de levantar suspeita de um ato de bioterrorismo. Os agentes devem ser convenientes em termos de produção em massa, armazenamento e transformação em arma, além de permanecerem estáveis durante a disseminação. A população-alvo deve apresentar pouca ou nenhuma imunidade e pouco ou nenhum acesso ao tratamento. Os terroristas devem contar com meios para proteger ou tratar suas próprias forças e população contra os agentes infecciosos ou toxinas (Beeching, 2002).

Os agentes com potencial para uso no bioterrorismo são patógenos bacterianos, fúngicos e virais, bem como as toxinas produzidas por organismos vivos. Os agentes infecciosos que potencialmente poderiam ser utilizados incluem aqueles causadores do antraz (*Bacillus anthracis*), peste (*Yersinia pestis*), tularemia (*Francisella tularensis*), encefalite equina (p. ex., vírus da encefalite equina venezuelana), febres hemorrágicas (arenavírus, filovírus, flavivírus e buniavírus) e varíola (vírus da varíola). As toxinas incluem a toxina botulínica produzida por *Clostridium botulinum*; toxina ricina produzida pela mamona (*Ricinus communis*); micotoxinas tricotecenos de *Fusarium, Myrotecium, Trichoderma, Stachybotrys* e outros fungos filamentosos; enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*; e toxinas produzidas por organismos marinhos, como dinoflagelados, marisco e algas azul-esverdeadas. Dependendo do agente, o resultado produzido pode ser letal ou incapacitante.

Tipos de ataques bioterroristas

Um ataque de bioterrorismo pode ocorrer de 2 modos: evidente ou oculto. Os ataques com agentes biológicos tendem a ocorrer de modo oculto. O ataque com esse tipo de agente não causa impacto imediato por conta do intervalo existente entre a exposição e o início da doença (i. e., o período de incubação). Portanto, será necessário que as primeiras vítimas de uma ação bioterrorista sejam identificadas por médicos ou outros prestadores de assistência à saúde. Com base na primeira onda de vítimas, os oficiais de saúde pública deverão determinar se trata-se da ocorrência de um ataque, identificar os organismos e evitar novos casos por meio da adoção de estratégias preventivas (p. ex., vacinação em massa, tratamento profilático) e da realização de procedimentos de controle da infecção (Kaufman, 1997). Os indícios de um potencial ataque de bioterrorismo incluem a ocorrência de um surto de doença em área não endêmica, casos de uma doença sazonal fora da estação, detecção de um patógeno com resistência incomum ou características epidemiológicas inusitadas, apresentação clínica ou distribuição etária incomum e detecção de um patógeno geneticamente idêntico que esteja emergindo de maneira rápida em diferentes áreas geográficas (Centers for Disease Control and Prevention, 2000a).

Agentes de ataques bioterroristas

Com base na facilidade da transmissão, na severidade da morbidade, na mortalidade e na probabilidade do uso, os agentes biológicos podem ser classificados em 3 categorias (Tab. 64.3). A Tabela 64.4 resume os agentes biológicos agrupados na categoria A. A Tabela 64.5 apresenta de forma resumida os agentes biológicos pertencentes à categoria B.

Tabela 64.3 Potenciais agentes do bioterrorismo

Categoria A	Categoria B	Categoria C
Variola major (varíola)	*Coxiella burnetti* (febre Q)	Vírus Nipah
Bacillus anthracis (antraz)	Espécies de *Brucella* (brucelose)	Hantavírus
Yersinia pestis (peste)	*Burkholderia mallei* (mormo)	Vírus causadores da febre hemorrágica transmitida por carrapato
Toxina do *Clostridium botulinum* (botulismo)	Alfavírus *Burkholderia pseudomallei* (melioidose): encefalomielite venezuelana; encefalomielite equina ocidental e oriental	Vírus causadores da encefalite transmitida por carrapato
Francisella tularensis (tularemia)	Toxina ricina de *Ricinus communis* (mamona)	Febre amarela
Filovírus; febre hemorrágica por Ebola; febre hemorrágica por Marburg	Toxina ε de *Clostridium perfringens*	Tuberculose multifarmacorresistente
Arenavírus; Lassa (febre de Lassa); Junin (febre hemorrágica argentina) e vírus correlatos	Enterotoxina B estafilocócica	
	Micotoxinas tricotecenos	
	Patógenos transmissíveis por meio dos alimentos e da água, incluindo (sem se limitar a) espécies de *Salmonella*; *Shigella dysenteriae*; *Escherichia coli* (0157:H7); *Vibrio cholerae*; e *Cryptosporidium parvum*	
	Rickettsia prowazekii (febre tifoide)	
	Chlamydia psittaci (psitacose)	

Tabela 64.4 Resumo dos agentes biológicos da categoria A

Agentes	Dose infecciosa	Período de incubação (d)	Mortalidade (%) Sem tratamento	Mortalidade (%) Com tratamento	Amostra diagnóstica	Testes diagnósticos	Isolamento	Tratamento	Profilaxia	Disponibilidade de vacina
Antrax	8.000–50.000 esporos	1–6	≈100	≈99	Sangue	Coloração de Gram ELISA de Ag Sorologia: ELISA	Padrão	Ciprofloxacina 400 mg i.v. q. 12 h Doxociclina 100 mg i.v. q. 12 h e 1 a 2 antimicrobianos adicionais	Ciprofloxacina 500 mg, p.o. duas vezes ao dia × 60 d	Sim
Botulismo	0,0001 g/kg (tipo A)	1–5	Surto: Primeiro paciente = 25 Casos subsequentes = 4 Geral = 5–10		*Swab* nasal (possivelmente)	ELISA de Ag Murino-neutro	Padrão	Antitoxina disponibilizada pelo CDC por meio dos departamentos de saúde locais e estaduais. Informações adicionais no CDC 404-639-2888 (24 h/d)	Toxoide prevalente	Investigação
Tularemia	10–50 organismos	2–10	33	< 4	Sangue, escarro, soro, ME de tecido	Cultura Sorologia: aglutinação	Padrão	Estreptomicina 1 g, i.m. q. 12 h × 10 d Gentamicina, 5 mg/kg/d, i.m. ou i.v. × 10 a 14 d	Doxociclina 100 mg, p.o., q.12 h × 14 d Tetraciclina 500 mg, p.o., q. 6 h × 7 d Ciprofloxacina 500 mg, p.o., q. 12 h × 14 d	Investigação
Peste	100–500	2–3	40–70	5	Sangue, escarro, aspirado de linfonodo	Coloração de Gram ou Wright-Giemsa ELISA de Ag Cultura Sorologia: ELISA, IFA	Contra gotículas, até o paciente ter sido tratado por 3 dias	Estreptomicina 15 mg/kg (máx. 1 g), i.m. q. 12 h × 10 d Gentamicina 5 mg/kg/d, i.m. ou i.v., ou dose de carga de 2 mg/kg seguida de 1,7 mg/kg i.m. ou i.v., t.d.s. × 10 d Cloranfenicol 25 mg/kg de dose inicial, seguida de 60 mg/kg/d, i.v., q. 6 h	Doxociclina 100 mg, p.o., q. 12 h × 14 d Tetraciclina 500 mg, p.o., q. 6 h × 10 d Ciprofloxacina 500 mg, p.o., q. 12 h × 7 d	Sim
Varíola	10–100 partículas	7–17	Varíola menor: < 1 Varíola maior: 20–50		*Swab* faríngeo, material de crosta de ferida	ELISA PCR Isolamento de vírus	Contra a transmissão por via aérea	Cidofovir (efetiva *in vitro*)	Imunoglobulina da vacínia 0,6 mL/kg, i.m. (dentro de um período de 3 d após a exposição; ideal, dentro de 24 h)	Sim
Febre hemorrágica viral (FH)	1–10 partículas	4–21	53–88		Soro, sangue	Isolamento de vírus ELISA de Ag RT-PCR Sorologia: ELISA	Contra o contato, considerar medidas preventivas adicionais em caso de hemorragia	Ribavirina 30 mg/kg de dose inicial, i.v.; 15 mg/kg, i.v., q. 6 h × 4 ; 7,5 mg/kg, q. 8 h × 6 d para casos de FH da Crimeia-Congo por arenavírus (CCFH) Anticorpos passivos para casos de FH argentina, FH boliviana, febre de Lassa e CCHF	N/A	Investigação

CDC = Centers for Disease Control and Prevention; ELISA = ensaio imunossorvente ligado à enzima; ME = micrografia eletrônica; i.m. = intramuscular; i.v. = intravenosa; IFA = imunoensaio com fluorescência de anticorpos indireto; p.o. = oral; PCR = reação em cadeia da polimerase.

Laboratory Response Network para bioterrorismo

A LRN consiste em consórcio e parceria estabelecidos entre laboratórios que, de forma imediata e sustentada, fornecem testes laboratoriais e comunicação para dar apoio a emergências de saúde pública, em particular na resposta aos atos de bioterrorismo. A LRN atualmente é composta por laboratórios de saúde pública locais, estaduais e federais, além de laboratórios clínicos particulares e comerciais, e por laboratórios selecionados que realizam testes de alimentos, água, agrícolas, militares e veterinários. Outros parceiros-chave são o Serviço Federal de Investigações, o Ministério da Defesa, a Agência de Proteção Ambiental, o Ministério da Agricultura, o Ministério da Justiça, o Ministério de Energia, a Food and Drug Administration, a Association of Public Health Laboratories, o National Institutes of Health, a American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians e a American Society for Microbiology. Todos os laboratórios são considerados parceiros e, em certos casos, membros registrados da LRN. Testes preliminares e triagens são primariamente realizados de forma distribuída, em vez de centralizada, a fim de garantir uma resposta inicial imediata. Um sistema de triagem e encaminhamento de amostras garante a transferência de materiais apropriados aos laboratórios especializados, que dispõem de equipamentos sofisticados, tecnologia e conhecimentos para análise das amostras.

Os objetivos da LRN são:

1. Assegurar que os laboratórios de saúde pública e clínicos, entre outros tipos seletos de laboratórios do país, estejam preparados para detectar e responder a eventos de bioterrorismo ou terrorismo químico de forma adequada e integrada.
2. Garantir que todos os laboratórios de referência integrantes mantenham coletivamente o padrão de última geração das capacidades de biodetecção e diagnóstico, o aumento da capacidade e também a transmissão eletrônica segura dos resultados dos testes para agentes biológicos e químicos provavelmente utilizados no ato de um evento de biocrime ou bioterrorismo.
3. Trabalhar com outros departamentos e agências para garantir uma resposta federal bem-sucedida a um ato de bioterrorismo, bem como facilitar e otimizar a habilidade dos estados de responder com competência e de forma independente a biocrimes ou emergências de saúde pública ocorridas em seus respectivos territórios.
4. Promover a agenda de pesquisas em bioterrorismo do CDC e dos Human Health Services, bem como as necessidades de resposta interna do CDC.
5. Angariar um número ótimo de laboratórios participantes da LRN registrados em todo o território dos Estados Unidos, conforme determinado pelo grupo de trabalho da LRN.

A LRN mantém:

1. Registro e sistema articulado de laboratórios clínicos e particulares localizados nos Estados Unidos, que incluem laboratórios-sentinela e laboratórios de referência.
2. Protocolos completos, acurados e padronizados de todos os níveis de testes destinados aos agentes considerados críticos e propensos a serem utilizados no cometimento de biocrime ou em atos de bioterrorismo.
3. Um suprimento agudo, porém acessível, de reagentes padronizados e tecnologias diagnósticas produzidas e mantidas pelo CDC.
4. Um sistema eletrônico seguro de comunicação laboratorial, que integra componentes-chave de respostas epidemiológicas, de vigilância e emergenciais.
5. Treinamento e teste de proficiência essencial ao processo diagnóstico.

Os laboratórios clínicos exercem papel crítico na LRN. Seu nível de alerta aumentado para a possibilidade de isolar agentes de bioterrorismo a partir de amostras de pacientes e encaminhamento de isolados suspeitos aos laboratórios de referência da área de saúde pública é crucial.

Classificação dos laboratórios integrantes da LRN

A classificação dos laboratórios de bioterrorismo pela LRN (Fig. 64.1) foi revisada em 2003. As designações originais dos laboratórios de níveis A, B, C e D deixaram de ser reconhecidas, e as designações atualmente válidas são as de laboratórios-sentinela, de referência e nacionais (Fig. 64.1).

Laboratório-sentinela (antigo laboratório de nível A)

Os laboratórios-sentinela são laboratórios clínicos que seguem as normas de biossegurança de nível 2 (BSL-2). Suas principais responsabilidades consistem em reconhecer e excluir ou encaminhar agentes suspeitos conforme as diretrizes-padrão estabelecidas para laboratórios-sentinela. Ainda que muitos laboratórios-sentinela sejam capazes de fornecer uma "provável identificação" de alguns organismos-alvo, todos devem encaminhar os isolados a um laboratório de referência da LRN.

Laboratório de referência (antigos laboratórios de níveis B e C)

Os laboratórios de referência da LRN são laboratórios de saúde pública locais e estaduais, laboratórios acadêmicos ou universitários selecionados e laboratórios designados por especialidade (veterinários, água, alimentos, químicos, militares e agrícolas), que possuem os reagentes e a tecnologia necessários à confirmação definitiva dos organismos, incluindo o teste de toxina, referidos pelos laboratórios-sentinela. Os laboratórios de referência da LRN seguem as normas de contenção e diretrizes de prática de BSL-3.

Tabela 64.5 Agentes de bioterrorismo da categoria B

Bactérias	Vírus	Toxinas
Coxiella burnetii (febre Q)	Alfavírus	
Espécies de *Brucella* (brucelose)	Encefalomielite venezuelana	Toxina ricina (*Ricinus communis*)
Burkholderia mallei (mormo)	Encefalomielite equina oriental	Toxina ε (*Clostridium perfringens*)
Burkholderia pseudomallei (melioidose)	Encefalomielite equina ocidental	Enterotoxina B (*Staphylococcus aureus*)
Rickettsia prowazekii (febre tifoide)		Micotoxinas tricotecenos*
Chlamydia psittaci (psitacose)		
Patógenos transmissíveis pela ingestão de alimentos ou água		
Espécies de *Salmonella*		
Shigella dysenteriae		
Escherichia coli 0157:H7		
Vibrio cholerae		
Cryptosporidium parvum		

* Não listadas como agentes de categoria B pelo Centers for Disease Control.

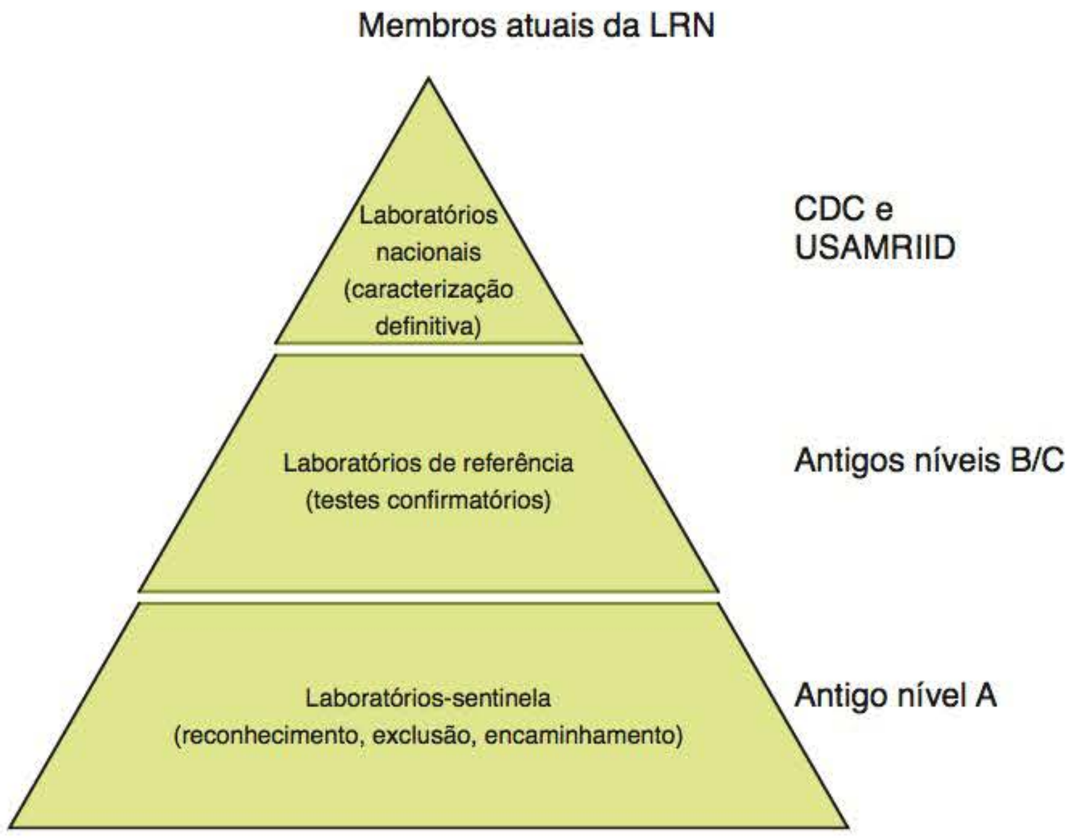


Figura 64.1 Classificação dos laboratórios da Laboratory Response Network (LRN). CDC: Centers for Disease Control and Prevention; USAMRIID: United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases.

Laboratório nacional (antigo laboratório de nível D)

Os laboratórios nacionais da LRN são laboratórios federais que possuem instalações de contenção e seguem diretrizes de prática consoantes com as BSL-4. O principal laboratório desse nível está localizado no CDC e é especializado no isolamento e na identificação de agentes de BSL-4, tais como os vírus Ebola, Marburg e da varíola. Esse laboratório também é capaz de realizar caracterização genética avançada e arquivamento de todos os agentes de bioterrorismo.

A responsabilidade do laboratório clínico

Como membros da LRN, os laboratórios-sentinela possuem acesso à rede e atuam como "vigias" para suposição e detecção precoce de agentes suspeitos, que não podem ser excluídos como possíveis organismos associados ao bioterrorismo. Os laboratórios-sentinela não têm acesso ao site seguro do CDC para obtenção de reagentes ou protocolos de teste de laboratórios de referência. Em vez disso, os laboratórios-sentinela devem utilizar testes convencionais para facilitar a "exclusão" ou "encaminhamento" de isolados suspeitos a um laboratório de referência da LRN.

O laboratório-sentinela não é responsável por um evento de bioterrorismo nem deve decidir se ele ocorreu. Essa é uma tarefa que cabe aos oficiais da saúde e encarregados do cumprimento da lei nas esferas local, estadual e federal. Um indivíduo designado em seu estabelecimento (de preferência um oficial de controle de infecções) deve ser notificado da detecção de um agente suspeito e, por sua vez, notificar os oficiais de saúde pública locais. Sob nenhuma circunstância, o laboratório deve contatar o laboratório de referência da LRN para obter orientação referente à disposição do agente suspeito antes de encaminhá-lo para testes de confirmação.

Nota: o laboratório-sentinela jamais deve aceitar amostras ambientais (substâncias em pó, cartas, embalagens), animais, alimentares ou de água para a realização de exames, cultura ou transporte de agentes associados ao bioterrorismo. Amostra desses tipos devem ser submetidas diretamente ao laboratório de referência da LRN mais próximo.

Diretrizes para expedição e manuseio de materiais infecciosos

Regulamentações nacionais, internacionais e comerciais determinam as regras para embalo adequado, documentação e expedição segura de mercadorias perigosas com o objetivo de proteger o público, os funcionários de companhias aéreas, os mensageiros e outros indivíduos que trabalham para empresas de expedição comerciais, bem como aqueles que manuseiam esses produtos no decorrer dos vários segmentos do processo de expedição. Além disso, o embalo e o despacho de produtos perigosos realizados do modo adequado reduzirão a exposição do encarregado da expedição aos riscos de imputabilidade criminal e civil associados à expedição de artigos considerados perigosos, em particular no caso de substâncias infecciosas.

O processo correto de embalo e despacho de uma substância infecciosa, amostra diagnóstica ou agente biológico consiste nas seguintes etapas sequenciais:

1. treinamento de todos os indivíduos envolvidos no processo de expedição;
2. determinação da aplicabilidade das regulamentações;
3. determinação de quaisquer limitações de expedição aplicáveis;
4. classificação da substância a ser despachada;
5. identificação da substância a ser despachada;
6. seleção das instruções de embalo adequadas para uso;
7. seleção da embalagem adequada;
8. marcação e rotulagem da embalagem;
9. documentação da expedição.

O cumprimento inadequado das regulamentações governamentais e comerciais relativas ao embalo e à expedição de substâncias infecciosas e outros produtos perigosos pode resultar na instauração de um processo criminal e em sanções financeiras substanciais.

Potenciais agentes de bioterrorismo

Bacillus anthracis

O *Bacillus anthracis* é um bastonete aeróbio, formador de esporos, imóvel, grande e Gram-positivo.

Manifestações clínicas

As pessoas se infectam com *B. anthracis* ao manusearem produtos ou consumirem carne mal cozida oriunda de animais infectados. A infecção também pode resultar da inalação dos esporos de *B. anthracis* a partir de produtos animais contaminados, tais como lã, ou quando os esporos são liberados de forma intencional. Não há nenhum relato de transmissão de um indivíduo a outro. Existem três formas de antraz que acometem seres humanos: cutâneo, gastrintestinal e inalatório (Lew, 2000).

Antraz cutâneo

As infecções cutâneas ocorrem quando a bactéria ou os esporos penetram por cortes ou escoriações produzidas na pele. A infecção na pele tem início com o aparecimento de pápula ou inchaço que coça. Em 1 a 2 dias, esse inchaço evolui para uma vesícula cheia de líquido, que se rompe e origina uma úlcera indolor (denominada escara), usualmente medindo 1 a 3 cm de diâmetro e com uma característica área central negra necrosada (morta). Cerca de 20% dos casos não tratados de antraz cutâneo resultam na morte do paciente, seja porque a infecção se torna sistêmica, seja em decorrência da angústia respiratória causada pelo edema formado nas regiões cervical e torácica superior.

Antraz gastrintestinal

A forma gastrintestinal do antraz pode ocorrer subsequentemente ao consumo da carne contaminada de animais infectados e se caracteriza pela inflamação aguda do trato intestinal. Os sinais iniciais de náusea, perda do apetite, vômitos e febre são seguidos de dor abdominal, vômitos de sangue e diarreia sanguinolenta severa. É difícil determinar a taxa de mortalidade associada ao antraz gastrintestinal, contudo estima-se que seja de 25 a 60% nos casos não tratados.

Antraz inalatório

O antraz inalatório resulta da inalação dos esporos de *B. anthracis* e ocorre mais provavelmente após a liberação intencional de aerossóis que contêm o bacilo. Após um período de incubação de 1 a 6 dias (dependendo do número de esporos inalados), a doença se inicia de forma gradual e inespecífica. Febre, mal-estar e fadiga podem estar presentes no início, às vezes associadas a uma tosse não produtiva e a um suave desconforto torácico. Esses sintomas iniciais com frequência são acompanhados de um curto período de melhora (que varia de horas a dias), seguido do desenvolvimento abrupto de angústia respiratória severa com dispneia (respiração difícil), diaforese

(transpiração), estridor (respiração ruidosa e alta) e cianose (cor da pele azulada). Choque e morte usualmente ocorrem em 24 a 36 horas após o início da angústia respiratória e, em estágios posteriores, a mortalidade se aproxima de 100% mesmo que o paciente receba um tratamento agressivo.

Seleção e teste da amostra

A Tabela 64.6 descreve a seleção das amostras para isolamento de *B. anthracis* (Logan, 1999).

Deve ser executado o procedimento da coloração de Gram/CQ por meio do protocolo laboratorial padrão. *B. anthracis* é um bastonete grande (1–1,5 μm × 3–5 μm) e Gram-positivo. As células vegetativas observadas no sangue e nos esfregaços feitos por impressão corados pelo método de Gram estão agrupadas em cadeias curtas, com 2 a 4 células encapsuladas, que podem ser visualizadas pela coloração Gram como zonas claras em torno dos bacilos. Não há esporos nas amostras clínicas, a não ser mediante exposição a baixos níveis de CO_2, similares aos níveis encontrados na atmosfera ambiente. Altos níveis de CO_2 no corpo inibem a esporulação. A presença de bastonetes grandes, encapsulados e Gram-positivos no sangue é fortemente preditiva da identificação de *B. anthracis*. Em ágar com sangue de carneiro (SBA, *sheep's blood agar*), esse organismo forma esporos ovais (1 × 1,5 μm), que podem ser desde centrais a subterminais e não causam tumefação celular significativa. Com frequência, ocorre sob a forma de longas cadeias de bacilos. Entretanto, as células oriundas do crescimento em SBA, independentemente das condições de incubação (atmosfera ambiente ou rica em CO_2), não são encapsuladas (Gilchrist, 2000).

Os meios devem ser inoculados e dispostos em estrias, para isolar os respectivos tipos de organismos (Tab. 64.6). Após a incubação das placas de SBA durante 15 a 24 horas, entre 35 e 37°C, as colônias de *B. anthracis* apresentam diâmetro de 2 a 5 mm. As colônias achatadas ou um pouco convexas possuem forma arredondada irregular, com bordas discretamente onduladas (bordas irregulares, com ondulações) e aspecto de vidro fosco. Com frequência, projeções em forma de vírgula saem das bordas da colônia e lhe conferem a aparência de "cabeça de Medusa". O *B. anthracis* cresce bem em SBA, mas não cresce em MAC. Esse organismo apresenta crescimento rápido. Áreas pesadamente inoculadas podem apresentar crescimento dentro de 6 a 8 horas, sendo possível detectar colônias individuais em 12 a 15 horas. O *B. anthracis* é desprovido de motilidade. A Tabela 64.7 e a Figura 64.2 descrevem os critérios a serem adotados para a identificação provável. Enquanto a hemólise, a determinação da morfologia por coloração Gram ou a detecção de motilidade podem ser utilizadas para fins de exclusão quando o resultado fornece evidências claras de que o isolado não é *B. anthracis* (p. ex., a observação de zona nitidamente visível de β-hemólise), recomenda-se basear a exclusão em uma combinação de 2 testes realizados por laboratório-sentinela. É necessário comunicar de imediato o diretor (ou funcionário designado) do laboratório de saúde pública e um oficial epidemiologista/de saúde do departamento estadual de saúde pública caso não seja possível excluir *B. anthracis* e haja suspeita de um evento de bioterrorismo. O médico/responsável pelo controle de infecções deve ser prontamente notificado, conforme as políticas internas, caso não seja possível excluir *B. anthracis*.

Espécies de *Brucella*

Brucella é um cocobacilo pequeno, fastidioso, aeróbio e Gram-negativo. Em 1954, *Brucella suis* tornou-se o primeiro agente biológico a ser transformado em arma pelos Estados Unidos, na época em que vigorava o programa americano ofensivo de guerra biológica. A dose infecciosa desses organismos é bastante baixa, quando adquirida por via inalatória. Essa característica faz desse organismo um potencial agente de bioterrorismo efetivo, bem como de risco no laboratório de microbiologia clínica.

Manifestações clínicas

Brucella causa infecções agudas e crônicas. Os sintomas da brucelose são inespecíficos e sistêmicos, e com frequência observa-se febre, sudorese, dor de cabeça, anorexia, dor nas costas e perda de peso. A forma crônica da doença pode mimetizar a tuberculose militar, com aparecimento de lesões supurativas em fígado, baço e ossos. O organismo muitas vezes é incluído no diagnóstico diferencial das febres de origem desconhecida. Está associada a uma mortalidade de 5% em indivíduos não tratados.

Seleção e teste da amostra

Consulte na Tabela 64.8 uma descrição das formas de seleção de amostras para detecção das espécies de *Brucella*. Frascos para cultura de sangue líquido devem ser assepticamente inoculados com a quantidade máxima de sangue ou líquido corporal, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, esses frascos devem ser incubados a 35°C. Culturas de sangue em caldo não automatizadas devem ser incubadas por 21 dias, sendo realizadas subculturas-cegas a cada 7 dias. Ao fim desse período, deve ser realizada uma subcultura terminal das culturas de sangue negativas, e as placas têm de permanecer vedadas por mais 7 dias. Os sistemas automatizados devem ser incubados por 10 dias, com realização de subculturas a cada 7 dias para aumentar o rendimento. O isolamento de *Brucella* muitas vezes é retardado, em comparação ao isolamento de outros patógenos encontrados na circulação sanguínea, e o pico de isolamento ocorre em 3 a 4 dias (comparado ao pico observado em 6 a 36 horas para a maioria dos demais patógenos).

Embora seja defendido um tempo de incubação de 21 dias acompanhado de subculturas-cegas semanais ou terminais, estudos detalhados conduzidos em áreas endêmicas de *Brucella* e utilizando o sistema BACTEC 9240 (BD Division Instrument Systems, Sparks, MD) sugeriram que um tempo máximo de 10 dias de incubação é suficiente para isolar esse organismo com segurança (93% dos 97 isolados de pacientes foram detectados em 5 dias) (Bannatyne, 1997). No caso do BacT Alert System (BioMérieux, Inc., Hazelwood, MO), subculturas terminais forneceram maior rendimento aos 7 dias de incubação. A técnica da lise-centrifugação mostrou-se menos sensível que os sistemas à base de caldo utilizados para amostras pediátricas. Diante da escassez de dados publicados sobre a utilização do sistema ESP (TREK Diagnostics, Westlake, OH), ainda desconhece-se sua eficiência na recuperação de *Brucella*. Para tecidos, recomenda-se inocular placas de ágar-sangue (SBA), ágar-chocolate e ágar MacConkey ou ágar EMB (ver Tab. 64.8), incubando-as em seguida a 35°C, por até 7 dias, em câmara úmida e atmosfera com 5 a 10% de CO_2. A umidade pode ser mantida colocando-se um recipiente cheio de água embaixo da câmara de incubação ou enrolando as placas com uma fita adesiva permeável a gases. *Brucella* é a responsável por numerosos casos de infecção adquirida no laboratório (Sewell, 1995; Fiori, 2000). Havendo suspeita de *Brucella* ou se a coloração de Gram revelar a presença de pequenos cocobacilos Gram-negativos, recomenda-se evitar a exposição a aerossóis e realizar subculturas dentro de uma cabine de biossegurança (Schreckenberger, 1999). As placas devem ser vedadas com fita adesiva, e todos os testes adicionais devem ser realizados somente no interior da cabine de biossegurança, utilizando práticas de BSL-3. As bactérias desse gênero são pequenos cocobacilos (0,4 μm × 0,8 μm) Gram-negativos, que podem ser vistos diretamente em frascos de culturas de sangue positivas ou por meio da coloração de Gram de colônias oriundas de meios primários. Quando se suspeitar de culturas de sangue, elas devem ser subcultivadas em SBA, ágar-chocolate e ágar MacConkey (ou ágar EMB). As placas devem ser incubadas a 35°C, em câmara úmida, sob atmosfera com 5 a 10% de CO_2. Todas as reações para oxidase, catalase e ureia são positivas para as espécies de *Brucella* (Fig. 64.3).

Alerta: a identificação de espécies de *Brucella* não deve ser realizada utilizando sistemas de identificação comerciais (Shapiro, 1999). Caso contrário, é possível confundir *Haemophilus* com *Brucella*. Entretanto, *Haemophilus* não cresce em SBA. Em caso de dúvida, esses dois gêneros devem ser diferenciados por meio de um teste-satélite. Para tanto, inocula-se uma placa de ágar-sangue e, em seguida, adiciona-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de forma que fique espalhado em estrias transversais ou pontos. Após 24 a 48 horas de incubação sob atmosfera com 5% de CO_2, o *Haemophilus* apresenta crescimento-satélite em torno de *S. aureus*, enquanto o crescimento de *Brucella* não se limita apenas à área em torno dos estafilococos.

Outros organismos que também podem ser confundidos com as espécies de *Brucella* por serem urease-positivos são *Oligella ureolytica* (comumente encontrada apenas na urina), *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Psychrobacter immobilis* e *Bordetella bronchieseptica* (móvel) (Tab. 64.9).

Tabela 64.6 Escolha da amostra: antraz (*Bacillus anthracis*)

Doença	Escolha da amostra	Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra				Outros
			SBA	CA	MAC	Coloração	
Possível exposição ao *B. anthracis* de paciente assintomático	*Swab* anterior das narinas: coletar apenas mediante recomendação por autoridades locais de saúde pública	≤ 24 h; TA	Não	Não	Não	Nenhuma	Seguir as orientações da saúde pública, que indica a realização de *swab* anterior de narinas SOMENTE quando a coleta for recomendada
Antrax cutâneo	Estágio vesicular: coletar líquido oriundo de vesículas intactas com auxílio de *swab* estéril. O organismo é mais bem demonstrado nesse estágio.	≤ 24 h; TA	X	X	X	Coloração de Gram	
	Estágio de escara: sem remover a escara, inserir o *swab* umedecido em salina estéril sob sua borda, girá-lo e coletar material da lesão	≤ 24 h; TA	X	X	X	Coloração de Gram	
	Estágios vesicular e de escara: coletar 2 biópsias por punção. Colocar uma das biópsias em formalina a 10% para ser enviada ao CDC para estudos de histopatologia, coloração imuno-histoquímica e PCR	Uma biópsia obtida por punção em formalina a 10%; uma vez tratada com formalina, a biópsia pode ser armazenada até o transporte ao CDC	Não	Não	Não	Realizada no CDC	Providenciar transporte para o CDC
	Submeter a outra biópsia dentro de um frasco de transporte anaeróbio para cultura	A segunda biópsia obtida por punção em frasco de transporte anaeróbio; ≤ 24 horas, TA	X	X	X	Coloração de Gram	
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas	Transportar à TA; incubar a 35–37°C de acordo com o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue				Positivas em alguns casos durante os estágios tardios da doença
	Tubos de tampa lilás (EDTA): apenas para pacientes internos, coletar para coloração de Gram direta	≤ 2 h, TA	Não	Não	Não	Coloração de Gram	
	Tubos de tampa vermelha ou azul para sorologia; tubos de tampa branca para PCR	≤ 24 h, 4°C	Não	Não	Não	Não	Providenciar transporte para o CDC
Antrax gastrintestinal	Fezes: coletar 5–10 g em frasco limpo, estéril e à prova de vazamentos	≤ 24 h, 4°C	Inocular meio de plaqueamento de fezes de rotina adicionado de CNA ou PEA				Recuperação mínima
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas	Transportar à TA; incubar a 35 a 37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue				Positivas durante os estágios tardios da doença
	Tubos de tampa lilás (EDTA): apenas para pacientes internos, coletar para coloração de Gram direta	≤ 2 h, TA	Não	Não	Não	Coloração de Gram	
	Tubos de tampa vermelha ou azul para sorologia; tubos de tampa branca para PCR	≤ 24 h, 4°C	Não	Não	Não	Não	
Antrax inalatório	Escarro: coletar amostra de expectoração em frasco estéril à prova de vazamento	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	Recuperação mínima
	Líquido pleural: coletar amostra em frasco estéril à prova de vazamento	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	Guardar o excesso (se houver) para PCR
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas	Transportar à TA; incubar a 35 a 37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue				Positivas durante os estágios tardios da doença
	Tubos de tampa lilás (EDTA): apenas para pacientes internos, coletar para coloração de Gram direta	≤ 2 h, TA	Não	Não	Não	Coloração de Gram	
	Tubos de tampa vermelha ou azul para sorologia; tubos de tampa branca para PCR	≤ 24 h, 4°C	Não	Não	Não	Não	
Meningite	Cultura de líquido cerebrospinal (LCE): coletar LCE de modo asséptico conforme o procedimento institucional	≤ 24 h, TA	X	X		Coloração de Gram	Pode ser observada nos estágios tardios da doença: considerar a adição de meios à base de caldo, tais como infusão cérebro-coração
	Culturas de sangue: coletar duas baterias (uma das baterias consiste em dois frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas	Transportar à TA; incubar a 35–37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue				Positivas durante os estágios tardios da doença

CA = ágar-chocolate; CDC = Centers for Disease Control and Prevention; CNA = ágar colistina-ácido nalidíxico; EDTA = ácido etilenodiaminotetracético; MAC = ágar MacConkey; PEA = ágar-sangue feniletil álcool; TA = temperatura ambiente; PCR = reação em cadeia da polimerase; SBA: ágar-sangue de carneiro.

Tabela 64.7 Prováveis identificações do *Bacillus anthracis*

Nível do laboratório	Tipo de amostra	Característica da provável identificação	Método
A (sentinela)	Amostra clínica	1. Bastonetes Gram-positivos E	Coloração de Gram
		2. Cápsulas	Coloração com nanquim
A (sentinela)	Isolado	1. Formador de esporos E	Coloração de Gram
		2. Morfologia da colônia E	Observação em SBA
		3. Não hemolítico E	Observação em SBA
		4. Sem motilidade	Motilidade em meio ou preparação a fresco

SBA = ágar-sangue de carneiro.

As espécies de *Brucella* crescerão na subcultura após 48 horas de incubação, sob atmosfera com 5 a 10% de CO_2, em ágar-chocolate e SBA. Esses organismos não crescem em MAC, e essa característica permitirá diferenciá-los de alguns cocobacilos Gram-negativos. As colônias tipicamente apresentam crescimento "semelhante ao pó" após a incubação de um dia a outro, sendo necessário um período de incubação mínimo de 48 horas para obtenção de crescimento suficiente para realizar outras identificações. As colônias são lisas, convexas e em relevo, e apresentam bordas inteiras (i. e., não exibem características distintivas).

É necessário comunicar de imediato o diretor (ou funcionário designado) do laboratório de saúde pública e um oficial epidemiologista/de saúde do departamento estadual de saúde pública caso não seja possível excluir *Brucella* e haja suspeita de um evento de bioterrorismo. O médico/responsável pelo controle de infecções deve ser prontamente notificado, conforme as políticas internas, caso não seja possível excluir *Brucella*.

Burkholderia mallei e *Burkholderia pseudomallei*

Burkholderia mallei é um cocobacilo sem motilidade, aeróbio e Gram-negativo, que pode ou não ser oxidase-positivo ou crescer em ágar MacConkey. *Burkholderia pseudomallei* é um bacilo oxidase-positivo, aeróbio e Gram-negativo, cujo formato é reto ou levemente curvado. O organismo cresce na maioria dos meios padrão, como SBA, ágar-chocolate e ágar MacConkey, e produz um característico odor de mofo.

Manifestações clínicas

O mormo (doença causada por *B. malei*) pode se manifestar como doença cutânea ou sistêmica. O período de incubação típico é de 1 a

Tabela 64.8 Seleção da amostra: brucelose (*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*)

Doença	Escolha da amostra	Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra				Outros
			SBA	CA	MAC	Coloração	
Brucelose aguda, subaguda ou crônica	Soro: coletar 10 a 12 mL de amostra de fase aguda o mais rápido possível, logo após o início da doença. O seguimento deve ser feito com amostra obtida em fase de convalescência, após 21 dias	Transportar em ≤ 2 h, TA. Armazenar a –20 °C	A amostra deve ser armazenada e despachada sob congelamento a –20°C para o laboratório estadual ou outro laboratório de referência (níveis B/C) da LRN				Diagnóstico sorológico: 1. Título único: ≥ 1:160 2. Elevação equivalente a 4 vezes 3. IgM. NOTA: *B. canis* não apresenta reação cruzada com reagentes sorológicos padrão
	Sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas	Transportar à TA. Incubar a 35–37°C	Frascos de cultura de sangue: subcultivar por 5 d e manter por 21 d				As taxas de isolamento em culturas sanguíneas variam de 15 a 70%, dependendo dos métodos e da duração da manipulação na cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	Medula óssea, baço ou fígado: coletar conforme o procedimento cirúrgico/patológico da instituição	≤ 24 h, TA	X	X	Manter as culturas por no mínimo 7 dias	Coloração de Gram	As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
Meningite	Cultura de líquido cerebrospinal (LCE): coletar LCE de modo asséptico conforme o procedimento institucional	≤ 24 h, TA	X	X	Manter as culturas por no mínimo 7 dias	Coloração de Gram	As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	LCE para teste de anticorpos	–20°C	A amostra deve ser armazenada e despachada sob congelamento a –20°C para o laboratório estadual ou outro laboratório de referência (níveis B/C) da LRN			Nenhuma	

CA = ágar-chocolate; MAC = ágar MacConkey; TA = temperatura ambiente; SBA = ágar-sangue de carneiro.

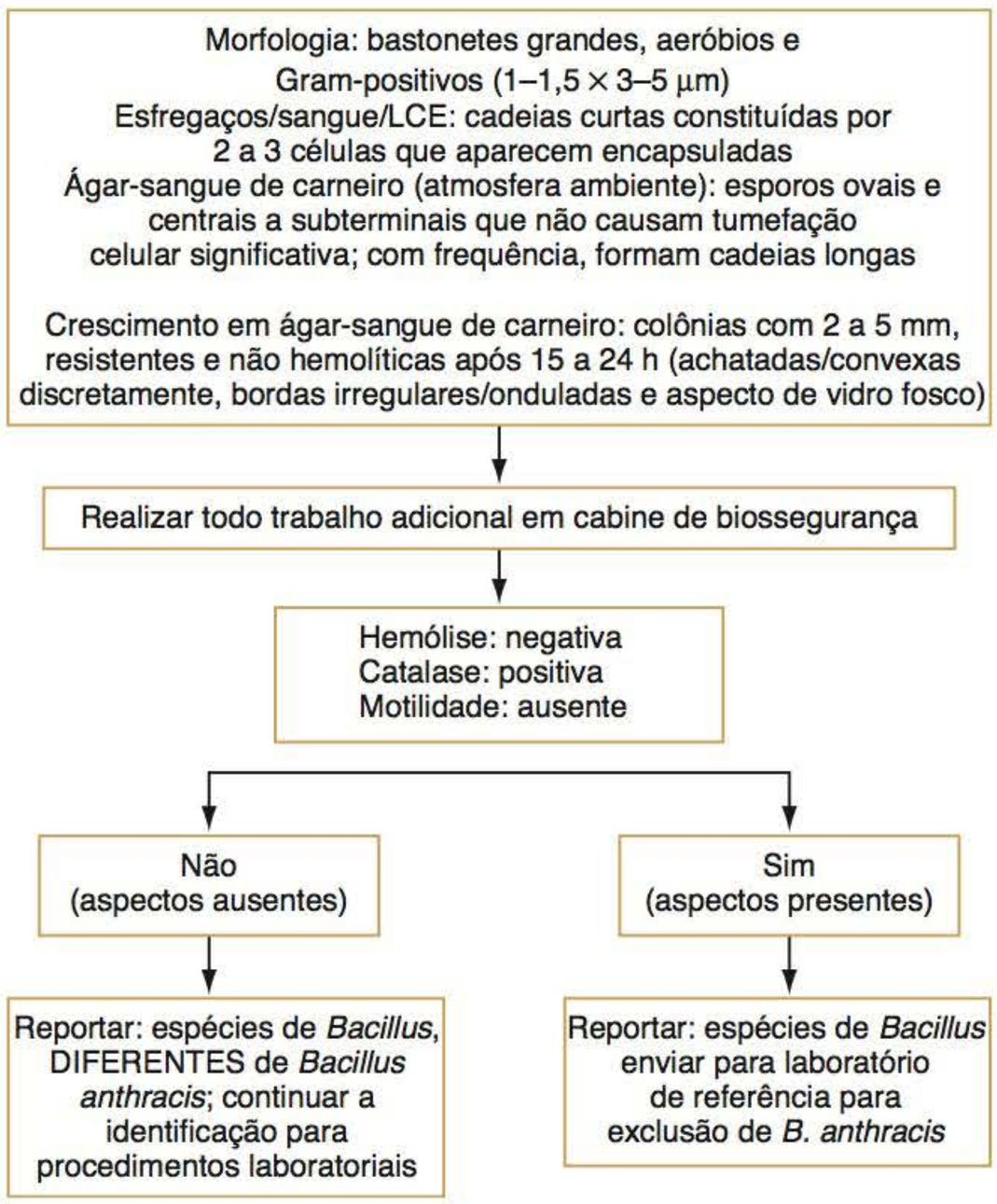


Figura 64.2 *Bacillus anthracis*: fluxograma de um laboratório-sentinela.

14 dias (Centers for Disease Control and Prevention, 2000b). Pacientes que desenvolvem infecção cutânea apresentam nódulos acompanhados de linfadenite localizada. A doença sistêmica usualmente se manifesta como broncopneumonia ou pneumonia lobar. Também pode haver bacteremia, com consequente aparecimento de lesões no fígado e no baço. A infecção humana por *B. mallei* com frequência é fatal na ausência de tratamento antimicrobiano. A melioidose, uma doença mormo-símile que afeta seres humanos e é produzida por *B. pseudomallei*, pode se manifestar com um processo assintomático, agudo, subagudo ou crônico (Currie, 2000). A apresentação típica da infecção aguda é a pneumonia. O período de incubação dessa infecção é de 2 a 5 dias. O indivíduo doente apresenta febre, dispneia e dor torácica pleurítica. As infecções subagudas podem mimetizar aquelas produzidas por *Mycobacterium tuberculosis*. Os pacientes podem apresentar febre baixa, mal-estar, anorexia e perda de peso no decorrer de alguns meses.

A infecção crônica é semelhante à tuberculose miliar, na qual a infecção é disseminada, podendo ser observadas lesões granulomatosas em uma variedade de tecidos. Os pacientes podem apresentar sintomas mínimos; no entanto, a maioria exibe sintomas parecidos com aqueles observados na tuberculose miliar, incluindo febre, tosse e perda de peso.

Seleção e teste da amostra

São amostras apropriadas: sangue, medula óssea, escarro, material oriundo de abscesso e *swabs* de ferida. *B. mallei* é um cocobacilo pequeno e Gram-negativo (Tab. 64.10), enquanto *B. pseudomallei* é um bastonete pequeno e Gram-negativo. É possível observar os organismos diretamente em amostras respiratórias ou de material de abscesso/ferida coradas por Gram (Gilligan, 2003). Esses organismos também são visíveis em esfregaços produzidos com material oriundo de frascos de cultura de sangue positivas. Devem ser utilizados meios de isolamento de rotina (SBA, ágar MacConkey etc.). Para melhorar o isolamento, um disco de colistina ou polimixina B pode ser colocado na área de inoculação inicial no SBA, caso haja solicitação específica para detecção de *Burkholderia* spp. No SBA, *B. mallei* forma colônias lisas, cinzas e translúcidas em 2 dias, sem pigmentação nem odor típico. *B. malei* crescerá sem inibição ao redor

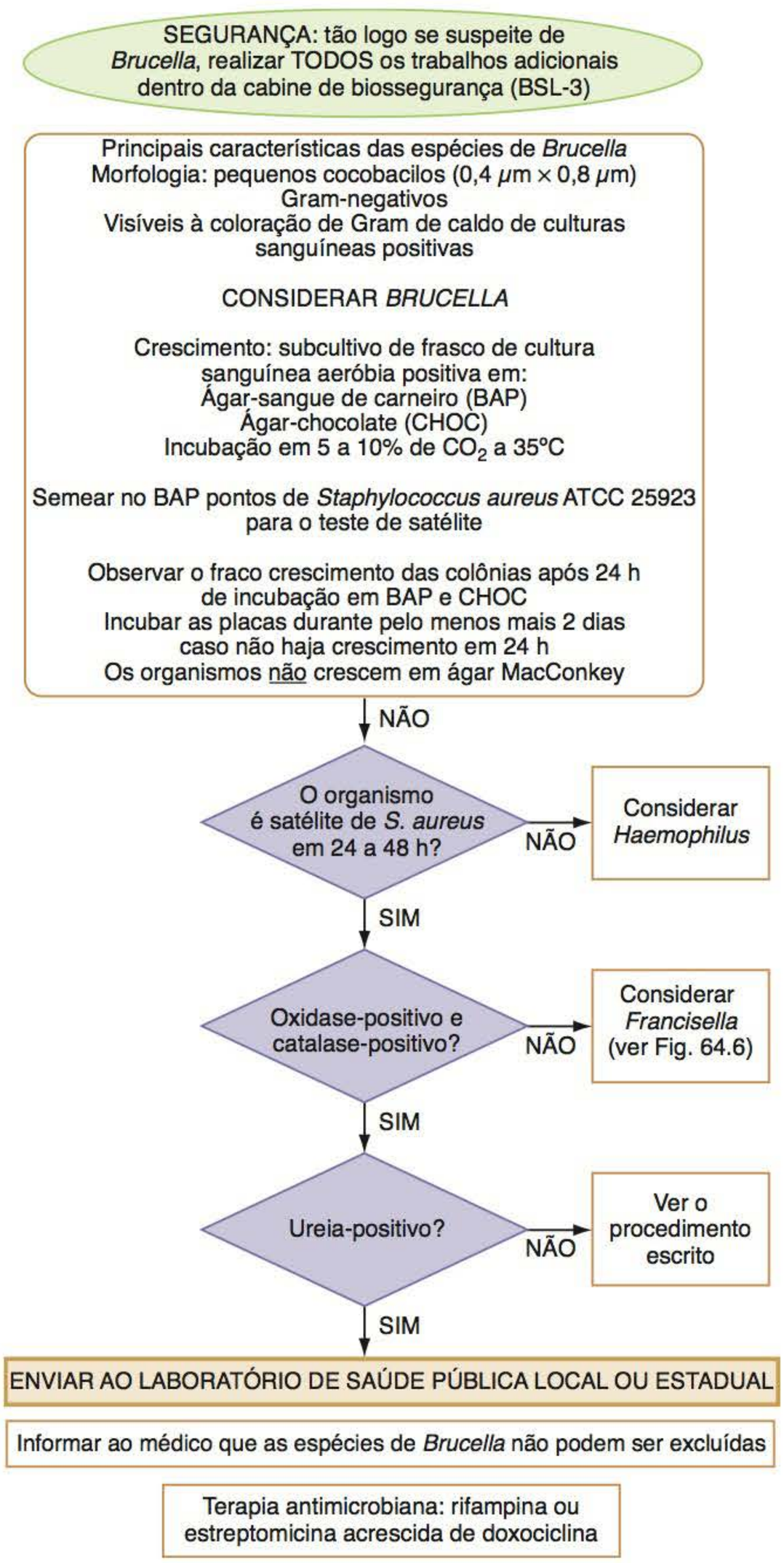


Figura 64.3 *Brucella*: fluxograma de um laboratório-sentinela.

do disco de colistina ou polimixina B. Também no SBA, *B. pseudomallei* muitas vezes forma colônias pequenas, lisas e de aspecto cremoso em 1 a 2 dias. Dentro de pouco dias, essas colônias vão mudando de maneira gradual ficando ressecadas e enrugadas, parecidas com as colônias produzidas por *Pseudomonas stutzeri*. As colônias de *B. pseudomallei* não apresentam pigmentação amarela nem violeta, e esse organismo cresce sem inibição ao redor do disco de colistina ou polimixina B. "Aspirar" placas que contêm *B. pseudomallei* é uma prática perigosa que deve ser evitada. Todavia, o odor é evidente e dispensa a necessidade de cheirar a placa. O leitor deve seguir os esquemas de isolamento ilustrados nas Figuras 64.4 e 64.5 para fins de triagem e confirmação.

Investigações epidemiológicas adicionais são necessárias sempre que uma identificação provável de *B. mallei* ou *B. pseudomallei* for feita. No cenário hospitalar, o serviço de doenças infecciosas e/ou o departamento de controle de infecções devem ser notificados para que possam ser conduzidas investigações adicionais acerca da história do

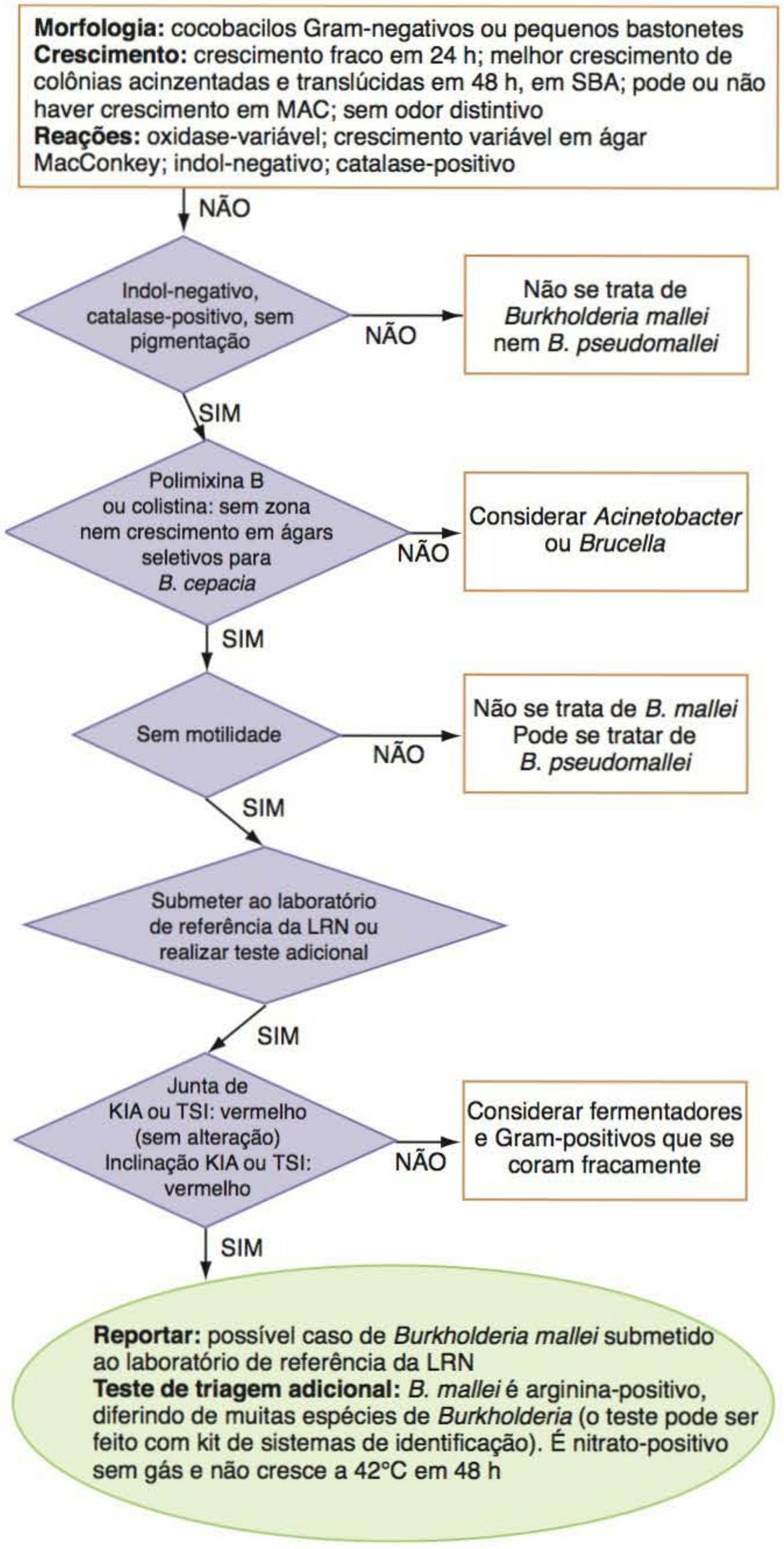


Figura 64.4 *Burkholderia mallei*: fluxograma de um laboratório-sentinela. KIA = ágar Kliger ferro; TSI = triplo-açúcar-ferro.

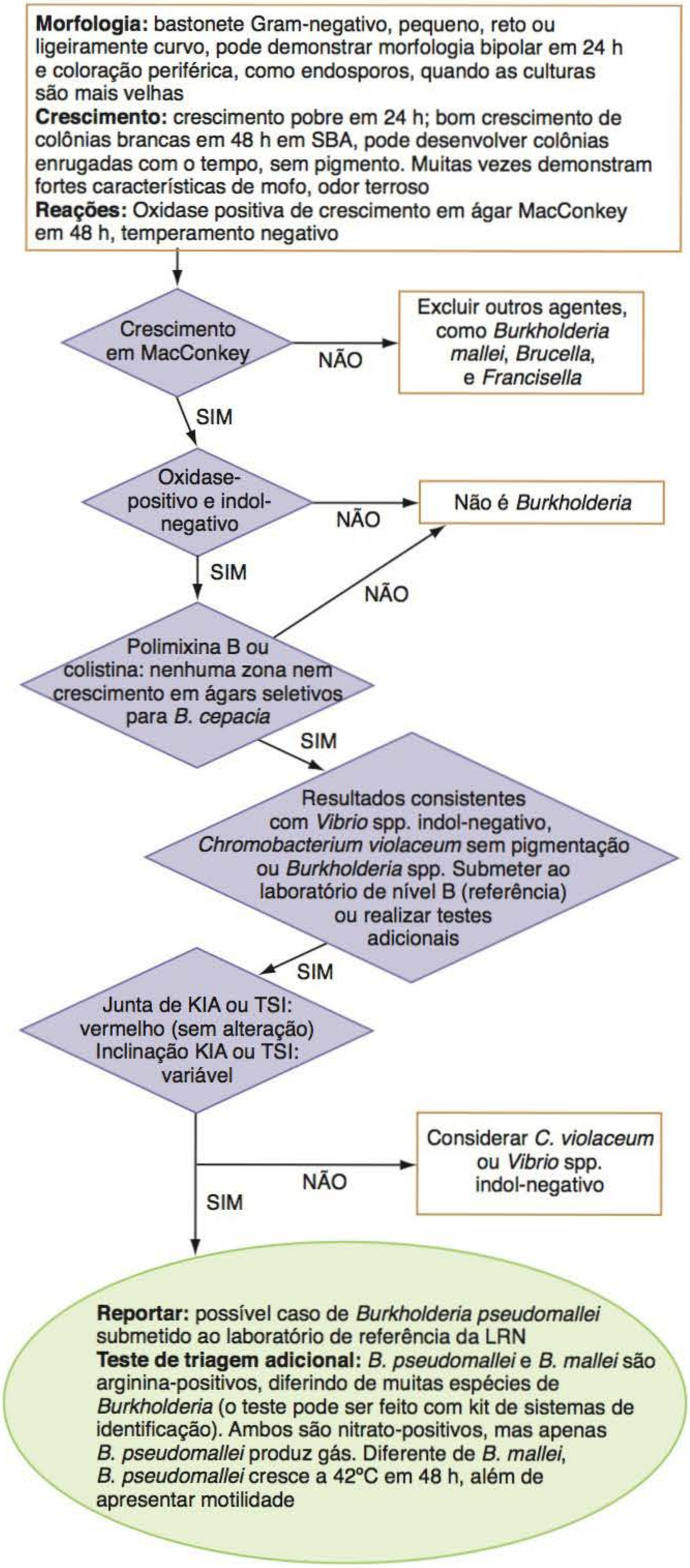


Figura 64.5 *Burkholderia pseudomallei*: fluxograma de um laboratório-sentinela. KIA = ágar Kliger ferro; SBA = ágar-sangue de carneiro; TSI = triplo-açúcar-ferro.

paciente e, assim, excluídas infecções de ocorrência natural. É necessário comunicar ao diretor (ou funcionário responsável) do laboratório estadual a identificação provável de *B. malei* ou *B. pseudomallei*. O diretor do laboratório estadual de saúde pública irá coordenar a notificação do CDC e das agências estaduais/federais responsáveis pelo cumprimento da lei.

Coxiella burnetii

Coxiella burnetii é um cocobacilo pleiomórfico Gram-negativo e intracelular obrigatório que mede 0,3 a 0,7 μm de comprimento. Existe uma forma similar a esporo – a variante de célula pequena – que é notavelmente estável em ambientes extracelulares. Há também a variante de célula grande, que constitui a forma vegetativa e metabolicamente ativa. Misturas de ambas as formas são encontradas nos fagolisossomos. Observa-se a existência de uma variação de fase, semelhante a que ocorre em *Salmonella*, na qual o lipopolissacarídeo (LPS) varia quimicamente e pode se apresentar como LPS "liso" de fase I (virulento) ou LPS "rugoso" de fase II (associado à espécie avirulenta *C. burnetii*). *C. burnetii* está filogeneticamente relacionado a *Pseudomonas, Francisella* e *Legionella*, no grupo *Legionella* da subdivisão de γ-proteobactérias. Trata-se de uma espécie relacionada à *Rickettsia*, porém mais distante (Heinzen, 1997).

Tabela 64.9 Diferenciação de *Brucella* dos demais cocobacilos ureia-positivos, oxidase-positivos e Gram-negativos

	Brucella	**EO-2, EO-4 *Psychrobacter immobilis***	***Psychrobacter phenylpyruvicus***	***Oligella ureolytica***	***Actinobacillus* spp.**	***Bordetella bronchiseptica Ralstonia paucula* (IV c2)**	***Bordetella hinaii***	***Haemophilus* spp.†**
Morfologia pela coloração de Gram	Ccb minúsculos, fracamente corados	Pequenos ccb, bastonetes E0-2 em maços	Ccb	Ccb minúsculos	Ccb, bastonetes	Ccb, bastonetes	Ccb, bastonetes	Ccb
Catalase	+	+	+	+	v	+	+	v
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	v
Ureia*	+	v	+	+	+	+	14% pos.	v
Motilidade	–	–	–	+, retardada	–	+	+	–
PDA	–	–	+	+	–	v	–	–
Nitrato	+	v	68%	+	+	v	–	NA
Nitrito	–	v	–	+	–	–	–	NA
TSI	Alcalino	Alcalino	Alcalino	Alcalino	Ácido/ácido	Alcalino	Alcalino	Sem crescimento
MAC – 48 h	–, fraco	–, fraco	–, fraco	–, fraco	–, fraco	+	+	–

O. ureolytica é principalmente um uropatógeno. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é ureia-negativo e raramente oxidase-positivo. Actinobacilos ureia-positivos são oriundos de fontes animais.

* Usar teste rápido de ureia para aumentar a sensibilidade. † Cresce apenas em ágar-chocolate ou em ágar-sangue associado a uma colônia de *Staphylococcus*.

NA = não se aplica; v = variável; ccb = cocobacilos; PDA = fenilalanina deaminase; TSI = ágar triplo-açúcar-ferro; MAC = ágar MacConkey.

Tabela 64.10 Escolha da amostra: melioidose e mormo (*Burkholderia pseudomallei* e *B. mallei*)

Doença	**Escolha da amostra**	**Transporte e armazenamento**	**Plaqueamento e processamento da amostra**				
			SBA	**CA**	**MAC**	**PC**	**Coloração**
Possível exposição a *B. pseudomallei* ou *B. mallei* em pacientes assintomáticos	Sem indicação para culturas nem sorologia						Seguir as orientações da saúde pública se a coleta de amostras for recomendada
Doença clínica	Medula óssea	Transportar em ≤ 2 h, TA. Armazenar ≤ 24 h, 4°C		X		Coloração de Gram	*B. pseudomallei* é um pequeno bacilo Gram-negativo que pode apresentar morfologia bipolar quando corado *B. mallei* é um pequeno cocobacilo Gram-negativo. A incubação deve ser feita a 35–37°C, sob atmosfera ambiente; a incubação em atmosfera com CO_2 é aceitável
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas; OU coletar culturas sanguíneas por lise-centrifugação (p. ex., isolador)	Transportar à TA. Incubar a 35–37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue OU coleta de culturas sanguíneas por lise-centrifugação (p. ex., isolador), e plaqueamento em CA	X			As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas com fita adesiva durante a incubação. A incubação deve ser feita a 35–37°C, sob atmosfera ambiente; a incubação em atmosfera com CO_2 é aceitável

CA = ágar-chocolate; MAC = ágar-MacConkey; PC = meio de cultura seletivo para *Burkholderia cepacia*; TA = temperatura ambiente; SBA = ágar-sangue de carneiro.

Manifestações clínicas

Os sintomas da febre Q em geral são inespecíficos. Existem múltiplas apresentações, entre as quais as mais comuns são pneumonia (47 a 63%), hepatite (60%) ou apenas febre (14%) (Raoult, 2001). Estima-se que a doença febril autolimitada possa, de fato, ser a forma mais comum da doença. O período de incubação é de 2 a 3 semanas. Os organismos proliferam nos pulmões após a inalação de aerossóis contaminados e, então, invadem a circulação sanguínea. A febre Q aguda caracteriza-se pelo início repentino de uma febre alta, dor de cabeça, mialgias, artralgias, tosse e, menos frequentemente, erupções cutâneas ou síndrome meníngea. Além das manifestações radiográficas de pneumonia, os pacientes muitas vezes apresentam níveis elevados de enzimas hepáticas, taxas de sedimentação eritrocitária altas e trombocitopenia. O desenvolvimento da febre Q crônica constitui uma doença mais séria, que pode se manifestar em até 20 anos após a infecção inicial. A principal complicação da febre Q crônica é a endocardite. De modo geral, a taxa de mortalidade associada à febre Q é baixa, em torno de 2,4% (Tissot-Dupont, 1992), mas pode chegar a 65% entre aqueles com febre Q crônica (Raoult, 2001).

Escolha e teste da amostra

O diagnóstico laboratorial da febre Q baseia-se sobretudo no teste sorológico (Fournier, 1998). Pacientes com febre Q aguda comumente produzem resposta de anticorpos principalmente ao antígeno de fase II de *C. burnetii*, enquanto as infecções crônicas por *C. burnetii* costumam desencadear resposta de anticorpos mais forte contra o antígeno de fase I. O diagnóstico pode ser confirmado (1) pela demonstração de alterações equivalentes a 4 vezes ou mais nos títulos de anticorpos quantificados em amostras de soro pareadas de fase aguda e de fase convalescente, utilizando teste de imunofluorescência de anticorpos; (2) pela detecção de *C. burnetii* por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou coloração imuno-histoquímica de material de biópsia de órgãos afetados; ou (3) por culturas realizadas com esse material. Dada a natureza altamente infecciosa desse organismo (BSL-3), amostras provenientes de casos com manifestação de febre Q devem ser imediatamente enviadas ao departamento de saúde local ou estadual, para isolamento e identificação. Como *C. burnetii* é extremamente infeccioso, os laboratórios de nível A (sentinelas) não devem tentar cultivar esse organismo e precisam estar cientes do potencial isolamento inadvertido dessa espécie em sistemas de cultura celular projetados para isolamento de vírus. *C. burnetii* pode ser isolado por acaso em culturas celulares convencionais de ampla variedade de linhagens celulares, entre as quais estão incluídas todas as linhagens de fibroblastos. Após um período de incubação de 5 a 15 dias, as células infectadas por *C. burnetii* são detectadas como inclusões citoplasmáticas.

O soro deve ser coletado (em tubos com tampa vermelha ou em tubos separadores de soro [TSS]) o quanto antes, após o início da manifestação dos sintomas (fase aguda). Decorridos 14 dias (fase convalescente), deve ser coletada uma amostra de soro para seguimento com teste sorológico (Tab. 64.11). O sangue deve ser coletado em um tubo que contenha ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (tampa lilás) ou citrato de sódio (tampa azul) e mantido a 4°C durante o armazenamento e a expedição para ser analisado por PCR ou culturas especiais. Se possível, as amostras devem ser coletadas antes do início da terapia antimicrobiana. Tecidos, líquidos corporais e outros materiais, incluindo cultura de células e sobrenadantes celulares, podem ser mantidos entre 2 e 8°C, quando transportados dentro de 24 horas. Essas amostras devem ser armazenadas sob congelamento a –70°C ou em gelo seco.

Os laboratórios de nível A (sentinelas) devem consultar o diretor do laboratório de saúde pública estadual (ou funcionário responsável), antes dos testes ou durante a sua realização, quando o médico que estiver cuidando do caso suspeitar de *C. burnetii*. A sorologia é disponibilizada tanto em laboratórios comerciais de referência quanto em laboratórios de saúde pública. Resultados positivos devem ser comunicados ao médico do paciente e aos oficiais de controle de infecção hospitalar e de saúde pública.

Tabela 64.11 Escolha da amostra: febre Q (*Coxiella burnetii*)

Escolha da amostra	Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra
Soro: coletar 10 mL de soro (tubos de tampa vermelha, tigrada ou dourada) o quanto antes, logo após o início dos sintomas (fase aguda). Coletar uma amostra para seguimento (fase convalescente) a partir do 14° dia e analisar por sorologia.	Transportar dentro de ≈6 h, a 4°C. Armazenar a uma temperatura entre –20 e –70 °C	**Não tentar o isolamento a partir da cultura de tecidos.** Isso poderia resultar em uma situação bastante perigosa, envolvendo significativa quantidade de organismos infecciosos. Os laboratórios-sentinela devem consultar o diretor do laboratório estadual de saúde pública (ou funcionário responsável) antes ou durante a realização de testes para identificação, se houver suspeita de *C. burnetii* por parte do médico atendente. A sorologia é disponibilizada em laboratórios de referência comerciais e nos laboratórios de saúde pública
Sangue: coletar sangue em EDTA (tubos com tampa lilás) ou citrato de sódio (tubos com tampa azul) e manter as amostras a 4°C durante o armazenamento e a expedição para realização de testes de PCR ou culturas especiais. Se possível, coletar as amostras antes do início da terapia antimicrobiana.	Transportar dentro de ≈6 h a 4°C. Armazenar a –4 °C	
Tecidos, líquidos corporais e outros materiais, incluindo culturas e sobrenadantes celulares: as amostras podem ser mantidas a 2–8°C se forem transportadas dentro de 24 h. Para fins de armazenamento, as amostras devem ser congeladas a –70°C ou em gelo seco.	Transportar em menos de 24 h a 2–8°C. Armazenar a –70°C ou em gelo seco	

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético.

Francisella tularensis

Francisella tularensis é um cocobacilo minúsculo (0,2–0,5 μm × 0,7–1 μm), pleiomórfico, desprovido de motilidade, Gram-negativo e intracelular facultativo. É um organismo fastidioso e pode requerer suplementação de cisteína para crescer bem nos meios de cultura laboratoriais em geral (Wong, 1999).

Manifestações clínicas

Os sintomas da tularemia não são exclusivos. O período de incubação é de 2 a 10 dias. Existem múltiplas apresentações, dentre as quais a mais comum é a doença ulcerativa glandular (45–80%). As bactérias se replicam na pele, no sítio de penetração localizado, no qual é comum haver formação de úlcera. A partir do(s) sítio(s) de penetração, as bactérias são transportadas pelo sistema linfático para os nódulos regionais e, então, disseminam-se para o sangue e outros sítios. O início é repentino: em geral, o paciente apresenta uma temperatura de 38 a 40°C, que é acompanhada de calafrios, dor de cabeça, dores generalizadas pelo corpo (por vezes proeminentes nas costas), coriza, faringite, tosse e dor torácica ou rigidez. Sem tratamento, os sintomas inespecíficos usualmente persistem durante várias semanas, e o paciente apresenta sudorese, calafrios, enfraquecimento progressivo e perda de peso característicos da doença. Outras formas de tularemia podem ser agravadas pela disseminação bacterêmica, com subsequente desenvolvimento variável de pneumonia, sepse e meningite (rara) tularêmicas (Overholt, 1961).

Seleção e teste da amostra

São amostras aceitáveis: sangue, amostras de tecidos obtidas por biópsia, raspado ou aspirado de úlcera e amostras de tecido afetado (Tab. 64.12). Deve ser realizado um procedimento de coloração Gram/controle de qualidade por meio do protocolo laboratorial padrão. A coloração de *F. tularensis* por vezes revela a presença de minúsculos cocobacilos (0,2–0,5 μm × 0,7–1 μm) pleiomórficos fracamente corados e Gram-negativos, vistos sobretudo como células isoladas. A interpretação dos resultados da coloração de Gram pode ser difícil, pois as células são mínima e fracamente coradas. As células de *F. tularensis* são menores que as de *Haemophilus influenzae*. A coloração bipolar não constitui um aspecto distintivo das células de *F. tularensis*. Esse organismo cresce em meios de cultura de sangue comerciais e requer suplementação de cisteína. Portanto, *F. tularensis* pode crescer primeiramente em SBA; contudo, após passagens subsequentes, deixará de crescer em meio SBA padrão. Em placas de ágar suplementadas com cisteína, esses organismos formam colônias opacas de cor cinza esbranquiçada que costumam ser pequenas demais para visualização em 24 horas nos meios de cultura mais genéricos, como ágar-chocolate, Thayer-Martin e ágar com extrato de levedura-carvão tamponado. Após um período de incubação mínimo de 48 horas, as colônias apresentarão as seguintes características: diâmetro de 1 a 2 mm, aspecto

Tabela 64.12 Escolha da amostra: tularemia (*Francisella tularensis*)

Doença	Escolha da amostra	Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra				Outros
			SBA	CA	MAC	Coloração	
Possível exposição a *F. tularensis* em paciente assintomático	Sem indicação para culturas nem sorologia						Seguir as orientações da saúde pública se a coleta de amostras for recomendada
Tularemia oculoglandular	Raspado conjuntival	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram; preparar esfregaços para encaminhar para TAFD	Adicionar uma placa de BCYE e proceder ao plaqueamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* (p. ex., Thayer-Martin modificado). Manipular as culturas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	Aspirado de linfonodo: pode ser necessário aplicar um jato de 1 mL de salina estéril para obter o material	Transportar à TA ou, se houver atraso, a 4°C Armazenar ≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram; preparar esfregaços para encaminhar para TAFD	
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas. O crescimento é mais provável a partir do frasco aeróbio	Transportar à TA ou, se houver atraso, a 4°C Armazenar ≤ 24 h, 4°C	Frascos de cultura de sangue; fazer subcultura do caldo para placas de BCYE e incubar sob condições aeróbias				As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
Tularemia ulcerativa glandular	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas. O crescimento é mais provável a partir do frasco aeróbio	Transportar à TA. Incubar a 35–37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue; fazer subcultura do caldo para placas de BCYE e incubar sob condições aeróbias				As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	Úlcera ou tecido: coletar biópsia (melhor amostra), raspado ou *swab*.	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	Adicionar uma placa de BCYE e proceder ao plaqueamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* (p. ex., Thayer-Martin modificado). Preparar esfregaços para encaminhar para TAFD. As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	Aspirado de linfonodo: pode ser necessário aplicar um jato de 1 mL de salina estéril para obter o material	Transportar à TA ou, se houver atraso, a 4°C Armazenar ≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	
Tularemia pneumônica	Escarro/garganta: coletar amostra de expectoração em frasco estéril e à prova de vazamento	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram; preparar esfregaços para encaminhar para TAFD	Adicionar uma placa de BCYE e proceder ao plaqueamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* (p. ex., Thayer-Martin modificado). Preparar esfregaços para encaminhar para TAFD. As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	Lavado bronquial/traqueal: coletar amostra conforme o procedimento da instituição, em uma área destinada à coleta de amostras respiratórias sob condições de isolamento/contenção (i. e., câmara/"bolha" de isolamento)	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma das baterias consiste em 2 frascos) conforme o procedimento institucional de rotina para culturas sanguíneas. O crescimento é mais provável a partir do frasco aeróbio	Transportar à TA. Incubar a 35–37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue; fazer subcultura do caldo para placas de BCYE e incubar sob condições aeróbias				As culturas devem ser manipuladas em cabine de biossegurança. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara e barreira protetora facial. Todas as culturas devem ser vedadas durante a incubação.
	2 tubos de tampa vermelha ou dourada: para PCR e sorologia (soro de fase aguda e, quando necessário para fins diagnósticos, soro de fase convalescente de 14 d)	≤ 2 h, TA; ≤ 24 h, 4°C	Não				O resultado positivo do teste sorológico atenderia aos critérios prováveis. A confirmação requer identificação de cultura ou aumento de título equivalente a 4 vezes.

BCYE = ágar extrato de levedura-carvão tamponado; CA = ágar-chocolate; TAFD = teste do anticorpo fluorescente direto; MAC = ágar MacConkey; TA = temperatura ambiente; SBA = ágar-sangue de carneiro.

opaco e achatado, cor que varia do cinza esbranquiçado ao cinza azulado, bordas inteiras, aspecto liso e superfície reluzente. *F. tularensis* não cresce em placas que contenham ágar MacConkey ou EMB. Como ilustrado na Figura 64.6, *F. tularensis* também é oxidase-negativo, fracamente catalase-positivo, β-lactamase-positivo, negativo para o teste-satélite ou teste-XV e negativo para o teste de urease.

É necessário comunicar de imediato o diretor (ou funcionário designado) do laboratório de saúde pública e um oficial epidemiologista/de saúde do departamento estadual de saúde pública caso não seja possível excluir *F. tularensis* e se suspeite de um evento de bioterrorismo. O médico/responsável pelo controle de infecções deve ser prontamente notificado, conforme as políticas internas, caso não seja possível excluir *F. tularensis*.

O caso mais comum de identificação errônea de *F. tularensis* é sua identificação como *H. influenzae* (satélite ou XV-positivo) e como espécie de *Actinobacillus* (β-lactamase-negativo). A identificação de isolados pelo emprego de sistemas de identificação comerciais não é recomendada, em razão da alta probabilidade de erro. O perfil Vitek NHI pode fornecer níveis de confiança de até 99% para a identificação de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em amostras que contenham *F. tularensis*.

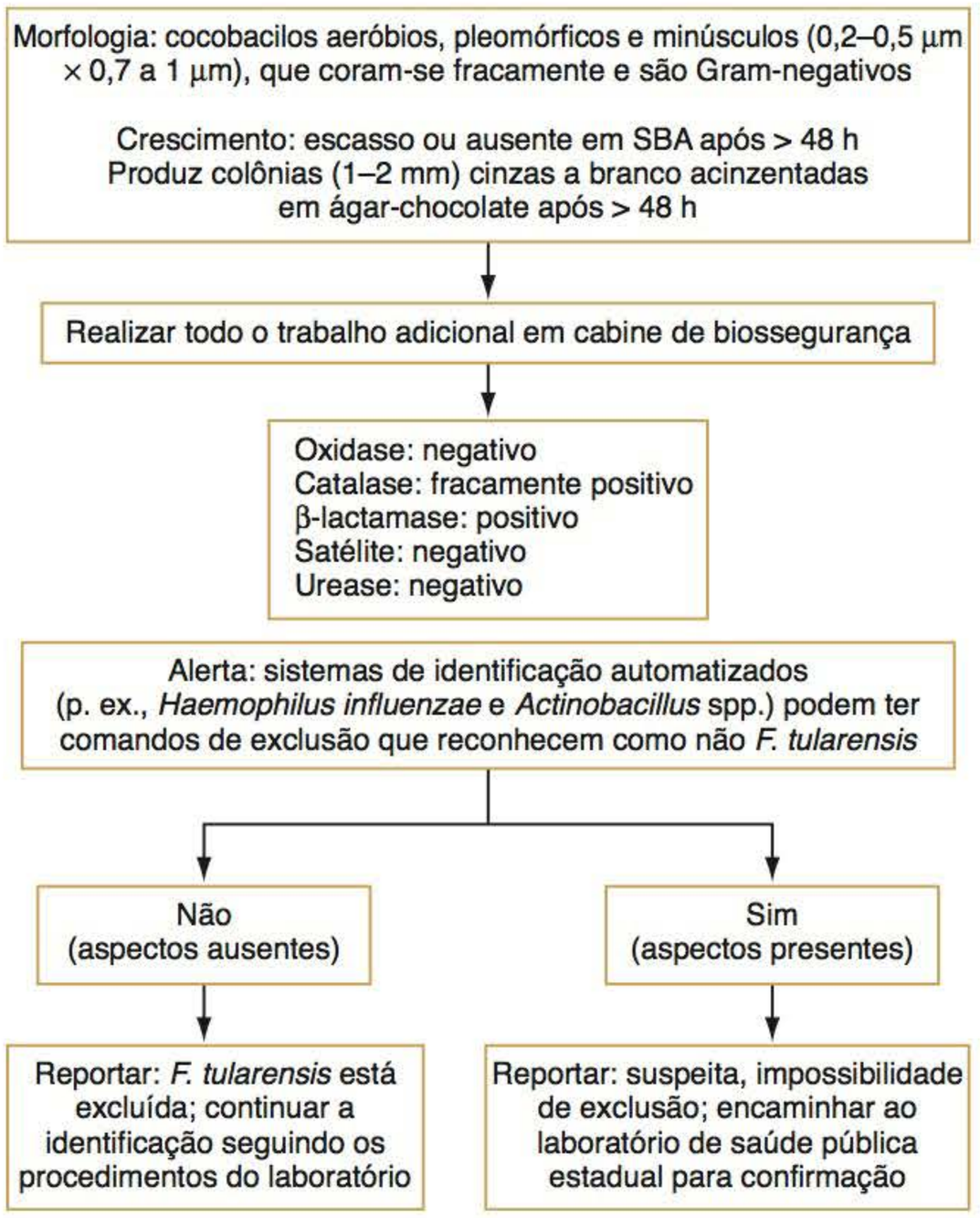


Figura 64.6 *Francisella tularensis*: fluxograma de um laboratório-sentinela. SBA = ágar-sangue de carneiro.

Vírus desconhecidos

Os vírus descritos como potenciais agentes de bioterrorismo estão listados nas Tabelas 64.13 e 64.14. Esses vírus são possíveis candidatos à recepção como vírus desconhecidos pelos laboratórios, em casos de surto (Henderson, 1999; Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Diante da suspeita de infecção por vírus da varíola, filovírus, arenavírus, alfavírus ou vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo, é necessário contatar os oficiais de saúde pública antes de coletar amostras. Não se deve coletar amostras e utilizar meios de transporte de vírus, a não ser diante de uma solicitação específica por parte dos oficiais de saúde pública. Amostras de origem animal ou ambiental devem ser recusadas e enviadas diretamente ao laboratório estadual de saúde. Nesse caso, os oficiais de saúde pública devem ser alertados. As amostras destinadas à exclusão de um potencial agente viral de bioterrorismo não devem ser inoculadas em culturas celulares. Em tais circunstâncias, é necessário informar de imediato a equipe de funcionários devidamente designada pelo protocolo hospitalar de prontidão para casos de bioterrorismo. A equipe médica deve iniciar uma comunicação direta com o departamento de saúde local ou estadual. Padrões não reconhecíveis de efeito citopático (ECP) podem ser produzidos por um potencial agente de bioterrorismo. Consulte o médico para verificar se a apresentação clínica do paciente é consistente com um caso de varíola ou de infecção viral hemorrágica. Se a história e/ou doença apresentada pelo paciente forem consistentes, o departamento de saúde pública deve ser notificado sobre o caso, e devem ser seguidas as instruções referentes ao envio de cultura e amostras remanescentes para o laboratório apropriado.

Varíola

A transmissão do vírus da varíola ocorre por meio da inalação direta de aerossóis infecciosos ou pelo contato direto com materiais contaminados (Ropp, 1999). A disseminação viral pode ocorrer com o início da febre (fase pródromo), no entanto é mais intensa no início do aparecimento das erupções cutâneas. A infectividade diminui com o início da formação das crostas das feridas, entretanto o indivíduo ainda é capaz de contagiar outras pessoas até a erradicação de todas as crostas. Os sintomas se desenvolvem em cerca de 12 a 14 dias após a exposição primária. Pode se passar um período aproximado de 2 semanas até que os sintomas visíveis sejam detectados e o diagnóstico seja confirmado. Os sintomas são comuns a diversas infecções virais e incluem febre e mialgias severas (Tab. 64.15). O surgimento inicial das vesículas ocorre na orofaringe, dentro de 72 horas após a manifestação dos primeiros sintomas. Em seguida, há disseminação de lesões primeiramente na face e, então, nos braços, nas mãos e nos pés, no decorrer dos 7 a 14 dias seguintes. As vesículas são mais abundantes na face, nos antebraços e na parte inferior das pernas, sendo mais escassas no tronco. As erupções da varíola inicialmente apresentam-se como pápulas eritematosas, que evoluem e originam vesículas, pústulas e, por fim, crostas de feridas. Uma infecção de progressão rápida pode levar o paciente à morte em 5 a 7 dias. A forma mais clássica da infecção pode causar morte em 10 a 14 dias.

A doença mais confundida com a varíola é a catapora. Durante os 2 a 3 primeiros dias de doença, o aspecto das erupções cutâneas da varíola é indistinguível daquele exibido pelas erupções cutâneas da catapora. Todavia, existem várias diferenças notáveis que auxiliam a identificar de maneira correta a síndrome viral: (1) as lesões da varíola se desenvolvem de maneira simultânea, amadurecem com uniformidade e se dispersam em iguais concentrações pelos sítios corporais infectados. Durante a catapora, em contraste, diferentes estágios de desenvolvimento das lesões (coleções) ocorrem ao mesmo tempo; (2) as

Tabela 64.13 Potenciais agentes virais de bioterrorismo

Poxviridae	*Arenaviridae*	*Bunyaviridae*	*Flaviviridae*	*Filoviridae*	*Alfavírus*
Vírus da varíola	Vírus da febre de Lassa Vírus Junin (FH argentina) Vírus Machupo (FH boliviana) Vírus Guanarito (FH venezuelana)	Vírus da febre de Rift Valley Vírus da FH da Crimeia-Congo Hantavírus (FH)	Vírus da doença de Floresta de Kyasanur Vírus da FH Omsk Vírus da FH da dengue Vírus da febre amarela	Vírus Ebola Vírus Marburg	Vírus da encefalite equina oriental Vírus da encefalite equina ocidental Vírus da encefalite equina venezuelana

FH = febre hemorrágica.

Tabela 64.14 Epidemiologia dos agentes virais de bioterrorismo

Família do vírus	Doença	Localização geográfica	Transmissão	Prevenção
Poxviridae	Varíola	Desconhecida*	Pessoa a pessoa	Vacina
Arenaviridae	Febre de Lassa	África Ocidental	Roedores	Ribavirina
	Febres hemorrágicas sul-americanas	América do Sul	Roedores	Vacina/plasma†
Bunyaviridae	Febre hemorrágica da Crimeia-Congo	Ásia, África Central	Carrapato	
	Febre de Rift Valley	África	Mosquito; sangue de animais infectados (p. ex., carneiro)	
Hantavírus	Febre hemorrágica	Sudeste asiático	Roedores	
Flaviviridae	Febre amarela	América do Sul, África	Mosquito	Vacina
	Febre hemorrágica da dengue	Ásia, África, Austrália, Américas	Mosquito	Repelentes de inseto (DEET)
	Doença de Kysanur Forest	Índia	Carrapato	Vacina
	Febre hemorrágica de Omsk	Rússia	Carrapato Rato-almiscarado	
Filoviridae	Febres hemorrágicas Ebola e Marburg	África	Contato direto‡	
Alfavírus	Encefalite equina oriental	Do Canadá até a América do Sul, Caribe	Mosquito	Não há vacina humana
	Encefalite equina ocidental	Do Canadá até a América do Sul	Mosquito	Não há vacina humana
	Encefalite equina venezuelana	América do Sul	Mosquito	Não há vacina humana

* A varíola foi considerada erradicada no mundo inteiro em 1980. † Vacina disponível apenas para o vírus Junin. A terapia à base de plasma da fase convalescente é útil em certos casos de febre hemorrágica sul-americana. ‡ O contato direto com líquidos corporais infectados (incluindo vômito, urina e fezes) promove a transmissão dos arenavírus ou filovírus. A transmissão pela via aérea também representa uma possibilidade, ainda que remota.

Tabela 64.15 Doenças com sintomas compatíveis aos da varíola ou de outras infecções por agentes virais de bioterrorismo

Pré-exantema	Exantema inicial	Exantema tardio
Influenza	Sarampo, rubéola	Catapora
Sepse	Varicela-zoster	Eritema multiforme
Infecção do sistema nervoso central	Exantema viral misto*	Síndrome de Stevens-Johnson
	Erupções cutâneas farmacológicas	Escabiose
Apendicite	Sífilis	Impetigo
Pneumonia	Eritema multiforme	Erupções cutâneas farmacológicas
Leucemia	Picadas de insetos	Pênfigo
Febre entérica	Meningococcemia†	Exantema viral misto*
		Meningococcemia†

* Um exantema viral misto (erupção cutânea) incluiria as infecções causadas pelo vírus do herpes simples, vírus varicela-zoster, enterovírus ou outros poxvírus, tais como os agentes causadores da vacínia, molusco contagioso ou ainda outros poxvírus que sejam transmissíveis de animais para seres humanos, como o vírus da varíola do macaco. † A meningococcemia poderia ser confundida com varíola hemorrágica.

vesículas da varíola são mais abundantes na face, nos antebraços e na parte inferior das pernas, sendo mais escassas no tronco. Na catapora, as lesões com frequência localizam-se no tronco e na cabeça.

Alguns indivíduos desenvolvem complicações após serem imunizados com a vacina contra varíola. As síndromes atualmente descritas são: (1) vacínia generalizada – infecção inofensiva tipificada pelo aparecimento de numerosas lesões no corpo; (2) vacínia progressiva (*vaccinia necrosum*), caracterizada pela necrose progressiva do sítio de vacinação; (3) eczema *vaccinatum* – infecção por vezes grave, que ocorre em indivíduos com eczema; (4) eritema multiforme – erupção cutânea eritematosa possivelmente associada a uma reação alérgica; e (5) encefalite pós-vacinal – infecção rara do sistema nervoso central que ocorre nas vacinações primárias.

Alfavírus

Mais notavelmente reconhecidos como agentes da encefalite equina, os alfavírus são capazes de produzir a doença humana epidêmica (Beaty, 1995; Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Em seres humanos, assim como nos cavalos, os vírus tendem a infectar o sistema nervoso central. Sintomas generalizados (p. ex., febre, mal-estar e dor de cabeça) precedem o início da encefalite. Dependendo do agente etiológico, os sintomas podem evoluir para manifestações neurológicas mais sérias. Considerando as 3 síndromes virais, a encefalite equina venezuelana (EEV) está associada à menor taxa de morbimortalidade. Sintomas semelhantes aos de uma síndrome de gripe usualmente se manifestam após um período de incubação de menos de 1 semana. Apenas um pequeno percentual dos casos progride para o envolvimento neurológico, e as expectativas de recuperação ultrapassam aquelas associadas às infecções pelo vírus da encefalite equina oriental (EEOR) ou pelo vírus da encefalite equina ocidental (EEOC). Tanto a EEOR quanto a EEOC produzem efeitos mais graves que, com frequência, progridem para coma. A incidência de fatalidades é maior na EEOR, e a infecção muitas vezes deixa sequelas. Assim como para todos os arbovírus, um vetor (mosquito ou roedor) dissemina os alfavírus na natureza. A transmissão humana via aerossóis infecciosos faz desse vírus um potencial agente de bioterrorismo.

Vírus causadores de febres hemorrágicas

Os sintomas clínicos são variáveis, dependendo do vírus e da resposta do paciente (Borio, 2002). Após diferentes períodos de incubação, que podem ser de 2 dias a 3 semanas, o paciente apresenta sintomas gerais de febre, dor de cabeça, sintomas diversos associados ao sistema nervoso central, mal-estar, dores musculares e articulares, náusea, diarreia e tosse. O vírus da febre hemorrágica sul-americana (SAHF, *South America hemorrhagic fever*) produz petéquias sobre as regiões do palato e axilar. Os filovírus produzem erupções cutâneas maculopapulares no tronco. À medida que a infecção progride, há desenvolvimento de petéquias e hemorragias nas membranas mucosas, assim como presença de sangue em urina e vômito. Coagulopatia, dano microvascular, choque circulatório e insuficiência de múltiplos órgãos caracterizam os estágios tardios da infecção. Os vírus causadores da febre de Lassa e da febre de Rift Valley produzem manifestações hemorrágicas menos severas que aquelas observadas na SAHF, na febre hemorrágica da Crimeia-Congo e nas infecções pelos vírus Ebola e Marburg. A necrose hepática severa e a renite são manifestações exclusivas da febre de Rift Valley. Dependendo do patógeno, as taxas de mortalidade variam de baixas a muito altas (vírus Ebola). O modo de transmissão dos vírus Ebola e Marburg envolvem o contato íntimo com líquidos e tecidos infectados.

Manifestações clínicas

O reconhecimento dos sinais iniciais de uma epidemia viral em uma população é variável e depende de certos fatores, tais como modo de transmissão, período de incubação e apresentação clínica. A liberação dos vírus usualmente ocorre antes do início dos sintomas e continua ao longo de todo o curso da doença. A coleta de amostras durante a fase inicial da infecção aumenta a capacidade do laboratório de recuperar ou detectar os vírus. A transmissão pode ocorrer por contato direto com um indivíduo (ou animal) infectado, exposição a fômites contaminados ou por meio da picada de um inseto-vetor. Uma epidemia propagada por contato entre pessoas dissemina-se mais lentamente na população. A exposição viral por uma fonte compartilhada (p. ex., alimentos e água contaminados, produtos aerossolizados) resulta em doença concomitante que afeta um número maior de indivíduos. O laboratório deve estar alerta quanto à possível presença de um vírus desconhecido em amostras de diversos tipos. Algumas infecções virais se disseminam a partir de um sítio de infecção primário para uma localização secundária, no hospedeiro. O vírus da varíola, por exemplo, é liberado a partir da mucosa do trato respiratório superior durante os estágios bem iniciais da infecção, contudo é encontrado em concentrações maiores nas características lesões cutâneas que se desenvolvem posteriormente. A diferenciação de um vírus desconhecido em relação a outros patógenos é importante tanto para o controle quanto para a rápida detecção de uma infecção.

Escolha e teste da amostra

Diante da suspeita de infecção por vírus da varíola, filovírus, arenavírus, alfavírus ou vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo, os oficiais de saúde pública devem ser alertados antes da coleta de amostras para teste diagnóstico. As amostras destinadas à exclusão de um potencial agente viral de bioterrorismo não devem ser inoculadas em culturas celulares. Em tais circunstâncias, é necessário informar de imediato a equipe de funcionários devidamente designada pelo protocolo hospitalar de prontidão para casos de bioterrorismo. A equipe médica deve iniciar uma comunicação direta com o departamento de saúde local ou estadual. Laboratórios-sentinela não devem aceitar amostras de origem animal ou ambiental, as quais devem ser enviadas diretamente para o laboratório de saúde estadual. As amostras apropriadas para detecção do vírus da varíola incluem lesões cutâneas, líquido vesicular, raspagens e crostas (Tab. 64.16). As amostras para detecção de alfavírus incluem secreções respiratórias, sangue e líquido cerebrospinal (Tab. 64.16). As amostras consideradas adequadas para a identificação dos vírus causadores de febres hemorrágicas são soro, plasma heparinizado (sem EDTA, citrato nem oxalato), sangue total, lavados de garganta, tecidos e urina (Tab. 64.16). As amostras apropriadas para a identificação de vírus desconhecidos incluem qualquer tipo de amostra viral ou bacteriana obtida a partir de um caso sem identificação clínica (Tab. 64.16).

Padrões não identificáveis de ECP poderiam ser causados por um potencial agente de bioterrorismo (Fig. 64.7). Consulte o médico para averiguar se a apresentação clínica do paciente é consistente com um caso de varíola ou de infecção por vírus hemorrágico. Se a história e/ou doença apresentada pelo paciente forem consistentes, não devem ser realizadas manipulações adicionais de culturas celulares. Notifique o departamento de saúde pública e siga as instruções para envio de culturas e amostras remanescentes ao laboratório apropriado.

Varíola: o agente causador da varíola (vírus da varíola) cresce nas linhagens celulares utilizadas para herpesvírus. O ECP é descrito como arredondamento hipertrófico das células da monocamada. *Alfavírus*: as linhagens celulares que permitem o crescimento dos alfavírus são MCR-5, A-549, Vero, LLCMK e rim de hamster. O ECP pode ocorrer somente após as passagens. *Vírus da febre hemorrágica*: filovírus, arenavírus e vírus da SAHF são cultiváveis em linhagens de células de primatas não humanos e de células humanas, tais como Vero e MRC-5. A hemadsorção de tipos específicos de eritrócitos humanos ou animais sobre a monocamada celular determina a presença de vírus produtor de hemaglutinina. Nenhum dos agentes virais de bioterrorismo identificados até o presente seria capaz de produzir hemadsorção sobre monocamadas. Se o vírus não for identificável por meio dos métodos padrão, é necessário entrar em contato com o médico do paciente para confirmar se a história clínica é consistente com um caso de infecção promovida por agente viral de bioterrorismo. Se a história e/ou doença apresentada pelo paciente forem consistentes com a exposição a um agente viral de bioterrorismo, as amostras ou culturas não devem ser destruídas. Nesse caso, é necessário contatar os oficiais de saúde pública para obter instruções. Todavia, se a história e/ou doença apresentada pelo paciente não forem consistentes com o envolvimento de agente viral de bioterrorismo, deve-se seguir o protocolo de rotina do laboratório.

O agente causador da varíola crescerá e produzirá ECP nas linhagens celulares utilizadas para os herpesvírus
Os vírus causadores de febre hemorrágica viral (FHV), como o Ebola, crescerão em linhagens celulares de primatas não humanos e em linhagens celulares humanas

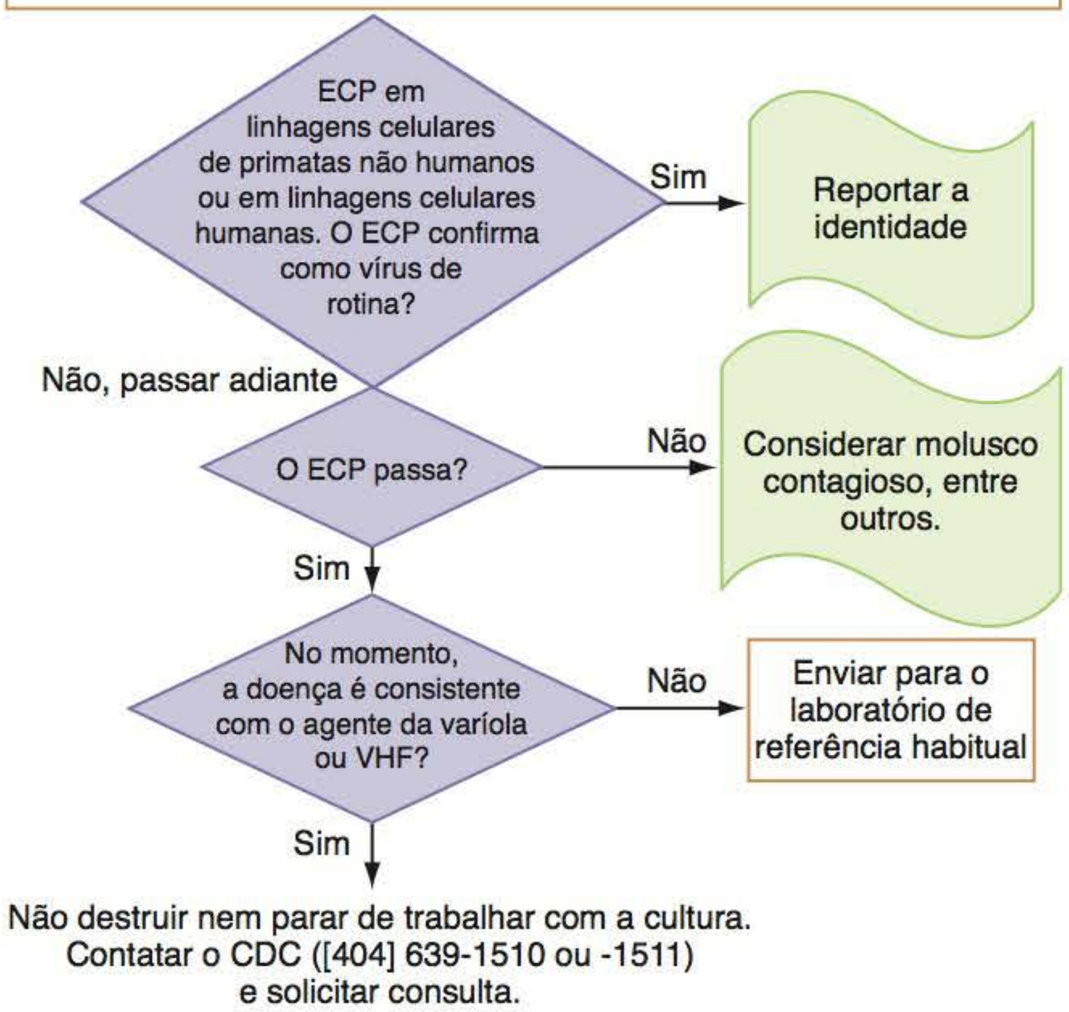


Figura 64.7 Vírus desconhecidos: fluxograma do laboratório-sentinela. ECP = efeito citopático.

Yersinia pestis

Yersinia pestis é um organismo facultativo desprovido de motilidade que apresenta crescimento lento. É classificado como pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Esses organismos são vistos como cocobacilos roliços e Gram-negativos, principalmente como células isoladas ou pares de células, e podem exibir coloração bipolar a partir de uma amostra direta.

O homem pode adquirir a peste pela picada de pulgas infectadas, pelo contato direto com tecido contaminado ou por via inalatória (Perry, 1997). Clinicamente, a peste pode ocorrer sob 3 formas distintas: bubônica, septicêmica e pneumônica (Perry, 1997). A peste bubônica é caracterizada por sepse, que é acompanhada por início súbito de febre, calafrios, fraqueza, dor de cabeça e formação de bubões (inchaço dos linfonodos regionais da virilha, axila ou pescoço). A peste septicêmica é similar à peste bubônica, porém não envolve inchaço dos linfonodos. A peste pneumônica, que constitui a forma mais letal e rapidamente transmissível da doença, apresenta-se como febre e linfadenopatia acompanhadas de tosse, dor torácica e, com frequência, hemoptise. O paciente pode desenvolver pneumonia secundária à disseminação hematógena do organismo (peste pneumônica secundária). Às vezes, o organismo também pode ser transmitido de uma pessoa a outra pelo contato próximo, como ocorre na peste pneumônica primária (Campbell, 1998). Provavelmente, a peste pneumônica primária seria a forma observada se *Y. pestis* fosse utilizada em um evento de bioterrorismo.

As amostras oriundas do trato respiratório inferior (pneumônicas) incluem lavado bronquial ou aspirado transtraqueal (Tab. 64.17). Para amostras de sangue (septicêmicas), devem ser coletados o volume de sangue apropriado e o número de conjuntos determinado pelo

Tabela 64.16 Escolha da amostra: doenças virais

Doença/ agente	Escolha da amostra		Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra
Varíola (vírus da varíola)	Consulte o documento do CDC *Specimen Collection and Transport Guidelines* para obter instruções detalhadas: http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/índex.asp#guidec (clicar em "Guide D"). NOTA: apenas recentemente, uma equipe de indivíduos vacinados com sucesso (dentro de um período de 3 anos) e utilizando barreiras de proteção adequadas (luvas, jaleco e protetores de sapatos) passou a ser considerada como capacitada a se envolver na coleta de amostras de casos com quadro de varíola. A proteção respiratória é desnecessária àqueles que foram recém-vacinados de forma bem-sucedida. Máscaras e óculos ou barreiras de proteção facial devem ser utilizados para prevenção contra possíveis espirros de amostra. Caso seja necessário enviar pessoal não vacinado para coletar amostras, somente aqueles que não apresentam contraindicações à vacinação devem ser selecionados para a tarefa, pois esses indivíduos deverão ser vacinados imediatamente caso venham a apresentar confirmação de um diagnóstico de varíola. Máscaras N95 testadas e ajustadas devem ser utilizadas por indivíduos não vacinados que estejam prestando assistência a pacientes com o quadro da doença.			
	Erupções cutâneas	Amostras obtidas por biópsia Crostas de feridas Líquido vesicular	Consulte o documento do CDC *Specimen Collection and Transport Guidelines* para obter instruções detalhadas (*Guide D*).	1. **Um caso com quadro de varíola deve ser reportado imediatamente aos respectivos departamentos de saúde local e estadual para revisão.** **NOTA: é preciso obter consentimento antes de enviar ao CDC amostras clínicas oriundas de um potencial paciente com varíola.** 2. Nesse momento, devem ser revistos os requisitos para embalamento/remessa exigidos pelo CDC, e também deve ser solicitada assistência na coordenação de um carregador para transporte/remessa. A. **Manusear/carregar todas as amostras e não enviar amostras via sistema de tubos pneumáticos.** B. Não tentar realizar culturas virais: esse vírus é um agente de biossegurança de nível 4 e qualquer tentativa de cultura geraria uma situação bastante perigosa, envolvendo grande quantidade de vírus infecciosos.
	Swab de tecido tonsilar posterior	*Swab*		
	Sangue	Usar tubos de plástico		
	Autópsia	Porções da pele que contenham lesões, fígado, baço, pilmões, linfonodos e/ou rim		
Febres hemorrágicas (incluindo diversos vírus: Ebola, Marburg, Lassa, Machupo, Junin, Guanarito, Sabia, febre hemorrágica da Crimeia-Congo, febre de Rift Valley, febre hemorrágica Osmk, doença de Kyasanur Forest, entre outros)	Soro para teste de anticorpos: coletar sangue em tubos de tampa vermelha ou dourada. Obter soro de fase convalescente, no mínimo 14 dias após a obtenção da amostra de fase aguda. Utilizar tubo Vacutainer ou outro tipo de tubo vedado, estéril e seco para coleta de sangue.		Transportar dentro de ≈2 h, à TA. Armazenar entre –20 e –70°C.	Condições específicas de manipulação estão sendo desenvolvidas atualmente. É necessário entrar em contato com o CDC para discutir formas adequadas de coleta e manuseio. 1. Colocar a amostra em embalagens duplas. 2. Limpar a parte externa da embalagem com desinfetante *antes* de removê-la do quarto do paciente. 3. Não utilizar tubos de vidro. 4. Manipular e carregar todas as amostras, e não enviá-las pelo sistema de tubos pneumáticos. **NOTA:** equipamentos descartáveis e pontiagudos devem ser descartados dentro de recipientes rígidos que contenham desinfetante e, em seguida, autoclavados ou incinerados. O lixo deve ser transferido para sacos duplos. O lado externo do saco deve ser tratado com desinfetante e, então, autoclavado ou incinerado. **Não tentar fazer isolamento a partir de culturas teciduais**. Essa prática somente deve ser feita em instalações de nível 4 de biossegurança. No laboratório: 1. Devem ser adotadas barreiras preventivas rigorosas. O equipamento de proteção pessoal inclui luvas, jaleco, máscara, protetores de sapatos e barreira protetora facial. 2. Sempre que possível, manusear as amostras dentro de uma cabine de segurança biológica. 3. Considerar o uso de uma máscara respiratória com filtro HEPA.
	Cultura viral, sangue: coletar soro, plasma heparinizado (tubo de tampa verde) ou sangue total durante a fase aguda da doença febril.		Transportar à TA. Armazenar a 4°C ou sob congelamento em gelo seco ou nitrogênio líquido.	
	Amostras de lavado da garganta: misturar com igual volume de meio de transporte viral.		Transportar no gelo (molhado). Armazenar a –40°C ou a temperaturas mais baixas.	
	Urina: misturar com igual volume de meio de transporte viral.		Transportar no gelo (molhado). Armazenar a –40°C ou a temperaturas mais baixas.	
	Líquido cerebrospinal, tecidos, outras amostras.		Conforme discutido com CDC.	

Tabela 64.16 Escolha da amostra: doenças virais (*continuação*)

Doença/ agente	Escolha da amostra	Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra
	Culturas de sangue: quando houver garantias fornecidas pela história clínica e pelo histórico de viagens, coletar 2 baterias (uma bateria equivale a 2 frascos) de culturas de sangue conforme o procedimento institucional para culturas sanguíneas de rotina. Esfregaço de sangue periférico para detecção de malária: quando houver garantias fornecidas pela história clínica e pelo histórico de viagens.	Transportar à TA. Incubar a 35 a 37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea. Tubo com tampa lilás à TA.	4. As amostras devem ser centrifugadas a baixa rotação. Bacteremia com coagulação intravascular disseminada e malária causada por *Plasmodium falciparum* constituem 2 entidades clínicas prejudiciais à vida e tratáveis, que podem apresentar achados clínicos proeminentes de hemorragia e febre em um paciente com histórico de viagem para áreas onde há febre hemorrágica viral. Manusear as amostras com cuidado, conforme já mencionado. Continuar a adotar as mesmas precauções anteriormente descritas.
Alfavírus (inclui os vírus causadores de encefalite equina oriental, encefalite equina ocidental e encefalite equina venezuelana, entre outros)	Soro: coletar 10 mL de soro (tubos de tampa vermelha, tigrada ou dourada) o quanto antes, logo após o início dos sintomas (fase aguda). Coletar uma amostra para seguimento (fase convalescente) a partir do 14° dia e analisar por sorologia. Sangue: coletar sangue em EDTA (tubos com tampa lilás) ou citrato de sódio (tubos com tampa azul) e manter as amostras a 4°C durante o armazenamento e expedição para realização de testes de PCR ou estudos especiais. Líquido cerebrospinal: as amostras (com mais de 1 mL) podem ser mantidas a 2–8°C se forem transportadas dentro de 24 h. Se estiverem congeladas, armazenar a –70°C e transportar em gelo seco. Tecidos, líquidos corporais e outros materiais, incluindo culturas e sobrenadantes celulares: as amostras podem ser mantidas a 2–8°C se forem transportadas dentro de 24 h. Para fins de armazenamento, as amostras devem ser congeladas a –70°C e transportadas em gelo seco.	Transportar dentro de ≈6 h, a 4°C. Armazenar entre –20 e –70°C. Transportar dentro de ≈6 h, a 4°C. Armazenar a –4°C. Transportar em gelo (molhado). Se já estiverem congeladas, armazenar a –70°C e transportar em gelo seco.	**Não tentar fazer isolamento a partir de culturas teciduais**, pois isso geraria uma situação bastante perigosa, envolvendo grande quantidade de vírus infecciosos.

CDC = Centers for Disease Control and Prevention; EDTA = ácido etilenodiaminotetracético; TA = temperatura ambiente.

protocolo laboratorial previamente estabelecido. Nos casos em que se suspeitar de peste, uma cultura adicional de sangue ou de caldo (caldo nutritivo de uso geral) deve ser incubada à temperatura ambiente (22 a 28°C), na qual o crescimento de *Y. pestis* é mais rápido. As amostras de aspirado de tecidos afetados (bubônicos) incluem amostras hepáticas, esplênicas, de medula óssea e pulmonares. Seguindo o protocolo laboratorial padrão, deve ser realizado um procedimento coloração de Gram/controle de qualidade. O exame microscópico direto das amostras e a coloração das culturas pelo método de Gram fornecem uma rápida identificação provável. Amostras coradas que contêm *Y. pestis* muitas vezes revelam a presença de bastonetes roliços Gram-negativos, que medem 1–2 μm × 0,5 μm e usualmente são vistos como células isoladas ou pares de células, bem como cadeias curtas em meio líquido. A presença de células bipolares nesses esfregaços deve levantar a suspeita de peste. A coloração de Wright com frequência revela as características de coloração bipolar de *Y. pestis*, que nem sempre são demonstradas pela coloração de Gram. A coloração de Wayson – outra coloração policromática – pode ser utilizada em substituição à coloração de Wright-Giemsa. *Y. pestis* cresce em colônias branco acinzentadas e translúcidas, que costumam ser pequenas demais para serem visualizadas como colônias individuais em 24 horas. Após um período de incubação de 48 horas, essas colônias apresentam 1 a 2 mm de diâmetro, aspecto opaco e coloração cinza esbranquiçada a levemente amarela. Há pouca ou nenhuma hemólise de hemácias de carneiro. *Y. pestis* cresce em pequenas colônias não fermentadoras de lactose em ágar MacConkey ou EMB.

Os laboratórios-sentinela (nível A) devem consultar o diretor do laboratório estadual de saúde pública antes ou durante os testes, caso o médico esteja suspeitando de *Y. pestis*. O médico/responsável pelo controle de infecções deve ser notificado de imediato, de acordo com as políticas internas, caso não seja possível excluir *Y. pestis*.

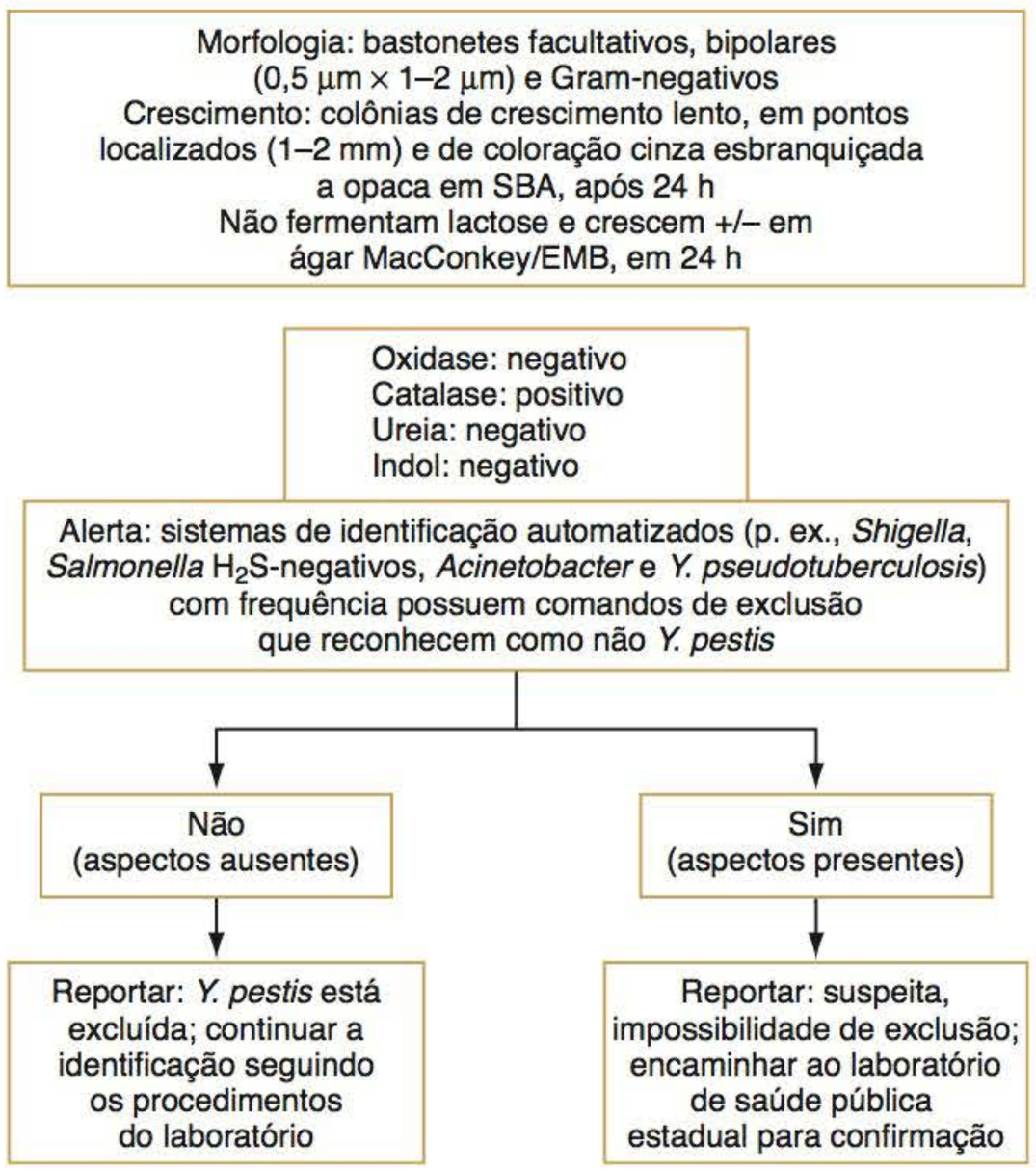


Figura 64.8 *Yersinia pestis*: fluxograma do laboratório-sentinela.

Tabela 64.17 Escolha da amostra: peste (*Yersinia pestis*)

Doença	Escolha da amostra	Transporte e armazenamento	Plaqueamento e processamento da amostra				Outros
			SBA	CA	MAC	Coloração	
Possível exposição a *Y. pestis* em paciente assintomático	Sem indicação para culturas nem sorologia						Seguir as orientações da saúde pública se a coleta de amostras for recomendada
Peste bubônica	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma bateria equivale a 2 frascos) de culturas de sangue conforme o procedimento institucional para culturas sanguíneas de rotina	Transportar à TA. Incubar a 35–37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue			Coloração de Gram de culturas positivas	Se a suspeita de peste for alta, obter uma bateria adicional para incubação à TA (22–28°C) sem agitação
	Tubos de tampa tigrada, vermelha ou dourada: para sorologia (soro de fase aguda e, quando necessário para fins diagnósticos, soro de fase convalescente de 14 d) Tubo de tampa verde (heparina): para PCR	≤ 24 h, 4°C	Não			Não	Pacientes que apresentam culturas negativas e um único título ≥ 1:10 específicos para o antígeno F1 por aglutinação em geral atendem a alguns critérios presuntivos
	Aspirado de linfonodo: pode ser necessário aplicar um jato de 1 mL de salina estéril para obter o material	Transportar à TA ou, se houver atraso, a 4°C Armazenar ≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram, coloração de Giemsa, coloração de Wright	Contatar o laboratório de referência da LRN ou laboratório superior para preparar os esfregaços para TAFD
	Tecido: coletar em frasco estéril com 1 a 2 gotas de salina estéril, não bacteriostática	Transportar à TA ou, se houver atraso, a 4°C Armazenar ≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram, coloração de Giemsa, coloração de Wright	Contatar o laboratório de referência da LRN ou laboratório superior para preparar os esfregaços para TAFD
	Garganta: coletar cultura de garganta de rotina com auxílio de um *swab* coletado dentro de frasco estéril e à prova de vazamento	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	Contatar o laboratório de referência da LRN ou laboratório superior para preparar os esfregaços para TAFD
Peste pneumônica	Escarro/garganta: coletar cultura de garganta de rotina com auxílio de um *swab* ou utilizando amostra de expectoração em frasco estéril à prova de vazamento	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	Contatar o laboratório de referência da LRN ou laboratório superior para preparar os esfregaços para TAFD
	Lavado bronquial/traqueal: coletar amostra conforme o procedimento da instituição, em uma área destinada à coleta de amostras respiratórias sob condições de isolamento/contenção (i. e., câmara/"bolha" de isolamento)	≤ 24 h, 4°C	X	X	X	Coloração de Gram	Contatar o laboratório de referência da LRN ou laboratório superior para preparar os esfregaços para TAFD
	Culturas de sangue: coletar 2 baterias (uma bateria equivale a 2 frascos) de culturas de sangue conforme o procedimento institucional para culturas sanguíneas de rotina	Transportar à TA. Incubar a 35–37°C conforme o protocolo de cultura sanguínea	Frascos de cultura de sangue			Coloração de Gram de culturas positivas	Se a suspeita de peste for alta, obter uma bateria adicional para incubação à TA (22–28°C) sem agitação
	Tubos de tampa tigrada, vermelha ou dourada: para sorologia (soro de fase aguda e, quando necessário para fins diagnósticos, soro de fase convalescente de 14 d) Tubo de tampa verde (heparina): para PCR	≤ 24 h, 4°C	Não			Não	Pacientes que apresentam culturas negativas e um único título ≥ 1:10 específicos para o antígeno F1 por aglutinação em geral atendem a alguns critérios presuntivos

CA = ágar-chocolate; TAFD = teste do anticorpo fluorescente direto; LRN = Laboratory Response Network; MAC = ágar MacConkey; TA = temperatura ambiente; SBA = ágar sangue de carneiro.

Alguns dos sistemas de identificação automatizados não identificam *Y. pestis* de forma adequada (Fig. 64.8). Esse organismo já foi falsamente identificado como *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella*, *Salmonella* H_2S-negativa ou *Acinetobacter* (Chu, 2000). *Y. pestis* constitui uma inclinação alcalina/junta ácida em ágar triplo-açúcar-ferro. Nos sistemas de identificação bioquímicos ou comerciais mais convencionais, o organismo mostra-se relativamente inerte, sendo de pouca valia realizar outros testes bioquímicos.

Referências bibliográficas

Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z: Rapid detection of *Brucella bacteremia* by using the Bactec 9240 system. J Clin Microbiol 1997; 35: 2673–2674.

Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE: Arbo viruses. *In* Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET (eds): Viral Rickettsial and Chlamydial Infections, 7th ed. Washington, DC, American Public Health Association, 1995, pp 189–212.

Beeching NG, Dance D, Alastair, RO, et al: Biological warfare and bioterrorism. Br Med J 2002; 321:336–339.

Borio L, Inglesby T, Peters CJ, et al: Hemorrhagic fever viruses as biological weapons. Medical and public health management. JAMA 2002; 287:2391–2405.

Campbell GL, Dennis DT: Plague and other *Yersinia* infections. *In* Kasper DL, et al (eds): Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed. New York, McGraw-Hill, 1998, pp 975–983.

Centers for Disease Control and Prevention: Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response: recommendations of the CDC strategic planning workgroup. Morbid Mortal Wkly Rep 2000a; 49(RR-4): 1–26.

Centers for Disease Control and Prevention: Laboratory-acquired human glanders – Maryland. Morbid Mortal Wkly Rep 2000b; 49:532–535.

Centers for Disease Control and Prevention: Recognition of illness associated with the intentional release of a biological agent. Morbid Mortal Wkly Rep 2001; 50:893–897.

Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, et al: Biological warfare. A historical perspective. JAMA 1997; 278:412–417.

Chu MC: Laboratory manual of plague diagnostic tests. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2000.

Currie BJ, Fisher DA, Anstey NM, Jacups SP: Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and reactivation. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94:301–304.

Daplan E, Marchell A: The Cult at the End of the World. New York, Crown Publishing, 1996.

Diamond J: Guns, Germs and Steel. New York, Norton & Co., 1999.

Eitzen EM, Takafuji, ET: Historical overview of biological warfare. *In* Sidell FR, Takafujii EF, Franz DR (eds): Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington, DC, Borden Institute, 1997, pp 415–423.

Fiori PL, Mastrandrea, Rapelli P: *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. J Clin Microbiol 38:2005–2006, 2000.

Fournier PE, Marrie TG, Raoult D: Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol 1998; 36:1823–1834.

Gilchrist MJR, McKinney WP, Miller JM, Weissfeld AS: Cumitech 33, Laboratory Safety, management, and diagnosis of biological agents associated with bioterrorism. Snyder JW (coordinating ed.). Washington, DC, ASM Press, 2000.

Gilligan PH, Lum G, Vandamme P, Whittier S: *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC, ASM Press, 2003, pp 729–748.

Heinzen RH: Intracellular development of *Coxiella burnetii*. *In* Anderson B, Friedman H, Bendinelli M (eds): Rickettsial Infection and Immunity. New York, Plenum Press, 1997, pp 99–130.

Henderson DA: Bioterrorism as a public health threat. Emerg Infect Dis 1998; 4:488–492.

Henderson, DA, Inglesby TV, Bartlett, JG, et al: Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. JAMA 1999; 281:2127–2137.

Kaufman AF, Metzer MI, Schmid GP: The economic impact of a bioterrorism attack: are prevention and past attack intervention programs justifiable? Emerg Infect Dis 1997; 3:73–94.

Lew DP: *Bacillus anthracis* (anthrax). *In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Disease, 5th ed. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone, 2000, pp 2215–2220.

Logan NA, Turnbull, PC: Bacillus and recently derived genera. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 1999, pp 357–369.

Overholt EL, Tigertt WD, Kadull PJ, et al: An analysis of forty-two cases of laboratory-acquired tularemia. Am J Med 1961; 30:785–806.

Perry RD, Fetherston JD: *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev 1997; 10:35–66.

Raoult, D, Mege JL, Marrie T: Q fever: queries remaining after decades of research. *In* Scheld WM, Craig WA, Hughes JM (eds): Emerging Infections. Washington, DC, ASM Press, 2001, pp 29–56.

Ropp SL, Esposito JJ, Loparev VN, Palumb GJ: Poxviruses infecting humans. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 1999, pp 1137–1144.

Schreckenberger PC, Von Coraevenitz A: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other nonfermentative gram-negative rods. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 1999, pp 539–560.

Sewell, DL: Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microbio Rev 1995; 8:389–405.

Shapiro DS, Wong, JD: *Brucella*. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 1999, pp 625–631.

Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P, et al: Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients 323 French cases. Am J Med 1992; 93:427–437.

Tucker JB: Historical trends related to bioterrorism: An empirical analysis. Emerg Infect Dis 1999; 5:498–504.

Wong JD, Shapiro DS: Francisella. *In* Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 1999, pp 647–651.

PARTE VIII

Patologia molecular

Editado por

Elizabeth R. Unger MD PhD, Matthew R. Pincus MD PhD

CAPÍTULO 65

Introdução à patologia molecular

Elizabeth R. Unger MD PhD, Matthew R. Pincus MD PhD

A revolução na biologia molecular e seu impacto na prática da patologia 1391
Discussão da patologia molecular diagnóstica 1391
Implicações do diagnóstico molecular sobre a prática da patologia e medicina 1392
- Redefinição da doença 1392
- Uso da biologia molecular no tratamento da doença 1392
- Análise de dados 1392
- Garantia da qualidade 1393
- Algumas advertências 1393

Referências bibliográficas 1393

PONTOS-CHAVE

- A revolução ocorrida na biologia molecular exerceu um profundo impacto no campo da patologia clínica (medicina diagnóstica).
- Técnicas novas, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros métodos de amplificação e hibridização, são capazes de detectar ínfimas quantidades de DNA em tecidos e líquidos corporais.
- Como consequência, torna-se possível detectar certos estados doentios, entre os quais o câncer.
- O projeto genoma humano criou novos métodos de alto *throughput* e alta sensibilidade genética (como os microarranjos), que não só detectam genes anormais presentes nas amostras de paciente, mas também estabelecem padrões de expressão genética característicos de doenças específicas.
- Os modernos métodos proteômicos de detecção de expressão proteica em amostras de soro oriundas de pacientes permitem diagnosticar diferentes tipos de cânceres.
- As novas metodologias de arranjo genético e proteômica requerem sofisticados métodos matemáticos de reconhecimento de padrão, que permitem detectar a doença.

A revolução na biologia molecular e seu impacto na prática da patologia

A patologia molecular se refere à análise de ácidos nucleicos e proteínas com o objetivo de diagnosticar a doença, predizer sua ocorrência, determinar o prognóstico de uma doença diagnosticada e orientar a terapia. Avanços recentes na biologia molecular revolucionaram a prática da medicina, sobretudo na medicina diagnóstica. Essas alterações revolucionárias resultam das novas habilidades de clonar os genes causadores de doença, bem como as proteínas codificadas por eles; detectar a presença desses genes, que são encontrados em quantidades mínimas nos líquidos corporais e/ou tecidos, por meio do uso de métodos de amplificação baseados na PCR e nos modernos métodos de hibridização de DNA altamente sensíveis; e usar métodos novos e de alta sensibilidade, baseados em técnicas como a espectroscopia de massa, para identificar proteínas implicadas na promoção da doença (Pincus, 2003). Muitas dessas técnicas foram desenvolvidas até o estágio de utilização nos processos de "alto *throughput*", nos quais amostras únicas de pacientes são analisadas quanto a múltiplos genes ou proteínas. Alguns desses processos já foram totalmente automatizados.

Uma consequência significativa da revolução ocorrida na biologia molecular foi o mapeamento do genoma humano pelo Projeto Genoma Humano (Venter, 2001), bem como dos genomas de numerosas espécies. Esses projetos identificaram numerosos genes novos, cujas funções desconhecidas agora podem ser determinadas e cujas expressões podem ser monitoradas em diversos estados doentios. Além disso, as técnicas empregadas nesses projetos mostraram-se excepcionalmente úteis para o estudo dos padrões de expressão genética em diferentes estados patológicos.

Discussão da patologia molecular diagnóstica

Esses métodos novos serão, então, descritos nas Partes VIII e IX deste livro. Na Parte VIII, primeiramente serão discutidos os princípios subjacentes às principais abordagens diagnósticas utilizadas na biologia molecular clínica. O Capítulo 66 descreve os princípios básicos da hibridização genética, incluindo o uso de *Southern* e *Northern blots*, bem como a clonagem de genes. O Capítulo 67 discute a metodologia da amplificação, englobando a PCR, que permite a identificação e quantificação da expressão genética. No capítulo subsequente, será analisado como a expressão de múltiplos genes – na verdade, de genomas inteiros – pode ser analisada nos microarranjos.

Uma das motivações para detectar anormalidades genéticas em doenças específicas, em especial nos cânceres hematopoéticos (p. ex., leucemia mielógena crônica), é a descoberta da existência de anormalidades cromossômicas reproduzíveis e bem definidas em um número significativo desses estados doentios. De fato, números crescentes dessas doenças podem ser identificados por meio da análise de cromossomos, utilizando a técnica recém-desenvolvida da hibridização *in situ* com fluorescência (FISH, *Fluorescent in situ hybridization*). Essa técnica permite detectar rearranjos e deleções de genes em certo número de doenças, sobretudo nos cânceres. Dessa forma, no Capítulo 69, será analisada a citogenética das doenças humanas e será mostrado como a tecnologia FISH proporcionou avanços importantes no diagnóstico de doenças. Todas essas abordagens diagnósticas constituem a biologia molecular diagnóstica/clínica ou o diagnóstico molecular. No Capítulo 70, portanto, será apresentado como o laboratório de diagnóstico molecular é estabelecido. Nos dois capítulos seguintes, então, será demonstrado como as técnicas de biologia molecular são utilizadas para diagnosticar doenças específicas: primeiramente no Capítulo 71, para doenças hematopoéticas, em especial as leucemias e os linfomas, e no Capítulo 72, para vários estados patológicos.

Uma das consequências da revolução genética foi o desenvolvimento da habilidade de identificar mutações de um único gene no DNA do paciente, as quais podem tanto resultar em doença quanto serem apenas polimorfismos. Nesse último caso, há a vantagem da possibilidade de estabelecer o grau de parentesco de crianças e de investigar crimes. Em consequência, houve um drástico aumento no uso do laboratório de diagnóstico molecular com finalidade forense. No Capítulo 73, então, será descrito como os polimorfismos de nucleotídeo único são utilizados para estabelecer parentescos, identidades de vítimas e criminosos.

Outra consequência momentânea da revolução ocorrida na biologia molecular foi a descoberta de que quase todos os cânceres humanos são causados por oncogenes. Estes, por sua vez, são formas mutantes de genes que ocorrem com frequência (proto-oncogenes), sendo produzidas por eventos de mutação associados, por exemplo, a carcinógenos e vírus oncogênicos. Esses genes codificam proteínas funcionalmente anormais, que são mutantes e/ou superexpressadas. São essas proteínas mutantes que promovem a transformação celular. Muitas proteínas oncogênicas são componentes críticos das conhecidas vias de transdução de sinal, nas quais os ligantes (p. ex., fatores de crescimento) se unem aos receptores de membrana celular desencadeando uma cadeia de cascatas de ativação proteica. Essas cascatas são transmitidas ao núcleo, com consequente aumento da transcrição e níveis finais elevados de expressão de proteínas pró-mitóticas, como as ciclinas. Se houver mutação de uma ou mais proteínas integrantes das vias mitogênicas de transdução de sinal, as células que as expressam transformam-se em células cancerosas. Uma vez transformadas, as células cancerosas expressam certo número de proteínas, além das oncoproteínas mutantes ou superexpressadas, que não são expressas pelas células normais nem mesmo durante a fase de crescimento.

Esses achados foram traduzidos em novos métodos diagnósticos úteis para encontrar proteínas anormais na detecção precoce do câncer em pacientes. A Parte IX deste livro, assim, é voltada ao modo como essas proteínas são empregadas na detecção precoce de tumores e no seguimento da eficácia do tratamento do câncer. Uma das principais descobertas nessa área foi que a triagem do câncer é mais efetiva quando múltiplas oncoproteínas são analisadas. Uma etapa pioneira nessa área de ensaios de múltiplas proteínas foi o desenvolvimento de novas técnicas de espectroscopia de massa, que permitem detectar padrões de expressão proteica sérica exclusivos de cânceres específicos – trata-se do campo conhecido como proteômica, que se mostrou bastante promissor na triagem de vários cânceres humanos importantes.

Um impacto significativo do Projeto Genoma Humano foi a possibilidade de estudar a expressão de múltiplos genes, sobretudo pelo uso dos microarranjos, em indivíduos normais e em certos estados patológicos específicos. O câncer é uma das principais áreas em que a expressão diferencial de genes específicos caracteriza determinados tumores em particular. A combinação da expressão genética com a proteômica agora permite o diagnóstico e a triagem de diferentes tipos de tumores, unificando as abordagens genética e proteômica. Sendo assim, no Capítulo 76 da Parte IX, tais abordagens são discutidas. Também serão discutidas as metodologias empregadas no mapeamento do genoma, uma vez que essas abordagens estão envolvidas na triagem de diversas doenças. Como consequência do conhecimento de um maior número de genes, tem se tornado cada vez mais viável realizar triagens de genomas de pacientes para detecção de anomalias genéticas, em especial daquelas que causam ou predispõem os pacientes ao desenvolvimento de câncer. Os laboratórios clínicos cada vez mais serão solicitados a realizar esse tipo de análise.

Implicações do diagnóstico molecular sobre a prática da patologia e medicina

Redefinição da doença

A disponibilização da sequência do genoma humano e a identificação de todos os genes humanos mudam imediatamente nossa compreensão acerca de doença, saúde, suscetibilidade e precursores de doenças (Pandey, 2000). A capacidade de identificar o padrão de expressão genética que torna uma entidade patológica única permite ao patologista delinear o perfil de doenças clinicamente singulares, cuja distinção seria difícil ou mesmo impossível com base apenas na morfologia ou em outros dados laboratoriais (Heller, 1997; Golub, 1999). Um exemplo comovente é o fenômeno do diagnóstico das leucemias e linfomas. Em termos de morfologia e imunofenotipagem, talvez seja comprovadamente difícil distinguir os tipos de cada doença. Entretanto, arranjos de genes específicos e padrões de expressão genética agora tornam possível essa diferenciação. Além disso, as relações existentes entre as doenças também podem ser definidas de forma mais nítida e, às vezes, sofrer modificações radicais mediante a comparação entre os padrões de expressão genética das doenças (Anbazhagan, 1999).

Por outro lado, o sequenciamento dos genes determinantes de doenças e o teste para detecção de mutações demonstram que as doenças apresentam amplo espectro de manifestações. Estas podem ser desde sintomas brandos – que não são reconhecidos como parte da doença e podem incluir complexos não identificados previamente em isolados como formas da doença – até a manifestação integral da doença. Um exemplo convincente dessa expansão marcante das síndromes compreendidas pela doença é a fibrose cística (Friedman, 1999). Além das disfunções pulmonares e pancreáticas de grau severo e mais brandas há muito aceitas como fibrose cística, exemplos isolados da ausência bilateral congênita dos vasos deferentes, pancreatite crônica e queixas sinopulmonares foram associados à ocorrência de mutações no gene da fibrose cística (CFTR). Essas mutações frequentemente não estão associadas à clássica forma severa da doença. O reconhecimento de sintomas complexos que ampliam a definição das doenças com base nas mutações genéticas tanto enfocará a supervisão correta do paciente nas formas branda ou atípica da doença quanto também definirá a patobiologia, não só de genes integrais mas também de éxons e íntrons específicos afetados.

Uso da biologia molecular no tratamento da doença

Conforme mencionado no Capítulo 73, genes e regiões não codificadoras de genomas apresentam polimorfismos que muitas vezes não possuem importância clínica, embora sejam bastante importantes para estabelecer parentescos ou identidade de indivíduos. O mapeamento do genoma humano revelou que esses polimorfismos ocorrem em 1 a cada 1.000 pares de bases (pbs). Entretanto, descobriu-se que alguns desses polimorfismos ocorrem em genes cujas funções são importantes para a resposta de pacientes à terapia (Evans, 1999). Genes codificadores de enzimas metabolizadoras de fármacos, tanto ativadoras quanto inativadoras, bem como genes codificadores de ligantes e receptores, podem apresentar polimorfismos que aumentam ou diminuem a efetividade terapêutica ou a toxicidade de fármacos já em ampla utilização, contribuindo para algumas das respostas idiossincráticas anteriormente desconhecidas ou imprevisíveis. À medida que mais polimorfismos vão sendo identificados e correlacionados com as respostas individuais dos pacientes ao tratamento, o patologista será convocado a representar o perfil de polimorfismos comuns apresentados por pacientes que estejam iniciando terapias para doenças comuns, como diabetes, hipertensão, câncer e infecções. A definição laboratorial do genótipo/fenótipo de um paciente individual determinará os fármacos específicos e as doses convenientes para ele. Esse avanço situa o patologista em uma posição mais definitiva na determinação de terapias adequadas, em comparação à tradicional previsão do comportamento da doença com base na morfologia das lesões ou características de cultura de organismos infecciosos.

Além da fenotipagem de pacientes, o patologista passou a ser solicitado a realizar a genotipagem de agentes infecciosos, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Cepas diferentes apresentam suscetibilidades farmacológicas acentuadamente distintas. Dessa forma, a determinação dos genótipos de agentes infecciosos tem implicações terapêuticas significativas.

As abordagens de proteômica para detecção de câncer igualmente resultaram no desenvolvimento de novas terapias. Muitos cânceres de mama, por exemplo, expressam um receptor para fator de crescimento, o *neu*/HER2, cuja presença pode ser detectada no soro por imunoensaio. Conforme descrito no Capítulo 74, constatou-se que a Herceptina, um anticorpo citotóxico dirigido contra esse receptor e isento de reação cruzada com anticorpos diagnósticos, destrói as células do câncer de mama. Esse anticorpo passou a ser efetivamente utilizado no tratamento do câncer de mama positivo para *neu*/HER2.

Análise de dados

Para capitalizar totalmente o poder da patologia molecular, estão sendo desenvolvidas novas abordagens de análise de dados e de dados relacionados à supervisão da doença. A investigação patológica da doença e da biologia básica tradicionalmente analisava e correlacionava apenas um dentre poucos marcadores, como antíge-

nos, enzimas, proteínas estruturais e similares. Hoje em dia, as técnicas moleculares produzem dados sobre muitos milhares de genes, incluindo sua expressão e sequência. Digerir toda essa informação, organizá-la em perfis de doenças ou de pacientes e correlacioná-la a diferentes perfis são tarefas que demandam novas abordagens de bioinformática. Como referido no Capítulo 76, isso envolve o uso de algoritmos matemáticos que seguem padrões de reconhecimento, tais como a teoria de rede neural (Khan, 2001). Sendo assim, o patologista deve trabalhar de perto com os matemáticos, bem como aprender abordagens analíticas mais sofisticadas para fins diagnósticos (Bitner, 1999).

Garantia da qualidade

Como para todos os métodos laboratoriais, é necessário instituir excelentes programas de garantia da qualidade que assegurem a acurácia e utilidade dos resultados de patologia molecular. Conforme discutido no Capítulo 70, dois componentes essenciais dos programas de garantia de qualidade são a padronização dos métodos e a comparação interlaboratorial dos resultados. Métodos padronizados para o bom desempenho dos testes de patologia molecular clínica mais comuns são publicados pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), atualmente conhecido como Clinical and Laboratory Standards Institute. O uso dessas diretrizes garante que os dados gerados pelos laboratórios de patologia molecular sejam produzidos por métodos considerados padrões da prática de excelência. A comparação interlaboratorial do desempenho dos testes é realizada pelo College of American Pathologists (CAP) (www.cap.org). As pesquisas de comparação interlaboratorial conduzidas pelo CAP incluem aplicações de microbiologia molecular, de genética, de hematologia, de parentesco e herança e de forenses gerais.

Ao aplicar os padrões de garantia de qualidade estabelecidos e utilizar as técnicas de patologia molecular conhecendo por completo seus pontos fortes e deficiências, conforme descrito nos capítulos subsequentes, o patologista continuará a capitalizar as oportunidades oferecidas por essas técnicas com o intuito de melhorar a assistência prestada ao paciente e a compreensão da patobiologia básica.

Algumas advertências

Conforme o leitor poderá observar ao longo das Partes VIII e IX, as técnicas de diagnóstico molecular fornecem novas hipóteses acerca das doenças, que no passado jamais seriam cogitadas. Entretanto, essas técnicas não devem ser utilizadas de modo isolado, e sim coordenadas aos testes laboratoriais tradicionais. No *work-up* diagnóstico das leucemias, por exemplo, os testes morfológicos e imunoquímicos devem ser sempre realizados. A análise genética torna-se crítica se houver dúvidas quanto ao tipo de leucemia ou na caracterização dos tipos de rearranjo gênico ocorridos. Quando se trata de patologia tecidual, as habilidades morfológicas envolvidas na histo e citopatologia devem ser empregadas para garantir que as células e os tecidos apropriados sejam analisados no âmbito molecular. Caso contrário, mesmo com o uso de métodos técnicos de alta qualidade interpretados de modo habilidoso e experiente, a análise de outras células/tecidos diferentes das células/tecidos-alvo podem conduzir a resultados errôneos e com frequência perigosamente enganosos.

Por outro lado, o rápido progresso no desenvolvimento de técnicas proteômicas e de biologia molecular altamente sensíveis tem propiciado algumas capacidades "isoladas" de diagnóstico molecular. Exemplificando, o uso da FISH para detecção do câncer de bexiga por meio da análise da urina é hoje considerado um modo excelente de diagnosticar essa condição. Outros aprimoramentos similares na área da biologia molecular mostram-se promissores na triagem de doenças específicas.

Resumindo, a patologia molecular está penetrando e permeando por completo o laboratório clínico, assim como fez a imunopatologia ao longo de duas décadas atrás. Os limites e barreiras continuarão a serem quebrados e dissolvidos no processo de transformação da medicina laboratorial, graças ao impacto da nova biologia da medicina – a "biologia celular e molecular".

Referências bibliográficas

Anbazhagan R, Tihan T, Bornman DM, et al: Classification of small cell lung cancer and pulmonary carcinoid by gene expression profiles. Cancer Res 1999; 59:5119–5122.

Bitner M, Meltzer P, Trent J: Data analysis and integration: of steps and arrows. Nat Genet 1999; 22:213–214.

Evans WE, Relling MV: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science 1999; 286:487–491.

Friedman KJ, Silverman LM: Cystic fibrosis syndrome: a new paradigm for inherited disorders and implications for molecular diagnostics. Clin Chem 1999; 45:929–931.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 286:531–537, 1999.

Artigo inspirador que mostra como as análises da expressão de múltiplos genes podem ser utilizadas para distinguir os diferentes tipos de leucemia.

Heller RA, Schena M, Chai A, et al: Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:2150–2155.

Khan J, Wei JS, Ringner M et al: Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. Nat Med 2001; 7:673–679.

Pandey A, Mann M: Proteomics to study genes and genomes. Nature 2000; 405:837–846.

Pincus MR, Friedman FK: Oncoproteins in the detection of human malignancies. *In* Molecular Diagnostics. New York, Reed Business Information Publishers, 2003, vol 1, pp 23–38.

Este artigo revisa o modo como múltiplas oncoproteínas podem ser utilizadas no sorodiagnóstico apenas para a triagem de diferentes tipos de câncer e, em alguns casos, para prever futuras ocorrências de câncer.

Venter JC, Adams MD, Myers EW et al: The sequence of the human genome. Science 2001; 291:1304–1351.

CAPÍTULO 66

Diagnóstico molecular: princípios e técnicas básicas

Martin Steinau, PhD Margaret A. Piper, PhD MPH Elizabeth R. Unger PhD MD

Bioquímica e biologia de ácidos nucleicos 1394
Composição e estrutura molecular 1394
Enzimas associadas a ácidos nucleicos 1396
Replicação do DNA 1396
Transcrição do DNA em RNA 1397
Modificação pós-transcricional 1397
Tradução do RNA em proteína 1397
Controle transcricional 1398
Mecanismos de reparo de DNA 1398
Mutações no DNA 1399
Análises de ácidos nucleicos 1400
Separação eletroforética 1400
Hibridização de ácido nucleico 1401
Ensaios de hibridização: componentes básicos 1401
Formatos de ensaio de hibridização 1403
Métodos de amplificação 1405
Ensaios baseados em polimorfismos 1405
Correlação com a avaliação laboratorial da doença 1405
Diagnóstico molecular 1405
Além do diagnóstico 1406
Referências bibliográficas 1406

PONTOS-CHAVE

- É necessário estar familiarizado com os conceitos básicos de biologia e bioquímica de ácidos nucleicos para compreender o teste diagnóstico molecular.
- A estabilidade química das fitas duplas de DNA contrasta com a labilidade do RNA.
- O pareamento das bases de ácidos nucleicos é ditado pelo alcance de um estado energeticamente favorável e constitui a base da replicação do DNA celular, transcrição do RNA e ensaios de hibridização.
- A similaridade química das moléculas de ácido nucleico, independentemente de sua fonte, indica que os métodos de extração, armazenamento e manuseio são semelhantes.
- As enzimas que sintetizam e modificam ácidos nucleicos (polimerases, transcriptases, nucleases, ligases etc.) podem ser aproveitadas como ferramentas de biologia e diagnóstico moleculares.
- As análises de ácidos nucleicos incluem eletroforese, ensaios de hibridização, técnicas de amplificação e análises de polimorfismo. Ensaios completos ou testes diagnósticos muitas vezes incluem várias dessas técnicas, tais como amplificação, eletroforese e hibridização.
- O diagnóstico molecular agora integra a corrente principal do diagnóstico laboratorial.

Os ácidos nucleicos são as moléculas essenciais da vida. O ácido desoxirribonucleico (DNA) reside no núcleo das células eucarióticas e preserva toda a informação necessária à manutenção do organismo, bem como as informações transferidas para gerações sucessivas. O ácido ribonucleico (RNA) carrega a informação contida no DNA até o citoplasma celular e direciona a síntese das proteínas necessárias ao funcionamento do organismo. O estado normal de saúde depende da estabilidade do DNA, bem como da acurada duplicação e translação desse DNA em proteína. A moderna biologia celular busca determinar os mecanismos básicos da estrutura e função celular, de modo que seus estudos enfocam cada vez mais o nível dos genes – as unidades codificadoras de DNA. Como consequência, os métodos diagnósticos também estão sendo direcionados para a avaliação dos ácidos nucleicos. O objetivo do presente capítulo é fornecer o arcabouço conceitual para as aplicações diagnósticas da análise de ácidos nucleicos.

Bioquímica e biologia de ácidos nucleicos

A bioquímica de ácidos nucleicos é central à biologia celular moderna e dita numerosos aspectos das aplicações diagnósticas. Uma parte significativa das enzimas associadas à síntese, degradação e reparo de ácidos nucleicos *in vivo* foi transformada em ferramenta básica de uso laboratorial para manipulação e análise de DNA e RNA. Os mecanismos celulares que operam para dirigir e controlar a replicação, transcrição e translação de DNA envolvem a biologia celular básica na saúde e na doença. O diagnóstico, terapia e pesquisa estão cada vez mais direcionados ao nível molecular da função celular. A primeira seção revisa os aspectos relacionados à bioquímica e biologia de ácidos nucleicos necessários à compreensão das atuais aplicações diagnósticas da biologia molecular. Uma abordagem mais detalhada é encontrada em livros-texto sobre biologia celular (Alberts, 2002).

Composição e estrutura molecular

O DNA de fita dupla (dsDNA, *double-strand DNA*) é uma longa molécula polimérica que existe predominantemente na forma de dupla hélice voltada para a direita. Cada molécula de DNA de fita única (ssDNA, *single-strand DNA*) é composta de um pequeno número de blocos constituintes. O esqueleto do polímero de ssDNA é o açúcar desoxirribose conectado por grupos fosfato (Fig. 66.1*A*). As ligações fosfodiéster existentes entre o carbono 3' de um anel de açúcar e o carbono 5' do próximo conferem ao esqueleto sua estrutura invariável, bem como a orientação no sentido 5' para 3'. O carbono 1' de cada açúcar está ligado a uma dentre quatro bases possíveis: timina (T) e citosina (C) (pirimidinas); adenina (A) e guanina (G) (purinas). As bases podem ocorrer em qualquer ordem sequencial e, assim, formar a porção variável do ssDNA. Os blocos constituintes do polímero de fita única são os quatro trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dTTP, dCTP, dATP, dGTP), e cada um consiste em uma molécula de açúcar, um grupo trifosfato e uma base. Durante a síntese de DNA, os nucleotídeos primeiro perdem dois grupos fosfato e, em seguida, são enzimaticamente unidos por ligações fosfodiéster para formar uma cadeia.

O DNA é uma molécula extraordinariamente estável, perdendo sua estrutura conformacional normal apenas sob condições extremas de calor e pH ou em presença de agentes desestabilizadores. A hélice de fita dupla é o estado mais energeticamente favorável do DNA, e o exame dos componentes dessa molécula explica esse fato. Os grupos açúcar e fosfato são hidrofílicos e formam pontes de hidrogênio

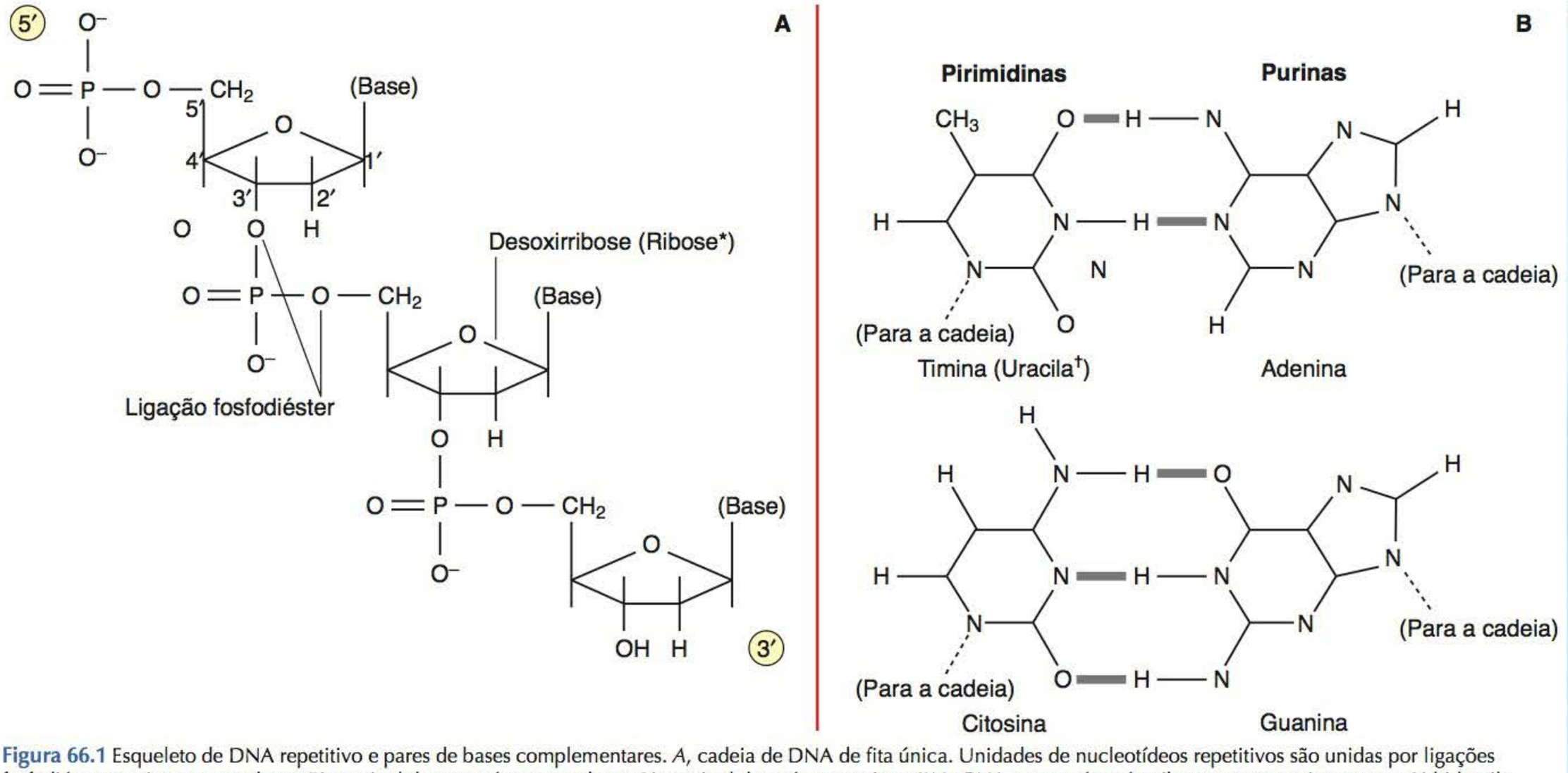


Figura 66.1 Esqueleto de DNA repetitivo e pares de bases complementares. *A*, cadeia de DNA de fita única. Unidades de nucleotídeos repetitivos são unidas por ligações fosfodiéster que juntam o carbono 5′ terminal de um açúcar ao carbono 3′ terminal do açúcar seguinte. (*No RNA, esse açúcar é a ribose, que possui um grupo 2′-hidroxila adicionado à desoxirribose.) *B*, bases de purinas e pirimidinas, e formação de pares de bases complementares. As barras sombreadas indicam os locais de formação de pontes de hidrogênio. (†No RNA, a timidina é substituída pela uracila, que difere da timina apenas quanto à ausência do grupo metil.) (Adaptado com permissão de Piper MA, Unger ER: Nucleic Acid Probes: A Primer for Pathologists. Chicago, IL, EUA ASCP Press, 1989.)

com moléculas de água adjacentes em solução. As bases, contudo, são hidrofóbicas e, portanto, insolúveis na água em pH normal. Uma molécula de DNA estável precisa garantir que as bases não entrem em contato com a água. Isso se torna possível quando dois polímeros ssDNA antiparalelos (um orientado no sentido 3' para 5', e o outro, no sentido 5' para 3') se entrelaçam em torno do mesmo eixo. Esse arranjo permite a formação de ligações de hidrogênio planares entre a adenina e a timina, bem como entre a guanina e a citosina (Fig. 66.1*B*). Como as duas cadeias possuem sequências de bases em ordem complementar, as fitas da hélice apresentam estrutura em forma de escada com anéis (pares de bases [bp]) de tamanhos consistentes. A flexibilidade das ligações de carbono-oxigênio na ligação fosfodiéster permite que a escada gire e forme uma hélice regular, de modo que os pares de bases planares fiquem empilhados uns sobre os outros, sem deixar espaço para moléculas de água entre eles. As séries poliméricas de pontes de hidrogênio de pares de bases mantêm as cadeias de ssDNA firmemente unidas, enquanto a conformação em hélice protege os pares de bases contra a água, expondo apenas os esqueletos hidrofílicos.

O dsDNA helicoidal é estável em uma faixa de pH aproximada de 4 a 9. Soluções cujo pH esteja fora desses limites conseguem romper as ligações entre os pares de bases e causar desnaturação da hélice de DNA ou fazê-la separar-se em duas espirais ao acaso. O calor extremo e os agentes que quebram pontes de hidrogênio (p. ex., formamida) também exercem o mesmo efeito. Essa transição hélice-espiral pode ser espectrofotometricamente observada a A_{260} (Fig. 66.2). As bases absorvem ao máximo a luz ultravioleta (UV) nesse comprimento de onda, porém o dsDNA apresenta uma menor absorvidade molar. A absorvidade aumenta em 20 a 30% quando o dsDNA é convertido em ssDNA. Como a temperatura com frequência é empregada para efetivar essa transição, o processo é referido como *desnaturação*. A temperatura em que 50% do dsDNA é convertido a ssDNA é denominada *ponto de desnaturação* ou t_d do DNA. O t_d das moléculas de DNA depende do conteúdo relativo de pares de bases G-C *versus* A-T, uma vez que três pontes de hidrogênio de pares de bases G-C requerem mais energia para serem rompidas do que a quantidade de energia necessária para quebrar duas pontes de hidrogênio de pares de bases A-T. O processo de desnaturação pode ser revertido com a redução da temperatura, e as duas fitas complementares podem reconstituir a hélice original se os pares de bases forem reformados em uma conformação linear correta.

O comprimento de uma molécula de DNA eucariótica estendida por completo seria de aproximadamente 3 m por genoma. Esse comprimento é bem mais longo do que a própria célula. O DNA purificado subestimado dá origem a uma solução viscosa e pegajosa, refletindo o comprimento extremo do DNA genômico (Fig. 66.3). Por outro lado, *in vivo*, o DNA encontra-se organizado em unidades regulares altamente compactadas denominadas cromossomos. Um cromossomo é composto de sua fita de DNA enrolada em torno de proteínas associadas ao DNA (cromatina) de forma altamente estruturada. A estrutura do cromosso-

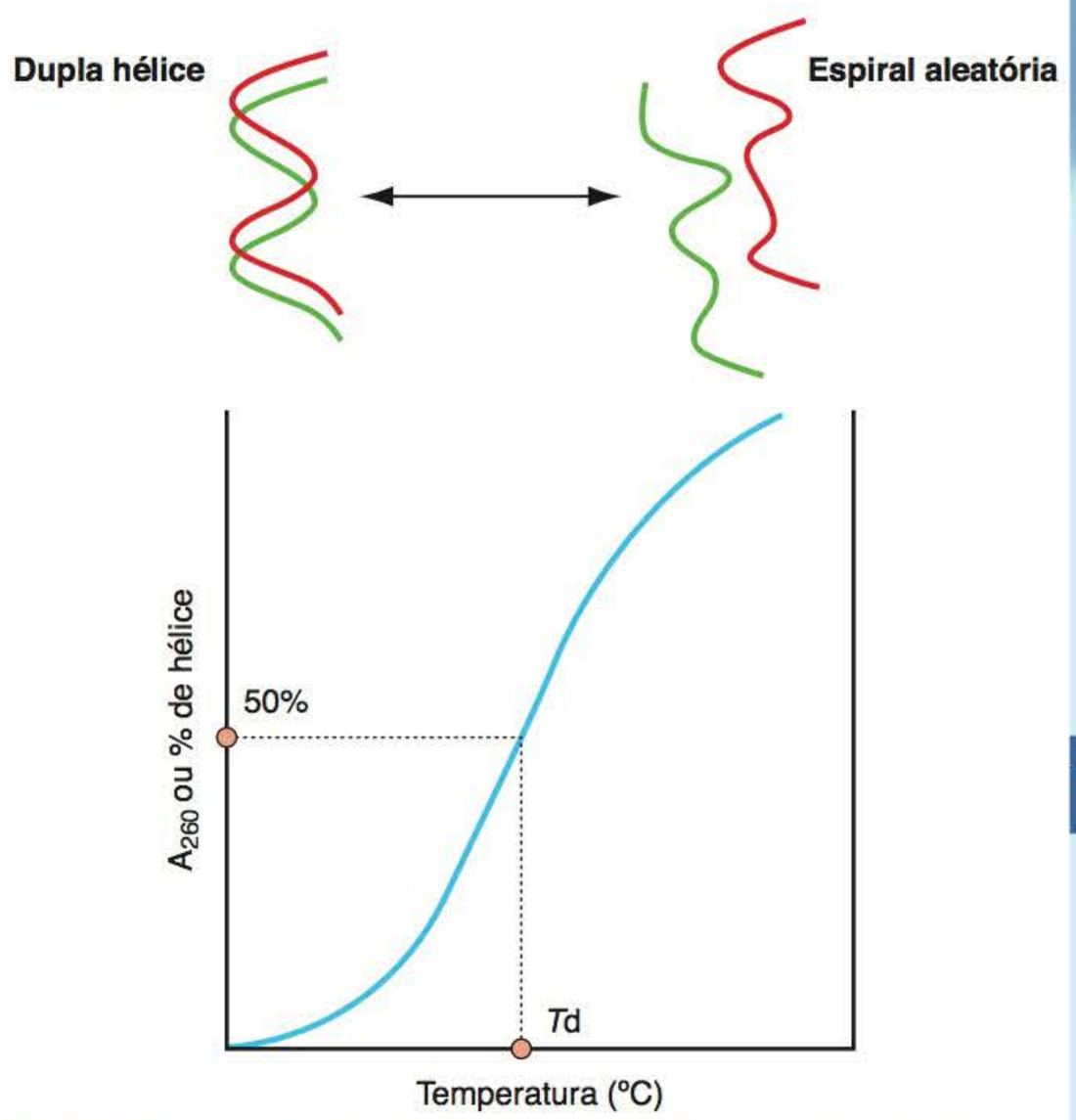


Figura 66.2 Curva de desnaturação/anelamento do ácido nucleico helicoidal de dupla hélice. (Adaptado com permissão de Piper MA, Unger ER: Nucleic Acid Probes: A Primer for Pathologists. Chicago, IL, EUA ASCP Press, 1989.)

Figura 66.3 Fotografia de um DNA purificado mostrando a natureza pegajosa e viscosa do DNA genômico minimamente compartilhado.

mo envolve vários níveis hierárquicos de empacotamento da cromatina, desde um nucleossomo em arranjo semelhante ao das "contas de um colar" (146 pares de nucleotídeos enrolados em torno de um núcleo de histona) a alças altamente condensadas que contêm, cada uma, cerca de 100 mil bps de DNA. Cada núcleo de célula humana contém cerca de 23 cromossomos de comprimento característico e uma sequência única de pares de bases. Juntos, esses cromossomos constituem o *genoma humano*. Os esforços do Projeto Genoma Humano resultaram na conclusão do sequenciamento completo dos 3 bilhões de pares de bases bioquímicas que constituem o genoma dos seres humanos.

O RNA difere do DNA quanto à composição bioquímica, estrutura e função (Tab. 66.1). No RNA, o açúcar é a ribose, que contém um grupo hidroxila na posição 2', além da substituição da timidina pela uracila metilada (U). O RNA existe predominantemente como uma molécula de fita única e em comprimentos bem mais curtos do que o DNA. A estrutura do RNA é mais irregular em razão da natureza de fita única da molécula, no entanto, pode conter algumas partes helicoidais. Moléculas de RNA que possuem a mesma sequência de bases, contudo, formarão a mesma estrutura tridimensional em consequência da adoção de uma conformação mais energeticamente favorável. O RNA é bem menos estável do que o DNA, não só por causa da estrutura em fita única mais aleatória, mas também por causa de sua suscetibilidade à hidrólise alcalina via grupo 2'-hidroxila da ribose. O RNA também é degradado de maneira rápida por enzimas RNA-específicas, que são ubíquas.

Enzimas associadas a ácidos nucleicos

O DNA deve ser duplicado antes da divisão celular, de modo que as células-filhas retenham uma cópia exata da informação genética contida nos cromossomos parentais. O RNA deve ser sintetizado por todas as células funcionais, a fim de dirigir a síntese das proteínas necessárias. O DNA precisa ser degradado durante o reparo de segmentos danificados, enquanto o RNA é degradado e ressintetizado de modo contínuo. As enzimas que operam diretamente em ácidos nucleicos afetam estas e outras funções. A Tabela 66.2 lista as principais categorias de enzimas ácido nucleico-específicas e suas respectivas funções *in vivo*. *In vitro*, as enzimas purificadas se transformam em ferramentas de uso laboratorial para o biólogo molecular, possibilitando a engenharia genética e facilitando diversos ensaios baseados em ácidos nucleicos.

Tabela 66.1 Comparação de parâmetros-chave entre DNA e RNA

Parâmetro	DNA	RNA
Açúcar	Desoxirribose	Ribose
Pares de bases	Timina-adenina Citosina-guanina	Uracila-adenina Citosina-guanina
Estrutura	Fita dupla Alfa-hélice	Fita única Aleatória (consultar o texto)
Estabilidade	Estável Degradado pela DNAse	Sujeito à hidrólise das bases Degradado pela RNAse
Função	Mantém a informação genética dentro do núcleo	Transporta a informação genética para o citoplasma

Tabela 66.2 Enzimas de ácido nucleico e funções correlatas

Enzima	Função *in vivo*
Polimerases DNA polimerases RNA polimerases	As polimerases unem os nucleotídeos de DNA ou RNA, formando uma molécula-filha de fita única tendo como molde uma extensão de molécula parental de fita única. Essas enzimas realizam a síntese de acordo com os papéis dos pares de bases, prosseguindo na direção 5'-3'.
Transcriptase reversa	Sendo na maioria das vezes de origem viral, a transcriptase reversa catalisa a síntese de DNA a partir de um molde de RNA ou de DNA.
DNA ligases	Enzimas que juntam fragmentos de DNA formados pela síntese descontínua durante a replicação ou nas vias de reparo do DNA.
Nucleases DNAses, RNAses Endonucleases Exonucleases	As nucleases "digerem" moléculas de ácido nucleico quebrando as ligações fosfodiéster. As endonucleases digerem ácidos nucleicos a partir da metade da molécula, enquanto as exonucleases atuam inicialmente em uma das terminações livres, podendo requerer a presença de uma terminação 3' ou 5'. As nucleases podem apresentar especificidade para fita única, fita dupla, DNA ou RNA. Algumas polimerases também possuem atividade de nuclease.
Endonucleases de restrição	Endonucleases bacterianas que reconhecem sequências curtas de pares de bases de DNA específicas e clivam a molécula de DNA somente no sítio de reconhecimento.

As enzimas específicas para ácidos nucleicos são as polimerases, que catalisam a formação de ligações fosfodiéster durante a síntese, e as nucleases, que hidrolisam essas ligações. As nucleases RNA-específicas (RNAses) estão presentes em quase todos os lugares. Por esse motivo, na prática laboratorial, o trabalho *in vitro* com RNA requer muito mais atenção do que quando se trabalha com DNA. As endonucleases de restrição constituem uma categoria específica de nucleases encontradas apenas em bactérias, onde atuam destruindo DNAs estranhos. Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição localizados nas moléculas de DNA são sequência-específicos e podem apresentar comprimento variável de 4 a 12 bps. Próximo à sequência de reconhecimento ou nela, as endonucleases de restrição produzem cortes terminais específicos assimétricos ou cegos nas moléculas de DNA (Fig. 66.4). Mais de 3.000 endonucleases de restrição foram descobertas e classificadas de acordo com a estrutura de seus sítios de reconhecimento de sequência correspondentes (Pingoud, 2001). A função *in vivo* e a utilidade *in vitro* de várias dessas enzimas ácido nucleico-específicas são discutidas nas próximas seções.

Replicação do DNA

O processo de duplicação do DNA, conhecido como *replicação semiconservativa*, emprega cada fita da molécula parental para dirigir a síntese de uma fita-filha (Virshup, 1990). Como a sequência de bases da fita parental determina a sequência da fita-filha, a replicação é fiel, e seus produtos consistem em duas moléculas de dsDNA, cada uma das

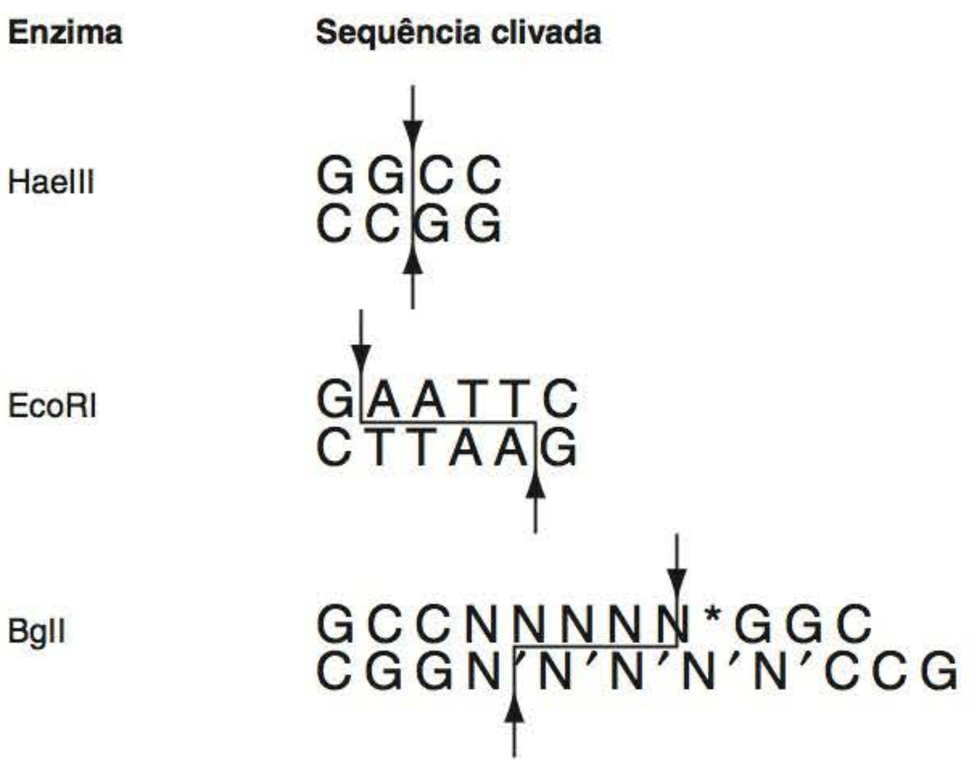


Figura 66.4 Exemplos de enzimas de restrição de DNA e suas respectivas especificidades. As enzimas são nomeadas com o nome da bactéria a partir da qual foram isoladas (*em que N é qualquer base e N′ é a base correspondente de pareamento).

quais composta por uma fita parental e uma fita-filha com exatamente a mesma sequência de pares de bases. Embora isso seja simples em termos conceituais, o processo é complicado e envolve certo número de proteínas e enzimas acessórias. Em primeiro lugar, para que a síntese comece, deve ser produzida uma pequena região de fita única. Isso é energeticamente desfavorável e deve ser feito utilizando proteínas que desenrolam e separam as fitas da hélice. Em seguida, um pequeno RNA iniciador é sintetizado de modo complementar à sequência de fita única. A DNA polimerase III continua a síntese de DNA e, posteriormente, o RNA iniciador é excisado e substituído por DNA por ação da DNA polimerase I. O DNA cromossômico contém diversos sítios de iniciação para replicação, e esse processo ocorre de forma simultânea pelo cromossomo. De modo notável, a DNA polimerase III é uma enzima direcional e pode sintetizar DNA apenas no sentido 5' para 3', pois precisa da terminação 3'OH. Isso significa que apenas uma fita-filha, denominada fita condutora, pode ser sintetizada de forma contínua. A fita oposta, denominada fita de retardo, é preparada pela RNA primase que dispensa uma terminação 3'OH. Essa fita é sintetizada de forma interrompida, em fragmentos curtos (fragmentos de Okazaki), conforme a forquilha de replicação é aberta. Esses fragmentos, então, são unidos por ação da DNA ligase. A DNA polimerase III é igualmente única, no que se refere à sua atividade de revisão e endonuclease. Um nucleotídeo adicionado de maneira incorreta à cadeia crescente é detectado e excisado pela porção endonuclease da enzima e, em seguida, o nucleotídeo correto é adicionado. Isso ajuda a explicar a extraordinária fidelidade do processo de replicação do DNA. Mecanismos de reparo pós-síntese também contribuem para a acurácia da replicação (ver adiante em "Mecanismos de reparo do DNA").

Transcrição do DNA em RNA

As seções de DNA que especificam as sequências de aminoácidos das proteínas são denominadas genes. Um gene contém o código da sequência de aminoácidos de uma proteína, bem como as sequências de DNA necessárias à regulação da produção dessa proteína. Nos 6 bilhões de nucleotídeos do genoma humano, existem cerca de 30.000 a 40.000 genes codificadores de proteínas. Embora essas sequências codificadoras sejam fundamentalmente importantes para a célula e para a função do organismo como um todo, na verdade representam menos de 5% dos nucleotídeos. A vasta maioria do genoma humano é composta de regiões de DNA não codificadoras, cujas funções estão começando a ser descobertas. Essas sequências por vezes eram denominadas *DNA-sucata* (*junk DNA*), contudo, parece que uma boa parte desse material pode ter alguma finalidade, como exercer papéis regulatórios secundários na expressão genética.

A síntese proteica tem início com a ativação do gene adequado. Uma cópia do gene é produzida a partir do DNA, em forma de RNA. Como a cópia de RNA carrega o código do DNA que está no núcleo celular para o citoplasma, onde ocorre a síntese de aminoácidos, esse tipo de RNA é denominado *RNA mensageiro* (mRNA, *messenger RNA*). O mRNA é sintetizado a partir de uma única fita de gene do DNA, de modo que a fita de DNA complementar não é utilizada. Essa síntese se dá por meio de um processo denominado *transcrição*. A síntese de mRNA ocorre em boa parte do mesmo modo como a replicação de DNA, com a sequência do ssDNA que determina a sequência do mRNA utilizando as mesmas regras de complementariedade de pares de bases (a base uracila pareia com a base adenina). Quando a extremidade do gene é alcançada, termina a síntese de mRNA. Alguns genes são sempre expressos, enquanto outros permanecem ativos apenas em certas situações fisiológicas. A taxa de transcrição também varia em diferentes células (ver a seção "Controle Transcricional").

Modificação pós-transcricional

Antes de ser transportada para o citoplasma, a molécula de mRNA é modificada de várias formas (Rosenthal, 1994). O mRNA contém sequências de aminoácidos codificadoras (éxons) e não codificadoras (íntrons). Os íntrons são excisados a partir da molécula de mRNA, antes da síntese proteica. Um complexo molecular denominado *spliceossoma* (Sharp, 1988), que é composto por RNA de baixo peso molecular e proteínas, reconhece sequências de mRNA identificadoras dos limites de um íntron, se une aos éxons flanqueadores e libera o íntron. O *splicing* precisa ser exato, pois a adição ou subtração de um único nucleotídeo na junção do *splice* mudaria o quadro de leitura de três nucleotídeos das sequências subsequentes.

Outras modificações da molécula de mRNA incluem a adição de resíduos de 7-metilguanosina à terminação 5' em uma única ligação 5'–5' fosfodiéster. A estrutura formada é denominada *cap* (capuz) e auxilia na ligação do ribossomo à molécula de mRNA para iniciação da síntese proteica. Uma *cauda* de poli-A, que pode ser necessária para estabilização e transporte até o citoplasma, é adicionada à terminação 3'. O *locus* de poliadenilação é especificado, em parte, pela sequência AAUAAA usualmente encontrada na região 3' não traduzida do transcrito de RNA. A essa altura, a molécula de mRNA está pronta para dirigir a síntese de sua proteína correspondente.

Tradução do RNA em proteína

A síntese proteica requer a tradução a partir da linguagem dos nucleotídeos para a linguagem dos aminoácidos. Assim, 21 aminoácidos diferentes são utilizados na síntese proteica. Cada aminoácido é especificado por uma ou mais trincas de nucleotídeos de mRNA denominadas *códons*. Como um aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, o código é referido como *código degenerado*. Exemplificando, AAG é o códon para lisina, e UCG é a trinca para serina. Assim, uma sequência de aminoácidos codificadora é lida em grupos de três nucleotídeos no sentido 5' para 3'. Trata-se do *quadro de leitura* de uma sequência codificadora de proteína. Três códons específicos (códons *de parada*) não codificam aminoácidos e, em vez disso, sinalizam o término de um gene.

A tradução ou translação a partir do código do nucleotídeo do mRNA em proteína é mediada por ribossomos localizados no citoplasma da célula. Um ribossomo se liga à terminação 5' das moléculas de mRNA e proporciona um ambiente bioquímico estável para todas as moléculas envolvidas na síntese proteica. Os aminoácidos são ligados à sequência correta por ação de pequenas moléculas de RNA adaptadoras denominadas *RNAs de transferência* ou *RNAs transportadores* (tRNAs, *transfer RNAs*). Cada molécula de tRNA contém uma região que é complementar a um códon de mRNA em particular: o *anticódon*. Ligado a uma terminação do tRNA, existe um aminoácido que corresponde ao códon de mRNA complementar do tRNA. Um tRNA com anticódon complementar correto se liga ao primeiro códon da sequência de mRNA, que é sempre AUG. Quando outro tRNA específico se liga ao próximo códon, enzimas ribossomais catalisam a formação de uma ligação peptídica entre os dois aminoácidos ligados aos tRNAs, removendo a ligação existente entre o primeiro aminoácido e sua molécula de tRNA. O primeiro tRNA é ejetado a partir do ribossomo, e um novo tRNA se liga ao próximo códon. Conforme esse processo continua, o ribossomo se move ao longo da molécula de mRNA, completando a síntese da cadeia de aminoácidos. Quando o códon de parada (UAG, UGA ou UAA) é alcan-

çado, o ribossomo se solta do mRNA. Na realidade, vários ribossomos podem se mover ao longo da mesma molécula de mRNA, cada um deles traduzindo o código do mRNA em uma nova molécula de proteína.

Controle transcricional

Para possibilitar a diferenciação celular e a resposta aos estímulos ambientais, devem existir mecanismos que controlam o repertório da transcrição genética e da tradução proteica. Alguns desses mecanismos operam no nível do DNA e controlam a transcrição do mRNA (Rosenthal, 1994). Um exemplo são os promotores, que consistem em sequências de DNA importantes para a iniciação da transcrição do mRNA. Os promotores são encontrados em contracorrente (na direção da terminação 5'), a uma distância relativamente invariável do início da sequência codificadora de proteína. Existem vários tipos de sequências de consenso promotoras (sequências de nucleotídeos que são encontradas em muitos exemplos). Os promotores mais comuns são ricos em adenina e timina, tendo sido denominados *caixas TATA*. Como as ligações dos pares de bases A-T são mais fracas que as ligações dos pares de bases C-G, o DNA se desenrola mais facilmente nas sequências A-T. Outras sequências promotoras reconhecidas são a *caixa GC* e o *motif CAA*. Após a ativação transcricional, uma região de ssDNA local é produzida e estabilizada pela montagem de um complexo constituído por RNA polimerase e fatores de transcrição gerais. O mRNA é sintetizado a partir da região de ssDNA local, sendo ejetado de modo rápido à medida que o DNA retorna ao seu estado mais energeticamente favorável de fita dupla helicoidal.

Os intensificadores são sequências de DNA que podem aumentar a transcrição do mRNA, sendo encontrados em diferentes locais em relação ao gene-alvo de sua ação. Os fatores de transcrição gene-específicos são proteínas que se ligam aos intensificadores e promotores, estimulando ou inibindo de maneira seletiva a transcrição do mRNA (Papavassiliou, 1995). Nos eucariontes, os intensificadores em geral contêm múltiplos sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, de modo que é o efeito líquido da ligação desses fatores aos elementos do DNA que determina a ativação e a taxa de expressão (Fig. 66.5). A disponibilidade dos fatores de transcrição, por sua vez, é controlada por eventos celulares (p. ex., fosforilação) ou por outras proteínas (p. ex., hormônios e fatores de crescimento). Uma rede de comunicação química intra e extracelular pode, assim, selecionar e controlar a síntese das proteínas requeridas.

Por ser bem menos estável do que o DNA, o mRNA apresenta meia-vida significativamente curta. Novas moléculas de mRNA são transcritas de modo contínuo a partir do DNA. Conforme a célula responde às alterações de sinais transcricionais, os genes transcritos em mRNA podem ser modificados de forma rápida e, como resultado, novas proteínas são sintetizadas de imediato. Dessa maneira, a célula é capaz de ajustar de modo rápido seu débito proteico em resposta ao ambiente que a cerca.

Recentemente, constatou-se que um novo método de supressão pós-transcricional mediada por pequenos segmentos de RNA – denominados *RNAs de interferência* ou *RNAis* – atua na maioria dos eucariontes. Descoberto primeiramente no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Fire, 1998), o RNAi resulta da presença de um dsRNA que desencadeia uma via celular constituída por duas fases principais (Fig. 66.6). Na primeira fase, o dsRNA é reconhecido por uma endonuclease específica denominada DICER. Essa enzima cliva a molécula de dsRNA em duplexes de nucleotídeos menores que contêm 21–24 bps. Na segunda fase, esses pequenos RNAis (siRNAs) são incorporados em outro complexo enzimático – o complexo silenciador induzido por RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*). Nesse nível, as duas fitas curtas de siRNA são separadas e alvejam mRNAs com sequências complementares. O RISC ativo degrada de maneira subsequente as moléculas de mRNA-alvo com um grau de especificidade bastante elevado. Acredita-se que esse mecanismo seja dirigido contra vírus e outros nucleotídeos patogênicos. Entretanto, o RNAi é efetivo contra ácidos nucleicos tanto exogénos quanto endógenos, podendo ser artificialmente induzido a inibir a expressão de quaisquer genes de interesse, incluindo aqueles envolvidos em doenças como câncer, diabetes ou infecções patogênicas (Dykxhoorn, 2005).

Mecanismos de reparo de DNA

Os erros de replicação e danos ao DNA que ocorrem ao longo da vida celular normal devem ser minimizados para preservar a saúde do

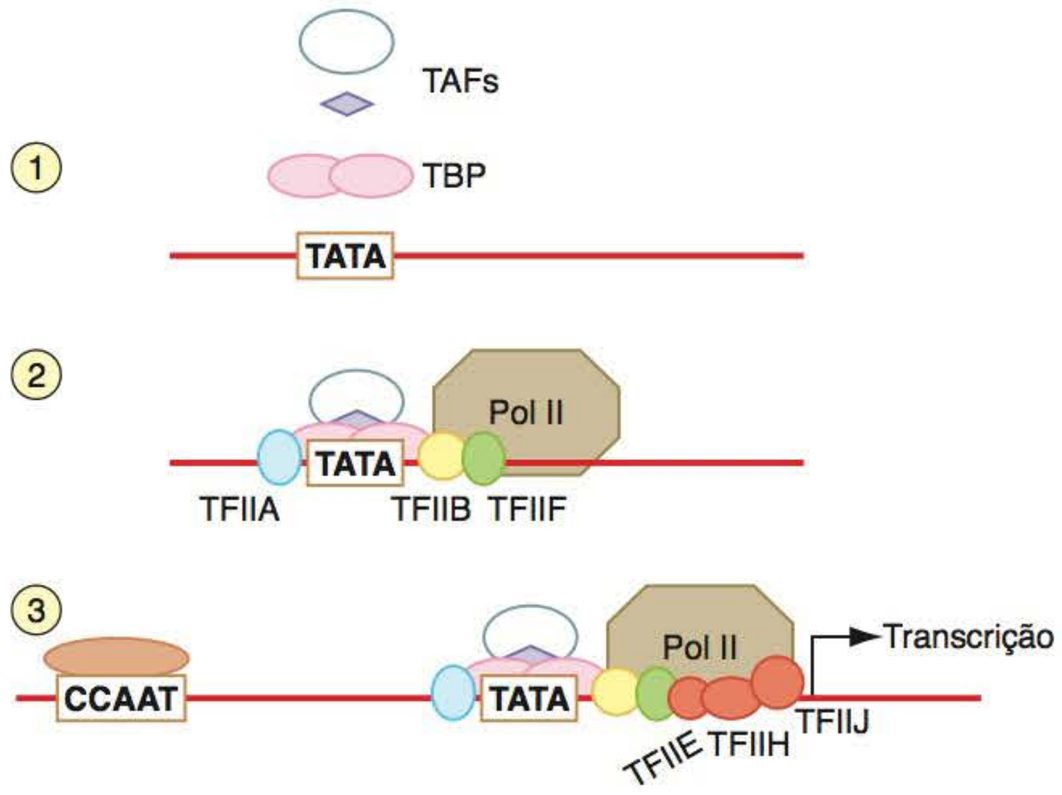


Figura 66.5 Montagem do complexo de iniciação da transcrição da polimerase II. (1) O complexo TFIID basal é montado como proteína de ligação do TATA-*box* (TBP, *TATA-box binding protein*) e fatores associados (TAFs) no TATA-*box* da região promotora. (2) Fatores de transcrição adicionais (TFIIA e TFIIB) são recrutados para propiciar a ligação da enzima polimerase II (Pol II) ao TFIIB. (3) O complexo é estabilizado com TFIIE, TFIIH e TFIIJ. Tipicamente, a ligação de fatores adicionais a sítios intensificadores em sentido oposto, como CCAAT ou GGGCGG, é necessária para que a transcrição do RNA seja efetiva.

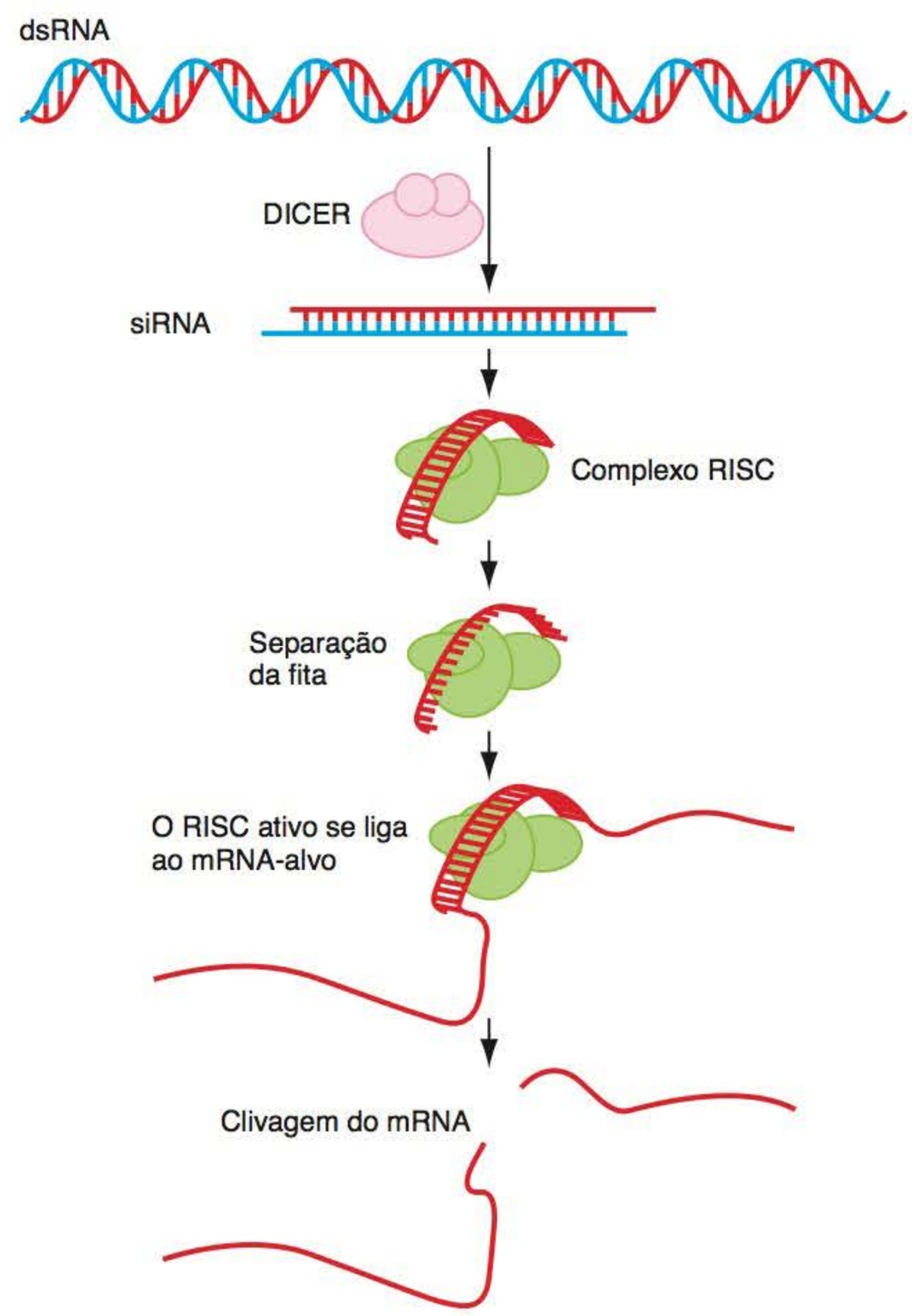


Figura 66.6 Diagrama da via do RNAi: o dsRNA é reconhecido pelo complexo DICER e processado em moléculas menores de siRNA, com 21–24 nucleotídeos. O complexo proteico RISC é montado com siRNAs e desenrola a fita dupla. O RISC ativo se liga ao mRNA-alvo com sequência complementar e o cliva, resultando na montagem de uma mensagem não funcional e de um gene silencioso.

organismo como um todo. Diversos mecanismos operam na manutenção da sequência de DNA normal. Primeiramente, existem mecanismos de prevenção contra erros que atuam durante a replicação do DNA. A DNA polimerase que sintetiza novos polímeros de DNA seleciona cada monômero de nucleotídeo sucessivo com base na sua complementaridade ao nucleotídeo seguinte da fita-molde. Nesse nível, a fidelidade é alta, e a maioria dos erros de síntese é evitada nesse momento. Mesmo assim, uma base ocasional pode ser adicionada de forma incorreta à fita em crescimento. Para consertar essa falha, a atividade de revisão exercida pela polimerase é capaz de reconhecer o erro, remover a base incorreta e refazer a síntese. Juntos, os mecanismos de prevenção a erros reduzem as incompatibilidades de pares de bases para aproximadamente 1 em 10 milhões (Radman, 1988). Isso representa um aumento equivalente a 100 mil vezes na eficiência, em comparação à taxa de erros de 1 para cada 100 bases associada à síntese de oligonucleotídeos em fase sólida *in vitro*.

Apesar da notável prevenção de erros de replicação do DNA, erros ocasionais de fato ocorrem. Além disso, o DNA pode ser danificado pela ação de reações bioquímicas normais e por agentes não fisiológicos, como luz UV e carcinógenos ambientais. Existem vários mecanismos de reparo adicionais que consertam danos de DNA (Yu, 1999) (Tab. 66.3).

Os mecanismos de reparo direto consertam as lesões em uma reação de etapa única. Exemplificando, a O^6-metilguanina DNA metiltransferase repara lesões decorrentes de alquilação pela transferência do grupo alquil da lesão para o sítio ativo da enzima. Outros mecanismos de reparo direto caracterizados na *Escherichia coli* podem igualmente existir nas células humanas (Yu, 1999).

O reparo de incompatibilidades (RI) atua imediatamente após a replicação do DNA, substituindo as bases incompatíveis pelas bases corretas (Modrich, 1994). Diversas proteínas de RI reconhecem o erro na fita recém-sintetizada e extirpam a região de incompatibilidade. A DNA polimerase III e a ligase restauram a sequência correta e integridade da fita-filha. A importância desse mecanismo para a estabilização do genoma é evidenciada por estudos recentes, que associam o câncer colorretal hereditário não ligado à polipose à existência de defeitos em proteínas reparadoras de incompatibilidade.

O reparo por extirpação de bases tem como alvo pequenos adutos não deformadores de hélice, como aqueles produzidos por metilação, oxidação, redução ou fragmentação de bases por radiação ionizante. A extirpação de bases cria hiatos de 3 a 4 nucleotídeos que, então, são preenchidos com os nucleotídeos corretos. Os entalhes são vedados pela enzima ligase. Dímeros ou adutos maiores e volumosos que deformam a hélice de DNA podem ser produzidos por radiação UV, carcinógenos e fármacos terapêuticos, entre outros agentes. Esse tipo de dano é eliminado pela via de reparo por extirpação de nucleotídeo (NER, *nucleotide excision repair*), que utiliza um sistema enzimático composto de muitas proteínas para extirpar um oligonucleotídeo de fita única que contém a lesão (Sancar, 1994). O hiato, então, é preenchido pela DNA polimerase e religado. Existem duas vias de NER: em uma delas, as lesões que bloqueiam a transcrição são rapidamente eliminadas (reparo acoplado à transcrição; Hanawalt, 1994); a outra via é uma via global que repara DNA em massa, incluindo a fita não transcrita de genes ativos. Algumas das possíveis consequências da perda de atividade de NER são exemplificadas pela doença denominada xeroderma pigmentoso, que é causada por mutações em *NER*. O xeroderma pigmentoso resulta em extrema sensibilidade à luz solar, e os indivíduos afetados desenvolvem câncer de pele ainda jovens (Weeda, 1998).

Quebras na fita dupla que ocorram raramente ou sejam produzidas por radiação ionizante e dano oxidativo causam problemas de reparo significativos. Quando esses problemas não são resolvidos, a replicação e transcrição das sequências envolvidas ficam bloqueadas. Para manter a integridade genômica local e geral, as quebras na fita dupla são consertadas por meio de mecanismos de reparo de recombinação alélica ou não homóloga.

Hoje, está esclarecido que o reparo do DNA exerce papel central na vida da célula. Evidências recentes também indicam que várias proteínas primariamente reparadoras também atuam na transcrição e regulação do ciclo celular. Assim, os processos que envolvem o DNA parecem ser altamente integrados e vêm sendo cada vez mais estudados como um todo, bem como em relação à doença humana.

Tabela 66.3 Vias de reparo de DNA

Reparo direto	Reparo de certos tipos de dano ao DNA, em uma reação de etapa única.
Reparo de incompatibilidade	Checagem de erros produzidos quando o DNA é replicado. Quaisquer bases incompatíveis presentes na fita-filha são removidas e substituídas pelas bases corretas compatíveis.
Reparo por excisão de base	Reparo de pequenos adutos deformadores de hélice, como aqueles produzidos pela melatonina, oxidação, redução ou fragmentação de bases por radiação ionizante.
Reparo por excisão de nucleotídeo	Remoção de adutos de DNA volumosos, como dímeros de timina e certos fotoprodutos, entre os quais adutos químicos e ligações cruzadas.
Reparo de quebras de fita dupla	Reparo de quebras na fita dupla, que resultam de processos fisiológicos ou da exposição à energia ionizante e a insultos oxidativos.

Mutações no DNA

Apesar dos extensivos mecanismos de reparo existentes, ainda ocorrem alterações na sequência de bases do DNA (mutações) que, até certo ponto, são necessárias à continuidade do processo de evolução. Mesmo assim, para um organismo individual comum, algumas mutações são claramente prejudiciais e podem estar associadas ao câncer e às doenças genéticas hereditárias. Estudos sobre essas doenças permitiram a caracterização dos diversos tipos de mutação que ocorrem no genoma humano (Weatheall, 1987). Os tipos de mutações podem ser agrupados de modo conceitual em algumas categorias principais (Tab. 66.4). Uma mutação em ponto é encontrada no gene da β-globina em indivíduos com anemia falciforme (Kan, 1992). Uma base de timina substitui uma base de adenina, provocando uma alteração crítica na estrutura da hemoglobina. Como descrito no Capítulo 72, a distrofia muscular é causada por deleções no gene codificador da proteína muscular distrofina. Na forma de Becker da doença, as deleções não quebram o quadro de leitura, porém o alteram na maioria dos casos da forma de Duchenne mais severa, em que a função da proteína é abolida de forma efetiva (Liechti-Gallati, 1989).

Tabela 66.4 Tipos de mutação de DNA e exemplos de doenças associadas

Mutação	Descrição	Doença
Pontual	Substituição de um único par de bases	Anemia falciforme
Deleção/inserção	Subtração/adição de códons de aminoácidos em múltiplos de 3. O quadro de leitura é preservado.	Distrofia muscular de Becker
Deleção/inserção com *frameshift*	Subtração/adição de códons de aminoácidos que não são múltiplos de 3. Resulta em deslocamento do quadro de leitura e em uma sequência codificadora de aminoácido completamente diferente a partir da mutação.	Distrofia muscular de Duchenne
Amplificação/ repetição de trinucleotídeo	Aumento do número de sequências repetidas em um DNA microssatélite. Resulta na interrupção da expressão do gene.	Síndrome do X frágil
Translocação	Troca intercromossômica de amplos fragmentos cromossomais. Resulta na produção de uma proteína nova, com função distinta.	Leucemia mielógena crônica

O DNA humano contém muitas sequências de nucleotídeos pequenas (DNA-microssatélite) que às vezes estão agrupadas em arranjos em tandem e se repetem várias vezes em todo o genoma humano. O número de repetições em tandem em determinados locais em particular constitui um caráter hereditário. Foi demonstrado que algumas repetições de trinucleotídeos aumentam em número de maneira associada à doença (Sutherland, 1994). Na síndrome do X frágil (Cap. 72), a expressão da doença está associada à amplificação além de um certo limite numérico de sequências de repetição de trinucleotídeos intragênicos. A expansão das repetições de trinucleotídeos além do número crítico interrompe a expressão do gene.

As translocações nem sempre são detectáveis pela análise de cariótipo cromossômico. No nível do gene, uma translocação pode criar um gene de fusão, que é a combinação de dois genes diferentes anormalmente unidos no sítio de translocação. Como consequência, não só é produzido um transcrito genético alterado mas também o produto de um gene passa a estar submetido ao controle transcricional do outro gene. Como discutido no Capítulo 71, o cromossomo Philadelphia, que é encontrado na maioria dos casos de leucemia mielógena crônica, resulta de uma translocação recíproca entre o gene *c-abl*, localizado no cromossomo 9, e a região do grupo do ponto de ruptura (*bcr*, *breakpoint cluster region*), no cromossomo 22. O gene de fusão produzido por esse rearranjo cromossômico, que consiste sobretudo em um gene *c-abl* e em um *bcr* truncado, codifica a proteína c-Abl. Essa proteína, por sua vez, é maior do que o produto normal, possui atividade enzimática intensificada e provavelmente interfere nas vias de transdução de sinal envolvidas no controle da morte e proliferação celulares normal.

Tanto o tipo quanto o local em que a mutação ocorre em relação ao gene determinam o efeito final sobre o produto proteico. Algumas mutações podem não produzir nenhum efeito sobre a expressão ou atividade funcional proteicas. Existem numerosas proteínas humanas em variantes detectáveis que não possuem nenhuma associação com doenças. É provável que as mutações que ocorrem nas regiões de íntron não apresentem efeito algum. Mesmo as pequenas mutações, todavia, que ocorrem em regiões codificadoras de domínios funcionais-chave (éxons) podem alterar de maneira drástica ou até eliminar uma função. As *mutações nonsense* (mutações sem sentido), que transformam um códon de aminoácido em códon de parada ou vice-versa, resultam na formação de produtos proteicos anormalmente curtos ou longos, respectivamente. As *mutações missense* (mutações de sentido incorreto), que mudam o código de um aminoácido para outro, podem ou não alterar a função da proteína, dependendo da modificação e da função do aminoácido. De maneira similar, mutações em sequências que denotam sítios de *splice* íntron-éxon poderiam eliminar éxons ou introduzir íntrons no mRNA transcrito. Também ocorrem mutações em sequências regulatórias, tais como promotoras ou intensificadoras, que produzem efeitos drásticos sobre os níveis de transcrição.

Análises de ácidos nucleicos

As propriedades bioquímicas exclusivas dos ácidos nucleicos foram exploradas na busca por informações acerca da biologia ou bioquímica de um sistema. Enquanto alguns dos ensaios (p. ex., eletroforese) são aplicáveis aos outros blocos de construção bioquímicos, como proteínas e lipídeos, a maioria se destina em particular aos ácidos nucleicos. As próximas seções descrevem de maneira breve os princípios das categorias básicas de análises empregadas para caracterizar DNA e RNA: separações eletroforéticas, ensaios de hibridização, técnicas de amplificação e polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição. Na prática, as categorias com frequência são combinadas para produzir novas variações do mesmo assunto. Um ensaio completo, por exemplo, pode envolver amplificação, eletroforese e hibridização.

Separação eletroforética

O esqueleto constituído de repetições de açúcar-fosfato dos ácidos nucleicos gera uma carga negativa líquida distribuída de modo uniforme sobre essas moléculas lineares. Por isso, a movimentação do DNA ou RNA em resposta a um campo elétrico será proporcional ao peso molecular ou comprimento dessas moléculas. Essa propriedade é utilizada para caracterizar o tamanho dos fragmentos de ácido nucleico na separação eletroforética. O formato é análogo àquele utilizado na separação proteica de acordo com o tamanho. Amostras múltiplas são aplicadas em poços separados em uma das extremidades de um meio de separação sólido e poroso. Quando a voltagem é aplicada, as amostras se movem linearmente na direção do eletrodo positivo, com cada poço de amostra formando uma tira de migração bem definida. O meio eletroforético sólido e o arranjo em poços de amostras é conhecido como *gel*. Padrões de tamanho, denominados *padrões em escada de DNA* ou *de RNA*, são misturas de fragmentos de ácidos nucleicos de comprimentos conhecidos, que são analisadas em uma ou mais tiras do gel. É possível determinar o tamanho das moléculas de interesse comparando a distância da migração de uma amostra desconhecida com o padrão em escada, seja macroscopicamente ou por medição assistida por computador.

A composição e concentração do meio de separação determina o tamanho dos fragmentos, que podem ser separados em bandas distintas. Outras variáveis que influenciam a resolução são a espessura do gel, o comprimento do caminho de migração eletroforética, a duração da eletroforese e a voltagem aplicada. Na prática, esses fatores são ajustados empiricamente e controlados da maneira mais cuidadosa possível, a fim de garantir a reprodutibilidade de um dia para outro. A agarose é o meio de separação utilizado com mais frequência, em geral associado ao leito eletroforético horizontal, em que o gel permanece imerso em tampão (*gel submarino*). As amostras ganham peso com a adição de sucrose ou Ficoll e, em seguida, são transferidas no tampão para os poços criados no gel (Fig. 66.7). Um poder de resolução maior, que permite a diferenciação de um único par de bases em termos de comprimento, é proporcionado pelo uso da acrilamida usualmente em disposição vertical, embora os formatos em capilares estejam sendo cada vez mais adotados, possibilitando a redução do tempo consumido na separação e da quantidade de amostra necessária. A abordagem mais simples para a visualização das bandas separadas por eletroforese consiste na coloração com corantes de intercalação (p. ex., brometo de etídio), que se inserem entre as bases empilhadas, seguida da observação por transiluminação UV. A visualização direta requer que a banda atinja um grau significativo de concentração. Em algumas aplicações, os fragmentos de ácido nucleico podem ser detectados com o auxílio de uma marcação radioativa ou fluorescente, cuja sensibilidade pode ser aumentada.

As moléculas contidas no DNA genômico são reduzidas a fragmentos que podem ser resolvidos por eletroforese, por meio da digestão com enzimas de restrição. Enzimas de restrição com sequências de reconhecimento relativamente simples produzem fragmentos que medem menos de 50 quilopares de bases (kb) de comprimento. Fragmentos de DNA extremamente amplos, medidos em megapares de bases (Mbp), são produzidos a partir da digestão por enzimas que possuem sequências de reconhecimento complexas e devem ser separados em sistemas eletroforéticos especiais empregando campo elétrico pulsado. A maioria das aplicações da eletroforese de DNA emprega condições não desnaturantes (i. e., os fragmentos resolvidos nas bandas são de fita dupla).

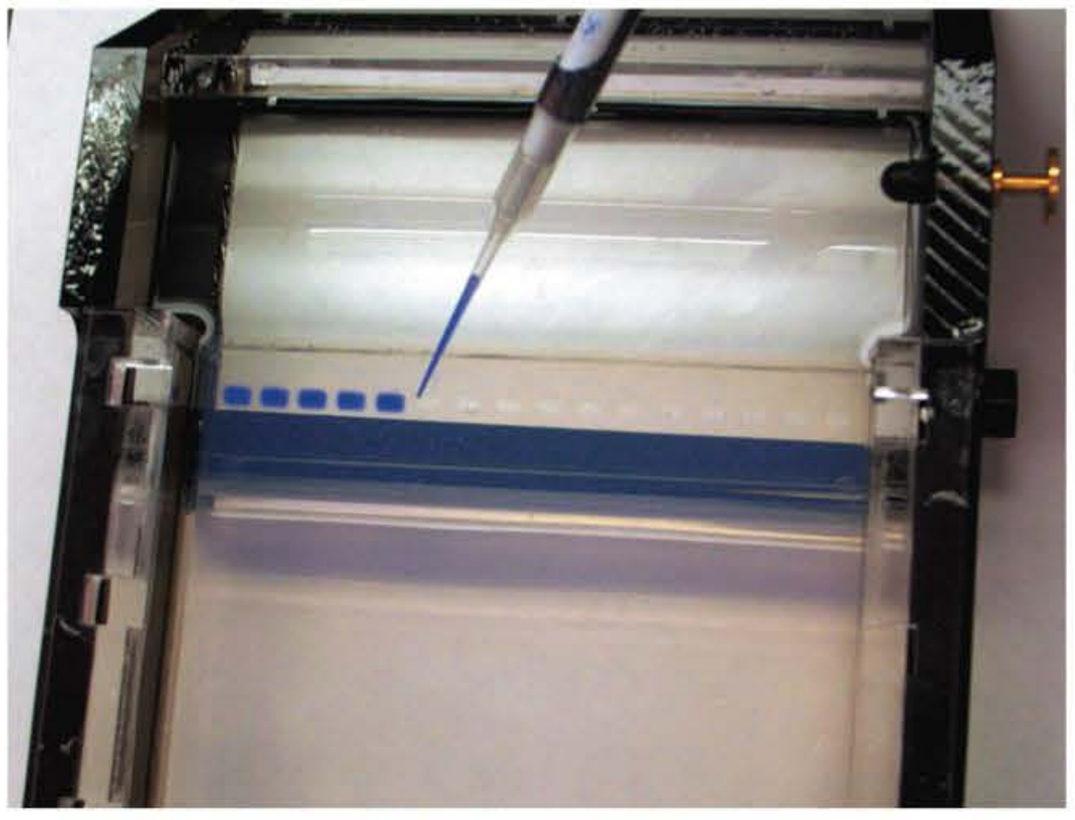


Figura 66.7 Fotografia da aplicação de amostra e corante com tampão em poços de um gel de agarose, no aparelho de eletroforese em gel submarino.

Em contraste, a maior parte das separações de RNA emprega condições desnaturantes (formamida ou glioxal) para eliminar a estrutura secundária das moléculas de fita única. As moléculas de RNA, sendo transcritos de DNA, são "pré-dimensionadas" e relativamente pequenas, dispensando a necessidade de digestão antes da eletroforese.

Hibridização de ácido nucleico

A hibridização é um conceito fundamental na bioquímica de ácidos nucleicos. É definida como a interação entre moléculas de ácido nucleico de fita única para formação de uma molécula duplex (fita dupla) baseada no pareamento de bases complementares de suas respectivas sequências. A hibridização é uma consequência direta da estrutura estável de fita dupla do DNA em condições fisiológicas. Como discutido anteriormente, a hélice é formada por duas fitas de DNA antiparalelas que são unidas pela força combinada de numerosas pontes de hidrogênio específicas existentes entre os pares de bases complementares, bem como pela blindagem hidrofóbica das bases contra um ambiente aquoso. Um aspecto central à reação de hibridização é a natureza reversível e base-sequência-específica da ligação existente entre as moléculas complementares separadas (fitas).

Quando nenhuma das fitas de DNA é marcada, o processo de reformação da estrutura de fita dupla estável é referido como *anelamento*. Havendo marcação de uma das fitas (i. e., associada a um marcador passível de detecção por meio de algum mecanismo), a fita marcada é referida como *sonda* e o processo é denominado *hibridização*, pois ocorre formação de uma molécula híbrida entre a fita marcada e a fita sem marcação. Moléculas de RNA também podem participar do processo de hibridização. O pareamento de bases pode ocorrer entre fitas complementares de DNA, entre DNA e RNA e entre fitas complementares de RNA, com consequente formação de estruturas em duplex de DNA-DNA, DNA-RNA ou RNA-RNA. Moléculas de duplexes com complementariedade exata em termos de sequência de bases formam estruturas mais estáveis, contudo pode haver formação de estruturas com graus variáveis de incompatibilidade de pares de bases, dependendo das condições. A relativa instabilidade desses duplexes incompatíveis será refletida na menor temperatura de dissociação deles (T_d mais baixa; ver Fig. 66.2).

As condições ambientais podem ser manipuladas para controlar o grau de incompatibilidade de pares de bases que será tolerado em uma estrutura em duplex (i, e., o *rigor* da compatibilidade da sequência; Fig. 66.8). Pouco rigor diz respeito a condições como alto teor de sal, baixa temperatura e ausência de formamida, que favorecem a blindagem das bases hidrofóbicas contra o ambiente aquoso mesmo na falta de um alinhamento perfeito. A compatibilidade não necessariamente deve ser perfeita. As condições altamente rigorosas – temperatura elevada (próxima de T_d), baixo teor de sal e alta concentração de formamida – permitirão que somente as estruturas de duplex mais perfeitamente compatíveis mantenham a conformação helicoidal estável.

Ensaios de hibridização: componentes básicos

Quando a reação de hibridização é utilizada para analisar o conteúdo de ácido nucleico de uma amostra desconhecida, o processo é referido como *ensaio de hibridização*. A propriedade do pareamento de bases complementares permite que fragmentos de composição conhecida (a sonda) investiguem um fragmento desconhecido quanto à presença de sequências compatíveis (complementares). Todos os ensaios de hibridização, portanto, requerem vários elementos básicos: uma sonda, uma amostra, condições controladas permissivas de pareamento de bases complementares e um método de detecção específica de híbridos sonda-amostra. Cada um desses elementos será brevemente discutido adiante, bem como os formatos variáveis desenvolvidos para possibilitar a execução e interpretação dos ensaios de hibridização.

Sonda

A especificidade da reação de hibridização é determinada pela sonda. Assim, a sonda é tão importante em um ensaio de hibridização quanto o anticorpo primário em um imunoensaio. Uma sonda consiste em um fragmento bem caracterizado de ácido nucleico, seja de DNA ou RNA. Na maioria dos formatos do ensaio, é a sonda que transporta para a reação o grupo *reporter* de detecção de moléculas hibridizadas,

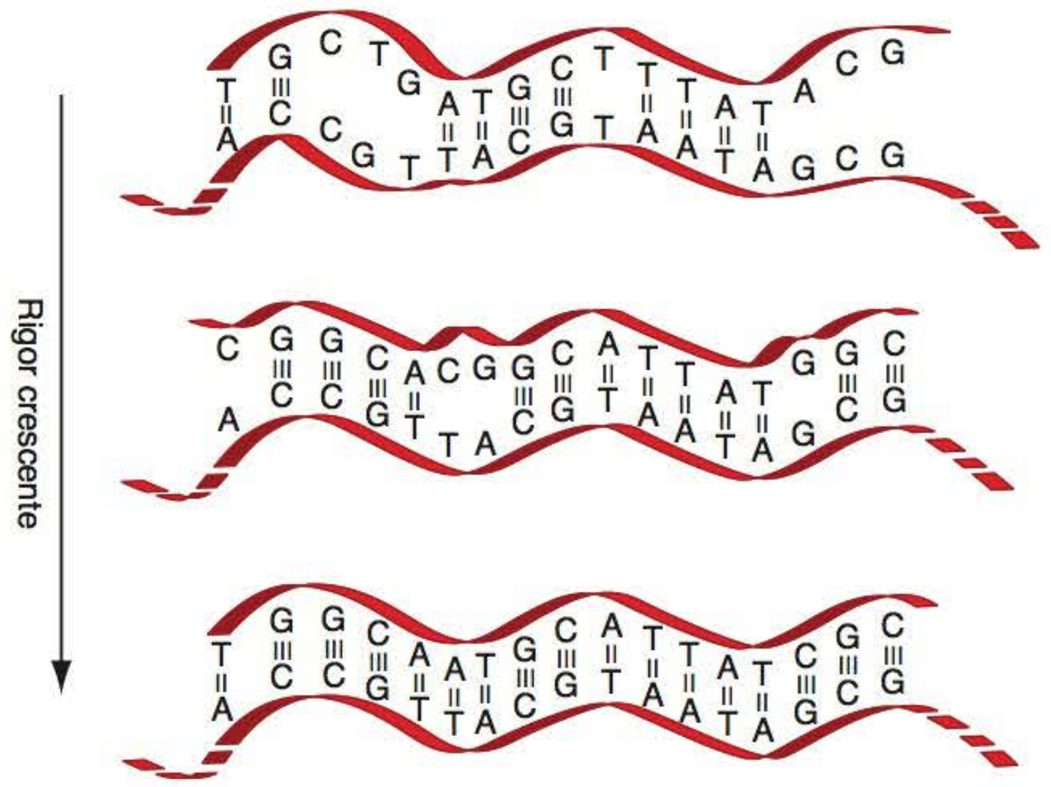


Figura 66.8 Ilustração do rigor. Como o rigor da solução de hibridização é maior, um número menor de incompatibilidades é tolerado em um duplex híbrido. Quando o nível de rigor é muito alto, até mesmo uma incompatibilidade envolvendo um único par de bases vai desfazer o duplex.

embora existam algumas variações. Os grupos *reporter* podem ser ou não radioativos (i. e., marcação por afinidade).

Numerosas sondas são produzidas pela tecnologia de ácidos nucleicos recombinantes, conforme ilustra a Figura 66.9. Os plasmídeos – pequenos segmentos de DNA de fita dupla circulares – são utilizados como vetores para propagar a sequência de interesse em bactérias. O segmento de interesse é introduzido no plasmídeo por meio de digestão e ligação mediadas por enzima de restrição, resultando na formação de uma nova molécula "recombinada" que conserva a habilidade de se propagar em bactérias e contém a sequência de DNA de interesse. Bactérias que contêm plasmídeo recombinante podem ser cultivadas em cultura, e os pequenos plasmídeos circulares podem ser facilmente isolados a partir do genoma bacteriano, com base no tamanho. São obtidas muitas cópias idênticas e, por esse motivo, o DNA com frequência é referido como *clonado*. Plasmídeos purificados podem ser utilizados como

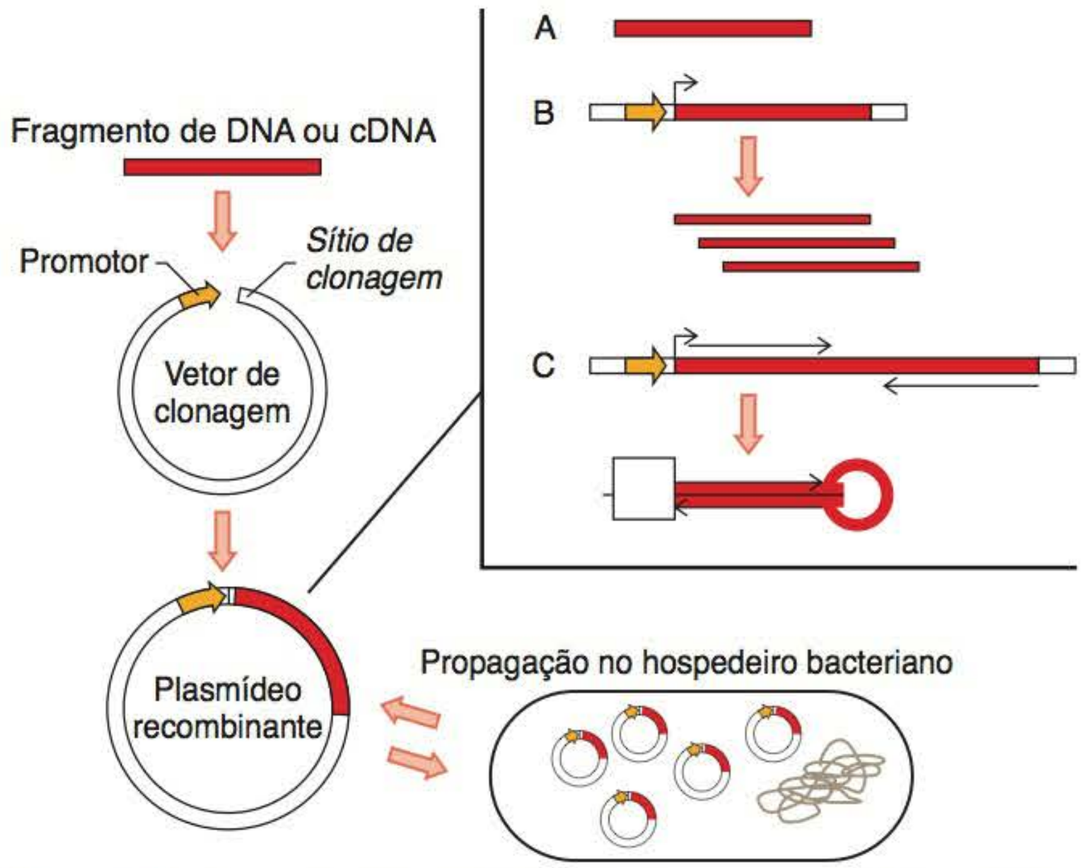


Figure 66.9 Produção de DNA ou RNA clonados. Um fragmento de DNA ou RNA previamente convertido em cDNA pode ser inserido em um vetor de clonagem. O plasmídeo recombinante é transformado em hospedeiro bacteriano, no qual rapidamente se propaga em milhões de cópias. O fragmento de DNA multiplicado pode ser isolado por excisão por meio de enzimas de restrição, que reconhecem as sequências localizadas nas bordas do fragmento inserido *(A)*. Alternativamente, esse fragmento de DNA pode ser utilizado para iniciar a transcrição do RNA *in vitro* com uma sequência promotora no plasmídeo *(B)*. Esses sistemas também são utilizados para produzir RNA de fita dupla por clonagem de duas sequências complementares nas direções *sense* e *antisense*, tipicamente com auxílio de um espaçador que forma uma alça estabilizadora no fragmento de dsRNA *(C)*.

sonda em ensaios cujas sequências de vetores não interfiram na especificidade da reação. Em diversas aplicações, a sequência de DNA inserida é separada da sequência do vetor por meio da digestão do plasmídeo isolado utilizando a mesma enzima de restrição originalmente empregada na construção da molécula recombinante. A sonda resultante de qualquer uma dessas abordagens consiste em uma molécula de DNA de fita dupla. Sondas de fita dupla precisam ser desnaturadas antes do uso, e o reanelamento da sonda limita a extensão da hibridização da sonda com o alvo. Um vetor plasmidial sem conteúdo de DNA clonado é em geral utilizado como controle negativo para esse tipo de sonda.

Vetores plasmidiais têm sido construídos para incluir regiões de RNA promotor adjacentes à sequência de DNA inserida. Esses plasmídeos recombinantes são utilizados para produzir transcritos de RNA do DNA inserido. Como resultado, obtém-se uma sonda de RNA de fita única que não sofre auto-hibridização. Controlar a orientação do DNA inserido em relação ao RNA promotor permite que os transcritos sejam produzidos na direção *sense* (igual ao mRNA) ou *antisense* (complementar ao mRNA). Em diversas aplicações, os transcritos *sense* formam sondas-controle negativo ideais para as reações de hibridização com sondas *antisense*. A sonda de RNA ligada de modo inespecífico (i. e., RNA que não se encontra na estrutura de fita única estável) pode ser removida com o auxílio de uma RNAse específica para RNA de fita única. A labilidade do RNA exige que as sondas sejam manipuladas com extremo cuidado, a fim de evitar a degradação (técnica estéril; água e vidraria tratadas).

As sondas recombinantes, tanto de DNA quanto de RNA, são geneticamente complexas. Isso significa que essas sondas podem conter muitos quilobases de informação genética. Em contraste, as sondas produzidas por métodos sintéticos são segmentos de DNA relativamente curtos. As sondas de oligonucleotídeos produzidas por meio de reações químicas automatizadas usualmente medem de 15 a 45 bases de comprimento, sendo sintetizadas para produzir uma sequência de bases específica. Sondas hibridizadas com alto grau de especificidade podem ser projetadas com base nas informações de sequências disponibilizadas em bancos de dados. Essas sondas podem ser produzidas na direção *sense* ou *antisense*, a um custo relativamente baixo. Essas sondas curtas são fitas únicas, difundem-se no alvo e hibridizam de modo rápido em função do pequeno tamanho, além de serem bastante sensíveis a incompatibilidades de até mesmo um único par de bases. A sensibilidade final alcançada pelas sondas de oligonucleotídeos é menor do que aquela apresentada pelas sondas recombinantes, por causa da limitada complexidade genética. Múltiplas sondas de oligonucleotídeos dirigidas contra diferentes áreas de um mesmo alvo às vezes são utilizadas para melhorar a sensibilidade por meio da ampliação da representação da sequência-alvo na mistura de sondas. Essa abordagem é análoga ao uso de uma combinação de anticorpos monoclonais que reagem contra diferentes epítopos do mesmo complexo antigênico.

Sondas mais longas do que aquelas obtidas por síntese química direta podem ser geradas por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou outras tecnologias de amplificação. Essas sondas podem ser fitas únicas ou duplas, dependendo das condições adotadas, bem como podem ser tão longas quanto o produto da reação de amplificação. Na maioria dos casos, medem de 100 bps a 1 kb de comprimento.

Amostra

Se por uma lado a escolha e preparação da sonda são essenciais para a determinação da sensibilidade e especificidade do ensaio de hibridização, por outro a contribuição do preparo da amostra para o sucesso do ensaio não pode ser negligenciada. Nas aplicações clínicas, as amostras de interesse podem ser bastante diferentes. Um laboratório de microbiologia, por exemplo, poderia prever o teste de amostras de sangue, urina, fezes e escarro. Pode ser difícil preservar a integridade dos RNA-alvos nessas condições, e até mesmo o DNA pode ser degradado pela manipulação inadequada. O objetivo da preparação da amostra é manter a integridade do ácido nucleico e disponibilizar a informação genética de interesse para interagir com a sonda. No caso de algumas aplicações, os requisitos de integridade do alvo determinarão a opção pelo congelamento instantâneo ou adição de tampão de lise que contenha poderosos inibidores de RNAse e DNAse. Em outras aplicações, mais métodos de rotina de coleta de amostras permitirão que o alvo seja preservado de forma adequada.

As similaridades físicas e químicas apresentadas pelos ácidos nucleicos, independentemente da fonte, permitem a utilização de métodos de extração e purificação uniformes. Para diversos ensaios, é preferível realizar uma extensa purificação de DNA ou RNA para remover os inibidores das enzimas a serem adicionadas ao ensaio (como uma enzima de restrição ou polimerase) e maximizar a acessibilidade do alvo à sonda. Entretanto, os esquemas de purificação completa são demorados e requerem uma quantidade relativamente considerável de amostra inicial. Em numerosas aplicações, é possível empregar técnicas simplificadas de purificação de amostra. As purificações em geral empregam lise celular (mecânica, química ou ambas), tratamento com protease e extração orgânica ou inorgânica. Hoje, existem métodos automatizados para padronizar e simplificar a extração de amostras.

Condições controladas e permissivas de pareamento de bases complementares

A sensibilidade e especificidade da reação de hibridização são em grande parte influenciadas pelo ambiente físico-químico durante a reação e subsequente detecção/coleta de moléculas híbridas. Na prática, o coquetel de hibridização é o meio empregado no controle do ambiente da reação de hibridização. Sendo empiricamente projetado, esse *coquetel de hibridização* consiste em uma mistura de reagentes selecionados para favorecer a interação dos ácidos nucleicos pelas pontes de hidrogênio sequência-específicas, e não por meio da carga. Os componentes variam amplamente, no entanto, incluem tampões, sais, agentes desnaturantes (p. ex., formamida), polímeros de alto peso molecular, DNA ou RNA transportadores e diversos componentes adicionados para reduzir a interferência de fundo (p. ex., detergentes, albumina bovina sérica, Ficoll). Uma mistura complexa desse tipo é convenientemente referida como *coquetel*. A força iônica tanto do coquetel de hibridização quanto das lavagens subsequentes é modulada com mais frequência pela concentração de um tampão de citrato de sódio em salina (SSC, *saline sodium citrate*), composto por cloreto de sódio (0,15 mol/L) e citrato de trissódio (0,015 mol/L), pH 7. A notação abreviada para tais condições diz respeito à força do SSC (ou seja, 2 x SSC; 0,1 x SSC). O grau de rigor final da reação de hibridização é controlado pela concentração de formamida e sal do coquetel de hibridização, pela temperatura em que ocorre a reação de hibridização e pela temperatura e concentração de sal nas etapas de lavagem.

Detecção dos híbridos

Uma ampla variedade de técnicas tem sido aplicada na coleta e análise de híbridos específicos, os quais serão brevemente discutidos na próxima seção. Uma vez que os híbridos específicos tenham sido coletados, os métodos de detecção obviamente estarão ligados aos métodos de marcação. Numerosas aplicações científicas e as primeiras aplicações clínicas dos ensaios de hibridização utilizavam marcações radioativas, como fósforo 32 (^{32}P), iodo 125 (^{125}I), enxofre 35 (^{35}S), carbono 14 (^{14}C) e trítio (^{3}H), que eram detectadas por meio de autorradiografia ou contagem de cintilação. A atividade específica da marcação influenciava diretamente a sensibilidade da detecção. Para as aplicações clínicas, buscaram-se alternativas à marcação radioisotópica. As sondas radioativas apresentam meia-vida relativamente curta, e isso torna instáveis os principais reagentes do ensaio de hibridização. Além disso, o risco imposto aos funcionários do laboratório e o custo do descarte de resíduos radioativos contribuem para a necessidade de encontrar métodos não radioativos. As sondas com marcação não isotópica são reagentes estáveis, facilitando bastante a produção não comercial e padronização essenciais à reprodutibilidade do ensaio.

A marcação não isotópica e os métodos de detecção de ácidos nucleicos apresentam muitas similaridades com os ensaios imunoquímicos desenvolvidos para a detecção não isotópica de proteínas. Em algumas aplicações, os ácidos nucleicos estão diretamente ligados a um composto gerador de sinal, em geral um fluorocromo ou, às vezes, uma enzima. Essa situação é análoga aos imunoensaios, em que o anticorpo primário é marcado. Os ácidos nucleicos são com frequência detectados de forma indireta, em ensaios que envolvem etapas múltiplas e, em termos de conceito, assemelham-se a uma reação com anticorpo indireto. A biotina, comumente utilizada como marcação por afinidade em imunoensaios, foi o primeiro marcador por afinidade a ser empregado para ácidos nucleicos (Langer, 1981). A própria bioti-

na em si não gera nenhum sinal, contudo, é detectada por uma interação de alta afinidade com moléculas de avidina ou estreptomicina que, por sua vez, são complexadas ou conjugadas a uma enzima geradora de sinal, fluorocromo ou partículas metálicas detectadas por dispersão luminosa (Yguerabide, 2001). Numerosos grupos funcionais distintos foram desenvolvidos como marcadores não isotópicos, entre os quais a bromodeoxiuridina, digoxigenina e sulfona. Nesses casos, a detecção é feita com anticorpos de alta afinidade dirigidos contra o grupo funcional. Esses anticorpos usualmente estão associados a uma enzima ou fluorocromo gerador de sinal, que atuam como anticorpo secundário marcado em uma reação imuno-histoquímica. A biotina também pode ser detectada utilizando anticorpos antibiotina, em vez de uma molécula de avidina ou estreptavidina.

Como as marcações por afinidade são detectadas com proteínas grandes e volumosas, como a avidina, ou um anticorpo, a disponibilidade da marcação para detecção do reagente é um fator crucial para a determinação da sensibilidade. Aumentando o número de marcações por afinidade, torna-se desnecessário aumentar o número de moléculas de detecção que serão ligadas ao ácido nucleico. Além disso, como as próprias marcações por afinidade são volumosas, o excesso de incorporação à molécula de ácido nucleico pode criar um obstáculo estérico da reação de hibridização. Por esses motivos, a atividade específica da marcação por afinidade não controla diretamente a sensibilidade da detecção.

Uma vantagem proporcionada pela detecção indireta das marcações por afinidade é a possibilidade de utilizar diversos métodos de detecção para a mesma marcação (Fig. 66.10). A biotina, por exemplo, pode ser detectada pela avidina ligada a uma enzima e subsequente detecção de formação de cor ou quimioluminescência, ou pela avidina com marcação fluorescente. Para todos os métodos não radioativos, a parte do ensaio que corresponde à detecção é crucial para a obtenção de uma sensibilidade ótima. Uma reação de hibridização efetiva pode ser arruinada por reagentes de detecção com interferência de fundo ruim e geração de sinal precária. A escolha das enzimas de marcação (peroxidase *versus* fosfatase alcalina), de substrato enzimático (colorimétrico *versus* quimioluminescente) e até mesmo da fonte de reagentes é crítica para a obtenção de resultados ótimos.

Formatos de ensaio de hibridização

Foi desenvolvida uma ampla variedade de formatos de ensaio de hibridização, cada um dos quais projetado para solucionar os problemas metodológicos apresentados por esse ensaio: condições que permitem o pareamento de bases complementares específico, um método para detecção de híbridos e a interpretação do resultado. Cada método possui pontos fortes e pontos fracos, de modo que a escolha do formato seja determinada pelo cenário clínico e pela pergunta diagnóstica em particular. Não existe nenhum ensaio perfeito. Vários dos formatos básicos serão brevemente descritos, bem como seus pontos fortes e pontos fracos particulares.

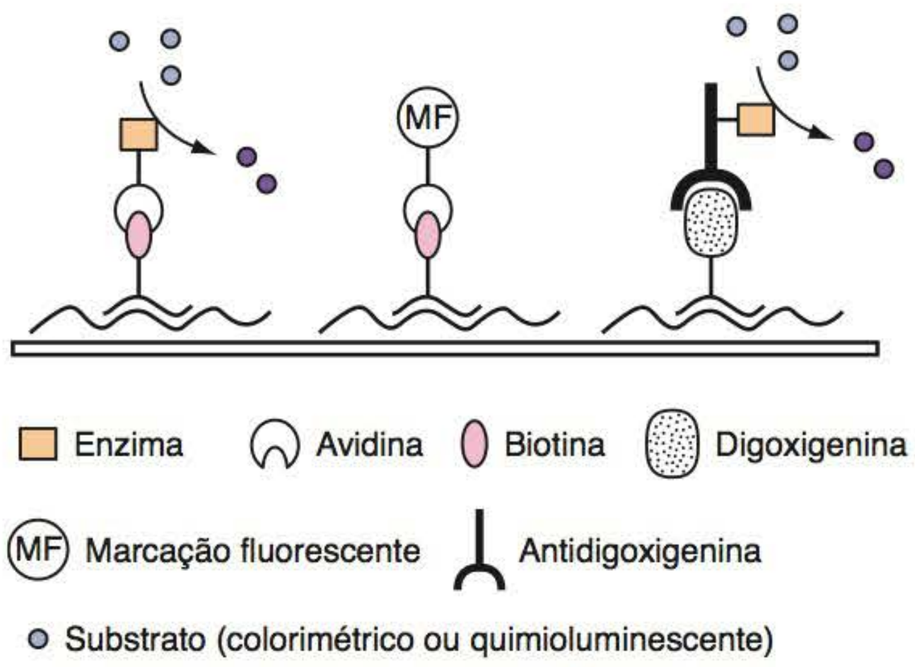


Figura 66.10 Exemplos de sistemas de detecção com sondas marcadas por afinidade. Os círculos azul-escuros representam o produto da reação catalisada pela enzima. (Adaptado com permissão de Unger ER, Piper MA: Nucleic acid biochemistry and diagnostic applications. *In* Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia, PA, EUA, WB Saunders, 1994.)

Cada ensaio de hibridização requer controles positivo e negativo para fins de validação. Um controle de amostra positivo é aquele que sabidamente contém sequências complementares à sonda. Isso é feito para estabelecer que a amostra seja devidamente preparada para liberar o alvo para o ensaio de hibridização, bem como para garantir que a sonda hibridize com o alvo específico nas condições do ensaio. Também pode ser utilizado um controle de amostra para monitorar a sensibilidade do ensaio, caso o controle positivo seja escolhido próximo dos limites inferiores de detecção. Um controle de amostra negativo (i. e., que sabidamente não contém sequências complementares à sonda) é utilizado para monitorar a especificidade das interações sonda-alvo. Os controles da sonda incluem sequências de vetor ou sondas não relacionadas marcadas, hibridizadas e detectadas sob condições de ensaio idênticas. Essas últimas condições permitem o monitoramento do sinal de fundo gerado pela localização da sonda por meio de interações não hibridizadas, como a carga ou captura. Na prática clínica, controles adicionais podem ser empregados para monitorar cada etapa do ensaio de hibridização.

Hibridização em fase líquida ou solução

Nos ensaios de hibridização em fase líquida, tanto a amostra quanto a sonda interagem em uma solução que maximiza a cinética da reação. As amostras de ácidos nucleicos em geral são purificadas para eliminação de proteínas e lipídeos contaminantes que poderiam interferir na coleta dos híbridos ao final do ensaio. O ensaio tolera certo grau de degradação da amostra. A amostra é desnaturada e aleatoriamente compartilhada antes da adição de uma sonda de fita única desprovida da capacidade de auto-hibridização.

A hibridização pode ser detectada pela ligação específica dos híbridos a uma matriz sólida, como a hidroxiapatita, que se liga apenas a estruturas em duplex. Uma vez que os híbridos estejam ligados, a sonda não hibridizada pode ser removida de modo eficiente por lavagem. A detecção da marcação na sonda ligada permite quantificar a reação de hibridização. Em uma variante dessa abordagem, um ensaio comercial (*Hybrid-Capture*) utiliza um anticorpo específico para híbridos de RNA-DNA para ligar especificamente estruturas em duplex constituídas pelo DNA-alvo e pela sonda de RNA. Uma análise alternativa envolve a digestão da mistura da reação de hibridização com a nucleasse S1 – uma enzima que atua apenas em ácidos nucleicos de fita única. Estruturas em duplex resistentes à digestão podem, assim, ser precipitadas pelo tratamento com ácido tricloroacético. No ensaio de proteção de hibridização, a marcação da sonda fica protegida da degradação química apenas quando a sonda está envolvida em uma estrutura em duplex.

Atualmente, estão em uso numerosas variações do ensaio de hibridização em fase sólida. A cinética ideal, a tolerância às etapas simplificadas de purificação e certo grau de degradação da amostra tornam o ensaio adaptável para fins de aplicação clínica. É possível quantificar o produto da reação dependendo do sistema de detecção. O formato em fase de solução não permite identificar o tamanho do produto de hibridização. Reações com baixa positividade são de difícil interpretação, pois os baixos níveis de alvo específico e os níveis elevados de alvo com fraca reatividade cruzada produzirão resultados similares. A hibridização em fase de solução é adaptável ao formato em placa de 96 poços, com leitura do tipo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), sendo possível prever um grau de automação cada vez maior para esse ensaio.

Hibridização em fase sólida

As variações dos ensaios de hibridização em fase sólida incluem a hibridização em ponto (*dot*) ou em mancha (*blot*), hibridização Southern, hibridização Northern, hibridizações por *microarrays* (*DNA chips*) e hibridização *in situ*. Nesses ensaios, a hibridização ocorre em ambiente bifásico, envolvendo uma fase sólida (em geral a amostra) e uma fase líquida (usualmente a sonda). A cinética da hibridização a um ácido nucleico ligado a um suporte sólido é bastante retardada, e a extensão da reação de hibridização é limitada. Essas desvantagens muitas vezes são superadas pela conveniência de contar com um meio sólido no qual ocorrem as múltiplas etapas do ensaio.

Hibridização dot/blot

Nesse formato de ensaio, múltiplas amostras são imobilizadas em arranjo geométrico em uma membrana de nitrocelulose ou *nylon*. O nome do ensaio advém do formato de cada amostra na membrana. Quando as amostras são aplicadas manualmente, esse formato é mais aleatório (*blot*). Empregando tubos de distribuição comercializados no mercado, as amostras usualmente são aplicadas por meio de sucção e, nesse caso, apresentam formato bastante irregular na membrana – arredondado (*dot*) ou alongado (*slot*). A matriz sólida permite que múltiplas amostras sejam processadas de modo simultâneo ao longo de todas as etapas do ensaio. Como todas as amostras e controles são expostos exatamente aos mesmos reagentes e condições, o grau de padronização do ensaio é maior.

A extensão do preparo da amostra varia desde a purificação completa dos ácidos nucleicos, antes da aplicação no filtro, até a aplicação direta da amostra não purificada. O ensaio tolera certo grau de degradação da amostra. Ácidos nucleicos purificados proporcionam a vantagem da maior disponibilidade para interação com a sonda, além de apresentarem menos problemas de interferência de fundo. A purificação de amostras individuais, contudo, é um processo demorado e trabalhoso. As aplicações que utilizam a transferência direta da amostra não purificada consomem todo o arranjo em um procedimento simplificado de purificação, que usualmente envolve lise e desnaturação, digestão proteica e lavagem com detergente. Essa abordagem tem como vantagem a aplicabilidade a pequenas quantidades de amostra de material inicial e a minimização do tempo consumido no preparo da amostra. Entretanto, a sensibilidade final da reação é menor, e a interferência de fundo por parte das interações inespecíficas da sonda pode tornar o ensaio pouco confiável.

A interpretação dos resultados do ensaio de hibridização *dot/blot* é relativamente simples. Quando a hibridização é efetivada, é gerado um sinal no ponto especificado. Dependendo da marcação utilizada para geração de sinal, é possível quantificar os resultados. Todavia, usualmente é fornecida apenas uma interpretação de sim/não (i. e., a amostra apresenta mais ou menos sinal do que as amostras adjacentes, bem como controles positivos e negativos). Os sinais fracos, que podem resultar de uma quantidade bastante pequena de alvo específico ou de uma grande quantidade de alvo apresentando reação-cruzada, podem causar problemas de interpretação. Não é disponibilizada nenhuma informação sobre o tamanho dos fragmentos de hibridização.

Uma interessante variação do ensaio *dot/blot* é conhecida como ensaio *dot/line blot* reverso. Nesse formato, aplicado em situações nas quais a amostra deve ser testada com muitas sondas diferentes e a amostra precisa ser limitada, a marcação é trazida para o ensaio pela amostra. As sondas não marcadas, ou alvos, são fixadas ao suporte sólido em arranjo linear ou matricial. As áreas de formação híbrida específica são identificadas e interpretadas como no ensaio *dot/blot* padrão. Esse formato de ensaio é uma forma conveniente de identificar o produto de um ensaio de amplificação (ver a seção seguinte e o Capítulo 67), como na tipagem do HLA (Bugawan, 1994) ou do papilomavírus humano (Gravitt, 1998).

Hibridizações Southern e Northern

Ambas as hibridizações, Southern e Northern, combinam a separação eletroforética do ácido nucleico de teste à transferência para um suporte sólido e subsequente hibridização. Esses ensaios, portanto, não só fornecem informação sobre a ocorrência de hibridização, mas também possibilitam a determinação do peso molecular das espécies de hibridização.

O procedimento original foi denominado hibridização por Southern *blot* ou Southern *blotting* em homenagem a seu inventor, E. M. Southern (Southern, 1975). Nesse ensaio, a amostra utilizada é o DNA. O *northern blotting* foi assim denominado em analogia àquela técnica utilizando amostras de RNA. (Estendendo a analogia ainda mais, o *western blot* é um procedimento similar em que as proteínas são submetidas à eletroforese e transferência. Foi descrita uma técnica de *southern-western blot*, que consiste na separação e *blotting* de DNA, seguidos de incubação com soluções proteicas para possibilitar a avaliação de proteínas de ligação ao DNA específicas.)

A preparação da amostra é demorada e trabalhosa para ambas as técnicas. Os ensaios não toleram a degradação da amostra de ácido nucleico, além de requererem uma quantidade relativamente significativa de material inicial. Para as hibridizações Southern, o DNA deve ser purificado com o mínimo de cisalhamento possível, uma vez que o dimensionamento dos fragmentos de DNA é feito por meio da digestão com uma ou mais enzimas de restrição. O cisalhamento e a degradação introduzem quebras aleatórias na amostra, reduzindo a quantidade disponível para ser cortada de forma específica nas sequências de reconhecimento apropriadas. As impurezas presentes na amostra podem interferir na atividade e especificidade da sequência da enzima de restrição. Amostras parcial ou inadequadamente digeridas podem produzir tamanhos de bandas falsos ou resultar em uma concentração de banda específica tão reduzida que deixa de ser detectada durante a hibridização. No caso da hibridização Northern, o material inicial é o RNA, e é necessário tomar extremo cuidado para evitar sua degradação durante a coleta e o preparo da amostra, em razão da natureza ubíqua das RNAses. O RNA é constituído de fragmentos cujos tamanhos são determinados pela transcrição e processamento de RNA mensageiro e ribossomal. Esse RNA não é digerido antes da eletroforese, contudo, é separado sob condições desnaturantes para remoção da estrutura secundária.

Os fragmentos são separados por tamanho no gel de agarose e, então, transferidos para um filtro de *nylon* ou nitrocelulose. Conforme o projeto original, a transferência se dá de forma passiva, por ação capilar. A maioria das aplicações atualmente utiliza vácuo ou pressão para acelerar a transferência. Após a transferência, os ácidos nucleicos são imobilizados por meio de ligação cruzada por ultravioleta ou cozimento, e a membrana é totalmente hibridizada com a sonda marcada.

A hibridização é seguida da detecção autorradiográfica, colorimétrica ou quimioluminescente das bandas com sequências complementares à sonda. A interpretação envolve tanto a detecção das espécies hibridizantes quanto a determinação do peso molecular da molécula. Esses ensaios tecnicamente exigentes requerem vários dias para serem realizados, mesmo assim pode ser necessário utilizá-los em aplicações clínicas nas quais outros formatos não são capazes de fornecer informação. A presença de bandas de pesos moleculares diferentes daqueles das amostras normais ou da linhagem germinativa (inalteradas em termos de desenvolvimento) pode indicar que o material genético sofreu alguma alteração.

Hibridização *por* microarray ("tecnologia do chip de DNA")

As hibridizações por *microarray* (microarranjo) podem ser consideradas uma variação do formato *dot/blot*, em que o material pontilhado é disposto em um padrão regular similar a uma grade, com cada característica reduzida a um tamanho bem pequeno. Dessa forma, de centenas a milhares de características podem ser colocadas sobre uma superfície sólida que, atualmente, é na maioria das vezes uma lâmina de vidro de microscopia. Por convenção, nessas aplicações, a amostra é marcada, e as características dispostas em arranjo são referidas como sondas. Os *microarrays* possibilitam traçar um amplo perfil transcricional ou determinar a sequência do genoma em um único experimento. A técnica e as aplicações são detalhadas no Capítulo 69.

Hibridização in situ

A hibridização *in situ* consiste na simples detecção de informação genética em um contexto morfológico. Esse tipo especializado de ensaio de fase sólida envolve a obtenção de amostras morfologicamente intactas de tecidos, células ou cromossomos fixadas em uma lâmina de vidro de microscopia por meio de um processo de hibridização. Para a detecção, têm sido empregados métodos autorradiográficos, colorimétricos e fluorescentes. A avaliação do produto final é bastante análoga à avaliação imuno-histoquímica e requer experiência em histopatologia. O ponto forte do método consiste em associar a avaliação morfológica microscópica à detecção de hibridização.

O método, discutido no Capítulo 69, também possui aplicações na análise citogenética da dispersão de cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos. Nesse contexto, a detecção usualmente é fluorescente e a técnica é referida como hibridização *in situ* com fluorescência (FISH). É possível detectar de maneira rápida aberrações numéricas ou translocações cromossômicas utilizando sondas para alvos específicos. A FISH elimina algumas das dificuldades da citogenética

convencional e pode apresentar maior sensibilidade para certos alvos. Embora a FISH não substitua completamente a cariotipagem, pode complementar e reduzir a necessidade de uma análise citogenética frequente. Variações mais modernas da FISH (Luke, 1998) exploram as possibilidades de automatização (FISH-rápida) e têm expandido a informação que pode ser obtida em um único ensaio. A imunofenotipagem e citogenética de interfase por fluorescência como ferramenta de investigação de neoplasmas (FICTION, *fluorescence immunophenotyping and interfase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms*) combina a imunofenotipagem à FISH. A FISH em fibra torna possível detectar e mapear de modo simultâneo os pontos de quebra cromossômicos. A FISH é considerada em maiores detalhes no Capítulo 69. A hibridização *in situ* pode ser uma técnica bastante trabalhosa e entediante. Aprimoramentos recentes, que resultaram na automatização do processamento das lâminas por meio do ensaio, representam bem mais significativamente uma promessa para a adoção mais ampla dessa técnica no futuro.

Métodos de amplificação

É quase impossível ler qualquer periódico médico sem se deparar com no mínimo uma aplicação da tecnologia da PCR. A PCR mudou para sempre o escopo das questões científicas a ser abordado para realmente eliminar o problema da limitação do tamanho da amostra. O reconhecimento da importância e elegância do conceito deu-se pela concessão do Prêmio Nobel de Química ao seu inventor, Kary Mullis, em menos de 10 anos após a publicação das primeiras aplicações práticas da PCR (Saiki, 1985). Atualmente, existem outras metodologias que resultam na multiplicação do alvo, sonda ou sinal. Tais metodologias podem ser agrupadas como tecnologias de amplificação, descritas no Capítulo 67.

Ensaios baseados em polimorfismos

Embora mais de 99% do genoma humano seja idêntico em todos os seres humanos, ainda existem milhões de regiões de DNA variáveis. Enquanto a maioria dos polimorfismos não produz consequências funcionais conhecidas, alterações nas regiões promotora ou intensificadora podem resultar em alterações na regulação da transcrição, causar variação de produtos de *splice* de mRNA (caso ocorra nas junções íntron-éxon), ou produzir sequências de aminoácidos alteradas (se um éxon for afetado). O gene codificador do transportador da serotonina (5-HTTLPR), por exemplo, pode ser encontrado sob a forma de duas variantes alélicas alternativas caracterizadas por um polimorfismo de inserção/deleção envolvendo 44 pares de bases na região promotora. Esse polimorfismo foi associado à ocorrência de distúrbios depressivos significativos, sendo possível distinguir as duas versões alélicas por meio da amplificação por PCR da região de DNA relevante, com consequente formação de dois produtos de tamanhos distintos (Fig. 66.11). A maioria das variações ocorre como alteração de uma base individual, conhecida como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Um exemplo seria a alteração do fragmento de *DNA ACGT* para *ACTT*, pela substituição da terceira base de guanina por timina. Dois indivíduos sem parentesco apresentarão cerca de três milhões de SNPs que são diferentes entre ambos.

As características do reconhecimento enzimático sequência-específico têm sido utilizadas desde a década de 1970, para detecção dessas variações de sequências. Nesses ensaios, denominados polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, "riflip"), o DNA é digerido por uma enzima de restrição e os fragmentos resultantes são analisados por eletroforese em gel, seguida da visualização das bandas ou análise de Southern *blot* utilizando sonda sítio-específica. Alterações na sequência de DNA podem resultar na alteração da sequência de reconhecimento da enzima. Uma alteração SNP pode introduzir sítios de enzima de restrição adicionais, remover sítios de restrição ou inserir/deletar sequências entre os sítios de restrição. Essas alterações serão refletidas na mudança do tamanho da banda visualizada em um gel ou da hibridização à sonda sítio-específica. Embora a abordagem tenha sido empregada com sucesso considerável em estudos familiais, a RFLP é um método relativamente imperfeito. O polimorfismo de sequências somente pode ser detectado se a distância entre dois sítios de restrição for diretamente afetada e a maioria dos SNPs não for detectada.

Em razão do tremendo potencial dos ensaios de polimorfismo para prever a herança de alelos alterados, esforços consideráveis foram empreendidos nos últimos anos a fim de melhorar a velocidade, precisão e efetividade de custo desses métodos. A conclusão do Projeto Genoma Humano, em 2001, disponibilizou uma referência para comparação de todos os demais dados de sequenciamento. Os pesquisadores também estão fazendo a triagem sistemática do genoma em busca de novos SNPs. Foram desenvolvidos métodos de análise de SNPs de alto *throughput*, que fazem a varredura simultânea de milhares de SNPs em milhares de amostras. O mapeamento abrangente do padrão de SNPs de um indivíduo é igualmente denominado genotipagem. A genotipagem é algo mais simples, uma vez que é possível comparar uma forma de uma dada sequência genética conhecida (alelo) a uma forma alternativa em um sítio predeterminado específico. Atualmente, utiliza-se uma ampla variedade de abordagens para discriminação alélica, sendo típico empregar uma combinação de técnicas moleculares. O leitor pode obter mais informações na referência de Chen & Sullivan (2002).

Correlação com a avaliação laboratorial da doença

Os próximos capítulos descrevem as atuais aplicações do diagnóstico molecular. É evidente que essa nova tecnologia causou impacto em todas as áreas do diagnóstico laboratorial. Os métodos moleculares também têm o potencial de redefinir a avaliação laboratorial das doenças para incluir aspectos que vão além de seu diagnóstico.

Diagnóstico molecular

As vantagens proporcionadas pela abordagem de diagnóstico molecular serão detalhadas para cada aspecto da aplicação atual. A crescente automação e os métodos comercialmente projetados reduziram os custos e o nível de conhecimentos técnicos necessários para a execução dos testes. Cada vez mais, a tecnologia molecular está sendo integrada à corrente principal de testes laboratoriais.

Detectar mutações e associá-las à doença constitui o objetivo central da atual explosão da informação na ciência médica, bem como de muitas aplicações no diagnóstico molecular. Uma das consequências mais importantes da revolução ocorrida na genética molecular foi o desenvolvimento da habilidade de localizar um gene responsável por uma dada doença sem conhecer o produto proteico correspondente.

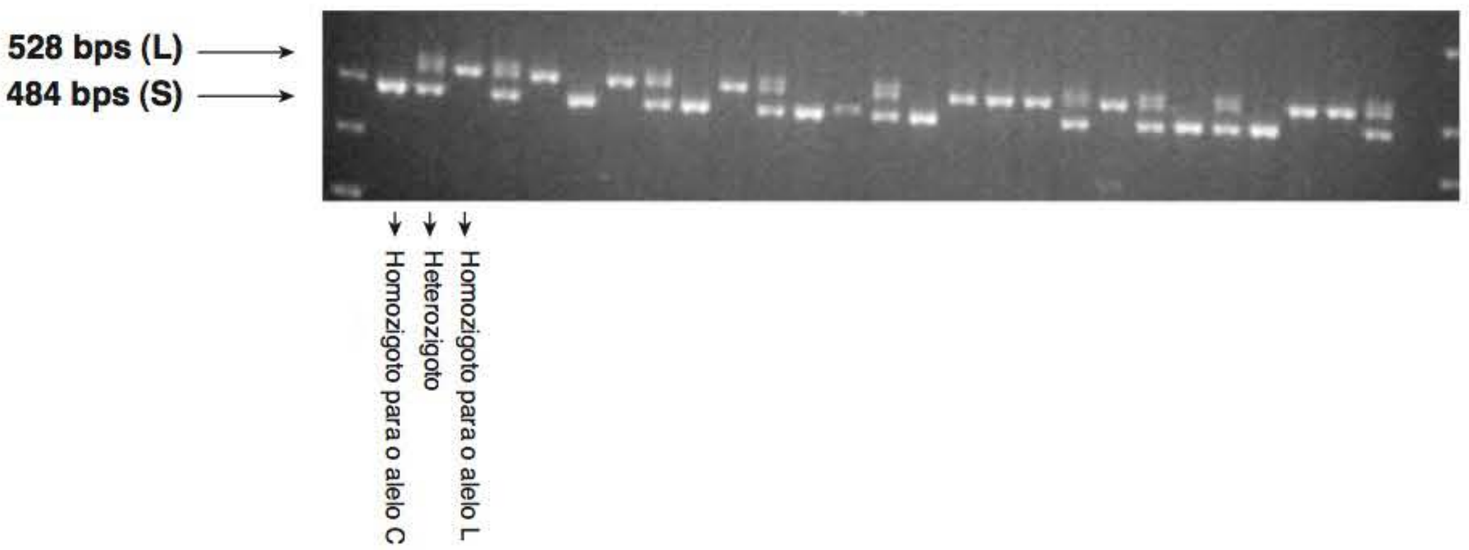


Figura 66.11 Exemplo de análise de polimorfismo por eletroforese em gel (tipagem alélica do gene codificador do transportador da serotonina [5-HTTLPR]). Foi sugerido que um polimorfismo de inserção/deleção envolvendo 44 pares de bases na região regulatória 5′ terminal está associado a um distúrbio depressivo significativo. A presença de dois alelos diferentes pode ser detectada por triagem utilizando iniciadores da reação em cadeia da polimerase em contracorrente e a jusante em relação ao sítio produtor de fragmentos de comprimentos distintos. Os *amplicons*, então, são separados por eletroforese em gel e corados com brometo de etídio. Um indivíduo pode ser homozigoto para a versão longa (alelo L = banda superior), heterozigoto com ambos os alelos (duas bandas) ou homozigoto para a versão curta (alelo C = banda inferior).

Denominado *clonagem posicional*, esse processo utiliza análises de ligação de RFLP de famílias que são portadoras e expressam a doença, a fim de localizar marcadores polimórficos cada vez mais próximos do gene determinante da doença até que este seja finalmente localizado. Marcadores polimórficos intimamente ligados e que tendem a segregar com a doença podem ser úteis em testes diagnósticos clínicos, mesmo antes de o gene ser totalmente caracterizado e da completa identificação do produto proteico. Nesse cenário, os testes de diagnóstico molecular são desenvolvidos e utilizados primeiro, para depois serem substituídos por métodos mais simples e custo-efetivos direcionados ao nível do produto genético, quando as consequências da mutação são inteiramente conhecidas.

Além do diagnóstico

As análises moleculares têm o potencial de ampliar de maneira significativao papel do laboratório nas áreas que envolvem aspectos além do diagnóstico das doenças. A análise molecular das mutações somáticas no câncer tem o potencial de fornecer informações prognósticas, orientar a escolha de uma terapia ideal e monitorar a resposta à terapia. Esse assunto será discutido nos Capítulos 71 e 76. As implicações do uso de marcadores moleculares para detecção de células neoplásicas na ausência de evidências clínicas ou morfológicas de doença, conhecida como doença residual mínima, atualmente estão sendo exploradas em uma variedade de tipos de malignidades (ver Cap. 71). Também é possível prever que essa abordagem do uso dos marcadores moleculares para detecção de doenças venha a causar impacto sobre os métodos secundários de prevenção ao câncer (triagem) e na avaliação da adequação da ressecção cirúrgica (avaliação das margens). A terapia genética para doenças de herança genética, bem como para o câncer, vem sendo introduzida com base em conhecimentos detalhados acerca da doença subjacente. O monitoramento desses pacientes quanto à presença e atividade dos genes terapeuticamente introduzidos acrescentará outro aspecto na avaliação laboratorial da doença.

Referências bibliográficas

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: Molecular Biology of the Cell, 4rd ed. New York, Garland Publishing, 2002.
Trata-se de um excelente livro-texto de biologia molecular, escrito de maneira clara. Está disponível em formato pesquisável no website do NCBI bookshelf: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books.

Bugawan TL, Apple R, Erlich H: A method for typing polymorphism as the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. Tissue Antigens 1994; 44:137–147.

Chen X, Sullivan PF: Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and thoughput. Pharmacogenomics J 2003; 3: 77–96.

Dykxhoorn DM, Lieberman J: The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool and therapeutic. Ann Rev Med 2005; 56: 401–423.
Revisão na área de RNA de interferência. Contém diagramas úteis e 114 referências.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998; 391:806–811.
Primeira descrição da existência de RNAi em células animais.

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM: Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. J Clin Microbiol 1998; 36:3020–3027.

Hanawalt PC: Transcription-coupled repair and human disease. Science 1994; 266:1957–1958.

Kan YW: Development of DNA analyses for human diseases: sickle cell anemia and thalassemia as paradigm. JAMA 1992; 267:1532–1536.

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:6633–6637.
Primeira descrição de nucleotídeos marcados por afinidade que apresentaram o nível de sensibilidade de detecção necessário à eventual substituição dos métodos radioativos.

Liechti-Gallati S, Koenig M, Kunkel LM, et al: Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. Hum Genet 1989; 81:343–348.

Luke S, Shepelsky M: FISH: recent advances and diagnostic aspects. Cell Vis 1998; 5:49–53.

Modrich P: Mismatch repair, genetic stability, and cancer. Science 1994; 266:1959–1960.

Papavassiliou AG: Transcription factors. N Engl J Med 1995; 332:45–47.
Tirada da série 'Molecular Medicine' do New England Journal of Medicine, esta breve revisão trata dos fatores de transcrição e de sua importância na medicina.

Pingoud A, Jeltsch A: Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucl Acids Res 2001; 29:3705–3727.

Radman M, Wagner R: The high fidelity of DNA duplication. Sci Am 1988; 259:40–46.

Rosenthal N: Regulation of gene expression. N Engl J Med 1994; 331:931–933.
Tirada da série 'Molecular Medicine' do New England Journal of Medicine, esta breve revisão trata da regulação da expressão genética e de sua relevância para a doença.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al: Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. Science 1985; 230:1350–1354.
Descrição original da reação em cadeia da polimerase.

Sancar A: Mechanisms of DNA excision repair. Science 1994; 266:1954–1956.

Sharp PA: RNA splicing and genes. JAMA 1988; 260:3035–3041.

Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98:503–517.
Descrição original da separação eletroforética de fragmentos de DNA, transferência para o filtro e hibridização para identificação.

Sutherland GR, Richards RI: Dynamic mutations. Sci Am 1994; 82:157–163.

Virshup DM: DNA replication. Curr Opin Cell Biol 1990; 2:453–460.

Weatherall DJ: Molecular pathology of single gene disorders. J Clin Pathol 1987; 40:959–970.

Weeda G, de Boer J, Donker I, et al: Molecular basis of DNA repair mechanisms and syndromes. Rec Results Cancer Res 1998; 154:147–155.

Yguerabide J, Yguerabide EE: Resonance light scattering particles as ultrasensitive labels for detection of analytes in a wide range of applications. J Cellular Biochem Suppl 2001;37:71–81.

Yu Z, Chen J, Ford BN, et al: Human DNA repair systems: an overview. Environ Mol Mutagen 1999; 33:3–20.

CAPÍTULO 67

Reação em cadeia da polimerase e outras tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos

Frederick S. Nolte PhD, Charles E. Hill MD PhD

Métodos de amplificação de alvo 1407
- Reação em cadeia da polimerase 1407
- Amplificação baseada em transcrição 1411
- Amplificação por deslocamento de fita 1412

Métodos de amplificação com sonda 1413
- Reação de amplificação da ligase 1414
- Tecnologia *cleavase/invader* 1414

Métodos de amplificação de sinal 1415
- DNA ramificado 1416
- Ensaios de captura híbrida 1416

Resumo 1417

Referências bibliográficas 1417

PONTOS-CHAVE

- A tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos criou novas oportunidades para que o laboratório clínico exercesse impacto na assistência prestada ao paciente.
- Embora a PCR seja o método de amplificação de ácidos nucleicos mais desenvolvido e amplamente utilizado, existem outros métodos com aplicação diagnóstica.
- As aplicações clínicas da tecnologia encurtam o caminho das disciplinas tradicionais na medicina laboratorial.
- É importante que todos os envolvidos na prática da patologia clínica conheçam os princípios básicos, os pontos fortes e as limitações dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos.

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*), por Mullis et al. (Saiki, 1988), foi um marco na biotecnologia, que anunciou o nascimento do diagnóstico molecular. Embora a PCR seja o método de amplificação do DNA mais amplamente utilizado, foram desenvolvidas outras abordagens, entre as quais várias apresentam propriedades e vantagens exclusivas. Esses métodos baseiam-se na amplificação do alvo, da sonda ou de um sinal. Exemplos de cada categoria serão discutidos nas seções deste capítulo. Essas técnicas apresentam uma sensibilidade analítica sem precedentes na medicina laboratorial, criando novas oportunidades para que o laboratório clínico exerça impacto na assistência prestada ao paciente.

Métodos de amplificação de alvo

PCR, amplificação baseada em transcrição e amplificação por deslocamento de fita são exemplos de métodos de amplificação-alvo. Todos eles compartilham algumas características fundamentais. Tratam-se de processos mediados por enzimas, nos quais uma ou múltiplas enzimas sintetizam cópias do ácido nucleico-alvo. Os produtos de amplificação de todas as técnicas são definidos por 2 oligonucleotídeos iniciadores, que se ligam a sequências complementares em fitas opostas de alvos constituídos por fitas duplas. Todos os processos resultam na produção de milhões a bilhões de cópias da sequência-alvo em questão de horas, sendo que, em cada caso, os produtos de amplificação podem servir de moldes para rodadas de amplificação subsequentes. Por causa disso, todas as técnicas são sensíveis à contaminação com moléculas de produtos oriundas de amplificações anteriores, o que pode acarretar a geração de resultados falso-positivos. Entretanto, foram desenvolvidos projetos, práticas e um fluxo de trabalho laboratorial especial destinados a reduzir a níveis aceitáveis a possibilidade de ocorrer reações falso-positivas.

Reação em cadeia da polimerase

A PCR é uma reação química *in vitro* simples, que permite a síntese de quantidades essencialmente ilimitadas de uma sequência de ácido nucleico-alvo. Para tanto, é necessário que uma DNA polimerase copie uma fita de DNA, mediante condições adequadas. Em sua definição mais simples, a PCR consiste em DNA-alvo, 2 oligonucleotídeos iniciadores em excesso molar, uma DNA polimerase estável ao aquecimento, mistura equimolar de trifosfatos de desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), $MgCl_2$, KCl e um tampão Tris-HCl. Os 2 iniciadores, que flanqueiam a sequência a ser amplificada, medem tipicamente menos de 100 bases e são complementares às fitas opostas do alvo.

A PCR é iniciada aquecendo-se a mistura da reação para que as 2 fitas de DNA-alvo se separem (desnaturação). Em seguida, o conjunto é resfriado para permitir que os iniciadores se anelem ao DNA-alvo de forma sequência-específica (anelamento) (Fig. 67.1). A DNA polimerase, então, começa a estender cada iniciador em sua terminação 3' (extensão). Os produtos da extensão do iniciador são dissociados do DNA-alvo por aquecimento. Cada produto de extensão, bem como o alvo original, pode servir de molde para rodadas subsequentes de anelamento e extensão de iniciador.

Um ciclo de PCR consiste em 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Ao final de cada ciclo, os produtos da PCR devem, teoricamente, ter sido duplicados. Assim, após n ciclos de PCR, a sequência-alvo pode ser amplificada 2^n vezes. Todo o procedimento é conduzido em um termociclador programável, que controla precisamente a temperatura em que as etapas ocorrem, bem como a duração de cada reação a diferentes temperaturas e o número de ciclos. De modo ideal, uma amplificação equivalente a 1 milhão de vezes é obtida após 20 ciclos de PCR e, após 30 ciclos, a amplificação conseguida é de 1 bilhão de vezes. Na prática, a amplificação talvez não seja totalmente eficiente, em razão da falha em otimizar as condições da reação ou da presença de inibidores da DNA polimerase. Nesses casos, a amplificação total é melhor descrita pela expressão: $(1 + e)^n$, em que e é a eficiência da amplificação ($0 = e = 1$) e n é o número total de ciclos.

Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)

A PCR foi originalmente descrita como uma técnica de amplificação de DNA. A PCR utilizando transcriptase reversa (RT-PCR) foi desenvolvida para amplificar alvos de RNA. Nesse processo, o DNA complementar (cDNA, *complementary DNA*) é produzido primeiramente a partir de RNAs-alvo por transcrição reversa e, em seguida, amplificado por PCR. Como descrito originalmente, a RT-PCR empregava 2 enzimas: uma transcriptase reversa sensível ao calor (p. ex., transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária [AMV-RT]) e uma DNA polimerase termoestável. Em razão dos requerimentos de temperatura da enzima termossensível, era necessário que a síntese de cDNA ocorresse a temperaturas mais baixas. Isso era problemático, tanto em termos de anelamento de iniciador inespecífico quanto em extensão de iniciador ineficiente em decorrência da formação de estruturas de RNA secundárias. Uma parte significativa desses problemas foi solucionada com o desenvolvimento de uma DNA polimerase termoestável derivada de

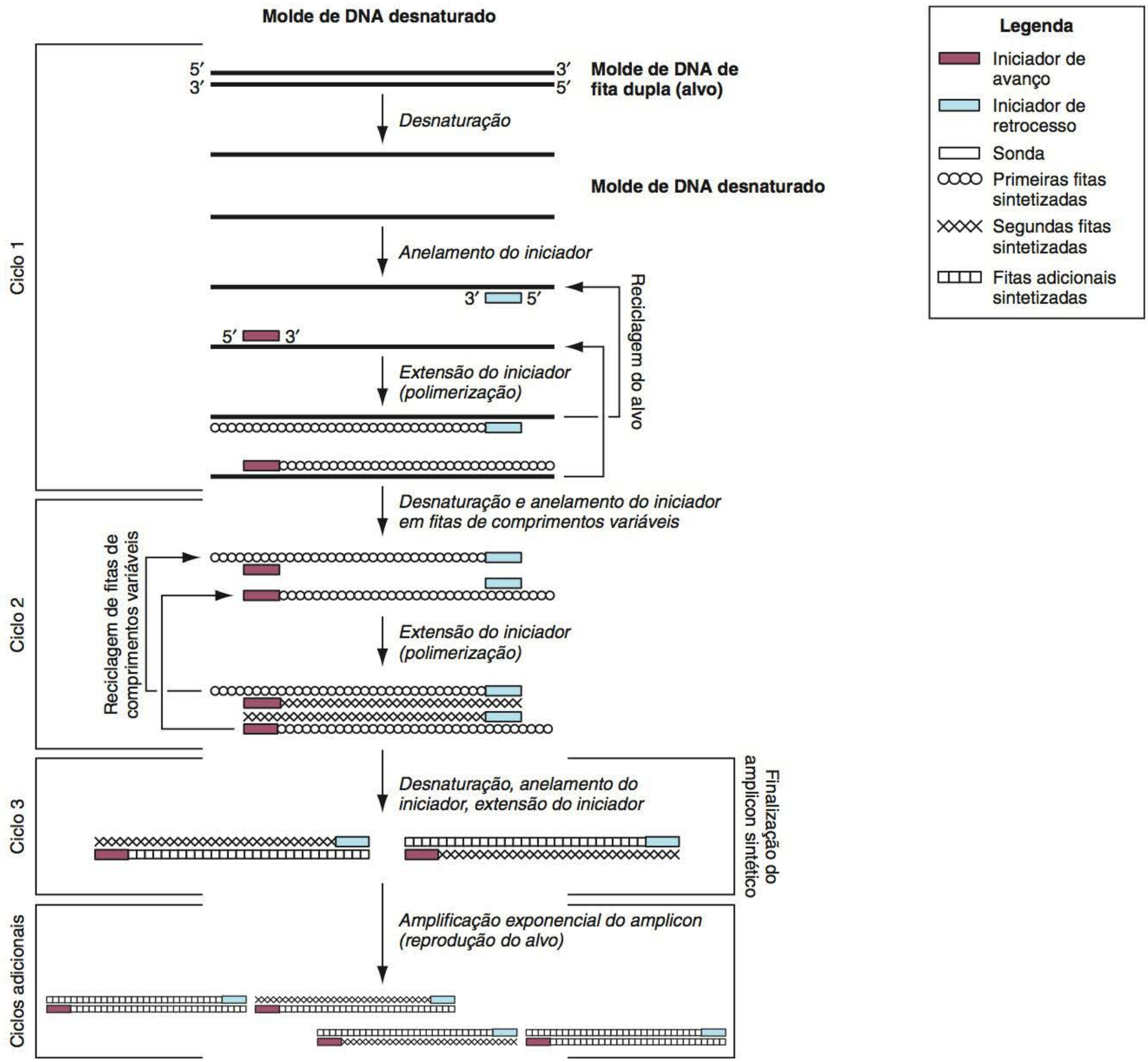


Figura 67.1 Reação em cadeia da polimerase. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

Thermus thermophilus. Essa enzima, sob condições apropriadas, é capaz de atuar de modo eficiente como transcriptase e como DNA polimerase (Myers, 1991). As RT-PCRs realizadas com essa enzima são mais específicas e eficientes, se comparadas aos protocolos anteriores, que utilizavam transcriptase reversa termossensível convencional. Existem kits comerciais (AMPLICOR, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) com RT-PCR de enzima única disponíveis para detecção de RNA do vírus da hepatite C (HCV), bem como para quantificação de RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1 e do HCV em amostras clínicas.

Embora a RT-PCR de enzima única apresente melhor sensibilidade e eficiência para detecção de alvos problemáticos, ainda existem muitas aplicações que empregam sistemas de 2 enzimas. Atualmente, são comercializadas transcriptases reversas termossensíveis modificadas e misturas de transcriptases reversas otimizadas, que apresentam especificidade e eficiência aprimoradas. A realização de uma reação de transcrição reversa utilizando iniciadores de sequência aleatórios permite realizar análises de PCR de múltiplos alvos a partir de uma única reação de transcrição reversa. Essa reação pode ser realizada utilizando iniciadores de oligo-dT, fornecendo cDNA apenas para mRNAs. Esse esquema também permite que a PCR seja realizada para múltiplos alvos a partir de uma única reação de transcrição reversa.

Reação em cadeia da polimerase aninhada (nested-PCR)

A PCR aninhada (*nested*-PCR) foi desenvolvida para aumentar a sensibilidade e a especificidade da PCR (Haqqi, 1988). A técnica emprega 2 pares de iniciadores de amplificação e envolve 2 rodadas de PCR. Tipicamente, um par de iniciador é utilizado na primeira rodada (15 a 30 ciclos). Os produtos dessa rodada de amplificação, então, são submetidos a uma segunda rodada, empregando o segundo conjunto de iniciadores, que se anelam a uma sequência interna da sequência amplificada pelo primeiro conjunto. A sensibilidade aumentada é obtida a partir do número total de ciclos, enquanto a maior especificidade está associada ao anelamento do segundo conjunto de iniciadores às sequências encontradas apenas nos produtos da primeira rodada, verificando, assim, a identidade do produto gerado nessa rodada. A principal desvantagem da *nested*-PCR é a elevada taxa de contaminação que pode ocorrer durante a transferência dos produtos da primeira rodada para o segundo tubo, para prosseguimento da segunda rodada de amplificação. Essa contaminação pode ser evitada pela separação física das misturas da primeira e da segunda rodadas de amplificação com o auxílio de uma camada de cera ou óleo, ou por meio do planejamento de protocolos

de amplificação utilizando apenas um tubo. Na prática, a maior sensibilidade proporcionada pelos protocolos de *nested*-PCR raramente se faz necessária em aplicações diagnósticas, sendo que a identidade de um produto de amplificação em geral é confirmada por meio da hibridização a uma sonda de ácido nucleico.

Reação em cadeia da polimerase multiplex

Na *multiplex*-PCR, 2 ou mais conjuntos de iniciadores, projetados para a amplificação de diferentes alvos, são incluídos na mesma mistura reativa (Chamberlain, 1988). Com essa técnica, é possível coamplificar em um único tubo mais de uma sequência-alvo de uma amostra clínica. Os iniciadores utilizados nas reações complexas devem ser escolhidos com cuidado, de modo que as temperaturas de anelamento sejam semelhantes, e não devem ser complementares entre si, para evitar a formação de dímeros de iniciadores e, consequentemente, reações ineficazes. As *multiplex*-PCRs são mais complicadas e, muitas vezes, menos sensíveis que as reações de PCR com conjunto único de iniciadores. No entanto, a *multiplex*-PCR permite detectar múltiplos alvos a partir de uma única amostra em apenas uma reação.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa de ponto final

Deve haver uma relação linear entre a quantidade fornecida de moldes e a quantidade de produtos de amplificação. Entretanto, como a quantidade final de produto de PCR depende da amplificação exponencial da quantidade inicial de moldes, diferenças mínimas em termos de eficiência de amplificação podem acarretar disparidades imprevisíveis bastante significativas no rendimento do produto final (Clementi, 1993). As diferenças existentes entre um tubo e outro podem depender da preparação da amostra, dos procedimentos de purificação do ácido nucleico, da presença de inibidores e do desempenho do termociclador. Por esses motivos, a simples quantificação dos produtos acumulados ao final da reação e o uso de curvas-padrão não são suficientes para determinar com segurança a quantidade de moldes inicialmente presente na amostra.

Foram desenvolvidas várias estratégias baseadas em PCR para quantificar com acurácia alvos de DNA e RNA em amostras clínicas. A abordagem por PCR competitiva (cPCR, *competitive PCR*) mostrou-se uma técnica confiável e robusta para aplicações clínicas (Gilliland, 1990; Piatak, 1993). O conceito básico por trás da cPCR é a coamplificação em um único tubo de reação de 2 moldes diferentes, que possuem comprimentos iguais ou semelhantes e as mesmas sequências de ligação de iniciador. Como ambas as sequências são amplificadas com o mesmo par de iniciadores, é possível garantir termodinâmicas idênticas e uma amplificação eficiente. É preciso saber a quantidade de um dos moldes e, após a amplificação, os produtos de ambos moldes devem ser distinguíveis. Diferentes tipos de competidores têm sido utilizados na cPCR, contudo aqueles mais efetivos geralmente são similares em termos de tamanho e composição de bases. Competidores a RNA devem ser utilizados em RT-PCRs, para resolver o problema da eficiência variável da transcrição reversa.

O rendimento da PCR em termos de produto é descrito pela equação: $Y = I(1 + e)^n$, em que Y é a quantidade de produtos de PCR, I é a quantidade de molde presente no início da reação, e é a eficiência da reação e n é o número de ciclos. Na cPCR, essa equação vale para ambos os moldes, sendo escrita da seguinte forma: competidor, $Y_c = I_c(1 + e)^n$; alvo, $Y_a = I_a(1 + e)^n$. Como e e n são os mesmos para competidor e alvo, a proporção relativa de produtos Y_c/Y_a depende diretamente da proporção de suas concentrações iniciais I_c/I_a, sendo que a função $Y_c/Y_a = I_c/I_a$ é linear.

Em teoria, uma única concentração de competidor é suficiente para quantificar uma quantidade desconhecida de alvo sem utilizar uma curva-padrão. Entretanto, como a análise de 2 espécies de moldes presentes em uma amostra em quantidades bastante diferentes pode ser uma tarefa difícil e imprecisa na prática, a cPCR geralmente era feita empregando várias concentrações de competidor dentro da faixa de concentração esperada do alvo. Todavia, essa abordagem não forneceu resultados mais acurados que aqueles obtidos com o uso de uma única concentração de competidor em um estudo sobre diversas abordagens para padronização da cPCR (Haberhausen, 1998). Os ensaios de PCR quantitativa de ponto final comerciais, para detecção de HIV-1 e HCV (Amplicor Monitor Tests, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), empregam uma única concentração de competidor para determinar a concentração inicial de alvo.

A próxima geração de ensaios de PCR quantitativa para laboratórios clínicos empregará métodos homogêneos cinéticos (em tempo real) de detecção de produtos (Barbeau, 2004) (ver próxima seção). Esses métodos proporcionam medidas mais precisas das concentrações iniciais de moldes, pois a análise é realizada no início da fase log de acúmulo de produtos e, como resultado, os métodos são menos propensos aos erros decorrentes das diferenças de eficiência de amplificação de uma amostra em relação a outra.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (homogênea, cinética)

A PCR em tempo real consiste em um método no qual as etapas de amplificação e detecção do alvo ocorrem de modo simultâneo, no mesmo tubo (homogênea). Esse tipo de método requer termocicladores especiais, dotados de óptica de precisão que permita monitorar a emissão de fluorescência a partir dos poços contendo amostra. Um *software* dá suporte ao termociclador no monitoramento dos dados durante cada ciclo da PCR (cinética), além de gerar um gráfico de amplificação para cada reação. A Figura 67.2 ilustra um gráfico de amplificação típico. Esse gráfico mostra o sinal de fluorescência normalizado emitido pelo *reporter* (R_n) a cada número de ciclo. Nos ciclos iniciais, ocorrem poucas alterações na quantidade de fluorescência. Isso define o nível basal representado pelo gráfico. Um aumento superior ao nível basal aponta a detecção de produtos de PCR acumulados. Para identificar as amostras positivas, é possível estabelecer um limiar fixo de fluorescência acima do nível basal. O ciclo de PCR em que a fluorescência da amostra ultrapassa esse limiar é definido como limiar do ciclo (C_L). Existe uma relação linear inversa entre o logaritmo da concentração inicial do alvo e o C_L. Alternativamente, o número do ciclo correspondente à alteração máxima da taxa de fluorescência, a segunda derivada máxima, apresenta uma relação similar com a concentração de alvo inicial.

No formato mais simples, o produto da PCR é detectado à medida que vai sendo produzido, com auxílio de corantes fluorescentes que se ligam preferencialmente ao DNA de fita dupla. O SYBR Green I é um dos corantes que têm sido empregados nesse tipo de amplificação (Morrison, 1998). No estado livre, a fluorescência emitida é relativamente baixa. Contudo, quando o corante se liga ao DNA de fita dupla, a emissão de fluorescência é consideravelmente intensificada. O corante com afinidade pelo DNA se ligará a qualquer DNA de fita dupla e, portanto, se ligará da mesma forma aos produtos específicos e inespecíficos da PCR. A especificidade da detecção pode ser aprimorada por meio da análise da curva de desnaturação. Conforme a temperatura é lentamente aumentada, as 2 fitas do *amplicon* sofrem desnaturação e se separam, ao mesmo tempo que a intensidade da fluorescência diminui. Os dados são transformados e analisados por meio da representação gráfica da primeira derivada da emissão de fluorescência no eixo y e da temperatura no eixo x. O produto específico

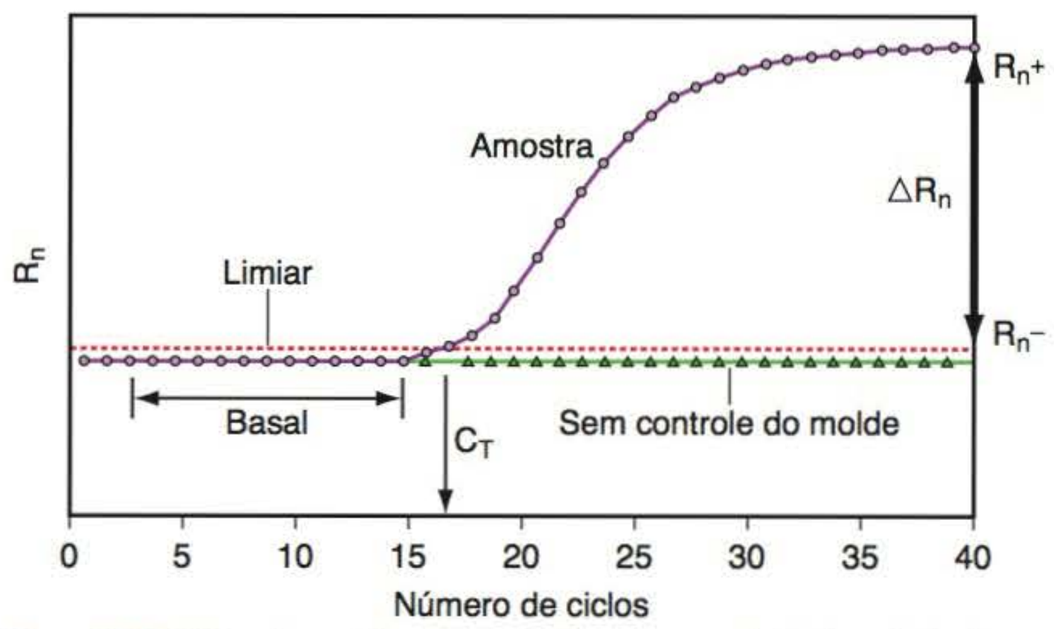


Figura 67.2 Gráfico da amplificação por PCR em tempo real. (Redesenhado de Applied Biosystems.)

amplificado apresentará um pico de desnaturação característico na temperatura de desnaturação prevista (T_d), enquanto os dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos devem apresentar T_d diferente ou picos maiores (Ririe, 1997).

A especificidade da PCR em tempo real também pode ser aumentada por meio da adição de sondas de hibridização à mistura das reações. Essas sondas são marcadas com corantes fluorescentes ou com combinações de um corante fluorescente a um corante de extinção. No ensaio de PCR com 5' nucleasse (Taqman), a atividade 5'–3' exonuclease da Taq DNA polimerase é utilizada para clivar uma sonda de hibridização não extensível durante a fase de extensão do iniciador da PCR (Holland, 1991). Essa abordagem emprega sondas de hibridização fluorogênicas duplamente marcadas. Um dos corantes fluorescentes atua como *reporter*, e seu espectro de emissão é extinto pelo outro corante fluorescente. A degradação da sonda de hibridização por ação da nuclease libera o corante *reporter*, acarretando um aumento de seu pico de emissão de fluorescência (Fig. 67.3). O aumento da emissão de fluorescência indica que um produto de PCR específico foi gerado, sendo que a intensidade da fluorescência está relacionada à quantidade de produto existente (Heid, 1996). A especificidade aumenta porque o sinal é gerado apenas quando o iniciador e a sonda estão ligados à mesma fita-molde.

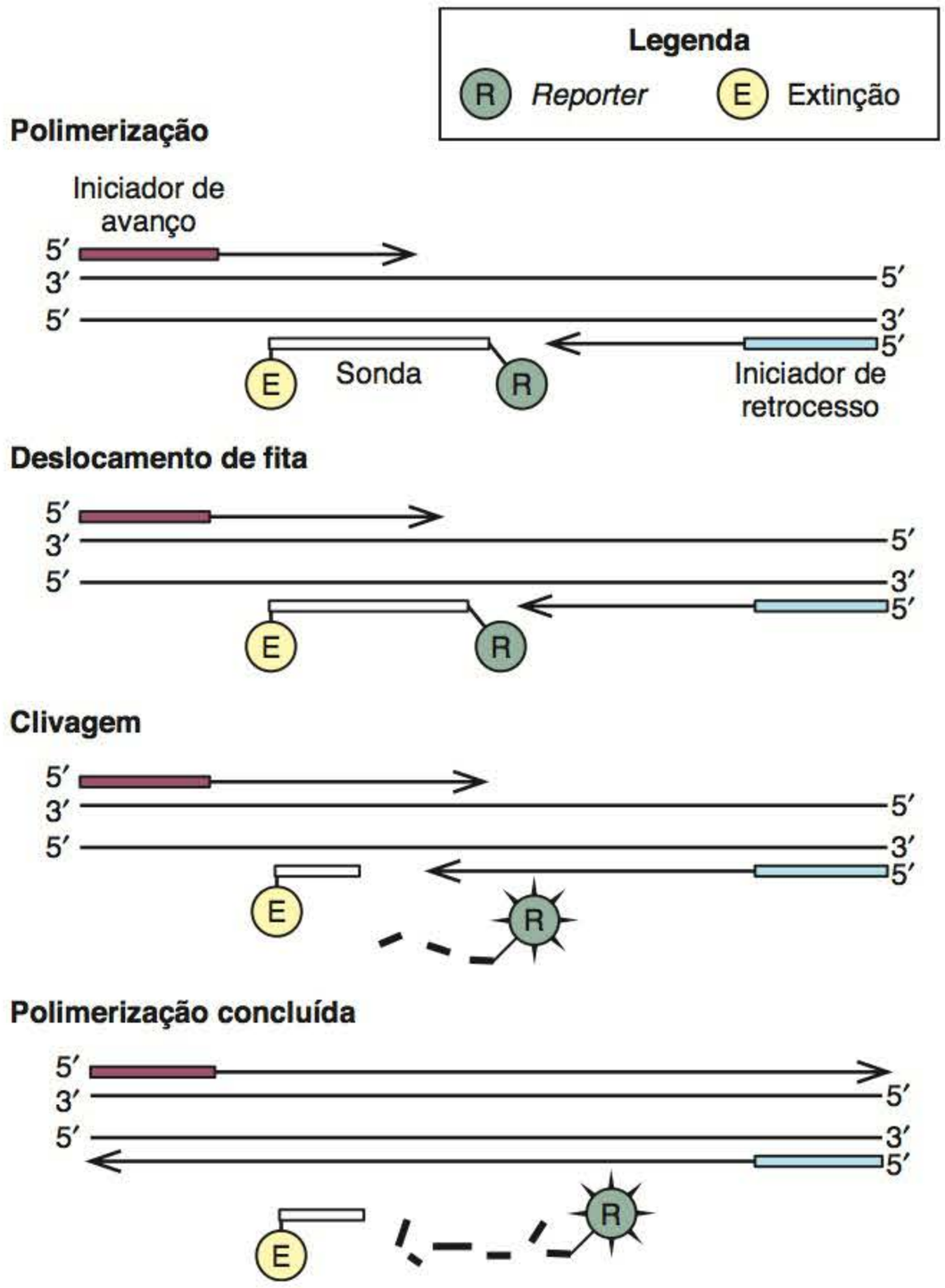


Figura 67.3 Mecanismo de geração de sinal em ensaios de PCR 5′ nuclease. (Redesenhado de Applied Biosystems.)

As sondas de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) também podem ser utilizadas para detectar o produto de PCR à medida que ele é gerado (Lay, 1997). Esse método requer 2 sondas oligonucleotídicas sequência-específicas especialmente projetadas. Essas sondas de hibridização são projetadas para hibridizarem próximas entre si, junto à molécula do produto. Conforme ilustra a Figura 67.4, a terminação 3' de uma das sondas é marcada com um corante doador, enquanto a terminação 5' da outra sonda é marcada com um corante receptor. O corante doador é excitado por uma fonte luminosa externa e, em vez de emitir luz, transfere sua energia ao corante receptor por meio de um processo denominado FRET. O corante receptor excitado emite luz a um comprimento de onda maior que aquele em que se dá a emissão do corante doador livre. A intensidade da emissão luminosa do corante receptor é proporcional à quantidade de produto de PCR existente.

A detecção e a quantificação em tempo real do produto de PCR também podem ser feitas utilizando-se guias moleculares (Tyagi, 1998). Os guias moleculares são sondas oligonucleotídicas com formato de grampo de cabelo, contendo um fluoróforo internamente extinto. A fluorescência desse fluoróforo é restaurada quando a sonda se liga ao ácido nucleico-alvo (Fig. 67.5). Essas sondas-guia são projetadas de tal modo que a porção da alça de sua molécula seja complementar à sequência-alvo. O tronco é formado pelo anelamento das sequências do braço complementar nas terminações da sonda. Um corante fluorescente é fixado a uma das terminações de um dos braços da sonda, e uma molécula de extinção (*quencher*) é fixada na terminação do braço oposto. O tronco mantém o fluorocromo e a molécula de extinção próximos entre si, de modo a evitar a emissão de luz. A sonda, ao encontrar uma molécula-alvo, forma um híbrido mais comprido e estável que o tronco e sofre alterações conformacionais que forçam o tronco a se separar. Com isso, o fluoróforo e a molécula de extinção se afastam um do outro e, assim, a fluorescência é restaurada.

Não é absolutamente necessário ter uma estrutura de tronco-alça para utilizar sondas não hidrolisáveis em aplicações de PCR em tempo real. As sondas de extinção escuras contêm um fluoróforo na terminação 5' e uma molécula de extinção não fluorescente na terminação 3' (Afonina, 2002). A fluorescência é extinta quando a sonda apresenta uma configuração aleatória em espiral, e é emitida quando a sonda se anela à sequência-alvo. Similarmente às sondas-guia moleculares ou sondas FRET, a DNA polimerase não degrada essas sondas durante a amplificação do alvo. Como não é fluorescente, a molécula de extinção escura não contribui para o sinal de fundo. Isso proporciona a vantagem de uma melhor proporção sinal/ruído no sistema de detecção, o que pode intensificar a sensibilidade. Essas sondas também incorporam um composto estabilizador de hibridização, conhecido como ligador de sulco menor (MGB, *minor groove binder*). Trata-se de uma molécula pequena, em forma de crescente, que se liga covalentemente à terminação 3' da sonda. Esta, por sua vez, estende-se por cerca de 3 a 4 nucleotídeos e se ajusta ao menor sulco do DNA, no qual forma pontes de hidrogênio com o molde. O ligador de sulco menor permite a utilização de sondas mais curtas e possibilita um melhor nivelamento da T_d, com consequente melhora da especificidade da reação de detecção (Kutyavin, 2000).

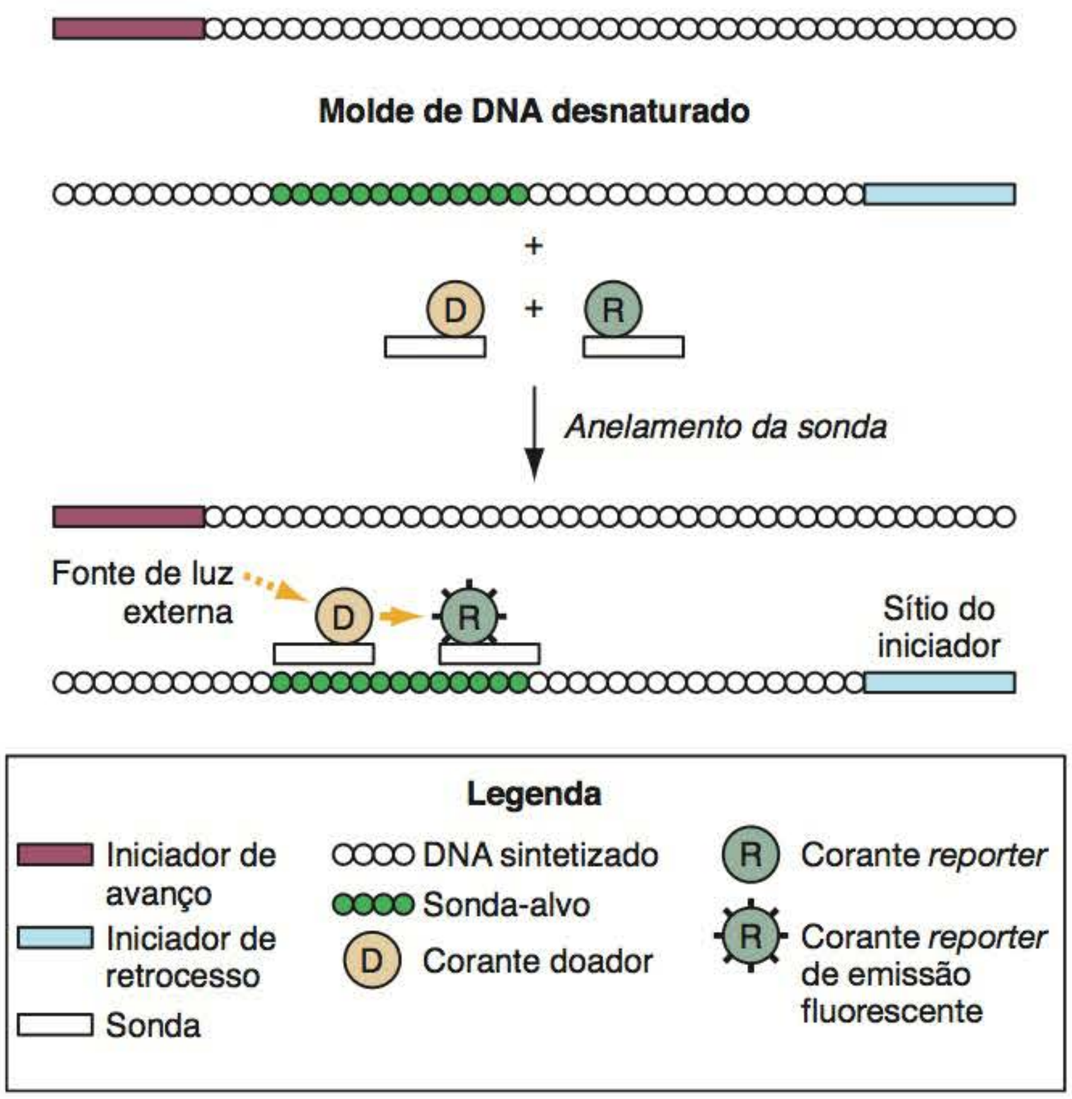


Figura 67.4 Sondas de transferência de energia de ressonância com fluorescência. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

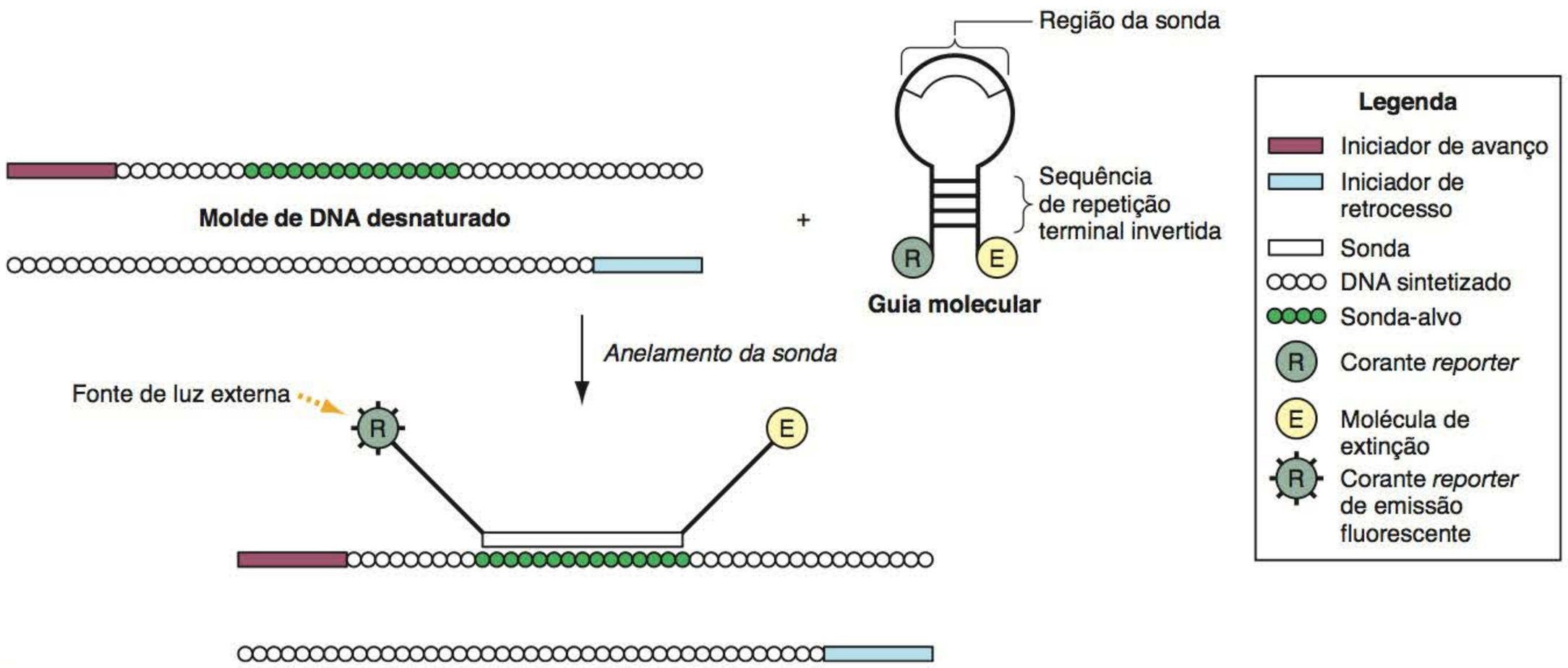


Figura 67.5 Sondas-guia moleculares. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

Os métodos de PCR em tempo real reduzem o tempo necessário para realizar os ensaios de detecção de ácido nucleico, porque dispensam as etapas de processamento pós-PCR. Do mesmo modo, como a amplificação e a detecção ocorrem no mesmo tubo fechado, esses métodos eliminam as manipulações de pós-amplificação que podem causar contaminação laboratorial com *amplicon*. Além disso, os métodos de PCR em tempo real são bastante úteis para aplicações quantitativas, pois a análise é realizada ainda no início da fase logarítmica de acúmulo do produto e, em consequência, é menos propensa aos erros que podem resultar das diferenças de eficácia da amplificação entre as amostras.

Reação em cadeia da polimerase de ciclo rápido

Enquanto os métodos de PCR em tempo real exerceram impacto significativo no tempo de ensaio, sua redução para os diversos formatos de PCR continua sendo alvo de considerável atenção. A PCR de ciclo rápido não difere quimicamente dos outros formatos de PCR padrão (Wittwer, 1991). As polimerases empregadas na PCR são capazes de incorporar de 35 a 100 nucleotídeos/segundo. É evidente que a maior parte do tempo consumido na execução da PCR se destina a equilibrar a temperatura para a solução, a fim de possibilitar um anelamento e uma extensão eficientes. Igualmente, gasta-se um tempo significativo na mudança de temperatura. Reduzindo o perfil térmico da solução, com a utilização de tubos ou capilares de parede delgada que forcem a solução reativa a entrar em colunas ou lâminas de líquidos, é possível melhorar as taxas de transferência térmica e as taxas de equilíbrio, de modo a reduzir significativamente o tempo de termociclagem. Em sistemas altamente otimizados, é possível aproximar-se da taxa de processabilidade ideal da polimerase, sendo possível realizar 40 ciclos de PCR em 30 minutos ou menos utilizando químicas de PCR padrão ou de PCR em tempo real.

Amplificação baseada em transcrição

A amplificação baseada em transcrição engloba a amplificação mediada por transcrição (TMA, *transcription-mediated amplification*) e a amplificação baseada na sequência de ácido nucleico (NASBA, *nucleic acid sequence-based amplification*). Ambas, TMA e NASBA, são técnicas isotérmicas de amplificação de ácido nucleico que, apesar de discretamente distintas na prática, são idênticas em termos de conceito e serão descritas juntas (Kwoh, 1989; Compton, 1991). TMA e NASBA são propriedades intelectuais do Gen-Probe (San Diego, CA) e do BioMérieux (Durham, NC), respectivamente. Essas técnicas essencialmente recapitulam a replicação retroviral *in vitro*, convertendo o RNA em DNA e, em seguida, utilizando o DNA como molde para transcrição de múltiplas cópias de RNA.

O processo começa com um RNA-alvo que, na maioria dos casos, existe como entidade de fita única, eliminando a necessidade de desnaturação térmica do molde antes da realização da amplificação (Fig. 67.6). Um DNA iniciador sequência-específico se liga ao RNA-alvo. A transcriptase reversa, então, estende o iniciador e cria um heteroduplex DNA-RNA. A terminação 5' do iniciador sequência-específico contém o promotor para uma polimerase do bacteriófago T7. A presença desse promotor T7 na terminação 5' do iniciador resulta na síntese de uma fita de DNA complementar ao RNA-alvo inicial, que contém o promotor T7 em sua terminação 5'. No caso do TMA, a própria enzima transcriptase reversa degrada o molde de RNA inicial enquanto sintetiza seu DNA complementar. Na NASBA, uma enzima à parte (RNAse H) degrada o molde de RNA inicial. A RNAse H cliva seletivamente o RNA que é heteroduplicado em DNA, e não em RNA isolado. Em ambos os casos, a fita única de DNA complementar resultante contendo a sequência promotora de T7 se liga a um segundo iniciador por meio da terminação 3'. A DNA polimerase inicia o alongamento a partir desse segundo iniciador, resultando na síntese de uma molécula de DNA de fita dupla que contém um promotor T7 intacto. Essa molécula de DNA, então, pode servir de molde para a polimerase T7 – uma enzima de bacteriófago que reconhece especificamente o promotor T7 e sintetiza múltiplas cópias de RNA. Cada uma das moléculas de RNA recém-sintetizadas está em antissentido (*antisense*) em relação ao alvo inicial, por isso elas conseguem se hibridizar ao segundo iniciador. A transcriptase reversa, o segundo iniciador, a RNAse H e a DNA polimerase, então, utilizam essa molécula de RNA *antisense* como molde para sintetizar novos moldes de DNA de fita dupla, que, por sua vez, produzem mais moldes de RNA. Utilizando esses métodos, é possível amplificar o RNA-alvo 10^9 vezes em até 2 horas.

TMA e NASBA proporcionam diversas vantagens em relação às técnicas de amplificação de RNA. Talvez a vantagem mais significativa seja a eliminação da necessidade da desnaturação inicial para que ocorra a amplificação. Com isso, as sequências de DNA não são desnaturadas e, assim, tornam-se incapazes de se ligar aos iniciadores durante a reação. A contaminação do DNA pode ser particularmente problemática quando técnicas como a PCR são utilizadas em ensaios de detecção de transcritos de RNA retroviral ou genes eucariônticos sem íntrons. NASBA e TMA eliminam o problema de contaminação do DNA que fornece determinações de RNA falsamente elevadas. Uma segunda vantagem reside no fato de essa tecnologia utilizar processos isotérmicos que evidenciam a necessidade de termocicladores sofisticados. A combinação dessa tecnologia ao uso de guias moleculares ou outras sondas sequência-específicas, que podem ser adicionadas diretamente à mistura de amplificação, cria um sistema de tubo fechado útil na prevenção da contaminação cruzada do *amplicon* em laboratório.

NASBA e TMA são empregadas com sucesso em uma variedade de aplicações. Essas técnicas têm sido utilizadas na detecção de alguns patógenos, incluindo vírus, como HIV, HCV, varicela-zóster,

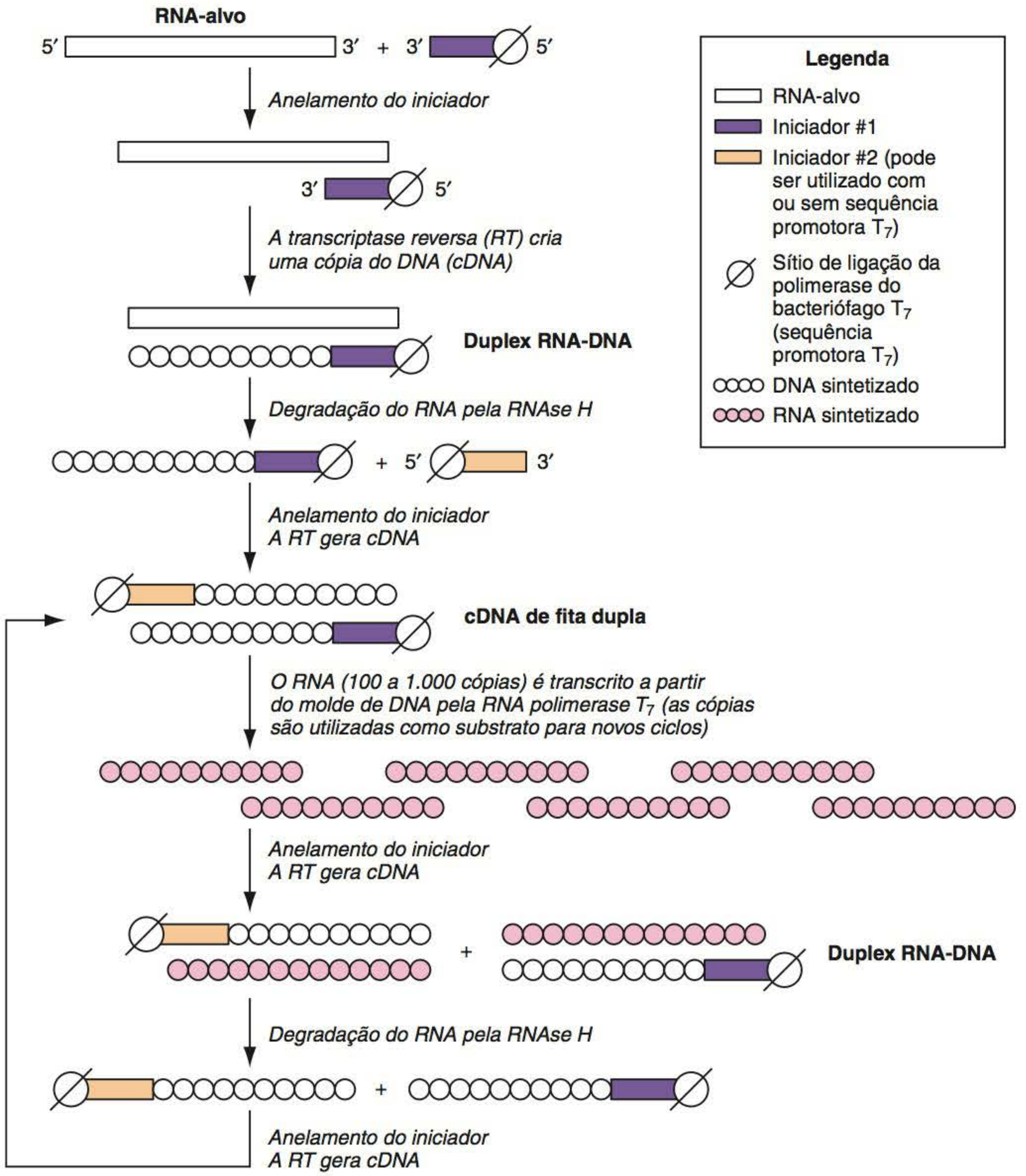


Figura 67.6 Amplificação baseada em transcrição. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

citomegalovírus (CMV), rinovírus, enterovírus, sarampo e papiloma vírus humano, e bactérias, como *Mycobacterium tuberculosis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae* e *Campylobacter jejuni*. Além disso, foram desenvolvidos testes quantitativos para HIV e HCV utilizando essa tecnologia. Também foram descritas aplicações genéticas humanas, como a tipagem HLA e a detecção da mutação do fator de Leiden V.

Em resumo, TMA e NASBA são técnicas de amplificação de RNA isotérmicas, de aplicabilidade disseminada e que proporcionam diversas vantagens exclusivas, distintas das oferecidas por outros métodos de amplificação, especialmente em termos de eliminação dos problemas de contaminação do DNA, sobretudo aqueles associados aos genes retrovirais e sem íntrons. A combinação dessas técnicas ao uso de sondas fluorescentes possibilita a amplificação em tempo real, tubo fechado e etapa única, dispensando a necessidade de ciclagem térmica.

Amplificação por deslocamento de fita

A amplificação por deslocamento de fita (SDA, *strand-displacement amplification*) é uma técnica de amplificação de molde isotérmica que pode ser utilizada para detecção de quantidades mínimas de DNA ou RNA de uma determinada sequência em particular. A SDA foi descrita pela primeira vez como um processo de amplificação direto que apresenta algumas limitações técnicas (Walker, 1992a, 1992b). Desde a sua descrição inicial, contudo, a técnica evoluiu e se transformou em uma ferramenta altamente versátil e de execução simples, embora conceitualmente complexa.

No atual processo de iteração, a SDA é realizada em 2 fases distintas: geração de alvo e amplificação exponencial do alvo (Little, 1999). Apenas a fase de amplificação do alvo é ilustrada na Figura 67.7. Na fase de geração de alvo, uma fita dupla de DNA-alvo é desnaturada e hibridizada em 2 pares de iniciadores distintos, chamados de iniciador amortecedor (*bumper*) e iniciador de amplificação. Os iniciadores de amplificação incluem a sequência da endonuclease de restrição de fita única para *Bso*B1, localizada na terminação 5' da sequência de ligação-alvo. Os *bumpers* são mais curtos e se anelam ao DNA-alvo em sentido oposto à região a ser amplificada. Na presença de *Bso*B1, DNA polimerase livre de exonuclease e de uma mistura dNTP consistindo de dUTP, dATP, dGTP e dCTP tiolada (C_s), são gerados produtos de extensão simultânea de ambos os iniciadores (*bumper* e de amplificação). Esse processo desloca os produtos dos iniciadores de amplificação, que estão disponíveis para hibridização com os produtos da fita oposta com iniciadores *bumper* e de amplificação da fita oposta.

A extensão simultânea dos iniciadores da fita oposta produz fitas complementares aos produtos formados pela extensão do primeiro iniciador de amplificação com C_s incorporado ao sítio de clivagem de *Bso*B1. Esse produto entra na fase de amplificação exponencial do alvo da reação. A enzima *Bso*B1 reconhece o sítio de fita dupla, porém, como uma das

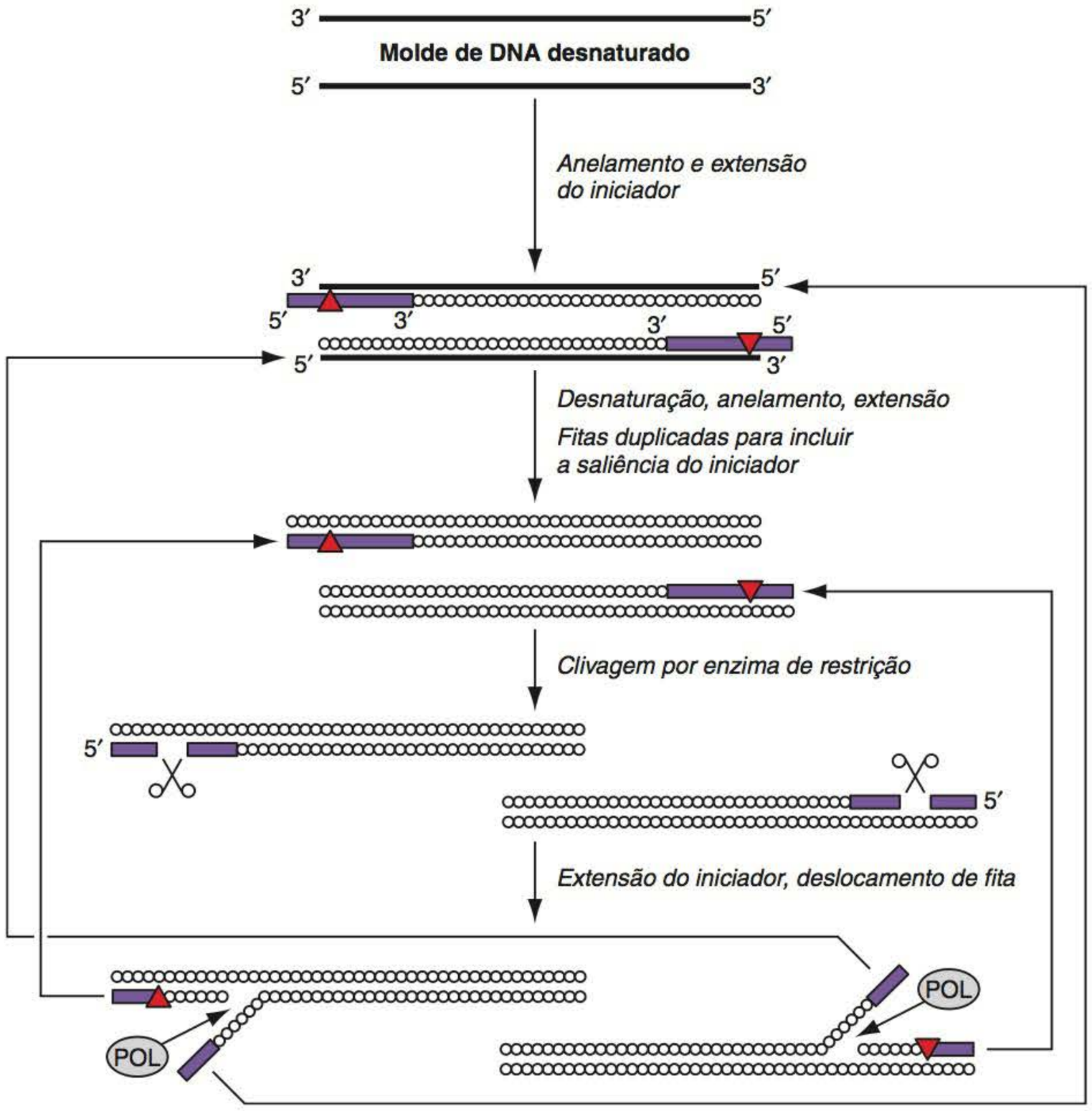


Figura 67.7 Amplificação por deslocamento de fita. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

fitas contém Cs, esse sítio sofre apenas um entalhe, em vez de ser clivado pela enzima. A DNA polimerase, em seguida, liga-se ao entalhe e começa a sintetizar uma nova fita, ao mesmo tempo em que desloca a fita no mesmo sentido. Essa etapa recria as espécies de fita dupla com sequência de reconhecimento da endonuclease de restrição hemimodificada, bem como as repetições de entalhes iterativos e processos de deslocamento. As fitas deslocadas são capazes de se ligar aos iniciadores da fita oposta, que promovem a amplificação exponencial das sequências-alvo.

Esses produtos de fita única também se ligam às sondas de detecção utilizadas na detecção por PCR em tempo real. As sondas detectoras são moléculas de DNA de fita única marcadas com fluoresceína e rodamina. A região localizada entre essas marcações engloba uma estrutura de tronco-alça. A alça contém o sítio de reconhecimento da enzima *Bso*B1. As sequências-alvo específicas estão situadas em posição 3' em relação à marcação da rodamina. Na ausência do alvo específico, a estrutura de tronco-alça é mantida com as marcações de fluoresceína e rodamina em íntima proximidade. O efeito líquido é a detecção de uma emissão muito baixa de fluoresceína após a excitação. Após a SDA, a sonda é convertida em uma espécie de fita dupla, que é clivada pela *Bso*B1. A clivagem promove a separação física das marcações de fluoresceína e rodamina, com consequente aumento da emissão da fluoresceína.

As aplicações diagnósticas da SDA incluem a detecção direta de *M. tuberculosis, C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas. Há relatos de que a sensibilidade da SDA é alta o suficiente para detectar de 10 a 50 cópias de uma molécula-alvo (Walker, 1992a). Utilizando-se o conjunto de iniciadores projetado para amplificar uma sequência repetitiva com 10 cópias no genoma de *M. tuberculosis*, o ensaio torna-se sensível o bastante para detectar de 1 a 5 cópias de genoma da bactéria. Recentemente, a SDA foi adaptada para quantificar RNA, adicionando-se uma etapa mediada pela transcriptase reversa (RT-SDA). Nesse caso, um iniciador é hibridizado ao RNA-alvo, e uma transcriptase reversa sintetiza cDNA. Esse cDNA, então, pode servir de molde para a incorporação do iniciador e o deslocamento da fita. Os produtos desse deslocamento de fita alimentam o esquema de amplificação descrito anteriormente. A RT-SDA foi utilizada para determinar a carga viral do HIV (Nycz, 1998).

A principal vantagem da SDA é ser um processo isotérmico que, diferente da PCR, pode ser realizado a uma única temperatura após a desnaturação inicial do alvo. Isso elimina a necessidade de usar termocicladores caros. Além disso, as amostras podem ser submetidas à SDA em um único tubo de ensaio, com tempos de amplificação que variam de 30 minutos a 2 horas. A principal desvantagem da SDA reside no fato de que a temperatura relativamente baixa (52,5°C) em que essa técnica é realizada, diferentemente da PCR, pode resultar na hibridização inespecífica do iniciador a sequências encontradas em misturas complexas, como o DNA genômico. Por isso, quando a quantidade de alvo é pouco abundante se comparada ao DNA de fundo, produtos da amplificação inespecífica podem inundar o sistema, diminuindo a sensibilidade da técnica. Entretanto, esse problema foi bastante amenizado com o uso de solventes orgânicos para aumentar o rigor a baixas temperaturas e a recente introdução de polimerases mais termoestáveis, capazes de deslocar a fita.

Métodos de amplificação com sonda

Os métodos que empregam sondas de amplificação diferem da amplificação de alvos no sentido de que os produtos de amplificação contêm uma sequência encontrada apenas nas sondas iniciais. A reação de amplificação da ligase e a tecnologia *cleavase/invader* exemplificam os métodos de amplificação com sonda que têm sido utilizados em aplicações diagnósticas.

Reação de amplificação da ligase

Em uma reação padrão de amplificação da ligase (LAR, *ligase amplification reaction*), 2 sondas oligonucleotídicas são hibridizadas adjacentes uma à outra em cada uma das fitas de DNA-alvo desnaturadas, de modo a formar um "entalhe". Em seguida, uma DNA ligase termoestável veda o entalhe unindo-se à terminação 3' de uma sonda e à terminação 5' da outra. Cada produto ligado, bem como o alvo original, pode servir de molde em ciclos subsequentes de desnaturação, anelamento e ligação, com consequente acúmulo exponencial de produtos (Wu, 1989; Barany, 1991).

Uma modificação dessa técnica, denominada reação da cadeia da ligase fenestrada (G-LCR, *gapped ligase chain reaction*), difere da LAR padrão, em que há formação de um pequeno hiato após o anelamento das sondas ao modelo (Fig. 67.8). O hiato é preenchido por uma DNA polimerase termoestável e o entalhe resultante é, então, ligado pela DNA ligase (Birkenmeyer, 1991). Uma combinação de kit de G-LCR para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas chegou a ser comercializada (Abbott), mas acabou sendo retirada do mercado americano. No entanto, esse kit ainda é vendido fora dos Estados Unidos. Nesse teste, os produtos de amplificação são capturados por micropartículas recobertas com anticorpos anti-hapteno, que se ligam ao hapteno capturado presente em uma das sondas. O anticorpo de detecção é dirigido contra um segundo hapteno presente na outra sonda e está conjugado à fosfatase alcalina. O anticorpo de detecção se liga apenas ao produto da amplificação capturado pela micropartícula. O produto ligado é detectado por meio da adição de um substrato fluorogênico, que é desfosforilado para gerar uma molécula fluorescente (Fig. 67.8).

Tecnologia *cleavase/invader*

A tecnologia *cleavase/invader* consiste em um método à base de sonda de amplificação, no qual determinadas estruturas de DNA são reconhecidas e clivadas de modo específico por membros da família FEN-1 de DNA polimerases (Lyamichev, 1999). Essas polimerases clivam a borda 5' da fita única de um duplex ramificado de bases pareadas, sendo denominadas *cleavases*. Essa atividade enzimática provavelmente exerce papel essencial na eliminação das estruturas complexas de ácidos nucleicos que surgem durante a replicação e o

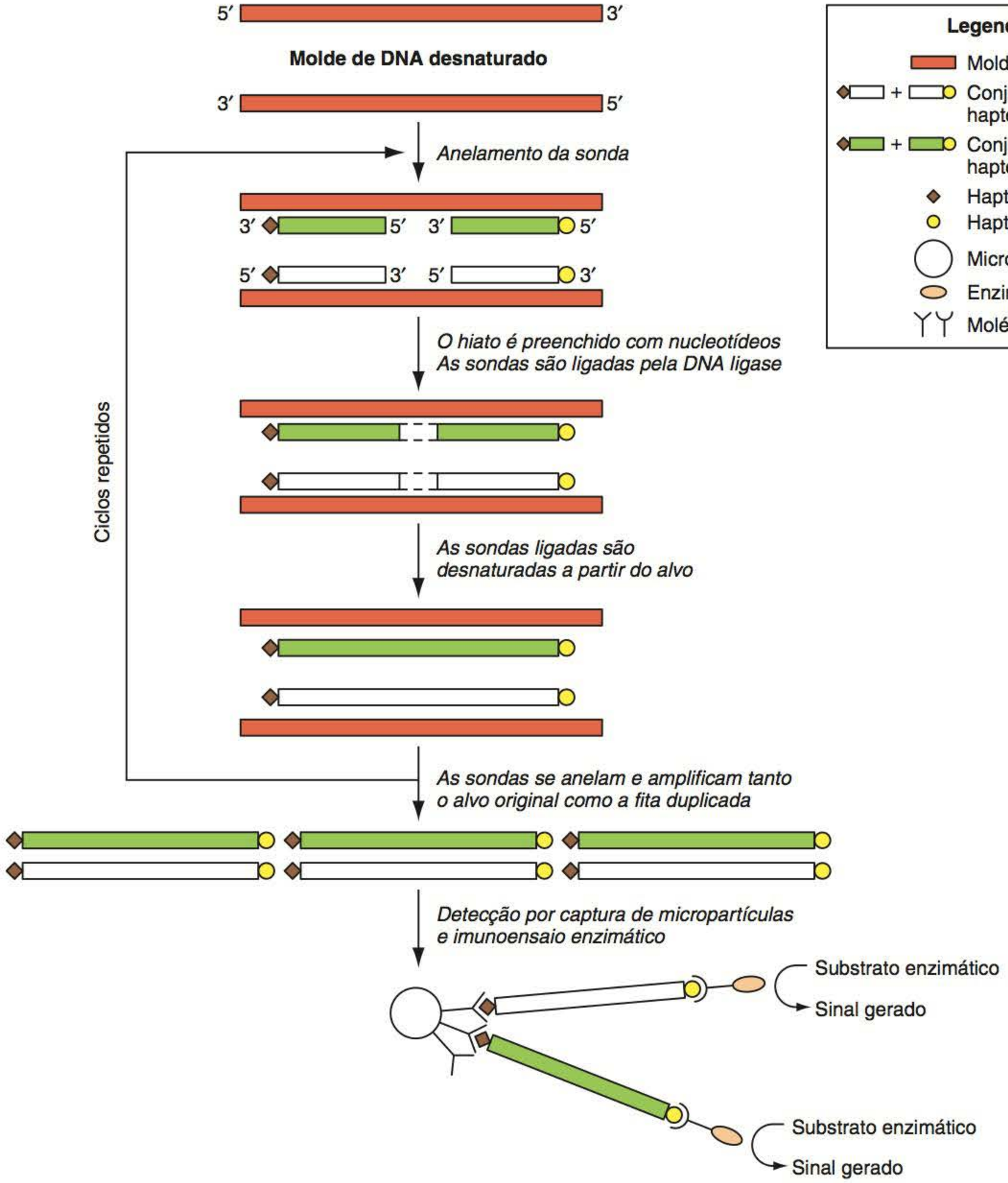


Figura 67.8 Reação da cadeia da ligase fenestrada. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

reparo do DNA *in vivo*. Como tais estruturas podem ocorrer em qualquer local do genoma em processo de replicação, a enzima reconhece a estrutura molecular do substrato independentemente da sequência de ácidos nucleicos que forma o complexo de DNA (Lieber, 1996). Foi demonstrado que essa atividade enzimática é uma ferramenta bastante útil para a análise de DNA, constituindo a base dessa tecnologia.

Nos ensaios *cleavase/invader*, 2 iniciadores são projetados para hibridizar a sequência-alvo por sobreposição (Fig. 67.9). Sob condições de anelamento apropriadas, as sondas de sinal e *invader* se ligam à sequência-alvo de tal modo que a hibridização do *invader* ocorra no sentido oposto ao da sonda de sinal, com uma região de sobreposição entre a terminação 3' do *invader* e a terminação 5' da sonda de sinal. Mediante condições adequadas, a sobreposição dos sítios de ligação dos iniciadores resulta no deslocamento do equilíbrio existente entre os iniciadores. A *cleavase* somente cliva bordas 5' e, com isso, a terminação 5' da sonda de sinal é liberada. A sequência-alvo atua como uma armação sobre a qual pode ser formada a estrutura de DNA correta. Como a estrutura de DNA que serve de substrato para a *cleavase* ocorre somente em presença da sequência-alvo, a geração de produtos da *cleavase* indica a presença do alvo. O produto clivado é detectado por se ligar a uma sonda FRET e funcionar como sonda *invader* para ela. A terminação 5' da sonda FRET é cortada por uma *cleavase*, com consequente liberação de molécula *reporter*, do mesmo modo como libera a terminação 5' da sonda de sinal.

O uso de uma enzima *cleavase* termoestável permite que as reações ocorram a temperaturas altas o suficiente para haver equilíbrio de troca de iniciador. Isso faz que sejam formados múltiplos produtos da *cleavase* a partir de uma única molécula-alvo. Dessa forma, o ensaio *invader* pode ser executado sob condições isotérmicas, eliminando a necessidade de ciclagem térmica. Essa tecnologia foi utilizada para detecção, quantificação e caracterização de uma variedade de ácidos nucleicos-alvo microbianos e humanos (Rosetti, 1997; Ryan, 1999).

A tecnologia *cleavase/invader* conta com diversas vantagens inerentes em relação às demais estratégias de amplificação. Como apenas é necessário que a sobreposição existente na sonda *invader* envolva um par de bases, essa tecnologia pode ser facilmente adaptada para detectar mutações pontuais de interesse, projetando a região de sobreposição para abranger a mutação a ser detectada. Ademais, diferentemente das técnicas de amplificação de alvo, em que a própria sequência-alvo é amplificada, o ensaio *invader* não aumenta a quantidade de sequências-alvo. Assim, ele é menos propenso a apresentar resultados falso-positivos decorrentes da contaminação cruzada do *amplicon*.

Além do ensaio *invader*, a *cleavase* também pode ser utilizada para gerar polimorfismos de comprimento de fragmento (de modo análogo ao polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). Por meio da desnaturação do DNA genômico seguida de um rápido resfriamento, há formação no DNA de estruturas secundárias em forma de alça de grampo de cabelo altamente reproduzíveis, que servem de substrato para a *cleavase*. A digestão do DNA resulta em um padrão distinto que tem sido empregado com sucesso na triagem da hepatite C resistente ao interferon-α (Sreevatsan, 1998) e na detecção de mutações específicas em genes humanos (Rosetti, 1997). Como as alças em forma de grampo de cabelo apresentam maior diversidade que a maioria dos sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, é possível realizar uma análise versátil dos padrões de fragmentação.

Assim, as endonucleases estrutura-específicas podem ser utilizadas para detectar ácidos nucleicos-alvo de uma sequência em particular, empregadas em um ensaio de detecção de mutações pontuais e utilizadas para gerar diversos padrões de fragmentação capazes de distinguir genótipos complexos. Essas enzimas são ferramentas poderosas para a análise de ácidos nucleicos.

Métodos de amplificação de sinal

Nos métodos de amplificação de sinal, a concentração de sonda ou alvo não aumenta. A maior sensibilidade analítica advém do aumento da concentração das moléculas de marcação que são fixadas ao ácido nucleico-alvo. Múltiplas enzimas, sondas e camadas de sondas, além da redução do ruído de fundo, são as estratégias utilizadas para intensificar a detecção de alvos (Kricka, 1999). Os sistemas de ampli-

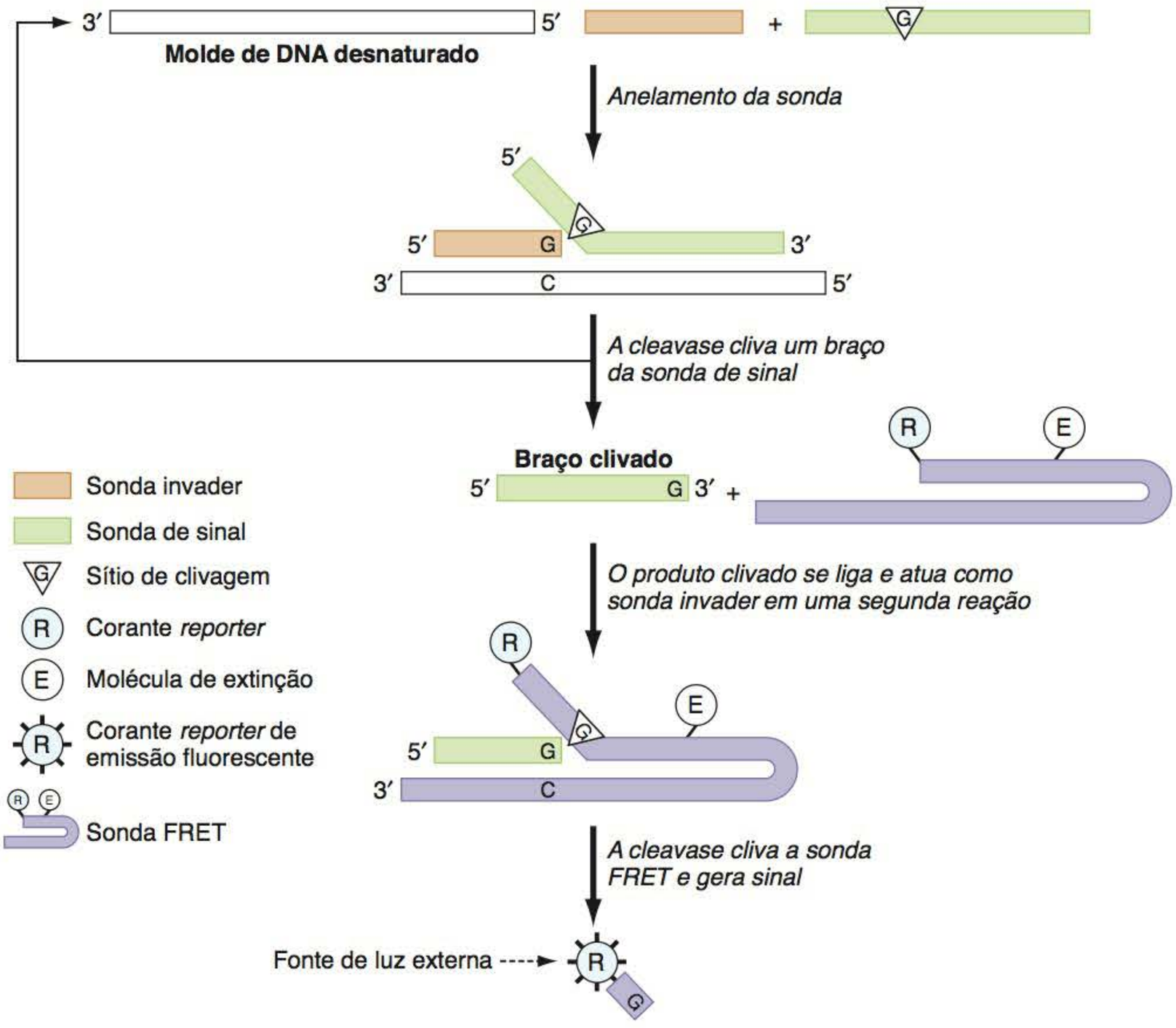


Figura 67.9 Clivagem invasiva e detecção de sonda oligonucleotídica utilizando DNA polimerase DEN-1. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

ficação de alvo em geral apresentam maior sensibilidade analítica que os métodos de amplificação de sinal, contudo, os avanços tecnológicos ocorridos, sobretudo nos ensaios de detecção de DNA ramificado, reduziram os limites de detecção a valores potencialmente equiparáveis aos dos ensaios de amplificação de alvo em certas aplicações (Kern, 1996).

Os ensaios de amplificação de sinal apresentam diversas vantagens em relação aos ensaios de amplificação de alvo. Nos sistemas de amplificação de sinal, o número de moléculas-alvo não é alterado e, como resultado, o sinal é diretamente proporcional à quantidade de sequência-alvo presente na amostra clínica. Isso reduz as preocupações com relação aos resultados falso-positivos produzidos pela contaminação cruzada, além de simplificar o desenvolvimento de ensaios quantitativos. Como os sistemas de amplificação de sinal não dependem de processos enzimáticos para amplificar sequências-alvo, eles não são afetados pela presença de inibidores enzimáticos nas amostras clínicas. Consequentemente, é possível utilizar métodos de extração de ácido nucleico menos trabalhosos. Em geral, os sistemas de amplificação de sinal empregam sondas maiores ou um número maior de sondas que os sistemas de amplificação de alvo e, assim, são menos propensos a erros resultantes da heterogeneidade sequencial dos alvos. Por fim, o RNA pode ser quantificado diretamente, dispensando a síntese de cDNA intermediário. O DNA ramificado e o ensaio de captura híbrida são exemplos de sistemas de amplificação de sinal que se desenvolveram em testes diagnósticos.

DNA ramificado

O DNA ramificado (bDNA, *branched-DNA*) é um ensaio de hibridização sanduíche em fase sólida, que incorpora múltiplos conjuntos de sondas oligonucleotídicas sintéticas (Nolte, 1998). A chave dessa tecnologia é a molécula amplificadora – uma molécula de DNA contendo 15 ramificações idênticas, cada qual capaz de ligar 3 sondas marcadas.

Sondas específicas para múltiplos alvos são utilizadas para capturar o ácido nucleico-alvo na superfície de um microtitulador (Fig. 67.10). Um segundo conjunto de sondas alvo-específicas também se liga ao alvo. Moléculas pré-amplificadoras ligam-se ao segundo conjunto de sondas-alvo e a até 8 bDNA amplificadores. Três sondas marcadas com fosfatase alcalina hibridizam-se a cada ramo do amplificador. A detecção das sondas marcadas ligadas é feita por meio da incubação do complexo com um substrato enzima-desencadeável (dioxetano), seguida da medida da emissão de luz com auxílio de um luminômetro. O sinal resultante é diretamente proporcional à quantidade de alvo existente na amostra. A quantidade de alvo contida na amostra é determinada a partir de uma curva-padrão externa.

A hibridização inespecífica de quaisquer sondas de amplificação e ácidos nucleicos que não os alvos conduz à amplificação do sinal de fundo. Para reduzir o potencial de hibridização para todos os componentes que não sejam alvos, as bases artificiais isocitidina (isoC) e isoguanosina (isoG) foram incorporadas às sondas de amplificação dos ensaios de bDNA de terceira geração (Collins, 1995). As bases isoC e isoG formam pares entre si, mas não pareiam com nenhuma das demais bases de ocorrência natural (Piccirilli, 1990). O uso das sondas isoC e isoG nos ensaios de bDNA intensifica a amplificação alvo-específica sem concomitantemente aumentar a interferência de fundo, melhorando bastante os limites de detecção. O limite de detecção do ensaio de bDNA de terceira geração para detecção de RNA de HIV-1 é de 50 cópias/mL (Kern, 1996). Os ensaios de bDNA para quantificação de DNA de HBV, RNA de HCV e RNA de HIV-1 estão disponíveis comercialmente (Bayer Diagnostics). Uma plataforma instrumental para os ensaios de bDNA automatiza a incubação, a lavagem, a leitura e o processamento de dados.

Ensaios de captura híbrida

O sistema de captura híbrida é um ensaio de anticorpos de captura em solução de hibridização que emprega a detecção por quimioluminescência. O DNA-alvo contido na amostra é desnaturado e hibridizado com uma sonda de RNA específica (Fig. 67.11). Os híbridos DNA-RNA são capturados pelos anticorpos específicos para esses híbridos, que revestem as paredes de um tubo de ensaio. Anticorpos anti-híbrido conjugados à fosfatase alcalina ligam-se aos híbridos imobilizados. O conjugado enzima-anticorpo ligado é detectado com auxílio de um substrato quimioluminescente, enquanto a luz emitida é medida por um luminômetro. A amplificação de sinal resulta do número significativo de sítios de ligação de anticorpo, bem como da eficiência da reação enzima-substrato. A intensidade da luz emitida é proporcional à quantidade de DNA-alvo presente na amostra. Os ensaios de captura híbrida para detecção de HPV (Cope, 1997) e CMV (Mazzulli, 1999) em amostras clínicas são atualmente comercializados (Digene, Gaithersburg, MD).

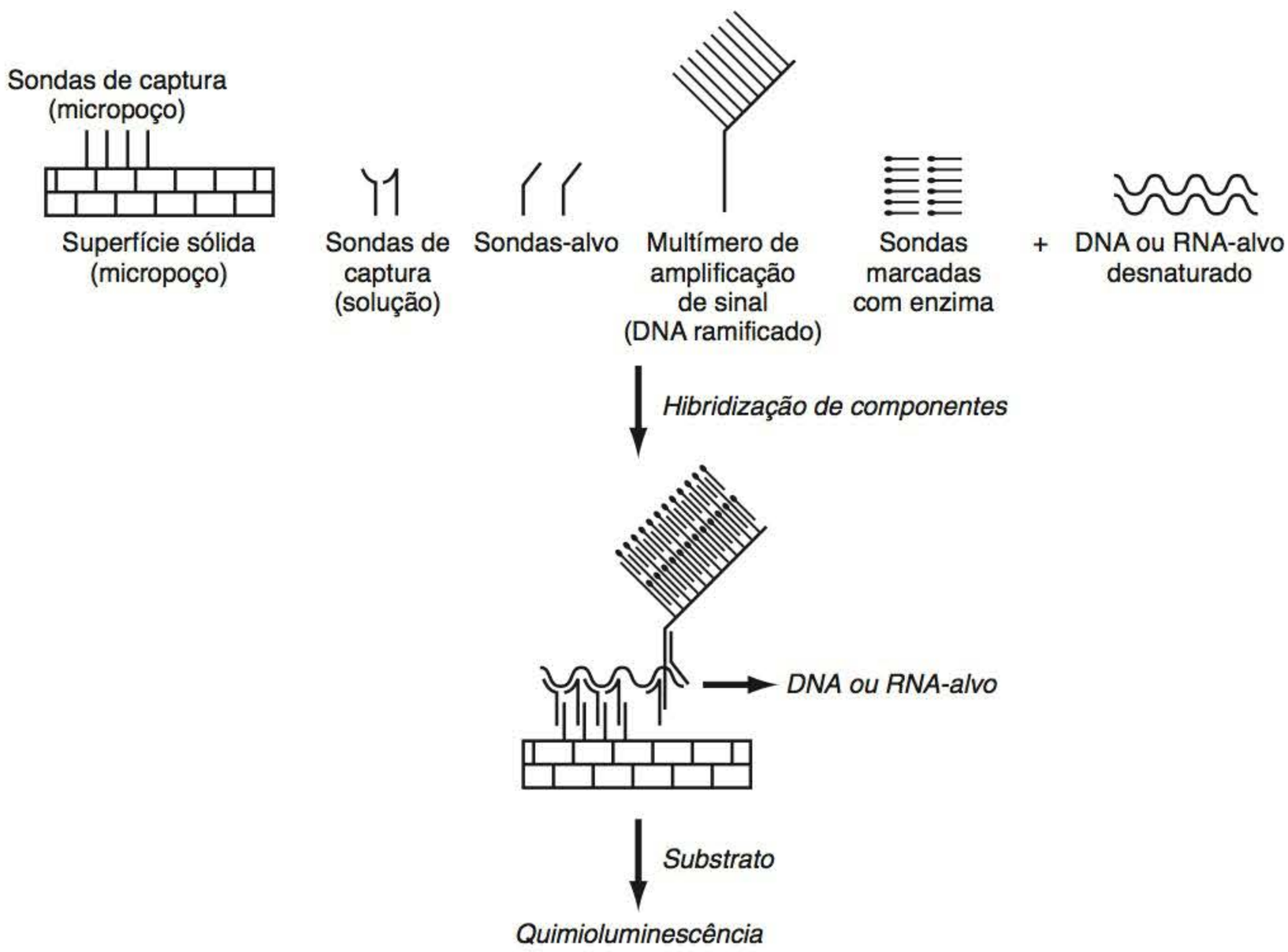


Figura 67.10 Amplificação de DNA ramificado. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

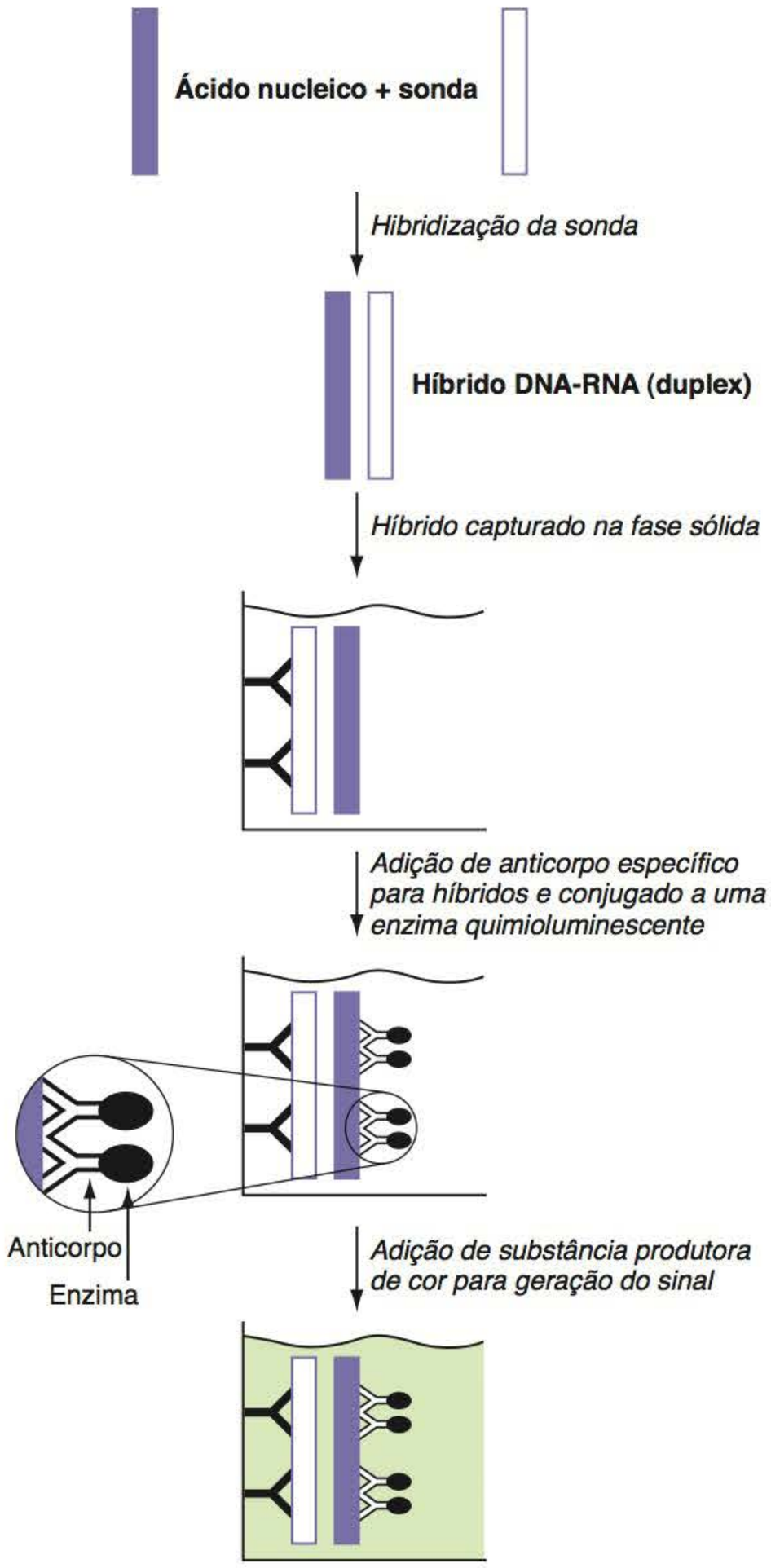


Figura 67.11 Amplificação de captura híbrida. (Redesenhado de Wolk, 2001.)

Resumo

No presente capítulo, forneceu-se a base necessária à compreensão dos princípios subjacentes aos diversos métodos de amplificação de ácido nucleico, bem como de seus respectivos pontos fortes e limitações. A tecnologia já exerce um enorme impacto sobre o diagnóstico das doenças infecciosas e distúrbios genéticos e promete revolucionar o diagnóstico e a supervisão dos pacientes com câncer. O verdadeiro poder da tecnologia reside em sua habilidade de transpor as disciplinas tradicionais da medicina laboratorial. Em consequência, é importante que todos os envolvidos na prática da medicina laboratorial tenham uma compreensão abrangente dos princípios básicos da tecnologia da amplificação de ácidos nucleicos.

Referências bibliográficas

Afonina IA, Reed MW, Lusby E, et al: Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. Biotechniques 2002; 32:940–944.

Este artigo descreve o desenvolvimento da segunda geração de sondas de PCR em tempo real empregando ligantes de sulco menor de DNA e um quencher *escuro, bem como sua utilização na detecção de polimorfismo de nucleotídeo único, na determinação da carga viral e na análise de expressão gênica.*

Barany F: Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:189–193.

Barbeau JM, Goforth J, Caliendo AM, Nolte FS: Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. J Clin Microbiol 2004; 42:3739–3746.

Birkenmeyer LG, Mushahwar IK: DNA probe amplification methods. J Virol Meth 1991; 35:117–126.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, et al: Delection screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res 1988; 16:1141–1156.

Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, et al: Quantitative PCR and RT-PCR in virology. PCR Methods Appl 1993; 2:191–196.

Collins ML, Zayati C, Detmer JJ, et al: Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched-DNA hybridization assays. Anal Biochem 1995; 226:120–129.

Compton J: Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 1991; 350:91–92.

Cope JJ, Hildesheim A, Schiffman MH, et al: Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:2262–2265.

Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 887:2725–2729.

Haberhausen G, Pinsl J, Kuhn C-C, Markert-Hahn C: Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. J Clin Microbiol 1998; 36:628–633.

Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS: Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. Nucleic Acids Res 1988; 16:11844.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6:986–994.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′ to 3′ exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:7276–7280.

Este artigo descreve como a atividade da 5 'exonuclease de uma DNA polimerase pode ser usada para detectar produtos de PCR, o que foi um fator-chave no desenvolvimento da PCR em tempo real.

Kern D, Collins M, Fultz T, et al: An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol 1996; 34:3196–3202.

Kricka LJ: Nucleic acid detection technologies – labels, strategies, and formats. Clin Chem 1999; 45:453–458.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al: 3′-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res 2000; 28:655–661.

Kwoh DY, David GR, Whitfield KM, et al: Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-

based sandwich hybridization format. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:1173–1177.

Lay MJ, Wittwer CT: Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid cycle PCR. Clin Chem 1997; 43:2262–2267.

Lieber MR: The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. BioEssays 1996; 19:233–240.

Little MC, Andrews J, Moore R, et al: Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. Clin Chem 1999; 45:777–784.

Lyamichev V, Mast A, Hall JG, et al: Polymorphism identification and quantitative detection from genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nature Biotech 1999; 17:292–296.

Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, et al: Multicenter comparison of the Digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. J Clin Microbiol 1999; 37:958–963.

Morrison T, Weiss JJ, Wittwer CT: Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR green I dye monitoring during amplification. BioTechniques 1998; 24:954–958.

Myers TW, Gelfand DH: Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. Biochemistry 1991; 30:7661–7666.

Este artigo é outro marco na enzimologia da PCR. Ele descreve o uso de uma única enzima termoestável para realizar a amplificação tanto da transcriptase reversa quanto do cDNA, facilitando o desenvolvimento da RT-PCR de etapa única em tubo-fechado para RNAs-alvo.

Nolte FS: Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. Adv Clin Chem 1998; 33:201–235.

Nycz CM, Dean CH, Haaland PD, et al: Quantitative reverse transcription strand displacement amplification; quantitation of nucleic acids using an isothermal amplification technique. Anal Biochem 1998; 259:226–234.

Piatak M Jr, Luk K-C, Williams B, Lifson JD: Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. BioTechniques 1993; 14:70–80.

Piccirilli JA, Krauch T, Moroney SE, Benner SA: Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. Nature 1990; 343:33–37.

Ririe K, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 1997; 245:154–160.

Este artigo descreve como a análise de curvas de fusão, empregando fluorímetro de microvolume integrado a um termociclador, pode ser usada para diferenciar e identificar produtos PCR pelo monitoramento da ligação do DNA de fita dupla ao corante SYBR Green.

Rosetti S, Englisch S, Bresin E, et al: Detection of mutations in human genes by a new rapid method: cleavage fragment length polymorphism analysis (CFLPA). Mol Cell Probes 1997; 11:155–160.

Ryan D, Nuccie B, Arvan D: Non-PCR dependent detection of the factor V Leiden mutation for genomic DNA using a homogeneous invader microtiter plate assay. Mol Diagn 1999; 4:135–144.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239:487–491.

Este influente artigo descreve o uso de uma DNA polimerase termoestável para catalizar a reação em cadeia da polimerase. Esse incremento facilitou a utilização da PCR pelo usuário e abriu caminho para a automação do processo.

Sreevatsan S, Bookout JB, Ringplis FM, et al: Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. J Clin Microbiol 1998; 36:1895–1901.

Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR: Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nature Biotech 1998; 16:49–53.

Walker GT, Little M, Nadeau J, Shank DD: Strand displacement amplification – an isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acid Res 1992a; 20:1691–1696.

Walker GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD: Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. Proc Natl Acad Sci USA 1992b; 89:392–396.

Wittwer CT, Garling DJ: Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. Biotechniques 1991; 10:76–83.

Wu DY, Wallace RB: The ligation amplification reaction (LAR) – amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. Genomics 1989; 4:560–569.

CAPÍTULO 68

Tecnologias de arranjos de hibridização

Martin H. Bluth, M.D., Ph.D., Michael E. Zenilman, M.D.

Tecnologias de arranjos 1419
- Macroarranjos 1420
- Microarranjos 1420
- Substratos de microarranjo 1420
- Fabricação de microarranjo 1420
- Microarranjos de oligonucleotídeos 1422
- Microarranjos de cDNA 1422
- Arranjos de sequenciamento 1422
- Hibridização, detecção e análise de imagem 1423
- Bioinformática 1424
- Aspectos da propriedade intelectual 1425

Aplicações clínicas da tecnologia de arranjos 1426
- Tecnologia de arranjos no laboratório clínico 1426
- Tecnologia de arranjos na doença clínica 1426
- Limitações 1427

Referências bibliográficas 1427

PONTOS-CHAVE

- A tecnologia de arranjos permite uma abordagem única e poderosa para varrer uma dada amostra em busca de dúzias ou milhares de genes.
- Existem numerosas plataformas de arranjo de hibridização. Contudo, os microarranjos (*microarrays*) à base de vidro atualmente em uso são preferidos para aplicações de alta densidade.
- Sinais positivos são gerados quando uma porção-alvo do ácido nucleico hibridiza com sua sonda complementar localizada em um suporte sólido (i. e., *chip*).
- É importante ter cuidado ao realizar e interpretar experimentos de microarranjo, pois numerosos fatores devem ser considerados na análise.
- Nos últimos anos, foram propostas diversas aplicações da tecnologia de arranjos, as quais variam do estadiamento molecular de tumores à identificação e à caracterização de agentes microbianos.

Em apenas alguns anos, a tecnologia dos arranjos de hibridização, que permite realizar milhares de reações de hibridização simultâneas sobre um único substrato sólido durante um único procedimento analítico, passou do projeto teórico para a realidade prática. Essas determinações paralelas em massa proporcionam oportunidades até então jamais imaginadas para fins de aplicação diagnóstica, desde o sequenciamento de genes e a determinação de polimorfismos genéticos até a medida dos padrões de expressão genética em células cancerosas. Os sistemas baseados em microarranjo oferecem uma plataforma para quantificar a expressão de milhares de genes ao mesmo tempo. Dessa forma, a vantagem sem precedentes conferida por essa tecnologia permite analisar cassetes genéticos inteiros ou padrões de expressão de genes, em vez de apenas 1 a 3 genes ao mesmo tempo. O esquema geral de processamento do microarranjo envolve a geração de ácido nucleico (i. e., DNA) complementar aos genes de interesse que, por sua vez, estão microscopicamente depositados sobre as superfícies sólidas em posições definidas (as sondas). O ácido nucleico (DNA) das amostras é adicionado sobre a superfície, de modo que há ligação do DNA complementar e a presença de DNA ligado é detectada pela observação da fluorescência emitida após a excitação produzida por um *laser* (uma revisão geral sobre o assunto pode ser encontrada em Friend & Stoughton [2002]).

É evidente que a tecnologia de arranjos de hibridização revolucionou o modo como o estudo das doenças é abordado. A abordagem de um gene ou uma proteína, uma função deixou de ser a base principal do projeto científico. A tecnologia de arranjos introduziu uma imagem-reflexo complicada dessa abordagem, ou seja, múltiplas funções, múltiplas proteínas, múltiplos genes. O poder dessa tecnologia reside na capacidade de "varredura" que ela proporciona. Sob condições experimentais definidas, tornou-se possível determinar a ocorrência de alterações em padrões genéticos por meio da identificação de múltiplos genes atuando em conjunto. Tais padrões, então, podem ser "explorados" utilizando-se diversos algoritmos de computador, agrupando os genes em categorias funcionais (i. e., genes associados à respiração, genes inflamatórios etc.) e utilizando-os para criar assinaturas diagnósticas da doença ou gerar novas hipóteses acerca da patogênese e da função celular. A relação desses genes entre si (aumento *vs* diminuição da expressão) é determinada e geneticamente expressa como intensidade da alteração. Os achados de microarranjo de expressão genética diferencial devem ser confirmados utilizando-se outras técnicas, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa (RT-PCR), ou estudos adicionais de microarranjos independentes.

Uma vez identificados os genes ou grupos de genes candidatos, as abordagens clássicas de determinação da função genética (i. e., gene *knockout* ou gene *knockdown*) podem ser empregadas para elucidar ou validar a função do(s) gene(s). Mais significativamente, a tecnologia de arranjos de hibridização, com subsequente extração dos dados, permite considerar genes inesperados, que não estavam associados à doença em estudo, gerando novos paradigmas a serem investigados no futuro. Plataformas similares podem ser utilizadas para sequenciar genes grandes e varrer o genoma em busca de polimorfismos de nucleotídeos únicos, bem como de sítios de metilação. O propósito deste capítulo é revisar as bases teóricas das diversas matrizes de plataformas de hibridização e fornecer uma perspectiva – atual e futura – de sua aplicação clínica.

Tecnologias de arranjos

Um arranjo de hibridização é o equivalente molecular de uma planilha, em que cada célula ou localização revela um fragmento específico de informações, usualmente inferido a partir da união de um ligante ao seu alvo específico. Os primeiros métodos baseados em arranjo foram explorados em imunoensaios (Ekins, 1987, 1999). Além disso, também foi proposto o uso de arranjos para estudos paralelos de alvos diversos, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos e pequenas moléculas (Fodor, 1991; Pirrung, 1992; Southern, 1996a; Guschin, 1997; Schena, 1998). De modo similar às interações antígeno-anticorpo empregadas nos imunoensaios, o princípio fundamental dos arranjos de ácido nucleico é a detecção de eventos de hibridização específica entre fitas complementares. Os princípios da hibridização de ácidos nucleicos e uma revisão sobre as diversas plataformas existentes são abordados no Capítulo 66. A efetividade dos formatos de hibridização em suporte sólido foi pioneira, utilizando membranas de nitrocelulose (Gillespie, 1965) para realização de *dot blots* (Kafatos, 1979), sondas em linha e *Southern blots* (Southern, 1975). A mudança da entidade marcada, em que a amostra passou a ser utilizada no lugar da sonda, foi inicialmente referida como hibridização em *line-blot* (ou *dot blot*) reversa e conduziu

à investigação de uma única amostra em busca de múltiplos alvos em potencial. A mudança de dúzias para milhares de alvos aconteceu de modo rápido ao longo dos últimos anos, impulsionada em parte pela convergência única das tecnologias de produção em escala microscópica, robótica e bioinformática, bem como pela demanda das análises genéticas de alto *throughput* resultantes do Projeto Genoma Humano.

Esse campo possui um potencial enorme, para o qual muitos investigadores preveem aplicações diagnósticas e prognósticas em classificação tumoral, responsividade terapêutica, detecção de patógenos, monitoramento da resistência antibiótica e caracterização de respostas inflamatórias. A tecnologia de arranjos pode concretizar o sonho da medicina molecular personalizada, em que os genes de um paciente individual podem ser avaliados para a determinação de fatores risco, suscetibilidade a doenças e previsão da resposta à terapia. Um estudo desse tipo emprega o perfil de expressão genética para prever quais pacientes afetados por traumatismo ou queimaduras irão desenvolver sepse e falência múltipla dos órgãos (www.gluegrant.org). Entretanto, ainda é preciso enfrentar desafios associados à reprodutibilidade e ao controle de qualidade laboratorial para, então, poder usufruir de todo esse potencial.

Macroarranjos

O termo *macroarranjo* (*macroarray*) tem sido aplicado aos formatos cujas áreas de localização de sonda, frequentemente denominadas características, são amplas o bastante para serem visualizadas sem necessidade de ampliação. Elas são confeccionadas em membranas de *nylon* ou nitrocelulose ou em tiras plásticas contendo arranjos lineares de alvos ligados. Em razão do tamanho das características, a densidade dos macroarranjos é bem menor que a dos microarranjos, podendo variar de algumas dúzias a centenas ou milhares de sondas. Usualmente, eles são depositados sobre a membrana por impressão (*printing*) ou *dot blotting* e, em seguida, secos e armazenados para uso futuro.

Nylon, plástico e vidro (chapa de silício) constituem os suportes-padrão para a fabricação dos macroarranjos. O *nylon* apresenta diversos defeitos quando comparado ao silicone, que atualmente está se transformando na matriz preferida para os arranjos de hibridização. Além de sua natureza porosa, o *nylon* exibe intensa autofluorescência, limitando a sensibilidade da detecção baseada na fluorescência por causa da elevada interferência de fundo. Esse último aspecto também impossibilita o desenvolvimento de ensaios medidores de relações ("2 cores"). Essa abordagem emprega 2 alvos, cada um dos quais marcado com um fluoróforo diferente. Na maioria das vezes, um deles é um controle de referência constante utilizado para comparação com a amostra desconhecida, com resultados expressos como uma proporção da emissão de 2 sinais fluorescentes (Duggan, 1999).

Os macroarranjos atualmente são utilizados para aplicações que empregam alvos. Exemplificando, alguns ensaios de arranjo comerciais estabelecem como alvo todos os genes codificadores de citocinas conhecidos, ou genes envolvidos nas vias de transdução de sinal específicas que são ativadas durante processos infecciosos e inflamatórios. Outros arranjos, que têm como alvos genes alterados durante a oncogênese, têm sido utilizados na pesquisa sobre o câncer (p. ex., Atlas Human Arrays, Clontech, Palo Alto, CA, ou GeneFilters, Research Genetics, Huntsville, AL). Outras aplicações comerciais, usualmente em formato de kit, são empregadas na detecção e na tipagem de produtos de PCR específicos, tais como a triagem para detecção da mutação determinante de fibrose cística, a tipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) ou a tipagem do papilomavírus humano (HPV). Entre as vantagens proporcionadas pelos macroarranjos estão a capacidade de utilizar aparato de hibridização padrão, triagem ou leitura simplificada, e a acessibilidade.

Alguns grupos obtiveram sucesso na produção personalizada de arranjos de *nylon* de alta densidade para uso na descoberta de genes (Gress, 1992; Takahashi, 1995; Granjeaud, 1996; Pietu, 1996; Clark, 1999). Mesmo na configuração de alta densidade, o tamanho dos arranjos de *nylon* exige um volume de líquido de hibridização relativamente significativo – uma limitação prática em termos de geração de sonda a partir de pequenas quantidades de material diagnóstico. Uma vez que os microarranjos (e não os macroarranjos) constituem a plataforma de escolha de alta densidade e elevado *throughput*, a maior parte do presente capítulo enfoca as aplicações dos microarranjos.

Microarranjos

A miniaturização dos ensaios, além de poupar tempo, reduz os custos das pesquisas e aplicações diagnósticas biomédicas. Trabalhar com volumes menores diminui o consumo de reagentes, aumenta a concentração das amostras e melhora a cinética da reação. Esses aprimoramentos permitem ao investigador obter centenas ou milhares de resultados no mesmo intervalo de tempo em que anteriormente se realizava um único experimento. Os microarranjos atualmente são comercializados por diversos fornecedores, bem como os equipamentos de leitura e fabricação sob encomenda de arranjos utilizados em pesquisas específicas ou aplicações diagnósticas.

Substratos de microarranjo

Uma distinção importante entre microarranjos e macroarranjos consiste na escolha de um suporte sólido não poroso. Como evitam a difusão dos alvos de ácido nucleico, as superfícies não porosas (substratos de plástico, vidro ou silicone) proporcionam uma cinética de hibridização mais veloz e etapas de lavagem mais simples. Para possibilitar a discriminação espacial das numerosas reações que ocorrem simultaneamente, as sondas moleculares são ligadas a uma superfície sólida em arranjos definidos. A deposição das sondas sobre um substrato sólido também é mais suscetível à automação e aceita o uso de maiores densidades de arranjo, com uma excelente definição de imagens. Essas características se aplicam a qualquer tipo de microarranjo, desde oligonucleotídeos sintéticos até cDNA clonados ou produtos de PCR (Southern, 1999). Hoje, a maioria dos microarranjos é desenvolvida no vidro. Ao contrário dos derivados do plástico, a transparência do vidro, aliada à falta de autofluorescência, proporciona uma detecção de fluorescência com baixa interferência de fundo. Entretanto, conforme aumenta o envolvimento da ciência de materiais nas tecnologias de arranjos, é possível que substratos alternativos venham a ser disponibilizados.

Fabricação de microarranjo

A funcionalização (i. e., modificação química) da terminação 3' dos ácidos nucleicos – oligonucleotídeos, produtos de PCR, cDNA ou oligômeros peptídicos de ácido nucleico – é necessária para obter imobilização covalente em superfícies de vidro ou polipropileno (Matson, 1995; Beier, 1999). O tratamento de lâminas de vidro com silano, por exemplo, permite que o vidro recoberto com grupos amino ligue sondas ligadas a grupos amino, por meio do emprego de moléculas bifuncionais, como dialdeído ou di-isotiocianato (Case-Green, 1994; Guo, 1994). Alternativamente, a cobertura do vidro com um policátion (p. ex., polilisina) permite a ligação carga-associada de sondas de DNA polianiônicas (Maskos, 1993a), enquanto uma etapa de fotoligação cruzada por radiação UV acrescenta ligações covalentes à interação iônica. A ligação covalente é essencial para que seja possível realizar lavagens vigorosas e, portanto, discriminar com acurácia as espécies hibridizadas. Foram publicados diversos protocolos para tratar da questão da ativação da superfície (Maskos, 1992; Beattie, 1995; Matson, 1995; Beier, 1999). Uma alternativa interessante consiste na deposição de pequenos fragmentos de poliacrilamina ativada aos quais são fixados oligonucleotídeos pré-sintetizados por microinjeção (Khrapko, 1991; Yershov, 1996; Guschin, 1997).

A densidade de empacotamento das sondas fixadas às superfícies sólidas influenciará bastante o desempenho das matrizes de hibridização. Uma baixa eficiência de pareamento, que por vezes ocorre quando são utilizadas matrizes de vidro, pode resultar em baixas densidades de sondas e proporções sinal/ruído. Por outro lado, uma densidade de empacotamento excessiva de oligonucleotídeos em uma superfície sólida cria obstáculos espaciais. Esse problema pode ser ainda mais notável no caso de biomoléculas mais longas, como os cDNAs. Os rendimentos da hibridização podem ser aumentados em até 2 ordens de magnitude com a introdução de espaçadores entre a superfície e os oligonucleotídeos (Southern, 1999). Quanto mais longo for o espaçador, melhor será a hibridização. Contudo, curiosamente, existe um comprimento ideal de espaçador além do qual há diminuição do rendimento da hibridização (Shchepinov, 1997; Duggan, 1999). Assim, foi relatado que um espaçador constituído por um átomo de carbono 40, por exemplo, intensifica a hibridização em 150 vezes (Shchepinov,

1997). A densidade de oligonucleotídeos é de aproximadamente 0,1 pmol/mm^2 em uma superfície de vidro – 2 ordens de magnitude a menos que a densidade do polipropileno aminado. Portanto, uma potencial vantagem proporcionada pelas matrizes de vidro em relação às matrizes de plástico atualmente é uma densidade de oligonucleotídeos ótima associada a uma menor formação de obstáculos espaciais (Southern, 1999). Químicas de superfície aprimoradas poderão, algum dia, possibilitar a produção de arranjos em folhas ou películas de plástico, o que poderá reduzir drasticamente os custos de produção.

A composição terminal (extremidade 5') dos oligonucleotídeos influencia o rendimento de duplexes, conforme determinado pela intensidade relativa. Como previsto, extremidades 5' ricas em G:C proporcionam melhor rendimento que seus homólogos (mesma composição, porém, sequências diferentes) (Maskos, 1993b). Dessa forma, podem ser consideradas abordagens para modificar a terminação 5' dos oligonucleotídeos (p. ex., adição covalente de um ligador degenerado) com o intuito de minimizar tal contribuição. Alternativamente, a constatação de que as incompatibilidades existentes nas terminações são menos desestabilizadoras e, portanto, mais difíceis de discriminar por hibridização (Southern, 1999) conduziu à introdução de melhorias inteligentes para detecção dos eventos de hibridização. Como as polimerases e ligases são mais sensíveis às incompatibilidades terminais (ao contrário das internas), foram desenvolvidos métodos enzimáticos para melhorar a detecção do rigor (minissequenciamento em fase sólida [Pastinen, 1997, 1998; Syvanen, 1999], a análise de *bit* genético [Nikiforov, 1994] ou os ensaios de ligação [Landegren, 1988; Nickerson, 1990]).

Arranjos comercializados foram previamente revistos por Marshall (1998). A fabricação de microarranjos cai em 2 categorias amplas: a) por distribuição direta das sondas sobre a superfície sólida, e b) por síntese *in situ*. Um terceiro método, desenvolvido pela Nanogen (San Diego, CA), consiste na utilização de oligonucleotídeos pré-fabricados capturados em pontos eletroativos em chapas de silicone (Edman, 1997; Sosnowski, 1997; Cheng, 1998; Heller, 1998). A modificação do campo elétrico por meio do emprego de eletrodos independentes e espacialmente endereçáveis pode acelerar a hibridização e, quando a polaridade é revertida, possibilitar uma lavagem vigorosa (Edman, 1997).

Técnicas de distribuição

A deposição de biomoléculas pré-sintetizadas foi iniciada por Pat Brown et al. (2000) (Schena, 1995; Shalon, 1996). Substâncias bioquímicas (p. ex., proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos, cDNAs) são preparadas, purificadas e armazenadas em placas de microtitulação. Pequenas quantidades de moléculas são mecanicamente derivadas em locais definidos com precisão, sobre uma superfície sólida, com auxílio de diferentes sistemas robotizados de precisão. Esse método é bastante flexível em termos de composição química, topologia de microarranjo (p. ex., tamanho e densidade dos pontos, pontos em duplicata para cada molécula) e facilidade de prototipagem, permitindo alterar o projeto para uso em diversas aplicações. Os métodos mecânicos permitem a síntese de microarranjos de densidade moderada a alta (até cerca de 16.000 sondas/cm^2 [Graves, 1999]). É o método de escolha quando há a necessidade de número significativo de microarranjos apresentando a mesma composição, bem como para sequências longas empregando produtos de PCR. Atualmente, existem várias companhias que fabricam e vendem arranjos pré-fabricados (p. ex., MicroMax, NEN Life Science, Boston, MA) ou arranjadores por deposição (Cheung, 1999) como alternativa à construção de um arranjador (Brown, 2000).

Os procedimentos de distribuição consistem em diferentes sistemas de microimpressão. A maioria dos arranjadores emprega ponteiras de micropipetagem similares a canetas-tinteiro (p. ex., Cartesian Technologies, Irvine, CA), contudo, foram desenvolvidos alguns sistemas originais (p. ex., técnica do alfinete-e-anel; Genetic MicroSystems, Woburn, MA). De uma forma geral, por conta da tensão superficial, da estática e de outros efeitos, a reprodutibilidade dos arranjos impressos é menor que a síntese *in situ* e precisa ser corrigida por experimentos isolados (repetições), pontos em replicata (na mesma lâmina), detecção de fluorescência multicolorida e/ou outro algoritmo de detecção específico (Chen, 1997). Por causa de sua flexibilidade e disponibilidade, é provável que a tecnologia de arranjos impressos exerça maior impacto sobre a pesquisa e os laboratórios clínicos no decorrer dos próximos anos.

Síntese in situ

A síntese *in situ* permite obter maiores rendimentos, menor variação entre os chips e densidades de sonda maiores. Esses métodos também permitem a fabricação de arranjos de "acesso aleatório" verdadeiros, o que significa que cada oligonucleotídeo em qualquer posição pode ter qualquer sequência escolhida (Southern, 1999). As estratégias combinatoriais dizem respeito aos métodos desenvolvidos para produzir microarranjos contendo todas as sequências de um determinado comprimento (também referidos como "arranjos genéticos"). Os arranjos combinatoriais foram promovidos sobretudo para estudar o comportamento da hibridização em larga escala (Southern, 1994) ou para sequenciamento de ácido nucleico em estado sólido (Drmanac, 1993a, 1993b, 1999, 1998; Lipshutz, 1993; Macevicz, 1991; Strezoska, 1991).

As técnicas de manufaturamento incluem o uso de máscaras fotolitográficas para controlar a ativação química por meio de etapas de fotodesproteção (Fodor, 1991), deposição de jato de tinta (Stimpson, 1998), bem como barreiras físicas para saturação sequencial de precursores (Maskos, 1993c). A Affymetrix acoplou a desproteção fotossequencial à síntese de DNA em fase sólida adaptando técnicas oriundas da indústria de semicondutores (Pease, 1994; Lockhart, 1996; Lipshutz, 1999). Ligadores sintéticos modificados com grupos protetores fotoquimicamente removíveis são fixados a chapas de silicone. Quando o brilho da luz UV incide pela máscara fotolitográfica, há fotodesproteção, e os blocos de construção química específicos (desoxinucleosídeos hidroxil-protegidos) podem, então, reagir com os grupos desprotegidos (Fodor, 1991) (Fig. 68.1). Ciclos alternados de fotodesproteção e incubação com diferentes blocos de construção permitem que ocorra a síntese de polidesoxinucleotídeos dirigida pela luz (Fig. 68.2). Os oligonucleotídeos sintetizados apresentam um comprimento prático máximo, em razão da limitada eficiência da fotodesproteção (80 a 95% a cada ciclo) (Forman, 1999). Por isso, a proporção de 20-mêros que exibem a sequência predefinida varia entre 1 e 36% (0,8E20–0,95E20) (Fodor, 1991).

As máscaras ou barreiras mecânicas permitem confinar áreas de superfície antes da saturação com precursores definidos. Máscaras físicas de diversos formatos (circulares, em forma de diamante) permitem a ocorrência da síntese *in situ* de um dado precursor em locais conhecidos. O deslocamento sequencial das máscaras seguido da saturação de outro precursor permite que ocorra a síntese de amplos arranjos combinatoriais de desoxinucleotídeo (Southern, 1992, 1996b; Maskos, 1993c). Até o momento, a Affymetrix consegue sintetizar até 400.000 polidesoxinucleotídeos diferentes em uma área de 1,6 cm^2 (Fodor, 1991). Um fator essencial para essa etapa é o alinhamento preciso da máscara com a chapa antes de cada etapa de síntese. Para garantir que essa etapa crucial seja concluída de forma acurada, as marcas de cromo existentes na chapa e na máscara devem estar perfeitamente alinhadas. Embora esse processo seja altamente eficiente, algumas moléculas ativadas falham em fixar o novo nucleotídeo. Para evitar que esses *outliers* se tornem sondas em que faltam nucleotídeos, é realizada uma etapa de capeamento para truncá-los. Além disso, as cadeias laterais dos nucleotídeos são protegidas a fim de evitar a formação de oligonucleotídeos ramificados (www.affymetrix.com). Apesar do alto custo, esse é o método de escolha para a realização de estudos de expressão genética em larga escala, em razão da sensibilidade, da reprodutibilidade e da redundância da informação.

As tecnologias de jato de tinta se desenvolveram graças à indústria de impressoras. Atualmente, essas tecnologias estão sendo desenvolvidas por várias companhias, tais como Incyte Pharmaceuticals (Palo Alto, CA), Protogene (Palo Alto, CA) e Rosetta Inpharmatics (Kirkland, WA) (Blanchard, 1996), sendo também comercializada (jato de tinta, Packard Instruments, Meriden, CT; bomba piezoelétrica, GeSiM, Grosserkmannsdorf, Alemanha). Uma abordagem desse tipo proporciona versatilidade para as biomoléculas que estão sendo distribuídas, além de eliminar a necessidade de contato físico com a superfície do arranjo. Essa última propriedade pode ser relevante para o desenvolvimento de arranjos cobertos com camadas metálicas delgadas e que utilizem diferentes métodos de detecção (Heyse, 1998; Schmid, 1998). A dispersão da luz a partir das micropartículas dirigidas contra as sequências-alvo pode ser detectada como onda evanescente imediatamente acima da superfície de vidro. Esse método permite realizar medidas da afinidade em tempo real, com um nível mínimo de interferência de fundo (Stimpson, 1996).

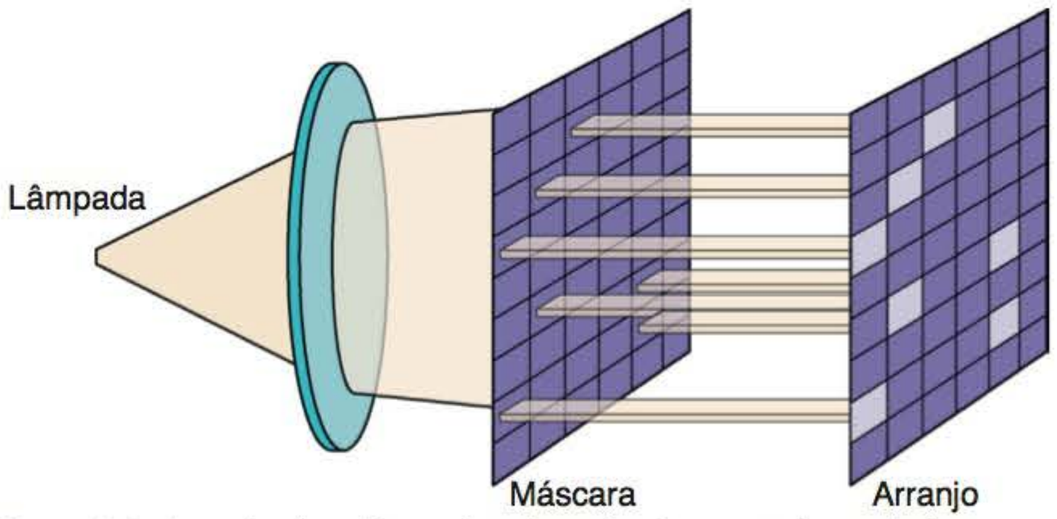


Figura 68.1 Síntese fotolitográfica. A luz ultravioleta é transmitida através de uma máscara fotolitográfica, permitindo a fotodesproteção localizada de blocos de construção químicos específicos. (Cortesia da Affymetrix.)

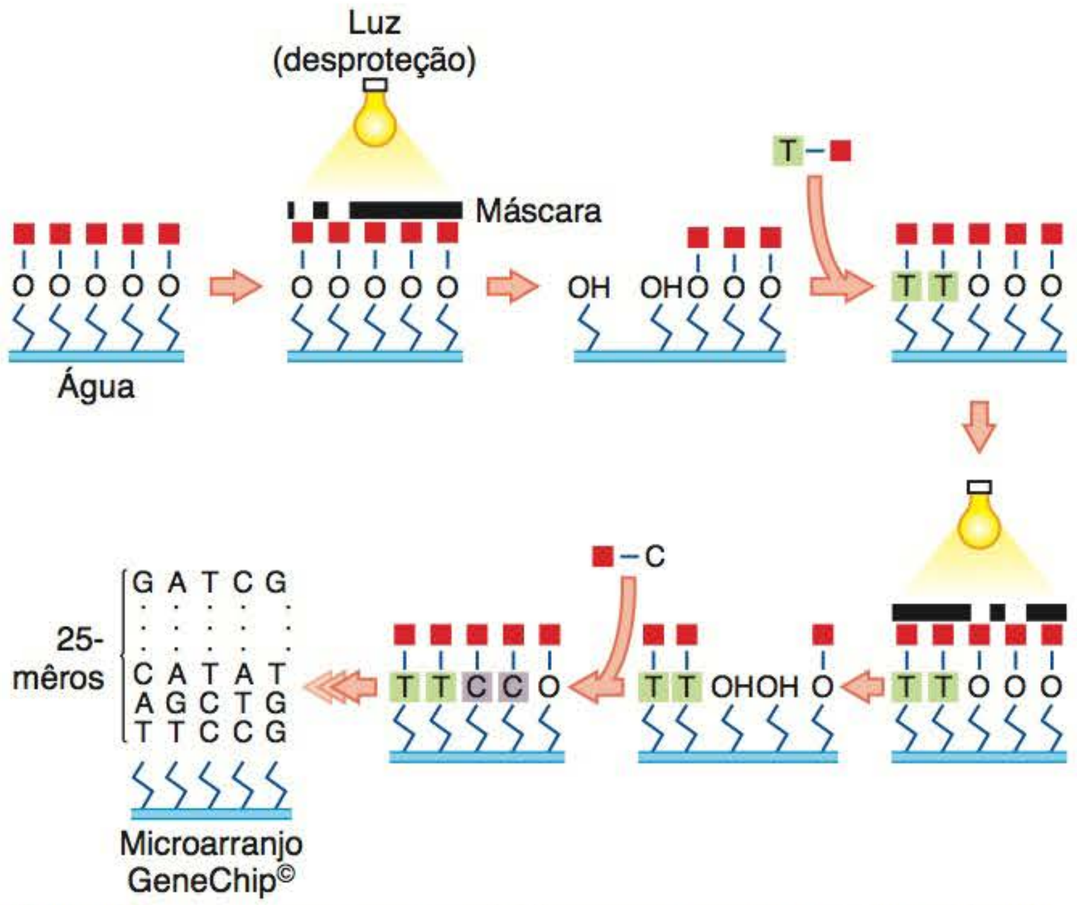


Figura 68.2 Diagrama representativo da fabricação do arranjo GeneChip utilizando uma combinação única de fotolitografia e química combinatorial. (Cortesia da Affymetrix.)

Microarranjos de oligonucleotídeos

A termodinâmica, a cinética da hibridização e os aspectos quantitativos da hibridização de oligonucleotídeos foram amplamente estudados (revisados por Wetmur, 1991; Hoheisel, 1996). Os arranjos de oligonucleotídeos apresentam menor sensibilidade que os arranjos de cDNA para a detecção de mensagens raras ou alvos de hibridização, bem como baixa previsibilidade das características da hibridização, porque o potencial de hibridização e, por conseguinte, a intensidade de sinal esperada não apresentam boa correlação com o conteúdo de G:C nem com a temperatura de desnaturação (Graves, 1999; Lockhart, 1996). Por outro lado, é mais fácil construir os arranjos de oligonucleotídeos por meio da deposição do produto sintetizado ou da síntese *in situ*, já descrita. Além disso, as condições de hibridização podem ser mais homogêneas que no caso do arranjo de cDNA, uma vez que o arranjo é projetado com oligonucleotídeos de tamanhos equivalentes.

Os arranjos de oligonucleotídeos possuem aplicações na determinação do perfil de expressão genética e no sequenciamento do DNA. Para uso no sequenciamento, esses arranjos podem ser divididos em 2 categorias: arranjos genéticos (representando uma matriz de oligonucleotídeos aleatória) ou arranjos específicos (para variantes moleculares de um alvo predeterminado). Os arranjos genéticos foram propostos como alternativas econômicas ao sequenciamento. O emprego de todas as possíveis combinações de um *n*-mêro permite "caminhar" em cada posição ao longo de uma sequência nucleotídica. Esse tipo de arranjo é o único capaz de detectar sequências faltantes em amplas bibliotecas eletrônicas. A Hyseq (Sunnyvale, CA) afirma ser a líder no campo do sequenciamento por hibridização. Veja como essa abordagem é descrita de modo mais completo mais adiante, na seção "Arranjos de sequenciamento". Em contraste, os arranjos dedicados são utilizados para sequenciamento repetitivo (ressequenciamento) do mesmo alvo na detecção de polimorfismos de nucleotídeos ou mutações funcionais. Isso implica conhecer os alvos e suas variantes mais frequentes, de modo a incorporar conjuntos predeterminados de oligonucleotídeos ao arranjo diagnóstico. Essa abordagem tem sido empregada para detecção de polimorfismos genéticos associados à resistência farmacológica do vírus da imunodeficiência humana (HIV), bem como de outros polimorfismos. Os arranjos de oligonucleotídeos também podem ser empregados para definir polimorfismos de nucleotídeos únicos (Guo, 1994), até mesmo por comparação de 2 amostras utilizando fluorescência multicolorida (Chee, 1996). Outros exemplos dessas aplicações são descritos a seguir.

A busca por oligômeros de maior afinidade abriu caminho para as modificações químicas de moldes e sondas oligonucleotídicas, com o objetivo de melhorar a cinética e a termodinâmica da ligação. As sondas de peptídeos de ácido nucleico (PNAs) permitem que a hibridização ocorra com um nível de rigor mais alto, por causa dos duplexes PNA-DNA de alta estabilidade (Corey, 1997). As sondas de RNA metilado (Corey, 1998) exibem afinidades relativamente parecidas. Entretanto, PNAs exibem condições de hibridização mais rápidas que seus respectivos ácidos nucleicos, principalmente em razão da sua estrutura em coluna de sustentação neutra (Freeman, 1999). Em geral, é possível dizer que, embora a redução do tempo de hibridização de horas para minutos represente uma vantagem nítida, o problema da imprevisibilidade dos pontos de desnaturação desses oligômeros de alta afinidade precisa ser resolvido antes da implementação nos microarranjos (Weiler, 1997). Além das sondas, os alvos podem ser quimicamente modificados para intensificar os sinais localmente. Regiões-alvo ricas em pirimidina podem gerar um sinal de hibridização mais intenso por meio da incorporação de 5-metiluridina durante a transcrição *in vitro* (Woski, 1998).

Microarranjos de cDNA

Os microarranjos de sequências de DNA permitem o monitoramento com base na hibridização da expressão de genes cognatos. Assim, essa estratégia implica ter acesso aos clones ou a possibilidade de gerar produtos de PCR. Até agora, as melhores estratégias utilizam a detecção de 2 cores de fluorescência para discriminar uma amostra de seu controle, bem como para checar níveis de expressão diferenciais. Esse método foi introduzido e validado por Pat Brown et al. (2000), na Universidade de Stanford (Schena, 1995, 1996; Shalon, 1996). As vantagens dessa abordagem consistem em cálculo de uma proporção para cada sonda, controle da qualidade da sonda, propriedades de hibridização específicas de cada par alvo/sonda, e eficácia da marcação. Para essa aplicação, a Synteni (uma subsidiária da Incyte, Palo Alto, CA) desenvolveu o Gene Expression Micro-arrays (GEMs) (Schena, 1998). A NEN Life Science atualmente vende lâminas de vidro pré-marcadas contendo 2.400 genes humanos conhecidos (MicroMax).

Embora aparentem ser inerentemente menos reproduzíveis, os microarranjos de cDNA são os que oferecem maior versatilidade em termos de deposição de sonda e acessibilidade da tecnologia. Diversas empresas atualmente oferecem equipamentos para fabricação de arranjos e leitura de matrizes hibridizadas. É provável que os arranjos de cDNA e os arranjos de oligonucleotídeos de alta densidade venham a exercer papéis complementares em laboratórios de pesquisa nos próximos anos. Os arranjos de alta densidade serão utilizados primariamente para descoberta de *loci* com relevância diagnóstica. Os arranjos dedicados serão cada vez mais utilizados em análises de média e baixa densidade de *loci* com relevância diagnóstica descobertos nas análises com arranjos de alta densidade.

Arranjos de sequenciamento

Os dados contidos na sequência de ácido nucleico são fundamentais para a biologia molecular moderna. Os métodos convencionais (Maxam, 1977; Sanger, 1977) são demorados, trabalhosos e caros. Métodos de sequenciamento alternativos, utilizando hibridização em fase sólida, foram propostos em uma base teórica (Bains, 1988; Khrapko, 1989) 15 anos após a sua descoberta (Southern, 1975).

Pouco tempo depois da publicação dos artigos teóricos, foram obtidos dados que confirmaram os princípios do sequenciamento baseado em arranjos para moldes artificiais curtos (Southern, 1992; Pease, 1994; Parinov, 1996). Uma revisão bem escrita sobre os métodos de sequenciamento por microarranjo foi publicada em 1999 (Hacia, 1999). O leitor poderia notar, contudo, que uma parte significativa dos trabalhos publicados e citados nessa área é fornecida por pesquisadores com algum interesse financeiro em um ou mais dispositivos proprietários avaliados em tais publicações. Em vez de endossar um dispositivo ou método em particular, o presente capítulo familiariza o leitor com os princípios básicos envolvidos no ensaio.

Qualquer sequência de ácido nucleico pode, em teoria, ser quebrada em subgrupos de comprimento igual *n*. Todos os possíveis oligonucleotídeos de comprimento *n* (*n*-mêros) podem, então, ser posicionados em locais fixos sobre uma superfície sólida. O ácido nucleico a ser sequenciado (o molde) é amplificado quando necessário, marcado com um marcador direto (fluorescente, luminescente, radioativo) ou indireto (afinidade) e submetido à hibridização com a coleção de *n*-mêros. A detecção da marcação permite ao sequenciador verificar uma compatibilidade com um *n*-mêro em um dado *locus* em particular sobre a superfície sólida. A intensidade do sinal no *locus* deve ser diretamente proporcional ao número de domínios existentes no molde correspondente ao *n*-mêro naquele *locus*. Os métodos destinados à execução de todas essas etapas são destacados nas seções anteriores do presente capítulo.

Para as aplicações de sequenciamento, os *n*-mêros compatíveis com o molde são, então, montados segundo uma ordem definida por meio da análise dos *n*-mêros com uma sequência de sobreposição, de modo semelhante, em princípio, ao arranjo de *contigs* por programas de sequenciamento em larga escala. Considerando um molde nonanucleotídico que, sob condições rigorosas, se liga apenas aos *loci* contendo 4 tetrâmeros listados a seguir em um arranjo contendo todos os 256 tetrâmeros possíveis:

Tetrâmero	Intensidade
5′ACTG	2
5′CTGA	2
5′TGAC	1
5′GACT	1

É trivial concluir, a partir das áreas de sobreposição, que o molde de nonanucleotídeo era 5′ACTGACTGA. Uma análise computacional desse tipo é simples. Desde o advento da computação, tornou-se possível automatizar a varredura do arranjos para detecção do marcador (da própria marcação em si) e, até certo ponto, também a extração e a amplificação do DNA. É muito bom visionar a "caixa preta" que realiza tudo isso em uma única tarde. Considere, todavia, um nonanucleotídeo que se liga aos *loci* contendo os seguintes tetrâmeros:

Tetrâmero	Intensidade
5′TCTA	1
5′CTAC	1
5′TACT	1
5′ACTT	1
5′CTTC	1
5′TTCT	1

Isso poderia representar 5′TCTACTTCT ou 5′TTCTACTTC; não há meios computacionais capazes de resolver essa questão. Quando *n* equivale a menos da metade do comprimento do molde, repetições com mesmo comprimento de *n*/2 tornam os dados ambíguos. A computação vai sendo dificultada de forma crescente à medida que o molde se torna um múltiplo cada vez maior de *n*. Assim, para o sequenciamento de domínios desconhecidos, é desejável contar com um *n* que seja tão longo quanto possível. Entretanto, o comprimento prático de *n* continua sendo limitado pela tecnologia, uma vez que 4^n (o número de *loci* requerido para representação universal) ultrapassa um milhão para $n = 10$. Isso está próximo dos atuais limites do número distinto de oligonucleotídeos que podem ser diferenciados em um chip fotolitográfico (Lipshutz, 1999).

Hibridização, detecção e análise de imagem

Um componente fundamental dos ensaios de microarranjo é a qualidade e a marcação da sonda. Como a amostra carrega a marcação, é possível prever certo grau de variação interamostras no preparo e na marcação das sondas. Quando os microarranjos são utilizados para determinação do perfil de expressão genética, essa etapa se torna ainda mais crítica por causa das dificuldades para a obtenção de mRNA de alta qualidade. Amostras de RNA insuficientes, degradadas ou de baixa qualidade podem fornecer resultados errôneos que, após a extração dos dados, levam a conclusões inadequadas (Russo, 2003). Embora existam muitos protocolos disponíveis que proporcionam alto rendimento de RNA, um rendimento final mínimo de poucas microgramas a cada experimento é desejável para a maioria das aplicações. Mesmo assim, os protocolos têm utilizado quantidades menores de RNA, com subsequente amplificação empregando intermediários de cDNA, que incorporam um RNA promotor e permitem a amplificação mediada pela RNA polimerase. As abordagens iniciais (Auffray, 1980) convertiam o mRNA em uma sonda de cDNA fluorescente com incorporação direta de nucleotídeos fluorescentes. Atualmente, a maioria das abordagens emprega RNA total, sendo que existem numerosas variações da incorporação da marcação às sondas de cDNA ou RNA, entre as quais as marcações indiretas por afinidade (p. ex., biotina com detecção auxiliada por anticorpo/avidina/estreptavidina marcada com fluorescência ou partículas de ouro dispersoras de luz) (Figs. 68.3 e 68.4). Cada etapa do preparo da sonda, desde a extração até a marcação, deve ser cuidadosamente controlada para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

A habitual consideração de tempo, temperatura, rigor e concentração da sonda determina as condições em que ocorre a hibridização do microarranjo. Os arranjos com frequência incluem sondas-controle negativas para determinação de um nível ótimo de rigor. Em razão da complexidade extremamente alta da sonda empregada na determinação do perfil de expressão genética, os tempos de hibridização em geral são estendidos para permitir a hibridização das mensagens de baixa abundância. As lavagens são planejadas de modo a remover a sonda ligada de maneira inespecífica e a reduzir a interferência de fundo. Todas as etapas precisam ser otimizadas e padronizadas. Após uma hibridização bem-sucedida, o ácido nucleico marcado se liga às sequências complementares que estão presas ao arranjo (Fig. 68.5). Algum tipo de análise de imagem é empregada para capturar o sinal. Na maioria das abordagens, a lâmina inteira passa por uma varredura (fluorescência, autorradiografia ou dispersão da luz) e um algoritmo é utilizado para ligar as características às intensidades e listas de genes. O *software* associado ao escaneador pode gerar uma "máscara" para alinhar a ima-

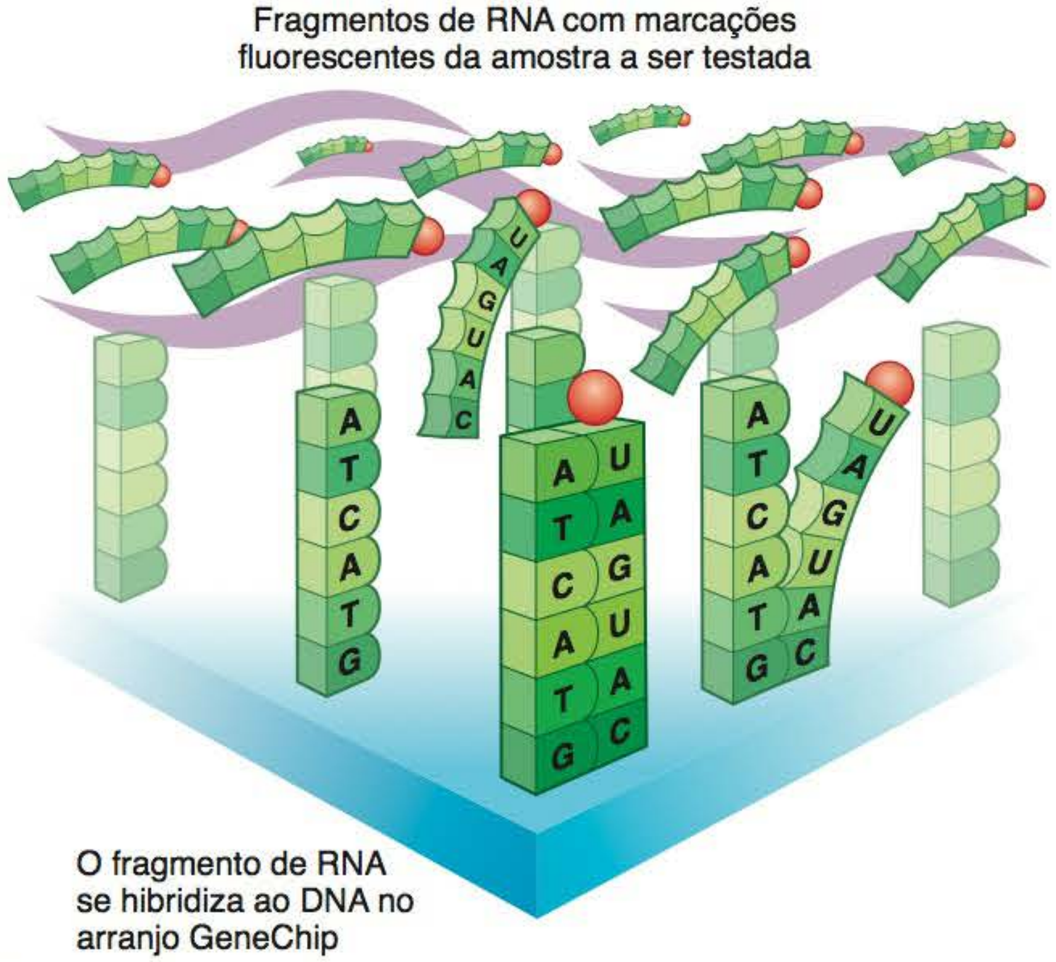


Figura 68.3 Ilustração representando a hibridização de sondas marcadas ao microarranjo GeneChip da Affymetrix. (Cortesia da Affymetrix.)

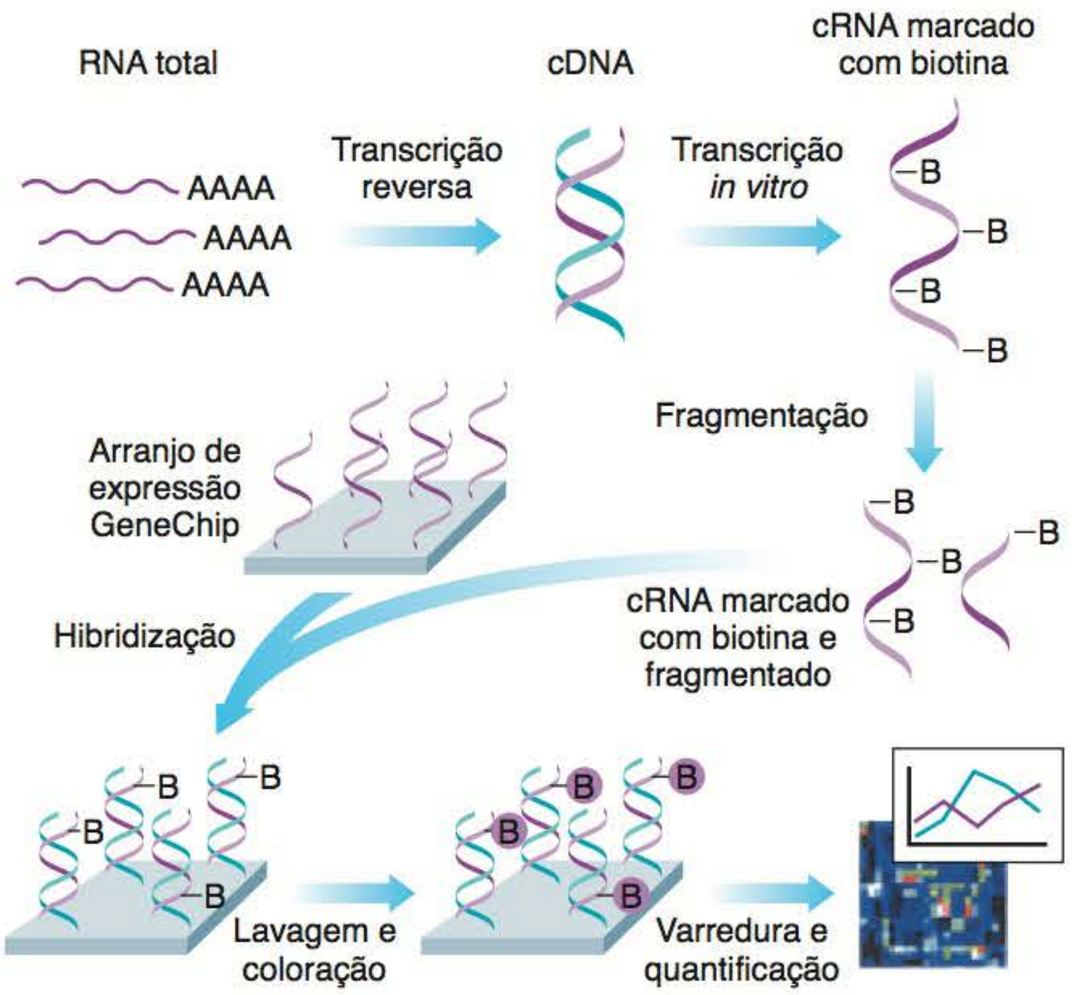


Figura 68.4 Ensaio padrão de determinação da expressão genética eucariôntica. Os alvos de cDNA ou cRNA derivados do mRNA de uma amostra experimental hibridizam-se às sondas de ácido nucleico presas no suporte sólido. Monitorando a quantidade de marcação associada a cada local no DNA, é possível inferir a abundância de cada espécie de mRNA representada. (Cortesia da Affymetrix.)

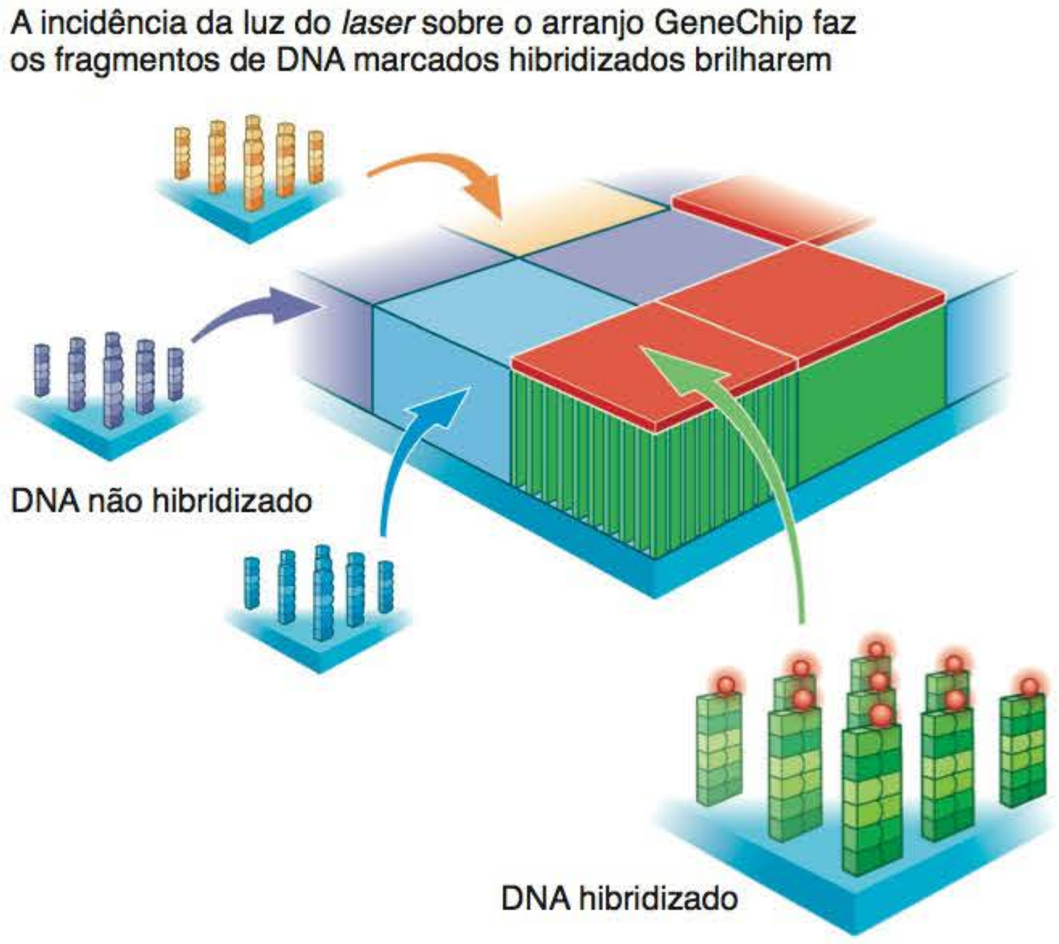


Figura 68.5 Ilustração representando a triagem de sondas com e sem marcação no microarranjo GeneChip da Affymetrix. (Cortesia da Affymetrix.)

gem com a grade utilizada na construção do arranjo. A aquisição dos dados gera amplos conjuntos de dados (uma imagem costuma utilizar de 10 a 50 MB) que precisam ser armazenados em formatos-padrão (.bmp, .gif, .jpg). O *software* de processamento de imagens se tornará cada vez mais automatizado para garantir um ajuste de grade adequado, detectar artefatos e identificar características para extrair informação significativa. Existem vários algoritmos disponíveis que determinam a intensidade do sinal e corrigem a interferência de fundo. Depois que as intensidades são atribuídas a cada característica, os dados estão prontos para serem analisados (ver seção "Bioinformática").

Bioinformática

O aspecto mais desafiador dos microarranjos se apresenta quando amplos conjuntos de dados – já montados e purificados para remoção de artefatos – aguardam a análise (Draghici, 2003; Parmigiana, 2003). A abordagem depende da natureza da pergunta e do planejamento do experimento. O conjunto de dados é submetido a uma exploração inicial para avaliação da qualidade, o que usualmente envolve a avaliação da interferência de fundo e a intensidade média das características no arranjo. Para facilitar as comparações estatísticas entre os arranjos, as intensidades comumente são transformadas em logaritmo, e os arranjos são "normalizados" entre si.

Uma abordagem popular para normalização da expressão genética baseia-se na suposição de que as condições, se comparadas (i. e., normal *versus* tumoral; infectado *versus* não infectado), afetariam a expressão genética de um número relativamente pequeno de genes, sem afetar a maioria deles. Na ausência de uma distorção sistemática, a intensidade mediana de todas as características contidas no arranjo deveria permanecer inalterada. Assim, um método de normalização comum consiste em dividir cada medida de intensidade contida no arranjo pela intensidade mediana do arranjo (Kano, 2003). Essas considerações são razoáveis quando o arranjo contém um número significativo de genes que representam uma ampla gama de funções biológicas.

Uma advertência com relação aos métodos de normalização da intensidade total advém da consideração implícita de que a variação sistemática é constante ao longo de toda a gama de intensidades de expressão do arranjo. Entretanto, como mostram os dados oriundos de arranjos técnicos repetidos, a variação sistemática muitas vezes depende da intensidade, ou seja, não é linear. Em outras palavras, a variação sistemática observada a baixas intensidades de expressão difere da variação sistemática observada a intensidades de expressão medianas e altas (Simon, 2005). Assim, para alguns genes, seria inapropriado realizar ajustes lineares, como dividir cada medida de um arranjo pela intensidade média desse arranjo. Para talvez 80% dos arranjos, a variação sistemática seja próxima o bastante da linearidade e, por isso, os métodos de normalização da intensidade total sejam suficientes. Contudo, os 20% restantes requerem a utilização de métodos de normalização não lineares (Genomics and Bioinformatics Group, 2005).

A normalização de quantil não é um método de normalização não linear realizado com frequência em microarranjos. Além de considerar que a expressão da maioria dos genes permanece inalterada sob condições experimentais, a normalização de quantil também assume a forte pretensão de que a distribuição das intensidades de expressão genética também deva ser invariável ao longo dos arranjos (Irizarry, 2003). Assim, tanto a intensidade média para cada arranjo quanto a intensidade em cada quantil do arranjo devem ser as mesmas. Por causa disso, a normalização de quantil escolhe todos os valores de intensidade no arranjo aumentando a intensidade dos valores e ajustando as intensidades de modo que o menor valor de intensidade seja idêntico em cada arranjo, que os segundos menores valores também o sejam e assim por diante. Note que o gene que apresenta menor valor de intensidade em cada arranjo pode ser diferente daquele com menor valor de intensidade em outro arranjo.

As variações sistemáticas dependentes de intensidade também são reveladas pelos arranjos de tecnologia bicolor. As distorções de coloração intensidade-dependentes foram identificadas pela primeira vez no laboratório de Terry Speed, onde observou-se que os genes de baixa abundância parecem ser positivamente regulados no canal Cy5, enquanto os genes de expressão moderada parecem sofrer regulação positiva no canal Cy3 (Yang, 2002). Esse artefato sistemático pode ser efetivamente corrigido por meio da realização de uma regressão linear ponderada localizada (*lowess*) (Fig. 68.6). A validade dos genes de manutenção (*housekeeping*) para a normalização foi questionada nos últimos anos. Nesse método, considera-se que os níveis de expressão dos genes de manutenção são constantes nas condições em que o experimento é realizado. Assim, as medidas da intensidade de um arranjo podem ser normalizadas para as intensidades médias desses genes. Entretanto, foi demonstrado que os níveis de expressão de alguns genes de manutenção variam consideravelmente sob determinadas condições experimentais (Thellin, 1999).

Uma vez normalizados os dados, o controle de qualidade é realizado tanto no nível da amostra quanto no nível genético. O controle de qualidade da amostra avalia globalmente os dados referentes a ela com o intuito de identificar *outliers* ou, nos casos em que a reprodutibilidade das replicações é comumente observada, uma ou algumas amostras

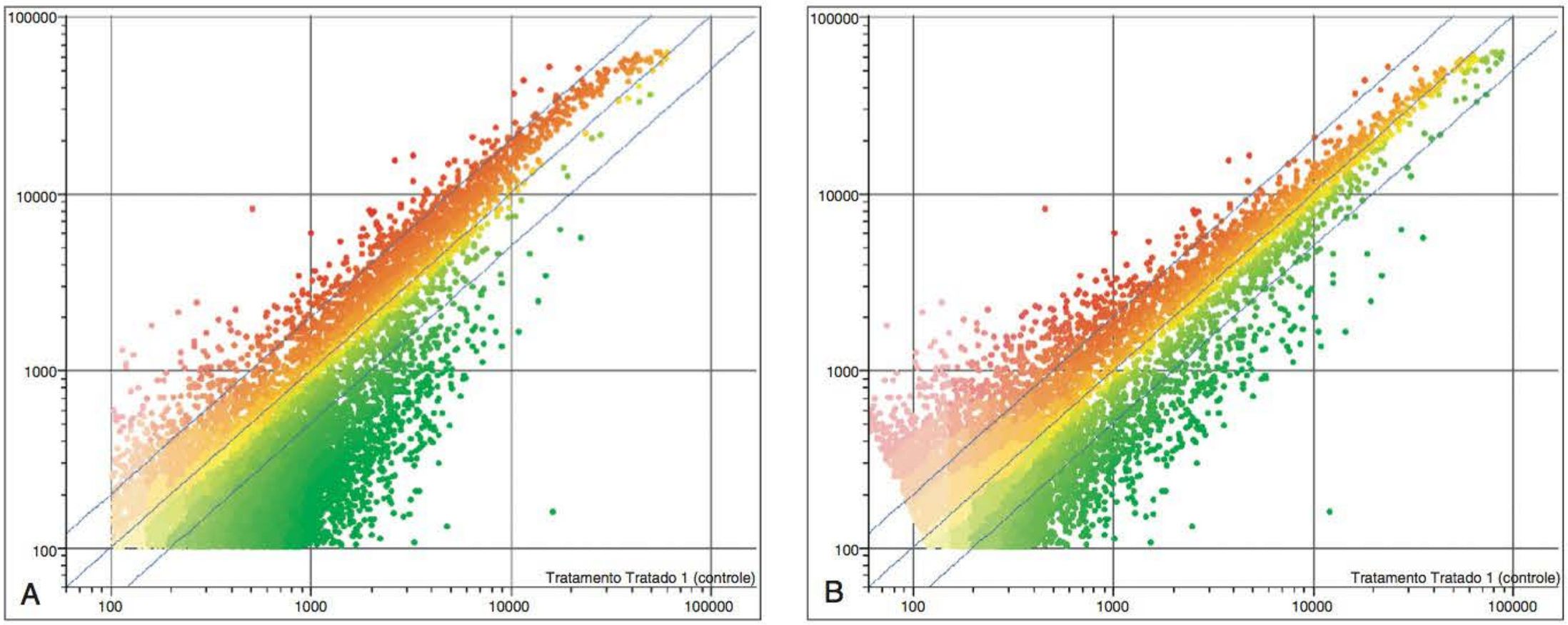


Figura 68.6 A normalização dos *lowess* intensidade-dependente é utilizada para dados bicoloridos. Trata-se de um tipo de esquema de normalização junto à lâmina que ajusta a variação intensidade-dependente decorrentes das propriedades do corante. As distorções associadas ao corante são causadas por inconsistências relativas à intensidade de fluorescência entre Cy5 e Cy3. Tais inconsistências muitas vezes resultam em uma relação não linear entre os 2 corantes, de modo que a curva seguirá um gráfico de dispersão. *A*, dados antes da normalização. *B*, aplicando a normalização de *lowess*, uma regressão localmente ponderada é ajustada aos dados para ajustar o valor do controle para cada medida. Em consequência, o gráfico do sinal *versus* valor de controle se tornará linear. (Cortesia da Agilent Technologies.)

que possam representar *outliers*. Os potenciais *outliers* podem ser identificados como aqueles que não formam grupos com amostras replicadas ou não apresentam correlação significativa com elas. Agrupamento hierárquico, análise do componente principal, algoritmos de predição de classe e métricas similares são utilizados com frequência para realizar controles de qualidade ao nível da amostra (Grewal, 2003).

O controle de qualidade ao nível genético filtra os genes para os quais uma elevada proporção de medidas se encontra dentro da faixa de ruído, a fim de criar um conjunto restrito de genes para realização de novas análises. Os genes removidos correspondem àqueles que não são expressos no(s) tecido(s) de interesse, ou cujos níveis de expressão são tão baixos que a tecnologia disponível é insuficientemente sensível para detectar diferenças de expressão. A remoção desses genes em geral reduz o ruído, a probabilidade de resultados falso-positivos em filtros de expressão diferencial subsequentes e o grau de severidade das múltiplas correções de teste exigidas nas análises estatísticas subsequentes.

Após a conclusão da normalização e do controle de qualidade dos dados importados, podem ser realizadas as análises para isolar os genes de interesse. Em um experimento de microarranjo, um objetivo básico consiste em identificar genes que possam ser expressos de maneira diferencial entre condições experimentais diversas. Os pesquisadores contam com numerosas variantes de testes estatísticos comuns para identificar genes que apresentam expressão diferencial. Em relação ao uso de testes estatísticos para identificação de genes expressos de modo diferencial, é preciso alertar que o número de resultados falso-positivos gerados pela análise estatística é proporcional ao número de testes realizados. Como geralmente centenas ou milhares de genes são testados ao mesmo tempo, o número de resultados falso-positivos gerados pela análise tem o potencial de dominar a lista de genes candidatos considerados possíveis genes de expressão diferencial. Assim, é importante limitar o número de resultados falso-positivos em uma análise estatística por meio da correção de múltiplos testes. Duas categorias de correção de múltiplos testes são aquelas que determinam: a) FWER (*family-wise error rate*); e b) FDR (*false discovery rate*). Os testes FWER controlam a probabilidade geral de que no máximo um gene seja identificado por engano como sendo diferencialmente expresso após a análise estatística e a realização de múltiplas correções de teste (Grewal, 2003). Exemplos de testes FWER são Bonferroni, Holms-Bonferroni *step-down* e permuta de Westfall e Young. Os testes FDR controlam a probabilidade de os resultados falso-positivos serem proporcionais ao número de genes que passaram no teste estatístico, e não ao número total de genes testados pela análise estatística. Um exemplo de teste FDR é o teste de Benjamini-Hochberg para taxa de falsas descobertas (Benjamini, 1995). Existem diversos pacotes estatísticos excelentes disponibilizados *on-line*, tais como BRB Tools, SAM, Focus, D Chip, R Bioconductor Library, PAM etc.

A análise de agrupamentos (Fig. 68.7) é conveniente para genes de agrupamento que se comportam de modo semelhante sob diversas condições durante um dado experimento. O agrupamento possui numerosas aplicações na análise de dados referentes à expressão. É possível inferir a função previamente ignorada de um gene a partir das funções dos demais integrantes do grupamento. Essa inferência se baseia no pressuposto de que os genes compartilhadores de funções similares compartilham também comportamentos de expressão parecidos sob condições experimentais. O agrupamento também pode ser útil para encontrar genes que possam estar corregulados. Chegou-se a essa conclusão com base na suposição de que os genes corregulados compartilham perfis de expressão similares. Assim, para encontrar elementos regulatórios comuns, pode ser útil analisar as regiões promotoras dos genes que se unem para formar agrupamentos (Grewal, 2003).

Os genes de interesse gerados podem, então, ser integrados com a biologia conhecida. Alguns programas (p. ex., GeneSpring) contam com a habilidade de criar referências cruzadas de listas de genes a partir da análise de expressão diferencial e/ou da análise de agrupamento contra a ontologia genética ou outras listas de função de genes, com o fim de descobrir a importância da sobreposição. Além disso, os genes podem ser relacionados a vias biológicas conhecidas e/ou bancos de dados (GenBank, LocusLink, UniGene, SAGE) públicos (NCBI).

Assim, em razão da necessidade intensiva de um padrão de reconhecimento, interpretação de dados multidimensionais e comparação de plataformas cruzadas, a tecnologia de microarranjo gozará de uma estreita relação com a bioinformática, sendo que a coevolução do *hardware* e do *software* parece ser inevitável (ver Cap. 76).

Aspectos da propriedade intelectual

A tecnologia do microarranjo constitui uma área que tem se movido rapidamente em função da concorrência feroz. Dessa forma, é necessário enfatizar que numerosas patentes foram registradas, algumas das quais com relevância direta para o diagnóstico clínico. A Affymetrix (Santa Clara, CA), por exemplo, possui amplos direitos de patente sobre os arranjos de oligonucleotídeos de alta densidade (Chee, 1998; Holmes, 1998), independentemente do modo pelo qual eles são produzidos. Considerando-se que um laboratório decida desenvolver internamente (*in-house*) arranjos de densidade moderada para testes de detecção de tumor, e venha a cobrar pela presta-

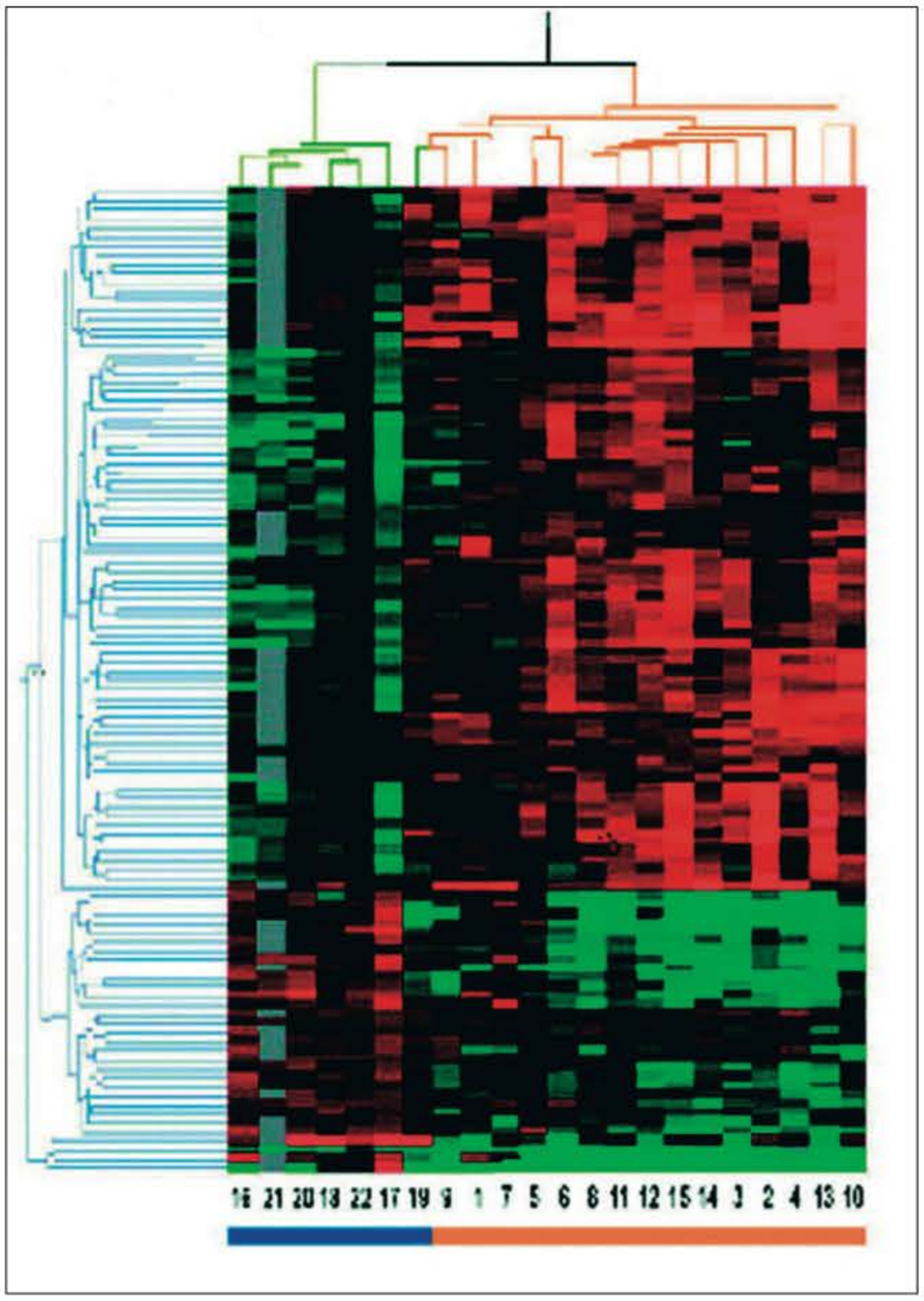


Figura 68.7 Dendograma de agrupamento hierárquico de genes duodenais oriundos de biópsias de diferentes tipos de doença celíaca (barra alaranjada) e de biópsias-controle (azul). O agrupamento de 109 genes ao longo das 22 amostras agrupa as 7 amostras-controle (barra azul) à parte das amostras obtidas a partir de 15 pacientes com doença celíaca (barra alaranjada). Cada coluna representa uma doença celíaca ou uma amostra-controle. Cada linha representa um gene individual. Para cada gene, um sinal verde representa subexpressão, sinais negros denotam genes similarmente expressos, um sinal vermelho representa genes superexpressos e um sinal cinza denota dados faltantes. (Adaptado com permissão de BMJ Publishing Group, de Diosdado, B; Wapenaar, MC; Franke, L et al.: *A microarray screen for novel candidate genes in coeliac disease pathogenesis*. Gut 2004; 53:944.)

ção desse serviço, o arranjo produzido pode infringir as patentes da Affymetrix se exceder 400 características/cm^2, independentemente do método de síntese utilizado (Fodor, 1998). As tecnologias de arranjos que empregam micromatrizes de blocos de gel de poliacrilamida (elementos de gel tridimensional) representam uma nova abordagem que pode não infringir os direitos da Affymetrix (Khrapko, 1991; Yershov, 1996; Guschin, 1997). Espera-se que, assim como aconteceu com as tecnologias de amplificação de ácido nucleico, a competição entre os fabricantes abaixe os custos dos arranjos de alta e média densidade e siga rumo à democratização dessa poderosa tecnologia.

Aplicações clínicas da tecnologia de arranjos

Numerosas aplicações da tecnologia de microarranjos foram propostas ao longo dos últimos anos, variando desde o estadiamento molecular de tumores até a identificação e a caracterização de agentes microbianos. Isso resultou em muita especulação sobre a tecnologia de arranjos representar a "próxima onda" de avanços tecnológicos a exercer impacto prático sobre o diagnóstico da doença humana, atrás apenas da PCR como tecnologia central no laboratório clínico de diagnóstico molecular. A presente seção se concentra nas aplicações atuais e futuras da tecnologia de arranjos.

Tecnologia de arranjos no laboratório clínico

A utilidade da tecnologia de arranjos para o laboratório clínico, embora ainda não esteja disseminada, já desponta no horizonte. Recentemente, Roth et al. (2004) empregaram a análise de arranjos para detectar patógenos respiratórios comuns e compararam esse método com a cultura convencional, realizada com amostras oriundas do líquido da orelha média. Em comparação à cultura, as sensibilidades do ensaio de arranjo para detecção de *Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* foram de 96% (93% para a cultura), 73% (93% para a cultura), 93% (80% para a cultura) e 100% (78% para a cultura), respectivamente. Além disso, o microarranjo à base de tecidos foi utilizado como ferramenta para controle de qualidade interno no aprimoramento da interpretação da coloração imuno-histoquímica (Packeisen, 2002; Gulmann, 2004). Também foram descritos aparelhos de arranjo microfluídico em pequena escala e automatizados que são capazes de detectar espécies de RNA a uma frequência de 1:100.000, com curto tempo de resposta e baixo coeficiente de variação (0,09 a 0,11) (Baum, 2003), o que ajuda a caracterizar tecnicamente essa tecnologia, no que se refere a faixa dinâmica, poder de discriminação e reprodutibilidade. Por outro lado, é provável que consistência metodológica, controle de qualidade e aplicação doença-específica tenham de ser dominados antes de sua implementação como teste de rotina no laboratório clínico. Além disso, o FDA recentemente concedeu à Roche Molecular Systems a liberação da comercialização de 501(k) unidades do teste AmpliChip CP450 Genotyping para serem utilizados no sistema de instrumentação da Affymetrix (Malone, 2005). Isso permitirá a determinação dos genótipos 2D6 e 2C19 do citocromo P450 do paciente, genes codificadores de enzimas hepáticas importantes para o metabolismo farmacológico, além de permitir ao médico clínico otimizar a dosagem de fármacos e minimizar os potenciais efeitos colaterais com base no genótipo individual. Esta é a primeira vez que foi concedida a liberação da comercialização de um chip de microarranjo como dispositivo diagnóstico para uso em laboratório clínico, anunciando a potencial nova era da medicina personalizada.

Tecnologia de arranjos na doença clínica

A tecnologia do microarranjo proporcionou a habilidade de triar genes que apresentam regulação diferencial em doenças clínicas e experimentalmente induzidas, além do estabelecimento de outras correlações entre genes seletos e suas respectivas funções. Ji et al. (2003), por exemplo, empregaram a tecnologia do microarranjo na triagem de genes que se encontravam positivamente regulados no estágio inicial da pancreatite aguda, utilizando 2 modelos experimentais diferentes da doença. Constatou-se que muitos genes estavam positivamente regulados em ambos os sistemas experimentais, sugerindo sua importância na condição humana estudada. Contudo, um gene em particular (*EGR1*) também foi analisado utilizando abordagens clássicas (*knockout* do gene), e descobriu-se que ele se tratava de um regulador-chave na doença que poderia ser importante no desenvolvimento da pancreatite aguda em estágio inicial. Outros pesquisadores (Iacobuzio-Donahue, 2003) realizaram uma avaliação abrangente e compararam os perfis de expressão genética de 39 amostras de câncer de pâncreas. Em tais estudos, foram identificados algo entre 6 e 40 genes que apresentavam intensa expressão ao exame por múltiplas metodologias (arranjos de oligonucleotídeos, arranjos de cDNA ou análise seriada da expressão genética [SAGE]), sendo isso eventualmente traduzido em alvos clinicamente úteis.

A análise de microarranjo de células e tecidos como forma de identificar candidatos terapêuticos-chave continua a evoluir. As malignidades ou os respectivos componentes teciduais que têm sido analisados na busca da identificação de alvos-chave, indicadores diagnósticos ou prognósticos e novas vias são melanoma (Nambiar, 2004), leucemias (Moos, 2002; Jaakson, 2003), linfomas (Hedvat, 2002; Kobayashi, 2003), síndromes mielodisplásicas (Pellagatti, 2004) e carcinomas de próstata (Pettus, 2004), de bexiga (Dyrskjot, 2003), renal (Moch, 1999), colorretal (Frederiksen, 2003), de mama (Jeffrey, 2002; Wilson, 2004), ovariano (Rosen, 2004) e endometrial (Saidi, 2004).

Outras aplicações clínicas que utilizam a capacidade de triagem genética da tecnologia de microarranjo são estudo do efeito da radiação

ionizante (Amundson, 1999), detecção do vírus da hepatite D (Sun, 2004), identificação de patógenos do sistema nervoso central (Hanson, 2004), cariotipagem de DNA livre de células no líquido amniótico (Larrabee, 2004), diagnóstico viral (Striebel, 2003), fornecimento de marcadores moleculares para alergia (Jahn-Schmid, 2003) e para distúrbios inflamatórios (Bennett, 2003), doença de Alzheimer (Pasinetti, 2001), esclerose múltipla (Whitney, 1999), diabetes (Sreekumar, 2002; Mootha, 2003), rejeição de transplante (Flechner, 2004) e hipertensão pulmonar (Geraci, 2001). Também foi descrita a habilidade de prever a ocorrência de reações farmacológicas adversas (Guzey, 2002), a resposta à terapia (Sotiriou, 2002), a sensibilidade a fármacos (Stein, 2004) e os perfis de toxicidade (Waring, 2001), entre outros (Cox, 2001). Graças ao potencial para rapidez e automação, o sequenciamento de microarranjo é uma alternativa atraente aos métodos de fenotipagem clássicos, notavelmente na triagem de resistência farmacológica.

Limitações

Apesar da excitação e do maior potencial para aplicação clínica da tecnologia de microarranjo, é preciso ter cautela com sua interpretação. A aplicação clínica irá requerer procedimentos para controle e garantia da qualidade. A abordagem para garantir a reprodutibilidade dos dados de alta densidade apresentados nos microarranjos não tem precedentes no laboratório clínico. Cada uma das numerosas etapas de extração da amostra, marcação, hibridização, análise de imagem e análise de dados contribui para as dificuldades de reprodutibilidade dos dados, podendo diferir nos sistemas comercialmente disponíveis (Kothapalli, 2002). Até mesmo alterações relativamente pequenas, como a variação do método empregado para isolamento do ácido nucleico (Feezor, 2004), podem afetar os resultados do perfil de expressão genética.

As abordagens existentes para evitar tais inconsistências são: verificação de cada sequência clonal antes da impressão do microarranjo, realização de experimentos em duplicata ou triplicata sempre que possível e verificação de genes candidatos utilizando métodos clássicos (PCR, Northern *blotting*, ensaio de proteção de RNAse etc). Alguns investigadores (Rajeevan, 2001) demonstraram que a maioria dos resultados do arranjo foi qualitativamente acurada nos experimentos de validação cruzada utilizando RT-PCR em tempo real. Entretanto, para os genes que apresentaram uma diferença inferior a 4 vezes nos arranjos, não foi obtida uma validação cruzada consistente com RT-PCR em tempo real. Também é bastante importante determinar se a diferença na expressão do mRNA se traduz em uma diferença nos níveis de expressão dos produtos proteicos correspondentes. Atualmente, ainda é preciso esclarecer com que frequência a diferença ao nível do mRNA é traduzida em uma diferença ao nível de expressão proteica.

Recomenda-se, também, cautela na interpretação dos genes que apresentam regulação diferencial durante a progressão tumoral (microarranjo de estadiamento). Qualquer fonte de ácido nucleico derivada de tecido de biópsia é constituída por numerosas populações celulares distintas, e somente pode representar um tecido homogêneo depois que a massa tumoral atinge um tamanho suficientemente grande (i. e., estágio tardio). Embora existam alguns métodos disponíveis para isolar células específicas de interesse em tumores menores (p. ex., microdissecção de captura a *laser*), tais metodologias são demoradas e não estão universalmente disponíveis.

Assim como todas as estratégias de sequenciamento, os microarranjos apresentam sensibilidade limitada para alelos minoritários. O exemplo da identificação baseada na sequência da resistência farmacológica no HIV será particularmente instrutivo. O sequenciamento por microarranjo de isolados clínicos pode prever de maneira correta alguns casos de resistência farmacológica com base em mutações específicas (Race, 1998), além de já estar evoluindo em direção à prática-padrão (Perez-Olmeda, 1999). Mesmo fazendo-se a consideração otimista de que o sequenciamento é capaz de detectar um alelo de resistência que esteja representado em 1% ou mais da população viral, ainda há motivos para duvidar do valor preditivo de um teste negativo para resistência. Poucos virologistas argumentariam que uma prevalência de 0,5% de resistência farmacológica é pouco relevante para um vírus que gera cerca de um bilhão de cópias por dia. Sendo assim, deveria ser entendido que o poder dessa tecnologia atualmente reside em sua habilidade na triagem da regulação de genes em parâmetros definidos (Russo, 2003).

Espera-se que, em um futuro próximo, novos avanços no diagnóstico, na classificação e no prognóstico sejam descobertos por métodos baseados em microarranjo. Conforme enfatizado anteriormente, não são meros aperfeiçoamentos na aparelhagem que tornam isso possível, e sim estratégias analíticas mais sofisticadas, que evoluem para acompanhar os dados mais complexos gerados por esses dispositivos (Bassett, 1999).

Referências bibliográficas

Amundson SA, Bittner M, Chen Y, et al: Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. Oncogene 1999; 18:3666.

Auffray C, Rougeon F: Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. Eur J Biochem 1980; 107:303

Bains W, Smith GC: A novel method for nucleic acid sequence determination. J Theor Biol 1988; 135:303.

Bassett DE Jr, Eisen MB, Boguski MS: Gene expression informatics – it's all in your mine. Nat Genet 1999; 21:51–55.

Baum M, Bielau S, Rittner N, et al: Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. Nucleic Acids Res 2003; 31:e151.

Beattie WG, Meng L, Turner SL, et al: Hybridization of DNA targets to glass-tethered oligonucleotide probes. Mol Biotechnol 1995; 4:213.

Beier M, Hoheisel JD: Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. Nucl Acids Res 1999; 27:1970.

Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Statist Soc B 1995; 57:2889.

Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al: Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. J Exp Med 2003; 197:711.

Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE: High-density oligonucleotide arrays. Biosens Bioelectron 1996; 11:687.

Brown MP, Grundy WN, Lin D, et al: Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:262–267.

Case-Green SC, Southern EM: Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides. Nucl Acids Res 1994; 22:131.

Chee M, et al: Arrays of nucleic acid probes on biological chips. Nov 17, 1998; Patent US1995000441887.

Chee M, Yang R, Hubbell E, et al: Accessing genetic information with high-density DNA arrays. Science 1996; 274:610.

Chen Y, Dougherty ER, Bittner ML: Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. Biomed Optics 1997; 2:364.

Cheng J, Sheldon EL, Wu L, et al: Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips. Nat Biotechnol 1998; 16:541.

Cheung VG, Morley M, Aguilar F, et al: Making and reading microarrays. Nat Genet 1999; 21(Suppl 1):1.

Clark MD, Panopoulou GD, Cahill DJ, et al: Construction and analysis of arrayed cDNA libraries. Methods Enzymol 1999; 303:205.

Corey DR: Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition. Trends Biotechnol 1997; 15:224.

Corey DR: DNA/RNA Diagnostics. Washington, DC, Cambridge Healthtech Institute, 19–21 May 1998.

Cox JM: Applications of nylon membrane arrays to gene expression.analysis. J Immunol Meth 2001; 250:3.

Diosdado B., Wapenaar M., Franke L., et al: A microarray screen for novel candidate genes in coeliac disease pathogenesis. Gut 2004; 53: 944.

Draghici, S: Data analysis tools for DNA microarrays. Boca Raton, FL, Chapman & Hall/CRC Press, 2003.

Drmanac R, Crkvenjakov R: Method of sequencing of genomes by hybridization of oligonucleotide probes. Apr 13, 1993b; Patent US5667972. Available on line at: http://www.freepatentsonline.com/5667972.html.

Drmanac R, Drmanac S: cDNA screening by array hybridization. Methods Enzymol 1999; 303:165–178.

Drmanac R, Drmanac S, Strezoska Z, et al: DNA sequence determination by hybridization: A strategy for efficient large-scale sequencing. Science 1993a; 260:1649.

Drmanac S, Kita D, Labat I, et al: Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics. Nat Biotechnol 1998; 16:54.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al: Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet 1999; 21:10.

Dyrskjot L. Clasification of bladder cancer by microarray expression profiling: towards a general clinical use of microarrays in clinical diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 2003; 3:635.

Edman CF, Raymond DE, Wu DJ, et al: Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. Nucl Acids Res 1997; 25:4907.

Ekins RP, Jackson TM: Free Ligand Assay. UK Patent no CA1227425 8 803 000. 1987.

Ekins RP, Chu FW: Microarrays: Their origins and applications. Trends Biotechnol 1999; 17:217.

Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, et al: Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analysis. Physiol Genomics 2004; 19:247.

Flechner SM, Kurian SM, Head SR, et al: Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. Am J Transplant 2004; 4:1475.

Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, et al: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 1991; 251:767.

Fodor SP, Stryer L, Read J, et al: Arrays of materials attached to a substrate. Apr 28, 1998; Patent US1995000466632. Available on line at: http://www.freepatentsonline.com/5744305.html.

Forman JE, Walton ID, Stern D, et al: Molecular modeling of nucleic acids. Washington, DC, American Chemical Society, 1999.

Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, et al: Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. J Cancer Res Clin Oncol 2003; 129:263.

Freeman WM, Gioia L: The maturation of nucleic acid technologies. Trends Biotechnol 1999; 17:44.

Friend SH, Stoughton RB: The magic of microarrays. Sci Am 2002; 286:44.

Geraci MW, Moore M, Gessell T, et al: Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. Circ Res 2001; 88:555–562.

Genomics and Bioinformatics Group: Microarray Data Analysis. Low-Level Analysis of Affymetrix Chips. Bethesda, MD, National Institute of Health, 2005. Available on line at: http://discover.nci.nih.gov/microarrayAnalysis/Affymetrix.Preprocessing.jsp.

Gillespie D, Spiegelman SA: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J Mol Biol 1965; 12:829.

Granjeaud S, Nguyen C, Rocha D, et al: From hybridization image to numerical values: a practical, high throughput quantification system for high density filter hybridizations. Genet Anal 1996; 12:151.

Graves DJ: Powerful tools for genetic analysis come of age. Trends Biotechnol 1999; 17:127.

Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, et al: Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. Mamm Genome 1992; 3:609.

Grewal A, Lambert P, Stockton J. Current Protocols in Bioinformatics. New York: John Wiley, 2003, p 7.1.1.

Gulmann C, Loring P, O'Grady A, Kay E: Miniature tissue microarrays for HercepTest® standardisation and analysis. J Clin Pathol. 2004; 57:1229.

Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, et al: Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. Nucl Acids Res 1994; 22:5456.

Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, et al: Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. Anal Biochem 1997; 250:203.

Guzey C, Spigset O. Genotyping of drug targets: a method to predict adverse drug reactions? Drug Saf 2002; 25:553.

Hacia JG: Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. Nat Genet 1999; 21:42.

Hanson EH, Neimeyer DM, Folio L, et al: Potential use of microarray technology for rapid identification of central nervous system pathogens. Mil Med 2004; 169: 594.

Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, et al: Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. Hum Pathol 2002; 33:968.

Heller MJ, O'Connell J P, Juncosa R D, et al: Methods for hybridization analysis utilizing electronically controlled hybridization. Dec 15, 1998; Patent US5849486. Available on line at: http://www.freepatentsonline.com/5849486.html.

Heyse S, Ernst OP, Dienes Z, et al: Incorporation of rhodopsin in laterally structured supported membranes: observation of transducin activation with spatially and time-resolved surface plasmon resonance. Biochemistry 1998; 37:507.

Hoheisel JD: Sequence-independent and linear variation of oligonucleotide DNA binding stabilities. Nucl Acids Res 1996; 24:430.

Holmes CP: Cyclic nucleic acid and polypeptide arrays. Jun 23, 1998; Patent US1996000647618.

Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, et al: Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. Cancer Res 2003; 63:8614.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, et al: Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res 2003; 31:e15.

Jaakson K Zernant J, Kulm M, et al: Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. Hum Mutat 2003; 22:395.

Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, et al: Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum Immunoglobulin E. Clin Exp Allergy 2003; 33:1443.

Jeffrey SS, Fero MJ, Borresen-Dale AL, et al: Expression array technology in the diagnosis and treatment of breast cancer. Mol Interv 2002; 2:101.

Ji, B, Chen, XQ, Misek DE, et al: Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. Physiol Genomics 2003; 14:59.

Um exemplo de como o microarranjo é empregado para triagem da regulação da expressão gênica em dois modelos de pancreatite experimental com posterior validação dos genes selecionados (EGR-1) por métodos convencionais.

Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A: Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucl Acids Res 1979; 7:1541.

Kano M, Kashima H, Shibuya T, et al: A method for normalization of gene expression data. Genome Informatics 2003; 14:336.

Khrapko KR, Lysov YP, Khorlin AA, et al: A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. DNA Seq 1991; 1:375.

Khrapko KR, Lysov YP, Khorlyn AA, et al: An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. FEBS Lett 1989; 256:118.

Kobayashi T, Yamaguchi M, Kim S, et al: Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo $CD5^+$ and $CD5^-$ diffuse large B-cell lymphomas. Cancer Res 2003; 63:60.

Kothapalli R, Yoder SJ, Mane S, et al: Microarray results: how accurate are they? BMC Bioinformatics 2002; 3:22.

Discute em detalhes os problemas associados aos microarranjos e avalia dados obtidos de dois sistemas diferentes comercialmente disponíveis.

Landegren U, Kaiser RJ, Sanders J, Hood L: A ligase-mediated gene detection technique. Science 1988; 241:1077.

Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E, et al: Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. Am J Hum Genet 2004; 75:485.

Lipshutz RJ: Likelihood DNA sequencing by hybridization. J Biomol Struct Dyn 1993; 11:637.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ: High density synthetic oligonucleotide arrays. Nat Genet 1999; 21:20.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol 1996; 14:1675–1680.

Macevicz SC: Nucleic acid sequence determination by multiple mixed oligonucleotide probes. Mar 26, 1991; Patent US5002867. Available on line at: http://www.freepatentsonline.com/5002867.html.

Malone B: FDA clears first gene chip for pharmacogenomics. Clin Lab News 2005; 31:14.

Marshall A, Hodgson J: DNA chips: An array of possibilities. Nat Biotechnol 1998; 16:27.

Maskos U, Southern EM: Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. Nucl Acids Res 1992; 20:1679.

Maskos U, Southern EM: A novel method for the parallel analysis of multiple mutations in multiple samples. Nucl Acids Res 1993a; 21:2269.

Maskos U, Southern EM: A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support. Nucleic Acids Res 1993b; 21:4663.

Maskos U, Southern EM: A novel method for the analysis of multiple sequence variants by hybridisation to oligonucleotides. Nucl Acids Res 1993c; 21:2267.

Matson RS, Rampal J, Pentoney SLJ, et al: Biopolymer synthesis on polypropylene supports: Oligonucleotide arrays. Anal Biochem 1995; 224:110.

Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:560.

Moch H, Schraml P, Bubendorf L, et al: High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. Am J Pathol 1999; 154:981.

Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, et al: Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. Clin Cancer Res 2002; 8:3118.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nat Genet 2003; 34:267.

Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Bar A, et al: Applications of array technology: melanoma research and diagnosis. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:549.

Nickerson DA, Kaiser RJ, Lappin S, et al: Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:8923.

Nikiforov TT, Rendle RB, Goelet P, et al: Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. Nucl Acids Res 1994; 22:4167.

Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W: Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. J Clin Pathol 2002; 55:613.

Parinov S, Barsky V, Yershov G, et al: DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides. Nucl Acids Res 1996; 24:2998.

Parmigiana G, Garret ES, Irizarry RA, Zeger SL (eds). The analysis of gene expression data: methods and software. Springer-Verlag, New York, 2003.

Pasinetti GM. Use of cDNA microarray in the search for molecular markers involved in the onset of Alzheimer's disease dementia. J Neurosci Res 201; 65:471.

Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, et al: Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. Genome Res 1997; 7:606.

Pastinen T, Perola M, Niini P, et al: Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. Hum Mol Genet 1998; 7:1453.

Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al: Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:5022.

Pellagatti A, Esoof N, Watkins F, et al: Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. Br J Haematol 2004; 125:576.

Perez-Olmeda M, Rodriguez-Rosado R, Gomez-Cano M, et al: Usefulness of genotypic analysis of resistance to nucleoside analogues in the clinical setting. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18:448.

Pettus JA, Cowley BC, Maxwell T, et al: Multiple abnormalities detected by dye reversal genomic microarrays in prostate cancer: a much greater sensitivity than conventional cytogenetics. Cancer Genet Cytogenet 2004; 154: 110.

Pietu G, Alibert O, Guichard V, et al: Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. Genome Res 1996; 6:492.

Pirrung MC, Read J L, Fodor SPA, Stryer L: Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding screening thereof. Sep 1, 1992; Patent US51438542. Available on line at: http://www.freepatentsonline.com/5143854.html.

Race E, Gilbert SM, Sheldon JG, et al: Correlation of response to treatment and HIV genotypic changes during phase III trials with saquinavir and reverse transcriptase inhibitor combination therapy. AIDS 1998; 12:1465.

Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER: Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. J Mol Diagn 2001; 3:26.

Rosen DG, Huang X, Deavers MT, et al: Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. Mod Pathol 2004; 17:790.

Roth SB, Jalava J, Ruuskanen O, et al: Use of an oligonucleotide array for laboratory diagnosis of bacteria responsible for acute upper respiratory infections. J Clin Microbiol 2004; 42:4268.

Russo G, Zegar C, Giordano A: Advantages and limitations of microarray in human cancer. Oncogene 2003; 22:6497.

Destaca alguns dos recentes desenvolvimentos e aplicações clínicas da tecnologia de microarranjos e discute áreas potencialmente

problemáticas associadas a essa tecnologia.
Saidi SA, Holland CM, Kreil DP, et al: Independent component analysis of microarray data in the study of endometrial cancer. Oncogene 2004; 23:6677.
Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:5463.
Schena M, Heller RA, Theriault TP, et al: Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends Biotechnol 1998; 16:301.
Schena M, Shalon D, Heller R, et al: Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:10614.
Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270:467–470.
Schmid EL, Tairi AP, Hovius R, Vogel H: Screening ligands for membrane protein receptors by total internal reflection fluorescence: the 5-HT3 serotonin receptor. Anal Chem 1998; 70:1331.
Shalon D, Smith SJ, Brown PO: A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Res 1996; 6:639.
Shchepinov MS, Case-Green SC, Southern EM: Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. Nucl Acids Res 1997; 25:1155.
Simon S: STATS – Steve's Attempt to Teach Statistics. Normalization for microarray data. 2005. Available on line at: http://www.cmh.edu/stats/model/datamining/arrayNormalization.htm.
Sosnowski RG, Tu E, Butler WF, et al: Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:1119.
Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M, et al: Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. Breast Cancer Res 2002; 4:R3.
Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98:503.
Southern EM: High-density gridding: Techniques and applications. Curr Opin Biotechnol 1996a; 7:85.
Southern EM: DNA chips: Analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. Trends Genet 1996b; 12:110.
Southern EM, Case-Green SC, Elder JK, et al: Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids. Nucl Acids Res 1994; 22:1368.
Southern EM, Maskos U, Elder JK: Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. Genomics 1992; 13:1008.
Southern EM, Mir KU, Shchepinov MS: Molecular interactions on microarrays. Nat Genet 1999; 21:5.
Sreekumar R, Halvatsiotis P, Schimke JC, Nair KS: Gene expression profile in skeletal muscle of type 2 diabetes and the effect of insulin treatment. Diabetes 2002; 51:1913.
Stein WD, Litman T, Fojo T, Bates SE: A serial analysis of gene expression (SAGE) database analysis of chemosensitivity: comparing solid tumors with cell lines and comparing solid tumors from different tissue origins. Cancer Research 2004; 64:2805.
Investiga a relação existente entre os perfis de expressão genética para um dado tipo de tumor e sua sensibilidade ou resistência a fármacos, com o intuito de fornecer esclarecimentos sobre a base molecular da intratabilidade de um tumor à quimioterapia.
Stimpson DI, Cooley PW, Knepper SM, Wallace DB: Parallel production of oligonucleotide arrays using membranes and reagent jet printing. Biotechniques 1998; 25:886.
Stimpson DI, Gordon J: The utility of optical waveguide DNA array hybridization and melting for rapid resolution of mismatches, and for detection of minor mutant components in the presence of a majority of wild type sequence: statistical model and supporting data. Genet Anal 1996; 13:73.
Strezoska Z, Paunesku T, Radosavljevic D, et al: DNA sequencing by hybridization: 100 bases read by a non-gel-based method. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:10089.
Striebel HM, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, et al: Virus diagnostics on microarrays. Curr Pharm Biotechnol 2003; 4:401.
Sun ZH, Zheng WL, Zhang B, et al: Detection of hepatitis D virus by cDNA microarray method. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2004; 3:423.
Syvanen AC: From gels to chips: 'minisequencing' primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. Hum Mutat 1999; 13:1.
Takahashi N, Hashida H, Zhao N, et al: High-density cDNA filter analysis of the expression profiles of the genes preferentially expressed in human brain. Gene 1995; 164:219.
Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 1999; 75:291.
Waring JF, Jolly RA, Ciurlionis R, et al: Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. Toxicol Appl Pharmacol 2001; 175:28.
Weiler J, Gausepohl H, Hauser N, et al: Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. Nucl Acids Res 1997; 25:2792.
Wetmur JG: DNA probes: Applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 1991; 26:227.
Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, et al: Analysis of gene expression in mutiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. Ann Neurol 1999; 46:425.
Wilson CA, Dering J: Recent translational research: microarray expression profiling of breast cancer-beyond classification and prognostic markers? Breast Cancer Res 2004; 6:192.
Woski SA, Fidanza J, McGall G, et al: Enhanced high density oligonucleotide array-based sequence analysis using modified nucleoside triphosphates. Nucl Acids Res 1998; 26:4975.
Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al: Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucl Acids Res 2002; 30:e15.
Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al: DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:4913.

CAPÍTULO 69

Aplicações da citogenética na patologia moderna

Constance K. Stein PhD

Introdução 1430
Definições 1430
Citogenética 1431
  Cromossomos 1431
  Anormalidades cromossômicas 1438
Clínica 1444
  Aplicações clínicas 1444
  Genética do câncer 1445
  Distúrbios citogenéticos 1448
  Outros fenômenos citogenéticos 1452
Resumo 1452
Referências bibliográficas 1453
  Leituras adicionais 1454

PONTOS-CHAVE

- A identificação de anormalidades cromossômicas geralmente tem correlação com doenças e anormalidades fenotípicas que ajudam no diagnóstico clínico e no tratamento.
- A morfologia padrão e um padrão de bandeamento específico foram estabelecidos para todos os cromossomos humanos. Uma variedade de tecnologias de coloração é usada unicamente para identificar cromossomos e determinar se há anomalias.
- A hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), um recurso diagnóstico único, que combina tecnologias tanto da citogenética quanto da genética molecular, pode fornecer informações importantes sobre as condições dos genes.
- As duas categorias básicas de anormalidade citogenética são numéricas e estruturais.
- As anormalidades citogenéticas podem ser do tipo *de novo* ou herdadas. A detecção pode ocorrer em qualquer fase da vida de uma pessoa, desde o período pré-natal até a idade adulta.
- A identificação de um clone citogeneticamente anormal em um câncer pode fornecer informações sobre o diagnóstico, prognóstico, tratamento e a progressão da doença.
- Muitas síndromes foram ligadas de forma específica a anomalias cromossômicas particulares; por exemplo, a trissomia do 21 na síndrome de Down; 45,X na síndrome de Turner; e a deleção do 22q11.2 na síndrome velocardiofacial.
- O diagnóstico de síndromes de microdeleção pode requerer uma combinação de análise do cariótipo, FISH e avaliação clínica.
- Pode-se usar a análise citogenética em quase toda especialidade médica, sendo um elemento importante na medicina clínica laboratorial.

Introdução

A genética é definida, de forma ampla, como o estudo científico da hereditariedade. No entanto, na medicina clínica laboratorial, o foco de interesse recai em duas especialidades desse campo: (1) a genética humana, que é o estudo da hereditariedade no ser humano, e (2) a genética médica, ou seja, o estudo da variação genética de importância clínica. A genética médica pode ser subdividida ainda em cinco grupos, sendo dois campos primordialmente clínicos (genética clínica e aconselhamento genético) e três sendo ciências laboratoriais (citogenética, genética molecular e genética bioquímica).

Descobertas fundamentais no campo da medicina podem ser atribuídas à genética. A pesquisa, incluindo a informação obtida com o Projeto Genoma Humano (conforme descrito no Cap. 76), continua a identificar novos genes e mutações diretamente relacionadas com doenças. O conhecimento da causa subjacente de uma doença dá novas oportunidades de diagnóstico e abre a possibilidade da terapia gênica e a probabilidade de curar algumas doenças genéticas no futuro. Atualmente, há uma demanda crescente por meios de usar tal informação em benefício dos pacientes, o que levou ao surgimento de novas técnicas laboratoriais na genética molecular e na citogenética, que estão aprimorando os métodos de diagnóstico e tratamento. Neste capítulo, enfatiza-se principalmente a citogenética, enquanto a discussão da genética molecular pode ser encontrada no Capítulo 72.

Definições

Como em todas as áreas da medicina, a genética baseia-se no uso apropriado de termos específicos para a comunicação. As seguintes definições fornecem um vocabulário básico desse campo.

Gene: uma sequência de nucleotídeos que representa uma unidade funcional de hereditariedade; uma região do DNA que codifica um produto, seja RNA ou proteína.

Cromossomo: uma estrutura altamente ordenada, composta por DNA e proteínas que carregam a informação genética. Os seres humanos possuem 46 cromossomos ordenados em pares.

Autossomo: todos os cromossomos exceto X e Y, designados *cromossomos sexuais*.

Cromossomos homólogos: cromossomos irmãos, os membros de um par de cromossomos em que um é herdado da mãe e outro, do pai.

Locus: a posição de um gene em um cromossomo.

Alelo: uma forma alternativa de um gene ocupar o mesmo *locus*. Um alelo pode ser o resultado de uma mutação. Há um máximo de dois alelos por complemento diploide de cromossomo (um alelo por cromossomo), mas pode haver múltiplos alelos em uma população.

Mutação: uma alteração permanente herdada na sequência do DNA genômico, que pode manifestar-se tanto no nível genético quanto molecular. Nem todas as mutações são eventos negativos; muitas são benignas (p. ex., a cor azul dos olhos) e algumas têm efeitos positivos (p. ex., o traço falciforme em países onde o risco de malária é alto). Os indivíduos com uma *mutação constitutiva* (i. e., uma mutação presente em cada célula do corpo) podem transmiti-la para sua progênie mediante a transmissão da linhagem germinativa. Em alguns casos, notavelmente no câncer, pode surgir uma *mutação adquirida* em uma única célula somática, que então divide-se por mitose e dá origem a um novo clone de células. A mutação será limitada a esse clone e não será transmitida para a progênie do indivíduo. Em raras circunstâncias de *mosaicismo gonadal*, uma mutação adquirida *de novo* pode surgir nas gônadas, resultando em uma população mista de gametas normais e mutantes. A progênie que recebe a nova mutação pode exibir um fenótipo que não está presente em qualquer um dos pais.

Cariótipo: a constituição do cromossomo de um indivíduo.

Cariograma: esquema que mostra os pares de cromossomos de uma célula dispostos em uma sequência padrão.

Diploide: a presença de duas cópias de cada cromossomo único por célula. Nos seres humanos, os cromossomos ocorrem em pares e o número diploide (2N) é 46.

Haploide: uma cópia de cada cromossomo único. Nos seres humanos os gametas são haploides (N = 23).

Homozigose: quando ambos os alelos em um *locus* são os mesmos. (No sistema ABO, um complemento AA representa homozigosidade.)

Heterozigoto: quando os dois alelos em um *locus* são diferentes. (No sistema ABO, um complemento AO representa heterozigosidade.)

Hemizigoto: a presença de apenas um cromossomo ou segmento de cromossomo, em vez dos dois habituais; aplica-se a indivíduos do sexo masculino com um único cromossomo X.

Genótipo: a constituição genética de um indivíduo ou organismo (i. e., quais alelos estão presentes). (No sistema ABO, AA, AO, BB, BO, AB e OO são genótipos.)

Fenótipo: o aspecto de um indivíduo que resulta da interação do ambiente com o genótipo. (No sistema ABO, os tipos sanguíneos A, B e O representam a expressão fenotípica dos alelos de determinado indivíduo.)

Alelo dominante: aquele que se expressa quando presente em apenas uma única dose (i. e., ele "domina" o outro alelo presente). (No sistema ABO, A é dominante sobre O, de maneira que um genótipo AO resulta em um fenótipo do tipo sanguíneo A. Da mesma forma, a presença de pigmento [T] é dominante quanto à ausência de pigmento [t] [i. e., albinismo], de modo que Tt resulta em pigmentação.)

Alelo recessivo: em um organismo diploide, um alelo que só se expressa quando em homozigose. (No sistema ABO, o grupo sanguíneo O só é visto com um genótipo OO; O é recessivo com relação a A e B. Similarmente, o albinismo [t] é recessivo com relação à pigmentação [T] e um fenótipo albino só ocorre com um genótipo tt.)

Alelos codominantes: em um organismo diploide, alelos que não exibem dominância ou recessividade em relação um com o outro, porém, quando presentes juntos, ambos expressam-se completamente. (No sistema ABO, A e B são codominantes, de modo que um genótipo AB expressa tanto o antígeno A como o antígeno B.)

Distribuição independente: a distribuição aleatória de cromossomos (paternos e maternos) nos gametas; a chance de 50:50 de herdar determinado cromossomo de um dos pais.

Ligação (*linkage*): a presença de dois ou mais genes no mesmo cromossomo que tendem a ser herdados juntos.

Crossing over: a troca física de material genético entre cromossomos homólogos.

Recombinação: a geração de novas combinações alélicas nos cromossomos, em geral por *crossing over*.

Mitose: divisão celular somática em que o DNA se replica e distribui-se uniformemente para duas células-filhas iguais.

Meiose: divisão celular nas gônadas que produz os gametas. Uma única replicação do DNA é seguida por duas divisões celulares que reduzem o conteúdo total do DNA de uma célula de 2N para N. Ocorre recombinação para aumentar a diversidade genética em uma população.

Não disjunção: falha na separação de cromossomos ou cromátides para polos opostos na divisão celular. Em geral, resulta em muitos ou poucos cromossomos em uma célula.

Citogenética

Define-se citogenética como a ciência que combina os métodos e achados da citologia e da genética para permitir a investigação da hereditariedade no nível celular – que abrange a avaliação cuidadosa dos cromossomos, estruturas compostas de uma fita dupla de DNA em complexo com proteínas histonas e não histonas. Os cromossomos foram observados pela primeira vez em células tumorais por Walther Fleming, em 1882, apenas 16 anos após Mendel ter estabelecido a genética como um novo campo científico, tornando a citogenética um dos campos mais antigos da genética. Logo após a virada do século, a importância dos cromossomos sexuais foi estabelecida e, em 1959, estudos citogenéticos foram utilizados pela primeira vez no laboratório clínico. A capacidade de detectar alterações na estrutura de um cromossomo e correlacioná-las diretamente a doenças e anomalias fenotípicas nos indivíduos provou ser um grande avanço no diagnóstico clínico. Com os anos, o número e os tipos de estudo aumentaram, com muitos dos testes realizados tendo se tornado o padrão do diagnóstico. No mundo atual, com um número cada vez maior de genes causadores de doenças sendo clonados, há uma ênfase crescente no desenvolvimento de análises diretas de mutação molecular (ver Cap. 72). Esses estudos funcionam bem quando se tem um diagnóstico ou uma suspeita dele, mas, na ausência de um distúrbio conhecido, a citogenética ainda mantém sua posição como o único teste de laboratório capaz de pesquisar a constituição genética de um indivíduo mediante um único ensaio. Consequentemente, as aplicações clínicas da análise citogenética podem ser encontradas em todos os grupos etários e variam do diagnóstico pré-natal à avaliação de câncer.

Cromossomos

Para reconhecer anormalidades, primeiro é importante entender o que compreende um conjunto "normal" de cromossomos. O complemento cromossômico humano inclui 46 cromossomos ordenados em 23 pares (Fig. 69.1). Um membro de cada par é herdado da mãe e outro, do pai do indivíduo; 22 pares são conhecidos como autossomos e parecem homólogos entre si (i. e., são indistinguíveis um do outro). O 23º par inclui os cromossomos sexuais, homólogos no sexo feminino (que tem dois cromossomos X), e não homólogos (estruturalmente diferentes) no masculino (que tem um cromossomo X e um Y) (Fig. 69.1). Os genes estão codificados no DNA e dispostos ao longo do comprimento dos cromossomos. Durante o ciclo celular, o comprimento absoluto dos cromossomos varia, porém, a forma mais condensada é alcançada na metáfase, momento em que os cromossomos podem ser observados com maior facilidade. Por esse motivo, os cromossomos em metáfase são a base da maioria dos estudos citogenéticos.

Estrutura dos cromossomos

Um cromossomo em metáfase é composto por duas hélices duplas de DNA, cada uma delas denominada *cromátide*, e as duas sendo mantidas juntas por uma região ainda não replicada do DNA, conhecida como *centrômero* ou constrição primária. Além de sua função na divisão celular, o centrômero age como uma demarcação e divide o cromossomo em duas regiões distintas, conhecidas como braços (Fig. 69.2A).

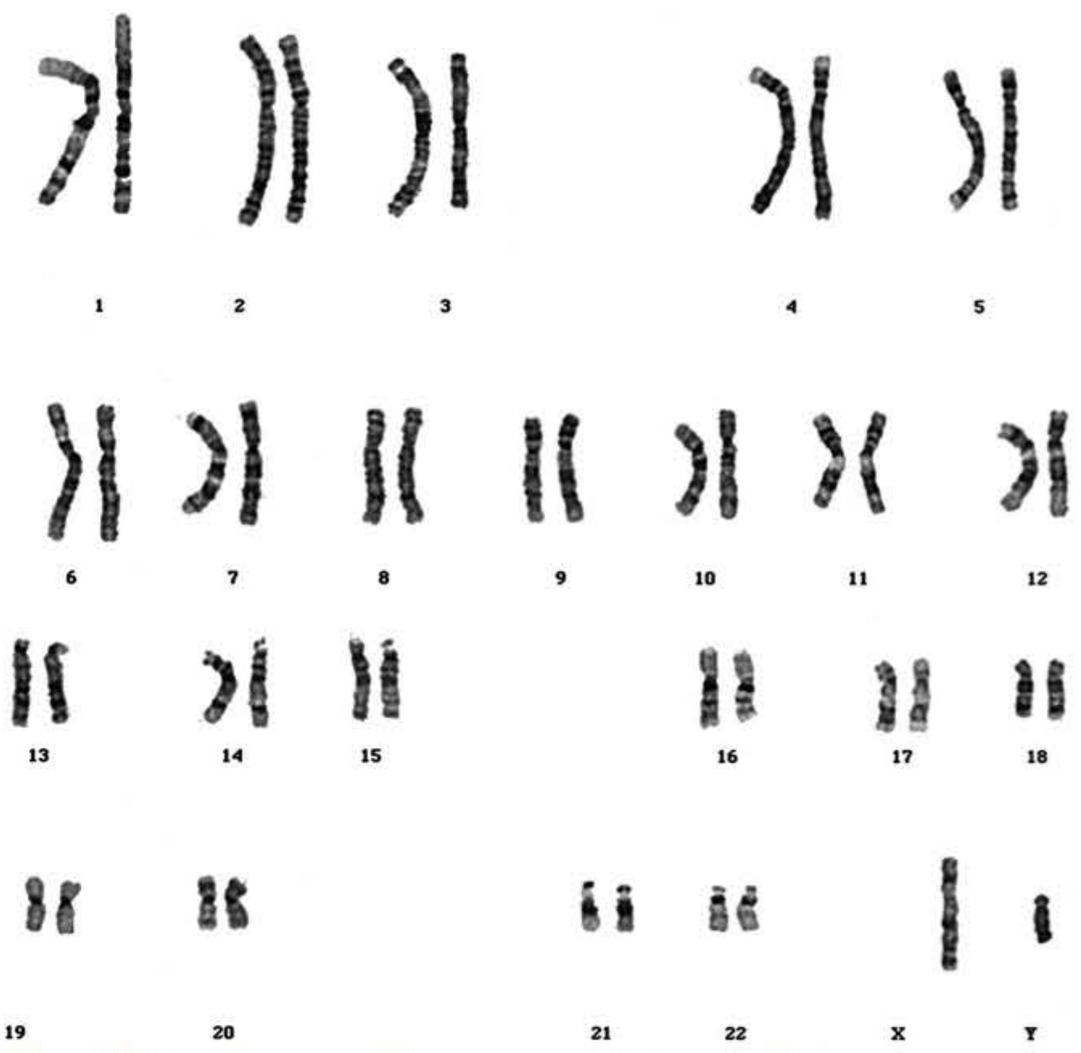


Figura 69.1 Cariótipo do complemento cromossômico masculino humano; o total de 46 cromossomos é ordenado em pares. Notar o par não homólogo de cromossomos sexuais, com um cromossomo X e um Y (embaixo, à direita).

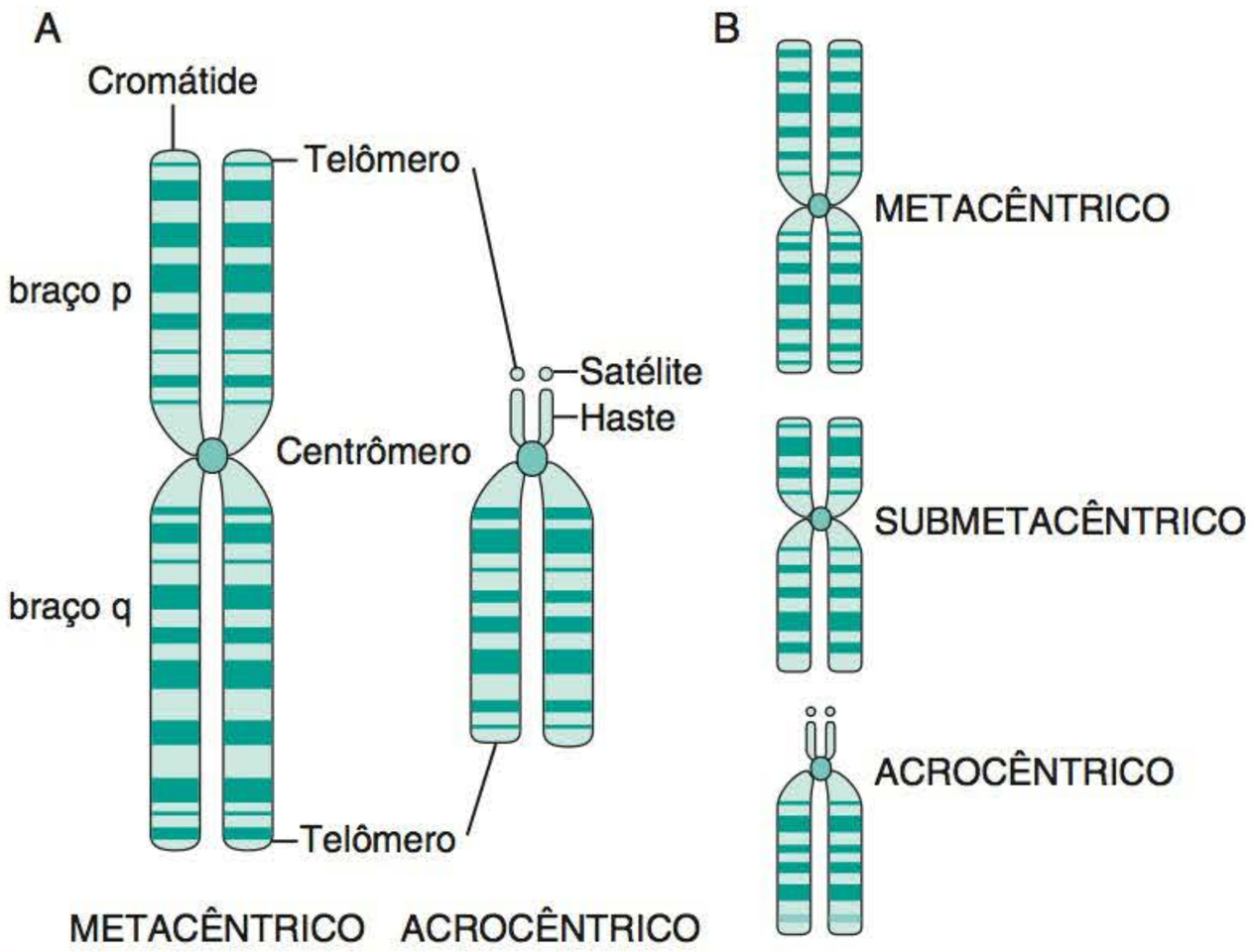


Figura 69.2 Estrutura do cromossomo. *A*, esquema da anatomia do cromossomo em metáfase, mostrando os principais marcos. Cada cromossomo é composto por duas cromátides mantidas unidas pelo centrômero. O telômero é a estrutura terminal do cromossomo. Uma forma metacêntrica típica é contrastada com uma acrocêntrica que tem na estrutura um braço curto modificado, composto de hastes e satélites. Em todos os casos, o braço mais curto, ou p, está orientado para cima e o mais longo, ou q, para baixo. *B*, a posição relativa do centrômero pode variar, resultando em cromossomos metacêntricos (centrômero perto do meio), submetacêntricos (mais perto de uma extremidade) e acrocêntricos (braço curto modificado).

O braço mais curto é designado p e o mais longo é conhecido como q. Quando o centrômero está aproximadamente equidistante de ambas as extremidades, diz-se que o cromossomo é metacêntrico, mas, se estiver mais próximo de uma extremidade que de outra, o cromossomo então é submetacêntrico (Fig. 69.2B). Cinco pares de cromossomos acrocêntricos têm braços curtos modificados, com hastes contendo apenas múltiplas cópias de RNAr gênico encobertas por um telômero modificado denominado *satélite* (Fig. 69.2A).

A extremidade de um cromossomo é o *telômero*. Sabe-se que tais regiões são compostas por DNA repetido em série (fileiras) com a sequência (TTAGGG)n, cuja função é estabilizar os cromossomos. A mecânica da replicação do DNA é tal que nem todo o DNA do telômero pode ser replicado em cada divisão, de maneira que há um encurtamento dos telômeros com o tempo. Foi levantada a hipótese de que a perda total dos telômeros leva a um aumento nas aberrações cromossômicas, o que pode, em parte, ser responsável pelo processo de envelhecimento humano (Harley, 1990; Wright, 1992; de Lange, 1998).

Cultura celular

Para a obtenção de células em metáfase para análise cromossômica, é preciso cultivar células do paciente *in vitro*. A célula humana média divide-se uma vez a cada 24 horas, de modo que apenas 1% da população celular está em divisão em qualquer momento determinado. No entanto, algumas células, como os linfócitos em um indivíduo normal saudável, não se dividem totalmente. Por isso, foram desenvolvidas técnicas especiais para estimular as células a se dividirem e aumentar a produção de células em metáfase.

Amostras

Praticamente qualquer amostra de células nucleadas viáveis pode ser usada para análise citogenética. Entretanto, é mais fácil obter e cultivar certos tipos de células, razão pela qual são preferíveis para preparações cromossômicas. Para estudos citogenéticos rotineiros, de adultos e crianças, sangue periférico heparinizado é a amostra preferida. A obtenção de uma amostra por meio de flebotomia padrão em geral é fácil e relativamente indolor para o paciente. No caso de distúrbios hematológicos, são obtidos os melhores resultados com amostras da medula óssea, pois esse é o local de origem da doença. Culturas de fibroblastos de biópsias ou punções cutâneas são uma fonte adequada de células em metáfase. Tecidos como o fígado, rins, pulmões e músculos não são usados rotineiramente por causa da natureza invasiva da obtenção de tais amostras. No entanto, esses tecidos com frequência constituem uma fonte excelente, desde que as amostras sejam obtidas logo após a morte, durante necropsia, ou de um feto abortado. Amostras de produto da concepção podem conter uma mistura de tecido materno e fetal, requerendo, assim, cuidado extra ao se estabelecer uma cultura (De Martinville, 1984).

A amostra mais comum para análise pré-natal é o líquido amniótico colhido por amniocentese. O procedimento é realizado sob orientação de ultrassonografia, para que o feto não seja atingido à medida que o médico passa uma agulha através do abdome e do útero da mãe até o saco amniótico. Isso é feito tipicamente entre 16 e 18 semanas de gestação, momento em que é possível retirar de 20 a 30 mL de líquido amniótico (urina fetal) sem prejudicar o feto. As células presentes na amostra são derivadas do feto e representam uma fonte de material para citogenética, genética molecular e ensaios bioquímicos. O próprio líquido contém α-fetoproteína (AFP), bem como outras proteínas e enzimas, e forma o substrato para outros ensaios pré-natais. O risco de perda fetal devida à amniocentese é de aproximadamente 0,5%.

Outro procedimento pré-natal é a obtenção de amostras de vilosidades coriônicas, que fornecem tecido da placenta em desenvolvimento (Blakemore, 1988; Rhoads, 1989). O procedimento é feito por via transabdominal ou transvaginal, com 10 a 14 semanas de gestação e risco de perda fetal aproximado de 1%. Como não é colhido líquido amniótico, não pode ser feito qualquer teste para AFP ou relacionado, embora sejam possíveis análises citogenéticas, bioquímicas e moleculares consideradas padrão.

A cordocentese ou obtenção percutânea de sangue umbilical resulta em uma amostra de sangue fetal que pode ser usada para estudos rápidos de cariotipagem ou moleculares. Esse procedimento é feito em idades gestacionais mais tardias (≥ 20 semanas) e implica alto risco de perda fetal (2–5%).

Todas as amostras clínicas para análise citogenética precisam ser colhidas da maneira mais estéril possível. A presença de bactérias ou fungos compromete seriamente o estudo, pois células procarióticas em geral competem com quaisquer células humanas presentes e se proliferam. Para maximizar o número de células viáveis, as amostras devem ser levadas para o laboratório o mais cedo possível após a coleta. Sangue, medula óssea, líquido amniótico e vilosidades coriônicas devem ser mantidos à temperatura ambiente, enquanto tecido sólido é transportado em gelo úmido. A diferença na temperatura de transporte deve-se às condições nativas da amostra. Células do sangue, da medula óssea e do líquido amniótico ocorrem como células individuais em um substrato líquido, e a integridade da amostra não será comprometida se mantida à temperatura próxima daquela do corpo. Contudo, a coleta de tecido requer a retirada de células do corpo por excisão, deixando células rompidas e mortas na periferia da amostra. A liberação de enzimas lisossômicas facilita a degradação das células mortas e leva ao ataque às células vivas adjacentes nas condições adequadas. Se a temperatura cair para perto de 4°C, a atividade enzimática será inibida e a viabilidade da amostra será mantida.

Técnica de cultura celular

Dependendo do tipo de célula, pode-se empregar uma técnica de cultura em suspensão (flutuante) ou monocamada (fixa a uma superfície). Células do sangue e da medula óssea crescem em suspensão, sendo fácil obter alíquotas para inoculação nos meios de cultura apropriados. A medula óssea é cultivada por 24 a 48 horas, enquanto linfócitos requerem 3 a 4 dias em cultura para produtividade máxima. Além disso, como os linfócitos normalmente não se dividem em cultura, sua divisão precisa ser induzida usando-se um mitógeno, em geral fito-hemaglutinina, e então as células resultantes em metáfase podem ser colhidas mediante o emprego de um inibidor mitótico como a colcemida. As células do líquido amniótico, das vilosidades coriônicas e de tecidos sólidos crescem como uma monocamada *in situ*. Tecido e vilosidades coriônicas são primeiramente desagregados mediante tratamento leve com colagenase, e então as células individuais são semeadas em lamínulas de vidro e cobertas com meio de cultura. Em uma amostra de líquido amniótico, as células têm de ser separadas do líquido por centrifugação antes de serem colocadas em placas, deixando-se que formem colônias *in situ*. O tempo típico para cultura é de 5 a 10 dias no caso de vilosidades coriônicas e amniócitos, e até 2 semanas para cultura de tecido sólido.

Assim que o crescimento máximo tiver sido alcançado, todos os tipos celulares são coletados com técnicas semelhantes. As células são intumescidas hipotonicamente (ao ponto de a membrana celular esticar sem romper-se) e então fixadas. Um leve sopro sobre a lamínula que contém células de culturas *in situ* fixadas é suficiente para que ocorra ruptura das membranas celulares e haja disseminação dos cromossomos em metáfase. Embora a maioria dos laboratórios ainda realize essas etapas manualmente, foi desenvolvido um coletor robótico automático que pode processar grande número de culturas com bastante eficiência. No caso de culturas em suspensão, as células fixadas precisam ser gotejadas em uma lâmina de microscopia limpa, o que rompe mecanicamente as membranas e deixa os cromossomos levemente separados, mas em uma região distinta ocupada por uma única célula (Fig. 69.3). Depois de secarem ao ar, as lâminas estão prontas para serem coradas. Em alguns casos, o envelhecimento artificial das células a 65°C por 30 a 60 minutos melhora a qualidade da coloração.

Figura 69.3 Cromossomo espalhado em metáfase. Cromossomos de uma única célula, conforme vistos em uma lâmina de microscopia.

Coloração

A coloração de rotina para cromossomos é feita por coloração de Giemsa ou de Wright, cujas cargas positivas se ligam às moléculas de DNA com carga negativa. A tripsinização leve dos cromossomos antes da coloração aparentemente enfraquece as interações entre DNA e proteína, resultando em um padrão definido de regiões claras e escuras alternadas após a aplicação do corante. Isso é denominado padrão de bandeamento (bandeamento G ou padrão de bandas determinado por coloração de Giemsa) (Yunis, 1973; Burkholder, 1977; Holmquist, 1982). Cada par de cromossomo tem um padrão de bandeamento único, representado de forma esquemática como um ideograma (ISCN, 2005) (Fig. 69.4), que é usado para identificar cada cromossomo e sub-regiões cromossômicas.

Embora o bandeamento G seja adequado para a maioria das situações, é possível obter informação adicional com outras técnicas especiais de coloração. Os corantes especiais mais comuns incluem os bandeamentos Q, C e R. O bandeamento Q, ou fluorescência da quinacrina, foi usado originalmente para cariotipagem de rotina (Comings, 1975). No entanto, como a fluorescência é transitória, foi agora substituída pelo bandeamento G, que fornece uma preparação que fica corada permanentemente (Sumner, 1973). A principal aplicação atual do bandeamento Q é para a identificação rápida do cromossomo Y. A extremidade distal do braço longo do cromossomo Y é composta de heterocromatina e é a região mais brilhantemente fluorescente na metáfase humana (Fig. 69.5A). Nos casos de genitália ambígua, uma preparação rápida para bandeamento Q, em geral, pode levantar a questão da presença ou ausência de um cromossomo Y no paciente. O bandeamento C, bandeamento constitutivo ou do centrômero, é usado para avaliar-se a heterocromatina constitutiva ou determinar se um cromossomo tem dois centrômeros (é dicêntrico). Normalmente, um centrômero aparece como um único ponto escuro em um cromossomo todo corado de forma pálida (Holmquist, 1979). No caso de um cromossomo dicêntrico, a presença de duas regiões escuras identifica com clareza os dois centrômeros (Fig. 69.5B). O bandeamento R, ou bandeamento reverso, resulta em cromossomos com o mesmo padrão de bandeamento observado no G, mas as bandas clara e escura estão invertidas, daí a denominação. Como os telômeros dos cromossomos tendem a ser bandas pequenas coradas em claro, pode não ser fácil detectar uma deleção com o bandeamento G padrão. Contudo, no bandeamento R, os telômeros devem aparecer como bandas escuras e, assim, sua ausência como resultado de uma deleção é mais óbvia.

Análise do cariótipo

Para se fazer uma análise citogenética (cariótipo), é essencial ser capaz de identificar rapidamente e com acurácia cada cromossomo e determinar quando há anormalidades cromossômicas. A primeira etapa é contar o número de cromossomos presentes na célula que está sendo avaliada. O número de centrômeros ativos define o número total de cromossomos e irá totalizar 46 em uma célula humana diploide normal. A presença de muitos ou poucos cromossomos indica uma anormalidade numérica potencial. A cultura *in vitro* pode resultar em artefatos, de modo que nenhuma célula é usada para definir o complemento cromossômico de um paciente. Portanto, um estudo clínico típico requer a análise de 15 a 20 células. Nos casos de mosaicismo ou outras situações especiais, podem ser avaliadas mais 10 a 30 células.

Cromossomos individuais são identificados com base no tamanho global de cada um deles, na posição de seu centrômero e no padrão de bandeamento. Qualquer variação na estrutura do cromossomo deve ser detectada nesse momento. Na maioria das circunstâncias, o bandeamento G rotineiro de cromossomos em metáfase é suficiente para propósitos de diagnóstico clínico. Entretanto, alguns distúrbios estão associados a deleções muito pequenas de material cromossômico, que podem não ser resolvidas nesse nível, daí o emprego da análise em alta resolução. São empregadas condições de cultura especiais, e as células são colhidas em um estágio um pouco mais precoce da divisão celular, a pró-metáfase. Nesse ponto do ciclo celular, os cromossomos estão menos condensados e são fisicamente maiores, o que facilita a detecção de pequenas anormalidades.

A análise é feita por um técnico que examina as células ao microscópio e, uma vez completado esse exame, determina se o complemento cromossômico é "normal" ou "anormal". Para documenta-

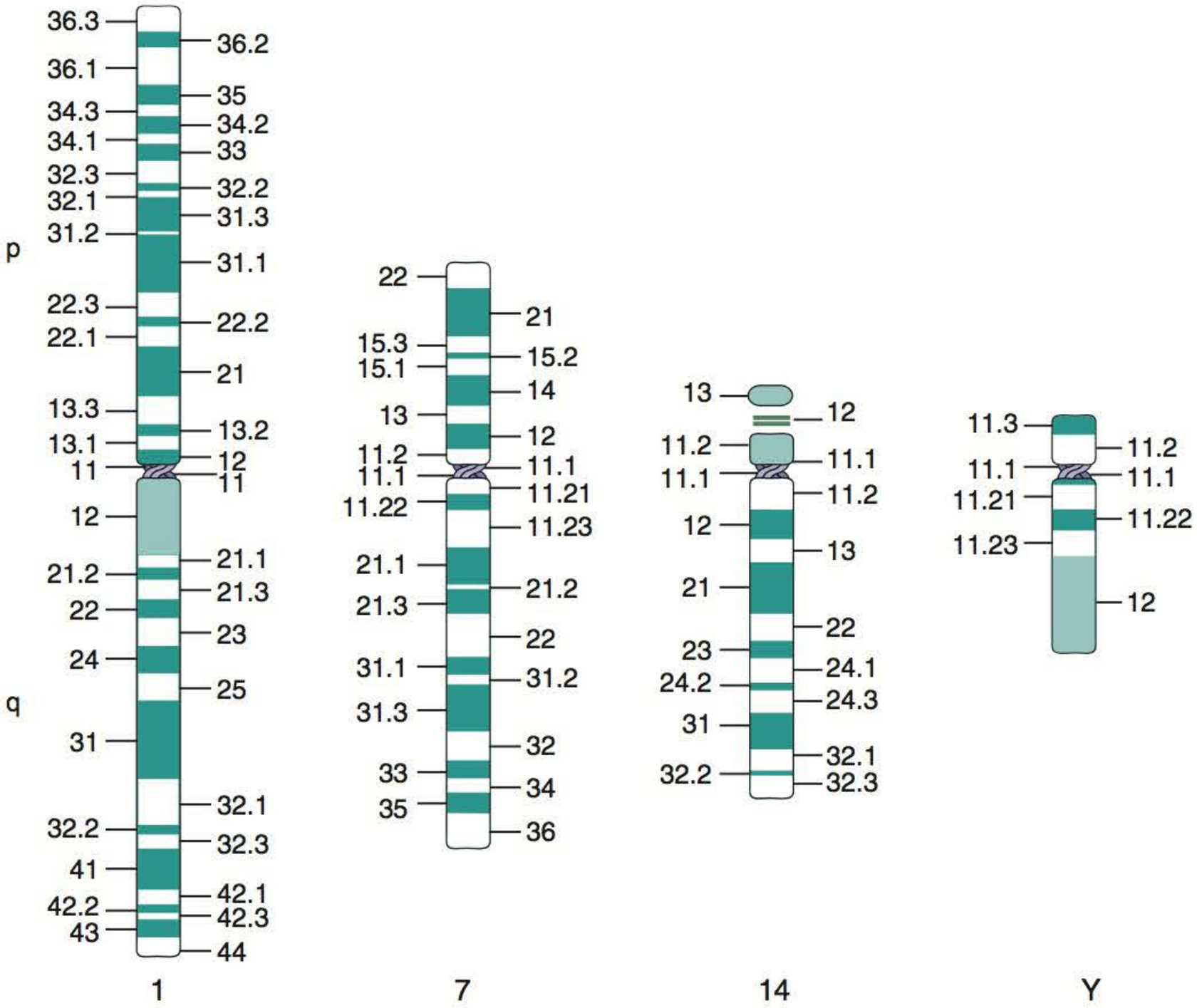


Figura 69.4 Exemplos de ideogramas para os cromossomos 1, 7, 14 e Y mostrando o padrão esperado de alternância de bandas claras e escuras.

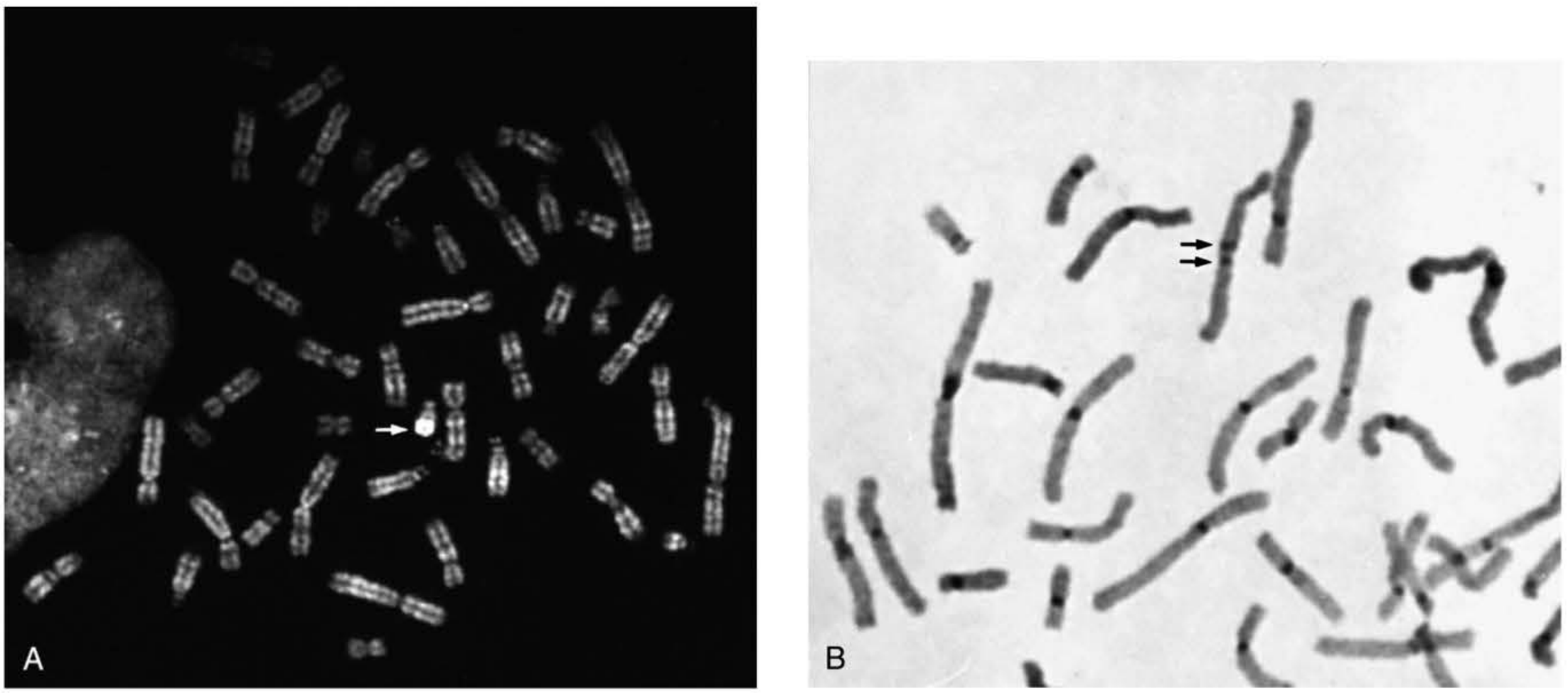


Figura 69.5 *A*, metáfase na banda Q mostrando fluorescência brilhante do cromossomo Y (seta). *B*, cromossomos na banda C mostrando os centrômeros corados em escuro. Um cromossomo dicêntrico foi detectado com duas bandas escuras (duas setas).

ção, são capturadas células em metáfase representativas e preparados cariogramas (ilustrações dos cromossomos de uma célula, Fig. 69.1). Tradicionalmente, essa captura tem sido feita por meio de fotografias com uma câmera de 35 mm montada no microscópio. O filme é então revelado e são feitas cópias fotográficas. Os cromossomos podem ser recortados e colados em uma folha de papel. Os pares homólogos são dispostos do maior para o menor, colocando-se o par de cromossomos sexuais em separado. Por convenção, o braço mais curto (p) é orientado para cima e o mais longo (q), para baixo.

Imagem assistida por computador

Atualmente, a maioria dos laboratórios de citogenética passou a usar a imagem computadorizada. Embora a imagem nas fotos impressas seja de alta resolução, a técnica requer muito tempo e esforço. Agora é possível montar uma câmera de vídeo acoplada a um dispositivo de carga (CCD, *charge-coupled device*) no microscópio, no lugar da câmera de 35 mm. Com o *software* especialmente designado, consegue-se capturar uma imagem digitalizada da célula em metáfase e exibi-la no monitor do computador. Nesse ponto, o *software* permite

que se modifique a imagem, clareando-a, escurecendo-a ou mudando o contraste, sendo possível uma variedade de manipulações dos cromossomos, inclusive esticá-los e importar cromossomos de outros campos. Então, pode ser gerado um cariograma usando-se um padrão de reconhecimento sub-rotineiro que identificará automaticamente os cromossomos e os colocará nos seus locais adequados, na forma de um cariograma. Dependendo do *software* e da qualidade da imagem, a acurácia desse processo pode variar de 10 a 85%. Depois de melhorar ao máximo a imagem com o computador, o técnico em citogenética bem treinado consegue fazer as correções necessárias. Assim que os cromossomos tiverem sido colocados nas posições adequadas, é possível fazer aprimoramentos estéticos para eliminar bordas rasgadas ou defeitos de fundo. Imprime-se, então, a versão final do cariograma, usando-se uma impressora de alta resolução. Embora a qualidade geral não seja tão boa quanto a fotográfica, economiza-se muito tempo com o sistema computadorizado. Um cariograma de rotina, desde a captura da imagem, deve ser feito por um técnico treinado em 15 a 20 minutos em média. Outra grande vantagem desse sistema é na aplicação à microscopia de fluorescência.

Hibridização in situ *com fluorescência*

A coloração clássica para citogenética discutida anteriormente resulta dos corantes que se fixam ao DNA ou à proteína de um cromossomo e permitem a visualização à microscopia óptica. A hibridização *in situ*, uma combinação de tecnologias moleculares e citogenéticas, abriu outra porta que permitiu investigar mais as anomalias cromossômicas. Com ela, em vez de um corante, é uma sonda molecular (i. e., um fragmento de DNA) que se liga ao cromossomo. Nos primeiros estudos, a sonda era marcada com um composto radioativo (em geral trício), de maneira que, após 5 a 10 dias de exposição a um filme de raio X, um padrão de grãos de prata poderia ser detectado, identificando a localização cromossômica daquela sonda. Tal técnica facilitou o mapeamento de genes e a identificação de seus *loci* (Trask, 1991).

A autorradiografia foi útil, mas só se podia usar uma sonda de cada vez, o que acarretava muito tempo de exposição, e ainda havia um grau de dispersão dos grãos de prata que exigia a análise estatística dos dados obtidos. Em meados da década de 1980, foi desenvolvida uma variação da técnica que se mostrou extremamente útil para aplicações clínicas. A nova tecnologia, hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), é mais rápida, mais específica e permite o uso de múltiplas sondas em um único procedimento de hibridização. Além disso, em vez de sondas com marcação radioativa, usa-se um corante fluorescente que é visualizado à microscopia de fluorescência (Ledbetter, 1989).

Nas aplicações clínicas da FISH, o objetivo mais comum é determinar se um gene, uma mutação específica ou um rearranjo cromossômico em particular está presente, de modo que a(s) sonda(s) molecular(es) precisa(m) ser bem caracterizada(s) e específica(s) para o *locus* em questão. Existem três tipos básicos de sondas. As sondas para *pintura de cromossomo*, na verdade, são um coquetel de muitos fragmentos únicos de DNA ao longo do comprimento de um cromossomo, de modo que, após a hibridização, todo o cromossomo fluoresce (Fig. 69.6A). Sondas de *sequência repetida* são isoladas das regiões do centrômero. As sondas de centrômero, em geral, são usadas na enumeração de cromossomos (i. e., para detectar o ganho ou a

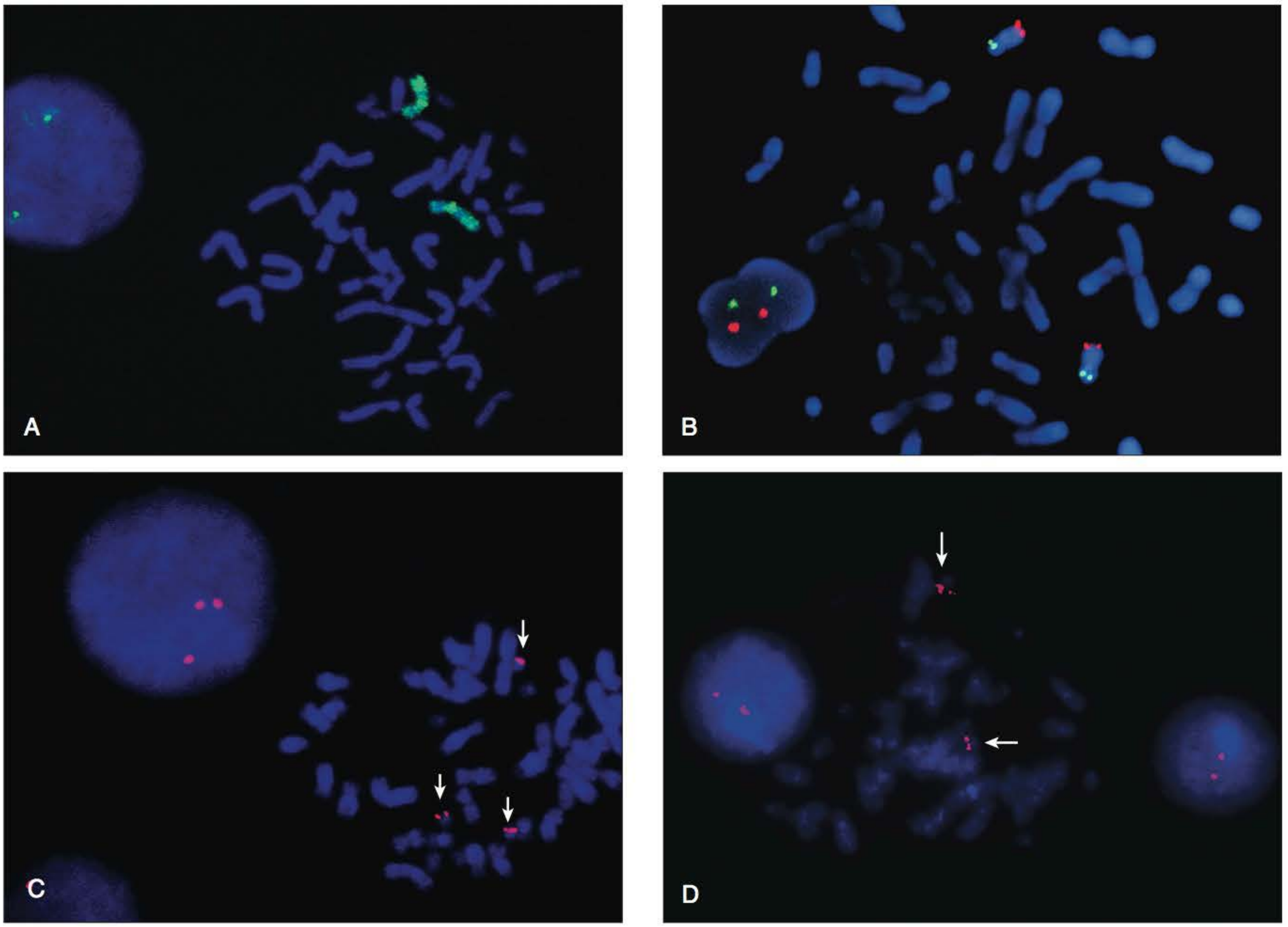


Figura 69.6 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). *A*, a sonda de todo o cromossomo pintado ressaltando os dois cromossomos X em uma célula feminina. *B*, cromossomos mostrando hibridização com sondas subteloméricas. O braço p ou curto subtelomérico está indicado pelos sinais verdes e o braço q ou longo subtelomérico está indicado pelos sinais vermelhos. Os sinais pareados vermelho e verde são vistos no núcleo em interfase à esquerda. *C* e *D*, sequência repetida da sonda de centrômero para o cromossomo 21. *C*, trissomia do 21 vista à esquerda em um núcleo em interfase e à direita em um núcleo na metáfase (setas). *D*, complemento normal de duas cópias do cromossomo 21 (setas), vistas na interfase (à esquerda e à direita) e na metáfase (no centro).

perda de cromossomos específicos) (Fig. 69.6C e D) (Lichter, 1990). Uma sonda verdadeira de telômero reconhece as seis bases repetidas presentes nas extremidades de todos os cromossomos e confirmará a presença ou ausência das regiões teloméricas. Uma sonda de sequência única, em geral, é isolada do DNA clonado de um gene causador de doença ou de um fragmento de DNA de localização conhecida associada a um gene particular. Usa-se esse tipo de sonda para identificar a presença ou ausência do gene, da região gênica ou um rearranjo cromossômico de interesse (Cherif, 1989; Lindsay, 1993). Sondas *subteloméricas* são um subconjunto dessa categoria. A pesquisa revelou que há sequências únicas proximais ao telômero de cada braço do cromossomo, que podem ser usadas para a identificação específica de cada braço. As sondas subteloméricas criadas tornaram-se muito valiosas para caracterizar rearranjos crípticos, ao determinarem se todos os subtelômeros estão presentes e localizados nos braços corretos do cromossomo e, se não, se ocorreu um rearranjo (Fig. 69.6B). Além disso, mostrou-se que 3 a 5% dos pacientes com retardamento mental inexplicado tinham uma deleção terminal não detectável citogeneticamente de um cromossomo (Flint, 1995, 2003; Rosenberg, 2001). A FISH subtelomérica agora permite a identificação de tais deleções e sua localização no cromossomo afetado (National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration, 1996; Irons, 2003).

Técnica

A FISH pode ser realizada em células na metáfase ou na interfase. Para a FISH na metáfase, as células são cultivadas e colhidas como para a análise rotineira do cariótipo, mas não é necessária cultura para a FISH na interfase. Células fixadas são colhidas, preparando-se lâminas como descrito anteriormente para cariotipagem. O DNA nas lâminas é então desnaturado e deixa-se uma sonda molecular de fita única marcada com um corante fluorescente hibridizar o DNA cromossômico sob uma temperatura amena, que favoreça a hibridização de regiões homólogas do DNA (Fig. 69.7A). Após um período apropriado de hibridização, o excesso da sonda é lavado e o DNA não hibridizado é corado com um contracorante que contenha outro fluorocromo, para permitir a visualização de todo o complemento do cromossomo. Um microscópio de fluorescência com lâmpada de mercúrio de 100 W, em combinação com conjuntos apropriados de filtros excitadores, permite avaliar as células. Devido às limitações ópticas dos filtros de vidro, um máximo de três cores pode ser visualizado em um microscópio típico de fluorescência. Para documentação, pode-se usar uma câmera de 35 mm adaptada ao microscópio, embora sejam obtidos resultados superiores com um sistema computadorizado para adquirir imagens fluorescentes. Um *software* apropriado também melhora sinais fracos e a nitidez da imagem.

Um dos elementos mais críticos na FISH é a seleção de uma ou mais sondas específicas que ajudem a esclarecer o problema clínico. Por exemplo, uma das aplicações mais úteis da FISH é a detecção de microdeleções pequenas demais para serem vistas quando se usa a citogenética clássica (Fig. 69.7B a D). O gene precisa ser conhecido e a sonda usada tem de ser homóloga da região crítica do gene que em geral é deletada. A hibridização com a sonda deve resultar em um sinal fluorescente apenas no *locus* alvo. Se um sinal estiver presente, o DNA complementar da sonda estará presente, de modo que não há deleção (Fig. 69.7B). No entanto, a ausência de sinal indica que há deleção (i. e., não há sequência de DNA presente no

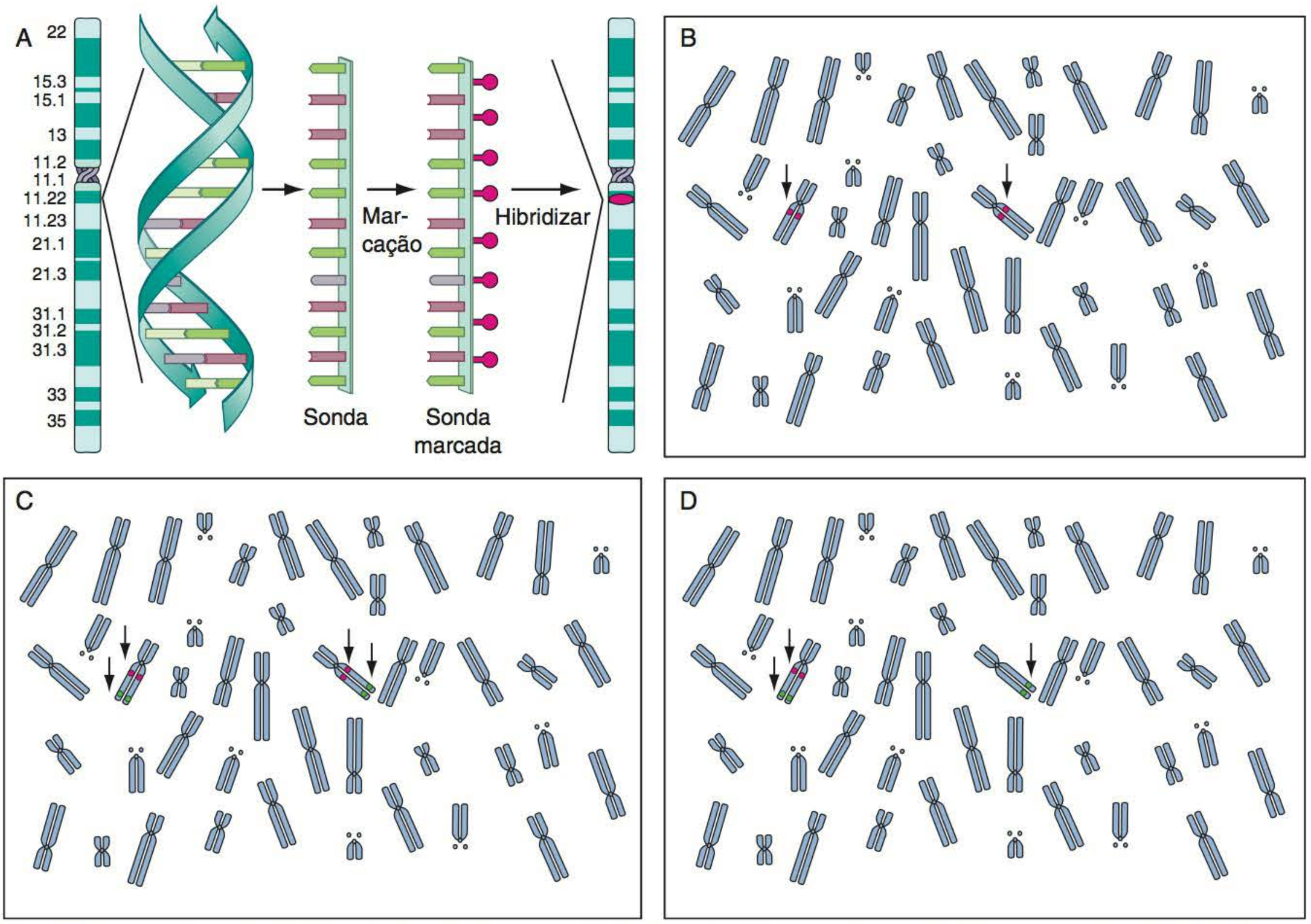


Figura 69.7 *A*, esquema da tecnologia FISH. O DNA derivado de um gene conhecido fica com fita única, marcada com um sinal fluorescente, e então é hibridizado de volta para os cromossomos de uma célula em metáfase. *B* a *D*, uma célula em metáfase com 46 cromossomos que foi processada pela tecnologia FISH. As sondas marcadas hibridizaram os alvos indicados pelas setas. *B*, sinais duplos indicando hibridização de ambos os alelos do gene alvo. *C*, gene alvo indicado pelo sinal vermelho e uma sonda de controle indicada em verde. Hibridização completa em todos os alelos. *D*, hibridização de ambos os controles (verde), mas presença de apenas um único gene alvo indicando deleção de um alelo.

cromossomo que é complementar à sonda, de modo que não pode ocorrer hibridização) (Fig. 69.7D). Em geral, usa-se uma sonda de controle para uma região diferente do cromossomo que está sendo testado como um controle de hibridização (Fig. 69.7C). Um indivíduo não acometido deve ter dois sinais por célula para cada gene autossômico, um sinal para cada cromossomo do par (Fig. 69.8A). Um indivíduo acometido com uma deleção deve ter um único sinal por célula, mostrando um cromossomo normal e um deletado (Fig. 69.8B). A sonda de controle deve mostrar dois sinais por célula em todas as células pontuadas. Em uma célula na metáfase, os cromossomos podem ser curtos e estar condensados, com cada cromátide individualmente visível, resultando em um sinal de FISH discreto em cada cromátide. Nessas células, pode parecer que há dois sinais por cromossomo para um total de quatro sinais, mas, na pontuação real, são considerados apenas cromossomos completos, de modo que um sinal em uma ou ambas as cromátides seria contado como apenas um sinal positivo.

Um dos problemas com esse sistema de detecção é que a falta de sinal é uma indicação positiva de uma deleção. A falha técnica de hibridização também pode resultar na ausência de sinal. Para eliminar isso como uma fonte de erro, é preciso avaliar um mínimo de 20 células e todas têm de ter o mesmo sinal. Caso se suspeite de mosaicismo, podem ser pesquisadas mais células. Além disso, atualmente são usadas sondas de sequência única em combinação com uma sonda de controle (Fig. 69.7C). A sonda secundária está localizada no mesmo braço do cromossomo que o *locus* de deleção. Ela pode ser marcada com o mesmo fluorocromo que o *locus* de deleção da sonda, mas descobriu-se que a interpretação dos resultados da hibridização é mais fácil se o sítio da sonda de controle for marcado com um fluorocromo de cor diferente. Em todas as células avaliadas, é preciso ver dois sinais claros de controle e então os sinais correspondentes para o *locus* da doença podem ser registrados. Isso fornece um controle da hibridização, bem como um marcador para o cromossomo de interesse (Fig. 69.7D). Caso se use um sistema duplo de cor, os resultados podem ser obtidos em células na interfase e na metáfase.

As sondas de coloração de cromossomo são mais úteis para identificar rearranjos complexos ou cromossomos marcadores. Se um paciente tem um cromossomo anormal com material extra de origem desconhecida, pode ser possível usar a pintura de cromossomo para identificar a fonte do DNA extra. Isso pode ajudar no diagnóstico ou no prognóstico do indivíduo. Por exemplo, no caso de um paciente com apenas um cromossomo X identificável e um pequeno cromossomo marcador não identificado, será importante determinar se a origem de um marcador é um cromossomo X ou Y. Isso pode ser conseguido usando-se pinturas para cromossomos para o X e o Y marcados com fluorocromos diferentes.

As sondas de FISH são mais informativas quando avaliadas em células na metáfase, em que é possível identificar o cromossomo específico que a sonda hibridiza. Todavia, em algumas preparações celulares, podem estar presentes muito poucas células em metáfase e, nesses casos, é possível obter informação com sondas de sequência única ou repetida nos núcleos na interfase. Aí, os problemas técnicos aumentam por causa da perda aleatória do sinal, de sinais extras e da sobreposição de sinais nas células, daí a necessidade de contar mais células (um total de 50–200) para obter-se um resultado que tenha significado estatístico.

Hibridização *in situ* com fluorescência multicolorida

Outra vantagem da FISH é a capacidade de hibridizar múltiplas sondas em uma única lâmina para uma compreensão melhor dos rearranjos cromossômicos (Schrock, 1996; Speicher, 1996). Para a maioria das sondas de FISH, o número máximo de cores é três (uma sequência alvo, outra de controle e uma contracoloração) e isso pode ser manipulado por um microscópio típico de fluorescência. No entanto, se forem necessárias mais de três cores, será preciso um sistema de imagem por computador, porque uma imagem fluorescente é o resultado da luz de mercúrio que passa através de um filtro excitador, batendo o fluorocromo na lâmina, e transmitindo uma imagem da cor apropriada para a ocular do microscópio. Cada fluorocromo requer seu próprio filtro, de maneira que, a cada cor adicional desejada, a luz precisa passar através de espessuras adicionais de vidro. As propriedades ópticas do vidro e da luz limitam o número total de cores visíveis a três. Entretanto, com um sistema de computador, a detecção de múltiplas cores torna-se possível. Na verdade, o computador não "vê" mais cores, mas pode detectar diferenças sutis nas sombras melhor do que o olho humano. Em um exame relativamente simples, dois fluorocromos são usados e misturados em proporções variáveis, para dar uma gama de cores. No exemplo da Figura 69.9A, um fluorocromo vermelho gera cores intermediárias do vermelho ao amarelo. São vistos oito sinais, mas, conforme visto através do microscópio, é impossível ter absoluta certeza de qual sinal corresponde a um cromossomo particular. Embora seja difícil para o olho humano distinguir, o computador pode registrar cada cor como uma sombra diferente de cinza e, então, o *software* assinala uma única cor para aquela sombra exibir no monitor. A Figura 69.9B mostra a versão final multicolorida, usando cores muito diferentes agora distinguíveis com facilidade, mas muito distintas da apresentação original (Fig. 69.9A). Usando a chave à esquerda, os seguintes cromossomos são detectados: dois de cada dos cromossomos 13, 21 e X; três cromossomos 18 e um cromossomo Y. Portanto, essa célula é trissômica para o cromossomo 18, com um complemento de cromossomo sexual XXY. Foram desenvolvidas combinações de fluorocromos que permitem a detecção de cada um dos 24 cromossomos diferentes seguidos por uma única cor assinalada pelo computador (Reid, 1992a, 1992b; Divane, 1994).

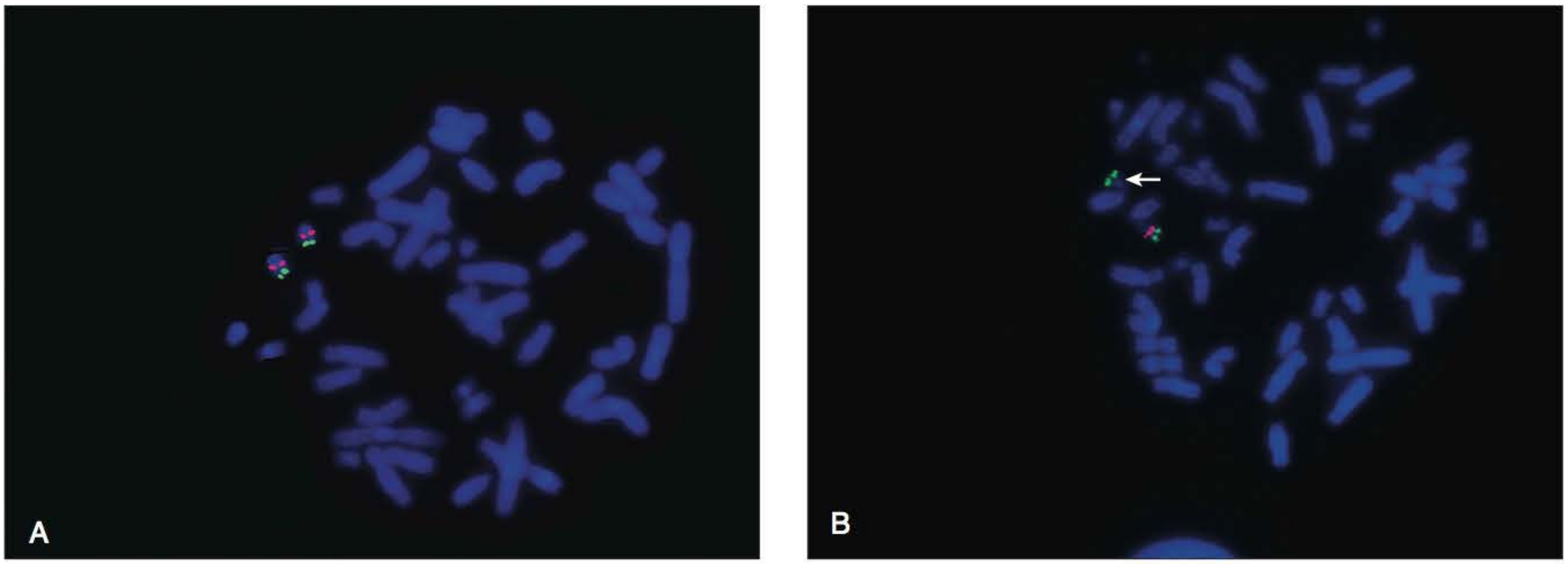


Figura 69.8 Detecção pela FISH de uma microdeleção do cromossomo 22 associada à síndrome velocardiofacial. *A*, indivíduo sem deleção, mostrando a presença de um sinal vermelho (*locus* do gene) e um verde (*locus* de controle) de cada cromossomo 22. *B*, paciente com uma deleção vista como um cromossomo com um único sinal verde (de controle). O cromossomo 22 homólogo é "normal", com um sinal vermelho e um verde.

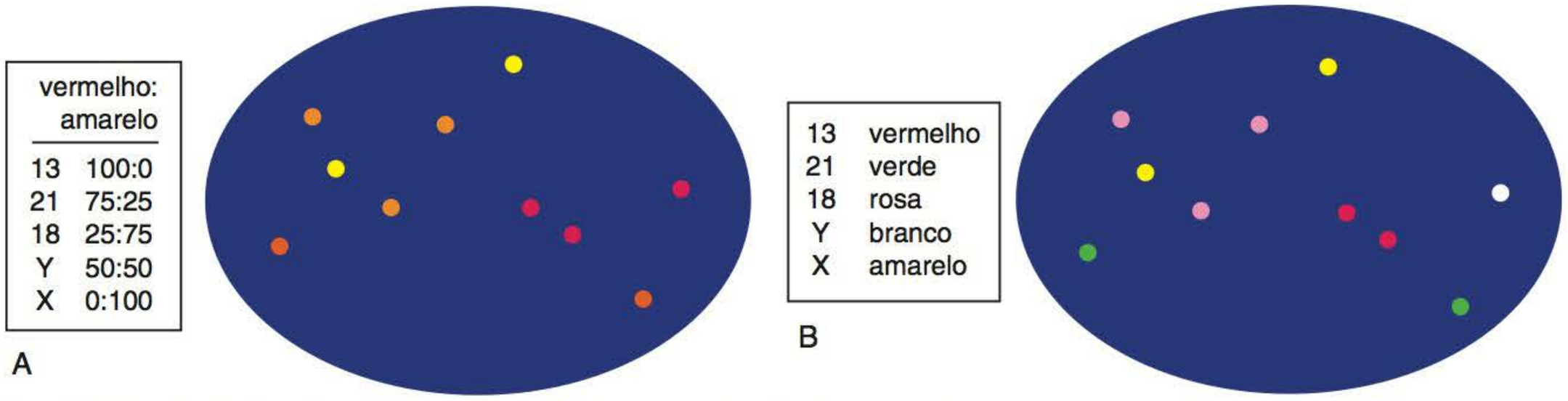


Figura 69.9 FISH multicolorida. *A*, diagrama do padrão de coloração para a combinação de cinco sondas (cromossomos 13, 18, 21, X e Y) em uma célula na interfase. A tabela à esquerda mostra as proporções relativas dos fluorocromos vermelho e amarelo usados para cada sonda. *B*, a mesma célula mostrada em *A*, agora com os sinais artificiais de cores determinados pelo computador (ver quais no quadro à esquerda). Essa célula agora pode ser interpretada como tendo duas cópias dos cromossomos 13, 21 e X, três cópias do cromossomo 18 e uma cópia do cromossomo Y.

Anormalidades cromossômicas

O teste citogenético clínico é parte integrante da medicina clínica. O achado de uma anomalia cromossômica particular pode explicar um problema físico ou uma anormalidade fenotípica no paciente e estar diretamente associado ao diagnóstico de uma doença. Portanto, é indispensável determinar se um indivíduo acometido tem um complemento cromossômico que difere do padrão de 23 pares de cromossomos com morfologia conhecida. Existem duas categorias básicas de variação detectável citogeneticamente: (1) alteração numérica e (2) estrutural.

Anormalidades numéricas

Em humanos e outros mamíferos, os cromossomos ocorrem em pares, de modo que, dos 46 cromossomos humanos, há apenas 23 exclusivamente diferentes. Um conjunto de 23 compreende o número haploide (N) de cromossomos, que é o número de cromossomos em um gameta. Quando ocorre a fertilização, dois complementos haploides unem-se para formar um zigoto com 46 cromossomos, o complemento diploide (2N). Erros na divisão podem originar complementos cromossômicos que tenham mais ou menos de 46 cromossomos. Múltiplos exatos do conjunto haploide de cromossomos são denominados *euploidia*. O ganho ou a perda de um ou alguns cromossomos é conhecido como *aneuploidia*.

Euploidia

A diploidia, o estado normal das células humanas, é uma forma de euploidia. Euploidias anormais incluem a triploidia (3N = 69 cromossomos) e a tetraploidia (4N = 92 cromossomos), que não são compatíveis com a vida e são detectadas primariamente em tecidos de abortos espontâneos. A triploidia (Fig. 69.10A) pode ser devida a falha na gametogênese de uma das divisões meióticas, dando origem a um gameta 2N que, quando fertilizado por um gameta haploide do outro genitor, produz um zigoto triploide. Um complemento 3N também pode ser derivado de dispermia, a fertilização de um ovo haploide por dois espermatozoides, e isso em geral resulta em uma mola hidatiforme parcial. Já a tetraploidia costuma ser um evento pós-meiótico e apresentar-se como uma duplicação de um complemento diploide (XXXX ou XXYY), mais provavelmente por conta de falha de uma divisão mitótica da clivagem precoce no zigoto.

Aneuploidia

Mais comuns são os erros de não disjunção que resultam em aneuploidia. Em tais casos, um único par de cromossomos falha em desunir-se apropriadamente na divisão, originando um cromossomo extra ou perdido por célula. Ocasionalmente, mais de um par de cromossomos pode estar envolvido, mas esses casos são extremamente raros. Podem ocorrer erros de não disjunção na meiose ou na mitose. A não disjunção mitótica precoce em um zigoto pode resultar em um indivíduo com o complemento cromossômico aberrante em todas as células do corpo, mas um erro na divisão tardia em geral produz um *mosaico*, um indivíduo com duas linhagens celulares que diferem apenas por um único cromossomo.

Na meiose normal, uma replicação do DNA é seguida por duas divisões celulares que resultam em quatro gametas haploides (N) (uma cópia de cada cromossomo) (Fig. 69.11A). A primeira divisão meiótica é de redução, em que o número total de cromossomos por células está reduzido pela metade. A segunda divisão meiótica é um tipo de divisão mitótica simples, com uma separação dos centrômeros e distribuição dos cromossomos para células-filhas. Erros meióticos podem resultar em gametas com um cromossomo extra ou um perdido (Angell, 1994). Um erro de não disjunção na primeira divisão mei-

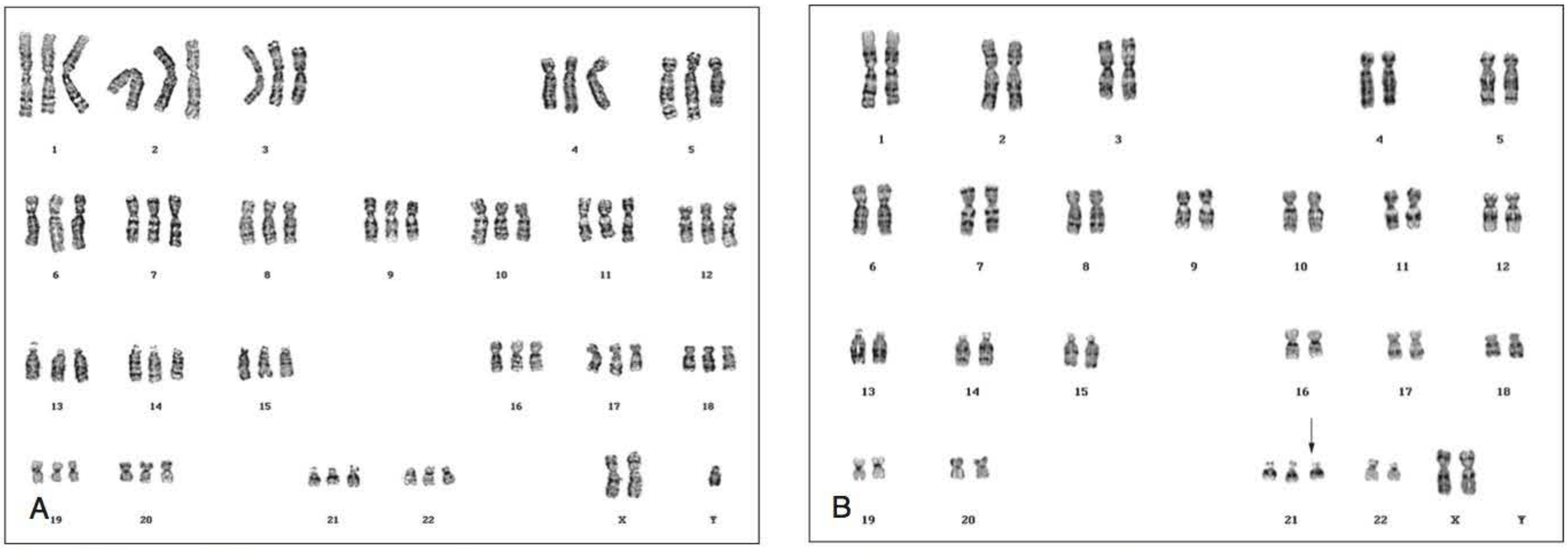


Figura 69.10 Anormalidades cromossômicas numéricas. *A*, complemento cromossômico triploide (3n), com três cópias de cada cromossomo (69,XXY). *B*, trissomia do 21 (47,XX,+21) com um cromossomo 21 extra (seta).

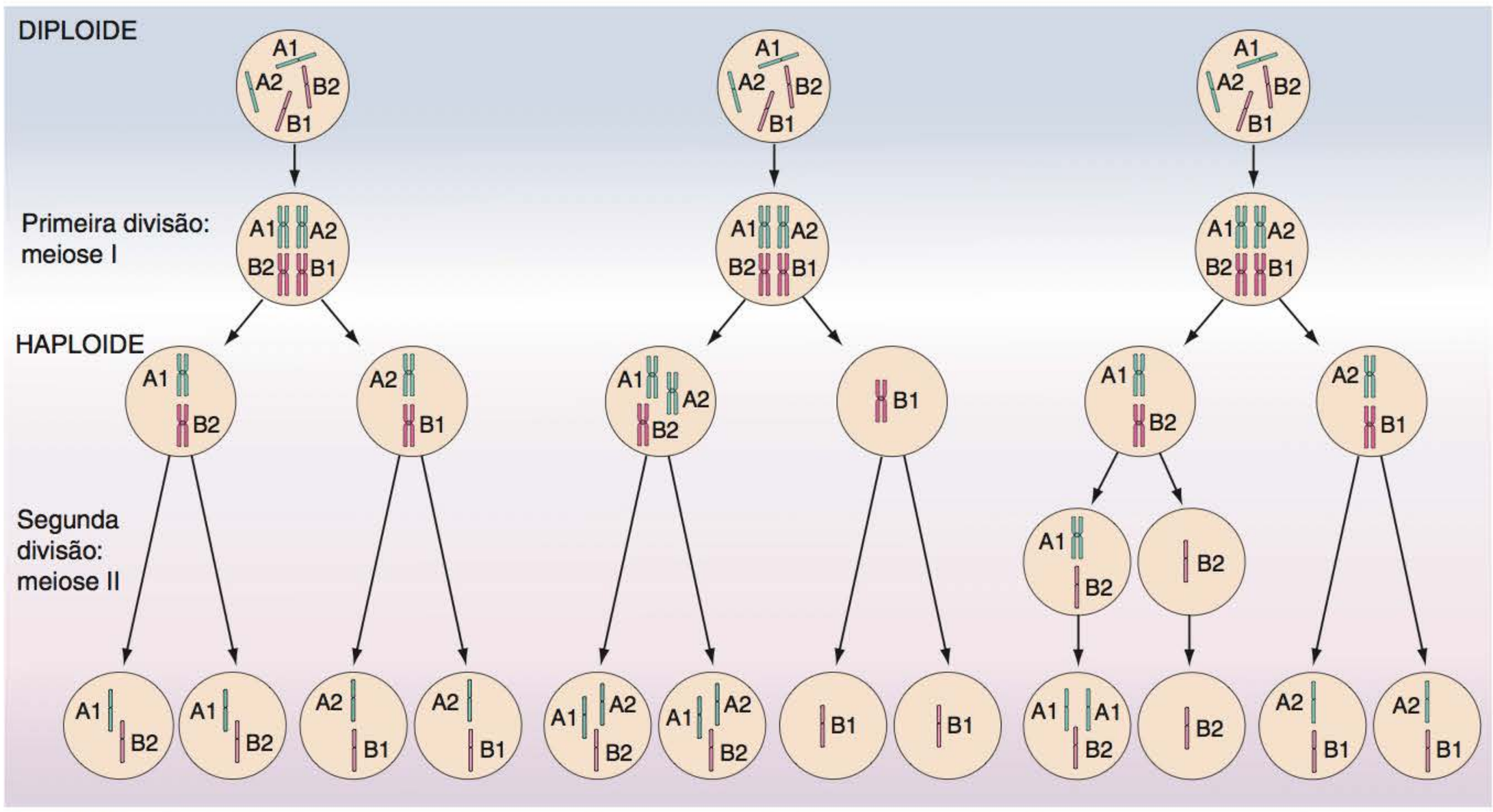


Figura 69.11 Erros de não disjunção na meiose e meióticos resultando em gametas aneuploides. *A*, meiose normal gerando quatro gametas com um conjunto haploide de cromossomos. *B*, não disjunção na meiose I, originando uma cópia extra do cromossomo "A" (heterodissomia) em dois gametas (extrema esquerda), mas ausência de qualquer cromossomo "A" (nulissomia) nos dois gametas restantes (à direita). *C*, a não disjunção na meiose II resulta em dois gametas com um complemento cromossômico normal (à direita), um gameta que perdeu um cromossomo "A" (no centro à esquerda) e um gameta com um cromossomo duplicado extra (duas cópias de "A1", resultando em isodissomia para o cromossomo "A1" (à esquerda).

ótica (Fig. 69.11B) leva à formação de dois gametas que são dissômicos para um cromossomo e dois gametas que estão perdidos daquele cromossomo (nulissômico). Quando fertilizado, o primeiro gameta irá resultar em uma concepção trissômica do cromossomo que não sofreu disjunção (p. ex., a trissomia do 21 na Fig. 69.10B) e o último resultará em uma monossomia. Similarmente, a Figura 69.11C mostra um erro na primeira divisão meiótica, resultando em dois gametas haploides normais, um gameta dissômico e um gameta nulissômico.

Pode ocorrer trissomia ou monossomia com qualquer cromossomo, porém, a maioria desses eventos é incompatível com a vida e termina espontaneamente. A trissomia do 16, por exemplo, é a trissomia detectada mais comumente em tecido de abortos espontâneos, mas não é relatada em nascidos vivos. As trissomias autossômicas de nascidos vivos incluem as dos cromossomos 13, 18 e 21. Pacientes com um complemento cromossômico mosaico para as trissomias do 8, 9 e 22 são identificados com pouca frequência. Trissomias de cromossomos sexuais são viáveis e bem documentadas (ver adiante). A única monossomia viável é a do cromossomo X (45,X). Exemplos de aneuploidias clinicamente significativas serão discutidos adiante neste capítulo.

Como as trissomias e monossomias são em grande parte incompatíveis com a vida, partiu-se do princípio de que sua presença resultaria em perda fetal. Contudo, análises moleculares mostraram que uma pequena fração dessas concepções aneuploides é "resgatada" e segue adiante resultando no nascimento de crianças vivas. No caso de uma monossomia, o resgate é conseguido pela duplicação do único cromossomo existente, resultando em um complemento cromossômico com *isodissomia uniparental* para aquele cromossomo (duas cópias do mesmo cromossomo herdado de um dos genitores) (Fig. 69.12, à direita) (Ledbetter, 1995). Isso é exemplificado por vários casos relatados na literatura em que uma criança acometida com fibrose cística (FC) mostrou ser homozigota para a mutação ΔF508, embora testes moleculares em ambos os pais tenham revelado que apenas um era portador dessa mutação (Spence, 1988; Voss, 1989). Concluiu-se que a concepção era uma monossomia do 7 inviável resgatada pela duplicação do cromossomo 7 existente que, por acaso, tinha a mutação para fibrose cística. Uma situação semelhante é possível no caso de uma trissomia. A maioria das trissomias também não é compatível com a vida, mas, se um dos três cromossomos for perdido, volta a haver uma dissomia para aquele par de cromossomos (Fig. 69.12, à esquerda). Em um conjunto de três cromossomos, a perda de um único cromossomo resulta em um complemento com um cromossomo materno e outro paterno (*heterodissomia biparental*) em dois a cada três eventos. Em 1/3 dos casos, os dois cromossomos restantes são de um único genitor (i. e., dissomia uniparental). Em tal situação, faz diferença em que divisão meiótica o erro ocorreu. Uma não disjunção na primeira divisão resultará em heterodissomia, que corresponde a dois cromossomos homólogos mas heterozigotos (um proveniente de um dos avós maternos e outro, de um dos avós paternos); todavia, um erro na segunda divisão resultará em cópias duplicadas de um único cromossomo, isodissomia (Fig. 69.11B e C e 69.13). Embora se pudesse pensar que 2 cromossomos por par seriam suficientes, os dados indicam fortemente que, em alguns casos, é essencial que os pares tenham um cromossomo materno e um paterno. Essa questão, incluindo os problemas de dissomia uniparental *vs.* biparental e isodissomia *vs.* heterodissomia, é de importância primordial para se entender questões de *imprinting*, tópico discutido em detalhes no Capítulo 72 (Nicholls, 1998; Hall, 1990; Cassidy, 1992; Petersen, 1992).

Anormalidades cromossômicas estruturais

Os cromossomos não são estruturas estáticas, sofrendo recombinação tanto na meiose quanto na mitose. Esse é um processo natural e fundamental para gerar variação nas espécies, por isso, um sistema regulador altamente desenvolvido atua para evitar que ocorram erros. Apesar disso, eles acabam ocorrendo, e às vezes resultam em rearranjos cromossômicos que modificam a estrutura de um ou mais cromossomos. Tais anormalidades são bastante variadas e, em geral, específicas do paciente. Os rearranjos podem ser (1) equilibrados (*balanceados*), se todo o material cromossômico estiver presente e funcional,

Figura 69.12 Geração de dissomia uniparental a partir de erros de não disjunção. À esquerda do diagrama, está ilustrada heterodissomia resultante da redução de uma trissomia para uma dissomia. À direita, vê-se isodissomia como resultado de resgate de monossomia (duplicação de um único cromossomo existente).

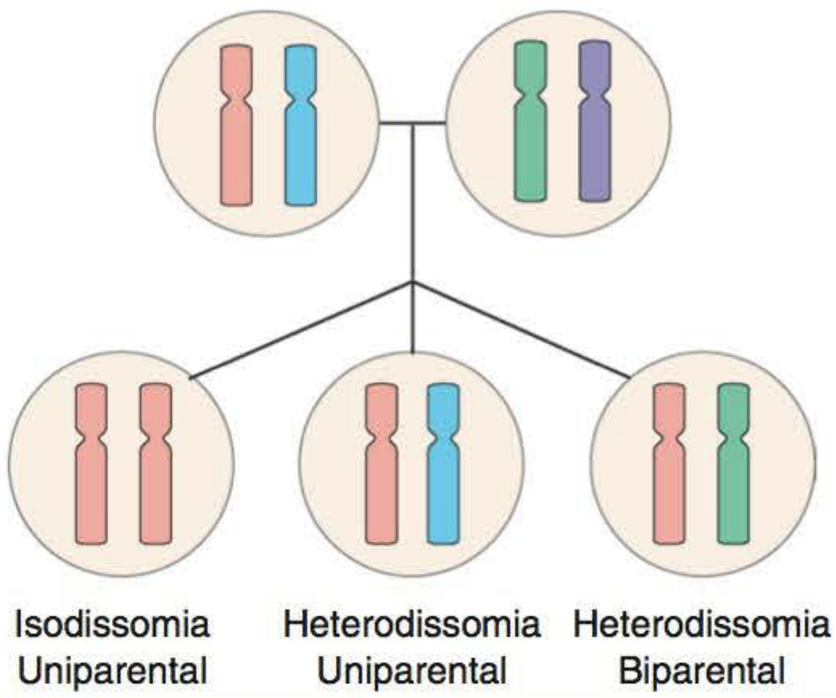


Figura 69.13 Isodissomia *vs.* heterodissomia. A conformação esperada de uma célula é heterodissômica biparental (à direita), i. e., com um cromossomo de cada genitor. Erros de divisão podem resultar em uma distribuição aberrante dos cromossomos parentais, de tal forma que ocorram duas cópias de um cromossomo de cada genitor (isodissomia uniparental) (à esquerda) ou dois cromossomos diferentes do mesmo genitor (heterodissomia uniparental) (no centro).

mas simplesmente disposto em uma conformação diferente; ou (2) desequilibrados (*não balanceados*), se houver perda e/ou duplicação de algum material cromossômico. Rearranjos equilibrados costumam ser clinicamente benignos e tendem a ser transmitidos de forma estável, mas podem aumentar o risco de erros na meiose, resultando em desequilíbrios cromossômicos em fetos ou crianças nascidas vivas. Complementos cromossômicos desequilibrados costumam estar associados a um fenótipo clínico anormal que geralmente inclui atraso do desenvolvimento e retardamento mental.

Uma *deleção* é a perda de uma parte de um cromossomo e acarreta monossomia parcial do cromossomo envolvido (Fig. 69.14B). O tamanho das deleções varia de muito grande a muito pequeno e pode ser *terminal* (à esquerda), quando há perda de uma porção do cromossomo que inclui o telômero, ou *intersticial* (à direita), quando há perda de um pedaço interno do cromossomo. A quebra de um cromossomo, diferente do *crossing over*, ou erros de não disjunção envolvendo rearranjos cromossômicos podem resultar em deleção. Em geral, deleções maiores resultam em anormalidades clínicas mais graves, por causa do número maior de *loci* gênicos que estão perdidos.

Uma *duplicação* é a presença de uma cópia adicional de um segmento cromossômico que leva à trissomia parcial daquele cromossomo (Fig. 69.14C). Tal anomalia também pode ser *terminal* ou *intersticial*. Duplicações verdadeiras parecem ser bastante raras e em geral são esporádicas. As duplicações são geradas pelos mesmos mecanismos das deleções e podem ser o resultado recíproco daqueles processos. Como é válido para as deleções, quanto maior o pedaço de cromossomo duplicado, mais graves tendem a ser as anormalidades.

Uma *inversão* é o oposto de um segmento cromossômico quanto ao arranjo normal do gene e requer um mínimo de duas quebras em um cromossomo (Fig. 69.14D). As inversões são classificadas como (1) *paracêntricas*, em que as duas quebras ocorrem no mesmo lado do centrômero (i. e., no mesmo braço), ou (2) *pericêntricas*, em que as quebras ocorrem nos lados opostos do centrômero e a inversão envolve ambos os braços (Fig. 69.15A). A maioria das inversões é equilibrada (balanceada), porém, se o cromossomo quebrar dentro de um gene e interromper a produção normal do produto gênico necessário, anormalidades clínicas podem ser detectadas. Há um risco maior de erro meiótico, e os portadores de inversão frequentemente exibem infertilidade ou perda fetal espontânea precoce devida a produtos cromossômicos desequilibrados.

Em um portador de inversão, a meiose começa normal, com o pareamento de cromossomos homólogos. O processo é um pouco mais complexo para um cromossomo invertido, que precisa formar uma estrutura conhecida como uma alça de inversão (Fig. 69.15B) para os *loci* homólogos do par (i. e., A para a, B para b, C para c etc). Se não ocorrer recombinação enquanto a alça está presente e os cromossomos separarem-se normalmente, os gametas não sofrem qualquer impacto negativo. Todavia, o *crossing over* dentro da alça de inversão pode resultar em desequilíbrio de produtos meióticos. Em uma inversão paracêntrica, os resultados da recombinação em geral são cromossomos acêntricos e dicêntricos não viáveis, de modo que há uma aparente supressão da recombinação (i. e., os únicos gametas viáveis produzidos são de cromossomos não recombinados) (Fig. 69.15B). Nas inversões pericêntricas, é possível que derivem gametas com duplicação cromossômica e/ou deleção. Geralmente, inversões pericêntricas maiores resultam em duplicações/deficiências menores e maior probabilidade de nascer uma criança viva com um desequilíbrio cromossômico e, provavelmente, anormalidades fenotípicas. Ao se identificar um portador de inversão, pode-se usar o diagnóstico pré-natal para avaliar os cromossomos de cada concepção.

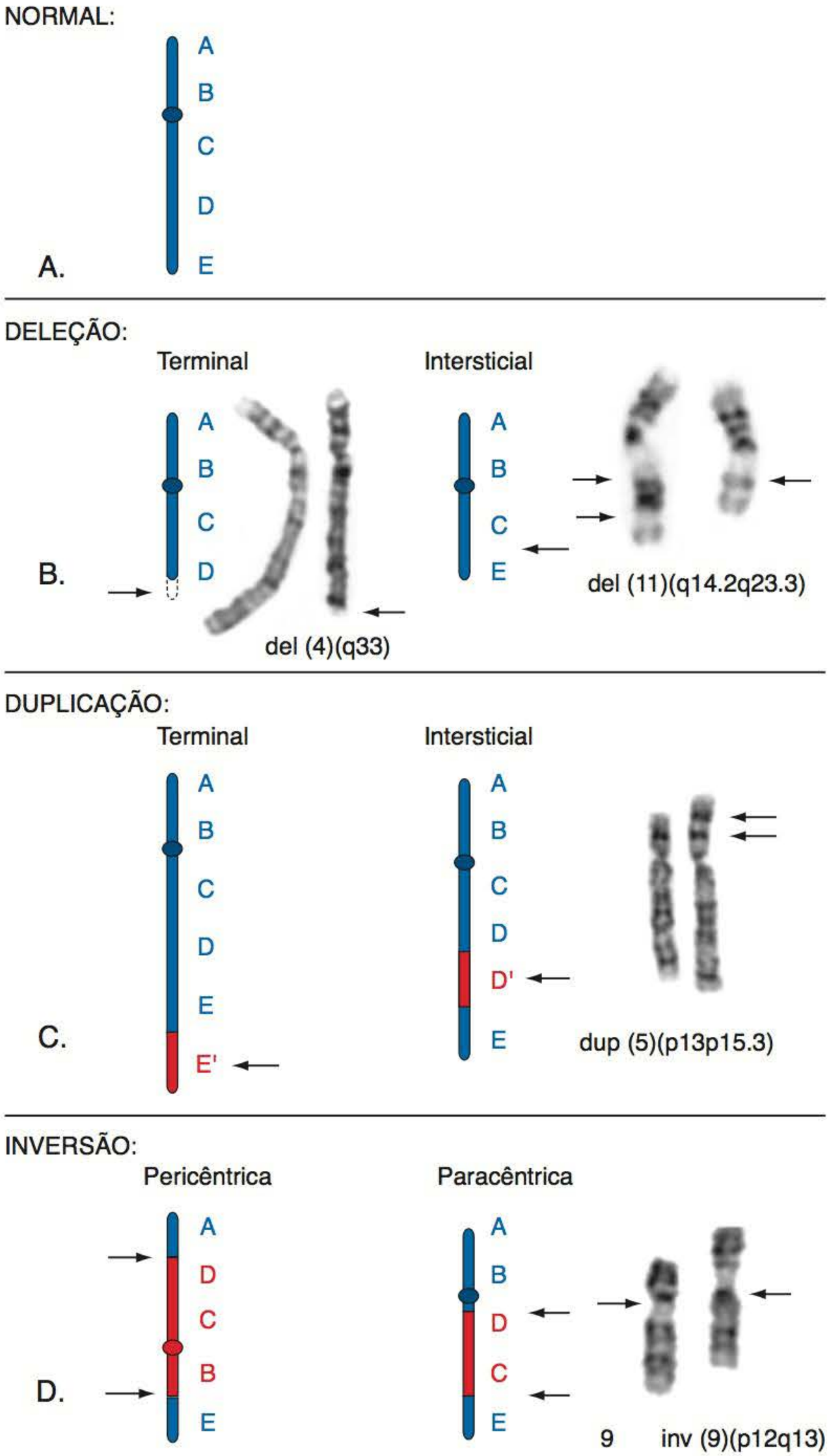
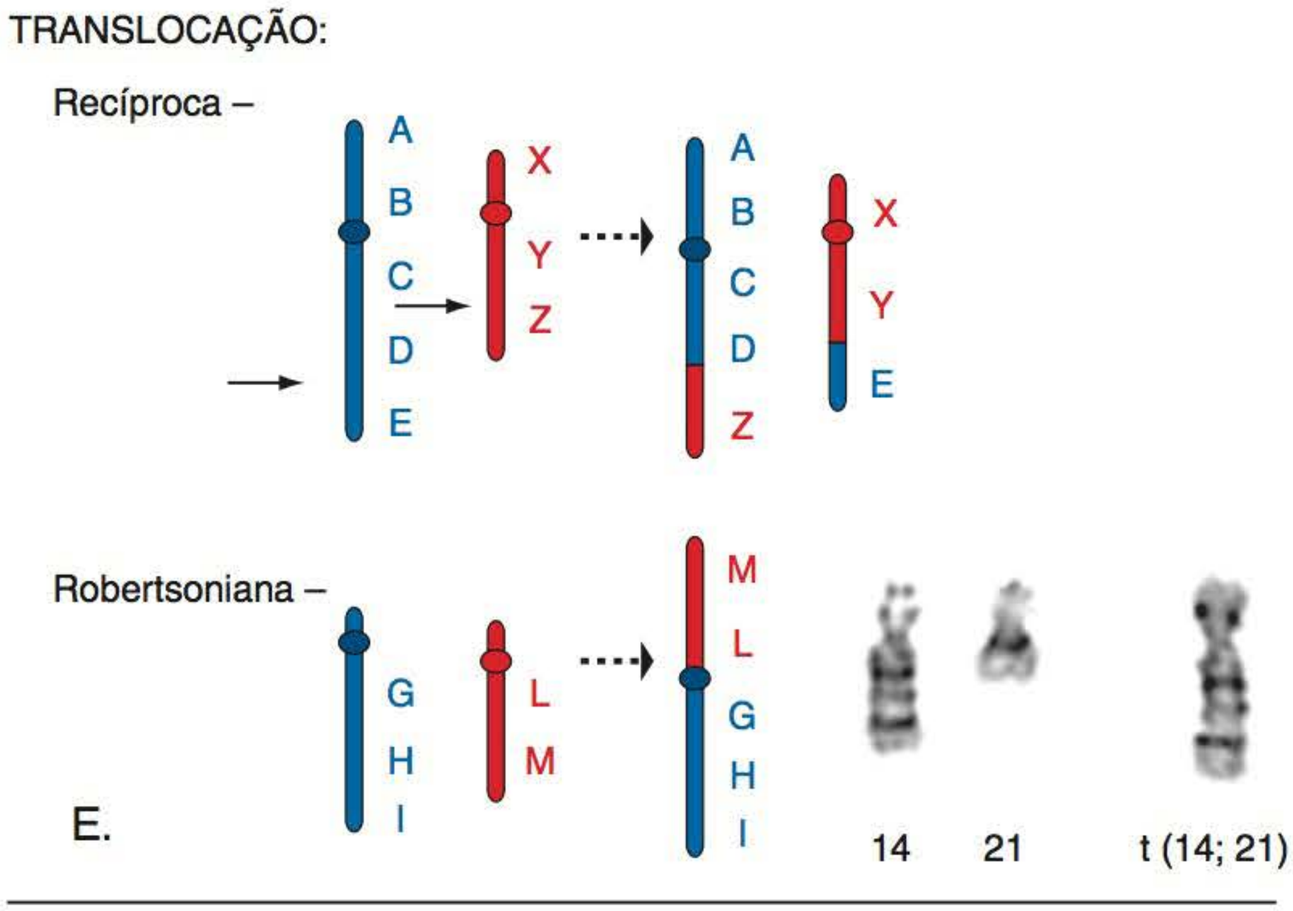


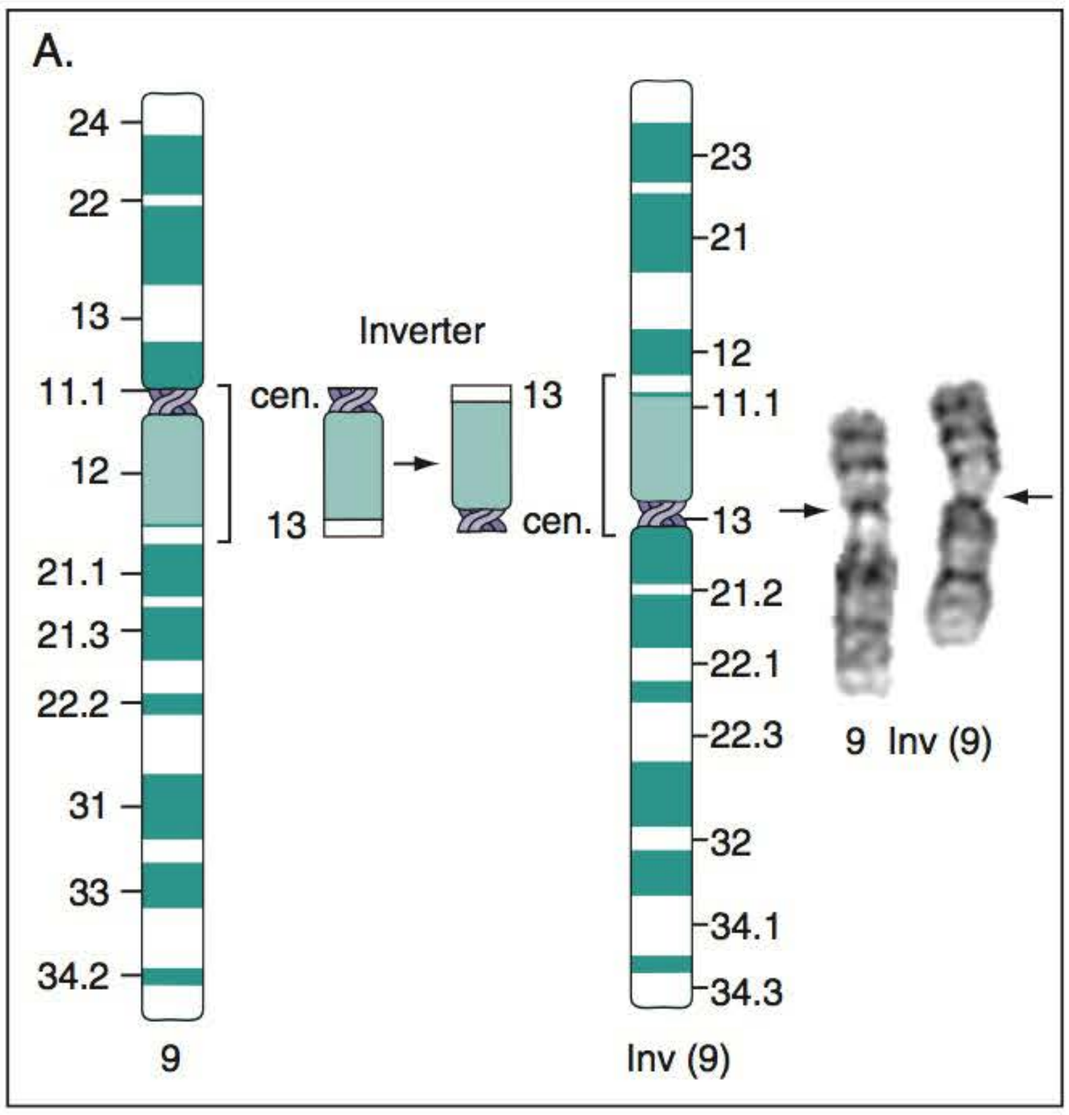
Figura 69.14 Representações esquemáticas de diferentes anomalias cromossômicas estruturais descritas no texto, associadas a exemplos de cada anomalia. *A*, a configuração normal generalizada de um cromossomo, onde A a E representam diferentes *loci* gênicos e o centrômero é representado por um pontilhado localizado entre os *loci* B e C. *B*, deleção: deleção cromossômica mostrando a configuração terminal (perda do *locus* E) e a intersticial (perda do *locus* D). Exemplos: deleção terminal do braço longo do cromossomo 4 (del[4][q33]) e uma deleção intersticial do braço longo do cromossomo 11 (del[11][q14.2q23.3]). *C*, duplicação: duplicação cromossômica mostrando a configuração terminal (ganho de E′) e a intersticial (ganho de D′). Exemplo: duplicação terminal do braço curto do cromossomo 5 (as setas duplas indicam a banda duplicada). *D*, inversão: inversão do cromossomo mostrando as formas pericêntrica e paracêntrica. Exemplo: inversão pericêntrica do cromossomo 9 (as setas indicam os centrômeros).

Translocações são rearranjos que envolvem dois ou mais cromossomos homólogos. Cada cromossomo quebra-se uma vez e os pedaços mudam de lugar, estabelecendo dois (ou mais) cromossomos derivados (Fig. 69.14E). Como nas inversões, a maioria das translocações é equilibrada e só quando um gene estrutural importante se rompe a translocação tem ramificações clínicas.

O principal perigo de uma translocação equilibrada é que os portadores correm maior risco de ter uma criança nascida viva cromossomicamente anormal. Na primeira divisão meiótica, os cromossomos translocados adquirem uma estrutura em forma de cruz, para que todos os alelos possam parear-se apropriadamente (Fig. 69.16). Na anáfase, os cromossomos alternados precisam segregar-se juntos para gerar gametas equilibrados. Em até 1/3 dos casos, os cromossomos não serão segregados dessa maneira e os gametas resultantes serão desequilibrados. Os erros mais comuns denominam-se segregação adjacente-1 e adjacente-2. Embora ambos os padrões resultem em duplicação/deficiência de material cromossômico nos gametas, a adjacente-2 é mais deletéria, pois caracteriza-se pela ocorrência não natural de centrômeros homólogos em uma única célula. A viabilidade de um feto que recebe um gameta desequilibrado depende dos cromossomos e genes envolvidos na translocação e do tamanho da duplicação/deleção. Os cromossomos também podem seguir um padrão de segregação 3:1, em que 3 cromossomos separam-se em uma célula com o cromossomo restante na segunda célula. Isso resulta em desequilíbrios macroscópicos de material cromossômico e geralmente é letal *in utero*. Ao se identificar um portador de translocação, é possível fazer o diagnóstico pré-natal.

Translocações robertsonianas são uma variação da translocação clássica. Elas ocorrem apenas entre 2 cromossomos acrocêntricos e parecem ser uma fusão dos braços longos no centrômero, com a perda resultante de ambos os braços curtos (Fig. 69.14E). A perda dos braços curtos acrocêntricos não é deletéria, pois múltiplas cópias do RNA dos genes estão localizadas em todos os cromossomos acrocêntricos.





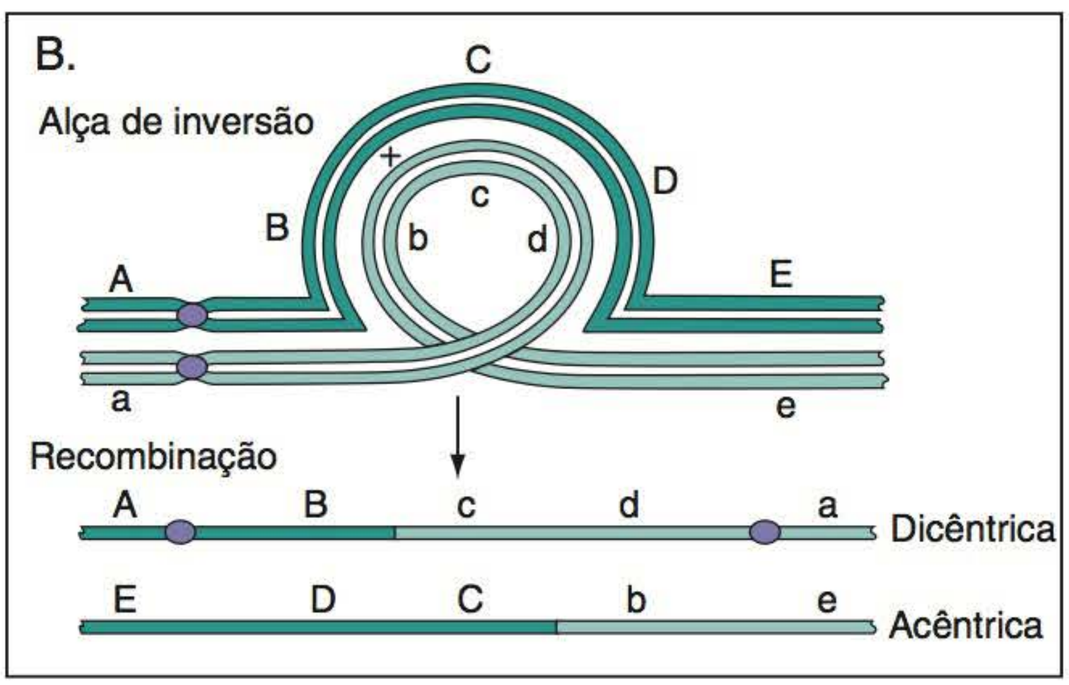


Figura 69.14 (*continuação*) *E*, translocação: translocação recíproca onde os *loci* E e Z trocam de lugares. *A*, translocação robertsoniana mostrada pela fusão de dois cromossomos acrocêntricos no centrômero. Exemplo: cromossomos 14 e 21 seguidos pela translocação robertsoniana 14;21. *F*, isocromossomo: resultado de uma divisão errônea do centrômero, gerando duplicações invertidas dos braços longo e curto do cromossomo original. Exemplo: isocromossomo do braço longo do cromossomo X. *G*, *cromossomo em anel*. Exemplo: cromossomos 18 e em anel 18.

Figura 69.15 Inversão cromossômica. *A*, diagrama de uma inversão pericêntrica do cromossomo 9 usando ideogramas para ilustrar o mecanismo de inversão. Cromossomos bandeados demonstrando essa inversão são mostrados à direita. *B*, alça de inversão mostrando o pareamento de homólogos na meiose de um cromossomo normal (verde-escuro) e um com uma inversão paracêntrica (verde-claro). Ocorrendo recombinação no ponto indicado pelo X na alça, são gerados cromossomos recombinantes, conforme mostrado embaixo. No caso de uma inversão paracêntrica, os cromossomos recombinados produzidos seriam dicêntricos ou acêntricos.

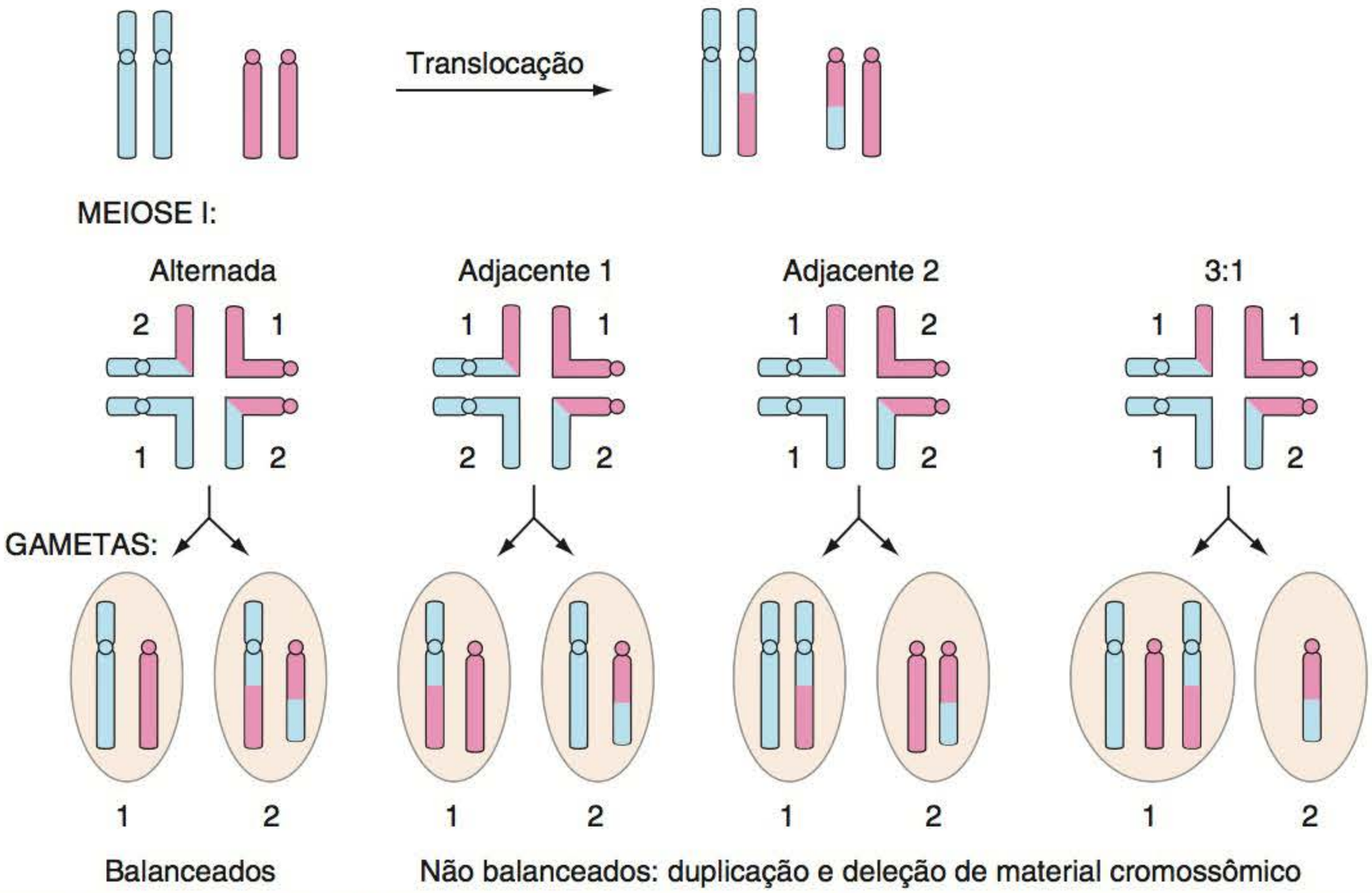


Figura 69.16 Translocação cromossômica. Diagrama da geração de gametas de uma translocação hipotética na meiose. O par de cromossomos em uma configuração em forma de cruz na meiose I. A segregação alternada irá resultar em gametas equilibrados. A segregação adjacente 1, adjacente 2 ou 3:1 irá produzir gametas não equilibrados, que podem dar origem uma criança anormal nascida viva. (Só é mostrada uma das várias segregações 3:1 possíveis.)

Um indivíduo portador de uma translocação robertsoniana tem uma contagem de cromossomos de 45, pois 2 cromossomos tornaram-se um funcionalmente e compartilham um centrômero. Tais indivíduos correm maior risco de erros de não disjunção meiótica que resultam em crianças trissômicas para um dos cromossomos rearranjados. O exemplo mais comum disso é um indivíduo com uma translocação robertsoniana que envolve os cromossomos 13 e 14, gerando uma criança nascida viva com trissomia do 13 (Fig. 69.17). A criança acometida terá 46 cromossomos, incluindo duas cópias livres de cromossomos 13 e a translocação robertsoniana. Outro rearranjo comum é uma translocação robertsoniana 14;21 (Fig. 69.14E), que iria originar uma progênie com trissomia do 21.

Embora as translocações robertsonianas mais comuns ocorram entre cromossomos acrocêntricos não homólogos, é possível ter tal rearranjo entre cromossomos homólogos. Por exemplo, um indivíduo com uma translocação robertsoniana 21;21 teria um total de 45 cromossomos, incluindo a translocação em que os dois 21s estão unidos no centrômero. Esse tipo de rearranjo é quase sempre do tipo *de novo*, pois é improvável que os portadores da anormalidade tenham uma progênie normal. Os gametas possíveis incluem: (1) uma célula com translocação robertsoniana (duas cópias do cromossomo 21) que, se fertilizada, dará origem a uma criança com síndrome de Down; ou (2) uma célula sem cópias do cromossomo 21 que, se fertilizada, resultará em uma monossomia do 21, que é incompatível com a vida.

Um cromossomo resultante da divisão errônea do centrômero durante a divisão celular, resultando em duas cópias de um braço do cromossomo mas perdendo o outro braço, é um *isocromossomo* (Fig. 69.14F). Esse mecanismo pode resultar em dois cromossomos derivados – um com uma duplicação invertida do braço curto e um com uma duplicação invertida do braço longo. Se ambos os cromossomos derivados ficassem retidos na célula, ela seria trissômica para aquele cromossomo, condição geralmente letal. Em um indivíduo vivo, portanto, é mais comum que um dos cromossomos derivados seja perdido, resultando em um portador que é trissômico para apenas um braço duplicado e monossômico para o outro braço. O melhor exemplo conhecido é o isocromossomo do braço longo do X. Uma paciente com síndrome de Turner (ver adiante em "Aneuploidias dos cromossomos sexuais") pode ter um cromossomo X intacto e um isocromossomo Xq (trissomia do braço longo, mas uma monossomia do braço curto do X). Como são necessárias duas cópias funcionais do braço curto do X para o desenvolvimento feminino normal, esse arranjo cromossômico resulta em desenvolvimento anormal. Cromossomos acrocêntricos também podem formar isocromossomos (duplicação invertida do braço longo), mas a homozigosidade resultante de todos os *loci* presentes poderia levar à expressão de distúrbios recessivos que de outra forma não seriam evidentes.

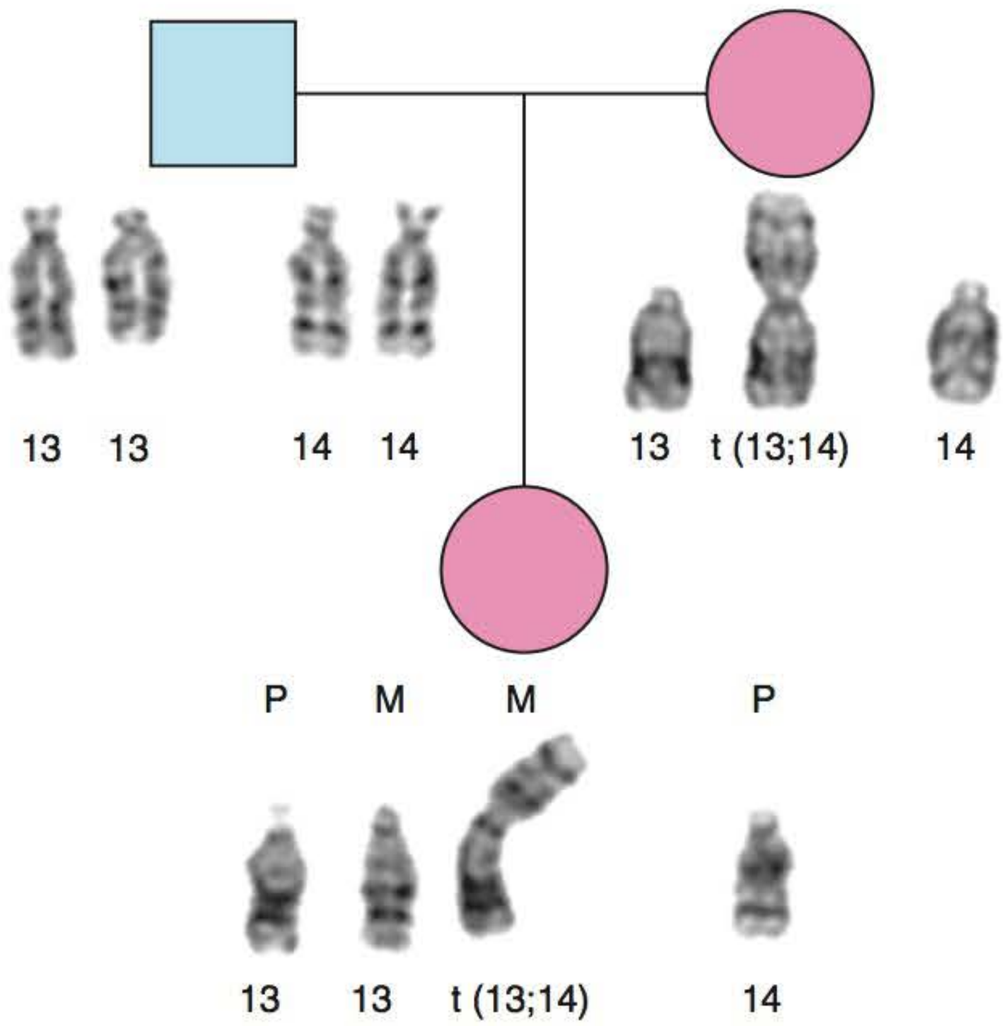


Figura 69.17 Heredograma e cromossomos bandeados mostrando a herança de uma translocação robertsoniana dos cromossomos 13 e 14. A mãe é portadora da translocação (t(13;14)) em uma forma equilibrada, mas um erro meiótico resulta na transmissão tanto do cromossomo com translocação robertsoniana como do cromossomo 13 da mãe para a criança, que tem trissomia do 13 (P = cromossomos 13 e 14 paternos; M = cromossomo 13 materno e translocação robertsoniana). Nota: a segunda cópia do cromossomo 14 não foi perdida, estando presente como parte do rearranjo robertsoniano.

Ocorre um *cromossomo* em anel quando ambos os telômeros de um cromossomo são perdidos e a porção restante do cromossomo fica circular para restabelecer a estabilidade do cromossomo (Fig. 69.14G). Infelizmente, esses construtos em geral são instáveis porque a replicação pode resultar em círculos interligados que levam à quebra e à perda do cromossomo quando os homólogos tentam separar-se na anáfase. Contudo, em certas circunstâncias, os anéis podem ser transmitidos de forma estável em linhagens celulares, o que em geral ocorre quando o anel contém material genético essencial para a função celular normal.

Um cromossomo *marcador* é aquele com um centrômero que é transmitido de forma estável para células-filhas, porém, não pode ser identificado com clareza por ser muito pequeno ou o padrão de bandeamento ser muito ambíguo. A FISH multicolorida é um recurso útil para determinar a origem dos marcadores. Ao "pintar" a metáfase inteira e gerar uma imagem com uma cor única para cada par de cromossomo, deve ser possível identificar a origem do cromossomo marcador, pois sua cor deve misturar-se com a de um dos outros cromossomos conhecidos do conjunto.

Conclusões

As anormalidades cromossômicas, sejam numéricas ou estruturais, que resultam em um complemento cromossômico desequilibrado, em geral, estão associadas a algum tipo de achado clínico anormal, e o tamanho do desequilíbrio tende a ser proporcional à gravidade do problema. A maioria dos indivíduos diagnosticados com uma anormalidade cromossômica constitucional tem apenas um único defeito cromossômico. No entanto, há casos raros em que uma pessoa pode ter dois ou mais erros cromossômicos. As anormalidades cromossômicas adquiridas (vistas em células cancerosas) podem ser mais complexas e haver múltiplas alterações numéricas e estruturais em uma única linhagem celular.

Nomenclatura

Ante essa ampla gama de variação cromossômica, foi necessário desenvolver um sistema de classificação que permitisse descrever, de forma sucinta, cada complemento cromossômico de um indivíduo e que isso fosse entendido em todo o mundo. A primeira nomenclatura genética foi um arcabouço e a "linguagem" evoluiu desde então. Atualmente, o padrão reconhecido é o da International System of Cytogenetic Nomenclature (ISCN).

A nomenclatura que descreve um complemento cromossômico pode ser dividida em três partes básicas: (1) o número total de cromossomos, (2) o complemento do cromossomo sexual e (3) quaisquer anormalidades cromossômicas. Tais unidades são listadas em ordem, separadas por vírgulas. Assim, uma mulher aparentemente normal seria codificada como 46,XX e um homem seria 46,XY. Se houver duas ou mais linhagens celulares, elas são listadas em sequência, separadas por uma barra, com um clone diploide normal, se presente, sempre listado por último (45,X/46,XX). Outros clones são ordenados pelo tamanho, começando-se pelo maior deles. O número de células em cada clone é indicado por um número entre colchetes (45,X[15]/47,XXX[3]/46,XX[12]). No caso de anomalias numéricas, o número total de cromossomos estaria aumentado ou diminuído, para indicar a alteração geral, e o cromossomo específico ganho ou perdido ficaria no final. Por exemplo, a trissomia do 13 em uma pessoa do sexo feminino seria escrita como 47,XX,+13 e a monossomia do 8 em um indivíduo do sexo masculino seria escrita como 45,XY,–8. Entretanto, no caso de uma variação cromossômica conhecida ser constitucional, não é necessário usar um sinal + ou –, pois a alteração no complemento cromossômico pode ser notada diretamente. A monossomia do X torna-se 45,X e o ganho de um cromossomo sexual seria 47,XXY, 47,XXX ou 47,XYY. Por outro lado, se a mudança do cromossomo sexual for adquirida, como em algumas linhagens celulares de câncer, seria necessário um sinal + ou – indicando isso (p. ex., 45,X,–Y em um indivíduo do sexo masculino cujo cromossomo Y foi perdido por causa da doença).

Alterações estruturais nos cromossomos não afetam o número total de cromossomos presentes, mas devem constar no final da nomenclatura, para esclarecer a condição do(s) cromossomo(s) rearranjado(s). Para agilizar a nomenclatura, criou-se uma série de abreviaturas para as anomalias estruturais comuns, encurtando a grafia (Tab. 69.1). Uma anormalidade estrutural é indicada pela abreviatura da anormalidade, seguida pelo cromossomo envolvido e seu(s) ponto(s) de ruptura. No caso de rearranjos em que dois cromossomos estão envolvidos, um primeiro conjunto de parênteses indica os cromossomos (em primeiro lugar, o de número mais baixo ou o cromossomo sexual), seguindo-se os pontos de ruptura do rearranjo na mesma ordem relativa, ou seja, t(4;9)(q21.2;p22) é uma translocação entre os cromossomos 4 e 9, com pontos de ruptura em 4q21.2 e 9p22.

Tabela 69.1 Abreviaturas comuns das anormalidades cromossômicas

Abreviatura	Significado
cen	Centrômero
del	Deleção
dup	Duplicação
ins	Inserção
inv	Inversão
i	Isocromossomo
mar	Marcador
r	Anel
rob	Translocação robertsoniana
t	Translocação

Os exemplos incluem o seguinte:

Deleção:	46,XX,del(4)(p15)	Deleção terminal do braço curto de 4 na banda 15
Duplicação:	46,XX,dup(11)(q13q23)	Duplicação intersticial do braço longo de 11
Translocação:	46,XY,t(4;9)(q21.2;p22)	Translocação entre 4q e 9p
Inversão:	46,XY,inv(9)(p11q21.1)	Inversão pericêntrica em 9 entre as bandas p11 e q21.1

Clínica

Aplicações clínicas

As anormalidades citogenéticas podem ser encontradas em indivíduos aparentemente "normais", bem como em pacientes com anomalias fenotípicas ou um distúrbio genético diagnosticado. O diagnóstico pode ser feito em qualquer época da vida. Quando se observa o mesmo conjunto de aspectos em vários indivíduos sem parentesco, é possível estabelecer uma síndrome. Presume-se que as características associadas a uma síndrome tenham uma base comum, que em geral pode ser demonstrada como uma anormalidade cromossômica específica. Entretanto, embora se defina uma síndrome por certo conjunto de características, há variabilidade nos indivíduos acometidos e nem todos vão exibir um fenótipo idêntico.

Citogenética pré-natal

Estudos mostraram que 1 a cada 13 conceptos tem uma anormalidade cromossômica, porém, desses, apenas 6 em 1.000 nascem vivos, indicando que a maioria dos erros é reconhecida e eliminada biologicamente. Por exemplo, de todas as concepções 45,X, 95% são perdidas espontaneamente. São registradas frequências similares de perda nos casos de trissomia de nascidos vivos (90% das concepções com trissomia do 13, 80% das concepções com trissomia do 18 e 65% das concepções com trissomia do 21 não vingam). Em média, 15% de todas as gestações reconhecidas terminam em perda fetal espontânea, com 80% ocorrendo no primeiro trimestre. De todos os abortos espontâneos, 60% são cromossomicamente anormais (Tab. 69.2) e, desses, 52% são trissomias autossômicas. A trissomia mais comum observada em material de aborto é a do 16, porém, a classe mais frequente de erro cromossômico em perdas espontâneas é a de 45,X.

Uma das estatísticas mais importantes é a correlação direta entre idade materna avançada e nascimentos com anormalidades cromossômicas. Embora a razão exata do fenômeno seja incerta, estudos populacionais mostraram que mulheres com mais de 35 anos de idade correm maior risco de uma concepção cromossomicamente anormal (Hassold, 1985), com a anormalidade cromossômica mais comum sendo a síndrome de Down (trissomia do 21) (Fig. 69.10B e 69.18). Isso passa a ter

Tabela 69.2 Anormalidades cromossômicas nas perdas fetais espontâneas e em lactentes nascidos vivos

Anormalidade	Cromossomo	Perdas fetais espontâneas (%)	Incidência em nascidos vivos
45,X		18,0	1/4.000
Triploidia		17,0	1/60 .000
Tetraploidia		6,0	0
Trissomia	16	16,4	0
	22	5,7	0
	21	4,7	1/830
	15	4,2	0
	14	3,7	0
	18	3,0	1/7.500
	13	2,0	1/5.000
	Outro	12,3	1/10 .000
Rearranjo desequilibrado		3,0	1/2.000
Rearranjo equilibrado		4,0	3/1.000

Fonte: dados de Hook, 1977; Jacobs, 1992; Nussbaum, 2004; Turnpenny, 2005.

mais importância em uma sociedade em que as mulheres adiam cada vez mais o momento de ter filhos, de modo que o diagnóstico pré-natal tornou-se uma área primordial do estudo clínico citogenético. Além da triagem para risco relacionado com a idade, outras razões comuns para encaminhamento incluem uma história familiar de filho com alguma anormalidade cromossômica, níveis anormais de AFP em um teste de triagem e uma anormalidade detectada ao ultrassom.

As anormalidades cromossômicas mais comuns detectadas em exames pré-natais são trissomias em nascidos vivos e aneuploidias de cromossomos sexuais. Como em geral resultam de erro de não disjunção meiótica, o risco de recorrência é muito baixo. Ocasionalmente, será identificada uma criança com uma anormalidade cromossômica estrutural equilibrada ou não equilibrada. Em tais circunstâncias, usa-se a análise do cariótipo de ambos os genitores biológicos para diferenciar entre um rearranjo hereditário e uma anomalia na criança que já tenha ocorrido na família. Por exemplo, uma criança com uma translocação hereditária equilibrada corre um risco inferior a 1% de que o rearranjo cromossômico venha a causar algum problema. Todavia, se a translocação aparentemente equilibrada observada no feto não for detectada em qualquer genitor biológico, sem dúvida ressurgiu na família ao ocorrer na criança, havendo um risco de 5 a 10% de comprometimento relacionado com o lactente. Infelizmente, o achado de uma translocação *não equilibrada* em um feto, qualquer que seja o estado de portador dos pais, é uma situação séria e quase sempre resulta em algum tipo de defeito genético na criança. O acompanhamento para determinar se um dos pais é um portador da translocação equilibrada informa sobre a recorrência do risco em gestações futuras.

Pós-natal

Aproximadamente 0,6% dos recém-nascidos tem uma anormalidade cromossômica. Se um lactente apresentar sinais ou sintomas de uma síndrome definida, a análise do cariótipo pode confirmar o diagnóstico. Se o recém-nascido tiver anomalias clínicas não relacionadas com um distúrbio específico, a análise do cariótipo pode informar sobre uma anormalidade cromossômica relacionada com os achados clínicos. A genitália ambígua pode estar relacionada com um complemento cromossômico sexual anormal, mas, caso se demonstre que os cromossomos são normais, o médico sabe que tem de procurar outra causa para a anormalidade do paciente. Se a criança morrer logo após o nascimento, a análise citogenética pode fornecer dados essenciais para o entendimento do problema, que deverão ser correlacionados com os resultados da necropsia para consubstanciar um diagnóstico.

Infância e idade adulta

Uma concepção errônea comum sobre os distúrbios genéticos é a de que, por serem hereditários, o diagnóstico será óbvio ao nascimento. Na verdade, a apresentação clínica completa de muitos distúrbios leva tempo e pode não se expressar totalmente até uma fase tardia da vida. Em consequência disso, ocorrem alguns dos problemas diagnósticos mais difíceis em crianças e adultos. Além de considerar toda a gama de possibilidades genéticas, as opções moleculares e bioquímicas também têm de ser consideradas.

Genética do câncer

Outra área da medicina em que a citogenética é cada vez mais importante é a oncologia. Embora a grande variabilidade dos achados cariotípicos da maioria dos tumores sólidos dificulte as decisões terapêuticas, existem dados clínicos excelentes para leucemias e linfomas, inclusive rearranjos cromossômicos específicos diretamente associados à tumorigênese (Tab. 69.3; ver Cap. 71; Block, 1998). Os achados do cariótipo foram usados primariamente como confirmação de um diagnóstico clínico, mas o papel da genética no tratamento do paciente mudou extremamente em 2001, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma classificação revista para leucemias e linfomas (Jaffe, 2001). A nova metodologia baseia-se nos dados colhidos por grupos de estudos clínicos que mostraram uma correlação direta entre a presença de várias anormalidades cromossômicas e a resposta do paciente à terapia. Portanto, no sistema de classificação revisto, os achados genéticos, sejam citogenéticos ou moleculares, passaram a ser uma exigência para o diagnóstico definitivo da maioria dos distúrbios hematológicos. Isso serviu para impulsionar a citogenética para a linha de frente dos exames em pacientes oncológicos.

Além do diagnóstico, a análise do cariótipo pode dar outra informação valiosa sobre a doença de um paciente com câncer. Assim que a anormalidade cromossômica é detectada, a progressão da doença pode ser monitorada. Se o tratamento for bem-sucedido, a maioria das anormalidades cromossômicas não será mais evidente na medula óssea e, à medida que o cariótipo parecer "normal", diz-se que o paciente está em remissão oncológica. No entanto, se o tratamento não eliminar completamente a linhagem celular aberrante, a remissão pode ser um

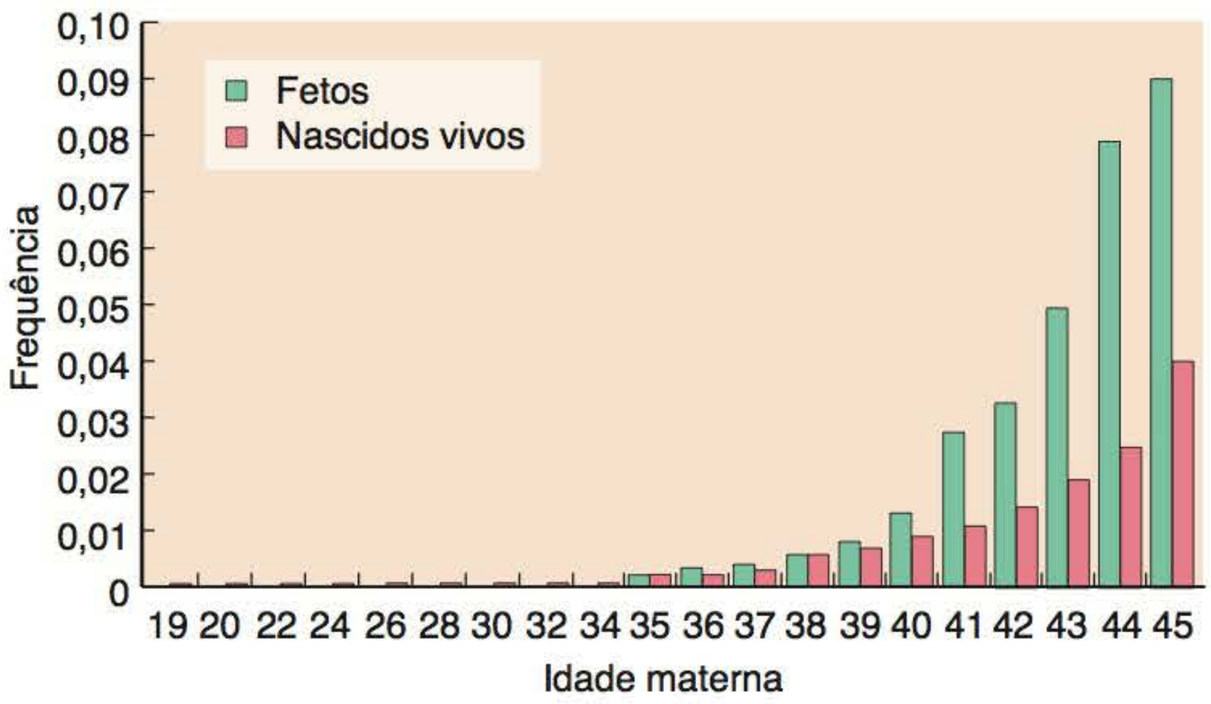


Figura 69.18 Maior risco de concepção de uma criança com síndrome de Down conforme a idade materna avançada. O número de nascidos vivos com essa síndrome é menor em razão da intervenção do diagnóstico pré-natal seguido pela interrupção de gestações anormais em mulheres de idade avançada.

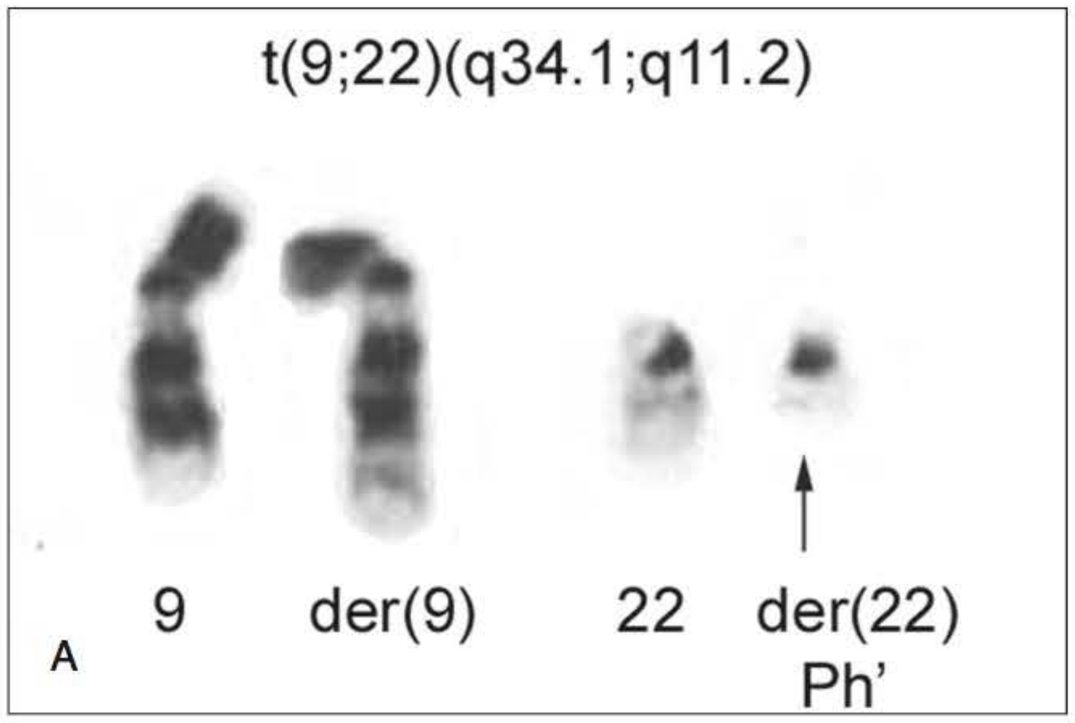
Tabela 69.3 Rearranjos citogenéticos comuns na leucemia e no linfoma

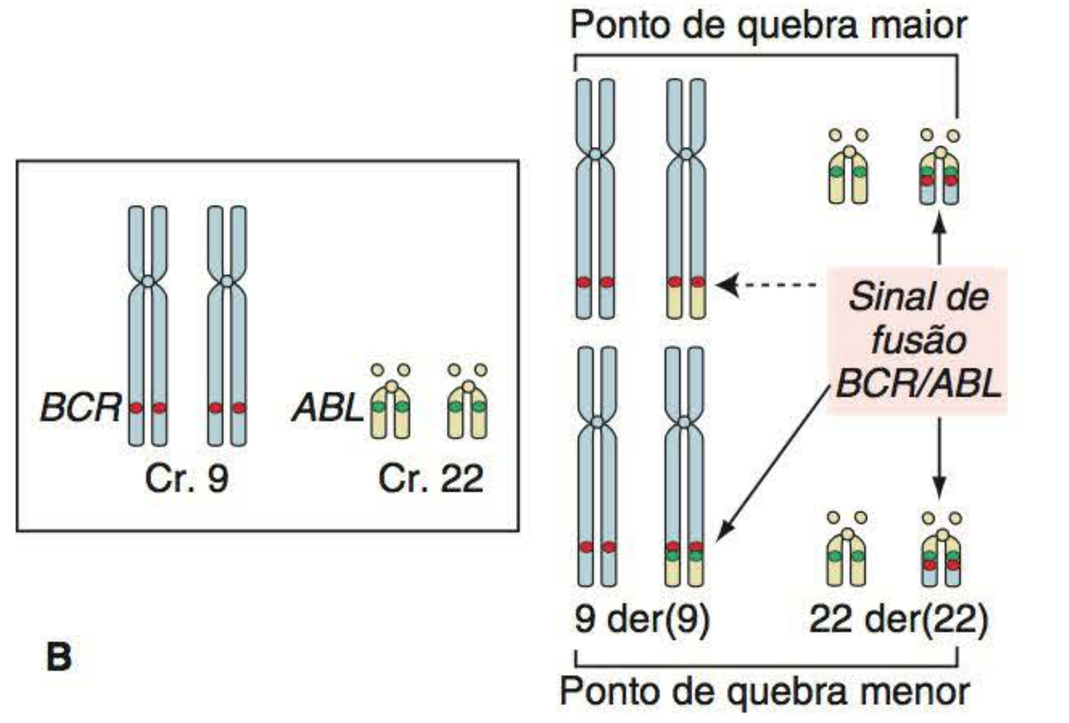
Distúrbio	Rearranjo(s) cromossômico(s)	Genes envolvidos	Classificação FAB (se diferente)
Doenças mieloproliferativas crônicas			
Leucemia mielógena crônica (crônica)	t(9;22)(q34.1;q11.2)	*ABL; BCR*	
Leucemia mielógena crônica (fase acelerada ou de blasto)	+8, i(17q), +19, + Ph'		
Policitemia vera	+8, +9, del(20q), del(13q)		
Mielofibrose idiopática crônica	+8, –7, del(7q), del(11q), del(13q), del(20q)		
Trombocitemia essencial	+8, del(13q)		
Síndromes mielodisplásicas			
Síndrome mielodisplásica com del(5q) isolada	del(5)(q13q33), del(5)(q22q33)		síndrome 5q–
Leucemia mielomonocítica crônica	–7, del(7q),+8, anormalidades de 12p		
Anemia refratária, anemia refratária com sideroblastos em anel, anemia refratária com excesso de blastos	–5, del(5q), –7, del(7q), +8, del(20q)		
Leucemia mieloide aguda (LMA) com anormalidades citogenéticas recorrentes			
LMA com t(8;21)	t(8;21)(q22;q22)	*LMA1; ETO*	LMA-M2
LMA com inversão ou translocação 16	inv(16)(p12q22), t(16;16)(p13;q22)	*CBFβ; MYH11*	LMA-M4Eo
Leucemia pró-mielocítica aguda	t(15;17)(q22;q12)	*PML; RARα*	LMA-M3
LMA com anormalidades de 11q23 (*MLL*)	t(9;11)(p21;q23), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3),	AF9; *LLM* *LLM; ENL*	LMA-M5
LMA com displasia de múltiplas linhagens	–5, del(5q), –7, del(7q), +8, del(11q), del(20q), +21, translocações envolvendo 3q21 e 3q26, t(9;22)(q34.1;q11.2)	AML-M1, AML-M6	
Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor B			ALL-L1/L2
	t(1;19)(q23;p13.3)	*PBX; E2A*	
	t(9;22)(q34;q11.2)	*ABL; BCR*	
	11q23 rearranjos, incluindo:	*MLL*	
	t(1;11)(p32;q23)	*AF1P; MLL*	
	t(4;11)(q21;q23)	*AF4; MLL*	
	t(11;19)(q23;p13)	*MLL; ENL*	
	t(12;21)(p13q22)	*TEL; AML*	
	Hiperdiploidia (número modal 50–56)		
Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor T			ALL-L1/L2
	Rearranjos em 14q11.2, 7q35, e de 7p14–15	*Loci* receptores de célula T	
	del(9p)	*CDKN2A*	
	translocações em 1p32	*TAL1*	
Neoplasias de célula B madura			
Leucemia linfocítica crônica/leucemia linfocítica pequena	+12, del13q, del11q23–24, 14q+, del17p13		
Linfoma linfoplasmocítico/macroglobulinemia de Waldenström	t(9;14)(p13;q32)	*PAX5; IGH*	
Mieloma plasmacítico	t(11;14)(q13;q32)	*CCND1; BCL1*	
Linfoma de célula B da zona marginal (MALT)	+3, t(11;18)(q21;q21)		
Linfoma folicular	t(14;18)(q32;q21), t(18;22)(q21;q11.2), +7, +18, del(6q), del/t(3)(q27)	*IGH; BCL2 BCL2; IGL*	
Linfoma de células de revestimento	t(11;14)(q13;q32)	*CCND1; BCL1*	
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	*MYC; IGH*	
	t(2;8) (p12;q24)	*IGK; MYC*	
	t(8;22)(q24;q11.2)	*MYC; IGL*	

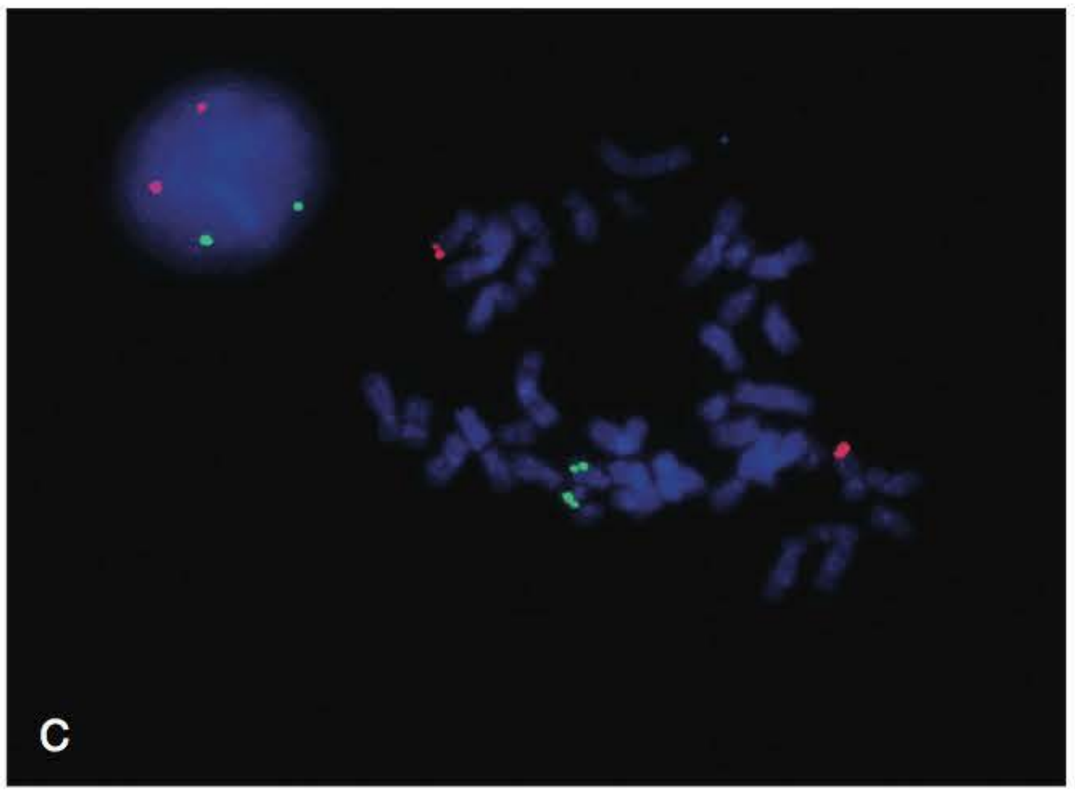
mero interlúdio em que as células causadoras da doença são suprimidas a níveis tão baixos que deixam de ser detectáveis em análises rotineiras do cariótipo. Ao ocorrer recidiva, as mesmas anomalias cromossômicas reaparecem e podem ser acompanhadas por outras anormalidades e/ou linhagens celulares mais complexas, achados consistentes com progressão da doença. Um aumento na complexidade com o tempo é conhecido como evolução cariotípica. Em geral, um prognóstico desfavorável e a gravidade da doença estão diretamente relacionados com o número e o tipo de anormalidades cromossômicas vistas.

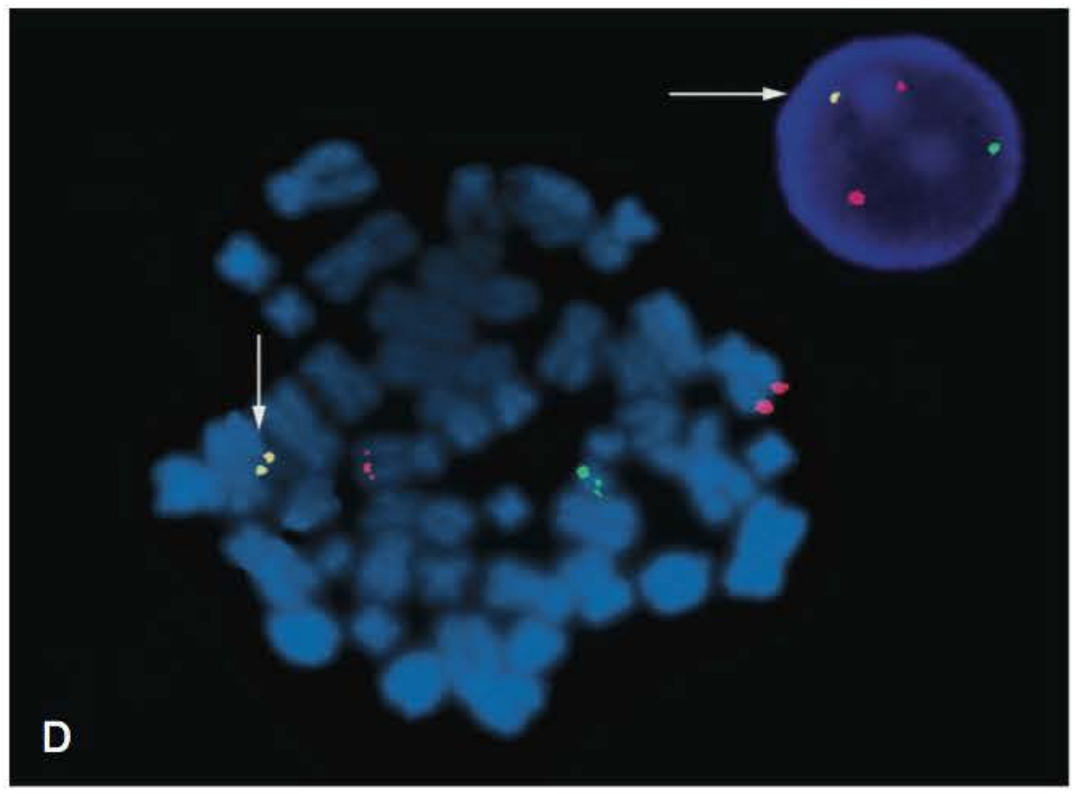
A FISH tornou-se um recurso valioso nos estudos de oncologia clínica, com muitas sondas comercialmente disponíveis (Cremer, 1988; Anastasi, 1991). Podem ser feitos estudos com células na interfase ou na metáfase, e a escolha baseia-se no tipo de dados desejados. Em geral, é preferível usar células na interfase, porque proporcionam uma amostra muito maior e que pode ser avaliada rapidamente, dando resultados com maior nível de significado estatístico (Werner, 1997).

No caso de translocações, foi desenvolvida uma combinação de sondas para FISH que hibridizam lados opostos dos pontos de ruptura da translocação. Há duas estratégias comuns empregadas para detectar uma translocação. Pode ocorrer desdobramento dos sinais se a translocação separar duas sondas, gerando dois sinais de cores diferentes, em vez do sinal original de uma única cor. Também pode ocorrer fusão se a translocação resultar na relocalização das sondas, aproximando duas sondas diferentes e gerando a fusão de duas cores que cria uma nova cor. Por exemplo, a tecnologia de FISH por fusão foi usada para identificar a translocação 9;22 na leucemia. Esse rearranjo caracteriza-se por uma translocação entre o proto-oncogene *ABL* no cromossomo 9 (9q34.1) e o gene *BCR* no cromossomo 22 (22q11.2) (Fig. 69.19A), que produz um gene quimérico associado à doença no cromossomo 22 derivado, também conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph') (ver também Cap. 71). A translocação é vista na leucemia mieloide crônica (LMC), na leucemia mieloide aguda (LMA) e na leucemia linfoblástica









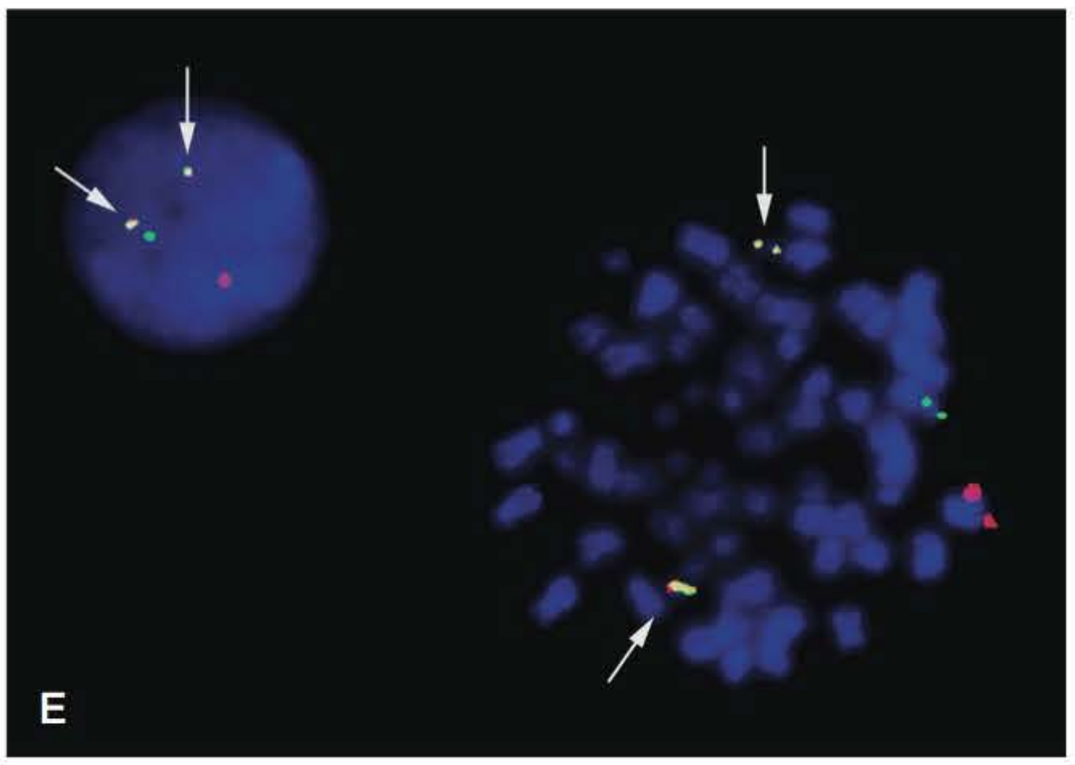


Figura 69.19 Detecção pela FISH da translocação 9;22 na LMC. *A*, cromossomos bandeados mostrando a translocação 9;22. O cromossomo 22 derivado é conhecido como Ph' ou cromossomo Philadelphia. *B*, diagrama mostrando a detecção pela FISH de uma célula normal sem translocação (à esquerda) e rearranjos dos pontos de quebra maior (M-bcr) e menor (m-bcr). Na parte superior à direita, vê-se o sinal padrão da translocação M-bcr: cr. 9 — sinal vermelho, der(9) — sinal vermelho parcial com material do cromossomo 22 abaixo (amarelo) (seta tracejada), cr. 22 — sinal verde e der(22), o cromossomo Ph' com um sinal de fusão verde-vermelho *BCR-ABL* e material do cromossomo 9 abaixo. A seta inferior mostra o sinal padrão m-bcr: cr. 9 — sinal vermelho, der(9) — sinal de fusão vermelho-verde e material do cromossomo 22 abaixo, cr. 22 – sinal verde e der(22) – sinal de fusão com material do cromossomo 9 abaixo. *C* a *D*, imagens reais da FISH. *C*, nenhuma translocação está presente, como se pode observar pelas duas cópias de sondas do cromossomo 9 (em vermelho) e do cromossomo 22 (em verde), ambas em células na interfase (à esquerda) e na metáfase (à direita). *D*, células com uma translocação M-bcr detectada pelo único sinal de fusão amarelo (seta) mais um verde, um vermelho grande e um vermelho pequeno (metáfase à esquerda e interfase à direita). *E*, células com uma translocação m-bcr detectada pelos dois sinais de fusão amarelos (setas) mais um verde e um vermelho (metáfase à direita e interfase à esquerda).

aguda (LLA) (Tab. 69.3) e, em termos citogenéticos, parece ser a mesma em todas as doenças. Entretanto, em nível molecular, a translocação pode ser separada em duas classes: (1) o rearranjo do ponto de quebra maior (*M-bcr*), que resulta em uma proteína quimérica de 210 kD (mais comum na LMC), e (2) o rearranjo do ponto de quebra menor (*m-bcr*), que resulta em uma proteína quimérica de 190 kD (encontrada em alguns adultos e em cerca de 50% das crianças com LLA). Foi elaborado um ensaio de FISH para detectar ambos os rearranjos (Vysis, Inc.). Usa-se um par de sondas: (1) vermelha — localizada no *locus ABL* (cromossomo 9), e (2) verde — localizada no *locus BCR* (cromossomo 22), abrangendo o ponto de quebra m-bcr mais proximal ao ponto de quebra M-bcr. Quando não há translocação, dois sinais verdes (detectando cada alelo *ABL*) e dois sinais vermelhos (detectando cada alelo *BCR*) devem estar presentes em cada célula (Fig. 69.19B e C). Quando ocorre o rearranjo M-bcr, a translocação quebra o cromossomo 22 distal ao sítio de reconhecimento da sonda, de modo que todo o sinal verde permanece no cromossomo 22. No cromossomo 9, a translocação desdobra o sinal vermelho ABL, de modo que um pequeno sinal vermelho é deixado no cromossomo 9 derivado e o restante do sinal vermelho move-se para o cromossomo 22. Isso faz com que um sinal verde e um vermelho se tornem adjacentes no cromossomo 22 derivado (Ph') e, com a resolução do microscópio óptico, os dois sinais se misturam resultando em um único sinal de fusão amarelo. Portanto, uma célula com uma translocação M-bcr terá quatro sinais: um verde (cromossomo 22), um vermelho grande (cromossomo 9), um vermelho pequeno (cromossomo 9 rearranjado) e um sinal de fusão amarelo que detecta o cromossomo Ph' (Fig. 69.19B e D). O rearranjo m-bcr é um pouco diferente. O cromossomo 22 é quebrado no sítio de reconhecimento da sonda verde, de maneira que uma parte do sinal verde ficará no cromossomo 22, mas a

segunda parte irá mover-se para o cromossomo 9 derivado. O sítio da sonda vermelha no cromossomo 9 é fendido conforme já foi descrito, com uma parte permanecendo no cromossomo 9 e uma segunda parte movendo-se para o cromossomo 22. Assim, essa translocação recíproca resulta em dois sinais de fusão amarelos (o 9 derivado é vermelho está fundido ao verde; o 22 derivado é verde e está fundido ao vermelho). O resultado final do ensaio FISH com m-bcr é o surgimento de quatro sinais: um verde (cromossomo 22), um vermelho (cromossomo 9) e dois sinais de fusão amarelos detectando a translocação 9;22 (Fig. 69.19B e E). Determinar qual dos dois rearranjos está presente na amostra de um paciente simplifica o diagnóstico e leva à metodologia de tratamento mais apropriada para o indivíduo. Outros ensaios de detecção com FISH usando outras sondas de genes específicos de doença podem ser designados para avaliar a ampla variedade de cânceres diferentes relacionados com rearranjos cromossômicos.

Além disso, pode ser fácil detectar aneuploidias cromossômicas em células cancerosas. Por exemplo, (1) o uso de uma sonda de centrômero específica do cromossomo 12 na triagem de uma população de células na interfase para detectar trissomia do 12 com células indicativas de LLC, (2) o uso de uma sonda do cromossomo 7 para detectar monossomia do 7 na síndrome mielodisplásica e LMA, e (3) o uso de uma sonda do cromossomo 8 para identificar trissomia do 8 em distúrbios crônicos e agudos. O uso de sondas de X e Y de cores diferentes para avaliar o sucesso de um transplante de medula óssea quando o doador e o receptor são de sexos opostos também foi muito bem-sucedido. Após o transplante, um homem que recebeu células de uma mulher doadora apresentou um complemento XX. A falha na implantação pode ser assinalada pela presença de uma alta frequência de células XY. Pode-se repetir a FISH a intervalos regulares para monitorar o progresso e saber logo se a população de células leucêmicas do paciente começou a proliferar.

No início, os clínicos estavam preocupados com os resultados aparentemente discrepantes da análise do cariótipo e da FISH na mesma amostra do paciente. Pelo cariótipo, um paciente com LMC pode mostrar todas as células com t(9;22), mas apenas 30% das células serão positivas para a translocação pela FISH na interfase. Esses dados são realmente consistentes. O cariótipo só pode ser feito com células em divisão e, como as células cancerosas tendem a dividir-se frequentemente, é típico a análise do cariótipo mostrar 100% de células leucêmicas. Já a FISH detecta todas as células nucleadas, mas nem todas as células em uma amostra da medula óssea são do clone doente. Um indivíduo acometido também terá uma população de células normais. A FISH na interfase pode quantificar os números relativos de células normais e doentes, fornecendo, assim, uma estimativa mais acurada do acometimento pela doença na população total. Isso pode ser usado com vantagem para monitorar a resposta de um paciente ao tratamento. Com o tempo, exames com amostras sequenciais podem mostrar uma redução na população de células doentes, e a recidiva irá refletir-se em um aumento na população de células leucêmicas. Assim, é importante fazer tanto a análise do cariótipo como a FISH com uma amostra diagnóstica. O cariótipo define as anormalidades cromossômicas presentes e a FISH estabelece a frequência basal do(s) clone(s) leucêmico(s). Tais dados podem ser usados como ponto de referência para todo exame futuro do paciente.

A FISH multicolorida também tem sido usada para avaliar linhagens de células leucêmicas. Os dados obtidos sugerem que as células cancerosas, na verdade, sofrem um grau significativamente maior de rearranjo cromossômico do que se pensava. Espera-se que a detecção de algum dos novos rearranjos forneça indícios de novos genes relacionados ao câncer (Veldman, 1997).

Distúrbios citogenéticos

Síndromes de aneuploidia cromossômica

Aneuploidias autossômicas

A causa mais comum de retardamento mental é a trissomia do 21 ou a síndrome de Down, distúrbio com incidência de 1 em 700 nascimentos e que se caracteriza por hipotonia, fácies plana, fissuras palpebrais inclinadas, orelhas pequenas, língua protrusa, crista palmar transversal, defeitos cardíacos e hipogonadismo. Cerca de 92,5% de todos os indivíduos com síndrome de Down têm 47 cromossomos, incluindo 3 cópias do cromossomo 21, o que resulta de um erro de não disjunção na meiose parental. Apenas menos de 3% dos pacientes tendem a expressar um fenótipo mais discreto, tendo-se demonstrado que eram mosaicos com duas linhagens celulares (47,XX,+21/46,XX ou 47,XY,+21/46,XY) e cerca de 5% dos pacientes com síndrome de Down têm apenas 46 cromossomos, pois o 21 extra é parte de uma translocação robertsoniana ou outra. Uma criança com uma translocação, em geral, é indicativa de que um dos pais é portador da translocação, de maneira que, em tais casos, a análise do cariótipo de ambos os pais é apropriada para determinar se o casal corre o risco de ter outros filhos com síndrome de Down no futuro. Embora seja mais comum um paciente com síndrome de Down ter três cópias completas do cromossomo 21, estudos moleculares feitos com indivíduos que tinham rearranjos no cromossomo 21 mostraram claramente que só é necessário ter três cópias da região do cromossomo 21 abrangendo as bandas 21q22.12–21q22.3, a região crítica para a síndrome de Down (Fig. 69.20) (Korenberg, 1990; Delabar, 1993).

As outras duas trissomias de nascidos vivos são a do 13 e a do 18. A *trissomia do 13*, síndrome de Patau, com incidência de 1 em 4.000 a 1 em 10.000 nascimentos caracteriza-se por cabeça pequena, fenda labial e/ou palatina, ciclopia, crista palmar transversa, polidactilia nas mãos ou pés, calcanhar proeminente, defeito do septo ventricular e escalpo afundado. A *trissomia do 18*, ou síndrome de Edwards (Fig. 69.21A), é vista em aproximadamente 1 de 8.000 recém-nascidos, com as características incluindo baixo peso ao nascimento, boca e mandíbula pequenas, hipoplasia dos músculos, occipício proeminente, orelhas mal formadas e de baixa implantação, pés chatos e dedos cruzados.

Apesar de suas consequências clínicas frequentemente graves, a síndrome de Down em geral é bastante tratável e os pacientes vivem até a segunda ou terceira década de vida. A trissomia do 13 e a do 18 são consideravelmente menos compatíveis com a vida e os pacientes em geral morrem no primeiro mês de vida. Quando um indivíduo sobrevive ao primeiro ano, o quadro é desalentador, pois os pacientes não aprendem a falar, a andar nem a cuidar de si mesmos. Por isso, o aconselhamento dos casos diagnosticados no pré-natal de trissomias do 13 e do 18 inclui a interrupção da gestação.

Aneuploidias de cromossomos sexuais

As aneuploidias de cromossomos sexuais são relativamente comuns (frequência geral de 1 em 500 nascimentos) e fenotipicamente mais brandas que as aneuploidias autossômicas, por causa do efeito da inativação do X e do número limitado de genes presentes no cromossomo Y. Quatro distúrbios, incluindo três trissomias e uma monossomia, são responsáveis pela maioria dos casos. Todos resultam de erros de não disjunção na meiose e, exceto no caso do XYY que é exclusivamente paterno, os outros distúrbios podem resultar de erro materno ou paterno.

Os cariótipos aberrantes de indivíduos com três cromossomos X (mulheres 47,XXX) ou com um cromossomo X e dois cromossomos Y (homens 47,XYY) em geral não serão detectados por toda a vida. A incidência é relativamente alta, de 1 em 1.000 nascimentos, mas, além de serem mais altos que a média, não há aspectos marcantes indicativos de uma anormalidade cromossômica. Alguns indivíduos têm dificuldades generalizadas de aprendizado e, assim, podem ser identificados em programas escolares de seleção. Mulheres XXX e homens XYY também são detectados nas clínicas de infertilidade, embora a anormalidade citogenética não esteja relacionada com a razão do encaminhamento, daí avaliações abrangentes terem mostrado que esses indivíduos são completamente férteis e, em geral, têm filhos cromossomicamente normais. Homens XYY correm maior risco de problemas comportamentais, com os primeiros estudos tendo sugerido que também tenham tendências criminais, pois há uma incidência maior do que a esperada de XYY naqueles encontrados em instituições penais (Jacobs, 1968; Price, 1970). Todavia, trabalho subsequente demonstrou que: (1) as conclusões do estudo original tiveram vieses por causa de um erro de amostragem, (2) é mais provável que a criminalidade se deva a uma combinação de múltiplas causas e (3) os homens XYY não são mais propensos a um comportamento criminal que os demais (Witkin, 1976; Pitcher, 1982; Theilgaard, 1984).

Homens com a síndrome de Klinefelter (47,XXY) tendem a ser magros de alta estatura, terem as pernas relativamente longas, embora

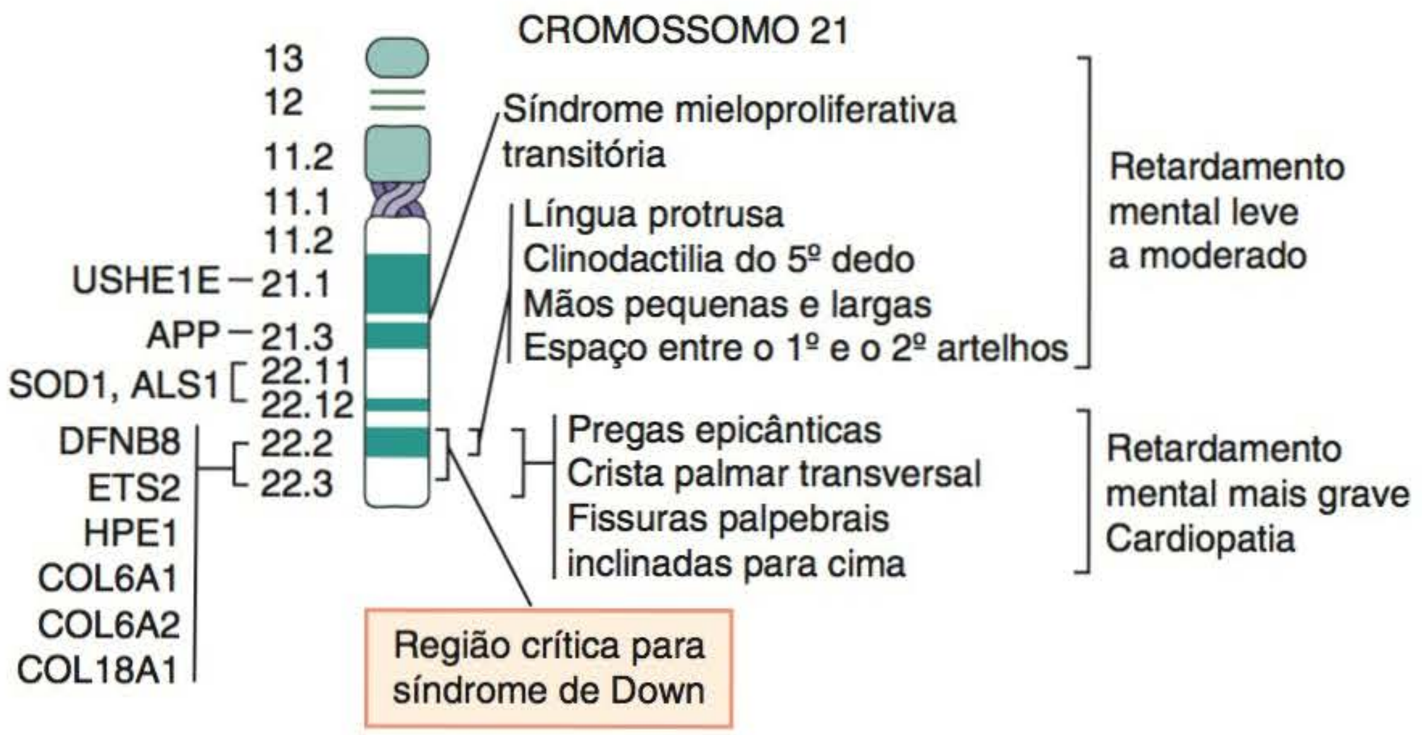


Figura 69.20 Mapa do cromossomo 21 mostrando a região crítica da síndrome de Down e posições relativas dos *loci* associados a vários aspectos clínicos à direita. À esquerda, são mostrados outros *loci* mapeados. ALS1 = esclerose lateral amiotrófica; APP = proteína amiloide β-precursora (associada à doença de Alzheimer); COL6A1/COL6A2/COL18A1 = genes de colágeno; DFNB8 = surdez 8; ETS2 = oncogene *ETS-2*; HPE1 = holoprosencefalia alobar-1; SOD1 = superóxido dismutase-1; USH1E = síndrome de Usher. (Fonte: dados de Korenberg, 1990; Delabar, 1993; OMIM, 1999.)

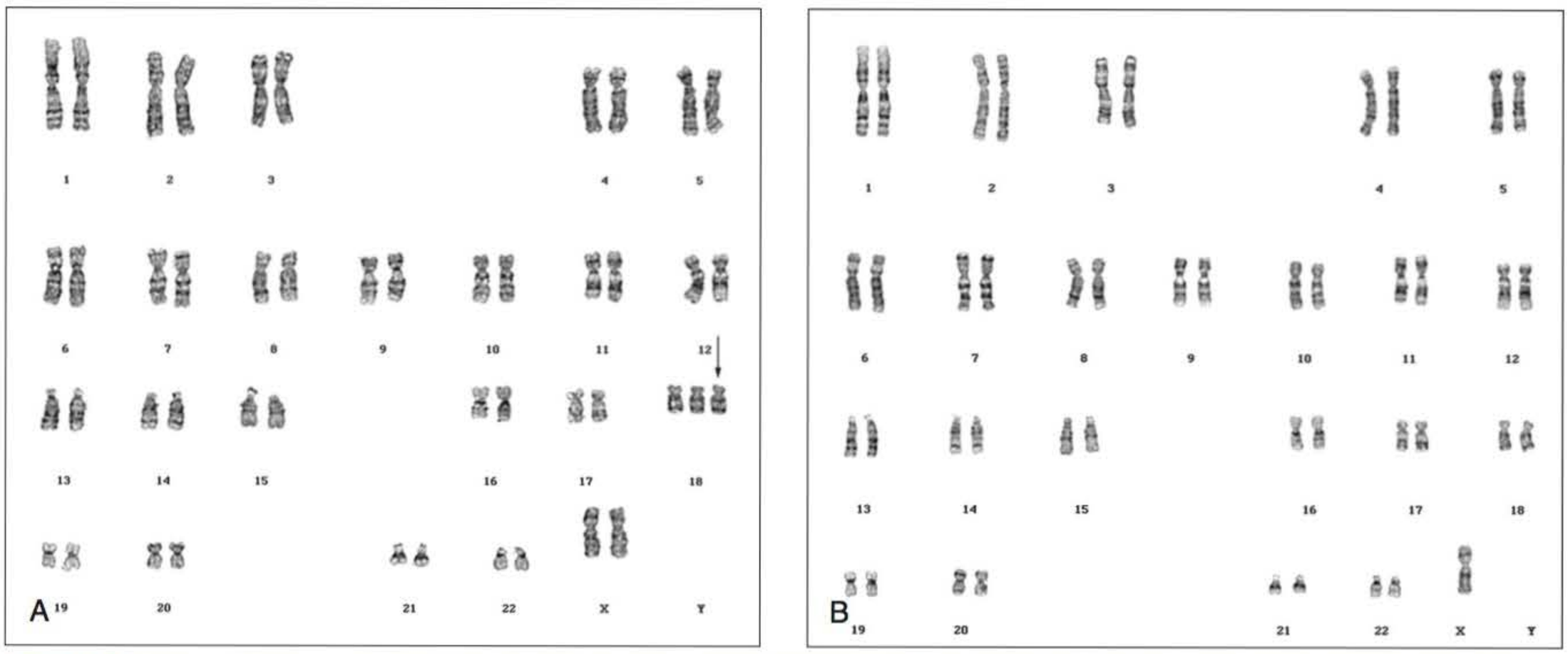


Figura 69.21 Cariótipos das síndromes cromossômicas numéricas. *A*, síndrome de Edwards (trissomia do 18): 47,XX,+18. *B*, síndrome de Turner (monossomia do X): 45,X.

no início da vida tais achados raramente os segreguem dos demais. Alguns são identificados na escola, por conta de suas dificuldades de aprendizado, porém, a razão mais comum para encaminhamento é o hipogonadismo pós-puberal, o desenvolvimento de mamas semelhantes às femininas e infertilidade por causa de testículos pequenos, túbulos testiculares hialinizados e azoospermia. Uma forma de síndrome de Klinefelter mais branda, com o potencial de fertilidade devido ao desenvolvimento normal dos testículos, é vista em indivíduos com um complemento de cromossomo em mosaico que inclui uma linhagem celular 46,XY (47,XXY/46,XY). A proporção relativa de células XY e XXY durante a determinação do sexo no zigoto inicial e nos testículos é a chave para a fertilidade. Um excesso de células XXY leva o indivíduo na direção da Klinefelter verdadeira, enquanto números maiores de células XY devem moderar o fenótipo e aumentar a probabilidade de fertilidade.

A aneuploidia de cromossomo sexual mais comumente reconhecida com um fenótipo feminino é 45,X: síndrome de Turner (Fig. 69.21B). Na determinação do sexo, o desenvolvimento feminino normal depende da presença de dois cromossomos X ativos. A região crítica para a diferenciação feminina foi limitada à região do braço curto do X, proximal ao centrômero. Se tal região for perdida ou inativa, o resultado é uma pessoa com síndrome de Turner. Cerca de metade de todas as pacientes com essa síndrome têm o clássico complemento cromossômico 45,X, que representa a única monossomia viável em um nascido vivo. O único cromossomo X em geral é de origem materna, indicando que a fonte mais comum de erro é uma não disjunção meiótica paterna. Além do 45,X, também são possíveis cariótipos mais complexos (Tab. 69.4) (Palmer, 1976). A maior preocupação é com indivíduos

Tabela 69.4 Distribuição dos diferentes complementos cromossômicos que originam a síndrome de Turner

Ocorrência (%)	Anomalia cromossômica
50	45,X
20	46,X,i(Xq)
15	Deleções do cromossomo X ou anéis, ou a presença de um cromossomo Y
10	Mosaicos: 45,X/46,XX; 45,X/46,XY

que possuem um cromossomo Y completo ou parcial em pelo menos uma linhagem celular, que correm maior risco de gonadoblastoma.

O fenótipo da síndrome de Turner é altamente variável. É comum as pessoas acometidas terem baixa estatura (< 150 cm), disgenesia gonádica e dificuldades de aprendizado. Outros aspectos comuns incluem pescoço alado, resultante de higroma cístico *in utero*, linha de implantação posterior dos cabelos baixa, anomalias cardíacas e renais, cúbito valgo (maior angulação do cotovelo) e tórax em escudo. Ao nascimento, os pacientes podem ter edema das mãos e dos pés. Pacientes com síndrome de Turner geralmente têm inteligência normal, embora isso possa variar e algumas tenham problemas mentais importantes. Além disso, embora a infertilidade seja um padrão na síndrome de Turner, sabe-se agora que alguns pacientes, em geral aqueles com cariótipo mosaico, podem se reproduzir. Com o uso de tecnologias de doação de óvulos, uma paciente com síndrome de Turner pode levar uma gestação a termo e ter um filho normal. Portanto, em razão da grande diver-

sidade de apresentação, o aconselhamento pré-natal a um casal com um feto identificado como tendo síndrome de Turner é extremamente difícil. Entretando, geralmente, a maioria dos nascidos com síndrome de Turner pode ter uma vida produtiva, e aqueles com acometimento discreto podem não saber que têm a doença até a puberdade.

Outras anormalidades dos cromossomos sexuais

A determinação do sexo em humanos resulta de uma via bioquímica complexa que envolve a interação de proteínas produzidas por genes presentes nos autossomos e os cromossomos X e Y. O sexo padrão em humanos é o feminino, de modo que, na ausência de quaisquer estímulos determinantes masculinos, desenvolve-se um indivíduo feminino. O desencadeador primário do desenvolvimento masculino é um gene localizado no braço curto do cromossomo Y, designado *TDF*, o fator determinante de testículos, que está situado na região determinante do sexo do cromossomo Y (*SRY*) (Fig. 69.22).

A proteína produzida pelo *TDF* inicia a via do desenvolvimento masculino. Foram identificados vários distúrbios associados a mutações em genes diferentes dentro dessa via, podendo resultar em genitália ambígua ou incompatibilidade do genótipo com o fenótipo (homem fenotípico com um complemento cromossômico sexual XX ou mulher fenotípica com um complemento XY).

Um homem XX em geral pode ser atribuído a uma de duas causas, a mais comum sendo a virilização de um feto feminino em decorrência do distúrbio autossômico recessivo hiperplasia suprarrenal congênita (HSC). O defeito na HSC é a falta da enzima 21-hidroxilase. Sem essa enzima, a via biossintética normal é bloqueada e os andrógenos se acumulam no corpo. Níveis excessivos de hormônios masculinos na circulação feminina podem resultar em um lactente com aspecto masculino, apesar do complemento cromossômico feminino. Além disso, como os androgênios são capazes de atravesar a placenta, um feto feminino normal pode desenvolver genitália ambígua em razão da exposição ao excesso de hormônios da mãe com HSC.

Um homem fenotípico com complemento cromossômico sexual XX também pode resultar de uma translocação críptica entre os cromossomos X e Y. As extremidades distais dos braços curtos dos cromossomos X e Y são homólogas e compreendem o que se convencionou denominar regiões pseudoautossômicas (Fig. 69.22), que são o sítio primário de pareamento do X com o Y durante a meiose, podendo ocorrer recombinação entre alelos X e Y. Raramente ocorre um evento de recombinação fora dos limites da região pseudoautossômica, resultando na transferência de *loci* únicos do Y, incluindo *SRY*, na ponta do cromossomo X. A quantidade de material cromossômico envolvida nessa alteração é extremamente pequena e não pode ser detectada pelos meios citogenéticos. Contudo, se esse indivíduo masculino transmitir esse cromossomo X rearranjado para uma prole que tenha recebido um X da mãe, a criança resultante terá um aparente complemento cromossômico XX, mas será um indivíduo masculino em termos fenotípicos, com Klinefelter devida à presença do gene *TDF* que dispara a via de desenvolvimento masculino.

A recíproca da translocação descrita anteriomente pode resultar em um indivíduo do sexo feminino com síndrome de Turner e um complemento XY aparente. A via de desenvolvimento masculino não será iniciada em um indivíduo com um cromossomo Y que não tenha *TDF/SRY*, e a determinação do sexo feminino irá falhar. Todavia, a ausência de duas cópias intactas do braço proximal do X impedirá o desenvolvimento feminino "normal", resultando em um indivíduo com síndrome de Turner. Tal situação é bastante rara. O achado mais comum, no caso de um indivíduo feminino XY, é insensibilidade ao androgênio, também conhecida como "feminização testicular". Em tais indivíduos, o cromossomo Y está intacto e o *TDF* está presente e funcional. O problema é uma mutação do gene receptor de androgênio localizado no braço longo do cromossomo X (Xq21.3), que faz com que não se produza proteína receptora de androgênio. O *TDF* inicia o desenvolvimento masculino, mas a via será bloqueada no ponto onde a proteína receptora de androgênio é necessária para formar um complexo entre a testosterona e a di-hidrotestosterona. Sem essa etapa essencial, a diferenciação masculina adicional não é possível, e o fenótipo voltará a ser feminino. No entanto, esses indivíduos são inférteis por causa da ausência de qualquer genitália funcional e comumente apresentam uma vagina cega e testículos no abdome ou no canal inguinal.

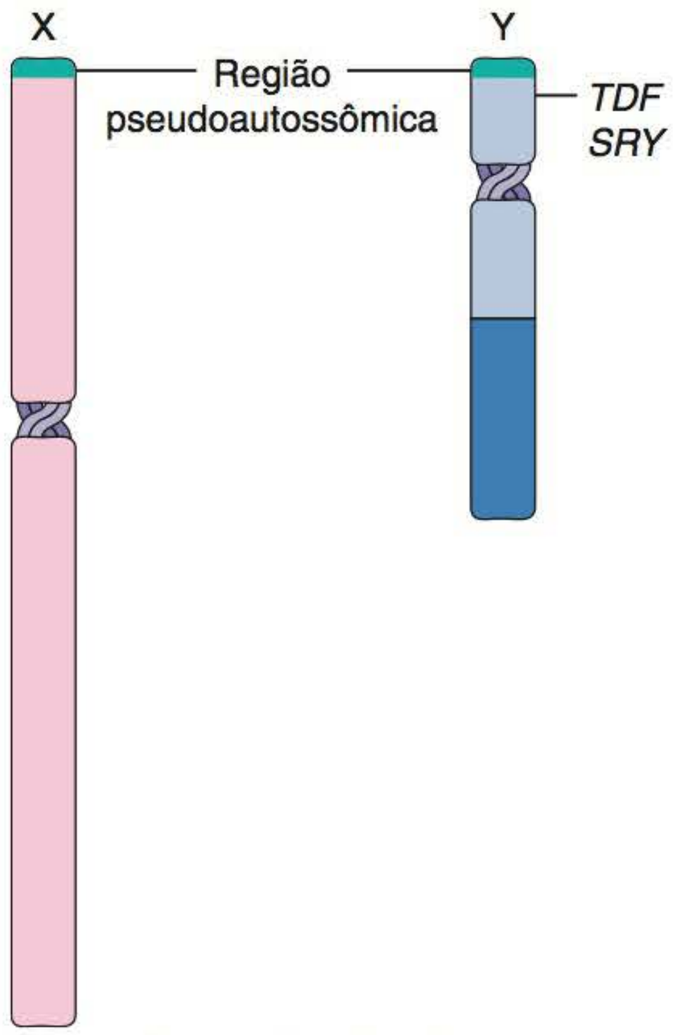


Figura 69.22 Diagrama das localizações relativas de *TDF*, *SRY* e as regiões pseudoautossômicas dos cromossomos X e Y.

Anomalias estruturais dos cromossomos

Foi descrito um número razoável de síndromes diretamente relacionadas com uma anormalidade cromossômica estrutural. A maioria delas é bastante rara. Segue-se uma discussão de algumas das síndromes mais comuns (ver também Jones, 2006).

A síndrome de Wolf-Hirschhorn, também conhecida como síndrome do 4p–, deve-se a uma deleção terminal do braço curto do cromossomo 4, del(4)(p16). Os achados clínicos incluem microcefalia, micrognatia hipotonia, pregas epicânticas e atraso do desenvolvimento. O aspecto facial característico lembra um capacete de guerreiro grego, por causa das sobrancelhas arqueadas e do nariz longo. Indivíduos com esse distúrbio precisam de educação especial e correm alto risco de ter convulsões.

A síndrome cri-du-chat ou do 5p–, del(5)(p15), caracteriza-se por um choro alto distinto, semelhante ao miado de gato, na fase de lactente. Outros aspectos incluem baixo peso no nascimento e crescimento subsequente lento, hipotonia, microcefalia, hipertelorismo, pregas epicânticas, anomalias cardíacas e retardamento mental. As crianças acometidas apresentam atraso do desenvolvimento e só conseguem alcançar o nível cognitivo e social de uma criança de 5 ou 6 anos de idade.

Síndromes de microdeleção e síndromes de genes contíguos

Por definição, uma microdeleção é uma deleção muito pequena, em geral apenas uma fração de uma única banda cromossômica. Microdeleções podem ser confundidas com deleções moleculares, daí a importância de reconhecer que, embora pequenas, são significativamente maiores (> 500 kb) do que a deleção molecular típica (um par de bases [bp] a várias centenas de bp), o que só pode ser resolvido pela tecnologia molecular (ver Cap. 72). O tamanho real de uma microdeleção pode variar de um paciente para outro, algumas sendo grandes o bastante para serem identificadas pela análise do cariótipo, embora a maioria requeira FISH. Ainda que originalmente se pensasse que eram deleções em genes únicos, já se demonstrou que certas síndromes na verdade devem-se a deleções que abrangem partes de vários genes adjacentes não relacionados. Portanto, a apresentação clínica pode ser uma combinação de aspectos decorrentes da ausência de diferentes produtos gênicos. O tamanho da deleção e o número de genes afetados podem variar, de modo que o fenótipo expresso pode diferir significativamente entre os indivíduos. Tomadas em conjunto, estas são denominadas *síndromes de genes contíguos*. Inclusas nesse grupo estão muitas das sín-

Tabela 69.5 Microdeleção e síndromes de genes contíguos

Distúrbio	Localização	Genes	Achados clínicos
Síndrome de Angelman	15q11.2	*UBE3A*	RM grave, atraso do desenvolvimento, boca grande, prognatia, ataxia, convulsões
Síndrome de DiGeorge	22q11.2, 10p, 4q, 6q	*?GCSL* + outros?	Fácies característica, fenda palatina, defeito cardíaco, hipoplasia do timo e das paratireoides, hipocalcemia grave, convulsões
Ictiose	Xp22.32	*STS*	Descamação cutânea, baixa estatura, hipogonadismo, RM
Síndrome de Kallmann	Xp22.3	*KAL1*	Hipogonadismo, anosmia
Síndrome de Langer-Giedion	8q24.11–q24.13	*TRPSI* *TRPSII* *EXT*	Dismorfismo craniofacial, anormalidades esqueléticas, retardamento mental discreto a grave
Lissencefalia	17p13.3	*LIS1*	Cérebro liso, retardamento profundo, convulsões
Síndrome de Miller-Dieker	17p13.3	*LIS1* ?outro(s)	Lissencefalia, microcefalia, fronte alta, nariz pequeno, micrognatia, implantação baixa das orelhas
Síndrome de Prader–Willi	15q11.2	*SNRPN*	Hipotonia ao nascimento, olhos amendoados, RM moderado a grave, ausência de saciedade, levando a exacerbação do apetite, mãos e pés pequenos, hipogonadismo
Retinoblastoma	13q14.1-q14.2	*Rb1*	Tumores dos retinoblastos do olho
Síndrome de Rubinstein-Taybi	16p13.3	*CBP*	Nariz adunco, columela proeminente, maxila hipoplásica, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, polegares e primeiros artelhos largos, RM, atraso na fala
Síndrome de Smith-Magenis	17p11.2		Braquicefalia, hipoplasia do meio da face, ponte nasal larga, mandíbula proeminente, mãos curtas e largas, hiperatividade, atraso da fala, comportamento autodestrutivo, RM
Síndrome velocardiofacial	22q11.2	*?GCSL*	Defeitos palatais, narinas hipoplásicas com nariz longo, deficiência auditiva, cardiopatia congênita
WAGR	11p13.3	*WT1* *AN2* ? outros	Tumor de Wilms, aniridia, defeitos geniturinários e retardamento mental
Síndrome de Williams	7q11.2	*ELN*	QI baixo, hipersensibilidade a sons, olhos azuis com padrão estrelado na íris, lábios proeminentes, voz rouca, estenose aórtica supravalvular ou outro defeito cardíaco, hipercalcemia, envelhecimento prematuro da pele

RM = retardamento mental.

dromes de microdeleção (Tab. 69.5) e também as síndromes de deleção clássica (maior), como a de Wolf-Hirshhorn e a de cri-du-chat.

A síndrome de Miller-Dieker ilustra com clareza a sobreposição entre síndromes de microdeleção e de genes contíguos. Tal distúrbio foi associado a uma microdeleção do braço curto distal do cromossomo 17 (17p13.3) e as características clínicas cardinais são lissencefalia (cérebro pequeno) e anomalias craniofaciais. A lissencefalia isolada também foi reconhecida como uma entidade independente, de modo que a síndrome de Miller-Dieker é uma apresentação mais complexa, que acopla o defeito cerebral com os aspectos faciais característicos. A análise molecular mostrou que há pelo menos dois genes envolvidos na síndrome de Miller-Dieker, daí ser uma verdadeira síndrome de genes contíguos, decorrente de uma microdeleção. Uma deleção menor apenas do gene *LIS1* resultaria em lissencefalia isolada (Ledbetter, 1992).

A síndrome de Prader-Willi e a síndrome de Angelman são as síndromes de microdeleção mais bem conhecidas. Ambas compartilham a mesma deleção intersticial do braço longo proximal do cromossomo 15, del(15)(q11.2q11.2), mas as apresentações clínicas são significativamente diferentes. Os pacientes com a síndrome de Prader-Willi são pequenos e hipotônicos ao nascimento, mas mudam no primeiro ano de vida e começam a ganhar peso rapidamente. Se não forem colocados sob uma dieta controlada, podem ficar bastante obesos por comerem demais. Outras características incluem mãos e pés pequenos, hipogonadismo e um temperamento ruim. Embora apresentem desenvolvimento retardado, a maioria apresenta bom desempenho nas aulas de educação especial. Por causa de seu comportamento e da dificuldade de controlar sua alimentação, podem ser colocados em instituições para grupos especiais que lhes proporcionem o ambiente adequado. Já os pacientes com a síndrome de Angelman apresentam retardamento mental grave. Embora sejam amigáveis, em geral não costumam manter uma conversação normal e o discurso frequentemente é pontuado por crises de riso impróprias. O distúrbio também se caracteriza por hiperatividade, baixa estatura, microcefalia, convulsões e ataxia.

Pela análise citogenética rotineira ou de alta resolução, a deleção 15q pode ser detectada em cerca de 60% dos indivíduos com a síndrome de Prader-Willi, mas apenas em 10 a 20% daqueles com a síndrome de Angelman. A FISH passou a ser um recurso diagnóstico melhor e, no caso de ambas as síndromes, as deleções agora podem ser estabelecidas em 80 a 85% dos casos. Embora fosse aceito que nem todas as deleções seriam visíveis no nível citogenético, considerava-se que a FISH não era capaz de detectar uma deleção em 100% dos casos. Isso, além do fato de que as síndromes de Prader-Willi e de Angelman parecem compartilhar a mesma deleção mas seus fenótipos são totalmente diferentes, sugeriu que poderia haver outra causa para tais distúrbios. Sabe-se agora que ambas são exemplos de *imprinting* genético e que os processos mutacionais que resultam nessas doenças são muito mais complexos que uma simples deleção do DNA (Nicholls, 1989; Robinson, 1991) (ver no Cap. 72 uma discussão sobre *imprinting* e detecção molecular de genes *imprinted*).

A síndrome de Williams foi associada a uma deleção do gene da elastina (*ELN*) no braço longo proximal do cromossomo 7 (7q11.23). O distúrbio caracteriza-se por anormalidades cardíacas, hipertensão, voz rouca, envelhecimento prematuro da pele e anomalias comportamentais. Como se sabe que a elastina é uma proteína importante para dar elasticidade a tecidos como o coração, os vasos sanguíneos, a pele e as cordas vocais, sua ausência explica muitas das anomalias físicas associadas a essa síndrome. Contudo, os problemas de comportamento não poderiam ser atribuídos à falta de elastina, de modo que atualmente acredita-se que a síndrome de Williams, na verdade, seja uma síndrome de genes contíguos e que a variabilidade do fenótipo esteja relacionada com o número de genes adjacentes deletados em combinação com o *ELN*.

Uma síndrome de genes contíguos muito bem caracterizada está localizada no braço curto do cromossomo 11 (11p13), sendo conhecida como WAGR (tumor de Wilms, aniridia, defeitos geniturinários e retardamento mental). Exceto pelos defeitos geniturinários, que parecem decorrentes de uma mutação variante no *locus* do tumor de Wilms, cada uma das três anomalias foi associada a um gene particular disposto em sequência no braço curto do cromossomo 11 (Fig. 69.23). O fenótipo de um indivíduo acometido varia de acordo com o tamanho da deleção. Em termos estatísticos, cerca de 1 a cada 3 crianças diagnosticadas com aniridia também desenvolverá tumor de Wilms. Em contrapartida, apenas 1 em 50 pacientes com tumor de Wilms tem aniridia. Nas deleções maiores, também se observam retardamento mental e defeitos geniturinários.

É possível que a síndrome velocardiofacial seja a microdeleção mais comum em humanos, porém, geralmente não é reconhecida por causa de seu quadro clínico de amplo espectro e sua apresentação, que pode ser bastante branda. Em geral, o distúrbio é diagnosticado no recém-nascido em razão de dificuldades de alimentação, defeitos cardíacos e dismorfologias faciais características. Dificuldades de aprendizado, baixa estatura e perda auditiva condutiva são observadas conforme a idade do indivíduo avança. É interessante o fato de que 10 a 15% dos pacientes têm um dos pais com a mesma deleção, porém, com acometimento bem mais discreto. Acredita-se que a deleção de 3 Mb no braço longo proximal do cromossomo 22 (22q11.2q11.2) deva-se à recombinação entre repetições diretas que flanqueiam a região comum de deleção. Tal recombinação intracromossômica geraria uma estrutura em alça que seria detectada como um defeito cromossômico pelas enzimas celulares de manutenção. As enzimas de reparo celular então excisariam o DNA na alça e voltariam a vedar a parte linear do cromossomo, resultando na deleção cromossômica e na perda de genes associados, o que acarretaria a doença (McDermid, 2002). Também foi relatado um mecanismo similar que resulta na deleção clássica da síndrome de Williams (Bayes, 2003), sugerindo a possibilidade de que essa é uma nova estratégia de mutação que explicaria a ocorrência de deleção em uma variedade de outras doenças.

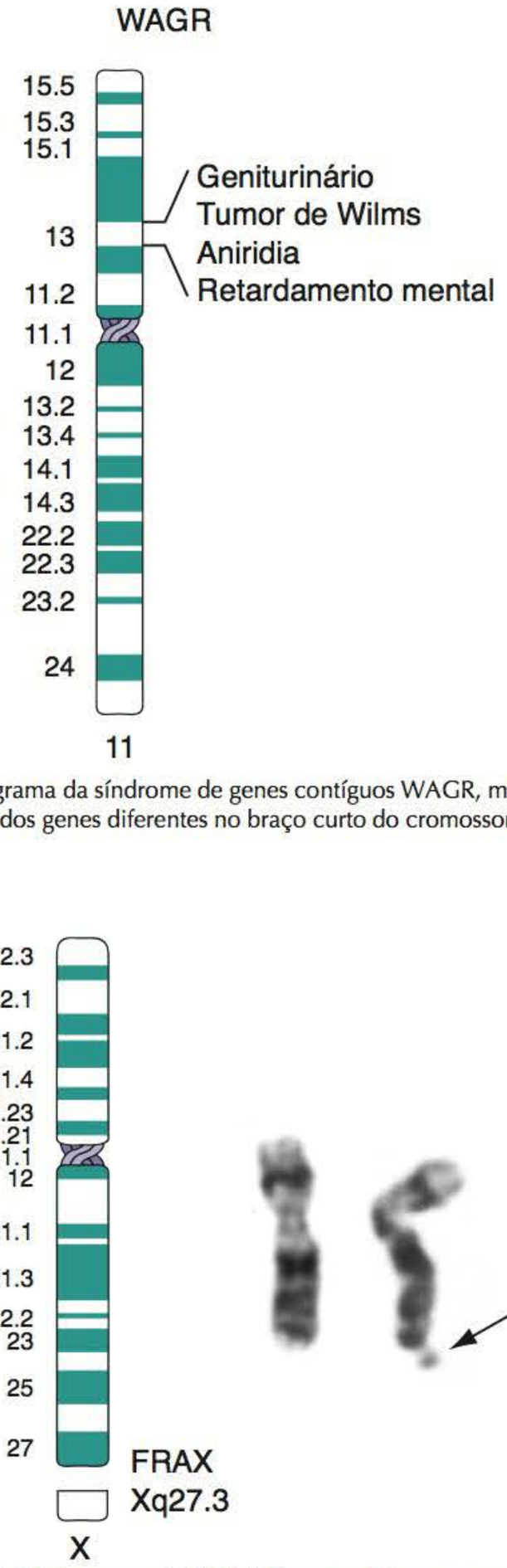


Figura 69.23 Diagrama da síndrome de genes contíguos WAGR, mostrando posições relativas dos genes diferentes no braço curto do cromossomo 11.

Figura 69.24 X frágil. Ideograma do X frágil (à esquerda) e um par representativo dos cromossomos da banda G mostrando o X frágil à direita.

Outros fenômenos citogenéticos

Síndrome do X frágil

A síndrome do X frágil é a segunda principal causa de retardamento mental e a principal causa de retardamento mental hereditário. O distúrbio foi descrito pela primeira vez por Herbert Lubs em 1969, quando ele observou a correlação entre retardamento e um "marcador" X em membros acometidos de uma família (Lubs, 1969). Subsequentemente, o marcador X ficou conhecido como X frágil, uma quebra ou hiato na estrutura do cromossomo X que pode ser detectada por meios citogenéticos (Fig. 69.24), cultivando-se células no meio de indução apropriado. Infelizmente, nem todos os indivíduos acometidos expressam o X frágil citogeneticamente, de modo que o teste clínico é falho. Apesar disso, foi o único ensaio disponível por anos e deu a confirmação necessária do diagnóstico em muitos indivíduos. Em 1991, o gene associado à síndrome do X frágil foi clonado, e a mutação, identificada como uma amplificação de uma sequência repetida de trinucleotídeos, algo que nunca havia sido visto antes ou associado a um mecanismo causador de doença. Felizmente, essa mutação é detectável em nível molecular, tendo sido desenvolvido um teste clínico altamente eficiente para permitir a detecção da mutação direta da síndrome do X frágil (Rousseau, 1991; Verkerk, 1991) (ver Cap. 72), de maneira que o teste citogenético não é mais usado.

Síndromes de quebra

As síndromes de quebra cromossômica (Tab. 69.6) são um conjunto de distúrbios autossômicos recessivos, originalmente agrupados por causa do achado comum de instabilidade ou fragilidade cromossômica (Arlett, 1978). Por isso, o teste citogenético foi possível como auxílio para o diagnóstico. Estudos moleculares mostraram mais um aspecto comum entre os distúrbios em que a mutação primária em cada um é um defeito no gene de reparo do DNA. Isso ajudou a explicar os outros aspectos das síndromes, pois a impossibilidade de reparo do DNA pode levar (1) a uma quebra ou recombinação maior que pode caracterizar-se por instabilidade cromossômica e (2) à disseminação da mutação e do defeito nas sequências de DNA que pode levar ao câncer.

Resumo

A citogenética é uma ciência laboratorial trabalhosa relativamente antiga e, na prática, ainda atua da mesma forma de sempre, embora o advento do sistema de cariotipagem computadorizado e da coleta robotizada tenha acrescentado um elemento de tecnologia avançada ao laboratório. Embora se tenha previsto que o diagnóstico molecular eliminaria a necessidade da citogenética, isso não aconteceu, e ela ainda é o único ensaio clínico que proporciona uma rápida visão geral de todo o genoma humano. A análise do cariótipo continua a ser importante para avaliar anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, além de ser o padrão para o diagnóstico de muitos distúrbios. Atualmente, a determinação da lesão citogenética é necessária para o diagnóstico de muitos cânceres. Para enfrentar novos desafios, a citogenética acrescentou novos testes e novas tecnologias. O uso da FISH ocupou o espaço entre a citogenética e o diagnóstico molecular, de modo que as duas áreas fornecem informação complementar em muitos casos. Assim, no momento, a citogenética continua a ter um lugar importante na medicina clínica laboratorial.

Tabela 69.6 Síndromes de quebra cromossômica

Distúrbio	Aspectos clínicos	*Locus* gênico	Manifestação citogenética	Tipo de câncer	Defeito de reparo do DNA	Diversos
Anemia de Fanconi	Pancitopenia, retardo do crescimento pré ou pós-natal polegares hipoplásticos ou ausentes possível deformação do braço, pigmentação escura da pele	1. Grupo A: 16q24.3 2. Grupo C – 9q22.3 3. Grupo D -3p22–p26 4. Grupo E – 6p21–p22 5. Grupos B, F, H não mapeados	Aumento das quebras cromossômicas detectado por tratamento com mitomicina C e diepoxibutano	Maior risco de LMA e insuficiência medular progressiva		Terapia atual: Transplante de medula óssea
Síndrome de Bloom	Atraso do crescimento, exantema facial em forma de borboleta, possível malignidade	15q26.1	Aumento da troca de cromátides-irmãs, em resposta à luz UV ou incorporação de BrdU		Atividade anormal da DNA ligase I	Alta frequência na população de judeus asquenazis:
Ataxia telangiectasia	Ataxia com degeneração do sistema nervoso central, telangiectasia na face, deficiência na imunidade celular, degenerativa, atraso do crescimento	11q22.3	Aumento da quebra espontânea de anéis trirradiais e translocações, particularmente com 7 e 14, induzido com bleomicina ou radiação ionizante	Várias leucemias e tumores sólidos		1/110 frequência de portador
Xeroderma pigmentoso	Sensibilidade ao sol, anormalidades neurológicas, ataxia e espasticidade	Incidência: 1 em 250.000 1. A: 9q22.3 2. C: 653p25 3. D: 19q13.2–q13.3 4. E: 11p11–p12 5. F: 16p13.1–13.2, 16p13.13–p13.3 6. G: 13q33	Aumento no SCE e rearranjo cromossômico em resposta à luz UV	Aumento da incidência de câncer de pele	1. Falta de excisão de dímeros de timina 2. Defeito de reparo pós-replicação	
Síndrome de Cockayne	Nanismo, envelhecimento prematuro, microcefalia, déficit neurológico, degeneração pigmentar, surdez, sensibilidade à luz solar, RM	Cr. 5	Sensibilidade à radiação UV	Aumento da incidência de câncer de pele	Possível deficiência de DNA ligase ou defeito de reparo acoplado à transcrição	

LMA = leucemia mieloide aguda; RM = retardamento mental; UV = ultravioleta.

Referências bibliográficas

Anastasi J: Interphase cytogenetic analysis in the diagnosis and study of neoplastic disorders. Am J Clin Pathol 1991; 95(Suppl 1): S22–S28.

Angell RR, Xian J, Deith J, et al: First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. Cytogenet Cell Genet 1994; 65:194–202.

Arlett CF, Lehmann AR: Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. Ann Rev Genet 1978; 12:95–115.

Bayes M, Magano LF, Rivera N, et al: Mutation mechanisms of Williams–Beuren syndrome deletions. Am J Hum Genet 2003: 73:131–151.

Blakemore KJ: Prenatal diagnosis by chorionic villus sampling. Obstet Gynecol Clin North Am 1988; 15:179–213.

Block, AW: Cancer cytogenetics. *In* Gersen S, Keagle M (eds): The Principles of Clinical Cytogenetics. Totowa, NJ, Humana Press, 1998, p 345.

Excelente referência sobre os aspectos citogenéticos da oncologia. As figuras e tabelas são de grande ajuda para interpretar os resultados do paciente.

Burkholder GC, Weaver MG: DNA–protein interactions and chromosome banding. Exp Cell Res 1977; 110:251–262.

Cassidy SB, Lai L-W, Erickson RP, et al: Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader–Willi syndrome due to maternal disomy. Am J Hum Genet 1992; 51:701–708.

Cherif D, Bernard O, Berger R: Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes. Hum Genet 1989; 81:358–362.

Comings DE, Kovacs BW, Avelino E, et al: Mechanism of chromosome banding. V. Quinacrine banding. Chromosoma 1975; 50:111–145.

Cremer T, Lichter P, Borden J, et al: Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. Hum Genet 1988; 80:235–246.

Delabar J-M, Theophile D, Rahmani Z, et al: Molecular mapping of the twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. Eur J Hum Genet 1993; 1:114–124.

De Lange T: Telomeres and senescence: ending the debate. Science 1998; 279:334–335.

De Martinville B, Blakemore KJ, Mahoney MJ, et al: DNA analysis of first-trimester chorionic villous biopsies: test for maternal contamination. Am J Hum Genet 1984; 36:1357–1368.

Divane A, Carter NP, Spathas DH, et al: Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncluttered amniotic fluid cells using five-colour fluorescence in situ hybridization. Prenat Diagn 1994; 14:1056–1069.

Flint J, Knight S: The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. Curr Opin Genet Devel 2003; 13: 310–316.

Flint J, Wilke AOM, Buckle VJ, et al: The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nat Genet 1995; 9:132–139.

Hall JG: Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. Am J Hum Genet 1990; 46:857–873.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 1990; 345:458–460.

Hassold T, Chiu D: Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. Hum Genet 1985; 70:11–17.

Holmquist G: The mechanism of C-banding: depurination and beta-elimination. Chromosoma 1979; 72:203–224.

Holmquist G, Gray M, Porter T, et al: Characterization of Giemsa dark- and light-band DNA. Cell 1982; 31:121–129.

Hook EB, Hamerton JL: The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies – differences between studies – results by sex and by severity of phenotypic involvement. *In* Hook EB, Porter IH (eds): Population Cytogenetics. New York State Department of Health, Birth Defects Institute Symposium 1975. New York, Academic Press, 1977, p 63.

Irons M: Use of subtelomeric fluorescence in situ hybridization in cytogenetic diagnosis. Curr Opin Pediatr 2003; 15:594–597.

ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, S Karger, 2005.

Referência que fornece os ideogramas-padrão, a nomenclatura citogenética aceita e seu modo de aplicação, bem como exemplos de uso da terminologia.

Jacobs PA, Browne C, Gregson N, et al: Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. J Med Genet 1992; 29:103–108.

Jacobs PA, Price WH, Court Brown WM: Chromosome studies on men in a maximum security hospital. Ann Hum Genet 1968; 31:339–358.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, and Vardiman JW: Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001.

Texto que constitui um guia importante sobre a patologia (i. e., descrições e achados) associada às leucemias e aos linfomas. Inclui a classificação atual da OMS para os distúrbios hematológicos.

Jones KL (ed): Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation, 6th ed. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders, 2006.

Korenberg JR, Kawashima H, Pulst S-M, et al: Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. Am J Hum Genet 1990; 47:236–246.

Ledbetter DH, Cavenee WK: Molecular cytogenetics: interface of cytogenetics and monogenic disorders. *In* The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th ed. New York, McGraw-Hill, 1989, pp 343–371.

Ledbetter DH, Engel E: Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. Hum Mol Genet 1995; 4:1757–1764.

Ledbetter SA, Kuwano A, Dobyns WB, et al: Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. Am J Hum Genet 1992; 50:182–189.

Lichter P, Jauch A, Cremer T, et al: Detection of Down syndrome by in situ hybridization with chromosome 21 specific DNA probes. *In* Patterson D (ed): Molecular Genetics of Chromosome 21 and Down Syndrome. New York, Wiley-Liss, 1990.

Lindsay EA, Halford S, Wadey R, et al: Molecular cytogenetic characterization of the DiGeorge syndrome region using fluorescence in situ hybridization. Genomics 1993; 17:403–407.

Lubs HA: A marker X chromosome. Am J Hum Genet 1969; 31:231–244.

McDermid HE, Morrow BE: Genomic disorders on 22q11. Am J Hum Genet 2002; 70:1077–1088.

National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration: A complete set of human telomeric probes and their clinical application. Nat Genet 1996; 14:86–89.

Nicholls RD, Knoll JHM, Butler MG, et al: Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader–Willi syndrome. Nature 1989; 342:281–285.

Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B: Imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes. Trends Genet 1998; 14:194–198.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: Thompson and Thompson – Genetics in Medicine, 6th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 2004.

Excelente livro sobre todos os aspectos da genética médica. Fornece uma introdução básica ao campo, seguida por descrições detalhadas de subespecialidades, incluindo citogenética, genética molecular, genética do câncer, imunogenética, genética pré-natal e aconselhamento genético.

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). http://www.ncbi.nlm.nih. gov/Omim/.

A melhor fonte de informação sobre genes relacionados a doenças. Cada entrada inclui dados sobre a descoberta do gene, aspectos citogenéticos e moleculares do distúrbio, testes genéticos possíveis, doenças relacionadas e referências da literatura científica.

Palmer CG, Reichmann A: Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome. Hum Genet 1976; 35:35–49.

Petersen MB, Bartsch O, Adelsberger PA, et al: Uniparental isodisomy due to duplication of chromosome 21 occurring in somatic cells monosomic for chromosome 21. Genomics 1992; 13:269–274.

Pitcher DR: Chromosome and violence. Practitioner 1982; 226:497–501.

Price WH, Jacobs PA: The 47,XXY male with special reference to behavior. Semin Psychol 1970; 2:30–39.

Reid T, Baldini A, Rand TC, et al: Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. Proc Natl Acad Sci USA 1992a; 89:1388–1392.

Reid T, Landes G, Dackowski W, et al: Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. Hum Mol Genet 1992b; 1: 307–313.

Rhoads GG, Jackson LG, Sachlesselman SE, et al: The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities. N Engl J Med 1989; 320:609–617.

Robinson WP, Bottani A, Yagang X, et al: Molecular, cytogenetic and clinical investigations of Prader–Willi syndrome patients. Am J Hum Genet 1991; 49:1219–1234.

Rosenberg MJ, Killoran C, Dziadzio L, et al: Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. Hum Genet 2001; 109:311–318.

Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, et al: Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. N Engl J Med 1991; 325:1673–1681.

Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 1996; 273:494–497.

Speicher MR, Ballard SG, Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet 1996; 12:368–375.

Spence EJ, Perciaccante RG, Greig GM, et al: Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. Am J Hum Genet 1988; 42:217–226.

Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA: Mechanisms involved in the banding of chromosome with quinacrine and Giemsa I. The effects of fixation in methanol–acetic acid. Exp Cell Res 1973; 81:214–222.

Theilgaard A: A psychological study of the personalities of XYY- and XXY-men. Acta Psychiatr Scand Suppl 1984; 315:1–133.

Trask BJ: Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. Trends Genet 1991; 7:149–154.

Turnpenny P, Ellard S: Emery's Elements of Medical Genetics, 12th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 2005.

Veldman T, Vignon C, Schrock E, et al: Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. Nat Genet 1997; 15:406–410.

Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al: Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell 1991; 65:905–914.

Voss R, Ben-Simon E, Avital A, et al: Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental diasomy be common in humans? Am J Hum Genet 1989; 45:373–380.

Vysis, Inc. http://www.vysis.com.

Criador e fabricante das sondas para FISH. O site dá informação sobre as sondas disponíveis e a biologia, além do ensaio para detecção.

Werner M, Ewig M, Nasarek A: Value of fluorescence in situ hybridization for detecting the *bcr/abl* gene fusion in interphase cells of routine bone marrow specimens. Diagn Mol Pathol 1997; 6:282–287.

Witkin HA, Mednick SA, Schulsinger F, et al: Criminality in XYY and XXY men. Science 1976; 193:547–555.

Wright WE, Shay JW: Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. Trends Genet 1992; 8:193–197.

Yunis JJ, Sanchez O: G-banding and chromosome structure. Chromosoma 1973; 44:15–23.

Leituras adicionais

Borgaonkar D: Chromosomal Variation in Man: A Catalog of Chromosomal Variants and Anomalies, 5th ed. New York, Wiley-Liss, 1989.

De Grouchy J, Turleau C: Clinical Atlas of Human Chromosomes, 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1984.

Gelehrter T, Collins FC, Ginsburg D: Principles of Medical Genetics, 2nd ed. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1998.

Heim S, Mitelman F: Cancer Cytogenetics, 2nd ed. New York, Wiley-Liss, Inc, 1995.

Excelente fonte de informação sobre todos os aspectos da genética do câncer. Inclui os aspectos moleculares, citogenéticos e clínicos de todas as leucemias, linfomas e tumores sólidos conhecidos.

McKusick V: Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-linked Phenotypes, 11th ed. Baltimore, MD, Johns Hopkins Press, 1983.

Mitelman F: Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer, 5th ed. New York, Wiley-Liss, Inc, 1994.

Rooney DE, Czepulkowski BH: Human Cytogenetics, A Practical Approach. Oxford, IRL Press, 1992.

Verma R, Babu A: Human Chromosomes – Principles and Techniques, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1995.

CAPÍTULO 70

Estabelecimento de um laboratório de diagnóstico molecular

Andrea Ferreira-Gonzalez PhD, David S. Wilkinson MD PhD, Carleton T. Garrett MD PhD

As instalações do laboratório 1456
- Planejamento laboratorial 1456
- Práticas auxiliares no controle da contaminação 1457
- Equipamento 1457
- Equipe 1458

Formas de testes clínicos 1459
- Testes desenvolvidos no laboratório 1459
- Métodos manuais à base de kits 1460
- Plataformas automatizadas para testes moleculares 1460

Seleção do teste 1461
- Reembolso de testes diagnósticos moleculares 1462
- Aspectos relacionados à patente 1463

Validação analítica e clínica dos ensaios moleculares 1463
- Reagentes analito-específicos 1465
- Restrições especiais do teste genético 1466

Controle e garantia da qualidade 1466
- Controle de qualidade do processo do teste 1466
- Controle de qualidade do equipamento 1467
- Garantia da qualidade 1468
- Acreditação laboratorial 1468

Referências bibliográficas 1468

PONTOS-CHAVE

- Os testes diagnósticos moleculares devem ser feitos em instalações separadas para eliminar ou controlar a contaminação, sobretudo no caso das técnicas de amplificação de ácido nucleico. Essas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade extraordinárias, contudo são suscetíveis a sinais falso-positivos gerados por quantidades ínfimas de produtos amplificados, remanescentes de diferentes amostras ou outras fontes ambientais. A aparelhagem essencial é exclusiva e usualmente não é encontrada em laboratórios clínicos típicos. A equipe de funcionários deve receber treinamento sobre os procedimentos e precauções referentes às técnicas de diagnóstico molecular. Atualmente, existem organizações profissionais que emitem certificados específicos para esses treinamentos.
- O formato tradicional do teste diagnóstico molecular tem sido o de ensaios "produzidos no laboratório", que requerem extensiva validação para serem executados pelo laboratório. Em um número crescente de ensaios comercializados, os fabricantes de kits fornecem reagentes (incluindo amostras para controle de qualidade) para todas as etapas do teste. Alternativamente, o laboratório pode combinar reagentes de diferentes kits para determinados usos clínicos em particular. Vários estágios dos testes foram automatizados – desde a extração de ácido nucleico até o desempenho analítico com ensaios homogêneos que estão emergindo para uso como sistemas fechados.
- Os fatores que influenciam a escolha do teste no laboratório de diagnóstico molecular incluem a necessidade clínica de um tempo de resposta rápido para os resultados, custo-efetividade (em comparação aos métodos alternativos, como cultura microbiológica), nível de reembolso determinado a partir dos planos de seguro-saúde e viabilidade de licenciamento dos processos patenteados.
- Para estabelecer e ofertar um teste diagnóstico molecular, é necessária a otimização de cada etapa do processo analítico, seguida de um processo de validação que vincula a padronização (quando possível) com materiais de referência (p. ex., oriundos de uma organização nacional ou internacional), bem como a definição de características analíticas (sensibilidade, acurácia, imprecisão, linearidade, efeitos de variáveis pré-analíticas/interferências) e clínicas (sensibilidade, eficácia e interpretação). Quando reagentes analito-específicos (RAEs) são utilizados, o relatório de resultados deve conter uma declaração confirmando que o laboratório determinou as características de desempenho do ensaio utilizado. Os relatórios de testes genéticos também devem ser acompanhados de declarações que qualifiquem a sensibilidade ou valor preditivo do resultado fornecido.
- Cada etapa do processo de teste, no diagnóstico molecular, exige a realização de um controle de qualidade para monitoramento do preparo de reagentes, coleta da amostra, preparo e obtenção de alíquotas das amostras, e desempenho do ensaio. Os ensaios desenvolvidos no próprio aboratório apresentam uma necessidade crítica de controle de qualidade para estabelecer a força, o grau de pureza e o desempenho da cada reagente utilizado. Equipamentos como os termocicladores requerem checagens de temperatura, enquanto as pipetas necessitam de controle de qualidade e manutenção. Os programas de garantia da qualidade monitoram a adesão aos padrões de treinamento, competência, equipamento e segurança, entre outros aspectos laboratoriais, além de avaliarem os resultados gerais dos serviços de teste de pacientes. A acreditação laboratorial baseia-se nessas práticas, bem como em testes de proficiência bem-sucedidos e listas de checagem projetadas para patologia molecular.

Ao longo da última década, adquiriu-se um vasto conhecimento sobre os genes e seu papel nas doenças humanas. Esse conhecimento permitiu compreender melhor diversos processos patológicos. Como consequência, as doenças passaram a ser cada vez mais definidas em termos de patogênese molecular. Isso levou ao desenvolvimento de novos ensaios moleculares clínicos para uso no diagnóstico, prognóstico, seleção de modalidades terapêuticas e monitoramento de doenças. Os ensaios moleculares clínicos representam uma coleção de técnicas e reagentes, cujo principal analito é o ácido nucleico. O ácido nucleico pode ser DNA ou RNA. Existem numerosas aplicações dessa tecnologia nas diferentes áreas do laboratório clínico. Uma das principais vantagens do uso de ácidos nucleicos como analito é que este constitui o marcador natural mais específico de todos os organismos vivos (i. e., a ordem dos nucleotídeos que compõem o genoma do organismo). Certo número de arranjos distintos dos quatro nucleotídeos – que podem estar presentes em uma molécula de DNA tão grande quanto o menor dos vírus conhecidos – é muitas vezes maior do que o número total de diferentes tipos de organismos vivos existentes em nosso planeta. Como resultado disso, a sequência de DNA de cada ser vivo pode conter informações únicas que podem ser úteis para identificar seu dono. Além da identificação de organismos específicos, modificações individuais nas sequências de DNA causam doenças genéticas e malignas e, portanto, fornecem informações diagnósticas e prognósticas significativas. Até o desenvolvimento de métodos simples e robustos para detecção das diferenças apresentadas pelas sequências de ácidos nucleicos, a análise no nível de sequência desses analitos era impraticável no laboratório clínico. Os avanços recentes

na nova tecnologia e instrumentação, aliados aos esforços de padronização, suplantaram uma parte considerável dessas limitações.

As instalações do laboratório

O poder dos diagnósticos moleculares deriva da extraordinária sensibilidade e especificidade conferida pelo uso do ácido nucleico como analito. A alta sensibilidade deriva da amplificação in vitro de sequências-alvo de ácido nucleico específicas presentes na amostra de um paciente. A amplificação in vitro cria milhões ou bilhões de cópias da sequência-alvo e, assim, possibilita a detecção de até mesmo uma única molécula-alvo presente na amostra do paciente. Ao mesmo tempo, porém, a alta sensibilidade impõe desafios consideráveis ao uso dessa tecnologia. Diante disso, uma das principais vantagens proporcionadas por essa tecnologia é também uma de suas principais limitações. A abertura/fechamento dos tubos de microcentrífuga que contêm produto amplificado pode gerar aerossóis de microgotículas que carregam 10 a 100 cópias da sequência-alvo amplificada. Essas microgotículas subsequentemente podem se depositar sobre as bancadas, instrumentos, mobiliário, assoalho, poeira, cabelo, pele exposta, enfim, sobre quase todas e quaisquer superfícies. Outra fonte de contaminação importante pode ser o próprio ácido nucleico-alvo. Os procedimentos de manipulação da amostra devem sempre proteger as amostras de pacientes contra a contaminação. Uma fonte de contaminação por ácido nucleico eventualmente negligenciada é consequente ao processamento das amostras de paciente realizado em um ambiente em que foi feita a amplificação biológica de ácidos nucleicos-alvo, seja por clonagem ou por cultura de células ou microrganismos. Assim, é necessário que as instalações do laboratório de diagnóstico molecular sejam planejadas com cuidado, a fim de garantir espaço suficiente e adequado para comportar funcionários e equipamentos, minimizando ainda o potencial problema da contaminação de amostras com ácido nucleico natural ou molde e/ou ácido nucleico oriundo da amplificação in vitro (amplicon).

Planejamento laboratorial

O espaço do laboratório deve ser projetado para minimizar o risco de contaminação e maximizar o fluxo de trabalho. É bastante desejável que sejam criadas barreiras de contenção por meio do uso de áreas de trabalho fisicamente isoladas para preparo de reagentes, avaliação de amostras, extração de ácido nucleico e análise de material amplificado. Um laboratório ideal é constituído por três recintos ou áreas completamente independentes. Dois desses recintos são considerados salas limpas, uma vez que todas as tarefas e serviços antecedentes à amplificação in vitro são realizadas nesses laboratórios. Esses recintos são denominados salas de pré-amplificação. A terceira área é considerada a sala suja, pois é dedicada à amplificação in vitro e à análise do material amplificado. Essa área é denominada sala de pós-amplificação. Os sistemas de tratamento de ar devem ser totalmente independentes entre si. Caso isso não seja possível, é bastante recomendável que os laboratórios de pré-amplificação sejam os mais próximos da fonte de ar em relação a ambos os tipos de laboratório. Os laboratórios de pré-amplificação devem permanecer sob pressão de ar positiva. Isso impedirá a entrada de qualquer contaminante transmissível pelo ar no laboratório de pré-amplificação, quando a porta estiver aberta. Além disso, o laboratório de pós-amplificação deve permanecer sob pressão de ar negativa, a fim de impedir a saída de qualquer partícula capaz de contaminar o ambiente circundante. A construção de uma antessala em cada laboratório representa uma forma econômica de criar pressões diferenciais para o laboratório. Uma antessala positivamente pressurizada destinada a um laboratório de pré-amplificação pode ser criada instalando-se um ventilador de teto, que tora o ar de dentro do laboratório e o conduz para dentro da antessala. Essa antessala positivamente pressurizada é tão eficiente quanto manter o laboratório inteiro sob pressão positiva. De modo semelhante, uma antessala para a sala de pós-amplificação pode ser facilmente transformada em uma área de pressão de negativa pela instalação de um ventilador, que retire o ar da antessala e o sopre para dentro do laboratório. Deve haver uma vedação em torno da porta situada entre a antessala e o laboratório, a fim de evitar que o ar contido no laboratório volte para a antessala. É importante enfatizar que a porta de comunicação do exterior com o interior da antessala e a porta de comunicação com o interior do laboratório jamais devem ser abertas ao mesmo tempo. Uma medida de segurança adicional consiste em colocar tapetes aderentes na entrada de cada antessala ou laboratório. O tamanho da antessala é determinado pelas atividades que nela serão realizadas. Além disso, se for instituído o uso de aventais de laboratório descartáveis, bem como de tocas e sapatilhas, deverá haver um espaço destinado ao armazenamento desses itens.

Diferentes atividades são realizadas em cada um desses três recintos/áreas. A amplificação in vitro jamais é executada nos dois laboratórios de pré-amplificação. Uma dessas áreas é dedicada ao preparo de reagentes, enquanto a outra se destina ao acesso e preparação da amostra, bem como à montagem da reação. Havendo limitação de espaço, as duas salas de pré-amplificação podem ser combinadas em um único laboratório. É fortemente recomendável utilizar capelas para preparar reagentes e montar reações. Essa medida torna-se mais crítica quando ambas as salas precisam ser combinadas em um único laboratório. O uso de capelas propicia um ambiente bastante controlado, em que tanto os reagentes quanto a reação podem ser preparados. É importante tentar localizar essa área em uma seção do laboratório que apresente baixa movimentação de tráfego. Nenhum RNA, DNA genômico ou plasmidial nem amostra de paciente devem ser introduzidos na capela onde os reagentes são preparados. Essa capela deve contar com um sistema de luz ultravioleta (UV) conectado a um temporizador. As áreas de superfície das capelas devem ser expostas à luz UV, limpas com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% recém-preparada e, então, com uma solução de etanol a 75% antes e após as realizações dos trabalhos nesse local. Considerando os motivos já mencionados, essas áreas devem conter equipamentos e instrumentos de uso exclusivo, cujo uso não seja compartilhado com nenhuma outra área. Alguns desses instrumentos exclusivos são: pipetas, agitador, ponteiras, tubos etc. É recomendável que os funcionários vistam aventais e calcem luvas de uso exclusivamente laboratorial antes de começar a trabalhar nesse ambiente.

A segunda sala ou área limpa no laboratório de pré-amplificação é o local onde a amostra é acessada e processada, e o ácido nucleico é transferido para o devido tubo de reação. Essa área deve contar com pelo menos uma cabine de biossegurança ambiental, para processamento de amostras e extração de ácidos nucleicos, além de equipamentos laboratoriais que sejam destinados exclusivamente a essa finalidade. Uma outra cabine de biossegurança ambiental deve ser disponibilizada, caso seja realizado qualquer tipo de cultura de tecidos nesse laboratório. Do mesmo modo, equipamentos laboratoriais devem ser exclusivamente destinados ao uso nas culturas. Ainda, quando são realizadas extrações de ácido nucleico orgânicas no laboratório, é necessário disponibilizar uma cabine de segurança química, onde deverão ser executadas as etapas do procedimento de extração que envolvem o uso de fenol e clorofórmio. Se forem realizadas extrações tanto de DNA quanto RNA no mesmo laboratório de pré-amplificação, tais procedimentos devem ser executados em áreas separadas do laboratório, utilizando equipamentos, pipetas e ponteiras com filtro exclusivos para cada procedimento. Nas circunstâncias em que o espaço constitui um aspecto importante e é impossível criar duas áreas totalmente isoladas destinadas, os procedimentos de extração de DNA e RNA devem ser realizados em ocasiões distintas ou em dias diferentes, após a limpeza completa das áreas antes de iniciar os trabalhos. Conforme já mencionado, todas as áreas de trabalho devem ser limpas com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% preparado de forma diária e, em seguida, com uma solução de etanol a 75%.

O laboratório de pós-amplificação é o local onde são realizadas a amplificação in vitro e análise de ácidos nucleicos. Os instrumentos utilizados nesse laboratório não devem ser compartilhados com outras áreas de pré-amplificação. Caso sejam utilizados termocicladores para a amplificação de ácido nucleico in vitro, recomenda-se que eles permaneçam nesse laboratório. Se os termocicladores forem colocados no laboratório de pré-amplificação, sob nenhuma circunstância os tubos de reação podem ser abertos nesse local após a amplificação. Além disso, os termocicladores devem estar conectados a linhas de energia elétrica exclusivas, com seus próprios disjuntores, a fim de evitar flutuações de eletricidade que possam afetar seu desempenho. Normalmente, esse tipo de laboratório requer mais espaço do que os

laboratórios de pré-amplificação, pois a instrumentação de análise de produtos amplificados tende a ocupar um espaço maior do que aquele necessário ao preparo de reagentes e extração de ácidos nucleicos. A eletroforese em gel, por exemplo, com frequência toma um significativo espaço aberto da bancada. É bastante recomendável montar uma sala escura, contendo um processador de filmes automático e um *freezer*. No entanto, é preferível que a sala escura esteja situada fora do laboratório de pós-amplificação, de tal modo que o acesso a ela seja feito sem necessidade de entrar nesse laboratório.

A tecnologia em tempo real já foi introduzida no laboratório clínico, de forma consideravelmente bem-sucedida. Um dos maiores benefícios proporcionados por essa instrumentação reside na detecção simultânea do produto amplificado à medida que ocorre a amplificação *in vitro*. Isso permite detectar e quantificar sequências de ácido nucleico específicas, dispensando manipulações ou aberturas dos tubos de ensaio adicionais e reduzindo dramaticamente o risco de contaminação do amplicon. Para ensaios desenvolvidos e realizados utilizando esses tipos de instrumento, os riscos de contaminação do amplicon são reduzidos de forma significativa. Entretanto, em tal conjuntura, os laboratórios de diagnóstico molecular devem continuar utilizando as plataformas "abertas" padrão para diversos testes, em particular aqueles desenvolvidos no laboratório que empregam reagentes analito-específicos. Para esses ensaios, o risco de contaminação do amplicon ainda constitui um aspecto significativo, que precisa ser abordado por meio do planejamento laboratorial e de práticas voltadas para a minimização dos riscos.

Práticas auxiliares no controle da contaminação

A introdução de práticas simples na rotina diária pode ajudar no controle da contaminação de amplicons e alvos. O fluxo de trabalho unidirecional deve ser seguido à risca. Os funcionários, obedecendo a esse fluxo unidirecional, realizam suas tarefas primeiramente nas salas limpas e, somente após a conclusão delas, entram na sala de pós-amplificação. Nenhum membro da equipe que tenha trabalhado no laboratório de pós-amplificação deve retornar à área de pré-amplificação sem antes tomar banho e trocar o vestuário. É recomendável o uso de aventais, sapatilhas e tocas de laboratório descartáveis. Quando os funcionários utilizam aventais de laboratório, torna-se necessário manter aventais de uso exclusivo em cada laboratório, os quais devem permanecer nos laboratórios e não serem utilizados nas áreas de escritório. Utilizar aventais de cores diferentes para cada área é uma forma de chamar a atenção dos funcionários para o fluxo de trabalho estrito.

Outro fator muito importante relacionado ao fluxo de trabalho é a manutenção. O controle do fluxo de trabalho da equipe de manutenção é igualmente importante. A abordagem mais segura, nesse caso, consiste em determinar que a equipe de funcionários execute algumas tarefas de manutenção, como ensacar o lixo gerado por cada laboratório e colocá-lo do lado externo para ser pego pelo pessoal da limpeza. Se isso não for feito, os funcionários da manutenção devem ser instruídos a remover primeiramente o lixo da sala de pré-amplificação, depois o lixo dos escritórios e, por último, o lixo da sala de pós-amplificação.

A proteção das bancadas com papel revestido de plástico absorvente, quando não trocada com frequência, pode acarretar acúmulo de poeira e do material amplificado presente nela. Ao usar esse tipo de papel, é necessários descartá-lo imediatamente após cada uso. A utilização de um alvejante (hipoclorito), de uma forma geral, parece ser o método mais aceito de descontaminação de superfícies. A descontaminação de bancadas, equipamentos de laboratório e mobiliários deve ser realizada com uma solução de alvejante a 10% recém-preparada e, em seguida, uma solução de etanol a 75% (ou mesmo água) para diluir o alvejante, pois este pode corroer as superfícies. Todas as ponteiras de pipetas devem possuir filtro hidrofóbico, a fim de evitar que a extremidade da pipeta seja contaminada com moldes ou material amplificado. A avaliação da efetividade da barreira hidrofóbica pode ser feita ajustando-se a pipeta para puxar um volume de líquido superior ao volume máximo da ponteira e, em seguida, pipetando uma solução colorida com a ponteira que contém o filtro hidrofóbico. Se a extremidade da pipeta for colorida pelo líquido, significa que a barreira de filtro é inadequada para uso. Após a utilização, as ponteiras descartáveis devem ser dispensadas em sacos com feixe de zip, tomando-se o cuidado de assegurar que todos os sacos estejam completamente selados para, só então, descartá-los. As luvas devem ser trocadas periodicamente ou quando se suspeitar de qualquer tipo de contaminação.

Outra abordagem adotada para prevenir a contaminação do amplicon consiste em submetê-lo a um tratamento químico, de modo que impossibilite sua amplificação mesmo que venha a ser acidentalmente adicionado a outra amostra. O amplicon pode ser destruído de diversas formas. O método de destruição mais utilizado é a exposição à radiação UV. O tratamento do DNA com radiação UV induz a formação de ligações cruzadas entre as duas fitas da molécula, pela formação de dímeros de timidina. Esse DNA em ligação cruzada perde a efetividade como molde. Uma das desvantagens do tratamento à base de UV é a maior efetividade para sequências com comprimento acima de 700 nucleotídeos. Na maioria dos ensaios clínicos, o comprimento do amplicon é inferior a 700 bp.

Um método químico de inativação ou esterilização do amplicon é a incorporação de trifosfato de desoxiuridina (em vez de trifosfato de desoxitimidina) ao amplicon durante o procedimento de amplificação. Depois disso, se o amplicon com uracila contaminar acidentalmente outra amostra, é possível destruí-lo antes de iniciar a amplificação, por meio do tratamento da amostra com uracil-N-glicosilado (UNG). O amplicon com uracil atua como substrato para UNG, ao contrário do molde com timidina. O mecanismo por trás dessa reação química consiste na remoção pelo UNG dos resíduos de uracil presentes no amplicon, cujo esqueleto de fosfodiéster intacto é preservado. Durante a primeira etapa de desnaturação do procedimento de amplificação, as ligações fosfodiéster são quebradas nos sítios onde estão localizados os resíduos de uracil. O amplicon fragmentado perde a capacidade de servir de molde. Foi demonstrado que o uso de trifosfato de desoxiuridina e UNG é efetivo no controle da contaminação, desde que a amplificação do amplicon com uracil não ultrapasse 10^6 a 10^7 cópias/reação.

Outro método de esterilização emprega tratamento fotoquímico de compostos do isopsoraleno. Esses compostos são adicionados à mistura da reação antes de iniciar a amplificação. Após a reação em cadeia da polimerase (PCR), contudo antes da abertura do tubo de ensaio, o frasco é exposto à luz UV (300 a 400 nm), e esta ativa os isopsoralenos para formar adutores entre as pirimidinas nos amplicons. Por conta desses adutores, a Taq polimerase para de realizar o processamento ao longo dos amplicons e, assim, impede a reamplificação subsequente de qualquer um desses amplicons contaminantes.

Também é preocupante a transferência de papéis entre os laboratórios e o escritório, como no caso dos procedimentos escritos ou das observações referentes a amostras específicas. Essa transferência deveria ser reduzida o máximo possível, em especial a papelada utilizada no laboratório de pós-amplificação. É altamente recomendável que seja instalada uma rede de computadores no laboratório, com determinado número de terminais de computador nos diversos laboratórios e áreas de escritório, a fim de reduzir ou eliminar a movimentação de papéis que passam por todo o laboratório e voltam para os escritórios. É importante fazer o *backup* do servidor da rede diariamente.

Equipamento

O equipamento de laboratório necessário à realização bem-sucedida dos modernos testes diagnósticos moleculares pode incluir uma instrumentação em geral pouco encontrada em laboratórios clínicos típicos. Mesmo quando há sobreposição em relação aos tipos de equipamento que estão sendo utilizados, é importante que o laboratório de diagnóstico molecular conte com seu próprio equipamento para fins de controle de contaminação. A Tabela 70.1 fornece uma lista abrangente de equipamentos de laboratório. Alguns equipamentos especializados adicionais que não foram incluídos na lista e poderiam ser úteis, dependendo do escopo das opções de testes disponíveis, incluem o sequenciador de DNA automático, termocicladores em tempo real, instrumental de eletroforese capilar e, até mesmo, cromatografia líquida de alto desempenho. Entre esses aparelhos especializados, muitos são caríssimos, e isso pode dificultar a implementação dos testes que requerem tais aparelhos. Mais recentemente, um novo método de aquisição de equipamentos foi viabilizado pelo estabelecimento de acordos de aluguel de reagentes com fabricantes de testes diagnósticos *in vitro* e de reagentes analito-específicos. Esse mecanismo de financiamento tem sido adotado há vários anos em outras áreas do laboratório clínico, contudo, é novo na área de diagnóstico molecular.

Tabela 70.1 Requerimentos de equipamentos essenciais

Descrição	Quantidade
Termociclador(es) de DNA	2
Capelas ambientais de fluxo laminar	2
Freezer/refrigerador	2
Freezer (–20°C) com descongelamento manual	2
Freezer (–70°C)	1
Microcentrífuga angular, 14.000 rpm	2
Microcentrífuga horizontal, 14.000 rpm	1
Balança eletrônica	2
pHmetro	2
Placa de aquecimento/agitador	2
Banho-maria	1
Fontes de alimentação para eletroforese	3
Aparelho para mini-PAGE	2
Sistema de fotodocumentação	1
Aparelho de eletroforese em gel de agarose	4
Processador automático de chapa de raios X	1
Cassetes de autorradiografia (43,2 × 35,6 cm)	4
Cassetes de autorradiografia (20,3 × 25,4 cm)	4
Micropipetas padrão (três tamanhos)	18
Capela	2
Instrumental de tecnologia de tempo real	1
Vórtices agitadores	3
Pipetador pneumático	4
Medidor de radiação de bancada	1
Espectrofotômetro-UV	1
Contador Geiger	1
Banho seco	4
Microcentrífuga refrigerada	2
Forno de hibridização	1
Centrífuga refrigerada de bancada	1
Incubadora	2

Equipe

Os laboratórios que realizam testes de diagnóstico molecular são classificados como laboratórios de testes de alta complexidade pela Clinical Laboratory Improvement Amendment de 1988 (CLIA'88) (Bachner, 1988). Essa classificação impõe exigências específicas de instrução e treinamento para funcionários que trabalhem nesses laboratórios. Além disso, é importante se lembrar de que esses testes são mais complexos do que os testes laboratoriais padrão e alguns foram desenvolvidos no próprio laboratório. Além disso, em consequência da introdução da nova tecnologia, tais ensaios são constantemente modificados com o intuito de aprimorar a especificidade, sensibilidade, tempo de resposta, fluxo de trabalho etc.

Diretor do laboratório

De acordo com a CLIA'88, diretores de laboratórios de testes de alta complexidade devem: (1) ser MD ou DO, com treinamento em patologia clínica ou anatômica; (2) ser MD ou DO, com experiência de 2 anos na direção ou supervisão de laboratório de testes de alta complexidade; ou (3) estar cursando doutorado em uma das áreas das ciências biológicas e ter experiência de 2 anos na supervisão de laboratório de testes de alta complexidade.

As responsabilidades do diretor do laboratório consistem em selecionar testes, implementá-los e solucionar as dificuldades técnicas. O diretor do laboratório também é responsável pelo desenvolvimento de programas laboratoriais de validação clínica e analítica de novos testes moleculares, bem como pelo desenvolvimento de diretrizes e práticas de supervisão que assegurem o desempenho confiável dos testes clínicos. Ademais, ao diretor do laboratório também cabe a responsabilidade de desenvolver, implementar e revisar os programas de garantia e controle de qualidade.

Supervisor técnico

Segundo a CLIA'88, para fins de qualificação para a posição de supervisor técnico, é preciso atender aos seguintes critérios: (1) possuir título de MD ou DO e ter 1 ano de experiência profissional em laboratório de testes de alta complexidade; (2) ter mestrado e mais 2 anos de experiência profissional; ou (3) ser bacharel e ter 4 anos de experiência profissional.

Tecnólogos médicos e técnicos em biologia molecular

Os tecnólogos médicos e técnicos em biologia molecular são responsáveis pela realização de tarefas e serviços necessários ao andamento das operações diárias da agenda do laboratório de testes. Esses indivíduos são responsáveis pela obtenção e processamento das amostras, realização dos testes diários e manutenção dos devidos registros de testes e controle de qualidade, bem como adesão aos procedimentos escritos e políticas de controle de qualidade, identificação de problemas e documentação da manutenção dos equipamentos. Manter o registro dos procedimentos laboratoriais é uma tarefa complicada, em razão do fato de os ensaios desenvolvidos no laboratório serem constantemente modificados em prol do aperfeiçoamento do processo de teste. Além disso, existem alguns equipamentos laboratoriais que são utilizados apenas em testes de diagnóstico molecular, mas se tem pouca experiência na utilização deles em laboratórios clínicos. Por causa desses fatores, é importante que a equipe técnica – em particular a equipe de técnicos seniores – possua um elevado senso de comprometimento profissional e mostre interesse e esforços constantes a fim de melhorar seu nível de instrução e treinamento. Também é importante que esses profissionais adquiram o máximo de habilidades laboratoriais avançadas possível, bem como realizem treinamentos cruzados na maioria dos (ou em todos os) diversos testes realizados no laboratório. É fundamental que a equipe técnica domine totalmente as bases científicas da metodologia, bem como as aplicações e implicações clínicas dos diferentes testes moleculares.

Residentes, bolsistas e estudantes de graduação

O envolvimento de residentes, bolsistas e estudantes de graduação pode contribuir significativamente para o sucesso de um laboratório de diagnóstico molecular. O valor desses indivíduos está associado ao elevado nível de comprometimento profissional e de suas teorias sobre a utilidade clínica de testes individuais. Quando esses indivíduos têm tempo suficiente para trabalhar no laboratório de diagnóstico molecular, com frequência conseguem desenvolver e validar rapidamente novos ensaios moleculares. Como resultado, esses indivíduos adquirem conhecimento na área de medicina laboratorial, que vem crescendo rapidamente, e isso lhes confere uma vantagem na busca por um futuro emprego. Como parte do treinamento em diagnóstico molecular, é importante para residentes, bolsistas e estudantes de graduação ganhar experiência em cada uma das diversas áreas de teste, incluindo doenças infecciosas, doenças genéticas e câncer. O treinamento deve incluir os princípios básicos da biologia molecular; experiência prática na otimização, validação e execução de testes diagnósticos moleculares; interpretação de resultados de testes; e preparo de relatórios para revisão. Além disso, recomenda-se que os diretores de laboratório propiciem aos estagiários a familiarização com os diversos aspectos envolvidos na supervisão laboratorial.

Certificação de funcionários em diagnóstico molecular

A certificação de funcionários com formação de nível de doutorado, que trabalham em laboratórios de diagnóstico molecular, pode seguir três caminhos, dependendo do tipo de diploma de doutorado, bem como de outras experiências de treinamento. Um desses caminhos é aberto pelo American Board of Medical Genetics (ABMG) aos indivíduos com MD ou PhD, sendo destinado a profissionais que prestam serviço em genética médica. O ABMG é membro do American Board of Medical Specialties, que representa a organização parental dos conselhos fornecedores de certificação em patologia, pediatria, medicina interna, cirurgia e outras especialidades médicas. A certificação consiste em um exame geral, seguido de um exame de subespecialidade em genética clínica, genética médica, citogenética clínica, genética bioquímica clínica ou genética molecular clínica. Para ser elegível para a certificação da ABMG, um indivíduo deve atender aos

critérios da área em que pretende obter a certificação. Os requisitos para obtenção da certificação em genética molecular clínica serão discutidos na presente seção. Além do doutorado em área apropriada, o candidato à certificação do conselho em genética molecular clínica deve concluir um período de treinamento de 2 anos em um programa totalmente credenciado. O candidato deve apresentar um caderno de registros com 150 casos de clínica molecular, ter concluído um teste de genética molecular clínica e apresentar uma lista de competências metodológicas assinada pelo diretor do laboratório, com metade do tempo de treinamento dedicado à bancada. O exame é oferecido a cada 3 anos.

Recentemente, o American Board of Medical Specialties aprovou o pedido do American Board of Pathology e do ABMG para criação de uma certificação de subespecialidade conjunta em patologia genética molecular. Os candidatos a essa certificação devem ter formação em nível de MD ou DO, serem certificados por seus respectivos conselhos, possuir uma licença ilimitada válida para exercer a prática de medicina ou osteopatia nos Estados Unidos e ter concluído um período de treinamento de 1 ano em um programa credenciado. Atualmente, existem 11 programas credenciados pelo ABMG e 12 programas que receberam acreditação provisória ou estão em processo de obtenção de acreditação. As organizações envolvidas na certificação estão empenhadas na definição dos padrões de treinamento em diagnóstico molecular. O candidato deve apresentar um caderno de registros com 150 casos de clínica molecular. O exame para certificação é oferecido a cada 2 anos.

Além disso, o American Board of Clinical Chemistry (ABCC) aprovou um programa de certificação em diagnóstico molecular que foi oferecido pela primeira vez em junho de 2000. O ABCC é uma corporação independente sem fins lucrativos, que confere a profissionais de nível de doutorado certificação em química clínica e química toxicológica. Os papéis e as regulamentações da ABCC para certificação em diagnóstico molecular foram estabelecidos recentemente. Antes da admissão aos exames, o aplicante deve obter uma certificação de qualquer um dos seguintes conselhos: ABCC, American Board of Medical Microbiology, American Board of Pathology, American Board of Medical Laboratory Immunology, American Board of Bioanalysis ou American Board of Histocompatibility and Immunogenetics. Os aplicantes devem atender às exigências de formação e experiência profissional, além de apresentarem três cartas de recomendação que atestem a familiaridade do aplicante com os conhecimentos profissionais, seu tempo de experiência na área etc. O exame é oferecido uma vez por ano.

A certificação de subespecialidade em diagnóstico molecular é oferecida a profissionais que não possuem formação em nível de doutorado, como tecnólogos médicos e técnicos em biologia molecular, pela National Credentialing Agency for Laboratory Personnel, Inc. (NCA). A NCA é uma organização não governamental sem fins lucrativos que fornece certificação para funcionários de laboratório. Os tecnólogos médicos e técnicos em biologia molecular são certificados como especialistas de laboratório em biologia molecular (LSp[MB]). Para tanto, existem sete tipos de elegibilidade:

1. concluir com sucesso um programa de bacharelado ou pós-bacharelado credenciado pela National Accrediting Agency for Clinical Laboratory Sciences, nas áreas de diagnóstico molecular ou biotecnologia molecular;
2. concluir com sucesso um programa de bacharelado ou pós-bacharelado de um programa de biologia molecular patrocinado por uma faculdade ou universidade credenciada, que inclua o equivalente a 6 meses de experiência profissional em laboratório de biologia molecular de atendimento integral;
3. concluir com sucesso um programa educacional de nível de bacharelado em ciências laboratoriais clínicas (ciências laboratoriais clínicas, tecnologia médica, citogenética) credenciado ou aprovado pela NAACLS e cumprir o equivalente a 6 meses de experiência em tempo integral obtida no último ano, em um laboratório de biologia molecular de atendimento integral;
4. ser certificado como cientista em laboratório clínico ou equivalente, especialista em laboratório clínico na área de citogenética ou tecnólogo registrado de nível avançado (Canadian Society for Medical Laboratory Science) e cumprir o equivalente a 6 meses de experiência em tempo integral obtida no último ano, em um laboratório de biologia molecular de atendimento integral;
5. possuir diploma de bacharel em ciências biológicas, químicas e/ou médicas emitido por faculdade ou universidade credenciada e concluir o equivalente a 1 ano de experiência profissional em tempo integral nos 2 últimos anos, em laboratório de biologia molecular de atendimento integral;
6. possuir diploma de bacharel emitido por faculdade ou universidade credenciada e concluir 36 horas semestrais de curso em ciências biológicas, químicas e/ou médicas (em adição ao curso de bacharelado ou como parte dele) e concluir o equivalente a 1 ano de experiência profissional em tempo integral nos 2 últimos anos, em laboratório de biologia molecular de atendimento integral;
7. possuir certificado de tecnólogo registrado pela Canadian Society for Medical Laboratory Science e concluir o equivalente a 2 anos de experiência profissional em tempo integral nos 4 últimos anos, em laboratório de biologia molecular de atendimento integral.

Um laboratório de biologia molecular de atendimento integral é definido como aquele capaz de fornecer conhecimento e experiência prática em todos os aspectos da análise molecular, incluindo (sem se limitar a) tecnologias de DNA recombinante, reação em cadeia da polimerase e técnicas de hibridização.

Diversas universidades e faculdades começaram a oferecer programas de bacharelado e mestrado na área molecular. Nem todos os programas conferem elegibilidade para o exame da NCA após terem sido concluídos. Uma lista de diversos programas para obtenção de graduação e elegibilidade para o exame da NCA é disponibilizada no site www.amp.org. Esse exame é oferecido duas vezes por ano em mais de 80 centros de aplicação de testes espalhados pelos Estados Unidos, bem como em alguns centros localizados em outros países.

Mais recentemente, a American Society for Clinical Pathologists (ASCP; www.ascp.org) introduziu uma nova certificação para tecnólogos, com ênfase no diagnóstico molecular. Essa certificação em diagnóstico molecular possibilita que o pessoal técnico atuante na área obtenha reconhecimento profissional. Para ser elegível nessa categoria de exame, o aplicante deve satisfazer os requisitos de ao menos uma das seguintes alternativas:

1. certificação de tecnólogo ou especialista emitida pela ASCP e diploma de bacharelado concedido por faculdade/universidade regionalmente credenciada;
2. diploma de bacharelado concedido por faculdade/universidade regionalmente credenciada, incluindo cursos de ciências biológicas, química e matemática e ter concluído com sucesso um programa de bacharelado em diagnóstico molecular ou biotecnologia molecular aprovado pela NAACLS;
3. diploma de bacharelado em ciências biológicas ou químicas concedido por faculdade/universidade regionalmente credenciada e experiência aceitável de 12 meses em diagnóstico molecular em um laboratório clínico regulamentado pela CLIA e credenciado nos últimos 5 anos;
4. diploma de graduação (doutorado ou mestrado) em ciências naturais ou ciências laboratoriais médicas concedido por faculdade/universidade regionalmente credenciada e 6 meses de experiência em diagnóstico molecular em um laboratório clínico regulamentado pela CLIA e credenciado nos últimos 5 anos.

Formas de testes clínicos

Basicamente, existem dois formatos de teste em uso na maioria dos laboratórios que realizam testes de diagnóstico molecular. Cada um desses formatos consiste em um teste desenvolvido internamente no respectivo laboratório, sendo também conhecidos como ensaios de fabricação interna *(home-brew assays)*. Os reagentes são fornecidos em kits comercializados por fabricantes de dispositivos médicos.

Testes desenvolvidos no laboratório

Os testes desenvolvidos internamente, no laboratório, são ensaios submetidos a um processo completo de desenvolvimento e validação efetuado pelo próprio laboratório que os realiza. Também são conheci-

dos como testes "de fabricação interna". Esses ensaios em geral empregam uma combinação de reagentes que são adquiridos separadamente de diversos fabricantes. Cada laboratório determina as características de desempenho do ensaio para uma determinada condição clínica em uma população de pacientes em particular. A validação analítica e clínica de todo o processo de testes é responsabilidade de cada laboratório.

Métodos manuais à base de kits

Existem duas categorias gerais de métodos manuais à base de kit que são utilizados para fins de diagnóstico molecular. Na primeira categoria, o fabricante do kit fornece reagentes (previamente submetidos ao controle de qualidade) para cada uma das etapas necessárias à realização integral do teste molecular. Um exemplo desse tipo de kit seria o conjunto de reagentes fornecido pela Roche Molecular Systems para quantificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1 no plasma de pacientes diagnosticados com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Esses kits incluem os reagentes necessários ao isolamento, amplificação e detecção de ácidos nucleicos. Além disso, contêm informação sobre sensibilidade, especificidade e limites de tolerância para a condição clínica em particular. Os fabricantes desses kits podem identificá-los com uma marcação de produto aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA), produto liberado pelo FDA, produto apenas para uso em pesquisa ou produto apenas para uso investigativo. A validação analítica e clínica desses kits varia drasticamente dependendo da marcação. Os procedimentos de validação serão discutidos adiante.

A segunda categoria de métodos manuais à base de kits engloba os kits desenvolvidos por um fabricante para fornecimento de reagentes (previamente submetidos ao controle de qualidade) a serem utilizados na execução de determinadas etapas do teste molecular. Exemplificando, existem kits comerciais para extração de ácido nucleico, kits que contêm reagentes amplificadores que incluem controles, sistemas de detecção de ácido nucleico amplificado *in vitro* etc. Com esses produtos, um laboratório consegue desenvolver um determinado teste molecular, combinando um ou mais kits do mesmo fabricante ou de fabricantes variados, para investigação de uma condição clínica em particular em uma dada população de pacientes. As validações analítica e clínica de cada etapa e o procedimento completo serão discutidos adiante.

Plataformas automatizadas para testes moleculares

Nos últimos anos, o desenvolvimento e a introdução de plataformas automatizadas para testes diagnósticos moleculares tornou-se mais comum (Epsy, 2001; Germer, 2003; Cook, 2004; Dalesio, 2004). Dispositivos automatizados menos demorados, que lidam com menores volumes e (em teoria) proporcionam maior precisão, têm substituído diversos testes diagnósticos moleculares historicamente realizados como séries de etapas de pipetagem manual. Um número considerável dessas plataformas foi desenvolvido por fabricantes de reagentes, com o intuito de automatizar uma ou várias etapas do processo de teste. A evolução da automação do diagnóstico molecular tem ocorrido em estágios. Para os propósitos dessa discussão, esses dispositivos serão agrupados com base no critério da função.

Os instrumentos automatizados de função única já são utilizados no laboratório de diagnóstico molecular há algum tempo. O típico aparelho automatizado de função única é o termociclador, que proporciona a amplificação automática de ácidos nucleicos ao realizar todas as etapas necessárias à amplificação deles. Os extratores de ácido nucleico constituem outro exemplo de dispositivo de função única, que converte um procedimento de seis etapas em um procedimento de etapa única. Esses extratores de ácido nucleico baseavam-se na extração em fenol/clorofórmio e mimetizavam o método correspondente realizado manualmente, empregando quase os mesmos reagentes e protocolos. Esses e outros instrumentos automatizados de etapa única – incluindo robôs preparadores e aliquotadores de reagentes, sequenciadores de DNA etc. – foram incorporados aos laboratórios de diagnóstico molecular. O desenvolvimento de novos procedimentos para extração de ácidos nucleicos revolucionou por completo o projeto dos extratores automáticos de ácido nucleico. O uso de pérolas magnéticas mudou drasticamente o modo como os laboratórios processam e isolam as amostras de ácido nucleico a partir de amostras de pacientes. A Tabela 70.2 fornece uma lista representativa dos extratores automáticos de última geração. Os laboratórios de diagnóstico molecular estão rapidamente adotando esses extratores de ácido nucleico automáticos, uma vez que essa etapa específica do processo de teste é uma das mais trabalhosas de todo o processo. Os dispositivos proporcionam capacidades maiores de *throughput*, maior precisão e economia em termos de funcionários.

Instrumentos mais recentemente automatizados, que realizam mais de uma função, foram desenvolvidos e introduzidos nos laboratórios de diagnóstico molecular. O analisador COBAS Amplicor, da Roche Molecular Systems, exemplifica esse tipo de plataforma automatizada. Trata-se de um aparelho equipado com: termociclador para amplificação de ácidos nucleicos; um braço cartesiano tridimensional com garra; blocos de aquecimento; estação de lavagem; e até mesmo um leitor colorimétrico. Com o desenvolvimento das sondas marcadas com fluorescência, que somente são detectáveis quando se ligam à sequência-alvo, os termocicladores de PCR evoluíram e se transformaram em aparelhos multifuncionais. Essas sondas incorporam dois corantes fluorescentes, em geral um em cada extremidade, em vez de apenas um único corante fluorescente. Esses corantes são compatibilizados em termos de requisitos de excitação e emissão, de tal modo que o corante excitado por uma fonte externa de fluorescência emite a um comprimento de onda que é absorvido pelo segundo corante. Esse processo é referido como transferência de energia fluorescente e funciona desde que ambos os corantes estejam relativamente próximos entre si. Essa técnica foi descrita no Capítulo 67. Durante o processo da PCR, uma das sondas sofre degradação e, como consequência, ambos os corantes se afastam. Outra possibilidade é a sonda sofrer alterações estruturais que resultam em aumento da distância entre os corantes. Em ambas as situações, o resultado final é a intensificação do sinal fluorescente de maneira proporcional à quantidade de produto gerada na reação de PCR. Esse processo é referido como PCR em tempo real. Para detectar o aumento da quantidade de produtos de PCR, foi feita a incorporação da óptica ao termociclador. Isso permitiu fazer a aquisição de sinal concomitantemente à realização da PCR.

Alguns fabricantes desenvolveram e comercializaram alguns tipos de aparelhos com a tecnologia de detecção em tempo real (da Roche: Lightcycler, Taq96 e Taq48; da BioRad: iCycler; da ABI: TaqMan). O maior benefício proporcionado por esses equipamentos é a capacidade de realizar a reação de PCR e fazer a aquisição de sinal simultaneamente, possibilitando realizar as análises qualitativa e quantitativa da reação de PCR em andamento, bem como eliminando a necessidade do processamento de pós-amplificação para detecção e quantificação da sequência-alvo. Essa característica proporciona uma redução dramática do tempo de resposta dos testes de diagnóstico molecular (de dias para horas). Com um *throughput* significativamente maior, esses aparelhos são hoje em dia utilizados na rotina para testes diagnósticos.

Está previsto, para um futuro próximo, a disponibilização de instrumentos totalmente automatizados que sejam capazes de executar processos analíticos completos (extração, amplificação, detecção e quantificação do ácido nucleico) em uma operação autolimitada e simples. Dois exemplos desse tipo de plataforma automatizada são o Ampliprep-TaqMan (Roche Molecular Systems) e TIGRIS (Gen-Probe). Esses instrumentos automatizados integrados são projetados para serem utilizados em sistemas homogêneos que permitam a amplificação e detecção em um mesmo tubo, evitando a necessidade de abrir os tubos de reação para todo tipo de manipulação pós-amplificação.

A crescente disponibilização comercial desses aparelhos proporciona várias oportunidades para os laboratórios clínicos adotarem a automatização. Um aspecto central dessa decisão é a economia que será obtida. Se por um lado a realização manual de testes moleculares envolve gastos substanciais, o custo da aquisição de instrumentos automatizados para realização das mesmas etapas/testes também pode ser significativo. Os laboratórios devem avaliar amplamente a relação custo/benefício desses dispositivos automatizados em relação à previsão de lucros, contabilizados a implementação e o custo dos instrumentos. Mais recentemente, alguns fabricantes começaram a oferecer programas de aluguel de reagentes para várias dessas plataformas. É necessário comparar de maneira cuidadosa o custo da execução manual *versus* o custo da execução automatizada desses testes.

Tabela 70.2 Extratores de ácido nucleico automáticos

Fabricante	Tecnologia	Instrumentos	Tipo de amostra	Amostra/corrida	Duração da corrida	Duração da prática
Qiagen	Partículas magnéticas/extração em sílica	BioRobot 9604	Sangue, tampão leucocitário, tecido, *swab* bucal, cortes de tecido parafinizados, urina, líquido cerebrospinal, sangue seco, plasma, soro	96	< 2,5 h	20 min
		BioRobot 48	Sangue, tampão leucocitário, tecido, *swab* bucal, cortes de tecido parafinizados, urina, líquido cerebrospinal, sangue seco, plasma, soro	48 (múltiplos de 6)	20 min/6 amostras 2,5 h/48 amostras	35 min/24 amostras
		BioRobot EZ1	Sangue, tampão leucocitário, tecido, *swab* bucal, cortes de tecido parafinizados, urina, líquido cerebrospinal, sangue seco, plasma, soro	1–6	20 min	
Roche Diagnostics	Partículas magnéticas/ sondas de captura de oligonucleotídeo	MagNA Pure LC	Sangue, tampão leucocitário, células, fungos, bactérias, líquido cerebrospinal, urina, cortes de tecido parafinizados, *swab* bucal, plasma, soro	32 (múltiplos de 8)	2 h/24 amostras	35 min/24 amostras
		MagNA Pure Compact	Sangue, tampão leucocitário, células, fungos, bactérias, líquido cerebrospinal, urina, cortes de tecido parafinizados, *swab* bucal, plasma, soro	1–8		30 min/24 amostras
	Extração à base de filtro/sílica	Ampliprep	Plasma, soro	72	2,5 h	
BioMérieux	Partículas magnéticas/extração em sílica	Nuclisens extractor		10	45 min	20 min
		Nuclisens EasyMag (em desenvolvimento)		24	1 h	< 20 min
Gentra Systems	Método modificado de *salting out*	AutoPure LS	Sangue total, tampão leucocitário, células concentradas, lisados para amostras comprometidas, *swab* bucal, células em cultura	96 (múltiplos de 8)	8 h/96 amostras 4 h/48 amostras	35 min

Seleção do teste

Como para qualquer laboratório clínico, a meta principal do laboratório de diagnóstico molecular é fornecer testes confiáveis e, em tempo hábil, que produzam resultados para analitos considerados importantes para o tratamento do paciente pela comunidade médica. A escolha do teste é crítica para o sucesso do laboratório de diagnóstico molecular e envolve diversas considerações importantes (Association for Molecular Pathology, 1999). Qualquer teste novo deve representar uma possibilidade mais econômica ou mais efetiva de diagnóstico e/ou supervisão do paciente. É igualmente importante não só tomar decisões acerca da escolha do teste com base nos custos da execução mas também determinar como o novo teste poderia causar impacto na assistência global e na supervisão do paciente. Em algumas circunstâncias, pode parecer que o teste molecular aumenta o custo da supervisão do paciente por representar a adição de mais um teste à bateria já existente utilizada para uma determinada condição clínica. Entretanto, com a introdução de um novo teste, a supervisão do paciente pode se tornar mais efetiva. Um exemplo seria o uso do teste de determinação da carga viral do HIV-1 para monitoramento da progressão da doença e da efetividade da terapia farmacológica em indivíduos infectados. Muitos pacientes infectados pelo HIV-1 atualmente estão sob tratamento com uma combinação (ou coquetel) de vários fármacos, incluindo inibidores de protease e não nucleosídeos/nucleosídeos inibidores de transcriptase reversa. Ainda que sejam caros, e o vírus adquira resistência contra eles, esses fármacos se mostram bastante efetivos na redução da morbidade e da mortalidade em uma população considerável de pacientes infectados pelo HIV-1. Assim, mesmo que sua adição tenha representado um aumento do custo da supervisão dos pacientes infectados pelo HIV, o teste proporciona uma forma rápida e acurada de determinar a efetividade dos regimes de tratamento à base de fármacos caros.

Outra consideração poderia ser a introdução de um teste molecular que substituísse um teste laboratorial já existente, sendo o teste molecular mais custo/efetivo. Mesmo se o custo real do teste molecular fosse maior do que o custo do teste a ser substituído, os ganhos em termos de aumento de sensibilidade, aumento de especificidade ou redução do tempo de resposta poderiam resultar em economias significativas na supervisão dos pacientes. Essa situação poderia ser exemplificada pela supervisão de pacientes com diagnóstico presumível de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Enquanto essa hipótese diagnóstica não puder ser excluída, os pacientes são tratados com fármacos potencialmente hepatotóxicos ou submetidos ao isolamento. O teste laboratorial padrão, que consiste na observação direta do escarro do paciente tratado com corante acidorresistente para detecção da presença de *M. tuberculosis*, apresenta baixa sensibilidade, porém é extremamente rápido. Por outro lado, a cultura é bastante sensível, mas pode demorar até 6 semanas para fornecer algum resultado. Nessa situação, um teste molecular capaz de fornecer um diagnóstico mais rápido, com maior grau de sensibilidade e especificidade, possibilitaria a rápida interrupção da terapia farmacológica ou do isolamento no caso de pacientes que de fato não estivessem doentes.

No centro médico, a identificação de testes moleculares potencialmente úteis é responsabilidade dos diretores médicos e técnicos. Às vezes, essa tarefa pode ser auxiliada pela revisão da lista de testes enviados do centro médico. Clínicos e patologistas podem ser uma fonte valiosa na identificação das necessidades do centro médico em termos

de testes. É importante que, durante o processo de escolha de teste, as capacidades técnicas do laboratório sejam realisticamente comparadas com as necessidades clínicas concretas em termos de volume de testes, tempo de resposta requerido e gastos associados à execução do ensaio.

Uma vez identificado um analito em particular a ser testado por métodos moleculares, é importante considerar as diversas alternativas de abordagem de teste disponíveis. No caso de alguns analitos, por exemplo, poderia ser utilizada a hibridização Southern, amplificação de ácido nucleico in vitro, citogenética ou FISH. Antes de selecionar uma determinada metodologia, é importante ter em mente a condição clínica em questão, bem como as vantagens e desvantagens de cada uma das diversas metodologias existentes, para diagnosticar a referida condição.

A introdução de um novo teste, associada ao período de triagem clínica, possibilita a avaliação da utilidade clínica do teste e pode propiciar uma oportunidade de marketing conveniente. Desde que planejada com cuidado, essa abordagem permite ao laboratório trabalhar diretamente com o usuário final do teste, além de fornecer meios para que esses usuários compreendam a utilidade clínica do teste e suas limitações e eventualmente o utilizem de forma mais efetiva. É importante definir com clareza a métrica que pode ser tanto avaliada ao final da triagem clínica quanto utilizada para justificar a implementação ou exclusão do teste em questão.

Reembolso de testes diagnósticos moleculares

O reembolso de testes laboratoriais é um processo complexo que pode ser dividido em três fases. Essas fases são: cobertura, codificação e pagamento pelos serviços prestados pelo laboratório. As decisões relativas à cobertura usualmente são determinadas por cada um dos diversos planos de assistência de saúde existentes. Nos Estados Unidos, a cobertura do seguro-saúde fica a cargo de programas públicos, como o Medicare e o Medicaid, ou de planos de saúde particulares que são adquiridos individualmente ou por meio de um empregador. Em geral, o escopo da cobertura fornecida por um plano de saúde é destacado em amplas categorias de benefícios. As decisões acerca de serviços específicos são tomadas individualmente, de acordo com cada caso, durante o processamento das solicitações. Os planos de saúde podem desenvolver políticas de cobertura formal que descrevem se um determinado serviço é coberto e em quais circunstâncias se dará a cobertura. Diretores médicos, os governos estadual e federal, comitês consultivos de política médica, empregadores e uniões estão entre algumas das entidades envolvidas na tomada de decisões referentes à cobertura. A necessidade médica é o principal critério considerado pelos planos de saúde quando da tomada de decisões referentes à cobertura, embora a definição de necessidade médica esteja sujeita a diferentes interpretações. Um dos principais critérios também é o de que a tecnologia deve contar com a aprovação final do devido corpo regulamentador governamental. Além disso, as evidências científicas devem ser capazes de permitir que se chegue a determinadas conclusões acerca do efeito da tecnologia sobre os resultados em termos de saúde.

A cobrança dos testes de diagnóstico molecular seguem o mesmo procedimento utilizado na cobrança dos demais testes laboratoriais. De uma forma geral, a codificação da Current Procedural Terminology (CPT) e a codificação diagnóstica da International Classification of Disease (ICD-9,) simplificam o processo de cobrança ao informarem quais serviços ou procedimentos foram realizados e por quê. Além disso, o processo de reembolso usualmente é específico para cada instituição e consiste em procedimentos de cobrança computadorizados e manuais executados localmente, em cada instituição. É importante determinar com antecedência que exigências devem ser atendidas, em termos de documentação e acesso por computador, para geração de uma ordem de cobrança. Até há pouco tempo, existiam poucos códigos da CPT específicos para o diagnóstico molecular (Tab. 70.3). Esses códigos procedimento-específicos da CPT eram utilizados para cobrança de extração de ácidos nucleicos, digestão enzimática, amplificação *in vitro* e assim por diante. Mais recentemente, foram criados e adicionados muitos códigos novos à crescente lista de códigos da CPT, os quais são específicos para o diagnóstico molecular microbiológico. Esses novos códigos para agentes infecciosos são códigos globais que abrangem o procedimento do teste, interpretação e relato. Mais de 60 desses novos códigos são analito-específicos e utilizados para testes de microbiologia molecular. Em geral, existem três códigos distintos para cada analito: um para a técnica da sonda direta, outro para a técnica de amplificação *in vitro* e outro para a quantificação, independentemente da tecnologia utilizada. Para os organismos sem códigos da CPT, foram criados e introduzidos três códigos genéricos, denominados "sem especificação" (NOS, *not otherwise specified*).

Para todos os demais testes moleculares sem codificação analito-específica da CPT, pode ser utilizada uma combinação de códigos de procedimentos da CPT. Além dos códigos procedimento-específicos, existe um código específico para interpretação e relato que pode ser utilizado no nível técnico ou profissional, porém não pode ser utilizado em ambos os níveis. A Tabela 70.4 lista exemplos de cobranças associadas a códigos analito-específicos da CPT e a códigos procedimento-específicos da CPT. Em razão da natureza limitada e da descrição dos códigos de procedimento da CPT, há uma falta de consistência na interpretação do objetivo do código. Além disso, existe uma falta de representação das tecnologias mais modernas, como arranjo de pérolas *(bead array)*, PCR em tempo real, microarranjo etc., que são amplamente utilizadas por numerosos laboratórios clínicos. Diante disso, os laboratórios talvez sejam forçados a subutilizar a codificação.

Mais recentemente, um novo conjunto de modificadores alfanuméricos foi criado para os códigos procedimento-específicos da CPT. O propósito desse invento é ajudar os pagadores terceirizados a identificar os serviços pelos quais estão pagando. O novo sistema emprega esses modificadores para identificar os seguintes casos: neoplasias (tumores sólidos), neoplasias (linfoides/hematopoéticas), hematologia não neoplásica/coagulação, histocompatibilidade/tipagem sanguínea, neurológico não neoplásico, muscular não neoplásico, meta-

Tabela 70.3 Códigos da terminologia de procedimentos moleculares vigentes

Códigos analito-específicos de diagnóstico molecular de doenças infecciosas
Agente infeccioso por ácido nucleico (DNA ou RNA) (87470-87752)
Técnica da sonda direta
Técnica da sonda amplificada
Quantificação
Agente infeccioso não especificado (NE) (87797-87799)
Técnica da sonda direta
Técnica da sonda amplificada
Quantificação
Genotipagem de HIV RT+PR (87901)
Genotipagem de HCV (87902)
Códigos específicos de procedimentos de diagnóstico molecular
83890 Isolamento ou extração molecular
83891 Isolamento ou extração de ácido nucleico altamente purificado
83892 Digestão enzimática
83893 Produção de *dot/slot blot*
83894 Separação por eletroforese em gel (p. ex., agarose, poliacrilamida)
83896 Sonda de ácido nucleico, cada
83897 Transferência de ácido nucleico (p. ex., Southern, Northern)
83898 Amplificação de um único par de iniciadores de ácido nucleico de paciente (p. ex., PCR, LCR), cada par de iniciador
83901 Amplificação de ácido nucleico de paciente, multiplex, cada reação
83902 Transcrição reversa
83903 Varredura para detecção de mutação, por propriedades físicas, heteroduplex, eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), RNAse A, segmento único, cada
83904 Identificação de mutação por sequenciamento, segmento único, cada segmento
83905 Identificação de mutação por transcrição de alelo específico, segmento único, cada segmento
83912 Interpretação e relato

Tabela 70.4 Códigos da terminologia de procedimentos vigente para pagamento de testes moleculares

Nome do teste	Código	Número de vezes em que o código foi cobrado	Nome do procedimento ou teste
Fator V de Leiden por tecnologia de tempo real	83890	1	Isolamento de ácido nucleico
	83898	1	Amplificação
	83896	2	Cada sonda
	83912	1	Interpretação e relato
T(9;22) por RT-PCR em tempo real	83891	1	Isolamento de ácido nucleico
	83902	2	Transcrição reversa
	83898	2	Amplificação
	83894	2	Cada sonda
	83912	1	Interpretação e relato
Carga viral de HIV-1	87536	1	Ensaio quantitativo para HIV
Carga viral de CMV	87497	1	Ensaio quantitativo para CMV
Carga viral de HCV	87522	1	Ensaio quantitativo para HCV

CMV = citomegalovírus; HCV = vírus da hepatite C; HIV = vírus da imunodeficiência humana; RT-PCR = reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa.

bólico, outros; transporte metabólico, metabólico-farmacogenética e dismorfologia. Por enquanto, esses modificadores alfanuméricos não são obrigatórios e, caso venham a ser requisitados, é possível prever que na verdade talvez possam reduzir o pagamento por testes que identificam um número significativo de mutações.

Os níveis de reembolso para qualquer teste individual são estabelecidos pelos pagadores terceirizados, podendo ter menor relação com o custo real da execução do teste. Alguns pagadores terceirizados fazem reembolsos de níveis bastante elevados, enquanto outros seguem o esquema de taxas cobradas pelos laboratórios estabelecido pelo Medicare e Medicaid para códigos da CPT específicos. A cobrança desses testes dispensa a aprovação da FDA, de modo que uma declaração de renúncia dos testes não liberados pela FDA deve ser adicionada ao relatório final em referência a esse aspecto. Essa questão voltará a ser discutida adiante. Alguns pagadores terceirizados se recusam a reembolsar testes que venham acompanhados dessas declarações de renúncia, pois julgam que o custo de um teste desse tipo deve ser coberto por fundos destinados à pesquisa, ainda que as características de desempenho e utilidade clínica do teste sejam validadas pelo laboratório clínico.

Aspectos relacionados à patente

A vasta maioria dos procedimentos de amplificação in vitro trata-se de processos patenteados, que requerem um acordo de licença para poderem ser utilizados. Caso contrário, o laboratório que utilizar esses procedimentos sem adquirir a licença estará sujeito à ação judicial por violação da patente. Tradicionalmente, a licença para uso de um procedimento em particular é obtida pela compra de um conjunto de reagentes aprovados pela FDA por meio do fabricante que detém a patente do processo de amplificação. Considerando os testes de diagnóstico molecular, essa abordagem é bastante limitada, pois são poucos os testes aprovados pela FDA. Sendo assim, um laboratório que faça uso clínico de um determinado processo patenteado deve primeiramente negociar um acordo de licença com o dono da patente. É muito importante notar que, dependendo da complexidade da instituição interessada no acordo e da complexidade desse acordo, pode demorar de 3 meses a 1 ano para a licença ser concedida e o procedimento, então, ser realizado e cobrado para fins de uso clínico.

Considerações praticamente idênticas se aplicam ao uso das informações de sequências necessárias ao planejamento de um ensaio. As sequências de genes recém-descobertos (p. ex., genes humanos ou genomas virais) com frequência são patenteadas por seus descobridores. O uso das informações contidas nessas sequências sem a obtenção de acordo de licença implica os mesmos riscos de sujeição à ação judicial por violação de patente. Infelizmente, considerando o ambiente em que o ser humano vive hoje e a diversidade de fontes de informação de sequências existente, nem sempre fica claro se uma determinada sequência já foi patenteada ou, se tiver sido, quem a patenteou. Por isso, antes de proceder ao desenvolvimento de qualquer teste que envolva sequências publicadas para o qual tenha sido planejado o comprometimento de recursos significativos, é recomendável consultar os pesquisadores que descreveram a sequência pela primeira vez, a fim de descobrir se existem questões sobre patente envolvidas.

Validação analítica e clínica dos ensaios moleculares

Como em qualquer área do laboratório clínico, a introdução de um novo teste requer a sua devida validação (Clinical and Laboratory Standards Institute, 1995, 2003; Niesters, 2001, 2002; Prence, 1999). A validação de um teste clínico é um processo complexo que pode ser dividido em duas fases: analítica e clínica. Diversas organizações estabeleceram diretrizes e padrões para testes de diagnóstico molecular. Uma lista de diretrizes é apresentada na Tabela 70.5. Os parâmetros a serem avaliados durante a fase de validação analítica são: sensibilidade, especificidade, acurácia, precisão e, no caso dos ensaios quantitativos, linearidade do ensaio. A sensibilidade se refere ao limite inferior de detecção para o analito a ser quantificado pelo teste, determinando ao final se esse teste será útil para a finalidade pretendida. A especificidade fornece informação sobre reatividade cruzada com outros ácidos nucleicos além da sequência-alvo de interesse. Esses parâmetros fornecem informações básicas sobre o desempenho analítico do teste. A outra fase da validação é a fase de validação clínica do teste. Nessa etapa, a utilidade clínica do teste é avaliada em relação ao uso pretendido. Com base na aplicação de interesse do teste, devem ser estabelecidos os ajustes analíticos apropriados que permitirão a estratificação dos pacientes em indivíduos com e sem doença e/ou em indivíduos cuja condição clínica esteja piorando ou melhorando. Esses ajustes são determinados primeiramente pela aplicação do teste a pacientes com e sem a doença específica e demografia para as quais o teste é dirigido.

Existem diferenças importantes entre a implementação de um teste aprovado pela FDA e de um teste que não possua essa aprovação. A CLIA'88 fornece disposições específicas para a validação desses tipos de ensaio. Os laboratórios que estejam implementado testes aprovados pela FDA devem verificar e documentar as características de desempenho do teste de interesse para as indicações e em populações similares àquelas para as quais o fabricante estabeleceu o desempenho. Por outro lado, a implementação de ensaios desenvolvidos internamente, no laboratório, requer um processo mais abrangente. Para tanto, é necessário realizar uma extensa documentação do desempenho do teste, além da adesão a programas de controle de qualidade que assegurem o desempenho diário do teste.

Na introdução de um ensaio molecular produzido no laboratório, o primeiro passo consiste em otimizar cada etapa do processo analítico, que abrange a extração de ácido nucleico, amplificação, detecção, cálculo e interpretação de resultados. Quando a otimização é realizada separadamente para cada etapa, é importante notar que na maioria dos casos, quando todas as etapas são reunidas, torna-se necessária uma reotimização. Após a otimização do ensaio, é importante avaliar e documentar as variáveis pré-analíticas que poderiam exercer impacto sobre as características de desempenho do ensaio. Algumas das variáveis pré-analíticas mais comuns são o tipo de amostra, transporte, requisitos referentes ao manuseio para fins de armazenamento e substâncias interferentes (p. ex., lipídeos, hemoglobina, bilirrubina etc.).

Após a otimização, os laboratórios devem realizar e documentar a validação analítica para o uso pretendido para o ensaio. É importante destacar que a aplicação de programas de validação analítica tem sido um desafio, por causa da falta de material de referência padrão para um número significativo de analitos de ácido nucleico. Esse déficit compromete a habilidade do laboratório de determinar a sensibilidade e acurácia do ensaio. Algumas organizações nacionais e internacionais estão adotando medidas para desenvolver materiais de referência padrão. O National Institute of Standards and Technology (NIST) desenvolveu o primeiro padrão de referência de ácidos nucleicos para o teste de identificação de seres humanos. Mais recentemente, a Organização

Tabela 70.5 Diretrizes e padrões para testes de diagnóstico molecular

Organização	Diretriz ou padrão	Endereço
Clinical and Laboratory Standards Institute	MM1-A Métodos de diagnóstico molecular para doenças genéticas MM2-A Ensaios para detecção de rearranjo de gene de imunoglobulina e de receptor da célula T MM3-A Métodos de diagnóstico molecular para doenças infecciosas MM-5A Ensaios de amplificação de ácido nucleico para hematologia molecular MM-6A Diagnóstico molecular quantitativo para doenças infecciosas MM-7A Métodos de hibridização *in situ* com fluorescência para genética médica MM-9A Métodos de sequenciamento de ácido nucleico em medicina laboratorial diagnóstica MM-14P Teste de proficiência para métodos moleculares Existem outras diretrizes em desenvolvimento. As atualizações são disponibilizadas no site.	Wayne, PA; www.nccls.org
American College of Medical Genetics	Padrões e diretrizes para laboratórios de genética clínica: declarações de política Hibridização *in situ* com fluorescência em interfase pré-natal Declaração da posição da ACMG em relação à triagem de marcadores múltiplos em mulheres com 35 anos ou mais Síndrome do X frágil: diagnóstico e teste de detecção de portador Diretrizes e padrões técnicos para a síndrome do X frágil: os primeiros em uma série de suplementos doença-específicos de padrões e diretrizes destinados a laboratórios de genética clínica da American College of Medical Genetics Instrução sobre armazenamento e uso de materiais genéticos Instrução sobre triagem de múltiplos marcadores em mulheres grávidas Instrução sobre o uso do teste de detecção de apolipoproteína E para doença de Alzheimer Teste diagnóstico para as síndromes de Prader-Willi e de Angelman Instrução sobre a triagem populacional para detecção da mutação *BRCA-1* em judias ashkenazi Suscetibilidade genética aos cânceres de mama e de ovário: diretrizes para avaliação, aconselhamento e teste Princípios de triagem: relatório do subcomitê de triagem do American College of Medical Genetics Clinical Practice Committee Declaração da posição sobre o teste de detecção de portador da doença de Canavan Diretrizes e padrões laboratoriais para a triagem de fibrose cística destinadas à triagem de portadores de fibrose cística com base na população Teste genético para câncer de cólon: uma declaração conjunta da American College of Medical Genetics e da American Society of Human Genetics Declaração de consenso sobre o teste de detecção da mutação do Fator V de Leiden Avaliação técnica e clínica da hibridização *in situ* com fluorescência: uma declaração da posição do ACMG/ASHG Considerações técnicas Recomendações do ACMG para a interpretação padrão de variações de sequência Declaração do American College of Medical Genetics sobre o teste diagnóstico para detecção de dissomia uniparental	ABMG/ABGC/ACMG, Administrative office, 9650 Rockville Pike, Bethesda. MD 20814–3998, www.acmg.net
American Society for Histocompatibility and Immunogenetics	Padrões para teste molecular de histocompatibilidade e imunogenético	ASHI, PO Box 15804, Lenexa, KS 66285–5804
National Institutes of Health–Department of Energy	Força-tarefa para teste genético e promoção de segurança e efetividade	www.nhgri.nih.gov/Policyandpublicaffairs/Elsi/tfgentest
Food and Drug Administration	Orientação para as indústrias na manufatura e avaliação clínica de testes de detecção *in vitro* de sequências de ácido nucleico de HIV-1 (esboço)	www.fda.gov/cber/gdlns/nashiv.pdf
	Orientação para indústrias e/ou equipe de revisores do FDA – Aprovação de aplicações pré-comerciais para ensaios pertinentes ao vírus da hepatite C (HCV), que são indicados para diagnóstico ou monitoramento da infecção por HCV ou doenças associadas (esboço de orientações)	ww.fda.gov/cdrh/ode/1353pdf
Association for Molecular Pathology	Recomendações para desenvolvimento interno e operação de testes de diagnóstico molecular	www.ampweb.org
Technical Working Group on DNA Analysis Methods	Orientações para programas de garantia de qualidade para análise de DNA	Crime Laboratory Digest 1991; 18:44–75

Mundial da Saúde (OMS) introduziu um padrão de referência para a hepatite C destinado à validação dos testes de ácido nucleico utilizados na triagem do sangue e de seus produtos. Painéis de referência calibrados segundo o material de referência padrão da OMS atualmente são comercializados (Boston Biomedica Inc., Boston, MA). Além disso, a FDA e várias empresas comerciais têm empreendido esforços com o intuito de desenvolver reagentes de referência para HIV-1.

Na ausência de matérias de referência padrão, os laboratórios podem desenvolver seu próprio material de referência para validação analítica e, subsequentemente, para o monitoramento do desempenho diário. A criação de material de referência no laboratório envolve o uso de um método estabelecido de forma independente para determinar a concentração de ácido nucleico-alvo. Como alternativa, o laboratório pode conduzir estudos para comparação com outro ensaio já estabelecido. Exemplificando, as amostras podem ser divididas para utilização em estudos comparativos em parceria com outro laboratório que realize um teste molecular semelhante. Essas amostras podem estar disponíveis internamente ou serem fornecidas por uma fonte externa, como laboratório colaborador, governo (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, FDA ou National Institutes of Health), ou até mesmo um laboratório comercial. A sensibilidade e linearidade analítica dos ensaios podem ser avaliadas por meio do teste de diluições seriadas de amostras-alvo positivas que já foram analisadas de modo quantitativo por outro ensaio ou pelo teste de

amostras-alvo negativas às quais foram adicionados ácido nucleico-alvo purificado, microrganismos ou células. A precisão do ensaio pode ser avaliada testando-se um determinado número de amostras de pacientes múltiplas vezes em uma única corrida e em corridas diferentes ao longo de vários dias. As amostras utilizadas nos estudos de precisão devem abranger a faixa dinâmica do teste. Assim como para a precisão, a validação da linearidade pode ser feita utilizando-se diluições seriadas de amostra-alvo positiva em uma amostra-alvo negativa. A Tabela 70.6 fornece um exemplo de protocolo de estudos analítico e de correlação para avaliação de um ensaio quantitativo de carga viral.

A avaliação das variáveis pré-analíticas anteriormente mencionadas pode ser feita injetando nas amostras-alvo negativas uma quantidade conhecida de alvo purificado, microrganismos ou células. A mesma abordagem também pode ser utilizada para avaliar o efeito de lipídeos, hemoglobina, bilirrubina, fármacos terapêuticos e anticoagulantes de amostra sobre o desempenho.

A validação da utilidade clínica de um ensaio também constitui um processo complexo que impõe muitos desafios. O primeiro passo na validação analítica consiste em formular uma pergunta clínica e identificar a população-alvo em que o teste será aplicado. A validação clínica requer a avaliação da sensibilidade clínica do ensaio por meio do teste de um número adequado de amostras de pacientes previamente diagnosticados com a doença. A especificidade clínica é determinada pela análise das amostras de pacientes diagnosticados com uma doença diferente, que possa ser confundida com a doença de interesse e apareça no diagnóstico diferencial. Além disso, as amostras provenientes de doadores sadios podem ser adequadas para determinar a especificidade clínica do teste. Os demais parâmetros a serem determinados são os valores preditivos positivo e negativo pertinentes ao desempenho do teste ao longo do curso da doença ou terapia. É prática geral de um laboratório clínico determinar a sensibilidade e especificidade de um novo ensaio por meio da comparação com um método considerado o padrão-ouro ou com um método que esteja em uso no laboratório. Em alguns casos, os testes moleculares parecem ser mais sensíveis ou específicos do que os testes considerados padrão-ouro. Pode ser um desafio a tarefa de eliminar as discrepâncias existentes entre os métodos novos e os métodos em uso ou considerados padrão-ouro. Há casos em que as discrepâncias foram resolvidas utilizando-se um método molecular diferente.

É imperativo que o laboratório documente e mantenha os resultados das validações analítica e clínica para futuras consultas e inspeções. A Tabela 70.7 fornece uma lista de parâmetros diferentes a serem documentados.

Reagentes analito-específicos

Um novo termo foi introduzido no léxico do diagnóstico molecular. O termo "reagente analito-específico" (ASR) foi criado pela FDA para fazer referência aos reagentes utilizados em testes clínicos que conferem especificidade à detecção do analito-alvo (Medical Device Amendments, 1976; Safe Medical Device Act, 1990; Food and Drug Administration Modernization Act, 1997; Medical Devices, 1997; Swanson, 1999; Kaul, 2001). A FDA define os ASRs como "anticorpos mono e policlonais, receptores específicos, proteínas, ligantes, sequências de ácidos nucleicos e reagentes similares que, por meio de ligação específica ou reação química com substâncias presentes na amostra, destinam-se ao uso em aplicações diagnósticas para identificação e quantificação de uma substância química ou ligante individual presente em uma amostra biológica". São considerados ASRs os iniciadores e sondas desenvolvidos especificamente para detectar certo tipo de DNA ou RNA-alvo, que sejam utilizados em qualquer ensaio desenvolvido no laboratório. A partir de novembro de 1998, os laboratórios clínicos que utilizam ensaios desenvolvidos internamente com ASRs devem aderir à regulamentação definitiva da FDA referente aos ASRs, publicada no registro federal. Como parte dessa regulamentação definitiva, os laboratórios são solicitados a incluir uma declaração de renúncia bastante específica em seus relatórios, afirmando que "esse teste foi desenvolvido e suas caraterísticas de desempenho foram determinadas pelo (nome do laboratório). O teste em questão não foi liberado pela FDA". Entretanto, ao mesmo tempo, a FDA permite aos laboratórios acrescentarem no relatório uma observação afirmando que (1) os ASRs dispensam a aprovação da FDA, (2) o teste no qual um ASR em particular é utilizado pode se prestar a finalidades clínicas e (3) o laboratório está sob a certificação da CLIA'88 para realizar testes de alta complexidade.

Além da definição dos ASRs, a FDA propôs um conjunto de controles e restrições a serem aplicados ao uso deles com o intuito de garantir a qualidade e consistência, bem como esclarecer que os laboratórios que

Tabela 70.6 Exemplo de estudos analítico e de correlação para avaliação de ensaio quantitativo viral

Amostra		Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5	Corrida 6	Corrida 7	Corrida 8
1	Controle de kit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Indeterminado	20.000.000
2	Controle de kit	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Indeterminado	Normal
3	Controle de kit	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Indeterminado	20.000.000
4	Precisão	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Indeterminado	Indeterminado	Normal
5	Precisão	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000
6	Precisão	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Indeterminado	Indeterminado	Normal
7	Precisão	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000
8	Precisão	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Indeterminado	Indeterminado	Normal
9	Precisão	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000
10	Sensibilidade	50 UI/mL	50 UI/mL	50 UI/mL	50 UI/mL	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Normal
11	Sensibilidade	50 UI/mL	50 UI/mL	50 UI/mL	50 UI/mL	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000
12	Sensibilidade	25 UI/mL	25 UI/mL	25 UI/mL	25 UI/mL	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Normal
13	Sensibilidade	25 UI/mL	25 UI/mL	25 UI/mL	25 UI/mL	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000
14	Sensibilidade	10 UI/mL	10 UI/mL	10 UI/mL	10 UI/mL	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Normal
15	Sensibilidade	10 UI/mL	10 UI/mL	10 UI/mL	10 UI/mL	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000
16	Sensibilidade	5 UI/mL	5 UI/mL	5 UI/mL	5 UI/mL	0	0	Indeterminado	Normal
17	Sensibilidade	5 UI/mL	5 UI/mL	5 UI/mL	5 UI/mL	2	2	Indeterminado	20.000.000
18	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	20	20	Indeterminado	Normal
19	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	200	200	Indeterminado	20.000.000
20	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	2.000	2.000	Indeterminado	Normal
21	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	20.000	20.000	Indeterminado	20.000.000
22	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	200.000	200.000	Indeterminado	Normal
23	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	2.000.000	2.000.000	Indeterminado	20.000.000
24	Linearidade	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	20.000.000	20.000.000	Indeterminado	Normal

Tabela 70.7 Lista de checagem da documentação para validação de ensaios

Nome do teste	Estabeleça o nome do teste, incluindo a tecnologia utilizada. Certifique-se de que o nome informado identifica o organismo em particular e/ou doença/condição a ser testada.
Uso pretendido	Informar o que o teste mede e qual a finalidade dessa medida. Identificar o microrganismo em particular e o(s) parâmetro(s) testado(s), bem como indicar o uso do teste (p. ex., diagnóstico, prognóstico, monitoramento da resposta ao tratamento, orientação de terapia etc.).
Indicações de uso	Forneça a(s) condição(ões) clínica(s). Utilize definições padrão de referência, conforme consta no OMIM.
Categoria metodológica	Identificar a metodologia empregada no teste.
Procedimento do teste	Fornecer informação referente aos tipos de amostra, manuseio e procedimentos de transporte da amostra, isolamento e armazenamento de ácido nucleico, descrição do procedimento do teste, relatórios de dados, resultados esperados, interpretação técnica dos resultados. Todos esses parâmetros devem ser incluídos nas políticas e nos procedimentos do teste em questão.
Resultados do teste	Fornecer exemplos de resultados.
Verificação analítica	Sensibilidade analítica, especificidade, precisão, faixa dinâmica, reatividade cruzada, substâncias interferentes etc.
Controle e garantia de qualidade	Delinear o programa de controle e garantia de qualidade. Identificar programas informais de proficiência, caso não haja nenhum programa aprovado pelo HHS.
Limitações do ensaio	Explicar com clareza e/ou discutir as potenciais limitações do ensaio.
Dados clínicos	Objetivo primário do estudo, condição clínica avaliada, população de pacientes, demografia, estimativa do tamanho da amostra.
Verificação clínica	Sensibilidade clínica, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.
Relato dos resultados do teste	Interpretação clínica.
Utilidade clínica	Potencial benefício para o paciente.

HHS = Department of Health and Human Services; OMIM = Online Mendelian Inheritance in Man (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/).

estabelecem ensaios desenvolvidos internamente são responsáveis pelo desempenho dos testes. De modo interessante, esses controles se aplicam tanto aos laboratórios onde são desenvolvidos internamente os ensaios que utilizam ASRs quanto aos fabricantes desse tipo de reagente. É exigido dos laboratórios o cumprimento das exigências de certificação da CLIA'88 para testes de alta complexidade, bem como a determinação das características de desempenho dos ensaios desenvolvidos internamente, segundo as regulamentações da CLIA'88. Dos fabricantes de ASRs, exige-se o registro na FDA, a observância às Good Manufacturing Practice e a restrição da venda desse tipo de reagente aos laboratórios certificados pela CLIA'88 para execução de testes de alta complexidade. Ademais, os fabricantes são responsáveis por comunicar à FDA quaisquer efeitos adversos decorrentes de falha no processo de manufaturação.

Restrições especiais do teste genético

Os testes genéticos são realizados para fins diagnósticos e/ou prognósticos, diagnóstico pré-natal, triagem de recém-nascidos, determinação do *status* de portador, diagnóstico, prognóstico, estado pré-sintomático e teste preditivo. Existem algumas limitações a serem consideradas ao oferecer testes genéticos. A primeira delas é que o teste talvez não detecte todas as mutações possivelmente presentes em um determinado gene causador de doença. Um único gene pode apresentar uma gama de mutações. Um resultado negativo não é capaz de garantir completamente que o indivíduo testado de fato não seja portador de uma mutação em um determinado gene. Ao mesmo tempo, um resultado de teste positivo pode impor riscos diferentes para cada indivíduo. Além disso, outra limitação do teste genético está relacionada à complexidade do desenvolvimento de certas doenças genéticas. Isso cria desafios sobretudo à realização de testes genéticos com finalidade prognóstica. A penetrância pode ser inferior a 100% e/ou a doença pode ser causada por uma alteração genética ainda desconhecida, além das mutações já identificadas no(s) gene(s) testado(s). Assim, o teste preditivo não fornece respostas absolutamente certas para cada indivíduo que possa apresentar risco de ter uma doença.

Controle e garantia da qualidade

Controle de qualidade do processo do teste

O estabelecimento de testes de diagnóstico molecular, em particular de ensaios de amplificação, requer o desenvolvimento de controles para cada etapa do processo, incluindo preparo de reagentes, coleta da amostra, aliquotagem da amostra e execução do ensaio em si (Neumaier, 1998; McGovern, 1999; Mulcahy, 1999; Schwartz, 1999; Carter, 2001; Dequeker, 2001; Commission on Laboratory Accreditation, 2005). Existem algumas considerações relativas ao controle de qualidade que se aplicam a todos os ensaios moleculares e são importantes para garantir a obtenção de resultados confiáveis. A Tabela 70.8 fornece uma lista de diversos parâmetros que devem compor o programa de garantia/controle da qualidade. Como para qualquer teste laboratorial, um procedimento bem planejado e bem redigido é essencial para garantir o desempenho reproduzível do ensaio. Trata-se de uma das ferramentas auxiliares mais importantes durante o treinamento prático de novos funcionários, ou nos casos em que o procedimento é executado poucas vezes. O protocolo do procedimento deve ser redigido de acordo com as diretrizes específicas estabelecidas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards e descrito nos manuais de procedimentos técnicos de laboratórios clínicos.

Uma seleção cuidadosa dos reagentes-controle é vital para a correta interpretação dos resultados dos testes. Vários tipos de controles são utilizados no decorrer da execução de um ensaio, com o intuito de garantir um desempenho apropriado. O uso de controles positivos e negativos é exigido pelas regulamentações da CLIA'88, e esses controles devem ser processados em cada teste clínico realizado. A falha em obter um resultado correto para qualquer um dos controles invalida todo o teste e requer a repetição dele para todas as amostras. Quando possível, os reagentes-controle positivos e negativos devem se parecer ao máximo com a amostra do paciente. Ademais, um controle positivo deve representar um nível clinicamente relevante de sequência-alvo de ácido nucleico contra a interferência de fundo da sequência-alvo de ácido nucleico negativa. O controle negativo deve conter as sequências de ácido nucleico "de fundo" que se espera encontrar na amostra do paciente. Além dos controles positivo e negativo, um controle *blank* (controle que contém todos os componentes da mistura reativa, exceto o ácido nucleico) deve ser incluído em cada ensaio.

Além do uso desses controles, às vezes torna-se imperativo incluir um controle interno para verificar a presença de inibidores em amostras de pacientes individuais. Se esse controle interno não for utilizado, então, quando um resultado negativo for obtido, será impossível saber se a ausência do amplicon se deveu à ausência da sequência-alvo na amostra do paciente ou à presença de inibidores que inibiram a reação de amplificação. Para evitar essa situação, recomenda-se amplificar uma sequência-controle positiva interna. O controle positivo interno pode ser uma sequência de ácido nucleico que não esteja relacionada à sequência-alvo do ensaio clínico, mas que esteja constitutivamente

Tabela 70.8 Condução do processo de teste clínico

Atividade		Consideração
Preparo do reagente	1	Execução do procedimento em ambiente de máxima limpeza.
	2	Armazenar as soluções-estoque de trabalho em alíquotas para serem utilizadas uma única vez.
	3	Realizar controle de qualidade para cada novo lote de reagentes, antes da utilização no teste clínico. Para a avaliação da sensibilidade, utilizar amostra que contenha poucas cópias.
	4	Preparar as misturas com mestria, a fim de reduzir a variabilidade e os erros.
Coleta da amostra	1	Estabelecer limites de tolerância aceitáveis para cada tipo de amostra a ser testada (temperatura de armazenamento, tempo de transporte, anticoagulante etc.).
	2	Distribuir protocolos a todos os potenciais usuários, para alertar quanto ao manuseio correto da amostra.
	3	Reter as informações clínicas e analíticas contidas na requisição.
Processamento da amostra	1	A amostra deve ser recebida e armazenada no laboratório de pré-amplificação (limpo).
	2	Desenvolver diretrizes para garantir que as amostras não sejam misturadas e para preservar a integridade da sequência-alvo.
Análise da amostra		
A. Procedimento de extração	1	Avaliar os procedimentos de extração quanto à presença de inibidores e fatores que reduzem o rendimento do alvo.
	2	Adicionar controle interno à amostra no momento da extração, a fim de identificar falsos-negativos produzidos por inibidores ou determinar a taxa de falsos-negativos de outra forma. Se não for possível avaliar um controle interno para cada amostra de paciente, então a taxa de falsos-negativos deve ser informada no relatório sob a forma de declaração de renúncia, em caso de resultados negativos.
B. Ajuste do ensaio, amplificação e detecção	1	Otimizar a concentração dos iniciadores, $MgCl_2$, dNTPs; volume; condições de ciclo e sistema de detecção.
	2	Desenvolver diretrizes para minimizar a possibilidade de contaminação com moldes de ácido nucleico ou *amplicons* (ver as seções sobre controle de qualidade).
	3	Os controles devem ser processados do mesmo modo que as amostras de pacientes.
	4	Desenvolver diretrizes para ajustar o ensaio, com o intuito de reduzir a contaminação cruzada de amostras e controles.
Interpretação e relatório	1	Desenvolver diretrizes para interpretação e relatório.
	2	A interpretação deve ser realizada por pelo menos dois indivíduos, independentemente.
	3	Desenvolver diretrizes para distribuição de relatórios.

presente na amostra. Como alternativa, esse controle pode representar uma sequência que tenha sido utilizada para "batizar" a amostra clínica durante alguma etapa do processo de teste. O controle positivo interno endógeno anterior em geral requer um conjunto à parte de iniciadores e pode necessitar de uma reação separada. O controle batizado em geral é uma sequência projetada para ser amplificada pelos mesmos iniciadores utilizados para o alvo clínico, sendo usualmente amplificada no mesmo tubo de reação em que está a amostra clínica. Como no caso do controle clínico positivo externo, o controle interno deve ser utilizado em uma concentração que seja relevante para o processo de teste clínico. Os controles positivos internos também são bastante valiosos para avaliar a presença de ácido nucleico amplificado e ausência de inibidores, bem como para checar se as reações de amplificação e detecção foram realizadas de acordo com as especificações.

O uso de uma série de controles positivos em diferentes concentrações de sequência-alvo pode ser bastante útil para monitorar o ensaio quanto à ocorrência de alterações na sensibilidade ao longo do tempo. Além disso, para a detecção de baixos níveis de amplicon, uma medida bastante útil pode ser a inclusão de um controle positivo em que a concentração de sequência-alvo esteja abaixo do limiar de detecção do ensaio.

No caso dos ensaios desenvolvidos no próprio laboratório, é extremamente importante implementar um programa de controle de qualidade para validar a força, a pureza e o desempenho de cada reagente crítico no processo de teste. Cada reagente crítico deve ser testado antes de ser aprovado para uso no teste clínico. Limites de tolerância devem ser estabelecidos para cada reagente crítico. Quando possível, esses limites devem ser estabelecidos por meio de uma medida quantitativa, a fim de evitar avaliações subjetivas da qualidade do reagente crítico.

Controle de qualidade do equipamento

Para todo equipamento utilizado no laboratório de diagnóstico molecular, deve ser redigido um procedimento de controle de qualidade que descreve os procedimentos de manutenção do equipamento e checagens de calibração. O procedimento de controle da qualidade deve ser redigido de acordo com as diretrizes publicadas em 1992, sob o título de Clinical Laboratory Technical Procedure Manual, pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (atual Clinical and Laboratory Standards Institute). Assim como para qualquer equipamento utilizado no laboratório clínico, os limites de tolerância para um desempenho aceitável e as checagens de calibração para todos os equipamentos utilizados durante o processo de teste devem ser definidos de forma clara e monitorados regularmente, a fim de assegurar uma produção contínua de resultados de teste acurados e confiáveis. Quando o desempenho ou as checagens de calibração ultrapassam os limites de tolerância definidos para qualquer instrumento em particular, este deve ser imediatamente retirado de serviço e enviado para conserto. Após o reparo do equipamento, é necessário calibrá-lo antes de liberá-lo para uso novamente. Como parte do programa de controle de qualidade desenvolvido por cada laboratório, a documentação de toda a manutenção, checagens de desempenho e calibração ou reparo de cada peça de equipamento deve ser mantida e protegida conforme a política de retenção de documentos adotada pelo laboratório.

Termocicladores são um item crucial para qualquer laboratório de diagnóstico molecular. Qualquer alteração no desempenho dos termocicladores exerce impacto direto na sensibilidade e precisão do ensaio realizado na parte afetada do equipamento. A manutenção, o controle de qualidade e a calibração do termociclador, assim como para qualquer instrumento, deve seguir as recomendações do fabricante. Resumindo, como parte do monitoramento do desempenho dos termocicladores, é necessário determinar e documentar o tempo de ciclo, verificar erros de ponto de ajuste e registrar quaisquer mensagens de erro. Os tempos de ciclo entre corridas distintas não diferem em mais de 2 minutos. Flutuações do tempo de ciclo constituem um sinal de alerta de que o termociclador está precisando de ajustes e restauração à sua condição original. Além disso, recomenda-se testar o resfriador, o aquecedor e a uniformidade de temperatura seguindo as instruções do fabricante. A checagem da uniformidade da temperatura de bloqueio pode ser feita utilizando-se um termopar acoplado a uma sonda de temperatura.

Outro item de equipamento importante, utilizado diariamente no laboratório de diagnóstico molecular, é o pipetador. As pipetas são utilizadas em quase todas as etapas do procedimento de teste. Uma ênfase especial deve ser dada ao controle de qualidade e manutenção das pipetas, pois estas podem ser uma das principais fontes de erro. Os demais itens de equipamento devem passar pelo controle de qualidade e manutenção, de acordo com as recomendações do fabricante. Quando possível, os equipamentos devem ser calibrados utilizando padrões ou materiais de referência certificados.

Cada laboratório de diagnóstico molecular deve elaborar por escrito um programa abrangente de garantia da qualidade. O objetivo desse programa é monitorar e avaliar, de forma objetiva e sistemática, a qualidade e o grau de adequação dos resultados fornecidos pelos testes. O programa de garantia da qualidade deve tratar de cada aspecto do processo de teste, desde a fase pré-analítica, passando pela fase analítica, até a fase pós-analítica. Esse programa deve incluir políticas redigidas por escrito, bem como a documentação para instrução e treinamento de funcionários, educação médica continuada, testes de proficiência, inspeções internas e externas, incluindo a documentação de ações corretivas para deficiências citadas e programas de controle de qualidade para testes clínicos, desempenho de equipamentos e segurança.

O programa de garantia da qualidade monitora os aspectos do teste clínico que não sustentam diretamente a validade analítica do resultado do teste e, assim, em geral não integram o programa de controle de qualidade de testes clínicos. Alguns desses parâmetros são o tempo de resposta mensal, revisões mensais dos resultados normais e anormais, desenvolvimento de critérios para rejeição de amostras, revisão do registro de amostras rejeitadas e indicadores de qualidade de teste. Ademais, o laboratório deve participar de programas de pesquisa de proficiência. Existem testes para os quais foram desenvolvidos programas de proficiência por diferentes associações de profissionais. O College of American Pathologists (CAP) oferece uma variedade de programas independentes e combinados na área de diagnóstico molecular de doença infecciosas, oncologia e genética. Esse último é um programa oferecido em cooperação com a American College of Medical Genetics. Recentemente, o CDC disponibilizou um programa de avaliação de desempenho para M. tuberculosis e HIV-1. No caso dos testes para os quais nenhum programa de proficiência oficial é oferecido, é necessário estabelecer programas de proficiência informais pela troca de amostras entre laboratórios que oferecem os mesmos serviços ou por outros meios, conforme a disponibilidade do laboratório.

Acreditação laboratorial

Os laboratórios que realizam testes com amostras de origem humana para fins de diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças estão sujeitos à regulamentação federal imposta pela CLIA'88. Como já descrito nos Capítulos 1 e 9, a CLIA'88 estabeleceu padrões projetados para melhorar a qualidade das práticas laboratoriais e também expandiu a fiscalização federal para abranger quase todos os laboratórios clínicos existentes nos Estados Unidos. É importante salientar que os laboratórios de pesquisa não estão sujeitos à CLIA'88, a menos que a pesquisa laboratorial divulgue resultados específicos aos indivíduos testados, aos familiares e/ou aos médicos responsáveis pelo tratamento deles. Isso se aplica mesmo quando houver uma declaração de renúncia no relatório final, afirmando que os resultados do teste devem ser utilizados somente para fins de pesquisa e/ou que os testes não foram cobrados. A CLIA'88 descreve padrões bastante específicos para todas as áreas do processo de teste, treinamento de pessoal, teste de proficiência, controle de qualidade e garantia de qualidade. A regulamentação federal estabelece um registro, sanções e procedimentos de execução que garantem a manutenção dos padrões definidos por ela. As regulamentações que determinam a implementação da CLIA'88 foram desenvolvidas pelo Department of Health and Human Services (HHS) e pelo Public Health Service. Quando essas normas foram estabelecidas, o CDC foi encarregado de classificar analitos e supervisionar a implementação de padrões. A FDA foi encarregada de revisar e garantir a segurança e eficácia dos testes, enquanto a Health Care Finance Administration foi incumbida de coletar taxas, conceder permissões, inspecionar laboratórios e iniciar ações punitivas quando necessário.

Sujeitos à CLIA'88, os testes foram classificados como microscopia realizada por prestador dispensada, testes de complexidade moderada e testes de alta complexidade. Os testes são classificados nas categorias de complexidade moderada e alta com base em um sistema de pontuação numérico. Esse sistema de pontuação considera alguns dos seguintes fatores: conhecimento necessário para execução do teste; treinamento e experiência; disponibilidade de calibradores; controle de qualidade; teste de proficiência; características operacionais, grau de interpretação e julgamento etc. Um teste é considerado de complexidade moderada se alcançar uma pontuação igual a 13 ou menos. Um teste com pontuação acima de 13 é considerado complexo.

Os testes de diagnóstico molecular são considerados testes de alta complexidade. Os laboratórios que realizam esses testes devem buscar a acreditação do HHS. O HHS concedeu à CAP o *status* de agência executiva, voltada para o cumprimento das referidas regulamentações. O CAP aceita os programas de acreditação desses laboratórios, considerando-os equivalentes ou mais rigorosos nas áreas de controle/garantia da qualidade, comparativamente aos padrões descritos na CLIA'88. Assim, a maioria dos laboratórios que realiza testes de diagnóstico molecular é reconhecida pela CAP. Em 1993, a CAP introduziu uma lista de checagem na área de patologia molecular e, desde então, continua a atualizá-la anualmente. Além disso, essa lista de checagem de patologia molecular representa um recurso significativo durante o desenvolvimento de laboratórios de diagnóstico molecular, para aperfeiçoamento de programas de controle e garantia de qualidade, requisição de amostras, relatórios etc.

Os laboratórios que realizam teste de identificação de DNA como parte de estudos de assistência social de análise forense de DNA também devem obter a acreditação para essa finalidade. Para tanto, uma abordagem seria o programa oferecido pela American Society of Criminalist Laboratory Directors (ASCLD). A ASCLD oferece um programa de acreditação de laboratórios de criminalística. Essa acreditação é um programa voluntário, do qual podem participar quaisquer laboratórios de criminalística que realizem análises de DNA. O objetivo da participação nesse programa é demonstrar a complacência do laboratório, em termos de operações de supervisão, equipe de funcionários, procedimentos, equipamentos, segurança da planta física e segurança, com as diretrizes propostas pelo Technical Working Group on DNA Analysis Methods (TWGDAM). O National Forensic Science Technology Center fornece assistência a laboratórios de criminalística que estejam se preparando para obter a acreditação da ASCLD/Lab, além de conceder certificação para laboratórios de análise de DNA complacentes com as diretrizes do TWGDAM. Com relação aos testes de paternidade, a American Association of Blood Banks (AABB) desenvolveu diretrizes para a realização dos testes com DNA; além disso, concede acreditação por meio do seu programa de acreditação de testes de paternidade. Existem mais de 40 laboratórios de teste de paternidade acreditados pela AABB. Essa acreditação ajuda os laboratórios a alcançarem um desempenho de qualidade.

Referências bibliográficas

Association for Molecular Pathology: Recommendations for in-house development and operation of molecular diagnostic tests. Am J Clin Pathol 1999; 111:449–463.

Bachner P. Hamlin W: Federal regulation of clinical and the clinical laboratory improvement amendments of 1988 – Part II. Clin Lab Med 1993; 13: 987–994.

Carter MA: Ethical aspects of genetic testing. Biol Res Nurs 2001; 3:24–32.

Clinical and Laboratory Standards Institute: MM3-A Molecular diagnostics method for infectious diseases: approved guideline. Wayne, PA, CLSI/NCCLS, 1995.

Clinical and Laboratory Standards Institute: MM6-A Quantitative molecular methods for infectious diseases: approved guideline. Wayne, PA, CLSI, 2003.

Esta é uma diretriz bastante abrangente, que fornece informações valiosas com relação à verificação dos novos ensaios quantitativos moleculares no laboratório clínico.

Commission on Laboratory Accreditation: Molecular pathology inspection checklist, 2005 edition. Commission on Laboratory Accreditation, College of American Pathologists, Northfield, IL, 2005.

Cook L, Ng KW, Bagabag A, et al: Use of the MagNA pure LC automated nucleic acid extraction system followed by real-time reverse transcription-PCR for ultrasensitive quantitation of hepatitis C virus RNA. J Clin Microbiol 2004; 42:4130–4136.

Dalesio N, Marsiglia V, Quinn A, et al: Performance of the MagNA pure LC robot for extraction of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA from urine and swab specimens. J Clin Microbiol 2004; 42:3300–3302.

Dequeker E, Ramsden S, Grody WW, et al: Quality control in molecular genetic testing. Nat Rev Genet 2001; 2:717–723.

Espy MJ, Rys PN, Wold AD, et al: Detection of herpes simplex virus DNA in genital and dermal specimens by LightCycler PCR after extraction using the IsoQuick, MagNA Pure, and BioRobot 9604 methods. J Clin Microbiol 2001; 39:2233–2236.

Food and Drug Administration Modernization Act 1997: Washington, DC, Public Law 105–115, 111 Statute 2296, 1997.

Germer JJ, Lins MM, Jensen ME, et al: Evaluation of the MagNA pure LC instrument for extraction of hepatitis C virus RNA for the COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, version 2.0. J Clin Microbiol 2003; 41:3503–3508.

Kaul K, Leonard DGB, Gonzalez A, Garrett CT: Oversight of genetic testing: an update. J Mol Diagn 2001; 3:85–91.
McGovern MM, Benach MO, Wallenstein S, et al: Quality assurance in molecular genetic testing laboratories. JAMA 1999; 281:835–840.
Medical Device Amendments 1976: Washington, DC, Public Law 94–295, 90 Statute 539, 1976.
Medical Devices: classification/reclassification; restricted devices; analyte specific reagents. Federal Register 1997; 62:62243–66260.
Mulcahy GM: The integration of molecular diagnostic methods into the clinical laboratory. Ann Clin Lab Sci 1999; 29:43–54.
Neumaier M, Braun A, Wagener C: Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem 1998; 44:12–26.
Niesters HG: Clinical virology in real time. J Clin Virol 2002; 25(Suppl 3):3–12.
Este artigo revisa recentes avanços tecnológicos introduzidos no laboratório de virologia molecular clínica, ao longo dos últimos anos. Fornece uma boa perspectiva dos futuros avanços tecnológicos que provavelmente se aplicarão ao laboratório clínico.
Niesters HG: Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. Methods 2001; 25:419–429.
Prence EM: A practical guide for the validation of genetic tests. Genet Test 1999; 3:201–205.
Safe Medical Device Act 1990: Washington, DC, Public Law 101–629, 104 Statute 4523, 1990.
Schwartz MK: Genetic testing and the clinical laboratory improvement amendments of 1988: present and future. Clin Chem 1999; 45:739–745.
Swanson PE: Labels, disclaimers, and rules (Oh my!). Analyte-specific reagents and practice of immunohistochemistry. Am J Clin Pathol 1999; 111:445–448.

CAPÍTULO 71

Diagnóstico molecular de neoplasias hematopoéticas

David S. Viswanatha MD FRCPC, Richard S. Larson MD PhD

Introdução: papel do diagnóstico molecular clínico dos cânceres hematológicos 1471

Diagnóstico molecular das leucemias 1471
- Conceito de fusão gênica na leucemia e a base da análise da reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa 1471
- Leucemia mieloide crônica e leucemia linfoblástica aguda Ph+: anormalidade t(9;22)/*BCR–ABL1* 1472
- Leucemias mieloides agudas 1474
- Leucemias linfoblásticas agudas 1477
- Impacto contínuo da caracterização molecular dos tumores hematopoéticos: *FIP1L1–PDGFRA* e distúrbios de eosinofilia primária; mutação do gene *JAK2* e distúrbios mieloproliferativos crônicos 1480

Diagnóstico molecular do linfoma não Hodgkin 1481
- Fundamento da análise genética molecular nos distúrbios linfoides 1481
- Rearranjos genéticos do receptor de antígeno para determinação de clonalidade 1481
- Detecção molecular e significado das translocações cromossômicas comuns associadas ao linfoma 1485

Monitoramento molecular de doença residual 1490
- Fundamentos e alertas na análise da doença residual mínima 1490
- Aplicações clínicas da análise de doença residual mínima 1491

Tecnologias emergentes: o papel do perfil de expressão gênica usando a tecnologia de microestrutura na neoplasia hematolinfoide 1492
- Distinção entre leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda com base na expressão gênica 1493
- Linfomas não Hodgkin e leucemias crônicas 1493

Agradecimentos 1494

Referências bibliográficas 1494

PONTOS-CHAVE

- O diagnóstico molecular é um componente estabelecido e cada vez mais integrante da classificação dos distúrbios hematolinfoides, que proporciona informação prognóstica e marcadores específicos para a monitoração de doença residual mínima (DRM) sensível.
- Embora várias técnicas laboratoriais complementares sejam utilizadas para identificar anomalias genéticas tumorais específicas, elas apresentam sensibilidades variáveis e a escolha da metodologia depende da fase da doença (i. e., diagnóstico *vs* pós-tratamento), bem como do tipo de amostra obtida. Os métodos da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) são altamente sensíveis e específicos, mas necessitam de um controle de qualidade rigoroso.
- As anormalidades genéticas características são altamente associadas ou indicativas de entidades patológicas específicas, entre elas leucemias e doenças mieloproliferativas; a presença dessas associações específicas classifica com mais acurácia essas doenças, mas também tem valor prognóstico e implicações terapêuticas.
- Apesar das grandes e imprevisíveis regiões genômicas de quebra e fusão em leucemias individuais geradas por translocações cromossômicas recorrentes, a PCR com transcrição reversa (RT-PCR) pode ser utilizada com sucesso para detectar a fusão gênica quimérica, única resultante de espécies do mRNA.
- As aberrações genéticas numéricas e estruturais são empregadas no esquema de estratificação do risco para o tratamento ideal das leucemias linfoblásticas agudas da infância.
- As translocações cromossômicas específicas em pacientes pediátricos com leucemia podem ser traçadas de volta até o nascimento, implicando no fato de que as lesões genéticas iniciais que predispõem a muitas leucemias da infância podem originar-se *in utero*; contudo, o achado dessas translocações em amostras de sangue do cordão umbilical, obtidas no período neonatal, sugere que são necessários eventos genéticos secundários para que ocorra leucemia franca em um indivíduo suscetível.
- Os rearranjos dos genes da imunoglobulina e do receptor de célula T servem como marcadores moleculares poderosos para demonstrar a presença ou ausência de clonalidade nas populações linfoides. A hibridização por *Southern blot* (SBH, *southern blot hybridization*) e a PCR são duas técnicas moleculares usadas para demonstrar os rearranjos clonotípicos desses *loci* genéticos.
- Embora a SBH represente um "padrão-ouro" para a detecção de clonalidade linfoide, ela é trabalhosa, tecnicamente exigente e demorada, o que favorece a PCR no contexto clínico; entretanto, a PCR tende a dar resultados falsos, tanto negativos quanto positivos, exigindo do patologista molecular que os interpreta um conhecimento abrangente dos aspectos técnicos e das limitações desses ensaios.
- Os linfomas não Hodgkin também são associados frequentemente a aberrações genéticas recorrentes, em particular translocações cromossômicas. Além da classificação mais acurada dos linfomas em subtipos, esses marcadores também podem dar evidência de clonalidade linfoide nas situações em que o diagnóstico diferencial inclui um processo reativo atípico.
- As translocações cromossômicas nos linfomas não Hodgkin resultam, em geral, na hiperexpressão de um gene particular (em contraste com a formação de um gene quimérico, do mRNA e de uma nova proteína de fusão, como em muitas leucemias). Portanto, os métodos de PCR baseados no DNA podem ter sensibilidade clínica subótima em amostras diagnósticas, em decorrência das regiões muito extensas do DNA genômico, que atravessa as regiões de quebra e fusão. A hibridização *in situ* por fluorescência é uma alternativa rápida para o diagnóstico inicial nesse contexto, apresentando altos índices de detecção.
- A monitoração de DRM pós-terapia de neoplasias hematolinfoides torna-se cada vez mais refinada e reprodutível com a disseminação do uso de plataformas de PCR quantitativa, automatizada em "tempo real" (Q-PCR).
- A avaliação do estado da DRM é importante para determinar a eficácia terapêutica, o risco de recidiva, mais a necessidade e o momento de intervenções terapêuticas adicionais.
- No momento, os cenários clínicos mais informativos para avaliação de DRM pela Q-PCR nos cânceres hematopoéticos incluem a leucemia mieloide crônica, a leucemia pró-mielocítica aguda e a leucemia linfoblástica aguda da infância.
- Embora o conhecimento dos marcadores genéticos característicos tenha revolucionado nossa definição e o entendimento dos tumores hematolinfoides, as análises genômicas globais e proteômicas estão trazendo mais progresso na elucidação da patogênese das doenças, na predição do prognóstico e na identicação de alvos terapêuticos potenciais. Um exemplo disso é a quantidade substancial de informação que surge da tecnologia de microarranjo da expressão gênica, conforme exemplificado pelo delineamento de subgrupos fenotípicos e clínicos distintos dentro de uma categoria histopatologicamente homogênea nos demais aspectos do linfoma difuso de célula B grande.

Introdução: papel do diagnóstico molecular clínico nos cânceres hematológicos

O diagnóstico das neoplasias hematolinfoides continua a passar por uma grande transformação com o advento e a aplicação de novas tecnologias. Embora a avaliação morfológica tradicional (microscopia óptica) com lâminas de microscopia ainda seja a peça central do diagnóstico patológico, a aplicação criteriosa de métodos auxiliares, como citoquímica especial, imuno-histoquímica, citometria de fluxo, citogenética (incluindo a hibridização *in situ* por fluorescência [FISH]) e a genética molecular, possibilitou o aprimoramento da reprodutibilidade diagnóstica. A natureza do sistema hematolinfoide também facilita, relativamente, a monitoração do estado da doença após a terapia, o que representa outra faceta importante no tratamento de pacientes com essas doenças.

Ante essa pletora de recursos diagnósticos, que papel tem a avaliação genética molecular ou o diagnóstico molecular? Talvez existam quatro cenários principais para os quais a análise diagnóstica molecular de uma proliferação hematolinfoide seja importante. Primeiro, a investigação molecular pode estabelecer um diagnóstico nas situações em que os detalhes morfológicos e resultados de outros exames laboratoriais sejam inconclusivos para malignidade. A presença de anormalidades genéticas específicas, ou a demonstração da "homogeneidade" genética tumoral de uma população celular (p. ex., por estudos do rearranjo do gene do receptor de antígeno), pode estabelecer a existência de um processo patológico clonal. Em segundo lugar, os métodos moleculares são utilizados para subclassificar as entidades mórbidas. Para essa finalidade, a classificação atual da Organização Mundial de Saúde (OMS) referente às neoplasias hematológicas inclui a caracterização molecular como um aspecto que define muitas leucemias e linfomas (Jaffe, 2001). A seguir, anomalias genéticas específicas nas malignidades hematolinfoides têm valor prognóstico importante, o que, por sua vez, influencia o tratamento inicial de certos tumores no sentido de um resultado clínico ideal. Por fim, tendo potencialmente alta sensibilidade, as técnicas moleculares podem ser usadas para avaliar os pacientes após o início da terapia, monitorando a presença e a extensão de doença residual mínima (DRM). Na Tabela 71.1 há um resumo de algumas das principais circunstâncias em que a avaliação diagnóstica molecular é vista na hematopatologia prática. Como a sinergia entre a informação biológica básica em expansão e a tecnologia em rápido progresso continua firme, o futuro de muitas aplicações adicionais do diagnóstico molecular no laboratório de patologia mantém-se promissor, incluindo a predição da suscetibilidade a doenças, da gravidade ou da resposta ao tratamento com base em fatores poligênicos; o perfil farmacogenômico dos pacientes para determinar sua sensibilidade medicamentosa e os perfis de toxicidade; e a avaliação de respostas individuais a terapias cada vez mais "direcionadas".

Neste capítulo, focalizamos os fundamentos, a justificativa clínica e as considerações técnicas fundamentais da avaliação diagnóstica molecular e da monitoração de tumores hematológicos e linfoides. Como a maioria desses ensaios laboratoriais baseia-se na reação em cadeia da polimerase (PCR), a ênfase é, consequentemente, colocada nos métodos pertinentes às técnicas de PCR com DNA ou RNA (i. e., transcrição reversa). Vale notar que é evidente que a detecção de anormalidades genéticas específicas de tumor pode ser obtida por diferentes meios analíticos, como a citogenética, a FISH ou a PCR. Embora à primeira vista esses vários métodos possam ser redundantes, as técnicas laboratoriais devem ser consideradas complementares, com a escolha da metodologia sendo determinada por um conjunto de fatores, como o conhecimento dos níveis de detecção e das limitações das diversas técnicas, a experiência e a capacidade de interpretação desses procedimentos, o tipo de amostra e a fase da doença em investigação. No último caso, questões de sensibilidade tornaram-se fundamentais, e é provável que ensaios baseados na PCR sejam necessários para identificar doença residual. A Tabela 71.2 indica as sensibilidades analíticas comparativas das principais modalidades usadas para detectar anormalidades genéticas relacionadas com tumores hematolinfoides.

A necessidade cada vez mais onipresente da avaliação genética molecular de cânceres hematopoéticos levou a tentativas enérgicas de elaborar e conseguir melhor padronização interlaboratorial, podendo-se esperar que tais esforços continuem a aprimorar o nível de sensibilidade e especificidade nesse campo. Apesar disso, na aplicação e na interpretação dos testes diagnósticos moleculares, um problema que não pode ser enfatizado o bastante é que os resultados dessas investigações nunca devem ser considerados isoladamente, e sim em conjunto com os dados clínicos, morfológicos e adicionais importantes sobre o paciente em questão. Ainda que a especificidade e a sensibilidade dos marcadores moleculares sejam notáveis, a complexidade evidente da neoplasia hematolinfoide torna obrigatória uma abordagem integrada para diminuir a possibilidade de erro diagnóstico.

Tabela 71.1 Indicações para investigação diagnóstica molecular nas neoplasias hematológicas e linfoides

Indicação	Exemplos
Diagnóstico	Determinação de uma população de células B clonais em uma proliferação tecidual morfologicamente equívoca ou quando outras investigações auxiliares não são informativas Determinação da clonalidade de células T Biópsia tecidual pequena ou tipo de amostra que não serve para outra técnica investigativa
Subclassificação	Identificação de subtipos específicos de leucemia mieloide aguda e leucemia linfoide, p. ex., t(8;21)/*AML1-ETO* na leucemia mieloide aguda com maturação Distinção entre linfomas não Hodgkin de linfócitos B pequenos com aspectos morfológicos sobrepostos, p. ex., linfoma de células de revestimento *vs.* linfoma linfocítico de pequenas células
Prognóstico	Identificação de subtipos de leucemia aguda com desfecho "favorável" e possibilidade de terapia específica, p. ex., t(15;17)/*PML-RARα* na leucemia pró-mielocítica aguda e uso do ácido retinoico todo trans (atRA) com quimioterapia Identificação de subtipos de leucemia aguda com desfecho "desfavorável", por ex., t(9;22)/*BCR-ABL1* na leucemia linfoblástica aguda Ph^+ Identificação de subconjuntos prognósticos nos tumores de células B, p. ex., estado de hipermutação somática na leucemia linfocítica crônica; t(11;18)/*API2–MALT1* nos linfomas de células B da zona marginal extranodal que não respondem à antibioticoterapia
Doença residual mínima	Utilidade na monitoração da leucemia mieloide crônica, na leucemia pró-mielocítica e na leucemia linfoblástica aguda da infância após o início da terapia Avaliação das amostras do paciente antes do transplante autólogo para linfoma não Hodgkin

Diagnóstico molecular das leucemias

Conceito de fusão gênica na leucemia e a base da análise da reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

As leucemias são cânceres hematológicos com patogênese e biopatologia diversas. No entanto, uma proporção significativa desses tumores caracteriza-se por translocações cromossômicas não aleatórias, em geral equilibradas, resultando na formação de genes de fusão, ou quiméricos. Embora duas dessas fusões sejam criadas nesse evento anormal (i. e., uma em cada cromossomo recíproco translocado), tipicamente apenas um desses *loci* derivados originam um gene leucemogênico "híbrido". No nível molecular, os sítios intrônicos de ponto de quebra e fusão nos genes envolvidos são altamente variáveis entre os pacientes com o mesmo tipo de leucemia, embora possa haver evidência de "pontos quentes" de quebra aglomerados em certos tipos de rearranjo de genes relacionados com a leucemia. Apesar da variabilidade nos sítios de ponto de quebra em ambos os genes envolvidos, um aspecto consistente da fusão de genes leucêmicos é a produção de uma molécula quimérica de mRNA. Esse transcrito anormal é ainda traduzido em uma proteína de fusão, presumivelmente operante na ruptura de muitas vias celulares envolvidas na regulação da capacidade proliferativa normal, da diferenciação e da sobrevivência na linhagem

Tabela 71.2 Sensibilidades relativas das principais técnicas usadas para detectar fusões gênicas por translocações associadas a leucemia ou linfoma

Método	Sensibilidade analítica (%)*	Notas
Citogenética	5	Avaliação genômica global Requer células frescas, estéreis Detecta aberrações cromossômicas numéricas e estruturais Difícil ou impossível detectar alterações sutis no DNA
Hibridização com fluorescência *in situ*	1–5	Avaliação direcionada de grandes anormalidades genômicas Tecnicamente direta e rápida; em geral pode ser realizada em núcleos na interfase Aplicável a uma variedade de fontes teciduais Requer padrões de qualidade rigorosos para evitar resultados falso-positivos quando a anormalidade em questão está em um nível baixo
Hibridização por *Southern blot*	5–10	Avaliação direcionada de anormalidades estruturais no DNA genômico Tecnicamente trabalhosa e demorada Requer amostras com DNA preservado de alto peso molecular (p. ex., células frescas ou congeladas)
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	10^{-2}–10^{-4}	Avaliação direcionada de anormalidades genômicas pequenas ou do mRNA A detecção de espécies de fusão gênica quimérica única do mRNA é altamente sensível Tecnicamente direta e rápida, mas pode requerer procedimentos de detecção pós-PCR Aplicável a uma ampla variedade de tipos, inclusive tecidos fixados em parafina Útil pela alta sensibilidade na monitoração de doença residual mínima

* A sensibilidade analítica é definida como o número mínimo de células tumorais que pode ser detectado em um fundo de células não tumorais, expresso como porcentagem. Esses níveis dilucionais em geral são verificados pelos métodos moleculares indicados, embora vários fatores técnicos ou biológicos possam influenciar os limites inferiores de detecção.

imatura (i. e., precursora) de células-tronco ou progenitoras. Embora saiba-se que a formação de uma fusão gênica por translocação seja necessária para que ocorra doença, os resultados obtidos em modelos animais sugeriram que, pelo menos em alguns tipos de leucemia, tal evento pode não ser suficiente, sendo necessárias também outras lesões genéticas secundárias, caracterizadas de forma incompleta.

Um aspecto prático do conceito de gene quimérico é que, qualquer que seja a localização variável dos pontos de quebra genômicos (no nível do DNA) em determinada fusão gênica por translocação, a presença de tal anormalidade pode ser confirmada detectando-se a espécie correspondente de mRNA quimérico não variante. No diagnóstico molecular laboratorial, podemos usar o método da transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para converter primeiro a fusão do transcrito de mRNA em seu DNA complementar (cDNA, *complementary DNA*) e, então, amplificar essa molécula específica. A capacidade de realizar a análise de RT-PCR evidencia as dificuldades impostas pelas regiões de flanco do DNA intrônico, geralmente muito extensas, que circundam os *loci* genômicos de quebra e fusão, os quais normalmente não seriam passíveis de amplificação por abordagens padronizadas de PCR baseadas no DNA. Além disso, a presença de tal espécie aberrante de mRNA é altamente específica da doença, pois teoricamente não deve estar presente em células normais. A Tabela 71.3 oferece uma lista das principais translocações associadas às leucemias, junto com sua fusão gênica resultante e produtos do mRNA.

Dois conceitos relacionados são importantes para a melhor compreensão de genes quiméricos e transcritos. "Heterogeneidade de ponto de quebra" refere-se à presença de dois (ou possivelmente mais) *loci* de pontos de quebra comuns em um gene particular, que pode ser alvejado pelo evento de translocação. Em alguns exemplos, sítios diferentes de ponto de quebra podem ser correlacionados com um fenótipo de doença ou aspectos clínicos particulares (p. ex., a fusão BCR-ABL1 na leucemia mieloide crônica [LMC] *vs* leucemia linfoblástica aguda [LLA]), mas nem sempre é esse o caso. Em segundo lugar, pode ocorrer emenda do éxon alternativo de um único transcrito quimérico, de modo que outros produtos relacionados do mRNA podem ser observados durante a amplificação adicional na PCR do alvo principal (p. ex., a fusão TEL–AML1 na LLA pediátrica). Ensaios baseados na RT-PCR requerem aspirado fresco de medula óssea ou células sanguíneas, embora tecido criopreservado ou células também possam ser usados efetivamente para isolamento do RNA. A extração do RNA e a RT-PCR de amostras de tecido em blocos de parafina também foram descritas como bem-sucedidas; entretanto, material celular fixo em geral é degradado ou comprometido pela presença de inibidores da PCR, resultando em um índice maior de falha na detecção pela PCR. Por fim, dada a natureza altamente sensível da amplificação por PCR, esses ensaios laboratoriais precisam ser cuidadosamente controlados para evitar artefatos de comunicação falso-positivos. As seções seguintes descrevem a genética molecular e os aspectos diagnósticos das doenças leucêmicas mais comuns e importantes em termos de prognóstico.

Leucemia mieloide crônica e leucemia linfoblástica aguda Ph⁺: anormalidade t(9;22)/*BCR–ABL1*

A leucemia mieloide crônica, embora seja uma neoplasia hematológica incomum, é um protótipo das doenças leucêmicas. A LMC é uma doença clonal de células-tronco da medula óssea, que resulta predominantemente em hiperproliferação de células granulocíticas em todos os estágios de maturação. A evolução natural da LMC é tipificada por uma "fase crônica" protraída, em geral de vários anos, seguida por uma transformação rápida em uma "crise blástica" mieloide aguda agressiva ou linfoide, com desfecho fatal. Décadas de investigação e tratamento desse distúrbio levaram da associação de uma anormalidade cariotípica com a doença ao inalcançável de sua genética molecular e sua patogênese biológica e, atualmente, ao desenvolvimento e à introdução de uma nova terapia farmacológica direcionada, na forma do mesilato de imatinibe (Gleevec, *Novartis Corporation*) (Goldman, 2003). A LMC caracteriza-se pela presença da translocação cromossômica t(9;22)(q34;q11), inicialmente observada como uma anormalidade do 22q– denominada cromossomo Philadelphia (Ph) (Nowell, 1960; Rowley, 1973). Essa translocação leva à justaposição do gene *ABL1* da tirosina quinase (9[q34]) com o gene *BCR* (22[q11]) no cromossomo 22q derivado, com a formação da fusão gênica *BCR-ABL1* e do mRNA, e produção de uma proteína quimérica BCR-ABL (Melo, 1996; Deininger, 2000). É notável o fato de que a t(9;22)/*BCR-ABL1* é patognomônica não apenas da LMC, mas também ocorre em 20 a 25% dos adultos e em aproximadamente 3% dos casos pediátricos de LLA (i. e., Ph⁺ LLA) que apresentam uma doença de comportamento altamente agressivo. Embora o papel funcional do produto gênico normal BCR não seja completamente entendido, essa fusão genética anormal impede a localização e a atividade regulada da tirosina quinase ABL, ocasionando efeitos complexos nas vias celulares de transdução do sinal, proliferação, controle da apoptose e adesão celular (Deininger, 2000). É intrigante o fato de que estudos topográficos *in vivo* dos genes BCR e ABL1 em células hematopoéticas progenitoras cíclicas normais, bem como a demonstração surpreendente de números muito baixos de transcritos BCR-ABL no sangue de muitos indivíduos saudáveis, sugerem que pode ocorrer t(9;22) com relativa frequência em células humanas normais da medula óssea (Biernaux, 1995; Bose, 1998; Neves, 1999). A interação complexa da resposta do hospedeiro a esses rearranjos genéticos anormais e a aquisição de outras lesões genéticas, com potencial de levar ao desenvolvimento franco de LMC (ou Ph⁺ LLA), ainda não foi determinada. O tratamento definitivo para pacientes com LMC é conseguido por meio de transplante alogênico de medula óssea ou células-tronco, embora

Tabela 71.3 Translocações comuns associadas a leucemia e fusões gênicas resultantes de espécies de mRNA

Anormalidade genética	Associações de doenças	Patogênese molecular básica	Detecção
t(9;22)/*BCR–ABL1*	• Leucemia mieloide crônica (100%) • Leucemia linfoblástica aguda Ph⁺ de adultos (ALL) (20–25%) • Leucemia linfoblástica aguda Ph⁺ pediátrica (3%)	Proteína quimérica de fusão com desregulação da tirosina quinase do ABL; efeitos sobre a proliferação celular, apoptose, adesão	RT-PCR; FISH
del 4q12/*FIP1L1–PDGFRA*	Síndrome hipereosinofílica/crônica leucemia eosinofílica (subconjunto de casos)	Desregulação do receptor de tirosina quinase PDGFRα	FISH > RT-PCR
t(15;17)/*PML-RARα*	Leucemia pró-mielocítica aguda (100%)	Proteína quimérica de fusão; interferência na maturação e na diferenciação mieloides	RT-PCR; FISH
t(8;21)/*AML1–ETO* inv(16) ou t(16;16)/*CBFB-MYH11*	Leucemia mieloide aguda (LMA) (10%) Leucemia mielomonocítica aguda com eosinófilos anormais (AMML-Eo)	Proteína quimérica de fusão que afeta o fator de ligação ao *core* (CBF) via reguladora transcricional; efeitos aberrantes sobre a proliferação e a diferenciação mieloides	RT-PCR; FISH
Mutações do *FLT3*	Leucemia mieloide aguda (20–30%)	Duplicação interna tandem (ITD) ou mutação pontual resultando em atividade constitutiva da FLt3 tirosina quinase e proliferação celular	DNA PCR
Mutação *JAK2*	Distúrbios mieloproliferativos crônicos, excluindo LMC: P. vera (~90%), mielofibrose crônica idiopática, trombocitose essencial (~50%); raramente na síndrome mielodisplásica ou MDS/MPD atípica	Mutação pontual G>T isolada, produzindo substituição do aminoácido V617F; resulta em perda da autoinibição e ativação constitutiva da Jak2 tirosina quinase	DNA PCR
t(12;21)/*TEL–AML1*	Leucemia linfoblástica aguda da infância com precursores de células B (20%)	Proteína de fusão quimérica; interrupção da via reguladora da transcrição de CBF; efeitos anormais sobre a função de transcrição de Tel	RT-PCR; FISH
t(1;19)/*E2A-PBX1*	LLA pediátrica de células pré-B (3%)	Proteína de fusão quimérica; interferência no desenvolvimento inicial normal da célula B	RT-PCR
Translocações 11q23/*MLL*	• LLA pediátrica (principalmente em lactentes) da linhagem B (5%) • LMA *de novo* em adultos, geralmente monocítica (subconjunto de casos) • Subconjunto de LMA secundária (após exposição da topoisomerase II do DNA ao agente)	Proteínas de fusão quiméricas; alteração da regulação da hematopoiese mediada por MLL	FISH; RT-PCR

FISH = hibridização *in situ* por fluorescência; RT-PCR = reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa.

o tratamento limítrofe da LMC tenha passado atualmente por uma modificação significativa, com o advento do inibidor da tirosina quinase, o mesilato de imatinibe (Druker, 2001; O'Brien, 2003). A LLA Ph⁺ está associada a um prognóstico geral extremamente desfavorável em resposta à quimioterapia convencional com altas doses, sendo necessário considerar o transplante de medula óssea ou de células-tronco. O acréscimo de novos agentes, como o mesilato de imatinibe, também pode trazer benefícios para esses pacientes.

No nível do DNA, a fusão gênica BCR-ABL1 exibe aspectos de heterogeneidade do ponto de quebra, com três *loci* reconhecidos de ponto de quebra no gene *BCR*, bem como alguma variação alternativa do transcrito emendado (Fig. 71.1) (Deininger, 2000; Melo, 1996). Em praticamente todos os casos de LMC, os pontos de quebra do gene *BCR* estão situados na chamada região do ponto de quebra "maior", ou M-BCR. Esses sítios de quebra ocorrem em uma região genômica relativamente pequena de 5,8kb, que atravessa os éxons b1-b5 do *BCR* (também conhecidos como éxons e12-e16), especificamente entre o b2 e o b3, e o b3 e o b4. Em contraste, os pontos de quebra do gene *ABL1* estão distribuídos sobre uma região muito extensa do DNA intrônico 5' para o éxon a2. Portanto, na LMC, podem surgir dois tipos de transcritos de mRNA pela fusão de *BCR-ABL1*, a partir do *locus* M-BCR de fusões de gene, ou seja, as formas b2-a2 ou b3-a2 (Fig. 71.1). Esses dois produtos codificam uma nova proteína de 210 *kDa* (p210). Embora a maioria dos casos de LMC tenha o tipo transcrito b2-a2 ou b3-a2, alguns tumores podem demonstrar união alternativa da última forma, gerando ambos os transcritos simultaneamente. Não parece haver significado clínico ou prognóstico para o tipo do *locus* M-BCR de fusão BCR-ABL1 na LMC. Um segundo *locus* de ponto de quebra comum está presente no gene *BCR*, designado como a região do *cluster* de quebra do *cluster* de quebra "menor", ou m-BCR (Fig. 71.1). As translocações que envolvem esse *locus* resultam na formação de um transcrito de fusão e1-a2 BCR-ABL1, que codifica uma proteína de 190 *kDa* (p190). O tipo e1-a2 BCR-ABL1 é altamente característico da LLA Ph⁺. No entanto, a subdivisão das fusões M-BCR e m-BCR como "associada à LMC" e "associada à LLA" não é muito correta, apesar dessas correlações gerais entre a localização do ponto de quebra e fusão BCR-ABL1 e o fenótipo da doença. Embora a maioria dos casos pediátricos de LLA Ph⁺ seja do tipo e1-a2 (m-BCR), aproximadamente de 30 a 40% dos pacientes adultos com LLA Ph⁺ demonstram fusões b3-a2 ou b2-a2 (M-BCR) BCR-ABL1. Na última situação, sabe-se bem que uma proporção significativa da LMC clássica com os tipos transcritos esperados b3-a2 ou b2-a2 também irá demonstrar abundância baixa concomitante de mRNA e1-a2, pelo grau mínimo de junção alternativa do transcrito maior derivado do M-BCR (Saglio, 1996; van Rhee, 1996). Potencialmente mais confuso é o achado de leucemias crônicas Ph⁺ raras com a fusão e1-a2, que manifestam predominantemente um fenótipo monocítico (em vez da predominância típica de células mieloides na LMC). Essas observações prévias subestimam a variabilidade biopatológica associada à expressão de BCR-ABL1 em células progenitoras mieloides e linfoides diferentes. A terceira região aglomerada para os genes de fusão *BCR-ABL1* foi denominada μ-BCR (Fig. 71.1) e resulta na formação de um transcrito e19-a2, que se presume resulte na translação de uma proteína de 230 *kDa* (p230) e, embora seja um tanto polêmico, esse tipo de evento BCR-ABL1 foi associado a pelo menos alguns casos da doença mieloproliferativa rara, descrita como leucemia neutrofílica crônica (LNC).

A Figura 71.1 também indica a colocação dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR para amplificação específica dos transcritos de fusão M-BCR (b3-a2, b2-a2), m-BCR (e1-a2) e μ-BCR (e19-a2), após transcrição reversa do mRNA total. Embora a eletroforese em gel dos produtos da PCR seja nominalmente suficiente para distinguir essas variantes de BCR-ABL1 (Fig. 71.1), muitos laboratórios diagnósticos fazem um

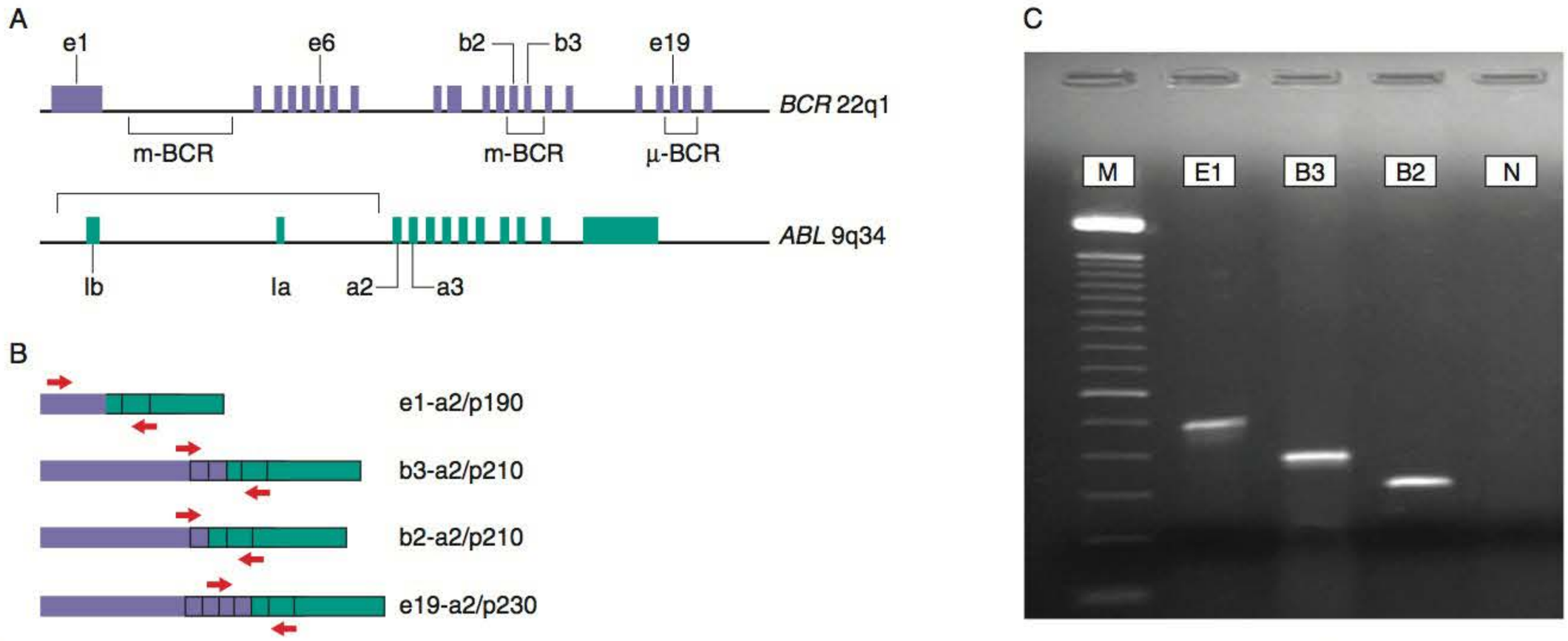


Figura 71.1 Anormalidade t(9;22)/*BCR–ABL1* na leucemia mieloide crônica (LMC) e na leucemia linfoblástica aguda positiva para o cromossomo Philadelphia (LLA Ph+). A. Mapa do éxon dos genes translocados *BCR* e *ABL1* (não em escala). São reconhecidas 3 regiões principais de ponto de quebra no gene *BCR*: a região do *cluster* menor (m-BCR), a região do *cluster* maior (M-BCR) e a μ-BCR. A M-BCR está envolvida em praticamente todos os casos de LMC e aproximadamente 1/3 dos de LLA Ph⁺ *de novo* em adultos. Uma pequena porcentagem de casos de LLA Ph⁺ pediátrica também pode ter pontos de quebra do *BCR* nesse sítio. A região m-BCR está tipicamente associada à maioria dos casos de LLA Ph⁺ pediátrica e à maioria daqueles em adultos. Os pontos de quebra na região μ-BCR foram associados à leucemia neutrofílica crônica. No caso do gene *ABL1*, os pontos de quebra estão distribuídos por toda uma grande região 5′ of éxon 2 (a2), que compreende a região do primeiro éxon. B. Os principais transcritos quiméricos *BCR-ABL1* que surgem desses vários pontos de quebra de fusão gênica por translocação. As fusões de éxon com éxon estão indicadas por esses transcritos e o tamanho da proteína quimérica correspondente é mostrado em quilodaltons (p. ex., e1–a2/p190). As setas alaranjadas indicam as posições relativas dos iniciadores usados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar essas formas nos ensaios com transcriptase reversa (RT-PCR). C. Resultados típicos da RT-PCR por eletroforese em gel para detecção dos transcritos m-BCR e M-BCR: M = tamanho do marcador molecular (100 bp); E1 = produto e1–a2; B3 = produto b3–a2; B2 = produto b2–a2; N = sem molde de controle.

ensaio confirmatório após a PCR, como a hibridização por *Southern blot* usando uma sonda marcada com oligonucleotídeo, específica da junção, ou métodos correlatos. Têm sido encontrados casos raros de LMC e LLA Ph⁺ que envolvem o uso de éxons adjacentes alternados BCR ou ABL, gerando formas transcritas b3-a3, b2-a3, e1-a3 ou e6-a2 (Melo, 1996; Deininger, 2000). Em geral, os ensaios de RT-PCR também podem ser modificados apropriadamente ou elaborados para detectar essas variantes infrequentes (Chasseriau, 2004). Também foram descritos métodos genômicos do *Southern blot* para detectar rearranjos do *locus* genômico BCR, mas apresentam utilidade limitada com relação à rapidez, especificidade e simplicidade relativa das técnicas de FISH e RT-PCR. A análise pela FISH pode ter alguma utilidade adicional para identificar grandes deleções genômicas concomitantes que ocorrem nos cromossomos derivados 9q ou 22q, associadas a um desfecho desfavorável nesse subgrupo de pacientes com LMC (Sinclair, 2000).

A detecção molecular desses transcritos BCR-ABL1 quiméricos anormais de mRNA é valiosa para o diagnóstico de LMC e LLA Ph⁺. Por exemplo, embora aproximadamente 98% dos casos de LMC sejam positivos para BCR-ABL, um pequeno número de imitadores morfológicos não terá essa anormalidade genética. Esses distúrbios leucêmicos enquadram-se em um subconjunto mal definido que inclui a LMC "atípica", a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) e outros distúrbios crônicos mieloproliferativos ou mielodisplásicos. É evidente que as opções terapêuticas e o desfecho para tais pacientes serão diferentes daqueles para a LMC verdadeira. Já as apresentações mieloproliferativas atípicas da LMC não são encontradas de forma infrequente, e a demonstração do BCR-ABL em tais situações é crítica para o diagnóstico e tratamento corretos. De forma semelhante, a detecção da anormalidade BCR-ABL1 na LLA adulta e pediátrica identifica esses subconjuntos de pacientes sob alto risco de falha da quimioterapia convencional e que podem beneficiar-se de esquemas terapêuticos mais intensivos. A avaliação diagnóstica molecular para BCR-ABL também é importante para resolver apresentações citogenéticas complexas que mascaram a t(9;22) e delinear o tipo específico de fusão de BCR-ABL1 no mRNA para a detecção molecular subsequente de doença residual após transplante alogênico ou modalidades mais conservadoras de tratamento, como a quimioterapia ou o uso de mesilato de imatinibe (ver adiante, em "Monitoração molecular de doença residual").

Leucemias mieloides agudas

As leucemias mieloides agudas (LMAs) podem ser classificadas como de prognóstico relativamente "favorável", "intermediário" ou "ruim", com base no grau de complexidade citogenética da natureza dos marcadores genéticos específicos. Por exemplo, anormalidades cariotípicas numéricas e estruturais extensas ou a presença de achados genéticos "de base mielodisplásica" (como as anormalidades dos cromossomos 5 ou 7) são indicativas de subtipos muito agressivos de LMA. Várias translocações cromossômicas recorrentes caracterizam outro subconjunto significativo de LMA e podem ser detectadas pelas técnicas diagnósticas moleculares baseadas na PCR. Tais translocações em geral ocorrem sem achados citogenéticos adicionais, costumam ter correlações distintas entre o genótipo e o fenótipo, e muitas estão associadas a um desfecho relativamente favorável. Em particular, as translocações t(15;17), t(8;21) e a inv(16) ou a t(16;16) relacionadas, são responsáveis em conjunto por cerca de 25 a 30% das novas ocorrências de LMA, tanto em adultos quanto em crianças. Em contraste, sabe-se comparativamente pouco sobre a patogênese molecular de um grande subgrupo de LMA com cariótipo "diploide" (normal). Apesar disso, dados recentes mostraram que rearranjos estruturais internos ou mutações pontuais do gene *FLT3* representam um dos achados moleculares mais frequentes na nova ocorrência de LMA com um cariótipo diploide, e as anormalidades no *FLT3* estão associadas a um prognóstico adverso. A importância desses marcadores tumorais genéticos reflete-se na classificação recente da OMS (Jaffe, 2001), em que as leucemias mieloides agudas são cada vez mais definidas por suas anormalidades genéticas características com relação aos aspectos fenotípicos, ao prognóstico e ao resultado clínico (Tab. 71.3). A identificação de marcadores genéticos específicos pode, assim, estabelecer uma subclassificação definitiva para a LMA, dar informação prognóstica importante, orientar a intervenção terapêutica e revelar dados sobre a biologia tumoral. Esta seção enfoca as anormalidades moleculares genéticas comuns relacionadas com a LMA, atualmente consideradas as de maior relevância clínica, por causa de sua frequência de ocorrência e do impacto sobre a terapia ou o prognóstico.

Leucemia pró-mielocítica aguda: anormalidade t(15;17)/PML-RARα

A leucemia pró-mielocítica aguda (LPA), ou LMA-M3 (de acordo com a classificação franco-americano-britânica [FAB] prévia da LMA), é responsável por 5 a 10% dos novos casos de LMA. De forma típica, os pacientes apresentam sintomas de citopenias sanguíneas periféricas e têm alta propensão a uma coagulopatia potencialmente fatal. Em termos morfológicos, a LPA consiste em uma proliferação de pró-mielócitos hipergranulares e mieloblastos, mas também não é raro encontrar uma variante "microgranular" (Brunning, 2001). A LPA é definida geneticamente pela presença da anormalidade t(15;17)(q22;q21) para formar um gene quimérico *PML-RARα*, resultando na fusão do gene do receptor a do ácido retinoico, *RARα* [17(q21)] com o gene *PML* [15(q22)] para formar um gene quimérico *PML-RARα* no cromossomo 15q derivado (Grignani, 1994). O produto gênico RARα é uma subunidade de um receptor nuclear heterodimérico para o ligante de ocorrência natural do ácido retinoico, ou vitamina A. A via do receptor nuclear retinoide funciona em muitos aspectos da proliferação e da diferenciação celulares normais (Chambon, 1996). O *PML* codifica uma proteína zíncica ligada ao DNA e associa-se a várias outras proteínas em um complexo macromolecular, formando corpúsculos nucleares discretos (Dyck, 1994; Weis, 1994). Essa proteína interessante parece ter múltiplas funções celulares possíveis, inclusive regulação da transcrição, apoptose e, possivelmente, vigilância imunológica (Quignon, 1998; Wang, 1998; Grimwade, 1999; Zhong, 2000).

A proteína híbrida PML-RARα está nitidamente envolvida na alteração de numerosos processos intracelulares, resultando primariamente em uma falha na diferenciação dos precursores mieloides neoplásicos, além do estágio pró-mielocítico. O significado da LPA como um "paradigma terapêutico" para a leucemia reside na capacidade de doses farmacológicas do ácido todo-trans-retinoico (atRA) de induzir a diferenciação de células leucêmicas *in vivo*. Quando usado em combinação com a quimioterapia citotóxica, os efeitos sinérgicos do atRA induzem remissões clínicas duráveis na maioria dos pacientes (Tallman, 1997, 2002). Esse achado notável intensificou os esforços para identificar outras formas de terapia "citodiferenciada" para a LMA. Embora o efeito do atRA pareça ter uma relação superficial de interação com a metade RARα na proteína anormal PML-RARα, outras investigações não revelaram os mecanismos moleculares básicos que levam ao sucesso desse agente. O receptor normal do ácido retinoico, quando não ligado a seu ligante, associa-se à histona desacetilase (HDAC) em um complexo proteico nuclear correpressor (Guidez, 1998; Melnick, 1999). Tal interação serve para reduzir a acessibilidade da cromatina a fatores de transcrição (e, assim, atividade de transcrição específica do *locus*), ainda que seja reversível em células normais da medula óssea após exposição a concentrações fisiológicas de ácido retinoico. A oncoproteína PML-RARα estabiliza e acentua o estado de repressão transcricional por seu complexo de multiproteína, mas doses terapêuticas de atRA parecem superar essa condição anormal e aliviar o bloqueio da diferenciação celular (Melnick, 1999).

A anatomia molecular da fusão gênica PML-RARα e dos produtos do mRNA na LPA está resumida de forma esquemática na Figura 71.2. O gene *PML* exibe heterogeneidade do ponto de quebra em que um dos três sítios possíveis pode ser encontrado em um paciente, envolvendo o íntron 3, o íntron 6 ou ocorrendo dentro do éxon 6 (Grignani, 1994; Gallagher, 1995). Em contraste, os pontos de quebra do *RARα* estão distribuídos de maneira uniforme no íntron 2 do gene. Portanto, um dos três possíveis mRNAs quiméricos *PML-RARα* pode resultar dessa fusão genética: éxon 6 do *PML*, éxon 3 de *RARα* (forma longa [L], ou BCR1), éxon 3 do *PML*, éxon 3 de *RARα* (forma curta [S], ou BCR3) e éxon 6 Δ do *PMLa* éxon 3 de *RARα* (forma variável [V], ou BCR2). O transcrito em forma de V é único, pelo fato de que a quebra do PML ocorre dentro do éxon 6 e uma proporção variável desse éxon fica retida, embora nucleotídeos adicionais possam ser acrescentados ou deletados (Gallagher, 1995). É notável a produção de uma fusão de mRNA em cada caso de LPA, subestimando a necessidade crítica da proteína PML-RARα na leucemogênese. As fusões de *PML–RARα* da forma L (BCR1) e da forma S (BCR3) são encontradas mais comumente na LPA (≈45–50% dos casos cada), enquanto a forma V (BCR2) só é encontrada raramente (5% da LPA). A estratégia para amplificação por RT-PCR desses transcritos de PML-RARα está ilustrada na Figura 71.2, bem como um ensaio representativo de PCR diagnóstica. É digno de nota que os tipos transcritos da forma L (BCR1) e da forma V (BCR2) mostram junção alternativa dos éxons

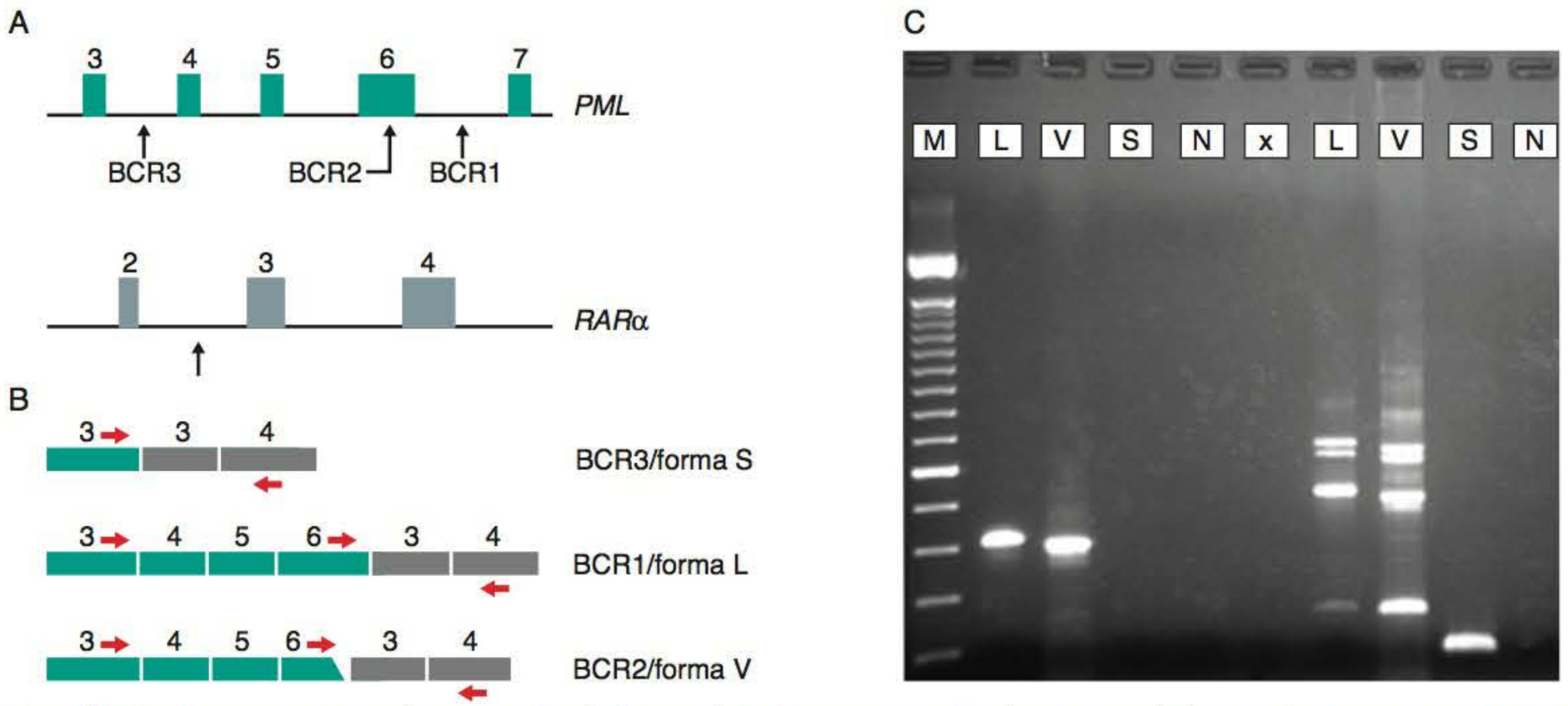


Figura 71.2 Anormalidade t(15;17)/*PML–RARα* na leucemia pró-mielocítica aguda. A. Congurações esquemáticas parciais do éxon genômico para *PML* e *RARα*. As setas pretas verticais indicam os três sítios de pontos de quebra no gene *PML* (BCR1, BCR2, BCR3) e a região do ponto de quebra no íntron 2 no gene *RARα*. Notar que o ponto de quebra BCR2 occore dentro do éxon 6 do gene *PML*. B. Representações do mRNA do transcrito *PML–RARα* derivado de cada um dos três pontos de quebra-eventos de fusão. Os três transcritos são denominados de forma alternativa de acordo com o comprimento da espécie quimérica: forma longa (L) para BCR1, forma curta (S) para BCR3 e forma variável (V) para BCR2. Nesse caso também a fusão BCR2/forma V contém apenas uma porção do éxon 6 do *PML*, embora nucleotídeos extras possam ser acrescentados ou deletados na junção para manter uma estrutura de leitura intacta *PML–RARα*. As setas alaranjadas indicam as posições relativas dos iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar esses transcritos quiméricos pela técnica da transcriptase reversa (RT-PCR). O painel C ilustra os resultados representativos da RT-PCR, detectando a anormalidade t(15;17)/*PML–RARα*: M = tamanho do marcador molecular (100 bp); L = forma longa/BCR1; V = forma V/BCR2; S = forma S/BCR3; N = nenhum controle de molde; x = espaço vazio. As bandas do gel no lado esquerdo (acima do espaço vazio, x) indicam os produtos da PCR para a forma L/BCR1 e a forma V/BCR2 detectados com iniciadores situados no éxon 6 do *PML* e no éxon 4 do *RARα*. Como o éxon 6 não está presente no transcrito da forma S/BCR3, nenhum produto da PCR é gerado, conforme mostrado no vazio correspondente. As bandas de gel à direita do espaço vazio x mostram os resultados obtidos com um iniciador do éxon 3 do *PML* e o mesmo iniciador do *RARα*. Nesse caso, é visto um padrão de bandeamento mais complexo para os produtos da forma L/BCR1 e da forma V/BCR2, devido à desunião alternativa do éxon 5 do *PML* e dos éxons 5 e 6. A fusão forma S/BCR3 é detectada facilmente com esse conjunto de iniciadores. Notar que, para o tipo raro forma V/BCR2 de *PML–RARα*, os produtos da PCR são ligeiramente menores do que os da espécie forma L/BCR1, por causa da perda de parte do éxon 6 do *PML*.

5 e 6, originando três produtos amplificados principais quando é empregado um éxon PML iniciador (Fig. 71.2).

A relevância clínica de detectar a anormalidade de fusão *PML-RARα* em casos de suspeita de LPA é evidente a partir da eficácia de administração da terapia específica (i. e., quimioterapia + atRA) com alta possibilidade de remissão e sobrevida a longo prazo. Com tal finalidade, apesar da estreita correlação entre a t(15;17)/*PML–RARα* e a morfologia da LPA, admite-se que ocorrem outras leucemias mieloides raras semelhantes à LPA. Essa morfologia simula translocações alternativas que envolvem o gene *RARα* com genes de fusão parceiros além do *PML*. Exemplos dessas variantes incluem as leucemias mieloides agudas t(11;17)/*PLZF–RARα*, t(11;17)/*NuMA–RARα* e t(5;17)/*NPM–RARα* (Melnick, 1999; Grimwade, 2000; Sainty, 2000). As leucemias positivas para *PLZF-RARα*, em particular, não respondem aos efeitos de diferenciação do atRA e estão associadas a um desfecho menos favorável. Outros subtipos morfológicos de LMA caracterizados por aumento de pró-mielócitos também não respondem ao atRA e precisam ser distinguidos da verdadeira LPA positiva para *PML-RARα*.

Vários estudos avaliaram o possível significado clínico do tipo transcrito PML-RARα em pacientes com LPA. Tanto a forma S (BCR3) quanto a rara forma V (BCR2) das fusões *PML-RARα* foram associadas a aspectos adversos, como alta contagem de leucócitos à apresentação, resposta precária ao atRA e, possivelmente, remissão de menor duração (Vahdat, 1994; Gallagher, 1995, 1997; Jurcic, 2001); entretanto, o valor prognóstico independente da subclassificação em LPA ainda não foi estabelecido. O transcrito PML-RARα também serve como um marcador molecular válido para acompanhar a resposta terapêutica. Ante a variedade de opções terapêuticas adicionais para a LPA, inclusive uma intervenção de segunda linha com trióxido de arsênico (As_2O_3) ou transplante alogênico de medula óssea ou células-tronco, a avaliação molecular de doença residual é parte integrante do tratamento de pacientes com LPA. Embora isso seja discutido em mais detalhes em "Monitoração molecular de doença residual", a investigação molecular inicial do indivíduo com LPA é crítica para definir o tipo de transcrito PML-RARα para avaliação subsequente do tratamento.

Leucemia mieloide aguda relacionada com o fator de ligação ao core: anormalidades t(8;21)/AML1–ETO e Inv(16) ou t(16;16)/CBFβ–MYH11

As leucemias mieloides agudas com t(8;21)(q22;q22) e a inv(16)(p13q22), ou anormalidades citogenéticas t(16;16)(p13;q22) relacionadas, são responsáveis em conjunto por aproximadamente 20% dos novos casos (Brunning, 2001). Embora a t(8;21) em geral esteja associada à LMA mostrando maturação (FAB tipo LMA-M2), a inv(16) e t(16;16) têm alta correlação com leucemia mielomonocítica aguda com eosinófilos anormais (FAB do tipo LMA-M4Eo) (Brunning, 2001). Clinicamente, esses subtipos de LMA definidos geneticamente respondem à quimioterapia (em especial a esquemas com altas doses de citarabina) e são considerados favoráveis em termos prognósticos, em comparação com a LMA em geral.

Embora fenótipos respectivos diferentes derivem dessas translocações, um aspecto biopatológico notável e comum das leucemias t(8;21) e inv(16) ou t(16;16) é a anulação do fator de ligação do *core* (CBF) na via de transcrição reguladora (Fig. 71.3) (Speck, 1999). O CBF é um fator de transcrição heterodimérico que consiste em uma subunidade α (CBFα) e uma subunidade β (CBFβ) que agem estabilizando a CBFα nos sítios de interação do DNA. Em células normais, o CBF atua nas sequências facilitadoras do *core* em vários genes necessários para a diferenciação ou maturação adequada de células mieloides e linfoides (Fig. 71.3). A ligação do CBF facilita o acesso de outros complexos de fator de transcrição para esses sítios de cromatina, em parte pelo aumento da acetilação das proteínas histonas ligadas ao DNA pelas acetiltransferases da histona (Lorsbach, 2001). Nas leucemias mieloides agudas humanas com a t(8;21), o gene *AML1* (também designado RUNX1 ou CBFA2), que codifica uma isoforma de CBFα, une-se a um fator de transcrição hipotético, ETO (ou MTG8) para formar a fusão LMA1-ETO (Downing, 1999). No caso da inv(16) ou t(16;16), o gene que produz CBFβ (i. e., CBFB) se justapõe a um gene *MYH11* da cadeia leve de miosina muscular para formar o híbrido *CBFB-MYH11* (Liu, 1995). Qualquer que seja o caso, acredita-se que a alteração profunda do programa de diferenciação normal é fundamental para causar leucemia aguda. A proeminência de alterações nas vias do CBF na leucemogênese também é enfatizada pelo achado de translocações do gene *AML1* em vários outros tipos de leucemia e mielodisplasia, incluindo a anormalidade t(12;21)/*TEL–AML1* (Fig. 71.3), a anormalidade genética mais comum na LLA pediátrica. Do ponto de vista mecanicista, acredita-se que a proteína de fusão leucêmica AML1-ETO atue de maneira negativa dominante para AML1 (i. e., CBFα), ao recrutar ou estabilizar elementos de repressão transcricional, inclusive complexos desacetilase histonas, em sítios críticos do DNA (Lorsbach, 2001). Em contraste, a proteína quimérica CBFβ-MYH11 sequestra a proteína CBFα normal no citosol, anulando assim a montagem heterodimérica no núcleo do CBF. Em cada caso, a inibição resultante da transcrição em genes importantes altera o programa genético para a proliferação e a diferenciação normais nas células-tronco ou progenitoras hematopoéticas. Contudo, ao se admitir que o conceito de que uma aberração genética individual provavelmente não é suficiente, por si só, para induzir carcinogênese, dados recentes obtidos com camundongos tornados transgênicos por engenharia genética, para que expressassem um oncogene, mostraram que só se desenvolve um estado de leucemia mieloide aguda após exposição a um mutágeno promotor (Lorsbach, 2001). Os últimos achados sugerem que é necessária maior investigação para que se entenda mais completamente a patogênese definitiva dessas leucemias.

Os rearranjos moleculares subjacentes da fusão *AML1-ETO* são tais que os sítios de ponto de quebra e fusão invariavelmente envolvem as mesmas regiões de íntron em ambos os genes, resultando em uma molécula de mRNA com *AML1–ETO* consistente em cada paciente com esse tipo de LMA. Em contraste, a detecção padrão do transcrito quimérico CBFB–MYH11 pela RT-PCR é complicada pelo potencial de heterogeneidade acentuada do ponto de quebra, principalmente no gene *MYH11*, bem como pelos raros sítios de quebra alternativos descritos no CBFB. No geral, foram identificadas mais de oito formas de transcrito de fusão *CBFB–MYH11*, até o momento (Liu, 1995; Viswanatha, 1998; Kadkol, 2004). Apesar dessa complexidade, a fusão gênica *CBFB–MYH11* pode ser prontamente detectada pela RT-PCR, pois quase 95% desses tumores abriga o chamado mRNA quimérico do "tipo A", caracterizado pela fusão do nucleotídeo 495 do CBFB com o nucleotídeo 1921 do MYH11, para formar um transcrito de comprimento relativamente curto. Estratégias de PCR mais abrangentes também foram desenvolvidas para detectar a maioria dos outros tipos raros de fusão *CBFB–MYH11*, cada um deles responsável por menos de 5% dos casos de inv(16) ou t(16;16) na LMA (Kadkol, 2004). A análise da RT-PCR para a anormalidade *CBFB–MYH11* é potencialmente vantajosa, pois a interpretação citogenética padrão pode não ser informativa em alguns casos (Merchant, 2004). Ante o desfecho clínico geralmente mais favorável de ambos os subtipos de LMA, o diagnóstico molecular pode, assim, ter um papel significativo tanto na identificação inicial como na monitoração da doença após o tratamento.

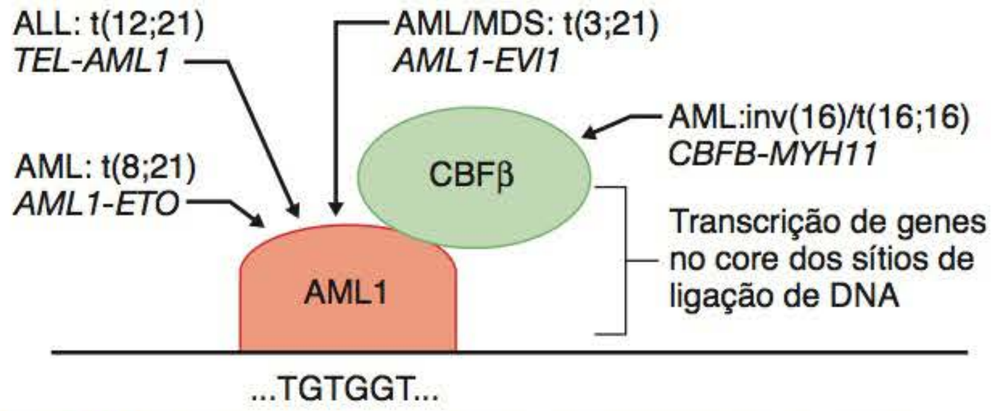


Figura 71.3 Alteração da via de transcrição do fator de ligação ao *core* na leucemogênese. O esquema ilustra o papel central da via de transcrição do fator de ligação ao *core* (CBF, *core binding factor*) na leucemogênese. Ambos os componentes do CBF heterodimérico são alvejados para alteração em uma variedade de leucemias agudas linfoblásticas e mieloblásticas. Dentre eles, a t(8;21)/*AML1–ETO* e a inv(16) ou t(16;16)/*CBFB-MYH11* são responsáveis por quase 20% dos novos casos de leucemia mieloide aguda, enquanto a t(12;21)/*TEL–AML1* é encontrada em 20% das leucemias linfoblásticas agudas pediátricas. Nomenclatura alternativa dos genes: *AML1 = CBFA2*; *ETO = MTG8*; *TEL = ETV6*. Ver mais detalhes no texto.

Leucemia mieloide aguda com anormalidades no gene FLT3

Há um número relativamente grande de casos de LMA com cariótipo diploide em que pouco se sabe sobre a patogênese fundamental. O comportamento clínico da LMA diploide também é heterogêneo. A expressão do gene *FLT3* (tirosina quinase semelhante à FMS; também conhecido como *FLK2* e *STK1*) produz uma proteína de membrana transdutora de sinal da família do receptor de tirosina quinase (RTK) do tipo III, cujos membros também incluem os genes de receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas e o gene *c-kit* (Agnes, 1994). As interações do receptor de FLT3 com o ligante são importantes para a manutenção e a propagação de células progenitoras iniciais na hematopoese mieloide e linfoide normal. Não surpreende o fato de que o receptor selvagem da proteína também se expresse na maioria dos casos de LMA e da linhagem B da LLA, enfatizando seu papel na sobrevida e na proliferação de células hematopoéticas imaturas (Gilliland, 2002; Stirewalt, 2003). As alterações genéticas do gene *FLT3* na LMA foram descritas pela primeira vez na forma de duplicações sequenciais internas (ITD, *internal tandem duplications*) de parte da região codificadora para a porção justamembranosa dessa tirosina quinase (Nakao, 1996b). Supõe-se que o defeito molecular resultante produza uma alteração constitutiva dominante do gene *FLT3* anormal, observação confirmada pelo achado de que todas ITDs preservam uma estrutura intacta, apesar da introdução de nucleotídeos adicionais no nível do DNA e do mRNA. Desde então, tem-se mostrado que as mutações ITD do gene *FLT3* ocorrem em 20 a 30% dos novos casos de LMA, com muitos pacientes sendo mais jovens (menos de 65 anos) e tendo um cariótipo tumoral diploide (Gilliland, 2002). A presença de ITD do *FLT3* só é encontrada raramente na LLA.

Um segundo tipo de lesão ativadora no gene *FLT3*, que compreende cerca de 5 a 10% dos casos de LMA, foi elucidado recentemente, sendo uma mutação pontual que afeta o sítio do aminoácido Asp835 na "alça de ativação" (Yamamoto, 2001). Também acredita-se que a mutação Asp835, em que o ácido aspártico nesse sítio é substituído por outro resíduo de aminoácido, cause desregulação da proteína FLT3 por efeitos diretos sobre a atividade da porção quinase da molécula. Estima-se que essas mutações no gene *FLT3* ocorram em pelo menos 30% dos casos de LMA em adultos (bem como em um número menor de casos pediátricos de LMA, LMA secundária e mielodisplasias), e parecem estar distribuídas entre todos os subtipos morfológicos; consequentemente, o *FLT3* é o achado genético recorrente anormal mais comum encontrado na LMA. A maioria dos casos de LMA com anormalidades do *FLT3* envolve apenas um alelo do gene com preservação do *locus* restante do tipo selvagem; contudo, foram notadas mutações bialélicas ocasionais. Em contraste com a situação para a translocação de genes de fusão com transcritos de mRNA, é possível detectar ITDs do *FLT3* por amplificação pela PCR do DNA genômico. A amplificação dos éxons 14 e 15 do *FLT3* (antes designados éxons 11 e 12) pode identificar a ITD, pois o tamanho de seus fragmentos é variavelmente maior do que o esperado nessa região do gene do tipo selvagem. A presença de uma ITD pode ser estabelecida pelo tamanho do produto da PCR, pela análise da conformação da fita única ou pelo sequenciamento do DNA. São usadas abordagens moleculares diferentes para detectar a mutação Asp835, incluindo a PCR do DNA seguida pela digestão *amplicon* com endonucleases de restrição informativas, sequenciamento direto ou outros métodos específicos da sequência.

Embora a presença de mutações do gene *FLT3* na LMA tenha sido associada a um prognóstico desfavorável, os dados são mais indicativos da ocorrência na população pediátrica (Zwaan, 2003; também revistos por Stirewalt, 2003). Entre adultos com LMA, a força de uma associação independente entre mutações do *FLT3* e desfechos adversos ainda não foi definida. É interessante que as mutações do *FLT3* são com frequência observadas na LPA (FAB AML-M3), sugerindo um papel cooperativo dessa aberração genética na fisiopatologia de um subconjunto desse tipo geralmente mais favorável de LMA (Kiyoi, 1997). Os pacientes com LPA e mutações do *FLT3* não têm um prognóstico significativamente diferente daqueles sem a doença, mas as anormalidades do gene *FLT3* estão associadas a aspectos proliferativos, como leucocitose. No entanto, em muitos outros pacientes com LMA e mutação do *FLT3*, a doença tem um comportamento biológico agressivo e a sobrevida é curta; em algumas dessas leucemias, coexistem lesões genéticas desfavoráveis, embora na maioria dos casos elas não estejam presentes. Um indício de efeitos aparentemente mais diversos da mutação do *FLT3* na LMA com cariótipo normal foi constatado da observação de que uma alta "dosagem gênica" ou proporção de ITDs no *FLT3*, com relação ao alelo do tipo selvagem, pode estar correlacionada com um desfecho clínico desfavorável (Thiede, 2002). Proporções elevadas de ITD do tipo selvagem, nesses casos de LMA, surgiriam possivelmente da amplificação gênica da ITD, ou da presença de um subclone mais prevalente de células leucêmicas com a ITD do *FLT3* (Stirewalt, 2003).

Qualquer que seja o mecanismo subjacente específico da ativação do FLT3, a alta expressão desse gene alterado parece estar associada a um prognóstico desfavorável em muitos casos de LMA. Portanto, os ensaios para avaliar a condição do gene *FLT3*, a quantidade relativa de mRNA ou os níveis de expressão de proteína vão contribuir com um aspecto adicional para diagnóstico, classificação e identificação do patógeno da LMA. Com um foco farmacológico crescente no desenvolvimento de inibidores do RTK específicos da classe como agentes anticancerosos, o produto gênico do *FLT3* que sofreu mutação representa outro alvo terapêutico potencialmente importante e fornece ainda um marcador molecular específico do tumor para a detecção de doença mínima.

Leucemias linfoblásticas agudas

Ha diferenças biológicas e clínicas significativas entre a LLA que começa na idade adulta e a da infância. Sabe-se comparativamente pouco sobre a patogênese da LLA em adultos, em geral associada a um desfecho relativamente desfavorável. Como tal, as anomalias citogenéticas e genética moleculares na LLA em adultos ainda não foram caracterizadas completamente, com exceção do prognóstico muito desfavorável da t(9;22)/BCR-ABL1 (i. e., LLA Ph^+). Além da detecção da fusão gênica BCR-ABL1, o diagnóstico molecular atualmente tem utilidade limitada no tratamento da LLA em adultos. Em acentuado contraste, a avaliação diagnóstica molecular da LLA pediátrica tem valor substancial na estratificação de pacientes de acordo com estratégias de tratamento "adaptadas ao risco". Nos últimos 20 anos, o aprimoramento dos esquemas terapêuticos para essas crianças, associado a um entendimento mais profundo da biologia tumoral na LLA, resultou em taxas de cura em torno de 80% (Pui, 2004). Por sua vez, isso levou ao conceito da terapia adaptada para subconjuntos definidos de pacientes, com base em uma combinação dos aspectos clínicos e biológicos da apresentação, inclusive a resposta inicial ao tratamento e a genética tumoral. Assim, o objetivo na LLA pediátrica evoluiu, de modo a equilibrar a maior probabilidade de remissão a longo prazo, com riscos mais baixos de eventos adversos. Embora os aspectos clínicos (p. ex., idade, grau de leucocitose, acometimento do sistema nervoso central etc.) sejam inicialmente usados para separar os indivíduos de risco "padrão" daqueles de "alto" risco, a genética tumoral também é um componente integrante da avaliação inicial (i. e., antes do tratamento) de pacientes com LLA pediátrica. Em termos mais amplos, as anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais são consideradas nesse processo (Tab. 71.4). Na primeira instância, "hiperdiploidia elevada", ou aneuploidia tumoral com um número de cromossomos ultrapassando 52, foi associada a uma resposta ao tratamento e um desfecho mais favoráveis, em particular no caso da presença de certas trissomias cromossômicas (p. ex., +4, +10, +17) (Harris, 1992; Heerema, 2000; Moorman, 2003). Em contrapartida, a hipodiploidia tumoral, em especial inferior a 40 cromossomos, está associada a uma propensão muito alta a falha no tratamento (Heerema, 1999). Entre os rearranjos estruturais, quatro translocações cromossômicas são responsáveis por aproximadamente 1/3 dos casos de LLA pediátrica, todas com importância prognóstica: t(9;22)/BCR–ABL1, t(1;19)/E2A–PBX1, t(12;21)/TEL–AML1 e rearranjos envolvendo o *locus* 11(q23)/MLL (Bartolo, 2000; Harrison, 2001; Pui, 2004). Em geral, as anormalidades numéricas e estruturais ocorrem de forma exclusiva, uma ou outra, em qualquer caso de LLA na infância, mas ocasionalmente podem coexistir.

Principais anormalidades de fusão de genes e translocações na leucemia linfoblástica aguda pediátrica

A t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1* é encontrada em aproximadamente 3% dos casos de LLA pediátrica. Tipicamente, os pacientes apresentam-se

Tabela 71.4 Estratificação do risco genético na leucemia linfoblástica aguda pediátrica da linhagem B

Anormalidade	Significado prognóstico	Notas
Hiperdiploidia elevada (mais de 52 cromossomos)	Favorável	Tumores hiperdiploides com cromossomos trissômicos particulares (p. ex., +4, +10, +17) associados a desfecho muito favorável
t(12;21)/*TEL–AML1*	Favorável	Desfecho muito favorável, mas incidência apreciável de recidivas tardias
t(1;19)/E2A-PBX1	Desfavorável	Anormalidade de prognóstico intermediário; a terapia intensiva resulta em bom prognóstico
t(9;22)/*BCR–ABL1*	Desfavorável	Risco muito alto de recidiva/doença refratária
Rearranjos gênicos 11q23/*MLL*	Desfavorável	Risco muito alto de leucemia linfoblástica aguda da infância; também considerados fator de alto risco para crianças maiores
Hipodiploidia (menos de 40 cromossomos)	Desfavorável	Risco muito alto de recidiva/doença refratária

Os aspectos da genética tumoral são considerados em conjunto com os achados clínicos e laboratoriais, inclusive a idade, a contagem de blastos, evidência de doença extramedular etc. Esses fatores de risco genéticos, portanto, modificam e refinam os parâmetros tradicionais. Outros preditores de risco, como o término da indução de blastos medulares, não foram incluídos (p. ex., medula "M3" com mais de 20% de blastos residuais como aspecto de muito alto risco de falha do tratamento primário).

com contagens acentuadamente elevadas de linfoblastos e outros aspectos clínicos adversos. Os aspectos diagnósticos estruturais e moleculares da fusão gênica *BCR-ABL1* já foram discutidos neste texto, porém, na LLA pediátrica, nota-se que a região do *cluster* de quebra menor (m-BCR) ou mRNA quimérico do tipo e1-a2 é detectada em aproximadamente 80 a 90% dos casos. A presença de *BCR-ABL1* na LLA pediátrica é um fator prognóstico desfavorável independente, que inclui esses pacientes entre os de risco muito maior de falha do tratamento e recidiva (Fletcher, 1991; Gaynon, 1997). A maioria dos pacientes com LLA positivos para *BCR-ABL1* é candidata a uma terapia mais agressiva, incluindo transplante alogênico precoce; todavia, pode ser que a introdução do mesilato de imatinibe represente uma modalidade terapêutica adicional para essa doença. A análise molecular do transcrito *BCR-ABL1* é crítica para a previsão do risco de LLA na infância, bem como para fornecer um marcador para a monitoração de doença residual.

A LLA pediátrica caracterizada pela anormalidade t(1;19)(q23;p13) é incomum, sendo responsável por menos de 5% dos casos. Essa translocação está fortemente associada a aspectos imunofenotípicos "pré-B", tipificados pela presença de produção citoplasmática de IgM nas células tumorais. Após seu reconhecimento inicial na LLA pediátrica, a t(1;19) foi associada a um desfecho desfavorável. No entanto, ficou evidente que protocolos de tratamento mais intensivos eliminaram em grande parte os efeitos adversos desse genótipo, resultando em remissões estáveis na maioria dos indivíduos. Portanto, o reconhecimento dessa translocação é necessário para o tratamento adequado. A t(1;19) quase sempre ocorre como uma forma não equilibrada de translocação (com perda resultante de algum material genético), e produz a fusão gênica quimérica *E2A-PBX1* (Hunger, 1991). O gene *E2A* codifica uma série de fatores de transcrição básicos hélice-alça-hélice, que estão envolvidos no desenvolvimento de miócitos e linfócitos B. O PBX1 é um fator de transcrição ligado ao DNA e que normalmente não se expressa em células linfoides.

A proteína de fusão E2A-PBX1 substitui os motivos de ligação do DNA e dimerização de proteína do E2A com a região de ligação do DNA do *PBX1*, predispondo a célula B progenitora à proliferação neoplásica. A localização dos pontos de quebra genômicos dentro dos íntrons E2A e PBX1 é consistente em praticamente todos os casos, resultando na formação de um único transcrito E2A-PBX1 (Hunger, 1991), com apenas poucas variantes relatadas. Esse mRNA de fusão é facilmente detectado pela RT-PCR e também pode servir como marcador específico da doença para a detecção sensível na medula óssea. É digno de nota que podem ocorrer casos raros de LLA detectáveis pela citogenética com uma t(1;19) equilibrada (balanceada), mas não têm E2A-PBX1 e parecem estar associados a um desfecho inferior (Privitera, 1992).

No geral, 20 a 25% dos casos de LLA pediátrica caracterizam-se pela presença da anormalidade t(12;21)(p13;q22), estabelecendo essa lesão como o achado genético recorrente mais comum nessa doença. De fato, a t(12;21) é citogeneticamente críptica em quase todos os casos, ao contrário do que geralmente é sugerido por uma deleção aparente do braço curto de um cromossomo 12. Embora os pacientes com LLA t(12;21) sejam encontrados distribuídos entre grupos diferentes de risco clínico, em geral esses indivíduos estão entre os 2 e 10 anos de idade e têm tumores com cariótipo diploide (Rubnitz, 1997b). A t(12;21) resulta na junção do *locus* 12p do gene *TEL* (também conhecido como ETV6) com o *AML1* (ou *RUNX1*, *CBFA2*) no 21q para formar a fusão gênica quimérica *TEL-AML1* no cromossomo 12 derivado (Romana, 1995). Pacientes pediátricos com LLA, positivos para *TEL-AML1*, têm um prognóstico favorável, com remissões excelentes sem doença perto de 80 a 90% (similar ao supracitado grupo de alta hiperploidia com trissomias cromossômicas específicas) (Shurtleff, 1995; Borkhardt, 1997; Rubnitz, 1997a, 1997b). Entretanto, relatos de uma taxa substancial de recidiva tardia entre alguns pacientes com LLA e *TEL-AML1* trouxeram de volta a atenção para uma definição mais clara das características de risco desse grupo, mesmo que muitos desses pacientes com recidiva continuem a responder aos protocolos de "tratamento de salvação" (Harbott, 1997; Seeger, 1998; Ford, 2001). A patologia molecular da LLA com *TEL-AML1* está relacionada com a interrupção da atividade do fator de ligação ao *core* (CBF), acentuando a repressão transcricional de muitos genes-alvo, como discutido similarmente para a anormalidade *AML1-ETO* na LMA (Fig. 71.3) (Zelent, 2004). Em um grande número de casos de LLA com *TEL1-AML1*, o alelo *TEL* remanescente é deletado parcial ou completamente de maneira subclonal, sugerindo que tal evento pode ser um evento secundário importante para a transformação leucemogênica, mediante a perda completa da função normal do TEL (Raynaud, 1996). No nível do DNA, os sítios de quebra do *TEL* e do *AML1* na LLA em geral ocorrem nas mesmas regiões genômicas do íntron 5 do TEL e do íntron 1 do AML1 (Romana, 1995), com evidência de alguma propensão para a aglomeração de pontos de quebra. Também foi descrita uma segunda variante menor, com pontos de quebra situados no íntron 2 do *AML1*. O mRNA transcrito *TEL-AML1*, assim, cerca uma nova região que une o éxon 5 do *TEL* ao éxon 2 do *AML1* (na maioria dos casos), ou o éxon 5 do *TEL* ao éxon 3 do *AML1* (menor número de casos) (Nakao, 1996a). Há mais complexidade ainda nessa fusão gênica como resultado da união alternativa dos éxons 2 ou 3 do *AML1*, com a possibilidade de serem detectadas quatro formas transcritas amplificadas de *TEL-AML1* pela RT-PCR em certos casos (Fig. 71.4). A detecção molecular (RT-PCR) de *TEL-AML1* é empregada frequentemente na LLA pediátrica, por causa da impossibilidade de diagnosticar a t(12;21) pela citogenética padrão. O mRNA quimérico representa ainda um marcador molecular altamente específico para a avaliação de doença residual.

As translocações que envolvem o gene da "leucemia de linhagem mista" (LLM), localizado no cromossomo 11(q23), são observadas em aproximadamente 5% dos casos de LLA pediátrica e representadas de forma desproporcional em lactentes com menos de um ano de idade (Bartolo, 2000). A presença de translocações do gene da LLM (gene *MLL*) está associada a um prognóstico desfavorável, porque essas crianças ainda são muito pequenas, considerando-se, também, um achado adverso em crianças maiores, em particular no contexto de resposta precária à prednisona (Pui, 2003). As leucemias em lactentes positivos para o *MLL* são da linhagem B, não têm positividade para CD10 e demonstram expressão aberrante de alguns marcadores associados à linhagem mieloide (Chen, 1993). Em termos clínicos, esses pacientes têm contagens iniciais altas de leucócitos, organomegalia e uma tendência ao aco-

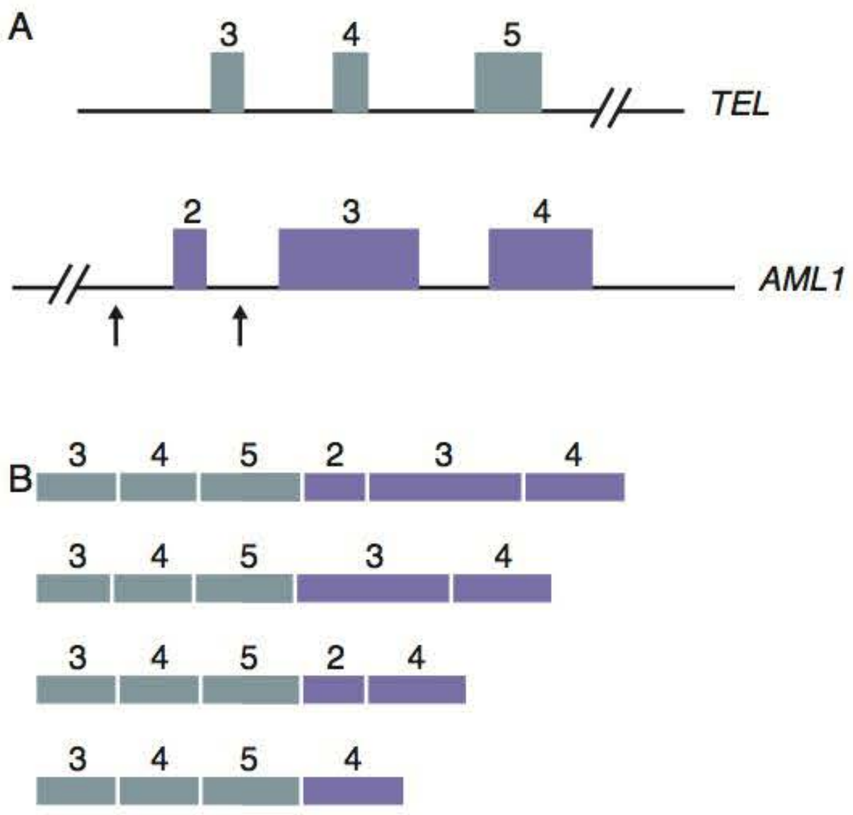


Figura 71.4 Anormalidade t(12;21)/*TEL–AML1* na leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células B. A. Congurações esquemáticas parciais do éxon genômico para *TEL* e *AML1*. No caso do gene *TEL*, ocorrem pontos de quebra no íntron 5, enquanto os pontos de quebra do *AML1* podem ocorrer no íntron 1 ou, em um número menor de casos, no íntron 2 (mostrado pelas setas pretas verticais). O transcrito primário mais comum de mRNA resultante da fusão *TEL–AML1* é, portanto, éxon 5 de TEL-éxon 2 de AML1, conforme ilustrado em B. No entanto, pode haver complexidade adicional em decorrência do desdobramento alternativo de éxon 2 relativamente curto de AML1, do éxon 3 ou de ambos, em alguns casos de leucemia linfoblástica aguda positiva para *TEL-AML1*. Essas formas alternativas de transcrito também estão indicadas no painel B. Notar que, no contexto menos frequente de uma fusão éxon 5 de TEL-éxon 3 de AML1, apenas um transcrito alternativo adicional poderia ser esperado. C. Resultados da reação em cadeia da polimerase típica com transcriptase reversa, conforme revelados em um gel de agarose corado com brometo de etídio. M = marcador de tamanho molecular (100 bp); + = amostra de leucemia positiva para fusão *TEL–AML1*; – = amostra de leucemia negativa para fusão *TEL–AML1*; N = sem molde de controle. As quatro formas possíveis do transcrito *TEL–AML1* que surgem da única fusão gênica nesse caso positivo indicado por asteriscos e as intensidades de bandas demonstram que o tipo de transcrito de comprimento total é tipicamente mais abundante.

metimento do sistema nervoso central. Também ocorrem translocações que envolvem 11(q23)/*MLL* em casos de LMA *de novo* e de LMA secundária (relacionada com a terapia) (Tab. 71.3), ambas caracterizadas por aspectos morfológicos monocíticos (i. e., tipos FAB AML-M4 ou M5).

Na LMA *de novo* do adulto, rearranjos do gene *MLL*, especificamente a anormalidade t(9;11), podem não representar um genótipo tumoral de alto risco. Em contraste, a LMA secundária surge em subconjuntos de pacientes tanto pediátricos quanto adultos, que já tenham sido submetidos à quimioterapia prévia em doses intensivas com inibidores da topoisomerase II do DNA (p. ex., epipodofilotoxinas e antraciclinas); esses tumores ocorrem abruptamente, meses a anos após a exposição, e têm uma evolução muito agressiva, resistente ao tratamento (Super, 1993; Smith, 1994). A biopatologia subjacente das translocações do gene *MLL* nesses tipos diferentes de leucemia aguda linfoide e mieloide *de novo* e secundária vem sendo cada vez mais bem entendida. A proteína MLL é uma grande proteína (≈430 *kDa*) de ligação do DNA e caracteriza-se por vários domínios funcionais, o que indica seu papel como fator de transcrição multifuncional (Li, 2005), sabendo-se que regula vários genes *HOX* (*homeoboxes*) envolvidos na coordenação do desenvolvimento esquelético adequado durante a embriogênese em mamíferos (Yu, 1995). Vários genes *HOX* também parecem ser fundamentais para o desenvolvimento e a manutenção das células progenitoras mieloides e linfoides, estabelecendo, assim, uma estreita ligação para o *MLL* também no controle genético da hematopoese normal (Ernst, 2004a, 2004b; Hess, 2004). As translocações do gene *MLL* produzem uma forma funcional alterada da proteína; qualquer que seja a circunstância, o motivo de ligação do N terminal "gancho A-T" do DNA do *MLL* é retido na proteína quimérica, tipicamente com fusão com parte de outro fator de transcrição (Waring, 1997). Dados recentes indicam que a expressão anormal das proteínas de fusão do *MLL* pode desregular de forma constitutiva certos genes *HOX*, levando à imortalização da célula progenitora hematopoética e à predisposição para a leucemogênese (Armstrong, 2003; Hess, 2004). Apesar disso, os mecanismos moleculares básicos que levam à regulação anormal da programação genética nas células hematopoéticas pelas translocações do *MLL* são um foco de estudo promissor (Li, 2005).

A partir da análise estrutural dos pontos de quebra do gene *MLL* em diferentes leucemias, foram feitas algumas outras descobertas biológicas importantes. A maioria dos casos novos de LMA, com translocações do *MLL*, tem sítios de quebra na posição 5' na região do *cluster* de quebra do *MLL*, enquanto a preponderância dos casos de LLM secundária ocorre em um segmento mais distal (3') desse *locus* (Stissel-Broeker, 1996). Os casos de LLA em lactentes também apresentam uma forte tendência para associar-se à região genômica 3', sugerindo algo em comum na patogênese com a LMA secundária. Essa área "quente" 3' contém um sítio de ligação de forte consenso para a topoisomerase II do DNA, bem como uma "região de inserção estruturada" altamente suscetível à clivagem por endonucleases. Embora a presença do sítio para a topoisomerase II seja uma explicação atraente para a base do desenvolvimento de LMA secundária (p. ex., via indução da quebra da fita dupla pelos inibidores da topoisomerase II e os subsequentes rearranjos da translocação do *MLL*), o sítio estruturado 3' hipersensível do gene tem chamado mais a atenção, porque também parece particularmente propenso a quebras da fita dupla em modelos experimentais (Stissel-Broeker, 1996). O último *locus* do *MLL* é realmente alvejado durante diversos estímulos apoptogênicos (p. ex., após estresse celular ou dano ao DNA) (Betti, 2001, 2003; Sim, 2001; Greaves, 2003a). Essas investigações recentes implicam que a exposição a agentes capazes de induzir essa quebra do sítio específico do *MLL* estabelece potencialmente o estágio para fusões do gene *MLL*, desenvolvendo formas muito agressivas de leucemia observadas em lactentes e após certos tipos de quimioterapia. Por sua vez, já tendo sido identificada a etiologia da LMA secundária como translocações do *MLL*, os estudos atuais em lactentes procuram descobrir possíveis fatores exógenos ou transplacentários de ocorrência natural que possam predispor ao desenvolvimento de células-tronco hematopoéticas fetais para a quebra do gene *MLL* e ilegitimar a recombinação. Na próxima seção, vamos abordar as implicações gerais desses e de outros estudos.

O gene *MLL* está envolvido em eventos de translocação com mais de 30 pares de genes conhecidos, mas a anormalidade t(4;11)/*MLL-AF4* é a mais frequentemente encontrada em lactentes com LLA (75% dos casos). Os pontos de quebra do *locus* do gene *MLL* estão distribuídos sobre uma região de 8,3 kb do DNA, que abrange os éxons 5 a 11. Essa heterogeneidade acentuada de pontos de quebra também pode ocorrer no gene translocado (p. ex., *AF4*), resultando na possibilidade de vários produtos gênicos híbridos do MLL, um dos quais se expressa tipicamente em certos pacientes com essa leucemia. Pode-se usar a RT-PCR para identificar o mRNA quimérico MLL-AF4, bem como outros transcritos de fusão gênica do *MLL*, porém, a combinação de múltiplos parceiros gênicos em rearranjo nessas leucemias e o potencial para variabilidade genômica substancial de pontos de quebra requerem abordagens laboratoriais abrangentes e tecnicamente desafiadoras, como ensaios múltiplos de PCR (Pallisgaard, 1998; Andersson, 2001). Rearranjos no *locus* do gene *MLL* também foram identificados com sucesso pela análise *Southern blot*, embora a técnica FISH agora seja uma alternativa rápida, menos problemática e igualmente eficaz para tal finalidade (Cuthbert, 2000). A RT-PCR, mesmo com as limitações descritas, continua a ocupar um lugar importante no diagnóstico e na monitoração dessas leucemias, pois o tipo específico de fusão gênica pode ser identificado com mais sensibilidade e especificidade, em contraste com outros métodos analíticos.

Origens pré-natais das leucemias na infância

Foram feitos grandes avanços na compreensão da base molecular das leucemias pediátricas agudas. Tais esforços abrangeram a ciência básica, a pesquisa translacional e, cada vez mais, os métodos baseados na população. Estudos sobre a LLA concordante que ocorre em gêmeos monozigóticos demonstraram primeiro que as leucemias originárias em cada indivíduo acometido eram geneticamente idênticas, com base na análise molecular das sequências genômicas de pontos de quebra dos rearranjos envolvidos com o *MLL*, *TEL-AML1* ou imunoglobulina clonotípica ou do gene de receptor de célula T (resumo em Graves, 2003b). É notável que as taxas de concordância são diferentes para os subtipos leucêmicos em gêmeos, aproximando-se de 100% no caso da translocação do *MLL* na LLA e de apenas 10% na LLA com *TEL-AML1*, sugerindo um potencial de transformação variável para essas fusões gênicas diferentes *in vivo* e levantando a questão da natureza e do momento das lesões genéticas secundárias. O impacto dessas investigações foi corroborado com o uso de técnicas experimentais semelhantes aos marcadores "rastreadores" do DNA específico da leucemia nas respectivas amostras de sangue neonatal arquivadas de cada criança (não gêmea) de diferentes idades com subtipos definidos geneticamente de LLA e LMA (Cuthbert, 1997; Wiemels, 1999, 2002a; Fasching, 2000; Yagi, 2000; Greaves, 2003a, 2003b).

Juntos, esses dados sugerem fortemente que muitos casos de LLA pediátrica (e alguns de LMA) têm origem *in utero*; em outras palavras, a aquisição pré-natal de eventos de translocação potencialmente leucemogênicos ou outras anormalidades genéticas pode ocorrer durante o período de hematopoese fetal ativa, mas, na maioria dos casos, é necessário que ocorram outras alterações genéticas em indivíduos suscetíveis para que haja leucemia franca. A evolução rápida da LLA associada ao *LLM vs* a latência mais prolongada (i. e., idade de início mais adiantada) da LLA com *TEL-AML1* indica que tanto os efeitos biológicos da lesão genética primária (predisponente) quanto o momento e o tipo da(s) lesão(ões) causadora(s) são heterogêneos, embora, nos subtipos definidos de leucemia, agora seja possível elucidar melhor as vias moleculares que resultam na tumorigênese.

Contudo, nem todos os tipos de LLA pediátrica podem ser rastreados até a origem em um clone celular pré-natal. Os dados sanguíneos neonatais retrospectivos para o subgrupo de LLA com t(1;19)/E2A-PBX1 confirma o conceito de que a maioria desses pacientes desenvolve essa aberração genética no período pós-natal (Wiemels, 2002b).

A triagem prospectiva por RT-PCR e FISH em amostras sanguíneas de crianças recém-nascidas saudáveis revelou, subsequentemente, uma frequência de detecção de 1% da anormalidade *TEL-AML1* e de 0,2% para o transcrito da fusão *AML1-ETO*, acentuadamente maior do que a incidência de cada um desses subtipos de leucemia na infância (Mori, 2002). Esses dados demonstram que a ocorrência de pelo menos algumas fusões gênicas por translocação cromossômica são eventos comuns *in utero*; entretanto, a presença de tal anormalidade evidentemente não é suficiente para causar leucemia franca na grande maioria dos indivíduos. Embora as leucemias agudas do tipo de translocação se caracterizem cariotipicamente na maioria das circunstâncias por uma aparente "anomalia genética única", está ficando cada vez mais evidente que esses tumores também se encaixam na hipótese de "duas causas" de Knudson, proposta para os cânceres de tecido sólido (Knudson, 1992), conforme discutido em mais detalhes no Capítulo 75. De acordo com esse conceito, o evento de translocação desencadeante tem de ser estável o bastante em uma célula hematopoética progenitora de longa vida para conferir alguma vantagem em termos de sobrevivência ou proliferação; a aquisição de um ou mais eventos genotóxicos subsequentes em um indivíduo suscetível, então, levaria à transformação maligna completa.

O destino de tais células silenciosas "positivas para a translocação" é portanto um parâmetro importante, não apenas pelo entendimento da patogênese da doença, mas também em um contexto prático para a interpretação de ensaios diagnósticos moleculares no sentido de detectar doença residual mínima. Embora muita pesquisa continue voltada para a base molecular e a biologia celular das leucemias agudas da infância, os métodos epidemiológicos moleculares terão um papel cada vez maior na identificação da interação entre fatores ambientais e polimorfismos genéticos do hospedeiro que determinam a predisposição a essa doença em alguns indivíduos. A possibilidade de desenvolver estratégias para diminuir o risco de leucemia infantil *in utero* é, portanto, uma meta desses esforços.

Impacto contínuo da caracterização molecular dos tumores hematopoéticos: *FIP1L1-PDGFRA* e distúrbios de eosinofilia primária; mutação do gene *JAK2* e distúrbios mieloproliferativos crônicos

Como fica evidente a partir da descrição das mutações no gene *FLT3* na LMA, o paradigma de classificação da doença continua a mudar à medida que se expande o conhecimento sobre a biologia molecular da leucemia. Quanto a isso, a descoberta recente da anormalidade de fusão gênica *FIP1L1-PDGFRA* em um subconjunto significativo de casos de síndrome hipereosinofílica idiopática/leucemia eosinofílica crônica (HES/CEL) é particularmente esclarecedora (Cools, 2003). Essa anomalia genética também pode estar altamente associada a apresentações que se caracterizam por mastocitose sistêmica com eosinofilia (SMCD-eos), embora a distinção da HES/CEL clássica possa não ser claramente definida por critérios clínicos e patológicos, em muitos casos (Pardanani, 2004; Bain, 2004).

O gene quimérico *FIP1L1-PDGFRA* forma-se no cromossomo 4(q12). No nível molecular, esses genes ficam justapostos após uma deleção intersticial ou translocação do gene interveniente *CHIC2*. Embora a RT-PCR possa identificar um transcrito de fusão gênica em muitos casos, os métodos FISH visando à deleção de *CHIC2* são mais informativos no sentido de revelar o *FIP1L1-PDGFRA*. É notável o fato de que sua presença confere responsividade tumoral à terapia com mesilato de imatinibe (Gleevec), acrescentando uma nova opção terapêutica para esse distúrbio neoplásico raro e intratável (Gotlib, 2004). Em contraste, a mastocitose sistêmica, que pode mostrar sobreposição de aspectos fenotípicos com doença de *FIP1L1-PDGFRA*, caracteriza-se por uma mutação pontual no gene *cKIT* (D816V) e não responde à administração de imatinibe (Pardanani, 2003).

No início de 2005, quatro grupos de pesquisa descreveram, de forma independente, uma nova anormalidade isolada de mutação pontual no gene *JAK2* (*janus kinase* 2), ocorrendo nos distúrbios crônicos mieloproliferativos exclusivos da LMC, definidos classicamente (Baxter, 2005; Levine, 2005; James, 2005; Kralovics, 2005). Acredita-se que essa mutação, que induz uma substituição V617F de aminoácido (fenilalanina por valina), seja fundamental para a proliferação celular fisiopatológica nesses distúrbios por ativação constitutiva da *JAK2* tirosina quinase. É notável que cada grupo de pesquisadores tenha chegado a esse achado por meio de abordagens experimentais muito diferentes. Nas análises dessas e de outras séries, as mutações *JAK2* têm sido encontradas na maioria dos casos de policitemia vera, mas em proporções variáveis (p. ex., 1/3 a 1/2) de mielofibrose crônica idiopática (CIMF) e de trombocitose essencial (TE). A mutação também foi encontrada em um pequeno número de tumores mieloproliferativos/mielodisplásicos atípicos e em algumas mielodisplasias, mas está ausente nas leucemias linfoblásticas e nos tumores linfoides. É digno de nota o fato de que a maioria dos distúrbios mieloproliferativos com essa anormalidade mostra um padrão de mutação heterozigoto, embora uma minoria de casos (mais notavelmente na policitemia vera) tenha demonstrado mutações homozigotas nas células tumorais que surgem da duplicação do alelo *JAK2* com mutação.

Embora o significado clínico da mutação *JAK2* nessa categoria de doenças mieloides ainda não esteja completamente entendido, essa descoberta refina a classificação diagnóstica de uma grande porcentagem de tais neoplasias, antes definidas principalmente por critérios morfológicos. A presença de mutações do gene *JAK2* nos distúrbios mieloproliferativos crônicos pode ser detectada por uma variedade de métodos, inclusive a PCR específica do alelo, a PCR com análise da curva de derretimento, a hibridização com sonda fluorescente específica do alelo, digestão enzimática de restrição e sequenciamento direto. Os dois últimos métodos podem ter sensibilidade analítica limitada para detectar pequenas porcentagens de células *JAK2* mutante em determinado caso, embora geralmente o sequenciamento seja realizado para a confirmação diagnóstica molecular de amostras de pacientes identificados como positivos por outros métodos.

Essas associações de lesões genéticas precedentes, recentemente identificadas, são significativas em dois aspectos profundamente críticos: primeiro, as terapias farmacológicas e clinicopatológicas (como imatinibe ou outros inibidores de pequenas moléculas) têm efeitos de maior espectro contra classes particulares de proteínas oncogê-

nicas, oferecendo, assim, opções terapêuticas adicionais para certos pacientes; segundo, a elucidação contínua de anomalias genéticas como *FIP1L1-PDGFRA* e a mutação em *JAK2* irá reclassificar tumores hematológicos historicamente descritos como HES/CEL e as doenças mieloproliferativas crônicas de uma nova maneira, definida em termos moleculares. Como tais, esses avanços estão servindo para redimensionar nossos conceitos atuais sobre o esquema de classificação das doenças mieloproliferativas.

Diagnóstico molecular do linfoma não Hodgkin

Fundamento da análise genética molecular nos distúrbios linfoides

Os linfomas não Hodgkin e as leucemias linfoides crônicas são malignidades relativamente comuns em adultos e sua incidência está aumentando (Ries, 1994; Chiu, 2003; Liu, 2003). Um paradigma central para o diagnóstico de linfoma é a demonstração de clonalidade, que tem alta correlação com o estado maligno. Muitas vezes, a clonalidade pode ser sugerida ou estabelecida com a ajuda de estudos imunofenotípicos, ao demonstrar restrição de cadeia leve no caso de neoplasias de células B, ou expressão aberrante de antígeno no contexto de proliferações de células T. No entanto, há várias circunstâncias em que análises precedentes podem ser insuficientes e a determinação da clonalidade linfoide continua sendo uma questão fundamental. Em tais situações, que incluem amostras com aspectos fenotípicos não informativos, biópsias teciduais pequenas, amostras parcialmente degradadas e tecidos em parafina, a avaliação molecular do rearranjo do gene de receptor de antígeno clonal é extremamente valiosa. Os métodos padrões de detecção molecular de clonalidade também são empregados para chegar ao diagnóstico definitivo de neoplasias linfoides com aspectos potencialmente simuladores de hiperplasias benignas (p. ex., linfoma folicular ou linfoma de célula B da zona marginal extranodal), para determinar a linhagem celular em tumores hematopoéticos não diferenciados (i. e., de células B *versus* T) e para ajudar no diagnóstico de linfoproliferações atípicas de células T.

Junto com os aspectos tumorais característicos à microscopia óptica e o perfil fenotípico do marcador celular (p. ex., por citometria de fluxo e imunoperoxidase), a identificação de anormalidades genéticas tumorais recorrentes não aleatórias, mais comumente produzidas por eventos de translocação cromossômica, contribuiu para melhorar significativamente a precisão diagnóstica e a subclassificação dos linfomas não Hodgkin. Na verdade, os dados citogenéticos e genéticos moleculares desse tipo de distúrbio são agora parte integrante da classificação atual da OMS para os linfomas (Jaffe, 2001). As seções subsequentes detalham as abordagens moleculares para a determinação da clonalidade de células B e T, bem como a detecção e o significado de translocações recorrentes, comuns no linfoma.

Rearranjos genéticos do receptor de antígeno para determinação de clonalidade

Mecanismo dos rearranjos genéticos do receptor de antígeno

Os genes de receptores de antígeno são rearranjados no início do desenvolvimento dos linfócitos B e T na medula óssea e no timo, respectivamente. O processo de rearranjo do DNA, ou recombinação gênica, envolve essencialmente a quebra e a fusão de um dos numerosos segmentos gênicos variáveis (V) com a junção (J) de um éxon. Nos mesmos *loci*, notavelmente dos genes da cadeia pesada de imunoglobulina e receptor β de célula T, um segmento de diversidade (D) interpõe-se entre os segmentos V e J. A seguir, o segmento montado V–J ou V–D–J junta-se com a região constante (C) do gene de receptor de antígeno para produzir uma sequência codificadora intacta, capaz de traduzir uma proteína receptora funcional de antígeno (Fig. 71.5) (Macintyre, 1999; Bassing, 2002). Células imunes incapazes de produzir proteínas receptoras funcionais sofrem deleção por apoptose. No caso de células B imaturas, o gene da cadeia pesada de imunoglobulina no cromossomo 14(q32) é o primeiro a sofrer esse rearranjo segmentar, seguido, por sua vez, pelo gene κ da cadeia leve no cromossomo 2(p12). Se a última tentativa não for produtiva em ambos os alelos, o *locus* λ no 22(q11) é selecionado para gerar a molécula tetramérica final de imunoglobulina. No caso das células T, o receptor δ de célula T (Tδ) (14[q11]) e os *loci* γ (Tγ) (7[p15]) iniciam o processo no timo; todavia, muitos desses rearranjos gênicos falham no sentido de produzir uma apoproteína receptora heterodimérica funcional. Assim, o rearranjo continua quase simultaneamente nos *loci* receptores α e β da célula T (Tα e Tβ), localizados nos cromossomos 14(q11) e 7(q34), respectivamente, gerando um receptor Tαβ na grande maioria (85–90%) das células T. Como um ponto importante relacionado com a análise molecular (discutido adiante), quase todas as células Tαβ maduras ainda mantêm um rearranjo gênico no *locus* Tγ.

Há uma diversidade enorme entre os receptores de imunoglobulina e células T, derivada do potencial de recombinação genética entre numerosos segmentos V, (D) e J nesses *loci*. Além disso, a atividade da enzima

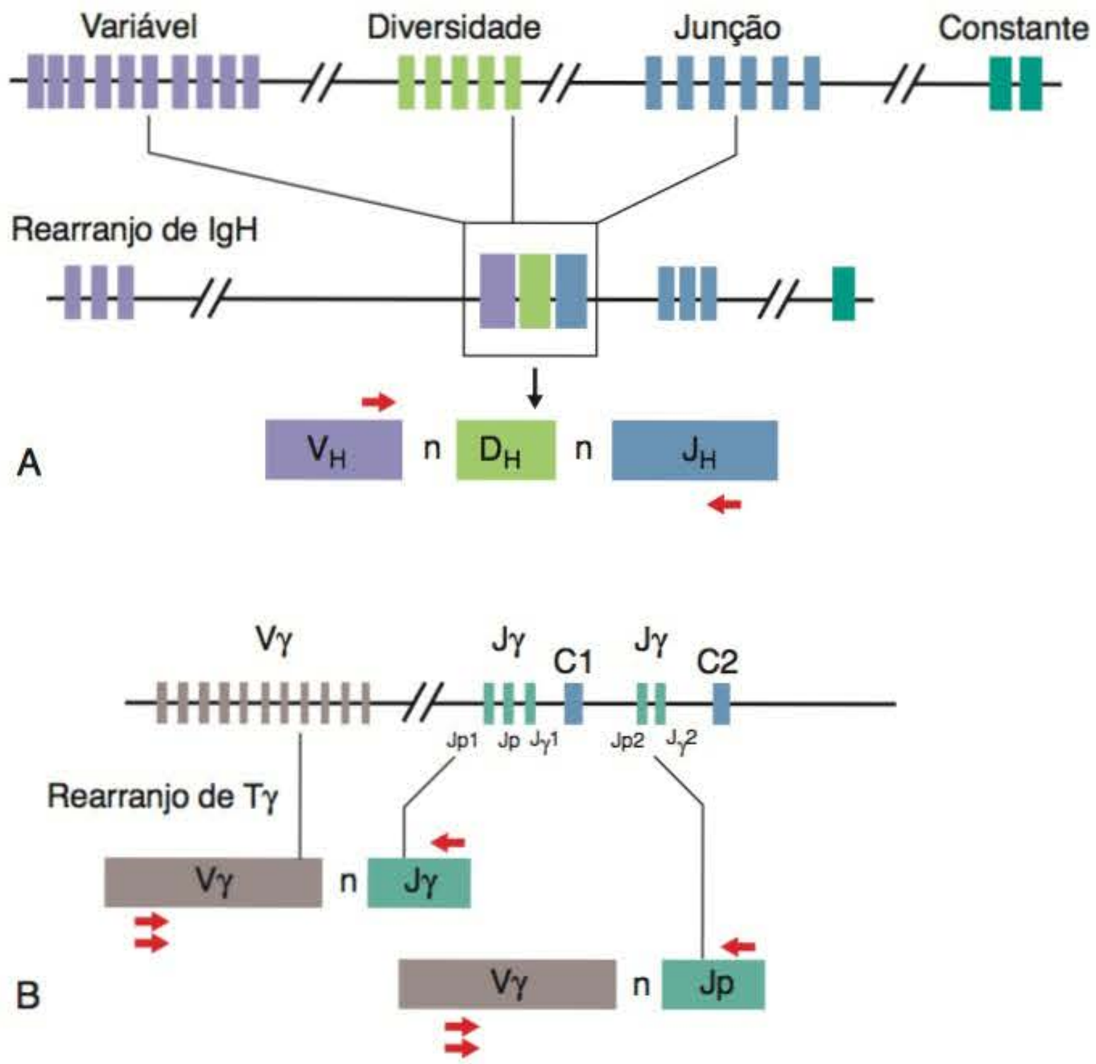


Figura 71.5 Rearranjo de segmento gênico somático de imunoglobulina e genes de receptores de célula T. A. O processo básico de rearranjo somático do *locus* da cadeia pesada de imunoglobulina (*IgH*) no cromossomo 14q32 que ocorre em células B em desenvolvimento. Seleção e rearranjo de diversidade IgH (D_H) e a junção de segmentos gênicos (J_H) que ocorre primeiro em uma grande região do DNA interveniente, seguidos pelo recrutamento de um éxon de uma região variável (V_H) para completar a codificação VDJ. É gerada diversidade substancial no nível do nucleotídeo, por causa da recombinação potencial de muitos segmentos V, D e J. Além disso, a atividade da enzima terminal desoxinucleotidil transferase (TdT), que insere um número aleatório de nucleotídeos "não moldados" (N) nas junções rearranjadas, aumenta essa diversidade. O segmento VDJ rearranjado une-se, então, com a região constante (C_H) para completar a unidade de cadeia pesada que codifica o gene. Ocorrem eventos de recombinação genética similares nos genes da cadeia leve de imunoglobulina (κ e λ) em sequência ao processamento do gene *IgH*. Se os rearranjos genéticos não produzirem uma proteína que seja uma imunoglobulina funcional em um alelo, o mecanismo prossegue no segundo alelo. O gene do receptor γ da célula T (*Tγ*) mostrado em B compartilha aspectos estruturais e de rearranjo similares com o gene *IgH*. O gene *Tγ* localizado no cromossomo 7p15 é menos complexo, tendo apenas 11 segmentos Vγ capazes de rearranjos funcionais e sem segmentos D, embora haja dois *loci* do segmento J (Jp e Jγ) e duas regiões constantes. A presença de homologia sequencial compartilhada entre muitos segmentos gênicos V nos genes *IgH* e *Tγ*, junto com a natureza altamente homóloga dos respectivos segmentos J nesses *loci*, permite a detecção da maioria dos rearranjos que ocorrem nos linfócitos B ou T pelos métodos da reação em cadeia da polimerase empregando iniciadores oligonucleotídicos de "consenso" flanqueadores. Esse conceito está indicado pelas setas alaranjadas e é mais bem detalhado na Figura 71.6.

terminal desoxinucleotidil transferase (TdT) acrescenta bases de ácidos nucleicos aleatórias não moldadas ("N") nas junções dos segmentos gênicos rearranjados e células B e T imaturas, aumentando, assim, a diversidade de sequência (Fig. 71.5). Como resultado de todo esse processo, linfócitos individuais B e T abrigam sequências de rearranjos gênicos específicos e expressam proteínas receptoras imunes únicas correspondentes de antígenos em suas superfícies celulares. Em uma expansão linfoide policlonal, em geral há uma distribuição altamente variável de rearranjos gênicos de receptores de antígenos, enquanto uma população monoclonal caracteriza-se por um único rearranjo gênico idêntico em cada célula. Tal conceito é explorado tanto na análise por hibridização por *Southern blot* (SBH) quanto na técnica da PCR, para distinguir proliferações policlonais ("benignas") das monoclonais ("malignas").

Técnicas para detectar rearranjos genéticos de receptores de antígeno

Hibridização por *Southern blot*

A técnica da SBH genômica pode ser considerada uma abordagem molecular relativamente em "larga escala", envolvendo a digestão de enzima endonuclease de restrição em uma amostra de DNA de alto peso molecular, seguida pela separação de fragmento, pela imobilização de uma membrana de náilon ou nitrocelulose e pela detecção com sonda marcada com radioisótopo específico (ou não radioisotópica) de um ou mais fragmentos de DNA-alvo relativamente grandes (Cossman, 1988; Beishuizen, 1993; Langerak, 1999; Macintyre, 1999; Medeiros, 1999; Arber, 2000). Na Figura 71.6, é mostrado um resumo esquemático e exemplo de SBH genômica conforme aplicada ao diagnóstico de linfoma. Resumindo brevemente, no caso de uma região estruturalmente inalterada (sem rearranjo) do DNA-alvo, a análise por SBH irá revelar um certo padrão de tamanhos ou bandas de fragmentos, estabelecendo configuração de "linhagem germinativa" com base na distribuição de sítios particulares de enzima de restrição, flanqueando ou dentro do *locus* em questão. Se essa região do DNA sofrer rearranjo, como no caso dos *loci* receptores de antígeno das células B e T, será produzido um padrão de bandeamento diferente (como resultado de desvios nas localizações dos sítios de enzima de restrição na linhagem germinativa) e essas alterações podem ser prontamente reconhecidas por hibridização com uma sonda específica. A sensibilidade da SBH é tal que pelo menos 5% de uma população de células precisa conter o mesmo rearranjo, não da linhagem germinativa, para serem detectadas (Tab. 71.2). Em uma população de linfócitos policlonais, células B ou T individuais carregam rearranjos únicos de seus genes codificadores de receptores de antígenos e, teoricamente, era de esperar que gerassem uma distribuição ampla ou "em escada" dos rearranjos quando analisados pela SBH com as sondas apropriadas. Entretanto, na prática, tal padrão de rearranjo não é visto em proliferações policlonais, pois mesmo grupos altamente selecionados e expandidos de células linfoides reativas não constituem tipicamente até 5% do total de células nessas situações. Em contraste, cada célula em uma população monoclonal contém um rearranjo do gene de receptor de antígeno idêntico e a SBH irá identificar bandas distintas rearranjadas (não da linhagem germinativa) (Fig. 71.6).

A aplicação bem-sucedida da técnica de SBH para detectar clonalidade linfoide depende de vários fatores. Primeiro, o *locus* interrogado precisa ser estruturalmente favorável para o estudo por digestão enzimática e hibridização com sonda. Certos *loci*, como o do gene *Tα*, são muito grandes e difíceis de avaliar adequadamente com alta sensibilidade usando-se um número prático de enzimas de restrição para digestão e sondas. Já o *locus Tγ*, como discutido adiante, é relativamente pequeno e tem diversidade limitada, resultando em baixa especificidade, o que em geral impede seu uso na SBH. Em segundo lugar, as sondas de hibridização precisam estar disponíveis para uso no laboratório clínico. As sondas podem ser produzidas a partir de DNA genômico clonado ou cDNA complementar da região de interesse, e são encontrados vários tipos no comércio. Por fim, o método de SBH requer o uso de DNA de alto peso molecular não degradado, obtido de fontes frescas ou tecido congelado. Como uma quantidade consistente de DNA é usada por digestão enzimática (p. ex., 5μg), a proporção relativa de células clonais em determinada amostra pode ser estimada pela análise por SBH.

Para a determinação de clonalidadae de células B pela SBH, têm sido usados tanto genes de cadeia pesada (IgH) de imunoglobulina quanto de cadeia leve. O gene *IgH* costuma ser avaliado com uma sonda da região J (Cossman, 1988; Beishuizen, 1993; Medeiros, 1999). A região J da IgH (J_H) é altamente informativa, pois esse *locus* é relativamente compacto, facilmente definido por digestão de enzima de restrição e sempre envolvido em eventos de recombinação nas células B (Fig. 71.6). Com o uso de uma sonda Jκ, o gene da cadeia leve κ também pode ser alvejado pela análise por SBH, embora uma minoria de casos de linfoma (principalmente aqueles com rearranjos na cadeia leve λ) possa ser perdida por causa de deleções específicas dos *loci* rearranjados abrangendo as regiões Cκ e algumas vezes Jκ (Medeiros, 1999; Cossman, 1998). Os rearranjos do gene λ de cadeia leve podem ser avaliados com uma sonda de região constante (Cλ), porém esse *locus* é altamente polimórfico e é mais difícil interpretar os resultados do uso de digestão por enzima de restrição e bandeamento (Saueracker, 1992).

O *locus* β da célula T (*Tβ*) provou ser mais útil para a detecção de clonalidade de célula T pela SBH, e essa região compartilha aspectos estruturais com o gene *IgH*. A complexidade do *locus Tβ* é notavelmente maior pela presença de duas regiões Dβ, Jβ e Cβ disponíveis em cada alelo para recombinação com um grande repertório de segmentos da região Vβ. No entanto, como duas regiões Cβ têm sequências praticamente idênticas, os rearranjos do gene *Tβ* podem ser identificados pela SBH usando-se uma sonda genômica comum Cβ e digestores de restrição apropriados do DNA-alvo (Langerak, 1999; Medeiros, 1999). O uso de sondas específicas da região Jβ também foi descrito para detectar clonalidade do *locus Tβ* e pode oferecer algumas vantagens em conjunto com sondas Cβ (Langerak, 1999). Em contraste, o *locus* Tγ em geral é menos favorável para a análise por SBH, por causa do número relativamente pequeno de rearranjo dos segmentos das regiões Vγ e Jγ. Essa capacidade limitada para recombinação segmentar cria um conjunto relativamente pequeno de rearranjos funcionais do gene Tγ. Portanto, em uma população de células T policlonais, a SBH com uma sonda da região Jγ pode potencialmente resolver várias bandas proeminentes, além dos fragmentos esperados da linhagem germinativa, em contraste com a análise por SBH no *locus Tβ*, em que os rearranjos dos subconjuntos de linfócitos reativos benignos individuais não aumentam acima do limiar de sensibilidade de detecção (Cossman, 1988; Medeiros, 1999). Essa situação leva à possibilidade de considerar erroneamente tais bandas "pseudoclonais" em processos reativos da célula T como rearranjos monoclonais verdadeiros ou, em contrapartida, pode obscurecer a identificação de um rearranjo monoclonal verdadeiro do gene *Tγ* na presença de células benignas coexistentes.

Reação em cadeia da polimerase

Os rearranjos dos genes de receptores de imunoglobulina e células T também podem ser identificados pelos métodos de PCR. Em contraste com a SBH, que detecta alterações genômicas estruturais relativamente grandes com base em alterações nos sítios da enzima de restrição, a PCR é designada por amplificar regiões curtas do DNA que abrangem a área imediata do segmento de fusão gênica nos genes de receptores de antígeno rearranjados. Nas condições padrões da PCR, uma configuração do gene do receptor de antígeno da linhagem germinativa é amplificada com baixa eficiência ou não é amplificada, por causa das áreas intervenientes muito grandes de DNA entre sítios iniciadores. Contudo, ao codificar os segmentos V, (D) e J justapostos em um gene rearranjado, a amplificação da região entre os iniciadores, agora estreitamente apostos, é prontamente conseguida pela PCR. Os dois *loci* mais amplamente usados para a determinação de clonalidade linfoide pela PCR são os genes *IgH* e *Tγ*.

A Figura 71.6 mostra uma representação esquemática da PCR direcionada no *locus IgH*. Foram descritas várias abordagens para a PCR do *IgH*. A técnica mais comumente aplicada envolve a amplificação através da terceira região determinante complementar (CDR III) do gene *IgH* rearranjado (Slack, 1993; Segal, 1994; Derksen, 1999; Medeiros, 1999; Macintyre, 1999). A CDR III abrange o sítio em que os éxons V, D e J unem-se no gene *IgH* rearranjado. A região do gene V_H compreende aproximadamente 100 segmentos discretos codificadores ou funcionais que podem ser agrupados em seis "famílias" com base nas similaridades de sequência. As regiões D_H e J_H contêm aproximadamente 15 a 20 e 6 segmentos gênicos, respectivamente.

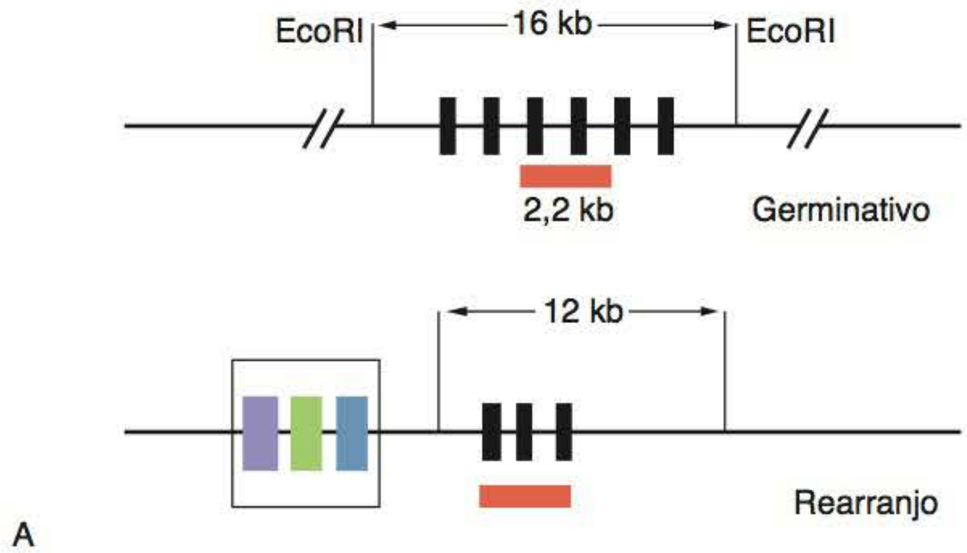


Figura 71.6 Hibridização por *Southern blot* (SBH) e reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de populações linfoides clonotípicas. A. Esquema da região do *locus* J do gene da cadeia pesada de imunoglobulina (*IgH*) no cromossomo 14q32. Os éxons J_H são mostrados como retângulos. A região intacta, ou região J_H de linhagem germinativa, é flanqueada por sítios da endonuclease de restrição EcoRI, que, na digestão do DNA, produz um fragmento de ≈16kb de tamanho. Esse grande fragmento de DNA pode ser detectado pela SBH, utilizando-se uma sonda clonada marcada com radioisótopo pela PCR (nesse caso, usa-se um fragmento genômico de 2,2 kb como sonda). Em contraste, quando a região J_H é alterada pelo processo de rearranjo gênico somático em uma célula B, é introduzida uma alteração nos sítios da enzima de restrição, de maneira que a digestão produz um fragmento de DNA de tamanho alterado em relação ao tamanho esperado da linhagem germinativa. Na ilustração, isso é mostrado como um novo fragmento J_H de 12 kb. Em uma população de células B monoclonais, todas as células B irão abrigar o mesmo rearranjo, e isso pode ser detectado pela técnica da SBH como uma nova banda rearranjada. Tipicamente, são realizadas duas ou três digestões enzimáticas com endonucleases "informativas" para confirmar a presença de um rearranjo de *locus*. A sensibilidade da SBH é tal que a população clonal deve representar pelo menos 5 a 10% do DNA total para ser detectada; os numerosos rearranjos do *IgH* nos processos de células B policlonais não aumentam acima desse limiar e, portanto, não apresentam uma série de tamanhos de banda alterados pela SBH. A mesma abordagem conceitual aplica-se à detecção de rearranjos no gene do receptor β da célula T (Tβ) nas populações dessas células, embora as considerações quanto ao projeto da sonda e à enzima de restrição sejam diferentes. B. Resultados típicos da SBH na detecção de rearranjos genéticos do *locus* IgH. As faixas "P" e "T" indicam amostras de DNA de placenta e tonsila digeridas com EcoRI e analisadas pela SBH, indicando a presença apenas de bandas (16 kb) da linhagem germinativa. A faixa "NHL" é uma amostra de linfoma de célula B mostrando bandas rearranjadas clonalmente, cujo tamanho difere nitidamente da configuração da linhagem germinativa. A presença de duas bandas na amostra NHL é indicativa de rearranjos bialélicos do *IgH*. C. Aspectos do *microlocus* de um gene *IgH* rearranjado, mostrando a região codificadora VDJ (ver detalhes na Fig. 71.5 e no texto). O segmento V_H codifica muito do componente variável da cadeia pesada de imunoglobulina. São identificadas três regiões estruturais (FR I-III), bem como duas regiões determinantes complementares (CDR I e II). A terceira e mais variável região da sequência nucleotídica é formada pela junção entre os segmentos V, D e J, com inserções de nucleotídeo não moldado (N) pela enzima TdT; essa região é denominada CDR III e representa uma sequência nucleotídica altamente singular em cada célula B. Devido à homologia de sequência compartilhada entre os segmentos V_H nas regiões estruturais e também entre os segmentos J_H, iniciadores de "consenso" da PCR podem ser projetados para amplificar os curtos estiramentos dos nucleotídeos que compreendem a CDR III. Mais comumente, isso é conseguido com iniciadores de consenso FR III e J_H, como ilustrado pelas respectivas setas alaranjadas. Outras abordagens de PCR incluem o uso de um iniciador de consenso FR II, ou uma família de iniciadores específicos de FR II (essas alternativas também estão indicadas por setas alaranjadas). Notar que, à medida que o iniciador FR é movido mais 5', o tamanho dos produtos da PCR gerados também aumenta. D, Resultados típicos da PCR para IgH usando iniciadores de consenso FR III e J_H. Em uma população de células B policlonais, há uma faixa de tamanhos de rearranjos VDJ, definidos pela natureza dos segmentos V, D e J usados e o número de nucleotídeos N inseridos. O fragmento desse tamanho é distribuído normalmente, como mostrado no painel do lado esquerdo. Em contraste, uma população de células B monoclonais caracteriza-se por um único rearranjo (ou duplo, se bialélico), conforme demonstrado no painel do lado direito. (Os dados da PCR foram gerados com um iniciador marcado por fluorescência e a análise foi realizada por eletroforese capilar; o eixo y representa a intensidade relativa da fluorescência dos produtos da PCR e o eixo x mostra o tamanho de um par de bases deduzido por *software* dos *amplicons* em relação aos marcadores de tamanho em vermelho). Abordagens técnicas e resultados semelhantes são obtidos com a PCR do gene do receptor de célula Tγ (Tγ) (não mostrado). A PCR com iniciador de consenso, embora rápida e extremamente útil para a detecção de clonalidade linfoide, peca por apresentar um índice de resultados falsos-negativos falsos devido a ocorrências ocasionais de homologia interna iniciador-molde ou hipermutação somática no sítio de ligação do iniciador. A última situação é encontrada principalmente nos linfomas de células B associados aos centros germinativos (p. ex., os tipos folicular e de células B grandes). A sensibilidade da PCR com iniciador de consenso (1–5%) é melhor do que a da SBH, mas pode ficar comprometida quando uma interferência de fundo produzida por linfócitos policlonais abundantes obscurece a população clonal.

A recombinação desses segmentos potenciais de éxons cria, assim, uma diversidade significativa de *IgH*, aumentada de forma substancial pelo acréscimo de nucleotídeos juncionais não modelados ("N") pela enzima TdT (Figs. 71.5 e 71.6). Enquanto a maioria das regiões determinantes de complementaridade 5' (CDR I e CDR II) também mostram uma variabilidade relativa de sequência entre células B, a CDR III é mais informativa a esse respeito, pois é produzida a partir da junção de diversos segmentos V, (D) e J, junto com a introdução aleatória de nucleotídeos N. Como resultado, a CDR III é única em qualquer célula B e pode ser usada como um marcador tipo "impressão digital" de clonalidade na neoplasia de célula B.

Embora a CDR III seja altamente variável entre os linfócitos B, os métodos de PCR que visam essa região são felizmente simplificados pelo uso de iniciadores de "consenso". A extremidade 3' da região V_H flanqueadora, conhecida como região estrutural (FR, do inglês *framework region*) III, exibe sequências de nucleotídeos altamente conservadas entre a maioria dos segmentos do gene V_H (Fig. 71.6). De forma similar, os éxons J_H contêm segmentos com uma sequência nucleotídica idêntica. Os iniciadores complementares da PCR de FR III e J_H podem ser designados assim que flanqueiam e, portanto, podem amplificar a CDR III no DNA da maioria das células B. A identificação de rearranjos amplificados é conseguida por eletroforese em gel (p. ex., agarose ou poliacrilamida) ou, mais comumente, por eletroforese capilar após amplificação por PCR com iniciadores fluorescentes (Beaubier, 2000; Greiner, 2002). Em uma proliferação policlonal de células B, é possível esperar muitas centenas ou milhares de rearranjos

individuais da CDR III. Como nenhuma dessas subpopulações reativas de células B está tipicamente presente acima do limiar de sensibilidade da análise padrão por PCR (nominalmente 1 a 2%), um esfregaço ou padrão em escada de banda múltipla pálida é visualizado pela eletroforese em gel ou como uma série de picos distribuídos normalmente por eletroforese capilar (Fig. 71.6). Em um processo monoclonal de célula B, todas as células abrigam um rearranjo CDR III idêntico, preferencialmente amplificado durante a PCR, produzindo uma banda clonal distinta ou perfil de pico durante a análise pós-PCR. Ocasionalmente, pode estar presente uma segunda banda amplificada ou pico, indicativos de rearranjos bialélicos de IgH.

O *locus Tγ*, embora não seja muito adequado para a SBH, tem sido utilizado com sucesso para a determinação de clonalidade de células T pela PCR (Slack, 1993; Beaubier, 2000; Greiner, 2002; Lawnicki, 2003). O rearranjo do gene *Tγ* ocorre no início do desenvolvimento tímico dos linfócitos T e esse evento genético é mantido, mesmo que a maioria das células T em desenvolvimento continue a rearranjar os *loci Tα* e *Tβ* e, por fim, desenvolva um fenótipo receptor Tαβ. Portanto, o *locus Tγ* proporciona um marcador global para avaliar a clonalidade ante a suspeita de neoplasia de células T. O *locus Tγ* abrange 11 segmentos codificadores da região Vγ, agrupados em quatro famílias com base nas similaridades de sequência. Cinco segmentos da região Jγ estão presentes, incluindo os éxons altamente conservados Jγ1 e Jγ2, bem como os éxons Jp, Jp1 e Jp2 (Fig. 71.5) (Greiner, 2002). A PCR do *Tγ* também confia na natureza única dos rearranjos juncionais em linfócitos T individuais; a técnica é muito informativa, apesar da diversidade segmentar limitada desse *locus*, com alguns problemas em mente (discutidos na seção seguinte). Podem ser usados iniciadores de consenso complementares para sequências de homologia compartilhadas nos segmentos Vγ e Jγ da célula T, de modo a simplificar o procedimento da PCR. De forma análoga ao caso da PCR para *IgH*, os produtos da amplificação de células T policlonais tendem a formar um padrão de esfregaço ou em formato de sino à eletroforese de produtos da PCR, enquanto a monoclonalidade é evidente como uma ou duas bandas ou um ou dois picos discretos.

Vantagens e desvantagens da hibridização por Southern blot *e reação em cadeia da polimerase para avaliação de clonalidade linfoide*

A decisão de usar a PCR ou a SBH requer o conhecimento de vários fatores, como a fonte tecidual, o tipo de distúrbio mieloproliferativo investigado, a sensibilidade dos respectivos ensaios e as taxas de resultados falsos, tanto positivos quanto negativos. As vantagens e desvantagens das respectivas técnicas estão resumidas na Tabela 71.5. Em geral, a PCR obteve mais popularidade para a determinação de clonalidade, principalmente por sua rapidez e pela relativa facilidade de realização. O método de SBH, em contraste, é muito trabalhoso, mais caro e leva cerca de uma a duas semanas para ser completado. Além disso, a SBH costuma ser feita com sondas com marcação radioativa. Outras desvantagens da SBH incluem a necessidade de tecido fresco ou congelado de boa qualidade (para DNA de alto peso molecular) e uma sensibilidade relativamente baixa, na faixa de 5 a 10%. A PCR é vantajosa porque fica pronta em questão de dias, é mais barata e requer menor quantidade de DNA iniciador (i. e., 0,5–1 μg) do que a SBH. A PCR tem uma sensibilidade nominal de 1 a 2%, embora um fundo policlonal proeminente de células B ou T possa piorar significativamente esse nível e reduzir a capacidade da técnica em detectar uma população monoclonal coexistente de linfócitos. A sensibilidade da PCR para o receptor de antígeno pode melhorar 0,1 a 0,01% em aplicações especialmente modificadas e otimizadas, como a detecção de linfoma ou leucemia residuais. Além disso, a PCR pode ser realizada com amostras de tecido fresco ou fixado em parafina, embora certos fixadores (p. ex., B5) ou substâncias de uso comum no processamento de linfonodos ou medula óssea possam inibir a PCR.

Embora os métodos de PCR sejam mais "simplistas" em termos comparativos, a técnica é muito sensível a alterações "micromoleculares" nas regiões alvejadas por iniciadores oligonucleotídicos. Assim, o uso de iniciadores de consenso não irá amplificar rearranjos incomuns de *IgH* ou *Tγ* envolvendo segmentos gênicos sem os sítios conservados complementares para essas sequências iniciadoras. Talvez seja mais significativo o fato de que mutações de base nucleotídica ou deleções no molde do DNA possam impedir a ligação eficiente das sequências iniciadores complementares, o que acarreta falha da PCR. Tais situações são mais comuns em certos tumores linfoides de células B que tenham sofrido hipermutações de nucleotídeos somáticos das regiões CDR e adjacentes. Os exemplos incluem linfomas foliculares, alguns linfomas grandes e difusos de células B e linfomas com diferenciação plasmacitoide, em que a detecção de clonalidade pode variar de apenas 35 a 60% quando se usa a PCR padrão para a CDR III do *IgH* (Segal, 1995; Lombardo, 1996; Derksen, 1999). Em contraste, a taxa de detecção de clonalidade em tumores pequenos de linfócitos B, com associação presumível a um "centro pré-germinativo" (p. ex., linfoma linfocítico pequeno, linfoma de células de revestimento) é de quase 100%. Ocasionalmente, as LLAs e linfomas de células B podem ter apenas um rearranjo clonal D–J, ou sofrer deleções e substituições na região gênica V_H, o que também impede o sucesso da PCR padrão para CDR III em uma minoria de casos (Beishuizen, 1994; Height, 1996; Szczepanski, 2002).

Há problemas diferentes para a avaliação da clonalidade de Tγ. Apesar da natureza juncional única de cada rearranjo do segmento V–J de *Tγ* em células individuais, a diversidade mais limitada de éxons nesse *locus* pode resultar em *amplicons* da PCR com tamanho muito semelhante e até mesmo características de sequência. Às vezes, isso pode criar dificuldade para se detectar uma população de células T monoclonais quando há células T policlonais ao fundo, pois sequências amplificadas de natureza similar, porém não homóloga, podem criar "heterodúplexes" com os *amplicons*-alvo durante a eletroforese em gel, mascarando, assim, a capacidade de detectar a população monoclonal. Já uma população limitada ou imprópria reativa de células T pode demonstrar um padrão altamente selecionado de segmento

Tabela 71.5 Hibridização por *Southern blot vs.* método da reação em cadeia da polimerase para análise da clonalidade linfoide

	Vantagens	Desvantagens
Southern blot	Essencialmente nenhum resultado falso-negativo Pode detectar a natureza de rearranjos incomuns (p. ex., D–J parcial) Pode detectar a presença de padrões oligoclonais de rearranjo gênico	Oneroso, trabalhoso, tecnicamente difícil Demorado (requer 1–2 semanas) Uso de sondas marcadas com radionuclídeos Requer DNA de alto peso molecular Requer grande quantidade de DNA (5 μg por digestão enzimática) Sensibilidade analítica limitada (pode detectar 5–10% de uma população monoclonal em células de fundo)
Reação em cadeia da polimerase	Rápida (24–48 h), de baixo custo, tecnicamente fácil Uso de DNA de muitas fontes, incluindo tecidos em parafina Requer um mínimo de DNA (≈0,5–1 μg por reação) Sensível (nominalmente 1–5%, podendo aumentar) Pode combinar diferentes estratégias de PCR para aumentar a taxa de detecção de clonalidade	Risco de resultados falsos-positivos (contaminação) Risco de resultados falsos-negativos (a taxa de detecção não chega a 100%) Não pode detectar rearranjos incomuns (parciais) (a menos que sejam usados conjuntos de iniciadores especiais) Pode perder populações oligoclonais A sensibilidade analítica pode ser afetada adversamente por um fundo proeminente de linfócitos policlonais, quando se usam iniciadores de consenso

gênico *Tγ* para uso, produzindo um resultado de amplificação "pseudoclonal" que lembra uma população clonotípica de células T. (As últimas complicações são, em geral, menos comuns com a PCR para *IgH*, pelo maior grau de recombinação potencial proporcionado pelo rearranjo mais numeroso dos segmentos V, D e J, e um fragmento de *amplicon* de tamanho correspondente mais estendido.)

Por causa dessas desvantagens da PCR, a SBH ainda pode ser necessária para resolver a difícil questão da clonalidade em uma proliferação linfoide. Como a SBH avalia a estrutura de regiões genômicas maiores, não tende a apresentar as dificuldades encontradas com a PCR. A SBH é considerada o "padrão-ouro" para determinação da clonalidade nesse contexto diagnóstico e, felizmente, como a PCR é um método muito rápido, é possível fazer a análise subsequente por SBH se os resultados da PCR forem inconclusivos. Contudo, a exigência de quantidades adequadas de DNA de tecido fresco ou congelado nem sempre pode ser satisfeita e, assim, tal limitação com relação à amostra tem restringido os aprimoramentos técnicos na PCR e na análise após a mesma. Por exemplo, têm sido usados conjuntos alternativos de iniciadores para superar a falha na amplificação devida a alterações nas regiões CDR III ou FR III encontradas com certa frequência no *locus IgH* ao se fazer a PCR. Um iniciador estrutural de consenso em contracorrente da região II (FR II) ou certo número de iniciadores V_H "específicos da família" FR I podem ser combinados com o iniciador de consenso J_H (Fig. 71.6) (Deane, 1991; Ramasamy, 1992; Aubin, 1995; Derksen, 1999). Similarmente, rearranjos nos genes da cadeia leve de imunoglobulina podem ser analisados pelos métodos de PCR (Gong, 1999; Diss, 2002; Pai, 2005). Tais manobras servem para aumentar o sucesso da detecção de clonalidade de aproximadamente 65% (com apenas a PCR padrão da região CDR III do *IgH*) para quase 90%, embora à custa de um pouco mais de trabalho e complexidade.

O uso de conjuntos de iniciadores abrangentes na PCR tem sido enfatizado para maximizar a detecção de clonalidade no *locus Tγ* (Lawnicki, 2003). Alterações na análise com gel também podem afetar significativamente a resolução e, portanto, a detecção de produtos clonais pela PCR. O uso da eletroforese em gel de poliacrilamida, em geral, é mais informativo que a análise em gel de agarose, e modificações na composição do gel podem ter efeitos importantes. No caso da PCR para *Tγ*, a resolução de populações monoclonais verdadeiras pode aumentar de forma substancial pelo tratamento prévio com "heterodúplexes" dos produtos da PCR, antes da eletroforese em gel (não desnaturante); nesse procedimento, bandas monolonais homodúplexes em migração rápida podem ser distinguidas com clareza dos heterodúplexes de movimento lento no gel, permitindo a separação de *amplicons* potencialmente similares com base no tamanho e nas características da sequência (Bottaro, 1994; Chhanabhai, 1997; Langerak, 1997). O advento da instrumentação para eletroforese capilar de alta resolução e a melhor padronização dos critérios de interpretação associados representam outros aprimoramentos na avaliação dos produtos da PCR para populações clonais linfoides (Lee, 2000; Lawnicki, 2003). A eletroforese capilar, em contraste com as abordagens em gel consideradas como o padrão, identifica os produtos da PCR desnaturados de fita única marcados com substâncias fluorescentes, de acordo com o comprimento exato do *amplicon* (Fig. 71.6).

Por último, como nota de rodapé, a demonstração de translocações cromossômicas recorrentes em subconjuntos de linfomas não Hodgkin pela técnica da PCR fornece ainda outro marcador, se o rearranjo gênico inicial do receptor de antígeno não for informativo pela PCR, aspecto discutido na próxima seção.

Em suma, a PCR e a SBH são técnicas fundamentais e complementares para a determinação de clonalidade nos distúrbios linfoides de células B e T. Em geral, os métodos de PCR são considerados a "linha de frente", com a SBH sendo reservada para os casos com material adequado e em que um resultado negativo à PCR é considerado inconsistente com outros achados clínicos e patológicos. Nesse contexto, é importante não esquecer os conceitos de "taxa de detecção" e "sensibilidade" relacionados à PCR. A taxa de detecção de *IgH* ou *Tγ* pela PCR depende de inúmeros fatores já descritos, como o subtipo de doença linfoproliferativa, a metodologia da PCR (conjuntos de iniciador único *vs.* abrangentes) e o tipo de análise pós-PCR empregado. A PCR não detecta rearranjos clonais em todos os casos de tumores linfoides malignos. Portanto, o conhecimento da taxa global de detecção de certa abordagem por PCR (i. e., a frequência esperada de resultados falso-negativos) ou aprimoramentos para melhorar tal abordagem, são valiosos para a interpretação dos resultados. Um exemplo é a detecção de linfoma folicular, tipicamente associado a uma taxa de detecção de 40 a 60% de *IgH* clonal quando se usa apenas o método da PCR da CDR III de *IgH* (Segal, 1995; Derksen, 1999). Combinando-se a PCR de *IgH* com um ensaio de PCR para identificar rearranjos do gene *BCL2*, podem ser detectados até 80 a 85% dos casos (Segal, 1995). É possível conseguir melhoras similares introduzindo-se iniciadores adicionais de *IgH* ou alvejando *loci* do gene de cadeia leve.

Já a capacidade de determinado ensaio por PCR resolver quantidades diminutas de um alvo molecular, ou sua sensibilidade analítica, em geral é explorada em circunstâncias especializadas, como a monitoração de doença residual mínima (i. e., linfoma ou leucemia) durante ou após um esquema de tratamento. A sensibilidade, em geral, é medida de maneira dilucional e otimizada por sequenciamento da única região juncional de um gene clonal receptor de antígeno rearranjado e designando iniciadores tumorais "específicos de alelos" ou sondas para uso na monitoração subsequente de amostras após a terapia de determinado paciente. Apesar disso, para o diagnóstico clínico molecular rotineiro, a sensibilidade nominal de um ensaio PCR diagnóstico usando iniciadores de consenso (não otimizados) deve ser determinada em cada laboratório e os fatores que influenciam adversamente o nível básico de sensibilidade (p. ex., aumento de fundo de células linfoides policlonais) devem ser claramente entendidos. Como os ensaios moleculares diagnósticos baseados na PCR diagnóstica são capazes de alcançar altos níveis de sensibilidade, é importante ter o máximo de cuidado para minimizar e eliminar a possibilidade de contaminação da amostra no laboratório. Mesmo uma quantidade diminuta de material estranho contaminando o molde pode converter um resultado policlonal verdadeiro da PCR em uma interpretação falso-positiva de monoclonalidade, com consequências clínicas igualmente sérias.

Detecção molecular e significado das translocações cromossômicas comuns associadas ao linfoma

A identificação de translocações cromossômicas recorrentes, associadas a certas neoplasias, contribuiu de forma substancial para nosso entendimento cada vez maior da biologia do linfoma não Hodgkin (Tab. 71.6) (Vega, 2003). A identificação dessas anormalidades genéticas não é útil apenas para o diagnóstico (estabelecimento de clonalidade e classificação do linfoma), mas fornece informação prognóstica ou revela um marcador tumoral específico para a detecção de doença residual. Em geral, as translocações cromossômicas nos linfomas não Hodgkin resultam na fusão de dois *loci* genéticos, envolvendo mais comumente o *locus* de *IgH* no cromossomo 14(q32), nas neoplasias de células B. Como consequência, um proto-oncogene, em geral altamente regulado, torna-se ativado em termos constitutivos, levando à hiperexpressão acentuada de uma proteína oncogenética. Em outros casos, como por exemplo a t(2;5), no grande linfoma anaplásico de células T, uma fusão gênica quimérica é produzida e expressa-se como um híbrido de mRNA e proteína. Qualquer que seja o caso, acredita-se que a interferência no crescimento normal das células linfoides, em sua homeostasia ou morte, tenha um papel central na linfomagênese. Acredita-se que os eventos de translocação associados ao linfoma estejam ligados, em muitos tumores, a consequências aberrantes dos sistemas ativos da enzima recombinase (RAG), de reparo da quebra do DNA durante o rearranjo do gene de receptor de antígeno normal.

Os mecanismos exatos dessas translocações nas leucemias e nos linfomas ainda não estão completamente entendidos, mas pode ser que envolvam a proximidade espacial não aleatória de genes durante o ciclo celular, sítios frágeis como intermediários de fita única do DNA propensos à quebra e à recombinação, e outros (Neves, 1999; Roix, 2003; Raghavan, 2004). Conforme mencionado, é notável que muitas das translocações cromossômicas conhecidas, associadas a malignidades hematolinfoides, sejam detectáveis em baixos níveis nas células hematopoéticas ou linfoides de indivíduos sadios, indicando que esses eventos são relativamente comuns, porém, provavelmente insuficientes para causar doença franca, sem promover outras lesões

Tabela 71.6 Translocações comuns associadas a linfoma e fusões gênicas resultantes

Anormalidade genética	Doenças associadas	Patogênese molecular básica	Detecção*
t(14;18)/*BCL2-IgH*	Linfoma folicular (90%) Linfoma difuso de células B grandes (20–30%)	Hiperexpressão da proteína antiapoptótica Bcl-2	FISH > PCR
t(11;14)/*BCL1–IgH*	Linfoma de células de revestimento (≈100%)	Hiperexpressão da proteína ciclina D1 da fase G1 do ciclo celular	FISH >> PCR
t(8;14)/translocações c-*myc-IgH* e c-myc variante	Leucemia/linfoma de Burkitt (100%)	Hiperexpressão de resposta inicial potente ao fator de transcrição mitogênico c-Myc	FISH
t(11;18)/*API2–MALT1* t(14;18)/*MALT1-IgH*	Linfomas da zona marginal extranodal (≈20–30%)	Suprarregulação da via de transdução do sinal NF-κB	FISH; RT-PCR (para atividade mRNA de *API2–MALT1*)
t(2;5)/translocações *NPM–ALK* e *ALK* variante	Linfoma de células T grandes anaplásicas (≈80–90%)	Ativação constitutiva e localização anormal de translocações variantes de ALk tirosina quinase	FISH (todas as variantes); RT-PCR (para mRNA de *NPM–ALK*)

* A detecção por técnicas moleculares está indicada; também é possível estabelecer o diagnóstico específico de alguns tumores detectando-se hiperexpressão da proteína específica (p. ex., ciclina D1 no linfoma de células de revestimento, Alk no linfoma de células T grandes anaplásicas).

genéticas. Embora a maioria das translocações associadas à leucemia seja detectada pela presença de sua espécie de fusão do mRNA, muitas das anormalidades de fusão gênica nos linfomas podem ser detectadas pela PCR a partir do DNA genômico, pelo alto grau de aglomeração no sítio de quebra dentro dos genes rearranjados e regiões genômicas intervenientes relativamente curtas. Os últimos aspectos permitem o uso de sequências de iniciadores de consenso, flanqueando o sítio da fusão gênica para detecção dessas translocações associadas a linfomas, em ensaios de PCR padronizados.

Apesar disso, a taxa de detecção global de translocações específicas do linfoma pela técnica da PCR é, em geral, limitada pela heterogeneidade do ponto de quebra. Por isso, análises adicionais, como a FISH ou a imuno-histoquímica, desempenham papéis vitais no diagnóstico específico e na subclassificação dos linfomas não Hodgkin.

Linfomas foliculares e difusos de células B grandes e a anormalidade t(14;18)/BCL2-IgH

A anormalidade t(14;18) é a translocação mais comum encontrada nos linfomas da linhagem B. No nível molecular, essa translocação resulta na justaposição do gene *BCL2* com a região J do *locus* de cadeia pesada da imunoglobulina (J_H) (Bakhshi, 1985; Cleary, 1985; Tsujimoto, 1985; Weiss, 1987). Em consequência, acredita-se que o gene *BCL2* é mantido sob o controle do elemento acentuador altamente ativo da IgH, levando à hiperexpressão acentuada da proteína BCL2. O produto gênico do *BCL2* é uma molécula antiapoptótica que serve como protótipo e é capaz de eliminar o processo normal de morte celular programada, protegendo, assim, as células contra uma variedade de eventos genéticos ou citotóxicos letais (Hockenberry, 1990; Yang, 1996; Adams, 1998). Os rearranjos do gene *BCL2* estão presentes em 85 a 90% dos linfomas foliculares, aproximadamente 25% dos linfomas difusos de células B grandes (LDCBGs) e, raramente, em outros distúrbios linfoproliferativos (Weiss, 1987; Horsman, 1995). A estrutura genômica parcial do *locus* do gene *BCL2* está ilustrada na Figura 71.7. A maior proporção (60–65%) de sítios de quebra e fusão no gene *BCL2* ocorre em uma área bem aglomerada de aproximadamente 150 pares de bases (bps) no segmento 3' não codificador do éxon 3, conhecido como a região de quebra principal (MBR, *main breakpoint region*) (Cleary, 1985). Um número menor de pontos de quebra (15–20%) ocorre corrente abaixo em uma segunda área, denominada região de aglomeração menor (mcr) (Cleary, 1986; Ngan, 1989). Raramente, uma região 5' do *BCL2*, descrita como "região do *cluster* variante" (VCR), está rearranjada nas leucemias linfocíticas crônicas; tipicamente, o *locus* VCR está envolvido em translocações com os genes de cadeia leve da imunoglobulina (Adachi, 1990; Dyer, 1994).

Os rearranjos do gene *BCL2* podem ser detectados pela técnica da SBH, usando sondas de MBR clonada e do *locus* mcr do DNA, embora esta seja uma abordagem trabalhosa (Horsman, 1995). A FISH provou ser altamente efetiva na identificação genética molecular da t(14;18) (Poetsch, 1996; Vega, 2003). No entanto, como resultado da aglomeração relativamente apertada dos pontos de quebra gênicos nos *loci* MBR (em menor extensão) e mcr, os métodos rápidos de PCR também podem ser empregados para detectar a maioria das fusões do *BCL2-IgH* (Ladanyi, 1992; Liu, 1993; Horsman, 1995; Aster, 2002; Hsi, 2002; Iqbal, 2004). Na maioria das situações, a região interveniente do DNA genômico entre iniciadores opostos é curta o suficiente para permitir a amplificação bem-sucedida. Essa estratégia é conseguida usando-se os iniciadores oligonucleotídicos MBR e mcr, colocados

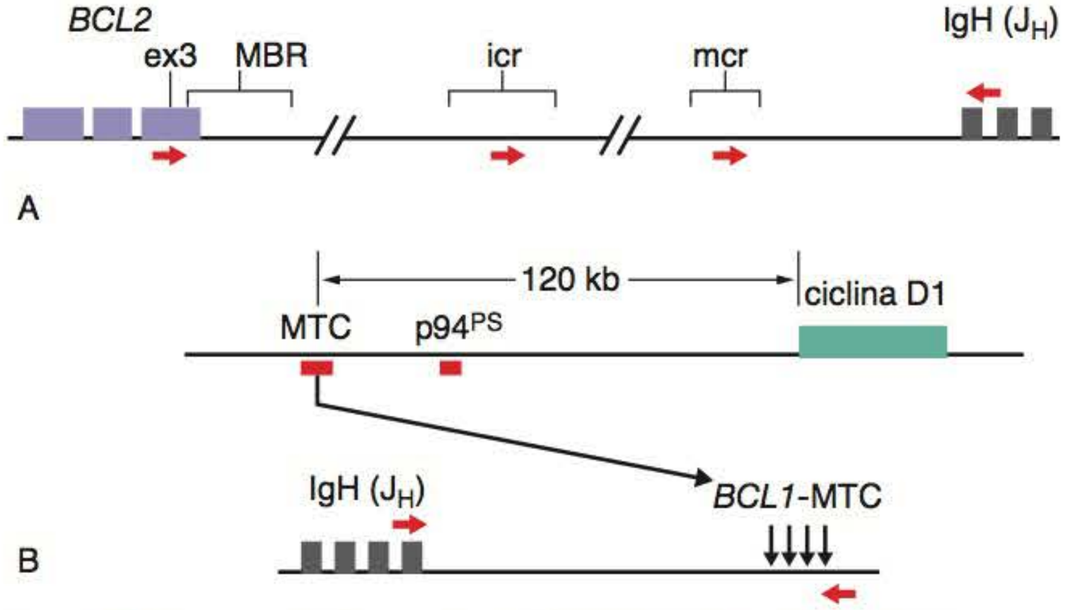


Figura 71.7 As anormalidades genéticas t(14;18)/*BCL2-IgH* e t(11;14)/*BCL1–IgH* no linfoma não Hodgkin. A. Consequências da anormalidade t(14;18) nos linfomas foliculares e difusos de células B grandes. A maioria dos pontos de quebra genômicos fica aglomerada de forma relativamente apertada no aspecto 3' do éxon 3 não codificador do gene *BCL2*, em uma região denominada região de quebra principal (MBR). Foram descritos dois *clusters* adicionais de ponto de quebra no *BCL2*: a região do *cluster* menor (mcr) e a região do *cluster* intermediário (icr). Para o gene *IgH*, ocorrem pontos de quebra dentro da região do segmento J_H. Devido à natureza aglomerada dos pontos de quebra e às distâncias intervenientes relativamente curtas entre *BCL2* e J_H na configuração rearranjada, iniciadores de consenso de reação em cadeia da polimerase (PCR) para *BCL2* e J_H (setas alaranjadas) podem ser usados para detectar a maioria das fusões gênicas *BCL2-IgH* originárias da t(14;18). Notar que ocorre uma variante de t(14;18) estreitamente relacionada nos linfomas de células B da zona marginal extranodal, resultando em uma fusão gênica *MALT1-IgH*. Embora idênticas em termos de cariótipo, são necessárias técnicas moleculares (p. ex., PCR ou hibridização *in situ* por fluorescência [FISH]) para distinguir essa entidade da anomalia *BCL2-IgH*. B. O resultado da translocação t(11;14) no linfoma de células de revestimento, causando um rearranjo genético entre o *locus* do *BCL1* em 11q13 e na região J do *IgH*. Conforme mostrado, o *locus* do *BCL1* está situado em 5', à distância do gene da ciclina D1 (nomenclatura *CCND1*) que, não obstante, é o alvo da desregulação pelo intensificador do gene *IgH*. A maioria (50%) dos pontos de quebra do *BCL1* ocorre na região do *cluster* de translocação maior (MTC), localizada aproximadamente 120 kb de *CCND1*. Foram ilustradas duas sondas genômicas (MTC e $p94^{PS}$) que podem identificar 50 a 60% dos rearranjos do *locus* do *BCL1* pela técnica do *Southern blot*; contudo, essa abordagem molecular hoje é raramente usada. Devido à aglomeração apertada na MTC (setas pretas pequenas, verticais), pode-se empregar a PCR com iniciadores de consenso para *BCL1-MTC* e J_H (setas alaranjadas), embora essa abordagem detecte apenas cerca de 40 a 50% de todos os rearranjos *BCL1-IgH* (e até uma fração menor, quando se usa tecidos em parafina como fonte). Devido ao maior grau de heterogeneidade dos pontos de quebra no *locus* do *BCL1*, a técnica FISH é um método altamente atraente para detectar a presença da t(11;14).

corrente acima das regiões aglomeradas de pontos de quebra, em combinação com um iniciador de consenso J_H (Fig. 71.7). Em termos gerais, uma técnica padrão de PCR como essa pode identificar aproximadamente 2/3 de todas as fusões gênicas *BCL2-IgH* que surgem da t(14;18) no linfoma não Hodgkin (Horsman, 1995). Em contraste com a SBH, a PCR pode ser realizada a partir de material tecidual fixo, arquivado, embora o DNA extraído de fontes embebidas em parafina possa estar comprometido em consequência de ligação cruzada e degradação. Como resultado, as taxas de detecção de *BCL2-IgH* para fusões, tanto do *locus* MBR quanto do mcr são, em geral, menores em amostras de tecido com parafina do que em amostras frescas ou congeladas. A aplicação da técnica da PCR do DNA de "longa distância" (LD-PCR), para identificar e caracterizar melhor a anatomia molecular das fusões *BCL2-IgH*, também foi recentemente descrita usando DNA de alto peso molecular (Akasaka, 1998a; Albinger-Hegyi, 2002). A análise de produtos da LD-PCR revelou sítios de quebra estendidos em toda a região 3' para o MBR e 5' para o mcr, responsáveis em grande parte pelo restante das fusões de *BCL2-IgH* não identificadas pelas técnicas padrões de PCR. A evidência de um terceiro sítio de *cluster*, a região do *cluster* intermediário (icr), emergiu de algumas dessas investigações (Fig. 71.7) (Albinger-Hegyi, 2002).

A identificação dos rearranjos do gene *BCL2* nas proliferações linfoides neoplásicas é muito útil em vários contextos clínicos, incluindo diagnóstico e subclassificação da doença. Como previamente mencionado, é comum não serem detectados os rearranjos gênicos clonais de imunoglobulina pelas técnicas da PCR padrão para *IgH*, em muitos linfomas foliculares e em um subconjunto de linfomas difusos de células B grandes (Segal, 1995; Derksen, 1999). Contudo, a anormalidade *BCL2-IgH* pode ser frequentemente determinada pela PCR nesses casos, oferecendo um marcador clonal alternativo para distinguir o linfoma folicular de uma hiperplasia folicular atípica ou florida, mas benigna, por exemplo. Além disso, a análise da fusão *BCL2-IgH* por PCR pode ser usada para diferenciar tipos de baixo grau de linfoma não Hodgkin com padrões morfológicos potencialmente superpostos, como linfoma folicular *vs.* linfomas de células de revestimento ou tipo zona marginal extranodal (LZMEN). Tal distinção pode ser bastante crítica no contexto do LZMEN, conforme descrito adiante, na seção sobre anormalidades do gene *MALT1*. Uma desvantagem do diagnóstico molecular que não pode ser esquecida diz respeito à menor proporção de linfomas foliculares do que a ausência de t(14;18). Em geral, muitos desses linfomas foliculares negativos para *BCL2-IgH* são de alto grau (p. ex., OMS 2/3 ou 3/3) e costumam caracterizar-se por anomalias genéticas alternativas, como rearranjos do gene *BCL6*.

Como indicado, a presença de rearranjos do gene *BCL2* nos linfomas foliculares quase sempre tem correlação com a hiperexpressão da proteína BCL2. Em contrapartida, é importante notar que muitos linfomas de célula B e leucemias estão associados à expressão desregulada da proteína BCL2 na ausência de alterações estruturais do gene *BCL2*, presumivelmente via mecanismos genéticos diferentes ou possivelmente epigenéticos. A esse respeito, a demonstração da expressão da proteína BCL2 em um tipo de linfoma não folicular de célula B não denota a presença de um rearranjo no gene *BCL2*. Entre os DLBCLs, a presença da t(14;18)/*BCL2-IgH* foi associada a um fenótipo de "centro germinativo". Embora cada vez mais evidências confirmem o conceito de que o DLBCL do tipo centro germinativo tem um desfecho clínico relativamente favorável, o valor prognóstico da própria t(14;18) no DLBCL continua controvertido (Gascoyne, 1997; Barrans, 2003).

Linfoma de células de revestimento e a anormalidade t(11;14)/BCL1-IgH

A presença da t(11;14) é constante no linfoma de células de revestimento (LCR), embora seja descrita ocasionalmente em casos de leucemia pró-linfocítica, linfoma esplênico da zona marginal (antes conhecido como linfoma esplênico com "linfócitos vilosos", LELV ou SLVL, *splenic lymphoma with villous lymphocytes*) e leucemia linfocítica crônica (LLC). No entanto, a reavaliação crítica do espectro clínico e patológico do LCR levou à conclusão de que muitos, senão quase todos esses outros tumores de células B positivos para a t(11;14) são de fato apresentações atípicas do LCR. A t(11;14) põe o *locus BCL1* na proximidade da região J_H do gene *IgH*. O gene da ciclina D1, ou *CCND1*, está localizado a uma grande distância telomérica da maioria dos sítios de quebra mas, apesar disso, é o alvo da desregulação transcricional pelo gene *IgH* nas fusões *BCL1-IgH*. A ciclina D1 é uma proteína inicial da fase celular G1, normalmente necessária para a atividade das quinases dependentes de ciclina (cdk)4 e 6; esses complexos holoenzimáticos promovem a progressão através da transição da fase G1 para a S do ciclo celular nas células em proliferação, principalmente mediante a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Sherr, 1999). Assim, acredita-se que a hiperexpressão oncogênica da ciclina tipo D1 desempenha um papel importante na patogênese do LCR. A estreita correlação entre anormalidades da ciclina D1 e o LCR foi habilmente demonstrada tanto pela análise do mRNA como da proteína (Rimokh, 1993; Bosch, 1994; Oka, 1994; Yang, 1994; Alkan, 1995; de Boer, 1995, 1997; Zukerberg, 1995; Soslow, 1997; Vasef, 1997). Em termos de diagnóstico molecular, a detecção de rearranjos no *locus* do gene *BCL1* implica hiperexpressão da *CCND1* (ciclina D1) e é diagnóstica de LCR.

A identificação da t(11;14) ou de rearranjos no gene *BCL1* no LCR é variável, dependendo da metodologia empregada, e varia de menos de 50 a 100%. O *locus* do *BCL1* abrange uma grande região na banda do cromossomo 11(q13). Aproximadamente metade dos pontos de quebra do *BCL1* ocorre em uma área bem definida, conhecida como a região do *cluster* de translocação maior (MTC, *major translocation cluster region*) (Williams, 1991, 1993a; Chibbar, 1998), localizada a cerca de 120 quilobases (kb) centroméricas do gene *CCND1* (Fig. 71.7). Outros pontos de quebra foram definidos pela SBH e são mais distais à MTC ou estão localizados na região 5' imediata do gene da ciclina D1 (Williams, 1991, 1993b). O método da SBH usando uma única sonda na região MTC, detecta quase todos os rearranjos do *BCL1* nos sítios de quebra da MTC, responsáveis por 50% do total de casos (Williams, 1993a). Com o uso de múltiplas sondas genômicas, também é possível identificar um número adicional de pontos de quebra não relacionados com a MTC, o que aumenta a taxa de detecção da SBH para 70% (Williams, 1991). Entretanto, essa complexidade técnica, bem como a ausência de sondas genômicas comumente disponíveis para múltiplas regiões do *BCL1*, torna a SBH impraticável com fins diagnósticos rotineiros. A técnica da PCR tem sido usada com sucesso para identificar um subconjunto de fusões *BCL1-IgH*, que ocorrem na região bastante aglomerada MTC, sendo responsável por uma taxa de detecção global de rearranjo no *BCL1* de aproximadamente 40% (Fig. 71.7) (Pinyol, 1996; Chibbar, 1998).

Portanto, é evidente que a grande e amplamente distribuída região de ponto de quebra que abrange o *locus* do *BCL1* apresenta dificuldades substanciais para essas abordagens diagnósticas moleculares. Por isso surgiram os ensaios FISH como métodos de escolha para resolver as fusões t(11;14)/*BCL1-IgH* no LCR (Coignet, 1996; Remstein, 2000b; Belaud-Rotureau, 2002). Sondas FISH, disponíveis no comércio, detectam a t(11;14) em grandes regiões genômicas dos *loci* tanto do *BCL1* quanto do *IgH*; portanto, em um laboratório experiente, essa técnica detecta praticamente 100% dos rearranjos do *BCL1* no LCR. Alguns pesquisadores também descreveram o uso da avaliação por RT-PCR "em tempo real" dos níveis de mRNA da ciclina D1 para ajudar no diagnóstico do LCR (Elenitoba-Johnson, 2002; Thomazy, 2002; Jones, 2004). Por fim, a hiperexpressão da apoproteína ciclina D1 pode ser detectada com facilidade pela técnica imuno-histoquímica, outro método complementar rápido e de ampla aplicação no diagnóstico do LCR (Yang, 1994; Alkan, 1995; de Boer, 1995; Zukerberg, 1995; Soslow, 1997; Vasef, 1997; Belaud-Rotureau, 2002). É preciso notar que casos raros recentes de LCR clássico em termos morfológicos e fenotípicos não têm a t(11;14) nem a hiperexpressão da ciclina D1, mas foram associados à desregulação de outras ciclinas do tipo D1 (Rosenwald, 2003).

Em termos clínicos, o LCR é um linfoma agressivo de células B, apesar de ter a morfologia de um linfoma pequeno, "indolente", de linfócitos B (Argatoff, 1997; Samaha, 1998; Weisenburger, 1999; Campo, 1999). Ante a distribuição anatômica superposta e os aspectos morfológicos em comum com vários linfomas de células B de baixo grau, sem dúvida é indispensável distinguir o LCR para fins de diagnóstico e tratamento. Embora os mecanismos moleculares de transformação pela ciclina D1, desregulada, ainda não tenham sido completamente elucidados, a aplicação da tecnologia microestrutural da expressão gênica tem proporcionado uma nova visão da patogênese desse tipo de linfoma não Hodgkin (Rosenwald, 2003).

Linfomas de células B da zona marginal extranodal e anormalidades do gene MALT1

Os linfomas de células B da zona marginal, também conhecidos como linfomas de tecido linfoide associados à mucosa ("MALTomas"), são tumores incomuns e especiais. Além do crescimento neoplásico em muitos tecidos extranodais diversos (estômago, pulmão, glândula salivar, tireoide etc.), em geral esses tumores caracterizam-se pela presença de condições inflamatórias predisponentes e um componente linfoide reativo precedente ou coexistente. O LZMEN gástrico é o protótipo desses linfomas e um grande número de tumores gástricos está relacionado com a presença de infecção pelo *Helicobacter pylori*, que parece desempenhar um papel fundamental na patogênese inicial da doença (Zucca, 2000; Isaacson, 2004).

Embora uma proporção desses linfomas, em todos os sítios, possa ter um cariótipo normal ou alterações cromossômicas numéricas correspondentes (p. ex., trissomias do 3 ou do 18), foram identificadas recentemente anormalidades específicas de translocação entre subconjuntos de LZMEN, e a biopatologia das últimas lesões agora é melhor entendida. A anormalidade t(11;18)/*API2-MALT1* foi a primeira a ser descrita e caracteriza-se pela fusão de um gene inibidor da apoptose (*API2* ou *IAP2*) com um gene que codifica uma proteína semelhante à paracaspase (Dierlamm, 1999; Rosenwald, 1999; Baens, 2000; Motegi, 2000; Remstein, 2000a; Yonezumi, 2001; Ye, 2003a, 2003b). Tumores positivos para *API2-MALT1* têm predileção por sítios gástricos e pulmonares, ocorrendo com pouca frequência em outros sítios. Um segundo evento de translocação que ocorre no LZMEN caracteriza-se pela fusão gênica *MALT1-IgH* (Murga Penas, 2003; Sanchez-Izquierdo, 2003; Streubel, 2003, 2004; Remstein, 2004; Ye, 2005). O *MALT1* está situado ligeiramente centromérico ao *locus* do *BCL2* no cromossomo 18q e, por isso, essas duas fusões gênicas associadas à t(14;18) são indistinguíveis pela citogenética padrão, sendo necessárias análises moleculares específicas (p. ex., FISH) para diferenciação. É intrigante o fato de que os linfomas positivos para *MALT1-IgH* distribuem-se em sítios orbitários, parotídeos, pulmonares e cutâneos, sendo raramente encontrados no estômago. Uma terceira translocação rara, descrita principalmente no LZMEN gástrico, é a anomalia t(1;14)/*BCL10-IgH* (Wotherspoon, 1990; Willis, 1999).

Apesar da aparente complexidade dos genótipos de translocação e distribuição tecidual, uma patogênese fundamental liga esses eventos no desenvolvimento do LZMEN. Mediante a hiperexpressão das proteínas MALT1 ou BCL10, ou pela expressão de MALT1 quimérica anormalmente ativa (i. e., do rearranjo *API2-MALT1*), a ativação constitutiva da via de transdução do sinal NF-κ é induzida, causando efeitos profundamente alterados sobre o crescimento celular, a imunidade e a regulação da apoptose (Isaacson, 2004).

A detecção desses eventos de translocação, em geral, é conseguida com mais facilidade pelas técnicas FISH. A análise por RT-PCR do transcrito *API2-MALT1* foi descrita e representa um método alternativo para avaliar a t(11;18); todavia, devido à heterogeneidade substancial do ponto de quebra em ambos os genes, é preciso empregar iniciadores abrangentes (e RNA suficiente) para a detecção pela PCR. Observa-se a hiperexpressão nuclear da proteína BCL10 de maneira mais consistente e categórica com a anormalidade t(1;14), embora também seja observada na maioria dos tumores positivos para t(11;18) (Ye, 2000; Liu, 2001a; Maes, 2002). Ainda que haja uma tendência à interpretação subjetiva, foi sugerido que padrões aberrantes de positividade para o *BCL10*, conforme determinados por imuno-histoquímica, podem ser usados para indicar a presença de tais eventos de translocação no LZMEN e da informação diagnóstica adicional para se diferenciar uma lesão maligna de uma proliferação linfoide benigna (Liu, 2001a; Ye, 2005). O significado clínico de reconhecer esses subconjuntos de LZMEN é exemplificado pela observação de que linfomas gástricos positivos para *API2-MALT1* não respondem à erradicação do *H. pylori* com antibióticos de amplo espectro, uma opção terapêutica em geral bem-sucedida para indicar regressão tumoral em um subconjunto de LZMEN gástrico negativo para a translocação (Liu, 2001b, 2002). Além disso, ao se elucidar a patogênese molecular desses subtipos genéticos relacionados de LZMEN, é possível desenvolver terapias farmacológicas direcionadas.

Para completar a discussão sobre o LZMEN em particular, o uso da PCR para *IgH* na avaliação da doença residual mínima, após a terapia, merece consideração. O significado de detectar células B clonais pela PCR em biópsias, após o tratamento de pacientes com LZMEN gástrico, tem sido controvertido, com alguns relatos sugerindo persistência prolongada de monoclonalidade após a erradicação histológica do linfoma, enquanto outros paradoxalmente mostraram a presença de populações clonotípicas de células B em proliferações linfoides gástricas benignas (Bertoni, 2002; Wundisch, 2003). Embora muitos desses estudos tenham empregado técnicas de PCR com sensibilidades diferentes, parece que a queda na detecção de células B clonotípicas pela PCR em geral vai além da normalização histológica do tecido gástrico em pacientes tratados com sucesso. Esses achados sugerem cautela na interpretação das investigações moleculares de clonalidade e na correlação com os achados morfológicos nesse contexto clínico.

Linfomas difusos de células B grandes e anormalidades do gene BCL6

Há relativamente pouco tempo, foram caracterizadas aberrações citogenéticas do cromossomo 3(q27) e do gene *BCL6* em um subconjunto de linfomas não Hodgkin de células B. Em contraste com outras translocações associadas ao linfoma, as fusões do gene *BCL6* podem envolver um grande número de genes participantes, muitos deles sem qualquer relação com os genes de receptores de antígeno (Ohno, 1997, 2004; Ohshima, 1997; Chen, 1998). Inúmeros casos vão demonstrar a clássica anormalidade t(3;14)(q27;q32), juntando o gene *BCL6* ao *locus* IgH, enquanto outros podem envolver os genes da cadeia leve de imunoglobulina. A aparente "promiscuidade" das translocações do gene *BCL6* levou ao conceito de substituição do promotor heterólogo como um mecanismo para a desregulação do *BCL6* e a resultante superprodução da proteína BCL6 (Chen, 1998). Todavia, a expressão do *BCL6* está presente em linfócitos normais do centro germinativo, demonstrando-se que, no gene *BCL6* de modelos murinos *knockout*, esse produto gênico é vital para a formação da reação normal no centro germinativo e para as respostas de anticorpo dependentes da célula T (Dent, 1997; Ye, 1997). Além disso, o *BCL6* parece necessário para o controle das respostas inflamatórias induzidas pela citocina do tipo Th2, pela expressão normalmente infrarregulada de uma classe de moléculas transdutoras de sinal, as proteínas STAT (Dent, 1997; Ye, 1997). O papel de repressão transcricional do *BCL6* é mediado via recrutamento de fatores correpressores (Polo, 2004). Recentemente mostrou-se que o *BCL6* infrarregula a proteína tumoral p53, sugerindo que o *BCL6* possa funcionar para proteger as células B do centro germinativo contra a sinalização apoptótica que surge da quebra fisiológica da fita dupla do DNA durante o processo de mutação somática (Phan, 2004). É importante lembrar que o *BCL6* não se expressa em células B normais ("nativas") do centro pré-germinativo e é rapidamente infrarregulado nas células B que saem do ambiente do centro germinativo. Assim, a presença da expressão da proteína BCL6 é observada na maioria dos linfomas de células B grandes, nos linfomas foliculares e no linfoma de Burkitt, tumores presumivelmente originários de centros germinativos relacionados, mas não em outros subtipos de linfomas (Cattoretti, 1995; Onizuka, 1995; Pittaluga, 1996; Falini, 1997).

Não surpreende que rearranjos aberrantes do gene *BCL6* também sejam encontrados predominantemente em linfomas associados ao centro germinativo, principalmente os tipos difusos de células B grandes (30–40%) ou foliculares (10–15%) (Otsuki, 1995; Ohno, 1997, 2004; Ohshima, 1997; Chen, 1998). Além disso, uma proporção mensurável desses linfomas demonstra hipermutações somáticas da região 5' reguladora (não codificadora) do *BCL6*, que podem estar ou não associadas a anormalidades gênicas estruturais detectáveis (Migliazza, 1995). O significado das alterações funcionais no *BCL6*, na ausência de rearranjo nesse gene, não está ainda completamente entendido, pois uma proporção de células normais do centro germinativo e B de memória (com alelos do *BCL6* intactos) também exibe esse achado. Por sua vez, os últimos achados sugerem que as mutações do *BCL6* ocorrem em muitos linfócitos reativos durante o processo de ativação do centro germinativo normal, em conjunto com o processo fisiológico de mutação do gene somático de imunoglobulina (Shen, 1998). Há alguma evidência de que pelo menos um subconjunto de mutações do *BCL6* na região 5' nos linfomas de células B está distribuído de maneira diferencial com relação às mutações nas células B normais,

implicando que, apesar de um mecanismo molecular comum para a indução dessas mutações, as regiões alvejadas resultam em efeitos biológicos diferentes (Pasqualucci, 2003).

Não obstante, a hiperexpressão da proteína BCL6 parece estar integralmente relacionada com a patogênese dos linfomas difusos de células B grandes, situação que pode ser induzida pela translocação do *BCL6*, ou por outros mecanismos sem rearranjo do gene em si (Allman, 1996). Além disso, as alterações no gene *BCL6* podem estar relacionadas com a patogênese de subtipos distintos de linfoma folicular, em particular aqueles que se caracterizam por alto grau citológico (p. ex., tumores de grau "3B") e ausência da t(14;18)/*BCL2-IgH* (Katzenberger, 2004). Também foram descritas anormalidades do gene *BCL6* entre linfomas de células B grandes após transplante e em alguns dos linfomas agressivos que surgem no contexto de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)/síndrome da imunodeficiência humana (AIDS). Embora os mecanismos moleculares exatos que predispõem ao desenvolvimento de um linfoma de células B grandes ainda precisem ser definidos, é evidente que a desregulação do *BCL6* "imortaliza" essas células linfoides em um estado de centro germinativo, criando, assim, um ambiente que conduz a desarranjos genéticos linfomagênicos.

A detecção de rearranjos do gene *BCL6* originários de translocações pode ser conseguida por vários métodos. A análise por SBH tem sido utilizada, pois a maioria desses casos exibe aglomerados de pontos de quebra perto da região 5', a primeira que não codifica o éxon e o íntron 1 do gene *BCL6* (Offitt, 1994). Aplicações mais recentes incluem a PCR de longa distância do DNA especificamente para a anormalidade t(3;14) e a técnica de FISH (Akasaka, 1996; Ueda, 1997; Sanchez-Izquierdo, 2001). No entanto, o significado clínico das anormalidades genéticas do *BCL6* no linfoma continua entendido de maneira incompleta e controverso até o momento. Alguns estudos implicaram um prognóstico adverso para os linfomas de células B grandes com rearranjos no gene *BCL6*, talvez pertinente a tumores sem translocações no gene da imunoglobulina (Akasaka, 2000; Barrans, 2002), enquanto outros pesquisadores mostraram achados opostos ou nenhum efeito prognóstico convincente (Jerkeman, 2002). Como a proteína BCL6 expressa-se em um grande número de linfomas de células B grandes, a presença desse marcador em si não foi associada de forma independente ao desfecho da doença. Apesar disso, o significado clínico da expressão do *BCL6* nos linfomas difusos de células B grandes está emergindo em combinação com outros marcadores genéticos e proteicos que definem um fenótipo de "centro germinativo". Os últimos estudos, realizados por análises microestruturais da expressão gênica ou por métodos quantitativos corroborativos de PCR e imuno-histoquímicos, estabeleceram uma relação entre essa expressão gênica que funciona como uma "assinatura" e a sobrevida favorável do paciente (assunto discutido adiante, na seção sobre o perfil da expressão gênica). A esse respeito, a determinação do estado de expressão gênica nos linfomas de células B grandes, em conjunto com outros marcadores importantes de centros germinativos, parece agora ter valor prognóstico, enquanto a patogênese molecular das alterações no gene *BCL6* nessas malignidades continua a ser estudada.

Linfoma/leucemia de Burkitt e anormalidades do gene c-myc

A alteração genética no *locus* do gene *c-myc* é classicamente associada ao linfoma/leucemia de Burkitt, porém, este gene também está implicado na patogênese de outros tumores linfoides, inclusive as transformações de alto grau (secundárias) de linfomas indolentes, linfomas associados a HIV/AIDS e distúrbios linfoproliferativos agressivos ocasionais pós-transplante. Mais comumente, o gene *c-myc* é translocado para o *locus* do IgH em decorrência da anormalidade t(8;14). Em outras circunstâncias, o *c-myc* pode ser trazido para perto dos genes de cadeia leve Igκ (2[p12]) ou Igλ (22[q11]). Em cada caso, o *c-myc* fica sob forte influência transcricional do elemento acentuador de imunoglobulina, o que leva à sua hiperexpressão. Em geral, o gene *c-myc* é altamente regulado na resposta nuclear "inicial" a sinais citoplasmáticos indutores do crescimento. O produto do gene *c-myc* forma um complexo ligado ao DNA com uma proteína, a Max, para iniciar a transcrição subsequente de vários genes necessários para a entrada no ciclo e a proliferação celulares (Blackwood, 1991). A Max, por sua vez, é regulada pela dimerização com outras proteínas, como a Mad, e esses complexos alternados agem reprimindo a atividade transcricional (Ayer, 1993; 1995; Zervos, 1993). Como resultado da translocação do *c-myc* no linfoma, a superprodução de c-Myc leva a um aumento dos dímeros c-Myc/Max e transativação potente de múltiplos genes-alvo cognatos, o que, por fim, resulta em proliferação celular descontrolada (Amati, 1993; Hecht, 2000). Como um corolário, a doença de Burkitt está entre as neoplasias humanas de crescimento mais rápido e mais agressivo.

A anatomia molecular dos pontos de quebra da região *c-myc* foi bem estudada no linfoma de Burkitt com a t(8;14) (Neri, 1988; Hecht, 2000; Blum, 2004). No chamado linfoma de Burkitt endêmico, ocorrem pontos de quebra no *c-myc* bem acima do gene, envolvendo primariamente o *locus* J_H de *IgH* no 14(q32). Em contraste, os linfomas de Burkitt do tipo esporádico demonstram quebras do *c-myc* mais perto da região 5' do gene e tipicamente estão associados à fusão com o isotipo da região da imunoglobulina. Tais dados indicam que os eventos de translocação envolvendo o *c-myc* nessas variantes do linfoma de Burkitt ocorrem em estágios ligeiramente diferentes de maturação em uma célula B em desenvolvimento. Entetanto, clinicamente, essas diferenças parecem ser insignificantes. É possível detectar rearranjos do *locus* do *c-myc* ou a presença da t(8;14) por SBH, FISH ou PCR do DNA de longa distância (Akasaka, 1998b; Siebert, 1998). A detecção das translocações do *c-myc* pela PCR padrão não é possível por causa da heterogeneidade dos pontos de quebra no *c-myc* e dos longos espaços intervenientes do DNA; assim, a FISH ou a análise do cariótipo atualmente continuam sendo as melhores opções para identificar essas anormalidades. Na prática, em geral pode-se suspeitar do diagnóstico de linfoma/leucemia de Burkitt com alto grau de probabilidade usando-se uma combinação de estudos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos (Braziel, 2001).

Linfoma de células T anaplásicas grandes e alterações do gene ALK

O linfoma de células anaplásicas grandes (LCAG) é um subtipo único de linfoma não Hodgkin de células T periféricas que pode estar presente como uma doença cutânea primária ou, mais comumente, como uma forma sistêmica que envolve linfonodos, órgãos viscerais e a pele. Uma característica fenotípica em quase todos os casos de LCAG é a forte expressão do antígeno CD30 (Ki-1), um marcador da ativação e membro da família do fator de necrose tumoral (Smith, 1993). Embora os tumores clássicos de LCAG sejam conhecidos por terem uma linhagem de células T, alguns exemplos não expressam marcadores associados à linhagem de células T (tipo celular "nulo"), mas esses casos em geral podem ser confirmados como sendo de origem nas células T, com base em estudos da clonalidade do gene de receptor de célula T. O LCAG de células T caracteriza-se por translocações envolvendo o gene da quinase do linfoma anaplásico (*ALK*), localizado no cromossomo 2(p23). O gene *ALK* codifica uma nova tirosina quinase que normalmente não se expressa em células linfoides (Morris, 1997). A anormalidade t(2;5) é a translocação mais comumente encontrada no LCAG e resulta na junção do gene *ALK* ao gene *NPM* no cromossomo 5(q35) (Kaneko, 1989; Rimokh, 1989; Mason, 1990; Stein, 2000). Acredita-se que o produto normal do gene *NPM*, a nucleofosmina, uma fosfoproteína nucleolar que se expressa com onipresença, seja importante na montagem do ribossomo. Como resultado da fusão antigênica *NPM-ALK*, a atividade de tirosina quinase do *ALK* fica desregulada, contribuindo para a linfomagênese pelo aumento da fosforilação da proteína-alvo e da tradução do sinal (Falini, 2001). A sublocalização celular dessa atividade de quinase da fusão é mediada anormalmente pela porção NPM. Ao contrário das consequências mais típicas da hiperexpressão gênica da maioria das translocações associadas ao linfoma, a fusão *NPM-ALK* difere pela produção de um mRNA e uma proteína quiméricos, embora a superprodução do gene *ALK*, normalmente silencioso em um linfócito T, pareça ser o mecanismo principal envolvido na transformação maligna. Além de *NPM-ALK*, também são descritos rearranjos genéticos variantes menos comuns nesse linfoma, incluindo as anormalidades t(1;2), t(2;3) e inv(2), todas causando desregulação do gene *ALK* (Stein, 2000; Delsol, 2001).

Os pontos de quebra genômicos em casos de LCAG positivos para t(2;5) ficam consistentemente nas mesmas regiões intrônicas dos

genes *NPM* e *ALK*, resultando na geração de um único mRNA quimérico. Como resultado, a técnica de RT-PCR pode ser empregada para detectar o transcrito da fusão com especificidade e sensibilidade altas (Ladanyi, 1994; Downing, 1995; Elmberger, 1995; Weiss, 1995; Wellmann, 1995; Lamant, 1996; Yee, 1996). Além disso, a PCR de longa distância também tem sido empregada com sucesso para identificar a anormalidade genômica *NPM-ALK* (Ladanyi, 1996; Sarris, 1998). A última abordagem requer DNA de alto peso molecular, mas deixa óbvia a necessidade de isolamento do RNA e transcrição reversa. A metodologia FISH é uma alternativa atraente com relação a outras técnicas moleculares no contexto de um possível LCAG, pois os rearranjos do *locus* desse gene podem ser alvejados, qualquer que seja o outro gene participante envolvido. Como a citogenética clássica é tecnicamente trabalhosa e feita com pouca frequência em biópsias de tecidos, esses métodos moleculares serviram para simplificar e aumentar a taxa de detecção dessa lesão genética. Por fim, como outros fenômenos de hiperexpressão gênica específicos nos linfomas não Hodgkin, o LCAG pode ser diagnosticado com facilidade pelos anticorpos monoclonais direcionados para a proteína ALK; a localização imuno-histoquímica da ALK é um adjunto diagnóstico importante e também se correlaciona até certo ponto com o tipo de evento de translocação que resulta na hiperexpressão do *ALK* (Falini, 1999a; Stein, 2000).

Em termos clínicos, a identificação de positividade para ALK em um linfoma que se suspeita ser um LCAG é muito importante, pois esse subconjunto de neoplasias de células T tem um prognóstico muito melhor do que os linfomas de células T negativos para ALK com morfologia anaplásica, ou os linfomas periféricos de células T em geral (Falini, 1999b; Gascoyne, 1999). Os primeiros relatos sugerem que casos raros de linfoma de Hodgkin poderiam ser positivos para ALK, mas o consenso atual é de que tais casos provavelmente representem LCAGs verdadeiros, com aspectos morfológicos sobrepostos. Tais ocorrências servem para ressaltar as dificuldades em subclassificar os linfomas da chamada "zona cinzenta" na interface entre doença de Hodgkin e linfoma não Hodgkin. A demonstração de evidência molecular ou imunohistoquímica de desregulação do gene *ALK* representa, assim, um avanço significativo no diagnóstico acurado do LCAG e em sua distinção do linfoma de Hodgkin. De uma perspectiva diagnóstica, é importante lembrar que o LCAG pode apresentar-se com aspectos morfológicos variáveis ou, em casos esporádicos, não ter positividade uniforme para CD30, sendo necessário um limiar apropriado de suspeita para buscar a presença de anormalidades no gene *ALK*. Embora tenha havido alguma controvérsia quanto à presença de proteínas de fusão do ALK no LCAG cutâneo primário, a preponderância dos dados confirma a hipótese de que a positividade para *ALK*, em uma aparente lesão cutânea primária, indica com maior probabilidade a presença de doença sistêmica que requer exame clínico e radiológico abrangente. Por fim, vários relatos recentes documentaram a presença de t(2;17)/*CLTC-ALK* ou fusões *NPM-ALK* em ocorrências muito raras de linfoma difuso de células B grandes com aspectos plasmablásticos (de Paepe, 2003; Gascoyne, 2003). Os últimos tumores não estão associados ao prognóstico favorável dos LCAGs de células T, mas servem para ressaltar o papel da alteração da função gênica do *ALK* em outros linfomas.

Monitoramento molecular de doença residual

Fundamentos e alertas na análise da doença residual mínima

Tradicionalmente, e até o momento, a avaliação de doença hematolinfoide residual, após o início da terapia, é feita pela análise morfológica em nível microscópico de doença inferior a 5% na medula óssea. O advento de técnicas moleculares biológicas sensíveis, capazes de detectar marcadores tumorais específicos, trouxe novas oportunidades para quantificar e monitorar com maior precisão a carga de doença tumoral após o início da terapia. Embora se possa demonstrar doença residual mínima (DRM) em vários níveis, usando uma variedade de técnicas genéticas, a aplicabilidade da citogenética ou mesmo da FISH padrão é relativamente limitada para detecção altamente sensível. Ainda que os últimos métodos possam ser empregados para confirmar o estado de remissão com níveis de doença de aproximadamente 1 a 5%, a presença e a alteração temporal na DRM de nível baixo parecem representar parâmetros importantes, associados ao prognóstico do paciente, em vários cânceres hematolinfoides. Com tal finalidade, as tecnologias reproduzíveis baseadas na PCR assumiram o papel central na detecção da DRM e são um aspecto integrante do melhor tratamento clínico para pacientes com esses distúrbios (Paietta, 2002). É preciso notar que a DRM de nível baixo também pode ser identificada pela citometria de fluxo destinada a detectar os perfis de expressão de marcadores celulares aberrantes característicos de várias leucemias e dos diversos linfomas. Embora as abordagens imunofenotípicas (i. e., citometria de fluxo) também tenham um mérito substancial e muitas vezes equivalente na avaliação da DRM, tal discussão está fora do âmbito desta seção.

Até recentemente, a quantificação de pequenas quantidades de doença residual era conseguida por ensaios de PCR competitivos trabalhosos e tecnicamente desafiadores. Tais experimentos foram valiosos para confirmar a relação entre a estimativa exata da DRM e seu efeito sobre o desfecho clínico. Mostrou-se que estimativas seriadas eram capazes de definir um "quadro de evolução de doença", com a capacidade de prever o risco de recidiva em muitos pacientes. Contudo, os métodos competitivos de PCR baseiam-se na detecção do ponto final, ou seja, a quantidade de alvo específico amplificado é determinada após todos os ciclos da PCR terem sido completados. Tal aspecto é problemático porque os fatores que limitam a eficiência da amplificação tardia na "fase de platô" da PCR (p. ex., exaustão de reagentes, reanelamento preferencial de tiras de produto da PCR, impedindo a ligação do iniciador etc.) podem gerar efeitos profundos sobre a quantificação acurada com relação à quantidade inicial de alvo específico. Esses problemas ficaram evidentes graças ao desenvolvimento dos métodos de PCR quantitativa fluorescente "em tempo real" (citada aqui como Q-PCR). Duas plataformas comerciais similares, a TaqMan (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) e a LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA), modificaram extremamente a estimativa laboratorial da DRM pela PCR (Heid, 1996; Wittwer, 1997; Gibson, 1999; van der Velden, 2003); essas técnicas são discutidas em detalhes no Capítulo 67. É notável que a quantidade de dados pode ter alta correlação quando se usa o formato para determinado alvo de DRM (Eckert, 2003). O auge desses esforços, aplicados nas malignidades hematolinfoides, foi demonstrado com mais habilidade pelas publicações abrangentes recentes do consórcio Europe Against Cancer (EAC) sobre a monitoração da DRM nas leucemias (Beillard, 2003; Gabert, 2003).

Além das antigas preocupações técnicas, a discussão geral da avaliação molecular de DRM não seria completa sem considerar a ampla gama de fatores clínicos e biológicos tumorais que influenciam o sucesso da PCR. O momento de colheita da amostra para análise de DRM é uma questão primordial. Em alguns tipos de leucemia, a positividade de um marcador tumoral específico, ao término da terapia de indução, pode não ter valor diagnóstico significativo, enquanto o oposto pode ser verdade em um tipo diferente de neoplasia. Com relação ao momento, está a escolha entre estimativas únicas (ou estáticas) de DRM no tempo *versus* avaliações seriadas durante a evolução. A última abordagem pode estar associada à morbidade adicional para o paciente (p. ex., amostras repetidas da medula óssea), mas fornece dados mais refinados sobre a carga tumoral e o comportamento biológico do tumor. Além disso, como os "limiares" de DRM indicativos de cura da doença não foram estabelecidos de forma confiável para malignidades hematolinfoides, o grande valor da Q-PCR está em sua capacidade de monitorar com sensibilidade as alterações no nível da doença com o tempo. Na maioria das situações, prefere-se medula óssea em vez de sangue para avaliação da DRM, pois a detecção em amostras de medula costuma ser bem mais fácil. Todavia, algumas leucemias derivadas de célula-tronco ou progenitora inicial mostram capacidade de diferenciação de múltiplas linhagens (p. ex., LMC), e a detecção de DRM em amostras de sangue é igualmente sensível. Uma consideração importante no desenvolvimento de ensaios para DRM é a interpretação de valores positivos com relação a ocorrências de "eventos raros" potencialmente confusos. Em alguns pacientes, mesmo assim, a detecção de transcritos quiméricos específicos de doença em níveis muito baixos pode ser compatível com um estado de remissão estável a longo prazo, conforme casos de vários pacientes com leucemia mieloide aguda positivos

para t(8;21)/*AML1-ETO*, tratados com quimioterapia ou transplante (Kusec, 1994; Jurlander, 1996), situação observada em pacientes com outras leucemias tratados com sucesso. Tais achados sugerem que, pelo menos em alguns indivíduos (ou talvez muitos) aparentemente curados de doença hematológica, a erradicação completa de DRM de nível muito baixo pode não ser possível com as terapias atualmente disponíveis. Populações menores de células tumorais remanescentes podem residir em um estado "latente" ou não proliferativo. Nesses casos, também a vantagem distinta da Q-PCR é a capacidade de ensaios sequenciais para determinar a "atividade" de células residuais para se avaliar o potencial biológico de recidiva da doença.

Por fim, estudos recentes demonstraram a ocorrência de translocação com fusão de genes associada a leucemia ou linfoma, como a t(9;22)/*BCR-ABL1* e a t(14;18)/*BCL2-IgH*, no sangue ou em tecidos de indivíduos saudáveis, sugerindo que a recombinação genética aberrante pode ser um evento relativamente comum. Isso implica que eventos genéticos isolados provavelmente são insuficientes para resultar diretamente em uma malignidade hematolinfoide (Limpens, 1995; Biernaux, 1995; Dolken, 1996; Bose, 1998). No entanto, essas lesões genéticas foram detectadas em níveis muito baixos em indivíduos normais, requerendo ensaios de PCR altamente sensíveis. Embora a detecção de um evento raro em células "latentes inocentes" possa parecer ter implicações na monitoração de DRM em pacientes após terapia para leucemia ou linfoma, os limites reproduzíveis de sensibilidade das tecnologias atuais de Q-PCR, em geral, são elaborados para otimizar a detecção de DRM em uma faixa clinicamente relevante, sem risco significativo de identificar tais células anômalas. Para concluir, é evidente que a utilidade da PCR para monitoração de DRM depende de vários fatores, inclusive o tipo de doença hematopoética, o momento e a frequência da monitoração, os níveis de sensibilidade dos ensaios em uso e o efeito de intervenções clínicas. É necessária uma compreensão abrangente dessas inter-relações para solicitar ensaios apropriados que detectem DRM, e a aplicação de métodos fluorescentes de Q-PCR, avanço significativo para estabelecer padrões acurados e reproduzíveis para uso clínico.

Aplicações clínicas da análise de doença residual mínima

Os conceitos e a utilidade da avaliação de DRM são demonstrados efetivamente no tratamento atual de várias doenças hematolinfoides específicas. Com o surgimento contínuo de novos agentes terapêuticos, a detecção de DRM passou a ter um papel proeminente na avaliação da resposta ao tratamento, no momento de administrar terapias alternativas e na previsão do risco de recidiva. A aplicação mais completa da tecnologia para DRM é no contexto pós-terapêutico da LMC. As respostas terapêuticas inicialmente são avaliadas por padrões clínicos (hematológicos) e citogenéticos. A avaliação molecular da DRM é pertinente em três situações na LMC: o transplante pós-alogênico de medula óssea ou de células-tronco (ABM/SCT, *postallogenic marrow or stem cell transplant*), a terapia com interferon (IFN)-α e a terapia com mesilato de imatinibe. A análise qualitativa de alta sensibilidade por RT-PCR terminal para o transcrito da fusão *BCR-ABL1* mostrou-se válida para prever o risco em pacientes com LMC após ABM/SCT. A positividade inicial à PCR (i. e., menos de seis meses após transplante) não é preditiva do risco de recidiva subsequente, provavelmente por causa do efeito do enxerto *vs* hospedeiro durante esse período. Entretanto, a conversão tardia do estado positivo à PCR (6 a 12 meses após transplante) ou a detecção persistente pela PCR de *BCR-ABL1* está associada a um risco estatístico apreciável de recidiva (Radich, 1995). O risco diminui à medida que aumenta o intervalo desde o transplante, mas a positividade à PCR nos pontos terminais tardios permanece um fator de risco significativo de recidiva. Já os pacientes que continuam negativos à PCR por mais de um ano após o transplante têm um bom prognóstico.

Em geral, esses dados confirmam o uso da avaliação por RT-PCR para *BCR-ABL1* no contexto pós-transplante, mas alguns pacientes com positividade à PCR no intervalo de monitoração mais preditivo mantêm a remissão da doença, e um pequeno número de sobreviventes a longo prazo continua a demonstrar níveis baixos de mRNA do *BCR-ABL1*. Os estudos de Q-PCR refinaram com maior clareza a capacidade de identificar pacientes em mais alto risco de falha do tratamento. O nível quantitativo do transcrito *BCR-ABL1* (expresso como a proporção de BCR-ABL/ABL) no início do período pós-transplante foi fortemente correlacionado com o risco de recidiva (Olavarria, 2001; Faderl, 2004). Outros dados sugerem similarmente que a Q-PCR melhora a predição do desfecho em pacientes positivos à PCR, independentemente do transplante (Radich, 2001). A Q-PCR para BCR-ABL também provou ser válida para avaliar a resposta ao tratamento com IFN-α, apesar da observação de que remissões moleculares com esse agente são muito incomuns. Nesse contexto, a redução da proporção BCR-ABL/ABL abaixo de um certo limiar mostrou ter correlação com um índice baixo de recidiva, enquanto aqueles com níveis altos de BCR-ABL correm um risco acentuadamente elevado de falha do tratamento.

Contudo, o maior impacto da monitoração de BCR-ABL na LMC pela Q-PCR veio com o uso mais disseminado da terapia direcionada com imatinibe. Como agente único, o imatinibe é capaz de induzir remissões hematológicas e citogenéticas na maioria dos pacientes em 6 a 12 meses; uma minoria de pacientes também retém o estado de remissão molecular. Os dados derivados do grande ensaio clínico International Randomized Study of Interferon and STI-571 (IRIS) demonstraram que a cinética da redução de BCR-ABL com a terapia com imatinibe (antes conhecido como STI-571) está relacionada com progressão sem doença. Os "respondedores moleculares maiores" (definidos como os que conseguiram uma redução >3 log no BCR-ABL a partir do nível basal ao diagnóstico em um ano) tendiam a apresentar remissão clínica e citogenética contínua, enquanto a falha ao manifestar uma redução de mais de 2 log no nível do BCR-ABL por 6 meses se correlacionou com um risco elevado de progressão da doença (Hughes, 2003; Faderl, 2004). A Q-PCR também provou ter valor na triagem de pacientes com resistência à terapia com imatinibe: indivíduos com aumento de níveis seriados de BCR-ABL mostraram forte associação à presença de mutações no gene *ABL* translocado, que conferiu resistência ao fármaco, enquanto aqueles com níveis baixos estáveis de transcrito tiveram uma incidência excepcionalmente baixa de resistência ao imatinibe, devido a tais mutações (Branford, 2004). Embora as diretrizes universais para a monitoração pós-terapêutica do BCR-ABL na LMC ainda estejam sendo definidas, a metodologia da Q-PCR tornou-se um novo padrão para a avaliação de DRM em andamento nessa doença (Faderl, 2004). É digno de nota lembrar que, para avaliações seriadas de DRM por BCR-ABL em pacientes com LMC, o sangue periférico pode ser substituído por amostras de medula óssea com eficácia equivalente, reduzindo, assim, a morbidade para o paciente.

Os pacientes com leucemia pró-mielocítica aguda (LPA) tratados com poliquimioterapia e atRA têm um prognóstico relativamente favorável, embora ocorram recidivas com frequência. O uso de métodos de RT-PCR qualitativos para detectar a fusão *PML-RARα* no mRNA (com sensibilidade típica de 10^{-3}–10^{-4}) foi estabelecido como um recurso extremamente poderoso para prever o risco de recidiva em pacientes individuais (Jurcic, 2001; Grimwade, 2002; Lo Coco, 2002). O momento, ou fase de tratamento da doença, é uma consideração importante nessa leucemia. Os pacientes avaliados para *PML-RARα* ao final da indução em geral são positivos, ou seja, o valor preditivo nesse momento não é significativo. Todavia, ao término da terapia de consolidação, a positividade à PCR é fortemente preditiva de recidiva em pacientes que aparentemente conseguiram remissão clínica completa, pois quase todos eles devem progredir para recidiva hematológica em questão de meses. O valor preditivo positivo para recidiva franca também é alto em pacientes repetidamente positivos à PCR em ocasiões consecutivas. Portanto, um dos principais objetivos terapêuticos na LPA é conseguir um estado de "remissão molecular" (i. e., negativa à PCR).

Apesar da contribuição indispensável da PCR qualitativa para a avaliação de *PML-RARα* após o início da terapia, sabe-se que um número significativo de pacientes com PCR negativa no final da terapia de consolidação terá recidiva. Assim, avanços recentes nessa área enfocaram a maior precisão da detecção de *PML-RARα*, embora a sensibilidade do ensaio também tenha melhorado (Choppa, 2003). A monitoração molecular mais frequente (p. ex., após cada etapa da quimioterapia) e, por extensão, a estimativa da taxa de redução de *PML-RARα* são metas

importantes nessa doença, que podem ser alcançadas com a análise rotineira pela Q-PCR. Com tal finalidade, vários grupos de estudo da LPA relataram resultados da monitoração seriada de *PML-RARα* usando técnicas de Q-PCR. Essa abordagem mostrou-se benéfica para detectar doença molecular de baixo grau e predizer a possibilidade de recidiva (Grimwade, 2002; Gallagher, 2003).

Em conjunto com os aprimoramentos na monitoração molecular na LPA, a atenção voltou-se também para o tratamento da DRM persistente ou "recidiva molecular" antes que se desenvolva recidiva hematológica. Ensaios preliminares sugeriram uma sobrevida global significativamente melhor em pacientes submetidos ao tratamento da DRM molecular apenas (Lo Coco, 2002). A disponibilidade de várias opções terapêuticas "de segunda linha" para combater a recidiva da LPA ou a LPA primária refratária ao tratamento (p. ex., trióxido de arsênico [As_2O_3], transplante alogênico e, possivelmente, terapia com anticorpo anti-CD33 [Mylotarg, Wyeth Ayerst, Inc.]), sem dúvida representa um avanço nesses esforços intervencionistas. Embora ainda não tenham sido estabelecidas diretrizes definitivas para a monitoração de *PML-RARα* na LPA, os momentos mais comuns para obtenção de amostras incluem o final da indução, o final da consolidação e, em seguida, a cada 2 ou 3 meses no primeiro ano após a terapia, pois é o período durante o qual ocorre a maioria das recidivas. É bom lembrar que a detecção de *PML-RARα* pela Q-PCR (ou por ensaios de RT-PCR qualitativos) deve ser feita com amostras de aspirados de medula óssea, pois a sensibilidade da detecção em sangue periférico após o início do tratamento é acentuadamente baixa.

Conforme descrito com relação à LLA na infância, foram desenvolvidas classificações clínicas e da genética tumoral sofisticadas para prever o prognóstico do paciente ao estabelecer-se o diagnóstico. Esses parâmetros têm sido úteis para a estratificação precoce de pacientes candidatos à terapia otimizada, com uma minoria das crianças (20 a 30%) apresentando falha do tratamento e recidiva da leucemia. Na busca por melhores marcadores substitutos da resposta biológica e da eliminação da doença, a avaliação da DRM emergiu como um método muito poderoso de predição pós-terapêutica, proporcionando uma abordagem mais "individualizada" para a avaliação do risco. Mostrou-se que níveis de DRM molecular tão altos como 10^{-2}–10^{-3} no término da terapia de indução podem ter uma correlação forte e independente com o risco de recidiva; aparentemente, níveis inferiores de DRM também estão associados a algum risco, em comparação com o estado negativo para DRM (Cave, 1998; van Dongen, 1998; Pui, 2000; Goulden, 2001; Nyvold, 2002).

As anormalidades gênicas comuns de translocação e fusão associadas à LLA pediátrica estão presentes em pouco menos de 1/3 dos casos novos de LLA da linhagem B, e anormalidades recorrentes de translocação na LLA de células T são ainda menos prevalentes. Assim, a atenção voltou-se para o desenvolvimento de ensaios de Q-PCR baseados no DNA altamente sensíveis e precisos, destinados a detectar rearranjos clonotípicos dos genes de receptores de antígeno, incluindo os genes das cadeias pesada e leve de imunoglobulina (IgH, Igκ) e os *loci* receptores de célula T (Tγ, Tβ e Tδ) (resumido por van der Velden, 2003). Esses rearranjos clonotípicos servem como assinaturas individuais e específicas ou "impressões digitais" dos tumores para a detecção de DRM. Notavelmente, na linhagem B da LLA, ocorrem rearranjos gênicos de linhagem cruzada frequentemente nos genes de receptores de célula T, de modo que a maioria dos tumores da LLA de células B tem pelo menos um e até dois ou três rearranjos gênicos únicos disponíveis para a monitoração de DRM. Essas sequências de DNA altamente específicas, formadas pela recombinação dos segmentos V, (D) e J ao longo de inserções de nucleotídeos sem molde (N), podem ter a estrutura e a síntese de iniciadores de PCR e sondas específicos do tumor do paciente acompanhadas para uso na Q-PCR. Isso pode ser conseguido empregando-se um iniciador de região de consenso e uma sonda fluorescente de consenso com um iniciador de oligonucleotídico "alelo-específico" (ASO, *allelic-specific oligonucleotide*) complementar à região de sequência clonotípica única no rearranjo do gene de interesse.

As sensibilidades típicas da Q-PCR para receptor de antígeno estão na faixa de 10^{-2}–10^{-5}, dependendo das características da sequência gênica alvo particular e do grau de competição inespecífica por iniciadores pelos rearranjos potencialmente homólogos nas células B ou T de fundo. De acordo com isso, podem ter de ser avaliados múltiplos alvos gênicos receptores de antígeno e, possivelmente, múltiplas sequências de iniciadores/sondas terão de ser feitas e avaliadas para se obter a melhor sensibilidade dilucional em determinado caso de LLA. A quantificação de DRM na LLA pediátrica baseia-se em diluições seriadas do DNA diagnóstico da leucemia do paciente em uma fonte básica de DNA (p. ex., leucócitos de doadores diversos) e o valor da amostra de medula óssea para DRM é então determinado com base em uma curva padrão gerada a partir dessas diluições. O momento de avaliar DRM é crítico na LLA pediátrica. O término da terapia de indução é um aspecto significativo e altamente informativo, embora estimativas seriadas possam aumentar ainda mais o valor preditivo (van Dongen, 1998). A positividade para DRM no final da terapia (p. ex., após consolidação) também tem valor prognóstico na predição do risco de recidiva, porém, a sensibilidade da Q-PCR para o gene de receptor de antígeno com níveis baixos de DRM é menor nesses intervalos, enfatizando a importância da avaliação precoce.

O grupo europeu multi-institutional BIOMED-2 publicou descrições detalhadas de ensaios otimizados com iniciadores/sondas para a detecção inicial de marcadores clonotípicos do gene de receptor de antígeno para aplicação em protocolos subsequentes de alta sensibilidade molecular para DRM (van Dongen, 2003). Esse trabalho abrangente representa uma etapa importante no sentido de se criar uniformidade na coleta de dados de Q-PCR entre os centros de teste envolvidos nos ensaios de LLA pediátrica. Com esses progressos, alguns grupos cooperativos de estudo sobre a LLA começaram a incorporar os dados da DRM do início da terapia como um componente rotineiro de avaliação de risco, tanto que pacientes de "alto risco" positivos para DRM são rapidamente estratificados em protocolos terapêuticos mais intensivos.

Rearranjos gênicos clonotípicos de *IgH* e *BCL2* também foram descritos para monitorar o estado de DRM em amostras de sangue ou medula óssea após terapias intensivas como a quimioterapia em altas doses e o resgate de células-tronco autólogas em linfomas não Hodgkin de células B (Bowman, 2004). Tipicamente, esses linfomas são neoplasias de "linfócitos B pequenos" (p. ex., LCR, LLC e linfoma reticular), com propensão a ampla disseminação, inclusive para a medula óssea. Em cada um desses contextos clínicos, a utilidade da avaliação de DRM nos linfomas na medula óssea deve ser interpretada no contexto de outros parâmetros de acompanhamento (em especial análises de imagem), para excluir os sítios extramedulares de recidiva. Em outra aplicação, a deleção de células B clonais em coleções de células-tronco antes do transplante autólogo foi correlacionada com maior risco de recidiva da doença após o transplante, em comparação ao observado nos pacientes que receberam amostras negativas à PCR.

Tecnologias emergentes: o papel do perfil de expressão gênica usando a tecnologia de microestrutura na neoplasia hematolinfoide

Desde sua introdução, a análise da microestrutura da expressão gênica global tornou-se um recurso promissor para a pesquisa biomédica. Embora a análise microestrutural ainda não faça parte da rotina no laboratório clínico, é uma tecnologia emergente poderosa que levou a várias observações de importância clínica (Levene, 2003; Hubank, 2004). A microestrutura contém oligonucleotídeos ou cDNA alvos em uma superfície de *chip* (circuito integrado). Esses alvos representam um grande componente do genoma ou todo o genoma e são designados para determinar os níveis de expressão do mRNA de muitos genes em paralelo numa única amostra. Descrições detalhadas das várias opções para análises de expressão baseadas na estrutura, bem como as técnicas relacionadas com sua análise e interpretação, são discutidas em outra parte deste livro (Capítulos 68 e 76). Estudos recentes sobre neoplasias hematopoéticas deram ideia sobre a "predição de classe" (predição de um tipo tumoral com base nos perfis gênicos de expressão específicos de genes informativos selecionados), bem como sobre a "descoberta da classe" (descoberta de novas subentidades dentro dos grupos de tumores antigamente considerados uma entidade homogênea). A descoberta da classe não se limita apenas à identificação de novos subtipos de leucemia, por exemplo, mas inclui a definição de grupos diferentes em termos de prognóstico, o que se espera influencie as estratégias terapêuticas. Como resultado

desses sucessos iniciais na descoberta e na predição de classes, parece uma meta realista que a resposta à terapia, o risco de recidiva e até mesmo o de desenvolver uma malignidade secundária possam ser previstos a partir da análise microestrutural. Aqui, vamos fazer apenas um comentário sucinto sobre as observações que levaram à classificação, ao diagnóstico e ao prognóstico das leucemias e dos linfomas graças ao uso da análise microestrutural.

Distinção entre leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda com base na expressão gênica

A distinção entre a LMA e a LLA é muito importante na prática diária rotineira e uma necessidade absoluta para decisões terapêuticas. Atualmente, tal distinção baseia-se na revisão da morfologia, na citoquímica enzimática, na imunofenotipagem e no cariótipo do tumor. O trabalho de Golub e colaboradores foi fundamental para demonstrar a aplicabilidade de ensaios microestruturais às neoplasias hematopoéticas (Golub, 1999). Tais esforços mostraram que a separação entre LMA e LLA só é possível com base na análise da microestrutura. Esses pesquisadores estudaram 38 casos de leucemia aguda (27 pacientes com LLA e 11 pacientes com LMA) e identificaram 50 genes discriminadores que distinguem essas leucemias. Em 36 dos 38 casos de leucemia aguda, o diagnóstico do tipo de leucemia foi feito corretamente apenas de acordo com os dados microestruturais. Em um conjunto subsequente de 34 amostras desconhecidas que não tinham sido usadas para fazer o modelo de predição, o conjunto de genes classificou corretamente 29 (85%) dos casos. Moos e colaboradores confirmaram que um conjunto de genes discriminatórios também poderia distinguir a LMA da LLA em 51 casos pediátricos (Moos, 2002). Embora não seja superior à análise patológica abrangente atual, esses estudos representam uma etapa importante no diagnóstico molecular de leucemia.

Leucemia linfoblástica aguda

Quanto à LLA, a discriminação básica de amostras não selecionadas de LLA e LMA baseia-se na sua expressão gênica específica, inspirada em vários estudos de acompanhamento. Em um estudo importantíssimo, subtipos de LLA pediátrica foram correlacionados com perfis únicos de expressão gênica (Yeoh, 2002). Tal estudo propôs, ainda, subconjuntos de marcadores gênicos adequados para o diagnóstico inicial, bem como perfis gênicos candidatos como preditores do desfecho clínico. Em termos mais específicos, 327 pacientes foram classificados de acordo com sua natureza imunológica e genética tumoral: LLA de linhagem T e *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1*, *TEL-AML1*, *MLL* e tipos hiperdiploides de LLA da linhagem B. A expressão que serve de assinatura de alguns casos não permitiu sua classificação em uma dessas categorias, tendo sido proposto um novo subgrupo de LLA. De particular interesse, esses pesquisadores identificaram assinaturas gênicas específicas em blastos de LLA ao diagnóstico, que pareceram indicar maior propensão ao desenvolvimento de LMA induzida pela terapia após o tratamento bem-sucedido da LLA. Tais observações foram extrapoladas em um estudo de análise microestrutural em que se compararam casos de leucemia aguda, contendo aberrações do gene *MLL*, com outros casos de LLA e LMA, mostrando uma separação nítida de todos os três grupos (Armstrong, 2002).

Leucemia mieloide aguda

Foram realizados inúmeros estudos correlacionando os achados microestruturais com a classificação de LMA. Haferlach postulou se os subtipos franco-americano-britânicos (FAB) poderiam ser correlacionados com perfis de expressão gênica (Haferlach, 2002a, 2002b, 2002c). Esse grupo estudou 130 casos de LMA classificados pelo FAB de acordo com a morfologia, a citoquímica e a citogenética. Também foi feita a imunofenotipagem em todos os casos de LMA-M0. Com base em uma expressão gênica de assinatura limitada, os casos de LPA clássica (LMA-M3), LPA microgranular (LMA-M3v), leucemia mielomonocítica aguda com eosinófilos anormais (LMA-M4eo) e eritroleucemia aguda puderam ser distinguidos de todos os outros subtipos com 100% de acurácia. A comparação entre leucemia mieloide aguda com maturação (LMA-M2) e leucemia mielomonocítica aguda (LMA-M4) mostrou a menor acurácia (85%), achado muito semelhante à concordância obtida pela revisão morfológica (e compatível com o limiar arbitrário de mais de 20% de positividade para a esterase inespecífica à citoquímica usada tradicionalmente na distinção entre essas leucemias). As comparações entre outras subcategorias de LMA variaram de 86 a 95% de acurácia. Além disso, a análise microestrutural separou 28 casos de leucemia mieloide aguda com maturação (LMA-M2) em três subgrupos citogenéticos: t(8;21)/*AML1–ETO*, cariótipo normal e cariótipo anormal complexo. No geral, esses resultados indicam que a LMA-M3, a LMA-M3v, a LMA-M4eo, a LMA-M6 e subtipos de LMA-M2 na verdade são entidades distintas quanto aos seus perfis de expressão gênica, enquanto outras subcategorias de LMA definidas ou descritas pelos aspectos da classificação FAB são mais heterogêneas.

Os dados microestruturais também foram comparados diretamente com dados da citometria de fluxo e citogenéticos na LMA. Isso é crítico porque, em muitos ensaios clínicos, demonstrou-se que o cariótipo de blastos leucêmicos é o parâmetro prognóstico independente mais importante com relação à resposta ao tratamento e à sobrevida na LMA. Schoch et al. demonstraram que subtipos de LMA definidos citogeneticamente com t(8;21)/*AML1–ETO*, LMA com t(15;17)/*PML–RARα* e LMA com inv(16)/*CBFB–MYH11* caracterizam-se por perfis de expressão gênica diferentes; um conjunto mínimo de apenas 13 genes foi suficiente para predizer com acurácia esses cariótipos (Schoch, 2002). Tais achados são consistentes com os estudos FAB comparativos supracitados, pois as anomalias t(8;21), t(15;17) e inv(16) apresentam forte correlação com os subtipos morfológicos LMA-M2, LMA-M3/M3v de LMA-M4eo, respectivamente. Foram feitos poucos estudos correlacionando as análises microestruturais com o desfecho clínico. Dois esforços recentes focados principalmente na LMA de adultos confirmaram as relações entre genótipo e expressão previamente identificadas, mas revelaram ainda novos aglomerados biológicos e a capacidade de construir conjuntos gênicos "preditores" que se correlacionam com o desfecho clínico (Bullinger, 2004; Valk, 2004).

Linfomas não Hodgkin e leucemias crônicas

A descoberta clássica e estudos de predição também foram realizados com amostras de pacientes com linfomas. Os estudos dos perfis da expressão gênica de DLBCL mostraram que essa categoria diagnóstica abrange pelo menos duas doenças geneticamente distintas que diferem no mecanismo oncogênico e no desfecho clínico (Alizadeh, 2000; Rosenwald, 2002; Dybkaer, 2004). Um desses subgrupos de DLBCL foi denominado grupo do centro germinativo semelhante à célula B (GCB) e expressa uma alta frequência de marcadores gênicos associados ao centro germinativo. O outro subgrupo é denominado grupo ativado semelhante à célula B (ABC) e expressa genes associados à ativação mitogênica. Embora as diferenças entre os estudos microestruturais relacionadas com a reprodutibilidade de conjuntos gênicos similares continuem problemáticas, experimentos de validação, como aqueles descritos por Lossos et al., geralmente confirmaram a existência de tipos biológicos distintos de DLBCL (Lossos, 2004). É intrigante que a investigação adicional do tipo ABC de DLBCL revelou que a via de transdução do sinal NF-κB é ativada de forma constitutiva, tendo-se sugerido o NF-κB como o alvo terapêutico nesse subgrupo de DLBCL (Davis, 2002).

Estudos microestruturais da expressão gênica da LLC levaram à identificação de dois subtipos que exibem desfechos clínicos diferentes e também segregam quanto à presença ou ausência de mutações somáticas do gene da cadeia pesada de imunoglobulina (*IgH*). É difícil analisar o estado mutacional do *IgH* no laboratório diagnóstico rotineiro, mas os resultados das análises microestruturais não cobriram a expressão do gene *ZAP-70* como um marcador substituto forte. Níveis altos de mRNA do *ZAP-70* correlacionam-se com genes *IgH* sem mutação e, consequentemente, com prognóstico desfavorável (Rosenwald, 2001). Isso levou preliminarmente aos esforços para avaliar a proteína ZAP-70, na LLC, como um possível indicador de agressividade da doença. Estudos microestruturais na LMC também levaram a descobertas singulares sobre a "assinatura de proliferação" desses linfomas tipicamente refratários ao tratamento, gerando alvos terapêuticos potenciais para novos fármacos (Rosenwald, 2003).

As doenças linfoproliferativas de células matadoras naturais (NK, *natural killer*) são entidades raras que se caracterizam por uma proliferação de linfócitos $CD3^-/CD56^+$, podendo ser divididas em duas cate-

gorias distintas: leucemia agressiva de células NK e linfocitose crônica de células NK. Em um estudo de 19 desses casos, foram identificados 15 genes que poderiam distinguir com clareza essas entidades, com quase 80% de acurácia (Choi, 2004). Por fim, a capacidade do perfil da expressão gênica de identificar o papel de células não neoplásicas dentro de um tumor foi enfatizada recentemente em um estudo de 191 biópsias obtidas de pacientes com linfoma folicular não tratado (Dave, 2004). Duas assinaturas de expressão multigênica permitiram separar os pacientes em quatro quartis com sobrevida mediana independente, diferindo de variáveis prognósticas clínicas. O mais intrigante é que a sobrevida entre esses pacientes com linfoma folicular tem correlação com o perfil molecular de células imunes não malignas que infiltram o tumor.

Portanto, é evidente que a tecnologia microestrutural está começando a reformular muitos de nossos conceitos sobre a classificação dos tumores e, certamente, trará novas contribuições para o entendimento da biologia tumoral. A análise global da expressão gênica nas neoplasias hematolinfoides é promissora para orientar clínicos e pesquisadores a conseguir refinamentos no diagnóstico, classificação e prognóstico, bem como na identificação de novos alvos terapêuticos potenciais. Embora a metodologia microestrutural, em seu formato atual, não seja prontamente aplicável no laboratório clínico que trabalha com diagnóstico molecular, sem dúvida os aspectos fundamentais dessa abordagem terão impacto na forma de analisar múltiplos genes pela Q-PCR ou na imunofenotipagem de múltiplos antígenos.

Agradecimentos

Os autores querem agradecer a excelente assistência de A. A. Magotra, M. Grady e A. M. B. Viswanatha na preparação deste capítulo.

Referências bibliográficas

Adachi M, Tefferi A, Greipp PR, et al: Preferential linkage of BCL-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 1990; 171:559–564.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998; 281:1322–1326.

Agnes F, Shamoon B, Dina C, et al: Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. Gene 1994; 145:283–288.

Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, et al: Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18) (q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. Genes Chromosomes Cancer 1998a; 21:17–29.

Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, et al: Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. Blood 1996; 88: 985–994.

Akasaka T, Ueda C, Kurata M, et al: Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. Blood 2000; 96:2907–2909.

Akasaka T, Yonetani N, Akasaka H: Detection of t(8;14) (q24;q32) by polymerase chain reaction for long DNA targets: a report of two patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Int J Hematol 1998b; 67:75–79.

Albinger-Hegyi A, Hochreutener B, Abdou M-T, et al: High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas. Improved polymerase chain reaction protocols for their detection. Am J Pathol 2002; 160:823–832.

Uma análise molecular abrangente das regiões adicionais de ponto de quebra no gene BCL2*, com estratégias para melhorar a detecção diagnóstica molecular da t*(14;18)/BCL2–IgH.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; 403:503–511.

Artigo importante que identificou inicialmente os grupos intrínsecos biológicos e clínicos de "centro germinativo" e assinaturas "ativadas" de célula B entre os linfomas de células B grandes pela técnica microestrutural da expressão gênica.

Alkan S, Schnitzer B, Thompson JL: Cyclin D1 protein expression in mantle cell lymphoma. Ann Oncol 1995; 6:567–570.

Allman D, Jain A, Dent A, et al: BCL-6 expression during B-cell activation. Blood 1996; 87:5257–5268.

Amati B, Brooks MW, Levy N: Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. Cell 1993; 72:233.

Andersson A, Hoglund M, Johansson B, et al: Paired multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PMRT-PCR) analysis as a rapid and accurate diagnostic tool for the detection of MLL fusion genes in hematologic malignancies. Leukemia 2001; 15:1293–1300.

Arber DA. Molecular diagnosis approach to non-Hodgkin's lymphoma. J Mol Diag 2000; 2:178–190.

Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ: A clinicopathologic study of 80 cases. Blood 1997; 89:2067–2078.

Armstrong SA, Golub TR, Korsmeyer SJ. *MLL*-rearranged leukemias: insights from gene expression profiling. Sem Hematol 2003; 40:268–273.

Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al: MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet 2002; 30:41–47.

Aster JC, Longtine JA. Detection of BCL2 rearrangements in follicular lymphoma. Am J Pathol 2002; 160:759–763.

Aubin J, Davi F, Nguyen-Salomon F, et al: Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. Leukemia 1995; 9:471–479.

Ayer DE, Kretzner L, Eisenman RN: Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. Cell 1993; 72:211.

Ayer DE, Lawrence QA, Eisenman RN: Mad–Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. Cell 1995; 80:767–776.

Baens M, Maes B, Steyls A, et al: The product of the t(11;18), an *API2–MLT* fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. Am J Pathol 2000; 156:1433–1439.

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell 1985; 41:899–906.

Bain BJ. Relationship between idiopathic hypereosinophilic syndrome, eosinophilic leukemia, and systemic mastocytosis. Am J Hematol 2004; 77:82–85.

Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, et al: Rearrangement of the *BCL6* locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol 2002; 117:322–332.

Barrans SL, Evans PAS, O'Connor SJM, et al: The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. Clin Cancer Res 2003; 9:2133–2139.

Bartolo C, Viswanatha DS. Molecular diagnosis in pediatric acute leukemias. Clin Lab Med 2000; 20:139–182.

Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. Cell 2002; 109:S45–S55.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365:1054–1061

Beaubier NT, Hart AT, Bartolo C, et al: Comparison of capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for the evaluation of T and B cell clonality by polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 2000; 9:121–131.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, et al: Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. Leukemia 2003; 17:2474–2486.

Beishuizen A, Verhoeven M-AJ, Mol EJ, et al: Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. Leukemia 1993; 7:2045–2053.

Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER, et al: Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. Blood 1994; 83:2238–2247.

Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Dubus P, et al: A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. Mod Pathol 2002; 15:517–525.

Bertoni F, Conconi A, Capella C, et al: Molecular follow-up in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: early analysis of the LY03 cooperative trial. Blood 2002; 99:2541–2544.

Betti CJ, Villalobos MJ, Diaz MO, et al: Apoptopic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division. Cancer Res 2003; 63:1377–1381.

Betti CJ, Villalobos MJ, Diaz MO, Vaughan AT. Apoptotic triggers initiate translocations within the MLL gene involving the nonhomologous end joining repair system. Cancer Res 2001; 61:4550–4555.

Biernaux C, Loos M, Sels A, et al: Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. Blood 1995; 86:3118–3122.

Blackwood EM, Eisenman RN: Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. Science 1991; 251:1211–1217.

Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. Blood 2004; 104:3009–3020.

Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al: Incidence and clinical relevance of *TEL/AML1* fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in German and Italian multicenter therapy trials. Blood 1997; 90:571–577.

Bosch F, Jares P, Campo E: PRAD1/cyclin d1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. Blood 1994; 84:2726–2732.

Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, et al: The presence of typical and atypical *BCR–ABL* fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. Blood 1998; 92:3362–3367.

Bottaro M, Berti E, Biondi A, et al: Heteroduplex analysis of T-cell receptor γ gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. Blood 1994; 83:3271–3278.

Bowman A, Jones D, Medeiros LJ, et al: Quantitative PCR detection of t(14;18) *bcl2*/JH fusion sequences in follicular lymphoma patients. J Mol Diagn 2004; 6:396–400.

Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, Grigg A, et al: Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR–ABL kinase domain mutations. Blood 2004; 104:2926–2932.

Braziel RM, Arber DA, Slovak ML, et al: The Burkitt-like lymphomas: a Southwest Oncology Group study delineating phenotypic, genotypic, and clinical features. Blood 2001; 97:3713–3720.

Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al: Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. *In* Jaffe E, Harris N, Stein H, et al (eds): Pathology and Genetics: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC Press; 2001.

Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult actue myeloid leukemia. N Engl J Med 2004; 350:1605–1616.

Campo E, Raffeld M, Jaffe E: Mantle-cell lymphoma. Semin Hematol 1999; 36:115–127.

Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, et al: BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. Blood 1995; 86:45–53.

Cave H, van der Werf ten Bosch J, Suciu S, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998; 339:591–598.

Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J 1996; 10:940–954.

Chasseriau J, Rivet J, Bilan F, et al: Characterization of the different *BCR–ABL* transcripts with a single multiplex RT-PCR. J Mol Diagn 2004; 6:343–347.

Chen W, Iida S, Louie DC, et al: Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. Blood 1998; 91:603–607.

Chen C-S, Sorensen PHB, Domer PH, et al: Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominant in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood 1993; 81:2386–2393.

Chhanabhai M, Adomat SA, Gascoyne RD, Horsman DE: Clinical utility of heteroduplex analysis of TCR gamma gene rearrangements in the diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders. Am J Clin Pathol 1997; 108:295–301.

Chibbar R, Leung K, McCormick S, et al: *bcl-1* gene rearrangements in mantle cell lymphoma: a comprehensive analysis of 118 cases, including B-5 fixed tissue, by polymerase chain reaction and Southern transfer analysis. Mod Pathol 1998; 11:1089–1097.

Chiu BC, Weisenburger DD. An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. Clin Lymphoma 2003; 4:161–168.

Choi YL, Makishima H, Ohashi J, et al: DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified $CD3^-$ $CD56^+$ fractions. Leukemia 2004; 18:556–565.

Choppa PC, Gomez J, Vall HG, et al: A novel method for the detection, quantitation, and breakpoint cluster region determination of t(15;17) fusion transcripts using a one-step real-time multiplex RT-PCR. Am J Clin Pathol 2003; 119:137–144.

Cleary ML, Galili N, Sklar J: Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in follicular lymphomas. J Exp Med 1986; 164:315–320.

Cleary ML, Sklar J: Nucleotide sequence of t(14;18) chromosomal translocation breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:7439–7443.

Coignet LJA, Schuuring E, Kibbelaar RE: Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-contour fluorescence in situ hybridization. Blood 1996; 87:1512–1519.

Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al: A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. N Engl J Med 2003; 348:1201–1214.

Cossman J, Uppenkamp M, Sundeen J, et al: Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. Arch Pathol Lab Med 1988; 112:117–127.

Cuthbert G, Thompson K, Breese G, et al: Sensitivity of FISH in detection of MLL gene rearrangements. Genes Chromosomes Cancer 2000; 29:180–185.

Cuthbert KB, Ford AM, Repp R, et al: Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:13950–13954.

Dave SS, Wright G, Tan B, et al: Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells N Engl. J Med 2004; 351: 2159–2169.

Davis RE, Staudt LM: Molecular diagnosis of lymphoid malignancies by gene expression profiling. Curr Opin Hematol 2002; 9:333–338.

Deane M, McCarthy KP, Weidemann LM, Norton JD: An improved method for detection of B-lymphoid clonality by polymerase chain reaction. Leukemia 1991; 5:726–730.

De Boer CJ, Schuuring E, Dreef E, Peters G: Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. Blood 1995; 86: 2715–2723.

De Boer CJ, van Krieken JM, Schuuring E, Kluin PM: Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. Ann Oncol 1997; 8(Suppl 2): S109–S117.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96:3343–3356.

Revisão abrangente e concisa da biologia molecular da leucemia mieloide crônica.

Delsol G, Ralfkiaer E, Stein H, et al: Anaplastic large cell lymphoma. *In* Jaffe E, Harris N, Stein H, et al (eds): Pathology and Genetics: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC Press; 2001, pp 230–235.

Dent AL, Shaffer AL, Yu X, et al: Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. Science 1997; 276:589–592.

De Paepe P, Baens M, van Krieken H, et al: ALK activation by the CLTC-ALK fusion is a recurrent event in large B-cell lymphoma. Blood 2003; 102:2638–2641.

Derksen PWB, Langerak AW, Kerkhof E, et al: Comparison of different polymerase chain reaction-based approaches for clonality assessment of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in B-cell neoplasia. Mod Pathol 1999; 12:794–805.

Ao comparar uma variedade de métodos com iniciadores oligonucleotídicos, esse trabalho ajuda na aplicação racional da PCR para a determinação de clonalidade de células B no contexto clínico.

Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, et al: The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. Blood 1999; 93:3601–3609.

Diss TC, Liu HX, Du MQ, Isaacson PG: Improvements to B cell clonality analysis using PCR amplification of immunoglobulin light chain genes. J Clin Pathol Mol Pathol 2002; 55:98–101.

Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Metelsmann R: BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with non-malignant diseases. J Clin Oncol 1996; 14:1333–1344.

Downing JR: The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. Br J Haematol 1999; 106:296–308.

Downing JR, Shurtleff SA, Zielenska M, et al: Molecular detection of the (2;5) translocation of non-Hodgkin's lymphoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Blood 1995; 85:3416–3422.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR–ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001; 344:1031–1037.

Dybkaer K, Iqbal J, Zhou G, Chan WC: Molecular diagnosis and outcome prediction in diffuse large B-cell lymphoma and other subtypes of lymphoma Clin Lymphoma 2004; 5:19–28.

Dyck J, Maul GG, Miller WH, et al: A novel macromolecular structure is a target of the promyelocytic-retinoic acid receptor oncoprotein. Cell 1994; 76:333–343.

Dyer MJS, Zani BJ, Lu WZ, et al: BCL2 translocations in leukemia of mature B cells. Blood 1994; 83:3682–3688.

Eckert C, Scrideli CA, Taube T, et al: Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. Leukemia 2003; 17:2517–2524.

Elenitoba-Johnson KSJ, Bohling SD, Jenson SD, et al: Fluorescence PCR quantification of cyclin D1 expression. J Mol Diagn 2002; 4:90–96.

Elmberger PG, Lozano MD, Weisenburger DD, et al: Transcripts of the *npm–alk* fusion gene in anaplastic large cell lymphoma, Hodgkin's disease, and reactive lymphoid lesions. Blood 1995; 86:3517–3521.

Ernst P, Fisher JK, Avery W, et al: Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. Dev Cell 2004a; 6:437–443.

Ernst P, Mabon M, Davidson AJ, et al: An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic expansion. Curr Biol 2004b; 14:2063–2069.

Faderl S, Hochhaus A, Hughes T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin N Am 2004; 18:657–670.

Resumo conciso da aplicação dos métodos mais atuais e precisos para tratamento da leucemia mieloide crônica após terapia.

Falini B: Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. Br J Haematol 2001; 114:741–760.

Exame abrangente da interação complexa entre variantes morfológicas e genéticas nesse linfoma único de células T.

Falini B, Fizzotti M, Pileri S, et al: Bcl-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Ann Oncol 1997; 8(Suppl 2):S101–S104.

Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al: ALK^+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. Blood 1999b; 93:2697–2706.

Falini B, Pulford K, Pucciarini A, et al: Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. Blood 1999a; 10:3509–3515.

Fasching K, Panzer S, Haas OA, et al: Presences of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 95:2722–2724.

Fletcher JA, Lynch EA, Kimball VM, et al: Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. Blood 1991; 77:435–439.

Ford AM, Fasching K, Panzer-Grumayer, et al: Origins of 'late' relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with *TEL–AML1* fusion genes. Blood 2001; 98:558–564.

Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al: Standardization and quality control studies of 'real--time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003; 17:2318–2357.

Este notável trabalho em colaboração descreve o projeto experimental e a validação dos métodos quantitativos de PCR (Q-PCR) para detectar as principais translocações e fusões de genes recorrentes associadas à leucemia. O estudo é significativo nesse âmbito, bem como na dedicação para estabelecer padrões mais universais para o desempenho da Q-PCR na monitoração de doença residual mínima.

Gallagher RE, Li Y-P, Rao S, et al: Characterization of acute promyelocytic leukemia cases with *PML–RARα* break/fusion sites in PML exon 6: Identification of a subgroup with decreased in vitro responsiveness to all-*trans* retinoic acid. Blood 1995; 86:1540–1547.

Gallagher RE, Willman CL, Slack JL, et al: Association of *PML–RARα* type with pretreatment hematologic characteristics but not treatment outcome in acute promyelocytic leukemia: an intergroup molecular study. Blood 1997;90:1656–1663.

Gallagher RE, Yeap BY, Bi W et al: Quantitative real--time RT-PCR analysis of *PML–RARα* mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. Blood 2003; 101:2521–2528.

Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al: Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997; 90:244–251.

Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, et al: Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. Blood 1999; 93:3913–3921.

Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, et al: ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. Blood 2003; 102:2568–2573.

Gaynon PS, Crotty ML, Sather HN, et al: Expression of BCR–ABL, E2A-PBX1 and MLL-AF4 fusion transcripts in newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group initiative. Leuk Lymphoma 1997; 26:57–65.

Gibson UEM, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1999; 6:995–1001.

Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002; 100:1532–1542.

Goldman JM, Melo, JV: Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med 2003; 349:1451–1464.

Excelente revisão abrangendo a ciência básica para o tratamento clínico atual na leucemia mieloide crônica.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286:531–537.

Gong JZ, Zheng S, Chiarle R, et al: Detection of immunoglobulin κ light chain rearrangements by polymerase chain reaction. An improved method for detecting clonal B-cell lymphoproliferative disorders. Am J Pathol 1999; 155:355–363.

Gotlib J, Cools J, Malone III JM, et al: The FIP1L1–PDGFRα fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. Blood 2004; 103:2879–2891.

Goulden N, Oakhill A, Steward C. Practical application of minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2001; 112:275–281.

Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM: Leukemia in twins: lessons in natural history. Blood 2003b; 102:2321–2333.

Greaves MF, Wiemels J: Origins of chromosome translocations in childhood leukemia. Nat Rev Cancer 2003a; 3:1–11.

Excelente resumo da questão intrigante de que muitas, senão a maioria, das leucemias pediátricas pode ser rastreada até um evento genético inicial que ocorre in utero. *São apresentadas as implicações para nosso entendimento da leucemogênese na infância.*

Greiner TC, Rubocki RJ: Effectiveness of capillary electrophoresis using fluorescent-labeled primers in detecting T-cell receptor γ gene rearrangements. J Mol Diagn 2002; 4:137–143.

Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, et al: Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. Blood 1994; 83:10–25.

Grimwade D: The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. Br J Haematol 1999; 106:591–613.

Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci M, et al: Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Blood 2000; 96:1297–1308.

Grimwade D, Lo Coco F: Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. Leukemia 2002; 16:1959–1973.

Resumo dos dados compilados para monitoração pela PCR de doença residual mínima na leucemia pró-mielocítica aguda, com uma discussão importante sobre as dificuldades de interpretação.

Guidez F, Ivins S, Zhu J, et al: Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARα underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood 1998; 91:2634–2642.

Haferlach T, Kohlmann A, Dugas M, et al: Gene expression profiling is able to reproduce different phenotypes in AML as defined by the FAB classification. Blood 2002a; 100:195a.

Haferlach T, Kohlmann A, Dugas M, et al: The diagnosis of 14 specific subtypes of leukemia is possible based on gene expression profiles: a study on 263 patients with AML, ALL, CML, or CLL. Blood 2002b; 100:139a.

Haferlach T, Schnittger S, Kohlmann A, et al: Genetic profiling in acute monoblastic versus mature monocytic leukemia: A gene expression study on 22 patients. Blood 2002c; 100:195a.

Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, et al: Incidence of *TEL/AML1* fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. Blood 1997; 90:4933–4937.

Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, et al: Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. Blood 1992; 79:3316–3324.

Harrison CJ: The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Blood Rev 2001; 15:49–59.

Hecht JL, Aster JC: Molecular biology of Burkitt's lymphoma. J Clin Oncol 2000; 18:3707–3721.

Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, et al: Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Children's Cancer Group. Blood 1999; 94:4036–4046.

Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al: Prognostic impact of trisomies 10, 17 and 5 among children with acute lymphoblastic leukaemia and high hyperdiploidy (>50 chromosomes). J Clin Oncol 2000; 18:1876–1887.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6:986–994.

Height SE, Swansbury GJ, Matutes E, et al: Analysis of clonal rearrangements of the Ig heavy chain locus in acute leukemia. Blood 1996; 87:5242–5250.

Hess JL: MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. Trends Mol Med 2004; 10:500–507.

Hockenberry D, Nunez G, Milliman C, et al: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990; 348:334–336.

Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, et al: Comparison of cytogenetic analysis, Southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma. Am J Clin Pathol 1995; 103:472–478.

Hsi ED, Tubbs RR, Lovell MA, et al: Detection of bcl-2/J_H translocation by polymerase chain reaction. A summary of the experience of the Molecular Oncology Survey of the College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:902–908.

Hubank M: Gene expression profiling and its application in studies of haematological malignancy. Br J Haematol 2004; 124:577–594.

Visão geral sucinta da tecnologia do perfil de expressão gênica e suas aplicações aos vários tipos de câncer hematológico e linfoide.

Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al: Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003; 349:1423–1432.

Artigo importante que estabelece não apenas o benefício da monitoração da leucemia mieloide crônica em pacientes pela (Q)-PCR quantitativa, como também mostra alguns parâmetros importantes relacionados com o sucesso ou a falha da terapia com imatinibe.

Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, et al: The t(1;19)(q23;p13) result in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. Blood 1991; 77:687–693.

Iqbal S, Jenner MJR, Summers, KE, et al: Reliable detection of clonal IgH/Bcl2 MBR rearrangement in follicular lymphoma: methodology and clinical significance. Br J Hematol 2004; 124:325–328.

Isaacson PG, Du M-Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. Nat Rev Cancer 2004; 4:644–653.

Resumo excelente e abrangente do progresso rápido em nossa compreensão da genética e da patogenia dos linfomas de células B da zona marginal extranodal.

Jaffe ES, Harris N, Stein H, et al: Pathology and Genetics: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France, IARC Press, 2001.

James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al : A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434:1144–1148.

Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, et al: Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma – a Nordic Lymphoma Group study. Int J Oncol 2002; 20:161–165.

Jones CD, Darnell KH, Warnke RA, et al: CyclinD1/CyclinD3 ratio by real-time PCR improves specificity for the diagnosis of mantle cell lymphoma. J Mol Diagn 2004; 6:84–89.

Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, et al: Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-α isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. Blood 2001; 98:2651–2656.

Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, et al: Persistence of the AML/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. Blood 1996; 88:2183–2191.

Kadkol S, Bruno A, Dodge C, et al: Comprehensive analysis of *CBFβ-MYH11* fusion transcripts in acute myeloid leukemia by RT-PCR analysis. J Mol Diag 2004; 6:22–27.

Kaneko Y, Frizzera G, Edamura S, et al: A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. Blood 1989; 73:806–813.

Katzenberger T, Ott G, Klein T, et al: Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. Am J Pathol 2004; 165:481–490.

Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, et al: Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). Leukemia 1997; 11:1447–1452.

Knudson AG: Stem cell regulation, tissue ontogeny, and oncogenic events. Semin Cancer Biol 1992; 3:99–106.

Kralovics R, Passamonti F, Buser A, et al: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005; 352:1779–1790.

Kusec R, Laczika K, Knobl P, et al: AML1/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. Leukemia 1994; 8:735–739.

Ladanyi M, Cavalchire G: Detection of the NPM-ALK genomic rearrangement of Ki-1 lymphoma and isolation of the involved NPM and ALK introns. Diagn Mol Pathol 1996; 5:154–158.

Ladanyi M, Cavalchire G, Morris SW, et al: Reverse transcriptase polymerase chain reaction for the Ki-1 anaplastic large cell lymphoma-associated t(2;5) translocation in Hodgkin's disease. Am J Pathol 1994; 145:1296–1300.

Ladanyi M, Wang S: Detection of rearrangements of the BCL2 major breakpoint region in follicular lymphomas. Correlation of polymerase chain reaction results with Southern blot analysis. Diagn Mol Pathol 1992; 1:31–35.

Lamant L, Meggetto F, Saati TA, et al: High incidence of the t(2;5)9p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. Blood 1996; 87:284–291.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, et al: Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. Leukemia 1997; 11:2192–2199.

Langerak AW, Walvers-Tettero ILM, van Dongen JJM: Detection of T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T cell malignancies by Southern blot analysis. Leukemia 1999; 13:965–974.

Lawnicki LC, Rubocki RJ, Chan WC, et al: The distribution of gene segments in T-cell receptor γ gene rearrangements demonstrates the need for multiple primer sets. J Mol Diagn 2003; 5:82–87.

Artigo importante que examina de forma sistemática a utilidade de múltiplos iniciadores para detectar rearranjos gênicos δ de células T clonotípicas. São fornecidos dados sobre o uso dos segmentos gênicos V e J nas neoplasias de células T, bem como o projeto apropriado de iniciador e análise pós-PCR por eletroforese capilar.

Lee S-C, Berg KD, Racke FK, et al: Pseudo-spikes are common in histologically benign lymphoid tissues. J Mol Diagn 2000; 2:145–152.

Levene AP, Morgan GJ, Davies FE: The use of genetic microarray analysis to classify and predict prognosis in haematological malignancies. Clin Lab Haem 2003; 25:209–220.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocytopenia, and agnogenic myeloid metaplasia. Cancer Cell 2005; 7:387–397,

Li Z-Y, Liu D-P, Liang C-C. New insight into the molecular mechanisms of *MLL*-associated leukemia. Leukemia 2005; 19:183–190.

Limpens J, Stad R, Vos C, et al: Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells or normal individuals. Blood 1995; 85:2528–2536.

Liu H, Ye H, Dogan A, et al: T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. Blood 2001a; 98:1182–1187.

Liu H, Ruskon-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A, et al: Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. Lancet 2001b; 357:39–40.

Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestraux A, et al: T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. Gastroenterology 2002; 122:1286–1294.

Liu J, Johnson RM, Traweek ST: Rearrangement of the *BCL-2* gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. Diagn Mol Pathol 1993; 2:241–247.

Liu PP, Hajra A, Wijmenga C et al: Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. Blood 1995; 9:2289–2302.

Liu S, Semenciw R, Mao Y: Increasing incidence of non--Hodgkin's lymphoma in Canada, 1970–1996: age--period-cohort analysis. Hematol Oncol 2003; 21:57–66.

Lo Coco F, De Santis S, Esposito A, et al: Molecular monitoring of hematologic malignancies: current and future issues. Sem Hematol 2002; 39 Suppl 1:14–17.

Lombardo JF, Hwang TS, Maiese RL, Segal GH: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: III. Intermediate and high grade B-cell neoplasms. Hum Pathol 1996; 27:373–380.

Lorsbach RB, Downing JR: The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. Int J Hematol 2001; 74:258–265.

Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al: Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. N Engl J Med 2004; 350:1828–1837.

Macintyre EA, Delbesse E: Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. Sem Hematol 1999; 36:373–389.

Revisão concisa da teoria e da aplicação das principais técnicas moleculares usadas para avaliar as proliferações linfoides.

Maes B, Demunter A, Peeter B, De Wolf-Peeters C: BCL10 mutation does not represent an important pathogenic mechanism in gastric MALT-type lymphoma, and the presence of the API2-MLT fusion is associated with aberrant nuclear BCL10 expression. Blood 2002; 99:1398–1404.

Mason DY, Bastard C, Rimokh R, et al: CD30-positive large cell lymphomas (`Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. Br J Haematol 1990; 74:161.

Medeiros LJ, Carr J: Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:1189–1207.

Artigo abrangente que revê os prós e contras dos métodos moleculares comumente empregados no diagnóstico de linfoma.

Melnick A, Licht JD: Deconstructing a disease: RARα, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood 1999; 93:3167–3215.

Exame bastante completo dos principais mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da leucemia pró-mielocítica aguda e relacionados com tumores "similares à LPA". Essa revisão extensa também enfatiza o conceito da eficácia do ácido retinoico todo trans na LPA positiva para t(15;17)/PML-RARα, em comparação com outras leucemias mieloides que apresentam translocações variantes do gene RARa.

Melo JV: The diversity of BCR–ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood 1996; 88:2375–2384.

Merchant SH, Haines S, Hall B, et al: Fluorescence in--situ hybridization identifies cryptic t(16;16)(p13;q22) masked by del(q22) in a case of AML-M4Eo. J Mol Diagn 2004; 6:271–274.

Migliazza A, Martinotti S, Chen W, et al: Frequent somatic hypermutation of the 5′ noncoding region of the *BCL6* gene in B-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:12520–12524.

Moorman AV, Richards SM, Martineau M, et al: Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. Blood 2003; 102:2756–2762.

Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, et al: Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. Clin Cancer Res 2002; 8:3118–313.

Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al: Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:8242–8247.

Morris SW, Naeve C, Mathew P, et al: ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). Oncogene 1997; 14:2175–2188.

Motegi M, Yonezumi M, Suzuki H, et al: API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. Am J Pathol 2000; 156:807–812.

Murga Penas EM, Hinz K, Röser K, et al: Translocations t(11;18)(q21;q21) and t(14;18)(q32;q21) are the main chromosomal abnormalities involving *MLT/MALT1* in MALT lymphomas. Leukemia 2003; 17:2225–2229.

Nakao M, Yokota S, Horiike S, et al: Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1996a; 10:1463–1470.

Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al: Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996b; 10:1911–1918.

Neri A, Barriga F, Knowles DM, et al: Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:2748–2752.

Neves H, Ramos C, da Silva MG, et al: The nuclear topography of *ABL*, *BCR*, *PML*, and *RARα* genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. Blood 1999; 93:1197–1207.

Ngan B, Nourse J, Cleary ML: Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. Blood 1989; 73:1759–1762.

Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132:1497.

Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, et al: Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. Blood 2002; 99:1253–1258.

O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chonic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003; 348:994–1004.

Artigo importante documentando a superioridade da terapia com imatainibe sobre a terapia baseada no interferon para pacientes com leucemia mieloide crônica.

Offit K, Lo Coco F, Louie DC, et al: Rearrangement of the Bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large cell lymphoma. N Engl J Med 1994; 331: 74–80.

Ohno H: Pathogenetic role of *BCL6* translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Histol Histopathol 2004; 19:637–650.

Ohno H, Fukuhara S: Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. Leuk Lymphoma 1997; 27:53–63.

Ohshima A, Miura I, Hashimoto K, et al: Rearrangements of the BCL6 gene and chromosome aberrations affecting 3q27 in 54 patients with non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 1997; 27:329–334.

Oka K, Ohno H, Kita K: PRAD1 gene overexpression in mantle cell lymphoma but not in other low grade B-cell lymphomas, including extranodal lymphoma. Br J Haematol 1994; 86:786–791.

Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al: Early detection of BCR–ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood 2001; 97:1560–1565.

Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, et al: BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. Blood 1995; 86:28–37.

Otsuki T, Yano T, Clark HM, et al: Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. Blood 1995; 85: 2877–2884.

Pai RK, Chakerian AE, Binder JM, et al: B-cell clonality determination using an immunoglobulin kappa light chain polymerase chain reaction method. J Mol Diagn 2005; 7:300–307.

Paietta, E: Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? Bone Marrow Transplant 2002; 29:459–465.

Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, et al: Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. Blood 1998; 92:574–588.

Pardanani A, Brockman SR, Paternoster SF, et al: *FIP1L1–PDGFRA* fusion: prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. Blood 2004; 104:3038–3045.

Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, et al: *CHIC2* deletion, a surrogate for *FIP1L1–PDGFRA* fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib therapy. Blood 2003; 102:3093–3096.

Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, et al: Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2003; 101:2914–2923.

Phan RT, Dalla-Favera R: The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal center B cells. Nature 2004; 432:635–639.

Pinyol M, Campo E, Nadal A: Detection of the bcl-1 rearrangement at the major translocation cluster in frozen and paraffin-embedded tissues of mantle cell lymphomas by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1996; 105: 532–537.

Pittaluga S, Ayoubi TAY, Wlodarska I, et al: BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol 1996; 179: 145–150.

Poetsch M, Weber-Matthison K, Plendl JJ, et al: Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast-artificial-chromosome probes in follicular lymphoma and nonneoplastic lymphoproliferation. J Clin Oncol 1996; 14:963–969.

Polo JM, Dell'oso T, Ranuncolo SM, et al: Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. Nat Med 2004; 10:1329–1335,

Privitera E, Kamps MP, Hayashi Y, et al: Different molecular consequences of the 1;19 chomosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 1992; 79:1781–1788.

Pui C-H, Campana D: New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2000; 14:783–785.

Pui C-H, Chessels JM, Camitta B, et al: Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. Leukemia 2003; 17:700–706.

Pui C-H, Relling MV, Downing JD: Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2004; 350:1535–1548.

Revisão concisa que detalha os avanços na compreensão da biologia da LLA pediátrica, com ênfase em alguns dos fatores prognósticos mais recentes da via molecular e farmacogenômicos.

Quignon F, De Bels F, Koken M, et al: PML induces a novel caspase-independent death process. Nat Genet 1998; 20:259–265.

Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al: Polymerase chain reaction detection of the BCR–ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: Results and implications in 346 patients. Blood 1995; 85: 2632–2638.

Radich JP, Gooley T, Bryant E et al: The significance of *BCR-ABL* molecular detection in chronic myeloid leukemia patients 'late,' 18 months or more after transplantation. Blood 2001; 98:1701–1707.

Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, et al: A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. Nature 2004; 428:88–93.

Ramasamy I, Brisco M, Morley A: Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. J Clin Pathol 1992; 43:770–775.

Raynaud SD, Cave H, Baens M, et al: The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood actue lymphoblastic leukemia. Blood 1996; 87:2891–2899.

Remstein ED, James CD, Kurtin PJ: Incidence and subtype specificity of *API2–MALT1* fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. Am J Pathol 2000a; 156:1183–1188.

Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, et al: Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. Br J Haematol 2000b; 110:856–862.

Remstein ED, Kurtin PJ, Einerson RR, et al: Primary pulmonary MALT lymphomas show frequent and heterogeneous cytogenetic abnormalities, including aneupolidy and translocations involving API2 and MALT1 and IGH and MALT1. Leukemia 2004; 18:156–160.

Ries LAG, Miller BA, Hankey BF: SEER Cancer Statistics Review, 1973–1991: tables and graphs. NIH Publ nº 94–2789. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 1994.

Rimokh R, Berger F, Bastard C: Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias. Blood 1993; 81:3063–3067.

Rimokh R, Magaud JP, Berger F, et al: A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma (`Ki-1 lymphoma). Br J Haematol 1989; 71:31–36.

Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, et al: Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. Nat Genet 2003; 34:287–291.

Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, et al: The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a *TEL–AML1* gene fusion. Blood 1995; 85:3662–3670.

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 2001; 194:1639–1647.

Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, et al: Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. Am J Pathol 1999; 155:1817–1821.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002; 346:1937–1947.

Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al: The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell 2003; 3:185–197.

Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973; 243:290–293.

Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH, et al: Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. Leukemia 1997b; 11:1201–1206.

Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, et al: TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. J Clin Oncol 1997a; 15:1150–1157.

Saglio G, Pane F, Gottardi E, et al: Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. Blood 1996; 87:1075–1080.

Samaha H, Dumontel C, Ketterer N, Moullett I: Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. Leukemia 1998; 12:1281–1287.

Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, et al: MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood 2003; 101:4539–4546.

Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L, et al: Detection of translocations affecting the BCL6 locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization. Leukemia 2001; 15:1475–1484.

Sainty D, Liso V, Cantu-Rajnoldi A, et al: A new morphological classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying *PLZF-RARA* rearrangements. Blood 2000; 96:1287–1296.

Sarris AH, Luthra R, Cabanillas F, et al: Genomic DNA amplification and the detection of t(2;5)(p23;q35) in lymphoid neoplasms. Leuk Lymphoma 1998; 29:507–514.

Saueracker EA, Kay PH, Spagnolo DV: Distinguishing between monoclonal rearrangements and allelic forms of the immunoglobulin lambda light chain constant region genes: Significance in the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Diagn Mol Pathol 1992; 1:109–117.

Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, et al: Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:10008–10013.

Seeger K, Adams HP, Buchwald D, et al: *TEL–AML1* fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood 1998; 91:1716–1722.

Segal GH, Jorgensen T, Masih AS, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. Hum Pathol 1994; 25:1269–1275.

Segal GH, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas. Hum Pathol 1995; 25:1276–1282.

Shen HM, Peters A, Baron B, et al: Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. Science 1998; 280:1750–1752.

Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G_1-phase progression. Genes Devel 1999; 13:1501–1512.

Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al: *TEL/AML1* fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. Leukemia 1995; 9:1985–1989.

Siebert R, Matthiesen P, Harder S, et al: Application of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphoma. Blood 1998; 91: 984–990.

Sim SP, Liu LF: Nucleolytic cleavage region during apoptosis. J Biol Chem 2001; 276:31590–31595.

Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha N, et al: Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 95:738–744.

Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, Sloane JP: Evaluation of sensitivity, specificity and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. Diagn Mol Pathol 1993; 2: 223–232.

Smith CA, Gruss HJ, Davis T, et al: CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. Cell 1993; 73:1349–1360.

Smith MA, Rubinstein L, Ungerleider RS: Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins: estimating the risk. Med Pediatr Oncol 1994; 23:86–98.

Soslow RA, Zukerberg LR, Harris NL, Warnke RA: BCL-1 (PRAD1/cyclin D1) overexpression distinguishes the blastoid variant of mantle cell lymphoma from B-lineage lymphoblastic lymphoma. Mod Pathol 1997; 10:810–817.

Speck NA, Stacy T, Wang Q, et al: Core-binding factor: A central player in hematopoiesis and leukemia. Cancer Res (Suppl) 1999; 59:1789s–1793s.

Stein H, Foss H-D, Dürkopp H, et al: $CD30^+$ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. Blood 2000; 96:3681–3695.

Stirewalt DL, Radich JP: The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer 2003; 3:650–665.

Revisão abrangente da biologia molecular e celular do FLT3 na hematopoese normal, bem como da associação de mutações do gene FTL3 (e seu significado) na leucemia aguda.

Stissel-Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, et al: Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoints cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with a scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. Blood 1996; 87:1912–1922.

Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, et al: T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. Blood 2003; 101:2335–2339.

Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L, et al: Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. Leukemia 2004; 18:1722–1726.

Estudo do tipo "mapeamento" abrangente usando a hibridização por fluorescência in situ *para delinear a prevalência e a distribuição das principais translocações associadas ao linfoma MALT.*

Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, et al: Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. Blood 1993; 82:3705–3711.

Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, et al: Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. Blood 2002; 99:2315–2323.

Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al: All-*trans*-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med 1997; 337:1021–1028.

Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM: Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. Blood 2002; 99:759–767.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al: Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 2002; 99:4326–4335.

Thomazy VA, Luthra R, Uthman MO, et al: Determination of cyclin D1 and CD20 mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR from archival tissue sections of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. J Mol Diagn 2002; 4:201–208.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphomas. Science 1985; 228:1440–1443.

Ueda Y, Nishida K, Miki T, et al: Interphase detection of BCL6/IgH fusion gene in non-Hodgkin lymphoma by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1997; 99:102–107.

Vahdat L, Maslak P, Miller WH Jr, et al: Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: Impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RARα isoform, and CD13 expression in patients treated with all-*trans* retinoic acid. Blood 1994; 84:3843–3849.

Valk PJM, Verhaak RGW, Beijen A, et al: Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2004; 350:1617–1628.

Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al: Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 2003; 17:1013–1034.

Avaliação técnica completa e sofisticada do estado atual na detecção de doença residual mínima pelas técnicas baseadas na PCR quantitativa.

Van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, et al: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98–3936. Leukemia 2003; 17:2257–2317.

Como no artigo de Gabert et al., essa contribuição europeia é notável em sua avaliação completa de múltiplos loci *receptores de antígeno e anormalidades genéticas associadas a tumores linfoides para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos pela PCR. A implicação é que a caracterização melhor e mais abrangente do marcador genético irá aprimorar as abordagens para detecção de doença residual mínima pelas técnicas moleculares de PCR quantitativas.*

Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 1998; 352:1731–1738.

Van Rhee F, Hochhaus A, Lin F, et al: p190 BCR–ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. Blood 1996; 87:5213–5217.

Vasef MA, Medeiros LJ, Koo C: Cyclin D1 immunohistochemical staining is useful in distinguishing mantle cell lymphoma from other low-grade B-cell neoplasms in bone marrow. Am J Clin Pathol 1997; 108:302–307.

Vega F, Medeiros J. Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin lymphomas. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:1148–1160.

Viswanatha DS, Chen IM, Liu PP, et al: Characterization and use of an antibody detecting the CBFB/SMMHC fusion protein in inv 16/t(16;16)-associated acute myeloid leukemias. Blood 1998; 91:1882–1890.

Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, et al: Pml is essential for multiple apoptotic pathways. Nat Genet 1998; 20;266–272.

Waring PM, Cleary ML: Disruption of a homolog of trithorax by 11q23 translocations: Leukemogenic and transcriptional implications. Curr Top Microbiol Immunol 1997; 220:1–23.

Weis K, Rambaud S, Lavau C, et al: Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of *PML–RARα* in acute promyelocytic leukaemia cells. Cell 1994; 76:345–356.

Weisenburger DD, Armitage JO: Mantle cell lymphoma – an entity comes of age. Blood 1999; 87:4483–4494.

Weiss LM, Lopategui JR, Sun LH, et al: Absence of the t(2;5) in Hodgkin's disease. Blood 1995; 85:2845–2847.

Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cheary ML: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. N Engl J Med 1987; 317:1185–1189.

Wellmann A, Otsuki T, Vogelbruch M, et al: Analysis of the t(2;5)(p23;q35) translocation by reverse transcription-polymerase chain reaction in $CD30^+$ anaplastic large-cell lymphomas, in other non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype, and in Hodgkin's disease. Blood 1995; 86:2321–2328.

Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al: Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet 1999; 354:1499–1503.

Wiemels JL, Leonard B, Wang Y, et al: Site-specific translocation and evidence of post-natal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 translocation in childhood acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2002b; 99:15101–15106.

Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, et al: In utero origin of t(8;21) *AML1–ETO* translocations in childhood actue myeloid leukemia. Blood 2002a; 99:3801–3805.

Williams ME, Meeker TC, Swerdlow SH: Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: Analysis with multiple breakpoint probes. Blood 78:493–498.

Williams ME, Swerdlow SH, Meeker TC: Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. Leukemia 1993a; 7:1437–1440.

Williams ME, Swerdlow SH, Rosenberg CL, Arnold A: Chromosome 11 translocation breakpoints at the PRAD1/cyclin D1 gene locus in centrocytic lymphoma. Leukemia 1993b; 7:241–245.

Willis TG, Jadayel DM, Ju MQ, et al: Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B-cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. Cell 1999; 96:35–45.

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, et al: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 1997; 22:176–181.

Wotherspoon AC, Soosay GN, Diss TC, Isaacson PG: Low-grade primary B-cell lymphoma of the lung. An immunohistochemical, molecular, and cytogenetic study of a single case. Am J Clin Pathol 1990; 94:655–660.

Wundisch T, Neubauer A, Stolte M, et al: B-cell monoclonality is associated with lymphoid follicles in gastritis. Am J Surg Pathol 2003; 27:882–887.

Yagi T, Hibi S, Tabata Y, et al: Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 96:264–268.

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al: Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001; 97:2434–2439.

Yang E, Korsmeyer SJ: Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. Blood 1996; 88:386–401.

Yang WI, Zukerberg LR, Motokura T: Cyclin D1 (Bcl-1, PRAD1) protein expression in low-grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia. Am J Pathol 1994; 145:86–96.

Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al: The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. Nat Genet 1997; 16:161–170.

Ye H, Dogan A, Karran L, et al: BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. Am J Pathol 2000; 157:1147–1154.

Ye H, Gong L, Liu H, et al: MALT lymphoma with t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 is characterized by strong cytoplasmic MALT1 and BCL10 expression. J Pathol 2005; 205:293–301.

Ye H, Liu H, Attygalle A, et al: Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H. pylori* in gastric MALT lymphomas. Blood 2003a; 102:1012–1018.

Ye H, Liu H, Raderer M, et al: High incidence of t(11;18)(q21;q21) in *Helicobacter pylori*-negative gastric MALT lymphomas. Blood 2003b; 101:2547–2550.

Yee HT, Ponzoni M, Merson A, et al: Molecular characterization of the (2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma (Ki-1) and Hodgkin's disease. Blood 1996; 87:1081–1088.

Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al: Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002; 1:133–143.

Artigo marcante sobre as análises microestruturais da expressão gênica das leucemias linfoblásticas agudas pediátricas.

Yonezumi M, Suzuki R, Suzuki H, et al: Detection of AP12-MALT1 chimaeric gene in extranodal and nodal marginal zone B-cell lymphoma by reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) and genomic long and accurate PCR analyses. Br J Haematol 2001; 115:588–594.

Yu BD, Hell JL, Horning SE, et al: Altered Hox empression and segmental identity in MLL-mutant mice. Nature 1995; 378:505–508.

Zelent A, Greaves M, Enver T: Role of the *TEL–AML1* fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Oncogene, 2004; 23:4275–4283.

Zervos AS, Gyuris J, Brent R: Mxil, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. Cell 1993; 72:223–232.

Zhong S, Salomoni P, Pandofi PP: The transcriptional role of PML and the nuclear body. Nature Cell Biol 2000; 2:E85–E90.

Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Cavalli F: The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. Blood 2000; 96:410–419.

Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A, Harris NL: Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas: detection by immunohistochemistry. Am J Clin Pathol 1995; 103:756–760.

Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, et al: FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. Blood 2003; 102:2387–2394.

CAPÍTULO 72

Diagnóstico molecular de doenças genéticas

Wayne W. Grody MD PhD, Walter W. Noll MD

Seleção das técnicas 1501
Seleção das aplicações 1502
Conceitos especiais exclusivos dos distúrbios genéticos moleculares 1503
- Heterogeneidade molecular 1503
- Penetrância e expressividade variável 1503
- *Crossing over* 1504
- Dissomia uniparental 1504
- *Imprinting* 1504
- Antecipação 1504
- Influências epigenéticas e herança não mendeliana 1504
- Frequências alélicas e triagem populacional em massa 1504

Exemplos específicos de doenças 1504
- Fibrose cística 1504
- Distrofia muscular de Duchenne 1505
- Anemia falciforme e outras hemoglobinopatias 1506
- Trombofilias hereditárias 1506
- Distúrbios da expansão de trinucleotídeos repetidos 1507
- Síndromes de Prader-Willi e Angelman 1509
- Cânceres familiares 1511
- Hemocromatose 1515
- Atrofia muscular espinal 1516
- Distúrbios do DNA mitocondrial 1516
- Outros alvos de testes genéticos moleculares e triagem 1517

Perspectivas futuras 1517
Referências bibliográficas 1518

PONTOS-CHAVE

- Os testes moleculares para detectar distúrbios hereditários podem ser a área em crescimento mais rápido da patologia molecular, graças à pletora de doenças genéticas descobertas durante o Projeto Genoma Humano.
- As mutações de distúrbios de um único gene, sejam dominantes ou recessivos, podem ser detectadas por uma variedade de técnicas diagnósticas moleculares, específicas da mutação, se esta for conhecida, ou por sequenciamento gênico abrangente, ou por abordagens de varredura da mutação em questão, se ela não for conhecida.
- Em certos distúrbios, como a fibrose cística, a frequência de portadores com a mutação é tão alta que eles tornaram-se alvos de programas de triagem na população em larga escala.
- Distúrbios dominantes de início tardio, como a doença de Huntington e os cânceres familiares, agora são alvos de testes pré-sintomáticos.
- Cada uma dessas aplicações implica uma variedade de questões éticas envolvendo privacidade genética, consentimento informado, interrupção da gravidez, estigmatização potencial e risco teórico de discriminação por parte das seguradoras.

Provavelmente a área da patologia molecular de crescimento mais rápido, e talvez controvertida, o diagnóstico genético molecular promete tornar-se o recurso diagnóstico e de triagem mais poderoso do século XXI. Ante o ritmo rapidamente acelerado da identificação de novos genes causadores de doença após ter-se completado o sequenciamento do genoma humano e o reconhecimento de que praticamente todas as doenças, incluindo as neoplásicas e até mesmo as infecciosas, têm algum componente genético, a utilidade clínica dessa subespecialidade pode continuar a expandir-se. E mais, sua capacidade única de diagnosticar doenças tanto no período pré-natal como antes que manifestem sintomas, deve conferir-lhe um papel fundamental na medicina preventiva, foco de urgência cada vez maior na era atual de contenção de custos na assistência médica. Além disso, o diagnóstico genético molecular naturalmente leva à terapêutica genética molecular, pois essencialmente as mesmas sequências gênicas normais usadas para detectar defeitos genéticos moleculares pela hibridização do DNA poderiam, em termos teóricos, ser usadas para corrigir tais defeitos pela terapia de reposição gênica. Como a última atividade aumenta o âmbito e a gama de usos, fica ainda mais ligada às atividades do laboratório de diagnóstico molecular, sobre o qual irá cair a responsabilidade de monitorar a inserção e a expressão apropriadas da reposição gênica.

Ainda assim, tal progresso tem obstáculos consideráveis. Ao lado da sofisticação técnica e da complexidade notáveis desses procedimentos, eles estão ligados de forma inexorável a inúmeros dilemas éticos sérios. Dissecar a constituição mais fundamental de um paciente e seus defeitos inatos levanta questões problemáticas sobre discriminação genética, estigmatização, diferenças étnicas, privacidade, consentimento informado e confidencialidade. Como no nível da genética molecular tudo se torna uma "condição preexistente", pode ser preciso rever a definição do que pode ser coberto pelas seguradoras de saúde, tendo sido relatadas circunstâncias de discriminação por parte delas e no trabalho, embora raras (Hall, 2000), em decorrência de testes genéticos (Billings, 1992). Além disso, a descoberta de mutações hereditárias em um indivíduo tem implicações profundas não apenas para o próprio paciente submetido ao teste de DNA (o "probando"), mas estende-se para outras pessoas da sua família, sendo que nenhuma delas talvez concorde com a exploração ou revelação desse tipo de informação. Na verdade, com o poder quase ilimitado dos testes de DNA proporcionado pelas técnicas de amplificação, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), passou a ser bastante fácil fazer análise genética sem o consentimento ou mesmo o conhecimento do paciente, pois o teste pode ser realizado com porções diminutas de amostras de tecido ou líquido obtidas com outras finalidades não relacionadas. O diagnóstico pré-natal – e, por extensão, a triagem de casais portadores genéticos antes da concepção – tornou-se motivo de debates éticos e religiosos veementes sobre o aborto. E a terapia gênica, apesar do consenso geral de que só deve ser direcionada para alvos celulares somáticos, não para as linhagens germinativas (ainda que essa noção esteja começando a mudar), aumenta a ameaça de eugenia entre os que não lembram de tempos idos, quando tais noções eram não só aceitas, como defendidas com veemência.

Muito da genética molecular envolve a avaliação do risco de ocorrência ou recorrência de um distúrbio em um indivíduo ou uma família. Por motivos que serão descritos mais completamente neste capítulo, os resultados dos testes obtidos em geral não são expressos em termos de uma concentração numérica ou uma resposta sim/não, mas como uma probabilidade, às vezes derivada de análise bayesia-

na multifatorial (Ojino, 2004). A transmissão precisa e significativa de tais incertezas complexas para os pacientes e até mesmo para os médicos que os encaminharam, pode ser bastante difícil e demorada. Por essa razão, e pelas próprias implicações éticas sérias desses testes, conforme mencionamos antes, essa área da medicina laboratorial, talvez mais que a maioria das outras, requeira uma comunicação muito estreita entre o laboratório e o clínico que encaminhou o paciente ou o conselheiro genético. De fato, muitos desses testes só devem ser solicitados por um geneticista clínico ou conselheiro genético, pois eles são os especialistas mais qualificados para avaliar a adequação do teste e explicar os resultados ao paciente. Alguns grandes laboratórios de referência especializados neste tipo de testes têm seus próprios conselheiros genéticos na equipe, como uma salvagauarda a mais para uso apropriado e comunicação com os médicos de cuidados primários, que podem não ser bem versados nessas questões.

Seleção das técnicas

Com tantos genes causadores de doenças, *loci* e mecanismos de mutações conhecidos, o diagnóstico genético molecular tem de ter vantagem sobre todo o espectro de técnicas biológicas moleculares modernas disponíveis, que incluem a PCR, o *Southern blotting*, a hibridização com sonda específica do alelo, o sequenciamento do DNA, a PCR em tempo real, ensaios microestruturais de ácido nucleico, ensaio Invader, sistema de mutação por amplificação refratária (ARMS), ensaio de ligação de oligonucleotídeo (OLA), métodos de varredura de mutações como a eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e o polimorfismo da configuração da fita única (SSCP), a espectrometria de massa e outras. A escolha da técnica a ser empregada em um caso particular depende, em grande parte, de dois fatores: (1) o conhecimento atual do(s) gene(s) associado(s) à doença em questão e (2) seu grau de heterogeneidade molecular. O primeiro critério divide superficialmente todas as doenças genéticas em duas categorias: aquelas em que o gene causador foi isolado e aquelas em que ele ainda não foi isolado. Em geral, as da primeira categoria são passíveis de uma abordagem por análise direta do gene/mutação, enquanto as da segunda categoria só podem ser abordadas por análise da ligação usando-se marcadores polimórficos do DNA perto do mesmo cromossomo, desde que a doença tenha sido mapeada até aquele nível mais elementar. O segundo conceito, de heterogeneidade, refere-se ao número de genes diferentes, ou à variedade de mutações em um único gene, que podem causar a mesma doença. Quanto maior a heterogeneidade, mais difícil, trabalhoso e oneroso o teste de DNA (e mais complexos os resultados relatados). Na verdade, as mutações responsáveis por alguns distúrbios são tão numerosas e disseminadas por genes tão grandes que a detecção de todas elas não é viável, devendo-se voltar à análise da ligação, ainda que o agente causador tenha sido identificado e clonado. Em outros distúrbios, uma ou mais mutações podem ter uma frequência tão alta em populações étnicas particulares que a triagem para aquelas poucas, embora ignorando-se as mutações muito raras relatadas, pode ser um teste produtivo o suficiente para justificar a abordagem direta.

Para tornar tais testes práticos e seu custo razoável, foram desenvolvidas várias estratégias multíplices para mutações simultâneas, conforme descrito a seguir. O leitor deve lembrar ainda que todas envolvem algum compromisso com a sensibilidade total do teste. Na verdade, o campo do diagnóstico genético molecular tolera, por necessidade, alguns testes de triagem com sensibilidade clínica comprovada abaixo da que seria considerada aceitável em outras áreas da patologia clínica laboratorial. A decisão sobre como baixar a sensibilidade aceitável final geralmente deve estar subordinada a questões de saúde pública. A maioria dos geneticistas argumenta que, pelo menos com relação aos testes de triagem, os benefícios potenciais para a saúde pública de oferecer um teste de sensibilidade subótima supera os argumentos contrários, desde que os pacientes recebam orientação e aconselhamento adequados para que entendam o risco residual inerente de um resultado negativo a algum teste. É importante não esquecer que estamos falando aqui sobre sensibilidade clínica, não sensibilidade analítica. Presume-se que o teste seja capaz de detectar determinada mutação se ela estiver presente, ficando evidente que mutações muito mais raras não serão reveladas pelo ensaio, de maneira que a mesma proporção de portadores será "perdida" – uma espécie de "negativo clínico falso" (Palomaki, 2004).

Os testes de mutação direta foram extremamente simplificados com o advento da PCR. Mediante a escolha criteriosa de iniciadores, essa técnica permite que o laboratório se concentre na mutação exata de interesse, ou estabeleça um "ponto quente" dentro de um gene que contém vários locais possíveis de mutação, usando quantidades diminutas de material inicial. Assim que a região contendo a mutação suspeita é amplificada, pode ser analisada por eletroforese em gel ou capilar, sequenciamento ou hibridização com sonda de DNA. Para uma deleção que se esperaria alterar o comprimento do *amplicon*, o tamanho molecular exato dos produtos da PCR por eletroforese será suficiente. Como alternativa, se a deleção ou mutação pontual altera (ou cria) um local de clivagem da endonuclease de restrição, pode ser detectada por análise eletroforética de produtos da PCR digeridos com aquela enzima (Fig. 72.1). Outra opção é hibridizar os produtos da PCR com sondas de oligonucleotídeos específicos do alelo (ASO), fragmentos curtos de DNA que são precisamente complementares da sequência alvo normal ou mutante. Conforme discutido no Capítulo 66, se a hibridização, em geral no formato de uma mancha correspondente a um ponto ou uma linha, for feita em condições estritas o suficiente, o DNA alvo contendo a mutação irá hibridizar-se apenas com a sonda mutante, e vice-versa no caso de DNA alvo normal. Vários pontos quentes de mutação em um gene podem ser amplificados juntos pela PCR multiplex. Como uma variação nessa abordagem, qualquer número de sondas alélicas pode disseminar-se em um suporte sólido para hibridização subsequente com uma amostra de DNA (ou *amplicons*) na forma de uma microestrutura ou em suspensão em microcontas. Por último, dispõe-se de inúmeros reagentes comerciais e instrumentos que detectam mutações pontuais por hibridização diferencial com sonda/*quencher* ou por eletroforese capilar e outras técnicas sofisticadas, como descrito nos Capítulos 68 e 76.

Existem várias técnicas de triagem satisfatórias para pesquisar mutações desconhecidas em uma doença genética que possam estar em qualquer lugar dos genes. SSCP, DGGE, cromatografia líquida de

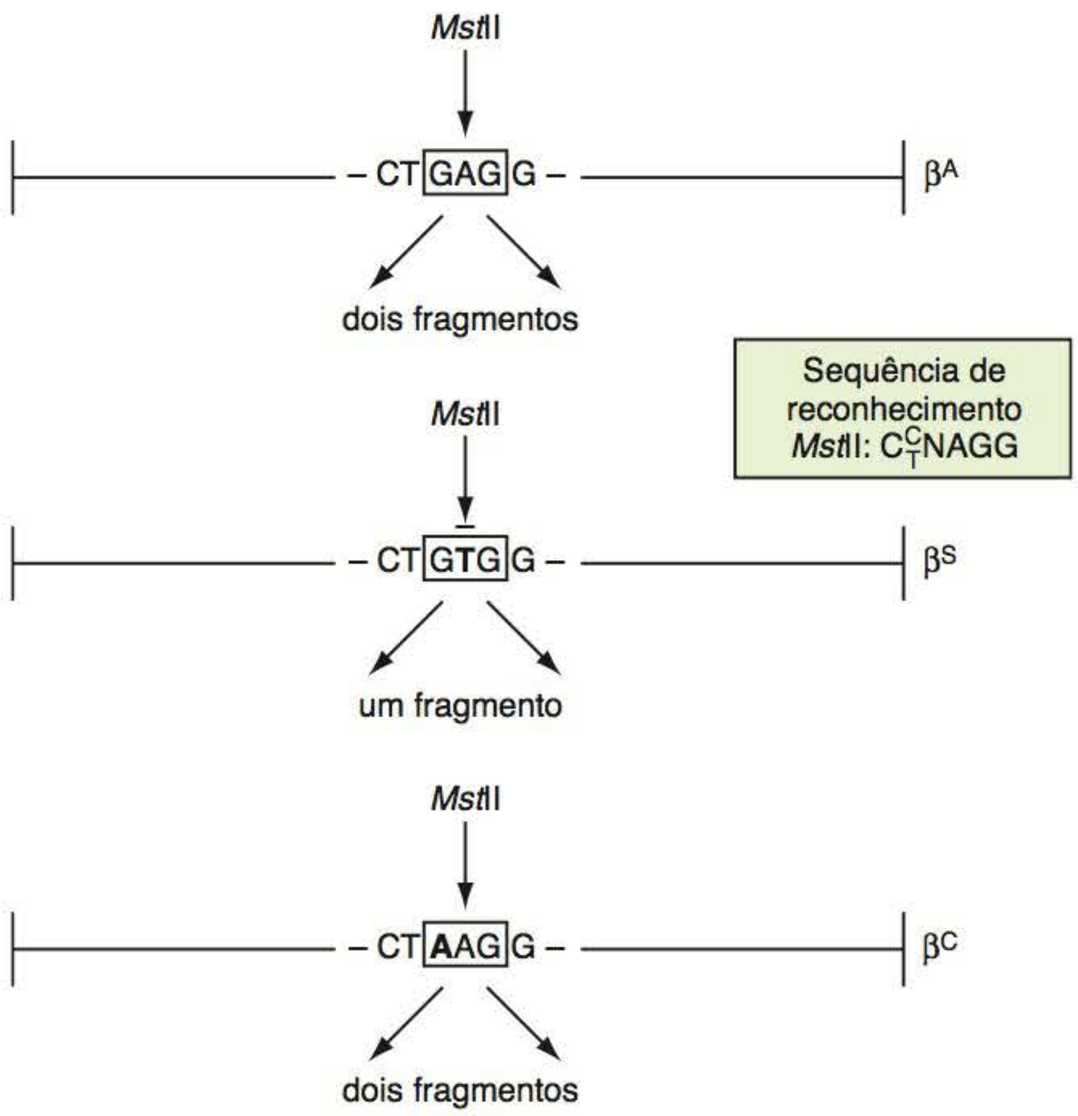


Figura 72.1 Exemplo esquemático de detecção de uma mutação de ponto por clivagem diferencial com uma enzima de restrição. Neste caso, a mutação falciforme, substituição de T por A no códon 6 do gene da globina β, destrói um local de clivagem MstII, de modo que a digestão de um produto da reação em cadeia da polimerase da região irá gerar dois fragmentos de DNA em indivíduos normais, mas apenas um fragmento nos homozigotos HbS. A mutação do primeiro nucleotídeo nesse códon, encontrado na doença da hemoglobina C, não destrói o local MstII (pois a enzima pode acomodar qualquer nucleotídeo nessa posição) e, portanto, não pode ser detectada por esse método.

alto desempenho com desnaturação (dHPLC) e outras variações do mesmo princípio teoricamente podem detectar mutações pontuais em qualquer parte de um gene, por causa da topologia alterada que os nucleotídeos substituídos induzem no DNA de fita única ou dupla desalinhada. Essas abordagens evidenciam a necessidade de sondas de ASO separadas e específicas para possível mutação, embora só possam ser realizadas em partes limitadas do gene amplificadas pela PCR (em geral éxons únicos ou partes de éxons) de uma vez e não são 100% sensíveis. O teste da proteína truncada detecta mutações que causam término prematuro do produto polipeptídico do gene, requer uma abordagem de transcrição/translação *in vitro* envolvida e só capta mutações "de parada" (e algumas variantes estruturais de desvio e junção), sobrepujando substituições simples de nucleotídeos comuns (mutações de sentido errado, *misense*). A única técnica que deveria ser 100% sensível para detectar todas as mutações pontuais possíveis, pelo menos na teoria, é o sequenciamento completo do DNA gênico, embora mesmo ele perca mutações fora dos alvos habituais da região (p. ex., em íntrons, promotores ou regiões intensificadoras).

Os distúrbios devidos à expansão gênica por uma mutação repetida de trinucleotídeo podem ser diagnosticados por *Southern blot* ou PCR, em qualquer caso observando-se um fragmento de DNA alvo maior do que o normal. Os distúrbios devidos a grandes deleções podem ser diagnosticados por *Southern blot* observando-se perda ou diminuição de tamanho de um fragmento, ou pela PCR, pela perda de um produto normalmente amplificado a partir daquele local ou pelo aparecimento de um novo fragmento "de junção".

No caso daqueles distúrbios com muitas mutações desconhecidas, ou um gene desconhecido, o diagnóstico preditivo pela análise de ligação é possível em certas famílias. Como a análise requer testes comparativos de outros irmãos e parentes acometidos e não acometidos, nem toda a família pode ser acessível ou informativa para essa abordagem. Também é necessário o conhecimento de marcadores polimórficos de DNA estreitamente ligados, de preferência flanqueando ou mesmo intragênicos, que possam ser observados cossegregando de forma consistente com o fenótipo normal ou da doença na família. Tradicionalmente, os marcadores usados têm sido polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição (RFLPs) detectados por *Southern blot*. Mais recentemente, polimorfismos microssatélites – sequências tandem de oligonucleotídeos de comprimento repetido variável – detectáveis pela PCR e por eletroforese em gel ou capilar tornaram-se preferíveis por sua abundância em todo o genoma, pela natureza multialélica de seus polimorfismos e pela relativa facilidade da metodologia do teste. Genes muito grandes, como aqueles da neurofibromatose e da distrofia muscular de Duchenne (DMD), em geral terão microssatélites intragênicos que podem ser acessados, minimizando as chances de recombinação entre mutação e o marcador.

As técnicas de ligação são menos favorecidas do que a abordagem de detecção direta de mutação, pela necessidade de testar múltiplos familiares e porque a recombinação meiótica entre o gene e o marcador pode interromper a fase aparente de ligação entre os pais e a prole, levando à interpretação de resultados falsos, tanto positivos como negativos. Para cada centimorgan de distância no mapa entre os dois *loci*, pode-se esperar 1% de recombinação (1 cM = 1 milhão de pares de bases [bp]). Por exemplo, na Figura 72.2 prevê-se que o feto será acometido, tendo herdado o mesmo fragmento RFLP do irmão previamente acometido. Mas se o local polimórfico da endonuclease de restrição testado estiver afastado 5 cM do gene doente, pode-se concluir que o feto tem 95% de risco de ser acometido.

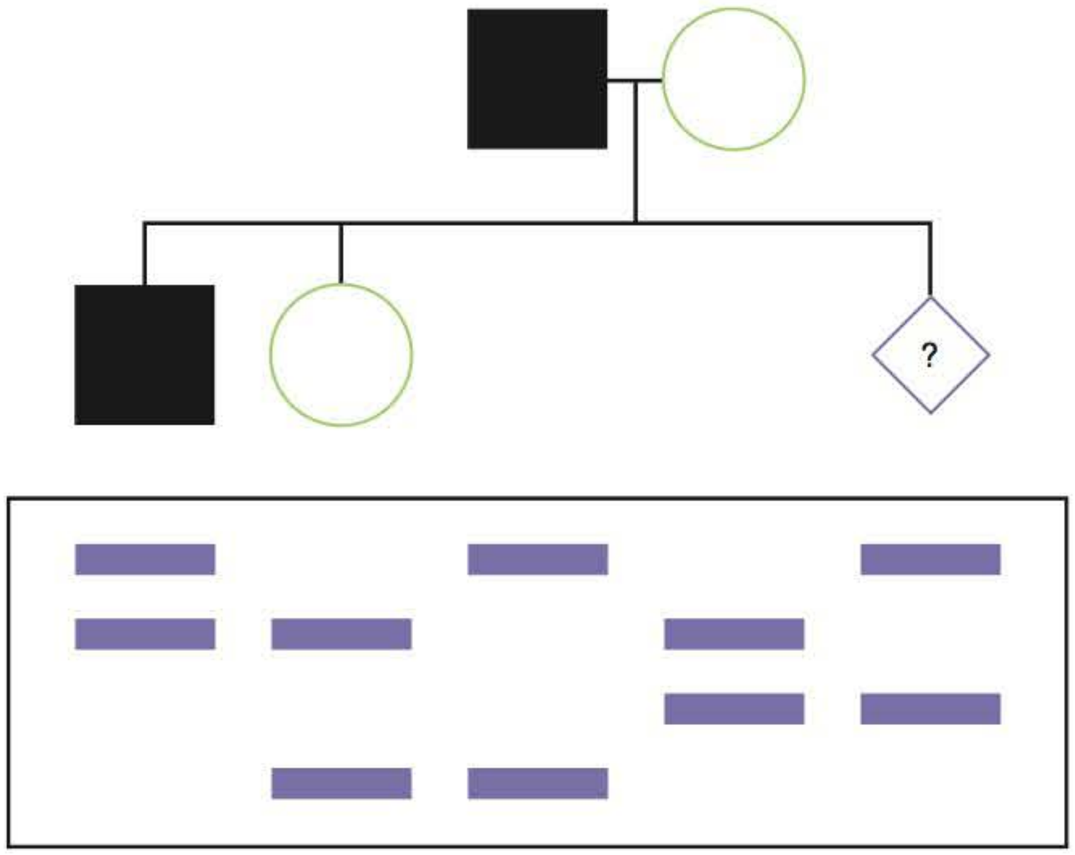


Figura 72.2 Exemplo de análise do comprimento do polimorfismo do fragmento de restrição para o diagnóstico pré-natal de um distúrbio autossômico dominante. Nesse *Southern blot*, a faixa superior do pai é a que cossegrega com o fenótipo da doença, como visto no filho acometido. Como o feto (?) também herdou essa faixa, prevê-se que será acometido. O risco exato depende da distância no mapa entre o gene da doença e o marcador do comprimento do polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP).

Seleção das aplicações

Até certo ponto, a escolha da técnica também vai depender da aplicação ou da indicação clínica. Na genética médica, essas aplicações enquadram-se em cinco áreas principais: triagem de portador, triagem de recém-nascidos, testes diagnósticos, testes pré-sintomáticos de DNA e testes pré-natais.

A *triagem de portadores* implica a detecção de mutações recessivas em indivíduos sadios para aconselhamento genético e planejamento familiar. Tal aplicação subdivide-se ainda na triagem dos indivíduos com histórico familiar do distúrbio e naquela baseada na população de grandes números de indivíduos com história familiar negativa, mas que podem estar em risco de ter o distúrbio por causa de sua prevalência no grupo étnico a que pertencem ou na população como um todo. Qualquer que seja o caso, a finalidade definitiva é identificar casais em risco (i. e., quando tanto o homem como a mulher são heterozigotos para mutações no gene), que então teriam uma chance de 25% de ter um filho acometido a cada gravidez. Mas as estratégias de teste escolhidas para os dois grupos diferem. Obviamente, uma pessoa cujo irmão tenha o distúrbio corre risco muito maior de ser portadora do que alguém da população geral. Portanto, aquela pessoa pode precisar de um teste mais agressivo (p. ex., triagem de um número maior de mutações ou possivelmente análise de ligação ou mesmo sequenciamento gênico completo) que seria efetivo com relação a alguém da população geral. Já o acesso ao DNA do irmão acometido pode permitir a identificação prévia da mutação, o que facilitaria bastante os testes subsequentes nos outros familiares. Em contraste, a triagem baseada na população em geral tenta manter o procedimento de teste o mais rápido e menos oneroso possível, focalizando talvez algumas das mutações mais prevalentes e sacrificando a sensibilidade clínica em nome da efetividade com relação ao custo e da conveniência do teste. E, naturalmente, com história familiar negativa, não existe a opção de membros acometidos para se fazer o teste de mutação em local único ou a análise de ligação.

Da mesma forma que a triagem de portadores baseada na população, a *triagem de recém-nascidos* visa identificar defeitos hereditários relativamente prevalentes (como são as doenças genéticas) em indivíduos assintomáticos nos demais aspectos. E, na verdade, as doenças que são alvos mais importantes, como a fenilcetonúria, a galactosemia, a anemia falciforme e a fibrose cística, provavelmente são distúrbios autossômicos recessivos. Entretanto, nesse caso, o objetivo é detectar os bebês acometidos no início da vida, de maneira que o tratamento (dietético ou farmacêutico) possa ser iniciado antes que ocorra dano irreversível. No momento em que escrevemos este texto, os métodos de genética molecular nesse contexto são empregados principalmente como um auxílio para confirmação de casos positivos confirmados por métodos bioquímicos ou enzimáticos menos dispendiosos e mais abrangentes, mas essa situação pode reverter no futuro, à medida que os métodos moleculares ficarem cada vez mais automatizados.

Por definição, um *teste genético diagnóstico* é realizado em um indivíduo sintomático. Como os testes de DNA para doenças genéticas são absolutamente específicos da doença, e as próprias doenças são bastante raras, esses procedimentos não são produtivos o suficiente para serem usados em diagnósticos diferenciais extensos; é preciso que os sintomas sejam suficientemente sugestivos do distúrbio em ques-

tão para justificar a solicitação do teste. O teste de DNA também deve ser comparado com métodos mais tradicionais em termos de custo, conveniência e utilidade. Por exemplo, a eletroforese da hemoglobina pode ser mais conveniente e abrangente para classificar uma hemoglobinopatia suspeita do que o teste específico de DNA para a mutação da doença falciforme. No entanto, os testes moleculares podem ser mais vantajosos ante apresentações clínicas iniciais ou atípicas. Por exemplo, o teste molecular para as mutações da fibrose cística pode ser realizado no período perinatal, quando a análise tradicional de cloreto no suor não é conveniente nem confiável. Os testes de DNA também têm a vantagem de funcionar bem após a morte, quando analisados bioquímicos clássicos não podem mais ser acessados.

O *teste pré-sintomático* de DNA é aplicado primariamente para distúrbios dominantes de início tardio, em que a prole de um genitor acometido está ciente de que corre 50% de risco de ter herdado o gene da doença e quer conhecer seu estado antes do início clínico, para tomar decisões informadas quanto a reprodução, emprego e estilo de vida ou iniciar a vigilância ou intervenções preventivas. Os distúrbios prototípicos desse grupo são a doença de Huntington e as síndromes de câncer hereditárias, embora doenças como a neurofibromatose, a síndrome de Marfan, a doença renal policística de adultos e a esclerose tuberosa também sejam relevantes. Esse tipo de teste era o mais problemático, tanto do ponto de vista psicossocial como ético, de qualquer outro diagnóstico genético molecular, com o risco de consequências adversas graves dos resultados relatados, inclusive suicídio. Por isso, os protocolos estabelecidos incluem estipulações para consentimento informado, avaliação clínica concomitante, aconselhamento extenso antes e após o teste, bem como apoio psicossocial (Huntington's Disease Society of America, 1989; American College of Medical Genetics, 1999).

Por fim, há a aplicação clínica mais distintiva da genética médica: o *teste pré-natal*, ou a detecção de doença no feto. Com poucas exceções (como a hidropsia fetal, a talassemia b homozigota, o nanismo tanatofórico e a osteogênese imperfeita do tipo I), a maioria dos distúrbios mendelianos, especialmente erros inatos do metabolismo, não se expressa de forma sintomática ou bioquímica no feto, de modo que o diagnóstico preditivo só pode ser feito no nível do DNA. Mesmo no caso dos distúrbios que poderiam ser detectados bioquimicamente, o DNA em geral prova ser o substrato mais acessível, de um ponto de vista obstétrico, do que os produtos proteicos afetados ou substratos metabólicos. Embora a análise molecular possa ser realizada com quantidades diminutas de amostras de líquido amniótico ou vilosidade coriônica colhidas por métodos rotineiros, mesmo se obtidas com outros propósitos, a menos que o produto proteico se expresse nos fibroblastos (e portanto nos amniócitos), a análise bioquímica vai requerer biópsia invasiva de tecidos fetais profundos. Por exemplo, para o ensaio da atividade da hidroxilase da fenilalanina para diagnosticar fenilcetonúria, seria necessária biópsia hepática fetal e, para a quantificação de distrofina para diagnosticar DMD, seria preciso biópsia muscular fetal.

Não se pode esquecer que o objetivo primário no diagnóstico pré-natal é a identificação de um feto acometido, em um momento em que a opção prática do término da gestação possa ser oferecida ao casal. Embora alguns argumentem que a obtenção do diagnóstico no período pré-natal seja uma vantagem, para que a terapia possa ser instituída logo ao nascimento, ou para tranquilização psicológica de um casal se o feto não estiver acometido, é difícil justificar o risco de aborto em decorrência da amniocentese e da obtenção de amostra de vilosidade coriônica (CVS) com tal finalidade. No caso de um feto acometido, a menos que se pretenda iniciar a terapia *in utero*, o tratamento provisório ao nascimento enquanto se aguarda o teste neonatal é perfeitamente aceitável.

Embora o aconselhamento genético pré-natal deva ser sempre neutro, não tendencioso, respeitando objeções morais e/ou religiosas ao aborto, tanto o conselheiro genético como o laboratório que faz o teste de DNA têm um direito legítimo e, na verdade, a responsabilidade de questionar a conveniência de solicitar um teste pré-natal, com seu risco e custo inerentes, de um casal para o qual o término da gravidez não é uma opção (o mesmo se aplicaria a pedidos muito tardios para interromper a gravidez). É por causa desses problemas que o teste pré-natal invasivo não é oferecido como um recurso de triagem na população geral em mulheres sem história familiar do distúrbio em questão. A capacidade da PCR de possibilitar a análise genética de uma única célula recentemente abriu o caminho para o diagnóstico pré-implantação, em geral abordado pela realização da fertilização *in vitro* e da microdissecção de um único blastômero a partir do embrião inicial. Essa estratégia, inicialmente aplicada a casos selecionados sob risco de fibrose cística (Handsyde, 1992) e outros distúrbios, poderia ser oferecida a qualquer casal sob risco para o qual o aborto não é uma opção, ainda que ela em si não esteja isenta de suas próprias objeções éticas (e econômicas).

Apesar desses dilemas médicos e morais, quando realizado nas circunstâncias apropriadas, o teste diagnóstico genético molecular pré-natal pode oferecer a casais em risco, muitos deles já tendo sofrido o trauma suficiente de ter pelo menos um filho acometido, um dos serviços mais valiosos de toda a medicina clínica.

Conceitos especiais exclusivos dos distúrbios genéticos moleculares

Embora as técnicas de análise do DNA discutidas neste capítulo para o diagnóstico de doenças genéticas em geral sejam as mesmas usadas para o diagnóstico molecular de câncer ou doenças infecciosas, sua aplicação no primeiro caso revelou vários fenômenos incomuns que não devem ser esquecidos ao se deparar com qualquer distúrbio hereditário. Alguns desses conceitos eram conhecidos desde os tempos de Mendel, mas agora podem ser entendidos de uma forma mecanicista no nível do DNA; outros surgiram muito mais recentemente, como subprodutos inesperados da dissecção molecular de doenças genéticas específicas.

Heterogeneidade molecular

Poucos distúrbios genéticos importantes estão associados a uma única mutação identificada de forma consistente em todos os casos acometidos (p. ex., a mutação de sentido errado no códon 6 do gene da globina β, causadora da doença falciforme). A grande maioria dos distúrbios genéticos pode ser causada por mais de uma mutação diferente – às vezes centenas – no gene da doença (p. ex., o gene *CFTR* da fibrose cística) e algumas vezes mesmo de mais de um gene (p. ex., os genes *TSC1* e *TSC2* de esclerose tuberosa, ou os genes *BRCA1* e *BRCA2* o câncer de mama/ovariano familiar). Obviamente, identificar as mutações causais em tais distúrbios é tecnicamente muito mais difícil ou às vezes impossível. Um corolário de tal heterogeneidade molecular é que nem todas as mutações irão causar doença igualmente grave: algumas podem causar apenas formas brandas ou mesmo síndromes relacionadas com pouca semelhança com o fenótipo clássico (p. ex., ausência isolada do ducto deferente, causada por certas mutações no gene *CFTR*, ou neoplasia endócrina múltipla ou doença de Hirschsprung causada por mutações diferentes no gene *RET*). Toda essa variabialidade aumenta muito a complexidade do aconselhamento genético e dos testes genéticos.

Penetrância e expressividade variável

Penetrância refere-se à proporção de indivíduos que, tendo uma doença de gene mutante, exibe o verdadeiro fenótipo da doença. Em geral aplicada a distúrbios dominantes, pode produzir o aspecto marcante de "salto de geração" nos heredogramas da doença. Isso pode complicar tanto o diagnóstico molecular quanto o aconselhamento genético, pois pode não ficar claro se o probante herdou a doença de um dos pais ou, em vez disso, representa uma nova mutação na família. É um aspecto de tais distúrbios genéticos relativamente comuns como a síndrome de Marfan e a neurofibromatose, ambas com os respectivos genes já identificados, mas ainda não de fácil detecção direta rotineira direta a ponto de poder substituir a análise de ligação ou técnicas de varredura da mutação na maioria dos casos.

Expressividade variável refere-se ao surgimento de sinais e sintomas diferentes de um distúrbio em indivíduos que herdaram a(s) mesma(s) mutação(ões). Como a penetrância, é provável que seja um reflexo de efeitos gênicos diferenciais dentro de fundos genéticos dessemelhantes (em outras palavras, a modulação da expressão fenotípica por outros genes não alélicos). Também é difícil de averiguar e aconselhar a respeito, além de levantar questões éticas sobre o aborto no caso de doenças de gravidade variável e imprevisível.

Crossing over

Esse fenômeno de recombinação meiótica entre cromossomos homólogos é, além de uma mutação aleatória, a principal força que vai além da diversidade genética e da evolução em organismos que se reproduzem de forma sexuada. Sua importância no diagnóstico genético molecular baseia-se na ruptura de uma ligação entre um gene de doença e um marcador polimórfico próximo, gerando diagnósticos falsos tanto positivos quanto negativos nos distúrbios testados por análise de ligação. Como discutido antes, o risco pode ser minimizado escolhendo-se marcadores mais estreitamente ligados ao gene da doença ou internos a ele. Isso tornou-se muito mais viável à medida que o mapa do genoma humano ficou saturado com polimorfismos repetidos *tandem* que podem ser acessados facilmente com iniciadores de PCR.

Dissomia uniparental

Essa causa incomum de um distúrbio recessivo de um único gene foi descoberta pela primeira vez em um paciente com fibrose cística, que tinha apenas um dos pais como portador (Spence, 1988). Pela haplotipagem do DNA com marcadores polimórficos, mostrou-se que o paciente tinha duas cópias herdadas do cromossomo 7 do genitor portador, contendo o gene mutante da fibrose cística e nenhum cromossomo 7 do outro genitor. Desde então, o fenômeno foi observado em outros casos de fibrose cística e doenças envolvendo outros cromossomos também. Em algumas doenças, como as síndromes de Prader-Willi e Angelman (ver adiante), a incidência de dissomia uniparental aproxima-se daquela de mecanismos clássicos de mutação na patogênese molecular, justificando o teste rotineiro para esse fenômeno.

Imprinting

Refere-se à expressão diferencial de um gene em uma prole, dependendo se foi herdado da mãe ou do pai, ou às vezes sobre outras influências genéticas (Hall, 1999). Alguns genes apenas se expressam ou então se desviam quando passam através da linhagem de oócitos, enquanto outros apenas quando passam através da linhagem de espermatócitos. Se um indivíduo herda o alelo normal através da linhagem parental que não se expressa, ele não pode se contrapor a uma mutação recessiva herdada do outro genitor. Em pelo menos alguns casos, o mecanismo molecular parece ser a metilação diferencial de regiões cromossômicas e elementos reguladores. Essa é a base tanto dos casos de dissomia por deleção quanto uniparental das síndromes de Prader-Willi e Angelman (ver adiante).

Antecipação

Esse termo refere-se a um aumento progressivo na gravidade e/ou na idade de início de um distúrbio genético em gerações subsequentes de uma família, estando tipicamente associado a distúrbios de nucleotídeos repetidos, como a distrofia miotônica e a síndrome do X frágil, em que um aumento na gravidade pode ser correlacionado com maior expansão da região repetida. Na distrofia, especialmente em casos graves que começam na infância ou ainda em lactentes, os recém-nascidos tinham mães afetadas, o que lembra a influência também do *imprinting* (Lopez, 1994). Observa-se o inverso na doença de Huntington, em que é mais provável ocorrer a expansão da repetição do *triplet* quando herdada do pai. É por essas razões que o tamanho molecular preciso do comprimento dos trinucleotídeos repetidos é tão importante para o diagnóstico e o aconselhamento genético nesses distúrbios.

Influências epigenéticas e herança não mendeliana

As alterações epigenéticas são hereditárias, mas potencialmente reversíveis na expressão gênica, de modo que não representam uma alteração na sequência do DNA genômico da célula. Os exemplos mais marcantes de herança epigenética são o *imprinting* genômico (já comentado) e a inativação do cromossomo X em mamíferos, ambos envolvendo o silenciamento transcricional de genes por metilação de citosinas nos nucleotídeos CpG. O estado de metilação do DNA é mantido após a replicação do DNA por metilases, que agem sobre a fita dupla hemimetilada do DNA, metilando também a nova tira de DNA sintetizada. O processo é perpetuado indefinidamente nas divisões celulares sucessivas. Evidência recente sugere que pode ocorrer metilação *de novo* de duplas de CpG nos promotores de alguns genes supressores tumorais, silenciando esses genes e, em essência, constituindo um ou ambos os "*hits*" nesse gene supressor tumoral, que leva ao desenvolvimento do tumor (Jones, 1999).

Outra categoria de herança epigenética entendida com menos clareza envolve a propriedade de algumas proteínas de influenciar a conformação de proteínas recém-sintetizadas ou montadas, como uma forma de autoperpetuação. Os exemplos mais notáveis em mamíferos são as doenças priônicas, responsáveis pelo prurido lombar dos ovinos (*scrapie*) e pela encefalopatia espongiforme bovina em animais e o *kuru* e a doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos. A proteína priônica causadora de doença, que pode resultar de uma mutação na sequência do código em casos familiares, dobra-se em uma conformação anormal e exerce um efeito de príons recém-sintetizados, de maneira que perpetua e prolifera a anormalidade conformacional causadora de doença.

Frequências alélicas e triagem populacional em massa

Já fizemos referência à aplicação da triagem de portadores de mutações recessivas em uma população. Para justificar isso em termos de saúde pública, o esforço e o gasto necessários para realizar um teste de DNA em milhares ou milhões de pessoas, é preciso que a incidência da doença seja bastante alta, em toda a população ou no(s) grupo(s) étnico(s) particular(es) destinado(s) à triagem. No caso de qualquer doença autossômica recessiva de incidência apreciável, a lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg prevê que a frequência de portadores será bem maior do que a prevalência de indivíduos acometidos. Além disso, a doença candidata a alvo precisa ser grave o bastante e/ou passível de alguma intervenção clínica após sua identificação. Agora parece que vários distúrbios se enquadrariam nesses critérios. As mutações associadas à hemocromatose hereditária e à resistência à proteína C ativada (fator V de Leiden) são encontradas em 5 a 10% da população de origem caucasiana (branca), enquanto a frequência da mutação para a anemia falciforme aproxima-se de 10% da população afro-americana. Infelizmente, controvérsias sobre a penetrância das duas primeiras doenças e questões econômicas e sociais complexas da terceira limitaram a aplicação da triagem desses genes (Grody, 2003a; Imperatore, 2003). A triagem para talassemia nas populações mediterrâneas e asiáticas, bem como um painel de distúrbios recessivos como a doença de Tay-Sachs e a de Gaucher em judeus asquenazes, também se justificam por frequências alélicas no grupo alvo. As mutações da fibrose cística, embora de frequência mais baixa, potencialmente representam uma maioria de casais norte-americanos que foram escolhidos como primeiro alvo de triagem genética molecular na população geral nos Estados Unidos da América (ver adiante). Esse impulso dos testes genéticos moleculares, além do âmbito das doenças raras ou pouco conhecidas e no contexto de traços comuns, terá um efeito profundo sobre a medicina preventiva e a saúde pública, levando a novos avanços na automatização dos testes de DNA nos próximos anos.

Exemplos específicos de doenças

Fibrose cística

Diante da alta frequência de portadores na América do Norte e no norte da Europa, sua natureza clínica séria, seu padrão de herança indiscutivelmente mendeliano (autossômico recessivo) e seu gene bem estudado, embora bastante complexo, a fibrose cística tornou-se o paradigma de distúrbio para triagem genética molecular em larga escala. Nesse âmbito, é possível encontrar uma ampla gama de técnicas genéticas moleculares e todo o espectro de dilemas científicos e éticos, derivados da variabilidade clínica da doença, da heterogeneidade molecular extrema das mutações causais e do advento de novos tratamentos, inclusive a terapia de reposição genética. Com uma frequência de portadores tão alta como um em cada 29 caucasianos de ascendência norte-europeia (e progressivamente menos do sul da Europa, de hispânicos, afro-americanos e asiáticos), houve uma grande motivação para triar parentes de pacientes e até mesmo a população geral, para identificar casais sob

risco de terem um filho acometido em cada quatro gestações. Mas como os portadores são assintomáticos e têm níveis normais de cloreto no suor, foi preciso esperar o isolamento do gene em 1989 (Kerem, 1989; Riordan, 1989). Embora o gene tenha sido mapeado no cromossomo 7 alguns anos antes, permitindo o diagnóstico pré-natal pela análise de ligação em famílias informativas, a triagem e o teste em outras, especialmente aquelas sem histórico familiar do distúrbio, só poderia ser considerado assim que fosse clonado, e as mutações fossem identificadas.

No entanto, mesmo com o consentimento louvável, a história do teste de DNA para a fibrose cística teve problemas e controvérsias. O gene tem mais de 250.000 bps de comprimento e codifica uma grande proteína de canal iônico denominada reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (Collins, 1992). O mais notável é que o espectro de mutações observadas é acentuadamente heterogêneo. Embora uma deleção de três nucleotídeos do códon 508 da fenilalanina (designado DF508) seja responsável por cerca de 70% das mutações em caucasianos não hispânicos (e significativamente menos em outros grupos étnicos), mais de 1.300 mutações adicionais também foram relatadas, a maioria delas tão rara que não é viável nem efetivo com relação ao custo incluí-las nos painéis de teste; apenas cerca de sete (além do DF508) são responsáveis por mais de 1% de cada mutação da fibrose cística na maioria das populações de origem caucasiana (Tsui, 1992) (Tab. 72.1). A sensibilidade da triagem de portadores com painéis de mutação entre seis e 25 alelos varia de 97% em judeus asquenazes (Abeliovich, 1992) a 75 a 90% nos norte-americanos caucasianos não asquenazes, cerca de 60% em hispano-americanos, 50% em afro-americanos e menos de 10% em asiáticos (Ober, 1992; Grebe, 1994; Macek, 1997). Tal sensibilidade variável e subótima em uma população etnicamente heterogênea como a dos Estados Unidos e as dificuldades envolvidas no aconselhamento de pacientes quanto ao risco residual de serem portadores ante um teste negativo tornaram a triagem populacional de portadores de mutações para a fibrose cística um assunto polêmico (Wilfond, 1990; Grody, 1999). Após muito debate e vários estudos pilotos de triagem, uma conferência de consenso recomendou que a triagem seja oferecida a todos os casais com a mulher em gestação e às que estejam planejando engravidar (NIH Consensus Statement Online, 1997). Um comitê representando o American College of Medical Genetics, o American College of Obstetricians and Gynecologists e o National Human Genome Research Institute decidiu criar um painel de triagem central com as 25 mutações mais prevalentes na população geral mista (Grody 2001a). O mesmo grupo elaborou materiais educativos acompanhantes, orientando os obstetras sobre como oferecer os testes de triagem, folhetos para orientação também dos pacientes e tabelas determinando o risco residual naqueles com testes negativos.

Com o lançamento dessas diretrizes em 2001, a análise de mutação do *CFTR* tornou-se instantaneamente o teste genético molecular de maior peso e um dos principais no diagnóstico molecular. Diante de tal mercado, os fabricantes de reagentes e instrumentos criaram uma variedade de ensaios e plataformas, agora substituídos em ampla escala pelos métodos domésticos antes empregados pelos laboratórios. Os métodos comerciais, que incorporam pelo menos o painel central de 25 mutações, e às vezes mais, incluem sondas de ASO em tiras de papel (Fig. 72.3), ARMS, OLA, ensaio Invader, microcontas e microestruturas (Richards, 2004). Além disso, o sequenciamento gênico completo é oferecido em alguns laboratórios (Strom, 2003), embora seja muito caro para a triagem geral de portadores e usado principalmente para ajudar no diagnóstico de casos de fibrose cística atípica ou identificar

Tabela 72.1 Painel central de mutações recomendado para a triagem de portadores de fibrose cística na população geral

ΔF508	ΔI507	G542X	G551D	W1282X	N1303K
R553X	621+1G>T	R117H	1717–1G>A	A455E	R560T
R1162X	G85E	R334W	R347P	711+1G>T	1898+1G>A
2184delA	1078delT*	3849+ 10kbC>T	2789+5G>A	3659delC	I148T*
3120+1G>A					

Painel recomendado pelo American College of Medical Genetics (Grody, 2001a).

* Mutações subsequentemente removidas do painel (Watson, 2004).

mutações parentais na prole acometida de modo a possibilitar o diagnóstico pré-natal em gravidezes futuras.

Mesmo anos após o lançamento, o programa de triagem de portadores de fibrose cística continua a ser um desafio tanto para os obstetras quanto para os laboratórios que fazes testes genéticos. Continua a haver dúvidas sobre a captação, a comunicação dos resultados, a utilidade de oferecer painéis de mutação extensos (especialmente para casais com testes positivos e negativos à triagem inicial) e mesmo quais mutações incluir no painel central. O painel já foi modificado uma vez, após a data inicial da triagem nacional e indicou que uma das mutações (1078delT) era mais rara que se pensava, e outra (I148T) não era uma mutação em si, mas um polimorfismo benigno, de maneira que ambas tiveram de ser excluídas (Watson, 2004).

Outro problema com o aconselhamento genético para a fibrose cística é a gravidade clínica variável do distúrbio e a inconsistência das relações entre o genótipo e o fenótipo. Além do achado de que os homozigotos DF508 tendem a ter insuficiência pancreática, pouco sobre a gravidade da doença ou complicações dela pode ser previsto com confiança a partir do conhecimento de duas mutações em um indivíduo acometido (Cystic Fibrosis Genotype–Phenotype Consortium, 1993). Mesmo os homozigotos para DF508, considerada o protótipo da mutação "grave", podem exibir uma grande variedade de comprometimento pulmonar (Burke, 1992). Em contrapartida, há mutações que causam doença pulmonar com níveis normais de cloreto no suor (Highsmith, 1994) e há outras e polimorfismos (como R117H e um traço intrônico politimidina) que não causam fibrose cística, mas sim infertilidade masculina em decorrência da ausência congênita do ducto deferente (Anguiano, 1992; Gervais, 1993). Ao considerarmos esses fatores junto com a sobrevida mediana dos pacientes com fibrose cística e o eventual advento de terapias gênicas de reposição efetivas, o aconselhamento genético e a tomada de decisão dos pais em relação a esse distúrbio são bastante difíceis. Ante a heterogeneidade molecular e clínica da maioria dos distúrbios genéticos, é provável que esses problemas provem ser a regra, e não exceção, no diagnóstico genético molecular.

Distrofia muscular de Duchenne

Essa miopatia progressiva ligada ao X foi o primeiro distúrbio cujo agente causal foi isolado pelo processo de clonagem posicional (Rowland, 1988). Antes de tal descoberta, o únicos testes que podiam ser oferecidos a famílias em risco eram da detecção de algumas mulheres portadoras (mas nem todas) pelo achado de níveis séricos elevados de creatinofosfocinase, seguido pelo da determinação pré-

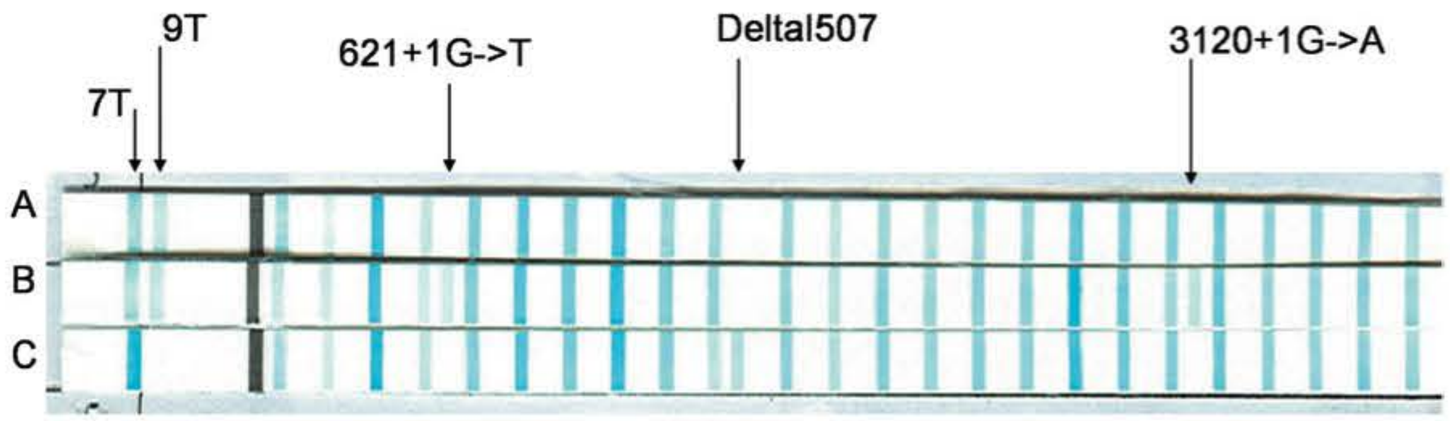


Figura 72.3 Tiras de hibridização reversa (Roche Molecular Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) contendo sondas de oligonucleotídeos específicas do alelo para 25 mutações do *CFTR*, recomendadas pelo American College of Medical Genetics e sequências normais correspondentes, mais os traços de alelos intrônicos poliT 5T, 7T e 9T. Os genótipos são: A, tipo selvagem 7T/9T; B, heterozigoto composto 621+IG>T/3120+IG>A 7T/9T; C, heterozigoto deltal507 7T/7T.

-natal do sexo com a opção de abortar um feto masculino (mesmo que 50% dessas gestações fossem normais). O aconselhamento genético tornou-se ainda mais problemático porque cerca de um terço dos casos de DMD surge de novas mutações.

Mesmo após a descoberta, a aplicação clínica não foi fácil, porque o gene, também conhecido como da "distrofina", provou ser ainda maior ao ser descoberto, com 2,4 milhões de bps e composto por 79 éxons (Ahn, 1993). O uso de sondas de cDNA de comprimento total ou parcial para detectar a variedade de deleções responsáveis pelos 2/3 dos casos foi trabalhoso e demorado (Darras, 1988; Prior, 1991). Só com o advento da PCR multiplex, descrita no Capítulo 67, o sistema foi desenvolvido para a identificação rápida e não onerosa de mais de 98% das deleções da distrofina e sua localização nos éxons específicos do gene (Beggs, 1990; Multicenter Study Group, 1992). Nesse sistema, identifica-se uma deleção pela ausência de um ou mais dos *amplicons* esperados na eletroforese em gel de brometo de etídio ou com instrumentos de eletroforese capilar (pois uma deleção do gene visado irá abolir o(s) local(is) de hibridização de um ou mais iniciadores, causando falha da PCR) (Fig. 72.4). Tal mapeamento estrutural refinado, combinado com o sequenciamento, também revelou descobertas importantes sobre a patogênese molecular da DMD e da variante alélica mais branda, a distrofia muscular de Becker (DMB). Embora ambas sejam causadas mais frequentemente por grandes deleções da distrofina, as da DMB tipicamente preservam a leitura correta da estrutura no transcrito processado resultante, enquanto as deleções na DMD resultam com maior frequência em mutações estruturais e um produto proteico mais truncado (Monaco, 1988).

Em geral, no terço restante de pacientes com DMD e em 15% daqueles com DMB em que não há deleção, são detectadas mutações pontuais ou microdeleções/inserções. Como o gene é muito grande, não é fácil identificar essas lesões diretamente, embora se use a varredura do gene pela análise conformacional (SSCP, DGGE) seguida pelo sequenciamento (Prior 1995; Mendell, 2001). Se isso falhar, deve-se fazer a análise da ligação. Essa abordagem é possível apenas em famílias informativas, em que o DNA de indivíduos previamente acometidos esteja disponível para estudo. Os protocolos iniciais confiavam nos marcadores de RFLP flanqueando o gene da distrofina; mais recentemente, marcadores intragênicos microssatélites levaram à haplotipagem mais rápida e acurada do cromossomo, baseada na PCR (Darras, 1987), embora ainda haja um risco de resultados falsos por causa de eventos de *crossing-over*, devido ao grande tamanho do gene. Como alternativa, podem ser feitos estudos no nível de proteína observando-se diminuição ou ausência da distrofina na DMD, distrofina de peso molecular anormal na DMB, por *Western blot* ou imuno-histoquímica de tecido de biópsia muscular (Hoffman, 1988). Esse procedimento tem limitações para o diagnóstico pré-natal, em que seria necessária a biópsia de músculo fetal, mas pode ser empregado nesse contexto e para diagnóstico do probando. Portanto, o diagnóstico molecular de DMD completou o círculo: da identificação do gene sem conhecimento do produto proteico ("genética reversa") à identificação e ao uso diagnóstico do produto proteico a partir do conhecimento do gene. Pode-se esperar esse tipo de evolução no diagnóstico laboratorial de muitas doenças genéticas, pois os estudos funcionais de um produto gênico são por definição mais abrangentes que a tentativa de rastrear incontáveis mutações individuais no nível do DNA.

Anemia falciforme e outras hemoglobinopatias

Dada a longa história do estudo do produto proteico, o diagnóstico de defeitos moleculares nos genes que codificam os polipeptídeos da globina não poderia ser feito por técnicas de "genética reversa"; em vez disso, esses genes foram clonados por métodos clássicos, usando anticorpos antiglobina para precipitação polissômica para isolar os ácidos nucleicos mensageiros relevantes (mRNAs). Como tais, as mutações da hemoglobina, e a que causa anemia falciforme em particular, estão entre as primeiras a serem diagnosticadas no nível do DNA. Como acontece, a mutação pontual falciforme no códon 6 do gene da globina b fica dentro (e portanto destrói) de um local de clivagem da endonuclease de restrição (para *Ms*II ou DdeI), proporcionando um método rápido de detecção por *Southern blot* ou digestão da enzima de restrição dos produtos da PCR da globina b (Hatcher, 1992) (Fig. 72.1). Como alternativa, as sequências da hemoglobina S e da hemoglobina A podem ser distinguidas por uma mancha em forma de ponto usando-se sondas complementares de oligonucleotídeos específicas do alelo para cada sequência normal ou mutante (Conner, 1983). Essas técnicas baseadas no DNA podem ser empregadas para o diagnóstico, a triagem de portadores ou o diagnóstico pré-natal em amniócitos, no último caso evidenciando a necessidade de obter-se uma amostra invasiva de sangue fetal e da eletroforese clássica da hemoglobina. Além disso, à medida que um número maior de estados norte-americanos inicia programas de triagem de recém-nascidos para anemia falciforme, mesmo por métodos bioquímicos, o teste de DNA torna-se importante para confirmação de resultados de triagem positivos ambíguos, como nos estados compostos heterozigotos envolvendo HbS e uma mutação de talassemia. Vários estudos mostraram que esses testes de DNA podem ser feitos nas mesmas manchas de sangue em papel de filtro colhido para a triagem inicial do recém-nascido (McCabe, 2004). Uma mutação diferente no códon 6, causando doença da hemoglobina C, não abole a sequência de reconhecimento da endonuclease de restrição (porque ela ocorre em uma posição flexível do nucleotídeo para a enzima) e, portanto, precisa ser distinguida por sondas de ASO (Maggio, 1993).

As talassemias envolvem alterações qualitativas e quantitativas em uma ou mais cadeias da globina, e seu diagnóstico em nível molecular é correspondentemente mais complexo que o da anemia falciforme. A talassemia a é a mais marcante, pois em geral é causada pela deleção de um ou ambos os genes a contíguos em um ou outro ou ambos os cromossomos 16. Isso pode ser detectado por *Southern blot* ou PCR, permitindo a diferenciação do estado de portador silencioso (um gene a perdido) daquele da hidropsia fetal muito grave (perda de todos os 4 genes) e dos dois estados intermediários (Oron-Karni, 1998). O diagnóstico molecular de talassemia b é mais complicado por causa da ampla variedade de mutações documentadas no promotor, no término, deleção, no local de união e estruturais. Entretanto, em cada população de risco (mediterrânea, asiática, africana), um subconjunto limitado de mutações (em geral 10 ou menos) é responsável pela maioria dos casos e de portadores. Portanto, o teste com um painel de sondas/iniciadores específicos de mutação, junto com linhas de triagem de fibrose cística, é razoável (Naja, 2004). Além disso, o gene da globina β não é grande, de modo que também se pode recorrer ao sequenciamento ou à varredura gênica.

Trombofilias hereditárias

A fibrose cística não é o único distúrbio com frequência de mutação alta o suficiente para se considerar a triagem da população por méto-

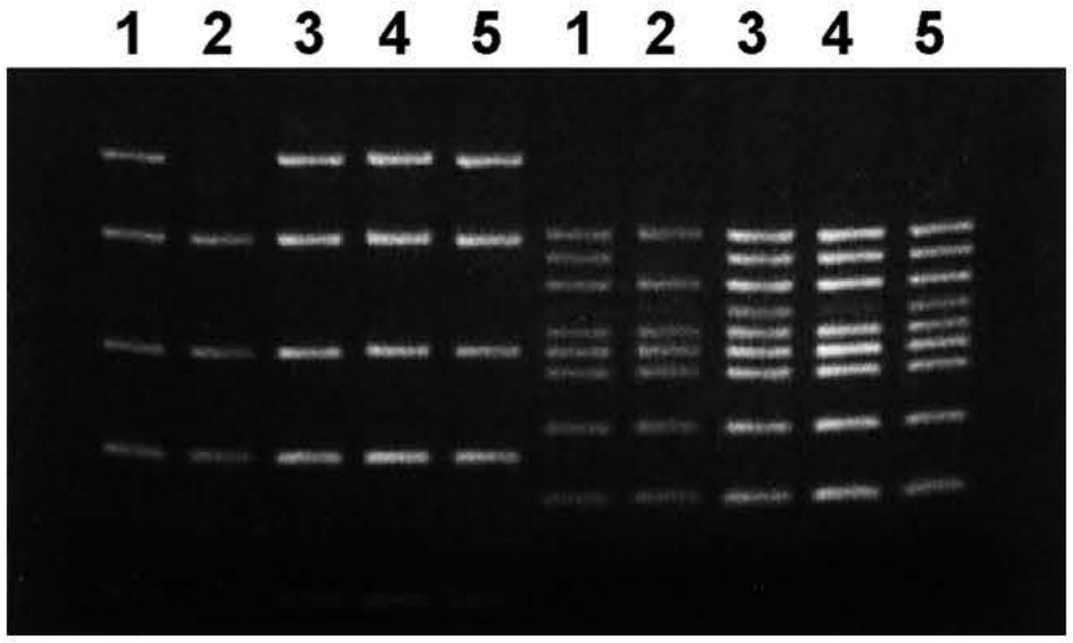


Figura 72.4 Análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para deleções no gene da distrofina na distrofia muscular de Duchenne. Amostras de DNA de cinco pacientes foram amplificadas simultaneamente com cinco pares de iniciadores (metade esquerda do gel) e nove pares de iniciadores (metade direita do gel) e os produtos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida. A ausência de uma faixa esperada de produto da PCR é indicativa de uma deleção. O paciente 2 não tem o alto da faixa no quinto plex e a segunda a partir do alto no nono, correspondendo a deleções nos éxons 50 e 48, respectivamente, no gene da distrofina. (A faixa 4 no nono plex é leve, mas está presente em todas as amostras.) (Cortesia da Dra. Kathryn E. Kronquist.)

dos moleculares. Várias outras doenças genéticas mostraram frequências de portador de ordem de magnitude pelo menos maior do que a fibrose cística. Incluídos nesse grupo estão genes envolvidos no sistema anticoagulante que, conforme discutido no Capítulo 41, controla a cascata da coagulação. O mais notável de tal alelo é a mutação do fator V de Leiden, uma alteração em um único nucleotídeo que causa uma substituição de aminoácido (R506Q) na proteína da coagulação fator V, tornando-a resistente à clivagem pela proteína C ativada (Bertina, 1994). O alelo está presente em 5 a 7% da população caucasiana e é responsável por mais de 90% da resistência clínica à proteína C ativada (APC), resultando em uma tendência a tromboembolismo venoso idiopático (Ridker, 1997a). Isso acarreta um risco relativo de trombose de cerca de sete vezes no estado heterozigoto e cerca de 80 vezes no estado homozigoto. Também está associado a complicações da gravidez, como aborto recorrente. O teste para a mutação é direto porque, como a mutação falciforme, destrói um local de endonuclease de restrição (Fig. 72.5), tendo sido desenvolvidos métodos automatizados para melhor processamento, como a PCR em tempo real (Louis, 2004) e o ensaio 'Invader', que se baseia na amplificação do sinal por transferência de energia fluorescente por ressonância (FRET) e uma enzima de clivagem (Ryan, 1999), conforme descrito em detalhes no Capítulo 67.

Contudo, como na fibrose cística, há controvérsias sobre a que pacientes oferecer-se a triagem. Apesar do aumento acentuado do risco relativo, o risco absoluto conferido por essa mutação é muito baixo, com uma penetrância ao longo da vida de sintomas trombóticos de cerca de 10%. Portanto, a maioria dos portadores não seria candidata à terapia anticoagulante, com seu risco de hemorragia e acidente vascular encefálico, e assim é incerto se a triagem alteraria o tratamento do paciente de forma significativa. Alguns propuseram triar indivíduos com fatores de risco ambientais conhecidos como atuantes sinergicamente com o risco do fator V de Leiden, como mulheres usuárias de anticoncepcionais orais. Mesmo assim, é questionável se obrigar uma mulher com um teste positivo a usar métodos de controle da natalidade menos efetivos causaria mais danos que benefícios, aumentando a taxa de gravidez com suas próprias complicações inerentes – algumas, ironicamente, de natureza trombótica (Kupferminc, 1999). No momento, a maioria dos pedidos recebidos pelos laboratórios de genética molecular para testar o fator V de Leiden é de pacientes que já tiveram um evento tromboembólico inexplicado de outra maneira, e duas afirmações de consenso profissional, da American College of Medical Genetics (ACMG) e do College of American Pathologists, designaram isso como uma indicação inequívoca primária para teste (Grody 2001b; Press, 2002).

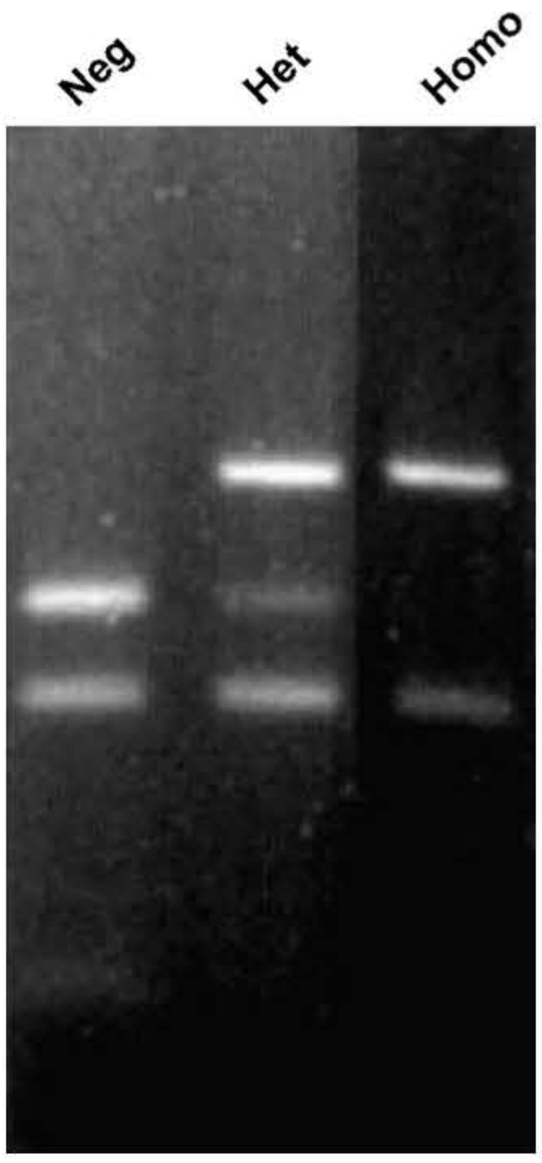


Figura 72.5 Exemplo de análise eletroforética pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de mutação do fator V de Leiden. O fragmento amplificado pela PCR do gene do fator V no códon 506 irá conter dois locais de clivagem de restrição *Mnl*I sites no DNA normal, mas apenas um se a mutação R506Q, que destrói um dos locais, estiver presente. Os padrões resultantes de digestão da restrição irão mostrar duas, três ou quatro bandas, respectivamente, dependendo se a mutação for homozigota (à direita), ausente (à esquerda) ou heterozigota (no meio). Quanto mais curto o fragmento, migrando perto do fundo da foto de gel, mais difícil vê-lo.

Além do fator V de Leiden, há outras mutações hereditárias de alta frequência alélica que conferem risco trombótico, como também foi discutido no Capítulo 41. A variante da protrombina 20210A, uma alteração única em nucleotídeo na região 3' não traduzida do gene da protrombina, resulta em aumento dos níveis circulantes de protrombina e um fenótipo similar ao do fator V de Leiden, estando presente em 1 a 2% da população geral (Poort, 1996). A variante 677C→T da metilenotetraidrofolato redutase, enzima envolvida no ciclo do folato do metabolismo da homocisteína, está presente em 30 a 40% da população geral e é associada a níveis plasmáticos elevados de homocisteína e risco de trombose vascular (inclusive de artéria coronária). As indicações para esse teste são um tanto obscuras, porque ninguém com a variante teve hiper-homocisteinemia nem todos os casos desse problema são causados por essa variante. Assim, a estimativa bioquímica dos níveis plasmáticos de homocisteína pode ser um método de triagem mais efetivo. Além disso, a suplementação dos alimentos com folato pode tornar o fator genético menos relevante, ao reduzir bastante os níveis de homocisteína na população. Ainda, as mutações para cada um desses fatores pode agir de forma sinérgica entre si, de modo que pacientes com dois ou mesmo três desses defeitos, incluindo também as deficiências mais raras de proteínas C e S, correm risco muito maior (Koeleman, 1994; Ridker, 1997b). Os testes de DNA para várias dessas mutações de trombofilia podem ser reunidos em um único ensaio (Louis, 2004).

Distúrbios da expansão de trinucleotídeos repetidos

Uma classe importante de mutações causadoras de doença foi revelada em 1991, com a descoberta de que a atrofia muscular espinal e bulbar ligada ao X (doença de Kennedy, AMEB) e a síndrome do X frágil (FRAXA) estão associadas à amplificação de sequências de repetição de trinucleotídeos instáveis nos genes receptores de androgênio (AR) e *FMR1* ("retardamento mental pelo X frágil"), respectivamente. Desde então, mutações semelhantes causadoras de doença têm sido associadas a vários outros distúrbios neurológicos e musculares (resumidos na Tab. 72.2), tendo sido elaborada uma classificação molecular das ataxias espinocerebelares. O gene afetado em cada um desses distúrbios normalmente contém uma sequência repetida de 3 bps – por exemplo, $(CGG)_n$ no gene *FMR1* –, em que *n* é variável, mas normalmente limitado nessa faixa. No entanto, em caso de doença, o tamanho do *triplet* repetido expande-se para fora da faixa normal, às vezes apenas ligeiramente e, em outras circunstâncias, de maneira acentuada. Os mecanismos pelos quais essas sequências repetidas expandidas causam doença são vários e incluem gene silencioso e ganho tóxico de função por proteínas mutantes.

Síndromes do XA frágil e do XE frágil

A FRAXA é o defeito mais comum de um único gene que causa retardamento mental moderado a grave em indivíduos do sexo masculino. Os indivíduos acometidos com esse distúrbio ligado ao X tipicamente exibem aspectos dismórficos, inclusive orelhas grandes, face alongada, mandíbula proeminente e macro-orquidismo. Aproximadamente 1 em 2.500 pessoas do sexo feminino são portadoras heterozigotas da mutação FRAXA, e um terço delas pode exibir evidência de comprometimento mental ou dificuldade de aprendizado na ausência do dismorfismo clássico visto nos indivíduos do sexo masculino acometidos.

Conforme explicado no Capítulo 69, a característica citogenética da FRAXA é um "sítio frágil" no cromossomo X, em Xq27.3, resultante de uma falha de condensação da cromatina normal durante a mitose. Embora o padrão de herança da doença seja claramente ligado ao X, não corresponde nitidamente a um padrão recessivo ou dominante de expressão gênica. O aspecto mais confuso tem sido a existência de

Tabela 72.2 Distúrbios que se caracterizam por expansões instáveis de repetições de trinucleotídeos do DNA

Distúrbio	Localização do cromossomo	Alelos normais, alelos intermediários	Alelos expandidos	Antecipação	Transmissão vieses sexuais	Posição repetidos	Produto gênico
Local frágil/retardamento mental associado à expansão de CGG ou GCC (ligada ao X)							
Síndrome do X frágil (CGG), FRAXA	Xq27	6–50 51–200	> 200	Sim	Materna, mutação completa	5'-UTR	FMR-1
Síndrome do X frágil (GCC), FRAXE	Xq28	6–25	> 200			5'-UTR	FMR-2
Doenças associadas à expansão repetida CAG (autossômica dominante, exceto na doença de Kennedy ligada ao X)							
Atrofia muscular espinobulbar (doença de Kennedy)	Xq11–12	11–33	36–62			Codifica	Receptor de androgênio
Doença de Huntington	4p16	6–35 36–39	40–121	Acentuada nos casos de início juvenil	Paterna, precoce	Codifica	Huntington
Atrofia dentatorrubral-palidoluisiana	12p13	3–35	49–85	Sim	Paterna	Codifica	Atrofina
Ataxia espinocerebelar 1	6p23	6–44	40–81	Acentuada nos casos de início juvenil	Paterna, precoce	Codifica	Ataxina 1
Ataxia espinocerebelar 2	12q24	16–31	36–64	Sim	Paterna	Codifica	Ataxina 2
Ataxia espinocerebelar 3 (doença de Machado-Joseph)	l4q24–q31	12–41	55–84	Sim	Paterna	Codifica	Ataxina 3
Ataxia espinocerebelar 6	19p13	6–17	21–30	Sim	Paterna	Codifica	CACNA1A
Ataxia espinocerebelar 7	3p21–pl2	4–35 28–3	37–>200	Sim	Paterna	Codifica	Ataxia-7
Ataxia espinocerebelar 12	5q31–q33	7–28	66–78	Sim	Paterna	5'-UTR	PPP2R2B
Ataxia espinocerebelar 17	6p27	25–42	45–63	Sim	Paterna	Codifica	TBP
Doenças associadas à expansão de CTG (autossômicas dominantes)							
Distrofia miotônica	19q13	5–35	50–>200	Sim	Materna, forma congênita	3'-UTR	Miotonina proteína quinase
Ataxia espinocerebelar 8	13q21	16–92	110–130	Sim	Materna	Não codifica	
Doença associada à expansão de GAA (autossômica recessiva)							
Ataxia de Friedreich	9q13	6–36	200–>900	Não		Íntron	Frataxina

homens fenotipicamente normais ("transmissores") que são portadores obrigatórios da anormalidade genética. Esses homens são filhos de portadores comprovados de FRAXA, passam o estado de portador para todas as suas filhas, que por sua vez transmitem a doença completamente expressa para uma alta proporção de seus filhos.

A descoberta, em 1991, da anormalidade genética que causa FRAXA imediatamente esclareceu seu padrão de herança incomum (Fu, 1991). A região 5' não traduzida do gene *FMR1* no cromossomo Xq27.3 leva uma sequência *triplet* $(CGG)_n$ repetida de tamanho variável. Em indivíduos normais, *n* varia até cerca de 50, mas em indivíduos com FRAXA clinicamente aparente, *n* é maior do que 200 (uma "mutação completa"). Tanto homens quanto mulheres com um cromossomo X em que *n* está entre 59 e 200 (uma "pré-mutação") não exibem sinais da síndrome clássica do X frágil, mas correm o risco de transmitir um alelo de tamanho até maior para seus filhos, isso por causa da "instabilidade" dos alelos pré-mutação e de sua tendência a aumentar de tamanho durante as divisões celulares meióticas que produzem os gametas masculino e feminino. Alelos de tamanho normal não são instáveis e são transmitidos inalterados. Portanto, parece que há um conjunto de alelos pequenos pré-mutação na população, possivelmente de origem ancestral antiga, que corre o risco de sofrer expansão adicional a cada passagem através de outra geração. À medida que o alelo pré-mutação aumenta de tamanho, a probabilidade de que ele se expanda ainda mais na próxima geração aumenta, variando de uma probabilidade muito baixa no caso de repetições da ordem de 60, a quase 100% no caso daquelas acima de 100 (Nolin, 2003). Alelos com cerca de 51 a 58 repetições tendem a expandir-se na maior faixa de permutação, mas aparentemente não na faixa de mutação completa. É interessante que a expansão de uma mutação completa só ocorre na meiose feminina, nunca na masculina, o que corresponde à observação de que as filhas de homens normais transmissores são sempre fenotipicamente normais. A Figura 72.6B ilustra uma família com FRAXA: um alelo de pré-mutação é transmitido da primeira para a segunda geração e então expande-se até uma mutação completa na terceira geração.

O mecanismo pelo qual a sequência *triplet* expandida repetida na região 5' não codificadora do gene *FMR1* produz o fenótipo FRAXA está sob investigação ativa. À medida que o tamanho da repetição se expande, há metilação progressiva da região reguladora do gene *FMR1* e menor expressão da proteína FMR-1. Essa proteína de ligação ao RNA expressa-se amplamente no cérebro em desenvolvimento e em outros tecidos. Presume-se que sua perda de expressão na FRAXA altera o desenvolvimento cerebral normal e acarreta retardamento mental. Raros pacientes com a síndrome típica do X frágil não têm a expansão *triplet* repetida ou o gene da hipermetilação, mas têm mutações pontuais inativadoras que levam à perda da expressão da proteína FMR1. Também foram descritos raros homens fenotipicamente normais ou de alto desempenho com expansões repetidas completas do gene FMR1 e locais frágeis visíveis à citogenética, mas sem o gene da hipermetilação e com expressão normal da proteína FMR1 (Hagerman, 1994; Smeets, 1995). Todos esses achados confirmam a hipótese de que é a ausência de expressão da proteína FMR1, em geral causada pela infrarregulação da transcrição do gene relacionada com a hipermetilação, que é responsável pelo fenótipo da doença.

Como a pré-mutação não é metilada e o fenômeno de homens transmissores "normais" foi bastante observado, presumia-se que esses alelos não tinham efeito fenotípico direto. Portanto, foi uma grande surpresa quando estudos recentes mostraram casos documentados de insuficiência ovariana prematura e uma síndrome incomum de tremor, ataxia e demência em portadores mulheres e homens pré-mutação, respectivamente. A penetrância parece ser de cerca de 20% para a primeira (Sherman, 2000) e de até 75% para a última (Jacquemont, 2004). O mecanismo molecular pode estar relacionado com níveis mais altos de mRNA no *FMR1* nos portadores de pré-mutação, traduzida em menos eficiência e/ou interferência na tradução do alelo normal ou de outros genes que interagem com ele. Obviamente, essas revelações complicaram ainda mais o aconselhamento genético para a síndrome do X frágil, além de levantarem questões éticas adicionais a respeito dos objetivos de fazer a triagem de permutações do X frágil em uma população.

Raras famílias com retardamento mental ligado ao X e um local frágil demonstrável à citogenética no cromossomo Xq27-28, mas não hipermetilação ou expansão da repetição $(CGG)_n$ no *FMR1*, levaram à descoberta de um segundo lugar frágil mais distal no Xq28 associado a hipermetilação e expansão da repetição $(GCC)_n$ (FRAXE). A maioria dos homens acometidos mostrou apenas comprometimento mental leve, sem os aspectos dismórficos da FRAXA; isso, mais a extrema raridade da condição, levantou a questão das indicações do teste e da triagem (Brown, 1996).

Distúrbios neurodegenerativos: doença de Huntington, atrofia muscular e espinobulbar ligada ao X, ataxias espinocerebelares e atrofia dentatorrubral-palidoluisiana

A doença de Huntington, a atrofia muscular e espinobulbar ligada ao X (AMEB), as atrofias cerebelares (ACS) dos tipos 1, 2, 3, 6, 7 e 17, e a atrofia dentatorrubral-palidoluisiana (ADRPL) são doenças autossômicas dominantes ou ligadas ao X, que se caracterizam por degeneração neuronal seletiva no sistema nervoso central (SNC). Em cada um desses distúrbios, há expansão de uma repetição de trinucleotídeos $(CAG)_n$ na região codificadora de um novo gene que produz alongamento anormal de um traço poliglutamina (dois outros tipos de ACS, o 8 e o 12, exibem expansões repetidas *triplets* em regiões não traduzidas dos genes e presumivelmente agem por outros mecanismos). A proteína anormal resultante produz inclusões neuronais intranucleares. Postula-se que as sequências expandidas de poliglutamina em cada uma dessas proteínas leva a alterações em seu dobramento e nas características de ligação e um ganho na função que é tóxica para neurônios de maneira seletiva, causando apoptose (Everett, 2004). As inclusões neuronais intranucleares, produzidas por essas proteínas anormais, foram demonstradas em vários desses distúrbios.

Em comum com outros distúrbios de repetição de *triplets*, as repetições expandidas nos distúrbios neurodegenerativos são instáveis e tendem a aumentar de tamanho nas gerações subsequentes. Há uma correlação positiva, mas não absoluta, entre o aumento de tamanho da repetição, o início cedo da doença e a gravidade clínica. Em contraste com o X frágil e a distrofia miotônica, em que ocorrem os aumentos mais acentuados no tamanho da repetição nas meioses maternas, a transmissão paterna produz as maiores expansões nos distúrbios neurodegenerativos de repetição exônica. Consequentemente, os casos de doença de Huntington de início juvenil, ADRPL e ACS em geral são transmitidos pelo pai.

Distrofia miotônica

É um distúrbio multissistêmico autossômico dominante, com uma ampla variação de expressão clínica. No final da infância ou no início da idade adulta, a maioria dos pacientes típicos desenvolve miotonia e fraqueza progressivas e atrofia dos músculos das extremidades distais e da face. Cataratas, defeitos da condução cardíaca e atrofia testicular também são comuns. No entanto, a doença pode ser tão leve a ponto de consistir exclusivamente em cataratas que se desenvolvem em uma idade avançada, ou tão grave a ponto de apresentar-se ao nascimento, com degeneração muscular acentuada e retardamento mental antecedendo a morte precoce. Às vezes, pode-se observar todo o espectro da doença na mesma família, ocorrendo em um padrão mencionado pelos geneticistas como "antecipação": a doença torna-se mais grave, com início em uma idade mais precoce, nas gerações sucessivas. A antecipação está presente em praticamente todos os distúrbios de repetição de trinucleotídeos, porém é mais acentuada na distrofia miotônica, em que o fenótipo clínico pode progredir de cataratas para doença congênita grave em três gerações.

A distrofia miotônica é causada pela expansão de uma repetição $(CTG)_n$ na região 3' não traduzida do gene da proteinocinase miotonina no cromossomo 19q13.3 (Fu, 1992; Mahadevan, 1992). Em indivíduos normais, o tamanho dessa repetição varia de 5 a 35 e é geneticamente estável. Repetições CTG maiores do que 50 são geneticamente instáveis e propensas a expansão à medida que passam para gerações subsequentes. Na faixa de 50 a 100, essas repetições em geral são assintomáticas ou acarretam sintomas mínimos. Quando estão presentes mais de 100 repetições, é provável o fenótipo típico da distrofia miotônica. Embora haja uma correlação geral entre o comprimento da repetição e a agressividade clínica, o tamanho da repetição não é um indicador confiável do prognóstico nos casos individuais. Expansões extremas de 1.000 a 2.000 repetições vistas na distrofia miotônica congênita só ocorrem quando há transmissão feminina da repetição instável; assim, a distrofia miotônica é herdada sempre da mãe.

O mecanismo pelo qual a repetição expandida de trinucleotídeos no gene da proteinocinase da miotonina produz o fenótipo da distrofia miotônica é desconhecido. Como a repetição não está localizada na região codificadora do gene, é possível que a expressão da proteína ou as interações reguladoras do mRNA estejam alteradas.

Ataxia de Friedreich

É a ataxia hereditária mais comum, com incidência de 2 por 100.000. Ao contrário dos outros distúrbios de repetição de trinucleotídeos, a ataxia de Friedreich é herdada como uma doença autossômica recessiva e não mostra evidência de antecipação. A repetição $(GAA)_n$ expandida está localizada no primeiro íntron do gene *FRDA* e reduz a expressão da frataxina, uma proteína mitocondrial, provavelmente por alguma interferência na transcrição ou no processamento do RNA. A frataxina está envolvida na respiração mitocondrial, no equilíbrio do ferro e na resposta ao estresse oxidativo. Cerca de 97% dos alelos da *FRDA* devem-se a expansões $(GAA)_n$; os alelos restantes devem-se a outras mutações inativadoras, inclusive mutações pontuais (Lodi, 1999).

Testes laboratoriais para os distúrbios de repetição de trinucleotídeos

Dependendo do comprimento do segmento repetido, as expansões de trinucleotídeos repetidos são prontamente demonstradas por *Southern blot* ou PCR. A PCR, seguida pela verificação do tamanho dos produtos da eletroforese em gel ou capilar, em geral é preferida para detectar a maioria desses distúrbios por sua velocidade, sua simplicidade e a capacidade de resolver alelos de tamanhos diferentes em uma única unidade repetida. Isso tem importância particular quando é necessário diferenciar alelos estáveis no limite superior de tamanho de alelos pequenos pré-mutação ou causadores de doença. Por exemplo, é criticamente importante distinguir uma repetição de 40 de uma de 39 na doença de Huntington, por causa das implicações clínicas extremamente diferentes e do impacto psicossocial de um resultado positivo. A PCR também é o método de escolha para a estimativa precisa do tamanho de alelos pré-mutação da FRAXA, o que é necessário para se graduar o risco ao aconselhar mulheres portadoras. No entanto, onde as expansões *triplets* são muito grandes, como na FRAXA completamente expressa ou na distrofia miotônica, pode não ser possível amplificar o segmento de DNA muito expandido pela PCR; nesse caso, é preferível a técnica do *Southern blot*, útil também para determinar o estado de metilação das mutações completas da FRAXA, pelo uso de endonucleases de restrição sensíveis à metilação, e assegurar que um alelo grande da doença de Huntington ou da FRAXA não tenha sido perdido em um paciente que parece homozigoto "normal" à PCR. De maneira similar, a técnica do *Southern blot* será mais confiável para identificar homens mosaicos cujas células mostrem uma mistura de alelos pré-mutação e de mutação completa, achado que não é raro por causa da instabilidade mitótica da mutação completa. A Figura 72.6 ilustra o uso do *Southern blot* e da PCR para detectar alelos de mutações FRAXA completas e de pré-mutação.

Síndromes de Prader-Willi e Angelman

Esses dois distúrbios, cujos genes ficam aproximadamente no mesmo *locus* no cromossomo 15, são quase sempre discutidos juntos, embora sejam causados por dois genes diferentes e quase nada tenham em comum em termos de fenótipo. A síndrome de Prader-Willi (SPW) caracteriza-se por obesidade, retardamento mental, genitália hipoplásica e aspectos dismórficos, enquanto a síndrome de Angelman exibe ataxia, fácies de boneca, retardamento mental, riso paroxístico e convulsões. O que compartilham de forma notável é um mecanismo de *imprinting* poderoso, que determina a expressão da doença. Ambos os distúrbios são quase sempre esporádicos. A síndrome de Prader-Willi, cujo gene ainda é desconhecido, é causada mais frequentemente por uma deleção no 15q12 apenas no cromossomo herdado do pai; isso é patológico porque apenas o gene paterno se expressa. Ocorre o oposto na síndrome de Angelman, mais frequentemente causada pela dele-

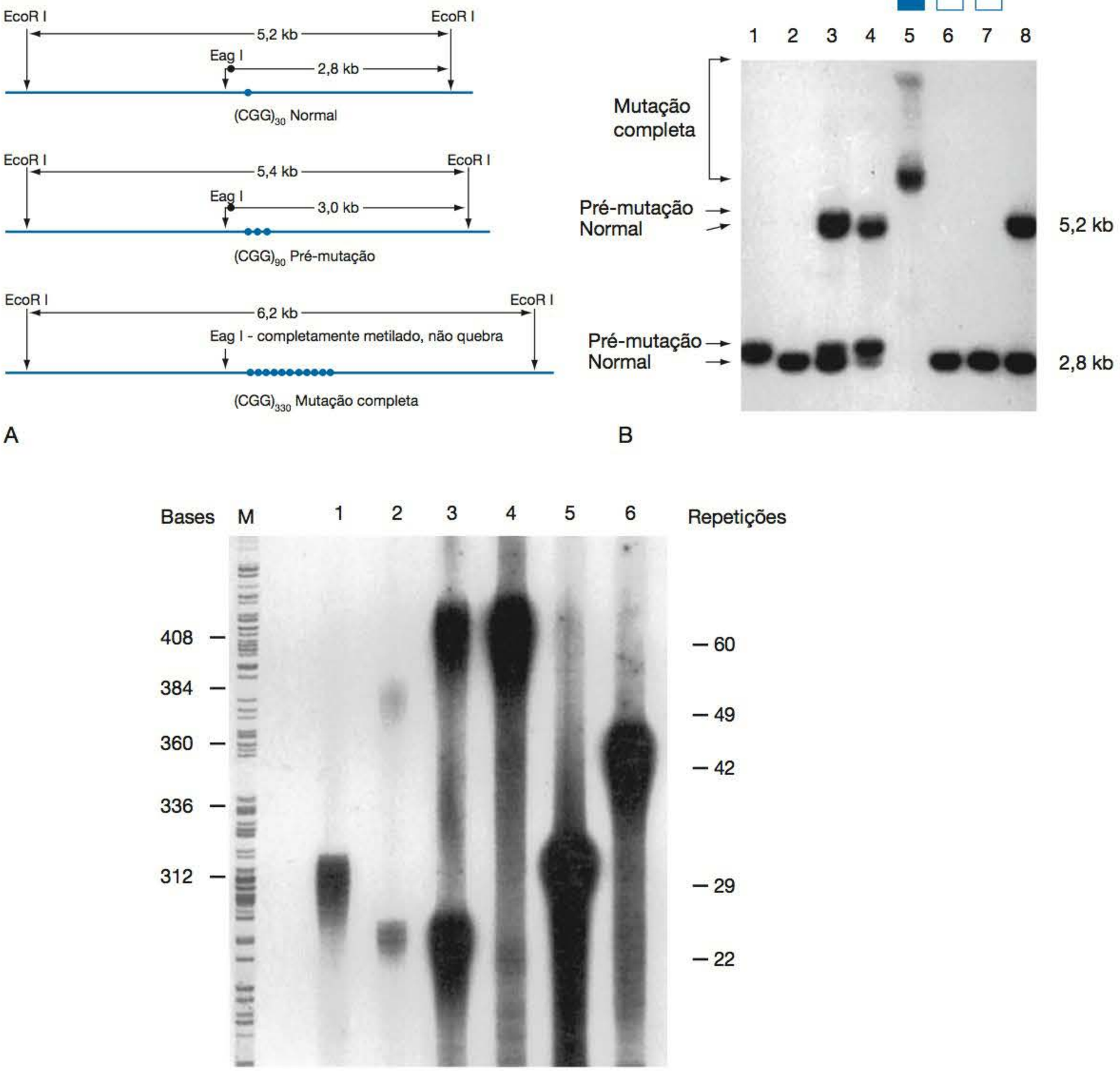


Figura 72.6 Detecção na expansão repetida de $(CGG)_n$ na síndrome do X frágil. *A*, Diagrama de alelos normais, com pré-mutação e mutação completa no *locus* FRAXA. Quando ocorre uma mutação completa na expansão repetida, o local da enzima de restrição *Eag* I fica *metilado e não quebra* a enzima. *B*, Família de um paciente (quadrado escuro) com a síndrome do X frágil. O *Southern blot* de cada indivíduo no heredograma foi examinado quanto à digestão do DNA por *Eco*R I/*Eag* I com uma sonda de DNA marcada que hibridiza 3′ para a repetição. Os três indivíduos à direita da figura são normais (quadrados e círculos vazados). Notar que os dois do sexo masculino têm uma única banda de 2,8 kb, enquanto o feminino tem ambas as bandas, uma de 2,8 e uma de 5,2 kb. Esse é o resultado esperado. A banda de 5,2 kb no indivíduo feminino é de um cromossomo X inativo normal (e, portanto, metilado) em cada uma de suas células. Como o DNA nesse cromossomo está metilado, não é cortado pela *Eag* I. Todavia, a banda de 2,8 kb é do cromossomo X ativo normal não metilado (*Eag* I corta o DNA nesse caso) tanto no indivíduo feminino como nos masculinos. O indivíduo masculino afetado tem uma banda bastante aumentada, em consequência da expansão acentuada da repetição do trinucleotídeo e da metilação do local da enzima de restrição *Eag* I. Os três indivíduos assinalados por pontos negros são portadores de alelos com pré-mutação. Nos femininos, a distinção entre alelos normais e expandidos é vista com mais clareza no DNA dos seus cromossomos X ativos (não metilados), onde estão as bandas distintas de 2,8 e 3 kb. Mais alto no gel, a resolução não é tão boa, e os alelos de 5,2 e 5,4 kb estão um pouco separados. Notar que, nessa amostra de sangue periférico da mãe do paciente afetado, a inativação do cromossomo X está enviesada com relação à expansão repetida: uma proporção maior de cromossomos X normais nessa população celular foi inativada aleatoriamente, em comparação com os cromossomos X contendo o alelo de pré-mutação. *C*, O tamanho das repetições de trinucleotídeos pela eletroforese em gel após amplificação do *locus* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Levinson, 1994). Os trajetos 1 a 6 representam seis indivíduos diferentes; M contém um marcador de tamanho. Os produtos da PCR foram marcados por incorporação de ^{32}P-dCTP durante a reação de amplificação, e o gel seco foi exposto a um filme de raios X. Indivíduos femininos heterozigotos mostram dois alelos, enquanto os masculinos e femininos homozigotos mostram alelos únicos. As múltiplas bandas produzidas com cada alelo são decorrentes do "deslizamento" da polimerase do DNA durante a reação da PCR; a banda mais intensa é considerada representativa do tamanho real do alelo. (C, cortesia da Dra. Anne Maddalena, Genetics & IVF Institute, Fairfax, VA.)

ção de um gene conhecido (*UBE3A*), herdado exclusivamente no cromossomo materno, sendo o único alelo que se expressa normalmente (Knoll, 1989; Matsuura, 1997). A síndrome de Prader-Willi também pode ser causada por dissomia uniparental do cromossomo materno 15, que contém a única cópia que não se expressa do gene; da mesma forma, a síndrome de Angelman pode ser causada por dissomia uniparental do cromossomo 15 paterno. Tais fenômenos podem ser detectados por hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), discutida no Capítulo 69, haplotipagem do cromossomo com marcadores microssatélites ou a técnica de *Southern blot* com enzimas de restrição sensíveis à metilação, que pode distinguir a região crítica materna metilada da região crítica paterna não metilada. Mais recentemente, foi desenvolvido um esquema diferencial de PCR que amplifica o alelo metilado ou o não metilado na proximidade do gene *SNRPN* dentro da região crítica,

com base na resistência de citosinas metiladas à modificação química causada pelo bissulfito de sódio (Kosaki, 1997) (Fig. 72.7). Entretanto, é importante lembrar que nem o *Southern blot* nem a PCR distinguem os mecanismos de deleção daqueles de unissomia parental, tampouco detectam casos (mais frequentes na síndrome de Angelman) devidos a mutações pontuais dentro do gene causador. Esses métodos também não distinguem casos raros de síndrome de Angelman ou de Prader-Willi devidos a defeitos primários de *imprinting* (que resultam de metilação aberrante causada por uma mutação no centro de *imprinting* do cromossomo 15) (Burger, 1997), que teriam um risco de recorrência muito maior.

Cânceres familiares

Todos os cânceres são distúrbios genéticos no nível celular, causados por mutações em genes que controlam a proliferação e a diferenciação celulares. Tais genes podem ser divididos de maneira geral em dois grupos, os que promovem a proliferação (proto-oncogenes ou, simplesmente, oncogenes) e os que impedem o crescimento celular (genes supressores tumorais). Ambos os tipos são discutidos no Capítulo 75. Mais frequentemente, as mutações nesses genes ocorrem em células somáticas, em geral sendo necessárias alterações em muitos ciclos celulares de vários oncogenes ou genes supressores tumorais antes que um câncer se desenvolva. Todavia, em alguns indivíduos, a mutação inicial nessa progressão pode ser uma lesão na linhagem germinativa, herdada de um dos pais e presente em cada célula do corpo daquele indivíduo.

As mutações herdadas causadoras de câncer foram encontradas mais frequentemente nos genes supressores tumorais, inclusive em vários grupos de genes que codificam proteínas com funções de reparo do DNA, mas também foram encontradas em alguns oncogenes (Tab. 72.3). A mutação herdada deve ser vista como o evento desencadeante do desenvolvimento tumoral, não ela própria suficiente para causar câncer, mas simplesmente a primeira etapa em uma série de mutações que por fim levam ao crescimento celular descontrolado, análogo à primeira mutação somática que inicia o desenvolvimento do tumor em um câncer esporádico. É provável que a maioria das mutações herdadas que contribuem para o desenvolvimento de câncer não tenha sido identificada, pois em si elas não são altamente penetrantes e requerem a interação de outros fatores genéticos e ambientais para iniciar o desenvolvimento do tumor – uma situação complexa difícil de desvendar. Contudo, foi identificado um número de genes altamente penetrantes que são os principais iniciadores do desenvolvimento tumoral em síndromes cancerosas hereditárias reconhecíveis (Tab. 72.3).

Em comparação com seus contrapartes esporádicos, os cânceres hereditários em geral desenvolvem-se em uma idade precoce, costumam ser multifocais e surgem bilateralmente em órgãos pares. Ao observar esses aspectos distintos no retinoblastoma esporádico e no retinoblastoma familiar, Knudson postulou que são necessários pelo menos dois eventos de mutação para produzir um tumor (Knudson, 1971). No caso de um tumor esporádico, são necessários dois eventos independentes de mutação na mesma célula para iniciar o desenvolvimento do tumor, enquanto no caso de um tumor hereditário a primeira mutação já está presente ao nascimento em todas as células do corpo, o que aumenta a probabilidade de ocorrer um segundo evento de mutação em uma idade mais precoce e geralmente em mais de uma célula. A hipótese de Knudson dos "dois eventos" é um conceito importante que tem orientado muitos estudos sobre a base genética do câncer. A elucidação das mutações herdadas nas síndromes cancerosas hereditárias foi extremamente informativa, não apenas quanto à compreensão desses raros distúrbios, como também para o entendimento das alterações fundamentais responsáveis pelas malignidades comuns.

Na discussão a seguir, vamos comentar alguns conceitos fundamentais das síndromes cancerosas hereditárias no contexto de um distúrbio causado por um gene supressor tumoral, o retinoblastoma, e um distúrbio causado por um oncogene, a neoplasia endócrina múltipla do tipo 2. Seguem-se descrições do câncer de mama e ovariano e do câncer colorretal hereditários, as síndromes cancerosas hereditárias mais comuns, com mais de um milhão de pessoas em risco nos Estados Unidos. A Tabela 72.3 traz uma lista desses distúrbios e de outras síndromes cancerosas hereditárias. A seção termina com uma discussão sobre as abordagens atuais para testes genéticos desses distúrbios. Para maiores informações, o leitor deve consultar duas revisões recentes sobre síndromes cancerosas hereditárias (Nagy, 2004; Garber, 2005).

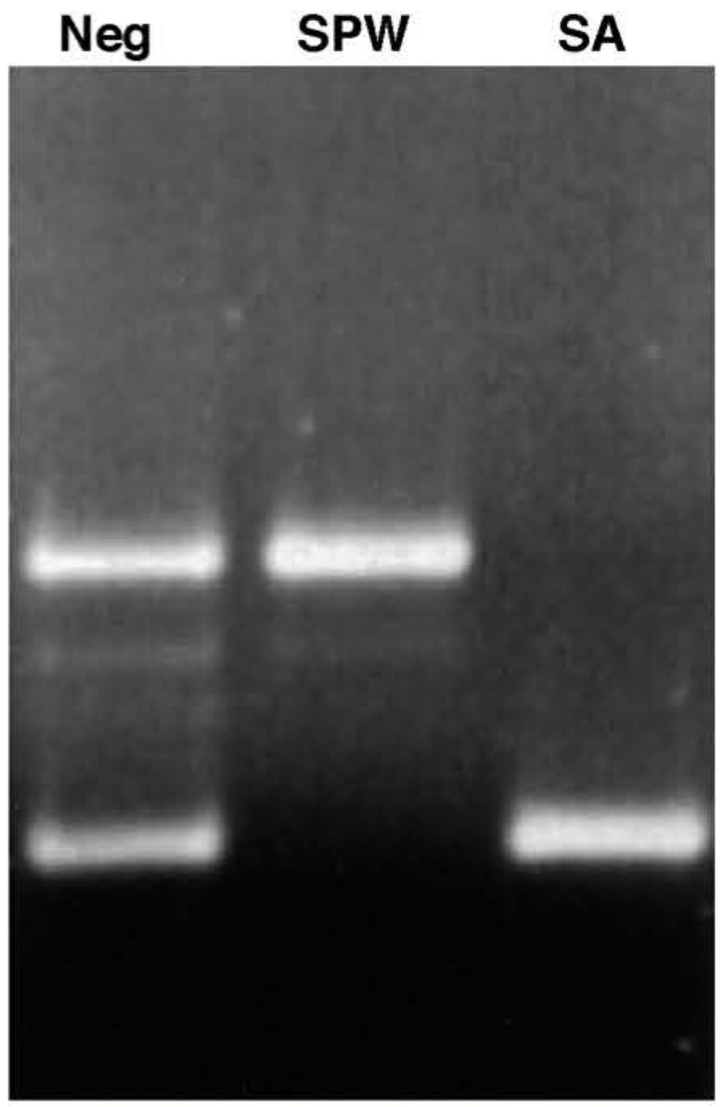


Figura 72.7 Padrões da análise eletroforética baseada na reação em cadeia da polimerase nas síndromes de Prader-Willi (SPW), e Angelman, pelo método do bissulfito de sódio de Kosaki (1997). Na síndrome de Prader-Willi (SPW), apenas o alelo materno metilado (faixa superior) está presente, graças à deleção do alelo paterno ou da dissomia uniparental do alelo materno. Na síndrome de Angelman (SA), apenas o alelo paterno não metilado (faixa inferior) está presente, devido à deleção do alelo materno ou dissomia uniparental do alelo paterno. É possível fazer análise similar pelo *Southern blot* usando enzimas de restrição sensíveis à metilação.

Genes supressores tumorais: o retinoblastoma como paradigma

Embora as síndromes de câncer familiar devidas a mutações nos genes supressores tumorais sigam um padrão dominante de herança, no nível celular as alterações em geral parecem recessivas, pois a tumorigênese é iniciada (na maioria dos casos) apenas quando ambas as cópias do gene supressor tumoral são inativadas. A perda do gene normal herdado do genitor não acometido pode ocorrer como resultado de uma segunda mutação patogênica nova, por deleção em ampla escala, substituição por uma cópia duplicada do gene mutante herdado do genitor acometido, por mecanismos genéticos como não disjunção cromossômica ou recombinação mitótica, ou ainda o silenciamento do gene devido a hipermetilação. Tais eventos ocorrem no retinoblastoma, um tumor da retina causado pela perda funcional de ambas as cópias do gene *RB1*, que codifica a proteína RB, envolvida no ciclo celular e na regulação da transcrição. Na maioria dos casos, ambos esses eventos de mutação ocorrem somaticamente, desenvolvendo-se um tumor solitário esporádico. Mas, em aproximadamente um terço dos casos, a primeira mutação do *RB1* está presente na linhagem germinativa da criança afetada, tendo sido herdada de um dos pais com o mesmo problema, ou ocorrendo como uma nova mutação durante a gametogênese. Quando é esse o caso, a probabilidade de que o gene *RB1* remanescente normal sofra mutação é maior do que 90%. Conforme Knudson observou, na maioria dos pacientes com doença familiar, os tumores são bilaterais e multifocais (Knudson, 1971), implicando que várias células tiveram mutações adicionais do *RB1*. Não se sabe se apenas as mutações do *RB1* são suficientes para a tumorigênese, mas certamente parecem ser o evento desencadeante.

O retiniblastoma familiar serviu como modelo para pesquisas importantes do câncer, levando à descoberta de um grande número de genes supressores tumorais que são determinantes fundamentais da patogênese de várias síndromes cancerosas hereditárias, incluindo a do câncer de mama e ovariano e a do câncer colorretal. Esses genes

supressores tumorais também são críticos para o desenvolvimento de muitos cânceres esporádicos comuns.

Oncogenes: neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 como paradigma

São poucas as síndromes de câncer familiar reconhecidamente causadas por uma mutação herdada em um oncogene (Tab. 72.3). Dessas, a neoplasia endócrina múltipla do tipo 2A (NEM 2A) e suas variantes, o carcinoma da tireoide medular familiar (CTMF) e a neoplasia endócrina múltipla do tipo 2B (NEM 2B), são mais bem conhecidas. Mutações isoladas e ativadas em um alelo do proto-oncogene *RET* são suficientes para iniciar a tumorigênese nesses distúrbios (Eng, 1999).

Todas essas três síndromes caracterizam-se por hiperplasia das células C da tireoide e carcinoma medular da tireoide. Nas famílias com NEM 2A, também estão presentes feocromocitomas e/ou adenomas paratireóideos. A NEM 2B caracteriza-se ainda pela presença de múltiplos neuromas da mucosa dos lábios, da boca e do trato gastrintestinal, aparência marfanoide, evolução clínica particularmente agressiva e alta proporção de indivíduos acometidos por causa de novas mutações no *RET*.

O *RET* é uma molécula sinalizadora com domínios receptores de tirosinocinase extra e intracelulares. Com poucas exceções, as muta-

Tabela 72.3 Síndromes cancerosas hereditárias

Distúrbio (entrada OMIM)	Tumores associados	Incidência na população	Gene	Localização do cromossomo
Genes supressores tumorais (herança autossômica dominante)				
Síndrome do nevo basocelular (de Gorlin) (109400)	Carcinoma basocelular, meduloblastoma	1/40.000	*PTCH*	9q22
Síndrome de Cowden (158350)	Carcinoma de mama, tireoide	1/200.000	*PTEN*	10q23
Polipose adenomatosa familiar (175100)	Carcinoma colorretal, duodenal	1/10.000	*APC*	5q21
Síndrome de câncer de mama-ovariano hereditário (113705, 600185)	Carcinoma de mama, ovário, pancreático, próstata	1/300–1/500	*BRCA1* *BRCA2*	17q21 13q12
Carcinoma gástrico difuso hereditário (137215)	Carcinoma gástrico	Rara	*CDH1*	16q22
Leiomiomatose e carcinoma de célula renal hereditário (150800, 605839)	Leiomiomas cutâneos e uterinos, carcinoma de célula da papila renal	Rara	*FH*	1q42
Melanoma hereditário (600160, 606719)	Melanoma, carcinoma pancreático	Desconhecido	*CDKN2A (p16)*	9p21
Paraganglioma hereditário (602690, 185470, 602413)	Paraganglioma, feocromocitoma	Rara	*SDHD* *SDHB* *SDHC*	11q23 1p35–36 1q21
Síndrome da polipose juvenil (174900)	Câncer gastrintestinal	1/100.000	*SMAD4* *BMPR1A*	18q21 10q22
Genes supressores tumorais (herança autossômica dominante)				
Síndrome de Li-Fraumeni (151623)	Sarcomas, carcinoma de mama, leucemia, tumores cerebrais	Rara	p53	17p13
Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (*NEM1*) (131100)	Tumores pancreáticos de células das ilhotas, hipófise, paratireoide	1/100.000	*MEN1*	11q13
Neurofibromatose do tipo 1 (162200)	Neurofibroma/sarcoma, feocromocitoma	1/3.000	*NF1*	17q11
Neurofibromatose do tipo 2 (101000)	Neuroma do acústico, meningioma	1/40.000	*NF2*	22q12
Síndrome de Peutz-Jeghers (175200)	Tumores gastrintestinais	1/200.000	*STK11*	19p13
Retinoblastoma hereditário (180200)	Retinoblastoma, osteossarcoma	1/20.000	*RB1*	13q14
Doença de von Hippel-Lindau (193300)	Hemangioblastoma, carcinoma de células renais, feocromocitoma	1/40.000	*VHL*	3p25
Oncogenes (herança autossômica dominante)				
Melanoma hereditário (123829)	Melanoma	Rara	*CDK4*	12q13
Neoplasia endócrina múltipla do tipo 2A e do tipo 2B (171400, 162300)	Carcinoma medular da tireoide, feocromocitoma, hiperplasia/adenoma da paratireoide; neuromas múltiplos da mucosa hiperplasia/adenoma da paratireoide; neuromas múltiplos da mucosa (tipo 2B)	1/30.000	*RET*	10q12
Carcinoma papilar renal hereditário (605074)	Carcinoma papilar renal	Rara	*MET*	7q31
Genes de reparo do DNA (herança autossômica dominante)				
Câncer colorretal não poliposo hereditário (114500)	Carcinoma colorretal, endometrial, ovariano	1/400–1/700	*MSH2* *MLH1* *MSH6* *PMS2*	2p16 3p21 2p16 7p22
Genes de reparo do DNA (herança autossômica recessiva)				
Ataxia-telangiectasia (208900)	Linfomas, outros	1/40.000–1/100.000	*ATM*	11q22
Síndrome de Bloom (210900)	Vários	Rara	*BLM*	15p26
Anemia de Fanconi (607139, 300515, 227645, 605724, 227646, 600901, 603467, 602956)	Leucemia mielógena aguda, outros	1/100.000	*FANCA-G*	Várias
Polipose associada a *MYH* (608456)	Carcinoma colorretal, polipose duodenal	1/10.000	*MYH*	1p34
Xeroderma pigmentoso (278700, 133510, 278720, 278730, 278740, 133520, 133530, 603968)	Carcinoma cutâneo basocelular e escamocelular	Rara	*XPA-G, POLH*	Várias

Fonte: dados de várias fontes, incluindo Garber, 2005; *GeneReviews*, 2005.

ções conhecidas do CTMF e da NEM 2A são substituições de base única em um de cinco códons no domínio extracelular, em cada caso produzindo a substituição de uma cistina por outro aminoácido. Mais de 95% das mutações da NEM 2B são idênticas, consistindo em uma única substituição de base que produz uma mutação de sentido errado no domínio da tirosinocinase. Não foram encontradas mutações em cerca de 5% das famílias com um desses distúrbios (Eng, 1999).

Câncer de mama e ovariano hereditário

O câncer de mama e ovariano hereditário (CMOH) acomete mais indivíduos que qualquer outra síndrome cancerosa hereditária (Narod, 2004), sendo causado por mutações na linhagem germinativa no *BRCA1* e no *BRCA2*, genes supressores tumorais autossômicos com papéis no reparo do DNA, na regulação da transcrição e no controle do ciclo celular. A prevalência combinada de portadores de variantes anormais desses dois genes na população geral dos Estados Unidos costuma ser estimada de 1/500 a 1/300. Três mutações encontradas em judeus asquenazes são responsáveis pelo aumento de 10 vezes (1/40) da prevalência nessa população. O CMOH é responsável por 5 a 10% dos casos de câncer de mama feminino e 12% dos casos de câncer ovariano. Embora o risco por toda a vida de uma mulher desenvolver câncer de mama ou ovariano na população geral seja de 7 e 1%, respectivamente, o risco de portadoras da mutação é de 56 a 87% no caso do câncer de mama (o risco de um segundo câncer contralateral chega a quase 60%) e de 23 a 54% no caso do câncer ovariano. Outros cânceres, em especial o de mama em homens, o pancreático e o de próstata, também são mais prevalentes. É típico o tumor ocorrer em uma idade mais jovem que os cânceres esporádicos, com a média etária ao diagnóstico do câncer de mama sendo de 64 anos. O desenvolvimento de câncer de mama em uma idade mais jovem é um dos preditores mais fortes da presença de CMOH.

O *BRCA1* e o *BRCA2* são genes grandes, que codificam uma proteína de 1.863 aminoácidos e uma de 3.418 aminoácidos, respectivamente. As mutações causadoras de doença, principalmente mutações estruturais ou sem sentido (*nonsense*) que causam truncamento de proteína, estão distribuídas amplamente em ambos esses genes. Até o momento, foram identificadas mais de 700 mutações deletérias isoladas do *BRCA1* e quase 800 do *BRCA2*. Embora a presença de mutações estabelecidas permita uma abordagem direcionada para a identificação da mutação em judeus asquenazes, é necessário o sequenciamento de todo o gene ou o uso de técnicas de varredura gênica para detectar a mutação na população geral heterogênea dos Estados Unidos.

Os testes genéticos para mutações do *BRCA1* e do *BRCA2* em pacientes de alto risco e seus familiares passaram a fazer parte da prática clínica. As estratégias preventivas para a prevenção do câncer em portadores de mutações (maior vigilância, quimioprevenção, cirurgia profilática) reduziram bastante a incidência de câncer ovariano e dos cânceres primários e secundários de mama (Narod, 2004). Indivíduos de alto risco podem ser identificados por sua história pessoal de câncer ovariano ou de mama de início em idade jovem em mulheres e/ou por uma história familiar desses cânceres nas linhagens paterna ou materna (National Comprehensive Cancer Network, 2005). Como o CMOH é um distúrbio autossômico dominante, os parentes de primeiro grau de portadores da mutação correm o risco de 50% de ter a mesma mutação.

Síndromes hereditárias de câncer colorretal

O câncer colorretal não polipoide hereditário (CCNPH, ou síndrome de Lynch), como o nome implica, é uma síndrome de câncer colorretal hereditária não associada a abundância de pólipos adenomatosos. Em contraste, a polipose adenomatosa familiar (PAF) e a polipose associada a MYH (PAM) são distúrbios hereditários em que podem estar presentes números variáveis e às vezes grandes de pólipos adenomatosos. Essa distinção clínica útil, ainda que imperfeita, é importante para a avaliação de indivíduos sob risco de apresentar esses distúrbios.

Câncer colorretal hereditário não ligado à polipoide

O CCNPH é a segunda síndrome cancerosa hereditária mais comum, acometendo quase tantos indivíduos quanto o número acometido pelo câncer de mama e ovariano hereditário. No entanto, como tem penetrância praticamente igual em ambos os sexos, seu impacto em termos de saúde pública é equivalente ao do CMOH. É digno de nota que, mesmo em geral não sendo conhecido, o câncer endometrial é parte proeminente da síndrome, com mais mulheres acometidas desenvolvendo câncer endometrial do que câncer colorretal. O CCNPH é responsável por 3 a 5% de todos os cânceres colorretais e 2 a 3% de todos os endometriais. A doença é causada por mutações na linhagem germinativa em um de cinco genes de reparo do DNA, *MSH2, MLH1, MSH6, PMS2* e *PMS1,* cada um deles contribuindo com mais ou menos 50%, 40%, 10% e menos de 1% os dois últimos, respectivamente, para a incidência geral do distúrbio. A prevalência combinada de portadores de variantes anormais de *MSH2* e *MSH1*, responsáveis por cerca de 90% dos casos de CCNPH, é estimada entre 1/700 e 1/400. O câncer colorretal no CCNPH caracteriza-se por início em idade jovem (em média aos 44 anos, comparado com 72 anos no caso do câncer colorretal esporádico), ocorre predominantemente do lado direito do cólon e pode ocorrer como tumores primários múltiplos simultaneamente ou durante algum tempo. O risco durante a vida para homens e mulheres de desenvolver câncer colorretal é de aproximadamente 80% (em comparação com 2% na população geral), embora o risco de câncer endometrial durante a vida toda seja de 40 a 60% (em comparação com 1,5% na população geral). O risco de câncer gástrico no decorrer da vida é de 13% e o de câncer ovariano é de 12% (em comparação com 1% na população geral), portanto, também sendo maior.

Foram descritas várias diretrizes para identificar indivíduos sob risco de CCNPH mediante uma combinação de história pessoal e familiar de câncer, como por exemplo Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines (Giardiello, 2001; *GeneReviews*, 2005). O câncer colorretal e/ou endometrial de início precoce são os preditores mais fortes do distúrbio, em particular quando vistos juntos em um indivíduo ou uma mesma família, acompanhados por outros tumores associados à doença e ocorrem em mais de uma geração da família.

Outro preditor de CCNPH em um paciente é a presença de "instabilidade microssatélite" no DNA daquele câncer colorretal em particular. Tal expressão descreve uma alteração no comprimento das sequências repetidas de DNA (microssatélites) no tumor devido a erros de reparo do desemparelhamento durante a replicação do DNA. A instabilidade microssatélite é altamente sensível, mas tem baixa especificidade para detectar câncer colorretal devido a CCNPH, mas, quando combinada com a imuno-histoquímica para detectar a ausência de uma ou mais proteínas de reparo desemparelhadas, é um indicador útil de que o teste genético da linhagem germinativa para CCNPH está indicado (*GeneReviews*, 2005).

Os genes de reparo do DNA desemparelhados são genes moderadamente grandes, com o *MSH2* codificando uma proteína de 935 aminoácidos e o *MLH1* codificando uma proteína de 757 aminoácidos. Embora haja poucas mutações com prevalência relativa alta em algumas populações devido a efeitos estabelecidos, a grande maioria está distribuída amplamente em ambos os genes. A maioria das mutações é estrutural ou sem sentido, causando perda da expressão gênica devido a instabilidade do RNA, instabilidade da proteína ou truncamento de proteína. Além disso, grandes deleções de éxons únicos ou múltiplos são responsáveis por aproximadamente um terço das mutações presentes no *MSH2* e por uma fração menor das mutações no *MLH1*.

O teste genético para *MSH2* e *MLH1* em pacientes de alto risco e seus familiares passou a fazer parte da prática clínica de maneira semelhante à observada com relação aos testes para *BRCA1* e *BRCA2* para CMOH. No caso dos indivíduos identificados como portadores de mutações deletérias, a colonoscopia completa, iniciada em uma idade precoce e feita a intervalos regulares, é muito efetiva para identificar pólipos adenomatosos pré-malignos, enquanto a biópsia endometrial e o ultrassom transvaginal podem identificar câncer endometrial no início. Se o câncer colorretal se desenvolver, pode-se considerar a colectomia subtotal como uma alternativa à ressecção segmentar, por causa da alta taxa de tumores sincrônicos e metacrônicos em pacientes com CCNPH. Pode-se considerar a histerectomia profilática com salpingo-ooforectomia bilateral em mulheres que não pretendam ter mais filhos. Como em todos os distúrbios autossômicos dominantes, os parentes de primeiro grau de portadores da mutação correm risco de 50% de também serem portadores.

Duas revisões de CCNPH que discutem o teste genético são recomendadas (Giardiello, 2001; *GeneReviews*, 2005).

Polipose adenomatosa familiar e polipose adenomatosa familiar atenuada

A polipose adenomatosa familiar é uma síndrome cancerosa colorretal hereditária que pode manifestar-se com um fenótipo marcante no cólon – câncer colorretal multifocal em um fundo de milhares de pólipos adenomatosos. Sabe-se agora que o fenótipo da PAF é diverso e o número de pólipos colônicos pode variar acentuadamente. Assim sendo, a PAF clássica é agora diagnosticada quando um indivíduo desenvolve pelo menos 100 pólipos adenomatosos durante a vida, enquanto PAF atenuada (PAFA) é a designação usada quando a carga de pólipos durante a vida fica na faixa de 20–100 pólipos. A distinção é inteiramente clínica, pois ambos os distúrbios são causados por mutações na linhagem germinativa no gene *APC* (da polipose adenomatosa do cólon), um gene supressor tumoral com várias funções celulares importantes e um provável iniciador também do desenvolvimento de câncer colorretal esporádico. As mutações *APC* da linhagem germinativa estão presentes em 1/10.000–1/5.000 indivíduos; a maioria dessas mutações terá sido herdada de um genitor com o mesmo problema, porém 20 a 30% são mutações *de novo*. De acordo com isso, não é possível excluir PAF ou PAFA ante a ausência de uma história familiar positiva, que é particularmente importante não esquecer ao avaliar um paciente com uma carga baixa de pólipos.

O início do câncer colorretal em uma idade jovem (em média aos 39 anos na PAF e ≥ 50 anos na PAFA) requer diagnóstico precoce e monitoração clínica estrita de indivíduos, determinada pelo risco de acordo com a história familiar e/ou o teste genético. As sigmoidoscopias de triagem devem começar aos 10 anos de idade e a colectomia profilática deve ser realizada quando os pólipos tiverem se desenvolvido. No caso de indivíduos de risco com PAFA menos florida, a triagem pode começar mais tarde na adolescência, mas a colonoscopia é aconselhada porque os pólipos desenvolvem-se de preferência no lado direito do cólon. A colectomia é realizada quando a carga de pólipos não é mais passível de tratamento por polipectomia. A vigilância do trato gastrintestinal superior também está indicada, porque também se desenvolvem pólipos gástricos e no intestino delgado. Isso é particularmente importante no duodeno, em especial na região periampular, onde o risco de progressão do câncer durante a vida é de 5 a 12% na PAF.

Os pacientes com PAF e PAFA também correm maior risco de outros cânceres (gástrico, pancreático, do trato biliar, da tireoide) e frequentemente têm outros achados clínicos: tumores desmoides, osteomas, anormalidades dentárias, cistos epidermoides e hipertrofia congênita do epitélio pigmentado da retina (HCEPR). Desses, os tumores desmoides, que acometem aproximadamente 10% dos pacientes com PAF, são os mais importantes. Essas proliferações clonais de miofibroblastos formam-se na cavidade abdominal, onde são localmente invasivas, comprimem órgãos abdominais e podem causar morbidade séria e mortalidade.

O APC é um gene grande, que codifica uma proteína de 2.843 aminoácidos. A maioria das mutações que causam doença é estrutural ou sem sentido, ocasionando truncamento de proteína. Essas mutações estão distribuídas ao longo de todo o gene. Algumas correlações do genótipo com o fenótipo são possíveis: mutações que resultam em características extraintestinais tendem a ocupar regiões particulares do gene, enquanto aquelas associadas à PAFA aglomeram-se principalmente nas regiões 5' e 3' do gene.

O teste genético para mutações do APC é apropriado nos familiares em que se sabe que esse distúrbio ocorre, bem como nos indivíduos sem uma história familiar significativa que tenha um grande número de pólipos adenomatosos, pois 20 a 30% dos pacientes com PAF/PAFA têm mutações *de novo*.

Duas revisões de PAF que discutem o teste genético são recomendadas (Giardiello, 2001; *GeneReviews*, 2005).

Polipose associada a *MYH*

A polipose associada a *MYH* é uma síndrome cancerosa hereditária autossômica recessiva reconhecida recentemente, causada por mutações no homólogo humano do gene bacteriano *mutY*, *MYH* (Al-Tassan, 2002; Wang, 2004). O fenótipo clínico é muito semelhante ao da PAFA ou das variantes menos floridas da PAF, ou seja, uma carga de pólipos na casa das dezenas a centenas, não de milhares. Como na PAF/PAFA, os pacientes correm risco de ter polipose duodenal, havendo relatos de alguns com manifestações extraintestinais, HCEPR e osteomas também. Devido à natureza autossômica recessiva desse distúrbio, as famílias com MAP tipicamente não mostram qualquer evidência de transmissão vertical da doença, como seria nos casos de PAF/PAFA autossômicos dominantes, mas poderiam incluir irmãos acometidos. Estima-se que a frequência aproximada de portadores de alelos mutantes *MYH* seja de 2%, o que implica uma frequência de 1/10.000 de indivíduos bialélicos (acometidos). Isso é muito parecido com o número de pacientes que tenham PAF/PAFA.

A estreita similaridade dos fenótipos da MAP e da PAF-PAFA, mais o fato de que até 30% dos indivíduos com PAF não têm evidência de transmissão vertical na família porque apresentam mutações *APC de novo*, podem dificultar o diagnóstico, especialmente quando a carga de pólipos não é muito grande. Em muitos casos, é necessário fazer análise da mutação tanto do *APC* como do MYH para chegar a um diagnóstico.

O *MYH* é um de um grupo de genes de reparo da excisão de base que reconhece e repara a desincorporação de 8-oxoguanosina durante a replicação do DNA. Na ausência de reparo, ocorrem mutações G:C→T:A. A inativação bialélica de *MYH* permite que essas mutações se acumulem e, no epitélio colônico, leva a mutações inativadoras bialélicas na *APC*. Isso inicia uma série de eventos de mutação que resultam em um fenótipo clínico muito semelhante ao da PAFA ou da PAF (Al-Tassan et al., 2002).

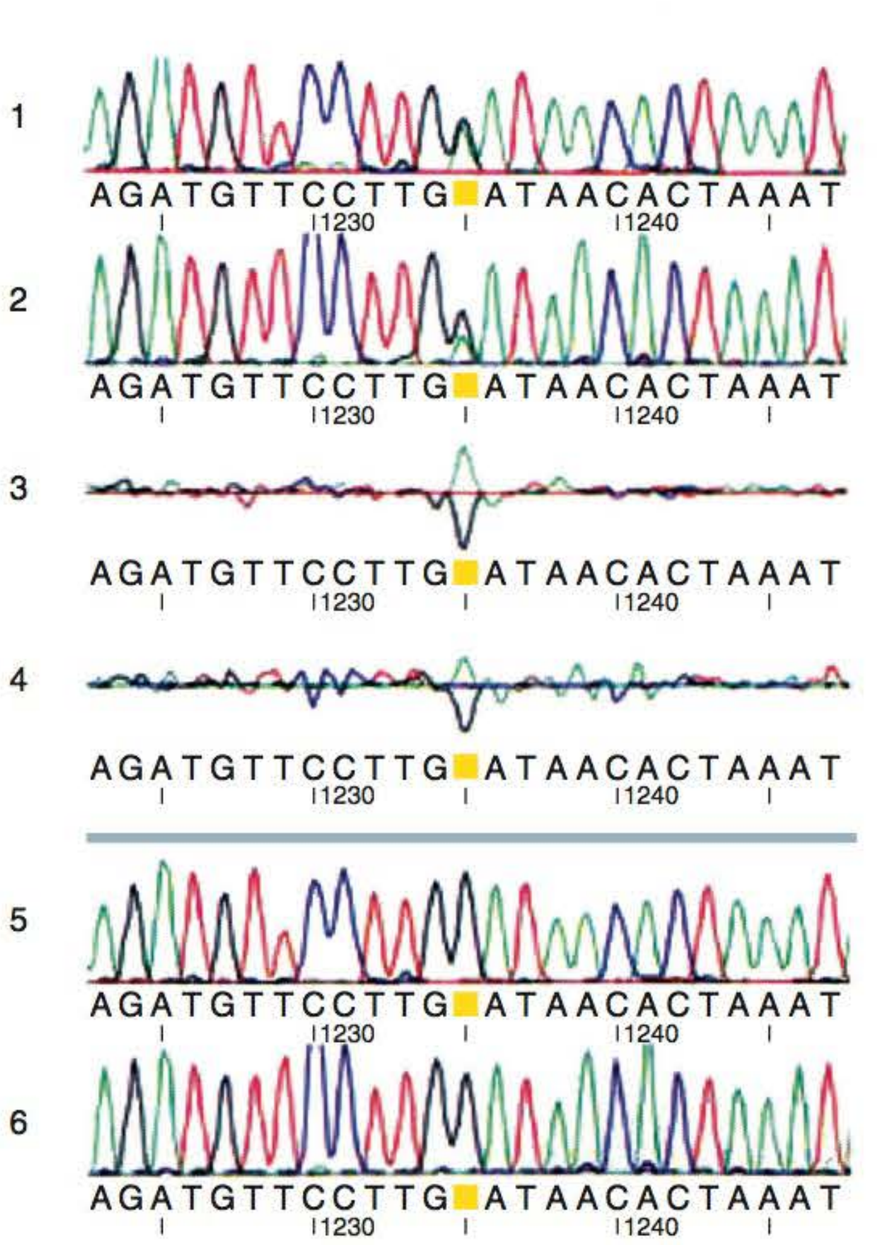
O espectro de mutação no *MYH* começou a ser explorado há pouco tempo. Há duas mutações comuns nas populações europeias, Y165C e G382D, responsáveis pela maioria das mutações deletérias conhecidas naquela população. É digno de nota que, nos poucos indivíduos não europeus com síndromes de polipose em que foram detectadas mutações bialélicas, nenhuma dessas mutações estava presente. De acordo com isso, ainda estão sendo desenvolvidas estratégias efetivas de detecção. O sequenciamento total do gene é uma abordagem. Outra, usada em indivíduos de ascendência europeia, é a triagem inicial de duas mutações comuns, seguida pelo sequenciamento gênico se for detectada uma das mutações comuns.

Testes laboratoriais para mutações no câncer familiar

A análise do DNA para detectar mutações herdadas que predispõem ao câncer tem enorme potencial em termos da prevenção de doença e do tratamento precoce. Se uma proporção muito alta das mutações causadoras de câncer em um gene particular for conhecida, e essas mutações ocorrerem em número relativamente pequeno, a análise direta dessas mutações pode ser simples e sem custo financeiro. Felizmente, esse às vezes pode ser o caso com um oncogene, pois a ativação do gene só pode ser conseguida de poucas maneiras. Como supracitado, o espectro de mutações na *RET* responsáveis pela MEN 2 é bastante pequeno, com poucas mutações bem definidas sendo responsáveis por mais de 95% do total.

Se, por outro lado, o gene for grande, e as mutações causadoras de câncer numerosas e muito dispersas (como costuma ser o caso dos genes supressores tumorais, que podem ser inativados de muitas formas diferentes), então a análise da mutação precisa ser considerada e capaz de triar grandes tiras de DNA. Em tais casos, o sequenciamento direto do DNA ou as técnicas de varredura antigênica como DHPLC, SSCP ou heterodúplex devem ser usadas. Além disso, deleções ou duplicações de todo o éxon, ou mesmo deleções de todo o gene que não são detectáveis por sequenciamento ou varredura gênica, podem constituir uma porcentagem significativa das mutações deletérias em um gene particular. Nesse caso, é preciso usar técnicas capazes de avaliar a dosagem gênica, como *Southern blotting*, alguma variação da PCR quantitativa ou uma plataforma de hibridização que seja capaz de medir as dosagens de sequência de maneira comparativa.

A Figura 72.8 ilustra a sequência em traços de dois exemplos de mutações deletérias no *BRCA1*. O lado esquerdo da figura demonstra uma única substituição de base, G→A em um alelo do *BRCA1* na posição do nucleotídeo 1.235, resultando na substituição de um códon de parada, TGA, para o triptofano, TGG, na posição do aminoácido 372 no éxon 11. Essa mutação produz uma proteína não funcional truncada, ou pode resultar em um RNA instável que é degradado. O lado direito da figura demonstra uma inserção de dois pares de bases, GA, na posição 5.598 em um alelo do éxon 24 do *BRCA1*.



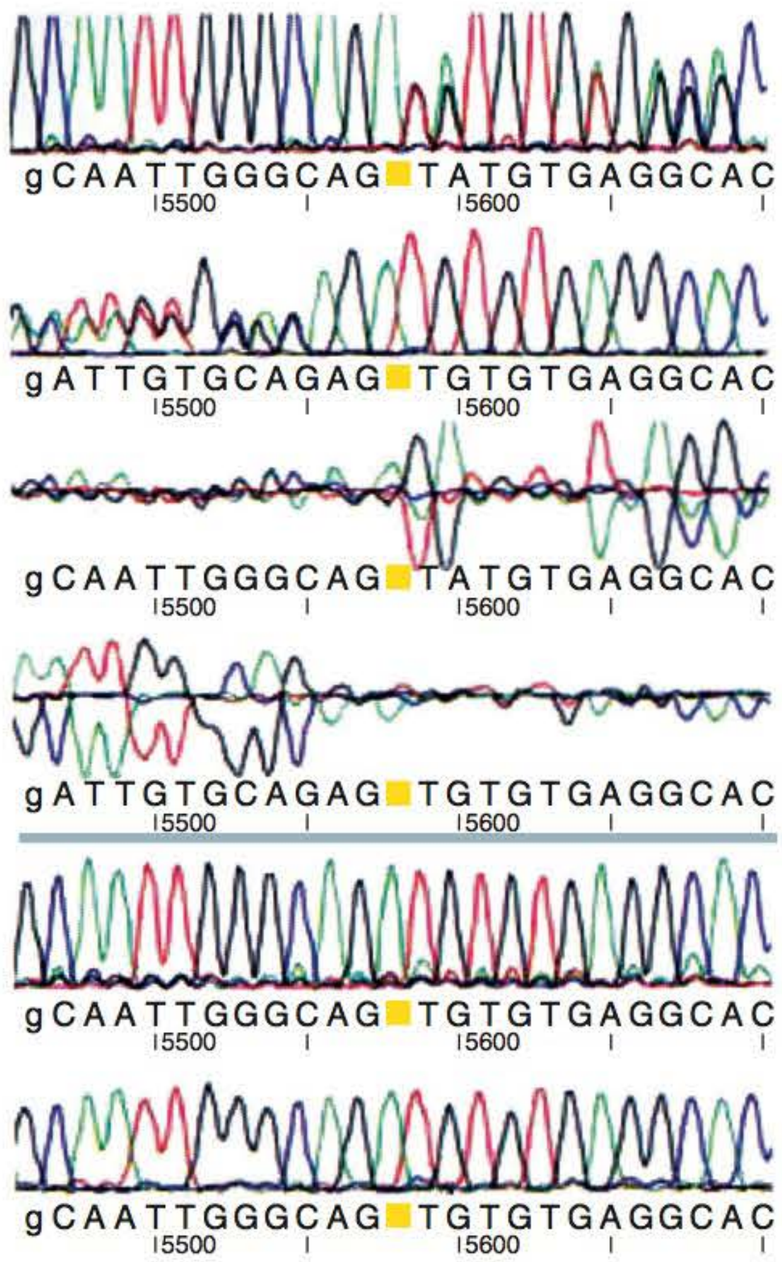


Figura 72.8 Detecção de mutações no *BRCA1* por sequenciamento gênico completo. Os dois traçados de sequência no alto de cada figura representam a sequência gênica de um paciente, determinada nas direções para a frente (linha 1) e reversa (linha 2). O traçado da sequência reversa é complementado com cor para ajudar na interpretação visual. As ondulações no fundo da figura são compostos, construídos a partir dos traçados de sequência de 20 indivíduos normais nas direções para a frente (linha 5) e reversa (linha 6). Os traçados no meio da figura foram obtidos subtraindo-se as ondulações do composto normal dos traçados de sequência do paciente nas direções para a frente (linha 3) e reversa (linha 4). O painel da esquerda demonstra uma única substituição de base, G→A, em um alelo do *BRCA1* na posição 1.235 do nucleotídeo no éxon 11, resultando na substituição de um códon de parada, TGA, por um de triptofano, TGG, na posição 372 do aminoácido. O painel da direita demonstra uma inserção de dois pares de base, GA, na posição 5.598 em um alelo do éxon 24 do *BRCA1*. Essa inserção fora da estrutura produz um códon de parada de sete aminoácidos à jusante.

Essa inserção fora da estrutura produz um códon de parada de sete aminoácidos a jusante, que resulta mais uma vez em uma proteína não funcional truncada. A Figura 72.9 ilustra uma avaliação baseada na avaliação pela PCR multiplex da dosagem da sequência relativa por todos os éxons do *BRCA1* e do *BRCA2*. Cada éxon é interrogado em pelo menos dois *loci* separados e os dados são combinados em um único ponto. Uma deleção completa do gene *BRCA1* é representada como uma dosagem correspondente à metade da normal ao longo de todo o comprimento do *BRCA1*, enquanto uma duplicação do éxon 13 do *BRCA1* é representada por um único ponto de dados em uma dosagem equivalente a uma vez e meia a normal. Embora essas abordagens possam ser demoradas e onerosas, assim que uma mutação é identificada em um indivíduo acometido, o teste subsequente de outros membros da família é relativamente simples e sem custo, desde que possa ser direcionado especificamente para aquela anormalidade.

Outra complicação da análise de mutação dos genes que predispõem ao câncer relaciona-se com o significado funcional de algumas mutações que possam ser encontradas. Embora as mutações de proteínas truncadas e locais de junção nos genes supressores tumorais em geral sejam significantes, mutações de senso errado que produzem uma substituição conservadora de aminoácido provavelmente são benignas. E mesmo isso pode não ser concluído com certeza, pois até mutações sinônimas (alterações de bases que não causam uma substituição de aminoácido) podem afetar a junção do RNA, em particular se ocorrem perto do limite do éxon com o íntron. Assim, também é preciso usar outras linhas de evidência, como a cossegregação da mutação com câncer em famílias, estudos de casos de controle, conservação de aminoácido através da espécie e análises funcionais. Como cada linha isolada de evidência em si pode não permitir a classificação precisa da mutação, é preciso tentar integrar esses dados em uma predição clínica útil. Na prática do laboratório clínico, a classificação da mutação em geral é um desafio maior do que os métodos analíticos usados para a obtenção dos dados.

Por fim, o teste genético para o risco de câncer é especialmente útil se os resultados puderem afetar de forma positiva o tratamento clínico. Felizmente, conforme comentado antes, podem ser tomadas medidas eficazes para prevenir ou minimizar o risco do desenvolvimento de câncer em muitas síndromes cancerosas hereditárias, inclusive aquelas que afetam mais frequência um grande número de indivíduos.

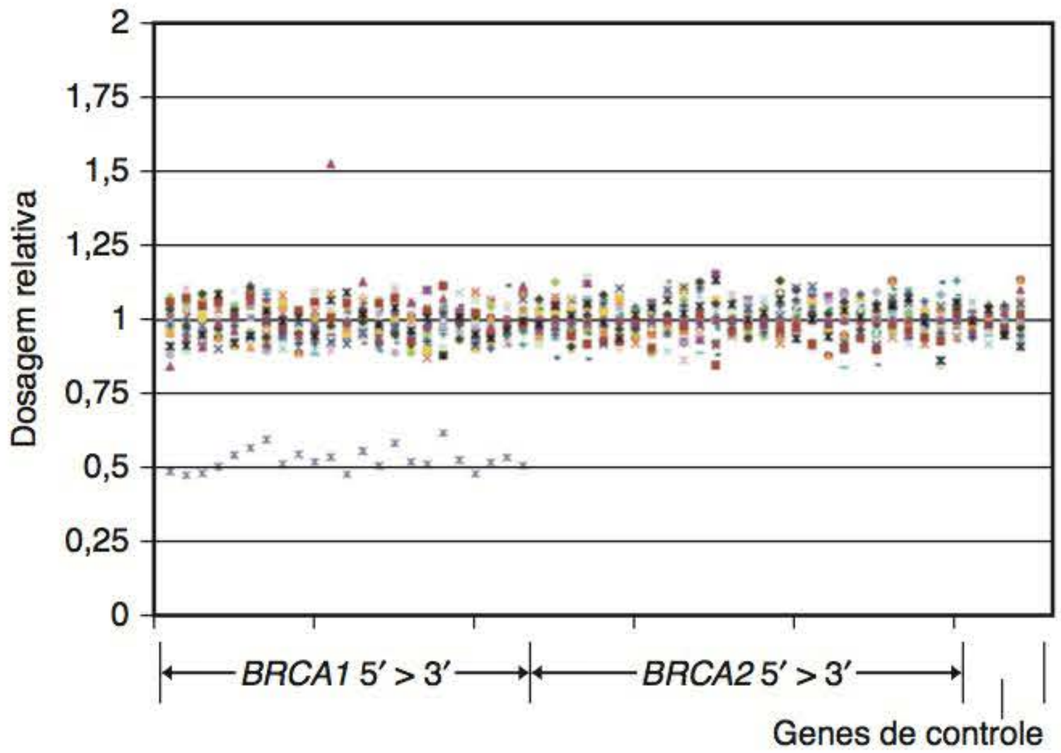


Figura 72.9 Detecção de grandes deleções e duplicações no *BRCA1* e no *BRCA2*. Foram interrogadas 23 regiões genômicas no *BRCA1* e 26 no *BRCA2*, em pelo menos dois *loci* separados em uma série de reações em cadeia da polimerase multiplex designadas para avaliar a dosagem relativa. Os dados desses *loci* foram combinados em um único ponto. Cada reação multiplex consistiu em números aproximadamente iguais de alvos no *BRCA1* e no *BRCA2*. O pontilhado ilustra a dosagem do gene através de todos os éxons do *BRCA1* e do *BRCA2* (5′–3′ mostrada), e quatro *loci* de controle em amostras de 32 pacientes. O valor 1 indica um complemento normal de duas cópias genômicas. O valor 0,5 indica a presença de uma cópia genômica (uma deleção). O valor 1,5 indica a presença de três cópias genômicas (uma duplicação). Os dados de cada paciente estão representados por símbolos únicos. Nesta figura, um paciente é portador de uma deleção de todo o gene *BRCA1*, representada por símbolos (x azuis) de todos os 23 éxons aglomerados perto da linha de dosagem relativa 0,5. Um segundo paciente é portador de uma duplicação do éxon 13 do *BRCA1*, representada pelo símbolo (triângulo vermelho) na linha de dosagem relativa 1,5. Os 12 pacientes restantes têm dosagem normal em cada *locus*.

Hemocromatose

Originalmente, acreditava-se que a hemocromatose hereditária, reconhecida pela primeira vez em sua expressão clínica plena como a tríade de cirrose, diabetes melito e bronzeamento da pele, era um

distúrbio raro de sobrecarga de ferro que afetava um em 5.000 ou menos caucasianos. Contudo, quando estudos genéticos ligaram o gene causador de doença ao *locus* HLA no cromossomo 6 e foram utilizados testes bioquímicos para detectar sobrecarga de ferro (principalmente saturação da transferrina), reconheceu-se que a predisposição genética subjacente à sobrecarga de ferro era extremamente comum. Na verdade, a hemocromatose hereditária é agora reconhecida como um distúrbio autossômico recessivo com frequência de portadores tão alta quanto de uma em oito pessoas descendentes de norte-europeus, o que a torna o distúrbio genético mais comum na população caucasiana dos Estados Unidos. A incidência de homozigotos em risco é de um em 250, mas apenas uma fração disso acumula excesso de ferro suficiente para causar lesão tecidual associada ao distúrbio clássico.

Nosso entendimento da hemocromatose hereditária entrou em uma nova era com a identificação do gene *HFE* (de início denominado *HLA-A*) dentro do *locus* de histocompatibilidade principal no cromossomo 6 (Feder, 1996). A proteína HFE, embora seja uma molécula semelhante ao complexo de histocompatibilidade principal da classe I, não se liga e apresenta peptídeos endógenos, acreditando-se que não tenha uma função imunológica. Em vez disso, conforme discutido no Capítulo 21, está se acumulando evidência de que a proteína HFE interage com o receptor de transferrina e modula a absorção entérica do ferro dietético (Waheed, 1999). Mutações no HFE prejudicam essa proteína reguladora, levando à absorção do excesso de ferro e a seu armazenamento nos tecidos.

Como notado no Capítulo 21, uma única mutação de sentido errado no *HFE*, C282Y, que resulta em uma substituição da tirosina por cistina no aminoácido 282 na proteína HFE, está presente no estado homozigoto em 80 a 90% dos caucasianos com hemocromatose. Um pequena porcentagem adicional de pacientes com hemocromatose é composta por heterozigotos, tendo um cromossomo com uma mutação C282Y e outro com uma mutação H63D. A H63D é um polimorfismo comum, com frequência de portadores de aproximadamente 20%, e sua associação à sobrecarga de ferro é muito baixa (1 a 2%) no estado composto heterozigoto e, provavelmente, menor no homozigoto (Gochee, 2002). Recentemente, a penetrância do estado homozigoto C282Y também foi questionada, e pode ser apreciavelmente inferior aos 80% antes pensados, talvez até de 10% ou mesmo 1% (Beutler, 2002; Pietrangelo, 2004). Por essa razão, a triagem de indivíduos na população sem sinais clínicos ou bioquímicos de hemocromatose para detectar essas mutações não foi recomendada. Como para o fator V de Leiden, é melhor reservar o teste do DNA para o diagnóstico diferencial em pacientes que já estejam exibindo o distúrbio clínico ou elevação da saturação de transferrina detectada à triagem bioquímica.

As mutações C282Y e H63D são substituições de um único nucleotídeo e podem ser analisadas facilmente por uma variedade de métodos de PCR, PCR em tempo real, microestrutura, microplaca ou métodos de sequenciamento.

Atrofia muscular espinal

A atrofia muscular espinal é um distúrbio autossômico recessivo do neurônio motor, que se caracteriza por fraqueza e desgaste musculares proximais. A forma mais grave, tipo I (também conhecida como doença de Werdnig-Hoffmann), manifesta-se por hipotonia na fase de lactente e morte precoce na infância por insuficiência respiratória. Formas intermediárias e atípicas também são descritas. A doença é causada por mutações no gene *SMN1* no cromossomo 5q13. Com uma frequência de portador de um em 50, a atrofia muscular espinal é um dos distúrbios recessivos letais mais comuns, com incidência semelhante à da fibrose cística.

A maioria (95%) dos pacientes acometidos exibe perda do gene *SMN1*, por deleção completa ou um evento de conversão gênica que envolve sequências no gene *SMN2* adjacente, o qual difere por um único nucleotídeo no éxon 7. Acredita-se que o gene *SMN2* não seja essencial, pois ambos os alelos estão ausentes em 5 a 10% dos indivíduos normais, embora ele seja parcialmente protetor, conforme demonstrado pelo achado de um número maior de cópias do *SMN2* em pacientes com formas menos graves da doença (Mailman, 2002). A presença desse gene estreitamente homólogo exigiu o desenvolvimento de ensaios de PCR/endonuclease de restrição para determinar deleção homozigota de *SMN1* na presença de *SMN2*. A identificação de portadores com base na análise da dosagem do gene *SMN1* é ainda mais desafiadora, exigindo o uso de métodos de PCR quantitativa ou em tempo real (Ojino, 2004b). A pequena porcentagem de pacientes que não apresenta perda ou conversão de ambos os genes *SMN1* em geral tem uma mutação intragênica em um alelo, havendo relatos de grande número de pessoas assim, que podem ser detectadas pelo sequenciamento ou por ensaios de PCR multiplex específicos do alelo (Mailman, 2002).

Distúrbios do DNA mitocondrial

Além dos seis bilhões de pares de bases de DNA que compreendem o genoma humano nuclear diploide, informação genética vital também é codificada nas moléculas de DNA existentes nas mitocôndrias. Essas moléculas circulares de fita dupla de DNA com 16.500 pares de bases estão presentes em duas a 10 cópias em cada uma das várias centenas de mitocôndrias da célula. O DNA mitocondrial codifica 13 das proteínas da cadeia respiratória e a sintase do trifosfato de adenosina (ATP), 22 RNAs de transferência necessários para a tradução e dois RNAs ribossômicos. O DNA mitocondrial é autorreplicante e transmitido estritamente por herança materna, pois as mitocôndrias de um esperamatozoide não se incorporam no zigoto quando ocorre a fertilização do óvulo.

As anormalidades do DNA mitocondrial que causam doenças podem resultar de vários mecanismos diferentes (Servidei, 2002). Grandes deleções isoladas (e, raramente, duplicações) que aparentemente ocorrem de forma esporádica na oogênese são típicas da síndrome de Kearns-Sayre, uma miopatia que se caracteriza principalmente por oftalmoplegia externa progressiva e retinopatia pigmentar. Uma ampla gama de distúrbios caracteriza-se por múltiplas deleções pequenas e exibe padrões de herança mendeliana típica autossômica dominante ou autossômica recessiva, aparentemente porque são causados por defeitos indefinidos em genes nucleares importantes para a replicação do DNA mitocondrial. Mais distintos do aspecto genético são os distúrbios que seguem um padrão de herança materna estrita, nunca mostrando transmissão de um homem acometido e passando de mães acometidas igualmente para os filhos e filhas. Essas doenças mais frequentemente resultam de mutações pontuais em um dos genes que codificam um RNA de transferência (p. ex., epilepsia mioclônica com fibras vermelhas anfractuosas [*MERRF, myoclonic epilepsy and ragged red fibers*] onfractuosase miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral [*MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes*]) ou uma proteína mitocondrial (p. ex., neuropatia óptica hereditária de Leber [*LHON, Leber's hereditary optic neurophathy*]). Além das encefalomiopatias hereditárias, há evidência crescente de que acúmulos de mutações mitocondriais somáticas específicas de tecido podem contribuir para o desenvolvimento de muitos distúrbios degenerativos comuns de início tardio, e talvez para o próprio envelhecimento.

A confirmação laboratorial das grandes deleções do DNA mitocondrial em geral presentes na síndrome de Kearns-Saye é conseguida com facilidade pela análise de *Southern blot* do DNA mitocondrial de tecidos afetados usando-se DNA mitocondrial total marcado como uma sonda. Mutações pontuais em outros distúrbios podem ser analisadas por várias técnicas. A apresentação clínica costuma orientar a escolha do teste do painel de mutação em etapas, pois certas mutações estão associadas a síndromes importantes (p. ex., mutações de sentido errado G11778A, T14484C, e G3460A com LHON). Se esses testes foram negativos, pode-se prosseguir para um segundo painel, para completar o sequenciamento do DNA mitocondrial. A situação torna-se complicada pelo achado de que algumas mutações são encontradas em mais de uma síndrome e pelo fenômeno de heteroplasmia – a ocorrência de proporções diferentes de mitocôndrias mutantes e normais em tecidos diferentes. Por essa última razão, o teste do DNA mitocondrial pode requerer biópsia do tecido envolvido (p. ex., músculo), pois a mutação pode não estar representada o suficiente em sangue para ser detectável.

Outros alvos de testes genéticos moleculares e triagem

Os exemplos de doenças específicas mencionados neste capítulo foram escolhidos porque estão entre os mais testados nos laboratórios de genética molecular, um mercado que se reflete por sua inclusão nos programas de teste de proficiência dos College of American Pathologists/American College of Medical Genetics. Por sua vez, isso levou à busca da frequência de portadores da mutação ou da prevalência da doença na população geral, bem como de sua gravidade clínica. Como já foi comentado, se a frequência de portadores de uma mutação recessiva for alta o suficiente na população alvo, a triagem geral pode estar justificada. No caso desses e de outros distúrbios, a aplicação do teste ao diagnóstico diferencial, ao diagnóstico pré-natal ou ao diagnóstico pré-sintomático também pode ser válida. Com mais de 10.000 doenças genéticas catalogadas, é evidente que há muitas outras a seren consideradas e, de fato, durante a elaboração deste livro, já se dispunha de mais de 1.000 testes genéticos moleculares para doenças, conforme listado no banco de dados *online* GeneClinics.org. Muitos deles são estranhos e oferecidos por apenas um ou poucos laboratórios. Os testes para doenças genéticas extremamente raras, ou "órfãs", podem estar disponíveis apenas no laboratório de pesquisa que clonou o gene. Isso tem causado alguma dificuldade, pois tais laboratórios, embora prestem um serviço vital a um pequeno número de famílias em risco, não estão credenciados pelo CLIA nos Estados Unidos e, portanto, não deveriam estar liberando resultados de testes com vistas a tratamento clínico. Várias soluções foram propostas, como modificar certas exigências do CLIA para tais casos, criar uma parceria entre o laboratório de pesquisa e o laboratório clínico na própria instituição, ou estabelecer uma rede de laboratórios dedicados a tais doenças.

Alguns distúrbios, que são raros na população geral, são suficientemente prevalentes em um grupo étnico particular para justificar uma triagem populacional limitada. Por exemplo, vários laboratórios oferecem um painel de triagem para judeus asquenazes, que inclui qualquer ou toda doença autossômica recessiva citadas a seguir, cuja frequência de portadores varie de 1/100 a 1/15: de Tay-Sachs, Gaucher, Canavan, fibrose cística, disautonomia familiar, doença de Niemann-Pick do tipo A, anemia de Fanconi do tipo C, síndrome de Bloom e perda auditiva relacionada com a conexina 26. A triagem das quatro primeiras gera resultados positivos em um de cada seis indivíduos dessa população (Eng 1997).

Além de prestar serviço a uma população nativa particular de pacientes, a escolha do menu de testes genéticos moleculares a partir do universo amplo e sempre em expansão dos genes causadores de doenças conhecidos vai depender tanto de fatores intelectuais quanto econômicos (Amos, 2004). O desenvolvimento de um teste molecular pode ser estimulado pelo interesse de um colega clínico em determinada doença e acrescido pelo de pacientes e parentes em risco. Um teste molecular pode ser necessário como confirmação de um teste bioquímico feito na mesma instituição, como no caso das hemoglobinopatias, da deficiência de α-1-antitripsina ou da hiperplasia suprarrenal congênita. É evidente que um forte motivador é a disponibilidade de plataformas comerciais consistentes distribuídas para a realização do teste (instrumentação, reagentes específicos para o analito [ASR] e/ou *kits* aprovados pelo FDA nos Estados Unidos), e isso, por sua vez, fará com que os fabricantes vejam um mercado potencial com relação à doença em questão. Naturalmente, os testes para a triagem de portadores serão sempre em maior volume do que os testes diagnósticos, o que explica a proliferação de sistemas comerciais ASR para detecção da mutação da fibrose cística que se seguiu às recomendações para a triagem dos ACMG/ACOG. Enquanto isso, um fator econômico que impulsiona na direção oposta, de disseminar menos os testes, é o espectro de patentes gênicas exclusivas. Dependendo das restrições e licenciamentos de quem mantém a patente, os laboratórios clínicos podem não ter acesso a certos testes desejados, mesmo se feitos com métodos desenvolvidos por eles mesmos. Por último, vale lembrar que primeiro é preciso comprovar a utilidade clínica e a validade analítica de qualquer novo teste considerado.

Perspectivas futuras

Com os muitos exemplos apresentados neste capítulo, deve ter ficado claro que os testes moleculares para doenças genéticas no momento estão em evidência e de fato constituem um marco na história da medicina. Como veremos no Capítulo 76, com a fase inicial do Projeto Genoma Humano recém-completada e a sequência completa de todos os genes conhecida, praticamente qualquer teste para uma mutação hereditária está dentro de nosso alcance. Além disso, avanços contínuos no sequenciamento do DNA de alta velocidade e na tecnologia de microestrutura podem fazer com que um dia a análise abrangente rotineira do genoma de um paciente seja economicamente viável. Mas, ainda que isso venha a ser praticável em termos analíticos, os laboratórios e clínicos serão capazes de lidar com o componente interpretativo? Como vamos distinguir as mutações patológicas dos milhares de polimorfismos benignos que existem por todo o genoma? Será a varredura de todo o genoma equivalente às atuais alardeadas TC de todo o corpo, com sombras de significado incerto?

Inseparáveis da "invasividade" tecnológica dos testes genéticos são as questões éticas levantadas no começo deste capítulo: privacidade genética, discriminação, estigmatização, confidencialidade, consentimento informado. Tudo isso foi discutido e publicado extensamente, inclusive no contexto da nova tecnologia (Grody, 2003a). Por causa dessas questões, surgiu a crença disseminada de que os resultados dos testes genéticos moleculares são diferentes em um aspecto fundamental (principalmente devido a seu poder preditivo) em comparação com todas as demais informações médicas, tendo de ser submetidos a uma supervisão mais estrita. Outros acham que os resultados desses testes, embora de longo alcance, não precisam implicar uma carga emocional maior do que a de muitos outros exames clínicos realizados no laboratório clínico e de patologia. Apesar disso, nos Estados Unidos, muitos estados e municípios estão em busca de soluções reguladoras para o potencial percebido de abuso, e uma variedade de iniciativas legislativas federais que visam salvaguardar a informação genética e a privacidade está pendente ou já foi aprovada.

Ainda que a análise molecular venha a tornar-se mais invasiva, as técnicas de colheita de amostras para os testes genéticos estão ficando menos invasivas. Abordagens como escovados bucais podem substituir a flebotomia e as biópsias para se detectar uma mutação em linhagem germinativa, e o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e seletivas para a obtenção de amostras fetais pode tornar a inavasividade da ameniocentese e da retirada de amostras de vilosidades coriônicas menos necessária para o diagnóstico pré-natal. Isso inclui o isolamento de células fetais ou DNA do sangue materno (Dhallan, 2004) ou conteúdos vaginais. Ao mesmo tempo, pode-se usar a PCR de uma única célula para biópsia de embrião precoce e diagnóstico genético pré-implantação, evitando a invasividade e o trauma emocional do diagnóstico pré-natal tardio e da interrupção da gravidez (Wells, 2001). Ao lado das questões sobre o acesso devido ao alto custo, o diagnóstico genético pré-implantação levanta a perspectiva de outro minicampo ético que antes era domínio da ficção científica: a capacidade de selecionar uma prole sem traços de doença. De fato, isso já está acontecendo, com a tipagem de embriões para o HLA pela PCR de uma única célula, sendo usados para implantação seletiva com base na possibilidade prevista de a prole servir como doadora de medula óssea para irmãos existentes com distúrbios hematopoéticos (Verlinsky, 2004).

As aplicações apresentadas neste capítulo foram todas de defeitos em um único gene, pois é o que abrange todo nosso conhecimento até o momento e a tecnologia atual pode manipular. No futuro, espera-se que os testes de genética molecular também sejam aplicados à medicina das doenças crônicas mais comuns, todas poligênicas: aterosclerose, diabetes melito, hipertensão, esquizofrenia. É nessa direção que um grande esforço está sendo feito para identificar polimorfismos de um nucleotídeo único (SNPs) e outras variantes dentro de genes candidatos que possam produzir em conjunto efeitos quantitativos mínimos sobre a homeostasia, o tônus vascular, o metabolismo de lipídios e assim por diante. Espera-se que a descoberta desses determinantes possibilite fazer programas de triagem do risco da população, seguidos pelas terapias direcionadas e intervenções preventivas. Dessa forma, os testes genéticos moleculares serão a modalidade central além e em maior proporção da prática médica no século XXI, e praticamente todo paciente, sadio ou doente, irá sentir seu impacto.

Referências bibliográficas

Abeliovich D, Lavon IP, Lerer I, et al: Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. Am J Hum Genet 1992; 51:951–956.

Ahn AH, Kunkel LM: The structural and functional diversity of dystrophin. Nat Genet 1993; 3:283–291.

Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al: Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. Nat Genet 2002; 30:227–232.

American College of Medical Genetics: Genetic Susceptibility to Breast and Ovarian Cancer: Assessment, Counseling and Testing Guidelines – Executive Summary. Albany, NY, American College of Medical Genetics and New York State Department of Health, 1999.

Amos J, Grody WW: Development and integration of molecular genetic tests into clinical practice: the US experience. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:465–477.

Anguiano A, Oates RD, Amos JA, et al: Congenital bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. JAMA 1992; 267:1794–1797.

Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet 1990; 86:45–48.

Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al: Mutations in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 343:1535–1536.

Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, et al: Penetrance of 845G-A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. Lancet 2002; 359:211–218.

O estudo mais cotado dentre vários que questionam a penetrância presumível de 80% da mutação importante HFE como causa de sobrecarga de ferro.

Billings PR, Kohn MA, de Cuervas M, et al: Discrimination as a consequence of genetic testing. Am J Hum Genet 1992; 50:476–482.

Brown WT: The FRAXE syndrome: is it time for routine screening? Am J Hum Genet 1996; 903–905.

Burger J, Buiting K, Dittrich B, et al: Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. Am J Hum Genet 1997; 61:88–93.

Burke W, Aitken ML, Chen S-H, Scott CR. Variable severity of pulmonary disease in adults with identical cystic fibrosis mutations. Chest 1992; 102:506–509.

Collins FS: Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 1992; 256:774–780.

Conner BJ, Reyes AA, Morin C, et al: Detection of sickle beta-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:278–282.

Cystic Fibrosis Genotype–Phenotype Consortium: Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med 1993; 329:1308–1313.

Darras BT, Harper JF, Francke U: Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy. N Engl J Med 1987; 316:985–992.

Darras BT, Koenig M, Kunkel LM, Francke U: Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy using the entire dystrophin cDNA. Am J Med Genet 1988; 29:713–726.

Dhallan R, Au W-C, Mattagajasingh S, et al: Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. JAMA 2004; 291:1114–1119.

Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. J Clin Oncol 1999; 17:380–393.

Eng CM, Schechter C, Robinowitz J, et al: Prenatal genetic carrier testing using triple disease screening. JAMA 1997; 278:1268–1272.

Everett CM, Wood NW: Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. Brain 2004; 127:2385–2405.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromoatosis. Nat Genet 1996; 13:399–408.

Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, et al: Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell 1991; 67:1047–1058.

Fu Y-H, Pizzuti A, Fenwick RG, et al: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. Science 1992; 255:1256–1258.

Garber JE, Offit K: Hereditary cancer predisposition syndromes. J Clin Oncol 2005; 23:276–292.

GeneReviews. www.geneclinics.org, 2005.

Site útil da internet com revisões didáticas e atualizadas sobre a genética e os aspectos clínicos dos principais distúrbios hereditários, bem como uma lista de âmbito mundial dos laboratórios de pesquisa onde pode ser feito cada teste específico.

Gervais R, Dumur V, Rigot J-M, et al: High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens (letter). N Engl J Med 1993; 328:446–447.

Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM: AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. Gastroenterology 2001; 121:198–213.

Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, et al: A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. Gastroenterology 2002; 122:646–651.

Grebe TA, Seltzer WK, DeMarchi J, et al: Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. Am J Hum Genet 1994; 54:443–446.

Grody WW: Cystic fibrosis: molecular diagnosis, population screening, and public policy. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:1041–1046.

Grody WW: Molecular genetic risk screening. Annu Rev Med 2003a; 54:473–490.

Grody WW: Ethical issues raised by genetic testing with oligonucleotide microarrays. Molec Biotechnol 2003b; 23:127–138.

Grody WW, Cutting G, Klinger K, et al: Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. Genet Med 2001a; 3:149–154.

Artigo que apresenta as recomendações do American College of Medical Genetics e do American College of Obstetricians and Gynecologists para a implementação da triagem de portadores de fibrose cística na população de toda a nação usando um painel central de 25 mutações do gene CFTR.

Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, et al: American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. Genet Med 2001b; 3:139–148.

Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, et al: High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded *FMR-1* mutation associated with protein expression. Am J Med Genet 1994; 51:298–308.

Hall JG: Human diseases and genomic imprinting. Results Probl Cell Differ 1999; 25:119–132.

Hall MA, Rich SS: Laws restricting health insurers' use of genetic information: Impact on genetic discrimination. Am J Hum Genet 2000; 66:293–307.

Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, et al: Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. N Engl J Med 1992; 327:905–909.

Hatcher SL, Trang QT, Robb KM, et al: Prenatal diagnosis by enzymatic amplification and restriction endonuclease digestion for detection of haemoglobins A, S and C. Mol Cell Probes 1992; 6:343–348.

Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, et al: A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. N Engl J Med 1994; 331:974–980.

Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, et al: Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. N Engl J Med 1988; 318:1363–1368.

Huntington's Disease Society of America: Guidelines for Predictive Testing for Huntington's Disease. New York, HDSA, 1989.

Imperatore G, Pinsky LE, Motulsky A, et al: Hereditary hemochromatosis: perspectives of public health, medical genetics, and primary care. Genet Med 2003; 5:1–8.

Jacquemont S, Hagerman R, Leehey MA, et al: Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. JAMA 2004; 291:460–469.

Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, et al: Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. Science 1989; 245:1073–1080.

Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, et al: Angelman and Prader–Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. Am J Med Genet 1989; 32:285–290.

Knudson AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68:820–823.

Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM: Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. Blood 1994; 84:1031–1035.

Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, et al: Prader–Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. Am J Med Genet 1997; 73:308–313.

Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, et al: Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. N Engl J Med 1999; 340:9–13.

Levinson G, Maddalena A, Palmer FT, et al: Improved sizing of fragile X CCG repeats by nested polymerase chain reaction. Am J Med Genet 1994; 51:527–534.

Lodi R, Cooper JM, Bradley JL, et al: Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:11492–11495.

Lopez de Munain A, Blanco A, Emparanza JI, et al: Anticipation in myotonic dystrophy: a parental-sex-related phenomenon. Neuroepidemiology 1994; 13:75–78.

Louis M, Dekairelle AAF, Gala JL: Rapid and combined genotying of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms using minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes) and real-time polymerase chain reaction. Clin Chem Lab Med 2004; 42:1364–1369.

McCabe LL, McCabe ERB: Genetic screening: carriers and affected individuals. Annu Rev Genomics Hum Genet 2004; 5:57–69.

Macek M, Mackova A, Hamosh A, et al: Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. Am J Hum Genet 1997; 60:1122–1127.

Maggio A, Gianbona A, Cai SP, et al: Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. Blood 1993; 81:239–242.

Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, et al: Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3′ untranslated region of the gene. Science 1992; 255:1253–1255.

Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, et al: Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. Genet Med 2002:4:20–26.

Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, et al: De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. Nat Genet 1997; 15:74–77.

Mendell JR, Buzin CH, Feng J, et al: Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. Neurology 2001; 57:645–650.

Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al: An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 1988; 2:90–95.

Multicenter Study Group: Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction: a multicenter study. JAMA 1992; 267:2609–2615.

Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. Oncogene 2004; 23:6445–6470.

Naja RP, Kaspar H, Shbaklott et al: Accurate and rapid prenatal diagnosis of the most frequent East Mediterranean beta-thalassemia mutations. Am J Hematol 2004; 75:220–224.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer 2004; 4:665–676.

National Comprehensive Cancer Network. Genetic/familial high-risk assessment: Breast and Ovarian. Clinical Practice Guidelines in Oncology – v.1.2005. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/genetics_screening.pdf

NIH Consensus Statement Online: Genetic testing for cystic fibrosis. Available at: http://text.nlm.nih.gov/nih/cdc/www/106txt.html.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, et al: Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. Am J Hum Genet 2003; 72:454–464.

Ober C, Lester LA, Mott C, et al: Ethnic heterogeneity and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) mutation frequencies in Chicago-area CF families. Am J Hum Genet 1992; 51:1344–1348.

Ojino S, Wilson RB: Bayesian analysis and risk assessment in genetic counseling and testing. J Mol Diagn 2004a; 6:1–9.

Ojino S, Wilson RB: Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 2004b; 4:15–29.

Oron-Karni V, Filon D, Oppenheim A, Rund D: Rapid detection of the common Mediterranean alpha-globin deletions/rearrangements using PCR. Am J Hematol 1998; 58:306–310.

Palomaki GE, FitzSimmons SC, Haddow JE: Clinical sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via CFTR carrier testing in a United States panethnic population. Genet Med 2004; 6:405–414.

Pietrangelo A: Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. N Engl J Med 2004; 350:2383–2397.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM: A common genetic variation in the 3′-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 1996; 88:3698–3703.

Prior TW: Genetic analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene. Arch Pathol Lab Med 1991; 115:984–990.

Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, et al: Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. Am J Hum Genet 1995; 57:22–23.

Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, Heit JA: Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:1304–1318.

Richards CS, Grody WW: Prenatal screening for cystic fibrosis: past, present and future. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:49–62.

Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE: Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women: implications for venous thromboembolism screening. JAMA 1997a; 227:1305–1307.

Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, et al: Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. Circulation 1997b; 95:1777–1782.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, et al: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245:1066–1073.

Rowland LP: Dystrophin: a triumph of reverse genetics and the end of the beginning (editorial). N Engl J Med 1988; 318:1392–1394.

Ryan D, Nuccie B, Arvan D: Non-PCR-dependent detection of the factor V Leiden mutation from genomic DNA using a homogeneous invader microtiter plate assay. Mol Diagn 1999; 4:135–144.

Servidei S: Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. Neuromuscul Disord 2002; 12:524–529.

Smeets HJM, Smits APT, Verheij CE, et al: Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. Hum Mol Genet 1995; 4:2103–2108.

Sherman SL: Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. Am J Med Genet 2000; 97:189–194.

Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, et al: Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. Am J Hum Genet 1988; 42:217–226.

Strom CM, Huang D, Chen C, et al: Extensive sequencing of the cystic fibrosis regulator gene: assay validation and unexpected benefits of developing a comprehensive test. Genet Med 2003; 5:9–14.

Tsui L-C: The spectrum of cystic fibrosis mutations. Trends Genet 1992; 8: 393–398.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Sharapova T, et al: Preimplantation HLA testing. JAMA 2004; 291:2079–2085.

Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, et al: Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:1579–1584.

Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, et al: MYH mutations in patients with attenuated and classical polyposis and with young onset colorectal cancer without polyps. Gastroenterology 2004; 127:9–16.

Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al: Cystic fibrosis couple carrier screening: 2004 revision of ACMG's mutation panel. Genet Med 2004; 6:387–391.

Wells D, Delhanty JDA: Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. Trends Mol Med 2001; 7:23–30.

Wilfond BS, Fost N: The cystic fibrosis gene: medical and social implications for heterozygote detection. JAMA 1990; 263:2777–2783.

CAPÍTULO 73

Análise de identidade: uso dos polimorfismos de DNA em testes de paternidade e forenses

Herbert F. Polesky MD, Rhonda K. Roby MPH

Antecedentes históricos 1520
Vantagens do DNA 1521
Seleção de marcadores genéticos 1521
  Polimorfismos 1521
As amostras e sua coleta 1521
Extração de DNA 1522
Métodos de teste e sistemas de marcadores 1523
  Repetições curtas em tandem 1523
  Marcadores de cromossomos X e Y 1523
  Sequenciamento de DNA mitocondrial 1524
  Outros sistemas 1525
Análise e uso dos dados do teste 1525
  O DNA no laboratório de criminalística 1525
  O DNA no laboratório de patologia 1525
  Exclusão de ternidade 1525
  Poder de exclusão 1526
  Probabilidade de exclusão cumulativa 1526
Inclusão de paternidade 1526
  Cálculo do índice de paternidade 1527
  Probabilidade de paternidade 1528
  Estimação de parentesco com pai ou mãe ausente 1528
  Reconstrução de famílias 1528
Padrões de garantia de qualidade 1528
Conclusões 1529
Agradecimento 1529
Referências bibliográficas 1530

PONTOS-CHAVE

- Os marcadores de DNA praticamente substituíram os demais sistemas de teste de identidade.
- Sistemas de marcadores padronizados, contendo polimorfismos alélicos conhecidos, são utilizados em painéis. Os alelos que contêm STR, constituem a base dos kits atualmente comercializados.
- O teste forense requer a documentação de todas as etapas conduzidas durante a coleta, a extração e o teste, de modo que os resultados possam resistir aos desafios legais.
- O DNA pode ser obtido a partir de qualquer amostra que contenha material celular. A estabilidade do DNA lhe confere resistência em meio a condições ambientais rigorosas, ou mesmo após longos períodos pós-morte. É preciso ter cuidado para excluir eventuais contaminações com DNA oriundo de outras fontes.
- O DNA mitocondrial pode ser extraído de ossos e dentes datados de centenas de anos, pois é pequeno e está presente em centenas a milhares de cópias em cada célula. O DNA mitocondrial é herdado da mãe e pode ser útil para fins de identificação de restos mortais.
- O DNA é utilizado para identificar restos mortais e também pode ser utilizado para associar um suspeito a um crime, absolver suspeitos acusados injustamente, reconhecer crimes em série, distinguir crimes de falsificação ou, ainda, auxiliar na reconstrução de acidentes (p. ex., ajudar a determinar quem era o motorista de um carro, por meio da análise de manchas de sangue encontradas no para-brisa do lado esquerdo do carro).
- Os laboratórios de patologia podem empregar testes de DNA para descobrir a composição de misturas de amostras, como ocorre quando amostras são acidentalmente trocadas ou quando o material patológico flutua e migra por lâminas histológicas ou citológicas.
- A American Association of Blood Banks (AABB) e o DNA Advisory Board do FBI desenvolveram padrões e diretrizes para garantia da qualidade destinadas a laboratórios de determinação de parentesco e forenses, respectivamente.

Nas edições anteriores deste livro, os testes de paternidade (determinação de parentesco) e testes forenses (de criminalística) foram abordados como tópicos separados. Na década passada, o teste de DNA se transformou no principal método em ambas as áreas. Com exceção da análise dos resultados do teste e da fonte das amostras, as similaridades são mais numerosas que as diferenças. No teste de paternidade, amostras obtidas de múltiplos indivíduos são comparadas quanto às semelhanças herdadas, enquanto, no teste forense, na maioria dos casos, as amostras encontradas na cena do crime são avaliadas quanto à exata compatibilidade com o suspeito.

Uma referência primordial frequentemente citada em casos de paternidade disputada está na Bíblia (1 Reis 3,16-27). Nessa passagem, Salomão toma uma decisão acerca da maternidade de uma criança disputada e ameaça fazer uso de sua espada para dar a cada uma das reclamantes uma parte da criança. Quando a paternidade está sendo disputada, o árbitro da verdade muitas vezes se depara com um dilema semelhante àquele enfrentado por Salomão: a falta de testemunhas do evento e a possibilidade de as partes envolvidas desconhecerem a verdade ou mentirem. Similarmente, diante da falta de testemunhas oculares ou de confissões, torna-se difícil identificar um indivíduo presente na cena do crime, enquanto a maioria das evidências fornece meras indicações de uma ligação suspeita. A disponibilidade de evidência biológica, como DNA, fornece informações que podem conduzir a uma clara resolução dos fatos disputados.

Antecedentes históricos

A descoberta do sistema ABO de grupo sanguíneo por Landsteiner, em 1900 (Landsteiner, 1901), e o reconhecimento de que essas características mensuráveis seguem as regras genéticas descritas por Gregor Mendel (Mendel, 1866) forneceram evidência laboratorial objetiva que poderia ser utilizada pelos tribunais para ajudar a tomar decisões em casos de indivíduos falsamente acusados de paternidade. Nos Estados Unidos, as leis que tratam do uso de marcadores genéticos para exclusão de paternidade foram promulgadas em 1935 (Schatkin, 1952). Nos anos subsequentes, o conhecimento sobre sistemas de marcadores genéticos aumentou dramaticamente. Em 1976, foram desenvolvidas diretrizes conjuntas por um comitê da American Medical Association-American Bar Association (AMA-ABA), que recomendavam 7 sistemas para uso nas investigações de rotina de grupos sanguíneos em casos de disputa de paternidade (ABO, Rh, MNSs, Kell, Duffy, Kidd e HLA) (Miale, 1976). Outros sistemas genéticos, como o das proteínas séricas polimórficas e o das enzimas eritrocitárias, também tiveram sua utilidade reconhecida. Muitos desses mesmos marcadores genéticos

também foram utilizados para correlacionar as evidências encontradas na cena do crime aos suspeitos ou vítimas.

Em 1980, o polimorfismo de comprimento de fragmento de DNA de restrição (RFLP) foi descrito por Botstein et al. (Botstein, 1980). Alec Jeffreys recebeu os créditos pelo primeiro relato da literatura científica a sugerir que a tipagem de DNA poderia ser útil para a identificação forense, cunhando o termo "*DNA fingerprint*" em seu artigo publicado na Nature, em 1985 (Jeffreys, 1985a, 1985b). Em 1986, laboratórios comerciais iniciaram estudos de casos nas áreas de parentesco e criminalística, utilizando testes de DNA (Forensic Science Associates, em 1986; Lifecodes, em 1986; Cellmark, em 1987), sendo seguidos pelos laboratórios de criminalística do governo em 1989 (FBI, em dezembro de 1989; Virginia, em março de 1989). No ano de 1990, quando foi publicada a primeira edição do Standards for Parentage Testing Laboratories (American Association of Blood Banks, 1990), foram incluídas exigências específicas para o teste de RFLP no rol de testes que hoje é referido como sistemas clássicos (antígenos de superfície de hemácias, antígenos leucocitários humanos, enzimas eritrocitárias e marcadores genéticos de proteínas séricas). O teste de DNA praticamente está substituindo a sorologia tradicional. A comunidade de testes forenses de DNA tem tolerado muitas iterações de tecnologias e métodos baseados em DNA e está padronizando seus testes com um conjunto de 13 *loci* de repetições curtas de tandem (STR, *short tandem repeat*) centrais como principal ponto de apoio dos testes, a fim de construir seus próprios bancos de dados de criminosos internacionais. Esse conjunto de *loci* é complementado por outros testes de DNA, análises de gênero (amelogenina), marcadores de cromossomo Y e sequenciamento de DNA mitocondrial. A eletroforese capilar constitui a principal plataforma instrumental, e são poucos os laboratórios que ainda usam a eletroforese em gel.

Vantagens do DNA

O DNA permite a identificação direta de sua fonte individual, pois é pessoal e manifesta variação biológica. O DNA é útil como marcador de identidade, uma vez que: (1) está presente em todas as células do corpo (exceto nas hemácias maduras); (2) é o mesmo em todas as células do corpo (exceto nos gametas sexuais haploides); (3) permanece inalterado ao longo de toda a vida do indivíduo, desde a sua concepção (a não ser que um transplante de células-tronco progenitoras possa resultar na presença das características de seu doador, em vez do DNA herdado pelo receptor); e (4) é diferente para cada indivíduo (exceto em gêmeos idênticos). A evidência fornecida pelo DNA é considerada evidência de identificação positiva, em vez de mera evidência estatística de identificação. O FBI atualmente considera um resultado de perfil de DNA com poder discriminatório equivalente a 1:10 vezes a população dos EUA como evidência de que um determinado indivíduo constitui a fonte de uma dada amostra de DNA.

Os testes de DNA possuem sensibilidade significativamente superior àquela dos marcadores sorológicos tradicionais. Os testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser realizados com amostras mínimas e até mesmo com depósitos de traços de DNA invisíveis. O DNA é uma molécula robusta, que resiste a ácidos fortes, bases, detergentes e fatores ambientais (Kobilinsky, 1992). A informação da tipagem a partir do DNA é encontrada na sequência de nucleotídeos, que independe do formato da molécula. Em consequência, comparativamente aos marcadores tradicionais, os testes de DNA podem ser realizados com sucesso utilizando amostras mais antigas e que já foram expostas a insultos ambientais mais intensos.

O grosso de todo o volume de estudos de casos recebido pelos laboratórios de criminalística nos Estados Unidos é de agressões sexuais. Nesses casos, *swab*s vaginais em geral contêm bactérias e células epiteliais femininas, bem como esperma masculino. O DNA oriundo do esperma pode ser isolado do DNA não oriundo de esperma por meio de um procedimento de lise diferencial, graças à capa protetora existente nos espermatozoides (ver adiante a seção "Extração de DNA"). Isso permite individualizar a fonte de sêmen sem que haja confusão com dados associados a evidências não relacionadas ao sêmen. As sondas de DNA geralmente também são específicas para seres humanos e primatas, de modo que a presença de DNA bacteriano não gera consequências.

Seleção de marcadores genéticos

Polimorfismos

O modelo de sistema genético para testes seria aquele em que o indivíduo possuísse um único marcador. Na determinação das relações, esse marcador pode ser encontrado tanto na criança quanto no genitor putativo. Atualmente, com o déficit de sequenciamento de genes, nenhum dos sistemas de marcadores fornece achados tão específicos. Desse modo, múltiplos sistemas genéticos que atendem a determinados critérios são empregados para fins de teste de paternidade e identidade. Em uma situação ideal, o sistema deveria contar com múltiplos alelos distribuídos na população, de modo que apresentasse um alto poder de exclusão, e o fenótipo menos comum tivesse uma frequência que pudesse ser determinada de maneira confiável. Todos os marcadores presentes no sistema deveriam ser expressos (sem alelos nulos) em codominância, as taxas de mutação deveriam ser conhecidas e baixas, e os fenótipos deveriam ser estáveis sob as condições de armazenamento habituais. Os métodos disponíveis para detecção dos marcadores deveriam ser confiáveis, reproduzíveis e viáveis para um número considerável de laboratórios. Além de ser conhecida, a genética do sistema deve seguir padrões de herança estabelecidos (leis mendelianas). O sistema deveria ser independente dos demais marcadores testados na rotina. Se o sistema for utilizado com o intuito de calcular as estimativas de paternidade ou identidade, as frequências genéticas devem ser estabelecidas nas diversas populações (Budowle, 2001).

O DNA de cada ser humano (com exceção de gêmeos idênticos) é único, em razão da existência de "polimorfismos", que são diferenças encontradas no DNA de indivíduos. Entretanto, a vasta preponderância da sequência de DNA é idêntica entre todas as pessoas. Em média, os indivíduos diferem apenas em 1 a cada 1.000 pares de nucleotídeos. Mesmo assim, isso significa que existem em média 3 milhões de pares diferentes entre 2 indivíduos, o que contribui para uma tremenda variação genética na população. Embora a diversidade existente nas regiões codificadoras do DNA (genes) seja significativa, as regiões não codificadoras do DNA também dão origem a uma considerável diversidade.

Polimorfismos baseados em comprimento são encontrados em DNAs repetitivos. Mais de 90% do genoma humano é composto de DNA não codificante, ou refugo, e desse total cerca de 20 a 30% é constituído de regiões repetitivas. Muitas regiões repetitivas apresentam número variável de repetições centrais, ou seja, *loci* de repetições em tandem de número variável (VNTR, *variable number of tandem repeat*). Fragmentos de DNA com VNTRs apresentam comprimentos variáveis e, por isso, são úteis para fins analíticos. As repetições de dinucleotídeos são as mais comuns, contudo repetições centrais maiores são mais úteis para fins de investigação forense. RFLPs, polimorfismos de comprimento de fragmento de DNA amplificado (AmpFLPs, *amplified DNA fragment-length polymorfisms*) e STRs são exemplos de técnicas analíticas baseadas no comprimento de fragmentos. Os polimorfismos de sequências ocorrem em sequências de fragmentos de DNA de tamanhos semelhantes. Os polimorfismos de sequência consistem em alterações diferenciais envolvendo uma ou mais bases da sequência de DNA, que ocorrem em uma determinada localização do genoma. As variações de sequência podem se manifestar como regiões de alelos alternativos ou de substituições, adições ou deleções de bases. A maioria dessas variações se constitui de meras mutações pontuais em regiões repetitivas e não repetitivas, sendo conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorfisms*). SNPs, oligonucleotídeos sequência-específicos (p. ex., *dot blots* reversos) e testes de DNA mitocondrial são exemplos de testes baseados em sequências.

As amostras e sua coleta

A amostra ideal é aquela coletada do indivíduo a ser testado. Para realizar o teste de paternidade e introduzir informações em bancos de dados de DNA, as amostras utilizadas com maior frequência são sangue total fresco, manchas de sangue coletadas em papel de filtro e/ou *swabs* bucais. Os resultados dos testes muitas vezes são utilizados em procedimentos legais. Assim, todos os aspectos dos procedimen-

tos adotados devem ser bem documentados, pois podem estar sujeitos à contestação por uma das partes interessadas. É bastante importante garantir a documentação da identificação dos indivíduos submetidos aos testes, da coleta e da marcação das amostras. Embora uma parcela significativa das disputas de paternidade sejam ações civis, algumas jurisdições exigem documentos que mostrem uma cadeia de custódia de amostras semelhante àquelas utilizadas em questões criminais. É solicitada aos laboratórios credenciados pela AABB a obtenção de uma história de qualquer tipo de transfusão realizada recentemente (nos últimos 3 meses) ou de transplante de células-tronco hematopoéticas. Uma identificação fotográfica e o devido consentimento informado também devem acompanhar cada amostra. No caso de menores, o consentimento deve ser dado pelo indivíduo que possui os direitos legais de custódia da criança.

A coleta adequada das amostras na cena do crime é um procedimento muito importante. A evidência deve ser reconhecida antes mesmo de poder ser devidamente coletada. Isso com frequência é feito com a ajuda de substâncias químicas e/ou fontes de luz alternada, que tornam as manchas de sangue visíveis. A análise do padrão de salpicos de sangue também é utilizada para ajudar o investigador a interpretar e coletar os exemplares de maneira inteligente, a partir de uma pletora de manchas de sangue. A documentação adequada da cadeia de custódia, o embalamento e a vedação, bem como a preservação da amostra, são fatores tão importantes quanto a coleta inicial.

Líquidos biológicos derramados sobre itens que podem ser coletados (p. ex., sangue sobre um pedaço de roupa) devem ser apenas coletados e acondicionados separadamente. Quando um líquido biológico é depositado sobre um superfície ou um item que não possa ser coletado, esse líquido deve ser coletado por *swab*. Nesse caso, *swab*s limpos e estéreis são umedecidos em água destilada estéril e passados sobre a mancha até que ela tenha sido totalmente coletada. Para marcas de mordida encontradas em corpos, foi descrita uma técnica (Sweet, 1997) que envolve passar um *swab* úmido no local e, em seguida, um *swab* seco. Deve ser feita a coleta de um *swab*-controle a partir de uma área sem manchas, adjacente à mancha de líquido. Os *swabs* da mancha e controle devem ser secos ao ar e embalados separadamente.

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e a mistura de citrato-fosfato-dextrose (CPD) continuam sendo os anticoagulantes de escolha para o teste de DNA. Sangue anticoagulado com heparina não é recomendado para uso no teste de DNA. Mesmo que as hemácias maduras sejam destituídas de DNA (nuclear e mitocondrial), há uma quantidade suficiente de DNA nos leucócitos circulantes para realização dos testes. Apesar da inibição da PCR pelo heme, o sangue é considerado uma boa fonte de DNA para testes à base de PCR, pois é possível eliminar facilmente a atividade inibitória do heme por meio de diluições.

Entretanto, existem outras fontes de DNA diferentes do sangue que são preferíveis em casos de coleta após a morte se houver um nível significativo de putrefação. Praticamente qualquer tecido pode ser utilizado com sucesso para fins de tipagem de DNA. Existem alguns tecidos que, embora possam ser intuitivamente considerados fontes mais satisfatórias de DNA por apresentarem maior densidade celular e, consequentemente, conterem concentrações maiores de DNA, são de fato menos adequados por apresentarem taxas mais altas de degradação pós-morte (Kobilinsky, 1992). Entre os tecidos moles, o DNA hepático parece ser degradado de modo rápido pela ação de enzimas autolíticas, enquanto o tecido cerebral constitui uma fonte de DNA relativamente satisfatória durante o período intermediário pós-morte. Ossos e dentes são fontes estáveis de DNA tecidual pós-morte. O DNA informativo é obtido de forma rotineira a partir de restos de esqueletos antigos, datados de décadas atrás. Em geral, quanto maiores forem o grau de decomposição do corpo e o período pós-morte, maior será a degradação do DNA obtido a partir dos tecidos cadavéricos.

É preciso ter o cuidado de evitar a contaminação da amostra por outras fontes de DNA. Ao coletar as amostras, é necessário usar luvas e instrumentos livres de qualquer contaminação. Quando possível, a coleta deve ser feita a partir de tecidos não expostos, utilizando uma técnica de obtenção de biópsia incisional. As amostras devem ser mantidas sob refrigeração ou, de preferência, congeladas (ainda que o congelamento/descongelamento repetidas vezes cause a destruição de grandes fragmentos de DNA). A desidratação, ainda que seja realizada apenas via secagem ao ar, pode ser um método adequado de armazenamento de algumas amostras de DNA (p. ex., manchas de sangue e osso). Tecidos em formalina não são fontes ideais, porém muitas vezes podem ser utilizados para testes de DNA à base de PCR. Nenhum tecido ou líquido biológico deve ser considerado inadequado e descartado antes de uma tentativa de utilizá-lo no teste de DNA.

O DNA contido na maioria das amostras sofrerá fragmentação progressiva e aleatória, ou "degradação". Dessa forma, o DNA de alto peso molecular se transformará em DNA de baixo peso molecular (Kobilinsky, 1992). Depois de alguns dias, geralmente não se obtém DNA de alto peso molecular a partir de um tecido. Por outro lado, o DNA de alto peso molecular pode permanecer retido em materiais desidratados ou congelados durante anos. Fragmentos de DNA residuais menores podem persistir em amostras consideravelmente degradadas. Em razão do elevado número de cópias (centenas a dezenas de milhares de cópias/célula), o DNA mitocondrial com frequência persiste mesmo quando nenhum DNA nuclear é recuperado. Em consequência, o teste de mtDNA é empregado de forma rotineira na identificação de restos de esqueletos antigos (Ivanov, 1996).

O DNA pode ser rapidamente degradado ou danificado sob certas condições (Parsons, 1997). A hidrólise química do DNA em geral é bastante lenta. Testes demonstraram que o tipo de DNA não sofre alterações quando ele é misturado a detergentes, óleo, gasolina e outros adulteradores. Entretanto, íons metálicos podem catalisar a hidrólise oxidativa. A radiação ultravioleta (UV) é bem conhecida por causar dimerização da timidina. A despurinização foi descrita para "DNAs antigos".

Extração de DNA

A primeira etapa – e também a mais crítica – em qualquer teste de DNA é a extração dessa substância a partir de sangue ou manchas produzidas por material biológico, entre outras fontes. O DNA obtido a partir de amostra de sangue, *swab* vaginal ou outra fonte deve ser isolado dos demais componentes celulares e contaminantes ambientais. A clássica extração em clorofórmio/fenol com precipitação em etanol, ainda que trabalhosa, constitui um método eficiente e confiável que tem dado suporte ao teste com o passar dos anos. Os métodos modernos são mais simples e rápidos. No método Chelex (Walsh, 1991), por exemplo, uma amostra é fervida para liberar os conteúdos celulares e, em seguida, a resina Chelex-100 é adicionada para a ligação dos íons metálicos, com consequente inativação das nucleases e polimerases. Enquanto o extrato é relativamente bruto, o rendimento de DNA resultante é alto e apresenta grau de pureza suficiente para a realização da maioria dos testes à base de PCR. Os métodos de extração em coluna de fase sólida (p. ex., colunas Quiagen) estão sendo cada vez mais utilizados para a extração de DNA, em particular nas operações que envolvem grandes volumes, que podem necessitar de automação. Quando comparados ao método da extração com Chelex, os métodos de extração em coluna fornecem um DNA mais altamente purificado, todavia a um custo maior. Tais métodos permitem remover contaminantes, como aqueles encontrados em pontas de cigarro e certos corantes. As pérolas de silicone constituem outro método excelente de purificação de DNA, indicado para casos em que há necessidade de remover inibidores. Diversos laboratórios eliminam totalmente a etapa da extração, realizando uma PCR direta com material obtido por punção de um item manchado com sangue. Essa técnica é mais utilizada para manchas de sangue obtidas em FTA Cards (papéis de filtro especialmente tratados) a partir de amostras arquivadas em bancos de dados e padrões de referência de sangue.

Como já mencionado, os *swabs* vaginais representam um caso especial de extração, pois requerem que o DNA masculino contido no esperma seja separado do DNA feminino contido nas células epiteliais por um procedimento de lise diferencial (Crouse, 1993). A fração feminina é facilmente produzida por procedimentos de extração padrão, a partir das frágeis células epiteliais presentes. A fração masculina é, então, recuperada por meio da quebra das pontes dissulfeto existentes na cápsula protetora dos espermatozoides, utilizando uma solução de ditiotreitol (DTT). Embora esse sistema funcione bem para a análise de RFLP, para a qual foi desenvolvido pela primeira vez, os sistemas baseados em PCR muitas vezes apresentam DNA de origem feminina na fração masculina.

Métodos de teste e sistemas de marcadores

Repetições curtas em tandem

Loci constituídos de unidades repetidas com 3 a 7 nucleotídeos são encontrados ao longo de todo o genoma (Weber, 1989). Os alelos contidos nesses *loci* STR são definidos pelo número de unidades repetidas contidas no produto de amplificação da PCR. As técnicas básicas de PCR empregadas nesse teste são descritas no Capítulo 67. O DNA extraído da amostra é transferido para uma mistura reativa de PCR que contém Taq polimerase, iniciadores específicos de avanço e reverso para cada um dos *loci* testados, trifosfatos de desoxinucleotídeo, cloreto de magnésio, Tris-HCl e albumina bovina sérica. A mistura é amplificada em termociclador, com o emprego de parâmetros cuidadosamente definidos para maximizar a detecção dos alelos. Em uma única amplificação, vários iniciadores com diferentes marcações fluorescentes podem ser adicionados à mistura para detecção de alelos contidos em diversos *loci*. Os produtos de PCR, que apresentam comprimento variável, são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida disposto em capilares ou placa. A detecção é realizada com o auxílio de um escaneador a *laser*, que detecta a marcação previamente incorporada ao iniciador (Figs. 73.1 e 73.2). O dimensionamento é feito com base na comparação com uma escada alélica de referência e/ou por meio da inclusão de um padrão de tamanho para cada *locus*, o qual deve ser marcado com um corante diferente daquele utilizado para a detecção dos marcadores presentes na amostra.

Conforme mostra a Tabela 73.1, os marcadores mais utilizados em laboratórios forenses e de investigação de paternidade são os 13 *loci* STR (identificados pelo FBI para uso no Combined DNA Index System [CODIS, Sistema de Índice de DNA Combinado]), que foram padronizados para serem utilizados na obtenção de perfis genéticos de indivíduos condenados por vários crimes. A Tabela 73.1 mostra o aumento do porcentual de participantes das comunidades de investigação de paternidade e forenses que reportam os 13 *loci* STR, bem como a diminuição do número de relatos de resultados de RFLP. Os sistemas de marcadores STR possuem alelos discretos e não são tão polimórficos quanto os sistemas de marcadores RFLP. Um *locus* STR pode ter 3 a 4 alelos comuns (frequências de 0,15 a 0,25) e vários alelos raros (frequências < 0,01). Assim, para obter uma alta probabilidade de exclusão cumulativa (PEC) e um elevado índice de paternidade combinado, usualmente é necessário testar ao menos 6 ou mais *loci* STR. Em uma série de 50 casos de investigação de paternidade testados em paralelo tanto por RFLP quanto por 9 *loci* STR, Alford et al. (1994) relataram que ambos os métodos excluíram os mesmos 13 pais alegados (com base em 2 ou mais *loci*). Para os 37 homens que não foram excluídos com base nos sistemas STR, a probabilidade de paternidade foi superior a 99% em 36 casos.

Marcadores de cromossomos X e Y

A determinação do sexo agora é uma prática comumente realizada por meio do *locus* da amelogenina. O iniciador para esse *locus* amplifica uma banda X-específica constituída por 212 bases (Xp22.1 a 22.3) e

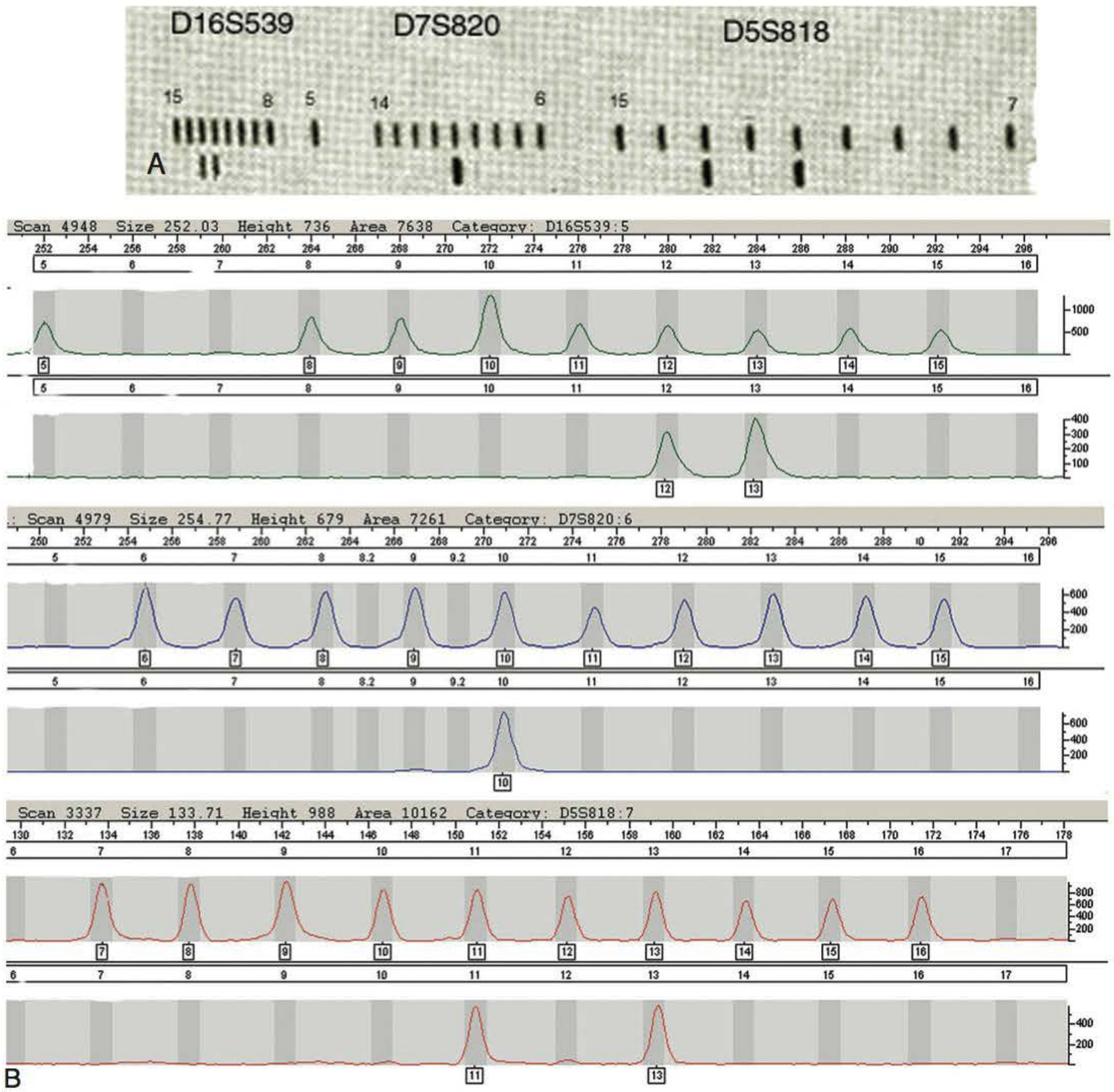


Figura 73.1 Os resultados de uma amostra processada em (A) FMBIO System, eletroforese em gel e PowerPlex 1.1 System; e (B) ABI PRISM 3100 Genetic Analyser com AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit. Os padrões em escada e os resultados acompanhantes para os 3 *loci*, D16S539 (alelos 12, 13), D7S820 (alelo 10) e D5S818 (alelos 11, 13) são visualizados nestas imagens. As imagens apresentam excelente resolução e resultados de genotipagem concordantes.

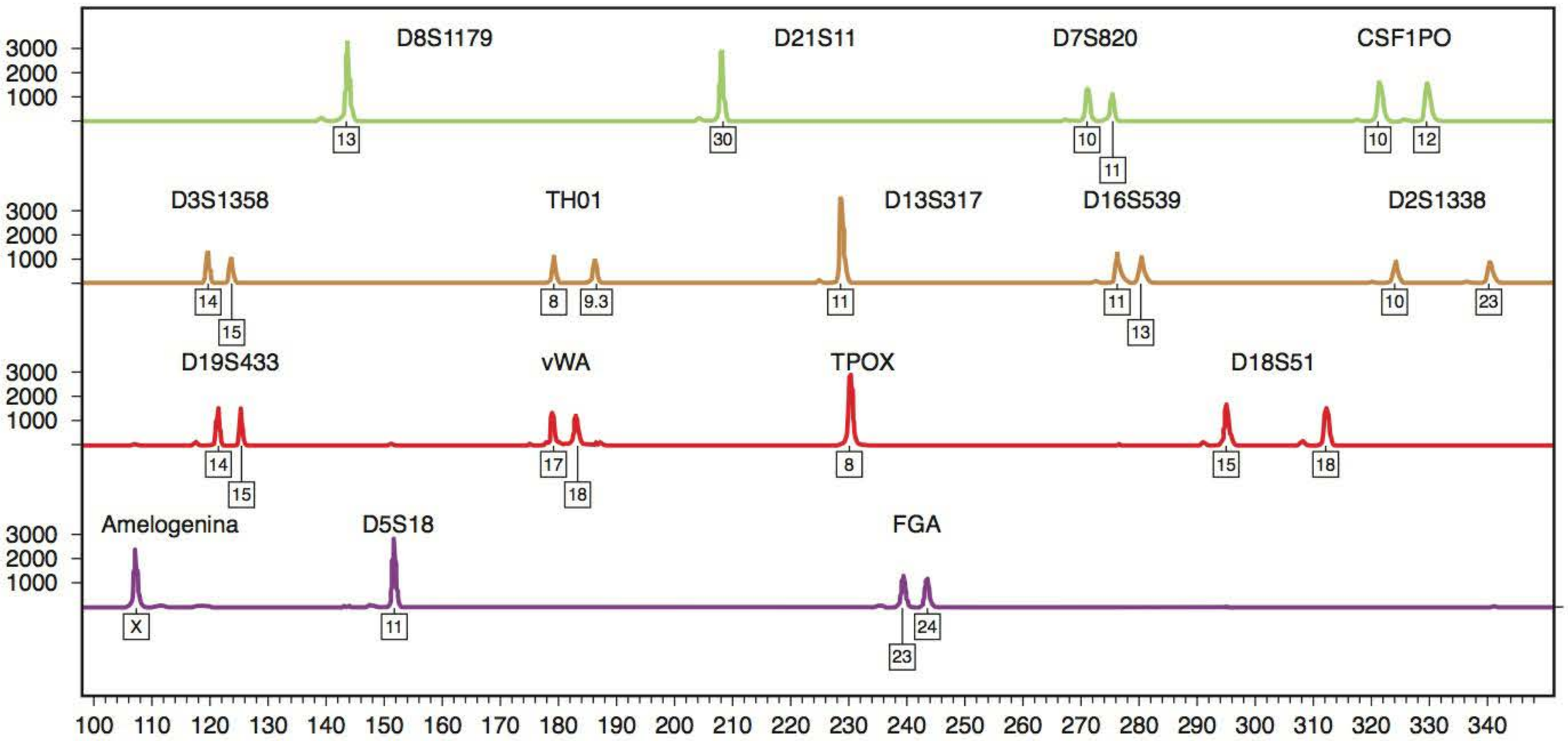


Figura 73.2 Controle positivo 9947A, incluído no Identifiler Kit, em seguida à análise com 3100 Genetic Analyser.

uma banda Y-específica composta por 218 bases. Esse sistema é coamplificado e coanalisado com sistemas de STRs multiplex. A determinação do sexo marca o afastamento de todos os demais marcadores de identidade de rotina, uma vez que fornece informações fenotípicas específicas sobre o indivíduo-fonte. Essa determinação também pode ser importante na investigação de potenciais suspeitos, bem como na classificação de exemplares de amostras originários de uma vítima ou de um suspeito.

Embora não sejam utilizados para determinação de gênero, os marcadores polimórficos de cromossomo Y de fato são promissores para a tipagem de *swabs* vaginais com fração feminina contaminando o DNA do esperma. Esses marcadores também podem ser utilizados para caracterizar a linhagem paterna, em grande parte do mesmo modo como o DNA mitocondrial pode ser utilizado para caracterizar a linhagem materna. A caracterização da linhagem da família de Thomas Jefferson foi alcançada utilizando marcadores de cromossomo Y (Foster, 1998). Dados oriundos de extensas tipagens Y-STR revelaram que certos haplótipos são indicativos da origem étnica.

Sequenciamento de DNA mitocondrial

O sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) é aplicável a situações em que há quantidades mínimas de amostra de DNA ou quando o DNA está extremamente degradado (p. ex., fios de cabelo caídos – que em geral não contêm DNA nuclear – e restos de esqueleto) (Butler, 1998; Holland, 1999). Centenas a milhares de cópias de mtDNA estão presentes em uma única célula, enquanto há apenas uma única cópia de DNA nuclear. Dessa forma, é possível obter um tipo de mtDNA quando for impossível obter um tipo de DNA nuclear. Considerando que até mesmo um único parente distante da linhagem materna pode ser utilizado como referência, o mtDNA também é útil nos casos em que há limitação de amostras de referência, uma vez que o teste de DNA nuclear geralmente requer múltiplos parentes próximos.

O mtDNA é composto de um fragmento circular de DNA que mede 16.569 bp de comprimento. Como inexistem regiões significativas de DNA repetitivo no mtDNA, é feita a tipagem apenas dos polimorfismos de sequência. A região do mtDNA que é analisada para fins de identificação humana é a região não codificadora da "alça de deslocamento" (alça-D), também conhecida como "região de controle". Esse *locus* abrange 1.100 bp e contém 2 regiões hipervariáveis. O sequenciamento direto é o método mais eficiente de tipagem de mtDNA para obtenção de informação de sequências integrais, embora também existam sistemas de oligonucleotídeos sequência-específicos.

Tabela 73.1 Sistemas utilizados pelos participantes das pesquisas de proficiência do CAP

Sistema	1999 (% de entrevistados) Labs. forenses	1999 (% de entrevistados) Labs. de paternidade	2004 (% de entrevistados) Labs. forenses	2004 (% de entrevistados) Labs. de paternidade
*CSF1PO	52	47	88	90
D2S1338			11	43
*D3S1358	43	41	89	89
*D5S818	52	53	89	91
*D7S820	53	58	89	91
*D8S1179	33	39	89	90
*D13S317	53	58	89	92
*D16S539	44	33	89	88
*D18S51	37	39	89	87
D19S433			11	42
*D21S11	37	41	89	90
FES/FPS	14	27		16
*FGA	43	67	89	91
PENTA E			32	28
*TH01	53	55	89	92
*TPOX	51	51	89	85
*vWA31/A	56	67	89	97
Amelogenina	52	43	89	90
Y-STRs			6	31
RFLPs	43	44	0	6

* *Loci* CODIS.

As mitocôndrias são herdadas da mãe e, por isso, o mtDNA não possui contribuição paterna. Diferente do DNA nuclear, que é encontrado em pares de cromossomos, em geral existe uma única sequência de mtDNA presente em cada célula ("homoplásmica") e, consequentemente, não ocorre recombinação genética. Uma compatibilidade exata de sequência de mtDNA pode ser investigada ao longo de toda a linhagem materna de uma determinada família, em várias gerações. Entretanto, o sequenciamento do mtDNA apresenta poder discriminatório limitado – da ordem de uma a poucas centenas. Além disso,

trata-se de um teste muito caro. Atualmente, são poucos os laboratórios que executam esse tipo de teste.

Outros sistemas

Um número bastante restrito de laboratórios utiliza sistemas de teste clássicos, testes de RFLP e testes de *dot blot*. Embora não sejam empregados de forma rotineira em testes de paternidade ou em testes forenses de identidade, sistemas de teste que utilizam combinações de amplificação de genes por PCR com iniciadores sequência-específicos, sondas de oligonucleotídeos sequência-específicos (SSOP, *sequence-specific oligonucleotide probes*) e sequenciamento direto foram descritos para estudos de genes localizados no *locus* do MHC (Allen, 1994; Bunce, 1995).

Métodos capazes de detectar polimorfismos de nucleotídeos únicos, também conhecidos como SNPs, são empregados na determinação de alterações de bases únicas em sequências de localização específica. Em razão da limitada variabilidade observada nesses *loci*, é necessário testar cerca de 70 SNPs para obter o mesmo nível de informação sobre grau de parentesco que aquele fornecido por um multiplex de vários *loci* de STRs. Esses marcadores têm sido utilizados na identificação de amostras altamente degradas, como aquelas obtidas no local do atentado terrorista ao World Trade Center.

Análise e uso dos dados do teste

O DNA no laboratório de criminalística

O teste de –DNA foi incorporado à rotina do laboratório de criminalística (National Research Council, 1996), e a evidência fornecida pelo DNA já é normalmente aceita pelos tribunais. Nos Estados Unidos, cerca de 3/4 dos testes de DNA criminais envolvem agressão sexual. Uma proporção significativa desses testes envolve casos de homicídio. Aproximadamente 1/3 dos testes de DNA inocentam pessoas acusadas por engano (Fig. 73.3), um quarto dos testes são inconclusivos, e menos da metade dos testes resulta no estabelecimento da correlação do suspeito ao crime. Entre os casos em que a evidência do DNA é testada, apenas uma fração de fato vai a litígio, enquanto a maioria dos casos resulta em barganha. No contexto criminalístico, o DNA pode ser utilizado para conectar um suspeito a um crime, inocentar suspeitos falsamente acusados, reconhecer crimes seriais e distinguir crimes de falsificação. Como alternativa, o DNA também pode ser utilizado para auxiliar a reconstrução de acidentes (p. ex., ajudar a determinar quem dirigia um carro, por meio da identificação de manchas de sangue encontradas do lado esquerdo do para-brisa). Além do uso do DNA como evidência associativa em cenas de crimes, o DNA também pode ser utilizado na identificação dos restos mortais.

O DNA no laboratório de patologia

Os testes de DNA de determinação de identidade são empregados na resolução de amostras confusas (Weedn, 1993), em situações de troca acidental de amostras ou quando há mistura de material patológico que flutuou e migrou sobre uma lâmina histológica ou citológica, por exemplo. Casos de testes de detecção de drogas na urina que foram contestados com base na alegação de troca de amostras podem ser resolvidos por meio do teste de DNA. Esse teste pode ser empregado para confirmar ou refutar erros de identificação de amostras de biópsia. Um pequeno fragmento de tecido canceroso ("flutuante") eventualmente depositado sobre uma lâmina de microscopia pode ser identificado como oriundo de outro indivíduo que não o paciente (Tab. 73.2).

Os marcadores STRs também são utilizados para avaliar a pega de enxertos de medula após a transplantação. Nos casos em que o doador é parente do receptor, pode ser necessário testar múltiplos marcadores para encontrar um *locus* informativo.

Exclusão de paternidade

Em casos de disputa de paternidade, a meta primária do teste de marcador genético consiste em identificar o pai biológico de uma determinada criança. Embora isso não possa ser feito com certeza absoluta, os testes de marcador genético podem fornecer evidências objetivas de ausência de paternidade. Pelo uso de múltiplos sistemas genéticos, é possível excluir a maioria (> 99%) dos indivíduos que não são pais da criança.

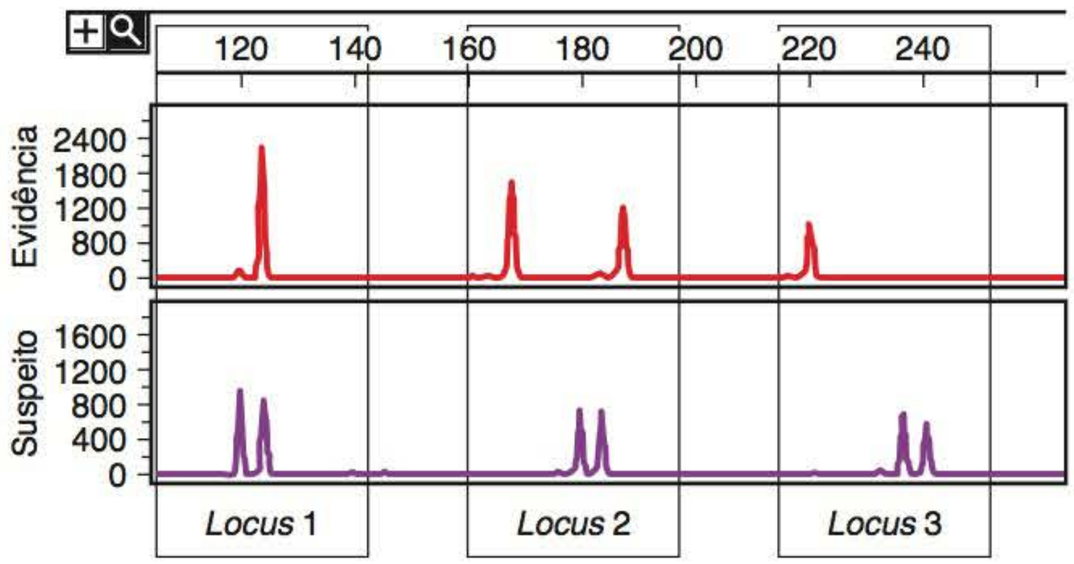


Figura 73.3 Exclusão de suspeito quando da comparação com a evidência da cena do crime. O perfil para a evidência nos *loci* 1, 2 e 3 é claramente distinto do perfil apresentado pelo suspeito. A evidência não poderia ter recebido contribuição do suspeito.

Tabela 73.2 Identificação de possível "flutuador"

Locus STR	Flutuador	Bloco de tecido	Amostra de paciente	Frequência do fenótipo do paciente
CSF1PO	10, 12	10, 12	10, 12	0,191
D3S1358	15, 16	16, 17	16, 17	0,099
D5S818	11	11, 12	11, 12	0,024
D7S820	9, 11	11	11	0,0529
D8S1179	13	12, 14	12, 14	0,0976
D13S317	11	11	11	0,0798
D16S539	9, 11	11, 12	11, 12	0,1764
D18S51	14, 15	14, 15	14, 15	0,0477
D21S11	30	28, 31,2	28, 31,2	0,0341

Os resultados sombreados indicam que o flutuador não é idêntico à amostra do paciente nem ao bloco de tecido. A probabilidade de que o bloco de tecido apresente os mesmos marcadores genéticos que a amostra do paciente, em comparação a um indivíduo caucasiano tomado ao acaso, é maior que $1{,}86 \times 10^{10}$.

Em sistemas que seguem as leis mendelianas da genética, as exclusões são identificadas pela detecção de exceções ao padrão de herança esperado. Quando a paternidade é questionada, a interpretação dos resultados do teste usualmente depende de assumir que a amostra definida como materna é proveniente da mãe biológica da criança. Os fenótipos da mãe e da criança devem ser comparados para determinar se os resultados são consistentes com os padrões de herança esperados. Um alelo presente na criança e ausente na mãe é referido como gene paterno obrigatório (GO). Se ambos os alelos presentes na criança e na mãe forem idênticos, então existem (2) possibilidades alternativas para o gene paterno.

Se o indivíduo do sexo masculino testado não puder ter transmitido o GO e se o marcador do gene estiver ausente na suposta mãe, a exclusão observada é denominada direta (Tab. 73.3). Esse tipo de exclusão em um dos sistemas clássicos usualmente é suficiente para conduzir à conclusão de que o homem testado não é o pai biológico da criança em questão. Nos sistemas de DNA, como a taxa de mutação é várias ordens de magnitude maior que aquela observada nos sistemas clássicos, uma exclusão em um único *locus* é considerada evidência insuficiente para estabelecer a ausência de paternidade (Standards for Relationship Testing Laboratories, 2005). Uma exclusão direta também ocorre quando a criança ou o homem testado é heterozigoto e os 2 marcadores estão ausentes no outro indivíduo. Esse tipo de exclusão direta às vezes é referido como exclusão de 2 haplótipos. Nos casos em que apenas a criança e um dos pais alegados estão disponíveis para realizar o teste, se o indivíduo testado ou a criança tiver 2 haplótipos, nenhum dos quais presente no outro, é possível estabelecer a ausência de paternidade.

A ausência de um marcador genético que se espera encontrar na criança, quando o pai em questão parece ser homozigoto para o gene, é denominada exclusão indireta. Em alguns casos, essa exclu-

Tabela 73.3 Exclusão de paternidade: fenótipo (genótipo)

Tipo de exclusão	Criança	Mãe	Homem testado	Gene(s) obrigatório(s)
Direta	AB (*ab*)	A (*aa*, *a?*)	C (*cc*, *c?*)	*b*
	AC (*ac*)	AB (*ab*)	AD (*ad*)	*c*
	AB (*ab*)	C (*cc*, *c?*)	AC (*ac*)	*b* (materno)
2 haplótipos	A (*aa*, *a?*)	A (*aa*, *a?*)	BC (*bc*)	*a* ou *?*
	A (*aa*, *a?*)	AB (*aa*, *ab*)	BC (*bc*)	*a* ou *?*
	AB (*ab*)	AB (*ab*)	CD (*cd*)	*a* ou *b*
	AB (*ab*)	Indisponível	CD (*cd*)	*a* ou *b*
Indireta*	A (*aa*, *a?*)	A (*aa*, *a?*)	B (*bb*, *b?*)	*a* ou *?*
	B (*bb*, *b?*)	AB (*ab*)	A (*aa*, *a?*)	*b* ou *?*
	B (*bb*, *b?*)	C (*cc*, *c?*)	AB (*ab*)	*b* ou *?* (materno)
	B (*bb*, *b?*)	Indisponível	A (*aa*, *a?*)	*b* ou *?*

* Mutação deve ser considerada.

são é chamada homozigose reversa. Uma exclusão indireta constitui evidência insuficiente para concluir que o indivíduo testado não é o pai da criança. A interpretação da homozigose reversa como exclusão indireta considera que os indivíduos testados possuem ambos os alelos idênticos no *locus*. No teste de PCR de STRs, essa ausência do alelo que se esperava encontrar pode ocorrer caso tenha havido mutação no sítio de ligação (Harrison, 2004) em um dos indivíduos testados. Outra possibilidade é a criança e o pai em questão apresentarem, ambos, alelo nulo (ou outro alelo indetectável) ou mutação, ambos eventos raros. A descoberta de exclusões indiretas em pelo menos 2 sistemas independentes com frequência constitui evidência suficiente para determinar a ausência de paternidade.

Poder de exclusão

Antes do teste, é possível fornecer uma estimativa da probabilidade média de o teste vir a comprovar a ausência de paternidade, se o acusado de fato não for o pai da criança. Essa estimativa é referida como poder de exclusão. Para cada sistema genético, um poder de exclusão médio (A) pode ser calculado com base nas frequências genéticas (p, q) dos alelos no sistema. A equação geral para sistemas de 2 alelos, $A = pq\ (1 - pq)$, foi descrita por Wiener em 1930. Quando um sistema possui múltiplos alelos, é necessário utilizar fórmulas mais complexas (Walker, 1978). A equação geral também foi adaptada (Brenner, 1990) para determinar A em sistemas que não possuem alelos discretos (p. ex., sistemas de DNA RFLP):

$$A = h^2(1 - hH^2),$$

em que H é o porcentual de homozigose e h é o porcentual de heterozigose, sendo ambos observados no *locus*. A Tabela 73.4 mostra os valores A para sistemas selecionados. Um sistema altamente polimórfico apresenta maior poder de exclusão que um sistema com poucos alelos, ou no qual existam 1 a 2 alelos comuns e muitos alelos raros (Tab. 73.4).

Probabilidade de exclusão cumulativa

Quando o teste inclui vários sistemas genéticos independentes, é possível calcular uma probabilidade de exclusão cumulativa utilizando a seguinte fórmula:

$$CPE = 1 - (1ts\} - P1)\ (1ts\} - P2)\ (1ts\} - P3)\ \ldots\ (1ts\} - Pn),$$

em que P é A para cada sistema utilizado. Conforme ilustra a Figura 73.4, à medida que mais e mais sistemas vão sendo utilizados, um número cada vez menor de indivíduos é excluído por cada teste adicional. Com uma bateria adequadamente selecionada de sistemas de marcadores de DNA, é fácil obter uma PEC ≥ 0,995.

Inclusão de paternidade

Após o teste de múltiplos sistemas independentes, se o pai disputado não tiver sido excluído (Fig. 73.5), torna-se necessário estimar a

Tabela 73.4 Poder de exclusão (*A*): sistema de teste selecionado

Sistema	*A*
Clássico	
ABO	0,166
RH	0,283
ACP	0,239
Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição	
D2S44	0,95
D10S28	0,96
Repetições curtas de tandem	
D7S820	0,523
D13S317	0,417
vWA31/A	0,65

Os valores variam em populações diferentes.

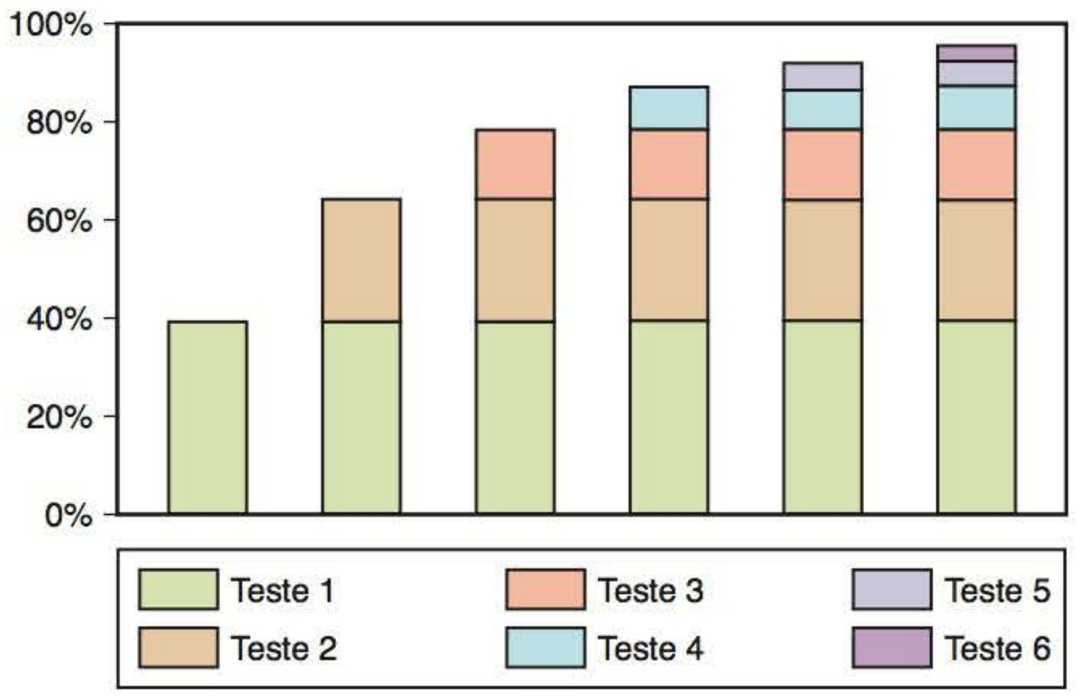


Figura 73.4 Poder de exclusão cumulativo (cada teste adicionado: A = 0,4). O porcentual da população excluído por cada teste adicional torna-se cada vez menor. A probabilidade de exclusão global dos 6 testes é igual a 95,3%. Se um sétimo teste com A = 0,5 fosse realizado, apenas um porcentual adicional de 2,4% da população seria excluído ([1–0,953] × 0,5 = 0,0235).

possibilidade de o indivíduo testado poder ser, de fato, o pai biológico da criança.

Para o fornecimento de estimativas de inclusão de paternidade, devem ser utilizadas tabelas de frequência genética apropriadas. Em geral, isso significa que foi feita a fenotipagem de uma população de indivíduos da mesma raça tomados ao acaso, o tamanho da amostra é grande o suficiente para fornecer frequências genéticas com erros mínimos de estimativa para os alelos do sistema e tanto o indivíduo do sexo masculino quanto o pai biológico testados são originários da mesma população. Quando múltiplos sistemas são testados, as diferenças observadas nas frequências genéticas em populações oriundas de várias localizações geográficas se tornam importantes para os cálculos da probabilidade de paternidade (Hummel, 1981). Nos casos em que o homem testado possui antecedentes de mistura racial ou é originário de uma população para a qual existem tabelas de frequência inadequadas, talvez seja impossível fornecer uma estimativa precisa da paternidade. Entretanto, quando múltiplos sistemas com elevado poder de exclusão são utilizados e o índice de paternidade (IP) utilizando uma população de referência apresenta valor alto, são mínimas as chances de que as frequências de uma população mais definida venham a exercer efeito significativo sobre a conclusão da paternidade. Em situações como essa, também pode ser útil fazer comparações com frequências de vários grupos raciais definidos.

Se o indivíduo do sexo masculino testado não for excluído, é sempre possível argumentar que a quantidade de testes realizados foi inadequada, que serão encontradas evidências para exclusão mediante realização de testes com outros sistemas genéticos ou que o verdadeiro

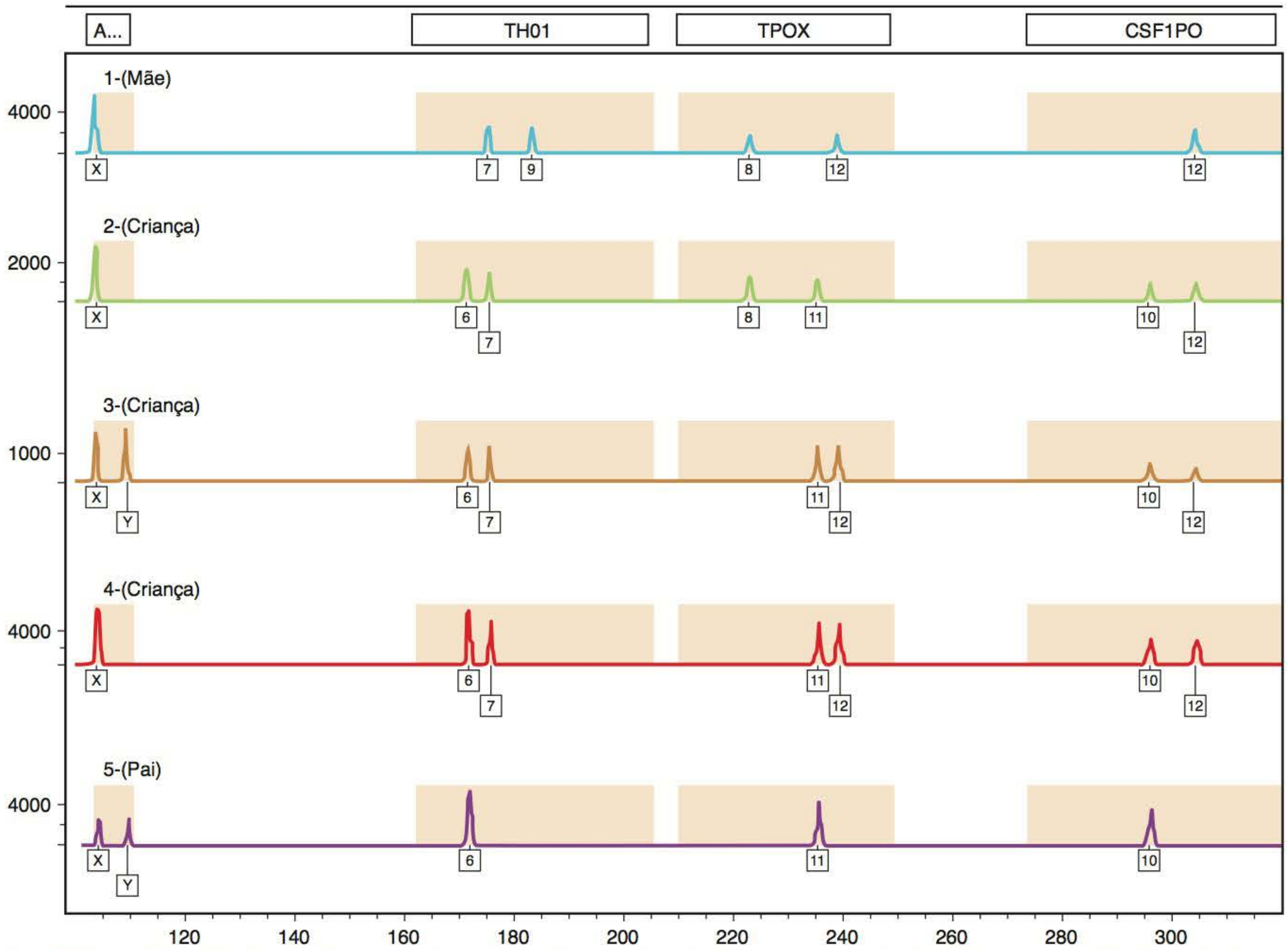


Figura 73.5 Exemplo de análise de uma família empregando teste de repetições curtas de tandem. Observe as correspondências alélicas entre a mãe (linha 1) e as três crianças (linhas 2, 3 e 4). A amostra proveniente do homem testado (linha 5) também apresenta correspondência com as crianças. As crianças das linhas 2 e 4 são do sexo feminino.

pai é um parente próximo do homem testado. Essa linha de raciocínio poderia estar correta apenas se o homem testado tivesse sido falsamente acusado. Além do poder de exclusão médio já descrito, também é possível calcular a frequência de não exclusão de um homem tomado ao acaso (RMNE, *random male not excluded*), com base no par mãe-criança com os fenótipos observados (Salmon, 1983). Esse valor está relacionado ao verdadeiro poder de exclusão dos testes realizados.

Cálculo do índice de paternidade

Nos casos que envolvem o teste de um trio, costuma ser utilizada uma abordagem geral referida como "método da comparação de esperma" (Walker, 1978). Esse cálculo compara as chances (x) de um esperma proveniente de um homem apresentando o fenótipo do homem testado poder ter fertilizado o óvulo da suposta mãe e as chances (y) de um esperma proveniente de um homem não testado originário de uma população aleatória poder ter produzido a criança. As razões de probabilidade (x/y) são calculadas para cada sistema genético independente pela comparação do homem testado às frequências do GO ou à contribuição genética paterna alternada na população aleatória da mesma raça do homem testado. Esses valores, então, são multiplicados para derivar o IP, que reflete as probabilidades genéticas favoráveis à paternidade, dados os fenótipos observados no trio. A Tabela 73.5 apresenta as fórmulas empregadas no cálculo dos índices com diversas combinações fenotípicas. A Tabela 73.6 exemplifica o uso dessas fórmulas para determinar o possível pai de um feto em um possível caso de estupro. Nesse exemplo, o homem testado 2 foi claramente excluído como pai biológico do feto.

Tabela 73.5 Cálculo da proporção do sistema* (índice de paternidade)

Mãe	Criança	Gene(s) obrigatório(s)	Homem testado	X	Y	Fórmula para a frequência de Y	X/Y
A	A	*a*	A	1	0,25	*p*	4
A	A	*a*	AB	0,5	0,25	*p*	2
A	AB	*b*	B	1	0,4	*q*	2,5
A	AB	*b*	AB	0,5	0,4	*q*	1,25
AB	AB	*a* ou *b*	A	1	0,65	*p* + *q*	1,54
AB	AB	*a* ou *b*	B	1	0,65	*p* + *q*	1,54
AB	AB	*a* ou *b*	AB	1	0,65	*p* + *q*	1,54
AB	AC	*c*	AC	0,5	0,3	*r*	1,67
BC	BC	*b* ou *c*	BC	1	0,7	*q* + *r*	1,43
AC	AD	*d*	BD	0,5	0,05	*s*	10

* Sistema hipotético com 4 alelos codominantes *p*, *q*, *r* e *s*.

Nos casos sem exclusão, os valores de IP podem ter valor numérico maior que zero tendendo ao infinito. Segundo os atuais padrões da AABB, para determinar a paternidade, é necessário que o teste resulte em um valor de IP mínimo igual a 100. Isso significa que as probabilidades (razão de probabilidade) de o homem testado ser o pai da criança são de 99 para 1.

Tabela 73.6 Determinação de paternidade a partir do tecido fetal

Locus STR	Tecido fetal*	Mãe	Homem testado 1	Homem testado 2	Índice de paternidade HT 1	Índice de paternidade HT 2
CSF1PO	10	10	10	10, 12	3,74	1,87
D3S1358	15, 16	15	16	14	4,49	0
D5S818	11, 12, 13	12, 13	10, 11	10	1,27	0
D7S820	8, 9	8, 9	8, 9	10, 11	3,31	0
D8S1179	11, 15	11, 15	12, 15	11, 15	2,60	5,19
D13S317	10, 12, 13	12, 13	10	11, 12	14,81	0
D16S539	9, 13	13	9, 12	9, 14	4,65	4,65
D18S51	12, 17	12	12, 17	17	4,76	9,52
D21S11	31	31	31	31	18,18	18,18
vWA31/A	16, 17, 18	16, 8	14, 17	14, 18	2,0	0
Amelogenina	X	X	XY	XY	–	–
				IPC	$2{,}19 \times 10^6$	0

* A amostra de tecido fetal está contaminada com tecido materno.
STR = *short tandem repeat*.

Probabilidade de paternidade

Outra estimativa útil – a probabilidade de paternidade – combina o teste genético com considerações acerca de eventos anteriores. Essen-Möller (1938) descreveu esse cálculo com base no Teorema de Bayes (Tab. 73.7). As estimativas empregam o IP (para resumir a informação genética) e o P (um valor para a probabilidade anterior) para explicar as afirmações de que o homem testado:

1. não era estéril;
2. manter relações sexuais com a mulher durante o período fértil;
3. não é um parente próximo (primeiro grau) do pai;
4. e que outros possíveis pais da criança são originários de uma população com frequências genéticas similares.

Se um P valendo 0,5 for adotado, serão atribuídas probabilidades anteriores iguais ao homem testado e a um outro homem não testado. Adotando esse valor, a probabilidade de paternidade (W) é igual a [IP/(IP + 1)]100. Outros valores de probabilidade anterior podem ser utilizados nesse cálculo, porém tais valores introduzirão uma tendenciosidade contra o homem testado (se forem maiores que 0,5) ou contra a mãe (se forem inferiores a 0,5).

Os valores matemáticos obtidos a partir dos cálculos de IP ou da probabilidade terão significado especial, pois em diversas jurisdições o valor relatado pode mudar a posição legal das partes envolvidas. Exemplificando, o Minnesota Statute Section 257.55 (Parentage Act, 2004) transfere o ônus da contestação de paternidade para o homem, caso o teste indique uma probabilidade acima de 99% de ele ser o pai da criança.

Estimação de parentesco com pai ou mãe ausente

Mesmo que um dos pais não possa ser submetido ao teste, ainda é possível fornecer uma estimativa da paternidade. Nesse caso, a situação mais comum é aquela em que há uma amostra disponível proveniente da criança e outra oriunda do pai alegado, mas não há nenhuma amostra fornecida pela mãe. Nessa situação, a criança deve compartilhar ao menos um gene em cada *locus* com o homem testado. As fórmulas (Tab. 73.8) empregadas para estimar o IP e a probabilidade de paternidade são parecidas com aquelas utilizadas em testes de trios (Tab. 73.5), a não ser pelo fato de as estimativas terem de incluir um ajuste para a frequência do alelo transmitido pela mãe ausente (Brenner, 1993). O cálculo se torna mais complicado quando a mãe ausente e o homem não testado são de raças diferentes (Traver, 1996). Se a criança ou o homem testado possuírem 2 marcadores em um *locus* que não estejam presentes no outro indivíduo testado, então o homem testado é excluído. Em caso de haver homozigose reversa na criança e no homem testado, isso também sugere ausência de paternidade.

Tabela 73.7 Fórmula para probabilidade de paternidade (*W*)

O Teorema de Bayes é utilizado para combinar o *p* ao IP
p = probabilidade anterior de eventos não genéticos
IP (índice de paternidade) = resumo dos resultados do teste

$$W = \frac{(p)(\text{IP})}{(p)(\text{IP}) + (1-p)}$$

$$W \times 100 = \%$$

Tabela 73.8 Cálculo da proporção do sistema* (índice de paternidade) quando apenas um dos pais é testado

Criança	Pai/mãe Testado(a)	Gene(s) parental(is) na criança	Gene(s) obrigatório(s) no outro pai/mãe	Fórmula para calcular a proporção do sistema
A	A	*a*	*a*	1/*p*
A	AB	*a*	*a*	1/2*p*
A	BC		*a*	Exclusão
AB	B	*b*	*a* ou *b*	1/2*q*
AB	AB	*a* ou *b*	*a* ou *b*	$(p+q)/4pq$
AC	AB	*a*	*a* ou *c*	1/4*p*
BC	A		*b* ou *c*	Exclusão
AD	BD	*d*	*a* ou *d*	1/4*s*

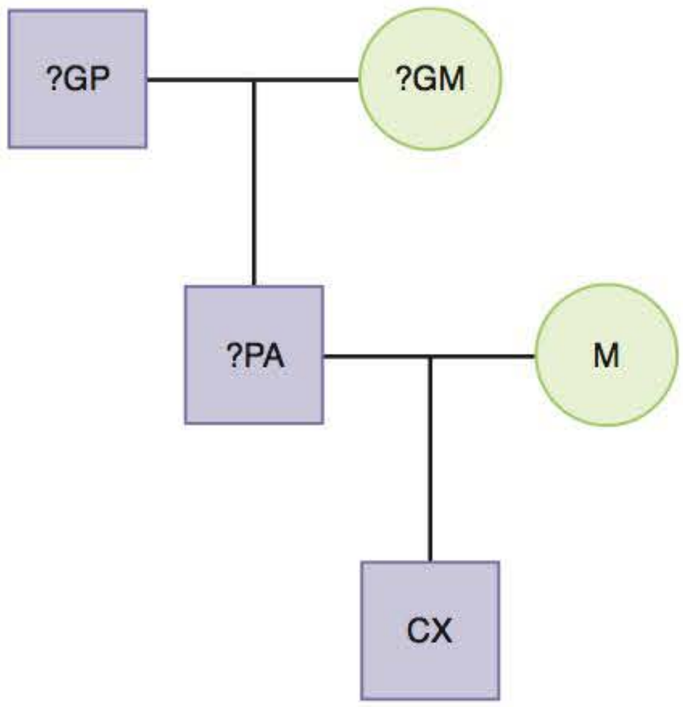
* *Locus* hipotético com 4 alelos A, B, C e D (frequência dos genes $a = p$, $b = q$, $c = r$ e $d = s$).

Reconstrução de famílias

Há diversas situações em que é importante estabelecer uma relação entre os indivíduos envolvidos. Isso ocorre quando certas pessoas tentam adquirir status de imigrante ou descobrir se compartilham um dos pais, ou ainda quando há questões relacionadas à herança. O teste de DNA pode ser informativo na identificação de pais a partir de material fetal encontrado em caçambas de lixo ou produtos de concepção, em casos de estupro. A reconstrução também é bastante valiosa quando se tenta identificar corpos ou partes de corpo após desastres em massa. Como apenas um dos pais e a criança compartilharão ao menos um marcador em cada *locus*, parentes podem ter sistemas nos quais não compartilham nenhum gene. Fórmulas que consideram o provável compartilhamento de marcadores por descendentes são empregadas para estimar o grau de proximidade da relação de parentesco existente entre 2 indivíduos (Wenk, 1986). Irmãos por parte de pai e de mãe apresentam uma probabilidade de 0,25 de não compartilharem um marcador em um sistema. Para meio-irmãos, tias ou tios, essa probabilidade é de 0,5. Nos casos em que um pai alegado é falecido, o seu fenótipo provável pode ser reconstruído se os pais dele forem testados (Mayr, 1983). A criança e os avós putativos devem compartilhar o GO paterno em todos os sistemas. Um índice de paternidade pode ser calculado utilizando uma frequência para x que considere a probabilidade de o falecido poder ter transmitido o marcador (Fig. 73.6). Também é possível fazer reconstruções utilizando dados oriundos de múltiplos supostos parentes, como mostra a Figura 73.7.

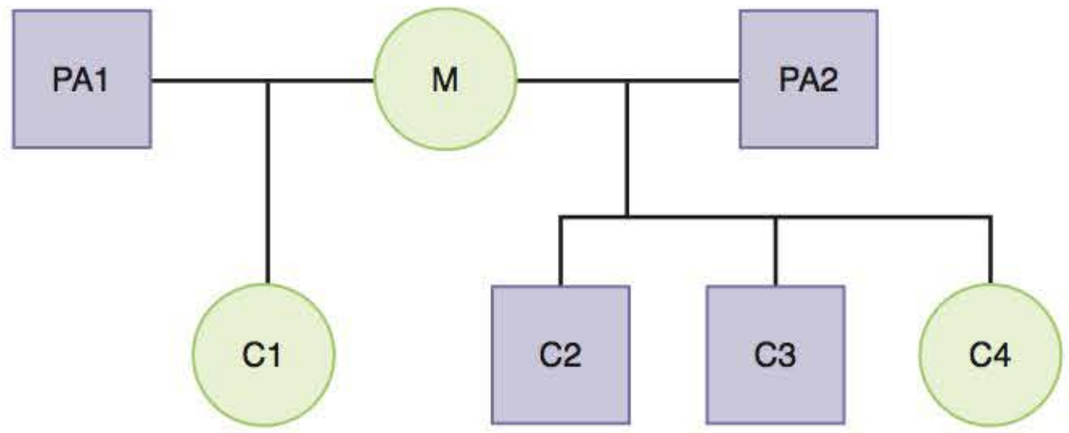
Padrões de garantia de qualidade

Os laboratórios que realizam testes de DNA forense (investigação de paternidade e criminalística) devem seguir padrões apropriados, obter acreditação e participar de programas de teste de proficiência. Espera-se que seja possível realizar um exame judicial minucioso e significativo de cada etapa dos procedimentos e práticas adotadas, desde a coleta das amostras até o relato dos resultados. Não é raro surgirem desafios para validação dos métodos utilizados, da fonte de bases de dados utilizada nos relatórios estatísticos e da qualificação da equipe de funcionários. Há um consenso quanto aos procedimentos laboratoriais apropriados



Sistema	Criança	Mãe	GO	?GP*	?GM*	Possíveis fenótipos do ?PA	Fórmula para calcular o índice do sistema
CSF1PO	10, 12	9, 12	*10*	10, 13	10, 11	10; 10,11; 10, 13; 11,13	0,5/*p*
D3S1358	14, 15	14, 17	*15*	15, 16	16, 17	15, 16; 15, 17; 16, 17; 16	0,25/*p*
D7S820	10, 11	10, 11	*10* ou *11*	8, 9	11	8, 11; 9, 11	0,5/*p* + *q*
D16S539	9, 12	9, 13	*12*	10, 12	12	10, 12; 12	0,75/*p*
TPOX	8	8, 11	*8*	8	8	8	1/*p*
vVWA31/A	18	18	*18*	18	18	18	1/*p*

Figura 73.6 Teste de família para estabelecer a paternidade. A interpretação considera que o falecido ?PA é filho dos indivíduos testados (?GP, ?GM) e que *p* e *q* são as frequências do(s) gene(s) obrigatório(s) paternal(is). Nesse caso, os supostos pais do pai alegado e já falecido foram testados para reconstrução de seu provável fenótipo. Em cada um dos sistemas testados, o gene obrigatório paterno (GO) está presente em um dos supostos avós da criança. Nota: para D7S820, qualquer alelo presente na criança poderia ser materno. O índice de paternidade combinado e a probabilidade de paternidade são obtidos pela multiplicação dos valores para os sistemas individuais.



Sistema	PA1	PA2	Criança 1	Criança 2	Criança 3	Criança 4
CSF1PO	10, 11	11, 12	10, **14**	12, **14**	**9**, 12	11, **14**
D3S1358	15, 17	15, 17	**14**, **17**	**17**	**14**, 16	**14**, 15
D5S818	13, 14	11, 12	**10**, 14	**10**, **12**	**12**	**12**
D7S820	8, 9	10, 13	8, **11**	10, **11**	10, **14**	13, **14**
D13S317	11, 12	8, 10	12, **14**	8, **10**	10, **14**	**10**
D16S539	12, 15	9, 11	**8**, 15	**8**, 11	11, **13**	9, **13**
vWA31/A	14, 20	16, 17	**15**, 20	**15**, 17	16, **18**	17, **18**
TH01	8, 9	6, 9	8, **9,3**	6, **9,3**	8, **9,3**	9, **9,3**
TPOX	8, 11	8, 10	**8**	**8**, **12**	**8**, **12**	**8**
Amelogenina	Masc.	Masc.	Fem.	Masc.	Masc.	Fem.
DYS390	23	23		23	23	
DYS391	10	11		11	11	

Figura 73.7 Estudo de família – a suposta mãe (M) é falecida: as quatro crianças desse estudo familiar poderiam ter a mesma mãe. O provável marcador materno em cada sistema foi destacado em negrito e sublinhado. Nota: em alguns sistemas, qualquer marcador poderia ser materno em uma das crianças (D3S1358 na criança 1). O pai alegado (PA) 1 compartilha um marcador com a criança 1 em todos os sistemas e foi excluído como possível pai das crianças 2, 3 e 4 em vários sistemas. O PA 2 foi excluído como pai da criança 1 em todos os sistemas, com exceção de D3S1358 e TPOX. PA 2 também foi excluído como pai da criança 3 em dois sistemas (D3S1358 e TH01). A descoberta de uma possível correspondência em nove dos 11 sistemas, incluindo dois Y-STRs, sugere que o pai verdadeiro da criança 3 talvez seja parente do PA 2 ou que duas mutações tenham ocorrido.

que devem ser utilizados no teste de DNA, bem como em relação à notável uniformidade dos procedimentos adotados, embora os métodos de tipagem de DNA não sejam especificamente padronizados.

O Technical Working Group on DNA Analysis Methods, do FBI, que passou a ser conhecido como Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, promulgou as diretrizes iniciais para procedimentos analíticos de DNA, que se tornaram padrões *de facto* (Technical Working Group, 1989, 1995). Esses padrões foram modificados pelo DNA Advisory Board do FBI e adotados pelo diretor do FBI nos termos do DNA Identification Act, um componente do Crime Bill votado e aceito em 1994 (Federal Bureau of Investigation, 1998). Esses padrões se aplicam a laboratórios de criminalística que submetem resultados de DNA ao National DNA Index System do FBI ou que aceitam certos tipos de apoio financeiro federal. A American Society of Crime Laboratory Directors conta com um programa de acreditação de laboratórios de criminalística. O American Board of Criminalists certifica criminalistas e possui uma categoria de subespecialidade para analistas de DNA. Analistas que trabalham com amostras de estudos de casos devem cumprir créditos universitários (ou equivalente) em genética, bioquímica e biologia molecular, além de terem 1 ano de experiência em biologia forense. Cada um desses padrões exige que cada analista seja submetido a um teste de proficiência 2 vezes por ano.

A American Association of Blood Banks, atualmente conhecida como AABB, começou a desenvolver padrões e a acreditar laboratórios de teste de paternidade em 1984. A sétima edição, renomeada como Standards for Relationship Testing Laboratories, foi publicada em 2005. Essa publicação aborda todos os aspectos do teste de paternidade, desde a organização do laboratório até o controle e o aperfeiçoamento do processo. Os standards incluem as exigências para documentação e registros, conteúdo de relatório e interpretação dos resultados. Aos laboratórios é solicitado participar de um teste de proficiência nivelado.

Conclusões

Evidências científicas que ajudarão a solucionar casos de disputa de paternidade, questões de parentesco e identidade podem ser obtidas testando-se múltiplos sistemas de DNA. A atual tecnologia fornece resultados de teste que excluem mais de 99,9% dos indivíduos falsamente acusados em casos de disputa de paternidade e em casos de crime. Os testes laboratoriais não possibilitam a comprovação da paternidade ou da culpa de um indivíduo. As estimativas matemáticas derivadas dos testes de marcadores genéticos, quando nenhuma exclusão é encontrada ou se houver correspondência entre a amostra e o suspeito, representam uma fonte significativa de dados que pode ser utilizada para estabelecer a paternidade ou a culpa de alguém.

Agradecimento

Os autores gostariam de agradecer a Victor Weedn, MD, JD pelo material do Capítulo 68 da última edição.

Referências bibliográficas

Alford RL, Hammond HA, Coto I, Caskey CT: Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. Am J Hum Genet 1994; 55:190–195.

Allen M, Lui L, Gyllensten U: A comprehensive polymerase chain reaction oligonucleotide typing system for the HLA class I A locus. Hum Immunol 1994; 40:25–32.

American Association of Blood Banks. Standards for parentage testing laboratories. Arlington, VA, AABB, 1990.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. Am J Hum Genet 1980; 32:314–331.

Brenner CH: A note on paternity computation in cases lacking a mother. Transfusion 1993; 33:51–54.

Brenner CH, Morris JW: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: Validation and other studies. *In* International Symposium on Human Identification, 1989. Madison, WI, Promega Corporation, 1990, pp 21–53.

Budowle B, Shea B, Niezgoda S, Chakroborty R: CODIS STR loci data from 41 sample populations. J Forensic Sci 2001; 46: 453–489.

Referência sobre os dados de frequência utilizados no cálculo dos resultados de parentesco, bem como das frequências populacionais para determinação da probabilidade de uma amostra compatível ser oriunda de um indivíduo tomado ao acaso. Vários fabricantes também possuem sites contendo tabelas de frequência que se baseiam nos resultados produzidos por seus reagentes.

Bunce M, Fanning GC, Welsh KI: Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCAR-SSP). Tissue Antigens 1995; 45:81–90.

Butler JM, Reeder DJ: Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase. Available on line at: http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase.

Este site, mantido pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), possui informação atualizada sobre os loci *de STR, incluindo novas variantes. Nele, também é possível encontrar* links *para outros sites úteis.*

Butler JM, Levin BC: Forensic applications of mitochondrial DNA. Trends Biotechnol 1998; 16:158–162.

Crouse CA, Ban JD, D'Alessio JK: Extraction of DNA from forensic-type sexual assault specimens using simple, rapid sonication procedures. Biotechniques 1993; 15:641–646.

DNA Advisory Board. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories (approved July 1998). Forensic Sci Comm 2000; 2. Available on line at: www.fbi.gov/programs/lab/fsc/current/codis2.htm.

Requisitos básicos de QA/QC para laboratórios de testes forenses.

Essen-Möller E: Die Beweiskraft der Ähnlichkeit in Vaterschaftsnachweis: theoretische Grundlagen. Mitt Anthrop Ges (Wien) 1938; 68:9–53.

Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, et al: Jefferson fathered slave's last child. Nature 1998; 396:27–28; also see Nature 1998; 396:13–14.

Harrison C, Allen R, Eisenberg A, et al: Phenotype versus genotype reporting for DNA polymorpisms. Prog Forensic Genet 10 2004; 526–528.

Holland MM, Parsons TJ: Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. Forensic Sci Rev 1999; 11:21–50.

Hummel K, Claussen M: Exclusion efficiency and biostatistical value of conventional blood group systems in European and non-European populations; suitability of Central European tables from non-German speaking populations. *In* Hummel K, Gerchow J (eds): Biomathematical Evidence of Paternity. Berlin, Springer-Verlag, 1981, pp 97–108.

Ivanov P, Wadhams M, Roby R, et al: Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. Nat Genet 1996:12:417–420.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 1985a; 314:67–73.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Individual specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 1985b; 316:76–79.

Kobilinsky L: Recovery and stability of DNA in samples of forensic science significance. Forensic Sci Rev 1992; 4:67–87.

Landsteiner K: Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wien Klin Wochenschr 1901; 14; 1132–1134.

Mayr WR: Paternity testing with unavailable putative father or mother. *In* Walker RH (ed): Inclusion Probabilities in Parentage Testing. Arlington, VA, American Association of Blood Banks, 1983, pp 373–379.

Mendel G: Versuche über Pflanzen-Hybriden. Verhandlung Nat Forsch Verein Brunn 1866; 4;3–47.

Miale JB, Jennings ER, Rettberg WAH, et al: Joint AMA-ABA guidelines: present status of serologic testing in problems of disputed parentage. Family Law Q 1976; 10:247–285.

National Research Council: The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Washington, DC, National Academy of Sciences, 1996.

Esta monografia consiste em uma avaliação abrangente dos testes e uma avaliação estatística dos dados a serem utilizados em procedimentos legais.

Parentage Act: Minnesota Statutes 2004, 257.55 Presumption of paternity.

Parsons TJ, Weedn VW: Preservation and recovery of DNA in postmortem specimens and trace samples. *In* Haglund WD, Sorg MH (eds): Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains. Boca Raton, FL, CRC Press, 1997.

Salmon D: The random man not excluded expression in paternity testing. *In* Walker RH (ed): Inclusion Probabilities in Parentage Testing. Arlington, VA, American Association of Blood Banks, 1983, pp 281–292.

Schatkin SB: Disputed Paternity Proceedings, 3rd ed. Albany, NY, Banks & Co, 1952, pp 233–234.

Standards for Relationship Testing Laboratories, 7th ed. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2005.

Periodicamente, a AABB fornece padrões para laboratórios credenciados que realizam testes de parentesco. Esses padrões incluem elementos fundamentais de QA/QC, testes, relatórios e requisitos para validação. Para cada edição dos Standards *é publicado um* Guidance for Standards *contendo explicações detalhadas sobre as exigências e apêndices compostos de tabelas e fórmulas.*

Sweet D, Lorente M, Lorente JA, et al: An improved method to recover saliva from human skin: the double swab method. J Forensic Sci 1997; 42:320–322.

Technical Working Group on DNA Analysis Methods: Guidelines for a quality assurance program for DNA restriction fragment length polymorphism analysis. Crime Lab Dig 1989; 17:40–59.

Technical Working Group on DNA Analysis Methods: Guidelines for a quality assurance program for DNA Analysis. Crime Lab Dig 1995; 22:21–43.

Traver M: Paternity calculations: special situations. *In* Statistics Workshop. Madison, WI, Promega Corporation, 1996.

Walker RH: Probability in the analysis of paternity test results. *In* Silver H (ed): Paternity Testing. Washington, DC, American Association of Blood Banks, 1978, pp 69–135.

Os anais da Airlie Conference contêm numerosos artigos sobre métodos de cálculo de dados oriundos dos testes de paternidade empregando os sistemas clássicos. Apesar do pré-teste de DNA, os princípios se aplicam aos sistemas STR.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 1991; 10:506–518.

Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 1989; 44:388–396.

Weedn VW: Where did this come from? Identification of sample mix-ups by DNA testing. Am J Clin Pathol 1993; 100:592–593.

Wenk RE, Traver M, Chiafari FA: Determination of sibship in any two persons. Transfusion 1986; 36:259–262.

Wiener AS, Lederer M, Polayes SH: Studies in isohemagglutination. IV: On the chance of proving non-paternity, with special reference to blood groups. J Immunol 1930; 19:259–282.

PARTE IX

Patologia clínica do câncer

Editado por

Richard A. McPherson MD, Matthew R. Pincus MD PhD,
Martin H. Bluth MD PhD

CAPÍTULO 74

Diagnóstico e tratamento de câncer com o uso de marcadores tumorais serológicos

Peng Lee MD PhD, Matthew R. Pincus MD PhD, Richard A. McPherson MD

Marcadores séricos como ferramenta eficaz para diagnóstico e monitorização do câncer 1534
Classificação funcional de marcadores tumorais 1534
Oncoproteínas como marcadores de proliferação celular 1535
Diferenciação celular e supressores tumorais 1535
Moléculas de adesão e metástase 1535
Outros marcadores 1535
Marcadores tumorais definidos por anticorpos monoclonais 1536
Aplicações clínicas 1536
Triagem 1536
Diagnóstico 1536
Prognóstico: recorrência, metástase e sobrevida 1537
Monitorização da resposta terapêutica 1537
Recomendações para solicitação dos testes de marcadores tumorais 1537
Marcadores tumorais individuais 1538
α-Fetoproteína (AFP) 1538
Fatores angiogênicos 1538
β_2-Microglobulina (β_2-M) 1541
Antígeno carcinoembrionário (CEA) 1541
CA 15-3 e CA 27-29 1541
CA 19-9, CA 50 e CA 19-5 1541
CA 125 1542
CA 72-4 1542
Calcitonina 1542
Cromogranina A 1542
Fragmento da citoqueratina 19 1542
Gonadotrofina coriônica humana 1542
Oncoproteína HER2/*neu* (c-*erbB-2*) 1543
p53 1543
Peptídeo relacionado ao paratormônio 1543
Antígeno prostático-específico 1543
Teste de sangue oculto e marcadores proteicos mutantes nas fezes 1545
Considerações finais e perspectivas futuras 1546
Genômica e proteômica sorológica como potenciais biomarcadores de câncer 1546
Ácidos nucleicos circulantes na detecção de câncer 1546
Proteômica sorológica na detecção de câncer 1546
Células tumorais circulantes no sangue periférico 1546
Referências bibliográficas 1546

PONTOS-CHAVE

- Este capítulo aborda o uso de proteínas, cujos níveis séricos estão frequentemente elevados em pacientes com processos malignos, no diagnóstico e tratamento de câncer.
- Muitas dessas proteínas são chamadas antígenos oncofetais, ou seja, proteínas expressas no tecido fetal durante o desenvolvimento, mas normalmente não são encontradas nos tecidos de adultos. Essas proteínas incluem a α-fetoproteína (AFP) e o antígeno carcinoembrionário (CEA), cujos níveis séricos se encontram muitas vezes elevados em cânceres hepatocelulares e colônicos, respectivamente.
- Outras proteínas, como CA 19-9, CA 125 e CA 15-3, são expressas nas células epiteliais e, com frequência, também estão presentes nos soros de pacientes com cânceres de pâncreas, ovário e mama, respectivamente.
- Como esses "marcadores tumorais proteicos" não são tecido-específicos e também podem ser expressos em outras doenças que não o câncer, as sensibilidades e especificidades dessas proteínas não são suficientemente altas para poderem ser utilizadas como proteínas de triagem do câncer. Essas moléculas são usadas sobretudo nos pacientes em tratamento contra processos malignos conhecidos.
- A exceção a isso é representada pelo antígeno prostático-específico (PSA), uma enzima tipo quimotripsina expressa quase exclusivamente no tecido prostático e elevada nos soros de grande parte dos pacientes com câncer de próstata. Os níveis séricos elevados de PSA, portanto, têm alta sensibilidade para o diagnóstico de câncer de próstata; como o PSA também se encontra aumentado em outras doenças prostáticas, como hiperplasia prostática benigna, esse antígeno exibe especificidade mais baixa, mas mesmo assim ainda pode ser utilizado de forma muito eficaz para detectar a presença da doença na triagem de pacientes .
- Novas descobertas no campo de detecção tumoral precoce com o uso de marcadores séricos também foram introduzidas neste capítulo. Tais descobertas englobam o emprego de proteínas mitogênicas, como HER-2/Neu, que sabidamente atuam como proteínas de transdução de sinal, cujos níveis estão elevados em muitos tipos de cânceres; a detecção de genes codificadores dessas proteínas em líquidos corporais; e as abordagens proteômicas com envolvimento de padrões de expressão de múltiplas proteínas que tipificam cânceres específicos.

Apesar do avanço de modalidades terapêuticas multidisciplinares, a mortalidade causada por câncer não sofreu redução significativa nos últimos 50 anos, em contraste às quedas drásticas na mortalidade por doença cardiovascular e infecciosa. Estudos demonstraram que a detecção precoce de câncer pode induzir à sobrevida superior a longo prazo. Assim, há uma necessidade urgente pela busca de biomarcadores tumorais com alta sensibilidade e especificidade para permitir a detecção precoce do câncer, o tratamento eficaz dessa doença e a diminuição da mortalidade. Por essa razão, muito esforço foi dedicado à descoberta, caracterização e aplicação clínica de marcadores tumorais para detectar a presença de câncer em um estágio precoce. Em consequência disso, foram identificados números crescentes de biomarcadores, empregados atualmente como marcadores com valor prognóstico, no tratamento clínico diário de pacientes com câncer. Esses marcadores podem ser utilizados não só para classificar os tipos de câncer mas também para monitorizar a resposta à terapia neoadjuvante. Por exemplo, receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e oncogene HER2/*neu* são usados no diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer, utilizando amostras cirúrgicas. Foi demonstrado que o ER é um marcador prognóstico para câncer de mama e um marcador preditivo para tratamento hormonal (Jensen, 2003). Também foi demonstrada a associação dos eventos de amplificação e superexpressão do HER2/*neu* com mau prognóstico; além disso, constatou-se que esses eventos são indicadores da resposta terapêutica em câncer de mama (Wilmanns, 2004). No entanto, foi demonstrada a associação do PR com prognóstico bom em câncer de ovário (Munstedt, 2000; Lee, 2005).

Entre esses marcadores, há uma série de marcadores tumorais presentes nos líquidos corporais circulantes, inclusive no sangue. Em

termos gerais, os biomarcadores tumorais dos líquidos do corpo (principalmente soro e urina) são divididos em três categorias: proteínas associadas a tumores, como antígenos oncofetais, que parecem ser expressos em muitos cânceres (foi descoberto, no entanto, que essas proteínas também estão presentes em outros distúrbios não neoplásicos); oncoproteínas, que estão envolvidas na regulação do ciclo celular e sofrem superexpressão ou mutação quase exclusivamente em distúrbios neoplásicos; e padrões recém-descobertos de expressão proteica no soro, que parecem ser exclusivos para tipos específicos de câncer, ou seja, proteomas. Este capítulo enfatiza o uso das duas primeiras classes de marcador tumoral. O Capítulo 75 aborda as oncoproteínas e o emprego de múltiplos perfis proteicos nos líquidos corporais, ou proteomas, como biomarcadores para detecção tumoral precoce.

Marcadores séricos como ferramenta eficaz para diagnóstico e monitorização do câncer

Idealmente, um marcador tumoral deve ficar elevado no soro apenas de pacientes com tumor maligno, mas não deve sofrer aumento no soro de indivíduos livres de doença ou daqueles com doenças não malignas, como processos inflamatórios ou infecciosos. Além disso, um marcador tumoral proteico deve estar elevado no soro de pacientes com câncer em uma fase inicial, possibilitando com isso a detecção precoce do tumor e o início de terapia adequada. Embora nenhum marcador tumoral atenda a todas essas características, há um progresso contínuo rumo à descoberta de tais marcadores.

De fato, estudos demonstraram que um ou mais biomarcadores cancerígenos, incluindo o DNA, a proteína ou as células tumorais, estão quase sempre presentes no soro de pacientes com câncer. Esses achados fornecem a base lógica para a detecção precoce de câncer, utilizando amostras séricas. Quaisquer produtos de células circulantes, incluindo DNA/RNA, proteínas (enzimas, proteínas séricas, metabólitos, receptores, proteínas carcinoembrionárias, oncoproteína e proteínas codificadas por genes supressores) e células tumorais podem ser utilizados como marcadores tumorais se associados com eventos relativos à formação e/ou ao crescimento de tumor (Fig. 74.1). Tais eventos, incluindo transformação, proliferação, desdiferenciação e metástase malignas, são específicos para essa finalidade. Os níveis sanguíneos de marcadores tumorais séricos são determinados por proliferação das células tumorais, volume do tumor, atividades proteolíticas na célula tumoral e liberação a partir das células tumorais necróticas. A melhoria recente de instrumentação, especialmente na consolidação de instrumentos de testes especializados como analisadores de imunoensaio para um analisador mais genérico de química, facilitou a análise de uma ampla gama de analitos com o mesmo grau de acurácia, especificidade e precisão. A melhora da sensibilidade dos ensaios tornou os testes sorológicos bem superiores a outros exames clínicos, com base nos métodos físicos. Uma vantagem adicional do teste sérico sobre os métodos baseados em tecido é a natureza não invasiva, a quantificação mais precisa e a falta de diferença interobservador (ou seja, entre os observadores), exatamente o oposto dos métodos baseados em tecido. Em virtude desses benefícios, os marcadores séricos são com frequência utilizados para triagem, diagnóstico e predição do comportamento de muitos cânceres.

O valor clínico de qualquer marcador tumoral dependerá de sua especificidade e sensibilidade, bem como do uso clínico planejado. Por exemplo, o PSA pode ser usado na triagem de câncer de próstata, culminando no tratamento precoce. O oncogene HER2/*neu* sérico é empregado como marcador de prognóstico e monitorização terapêutica em casos de câncer de mama. A distinção na utilidade desses marcadores se deve à diferença na especificidade do tecido e sensibilidade do câncer: o PSA é específico ao órgão (mas não ao câncer), enquanto o HER2/*neu* está elevado em múltiplos cânceres. O uso de marcadores tumorais como fatores prognósticos e fatores de risco ganhou mais popularidade nos últimos anos. Foi constatado que a mensuração do nível dos fatores de risco seja valiosa na avaliação da agressividade tumoral e útil na seleção de estratégias terapêuticas. A utilidade de marcadores tumorais é adjuvante ao tratamento médico e cirúrgico de processos malignos, ajudando a detectar as recorrências e predizer o prognóstico.

Figura 74.1 Diferentes tipos de marcador tumoral sérico são utilizados para detectar o câncer. O HER2 e o antígeno prostático-específico (PSA) refletem o aumento da proliferação celular. O antígeno carcinoembrionário representa o processo de desdiferenciação do câncer. A tecnologia atual de genoma e proteoma concentra-se em mudanças coletivas nas células malignas.

Classificação funcional de marcadores tumorais

Para aprender a identificar, selecionar e utilizar marcadores tumorais para o diagnóstico de câncer e o tratamento de pacientes acometidos por essa neoplasia, é essencial estar familiarizado com a função de cada marcador tumoral sérico ou de grupos deles. Esse capítulo enfatiza o papel desempenhado por três classes específicas de marcadores tumorais, comumente utilizados no diagnóstico de processos malignos humanos: (1) antígenos oncofetais, como AFP e CEA, em geral expressos durante o desenvolvimento fetal, mas não nos tecidos ou soros de crianças e adultos; (2) ocorrência de proteínas nas células epiteliais, elevadas no tecido e soro em casos de adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas, como proteínas CA 19-9, CA 125 e CA 15-3; e (3) hormônios polipeptídicos, como a cadeia beta da gonadotrofina coriônica humana (β-hCG), e enzimas específicas, como a isoforma placentária da fosfatase alcalina, elevadas no soro de pacientes com tumores específicos. Com frequência, é constatada uma elevação desses dois últimos marcadores tumorais nos soros de pacientes com tumores de células germinativas. Além disso, proteínas semelhantes a hormônios são encontradas nos soros de pacientes com diferentes tipos de câncer, como proteína semelhante ao paratormônio, que induz à hipercalcemia, como parte da chamada síndrome paraneoplásica, em cânceres como carcinomas de células renais.

A maioria dessas proteínas foi descoberta com base na observação dos soros de coortes de pacientes com tipos específicos de câncer. Contudo, muitas delas também são encontradas nos soros de pacientes com distúrbios não malignos, por exemplo, inflamatórios. Além disso, essas proteínas podem não ocorrer em uma quantidade significativa de pacientes diagnosticados com esses cânceres. Dessa forma, as sensibilidades e especificidades desses marcadores tumorais proteicos são frequentemente baixas, o que os torna inúteis para fins de triagem. Por outro lado, todas essas proteínas são muito úteis para monitorização de cânceres específicos. Por exemplo, o CEA com frequência encontra-se elevado nos soros de pacientes com câncer de cólon. Assim, níveis séricos elevados de CEA em pacientes submetidos à ressecção de câncer de cólon indicam recorrência tumoral. Conforme discutido adiante, a única exceção é o PSA, uma enzima tipo quimotripsina que ocorre quase exclusivamente na glândula prostática e se mostrou muito útil na triagem de câncer de próstata e na monitorização de pacientes tratados para essa doença.

Atualmente, os ensaios padrão para todas essas proteínas são bem desenvolvidos e receberam aprovação da US Food and Drug Administration (FDA) para uso na monitorização do tratamento de cânceres conhecidos, mas não, exceto o PSA, para triagem de cânceres humanos. Em função das considerações mencionadas anteriormente, as pesquisas estão sendo concentradas na busca por proteínas expressas apenas em células cancerígenas. Os resultados dessas pesquisas estão descritos com detalhes nos dois capítulos a seguir. Aqui, serão resu-

midas algumas das proteínas descobertas recentemente, quase sempre expressas em doenças cancerígenas, porém de maneira menos comum em doenças não cancerígenas, além de serem promissoras para a triagem quanto à ocorrência de câncer e monitorização da terapia.

Oncoproteínas como marcadores de proliferação celular

As oncoproteínas são proteínas que estão direta ou indiretamente envolvidas no controle da mitose e são alteradas a ponto de sinalizar a divisão contínua da célula. Essas proteínas ficam localizadas nas vias de transdução de sinal, sendo responsáveis pela condução de sinais mitogênicos dos fatores de crescimento na membrana celular para o núcleo ou, então, estão envolvidas na regulação da transcrição, ativando os genes indutores de crescimento e mitose das células (ver Cap. 75). Por exemplo, o HER2/*neu* é um receptor transmembrana com três domínios (extracelular, transmembrana e intracitoplasmático) que contém tirosina-quinase. À ligação dos fatores de crescimento extracelulares, a quinase intracelular torna-se ativada, provocando dimerização do receptor e interação com alguma proteína adaptadora citosólica, a Grb-2, para retransmitir a mensagem próxima ao fator de troca do nucleotídeo guanina, SOS. O SOS, por sua vez, liga-se à proteína criticamente importante, a p21-ras (Barbacid, 1987). O promotor oncogênico c-Myc é exemplo de um tipo distinto de fator transcricional de oncogene, que atua via ativação de seus genes-alvo, induzindo à síntese de proteínas mitogênicas.

Com frequência, essas proteínas podem ser detectadas no soro de pacientes com crescimento celular anormal, ou seja, câncer ou estados pré-cancerosos. Testes extensos para detectar a presença de oncoproteínas revelaram que muitas oncoproteínas são detectadas no soro e/ou em outros líquidos corporais de pacientes com câncer. No Capítulo 75, o leitor pode encontrar uma discussão detalhada sobre cada oncoproteína.

Diferenciação celular e supressores tumorais

Isolado dos oncogenes, mas também muito importante, encontra-se um grupo de genes supressores de tumor. As proteínas codificadas por eles são responsáveis pela supressão do crescimento celular, causando interrupção desse crescimento no ciclo celular ou apoptose. Muitas vezes, esses genes supressores sofrem deleções ou mutações, resultando na produção de produtos gênicos inativos. Entre os genes supressores de tumor, a proteína p53 antioncogênica foi muito investigada e mais bem caracterizada por seu papel em vários cânceres. Essa proteína está envolvida nos processos de apoptose, parada do ciclo celular, envelhecimento celular e resposta de dano ao DNA. Deleções ou mutações do gene p53 predispõem as células a uma transformação maligna. Foram identificadas mutações desse gene em quase 50% dos processos malignos em seres humanos (Soussi, 2001). Há análises moleculares que detectam mutações no DNA sérico de genes supressores de tumor. Além disso, anticorpos contra as proteínas supressoras anormais de tumor podem ser utilizados como biomarcadores de câncer.

Foram descritos métodos moleculares, como PCR-SSCP (*polymerase chain reaction single strand conformation polymorfism*, reação em cadeia da polimerase seguida de análise de polimorfismo de conformação de fita única) e DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*, cromatografia líquida desnaturante de alto desempenho), para detectar mutações de p53 sérica em casos de câncer. De maior importância, foram detectados anticorpos contra as proteínas p53 supressoras anormais de tumor no soro de pacientes com câncer (Soussi, 2000). É interessante notar que a presença de anticorpos anti-p53 está correlacionada com a mutação do gene *p53* (Guinee, 1995; Hammel, 1999). No câncer de mama, vários estudos indicaram que a presença do anticorpo anti–p53 no soro se correlacionava com o aumento do antígeno de proliferação celular (Ki-67) e a falta de expressão do ER, sinalizando que esse anticorpo pode servir como marcador prognóstico desse tipo de câncer (Schlichtholz, 1992; Sangrajrang, 2003).

A descoberta de dois genes de suscetibilidade (ou genes supressores de tumor) para o câncer de mama, BRCA1 e BRCA2, gerou tremendo interesse. Estudos sugerem que as mutações no BRCA1 são responsáveis por cerca da metade de todos os casos de câncer mamário hereditário (Easton, 1993; Miki, 1994; Wooster, 1994). Além disso, os portadores de mutações no BRCA1 também exibem risco elevado de câncer de ovário, cólon e próstata (Futreal, 1994). Acredita-se que o segundo gene de suscetibilidade, o BRCA2, para o câncer de mama, seja responsável por aproximadamente 70% dos casos de câncer mamário hereditário não atribuídos a mutações do gene BRCA1, além de estar associado com alto risco de câncer de mama em homens.

Os genes supressores e seus produtos são potencialmente úteis como marcadores tumorais para a triagem e a identificação de famílias ou indivíduos de alto risco. Os imunoensaios para mensurar as proteínas codificadas tanto pelo gene BRCA1 quanto pelo BRCA-2 estão sob desenvolvimento e podem ser de grande utilidade para a identificação de indivíduos de alto risco e suas famílias.

Moléculas de adesão e metástase

As metástases tumorais envolvem várias etapas importantes (Liotta, 1987). Em primeiro lugar, as células tumorais têm de penetrar em seus arredores adjacentes, período depois do qual elas invadem sistemas vasculares ou vasos linfáticos. As células tumorais, então, são conduzidas para locais distantes, até que fiquem alojadas nos leitos venosos ou capilares de algum órgão distante. Nesse novo ambiente, essas células tumorais novamente devem penetrar nas paredes vasculares para crescer em locais distantes. As moléculas de adesão celular, incluindo as integrinas, selectinas, caderinas e moléculas de adesão celular das famílias dos genes de imunoglobulina, regulam muitas etapas do processo metastático. As alterações nos níveis de expressão dessas moléculas de adesão celular refletem o comportamento maligno do câncer. Por exemplo, observam-se níveis séricos elevados de E-selectina, bem como aumento das moléculas de adesão intercelular (ICAM, *intracellular adhesion molecule*) e celular vascular (VCAM, *vascular cell adhesion molecule*), em particular nos pacientes com câncer de mama em estágio terminal (O'Hanlon, 2002; Sheen-Chen, 2004). O nível sérico elevado de VCAM pode ser usado para predizer uma sobrevida mais curta. Outro estudo indicou que os níveis pós-quimioterápicos de E-selectina e ICAM séricas estão associados com a resposta ao tratamento de pacientes com doença de Hodgkin (Syrigos, 2004). Além disso, sugere-se que o aumento dos níveis de E-selectina, ICAM-1 e VCAM seja um fator prognóstico quanto à sobrevida em pacientes com câncer gástrico (Alexiou, 2003). Portanto, o aparecimento dessas moléculas de adesão celular na circulação sanguínea pode indicar risco ou ocorrência de metástases ou mau prognóstico.

Outros marcadores

Muitos hormônios (hCG), proteínas séricas, enzimas (lactato desidrogenase [LDH], fosfatase alcalina [AP]) e seus metabólitos (ácido vanililmandélico [VMA], ácido homovanílico [HVA], ácido 5-hidroxi-indolacético [5-HIAA]) podem ficar elevados em tumores por causa da alta taxa de proliferação das células tumorais. Os níveis séricos desses marcadores sobem ainda mais quando algum tumor benigno se transforma em maligno e sofre metástase. As doenças benignas e não malignas também podem envolver níveis elevados de marcadores; assim, esses marcadores não são adequados para fazer a triagem ou para formular o diagnóstico de câncer por conta do grande número de resultados falso-positivos que seria gerado. Esses marcadores são utilizados de forma mais apropriada para monitorização da resposta do paciente durante o tratamento.

Uma exceção a isso se relaciona à enzima fosfatase alcalina (ALP) abordada no Capítulo 21. Há muitas isozimas dessa enzima, das quais uma delas é representada pela fosfatase alcalina placentária (PLAP). Essa forma torna-se elevada no soro de pacientes com tumores de células germinativas. Um uso específico da PLAP está no soro ou, de maneira mais eficiente, no líquido cerebrospinal (LCE) de pacientes acometidos por massa na região pineal com diagnóstico diferencial de tumor de células germinativas versus pinealoma. Se a PLAP estiver elevada no LCE de paciente com massa na área pineal, pode ser feito o diagnóstico de tumor de células germinativas. Com efeito, a radioterapia é curativa, dispensando a necessidade de cirurgia.

As atividades enzimáticas de várias glicosiltransferases tecido-específicas sofrem alteração nas células tumorais. Algumas das glicosiltransferases elevadas são usadas como marcadores tumorais. A sequência de açúcar e a composição da porção de carboidrato de mui-

tas glicoproteínas séricas, incluindo substâncias do grupo sanguíneo e mucinas, como CA 19-9, são marcadores tumorais resultantes de atividade alterada da glicosiltransferase. A AFP isolada de pacientes com carcinoma hepatocelular primário possui uma fucose adicional em comparação à mesma enzima decorrente de hepatopatia benigna, um exemplo de fucosiltransferase alterada em células de carcinoma hepatocelular (Wu, 1990).

Proteínas ectópicas são frequentemente expressas no câncer. Proteínas carcinoembrionárias, detectáveis em tecidos tanto fetais quanto tumorais, mas não em tecidos normais de adultos, em geral carecem de qualquer função fisiológica conhecida e apresentam concentrações sanguíneas em nanograma por mililitro. Portanto, as mensurações das proteínas carcinoembrionárias na circulação devem contar com imunoensaios. Apesar de não serem de 100%, a especificidade e a sensibilidade associadas com essas proteínas são muito mais altas do que aquelas de enzimas e metabólitos usados como marcadores tumorais no passado. A concentração sérica dessas proteínas carcinoembrionárias não só se correlaciona bem com a atividade tumoral mas também pode ser usada para predizer o prognóstico. Contudo, as proteínas carcinoembrionárias em geral não são adequadas para triagem pelas seguintes razões: primeiro, os anticorpos policlonais direcionados contra essas proteínas frequentemente sofrem reação cruzada com outras proteínas normais; segundo, essas proteínas carcinoembrionárias não aparecem cedo o suficiente para serem detectadas no sangue de pacientes com câncer. No entanto, essas proteínas carcinoembrionárias são utilizadas como testes adjuvantes para diagnóstico de câncer, sendo de extrema utilidade para monitorização do sucesso terapêutico e detecção de recorrência.

Marcadores tumorais definidos por anticorpos monoclonais

O desenvolvimento da tecnologia de hibridoma provocou grande impacto na identificação de marcadores tumorais (Milstein, 1983). Em vez de trabalhar com uma molécula inteira de estrutura proteica conhecida, agora é possível focar em apenas uma pequena área de superfície, um epítopo ou determinante antigênico, utilizando anticorpos monoclonais. Não é mais necessário purificar o antígeno para a preparação de anticorpos policlonais em animais. Também não há mais necessidade de caracterização e identificação completas da molécula portadora do epítopo. Um hibridoma pode ser preparado injetando-se uma fração enriquecida de membrana da célula tumoral ou dessa célula inteira em um camundongo. Os hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais de interesse são selecionados pelo procedimento subsequente de triagem, conforme descrito na Seção VI. Assim que um hibridoma for criado, haverá um aporte ilimitado e consistente de anticorpo monoclonal (AcM) para vários usos.

Ao combinar os anticorpos monoclonais com o modelo de teste de sanduíche de fase sólida, foram desenvolvidos muitos ensaios, que eliminaram diversos problemas associados com ensaios policlonais, envolvendo baixa reprodutibilidade, variações entre os lotes, baixa especificidade e reatividade cruzada inespecífica (Diamond, 1981). Isso também reduz as diferenças entre os kits e amplia a faixa de concentração linear para o ensaio. Sempre que um anticorpo monoclonal estiver disponível, seu uso será recomendado. Para obter a sensibilidade mais alta do teste, foi descoberto que a combinação de múltiplos anticorpos monoclonais melhora a afinidade entre múltiplos anticorpos monoclonais absorvidos de fase sólida e o antígeno solúvel.

Foi demonstrado que os testes para a detecção de marcadores tumorais definidos por anticorpos monoclonais (Tab. 74.1) possuem sensibilidade e especificidade mais altas que aqueles conduzidos com anticorpos policlonais. Por exemplo, os marcadores CA 19-9, CA 125 e CA 15-3 são muito mais sensíveis e específicos que o CEA para carcinomas pancreático, ovariano e mamário, respectivamente. Esses marcadores são recomendados para substituir o teste de CEA policlonal para o diagnóstico e tratamento de pacientes com os carcinomas mencionados anteriormente. Vários marcadores tumorais derivados de diferentes tumores também compartilham muitos epítopos associados ao tumor. Por exemplo, os marcadores CA 19-9, CA 15-3 e CA 125 são expressos por quase todos os carcinomas em graus variados. Além do compartilhamento de qualquer epítopo por mais de um carcinoma, também é possível que uma única molécula expresse mais do que um epítopo (Yu, 1991). Por exemplo, é provável que os marcadores CA 15-3 e CA 125 sejam expressos pela mesma molécula de mucina.

Tabela 74.1 Marcadores tumorais definidos por anticorpos monoclonais

Marcador tumoral	Doença maligna principal
CA125	Carcinoma ovariano
CA19-9	Carcinoma pancreático
CA15-3	Carcinoma mamário
CA72-4	Carcinoma gástrico
HER2/*neu*	Carcinoma mamário

Aplicações clínicas

Atualmente, os marcadores tumorais séricos são utilizados para a triagem e o diagnóstico, bem como para a predição do prognóstico e da resposta terapêutica. O uso de testes para triagem de doença, mesmo aqueles com sensibilidade e especificidade elevadas, deve ficar restrito o máximo possível às populações sob risco da doença. Isso porque o valor preditivo positivo (VPP) depende da prevalência da doença. Conforme apontado previamente, como a maioria dos marcadores tumorais descritos neste capítulo é expressa tanto em distúrbios neoplásicos quanto nos benignos, o uso desses marcadores é limitado à possível recorrência tumoral em pacientes tratados para tipos específicos de tumor.

Triagem

A recomendação de triagem para câncer de próstata pela mensuração do PSA sérico em combinação com o exame digital do reto (EDR) em homens acima de 50 anos de idade se deve à alta especificidade tecidual desse antígeno (Wu, 1994) e à alta prevalência desse tipo de câncer. A combinação do teste de PSA e do exame digital do reto constitui a abordagem mais barata para a detecção de câncer de próstata (Littrup, 1993). A triagem com PSA é sobretudo recomendada para homens afro-americanos, porque a incidência de câncer de próstata nessa população é quase o dobro daquela da população geral e a taxa de óbito chega a ser até três vezes mais alta. A triagem permite o tratamento de câncer prostático potencialmente curável e confinado ao órgão, descoberto em homens com expectativa de vida superior a 10 anos.

Embora não aprovada para a triagem de carcinoma hepatocelular nos Estados Unidos, a AFP é usada para fazer a triagem de carcinoma hepatocelular primário na China por causa da alta incidência de câncer de fígado nesse país. O diagnóstico de câncer de ovário tradicionalmente conta com as técnicas de diagnóstico por imagem e a descoberta durante cirurgia, por exemplo, laparotomia exploratória. Contudo, em grande parte dos casos, no momento da detecção, o tumor avançou para um estágio em que a possibilidade de cura é baixa. A viabilidade da triagem de câncer de ovário em mulheres pela mensuração do CA 125 sérico ainda está sendo pesquisada.

Diagnóstico

Recentemente, foram sugeridas várias abordagens para melhorar a recuperação diagnóstica (i. e., a proporção de resultados de testes que dão positivo) de muitos marcadores tumorais. O uso de múltiplos marcadores é uma abordagem que tem recebido ampla aceitação. Assim como mencionado no Capítulo 75, padrões específicos de múltiplos marcadores tumorais parece estar associado com doenças malignas individuais. Outra abordagem para melhorar a especificidade e a sensibilidade de marcadores tumorais, como no caso do teste de PSA sérico, envolve a mensuração da velocidade (a taxa de aumento da concentração do PSA com o passar do tempo) e da densidade (p. ex., mensurada dividindo-se a concentração de PSA sérico pelo volume da glândula prostática, determinado por ultrassom transretal) (Benson, 1992). Esses esforços visam a melhorar a diferenciação entre dois cenários: nível de PSA sérico levemente elevado com glândula prostática pequena pode indicar câncer, enquanto o mesmo valor de PSA em paciente com glândula volumosa pode sinalizar hiperplasia prostática benigna.

Prognóstico: recorrência, metástase e sobrevida

A avaliação da agressividade tumoral e do prognóstico quanto ao desfecho de paciente com câncer tem recebido muita atenção nos últimos anos. O conhecimento da agressividade do tumor ajuda no desenvolvimento de terapia apropriada para o paciente. Por exemplo, a detecção de marcadores tumorais, altamente associados com processos malignos e metástases, sugerirá a instituição de um tratamento sistêmico mais rigoroso. A monitorização de marcadores tumorais para a detecção de recorrência após a remoção cirúrgica do tumor é a segunda aplicação mais útil desse tipo de marcadores. Sabe-se bem que o aparecimento de grande parte dos marcadores tumorais circulantes leva alguns meses (3 a 6 meses) antes do estágio em que muitos dos procedimentos físicos poderiam ser utilizados para a detecção do câncer. A especificidade de marcadores tumorais não representa um problema para essa aplicação. A facilidade de coleta do sangue e a sensibilidade dos testes de marcador tumoral tornam esse processo de monitorização não invasiva amplamente aceito.

A maioria dos marcadores tumorais eleva-se de maneira progressiva quando o tumor sofre metástase. Infelizmente, pouquíssimos marcadores tumorais possuem um claro limite de corte entre os estágios benignos e malignos. As proteínas que refletem os fatores de risco associados com o processo de metástases tumorais, como proteases e moléculas de adesão, costumam ser os melhores marcadores para predição do prognóstico. Contudo, a maioria desses marcadores ainda é mensurada nos tecidos tumorais e citosois teciduais. O achado do domínio extracelular da proteína c-*erb*B-2 no soro (Fig. 74.2) e a correlação do domínio extracelular sérico com os níveis de outros marcadores tumorais séricos são animadores. Em breve, espera-se que seja possível mensurar esses fatores prognósticos séricos no sangue. Outra área de estudo intensivo consiste na exploração do uso de marcador sérico substituto na predição da sobrevida de paciente com câncer.

Monitorização da resposta terapêutica

Uma das aplicações mais úteis de marcadores tumorais envolve a monitorização do curso da doença, em especial durante o tratamento. O nível sérico de marcadores tumorais reflete o sucesso da cirurgia ou a eficácia da quimioterapia. A detecção de níveis elevados de algum marcador tumoral no período pós-cirúrgico indicaria a remoção incompleta do tumor, recorrência do quadro ou presença de metástases. A mensuração de marcadores tumorais séricos durante a quimioterapia também indica a eficácia do medicamento anticancerígeno utilizado e fornece orientação para a escolha do agente terapêutico mais eficaz para cada caso em particular.

Recomendações para solicitação dos testes de marcadores tumorais

Ao solicitar a mensuração de marcadores tumorais como teste diagnóstico adjuvante para o tratamento de pacientes com câncer, as recomendações expostas a seguir devem estar em mente para evitar o erro de interpretação dos resultados.

Jamais confiar no resultado de um único teste. Em virtude da baixa especificidade associada com a maioria dos marcadores tumorais, é difícil diferenciar as doenças malignas das benignas com base no resultado de um único teste. Grande parte das elevações de marcadores tumorais encontradas em doenças não malignas pode ser transitória, enquanto o nível desses marcadores frequentemente permanece elevado ou sobe de forma contínua em casos de câncer. A solicitação de testes seriados pode ajudar a detectar níveis falsamente elevados em função desse aumento transitório. Por exemplo, níveis séricos aumentados de AFP podem ser detectados em pacientes com carcinoma hepatocelular primário ou hepatopatia benigna. No entanto, em um teste subsequente realizado duas semanas depois, o nível sérico de AFP permanecerá elevado em pacientes com câncer, mas pode retornar ao normal em condições benignas.

Na solicitação de teste seriado, não se esquecer de solicitar cada teste do mesmo laboratório, utilizando o mesmo kit de análise. Cada kit comercial pode gerar resultados distintos, mesmo se designados para o mesmo marcador tumoral. A solicitação de exame do mesmo laboratório também garante um desempenho mais sólido. É importante garantir que qualquer alteração observada durante o processo de monitorização se deve a uma mudança de volume do tumor ou outras atividades tumorais e não à variabilidade laboratorial.

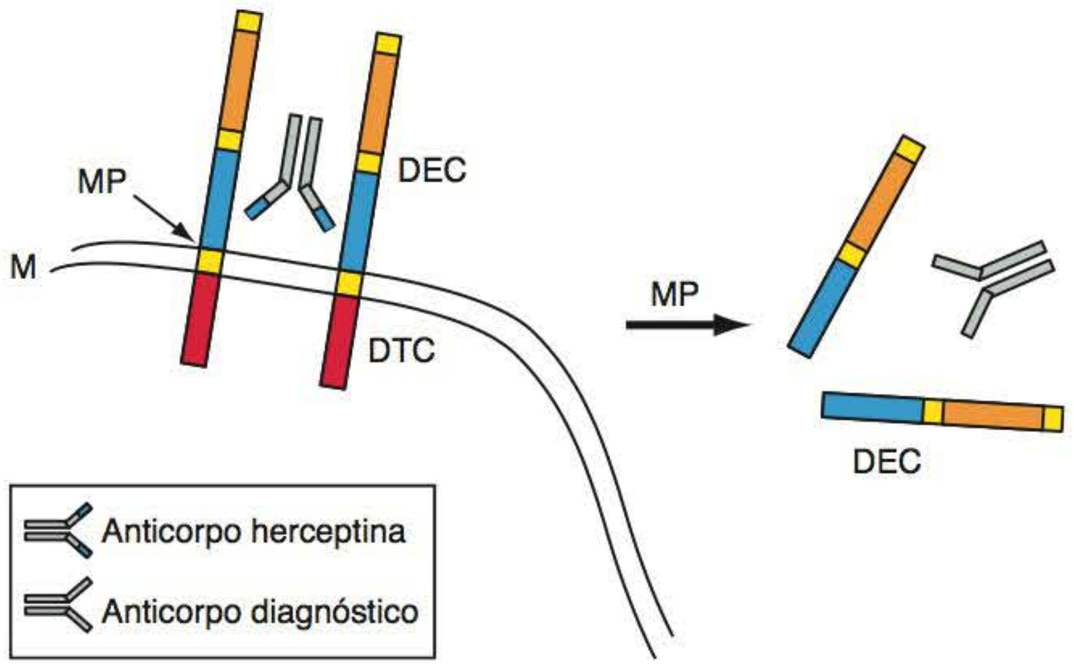


Figura 74.2 Anticorpos monoclonais anti-HER2/*neu* são utilizados tanto para fins diagnósticos quanto terapêuticos no câncer de mama. O anticorpo monoclonal anti-HER2 humanizado trastuzumabe (Herceptin), demonstrado com uma região determinante de complementaridade azul-clara, reage com uma região específica do epítopo de HER2 (azul-clara), causa morte de células mamárias malignas e, com frequência, é eficaz no tratamento do câncer de mama. Por outro lado, diferentes anticorpos monoclonais, que não sofrem reação cruzada com o determinante do trastuzumabe, reconhecem o domínio extracelular (DEC) de HER2/*neu* no soro após clivagem desse receptor de fator de crescimento por metaloprotease. Como o trastuzumabe e os anticorpos monoclonais diagnósticos reconhecem epítopos diferentes de HER2, não há interferência na detecção de níveis séricos de HER2 em pacientes tratados com o trastuzumabe. DEC = domínio extracelular; M = membrana celular; MP = metaloprotease; DTC = domínio tirosina-quinase.

Ter certeza de que o marcador tumoral selecionado para monitorizar recorrência estava elevado no paciente antes da cirurgia. Como nenhum dos marcadores tumorais é 100% sensível para a detecção de qualquer câncer específico, é importante se certificar de que o marcador tumoral solicitado para detectar recorrência esteja elevado antes do procedimento cirúrgico. Do contrário, múltiplos marcadores devem ser mensurados antes da cirurgia a fim de selecionar o marcador tumoral que demonstra a maior elevação como o marcador para monitorização da atividade patológica. Diversos marcadores podem ser utilizados para monitorizar os efeitos terapêuticos em termos de aumento da sensibilidade.

Considerar a meia-vida do marcador tumoral ao interpretar o resultado do teste. Antes da cirurgia, estimar o tempo necessário para que o nível decline ao normal ou, no caso de PSA, para um nível não detectável, com base na meia-vida conhecida do marcador tumoral. É importante que o sucesso da remoção cirúrgica de algum tumor, conforme determinado pelas concentrações de marcador tumoral, não seja avaliado antes de duas semanas do pós-operatório. Se possível, é preferível esperar um mês inteiro para permitir que o marcador tumoral preexistente no soro tenha tempo suficiente para declinar a níveis mais baixos. Por exemplo, a meia-vida do PSA sérico gira em torno de 3 a 4 dias. Portanto, levará um período de 30 dias para que o PSA sérico a 50 ng/mL caia a um nível não detectável após uma cirurgia bem-sucedida.

Considerar a forma de remoção ou de metabolização do marcador tumoral na circulação sanguínea. Níveis séricos elevados de marcadores tumorais são frequentemente detectados em pacientes com nefro ou hepatopatia, dependendo se o marcador tumoral é removido pelos rins ou metabolizado pelo fígado. Por exemplo, os níveis séricos de CEA com frequência se encontram elevados em pacientes hepatopatas, já que o fígado comprometido não consegue remover esse marcador da circulação sanguínea com eficiência, enquanto os níveis séricos de β_2-microglobulina (β_2M) muitas vezes estão aumentados em pacientes com insuficiência renal, pois até mesmo a pequena molécula de β_2M tem dificuldade de atravessar a membrana glomerular de forma normal.

Considerar a solicitação de múltiplos marcadores para melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico. Os tumores são constituídos de tipos heterogêneos de células. Alguns ainda podem permanecer normais, enquanto outros podem ser compostos de células tumorais heterogêneas como resultado de diferentes sequências

de múltiplas mutações. Cada tipo de célula pode expressar um único marcador ou uma série de marcadores tumorais característicos. O mesmo marcador também pode ser produzido por diferentes tipos de células. Algumas células talvez nunca produzam algum marcador exclusivo. Certos tipos de câncer são heterogêneos em sua composição celular. Em consequência, pode haver a necessidade de mais de um marcador tumoral para conferir alta sensibilidade de detecção. A heterogeneidade na composição celular e na porcentagem da distribuição celular de cada tumor explica por que uma série de marcadores tumorais pode ser necessária para atingir alta sensibilidade (> 90%) de detecção e a razão pela qual a sensibilidade de cada marcador difere entre os pacientes com câncer. A Tabela 74.2 lista múltiplos marcadores tumorais associados com doenças malignas individuais; o aparecimento de marcadores tumorais individuais em vários processos malignos está listado na Tabela 74.3. Isso explica por que nenhum dos marcadores tumorais empregados atualmente é 100% sensível e específico, bem como por que o uso de inúmeros marcadores aumentará a sensibilidade de detecção. Contudo, pode ser identificado um único padrão de vários marcadores com tumores derivados dos mesmos tecidos. Portanto, a solicitação de muitos marcadores tumorais também pode aumentar a especificidade do teste. Por exemplo, um padrão específico parece estar associado com carcinomas de cólon, mama, ovário e pâncreas quando os quatro marcadores tumorais definidos por anticorpos monoclonais (i. e., CEA, CA 19-9, CA 15-3 e CA 125) forem mensurados de forma simultânea. Considerando-se os parâmetros clínicos, essas informações são importantes, pois mais de 60% dos cânceres humanos diagnosticados são carcinomas derivados de células epiteliais (Wu, 1989). Múltiplos marcadores foram utilizados para desenvolver uma estratégia de triagem mais específica em caso de câncer de ovário. O uso de CA 15-3 e CA 72-4 em combinação com CA 125 pode aumentar a especificidade aparente da análise deste último marcador para distinguir doença ovariana maligna de benigna (Bast, 1991). Outro exemplo é a combinação de CEA, CA 19-9 e CA 72-4. O emprego dessa combinação melhora a precisão diagnóstica de cânceres gastrintestinais (Carpelan-Holmstrom, 2002). Durante a seleção de inúmeros marcadores tumorais, devem ser selecionados apenas os marcadores complementares entre si. Muitos marcadores tumorais, que correm paralelamente entre si quando correlacionados com atividades tumorais, não devem ser selecionados para esse propósito.

Estar ciente da presença de marcadores tumorais ectópicos. A expressão de marcadores tumorais está sob regulação genética. Para tumores benignos, os marcadores produzidos pelo tumor costumam ser específicos às células e estão relacionados a produtos celulares normais em uma concentração elevada (Fig. 74.1). Se algum tumor benigno se tornar maligno, a síntese dos marcadores proteicos pode deixar de ocorrer. Além disso, as proteínas que com frequência são encontradas em um estágio fetal precoce e não sob mecanismos regulatórios celulares normais podem vir a ser constitutivamente expressas. Essa é a razão pela qual as proteínas carcinoembrionárias e os marcadores tumorais ectópicos costumam ser expressos em doenças malignas avançadas. Em outras palavras, o aparecimento de marcadores tumorais ectópicos está associado com prognóstico mau ou metástases. Por exemplo, altas concentrações séricas de AFP podem ser detectadas em pacientes com cânceres do trato gastrintestinal que envolvem metástases, ainda que as provas de função hepática permaneçam normais. A Tabela 74.4 lista alguns dos marcadores ectópicos conhecidos e suas doenças malignas associadas.

É preciso ter consciência das diretrizes recentes sobre o uso de marcadores para câncer do trato gastrintestinal e de mama, publicadas pela American Society of Clinical Oncology (Smith, 1999). Os membros dessa sociedade recomendam o autoexame de mama mensalmente e a mamografia anual da mama preservada e da contralateral, bem como a obtenção de histórico detalhado e a realização de exame físico rigoroso a cada 3 a 6 meses por 3 anos, depois a cada 6 a 12 meses por 2 anos e, depois, anualmente. Não é recomendado o uso de marcadores tumorais (como CEA, CA 15-3 e CA 27-29) para triagem, assim como cintilografias ósseas de rotina, radiografias torácicas, contagens hematológicas, ultrassonografias hepáticas ou tomografia computadorizada. A American College of Physicians também publicou diretrizes clínicas a respeito da detecção precoce de câncer de próstata. Os membros dessa faculdade enfatizam a importância da triagem com PSA e da realização do EDR para a detecção precoce desse tipo de câncer. Embora o EDR não seja tão sensível quanto a triagem com PSA, esse exame é capaz de detectar o câncer que, sob outras condições, passaria despercebido pela mensuração desse antígeno (Coley, 1997a, 1997b).

Anticorpo heterófilo. O uso de anticorpos monoclonais em imunoensaios e a aplicação clínica crescente de anticorpos monoclonais de camundongos para obtenção de imagens direcionadas e imunoterapia geram um novo problema. Os indivíduos tratados aparentemente produzem anticorpos heterófilos contra anticorpos murinos que interferem em muitos dos imunoensaios para marcadores tumorais (Nahm, 1990), embora isso não seja um achado comum. A interferência causada pelos anticorpos heterófilos no soro de seres humanos pode aumentar ou diminuir os resultados de algum imunoensaio. Esses anticorpos reagem de forma similar contra os antígenos em termos de ligação a anticorpos associados à fase sólida e sinalizadores. Esses anticorpos heterófilos podem se ligar a qualquer sítio, exceto o sítio de ligação do analito, unindo de forma cruzada o anticorpo sinalizador com o anticorpo de captura. Com isso, podem gerar uma falsa resposta do ensaio. Sabe-se que o equivalente a 15 a 40% das pessoas pode ter um ou mais anticorpos heterófilos. A abordagem padrão para reduzir a interferência do anticorpo heterófilo é adicionar soro de camundongo em excesso ou imunoglobulinas inespecíficas de camundongo ao imunoensaio.

Marcadores tumorais individuais

α-Fetoproteína (AFP)

A AFP é uma proteína sérica fetal importante e também uma das principais proteínas carcinoembrionárias. Ela assemelha-se à albumina em muitas propriedades físico-químicas. No feto, a AFP é sintetizada pelo saco vitelino e pelos hepatócitos e, em menor grau, pelo trato gastrintestinal e pelos rins. A elevação da AFP pode ser encontrada em pacientes com carcinoma hepatocelular primário e tumores de células germinativas derivados do saco vitelino, sendo o marcador sérico mais útil para o diagnóstico e tratamento de carcinoma hepatocelular e tumores de células germinativas (Lamerz, 1997). Contudo, a AFP também se encontra transitoriamente elevada durante a gravidez e em muitas doenças hepáticas benignas. Em função da alta prevalência de câncer de fígado na China e em outros países no sudeste da Ásia, o teste de AFP é utilizado com sucesso na triagem de carcinoma hepatocelular nessa região do mundo. Os testes tanto de AFP quanto de hCG são úteis para reduzir os erros de estadiamento clínico em pacientes com alguns tumores testiculares e auxiliam no diagnóstico diferencial de vários tumores de células germinativas. Como um aumento de fucosilação da AFP (daí, a reatividade da lectina de lentilha da AFP sérica) foi encontrado em casos de carcinoma hepatocelular primário, a determinação da reatividade da lectina de lentilha da AFP sérica se mostrou útil não só para diferenciar o carcinoma hepatocelular primário de doenças hepáticas benignas mas também para fornecer um sinal precoce indicativo de que o carcinoma hepatocelular pode começar a se desenvolver em pacientes hepatopatas. Embora a necessidade da triagem de rotina com AFP necessite de mais estudos, um único estudo indica que a triagem combinada com AFP e ultrassonografia resulta em aumento da sensibilidade de 75 para quase 100% na detecção de carcinoma hepatocelular de pacientes com hepatite B e C (Izzo, 1998; Gebo, 2002). Por fim, a AFP é oferecida atualmente para triagem pré-natal em busca de defeitos do tubo neural e, em conjunto com β-hCG livre e estriol não conjugado, para síndrome de Down (Cuckle, 2000; Yamamoto, 2001).

Fatores angiogênicos

Angiogênese consiste na formação de vasos sanguíneos *in situ*, envolvendo os processos ordenados de migração, proliferação e diferenciação de células vasculares. A formação de vasos sanguíneos também é importante na patogênese de crescimento rápido e metástase de tumores maciços. Foram identificados vários fatores angiogênicos, tais como fator de crescimento ácido e básico de fibroblastos (bFGF), descrito no Capítulo 75, angiogenina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Folkman, 1992). No soro de pacientes com doença maligna, já foram encontrados fatores angiogênicos e antiangiogênicos

Tabela 74.2 Marcadores tumorais sorológicos associados com doenças malignas

Doença maligna	Principal marcador	Outros marcadores
Tumores neuronais		
Tumor cerebral	Desmosterol	Poliaminas
Neuroblastoma	VMA	HVA, NSE, cistationina, ferritina, metanefrinas
Tumores da cabeça e do pescoço		
Carcinoma de células escamosas	CYFRA 21-1	
Sistema endócrino		
Tumores hipofisários	Hormônio de crescimento	IGF-I
Tumores hipofisários-adrenais	Cortisol	Catecolaminas livres, DHEA, 17-cetosteroides, prolactina
Síndrome de Cushing	ACTH	Endorfina, lipotropina
Hipercalcemia da malignidade	Peptídeo relacionado ao PTH	
Tumores pancreáticos endócrinos: Gastrinoma Glucagonoma Insulinoma	Polipeptídeo pancreático: Gastrina Glucagon Insulina	Cromogranina AC-peptídeo, proteína ligadora I do IGF-I
Carcinoma medular da tireoide	Calcitonina	NSE
Microadenomas (hipofisários)	Prolactina	
Neoplasias endócrinas múltiplas	Cromogranina A	
Câncer papilar e folicular da tireoide	Tireoglobulina	
Tumores da paratireoide	PTH-intacto	
Síndrome de Zollinger-Ellison	Gastrina	
Feocromocitoma	Metanefrina	Cromogranina A, catecolaminas plasmáticas
Tumores hipofisários	βhCG livre	FSH, LH, prolactina, TSH
Sistema ósseo e musculoesquelético		
Osteossarcomas	Fosfatase alcalina	
Câncer de mama		
Câncer de mama	HER2/*neu*, CA 15-3	CYFRA 21-1, CEA, calcitonina
Sistema pulmonar		
Carcinoma broncogênico	Prolactina	
Câncer de pulmão (NSC)	CYFRA 21-1, NSE	ACTH, CK-BB, calcitonina, CA 72-4, CEA, AFP, Ferritina, LASA-P, TPA
Tumores carcinoides	Histamina, ADH, bradicinina	
Câncer de células em grão de aveia	ACTH, ADH, CEA, CK-BB, NSE, bombesina, calcitonina	
Sistema gastrintestinal		
Câncer colorretal	CEA	CA 19-5, CA 19-9, CA 72-4, NSE
Carcinoma gástrico	CA 72-4	CA 19-9, CA 50, CEA, ferritina, CK-BB, hCG, LASA-P, pepsinogênio II
Carcinoma hepatocelular	AFP	CEA, ferritina, rGT, ALP, TPA, γ-glutamiltransferase
Carcinoma pancreático	CA 19-9	CA 19-5, CA 50, CA 72-4, CEA, CK-BB, ADH, ALP
Vipoma (pâncreas)	VIP	
Sistema geniturinário		
Câncer de bexiga	Antígeno-T, inibidor da uroquinase, TPA, citoqueratinas	Glicosaminoglicanos, uroplaquinas
Tumor não seminomatoso do testículo	AFP	hCG
Carcinoma prostático	PSA	PAP, racemase
Carcinoma de células renais	Renina, eritropoetina, IL-4, PGA	
Câncer de testículo	hCG	PLAP, Oct3/4
Tumores ginecológicos		
Câncer do colo uterino	SCC	CA 125, CEA, TPA
Carcinoma ovariano	CA 125	UGF, inibina, AFP, isozima amilase, CEA, CK-BB, hCG
Coriocarcinoma	hCG	
Tumores placentários	hCG	α-hCG livre, CA 15-3, PTH, NSE, prolactina
Câncer uterino	SCC	
Teratoblastoma	AFP	hCG, ferritina
Processos malignos hematológicos e linfomas		
Leucemia linfocítica crônica de células-B	TdT	β_2M sérica, LASA-P
Processos malignos de células-B	β_2M	
Mieloma múltiplo	Proteína de Bence-Jones	β_2M
Leucemia mielógena crônica	TdT	
Leucemia de células pilosas	Receptor de IL-2	
Doença de Hodgkin	LASA-P, ferritina	
Leucemia	TdT	ALP, β_2M, ferritina, LDH, proteína básica da mielina, adenosina desaminase, PNP

Tabela 74.2 Marcadores tumorais sorológicos associados com doenças malignas (*continuação*)

Doença maligna	Principal marcador	Outros marcadores
Linfoma	β_2M	TdT, Ki-67, LASA-P
Mieloma múltiplo	Cadeia leve e pesada de imunoglobulina	Proteína de Bence-Jones, β_2M, IgA
Doença de Waldenström	Imunoglobulinas IgM	β_2M
Melanoma		
Antígeno de melanoma	LASA-P associado ao melanoma, L-dopa	Proteína C-reativa
Sistema endorreticular		
Tumores esplênicos	Ferritina	
Outras		
Sarcoma	β_2M	

β_2M = β_2-microglobulina; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico; ADH = hormônio antidiurético; AFP = α-fetoproteína; ALP = fosfatase alcalina; CEA = antígeno carcinoembrionário; CK-BB = isozima BB da creatina quinase; DHEA = deidroepiandrosterona; FSH = hormônio foliculoestimulante; hCG = gonadotrofina coriônica humana; IGF = fator de crescimento insulino-símile; IL = interleucina; LASA-P = ácido siálico associado a lipídeo no plasma; LDH = lactato desidrogenase; LH = hormônio luteinizante; NSC = células não pequenas do pulmão; NSE = enolase neurônio-específica; PAP = fosfatase ácida prostática; PGA = prostaglandina A; PLAP = fosfatase alcalina placentária; PNP = purina nucleosídeo fosforilase; PTH = paratormônio; rGT = gama-glutamil transpeptidase; SCC = carcinoma de células escamosas; TPA = ativador do plasminogênio tecidual; TSH = hormônio tireoestimulante; VIP = polipeptídeo intestinal vasoativo; UGF = fator de crescimento uterino; VMA = ácido vanililmandélico.

Tabela 74.3 Doença maligna associada com marcadores tumorais sorológicos

Marcador tumoral	Doença maligna associada Doença de maior importância	Doença de menor importância
α-Fetoproteína	Carcinoma hepatocelular primário	Teratoblastomas do ovário e dos testículos
β-hCG	Tumores hipofisários	
β_2-Microglobulina	Neoplasias das células-B	Mieloma múltiplo, linfoma de células-B, leucemia linfocítica crônica de células-B e sarcoma de células reticulares; macroglobulinemia de Waldenström
β-Gonadotrofina coriônica humana	Coriocarcinoma	Cânceres (não seminomatosos) do testículo, tumores trofoblásticos
Proteína de Bence-Jones	Mieloma múltiplo	
Bombesina	Câncer de células em grão de aveia	
Proteína C-reativa	Melanoma	
CA 15-3	Câncer de mama	Vários carcinomas
CA 19-9	Carcinoma pancreático e gástrico	Vários carcinomas
CA 72-4	Carcinoma gástrico	Vários carcinomas
CA 125	Carcinoma ovariano	Vários carcinomas
CA 549	Câncer de mama	
CA M26	Câncer de mama	
Calcitonina	Carcinoma medular	Câncer da tireoide, câncer de fígado, câncer renal
Antígeno carcinoembrionário	Carcinoma colorretal	Vários carcinomas
Oncoproteína c-*erb*B-2	Carcinoma mamário	Vários carcinomas
Cromogranina A	Feocromocitoma, neuroblastoma	Neoplasias endócrinas múltiplas, câncer de células pequenas do pulmão, tumores carcinoides
CYFRA 21-1	Carcinoma de células escamosas do pulmão	
DHEA	Câncer suprarrenal/hipofisário	
Ferritina	Leucemia mielocítica aguda	Linfoma de Hodgkin, neuroblastoma e vários carcinomas, teratoblastoma
Galactosiltransferase	Câncer ovariano	
Isozima II da galactosiltransferase	Câncer pancreático	
Gastrina	Gastrinoma	Síndrome de Zollinger-Ellison
Her2/*neu*	Ver oncoproteína c-*erb*B-2	
Gonadotrofina coriônica humana	Coriocarcinoma	Carcinoma gástrico, ovariano e mamário; tumores de células germinativas ou trofoblásticas, câncer de testículo
Ácido hialurônico	Mesotelioma	
Imunoglobulina A	Mieloma múltiplo	
Fator de crescimento I insulino-símile	Câncer hipofisário	Insulinoma
Receptor de interleucina-2	Leucemia	
Imunoglobulinas	Mieloma múltiplo	Linfoma do Mediterrâneo, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma maligno
Inibina	Tumores de células da granulosa	
17-cetosteroides	Câncer suprarrenal/hipofisário	

(Morelli, 1998). Os níveis séricos de bFGF e VEGF refletem a expressão desses fatores em determinados tumores (Poon, 2003; Granato, 2004). O significado de VEGF sérico elevado em pacientes com câncer foi avaliado em vários estudos, incluindo carcinomas mamário, ovariano, hepatocelular, colorretal e renal, além de sarcoma de tecidos moles. Os altos valores séricos do VEGF em pacientes com câncer de ovário foram correlacionados com diferenciação e metástase do câncer e, de maneira mais significativa, com tempo médio de sobrevida

Tabela 74.4 Marcadores tumorais ectópicos

Marcador	Tumor
α-Fetoproteína	Carcinoma gastrintestinal, renal, vesical e ovariano
Calcitonina	Tumores endócrinos (células de ilhotas, carcinoide, medular da tireoide, feocromocitoma); carcinoma pulmonar, mamário e ovariano
Cromogranina A	Tumores endócrinos (células de ilhotas, carcinoide, medular da tireoide, feocromocitoma); câncer de próstata
α-hCG livre	Carcinoma colorretal e tumores endócrinos pancreáticos
hCG	Carcinoma gástrico e pancreático, hepatoma, carcinoma ovariano, tumor de células germinativas do testículo
Tireoglobulina	Carcinoma diferenciado da tireoide

hCG = gonadotrofina coriônica humana.

mais curto (Alvarez Secord, 2004; Harlozinska, 2004; Li, 2004). Além disso, o alto nível sérico do VEGF foi associado com sobrevida mais curta em carcinoma de células renais (Ljungberg, 2003) e carcinoma de cólon (De Vita, 2004).

β_2-Microglobulina (β_2-M)

β_2-M corresponde à cadeia leve constante do antígeno de histocompatibilidade humano (HLA, *human histocompatibility locus antigen*, antígeno leucocitário humano), expresso na superfície de grande parte das células nucleadas. O peso molecular da β_2-M é de apenas 11,8 kDa. A β_2-M é eliminada no líquido extracelular e aumenta não só em tumores maciços mas também em doenças linfoproliferativas (incluindo leucemia linfocítica crônica de células-B, linfoma não Hodgkin e, sobretudo, mieloma múltiplo) (Wu, 1986). A concentração sérica de β_2-M correlaciona-se com atividade linfocítica, tornando essa microglobulina um marcador satisfatório para processos malignos linfoides da linhagem das células-B. Esse marcador já foi usado como indicador de resposta do paciente ao tratamento (Haferlach, 1997). Os níveis de β_2-M no LCE são úteis para detectar metástases no sistema nervoso central (SNC). Há relatos de que o nível sérico de β_2-M se encontra elevado em 75% dos pacientes com mieloma múltiplo (Kyle, 2003), sendo um marcador útil para o acompanhamento da eficácia terapêutica dessa doença.

Antígeno carcinoembrionário (CEA)

A CEA é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 200 kDa. É a primeira das chamadas proteínas carcinoembrionárias e foi descoberta por Gold e Freedman em 1965. O CEA ainda é o marcador tumoral mais utilizado para câncer gastrintestinal nos dias atuais, mas a maioria dos ensaios desse antígeno substituiu anticorpos antiCEA policlonais por monoclonais.

Originalmente se acreditava que o CEA fosse um marcador específico para câncer colorretal, mas se verificou que ele é um marcador inespecífico em outros estudos. Os níveis de CEA podem estar elevados em cânceres de mama, pulmão e fígado, entre outros. Estudos com esse antígeno demonstraram que os marcadores tumorais podem ser utilizados para acompanhar os pacientes durante a terapia e detectar a recorrência após uma cirurgia bem-sucedida. A associação entre concentração sérica altamente elevada de marcador tumoral, metástases e prognóstico mau também foi descoberta por meio de estudos com CEA. Níveis elevados desse marcador antes da ressecção de câncer de cólon podem ser sugestivos de prognóstico desfavorável. Níveis declinantes durante o tratamento sugerem resposta à terapia, enquanto níveis crescentes indicam evolução da doença. No entanto, as decisões clínicas a respeito do tratamento das doenças não podem ser tomadas com base apenas nos níveis de CEA (Mitchell, 1998). Como o fígado é responsável pela metabolização do CEA, a ocorrência de dano hepático pode comprometer a depuração desse antígeno e levar ao aumento dos níveis na circulação sanguínea. Em alguns pacientes, observaram-se concentrações elevadas de CEA após quimiorradioterapia. Por essa razão, foi recomendado que esse marcador deva fazer parte do sistema de estadiamento do American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Compton, 2000). O CEA pode ser usado como marcador para monitorização de câncer colorretal (Bast, 2001). Contudo, um valor preditivo positivo baixo para o diagnóstico em pacientes assintomáticos limita o uso disseminado desse marcador na triagem.

Outros marcadores tumorais genéticos estão sendo utilizados com maior frequência. Por exemplo, o fator transformador do crescimento (TGF, *transforming growth factor*)-α, o fator de crescimento de fibroblastos e a oncoproteína Ras estão sempre elevados em casos de câncer colorretal e sofrem declínio após ressecção cirúrgica. Mais recentemente, foi demonstrado que mutações dos genes de reparo de DNA (p. ex., *hMSH2*, *hMLH1* e *hMSH6*) estejam associadas com câncer colorretal hereditário não polipoide. Estudos clínicos adicionais para correlacionar os níveis séricos de expressão e mutação nesses genes poderiam gerar uma ferramenta diagnóstica e prognóstica mais satisfatória.

CA 15-3 e CA 27-29

Esses antígenos correspondem a sequências de mucinas chamadas mucinas epiteliais polimórficas (PEMs, *polymorphic epitelial mucins*) que, frequentemente, são superexpressas nas superfícies celulares de células glandulares malignas, como ocorre em câncer de mama, mas quantidades crescentes são liberadas na circulação onde podem ser detectadas, tornando-as úteis como marcadores tumorais. O núcleo polipeptídico da PEM contém um domínio citoplasmático composto por 69 aminoácidos e outro domínio extracelular muito maior constituído por repetições em tandem de 20 aminoácidos, que variam entre os indivíduos; no entanto, diferentes alelos do gene MUC1 humano pode codificar entre 25 e 100 ou mais repetições em tandem. Uma grande parte da molécula é composta por carboidrato, e o grau de glicosilação é variável, tornando a PEM muito heterogênea em termos de estrutura (Klee, 2004).

O determinante antigênico do CA 15-3 é identificado por dois anticorpos monoclonais distintos. O ensaio utiliza um anticorpo monoclonal (AcM) conjugado de fase sólida, o AcM 115D8, para capturar o antígeno MAM-6 no plasma humano, além de um AcM DF3 marcado como anticorpo de detecção. O AcM 115D8 foi preparado contra glóbulo de gordura de leite desnatado humano, enquanto o preparo do AcM DF3 foi feito contra a linhagem celular de carcinoma mamário MCF-7. O antígeno CA 15-3 está presente em uma série de adenocarcinomas, como de mama, cólon, pulmão, ovário e pâncreas.

O CA 15-3 é um marcador mais sensível e específico para monitorizar a evolução clínica de pacientes com câncer de mama metastático (Canizares, 2001). Os níveis de CA 15-3 aumentam com os estágios mais elevados do câncer de mama (Bast, 2001). Além disso, o CA 15-3 pode ser utilizado para predizer desfechos adversos em pacientes com câncer de mama (Gion, 2002; Kumpulainen, 2002; Duffy, 2004). Contudo, a sensibilidade (23%) e a especificidade (69%) relativamente baixas (Chan, 2001) para detectar a presença de câncer de mama têm limitado o uso desse marcador. O CA 15-3 também pode estar elevado em casos de hepatite crônica, cirrose hepática, sarcoidose, tuberculose e lúpus eritematoso sistêmico, bem como em pacientes fumantes (Tondini, 1988). O CA 27-29, outro antígeno associado ao marcador de mucina MUC1, é um marcador levemente mais sensível para câncer de mama, em comparação ao CA 15-3. A FDA aprovou tanto o CA 15-3 quanto o CA 27-29 para monitorizar a terapia de câncer de mama avançado ou recorrente.

CA 19-9, CA 50 e CA 19-5

CA 19-9 é o primeiro marcador tumoral de um grupo de novos epítopos, incluindo CA 125, CA 15-3 e CEA, definidos por anticorpos monoclonais. Esses novos kits monoclonais detectam epítopos recém-descobertos e foram planejados para substituir as mensurações de CEA policlonal para vários carcinomas. O ensaio em busca de CA 19-9 mensura um determinante antigênico de carboidrato expresso em uma mucina de alto peso molecular. O CA 19-9 é um epítopo, definido como lacto-*N*-fucopentose II sialilada, identificada pelo AcM 1116NS-199. A molécula, portadora do epítopo CA 19-9, aparece sob a forma de mucina nos soros de pacientes com câncer, mas sob a forma de gangliosídeo nas células tumorais. O CA 19-9 também está relacionado a substâncias do grupo sanguíneo de Lewis. Apenas o antígeno sérico de pacientes com câncer pertencente ao grupo sanguíneo Le (a^-b^+) ou Le (a^+b^-) será positivo para o CA 19-9. Além do CA 19-9, os marcadores CA 19-5 e

CA50 também são definidos por anticorpos monoclonais, um pouco diferentes do CA 19-9. O CA 19-9 pode estar elevado em pacientes com câncer colorretal, gástrico e pancreático. O epítopo relacionado ao CA 50 é muito similar àquele do CA 19-9, mas carece do resíduo de fucose, o mesmo epítopo encontrado em indivíduos negativos para o grupo sanguíneo de Lewis (a^-b^-). As concentrações séricas de CA 19-9 não só estão frequentemente muito elevadas em carcinomas gástricos e pancreáticos mas também são úteis para monitorizar o êxito da terapia e para detectar a recorrência nesses pacientes com câncer. No entanto, relata-se que os marcadores CA 19-9 e CA 50 se complementam em carcinomas pancreáticos e outros carcinomas: o uso simultâneo desses marcadores aumentará a sensibilidade na detecção dessas doenças malignas. O CA 19-5 é detectado pelo AcM CC3C-195 de camundongo e ainda reage com epítopos Le^a e sialil-Le^a. O CC3C-195 liga-se com alta afinidade ao antígeno do grupo sanguíneo Le^a sialilada, mas exibe uma afinidade mais baixa com a forma não sialilada. Altos níveis séricos de CA 50 e CA 19-5 também podem ser encontrados em pacientes com carcinomas colônicos, pancreáticos e hepatocelulares. Em pacientes com hepatopatia benigna, podem ocorrer resultados falso-positivos, possivelmente atribuídos à colestase nesses pacientes (Wu, 1992).

CA 125

CA 125 constitui outro determinante antigênico definido por algum AcM e também está associado com uma glicoproteína semelhante à mucina de alto peso molecular (> 200 KDa). O CA 125 é expresso por mais de 80% dos carcinomas ovarianos epiteliais não mucinosos, sendo encontrado em grande parte dos carcinomas serosos, endometrioides e células claras do ovário (Jacobs, 1989). Entretanto, os pacientes submetidos à quimioterapia podem exibir um falso declínio do antígeno CA 125, e um resultado negativo nem sempre descarta a recorrência do tumor. O CA 125 também é usado clinicamente para acompanhamento de tumores uterinos (> 60% estão elevados) e benignos, inclusive endometriose. Estudos recentes revelaram grande aumento da sensibilidade do CA 125 sérico em combinação com outros marcadores, utilizando a tecnologia de proteoma, demonstrada por vários estudos (discutidos em detalhes nos próximos capítulos) (Jacobs, 2004; Lu, 2004; Zhang, 2004). Foram realizados estudos para a aplicação de CA 125 sérico em outras doenças cancerosas (p. ex., linfoma não Hodgkin, câncer de pulmão) e não malignas (p. ex., cirrose hepática) (Ando, 2003; Xiao, 2003; Zidan, 2004); tais estudos revelaram aumento dos níveis de CA 125 nos soros desses pacientes.

CA 72-4

O ensaio de CA 72-4 detecta um antígeno associado a adenocarcinoma humano semelhante à mucina, o TAG-72, que corresponde a uma molécula complexa semelhante à mucina de alto peso molecular (> 10^6 Da). Como a TAG-72 pode ser detectada tanto nos epitélios fetais quanto nos soros de pacientes com vários carcinomas, considera-se que essa molécula também seja uma proteína carcinoembrionária. Contudo, apenas uma elevação sérica moderada de CA 72-4 é encontrada na maioria dos carcinomas. Atualmente, considera-se que o CA 72-4 seja um marcador útil para o tratamento de pacientes com carcinoma gástrico e colorretal. O CA 72-4 foi proposto como marcador específico para ocorrência tumoral de câncer gástrico ressecável (Marrelli, 2001) e marcador prognóstico em termos de sobrevida (Gaspar, 2001). Há relatos de que o CA 72-4 seja um marcador prognóstico independente quanto à sobrevida em câncer colorretal (Louhimo, 2002) em análise multivariada com β-hCG e CEA.

Calcitonina

Calcitonina é um dos hormônios peptídicos circulantes que pode ficar elevado em pacientes com alta taxa de renovação (*turnover*) óssea associada com metástases esqueléticas. Esse hormônio pode sofrer aumento ectópico em carcinomas broncogênicos e também pode estar elevado em carcinoma medular da tireoide.

Cromogranina A

Cromogranina A é a principal proteína solúvel dos grânulos de cromafins. A cromogranina A e as catecolaminas são liberadas da medula suprarrenal sob estimulação do nervo esplâncnico. Todavia, a cromogranina A não está confinada às células cromafins da medula suprarrenal e dos neurônios simpáticos. Essa proteína também está presente em vários órgãos neuroendócrinos. Altos níveis séricos de cromogranina A podem ser detectados em feocromocitoma (Giovanella, 2002), carcinoma medular da tireoide e carcinoma de células pequenas do pulmão (Ma, 2003). É interessante notar que o aumento dos níveis séricos de cromogranina A é detectado em cânceres epiteliais com diferenciação neuroendócrina, como câncer de próstata, mama, ovário, pâncreas e cólon (Wu, 2000).

O câncer de próstata com diferenciação neuroendócrina constitui uma área ativa de estudo. Níveis mais altos de cromogranina A sérica estão associados com câncer de próstata pouco diferenciado (Isshiki, 2002). Essa proteína também sofre aumento após terapia de bloqueio androgênico e terapia sistêmica com radionuclídeos (Ferrero-Pous, 2001) para câncer de próstata. Além disso, foi observada associação entre o aumento da cromogranina A e a metástase de câncer prostático (Tarle, 2002). A terapia de privação androgênica intermitente pode reduzir os níveis da cromogranina A e, como consequência, a diferenciação neuroendócrina do câncer de próstata (Sciarra, 2003).

Fragmento da citoqueratina 19

O fragmento da citoqueratina 19 (CYFRA 21-1) é um fragmento do filamento intermediário dessa citoqueratina encontrado no soro. Esse fragmento corresponde à subunidade de um filamento intermediário de citoqueratina expresso em epitélios simples e suas contrapartes malignas. Os estudos de CYFRA 21-1 sérico elevado concentraram-se no câncer de mama e no carcinoma de células escamosas do pulmão. Foi relatado que o CYFRA 21-1 tem sensibilidade de 60, 64,2 e 89% para a detecção do câncer de mama em estágio IV, recorrência e metástase, respectivamente. A probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer primário, a recorrência após cirurgia e a resposta após quimioterapia foram correlacionadas com níveis séricos pré-operatórios elevados de CYFRA 21-1 em pacientes com câncer de mama (Nakata, 2000, 2004). Também foi demonstrado que o CYFRA 21-1 reflete a massa tumoral em múltiplos estudos com correlação ao estágio do tumor, à sobrevida ao paciente, ao papel preditivo em tratamento cirúrgico para doença em estágio precoce e à quimioterapia para câncer de células não pequenas do pulmão em estágio avançado. Em um único estudo de carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço, o aumento do CYFRA 21-1 pós-radioterapia ou quimioterapia foi explorado como um indicador precoce de metástase à distância (Kuropkat, 2002). O CYFRA 21-1 não se encontra elevado em pacientes com pneumopatia não neoplásica, incluindo pneumoconiose e doença obstrutiva das vias aéreas (Schneider, 2003).

Gonadotrofina coriônica humana

Gonadotrofina coriônica humana, um membro da família dos hormônios glicoproteicos, é sintetizada e secretada por células trofoblásticas da placenta, além de ser um hormônio heterodimérico composto de subunidades α e β unidas por uma ligação não covalente e ligadas internamente por pontes dissulfeto. Os ensaios atuais conduzidos com anticorpos monoclonais estão disponíveis para detectar hCG intacto, hCG "clivado" (um hCG parcialmente degradado, que carece de ligações peptídicas entre os aminoácidos nas posições 44 e 45 ou 47 e 48), subunidade α do hCG, subunidade e núcleo β do hCG (β-hCG residual, resíduos 6 a 40 unidos por pontes dissulfeto a resíduos 55 a 92 do β-hCG) (Berger, 2002, Birken, 2003). As células trofoblásticas tanto malignas quanto não malignas sintetizam e secretam não apenas o dímero α, biologicamente ativo, mas também as subunidades α e β não combinadas (ou livres). Além do dímero intacto, uma subunidade , livre do hCG foi detectada no soro de mulheres durante o início da gravidez e em pacientes com tumores malignos (descritos com detalhes no Cap. 25).

A mensuração da subunidade β livre é útil para a detecção de recorrência ou metástase de coriocarcinoma nos momentos em que o hCG intacto puder permanecer normal. A análise das subunidades do hCG sérico é particularmente proveitosa para o tratamento de pacientes com tumores de células germinativas (von Eyben, 2003). Contudo, altos níveis de hCG podem ser encontrados em tumores trofoblásticos,

coriocarcinoma e tumores testiculares. Mais de 60% dos pacientes com tumores não seminomatosos de células germinativas e 10 a 30% dos pacientes com seminomas apresentam β-hCG livre elevado.

O câncer testicular seminomatoso contém hCG e β-hCG intactos ou subunidades α livres em quantidades iguais. Por essa razão, há necessidade de apenas um único ensaio para monitorização desses pacientes. Por outro lado, somente o hCG ou as subunidades do hCG podem ser encontrados em pacientes com cânceres não seminomatosos. A mensuração das subunidades livres e do hCG intacto aumentará a sensibilidade do teste para esses pacientes com cânceres não seminomatosos.

Em cerca de 30% dos pacientes com outros tipos de câncer (inclusive câncer urotelial), ocorre produção ectópica de β-hCG livre, mas apenas o β-hCG livre e seu respectivo produto de degradação, o núcleo-β, foram detectados nessas amostras clínicas. O α-hCG ectópico é um marcador de processo maligno em tumores endócrinos pancreáticos (Ma, 2003). Esforços recentes na preparação de um novo reagente de referência da Organização Mundial de Saúde para hCG (HCG, hCG-α e hCG-β) e suas moléculas relacionadas podem diminuir a reação inespecífica e aumentar a precisão do exame clínico de hCG (Bristow, 2005).

Oncoproteína HER2/*neu* (c-*erb*B-2)

O oncogene HER2/*neu* (c-*erb*B-2) refere-se a uma proteína transmembrana de 185 kDa da família de receptores da tirosina-quinase e será amplamente discutido no Capítulo 75. Esse oncogene exibe homologia estrutural e funcional com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), contendo domínios intracelular, transmembrana e extracelular (Fig. 74.2). Foi descoberto que o HER/*neu* está elevado nos soros de pacientes com diversos tipos de câncer de células epiteliais, incluindo cânceres mamário, pulmonar, colorretal e ovariano. O ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) mensura os níveis do c-*erb*B-2 circulante, denominado p105 ou HER2 sérico que, por sua vez, constitui o ectodomínio (Fig. 74.2). Aqui, será enfatizado que, em pacientes com câncer de mama, o HER2/*neu* sérico é mais importante como marcador prognóstico e preditivo. No momento do diagnóstico inicial, o HER2/*neu* sérico apresenta-se elevado em apenas 5 a 10% dos pacientes com câncer de mama. Foi demonstrada a associação de aumento do HER2/*neu* sérico antes da terapia adjuvante com ampliação do volume tumoral, grau do tumor e positividade dos linfonodos. Os níveis do HER2/*neu* pré e pós-quimioterapia podem servir como marcador prognóstico de sobrevida livre de doença e sobrevida global (Hayes, 2001; Saghatchian, 2004). Além disso, os níveis séricos do HER2/*neu* correlacionam-se com a resposta à quimioterapia (que inclui agentes quimioterápicos, antagonistas hormonais e Herceptin [trastuzumabe], um anticorpo anti-HER2/*neu*); os níveis mais altos predizem resposta terapêutica mais curta, enquanto níveis baixos sugerem respostas terapêuticas mais prolongadas ou completas (Colomer, 2000; Harris, 2001; Lipton, 2002; Bethune-Volters, 2004; Luftner, 2004). Como o HER2/*neu* também sofre superexpressão e/ou ampliação em casos de câncer ovariano, prostático, gástrico e carcinomas brônquicos, esse marcador pode ser utilizado como alvo terapêutico nesses tipos de câncer (Agus, 2000).

Atualmente, há dois ensaios ELISA aprovados pela FDA para detecção de HER2 circulante sérico, utilizando anticorpos monoclonais, um por ensaio com placas de microtitulação (Oncogene Science) e outro por algum instrumento automatizado (Bayer Diagnostics). De maior importância, o teste de HER2/*neu* sérico não sofre interferência por anticorpos heterófilos e, sobretudo, pelo AcM terapêutico trastuzumabe, porque diferentes epítopos antigênicos são o alvo (Fig. 74.2).

p53

O marcador p53 (descrito com detalhes no Cap. 75) é uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa e um regulador negativo de crescimento celular. Esse marcador atua como supressor tumoral, induzindo à expressão de produtos gênicos responsáveis pela inibição ou interrupção dos processos de crescimento e proliferação celulares. A capacidade da proteína p53 de regular a transcrição de seus genes-alvo baseia-se em sua atividade ligante ao DNA específica à sequência desse nucleotídeo e na presença de algum domínio capaz de ativar a transcrição quando ligado ao domínio ligante de DNA da proteína-alvo p53. É o domínio ligante de DNA que parece ser sensível à ruptura por mutação, embora a maioria das lesões associadas com cânceres humanos ocorra dentro desse domínio. Foi descoberto que o gene responsável pela codificação da proteína p53 sofra mutação em cerca de metade de quase todos os tipos de cânceres que se originam de um amplo espectro de tecidos. Em virtude de sua meia-vida curta (20 minutos), a proteína *p53* do tipo selvagem não é detectável na circulação sanguínea (Malkin, 1990; Harris, 1993). Contudo, as técnicas moleculares atuais, como PCR/SSCP (descritas com detalhes na Seção VIII), são capazes de detectar mutações no gene *p53*. A presença de anticorpo anti-p53 no soro facilitou a detecção de p53 sorologicamente anormal. De maior significado, a presença desse anticorpo no soro está associada com a expressão de mutações da proteína p53 e apresenta correlação positiva com o grau de malignidade do câncer (assunto abordado no Cap. 75).

Peptídeo relacionado ao paratormônio

As concentrações plasmáticas do peptídeo relacionado ao paratormônio (PTH-RP, *parathyroid hormone-related peptide*) estão elevadas na maioria dos pacientes com hipercalcemia associada ao câncer. O PTH-RP é secretado por tumores associados com hipercalcemia. As formas circulantes do PTH-RP nesses pacientes incluem um peptídeo aminoterminal grande e outro carboxiterminal com homologia estreita de sequência à paratirina (paratormônio [PTH]). O mecanismo pelo qual o PTH-RP induz à hipercalcemia envolve a ligação e a ativação de receptores que também se ligam ao PTH. A mensuração das concentrações dos PTH-RPs pode ser útil no diagnóstico diferencial de hipercalcemia relacionada à malignidade e associada com hiperparatireoidismo primário, sarcoidose, toxicidade da vitamina D ou vários processos malignos (incluindo carcinomas renais, vesicais e ovarianos, além daqueles de células escamosas). É preciso notar que pacientes com função renal comprometida, mas sem hipercalcemia ou câncer, podem apresentar concentrações plasmáticas elevadas do PTH-RP (Burtis, 1990).

Antígeno prostático-específico

O PSA (*prostate-specific antigen*), membro da família de genes das calicreínas (proteases de serinas), é sintetizado exclusivamente nas células epiteliais da glândula prostática. A expressão do PSA nessas células é regulada pelo receptor androgênico. Em virtude de seu alto grau de especificidade tecidual, o PSA talvez seja o marcador tumoral mais utilizado descoberto até então. A faixa normal de referência é de 0 a 4 ng/mL. A sensibilidade do câncer e a especificidade tecidual do PSA tornam esse antígeno o marcador tumoral mais útil disponível para a triagem e o tratamento de câncer de próstata. A falta de especificidade do câncer, na distinção entre câncer de próstata e lesões não malignas dessa glândula, é o principal obstáculo do PSA. Condições benignas, como hiperplasia prostática benigna, prostatite aguda e infarto, também podem ser correlacionadas com níveis séricos elevados de PSA.

O PSA serve como um excelente marcador tumoral na triagem, no diagnóstico, na predição do risco de câncer e na recorrência de câncer de próstata. Desde sua descoberta em 1980 no soro de pacientes com câncer de próstata (Papsidero, 1980), o PSA foi submetido a intensas pesquisas e uso clínico na triagem, detecção e monitorização desse tipo de câncer. O PSA e suas várias formas são utilizadas com o objetivo de orientar as decisões clínicas para futuras biópsias teciduais diagnósticas, resultando em aumento da detecção de câncer prostático, sobretudo em homens jovens. O uso do PSA para detectar câncer de próstata também culminou em uma redução no número de cânceres dessa glândula descobertos apenas em estágios tardios, ou seja, nos momentos em que já ocorreram metástases, de um valor em torno de 30% de todos os casos recém-diagnosticados até quase 10% de todos esses casos (Cooperberg, 2004). A triagem anual com PSA é recomendada pela American Urological Association e pela American Cancer Society para todos os homens com mais de 50 anos de idade. Além disso, em virtude de sua especificidade tecidual, o ensaio do PSA é particularmente útil para monitorizar o sucesso de prostatectomia cirúrgica. A remoção completa da próstata deve resultar em níveis indetectáveis de PSA, enquanto a ressecção incompleta da glândula (sem doença persistente) pode culminar em níveis mensuráveis desse antígeno. No entanto,

o PSA deve permanecer inalterado em acompanhamento por tempo prolongado. Qualquer aumento no PSA mensurável após prostatectomia radical bem-sucedida indicaria recorrência ou metástase de câncer de próstata. É preciso notar a possível ocorrência de aumento transitório e modesto do PSA durante a realização de radioterapia, o que não deve ser erroneamente interpretado como evolução da doença.

Inúmeros estudos sugerem que mais de 80% (em alguns estudos, > 90%, p. ex., DeSoto-LaPaix, 2003) de pacientes com câncer de próstata são diagnosticados com essa condição a partir de níveis séricos do PSA acima de 4 ng/mL. Como a hiperplasia prostática benigna e a prostatite aguda também induzem a níveis séricos elevados de PSA, foi constatado que cerca da metade dos pacientes com valores acima de 4 ng/mL desse antígeno não apresentam câncer de próstata à biópsia, mesmo com níveis significativamente altos (i. e., superiores a 10 ng/mL). Esses estudos, portanto, sugerem que o PSA tem sensibilidade de, no mínimo, 80% e especificidade em torno de 50%. Contudo, também foi descoberto que por volta de 20% das biópsias a princípio negativas, quando repetidas em um período de 3 anos, ficam positivas (DeSoto-LaPaix, 2003). Dessa forma, a especificidade do PSA pode ser mais alta, admitindo-se que as biópsias negligenciaram alguma lesão maligna e que um novo processo maligno não ocorreu no período de 3 anos.

Por outro lado, o valor de corte de 4 ng/mL não distingue suficientemente os pacientes com e sem câncer de próstata, inclusive os casos agressivos (Schroder, 2000; Horninger, 2002; Punglia, 2003; Thompson, 2004). Em um estudo recente (Thompson, 2004), foi verificado que, em um grande grupo de mais de 1.000 pacientes acompanhados anualmente com níveis séricos de PSA e biópsias de próstata, acima de 25% tinham câncer de próstata, alguns deles com altos escores de Gleason, e níveis séricos de PSA abaixo de 4 ng/mL, muitos deles com níveis de PSA inferiores a 2 ng/mL. Esse resultado sugere que o uso do valor de corte de 4 ng/mL para o PSA limita a sensibilidade desse antígeno para cerca de 75%, o que chega perto do valor de 80% obtido em outros estudos. Esse estudo não conseguiu revelar se os valores de PSA no grupo de 25% com câncer de próstata comprovado por biópsia, mas negativo para o nível sérico de PSA, subiriam e, em caso afirmativo, em que intervalo de tempo. Ironicamente, conforme discussão prévia, as primeiras biópsias também falham na detecção do câncer de próstata em quase 20% das vezes. Na verdade, a repetição das biópsias é com frequência realizada em decorrência de valores elevados e crescentes de PSA.

Uma solução para o dilema de detectar a presença de câncer de próstata em pacientes, cujos níveis séricos de PSA são menores que 4 ng/mL, é trocar o corte para valores mais baixos (Punglia, 2003) e, de fato, muitos kits comerciais de teste do PSA disponíveis atualmente são capazes de detectar níveis séricos desse antígeno abaixo de 0,1 ng/mL. Infelizmente, isso não induz ao declínio substancial da especificidade do PSA, diminuindo com isso o valor preditivo positivo desse antígeno e a possibilidade de uso para a detecção dessa doença na triagem de pacientes.

Diversas abordagens foram desenvolvidas para aumentar a sensibilidade e a especificidade do PSA na detecção do câncer de próstata. Primeiro, conforme mencionado previamente, o uso do PSA sérico em combinação com EDR ou ultrassom transretal da próstata resulta em aumentos na sensibilidade e na especificidade (Catalona, 1991; Brawer, 1992). Além disso, as frações de PSA, ou seja, livre e ligada, são utilizadas para aumentar a sensibilidade e a especificidade do nível sérico elevado desse antígeno no diagnóstico de câncer de próstata.

PSA livre, PSA complexado e porcentagem de PSA livre

O PSA é capaz de se unir sob a forma de complexos com vários inibidores das proteases endógenas, incluindo α_1-antiquimotripsina (ACT) e α_2-macroglobulina (a qual se liga de forma covalente). Em consequência disso, o PSA sérico existe em grande escala (até 90% do PSA total) (Vessella, 1997) no soro, na forma de complexo, como PSA-ACT (PSA-α_1-antiquimotripsina) (Christensson, 1993).

Foi constatado que, em câncer de próstata, em geral há um aumento na concentração sérica de PSA ligado e uma diminuição correspondente no PSA não ligado ou livre (Parsons, 2004). Assim, foram desenvolvidos imunoensaios que quantificam o PSA ligado ou livre. Com base nesses ensaios, foi descoberto que a mensuração do PSA complexado (unido com ACT) por via direta não só elimina muitos problemas técnicos associados com os ensaios do PSA mas também melhora a diferenciação entre hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata (Wu 1994, 1998), aumentando com isso a especificidade do teste (Parsons, 2004). Por outro lado, a mensuração do PSA livre (PSAl) e o cálculo da porcentagem do PSAl (% do PSAl = [PSAl/PSA total] x100), que possui uma relação inversa com o risco de câncer de próstata (Polascik, 1999), é utilizada para ajudar a diferenciar a hiperplasia prostática benigna do câncer de próstata, aumentando também a especificidade do teste e reduzindo as biópsias desnecessárias em pacientes com esse tipo de hiperplasia. De maior importância, a relação de PSA livre melhora a especificidade de detecção do câncer de próstata em homens com níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL, diminuindo também as biópsias desnecessárias. Ademais, o PSA livre pode ser útil como indicador de morbidade do câncer de próstata (Polascik, 1999; Ito, 2003). Alguns estudos também revelaram que a porcentagem do PSAl pode ser usada para predizer o câncer de próstata em pacientes com PSA abaixo de 4 ng/mL (Djavan, 1999, Horninger, 2002). Uma advertência é que o PSA livre está sujeito à degradação rápida em temperaturas iguais ou superiores a 4°C. O intervalo de tempo recomendado desde a coleta da amostra até a realização do ensaio deve ser inferior a 3 horas e a amostra, armazenada e enviada a –70°C (Woodrum, 1996). De modo geral, o câncer de próstata está associado com altos níveis de PSA complexado e baixa porcentagem de PSAl (< 6%) (Catalona, 1995), mas relações mais altas de PSA livre (> 23%) costumam estar associadas com hiperplasia prostática benigna.

Existem vários ensaios para mensurar o PSA livre e complexado, dos quais alguns deles estão resumidos na Figura 74.3. Quando o PSA está ligado, certos determinantes antigênicos ficam "incrustados" pela proteína a qual se liga (sobretudo ACT). Obviamente, esses determinantes antigênicos ficam expostos no PSA livre, de modo que os anticorpos contra os determinantes "incrustados" do PSA complexado detectarão apenas o PSA livre. Por outro lado, alguns determinantes são expostos tanto no PSA livre quanto na forma complexada e podem ser detectados por anticorpos contra esses determinantes, permitindo a determinação do PSA total. Por fim, alguns anticorpos agem contra o determinante incrustado do PSA, assim como bloqueiam o determinante exposto comum. Esses anticorpos reagem somente com o PSA livre por se ligar ao determinante incrustado, mas também bloqueiam o sítio comum exposto. Atualmente, na presença desse anticorpo bloqueador, adiciona-se outro anticorpo que reage apenas com o determinante exposto comum. Os únicos determinantes expostos comuns encontram-se no PSA complexado. Assim, essa abordagem de anticorpos duplos, utilizando anticorpo de bloqueio e anticorpo de detecção, quantifica o nível de PSA complexado.

Tempo de duplicação, velocidade e densidade do PSA

O tempo requerido para que o valor de PSA dobre é conhecido como tempo de duplicação do PSA. Foi demonstrado que esse tempo de duplicação do PSA é capaz de predizer a recorrência após prostatectomia radical em pacientes com câncer de próstata independente de androgênios (Lee, 2003; Loberg, 2003).

A taxa de aumento do PSA com o passar do tempo, ou seja, a velocidade do PSA (Carter, 1992), corresponde à diferença do PSA dividida pelo número de anos. Foi comprovado que uma velocidade de PSA igual ou superior a 0,75 ng/ano é forte indicador de câncer com especificidade de 95% (Carter, 1992). Mais recentemente, demonstrou-se que a velocidade do PSA pode ser de grande utilidade para predizer o risco de câncer de próstata quando os níveis desse antígeno se encontram entre 2,0 e 4,0 ng/mL (Fang, 2002). Isso é em particular útil para predizer o risco de câncer e orientar a necessidade de biópsia da próstata em pacientes com valor de PSA baixo a normal (2,0 a 4,0 ng/mL). Em um estudo recente, foi evidenciado que os pacientes com velocidade do PSA pré-operatório acima de 2,0 ng/mL podem apresentar um risco relativamente alto de morte por câncer de próstata (D'Amico, 2004). Isso é um achado notável, pois o câncer de próstata provoca mortalidade significativa, embora um grande número de pacientes com esse tipo de câncer morra por outras causas. Embora esses estudos demonstrem um método de identificação das formas agressivas do câncer de próstata, há necessidade de estudos randomizados de coorte de maior escala para validar essas observações. A velocidade do PSA pré-operatório não é um bom parâmetro em termos de grau, estágio ou recorrência do câncer de próstata (Freedland, 2001).

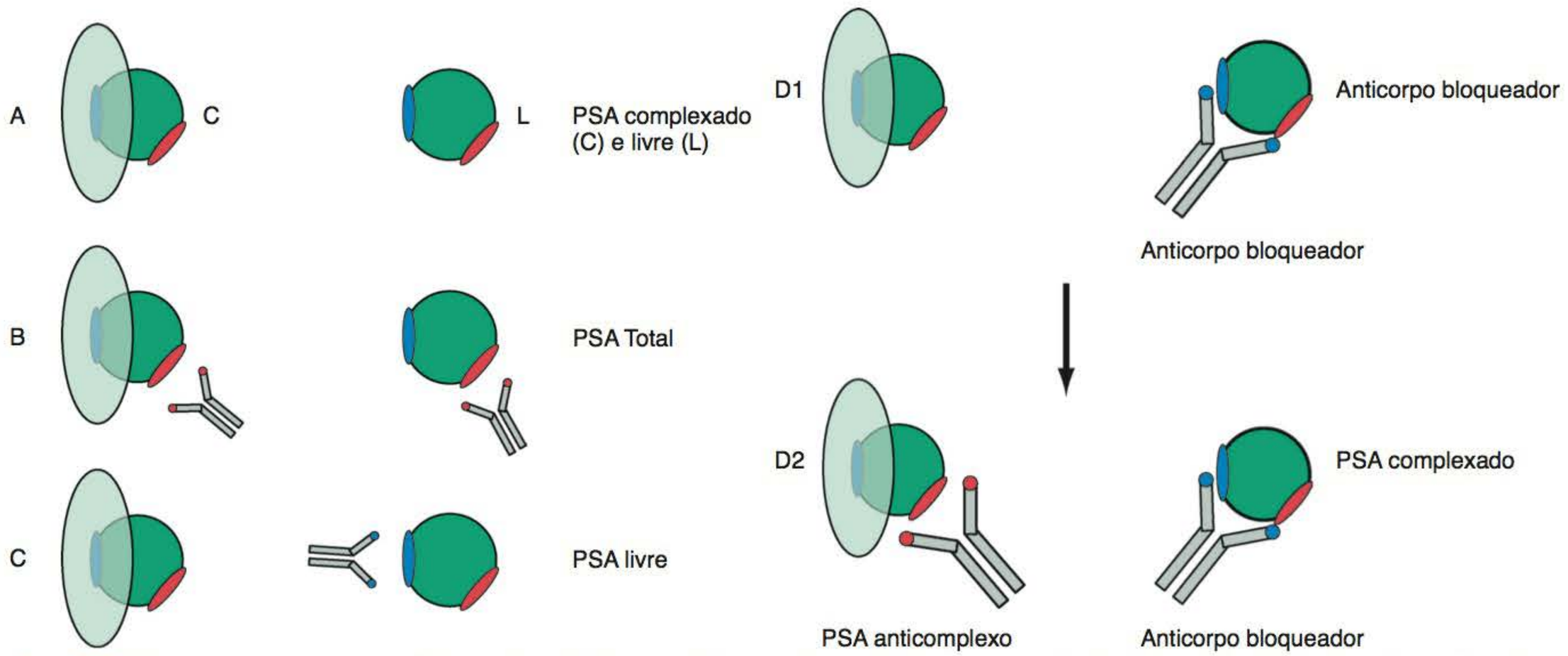


Figura 74.3 Três ensaios para o antígeno prostático-específico (PSA). Em A, está demonstrado que o PSA existe nos estados livre (L) e complexado (C). Alguns de seus determinantes antigênicos (em azul na figura) estão incrustados no estado complexado. Esses determinantes estão expostos no estado livre. Por outro lado, conforme ilustrado em B, há determinantes comuns (de cor vermelha na figura) que ficam expostos tanto no PSA complexado quanto na forma livre. Anticorpos contra esses determinantes comuns detectarão o PSA total (formas livre + complexada). Como os determinantes de cor azul são expostos apenas no PSA livre, conforme demonstrado em C, os anticorpos contra esses determinantes detectarão apenas a forma livre desse antígeno. Por fim, conforme exibido em D1, foram desenvolvidos anticorpos contra o determinante de cor azul do PSA livre, que também bloqueiam o determinante de cor vermelha. Dessa forma, os anticorpos contra o determinante de cor vermelha, que é comum tanto para o PSA livre quanto para aquele complexado, reagirão apenas com o PSA complexado, conforme indicado em D2. Essa é a base do ensaio da Bayer para detecção de PSA complexado.

A densidade do PSA é uma medida da relação do PSA total com o volume da glândula prostática, conforme mensurado pela ultrassonografia transuretral; densidades do PSA superiores a 0,15 indicam uma probabilidade elevada de câncer de próstata, exatamente o oposto à hiperplasia prostática benigna (Polascik, 1999).

O PSA, portanto, é um biomarcador útil para câncer de próstata e pode se tornar ainda mais útil em termos diagnósticos, empregando-o em conjunto com outros métodos, como EDR, e quantificando suas frações (forma complexada e livre).

Teste de sangue oculto e marcadores proteicos mutantes nas fezes

Talvez o teste mais familiar para triagem de câncer em pacientes seja o de sangue oculto nas fezes, realizado no consultório médico em amostras fecais obtidas pelo exame digital do reto (EDR). Esse teste é efetuado com certa frequência como parte dos check-ups anuais na maioria dos pacientes. No ambiente ambulatorial hospitalar, é mais comum o paciente obter uma amostra fecal para execução do teste após evacuação. É lógico que a ideia é a de que, se o sangue for descoberto nas fezes, pode ser que a presença de tumor colônico seja a causa e, nesse caso, a realização de mais exames, como colonoscopia, é fortemente recomendada. O teste para pesquisa de sangue oculto nas fezes baseia-se na capacidade de a porção heme da hemoglobina catalisar a oxidação do ácido guaiacônico composto incolor (daí o nome, teste de guáiaco) na presença de H_2O_2 em uma quinona azul altamente conjugada. Em geral, o ácido guaiacônico é impregnado em uma fita ou suporte sólido, e a amostra fecal, colocada sobre uma pequena parte dessa fita. É evidente que esse método é um teste inespecífico, pois o sangue nas fezes pode ser provocado por uma série de causas não malignas, tais como hemorroidas, colite, diverticulite e traumatismo local à região perianal, diminuindo a especificidade desse teste. Resultados falso-positivos para esse teste também são causados por fatores exógenos, como fibras de carne provenientes da ingestão desse ingrediente e bismuto presente nas preparações de antiácidos, como Pepto-Bismol. Além disso, a capacidade desse método de detectar a presença de câncer de cólon depende de alguns fatores, como a existência e o grau de hemorragia advinda do câncer, a localização do câncer (quanto mais próximo ao reto, maior a probabilidade de detecção) e o padrão de crescimento (p. ex., é mais provável que tumores exofíticos sejam detectados do que os não exofíticos). A sensibilidade do teste de sangue oculto nas fezes está entre 15 e 30%. Esse teste é muito menos eficaz que a colonoscopia, o método definitivo de detecção do câncer de cólon. Contudo, a pesquisa de sangue oculto nas fezes oferece a vantagem de não ser um método invasivo; porém, essa vantagem é reduzida com a "colonoscopia virtual" baseada na varredura do cólon por tomografia computadorizada (TC).

Em consequência disso, há um esforço para criar testes não invasivos nas amostras fecais — testes estes que tenham maior sensibilidade e especificidade do que a pesquisa de sangue oculto nas fezes. Conforme será discutido no capítulo seguinte, vários genes mutantes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular foram muito implicados como fatores causais vitalmente relevantes do câncer de cólon. Esses genes incluem o gene ras mutante (estrutura do Kirsten ou variedade-K), o gene *p53* mutante, o gene da polipose adenomatosa do colo (*APC*) e o produto gênico BAT-26, associados com a instabilidade de microssatélites. Todos esses genes mutantes são oncogenes no câncer de cólon. As técnicas padronizadas da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), discutidas na Seção VIII, estão disponíveis para detectar mutações em qualquer uma ou em todas essas proteínas. Além disso, também foi constatado que o DNA "longo", supostamente resultante de apoptose desordenada das células cancerígenas em câncer de cólon, ocorre em uma série de cânceres desse segmento intestinal. Se uma quantidade suficiente de células cancerígenas do câncer de cólon se desprender para o lúmen, um ou mais dos genes mutantes mencionados anteriormente (e/ou o DNA longo) podem ser descobertos, possibilitando a detecção não invasiva desse tipo de câncer.

Utilizando essa abordagem, um estudo cooperativo envolvendo o *Colorectal Cancer Study Group* foi recentemente concluído; nesse estudo, foram inscritos mais de 5.000 pacientes, porém mais de 2.000 foram submetidos à avaliação completa quanto à presença de câncer de cólon, utilizando teste de sangue oculto nas fezes, pesquisa de múltiplos oncogenes nas fezes e colonoscopia (Imperiale, 2004). Todos os pacientes tinham 50 anos de idade ou mais (média 69,5 anos). Os resultados revelaram que a metodologia genética à base de RT-PCR resulta em taxas significativamente mais altas de detecção do que o teste de sangue oculto nas fezes. Em geral, a taxa de detecção de adenocarcinoma foi de 51,6% para a triagem genética e de 12,9% para a triagem por sangue oculto nas fezes. De modo interessante, foram detectados adenomas avançados em 15,1% dos casos na triagem genética e 10,7% na triagem por sangue oculto nas fezes. Como essa condição pode ser considerada um precursor de malignidade franca, ambos os métodos parecem ter taxas similares de detecção precoce.

Por outro lado, a taxa de detecção do câncer de cólon em estágio I segundo o sistema de estadiamento TNM (*Tumor-Node-Metastasis*, tumor-linfonodo-metástase) por triagem genética foi de 53,3%, e de 6,7% para triagem por sangue oculto nas fezes, sugerindo que o primeiro método é substancialmente mais eficaz na detecção de câncer colônico real em seus estágios precoces. De modo surpreendente, foi descoberto que ambos os testes possuem taxas de falsa positividade aparentes similares em condições de pólipos menores (7,6 *vs.* 4,8% para teste genético e teste de sangue oculto nas fezes, respectivamente) e a condição de ausência de pólipos à colonoscopia (5,6 *vs.* 4,8% para teste genético e teste de sangue oculto nas fezes, respectivamente). Embora esse estudo tenha certas desvatangens, como um número muito pequeno de pacientes com cânceres e adenomas avançados com displasia de alto grau, desvio da idade da população até 65 anos de idade ou mais e falta de informações a respeito dos intervalos apropriados de teste para a abordagem genética, esses resultados são animadores e justificam a realização de mais estudos sistemáticos utilizando essa abordagem.

Considerações finais e perspectivas futuras

Em suma, uma molécula, quase sempre uma proteína, pode ser utilizada como marcador tumoral, contanto que a alteração de sua concentração reflita atividade da célula tumoral. A avaliação da utilidade clínica de cada marcador tumoral baseia-se em sua sensibilidade e especificidade. Há uma clara tendência para melhorar a especificidade e a sensibilidade do teste por meio da solicitação de múltiplos marcadores tumorais. Contudo, há controvérsias a respeito de qual e como muitos marcadores tumorais devem ser incluídos em um painel de doenças malignas. Vários marcadores tumorais novos, abordados nos capítulos subsequentes, estão surgindo no horizonte. Esses marcadores tumorais consistem em oncoproteínas, proteínas supressoras, moléculas de adesão, ciclinas e fatores angiogênicos. Tais marcadores diferem, sobretudo, dos marcadores tumorais utilizados atualmente em sua associação com vias metabólicas conhecidas específicas ou reações fisiológicas. A maioria dos marcadores tumorais empregados hoje em dia para o tratamento de pacientes não é associada com qualquer reação biológica específica conhecida. Dentro do possível, a mensuração desses novos marcadores tumorais fornecerá informações sobre defeitos mais específicos, que ajudarão no planejamento de terapias mais eficientes. O melhor exemplo é o uso bem-sucedido de Herceptin (um AcM humanizado contra o ectodomínio do receptor c-*erb*B-2) em pacientes com câncer de mama metastático.

Genômica e proteômica sorológica como potenciais biomarcadores de câncer

A tecnologia atual abriu novas diretrizes na busca de marcadores séricos adequados para triagem, diagnóstico e prognóstico precoces do câncer, bem como para monitorização da resposta terapêutica. Esse campo ativo consiste na aplicação da geômica e proteômica modernas, bem como de técnicas moleculares mais recentes, na detecção de ácido nucleico circulante (DNA e RNA) e células tumorais. A determinação do perfil de marcador sorológico com genoma e proteoma (Johann, 2004; Petricoin, 2004; Rai, 2004) é uma área de pesquisa muito promissora. Esses avanços recentes estão descritos no Capítulo 75.

Ácidos nucleicos circulantes na detecção de câncer

Foram desenvolvidas muitas técnicas para a detecção de ácidos nucleicos circulantes anormais (DNA/RNA) em pacientes com câncer. Entre elas, a técnica de PCR-SSCP é utilizada para detectar mutações do DNA sérico, enquanto a análise de microssatélites fluorescentes é empregada para detectar perda de heterozigosidade. A análise de microssatélites fluorescentes é usada com frequência para identificar desequilíbrio de alelos e perda de heterozigosidade como marcador sorológico do carcinoma urotelial (von Knobloch, 2004) ao nível molecular. Esses métodos podem vir a ser úteis se a especificidade e a sensibilidade forem avaliadas em grandes coortes de pacientes. No capítulo a seguir, podem ser encontrados detalhes sobre o proteoma sérico.

Proteômica sorológica na detecção de câncer

A tecnologia proteômica representa uma combinação de espectrometria de massa e bioinformática de última geração. Essa tecnologia envolve ionização por dessorção a laser realçada por superfície com chip de proteína (SELDI, *surface-enhanced laser desorption ionization*) e ionização por dessorção a *laser* assistida por matriz, seguidas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo. O uso final dessas técnicas desafiadoras será determinado em ensaios clínicos futuros.

Células tumorais circulantes no sangue periférico

O maior obstáculo para detectar células cancerígenas circulantes no sangue periférico é sua escassez, resultando na dificuldade de coleta e detecção de células tumorais. Novos métodos de coleta celular (p. ex., separação de células com pérolas imunomagnéticas [MACS, *magnetic-activated cell sorting*] e separação celular assistida por fluxo [FACS, *fluorescence-activated cell sorting*]), bem como técnicas de detecção (p. ex., microscopia fluorescência, citometria de fluxo, RT-PCR e PCR para DNA metilado), despertaram essa área de pesquisa (Molnar, 2003). Em um único estudo, foram detectadas células cancerígenas prostáticas circulantes positivas para Her2/*neu* em 6 de 11 (54%) dos casos metastáticos e apenas 3 de 31 (9,6%) dos pacientes com câncer de próstata localizado (Ady, 2004). A presença de células tumorais no sangue periférico está relacionada à recorrência ou recidiva do quadro. Como a ocorrência de metástase hematológica é característica de um número significativo de carcinomas, o aumento de células tumorais no sangue periférico indica metástase ou sensibilidade à quimioterapia.

Referências bibliográficas

Ady N, Morat L, Fizazi K, et al: Detection of HER-2/neu-positive circulating epithelial cells in prostate cancer patients. Br J Cancer 2004; 90:443–448.

Agus DB, Bunn PA Jr, Franklin W, et al: HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer.' Semin Oncol 2000; 27(Suppl 11):53–63.

Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, et al: Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. Am J Gastroenterol 2003; 98:478–485.

Alvarez Secord A, Sayer R, Snyder SA, et al: The relationship between serum vascular endothelial growth factor, persistent disease, and survival at second-look laparotomy in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2004; 94:74–79.

Ando S, Kimura H, Iwai N, et al: Positive reactions for both Cyfra21-1 and CA125 indicate worst prognosis in non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2003; 23:2869–74.

Barbacid, M: *ras* genes. Annu Rev Biochem 1987; 56:779–827.

Bast RC Jr, Knauf S, Epenetos A, et al: Coordinate elevation of serum markers in ovarian cancer but not in benign disease. Cancer 1991; 68:1758–1763.

Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2001; 19:1865–1878.

Benson MC, Whang IS, Pantuck A, et al: Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. J Urol 1992; 147:815–816.

Berger P, Sturgeon C, Bidart JM, et al: The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives. Tumour Biol 2002; 23:1–38.

Bethune-Volters A, Labroquere M, Guepratte S, et al: Longitudinal changes in serum HER-2/neu oncoprotein levels in trastuzumab-treated metastatic breast cancer patients. Anticancer Res 2004; 24:1083–1089.

Birken S, Yershova O, Myers RV, Bernard MP, et al:. Analysis of human choriogonadotropin core 2 o-glycan isoforms. Mol Cell Endocrinol 2003; 204:21–30.

Brawer MK, Chetner MP, Beatie , et al: Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. J Urol 1992; 147:841–845.

Bristow A, Berger P, Bidart JM, et al: Establishment, value assignment, and characterization of new WHO reference reagents for six molecular forms of human chorionic gonadotropin. Clin Chem 2005; 51:177–182.

Burtis WJ, Brady TG, Orloff JJ, et al: Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. N Engl J Med 1990; 322:1106–1112.

Canizares F, Sola J, Perez M, et al: Preoperative values of CA 15-3 and CEA as prognostic factors in breast cancer: a multivariate analysis. Tumour Biol 2001; 22:273–281.

Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, et al: CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. Anticancer Res 2002; 22:2311–2316.

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ , et al: Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. JAMA 1992; 267:2215–2220.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al: Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N Engl J Med 1991; 324:1156–1161.

Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, et al: Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. JAMA 1995; 274:1214–1220.

Chan DW, Sell S: Tumor Markers. Philadelphia, PA, WB Saunders, 2001.

Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al: Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urol 1993; 150:100–105.

Coley CM, Barry MJ, Fleming C, et al: Early detection of prostate cancer. Part II: Estimating the risks, benefits, and costs. American College of Physicians. Ann Intern Med 1997a; 126:468–479.

Coley CM, Barry MJ, Fleming C, Mulley AG: Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests. American College of Physicians. Ann Intern Med 1997b; 126:394–406.

Colomer R, Montero S, Lluch A, et al: Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2000; 6:2356–2362.

Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP: American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. Cancer 2000; 88:1739–1757.

Cooperberg MR, Broering JM, Litwin MS, et al: The contemporary management of prostate cancer in the United States: lessons from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor (CapSURE), a national disease registry. J Urol 2004; 171:1393–1401.

Cuckle H: Biochemical screening for Down syndrome. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 92:97–101.

D'Amico AV, Chen MH, Roehl KA, Catalona WJ: Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. N Engl J Med 2004; 351:125–135.

De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, et al: Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. Cancer 2004; 100:270–278.

Diamond BA, Yelton DE, Scharff MD, et al: Monoclonal antibodies. A new technique for producing serologic reagents. N Engl J Med 1981; 304:1344–1349.

Djavan B, Zlotta A, Kratzik C, Remzi M, et al: PSA, PSA density, PSA density of transition zone, free/total PSA ratio, and PSA velocity for early detection of prostate cancer in men with serum PSA 2.5 to 4.0 ng/mL. Urology 1999; 54:517–522.

O uso do PSA mudou o tratamento de pacientes com câncer de próstata. Esta referência apontou um dilema utilizando o valor de corte atual do PSA e resume vários parâmetros do PSA para aumentar a especificidade desse antígeno.

Duffy MJ, Duggan C, Keane R, et al: High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node--negative and node-positive breast cancer: study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. Clin Chem 2004; 50:559–563.

Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP: Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 1993; 52:678–701.

Fang J, Metter EJ, Landis P, Carter HB: PSA velocity for assessing prostate cancer risk in men with PSA levels between 2.0 and 4.0 ng/ml. Urology 2002; 59:889–893.

Ferrero-Pous M, Hersant AM, Pecking A, et al: Serum chromogranin-A in advanced prostate cancer. BJU Int 2001; 88:790–796.

Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. J Biol Chem 1992; 267:10931–10934.

Freedland SJ, Dorey F, Aronson WJ: Preoperative PSA velocity and doubling time do not predict adverse pathologic features or biochemical recurrence after radical prostatectomy. Urology 2001; 57:476–480.

Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, et al: BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science 1994; 266:120–122.

Gaspar MJ, Arribas I, Coca MC, Diez-Alonso M: Prognostic value of carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. Tumour Biol 2001; 22:318–322.

Gebo KA, Chander G, Jenckes MW, et al: Screening tests for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: a systematic review. Hepatology 2002; 36(Suppl 1): S84–S92.

Gion M, Boracchi P, Dittadi R, et al: Prognostic role of serum CA15.3 in 362 node-negative breast cancers. An old player for a new game. Eur J Cancer 2002; 38:1181–1188.

Giovanella L, Ceriani L: Serum chromogranin-alpha immunoradiometric assay in the diagnosis of pheochromocytoma. Int J Biol Markers 2002; 17:130–134.

Granato AM, Nanni O, Falcini F, et al: Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? Breast Cancer Res 2004; 6:R38–R45.

Guinee DG Jr, Travis WD, Trivers GE, et al: Gender comparisons in human lung cancer: analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and C-erbB-2 expression. Carcinogenesis 1995; 16:993–1002.

Haferlach T, Loffler H: Prognostic factors in multiple myeloma: practicability for clinical practice and future perspectives. Leukemia 1997; 11(Suppl 5):S5–S9.

Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette MT, et al: Correlations between p53-protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. Int J Cancer 1999; 81:712–718.

Harlozinska A, Sedlaczek P, Kulpa J, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration in sera and tumor effusions from patients with ovarian carcinoma. Anticancer Res 2004: 24:1149–1157.

Harris CC, Hollstein M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 1993; 329:1318–1327.

Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, et al: Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. J Clin Oncol 2001; 19:1698–1706.

Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, et al: Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662. Clin Cancer Res 2001; 7:2703–2711.

Esta referência fornece provas de que o HER2/neu sérico pode ser útil no prognóstico e na monitorização do tratamento de pacientes com câncer de mama.

Horninger W, Cheli CD, Babaian RJ, et al: Complexed prostate-specific antigen for early detection of prostate cancer in men with serum prostate-specific antigen levels of 2 to 4 nanograms per milliliter. Urology 2002; 60(Suppl 1):31–35.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al; Colorectal Cancer Study Group: Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. N Engl J Med 2004; 351:2704–2714.

Isshiki S, Akakura K, Komiya A, et al: Chromogranin a concentration as a serum marker to predict prognosis after endocrine therapy for prostate cancer. J Urol 2002; 167:512–515.

Ito K, Yamamoto T, Ohi M, et al: Free/total PSA ratio is a powerful predictor of future prostate cancer morbidity in men with initial PSA levels of 4.1 to 10.0 ng/mL. Urology 2003: 61:760–764.

Izzo F, Cremona F, Ruffolo F, et al: Outcome of 67 patients with hepatocellular cancer detected during screening of 1125 patients with chronic hepatitis. Ann Surg 1998; 227:513–518.

Jacobs I, Bast RC Jr: The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. Hum Reprod 1989; 4:1–12.

Jacobs IJ, Menon U: Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. Mol Cell Proteomics 2004; 3:355–366.

Jensen EV, Jordan VC: The estrogen receptor: a model for molecular medicine. Clin Cancer Res 2003; 9:1980–1989.

Johann DJ Jr, McGuigan MD, Patel AR, et al: Clinical proteomics and biomarker discovery. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022:295–305.

Klee GG, Schreiber WE: MUC1 gene-derived glycoprotein assays for monitoring breast cancer (CA 15-3, CA 27.29, BR): are they measuring the same antigen? Arch Pathol Lab Med 2004; 128:1131–1135.

Kumpulainen EJ, Keskikuru RJ, Johansson RT: Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; 76:95–102.

Kuropkat C, Lippert BM, Werner JA: Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. Oncology 2002; 63:280–285.

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al: Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc 2003; 78:21–33.

Lamerz R: AFP isoforms and their clinical significance (overview). Anticancer Res 1997; 17:2927–2930.

Lee D: Prostate-specific antigen doubling time predicts disease progression and survival. Clin Prostate Cancer 2003; 1:208–211.

Lee P, Rosen DG, Zhu C, Silva EG, et al: Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2005; 96:671–677.

Li L, Wang L, Zhang W, et al: Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. Anticancer Res 2004; 24:1973–1979.

Liotta LA: Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastases. Clin Physiol Biochem 1987; 5:190–199.

Lipton A, Ali SM, Leitzel K, et al: Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002; 20:1467–1472.

Esta referência fornece provas de que o HER2/neu sérico pode ser útil no prognóstico e na monitorização do tratamento de pacientes com câncer de mama.

Littrup PJ, Goodman AC, Mettlin CJ: The benefit and cost of prostate cancer early detection. The Investigators of the American Cancer Society–National Prostate Cancer Detection Project. CA Cancer J Clin 1993; 43:134–149.

Ljungberg B, Jacobsen J, Haggstrom-Rudolfssson S, et al: Tumour vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progression in human renal cell carcinoma. Urol Res 2003; 31:335–340.

Loberg RD, Fielhauer JR, Pienta BA, et al: Prostate-specific antigen doubling time and survival in patients with advanced metastatic prostate cancer. Urology 2003; 62(Suppl 1):128–133.

Louhimo J, Carpelan-Holmstrom M, Alfthan H, et al: Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. Int J Cancer 2002; 101:545–548.

Lu KH, Patterson AP, Wang L, et al: Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. Clin Cancer Res 2004; 10:3291–3300.

Luftner D, Henschke P, Flath B, et al: Serum HER-2/neu as a prediction and monitoring parameter in a phase II study with weekly paclitaxel in metastatic breast cancer. Anticancer Res 2004; 24:895–906.

Ma PC, Blaszkowsky L, Bharti A, et al: Circulating tumor cells and serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. Anticancer Res 2003; 23:49–62.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 1990; 250:1233–1238.

Marrelli D, Pinto E, De Stefano A, et al: Clinical utility of CEA, CA 19-9, and CA 72-4 in the follow-up of patients with resectable gastric cancer. Am J Surg 2001; 181:16–19.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266: 66–71.

Milstein C, Cuello AC: Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. Nature 1983; 305:537–540.

Mitchell EP: Role of carcinoembryonic antigen in the management of advanced colorectal cancer. Semin Oncol 1998; 25(Suppl 11): 12–20.

Molnar B, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z: Molecular detection of circulating cancer cells. Role in diagnosis, prognosis and follow-up of colon cancer patients. Dig Dis 2003; 21:320–325.

Morelli D, Lazzerini D, Cazzaniga S, et al: Evaluation of the balance between angiogenic and antiangiogenic circulating factors in patients with breast and gastrointestinal cancers. Clin Cancer Res 1998; 4:1221-1225.

Munstedt K, Steen J, Knauf AG, et al: Steroid hormone receptors and long term survival in invasive ovarian cancer. Cancer 2000; 89:1783–1791.

Nahm MH, Hoffmann JW: Heteroantibody: phantom of the immunoassay. Clin Chem 1990; 36:829.

Nakata B, Ogawa Y, Ishikawa T, et al: Serum CYFRA 21-1 is one of the most reliable tumor markers for breast carcinoma. Cancer 2000; 89:1285–1290.

Nakata B, Takashima T, Ogawa Y, et al: Serum CYFRA 21-1 (cytokeratin-19 fragments) is a useful tumour marker for detecting disease relapse and assessing treatment efficacy in breast cancer. Br J Cancer 2004; 91:873–878.

O'Hanlon DM, Fitzsimons H, Lynch J, et al: Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma. Eur J Cancer 2002; 38:2252–2257.

Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, et al: A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. Cancer Res 1980; 40:2428–2432.

Parsons JK, Brawer MK, Cheli CD, et al: Complexed prostate specific antigen (PSA) reduces unnecessary prostate biopsies in the 2.6–4.0 ng/mL range of total PSA. BJU Int 2004; 94:47–50.

Petricoin EF, Ornstein DK, Liotta LA: Clinical proteomics: applications for prostate cancer biomarker discovery and detection. Urol Oncol 2004; 22:322–328.

Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW: Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. J Urol 1999; 162:293–306.

Poon RT, Lau CP, Cheung ST, et al: Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2003; 63:3121–3126.

Punglia RS, D'Amico AV, Catalona WJ, et al: Effect of verification bias on screening for prostate cancer by measurement of prostate-specific antigen. N Engl J Med 2003; 349:335–342.

Rai AJ, Chan DW: Cancer proteomics: serum diagnostics for tumor marker discovery. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022: 286–294.

Esta referência serve como exemplo e resumo da identificação de biomarcadores utilizando a tecnologia atual do proteoma sérico e será a tendência dos biomarcadores futuros.

Saghatchian M, Guepratte S, Hacene K, et al: Serum HER-2 extracellular domain: relationship with clinicobiological presentation and prognostic value before and after primary treatment in 701 breast cancer patients. Int J Biol Markers 2004; 19:14–22.

Esta referência fornece provas de que o HER2/neu sérico pode ser útil no prognóstico e na monitorização do tratamento de pacientes com câncer de mama.

Sangrajrang S, Arpornwirat W, Cheirsilpa A, et al: Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. Cancer Detect Prev 2003; 27: 182–186.

Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, et al: The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. Cancer Res 1992; 52:6380–6384.

Schneider J, Philipp M, Velcovs.ky HG, et al: Pro-gastrin--releasing peptide (ProGRP), neuron specific enolase (NSE), carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19-fragments (CYFRA 21-1) in patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. Anticancer Res 2003; 23:885–893.

Schroder FH, van der Cruijsen-Koeter I, de Koning HJ, et al: Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. J Urol 2000; 163:806–812.

Sciarra A, Monti S, Gentile V, et al: Variation in chromogranin A serum levels during intermittent versus continuous androgen deprivation therapy for prostate adenocarcinoma. Prostate 2003; 55:168–179.

Sheen-Chen SM, Eng HL, Huang CC, Chen WJ: Serum levels of soluble E-selectin in women with breast cancer. Br J Surg 2004; 91:1578–1581

Smith TJ, Davidson NE, Schapira DV, et al: American Society of Clinical Oncology 1998 update of recommended breast cancer surveillance guidelines. J Clin Oncol 1999; 17:1080–1082.

Soussi T: p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. Cancer Res 2000; 60:1777–1788.

Soussi T, Beroud C: Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. Nat Rev Cancer 2001; 1:233–240.

Syrigos KN, Salgami E, Karayiannakis AJ, et al: Prognostic significance of soluble adhesion molecules in Hodgkin's disease. Anticancer Res 2004; 24:1243–1247.

Tarle M, Ahel MZ, Kovacic K: Acquired neuroendocrine--positivity during maximal androgen blockade in prostate cancer patients. Anticancer Res 2002; 22:2525–2529.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al: Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med 2004; 350:2239–2246.

Tondini C, Hayes DF, Gelman R, et al: Comparison of CA15-3 and carcinoembryonic antigen in monitoring the clinical course of patients with metastatic breast cancer. Cancer Res 1988; 48:4107–4112.

Vessella RL, Lange PH: Issues in the assessment of prostate-specific antigen immunoassays. An update. Urol Clin North Am 1997; 24:261–268.

Von Eyben FE: Laboratory markers and germ cell tumors. Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40:377–427.

Von Knobloch R, Brandt H, Hofmann R: Molecular serological diagnosis in transitional cell bladder cancer. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022:70–75.

Wilmanns C, Grossmann J, Steinhauer S, et al: Soluble serum E-cadherin as a marker of tumour progression in colorectal cancer patients. Clin Exp Metastasis 2004; 21:75–78.

Woodrum D, French C, Shamel LB: Stability of free prostate-specific antigen in serum samples under a variety of sample collection and sample storage conditions. Urology 1996; 48(Suppl):33–39.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12–13. Science 1994; 265:2088–2090.

Wu JT: Expression of monoclonal antibody-defined tumor markers in four carcinomas. Ann Clin Lab Sci 1989; 19:17–26.

Wu JT: Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. Ann Clin Lab Sci 1990; 20:98–105.

Wu JT: Assay for prostate specific antigen (PSA): problems and possible solutions. J Clin Lab Anal 1994; 8:51–62.

Wu JT, Carlisle P: Low frequency and low level of elevation of serum CA 72-4 in human carcinomas in comparison with established tumor markers. J Clin Lab Anal 1992; 6:59–64.

Wu JT, Clayton F, Myers S, Knight J: A simple radial immunodiffusion method for assay of β 2-microglobulin in serum. Clin Chem 1986; 32:2070–2073.

Wu JT, Erickson AJ, Tsao KC, et al: Elevated serum chromogranin A is detectable in patients with carcinomas at advanced disease stages. Ann Clin Lab Sci 2000; 30:175–178.

Wu JT, Liu GH: Advantages of replacing the total PSA assay with the assay for PSA-alpha 1-antichymotrypsin complex for the screening and management of prostate cancer. J Clin Lab Anal 1998; 12:32–40.

Xiao WB, Liu YL: Elevation of serum and ascites cancer antigen 125 levels in patients with liver cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18:1315–1316.

Yamamoto H, Lambert-Messerlian GM, Silver HM, et al: Maternal serum levels of type I and type III procollagen peptides in pre-eclamptic pregnancy. J Matern Fetal Med 2001; 10:40–43.

Yu YH, Schlossman DM, Harrison CL, et al: Coexpression of different antigenic markers on moieties that bear CA 125 determinants. Cancer Res 1991; 51:468–475.

Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, et al: Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. Cancer Res 2004; 64:5882–5890.

Esta referência serve como exemplo e resumo da identificação de biomarcadores utilizando a tecnologia atual do proteoma sérico e será a tendência dos biomarcadores futuros.

Zidan J, Hussein O, Basher W, Zohar S: Serum CA125: a tumor marker for monitoring response to treatment and follow-up in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Oncologist 2004; 9:417–421.

CAPÍTULO 75

Oncoproteínas e detecção precoce de tumor

Matthew R. Pincus MD PhD, Paul W. Brandt-Rauf MD PhD DPH,
Martin H. Bluth MD PhD

Biologia celular e mitogênese 1549
Vias de transdução de sinal 1550
Oncoproteínas na detecção de tumor 1550
Fatores de crescimento 1551
Fatores transformadores do crescimento α e β 1551
Fator de crescimento derivado de plaquetas 1551
Fator de crescimento de fibroblasto básico 1552
Fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento de hepatócitos 1552
Receptores do fator de crescimento 1552
Receptor do fator de crescimento epidérmico 1553
Receptor HER-2/*neu* 1553
Proteínas G 1554
Quinases mitogênicas citosólicas: raf 1555
Oncoproteínas nucleares 1555
Proteínas p53 e c-*myc* 1555
Detecção de malignidades por análise da proteína p53 1555
Anticorpos anti-p53 circulantes na detecção de tumor 1556
Proteína codificada pelo oncogene *myc* na detecção de tumor 1556
Anticorpos séricos antiproteína *c-myc* na detecção de tumor 1556
Proteínas da matriz nuclear – detecção de câncer de bexiga 1557
Uso de múltiplos marcadores oncoproteicos no diagnóstico de câncer 1557
Análise de múltiplas oncoproteínas em pacientes sob risco de desenvolvimento tumoral 1557
Arranjos de oncoproteínas como ferramentas promissoras na detecção de anticorpos antioncoproteínas no soro de pacientes 1557
Abordagens proteômicas para detecção precoce de câncer no soro 1558
Detecção de oncogenes no soro e em outros líquidos corporais 1558
Teste de ácido nucleico livre de células no câncer 1558
Arranjos genéticos utilizados na detecção de anormalidades de oncoproteínas 1559
Teste de DNA celular para câncer utilizando hibridização *in situ* por fluorescência 1559
Avaliação e considerações finais 1560
Eficácia diagnóstica de oncoproteínas séricas 1560
Origens de processos malignos 1560
Tamanho do tumor e níveis de oncoproteínas 1561
Referências bibliográficas 1562

PONTOS-CHAVE

- Como resultado do vasto progresso obtido muito recentemente no sequenciamento de todo o genoma humano e no esclarecimento das vias envolvidas na tumorigênese, ficou claro que o mau funcionamento de proteínas mutantes é a principal causa de cânceres em seres humanos.
- Essas proteínas – fatores de crescimento, receptores dos fatores de crescimento, proteínas G como $p21^{ras}$, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e proteínas nucleares como Myc, Fos, Jun e p53 – são críticas nas vias de transdução de sinal, cujos sinais de proliferação provenientes dos fatores de crescimento na membrana celular são transduzidos até o núcleo e estimulam a divisão celular.
- As mutações nessas proteínas resultam em substituições ou deleções de aminoácidos, que as tornam permanentemente ativadas. As mutações nos domínios reguladores dos genes responsáveis pela codificação dessas proteínas podem resultar em superexpressão proteica, o que também pode culminar em sinalização mitogênica contínua.
- Essas proteínas e os anticorpos que as combatem podem ser utilizados para se detectar a presença de cânceres em estágios precoces e até mesmo predizer a ocorrência futura dessa doença nos pacientes.
- A detecção dessas proteínas mutadas podem ser prontamente alcançada por meio de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), de *Western blotting*, e de espectroscopia de massa.
- Isso tem dado origem a todo um novo campo da proteômica, isto é, na detecção dessas proteínas e do DNA que as codifica, no sangue e em outros fluidos corporais de pacientes.
- Embora as proteínas mutadas de transdução de sinal estejam envolvidas em muitos cânceres humanos diferentes, parece haver padrões de expressão de proteínas mutadas que tipificam cânceres específicos.

Como resultado do vasto progresso obtido muito recentemente no sequenciamento de todo o genoma humano e no esclarecimento das vias envolvidas na tumorigênese, ficou claro que o mau funcionamento de proteínas mutantes é a principal causa de cânceres em seres humanos. Isso deu origem a um novo campo da tecnologia proteômica, ou seja, a detecção dessas proteínas aberrantes no sangue e em outros líquidos corporais dos pacientes. O presente capítulo explica essas novas abordagens e enfatiza que muitas dessas proteínas aberrantes estão, na verdade, envolvidas na transmissão de sinais de proliferação nas vias de transdução de sinal, das quais as mais proeminentes foram abordadas. Os principais objetivos deste capítulo são explicar nossa compreensão sobre as vias de transdução de sinal na proliferação celular; como diferentes proteínas mutantes nessas vias podem causar sinalização anormal de proliferação contínua, que levam à transformação celular; como essas proteínas e seus anticorpos podem ser utilizados para detectar a presença de cânceres e até mesmo predizer a ocorrência futura da doença nos pacientes; e refletir sobre como essas novas proteínas fortemente associadas a diferentes tipos de câncer foram descobertas e podem ser utilizadas para a detecção desses cânceres em estágios precoces.

Biologia celular e mitogênese

O controle do processo de divisão celular em células eucarióticas, especialmente nas formas superiores de vida, é vital para os processos de proliferação e diferenciação celular. O delicado equilíbrio entre esses dois processos é regulado por inúmeras proteínas que interagem na célula para garantir sua manutenção. Praticamente todas essas proteínas, muitas das quais são críticas na regulação do ciclo celular, são codificadas por oncogenes. Mutações em oncogenes podem resultar na produção de proteínas que ficam permanentemente ativadas na estimulação dos processos de crescimento e proliferação celular (como a

proteína p21 codificada pelo gene ras) ou ficam inativas na inibição da proliferação celular (como a proteína p53). Ambos os eventos dão origem às células tumorais malignas. O conhecimento não só da existência desses oncogenes e de suas oncoproteínas codificadas mas também dos mecanismos pelos quais eles exercem seus efeitos resultou em uma nova série de ensaios altamente sensíveis para oncogenes mutados e suas proteínas mutantes codificadas. Os ensaios que utilizam métodos de amplificação, como reação em cadeia da polimerase (PCR) para oncogenes mutados são abordados na Seção VIII. Neste capítulo, discutiremos como a detecção de proteínas oncogênicas, ou oncoproteínas, que ocorrem no soro de pacientes com tumores malignos possibilita a formulação do diagnóstico de processo maligno, muitas vezes em um estágio precoce de desenvolvimento do tumor. Como o encontro de níveis elevados de qualquer uma dessas oncoproteínas ou formas mutadas dessas proteínas no soro humano indica a provável presença de algum tumor maligno. Essas proteínas também são mencionadas neste capítulo como marcadores tumorais.

A oncogênese, o processo pelo qual as células normais se tornam malignas, envolve múltiplas etapas que, em geral, podem ser classificadas em iniciação e promoção do tumor. A mitogênese por si só é um processo de múltiplas etapas que começa na membrana celular como resultado da ativação de algum receptor de fator de crescimento; isso, então, ativa outras proteínas da membrana e do citosol, bem como moléculas de segundo mensageiro, que transduzem o "sinal" mitogênico até o núcleo.

Vias de transdução de sinal

Foram elucidadas diversas etapas das vias de transdução de sinal – etapas estas que são invocadas na transdução de sinal desencadeado por fator de crescimento até o núcleo; no entanto, muitas das etapas envolvidas não são completamente compreendidas. A Figura 75.1 resume uma via bem-estabelecida para a via de sinalização mitogênica induzida pelo oncogene ras. Essa figura mostra que, ao ser ativado por seu fator de crescimento, o receptor do fator de crescimento ativa várias proteínas intermediárias (Grb-2 e SOS) que, por sua vez, ativam as proteínas G essenciais (i. e., proteínas ligadoras de trifosfato de guanosina [GTP]), conhecidas como $p21^{ras}$. Essa proteína de 21 kDa ligada à membrana, contendo 189 aminoácidos, é ativada quando a proteína SOS leva à ligação de GTP no lugar de GDP. Em seu estado ativado (ligado ao GTP), a $p21^{ras}$ ativa diretamente o gene raf (Moodie, 1993; Stokoe, 1994), o qual, por sua vez, induz uma cascata sequencial de proteínas-quinases, começando com a MEK quinase (conhecida antigamente como MAP quinase quinase) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) codificada pelo gene ERK, conforme ilustrado na Figura 75.1.

A MAP quinase ativa diretamente os fatores de transcrição nuclear, sendo um deles o Fos. Essa importante proteína forma um complexo heterodimérico com outro fator de transcrição nuclear, o Jun, que é diretamente ativado pela Jun quinase (JNK). O complexo Fos-Jun, também chamado de AP1, liga-se a regiões específicas do DNA genômico, levando à transcrição de proteínas mitogênicas, como as ciclinas. A transcrição dessas proteínas é bloqueada pela proteína p53 antioncogênica (Fig. 75.1), que induz ainda mais a transcrição de proteínas antimitóticas, como Bax e Waf, indutoras de apoptose.

Também ilustradas na Figura 75.1 estão várias outras proteínas nucleares importantes codificadas por oncogenes, como Myc, uma proteína de 75 kDa superexpressa no linfoma de Burkitt. Essa proteína oncogênica não está diretamente na via de transdução de sinal mediada pelo gene ras. É interessante observar que certas linhagens celulares, quando transfectadas com o oncogene ras ou com o oncogene myc, não sofrem transformação celular, mas apenas quando transfectadas por ambos os oncogenes ao mesmo tempo. Esses resultados indicam que os oncogenes ras e myc podem ser interdependentes e constituem excelente exemplo prototípico da natureza de múltiplas fases da oncogênese.

Um aspecto central dos eventos de transdução de sinal resumidos na Figura 75.1 é que as cascatas de ativação são ordenadas e estão sob controle regulatório estrito. Assim, por exemplo, enquanto a SOS ativa a Ras-p21, a proteína ativadora da GTPase (GAP) provoca a hidrólise do GTP ligado à Ras-p21, causando sua inativação (Fig. 75.1). A MEK ativada promove regulação (modulação) negativa da SOS, diminuindo a troca de GDP/GTP pela Ras-p21 (Holt, 1996).

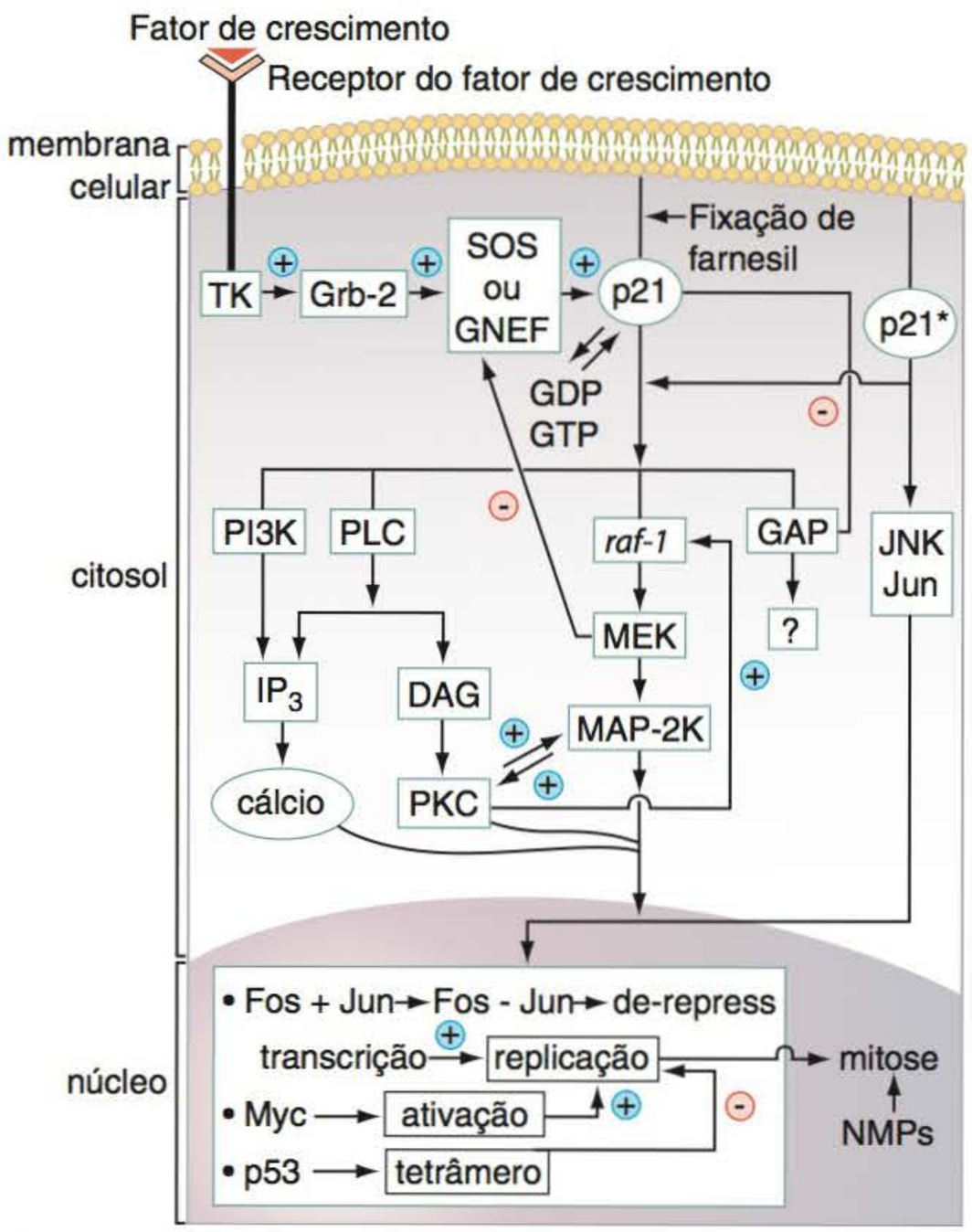


Figura 75.1 Esquema de alguns dos componentes conhecidos da via de transdução de sinal *ras*, que começa (parte superior, à esquerda) quando um fator de crescimento se liga a seu receptor celular. A explicação dos demais eventos está no texto. DAG = diacilglicerol; GAP = proteína ativadora de GTPase, que promove hidrólise de GTP em GTP ligado à p21; grb-2 = a proteína adaptadora que concomitantemente une a proteína p21 e a proteína ou o fator de troca do nucleotídeo guanina, SOS; PI3K = fosfoinositol-3-hidroxiquinase, uma enzima que induz à síntese de IP3 e está envolvida em muitos aspectos da transdução de sinais mitogênicos; IP3 = trifosfato de inositol; MAP-2 quinase = proteína quinase ativada por mitógeno ou proteína quinase-2 associada a microtúbulos (MAP-2K na figura, também chamada de ERK); *myc*, *fos* e *jun* = oncogenes nucleares que codificam proteínas nucleares; NMP = proteínas da matriz nuclear; PKC = proteína quinase C; PLC = fosfolipase C; Raf-1 = proteína p74 codificada por oncogene, que atua como quinase responsável pela fosforilação de outra quinase de massa molecular de 43 kDa, conhecida como MAP-2 quinase quinase, MEK (conforme ilustrada na figura, ou MAP-KK na figura); proteína p21-*ras*, $p21^{ras}$, definidas no texto.

Se uma ou mais proteínas nas vias, como aquela exibida na Figura 75.1, sofrerem mutação a tal ponto de não serem inibidas, a sinalização mitogênica contínua torna-se possível, induzindo finalmente a ocorrência da neoplasia. Quanto mais mutações desse tipo ocorrerem, maior será a probabilidade de que a célula sofra transformação maligna. Dessa forma, lesões progressivas na via mitogênica podem corresponder a múltiplas etapas na carcinogênese.

A Tabela 75.1 resume os mecanismos pelos quais cada tipo de elemento de transdução de sinal leva à transformação celular, começando com os fatores de crescimento, evoluindo para os receptores dos fatores de crescimento, depois para as proteínas G e as cascatas de proteínas quinases e, por fim, para as proteínas nucleares. Esses mecanismos são tratados com mais detalhes em cada seção deste capítulo, dedicado a essas diferentes proteínas de transdução de sinal.

Oncoproteínas na detecção de tumor

A detecção de proteínas mutadas das vias de transdução de sinal ou de altos níveis das proteínas do tipo selvagem no soro ou nos líquidos corporais é fortemente sugestiva de neoplasia. Portanto, muitos ensaios para diferentes oncoproteínas estão disponíveis atualmente na forma de kit, incluindo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA, enzime-linked immunoassays) para o fator transformador do crescimento (TGF, transforming growth factor)-α e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF,

Tabela 75.1 Mecanismos para indução de carcinogênese por elementos da via mitogênica

Elemento da via	Mecanismo de ação
1. Fatores de crescimento	a. Superprodução pela célula nos meios circundantes b. Interação de fatores de crescimento com receptores de alta afinidade
2. Receptores dos fatores de crescimento	a. Superexpressão, que levam à alta concentração de dímeros b. Perda de domínio extracelular, resultando em dimerização permanente de receptores dos fatores de crescimento e sinalização contínua c. Substituições de aminoácidos no domínio transmembrana, induzindo à dimerização permanente
3. Proteínas citosólicas	a. Superexpressão de proteínas G e proteínas quinases normais b. Substituições de aminoácidos que permanentemente mudam de conformação para uma forma ativada c. Mutações que removem os domínios reguladores das quinases
4. Oncoproteínas nucleares	a. Superexpressão das proteínas de transcrição e replicação b. Mutações nas proteínas antioncogênicas que as inativam c. Mutações que removem os domínios reguladores

fibroblast growth factor), as proteínas dos receptores de fator de crescimento EGFr e HER-2/Neu, a Ras-p21, bem como as proteínas nucleares p53, Myc e NMP22 das empresas Oncogene Science (Uniondale, NY, EUA), Triton Bioscience (Houston, TX, EUA) e Matritech (Newton, MA, EUA). Uma série de estudos também emprega a técnica de Western blotting ou immunoblotting, descrita em outra parte desta obra.

Inúmeros estudos documentaram alterações na expressão de oncogene, oncoproteína ou fator de crescimento em termos de RNA mensageiro (mRNA, *messenger RNA*) ou proteína no tecido tumoral, em comparação com tecido normal (Pimentel, 1989; Brandt-Rauf, 1998; Pincus, 2003). Vários estudos avaliaram a expressão de oncoproteína ou fator de crescimento em líquidos biológicos, como urina ou efusões (derrames), e demonstraram a viabilidade do uso desses peptídeos e proteínas como marcadores quanto à presença de neoplasia (Niman, 1985; Yeh, 1989). Estudos subsequentes confirmaram esses achados iniciais, resultando no uso clínico desses marcadores para detecção da presença de neoplasia.

Estudos recentes revelaram que os oncogenes por si só podem ser detectados nos líquidos corporais de pacientes com diferentes tipos de câncer. Com o advento das técnicas de microarray (microarranjos), tanto para a expressão de quanto para a detecção de proteínas, agora é possível analisar a presença de múltiplos oncogenes e oncoproteínas nos líquidos corporais de pacientes com câncer, especialmente no soro. Foi desenvolvida uma nova abordagem paralela para a triagem do câncer; nela, as amostras séricas são submetidas a espectroscopia de massa e análise de padrão que detecta a presença de proteínas expressas exclusivamente no sangue de pacientes com câncer.

O foco deste capítulo, portanto, estará na identificação de diferentes oncoproteínas e fatores de crescimento, nos genes responsáveis pela codificação dessas proteínas e nos líquidos corporais (soro, plasma ou urina) em pacientes com câncer ou sob risco de desenvolvimento dessa doença.

A Tabela 75.2 exibe um resumo de alguns dos muitos (> 50) oncogenes conhecidos e suas funções na célula. Aqueles para os quais há ensaios comerciais disponíveis estão indicados com um asterisco.

Fatores de crescimento

Como vários fatores de crescimento supostamente desempenham um papel para influenciar a proliferação celular durante o processo de tumorigênese e como os fatores de crescimento são ativamente secretados no ambiente extracelular, eles representam alvos potencialmente atrativos para a detecção no sangue durante o desenvolvimento de câncer. Diversos estudos conduzidos até o momento foram capazes de demonstrar as diferenças nos níveis sanguíneos dos fatores de crescimento em pacientes com câncer e nos controles livres dessa doença.

Fatores transformadores do crescimento α e β

O TGF-α, um polipeptídeo de 50 aminoácidos, liga-se ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF, epidermic growth factor), que sofre dimerização ao se ligar ao EGF. O TGF-β é uma família de proteínas marcadas de β_1 a β_5. O TGF-β_1 é um homodímero de duas subunidades de 12 kDa unidas por pontes dissulfeto. Embora se tenha descoberto que o TGF-β é elaborado por muitos tipos diferentes de tumores malignos humanos, níveis séricos elevados desse fator de crescimento foram encontrados predominantemente em cânceres do fígado e da bexiga. Curiosamente, foi constatado que o TGF-β inibe a mitose em linhagens celulares específicas em cultura, tais como células epiteliais brônquicas de marta (animal também conhecido como visom). Dessa forma, o soro de pacientes com tumores produtores desse fator de crescimento pode ser analisado, mensurando-se o grau de inibição do crescimento celular.

A atividade do TGF-β determinada com o uso dessa técnica mostrou-se acentuadamente elevada em pacientes com carcinoma hepatocelular, mas não em controles de idade compatível (Shirai, 1992). Nos soros de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica desses tumores, a atividade do TGF-β é pouco detectável, sugerindo que o tumor seja a fonte dos níveis elevados do fator de crescimento no soro. Em muitos pacientes com carcinoma hepatocelular, é interessante constatar a elevação do nível de TGF-β na urina (Tsai, 1997).

O uso da técnica de ELISA com anticorpo monoclonal direcionado contra o TGF-β_2 revelou que esse fator se encontra elevado em grande proporção de pacientes com câncer de bexiga invasivo, mas não naqueles com câncer não invasivo desse órgão ou em outros livres da doença (Klocker, 1994; Brandt-Rauf, 1998; Pincus, 2003). Recentemente, a proteína de matriz nuclear NMP22, detectada na urina, tem constituído um novo marcador tumoral para câncer de bexiga; esse marcador parece ser mais preciso no diagnóstico de câncer não invasivo e invasivo desse órgão, conforme discutido adiante.

Portanto, os ensaios séricos para TGF-β são altamente úteis no diagnóstico e acompanhamento de carcinoma hepatocelular. No entanto, eles têm menos utilidade no diagnóstico de carcinoma da bexiga, embora esse fator de crescimento tenha alta sensibilidade e especificidade para câncer de bexiga invasivo.

Foi constatada a elevação do TGF-α em grande número de pacientes com tumores de células epiteliais (Katoh, 1990; Chakrabarty, 1994), predominantemente de mama (quase 100%), pulmão, estômago, cólon e fígado. Em contraste, indivíduos normais apresentam níveis séricos muito baixos desse fator de crescimento. Em relação ao fígado, foram verificados altos níveis de TGF-α nos soros de pacientes com carcinoma hepatocelular, mas não naqueles acometidos por cirrose. Os níveis elevados sofriam declínio em pacientes tratados para esse tipo de carcinoma (Tomiya, 1996).

Estudos recentes confirmam que o TGF-α é um indicador eficaz da ocorrência de processos malignos em um estágio precoce. Por exemplo, em 36 pacientes com histórico de asbestose e subsequente desenvolvimento de câncer, principalmente adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas do pulmão, mais de 1/3 deles eram soropositivos para o TGF-α. As amostras sanguíneas de todos esses pacientes foram coletadas, reservadas e, depois, aproveitadas no momento do diagnóstico de asbestose e antes do diagnóstico de processo maligno. Todos os pacientes soropositivos, exceto 1, apresentavam níveis expressivamente elevados de TGF-α em seu sangue armazenado (Brandt-Rauf, 1998).

Desse modo, o TGF-α parece ser um excelente marcador no que se refere à presença de malignidade. Ao contrário do TGF-β, suas elevações não são específicas para tumor. Apesar disso, está claro que o TGF-α é extremamente útil para a triagem de pacientes quanto à presença de tumores malignos.

Fator de crescimento derivado de plaquetas

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), uma proteína com massa molecular de 28 kDa, existe sob a forma de dímero de cadeias A e B, como as formas diméricas A–A, A–B ou B–B. Cada

Tabela 75.2 Resumo de alguns oncogenes importantes e seus produtos proteicos

Oncogene	Produto proteico	Função
1. *erbB**	Receptor do EGF	Liga-se ao EGF; sofre dimerização; ativa as tirosinas quinases na transdução de sinal. Pode atuar através do *ras*
2. *erbB*-2*	Receptor do FC	Muito semelhante ao receptor do EGF, mas utiliza um FC diferente. Pode atuar através do *ras*
3. *sis**	Cadeia-β de PDGF	Receptor de fator de crescimento. Pode atuar através do *ras*
4. *src*	Tirosina-quinase	Promove transdução de sinal através do *ras*
5. *ras**	Proteínas p21; formas H, K e N	Proteínas G; ligam-se à membrana celular e efetuam a transdução de sinais através de segundos mensageiros e *raf*, GAP(?), JNK, PKC e PLC
6. *rap*-1A	Oncogene anti-*ras*; na família *ras*	Bloqueia a ação do *ras* nas células
7. *raf**	Proteína de 74 kDa	Fosforila a MAP quinase quinase que, então, fosforila a MAP quinase
8. *erk-1* e *erk-2**	Família MAP quinase Proteínas de 43 kDa	Envolvidos nos rearranjos citoesqueléticos e na sinalização nuclear
9. *myc**	Proteína nuclear de 62/64 kDa	Ativa os fatores de transcrição envolvidos no processo de replicação
10. *jun*	Proteína nuclear	Forma complexo com *fos*
11. *fos*	Proteína nuclear	Forma complexo com *jun*. O complexo *fos–jun* ativa os fatores de transcrição
12. p53*	Proteína antioncogênica nuclear de 53 kDa	Forma tetrâmeros e, então, liga-se a segmentos do DNA para bloquear os processos de transcrição e replicação
13. *NMP22**	Proteína da matriz nuclear de 236 kDa	Envolvido na formação de fusos mitóticos

Apenas alguns dos muitos oncogenes (mais de 50) estão listados nesta tabela. Eles codificam proteínas para as quais foram desenvolvidos ensaios ou estão intimamente relacionados a essas proteínas. Nenhum fator de crescimento, exceto o PDGF, está incluído nesta tabela. Foram utilizadas as seguintes abreviaturas: FC, fator de crescimento; EGF, fator de crescimento epidérmico; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; GAP, proteína ativadora de GTPase; MAP quinase, proteína quinase ativada por mitógeno; NMP22, proteína da matriz nuclear número 22. Os nomes dos oncogenes, comumente utilizados, relacionam-se aos locais onde eles foram originalmente descobertos. Por exemplo, *ras* é abreviatura de *rat sarcoma viral oncogene*, ou seja, oncogene viral de sarcoma de rato.

* Proteínas codificadas por oncogenes, cujos ensaios foram realizados em soro humano.

cadeia pode ser glicosilada, aumentando sua massa molecular para 30 kDa. Esse fator de crescimento, originalmente isolado de plaquetas, liga-se a um receptor transmembrana de fator de crescimento. A cadeia B é codificada pelo oncogene sis. Foi descoberto que o PDGF é um potente mitógeno em linhagens celulares linfoides, mieloides e fibroblásticas. Esse fator de crescimento também foi avaliado no sangue de pacientes com câncer. Em geral, verifica-se que o PDGF se encontra elevado em termos significativos em mais de 15% dos pacientes com carcinomas, sarcomas e linfomas, mas de modo algum em indivíduos normais. Em pacientes com câncer de mama, há uma excelente correlação entre o estágio do câncer e o nível sérico do fator de crescimento (Ariad, 1991). Níveis mais altos predizem sobrevidas mais curtas. Além disso, o PDGF-B (Sis) no tecido mamário parece correlacionar-se com a proliferação celular acentuada, à medida que a expressão desse fator aumenta com estados malignos ou não e diminui após a menopausa. Em caso de malignidade, o PDGF-B não se correlaciona com a expressão de p53, o nível de estrogênio/progesterona ou o grau do tumor (Coltrera, 1995). O papel desempenhado pelo PDGF-B como marcador em câncer colorretal não é muito claro (Lindmark, 1993).

Fator de crescimento de fibroblasto básico

O fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) é um proteína que contém 155 aminoácidos. Além de ser um fator de crescimento para células mesenquimais, também foram descobertas concentrações relativamente altas no sistema nervoso central (SNC). É interessante notar a presença de bFGF em altas concentrações nos soros de pacientes com tumores de células epiteliais. O carcinoma de células renais é proeminente entre esses tumores. Mais de 50% dos pacientes com essa doença apresentam níveis séricos acentuadamente elevados de bFGF (Fujimoto, 1991; Ii, 1993), conforme determinado pela técnica de ELISA ou por ensaios quimioluminescentes realçados. Esse fator de crescimento também se encontra aumentado nos soros de mais de 50% dos pacientes com tumores do SNC, 90% daqueles com cânceres de pulmão (Ii, 1993) e acima de 60% de outros com linfomas (Kurobe, 1993). Tal fator, entretanto, não está elevado nos soros de grandes populações de indivíduos normais (grupos-controle). Recentemente, verificou-se que o aumento dos níveis séricos de bFGF é um bom fator prognóstico em pacientes com carcinomas de células não pequenas do pulmão (Brattstrom, 1998).

Dessa forma, os fatores TGF-α e TGF-β, PDGF e bFGF, sem exceção, parecem estar elevados nos soros de um número significativo de pacientes com tumores de células epiteliais, embora não sejam totalmente específicos para tumor. O TGF-α e o TGF-β possuem certa especificidade para câncer de mama e carcinoma hepatocelular, respectivamente. O bFGF sofre elevação em uma variedade de processos malignos, incluindo tumores de células não epiteliais, como linfomas e tumores do SNC. O PDGF exibe pouca especificidade para o tipo de tumor, embora altos níveis desse fator no soro indiquem a presença de malignidade.

Fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento de hepatócitos

Foi descoberto que o fator de crescimento epidérmico se mostra elevado no soro de alguns pacientes com câncer de estômago (Pawlikowski, 1989) e da língua (Bhatavdekar, 1993), mas esse fator permanece inalterado ou diminuído em outros tipos de câncer (Nedvidkova, 1992). O aumento nos níveis séricos do fator de crescimento de hepatócitos foi relatado em casos de carcinoma hepatocelular. Contudo, esse fator de crescimento parece ser singular, pois também ocorrem níveis elevados em hepatopatias não malignas (Hioki, 1993), o que diminui sua utilidade como marcador tumoral.

Receptores do fator de crescimento

No nível dos receptores do fator de crescimento, há vários mecanismos pelos quais se pode dar início a um processo descontrolado de mitogênese. Esses mecanismos estão resumidos na Figura 75.2. Tanto para o receptor do EGF quanto para a proteína p185 do receptor de fator de crescimento codificada pelo oncogene HER-2/neu, fortemente associados com câncer de mama (Slamon, 1989; Brandt-Rauf, 1998; Pincus, 2003), o receptor dimeriza e ativa as tirosinas quinases envolvidas na fosforilação de proteínas que transduzem o sinal mitogênico até o núcleo. Existem três mecanismos patológicos conhecidos capazes de resultar em dimerização anormalmente prolongada do receptor, culminando em sinalização mitogênica contínua. Tais mecanismos consistem em perda do domínio de ligação extracelular (DEC); mutações no domínio transmembrana que promovem a dimerização (Brandt-Rauf, 1990; Pincus, 2003); e superexpressão do receptor.

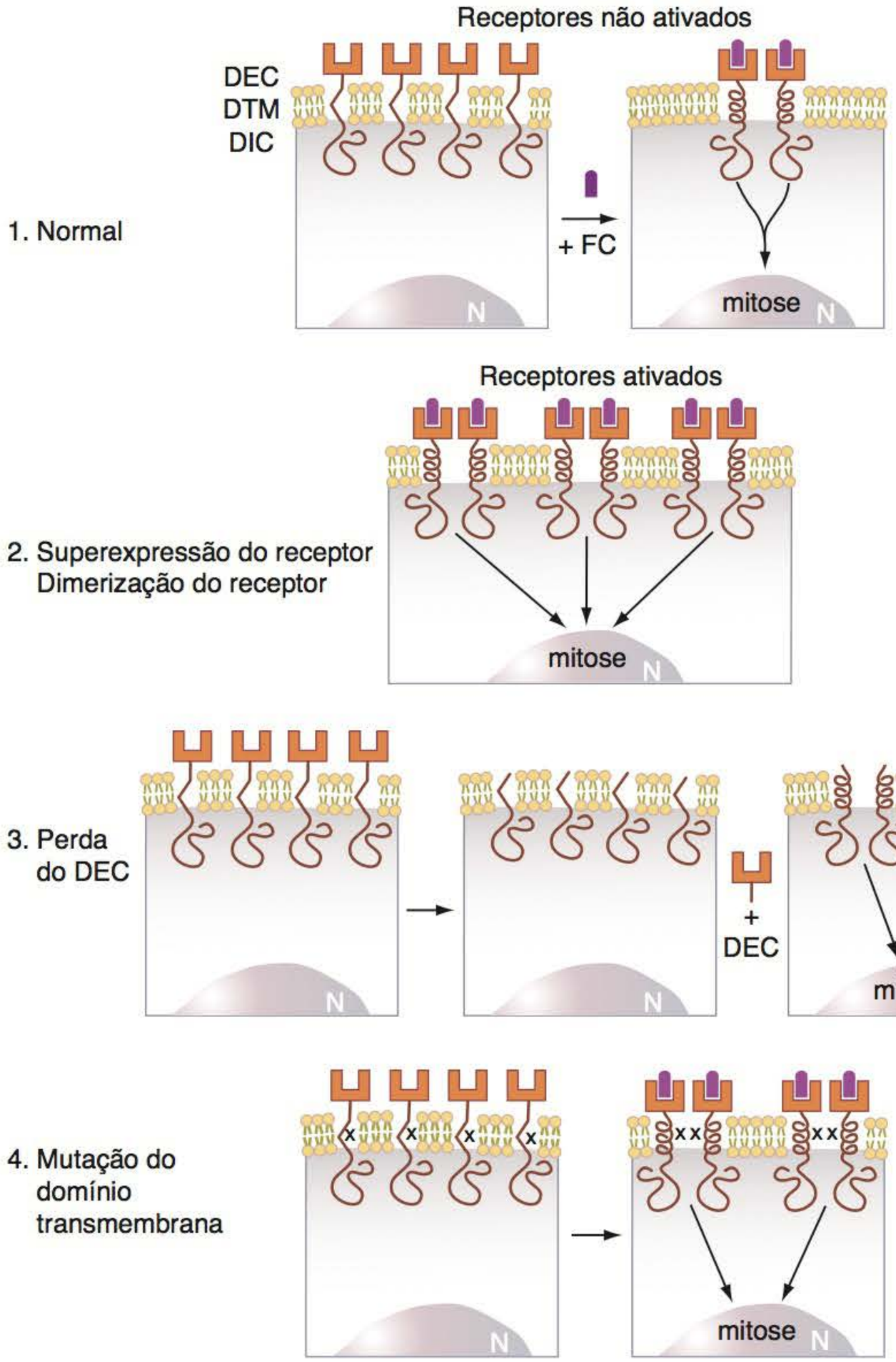


Figura 75.2 Mecanismos para sinalização mitogênica contínua por receptores de fator de crescimento. O esquema 1 mostra que esses receptores possuem três domínios: um domínio extracelular de ligação ao fator de crescimento (DEC), um transmembrana (DTM) e outro intracitoplasmático (DIC). Um fator de crescimento (FC) liga-se ao receptor, provocando sua dimerização e colocando em movimento uma cascata de eventos intracelulares transduzidos até o núcleo (N), conforme descrito na Figura 75.1. Existem três vias conhecidas em que pode ocorrer a sinalização celular contínua pelo receptor do fator de crescimento, resultando em transformação maligna das células. O esquema 2 retrata a primeira dessas vias, ou seja, a superexpressão do receptor, resultando em muitos processos de ativação e sinalização contínua até o núcleo. O esquema 3 ilustra o segundo mecanismo, no qual o DEC está ausente ou sofre clivagem por proteases intracelulares, induzindo à dimerização espontânea. O esquema 4 exibe o terceiro mecanismo, cuja mutação no gene do receptor do fator de crescimento resulta em substituição de aminoácido (X na figura) no domínio transmembrana, o que leva à formação de α-hélices que se associam (Brandt-Rauf, 1990) e culmina em dimerização espontânea; essa dimerização, por sua vez, pode ocorrer na ausência ou presença do ligante.

Os receptores transmembranas de fator de crescimento codificados pela família erbB de oncogenes (i. e., erbB, que codifica o receptor do EGF, também conhecido como EGFr, e o receptor HER-2/neu [erbB-2]) são alvos particularmente atrativos para detecção no sangue durante o desenvolvimento de câncer, pois se constatou que, em cânceres humanos induzidos por esses receptores, o mecanismo parece envolver proteólise do domínio de ligação extracelular do receptor (Fig. 75.2, terceira ilustração). Os domínios extracelulares liberados, denominados DEC, ingressam na circulação e podem ser facilmente detectados no soro pela utilização de técnicas convencionais de imunoensaio (Brandt-Rauf, 1994a, 1994b, 1998; Pincus, 2003).

Receptor do fator de crescimento epidérmico

Elevações dos níveis circulantes do DEC desse receptor de fator de crescimento foram estudadas em pacientes com asbestose (Brandt-Rauf, 1992), o que sabidamente predispõe esses indivíduos a malignidades. Dentre esses pacientes, conforme se descobriu, aqueles com níveis séricos de DEC de 636 fmol/mL ou mais altos apresentam malignidade associada a asbestos (carcinoma do pulmão ou mesotelioma) ou subsequentemente desenvolvem esse tipo de processo maligno. Foi verificado que grande número de indivíduos normais têm níveis séricos muito mais baixos de DEC. Assim, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr) parece ser um excelente marcador para tumores induzidos por asbestos. Tais resultados também são de interesse, pois sugerem que o principal efeito de asbestos como carcinógeno é causar mutações no gene do EGFr (Brandt-Rauf, 1998).

Receptor HER-2/*neu*

Essa proteína foi abordada no capítulo anterior como marcador para câncer de mama. Aqui, consideramos seu potencial como marcador para diferentes estágios desse câncer e para outras neoplasias epiteliais humanas. Em virtude da forte associação documentada entre câncer de mama e mutações no gene HER-2/neu, muitos estudos avaliaram o DEC da proteína p185 codificada pelo gene erbB2 no sangue de pacientes com câncer, particularmente câncer de mama. Estudos prévios sobre superexpressão da proteína p185 induzida pelo oncogene neu (Slamon, 1989) constataram que o nível de expressão do oncogene neu em tecido obtido por biópsia de câncer de mama se correlacionava com a extensão do tumor e era o melhor indicador prognóstico das taxas de sobrevida, excedendo o grau de envolvimento de linfonodos como indicador prognóstico.

Os resultados sobre a quantificação do DEC da p185 no soro de pacientes com câncer de mama correm paralelamente àqueles dos resultados genéticos prévios. Entre 25 e 50% dos pacientes com câncer de mama em estágio III ou IV verificaram-se níveis acentuadamente elevados do DEC da p185 em seus soros – 40 a 190 vezes mais do que nos soros de indivíduos-controle normais (Mori, 1990; Carney, 1991; Kath, 1993). Para os pacientes com material de biópsia tumoral disponível, há uma excelente

correlação entre os níveis séricos de DEC e o nível tecidual de expressão (Breuer, 1993, 1994). Também há uma notável correlação entre os níveis de DEC sérico e a recorrência de doença (Brandt-Rauf, 1998). Também foi descoberto que os níveis de DEC no soro constituem um ótimo indicador prognóstico para câncer de mama (Molina, 1996).

Como os níveis séricos do DEC da p185 se correlacionam com a carga e o estágio do tumor, a detecção de câncer de mama incipiente por meio desses níveis séricos é menos eficaz para esses pacientes. Em geral, a taxa de detecção de câncer de mama em estágios I e II pelo uso dos níveis séricos de DEC, com base nas técnicas convencionais de ELISA, varia de 10 a 15%. No entanto, o emprego de um ensaio sensível de ELISA para detecção de DEC da p185 em pacientes com câncer de mama resultou na descoberta de carcinoma in situ em 43% dos indivíduos com essa doença (Breuer, 1993). Este último resultado indica que o uso de ensaios mais sensíveis para a detecção de DEC da p185 identifica um aumento significativo no número de pacientes com carcinoma *in situ* (i. e., em um estágio precoce de desenvolvimento).

Neoplasias pulmonares

O DEC da proteína p185 também está elevado em uma alta porcentagem de pacientes com cânceres de pulmão. Altos níveis séricos de EGFr na detecção precoce de tumor são empregados para fazer a triagem de pacientes com predisposição conhecida, como pneumoconioses, para o desenvolvimento desses cânceres. Em 70% dos pacientes com pneumoconioses, verificaram-se níveis séricos elevados de DEC da p185 antes do início de malignidade franca. Em quase 100% dos pacientes com esse fator predisponente e câncer de pulmão, os níveis séricos de DEC da p185 apresentam-se acentuadamente elevados (Brandt-Rauf, 1994a). Fica claro que essa proteína é um marcador altamente sensível para cânceres pulmonares. Em contraste, não foi encontrado qualquer aumento de DEC da p185 nos soros de grande número de indivíduos normais (Brandt-Rauf, 1998; Pincus, 2003).

Carcinomas hepatocelulares

Conforme já mencionado, o TGF-β pode ser um bom marcador para carcinoma hepatocelular. Hoje em dia, há fortes indicações de que o DEC da p185 também seja um marcador sensível para essa doença. Foram constatados altos níveis séricos de DEC da p185 em quase 100% das pessoas do Leste Asiático, que sabidamente apresentam fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença (Luo, 1993; Yu, 1994a, 1994b). No entanto, a expressão tecidual de c-erbB-2 em biópsias obtidas de pacientes com carcinoma hepatocelular e adenoma não revelou superexpressão nem amplificação pelo método de hibridização in situ por fluorescência (FISH) ou imuno-histoquímica (Vlasoff, 2002). Além disso, nenhuma dessas elevações foi observada em indivíduos normais de idade e raça semelhantes ou naqueles com exposição aos fatores de risco para essa doença, mas que subsequentemente não desenvolveram câncer.

DEC da proteína p185 codificada pelo gene erbB-2 em outros tumores

Atualmente, verificou-se a ocorrência de níveis séricos elevados de DEC do gene erbB-2 em pacientes com câncer colorretal, pancreático, prostático, hepático e ovariano (Wu, 1993) em frequências mais baixas de detecção (15–20%) e, ainda, níveis significativamente mais altos em pacientes com carcinoma nasofaríngeo (Yazici, 2001). Em muitos desses casos, foram constatadas excelentes correlações entre níveis séricos e teciduais. Há uma correlação direta entre os níveis séricos de DEC da proteína p185 e o volume do tumor para adenomas pré-malignos do cólon (Brandt-Rauf, 1994b). Como a neoplasia colônica geralmente evolui por etapas bem-definidas de adenoma para carcinoma com o potencial maligno de aumento de volume dos adenomas, os níveis séricos de DEC do gene erbB-2 podem ser úteis para monitorar essa evolução. A amplificação do gene e a superpexpressão proteica de c-erbB-2 também foram encontradas em adenocarcinoma derivado do esôfago de Barrett (Geddert, 2002).

Proteínas G

Como acontece com os receptores de fator de crescimento, as proteínas sinalizadoras que ocorrem à jusante dos receptores de fator de crescimento se tornam oncogênicas principalmente por superexpressão e substituições de aminoácidos em posições críticas em suas cadeias polipeptídicas. Menos comumente, para algumas proteínas, como Raf (Fig. 75.1; Tab. 75.2), a perda de domínios reguladores também pode levar à oncogênese. As substituições de aminoácidos em proteínas transdutoras de sinal fazem com que essas proteínas sofram alterações conformacionais – alterações estas que resultam em ativação permanente para estimular a divisão celular (Pincus, 1992, 2000, 2004).

Esse mecanismo foi bem documentado para a proteína p21 codificada pelo oncogene ras, cujas substituições de grande parte dos aminoácidos pela glicina-12 ou glutamina-61 resultam em uma proteína oncogênica. Muitas proteínas p21 com tais substituições foram clonadas e microinjetadas diretamente em células normais em cultura, como células NIH 3T3 (Barbacid, 1987). As células sofrem transformação maligna que perdura até que a proteína mutante adicionada seja metabolizada e removida das células. As formas mutantes oncogênicas do gene ras e de sua proteína p21 codificada foram encontradas em aproximadamente 1 a cada 3 tumores epiteliais humanos comuns, em mais de 90% dos tumores pancreáticos e em 75% dos cânceres de cólon em seres humanos (Almoguera, 1988; Forester, 1987).

Uma das consequências das substituições de aminoácidos na proteína p21 e presumivelmente em outras proteínas transdutoras de sinal é a ativação anormal de vias alternativas e desreguladas de transdução de sinal. Foi descoberto que a proteína oncogênica $p21^{ras}$ (p21 na Fig. 75.1) se liga diretamente ao fator de transcrição nuclear, Jun, e à sua quinase ativadora, a Jun quinase (JNK). Tal processo de ligação resulta na ativação direta dessas proteínas indutoras de transcrição nuclear, desviando-se com isso dos controles celulares normais. A ilustração desse desvio ou dessa via de circuito curto está à direita na Figura 75.1 para a proteína p21 (Adler, 1995; Amar, 1997). Além disso, a proteína oncogênica $p21^{ras}$ requer ativação da proteína quinase C como um evento à jusante em sua via de transdução de sinal (Pincus, 1992), conforme ilustrado na Figura 75.1.

Conforme mencionado anteriormente, as proteínas p21 codificadas pelo oncogene ras são proteínas G de 21 kDa associadas à membrana e implicadas no processo de transdução de sinal do crescimento, desde a membrana celular até as quinases citoplasmáticas. Foram identificadas alterações qualitativas (i. e., mutações pontuais) e quantitativas (i. e., superexpressão) na proteína p21 como fatores que contribuem para a carcinogênese humana (Barbacid, 1987). Por mecanismos ainda não definidos, as proteínas p21 ganham acesso ao meio extracelular. Dessa forma, é possível detectar quantidades elevadas da p21 ou de formas mutantes pontuais dessa proteína pela técnica de immunoblot com anticorpos monoclonais no sobrenadante de células em cultura que sabidamente superexpressam a proteína p21 ou expressam sua forma mutante, respectivamente (Brandt-Rauf, 1991, 1998; Pincus, 2003).

Do mesmo modo, a técnica de immunoblot possibilita a detecção de quantidades aumentadas da p21 ou de formas mutantes dessa proteína no soro de camundongos acometidos por tumores que superexpressam a proteína p21 ou expressam sua forma mutante, respectivamente (Hamer, 1991). Esses resultados sugerem que a detecção de níveis elevados de p21 ou de sua forma mutante no sangue é possível em seres humanos.

Em virtude de seu papel central na transdução de sinal mitogênico, a proteína p21 superexpressa e/ou mutada pode estar supostamente presente em uma ampla variedade de tumores humanos. De fato, foram identificados altos níveis séricos de p21 no soro de até 68% dos pacientes com muitos tipos diferentes de câncer, incluindo câncer de mama, próstata, cólon, pulmão e fígado. Entretanto, constatou-se que apenas uma pequena porcentagem de indivíduos normais tem níveis séricos detectáveis (Weissfeld, 1994).

Uma incidência muito alta de ocorrência da forma oncogênica do gene K-ras foi encontrada em cânceres pancreáticos e colônicos humanos. Novos ensaios conduzidos com base na técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) detectaram o oncogene ras nas fezes de alta porcentagem de pacientes com câncer de cólon (Pincus, 2004). Além disso, foram obtidos resultados igualmente animadores, utilizando o escarro de pacientes com câncer de pulmão. Atualmente, também foram adquiridos resultados paralelos com o teste ELISA em busca da proteína p21, utilizando o soro de pacientes com carcinoma pulmonar e colônico. Foram encontrados altos

níveis (5 vezes maior que os controles) da p21^{ras} sérica em até 83% dos pacientes com câncer de pulmão, porém apenas baixos níveis nos soros de indivíduos normais (Brandt-Rauf, 1991, 1998). Em outros estudos, a técnica de PCR para detecção de genes mutantes K-ras com alterações de base nos códons 12 e 13 foi conduzida concomitantemente no tecido tumoral e no soro de pacientes com estágios diferentes de câncer colorretal (de Kok, 1997). Em mais de 90% dos pacientes com genes mutantes ras específicos, o mesmo gene ras mutado foi descoberto no soro desses indivíduos, independentemente do estágio do tumor.

Na discussão prévia sobre a proteína p185 codificada pelo oncogene HER-2/neu, foi mencionado o encontro de altos níveis séricos dessa proteína em pacientes com pneumoconioses que evoluíam para o desenvolvimento de malignidades francas. Um estudo paralelo realizado em pacientes com pneumoconioses, em cujos ensaios foi detectada a proteína p21^{ras} no soro. Para pacientes com essa condição predisponente verificou-se, pela técnica de immunoblotting (Western blotting), que 39% deles tinham níveis séricos elevados da proteína p21. Quase todos esses pacientes desenvolveram algum tumor pulmonar maligno subsequentemente às elevações observadas da proteína p21. Dessa forma, semelhante ao que se observou quanto ao DEC da proteína p185, a p21 sérica elevada é um biomarcador de doença maligna precoce em pacientes com predisposição conhecida. Um estudo óbvio que ainda está para ser realizado consiste na análise dos soros desses pacientes quanto à presença de HER-2/neu e p21^{ras} para aumentar a sensibilidade dos ensaios.

Os estudos prévios ocupam-se da detecção de níveis séricos elevados da proteína p21 no soro como indicador de malignidade. Conforme se mencionou, um mecanismo importante para a oncogênese induzida pela proteína p21^{ras} envolve substituições de aminoácidos em sua sequência, resultando em sua ativação permanente. Foi descrita a identificação de genes mutantes ras pela técnica de PCR e pelo sequenciamento direto de DNA isolado do soro ou plasma de três pacientes com câncer pancreático (Sorenson, 1994), mas até pouco tempo a detecção direta da proteína p21 mutante ainda não havia sido relatada no sangue humano (de Kok, 1997). Atualmente, no entanto, as substituições oncogênicas de aminoácidos na proteína p21 podem ser identificadas pelo uso de anticorpos monoclonais que reconhecem substituições oncogênicas específicas.

No soro de pacientes com histórico conhecido de exposição ao carcinógeno cloreto de vinila, detectou-se a proteína p21 mutada. Foi demonstrado que essa substância química predispõe os indivíduos ao desenvolvimento de angiossarcomas (Brandt-Rauf, 1998). Estudos teciduais desses angiossarcomas revelam que um gene ras mutante responsável pela codificação do ácido aspártico no lugar da glicina de ocorrência normal na posição 13 da cadeia polipeptídica está presente nas células tumorais. Foi obtido um anticorpo monoclonal que reconhece a forma Asp13 da proteína p21 (Oncogene Science). Essa proteína p21 mutante foi identificada nos soros de 80% dos pacientes com angiossarcoma hepático induzido pelo cloreto de vinila, mas não em indivíduos normais (DeVivo, 1994). Além disso, há uma correlação direta entre o grau de exposição dos pacientes ao cloreto de vinila e a probabilidade de descoberta da forma oncogênica da proteína no soro desses pacientes.

Uma série de outros anticorpos monoclonais antiproteína p21 mutante altamente específicos que reconhecem substituições específicas de aminoácidos nas posições 12, 13, 59 e 61 foi obtida. O uso desses anticorpos nos soros de pacientes com fatores de risco conhecidos para o câncer parece ser muito promissor para a detecção precoce de tumor.

Quinases mitogênicas citosólicas: *raf*

Como se observa na Figura 75.1 e na Tabela 75.2, a Raf (proteína de 74 kDa) corresponde a um alvo crítico da p21^{ras}. Essa proteína ativa diretamente a MEK, que, por sua vez, ativa a MAPK (ERK) (Fig. 75.1, Tab. 75.2). Ela está envolvida nos processos de crescimento, proliferação, apoptose e diferenciação celular. Há várias isoformas diferentes da proteína Raf, como Raf A e Raf B, as quais podem diferir em suas funções celulares exatas. Foram identificadas mais de 30 mutações do gene raf-B associadas com cânceres humanos (Wan, 2004). A análise de Western blot demonstrou que a Raf ativada se encontrava superexpressa em tecidos obtidos de pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (91,2 e 100%, respectivamente) (Hwang, 2004). Mutações do raf-B também foram encontradas em casos de câncer de cólon, embora com menos frequência que o K-ras (Monstein, 2004). Contudo, a proteína Raf é detectada em níveis mínimos a ausentes nos tecidos de pacientes com carcinoma vesical ou endometrial (Mutch, 2004; Stoehr, 2004). O papel desempenhado pela Raf em casos de melanoma não é muito claro, já que essa proteína também é encontrada em grande parte dos nevos benignos (Wellbrock, 2004). Esses resultados sugerem que a proteína Raf pode ser um marcador útil e específico para carcinomas colônico e hepatocelular.

Oncoproteínas nucleares

Conforme observação prévia, duas proteínas nucleares importantes que parecem desempenhar papéis críticos na regulação do crescimento e da divisão celular consistem na proteína do gene supressor de tumor, a p53, e na proteína p62/75 codificada pelo oncogene c-myc para as quais foram desenvolvidos ensaios séricos. Além disso, as proteínas do esqueleto ou da matriz nuclear constituem os alvos das quinases transdutoras de sinal, como a MAP quinase, como indica a Figura 75.1.

Proteínas p53 e c-*myc*

A proteína p53 sabidamente atua como homotetrâmero e, nessa forma, liga-se a sequências específicas do DNA. O efeito consiste em reprimir o processo mitótico. Além disso, a ativação da p53 em células transformadas resulta em apoptose via ativação de proteínas pró-apoptóticas, como Bax, waf^{p21} e caspases. Assim, a p53 é uma proteína antioncogênica. Podem ocorrer mutações na p53 que a inativam. Essa inativação pode, por si só, ser oncogênica, pois o controle vital exercido por essa proteína sobre a mitogênese é removido. Entre as mutações inativadoras, estão as deleções de todo o gene, conforme foi encontrado em uma série de cânceres de cólon, e as mutações gênicas com consequentes substituições de aminoácidos na proteína p53 codificada. Essas substituições provocam alterações conformacionais na proteína, incapacitando-a de realizar sua função antioncogênica na célula (Brandt-Rauf, 1996).

Em tumores humanos, foram identificadas muitas mutações pontuais diferentes no gene p53 (Soussi, 1994). O efeito dessas mutações é causar uma perda da função inibitória da p53 sobre o crescimento normal e, ao mesmo tempo, algumas dessas mutações resultam em proteínas p53 com meias-vidas consideravelmente aumentadas; dessa forma, as proteínas mutantes acumulam-se nas células transformadas (Soussi, 1994).

A oncoproteína c-myc é ativada até causar transformação celular por superexpressão e, portanto, também se acumula nas células transformadas (Field, 1990). Dessa forma, tanto para a p53 quanto para a p62/75 myc, podem ser detectados altos níveis das proteínas em células transformadas e tumores humanos (Field, 1990; Soussi, 1994). Essa superexpressão aparentemente resulta em extravasamento das proteínas para o meio extracelular. Portanto, não só é possível detectar essas proteínas no soro e em outros líquidos corporais, mas também essas proteínas normalmente sequestradas são reconhecidas como estranhas, e, por conta disso, alguns pacientes com câncer desenvolvem anticorpos contra a p53 ou a p62/75 myc. Em consequência disso, concentrações elevadas de p53 ou p62/75 ou de anticorpos contra essas proteínas no sangue são excelentes marcadores para o estudo da carcinogênese humana.

Detecção de malignidades por análise da proteína p53

Carcinoma hepatocelular

Foram encontrados altos níveis da proteína p53 mutante no soro pela técnica de ELISA (> 0,3ng/mL, limite superior de 100 resultados normais) em 20% dos pacientes com carcinoma hepatocelular e 30% de outros com cirrose, um grupo que sabidamente apresenta alto risco para o desenvolvimento desse tipo de carcinoma (Virji, 1992). Como os pacientes cirróticos exibem altos níveis da p53 em seus soros e algum fator de risco conhecido para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, os níveis elevados dessa proteína podem ser um indicador precoce de tumorigênese.

Cânceres de mama e pulmão

Existem poucos estudos sobre a proteína p53 como marcador tumoral nos soros de pacientes com cânceres de mama e de pulmão. Há relatos de altos níveis séricos da p53 mutante detectados pelo método de ELISA em 8% dos pacientes com câncer de mama, com níveis decrescentes após ressecção cirúrgica dos tumores (Rosanelli, 1993); isso indicou que os tumores eram a fonte da p53 elevada. As elevações da proteína p53 não foram observadas nos soros de quaisquer indivíduos normais.

Em casos de câncer de pulmão, constataram-se níveis séricos elevados da p53 mutante pelas técnicas de ELISA e immunoblotting em até 34% dos pacientes com esse tipo de câncer, mas não em indivíduos normais (Fontanini, 1994). Para esses pacientes, a coloração imunohistoquímica de tecido subsequentemente obtido por biópsia revelou níveis elevados da p53, correlacionando-se com os achados séricos.

Câncer de cólon

Um mecanismo importante que supostamente atua no desenvolvimento de carcinoma colônico é a deleção do gene p53 normal ou a mutação do gene indutor de proteína antioncogênica não funcional. Em cerca de 1 a cada 5 pacientes com carcinomas de cólon e em aproximadamente 1 a cada 10 pacientes com adenomas desse segmento intestinal foram econtrados altos níveis séricos da p53 mutante determinados pela técnica de ELISA. Foi possível constatar que indivíduos normais são negativos para a proteína p53 sérica. Esses resultados demonstram a sensibilidade relativamente baixa desse marcador para o câncer de cólon, possivelmente porque a deleção do gene p53 ocorreu em uma alta porcentagem dos tumores estudados.

Câncer de bexiga

Estudos conduzidos na urina de pacientes com câncer de bexiga, utilizando a técnica de PCR para detecção do gene p53 em células eliminadas nas amostras urinárias, descobriram que esse gene havia sofrido mutação em uma alta proporção desses pacientes (Sidransky, 1991), apoiando o uso da p53 na triagem dessa doença de maneira totalmente não invasiva. Conforme se discute adiante, a p53, juntamente com vários outros marcadores promissores, pode resultar em um conjunto de testes com alto valor preditivo positivo.

Anticorpos anti-p53 circulantes na detecção de tumor

Há relatos de que anticorpos séricos contra a proteína p53 sejam uma ocorrência frequente em pacientes com vários tipos de câncer. A produção de anticorpos contra essa proteína e outras oncoproteínas é atribuída a seu acúmulo em células necróticas e sua subsequente liberação na circulação, local onde são identificadas como estranhas (Pincus, 2003). Em relação à p53, há outra causa para o desenvolvimento de anticorpos contra a p53 oncogênica. De maneira semelhante à que ocorre com a $p21^{ras}$ oncogênica, as proteínas p53 mutantes contendo substituições de um único aminoácido em posições críticas na cadeia polipeptídica tornam-se, por si só, oncogênicas. Essas substituições de aminoácidos induzem a alterações importantes na conformação da proteína p53 (Brandt-Rauf, 1996; Adler, 1998). Entre essas alterações está a exposição de determinantes antigênicos específicos que não são normalmente expostos (Pincus, 2003). Se a proteína se difundir para a circulação, com frequência ocorrerá o desenvolvimento de anticorpos contra esses determinantes.

Em vários estudos importantes (incluindo um amplo estudo de 1.392 pacientes com câncer) foram encontrados níveis séricos elevados de anticorpos anti-p53 em indivíduos com cânceres de ovário e cólon (15%); cânceres de pulmão, inclusive tumores de células pequenas (até 25%); e cânceres de mama, inclusive carcinoma intraductal (até 15%). Indivíduos normais não tinham níveis séricos elevados desses anticorpos (Angelopoulou, 1994). Em um número significativo de pacientes acompanhados quanto à presença de anticorpos anti-p53 em seus soros, constatou-se que o aparecimento desses anticorpos antecedia a ocorrência de tumores malignos. Também se verificou a ocorrência de anticorpos anti-p53 em mais de 20% dos pacientes com câncer de bexiga (sobretudo em estágios mais avançados), em uma alta proporção de pacientes com carcinomas pancreático e hepatocelular, bem como em linfomas infantis.

Estudos contínuos de acompanhamento sobre anticorpos anti-p53 em pacientes com diferentes tipos de câncer revelam que até metade dos pacientes com carcinoma hepatocelular, não importando o volume, apresenta níveis séricos acentuadamente elevados de anti-p53 (Ryder, 1996). Esses níveis elevados correlacionam-se com o aumento conhecido de p53 nos soros de pacientes com esse tipo de câncer, conforme discutido anteriormente. Além disso, foram encontrados anticorpos anti-p53 no soro de pacientes com lesões orais e constatou-se que muitos desses pacientes possuem lesões pré-malignas (Kaur, 1997), o que indica os anticorpos anti-p53 como marcadores para a detecção precoce de câncer oral. Também foram descobertos níveis elevados de anti-p53 em mais de 50% dos pacientes com carcinoma esofágico de células escamosas (Shimada, 1998).

Em um estudo prospectivo de pacientes com carcinoma do pulmão, verificaram-se níveis séricos de anticorpos anti-p53 em 100% dos pacientes com carcinoma de células grandes, 28% com adenocarcinomas, 55% com carcinomas de células escamosas e 71% com carcinomas de células pequenas (Segawa, 1998). Esses resultados demonstram que os elevados níveis de anticorpos são do tipo tumoral-específicos para para carcinoma pulmonar, o que revela altas taxas de positividade para carcinomas pulmonares de células grandes e pequenas.

Foi conduzido um estudo retrospectivo recente (Li, 2004) de 103 pacientes com exposição prolongada conhecida a asbesto (amianto), cujo soro foi armazenado entre os anos 1980 e 1988. Todos esses pacientes, sem exceção, foram acompanhados até o final de 2001. As análises para detecção de anticorpos anti-p53 foram realizadas nos soros armazenados. Descobriu-se que, de 49 pacientes que desenvolveram câncer, 13 (26,5%) tinham níveis significativamente elevados de anticorpos anti-p53 em seus soros, enquanto 4 de 54 (7,4%) indivíduos que não desenvolveram câncer possuíam esses anticorpos. Em todos os 4 casos, constatou-se que os níveis de anticorpos estavam marginalmente acima do valor de corte em termos de positividade e, em todos esses casos, as amostras séricas armazenadas subsequentes eram negativas quanto à presença de anticorpos. Em contraste, em todos os 13 pacientes acometidos por câncer com múltiplas amostras disponíveis, todas as amostras eram positivas para esses anticorpos. A análise estatística desses resultados revela que a presença de anticorpos anti-p53 é um indicador independente da ocorrência de câncer e que a sobrevida em pacientes livres de anticorpos anti-p53 é significativamente maior que naqueles positivos para esse anticorpo.

Proteína codificada pelo oncogene *myc* na detecção de tumor

O gene myc codifica uma proteína de massa molecular de 75 kDa que atua como fator de transcrição. Quando ativada, essa proteína deprime a expressão de outros genes que codificam proteínas envolvidas no processo de replicação. Esse oncogene sofre superexpressão em uma série de tumores, incluindo linfoma de Burkitt, em que o gene myc no cromossomo 8 é translocado para uma região semelhante à repetição terminal longa de uma região do cromossomo 14 responsável pela codificação de imunoglobulina. As regiões de repetição terminal longa permitem a expressão constitutiva de genes adjacentes a elas.

Proteínas relacionadas ao gene c-myc e anticorpos contra a proteína c-myc, assim como a proteína p53 e os anticorpos contra ela, foram identificados no soro de pacientes com câncer. A detecção dessa proteína de 62/75 kDa é dificultada por sua meia-vida curta no soro. Contudo, é possível detectar uma proteína p40 relacionada ao c-myc específica no soro desses pacientes, utilizando-se a técnica de immunoblotting. Foram constatadas as mais altas frequências de ocorrência da proteína myc no soro humano em casos de câncer de mama (cerca de 20%) e de cólon. O tratamento de ambos os tipos de câncer resulta em diminuição acentuada nos níveis séricos dessa proteína. As recorrências culminam em níveis elevados; a proteína c-myc, portanto, é útil no acompanhamento da evolução de tumores malignos. Essa proteína não foi detectada nos soros de indivíduos normais.

Anticorpos séricos antiproteína c-*myc* na detecção de tumor

Altos níveis séricos de anticorpos anti-c-myc foram encontrados nos soros de pacientes com câncer colorretal (55–65%) e daqueles com

leucemias mieloides e linfoma de Burkitt. Há relatos de ocorrências mais baixas de anticorpos elevados em pacientes com câncer de mama (em torno de 10%) e cânceres de ovário (10%). Esses anticorpos anti-c-myc não foram constatados nos soros de indivíduos normais.

Proteínas da matriz nuclear – detecção de câncer de bexiga

Conforme ilustrado na Figura 75.1, proteínas da matriz nuclear (NMPs), também denominadas proteínas do esqueleto nuclear, e proteínas do aparato mitótico nuclear são importantes alvos de proteínas codificadas por oncogenes. Essas proteínas de 236 kDa são vitais para a formação correta de fuso mitótico. Tais proteínas contêm cabeça globular e cauda separadas por domínio de core α-helicoidal semelhante a um bastão central, consistindo em sequências repetidas de 7 aminoácidos (conhecida como heptad repeat). Essas proteínas variam por tipo de célula, estágio de diferenciação e fase do ciclo celular. De forma crítica, foi identificada uma série de NMPs asssociadas a tumor; cada uma delas é específica para 1 de 5 tipos de tumor (bexiga, próstata, mama, cólon e osso). A proteína mais bem estudada é uma fortemente associada com carcinoma de células de transição da bexiga, a NMP22, que atua como uma proteína do aparato mitótico nuclear, envolvida na separação dos cromossomos durante a mitose (Hughes, 1999). A quantidade dessa proteína em células epiteliais de transição malignas é de 10 a 20 vezes maior que nas células normais.

Foram desenvolvidos anticorpos específicos contra essa NMP que, atualmente, são utilizados em um teste ELISA comercial na urina (Matritech, Newton, MA, EUA). Essa análise baseia-se no esfacelamento de células uroteliais malignas na urina e na especificidade dessa NMP para células de câncer da bexiga, pois a elevação dessa proteína na urina pode ser detectada em pacientes com esse tipo de câncer. Múltiplos estudos de pacientes com cânceres de bexiga em diferentes estágios revelam que a sensibilidade chega perto de 90% em casos de câncer maligno invasivo e de 75% em carcinoma in situ. O último resultado é bastante animador, já que esse estágio é o mais precocemente detectável. Para carcinoma papilar maligno não invasivo, a sensibilidade é de 62%. A especificidade global desse marcador está acima de 90%.

A comparação da sensibilidade entre o teste ELISA para detecção da proteína NMP22 e a citologia para detecção de tumores uroteliais revela que os dois métodos possuem sensibilidade em torno de 83% para carcinoma invasivo; nos casos de carcinoma de células de transição de grau I, no entanto, a sensibilidade da NMP é de 61%, e da citologia, apenas de 17% (Landman, 1998). Para cânceres de grau II e III, o teste ELISA para detecção de NMP22 é mais sensível em 78 e 93% dos casos, em comparação com as sensibilidades citológicas, de 50 e 87%, respectivamente (Landman, 1998).

Esse método foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), tanto para a triagem referente à presença de câncer de bexiga quanto para o acompanhamento desse tipo de câncer em pacientes tratados para essa doença. Em relação ao uso mais recente desse método, foram realizados estudos clínicos em que se usou o teste ELISA para detecção da NMP22 na urina de pacientes tratados para carcinoma de células de transição, 20 a 60 dias após o tratamento; na sequência, os pacientes foram submetidos a cistoscopia 2 a 6 meses após a terapia. Utilizando-se um valor de corte de 10 U/mL, foi constatado que 86% dos pacientes com valores negativos para a proteína NMP22 (< 10 U/mL) exibem resultados cistoscópicos negativos e 71% daqueles com valores superiores a 10 U/mL apresentam achados cistoscópicos positivos. Esses resultados, combinados com os de outros estudos, sugerem que essa metodologia pode dispensar a necessidade de realização da cistoscopia em muitos pacientes que estão sendo acompanhados em termos de recorrência de tumor (Miyanaga, 1997).

A NMP22 pode ser utilizada para monitorar a recorrência de câncer de bexiga após ressecção cirúrgica. Entretanto, como os tumores recorrentes são menores que os iniciais, os valores de corte devem ser modificados nesses casos, pois a sensibilidade desse teste aumenta de 19 para 49% quando o valor de corte é reduzido para 5 U/mL (Miyanaga, 2003).

Antígeno de tumor de bexiga

Vários outros biomarcadores para câncer de bexiga também estão sendo usados para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento dessa doença. Entre esses biomarcadores, destaca-se o assim chamado antígeno de tumor de bexiga, que mensura uma proteína relacionada ao fator de complemento humano H, produzida pelas células epiteliais de transição malignas, mas não pelas normais. Esse marcador tem sensibilidade um pouco mais baixa que à da proteína NMP-22; também possui especificidade mais baixa em virtude dos resultados falso-positivos gerados por traumatismo ao trato urotelial. No entanto, o uso da NMP-22, juntamente com o antígeno de tumor de bexiga e uma série de outros marcadores, incluindo ativador de plasminogênio tipo uroquinase, pode melhorar a sensibilidade global de detecção do câncer de bexiga (Shariat, 2003). Deve-se notar, ainda, que outros testes de urina, como aqueles para detecção de p53 mutante ou ausente, conforme já discutido, e para pesquisa de deleção homozigota do cromossomo 9p21, abordado adiante, também têm alta recuperação diagnóstica (i. e., proporção de resultados de testes que dão positivo). Como esses testes são relativamente simples de se realizar, é concebível que eles possam ser inseridos em um chip, como será discutido adiante, o qual permitirá avaliações simultâneas. Um resultado positivo em um ou mais testes seria diagnóstico de câncer de bexiga.

Uso de múltiplos marcadores oncoproteicos no diagnóstico de câncer

Em vista do sucesso na detecção da presença de câncer por meio do uso de marcadores oncoproteicos isolados, é surpreendente que existam poucos estudos sobre o uso de múltiplos marcadores oncoproteicos para este fim. Quando tais estudos são realizados, o índice de recuperação diagnóstica aumenta.

Análise de múltiplas oncoproteínas em pacientes sob risco de desenvolvimento tumoral

Em um estudo prospectivo, 46 pacientes com histórico de exposição a carcinógenos e com pneumoconiose concomitante participaram de um estudo em que os soros foram analisados quanto à presença de níveis elevados de 5 oncoproteínas: $p21^{ras}$, Fes, Myb, PDGF e Int-1. Foi descoberto que 18 desses pacientes tinham câncer, incluindo 13 com câncer de pulmão ou mesotelioma, no momento em que as análises foram realizadas. Desses 18 pacientes, 13 apresentavam níveis acentuadamente elevados de, no mínimo, 1 das 5 oncoproteínas analisadas. Oito desses pacientes exibiam aumentos de, pelo menos, 2 dessas proteínas. Outros 7 pacientes tinham elevações de, ao menos, 2 dessas oncoproteínas, apesar de não terem câncer. Embora alguns desses últimos pacientes houvessem perdido o acompanhado, acompanhamentos a longo prazo revelam o subsequente desenvolvimento de câncer em todos os pacientes remanescentes. A descoberta de maior relevância indicou que vários dos pacientes com apenas um marcador elevado possuíam aumentos de diferentes marcadores tumorais em seu soro, o que enfatiza a importância de se analisar a maior quantidade possível de oncoproteínas diferentes (Qin, 2002).

Arranjos de oncoproteínas como ferramentas promissoras na detecção de anticorpos antioncoproteínas no soro de pacientes

Com base nos achados abordados anteriormente de que muitos pacientes com cânceres possuem anticorpos contra uma série de oncoproteínas (como p53 e Myc), foram conduzidos estudos para detecção de um ou mais desses anticorpos nos soros de pacientes. Em um único estudo desse tipo, foi preparado um miniarranjo de até 7 oncoproteínas recombinantes de extensão completa, que incluiu oncoproteínas como Myc e p53.

Esse arranjo de oncoproteínas foi empregado para se detectar anticorpos em 527 soros de pacientes com 6 tipos diferentes de câncer (Zhang, 2003). A frequência de anticorpo contra qualquer oncoproteína era da ordem de 15 a 20%, mas a inclusão de todas as 7 oncoproteínas resultou em detecção de até 68%. Além disso, foram encontrados padrões distintos de expressão de anticorpos em pacientes com câncer de mama, pulmão e próstata, mas nenhum padrão diferenciado em pacientes com carcinomas gástrico, colorretal e hepatocelular.

Esses resultados animadores podem ser facilmente potencializados pela inclusão de mais oncoproteínas. Considerando-se os resultados previamente discutidos sobre os resultados na detecção de oncoproteínas isoladas, pareceria ainda mais eficaz elaborar arranjos de anticorpos contra o grande número de oncoproteínas conhecidas encontradas em pacientes com câncer, para analisar a presença de níveis elevados dessas proteínas e/ou de formas mutadas.

Abordagens proteômicas para detecção precoce de câncer no soro

As abordagens antes mencionadas para detecção de tumor baseiam-se no uso de oncoproteínas conhecidas expressas em proliferação celular descontrolada. Como alternativa, outras abordagens, sobretudo a assim chamada protêomica, descrita de forma ampla no próximo capítulo, foram desenvolvidas nos últimos anos para pesquisar pela manifestação de múltiplas proteínas (daí o termo "proteômica"), que ocorrem exclusivamente em cânceres humanos e não em células normais ou não malignas. Tais proteínas, então, são utilizadas para se detectar a presença de tumores em um estágio precoce. Essas técnicas envolvem eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida em extratos proteicos, obtidos de amostras de tecido e soro, que são marcados primeiramente com diferentes fluorocromos (Wulfkuhle, 2003). Os géis resultantes de pacientes com câncer são comparados com aqueles de indivíduos normais para se detectar as diferenças na marcação fluorescente. As bandas que se diferem são submetidas a eluição e espectrometria de massa para se determinar o peso molecular e os padrões de fragmentação.

Por fim, a espectroscopia de massa, cujos princípios estão descritos nos Capítulos 4 e 23, pode ser utilizada para se obter informações de sequências sobre essas proteínas. Pelo uso dessa técnica, a proteína RS/DI-1 que regula as interações proteína-RNA foi identificada como uma proteína circulante nos soros de pacientes com câncer de mama, mas não em indivíduos normais. Do mesmo modo, foi constatada a ocorrência da proteína PGP9.5 nos soros de pacientes com câncer de pulmão (Wulfkuhle et al., 2003).

Essa abordagem, portanto, tem-se mostrado promissora na identificação de marcadores exclusivos para diferentes tipos de câncer. No entanto, ela requer altas concentrações de proteínas para possibilitar a detecção nos géis bidimensionais, além de ser muito demorada. Apesar disso, é um método poderoso para a descoberta de proteínas exclusivas para tipos específicos de tumor.

Nos últimos 2 anos, foi traçada outra abordagem mais direta e mais sensível, capaz de detectar a presença de câncer no soro de pacientes afetados. Por esse método, os soros de pacientes são diretamentes aplicados a um chip, o que permite a separação parcial das proteínas na amostra. O chip, então, é submetido à espectrometria de massa por tempo de voo com ionização por dessorção a laser realçada por superfície (SELDI-TOF), conforme descrição no Capítulo 4. Isso produz um padrão complexo de fragmentos proteicos e iônicos proteicos com diferentes relações massa-carga (Wulfkuhle et al., 2003).

Os padrões dos soros de pacientes com câncer são comparados com aqueles de indivíduos normais, utilizando-se algoritmos computadorizados de reconhecimento de padrões (alguns deles se baseiam na teoria de redes neurais), capazes de distinguir padrões de câncer dos normais. De maior importância, os soros normais fornecem um "conjunto de amostras" de padrões que define o padrão normal, enquanto um segundo grupo de soros obtidos de pacientes com câncer conhecido define o conjunto de amostras do câncer (Wulfkuhle et al., 2003). O conceito de definição do perfil de pacientes com tipos diferentes de tumor é compatível com a discussão exposta anteriormente, pois foi observado que certos padrões de ocorrência de anticorpos antioncoproteicos no soro parecem caracterizar cânceres específicos.

A abordagem proteômica de reconhecimento de padrões foi aplicada a 25 pacientes com cânceres de ovário em todos os estágios e a um grupo de indivíduos não acometidos. Os soros foram analisados em um estudo cego. O método resultou na detecção de 100% das pacientes com câncer de ovário, inclusive 18 delas acometidas pela doença em estágio I (precoce). Todos os soros obtidos das pacientes não afetadas foram identificados como negativos para o câncer de ovário (Wulfkuhle et al., 2003). Os soros de pacientes com outros tipos de câncer, por sua vez, não podiam ser classificados pelo algoritmo, sugerindo que o câncer de ovário possuía um "perfil" proteico exclusivo.

Atualmente, foram obtidos resultados similares em pacientes com cânceres de mama e próstata. Em um único estudo, conduzido com o uso de algoritmo que incorporava um sistema de classificação por árvore de decisão, o método teve sensibilidade de 83% e especificidade de 97% na distinção entre soros de pacientes com câncer de próstata e soros daqueles com distúrbios não cancerosos como hipertrofia prostática benigna ou livres de doença. A sensibilidade podia ser aumentada para 100% pela incorporação de algum algoritmo mais robusto (Wulfkuhle et al., 2003).

Conforme foi mencionado no Capítulo 74, o antígeno prostatico-específico (PSA) é o marcador utilizado no diagnóstico de câncer de próstata; considera-se que o limite superior de normalidade do PSA seja de 4 ng/mL, mas a faixa de 4 a 10 ng/mL abrange muitos resultados falso-positivos. Dessa forma, esse método foi aplicado a pacientes com níveis séricos de PSA de 4 a 10 ng/mL. Foi constatado que tal método conseguia predizer com exatidão a ocorrência de câncer em 95% dos pacientes com valores de PSA nessa faixa e ainda detectar 70% (107 de 153 pacientes) daqueles acometidos por doença benigna, mas com níveis de PSA acima de 4 ng/mL (faixa superior de referência) (Wulfkuhle et al., 2003).

A abordagem proteômica parece, assim, ser altamente promissora. Os inconvenientes incluem a ausência de identidade de muitas das proteínas nos conjuntos de amostras. No caso de detecção do câncer de próstata, diferentes grupos que analisaram os soros de pacientes com esse tipo de câncer e de indivíduos não acometidos obtiveram padrões diagnósticos distintos de proteínas, mas em nenhum deles o PSA foi identificado (Diamandis, 2003). Entretanto, sabe-se que o PSA se encontra elevado em mais de 90% dos pacientes com câncer de próstata. Com isso, outras questões foram levantadas quanto à presença de moléculas proteicas importantes, como o PSA, em concentração suficientemente alta em uma amostra sérica para serem detectadas pelo método e se os padrões existentes realmente caracterizam o tecido prostático. Com a identificação das proteínas nos conjuntos de amostras, essas dúvidas deverão ser sanadas.

Detecção de oncogenes no soro e em outros líquidos corporais

Teste de ácido nucleico livre de células no câncer

Os marcadores tumorais proteicos e o estadiamento histopatológico constituem as bases do diagnóstico e prognóstico de processos malignos. Na última década, a descoberta de ácidos nucleicos livres de célula no soro, no plasma, na urina ou em outros líquidos corporais promoveu a investigação de oncogenes responsáveis pela codificação de oncoproteínas como meio de detectar a presença de malignidade em diversos cânceres com sensibilidade potencialmente maior (Schmidt, 2004), incluindo melanoma (Kopreski, 1999), câncer de pulmão (Fleishhacker, 2001; Schmidt, 2004), câncer de cólon (Silva, 2002), câncer de mama (Chen, 2000; Gal, 2001), câncer de próstata (Goessl, 2001, 2002), câncer de ovário (Hickey, 1999), linfomas positivos para o vírus Epstein-Barr (Lechowicz, 2002; Lei, 2002), neoplasias intracranianas (Rhodes, 1994) e câncer de bexiga (Goessl, 2001, 2002; Utting, 2002).

O conceito básico envolve a possibilidade de detecção de ácido nucleico derivado do tumor em fontes isentas de células, como soro, plasma, urina, líquido de lavado etc., utilizando-se métodos de amplificação, como RT-PCR. Normalmente, o DNA é isolado do tecido por meio de procedimentos-padrão, pela extração com fenol-clorofórmio seguida de precipitação com etanol. No entanto, o DNA também pode ser obtido diretamente do soro, do plasma ou de outros líquidos corporais por centrifugação, sendo assim separado das células e plaquetas. A metodologia de detecção do ácido nucleico livre da célula inclui a detecção de mutações gênicas, alterações de microssatélites e hipermetilação de promotores gênicos.

Mutações de genes

Essas mutações costumam envolver o sequenciamento de ácido nucleico e são capazes de detectar alterações de bases isoladas no DNA genômico ou mitocondrial (gDNA e mtDNA, respectivamente). O mtDNA pode ter de 20 a 200 cópias de DNA, em comparação com 2 cópias do gDNA. Foi detectada a presença de mtDNA mutado em 3 de 3 pacientes (100%) com câncer de próstata (Jeronimo, 2001), enquanto outros relataram uma taxa de detecção mais baixa de mtDNA em pacientes com câncer colorretal (Anker, 1997; Hibi, 2001). O DNA do tumor e aquele do plasma de 25 pacientes com câncer de mama ou câncer de células pequenas do pulmão foram analisados quanto à presença de mutações do gene p53. Seis pacientes exibiram mutações detectáveis em seu tecido, mas 3 desses 6 (50%) tiveram mutações detectadas em seu plasma (Silva, 1999). Além disso, apesar da detecção de mutações gênicas no tecido obtido de pacientes com processos malignos e outros saudáveis, isso não é verdadeiro para o plasma. As mutações detectadas no plasma são muito específicas para malignidade (Johnson, 2002).

Alterações de microssatélites

Os microssatélites são sequências repetitivas polimórficas de ácidos nucleicos, que variam de 2 a 6 pares de bases e formam estiramentos variáveis de DNA; tais estiramentos aparecem sob a forma de perda de heterozigosidade e são detectáveis por análise de microssatélites, utilizando-se a técnica de PCR. Um painel de 4 a 6 marcadores apropriados para detectar esses microssatélites pode ser utilizado para definição do perfil de tumores. A perda de heterozigosidade requer, no mínimo, 20% do DNA tumoral incorporado ao DNA normal. A instabilidade de microssatélites refere-se à detecção de produtos adicionais de PCR, o que exige uma relação de DNA tumoral:normal superior a 0,5% (Goessl, 2001, 2002). As análises de alterações de microssatélites conduzidas em amostras de lavado brônquico livre de células e obtidas de pacientes com câncer de pulmão revelaram a presença de genes associados ao tumor em 47% dos casos se o DNA fosse utilizado como o material de origem (n = 30) e em 100% se o RNA fosse usado como esse tipo de material (n = 25) (Schmidt, 2004). Além disso, foram detectados 4 loci de microssatélites nos soros de 17 dentre 34 pacientes com câncer de mama; a perda de heterozigosidade em vários locos foi observada em 16 pacientes, enquanto a instabilidade de microssatélites foi detectada em 1 paciente (Schwarzenbach, 2004). Contudo, não se constatou nenhuma correlação entre o DNA tumoral circulante e o nível do marcador proteico CA 15-3 associado ao tumor (Schwarzenbach, 2004) (ver capítulo sobre marcadores tumorais). Como a perda de heterozigosidade no plasma também foi encontrada em pacientes com câncer de bexiga recorrente, esse evento parece ser um marcador confiável nesse tipo de tumor (Dominguez, 2002).

Hipermetilação de promotores gênicos

A metilação de ilhas CpG, localizadas na região promotora de muitos genes, está associada com a inativação transcricional desses genes. Dessa forma, a hipermetilação aberrante de genes supressores tumorais essenciais pode permitir a expressão de oncogenes normalmente quiescentes. A técnica de PCR específica para metilação (MSP) é capaz de detectar a hipermetilação de promotores gênicos, enquanto a imuno-histoquímica consegue determinar a expressão reduzida de proteína. A MSP requer uma relação de DNA tumoral:normal de 0,1 a 0,001% (Goessl, 2001, 2002; Bearzatto, 2002). A metilação aberrante de, no mínimo, 1 de 4 genes supressores de tumor foi detectada em biópsias teciduais de 15 dentre 22 (68%) pacientes com câncer de células não pequenas de pulmão. Dos 15 pacientes com câncer positivo de células não pequenas de pulmão, 11 (73%) também tinham DNA metilado anormal em suas amostras séricas (Esteller, 1999). Além disso, 17 de 27 (63%) pacientes com câncer de bexiga exibiram alterações nos genes supressores de tumor em DNA derivado de célula e do soro (Dominguez, 2002).

É preciso ter cuidado na interpretação dos resultados obtidos de teste livre de células, pois podem variar dependendo do método de detecção (hipermetilação de promotores gênicos, rearranjos de genes, alterações de microssatélites, PCR, RT-PCR), da amostra testada (Lee, 2001) e da fonte de ácido nucleico utilizada (RNA, DNA) (Fleishhacker, 2001; Garcia, 2001; Johnson, 2002; Schmidt, 2004). Todavia, isso continua sendo uma nova e promissora modalidade para detecção precoce de câncer (Chan, 2002; Lechowicz, 2002).

Arranjos genéticos utilizados na detecção de anormalidades de oncoproteínas

Tem sido notada a facilidade de detecção do DNA circulante de oncogenes mutados no soro de pacientes com câncer (Sorenson et al., 1994; de Kok, 1997) e a identificação bem-sucedida de $p21^{ras}$ nas fezes de pacientes com câncer colorretal, da proteína p53 alterada na urina de pacientes com câncer de bexiga (Sidransky, 1991), bem como das moléculas ras, neu/HER2 e PDGF na bile de pacientes com câncer do trato biliar (Su et al., 2001), pelo método de PCR. Considerando-se a existência atual de microchips contendo genomas inteiros capazes de sofrer hibridização com o RNA total das células para detectar diferentes níveis de expressão gênica, estudos conduzidos com o uso de chips dotados de diferentes oncogenes podem ser eficazes para detectar a expressão de oncogenes específicos presentes nos líquidos corporais de pacientes com diferentes tipos de câncer.

Em um estudo recente feito no tecido de 20 carcinomas de células escamosas do esôfago (Arai, 2003), foi demonstrado que tais estudos são possíveis e praticáveis. Um total de 57 oncogenes estava presente no arranjo e incluiu muitos dos oncogenes discutidos aqui, tais como FGF, erb-B2 (neu/HER2) e myc. Em 9 das 20 amostras, a expressão de 8 oncogenes, incluindo erb-B2 e myc, era 2 a 4 vezes maior que no tecido-controle normal. A comparação desses resultados com aqueles obtidos com a utilização dos métodos convencionais de hibridização revelou que, com frequência, essa amplificação do gene não era atribuída a um aumento no número de cópias. Conforme mencionado anteriormente, o gene p53 muitas vezes sofre superexpressão e/ou mutação em carcinomas de células escamosas do esôfago, bem como em carcinomas de células escamosas da cabeça e do pescoço. Infelizmente, o p53 não foi adicionado a esse arranjo de genes. Além disso, esse estudo não incluiu os ensaios de hibridização para genes mutantes.

Apesar disso, esses estudos ilustram que os oncogenes frequentemente se encontram superexpressos em cânceres humanos e podem ser detectados em arranjos de genes. Os estudos mais precoces de PCR em líquidos corporais ilustram que os processos de amplificação e mutação gênica também podem ser facilmente detectados nesses líquidos corporais. Portanto, o arranjo genético contendo grande número de diferentes oncogenes, que possibilitem a realização de ensaios rápidos, parece ser bastante promissor na detecção de tumor em líquidos corporais.

Teste de DNA celular para câncer utilizando hibridização *in situ* por fluorescência

Essa técnica está descrita no Capítulo 69, sobre Citogenética. Em suma, as sondas de oligonucleotídeos de DNA contendo sequências que sabidamente ocorrem em cromossosmos específicos são incubadas com células concentradas a partir dos líquidos corporais, como sangue e urina. Essas sondas são assim elaboradas para que sofram hibridização com sequências específicas de DNA de ocorrência normal (natural) em cromossomos específicos ou com sequências conhecidas de junções cromossômicas de ocorrência anormal (geralmente, o resultado de translocações). As últimas costumam produzir proteínas mitogênicas superexpressas ou proteínas mitogênicas mutadas constitutivamente ativadas.

Um exemplo da aplicação dessa técnica está no diagnóstico de câncer de bexiga, para o qual um novo teste, o sistema de detecção Urovision (Vysis-Abbott Laboratories), foi desenvolvido e recém-aprovado pela FDA. Uma lesão cromossômica crítica e comum nessa doença consiste na deleção homozigota em 9p21 – talvez o achado genético mais constante em câncer de bexiga. Isso resulta em deleção de gene supressor de tumor, responsável pela codificação da proteína antioncogênica p16, culminando novamente em perda de controle da taxa mitótica (Halling, 2002, 2003).

Uma sonda de oligonucleotídeo, marcada com corante fluorescente dourado, foi desenvolvida para uma sequência de 9p21. Além disso, foram preparadas diversas outras sondas de oligonucleotídeos, ligadas a outros corantes fluorescentes coloridos, que sofrem hibridização com sequências específicas nos centrômeros de outros "cromossomos-controle". Uma mistura dessas sondas é incubada com células obtidas dos sedimentos urinários de pacientes e submetida à micros-

copia por fluorescência. Se as células estiverem normais, aparecerão manchas coloridas duplicadas decorrentes de cromossomos normais diploides.

Contudo, a ausência de uma ou de ambas as manchas amarelas para o cromossomo 9p21, mas a presença de manchas fluorescentes duplicadas para as sondas-controle, é uma forte indicação de deleção em 9p21 e da existência de câncer urotelial (mais provavelmente, bexiga). Deve-se notar que esse procedimento de hibridização também é capaz de detectar células epiteliais aneuploides malignas da bexiga (com múltiplas cópias de cromossomos) diretamente.

Esse método tem sensibilidade de 36, 76 e quase 100%, respectivamente, para cânceres de grau I, II e III, além de especificidade global de 97% (Halling, 2002, 2003). Tal método, portanto, tem grande potencial na detecção de câncer de bexiga, sobretudo se combinado com sondas para outras lesões genéticas que sabidamente ocorrem nessa doença, conforme discutido mais acima, no capítulo, sobre marcadores para câncer de bexiga. Ademais, foram preparadas múltiplas sondas para lesões cromossômicas conhecidas em diversos linfomas e leucemias; elas são promissoras para a detecção dessas doenças em líquidos corporais e tecido.

Avaliação e considerações finais

Existem vias bem definidas para transdução de sinal mitogênico entre a membrana e o núcleo das células. Essas vias consistem principalmente em proteínas, cujas mutações ou superexpressão podem dar origem à sinalização mitogênica descontrolada e ao câncer.

Eficácia diagnóstica de oncoproteínas séricas

Os resultados dos ensaios para as diferentes oncoproteínas, anteriormente mencionadas, no soro e na urina (NMP-22) estão resumidos na Figura 75.3, para diferentes tipos de tumor. A figura exibe gráficos tridimensionais do tipo de tumor (eixo y), do marcador tumoral (eixo x) e da porcentagem de casos de cada tipo de tumor detectado de forma bem-sucedida por cada marcador. Os resultados para cada marcador são fornecidos sob a forma de um gráfico de barras tridimensional especificamente colorido. A partir da Figura 75.3, fica claro, acerca das proteínas estudadas até o momento, que altas taxas de positividade ocorrem em certos cânceres, enquanto os grupos-controle, fornecidos ao lado de cada tipo de tumor com um "N" entre parênteses, demonstram taxas de positividade muito baixas. É interessante observar que, embora as oncoproteínas estudadas sejam provenientes das vias de transdução de sinal envolvidas em muitos tipos diferentes de célula, parece haver certa especificidade de expressão de oncoproteínas específicas para certos tipos de câncer.

Por exemplo, o fator de crescimento TGF-α encontra-se elevado em grande parcela de cânceres colorretal, cerebral e ovariano, enquanto o TGF-β se apresenta aumentado em cânceres hepatocelular, pulmonar e vesical. O DEC da proteína p185 (induzida pelo oncogene neu) exibe aumento nos soros de muitos pacientes com carcinomas mamários (em estágios mais avançados) (Fig. 75.3). A proteína $p21^{ras}$ está elevada em carcinomas colorretal e hepatocelular, angiossarcomas do fígado e cânceres de pulmão, ao passo que a proteína p53 está aumentada em cânceres colorretal e pulmonar, mas exclusivamente em cânceres orofaríngeos. Além disso, a elevação da p53 também é observada em alta proporção de linfomas. Ocorre aumento do anticorpo anti-myc em muitos cânceres de cólon e, vale ressaltar, em alta proporção de cânceres de próstata. Este último achado sugere a necessidade de investigação mais detalhada. Por exemplo, níveis séricos elevados de anti-myc podem auxiliar no diagnóstico definitivo de câncer de próstata em pacientes com PSA sérico aumentado.

É importante notar que, para essas proteínas, a sensibilidade de detecção de doença é alta e excede a de qualquer um dos antígenos oncofetais. Ademais, em todo estudo realizado até o momento, em alguns milhares de pacientes, a frequência de ocorrência desses fatores de crescimento e das oncoproteínas é muito baixa nos soros de indivíduos não acometidos por câncer. Portanto, a especificidade de uso dos fatores de crescimento e das oncoproteínas como marcadores tumorais também é relativamente alta. Essa conclusão não implica que a ausência de determinada oncoproteína no soro de algum paciente signifique a ausência de malignidade. Em virtude da natureza da carcinogênese em múltiplas etapas, existem muitas oncoproteínas potenciais que podem se tornar anormais. Por essa razão, qualquer uma das oncoproteínas ou grupo de outras oncoproteínas podem estar presentes no soro do paciente.

De fato, a Figura 75.3 também indica que a frequência de detecção de certas oncoproteínas nos soros de pacientes com determinado tipo de tumor pode ser relativamente baixa. Por exemplo, a partir da Figura 75.3A, foi constatada a elevação de c-Myc nos soros de cerca de 8% dos pacientes com câncer de mama. As baixas taxas de detecção dessa oncoproteína nesse tipo de tumor originam-se do grande número de possíveis etapas nas vias onde as proteínas ou os fatores de crescimento aberrantes podem ser produzidos. Assim, os tumores que ocorrem em determinado tecido podem ter múltiplas causas diferentes, que levam à produção de proteínas aberrantes distintas na cadeia.

O próximo passo, portanto, para utilizar esses marcadores oncoproteicos no diagnóstico precoce de câncer consiste em analisar múltiplos marcadores no soro de determinado paciente, já que a descoberta de, no mínimo, um componente aberrante da via de transdução de sinal se torna muito mais provável. Caso se encontre, pelo menos, um resultado positivo, o paciente poderá ser acompanhado em busca de sinais de desenvolvimento de tumor.

Conforme o que já foi discutido, houve grande progresso nessa área. Foram elaborados arranjos de genes e proteínas para múltiplos oncogenes e oncoproteínas, que têm conseguido aumentar a taxa de diagnósticos positivos de câncer nos pacientes. Além disso, o advento da abordagem proteômica/reconhecimento de padrões para detecção de câncer está se mostrando bem-sucedido em estudos nos quais tal abordagem foi testada até o momento, como no diagnóstico de cânceres de ovário, próstata e mama. A combinação desses dois métodos resultaria em altas recuperações diagnósticas; o uso de ambos seria possível e praticável, pois cada um deles pode ser realizado com rapidez.

Origens de processos malignos

A Figura 75.3 indica que a descoberta de nível elevado de alguma oncoproteína no soro do paciente geralmente não fornece informações conclusivas sobre a origem do processo maligno. Por exemplo, embora a $p21^{ras}$ esteja elevada, com certa especificidade, em cânceres de cólon e pulmão, bem como em angiossarcomas do fígado, e apesar de o DEC da p185 codificada pelo oncogene *neu*/HER-2 (c-*erbB*-2) também estar aumentado em cânceres de cólon, pulmão e mama, a elevação de uma dessas oncoproteínas no soro de algum paciente não permite a identificação exata do tecido de origem da malignidade. Como as vias de transdução de sinal em grande parte das células são notavelmente similares entre si, a elevação de qualquer oncoproteína pode significar a presença de processo maligno em uma série de tipos celulares diferentes. Por outro lado, com a utilização da abordagem proteômica, os padrões de proteínas séricas na espectrometria de massa SELDI-TOF são exclusivamente característicos de tumores específicos; dessa forma, essa abordagem é capaz de identificar o tecido de origem do tumor.

Além disso, muitos estudos sobre as correlações entre a presença de tumores e os níveis séricos de oncoproteínas ainda precisam ser realizados. Por exemplo, não há dados publicados sobre a ocorrência de formas detectáveis da proteína $p21^{ras}$ mutante no soro de pacientes com carcinoma pancreático em comparação a grupos-controle compostos por indivíduos de sexo e idade compatíveis e grupos de pacientes com pancreatite, mas sem tumores. Este é um estudo essencial, porque mais de 90% dos cânceres pancreáticos expressam a $p21^{ras}$ oncogênica (Almoguerra, 1988).

Uma maneira de utilização das oncoproteínas séricas para se detectar a presença de tumores específicos em um estágio precoce na evolução tumoral é nas populações que sabidamente estão sob risco de desenvolvimento de cânceres específicos a partir do histórico de exposição a carcinógenos ou mutágenos, como em caso de exposição ocupacional, ou a partir de condições médicas preexistentes, como no caso de exposição a cloreto de vinila associada com angiossarcoma do fígado e pneumoconioses associadas com câncer de pulmão. Ambas as condições são relacionadas com altos níveis séricos da proteína $p21^{ras}$; a última também está vinculada com altos níveis séricos da $p185^{neu}$.

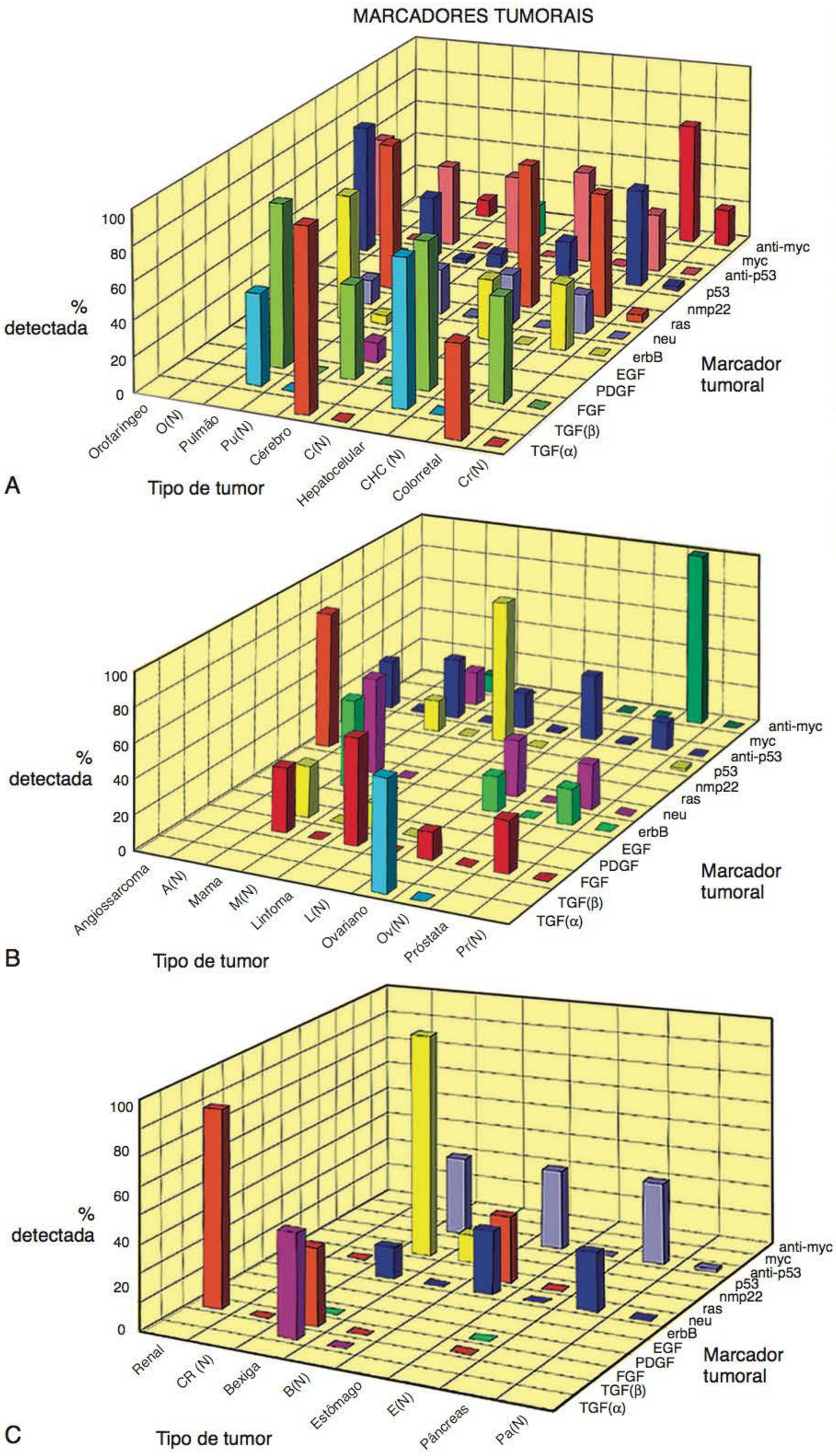


Figura 75.3 Resumo dos resultados de ensaios séricos para diferentes componentes das vias de sinalização mitogênica. Nesta figura estão representados gráficos tridimensionais com o tipo de tumor no eixo das abscissas (X) e o componente da via no eixo das ordenadas (Y), bem como a porcentagem detectada ou a frequência de encontro de cada um dos componentes da via, elevado no soro de pacientes com cada tipo tumoral no eixo perpendicular (Z). Próximos aos resultados para cada tipo de tumor, os resultados para os grupos-controle estão indicados como "N" para "normais", ou seja, controles de idade e sexo compatíveis, que estavam livres de tumor. Os controles de pacientes com cada tipo de tumor estão abreviados por uma única letra (com "N" entre parênteses) para cada tipo tumoral, como "C" para cérebro no gráfico A. TGF_{α} = fator transformador do crescimento-α; TGF_{β} = fator transformador do crescimento-β; FGF = fator de crescimento de fibroblastos; PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas; EGF = fator de crescimento epidérmico; *erbB* = receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF); neu = a proteína p185 que é similar à proteína *erbB* e também é conhecida como erbB-2 e HER-2; ras = a proteína p21; NMP-22 = proteína da matriz nuclear número 22; p53 = uma proteína antioncogênica; anti-p53 = anticorpo anti-p53; *myc* = um oncogene nuclear que codifica a proteína Myc; anti-Myc = anticorpo antiproteína Myc.

Tamanho do tumor e níveis de oncoproteínas

Atualmente, há pouca informação sobre o volume tumoral mínimo que dá origem a elevações séricas de oncoproteínas. Contudo, há indícios de que pequenas lesões possam produzir níveis significativos de certas oncoproteínas. Em primeiro lugar, em um número significativo de pacientes com riscos conhecidos de câncer, as oncoproteínas eram descobertas nos soros desses indivíduos antes do desenvolvimento de câncer detectável. Assim, em pacientes com asbestose, o DEC da proteína $p185^{erbB}$ ficava elevado antes do diagnóstico de tumores de pulmão. A superexpressão do DEC da p185 ocorria em diversos pacientes antes do diagnóstico de câncer de mama. Os pacientes do Leste Asiático que tinham altos níveis séricos de DEC da p185 passavam a desenvolver carcinoma hepatocelular. Foi constatado que os pacientes com pneumoconioses apresentavam níveis elevados da proteína p21 e/ou de DEC da p185 e, subsequentemente, desenvolviam carcinomas de pulmão. A proteína p21 mutante (Asp 13-) foi descoberta no soro de uma porcentagem

muito alta de pacientes expostos ao cloreto de vinila que, posteriormente, desenvolveram angiossarcoma. Foram encontrados anticorpos anti-p53 nos soros de indivíduos com subsequente desenvolvimento de angiossarcomas ou cânceres de pulmão. Todos esses estudos sugerem que lesões malignas indetectáveis por técnicas convencionais podem ser percebidas pela mensuração dos níveis séricos de oncoproteínas ou anticorpos contra oncoproteínas, sobretudo em pacientes com exposições ou fatores de risco conhecidos para o câncer.

Em segundo lugar, parece haver uma boa correlação em alguns pacientes entre os níveis séricos de marcadores oncoproteicos e o volume do tumor e/ou o nível de expressão do marcador no tecido tumoral em si. Nesse sentido, foi descoberto que alguns adenomas pequenos (< 1 cm) dão origem a níveis elevados de $p21^{ras}$ ou de DEC da p185 nos soros desses pacientes. Tanto para a proteína $p21^{ras}$ quanto para o DEC da proteína $p185^{erbB}$ há uma excelente correlação entre o nível sérico desses marcadores e o estado clínico pré e pós-terapêutico do paciente. Apesar disso, um número consideravelmente maior de estudos sobre a correlação entre o volume do tumor e o nível sérico de oncoproteínas ainda precisa ser realizado. Pode ser conflitante, contudo, o fato de um pequeno tumor ser capaz de produzir grandes quantidades de marcador, enquanto tumores mais volumosos geram quantidades menores do marcador. Sobre esse aspecto, destaca-se que as oncoproteínas sofrem aumento em uma grande proporção de carcinomas in situ, conforme evidenciado por altos níveis séricos da proteína $p185^{neu}$ em câncer de mama incipiente e da NMP22 em carcinoma in situ da bexiga.

Apesar das advertências prévias nas interpretações de aumentos dos níveis séricos de oncoproteínas ou da detecção de formas anormais dessas proteínas no soro e da necessidade de mais estudos sobre correlação, as análises quanto à presença de oncoproteínas no soro mostram-se excepcionalmente promissoras em termos de detecção de tumores malignos em um estágio precoce, bem como para o monitoramento de sua evolução, resposta à terapia, remissão e recorrência.

Referências bibliográficas

Adler V, Pincus MR, Brandt-Rauf PW, Ronai Z: Complexes of ras-p21 with jun-N-kinase and c-jun proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:10585–10589.

Adler V, Pincus MR, Minamoto T, et al: Conformation-dependent phosphorylation of p53. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 94:1686–1691.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al: Most human carcinomas of the endocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell 1988; 53:549–554.

Amar S, Glozman A, Chung DL, et al: Selective inhibition of oncogenic ras-p21 in vivo by agents that block its interaction with jun-N-kinase (JNK) and jun proteins. Implications for the design of selective chemotherapeutic agents. Cancer Chemother Pharmacol 1997; 41:79–85.

Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, et al: Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. Int J Cancer 1994; 58:480–487.

Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, et al: K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. Gastroenterology 1997; 112:1114–1120.

Arai H, Ueno T, Tangoku A, et al: Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis. Cancer Genet Cytogenet 2003; 146:16–21.

Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR: Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression. Breast Cancer Res Treat 1991; 20:11–17.

Barbacid M: Ras genes. Ann Rev Biochem 1987; 56:779–827.

Bearzatto A, Conte D, Frattini M, et al: $p16^{INK4A}$ hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2002; 8:3782–3787.

Bhatavdekar JM, Patel DD, Vora HH, et al: Circulating markers and growth factors as prognosticators in men with advanced tongue cancer. Tumour Biol 1993; 14: 55–58.

Brandt-Rauf PW: Oncogene proteins as biomarkers in the molecular epidemiology of occupational carcinogenesis: the example of the ras oncogene-encoded p21 protein. Int Arch Occup Environ Health 1991; 63:1–8.

Brandt-Rauf PW, Chen JM, Marion M-J, et al: Conformational effects in the p53 protein of mutations induced during chemical carcinogenesis: molecular dynamic and immunologic analyses. J Protein Chem 1996; 15:367–375.

Brandt-Rauf PW, Luo JC, Carney WP, et al: The detection of increased amounts of the extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein in serum during pulmonary carcinogenesis in humans. Int J Cancer 1994a; 56:383–386.

Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP: The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. Crit Rev Oncog 1994b; 5:313–329.

Brandt-Rauf PW, Pincus MR: Molecular markers of carcinogenesis. Pharmacol Ther 1998; 77:135–148.

Esta referência é uma revisão das oncoproteínas importantes que se revelam como marcadores para detecção precoce de tumor ou que se mostram muito promissoras como biomarcadores para detecção precoce de câncer.

Brandt-Rauf PW, Rackovsky S, Pincus MR: Correlation of the transmembrane domain of the neu oncogene-encoded p185 protein with its function. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:8660–8675.

Brandt-Rauf PW, Smith S, Hemminki K, et al: Serum oncoproteins and growth factors in asbestosis and silicosis patients. Int J Cancer 1992; 50:881–885.

Brattstrom D, Bergvist M, Larsson A, et al: Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients. Anticancer Res 1998; 18:1123–1127.

Breuer B, DeVivo I, Luo JC, et al: erbB-2 and myc oncoproteins in sera and tumors of breast cancer patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3:63–66.

Breuer B, Luo JC, DeVivo I, et al: Detection of elevated c-erbB-2 oncoprotein in the serum and tissue in breast cancer. Med Sci Res 1993; 21:383–384.

Carney WP, Hamer PJ, Petit D, et al: Detection and quantitation of the human neu oncoprotein. Tumor Marker Oncol 1991; 6:53.

Chakrabarty S, Huang S, Moskal TL, et al: Elevated serum levels of transforming growth factor-alpha in breast cancer patients. Cancer Lett 1994;79:157–160.

Chan KC, Lo YM: Circulating nucleic acids as a tumor marker. Histol Histopathol 2002; 17:937–943.

Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, et al: Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. Clin Cancer Res 2000; 6:3823–3826.

Coltrera MD, Wang J, Porter PL, Gown AM: Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma. Cancer Res 1995; 55:2703–2708.

De Kok JB, van Solinge WW, Ruers TJ, et al: Detection of tumor DNA in serum of colorectal cancer patients. Scand J Clin Lab Invest 1997; 57:601–604.

DeVivo I, Marion MJ, Smith SJ, et al: Mutant c-Ki-ras p21 protein in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl chloride. Cancer Causes Control 1994; 5:273–278.

Diamandis, E.P. Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? Clin Chem 2003; 49: 1272–1275.

Dominguez G, Carballido J, Silva J, et al: p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. Clin Cancer Res 2002; 8:980–985.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. Cancer Res 1999; 59:67–70.

Field JK, Spandidos DA: The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis. Anticancer Res 1990; 10:1–22.

Fleischhacker M, Beinert T, Ermitsch M, et al: Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. Ann NY Acad Sci 2001; 945:178–188.

Fontanini G, Fiore L, Bigini D, et al: Levels of p53 antigen in serum of non-small lung cancer patients correlate with positive p53 immunohistochemistry on tumor sections, tumor necrosis and nodal involvement. Int J Oncol 1994; 5:553.

Forester K, Almoguera C, Han K, et al: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature 1987; 327:298–303.

Fujimoto K, Ichimori Y, Kakizoe T, et al: Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal cell carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 1991; 180:386–392.

Gal S, Fidler C, Lo YM, et al: Detection of gammaglobin mRNA in the plasma of breast cancer patients. Ann N Y Acad Sci 2001; 945:192–194.

Garcia JM, Silva JM, Domiguez G, et al: Heterogeneous tumour clones as an explanation of discordance between plasma DNA and tumor DNA alterations. Genes Chromosomes Cancer 2001; 31:300–301.

Geddert H, Zeriouh M, Wolter M, et al: Gene amplification and protein overexpression of c-erb-b2 in Barrett carcinoma and its precursor lesions. Am J Clin Pathol 2002; 118:60–66.

Goessl C, Muller M, Heicappell R, et al: DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. Ann NY Acad Sci 2001; 945:51–58.

Goessl C, Muller M, Straub B, et al: DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. Eur Urol 2002; 41:668–676.

Halling KC, King W, Sokolova IA, et al: A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. J Urol 2002; 167:2001–2006.

Esta referência consiste em uma revisão e avaliação, ambas abrangentes de diferentes marcadores para câncer de bexiga, que enfatiza o valor da técnica de FISH (hibridização in situ *por fluorescência) como método de detecção desse tipo de câncer.*

Halling KC: Vysis UroVysion for the detection of urothelial cancer. Expert Rev Mol Diagn 2003; 3:507–519.

Hamer PJ, LaVecchio J, Ng S, et al: Activated Val-12 ras p21 in cell culture fluids and mouse plasma. Oncogene 1991; 6:1609–1615.

Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, et al: Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients. Int J Cancer 2001; 94:429–431.

Hickey KP, Boyle KP, Jepps HM, et al: Molecular detection of tumour DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. Br J Cancer 1999; 80:1803–1808.

Hioki O, Watanabe A, Minemura M, et al: Clinical significance of serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases. J Med 1993; 24:35–46.

Holt KH, Kasson BG, Pessin JE: Insulin stimulation of MEK-dependent but ERK-independent SOS protein kinase. Mol Cell Biol 1996; 16:577–583.

Hughes JH, Cohen MB: Nuclear matrix proteins and their potential applications to diagnostic pathology. Am J Clin Pathol 1999; 111:267–274.

Hwang YH, Choi JY, Kim S, et al: Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatol Res 2004; 29:113–121.

Ii M, Yoshida H, Aramaki Y, et al: Improved enzyme immunoassay for human basic fibroblast growth factor using a new enhanced chemiluminescence system. Biochem Biophys Res Commun 1993; 193:540–545.

Jeronimo C, Nomoto S, Caballero OL, et al: Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. Oncogene 2001; 20:5195–5198.

Johnson PJ, Lo YM: Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. Clin Chem 2002; 48:1186–1193.

Kath R, Hoffken K, Otte C, et al: The neu-oncogene product in serum and tissue of patients with breast carcinoma. Ann Onco 1993;l 4:585–590.

Katoh M, Inagaki H, Kurosawa-Ohsawa K, et al: Detection of transforming growth factor alpha in human urine and plasma. Biochem Biophys Res Commun 1990; 167:1065–1072.

Kaur J, Srivastava A, Ralhan R: Serum p53 antibodies in patients with oral lesions: correlation with p53/HSP70 complexes. Int J Cancer 1997; 74:609–613.

Klocker EI, Stenzl A, Cronauer MV, et al: Quantitative determination of transforming growth factor-alpha in serum and urine in patients with bladder cancer and its expression in malignant and non-malignant primary epithelial cells. Proc Am Assoc Cancer Res 1994; 35:A261.

Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, et al: Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. Clin Cancer Res 1999; 5:1961–1965.

Kurobe M, Takei Y, Ezawa H, et al: Increased level of basic fibroblast growth factor (bFGF) in sera of patients with malignant tumors. Horm Metab Res 1993; 25:395–396.

Landman J, Chang Y, Kavaler E, et al: Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase and BTA in the detection of human bladder cancer. Urology 1998; 52:398–402.

Lechowicz MJ, Lin L, Ambinder RF: Epstein–Barr virus DNA in body fluids. Curr Opin Oncol 2002; 14:533–537.

Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, et al: Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. Transfusion 2001; 41:276–282.

Lei KI, Chan LY, Chan WY, et al: Diagnostic and prognostic implications of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in natural killer/T-cell lymphoma. Clin Cancer Res 2002; 8:29–34.

Li Y, Karjalainen A, Koskinen H, et al: p53 Autoantibodies predict subsequent development of cancer. Int J Cancer 2004; 114:157–160.

Lindmark G, Sundberg C, Glimelius B, et al: Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer. Lab Invest 1993; 69:682–689.

Luo JC, Yu MW, Chen CJ, et al: Serum c-erbB-2 oncopeptide in hepatocellular carcinogenesis. Med Sci Res 1993; 21:305.

Miyanaga N, Akaza H, Ishikawa S, et al: Clinical evaluation of nuclear matrix protein 22 (NMP22) in urine as a novel marker for urothelial cancer. Eur Urol 1997; 31:163–168.

Miyanaga N, Akaza H, Tsukamoto S, et al: Usefulness of urinary NMP22 to detect tumor recurrence of superficial bladder cancer after transurethral resection. Int J Clin Oncol 2003; 8:369–373.

Molina R, Jo J, Filella X, et al: C-erb-B oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. Anticancer Res 1996; 16:2295–2300.

Monstein HJ, Fransen K, Dimberg J, et al: K-ras and B-raf gene mutations are not associated with gastrin- and CCK2-receptor mRNA expression in human colorectal tumour tissues. Eur J Clin Invest 2004; 34:100–106.

Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A: Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. Science 1993; 260:1658–1661.

Mori S, Mori Y, Mukaiyama T, et al: In vitro and in vivo release of soluble erbB-2 protein from human carcinoma cells. Jpn J Cancer Res 1990; 81:489–494.

Mutch DG, Powell MA, Mallon MA, et al: RAS/RAF mutation and defective DNA mismatch repair in endometrial cancers. Am J Obstet Gynecol 2004; 190:935–942.

Nedvidkova J, Nemec J, Stolba P, et al: Epidermal growth factor (EGF) in serum of patients with differentiated carcinoma of thyroids. Neoplasma 1992; 39:11–14.

Niman HL, Thompson AM, Yu A, et al: Anti-peptide antibodies detect oncogene-related proteins in urine. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:7924–7928.

Pawlikowski M, Cicslak D, Stepien H, et al: Elevated blood serum levels of epidermal growth factor in some patients with gastric cancer. Endokrynol Pol 1989; 40:149–153.

Pimentel E: Oncogenes, 2nd ed. Boca Raton, FL, CRC Press, 1989.

Pincus MR, Brandt-Rauf PW, Michl J, et al: ras-p21-induced cell transformation: Unique signal transduction pathways and implications for the design of new chemotherapeutic agents. Cancer Invest 18:39–50, 2000.

Pincus MR: Development of new anti-cancer peptides from conformational energy analysis of the oncogenic Ras-p21 protein and its complexes with target proteins. Front Biosci 2004; 9:3486–3509.

Pincus MR, Chung D, Dykes DC, et al: Pathways for activation of the ras-oncogene-encoded p21 protein. Ann Clin Lab Sci 1992; 22:323–342.

Pincus MR, Friedman FK: Oncoproteins in the detection of human malignancies. Mol Diagn 2003; 1:23–38.

Esta referência é uma revisão de oncoproteínas como marcadores para detecção precoce de tumor, com ênfase nas oncoproteínas como componentes das vias de transdução de sinal.

Qin LX, Tang ZY: The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2002; 8: 385–392.

Rhodes CH, Honsinger C, Sorenson GD: Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid. J Neuropathol Exp Neurol 1994; 53:375–368.

Rosanelli GP, Wirnsberger GH, Purstner P, et al: DNA flow cytometry and immunohistochemical demonstration of mutant p53 protein versus TPS and mutant p53 protein serum levels in human breast cancer. Proc Am Assoc Cancer Res 1993; 34:A1353.

Ryder SD, Rizzi PM, Volkmann M, et al: Use of a specific ELISA for the detection of antibodies directed against p53 protein in patients with hepatocellular carcinoma. J Clin Pathol 1996; 4:295–299.

Schmidt B, Carstensen T, Engel E, et al: Detection of cell-free nucleic acids in bronchial lavage fluid supernatants from patients with lung cancer. Eur J Cancer 2004; 40:452–460.

Schwarzenbach H, Muller V, Stahmann N, et al: Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022:25–32.

Segawa Y, Kageyama M, Suzuki S, et al: Measurement and evaluation of serum anti-p53 antibody levels in patients with lung cancer at its initial presentation: a prospective study. Br J Cancer 1998; 78:667–672.

Esta referência é um estudo valioso sobre o uso de anticorpos anti-p53 como meio de detecção de cânceres de pulmão.

Shariat SF, Casella R, Monoski MA, et al: The addition of urinary urokinase-type plasminogen activator to urinary nuclear matrix protein 22 and cytology improves the detection of bladder cancer. J Urol 2003; 170:2244–2247.

Shimada H, Nakajima K, Ochiai T, et al: Detection of serum p53 antibodies in patients with esophageal squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological features and tumor markers. Oncol Rep 1998; 5:871–874.

Shirai Y, Kawata S, Ito N, et al: Elevated levels of plasma transforming growth factor-beta in patients with hepatocellular carcinoma. Jpn J Cancer Res 1992; 83:676–679.

Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al: Identification of p53 gene mutation in bladder cancers and urine samples. Science 1991; 252:706–709.

Silva JM, Gonzalez R, Dominguez G, et al: TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. Genes Chromosomes Cance 1999;r 24:160–161.

Silva JM, Rodriguez R, Garcia JM, et al: Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. Gut 2002; 50:530–534.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies on the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244:707–712.

Este trabalho é um material de referência que definiu o gene HER-2/neu como importante fator na causa de câncer de mama e seu uso como fator prognóstico quanto à evolução da doença.

Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al: Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3:67–71.

Soussi T, Legros Y, Lubin R, et al: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. Int J Cancer 1994; 57:1–9.

Stoehr R, Brinkmann A, Filbeck T, et al: No evidence for mutation of B-RAF in urothelial carcinomas of the bladder and upper urinary tract. Oncol Rep 2004; 11:137–141.

Stokoe D, MacDonald SG, Cadwallader K, et al: Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. Science 1994; 275:1463–1467.

Su WC, Shiesh SC, Liu HS, et al: Expression of oncogene products, HER2/Neu and Ras and fibrosis-related factors bFGF, TGF-beta and PDGF in bile from biliary malignancies and inflammatory disorders. Dig Dis Sci 2001; 46: 1387–1392.

Tomiya T, Fujiwara, K: Serum transforming growth factor-alpha level as a marker of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. Cancer 1996; 77:1056–1060.

Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, et al: Urinary transforming growth factor-beta 1 in relation to serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. Scand J Gastroenterol 1997; 32:254–260.

Utting M, Werner W, Dahse R, et al: Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. Clin Cancer Res 2002; 8:35–40.

Virji MA, Rosendale B, Piper M, et al: Circulating levels of a mutant p53 protein in patients with hepatocellular carcinoma. Proc Am Assoc Cancer Res 1992; 33:A1508.

Vlasoff DM, Baschinsky DY, De Young BR, et al: C-erb B2 (Her2/neu) is neither overexpressed nor amplified in hepatic neoplasms. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002; 10:237–241.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell 2004; 116:855–867.

Weissfeld JL, Larsen RD, Niman HL, et al: Evaluation of oncogene-related proteins in serum. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3:57–62.

Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, et al: V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. Cancer Res 2004; 75:2338–2342.

Wu JT, Astill ME, Zhang P: Detection of the extracellular domain of c-erbB-2 oncoprotein in sera from patients with various carcinomas: correlation with tumor markers. J Clin Lab Anal 1993; 7:31–40.

Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF: Proteomic applications for the early detection of cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 267–275.

Esta referência é uma revisão escrita em linguagem clara sobre diferentes abordagens proteômicas na detecção de câncer em amostras sanguíneas e explica as bases dessas abordagens que possibilitam uma boa compreensão de cada método.

Yazici H, Altun M, Hafiz G, et al: Serum and tissue c-erb B2, bcl-2, and mutant p53 oncoprotein levels in nasopharyngeal cancer. Cancer Invest 2001; 19:773–778.

Yeh J, Yeh JC: Transforming growth factor-alpha and human cancer. Biomed Pharmacother 1989; 43:651–659.

Yu MW, Chen CJ, Luo JC, et al: Correlations of chronic hepatitis B virus infection and cigarette smoking with elevated expression of neu oncoprotein in the development of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 1994a; 54:5106–5110.

Yu MW, Luo JC, Brandt-Rauf PW, et al: Correlations of chronic hepatitis B virus infection and cigarette smoking with elevated expression of the neu oncoprotein in the development of hepatocellular carcinoma. Proc Am Assoc Cancer Res 1994b; 35:A1754.

Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, et al: Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12:136–143.

Importante artigo que revela a maior eficácia do uso de perfis de oncoproteínas no sangue e em líquidos corporais sobre o emprego de oncoproteínas isoladas na detecção de câncer.

CAPÍTULO 76

Impacto diagnóstico e prognóstico de tecnologias genômicas e proteômicas de alto desempenho na era pós-genômica

Jennifer Beane BA BE, Aran Kadar MD, Charles DeLisi PhD, Martin H. Bluth MD PhD, Avrum Spira MD PhD

Introdução 1565
O Projeto Genoma Humano 1566
Esforço público de sequenciamento (sequenciamento hierárquico por fragmentos aleatórios [*shotgun*]) 1566
Esforço privado de sequenciamento (sequenciamento de todo o genoma por fragmentos aleatórios [*shotgun*]) 1567
Finalização da sequência do genoma humano 1567
Tecnologias de alto desempenho 1568
Tecnologia genômica 1568
Tecnologia proteômica 1572
Marcadores moleculares para o diagnóstico de neoplasia humana 1573
Marcadores genômicos 1573
Tecnologia proteômica 1575
Marcadores moleculares prognósticos de doença 1576
Genômica 1576
Integração de tecnologias genômicas e proteômicas: o câncer pulmonar como o novo paradigma 1578
Armadilhas de marcadores moleculares em termos de prognóstico e diagnóstico 1578
Discordância entre conjunto de dados relacionados de microarranjos de DNA 1578
Overfitting do preditor 1579
O efeito *bystander* 1579
Limitações das técnicas proteômicas 1579
Considerações finais e desafios futuros 1579
Referências bibliográficas 1580

PONTOS-CHAVE

- A recente conclusão do projeto genoma humano forneceu aos cientistas um mapeamento detalhado do genoma humano e as regiões de codificação previstas, que facilitaram o surgimento de tecnologias genômicas e proteômicas de alto desempenho.
- Existe uma série de plataformas desenvolvidas para a definição do perfil de expressão gênica no tecido humano, incluindo a análise seriada da expressão gênica (SAGE, *serial analysis of gene expression*), os microarranjos de DNA e a reação em cadeia da polimerase competitiva real.
- As tecnologias proteômicas emergentes, abrangendo a espectrometria de massa e os arranjos de proteínas, começaram a explorar a composição proteica complexa e dinâmica de tecido humano saudável e enfermo.
- As tecnologias de microarranjo de DNA e SAGE identificaram as assinaturas diagnósticas de expressão gênica para uma série de processos malignos, hematológicos e maciços que, frequentemente, são de difícil distinção com o uso de análise histológica tradicional.
- Os perfis prognósticos de expressão gênica e proteica foram identificados em um grande número de quadros de câncer, como linfoma, câncer de pulmão, câncer de mama e leucemia mieloide aguda.
- São necessárias a validação dos métodos em grandes ensaios clínicos, a padronização das técnicas e dos controles, bem como a inclusão de padrões analíticos, antes da implementação clínica disseminada dessas tecnologias.

Introdução

Com a recente elucidação da sequência completa do genoma humano e de outros genomas, testemunhou-se uma explosão de informações e ferramentas de alto desempenho, que estão alterando profundamente as pesquisas biomédicas e a cultura científica. Essa revolução, que começou em meados dos anos 1980, surgiu a partir do desenvolvimento de três áreas: biologia molecular, em especial os avanços no rápido sequenciamento do DNA; tecnologia da informação, em particular a capacidade de armazenar e analisar a quantidade de dados sem precedentes; e – de maior importância – progresso na genética humana, sobretudo a identificação de milhares de distúrbios humanos em um único gene. A convergência desses avanços tecnológicos e científicos suscita a promessa da rápida identificação de genes relacionados a doenças, levando à melhoria nos testes diagnósticos e ao surgimento de terapias mais eficazes.

Mapeamentos detalhados do genoma humano e de outros genomas fornecem as informações necessárias para traçar um caminho rumo à compreensão e ao tratamento de muitas doenças. Esse caminho, no entanto, continua sendo longo e difícil. Embora o progresso surja com maior facilidade para os distúrbios que seguem os padrões de herança mendeliana, até esses distúrbios apresentam dificuldades expressivas. Por exemplo, embora a biologia e a genética de anemia falciforme sejam, de forma razoável, bem-compreendidas por mais de meio século – um único aminoácido valina substitui o ácido glutâmico na posição 6 na cadeia beta da hemoglobina –, o desenvolvimento de terapia eficaz ainda está lento. A penetrância de doenças genéticas que, supostamente, são atribuídas a mutações isoladas, conta muitas vezes com interações mais complexas entre a mutação e uma variedade de polimorfismos genéticos concomitantes, como aqueles observados nos genes codificadores de proteínas de superfície nas células endoteliais de vênulas pós-capilares que, em parte, são responsáveis pela gravidade da anemia falciforme.

Muitas doenças comuns, em particular as doenças cardiovasculares, os distúrbios mentais e quase todos os cânceres, originam-se de causas multigênicas. Além disso, essas doenças invariavelmente possuem fortes componentes ambientais, representando um desafio considerável para o desenvolvimento de testes diagnósticos e prognósticos eficazes e econômicos. Mesmo na ausência de influência ambiental de confusão, relacionar o fenótipo quantificável de alguma doença a um conjunto de alelos distintos é uma tarefa complexa. Para complicar ainda mais a situação, muitos distúrbios não têm fenótipos quantificáveis bem definidos.

Em um capítulo repleto de tecnologias promissoras, fizeram-se essas observações decepcionantes para enfatizar que uma maior compreensão nunca garante a descoberta de curas ou o desenvolvimento de terapias. Contudo, a maior compreensão auxilia o desenvolvimento de estratégias racionais para detectar e controlar as doenças. O genoma de referência permite a caracterização rápida de polimorfismos em toda a população humana, mas também possibilita o desenvolvimento de tecnologias moleculares de *fingerprinting*, que permitem a identifi-

cação dos precursores e das consequências de alterações fisiológicas e patológicas na expressão gênica e proteica. Os autores deste capítulo estão confiantes e convencidos de que o potencial de tecnologias genômicas vai muito além de qualquer tecnologia antes disponível e que, durante as próximas décadas, elas tornarão possível o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para o câncer e outras doenças comuns, alterando bastante a prática médica.

O presente capítulo concentra-se em uma série de tecnologias genômicas e proteômicas de alto desempenho, com o potencial de exercer impacto sobre a classificação e o prognóstico de doenças (Fig. 76.1). Essas ferramentas moleculares têm afetado praticamente todas as formas de doença humana. No entanto, considerando as implicações à saúde pública e a predominância de publicações recentes na área, concentrou-se nas aplicações diagnósticas e prognósticas relacionadas ao câncer. Após uma breve revisão do Projeto Genoma Humano e das consequentes tecnologias de alto desempenho, foram discutidos exemplos de aplicações em diversos processos malignos hematológicos e maciços. O objetivo do capítulo ficou restrito às tecnologias de alto desempenho e, portanto, não representa um panorama abrangente de todas as tecnologias que estão sendo utilizadas em estudos genômicos e proteômicos clínicos. Além disso, dentro das tecnologias apresentadas, algumas receberam maior destaque por conta de seu uso disseminado. À medida que maior quantidade de dados for coletada com o uso das tecnologias, estratégias que combinem o conjunto de dados podem vir a ser poderosas abordagens para o desenvolvimento de ferramentas clínicas precisas. Além de medir os níveis de expressão gênica e proteica, a compreensão da variação genética humana no DNA será importante para elucidar os marcadores e mecanismos das doenças. Entretanto, uma discussão das tecnologias de genotipagem de alto desempenho para analisar polimorfismos de nucleotídeo único vai além do escopo deste capítulo (para uma revisão, ver Syvanen, 2001).

O Projeto Genoma Humano

Esforço público de sequenciamento (sequenciamento hierárquico por fragmentos aleatórios [*shotgun*])

O sequenciamento do genoma humano foi um projeto de 15 anos, que custou 3 bilhões de dólares e teve início em 1990 como um esforço conjunto entre o US Department of Energy e os National Institutes of Health (Collins, 2003). Desde a concepção do projeto até 1995, foram elaborados mapas físicos e genéticos dos genomas do ser humano e do camundongo e sequenciados os genomas de leveduras e vermes. Esses projetos iniciais, aliados com avanços na tecnologia de sequenciamento e análise de dados de sequência, traçaram estratégias e técnicas altamente eficazes em termos de custo, ao mesmo tempo em que demonstraram a praticabilidade e a viabilidade de sequenciar o genoma humano. Em março de 1999, o esforço para sequenciar o genoma humano começou de forma intensa e ficou determinado que ele fosse concluído em duas fases – a primeira fase envolveria a conclusão de uma sequência de esboço, enquanto a segunda seria uma fase de finalização para solucionar as regiões mal-agrupadas e preencher as lacunas da sequência. Por volta de junho de 2000, os centros envolvidos no projeto estavam produzindo dados brutos da sequência em uma taxa de cerca de 1.000 nucleotídeos por segundo, 24 horas por dia, 7 dias por semana (Lander, 2001).

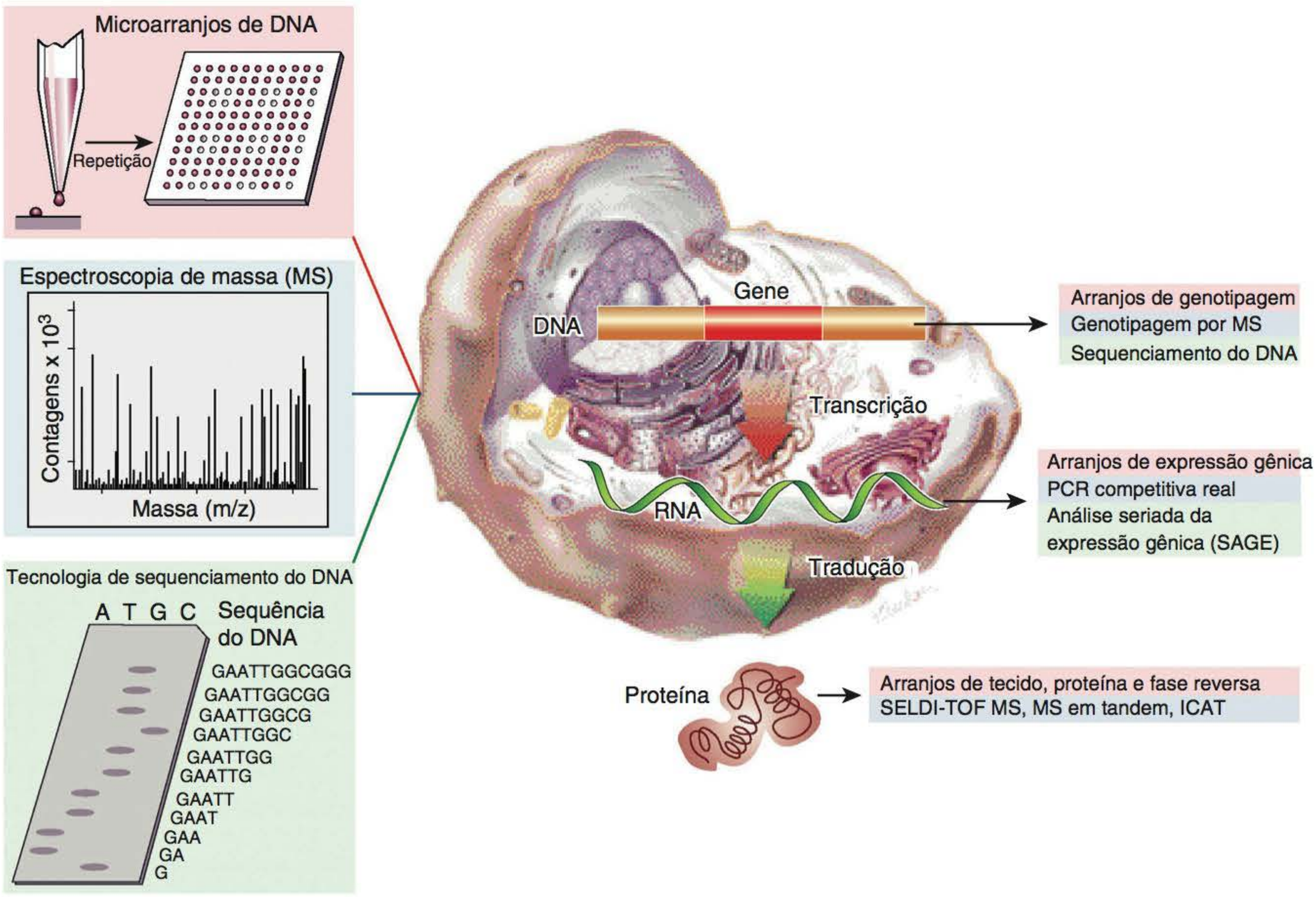


Figura 76.1 As plataformas de alto desempenho e o dogma central da biologia. As três principais tecnologias responsáveis pela rápida análise dos sistemas biológicos incluem espectrometria de massa, sequenciamento e microarranjos. Foram listados exemplos de cada tecnologia, conforme sua aplicação em cada estágio das informações biológicas – DNA, RNA e proteína. MS = espectroscopia de massa; SELDI–TOF = ionização por dessorção a laser realçada por superfície, espectroscopia de massa por tempo de voo; ICAT = *tags* de afinidade isótopo-codificada. (Adaptada com a permissão de Kufe DW, Holland JF: Cancer Medicine, 6.ed. Hamilton, Ontario, BC Decker, 2003; Wilson J, Hunt T: Molecular biology of the cell, 4.ed. New York, NY, EUA, Garland Science, 2003; Brown TA: Genomes, 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 2002.)

A primeira fase do Projeto Genoma Humano, uma colaboração empreendedora de 20 grupos em seis países, foi concluída e publicada em fevereiro de 2001 no periódico *Nature* (Genome International Sequencing Consortium, 2001; Lander, 2001). A sequência de esboço abrangeu cerca de 96% da porção eucromática (rica em genes) do genoma humano e 94% de todo o genoma, com uma média de cobertura de 4 vezes (ou seja, cada base foi sequenciada em uma média de 4 vezes). O International Human Genome Sequencing Consortium empregou uma estratégia de sequenciamento referida como sequenciamento hierárquico por fragmentos aleatórios (*shotgun*) (também conhecido como sequenciamento à base do mapa gênico, à base de cromossomo artificial bacteriano ou clone por clone) (Olson, 2001). O DNA genômico obtido de voluntários de diversas raças e etnias foi parcialmente digerido por endonucleases de restrição. Os fragmentos de 1 a 2 Mb de comprimento foram clonados em cromossomos artificiais bacterianos (BACs, *bacterial artificial chromosomes*). Oito bibliotecas de DNA contendo clones de inserção sobrepostos foram criados, representando uma cobertura do genoma de 65 vezes (cada base é representada em uma média de 65 vezes se todas as oito bibliotecas forem examinadas).

Os BAC contendo fragmentos do genoma humano são inseridos em bactérias e replicados à medida que esses microrganismos crescem e se dividem. Cada clone de BAC é completamente digerido por alguma enzima de restrição até produzir um padrão único de fragmentos de DNA, conhecidos como *fingerprints*. Os *fingerprints* de diferentes clones de BAC podem ser comparados para selecionar um conjunto de clones de BAC sobrepostos que cobrem uma parte do genoma (uma grande região do genoma coberta por clones sobrepostos recebe o nome de *contig*). Os *contigs* podem ser posicionados ao longo do cromossomo, utilizando marcadores conhecidos obtidos de mapas físicos e genéticos pré-elaborados do genoma humano. Os clones de BAC selecionados são divididos em fragmentos sobrepostos menores, subclonados e sequenciados. A subclonagem é necessária porque cada reação de sequenciamento é capaz de ler apenas ~500 pares de base (bp, *base pairs*) de forma confiável. A sequência do clone de BAC pode ser reconstruída a partir do conjunto de sequências obtidas dos subclones, enquanto os *fingerprints* de BAC orientam o agrupamento de vários clones de BAC em *contigs*.

As sequências de esboço foram requeridas para obter uma média de cobertura de 4 vezes e uma acurácia de 99%, conforme determinado pelo *software* (ou seja, PHRED e PHRAP), que atribui escores de qualidade às bases e agrupa as sequências de acordo com os escores. Ao longo de todo o projeto, exigiu-se que as sequências com mais de 2 kb de comprimento fossem depositadas em banco de dados públicos em até 24 horas (os dados estão disponíveis na University of California, no Navegador do Genoma de Santa Cruz [Santa Cruz's Genome Browser], www.genome.ucsc.edu, no GenBank do National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov, bem como no European Bioinformatics Institute Ensemble e no Sanger Centre Ensemble, www.ensembl.org). O agrupamento da sequência de esboço foi um processo composto de três partes, que envolveu a filtragem dos dados de sequência para eliminar as sequências bacterianas e mitocondriais, a elaboração de um *layout* dos clones ao longo do genoma e a fusão dos clones sobrepostos para produzir uma sequência de esboço.

A abordagem do sequenciamento hierárquico por fragmentos aleatórios (*shotgun*) foi escolhida pelo consórcio público por várias razões. A distribuição do trabalho entre os centros de sequenciamento foi simples com o uso dos clones. Além disso, o agrupamento de clones para produzir uma sequência de esboço provavelmente seria mais preciso, pois cerca de 46% do genoma humano consiste em sequências repetidas e contém ampla variação de sequências individuais. Ademais, a abordagem também pode lidar com tendências de clonagem e, nesse caso, sequências subrepresentadas podem ser alvo de sequenciamento.

Esforço privado de sequenciamento (sequenciamento de todo o genoma por fragmentos aleatórios [*shotgun*])

Em 1998, uma empresa privada, a Celera Genomics, chefiada por Craig Venter, anunciou sua intenção de sequenciar o genoma humano em 3 anos, utilizando uma abordagem diferente conhecida como sequenciamento de todo o genoma por fragmentos aleatórios (*shotgun*). A sequência do genoma humano esboçada por essa empresa foi relatada na edição de fevereiro de 2001 da revista *Science* (Venter, 2001). A empresa Celera gerou 14,8 bilhões bps da sequência do DNA em 9 meses, produzindo uma sequência de consenso de 2,91 milhões de bps da porção eucromática do genoma humano, com média de cobertura de 5 vezes. A empresa utilizou o DNA genômico obtido de 3 mulheres e 2 homens dos seguintes grupos etnogeográficos: afro-americanos, asiáticos-chineses, hispano-mexicanos e caucasianos. Foram elaboradas 16 bibliotecas diferentes de DNA com três tamanhos distintos de inserção: 2kb, 10kb e 50kb. Ambas as extremidades da inserção de clones escolhidos de forma aleatória foram sequenciadas para produzir leituras de sequenciamento de "pares casados". A distância média entre pares casados foi conhecida, porque a faixa de tamanhos de inserção para clone obtido de biblioteca específica pôde ser caracterizada, calculando-se a distância entre pares casados em estiramentos previamente sequenciados do genoma. A empresa gerou um conjunto de 27,26 milhões de leituras com comprimento médio de 543 bps.

Além disso, a empresa Celera combinou seus dados de sequência com todos os dados obtidos do esforço genômico financiado publicamente disponíveis até setembro de 2000 no banco de dados GenBank e adotou duas estratégias distintas de agrupamento. A estratégia de agrupamento de todo o genoma envolveu o "retalhamento" das sequências publicamente financiadas em pequenos fragmentos, combinando esses fragmentos com as leituras da Celera, identificando as sequências sobrepostas e unindo-as para produzir longas sequências contínuas de consenso. Esses *contigs* foram ordenados e as lacunas entre os *contigs* foram quantificadas, utilizando as informações obtidas das leituras de pares casados. Uma variante do processo mencionado antes, conhecida como agrupamento por fragmentos aleatórios compartimentalizados, produziu resultados um pouco melhores, pois as sequências eram agrupadas em primeiro lugar, com base nas informações de mapeamento, em uma região do cromossomo antes de realizar o processo descrito previamente.

As análises das sequências de esboço efetuadas pelos dois grupos geraram resultados similares. Alguns genes eram derivados de bactérias ou elementos de transposição, mas grandes duplicações segmentares também eram evidentes ao longo de todo o genoma. Foi descoberto que a distribuição de genes, ilhas CpG, sítios de recombinação e repetições é muito variável em todo o genoma. Como a variação genética disseminada era evidente, foram descobertos cerca de 2,1 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único, um para cada 1.250 bps. Um dos resultados mais surpreendentes revelado pela conclusão da sequência de esboço foi estimar que o genoma continha cerca de 30.000 genes codificadores de proteína, consideravelmente menos do que 100.000 ou mais do que se havia postulado. O número é apenas um terço maior do que o da minhoca; no entanto, é provável que, haja um número muito maior de proteínas diferentes por conta de junção alternativa (Claverie, 2001). Os cientistas utilizaram muitos métodos de predição gênica para chegar à estimativa de 30.000 genes. Os algoritmos de predição gênica predizem a localização de genes desconhecidos no genoma com o uso de características de sequência extraídas de genes conhecidos, incluindo composição de códons e nucleotídeos dentro das regiões codificadoras e sequências conservadas nos limites entre éxons/íntrons e dentro das regiões promotoras. A sequência do genoma humano tem uma baixa relação de sinal:ruído, visto que as regiões codificadoras representam apenas cerca de 3% do genoma e, portanto, os algoritmos produzem um grande número de falso-positivos. A maioria dos algoritmos, no entanto, utiliza duas outras fontes de informações importantes – similaridade com proteínas e transcritos expressos humanos conhecidos, além de homologia a proteínas e sequências caracterizadas em outros organismos (para uma revisão sobre algoritmos de predição gênica, ver Mathe, 2002).

Finalização da sequência do genoma humano

Recentemente, em outubro de 2004, no periódico *Nature*, o International Human Genome Sequencing Consortium publicou um artigo intitulado "Finishing the euchromatic sequence of the human genome" ("Finalização da sequência eucromática do genoma humano") (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). O artigo relatou que a sequência de esboço carecia cerca de 10% da

porção eucromática do genoma (ou seja, estava incompleta), continha em torno de 150.000 lacunas e tinha muitos segmentos de sequência sem atribuição de ordem ou orientação. A sequência atual contém 2,35 bilhões de nucleotídeos, abrange cerca de 99% do genoma e possui apenas 341 lacunas (com um erro a cada 100.000 bases). A revisão da sequência prediz entre 20.000 e 25.000 genes codificadores de proteína e a discrepância dos números deve-se às diferenças nos algoritmos de predição gênica. A sequência recém-publicada revela que as duplicações segmentares abrangem por volta de 5,3% da porção eucromática, fornecendo informações sobre a evolução do genoma humano e auxiliando o estudo de doenças causadas por deleções e rearranjos dessas regiões (p. ex., síndrome de DiGeorge) (Stankiewicz, 2002). A sequência recém-publicada também torna possível rastrear o nascimento e a morte dos genes – genes "recém-nascidos" como resultado de duplicação gênica e genes "perdidos" em consequência de mutação.

O sequenciamento do genoma humano é uma enorme conquista e reúne informações "preciosas sobre o desenvolvimento, a fisiologia, a medicina e a evolução da espécie humana" (Lander, 2001). O genoma humano tem fornecido infraestrutura não só para o sequenciamento dos outros genomas, mas também para a compreensão da estrutura e da complexidade da variação genética humana. Esse mapa detalhado do genoma humano e das regiões codificadoras preditas tem facilitado o surgimento de uma série de tecnologias de alto desempenho por meio das quais os cientistas começaram a explorar o conjunto completo de expressão gênica e proteica em tecido humano saudável e enfermo. Essas tecnologias prometem revolucionar a classificação das doenças humanas e anunciar o início de uma nova era da medicina molecular individualizada.

Tecnologias de alto desempenho

Tecnologia genômica

Uma compreensão profunda dos mecanismos celulares representa a primeira etapa para desvendar a complexidade das doenças humanas. Conclusões importantes a respeito da função de algum gene podem ser deduzidas, determinando-se o tipo celular e as condições sob as quais um gene se expressa e quantificando-se o nível de mensagem transcrita. Uma técnica comumente utilizada para avaliar o nível de expressão de um único gene (representado por mRNA) em algumas condições distintas é chamada *Northern blot*. Essa abordagem "gene por gene" começou a mudar no início dos anos 1990 como resultado do sucesso do Projeto Genoma Humano e dos vários avanços tecnológicos que possibilitaram o desenvolvimento de análises de alto desempenho da expressão gênica, em que vários genes puderam ser analisados simultaneamente. Serão abordadas três tecnologias genômicas distintas de alto desempenho. Tanto a análise seriada da expressão gênica (SAGE) (Velculescu, 1995) quanto os microarranjos de DNA (Schena, 1995, Lockhart, 1996) foram desenvolvidos nos anos 1990 e, na atualidade, a utilização dessas técnicas está bem difundida, enquanto a reação em cadeia da polimerase (PCR) competitiva real com o uso da espectroscopia de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF-MS, *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy*) foi publicada pela primeira vez em 2003 (Ding, 2003). Os princípios básicos subjacentes aos microarranjos de DNA são discutidos no Capítulo 68, ao passo que aqueles sobre PCR competitiva real são abordados no Capítulo 67.

Dependendo do modelo experimental, coletam-se as amostras de culturas celulares ou tecidos cirúrgicos e isola-se o RNA total. As técnicas como microdissecção por captura a laser (Emmert-Buck, 1996) são frequentemente utilizadas antes do isolamento do RNA para obter uma população homogênea de células de amostras teciduais. Após a obtenção de RNA total ou mRNA e sua transcrição reversa em cDNA, cada tecnologia utiliza um protocolo diferente para medir com rapidez os níveis transcritos dos genes em cada amostra. Os princípios de cada método, bem como as vantagens e as desvantagens correspondentes serão descritas adiante.

Análise seriada da expressão gênica

A SAGE mede o nível de expressão dos genes em uma amostra, pelo isolamento e pelo sequenciamento de milhares de *tags* (marcadores) curtos de 10 a 14 bps isolados de cDNA. Duas informações importantes podem ser deduzidas do resultado: as sequências dos *tags* geralmente permitem a identificação de seus genes correspondentes e o número de vezes em que um *tag* específico é sequenciado equivale a uma medida da abundância de transcritos. A capacidade de identificar um transcrito com exclusividade, utilizando uma sequência tão curta quanto 9 bps, reside na probabilidade de definir essa sequência a partir de outras. Tal sequência é capaz de distinguir 262.144 transcritos (4^9), o que é superior às estimativas atuais do número de transcritos no genoma humano (Velculescu, 1995; Pennisi, 2000).

O protocolo da SAGE envolve o isolamento do RNA de uma amostra de interesse. O RNA é convertido em cDNA de fita dupla, utilizando um iniciador oligo (dT) biotinilado para síntese da primeira fita. A SAGE, então, usa dois tipos de enzimas de restrição. A primeira, chamada enzima de ancoragem, reconhece uma sequência específica de 4 bps (p. ex., *NlaIII*). Quaisquer enzimas de reconhecimento de 4 bps podem ser utilizadas já que, em média, elas promovem a clivagem a cada 256 bps (4^4). A enzima de ancoragem deixa um curto fragmento saliente de fita única do DNA na extremidade 5' do local de clivagem. O fragmento biotinilado, que representa a extremidade 3' do gene, é, então, ligado a conjugados de estreptavidina, capturando apenas os fragmentos de cDNA digeridos que contêm uma porção da cauda poli(A^+). Os fragmentos capturados são purificados e aleatoriamente divididos em dois *pools* iguais.

A segunda enzima, chamada enzima de marcação, comporta-se de forma diferente, promovendo a clivagem de 14 a 15 bps do DNA de imediato após a região 3' de sua sequência de reconhecimento (p. ex., *BsmFI*). A sequência de reconhecimento para a enzima de marcação é transformada na sequência dos ligantes descritos adiante.

Após a divisão dos fragmentos purificados em dois *pools*, dois ligadores diferentes de oligonucleotídeos, cada um deles contendo uma sequência diferente de iniciadores para PCR (para fins de análise, os ligadores serão assinalados com as letras A e B), a sequência de reconhecimento da enzima de marcação e uma saliência da fita simples do DNA, que faz parte da sequência de reconhecimento da enzima de ancoragem, são desenhadas e sintetizadas. O ligador A é ligado às extremidades 5' dos fragmentos de cDNA em um *pool*, enquanto o ligador B, às extremidades 5' dos fragmentos de cDNA no outro *pool*. A ligação ocorre por meio do pareamento de bases entre as extremidades salientes de fita simples complementar do DNA tanto nos fragmentos de cDNA quanto nos ligadores, criando uma sequência intacta de reconhecimento da enzima de ancoragem. Os fragmentos de cDNA em cada *pool* são, então, cortados com a enzima de marcação, resultando em um novo fragmento que contém o ligador acrescido de uma curta região de 10 bps do cDNA, conhecida como *tag* ou marcador (o fragmento remanescente de cDNA e a porção da cauda poli(A+) são removidos). Os dois *pools* de fragmentos de cDNA são unidos, criando *ditags* ou marcadores duplos (as novas sequências são as seguintes: ligador A–*tag*–*tag*–ligador B). Os *ditags* são amplificados por PCR, utilizando iniciadores desenhados com base nas sequências dos ligadores A e B.

A criação dos *ditags* é importante por várias razões. Em primeiro lugar, os *ditags* podem ser amplificados por PCR para etapas subsequentes de clonagem. Em segundo lugar, cada *tag* dentro de um *ditag* é ligado cauda-a-cauda e flanqueado por sequências de reconhecimento da enzima de ancoragem, fornecendo informações importantes de orientação utilizadas para identificar os genes correspondentes a cada *tag*. Por fim, mesmo se os *tags* estiverem em alta abundância, a probabilidade de criar-se *ditags* idênticas é extremamente baixa. Em consequência disso, a ocorrência de *ditags* idênticos indica tendências da PCR, mas esses *ditags* são excluídos da análise final para garantir a quantificação precisa da abundância de transcritos (Velculescu, 1995; Yamamoto, 2001).

Após a amplificação, a enzima de ancoragem é utilizada para promover a clivagem dos ligadores dos *ditags*. *Ditags* formados por diferentes reações são unidos até formar cadeias de 10 a 50 *tags*. As cadeias concatenadas de *ditags* são clonadas em plasmídeos e sequenciadas. Tipicamente, cerca de 50.000 *tags* são sequenciados para cada amostra de interesse, utilizando sequenciador de alto desempenho (para mais detalhes sobre a metodologia, ver a revisão feita por Madden, 2000). Os níveis absolutos de expressão dos genes na amostra são quantificados pela contagem do número de *tags* sequenciados que correspondem a cada gene. A Figura 76.2 fornece um esquema visual do procedimento.

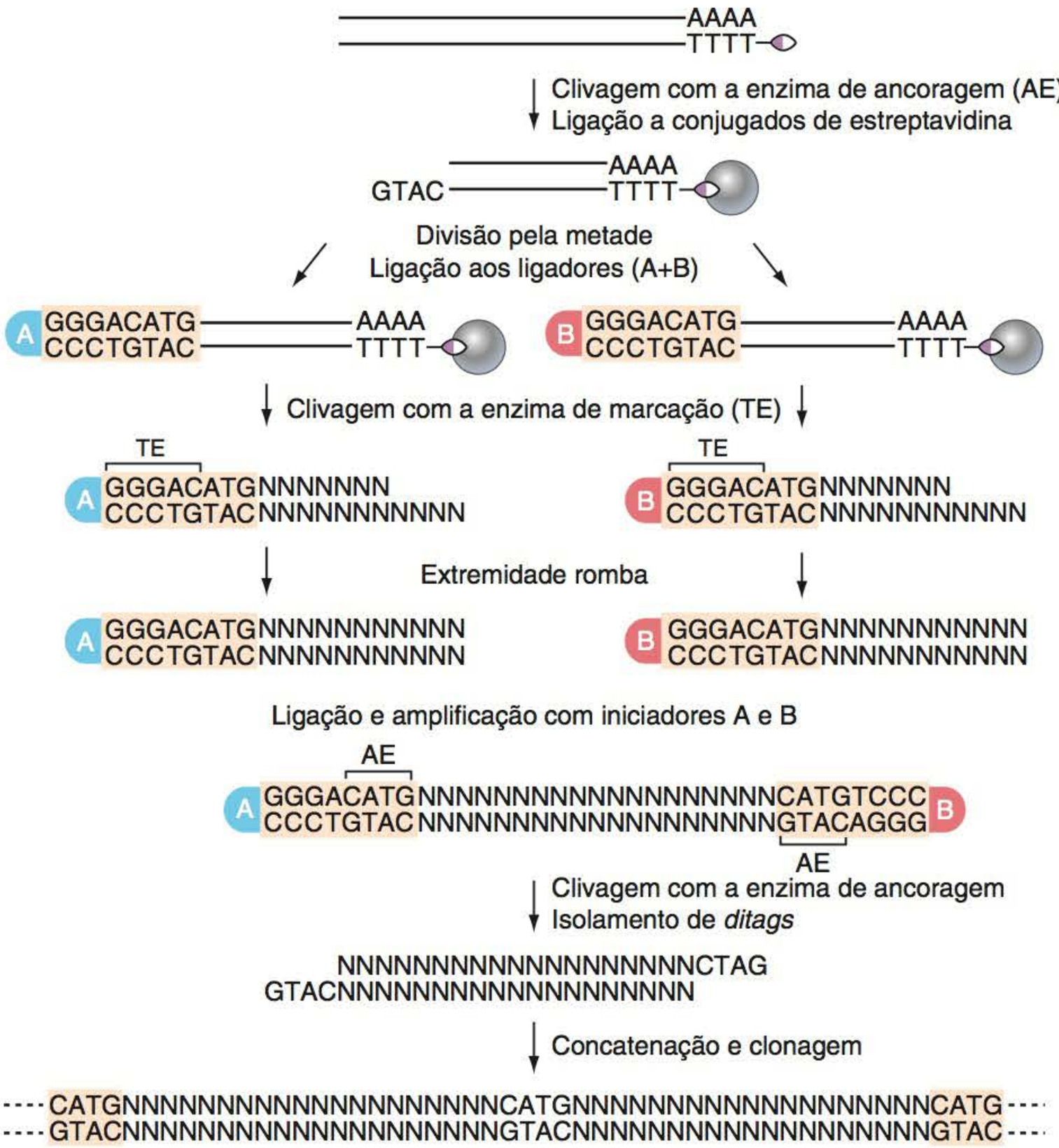


Figura 76.2 A análise seriada da expressão gênica (SAGE) é uma técnica que mede os níveis de expressão de genes em uma amostra de interesse. O RNA é isolado da amostra, o cDNA é sintetizado, e as milhares de *tags* curtos de pares de bases (bps) são isolados. A SAGE utiliza dois tipos de enzima de restrição: uma, chamada enzima de ancoragem (ou seja, *NlaIII*), reconhece uma sequência específica de 4 bps e promove a clivagem do DNA a cada 256 bps, imediatamente após a região 5′ da *tag* de sequência. A segunda enzima, chamada enzima de marcação (ou seja, *BsmFI*), comporta-se de forma diferente, promovendo a clivagem de 14 ou 15 bps do DNA de imediato após a região 3′ de sua sequência de reconhecimento. Em primeiro lugar, os fragmentos de cDNA são clivados com a enzima de ancoragem, capturados com o uso de cromatografia de afinidade da biotina por estreptavidina, purificados e divididos em dois *pools*, A e B. Em segundo lugar, dois ligadores diferentes (A e B) são ligados às extremidades 5′ dos fragmentos de cDNA em seus respectivos *pools*. Os fragmentos de cDNA em cada *pool* são, então, clivados com a enzima de marcação, resultando em um novo fragmento que contém o ligador acrescido de uma região curta de 10 bps do cDNA, conhecida como *tag*. Os dois *pools* de fragmentos de cDNA são ligados, criando *ditags*. Os *ditags* são amplificados por PCR, utilizando iniciadores desenhados com base nas sequências dos ligadores A e B. Após a amplificação, a enzima de ancoragem é utilizada para promover a clivagem dos ligantes das extremidades dos *ditags*. *Ditags* formados por diferentes reações são unidas até formar cadeias de 10 a 50 *tags*. As cadeias concatenadas de *ditags* são clonadas em plasmídeos e sequenciadas. As sequências dos *tags* são usadas para identificar os genes correspondentes e representam uma medida da abundância de transcritos (Adaptada com a permissão de Yamamoto M, Wakatsuki T, Hada A, Ryo A: Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. J Immunol Methods 2001;250:45–66).

O Cancer Genome Anatomy Project, do National Cancer Institute, optou pela tecnologia da SAGE para sequenciar mais de 5 milhões de *tags* em mais de 100 tipos de células humanas diferentes. Os dados ficam armazenados em um banco de dados públicos conhecido como SAGEmap (Lal, 1999; Lash, 2000), além de existirem várias ferramentas, como SAGE Genie (Boon, 2002), disponíveis para atribuir *tags* aos genes com segurança, bem como para análise e visualização dos dados. Informações e detalhes adicionais podem ser obtidos nos *sites* http://cgap.nci.nih.gov/SAGE ou http://www.sagenet.org.

Microarranjos de DNA

Os microarranjos de DNA constituem arranjos ordenados de pontos ou *spots*, cada um deles composto do DNA representativo de um único gene, imobilizado em um suporte sólido, como uma lâmina de vidro, conforme descrito no Capítulo 68. Os microarranjos de DNA têm a vantagem do pareamento de bases Watson-Crick e, portanto, apenas as fitas de DNA que são complementares sofrerão hibridização e produzirão um sinal passível de ser utilizado como medida da expressão gênica. A produção e o uso de microarranjos passam por diversas etapas, incluindo a criação de sondas, a fabricação de arranjos, a hibridização de alvos, a varredura por fluorescência e o processamento de imagens para produzir uma leitura numérica da expressão gênica. Ao longo de todo o capítulo, uma sonda será referida como uma sequência de ácido nucleico ligada a algum suporte sólido, e o alvo corresponderá a uma sequência livre complementar de ácidos nucleicos que está sendo mensurada quanto à abundância utilizando microarranjos (Phimister, 1999). Uma descrição detalhada a respeito da fabricação de arranjos de cDNA e oligonucleotídeos, juntamente com a forma de preparo e hibridização do RNA nessas plataformas, pode ser encontrada no Capítulo 68.

Os experimentos de microarranjos de DNA podem produzir milhões de dados pontuais, que necessitam de uma série de etapas de processamento de dados para selecionar os genes relevantes. Embora não exista um protocolo padrão, as etapas descritas a seguir costumam estar presentes nas análises de um experimento de microarranjos de DNA (Fig. 76.3). Os arquivos das imagens são convertidos em valores numéricos, que são normalizados e resumidos com o uso de um *software* (existem programas comerciais e gratuitos disponíveis [Affymetrix, 2001; Li, 2001; Irizarry, 2003]). A seguir, os arranjos de má qualidade são removidos da análise. Os genes não detectados com precisão pelos arranjos ou aqueles que demonstram pouca variação nas amostras são filtrados. Então, diversas análises computacionais e estatísticas são realizadas. As análises exploratórias dos dados, incluindo a classificação e a identificação de genes diferencialmente expressos, podem ser divididas em duas categorias – métodos com e sem supervisão. Os métodos supervisionados, como algoritmos de predição de classe, utilizam grupos predefinidos de amostras (denominados como conjunto de treinamento) para identificar os genes capazes de distinguir entre os grupos a fim de classificar as amostras desconhecidas (denominadas como conjunto de teste) com precisão. Um grande número de algoritmos de predição de classe supervisionados foi aplicado a dados de microarranjos, incluindo análise discriminante linear ou quadrática (Dudoit, 2002), método dos k-vizinhos mais próximos (Simon, 2004), votação ponderada (Golub, 1999), redes neurais artificiais (Khan, 2001), máquinas de vetores de suporte (Brown, 2000) e centroides encolhidos (Tibshirani, 2002). Os algoritmos supervisionados como análise da significância de microarranjos (SAM, *significance analysis of microarrays*) (Tusher, 2001), bem como os testes estatísticos paramétricos e não paramétricos entre os grupos

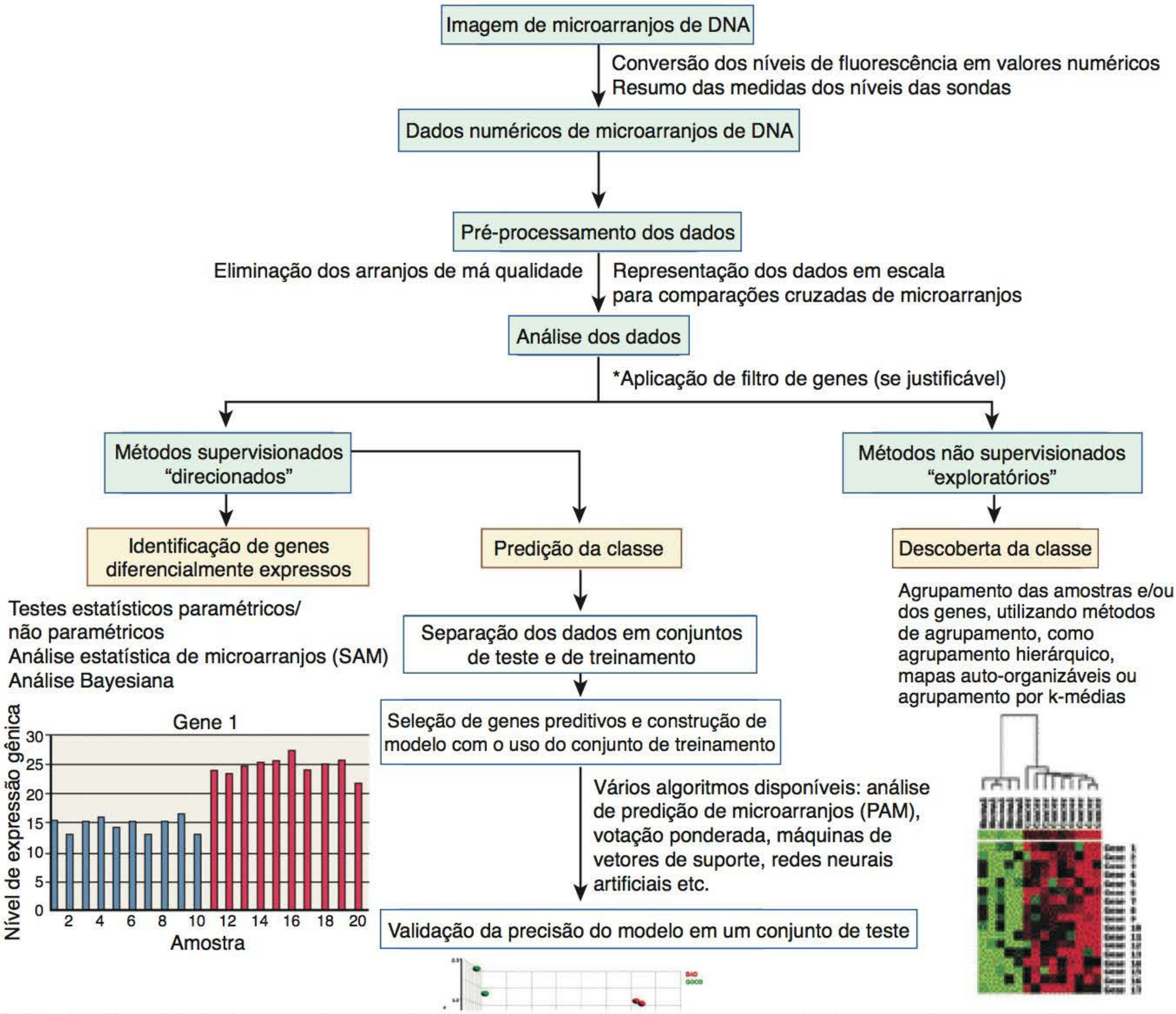


Figura 76.3 Análise de dados de microarranjos de DNA. O diagrama esquemático esboça as várias etapas requeridas na análise de dados de microarranjos de DNA. Os arquivos de imagens são convertidos em valores numéricos e normalizados. Na sequência, os arranjos de má qualidade são retirados da análise. Por fim, os genes não detectados com precisão pelo arranjo ou aqueles com pouca variação nas amostras são filtrados. A análise computacional e estatística a jusante dos dados pode ser dividida em duas categorias – métodos com e sem supervisão. Os métodos supervisionados, como os algoritmos de predição de classes, utilizam grupos predefinidos de amostras para identificar os genes capazes de diferenciar entre os grupos e classificam com exatidão as amostras desconhecidas. Os métodos não supervisionados, também conhecidos como métodos de descoberta de classes, tentam encontrar as classes previamente desconhecidas, como novos subtipos de câncer, dentro de um conjunto de dados.

de amostras podem ser utilizados para identificar os genes diferencialmente expressos. Os métodos não supervisionados, também conhecidos como métodos de descoberta de classe, tentam descobrir as classes antes desconhecidas, como os novos subtipos de câncer, dentro de um conjunto de dados. Várias técnicas de agrupamento, como agrupamento hierárquico (Eisen, 1998) e mapas auto-organizáveis, são, em geral, utilizadas como algoritmos de descoberta de classe (ver Kaminski, 2002, para uma revisão geral sobre o assunto; ver Leung, 2003, para uma revisão da análise de arranjos de cDNA; e ver Tumor Analysis Best Practices Working Group, 2004, para uma revisão da análise de arranjos de oligonucleotídeos).

O banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO; disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) é um depósito central de dados de expressão gênica de alto desempenho. Além disso, uma ampla variedade de dados de microarranjos provenientes de experimentos divulgados está publicamente disponível. Todos os dados de microarranjos depositados no GEO aderem-se às diretrizes das Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME), estabelecidas para fornecer informações básicas sobre modelos experimentais, amostras e tipo de tecnologia utilizada. Além do GEO, existem diversas ferramentas de bioinformática para análises de dados de microarranjos (para uma revisão, ver Quackenbush, 2001). Não existem padrões estabelecidos para analisar os dados de microarranjos e, com frequência, várias metodologias podem produzir diferentes resultados (em busca de uma discussão a respeito, ver Tumor Analysis Best Practices Working Group, 2004). Os estudos de validação, com tamanhos maiores de amostras ou uso de tecnologia diferente, costumam ser necessários para confirmar achados significativos.

Reação em cadeia da polimerase competitiva real

A PCR competitiva real combina técnicas convencionais de PCR competitiva com extensão de base única e MALDI-TOF MS para medir níveis de expressão gênica. Os princípios da espectroscopia de massa foram abordados nos Capítulos 4 e 23, enquanto o emprego da espectroscopia de massa em tecnologias proteômicas na detecção de câncer foi discutido no Capítulo 75. O uso de MALDI-TOF MS em estudos genômicos de alto desempenho é uma inovação recente, que é capaz de realizar a quantificação absoluta de genes com sensibilidade extremamente alta e produz resultados compatíveis com PCR em tempo real e microarranjos de DNA. Os princípios básicos subjacentes à técnica de PCR em tempo real foram tratados no Capítulo 67.

Análogo ao método de PCR em tempo real, o uso dessa técnica requer o conhecimento prévio das sequências dos genes de interesse. Nessa abordagem (Figs. 76.4 e 76.5), o RNA total de uma amostra passa por transcrição reversa, utilizando hexâmeros aleatórios ou iniciadores gene-específicos. Uma região de 80 a 100 bps é selecionada a partir do gene de interessse, e os iniciadores são desenhados para amplificar essa região em uma reação de PCR. Uma concentração conhecida de um oligonucleotídeo de DNA de 80 a 100 bps do mesmo comprimento e da mesma sequência, exceto por uma única mutação pontual (conhecida como o competidor), também é adicionada à reação de PCR para amplificação com o gene de interesse. O competidor e o gene de interesse serão amplificados com a mesma cinética, pois suas sequências são quase idênticas e, em consequência disso, a concentração do gene de interesse pode ser calculada com base na quantidade de competidor presente na reação de PCR. Diversas reações de PCR são realizadas com diferentes concentrações do oligonucleotídeo competidor, com o objetivo de titular a concentração final do gene candidato com precisão. Em seguida, cada reação de PCR fica sujeita a uma reação de extensão de base. Um iniciador curto de extensão de base (aproximadamente 23 nucleotídeos de comprimento) é desenhado para se anelar a ambos os produtos de PCR amplificados de 80 bps adjacentes ao local da única mutação pontual. Uma reação de extensão de base, então, é realizada com 3 ddNTPs e um único dNTP até gerar dois produtos de extensão que diferem em seus nucleotídeos terminais. Como resultado dessa diferença de um único nucleotídeo, a MALDI-TOF MS é capaz de identificar e quantificar os dois produtos com base em seus pesos moleculares diferentes. O rendimento da análise pode ser ampliado por uma técnica conhecida como multiple-

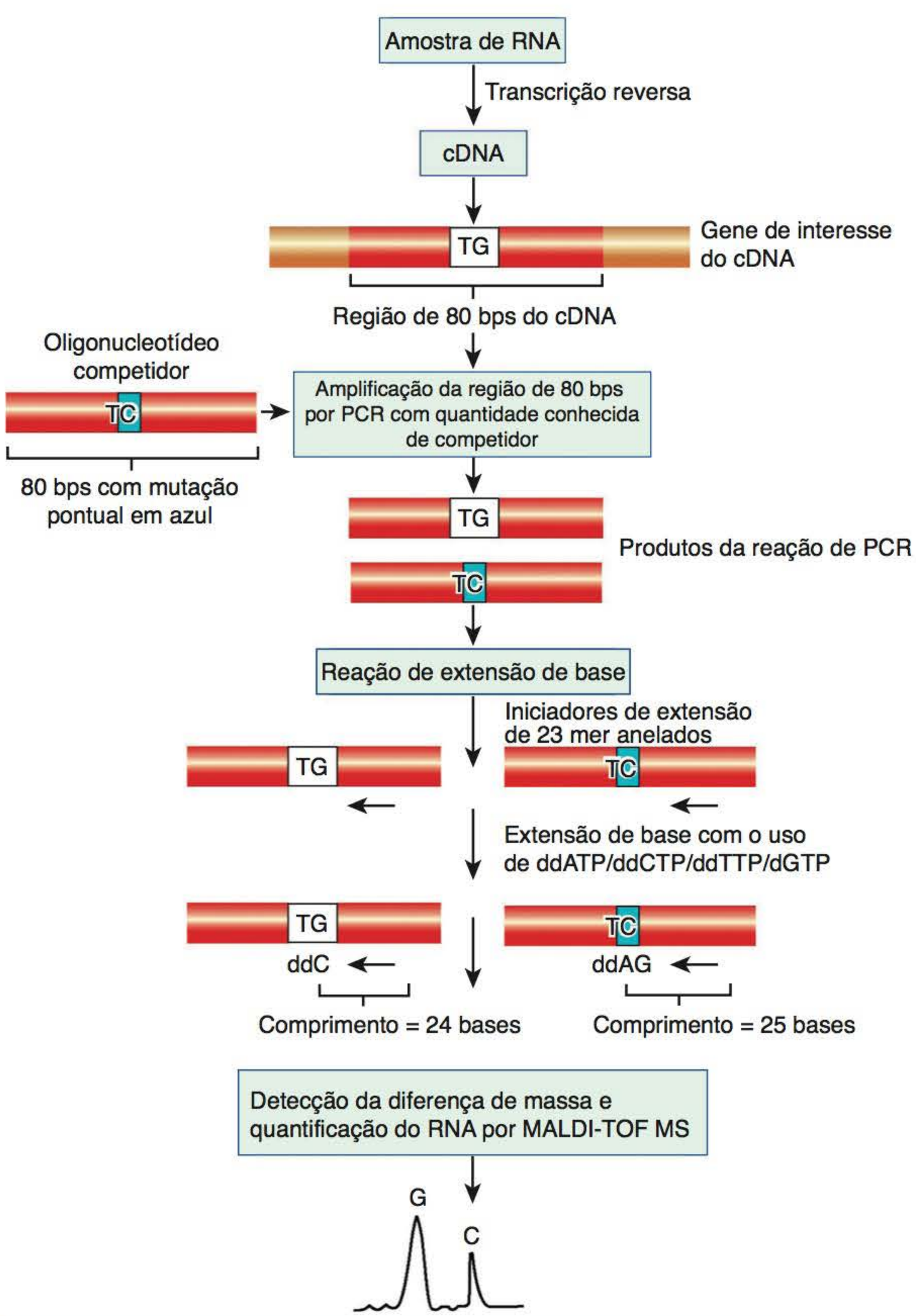


Figura 76.4 A reação em cadeia da polimerase (PCR) competitiva real associada com a espectroscopia de massa MALDI-TOF é uma técnica utilizada para medir a abundância de transcritos de um gene em alguma amostra de interesse. O RNA é isolado, o cDNA é sintetizado a partir de uma amostra, e uma região (~80 bps) do gene de interesse é selecionada para amplificação por PCR. Uma concentração conhecida de oligonucleotídeo competidor do mesmo comprimento e da mesma sequência, exceto por uma única mutação pontual, também é adicionada à reação de PCR para amplificação. Um iniciador curto de extensão de base (~ 23 bps) é desenhado para se anelar a ambos os produtos amplificados adjacentes ao local da única mutação pontual. Uma reação de extensão de base é, então, realizada com 3 ddNTPs e um único dNTPs até gerar dois produtos de extensão que diferem em seu comprimento por uma única base. Como resultado dessa diferença de um único nucleotídeo, a técnica MALDI-TOF MS é capaz de identificar e quantificar os dois produtos com base em seus pesos moleculares diferentes. (Adaptada com a permissão de Ding C, Cantor CR: A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:3059–3064.)

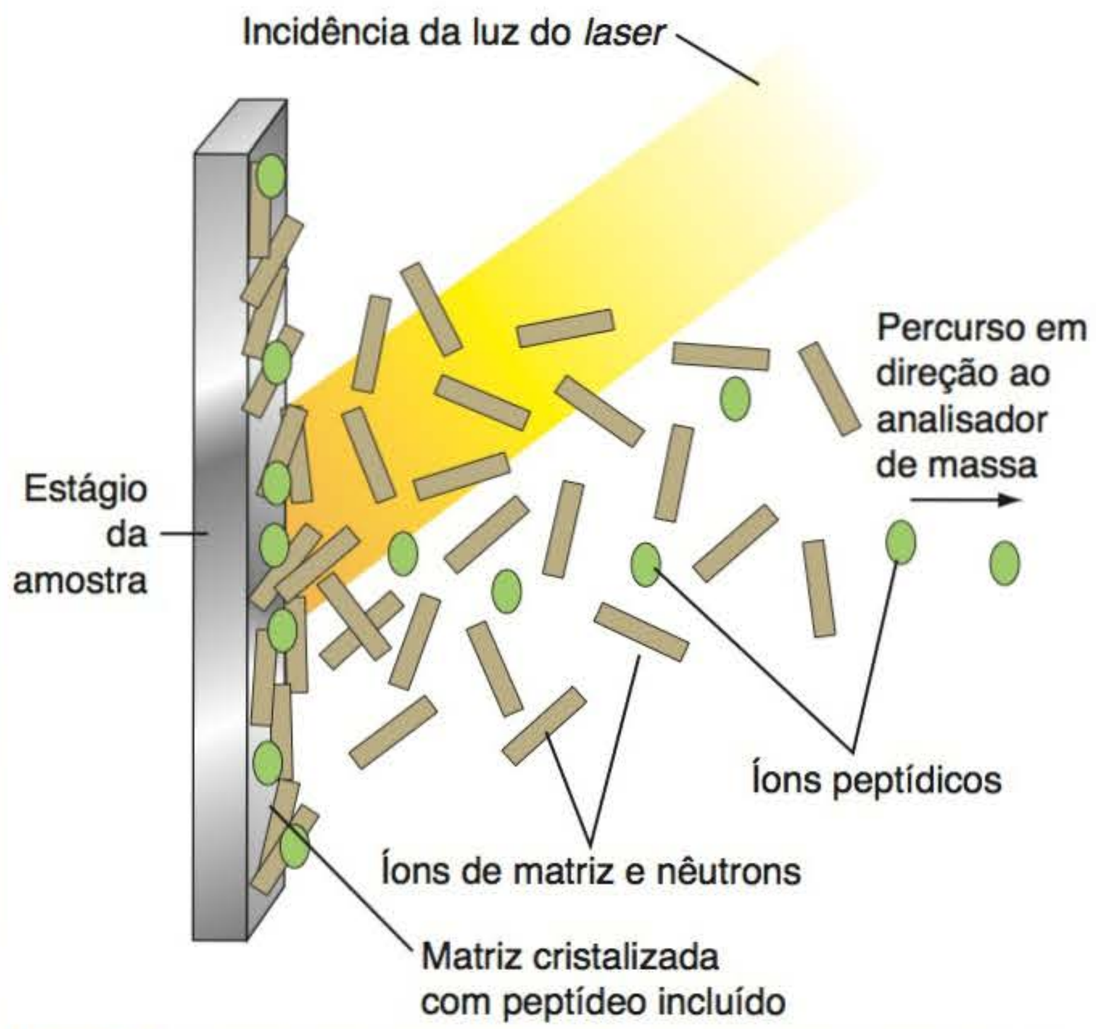


Figura 76.5 Espectrometria de massa MALDI-TOF. Um pulso de *laser* fornece energia para a solução matriz promover a ionização de peptídeos e oligonucleotídeos, que se propagam a jusante até o analisador de massa. (Reproduzida de Kintner M, Sherman, NE: Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. New York, John Wiley & Sons, Inc., 2000.)

xação, em que diversos genes são quantificados em uma única reação de PCR e de extensão de iniciador, utilizando iniciadores exclusivos, competidores e oligonucleotídeos de extensão para cada gene.

O sistema, desenvolvido inicialmente para genotipagem de alto desempenho, foi adaptado para a análise de expressão gênica em 2003 (Ding, 2003) e, agora, está sendo comercializado por uma empresa com sede na Califórnia, a Sequenom, Inc. e, por essa razão, dados públicos e recursos da análise ainda não foram desenvolvidos. Aplicações recentes da técnica incluem a medida não só dos níveis de expressão para três genes em RNA isolado de células da mucosa bucal obtidas de fumantes *versus* não fumantes (Spira, 2004), mas também de expressão aleloespecífica de *ABCD1*, um gene envolvido na adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (Ding, 2004).

Comparação das tecnologias

As três tecnologias genômicas de alto desempenho destacadas anteriormente utilizam técnicas muito diferentes para medir a abundância de transcritos de genes, cada uma delas com um conjunto exclusivo de vantangens e desvantagens. Uma breve revisão comparando as três plataformas diferentes pode ser encontrada na Tabela 76.1. A principal limitação da SAGE está em sua necessidade de reações de PCR e sequenciamento muito trabalhosas por amostra e, por essa razão, essa técnica é de alto desempenho em termos de genes, não para amostras. Outra desvantagem da SAGE é a necessidade de grande quantidade de RNA de partida; no entanto, foram feitas várias modificações no protocolo, e uma nova técnica, conhecida como microSAGE, requer apenas entre 1 e 5 ng de RNA poli(A^+) (Datson, 1999). Uma vantagem da tecnologia está no fato de não ser baseada em informações prévias de sequência, além de ser capaz de descobrir novos transcritos. A SAGE produz dados de sequência que permitem a identificação direta de transcritos, utilizando banco de dados públicos de sequência.

Os microarranjos de DNA, por outro lado, possuem capacidade superior à SAGE em termos de genes e amostras. Tais microarranjos são mais práticos para estudos de avaliação de amostras clínicas, em que se exige alta produção (rendimento) de amostras e se consegue obter apenas pequenas quantidades de RNA de partida. Os níveis de expressão gênica obtidos de microarranjos de DNA são apenas níveis relativos de transcritos (em contraste a níveis absolutos com SAGE), que dependem da seleção da sonda, dificultando, consequentemente, as comparações de plataformas cruzadas.

Por fim, com o uso da PCR competitiva real, fica difícil avaliar milhares de genes, porque cada gene requer o desenho de iniciadores específicos para as reações de PCR e de extensão de base. Assim que a análise for concebida, a técnica poderá ter, entretanto, alto rendimento em termos de amostras. Como resultado, é provável que a PCR competitiva real não seja utilizada como uma plataforma de descoberta como SAGE e microarranjos de DNA, mas, sim, como uma ferramenta de validação e potencial clínico para avaliar números relativamente pequenos de genes em grande número de amostras individuais.

Tecnologia proteômica

A tecnologia proteômica atual oferece uma variedade de abordagens promissoras de alto desempenho à investigação na área de biologia celular. À medida que se passa do genoma relativamente estático, em lento processo de mudança, para a transcrição de RNA e, por fim, para a tradução de proteína e mais modificações pós-tradução, as informações tornam-se cada vez mais dinâmicas. No genoma humano, estima-se uma quantidade de 30.000 genes (Lander, 2001), que são traduzidos em mais de um milhão de proteínas (Anderson, 2002) – a complexidade do sistema contradiz uma análise global simples (Oh, 2004). A impossibilidade de amplificação de proteínas necessita, com frequência, do trabalho com pequenas quantidades de amostras biológicas. Além disso, a faixa de concentração proteica, que ocupa várias unidades de log, pode obscurecer os sinais de utilidade clínica.

Espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS, *mass spectrometry*) representa a principal ferramenta utilizada para investigar a composição proteica de amostras biológicas complexas. Os princípios da espectroscopia de massa foram abordados nos Capítulos 4 e 23, mas o uso da MS para

Tabela 76.1 Comparação de tecnologias genômicas de alto desempenho

	SAGE	Microarranjos de DNA	PCR competitiva real
Equipamentos necessários	Sequenciador	Arranjador (apenas de cDNA), varredor (*scanner*) de arranjo	Nanodispensador, MALDI-TOF MS
Rendimento			
Genes	Médio ~2.000 a 20.000 *tags*/dia, dependendo do sequenciador	Mais alto, ~40.000/arranjo	Médio, ~100/dia
Amostras	Baixo, ~1/semana	Médio, ~10 a 20/dia	Alto, ~100/dia
Custo	U$1.500 a 2.500/amostra, se entre 50.000 e 100.000 *tags* forem sequenciados	U$500 a 1.000/*chip*	U$1 a 2/gene/amostra
Quantidade de material de partida necessário	500 a 1.000 mg de RNA total/amostra	1–15 mg de RNA total/amostra, até 10 a 100 ng de RNA total/amostra podem ser utilizados com um protocolo modificado	5 ng de RNA total/gene/amostra
Necessidade de conhecimento prévio das sequências gênicas	Não	Sim	Sim
Quantificação absoluta dos genes	Sim	Não	Sim

detecção de proteínas relacionadas ao câncer foi tratado no Capítulo 75. Antes das descobertas que tornaram possível a análise de proteínas por MS, a identificação dessas moléculas dependia de técnicas mais trabalhosas e intensivas, como sequenciamento de Edman ou análises à base de anticorpos. O principal obstáculo à análise proteica de alto desempenho pelo uso da MS está na dificuldade técnica de proteínas ionizantes. As inovações de John Fenn, que trabalhou com ionização por *electrospray*, e de Koichi Tanaka, que desenvolveu ionização por dessorção a laser, abriram caminho para a área da tecnologia proteômica. Por suas contribuições à área, ambos os cientistas dividiram metade do Prêmio Nobel de 2002 em Química. A ionização por *electrospray* cria pequenas gotículas carregadas de proteína em solução. Conforme as gotículas deslocam-se para uma câmara de vácuo, o líquido evapora, deixando para trás uma fração de proteína carregada. Na dessorção a laser, coloca-se a proteína em uma solução química (chamada matriz) que, quando energizada por uma explosão de energia, transmite íons a essa proteína. Uma vez ionizada, a relação peso-carga (m/z) pode ser determinada pela resposta da proteína a variações em um campo eletromagnético.

Outros problemas analíticos surgem da estrutura elaborada de proteínas, bem como da mera abundância observada em grande parte das amostras biológicas. Com sua estrutura secundária, terciária e quartenária, bem como as modificações pós-tradução, a estrutura das proteínas é muito mais complexa e menos previsível que a do DNA ou do RNA. Avanços na análise proteica possibilitaram uma identificação mais rápida. No entanto, muitos desses métodos estão sujeitos a variações em virtude do contexto em que a proteína é encontrada, em particular seu formato, e do ambiente em que ela é analisada. A separação continua sendo uma importante etapa para reduzir amostras biológicas complexas em amostras mais manejáveis. A maior parte dos experimentos proteômicos conta com a separação de constituintes proteicos em um gel bidimensional, um método demorado e trabalhoso que retarda o processo de descoberta e requer quantidades relativamente grandes da amostra de partida. Outras técnicas para melhorar a resolução dos dados incluem análise proteômica de lisado celular total, em geral separado por cromatografia líquida de alta pressão, ou cromatografia líquida multidimensional.

Embora a quantidade de peptídeo em uma amostra possa aumentar a amplitude do pico m/z observado na MS, outros fatores como a tendência de ionização dos peptídeos ou os íons circunjacentes no momento da medição também afetam a amplitude, tornando difícil a quantificação comparativa de amostras similares obtidas de condições experimentais distintas. O uso de *tags* de afinidade isótopo-codificada (ICAT, *isotope-coded affinity tags*) permite a comparação quantitativa de amostras. A *tag* consiste em um marcador de biotina e um elo, que contém oito hidrogênios ou oito deutérios. Para comparar a quantidade de uma única proteína de duas amostras diferentes, pode-se marcar uma amostra com o marcador leve e a outra com um pesado. Isso é feito antes da análise da MS, o que então mostraria uma série de picos pareados para cada fragmento peptídico, com as amostras de *tag* pesada tendo 8 unidades de m/z a mais do que a amostra com a *tag* leve. Com isso, é possível comparar a amplitude relativa das duas amostras.

A tecnologia multidimensional para identificação de proteínas (MudPIT, *multidimensional protein identification technology*) permite a identificação dessas moléculas em uma amostra digerida. Os fragmentos proteicos são introduzidos pela cromatografia líquida de alta pressão em um espectrômetro de massa em tandem. A relação m/z para cada peptídeo é mensurada na primeira câmara de MS, período depois do qual o peptídeo é fragmentado. Comparando-se os pesos relativos desses fragmentos, pode-se determinar o aminoácido responsável pela alteração, na verdade no sequenciamento do peptídeo. Essas sequências peptídicas mensuradas são emparelhadas e comparadas com fragmentos preditos de proteínas conhecidas, gerando a identidade de um grande número de proteínas obtidas de alguma amostra biológica complexa.

Arranjos de proteínas

Os microarranjos teciduais produzem um arranjo compacto de cortes de tecido congelado ou embebido em parafina, combinando as amostras em uma única plataforma. Antes dos avanços de amostragem descritos por Kononen, o número de cortes que podia ser disposto em paralelo limitava a investigação simultânea de múltiplos cortes teciduais. Atualmente, um microarranjo de tecido pode sustentar milhares de amostras, que podem ser identificadas e marcadas por hibridização *in situ* ou ensaios imuno-histoquímicos (Kononen, 1998; Russo, 2003). O potencial dessa investigação paralela de grande escala proporciona um meio mais rápido de responder às questões sobre os mecanismos biológicos envolvidos na evolução do tecido normal para a neoplasia (Kononen, 1998) ou as vias relacionadas ao prognóstico variável entre os tumores de histologia semelhante (Bubendorf, 1999), bem como representa um método fácil de validar os resultados de outros experimentos genômicos ou proteômicos (Chen, 2003).

Paweletz et al. foram pioneiros no desenvolvimento de microarranjos de proteína de fase reversa. Em vez de pontos em pequenos cortes de tecido, essas lâminas contêm arranjos de lisado celular total proveniente de uma porção celular específica de tecido (Paweletz, 2001). Sob o microscópio, os cientistas podem "apanhar manualmente" aquelas células de interesse, capturando-as com um pequeno laser focado que liga as células a uma membrana de transferência sobrejacente.

Em contraste aos arranjos com algum tecido ou células de interesse em seu conteúdo, os arranjos também podem conter material destinado a se ligar a proteínas de uma amostra aplicada à superfície do arranjo. Anticorpos, DNA, RNA e ribossomos – qualquer substância com afinidade por alguma proteína – podem ser utilizados como uma sonda na superfície do arranjo. A fabricação dessas lâminas emprega tecnologia de *spotting* semelhante àquela descrita para arranjos de oligonucleotídeos (ver anteriormente).

Marcadores moleculares para o diagnóstico de neoplasia humana

Marcadores genômicos

Uma aplicação clinicamente relevante de tecnologias genômicas de alto desempenho é a identificação de marcadores moleculares diagnósticos para doenças humanas, como câncer. A análise histológica complementada por imuno-histoquímica, microscopia eletrônica e análise molecular de anormalidades cromossômicas é utilizada com frequência para classificação de cânceres. Muitas vezes, pode ser difícil determinar os diagnósticos definitivos; tais diagnósticos, no entanto, são importantes, pois, com frequência, influenciam o tratamento, a resposta e o prognóstico do paciente. O primeiro trabalho sobre o uso de microarranjos de DNA em amostras clínicas, com o objetivo de desenvolver perfis de expressão gênica para classificação de câncer, foi publicado em 1999 por Todd Golub (Golub, 1999). Desde essa época, os microarranjos de DNA vêm sendo extensivamente utilizados em uma ampla variedade de amostras de tecidos malignos e normais na tentativa de desenvolver testes diagnósticos e prognósticos.

Leucemia mieloide aguda/leucemia linfoblástica aguda: um novo paradigma

Conforme mencionado no Capítulo 71, um estudo pioneiro foi realizado com o uso de microarranjos de DNA para diferenciar entre leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA). Nesse estudo, *chips* de genes (Affymetrix GeneChips) contendo aproximadamente 6.800 genes humanos foram empregados para medir a expressão gênica de células mononucleares da medula óssea obtidas de pacientes com uma dessas doenças (Golub, 1999). A escolha de leucemias agudas, um processo maligno hematológico, neste estudo foi importante por várias razões. Experimentos prévios de microarranjos de DNA haviam produzido resultados reprodutíveis em linhagens celulares; entretanto, amostras clínicas introduzem ruídos adicionais que podem obscurecer diferenças. As células mononucleares diminuem esses ruídos, pois constituem uma população de células cancerígenas relativamente homogênea, em contraste com as biópsias de tumores maciços com quantidades variadas de células estromais circunjacentes. Além disso, a distinção entre os subtipos de leucemia aguda não é uma tarefa fácil com o uso das técnicas existentes, mas a descoberta de marcadores moleculares adicionais aumentaria a precisão do diagnóstico e, por fim, exerceria impacto sobre a escolha do esquema terapêutico.

A fim de analisar a possibilidade de detecção de diferenças na expressão gênica entre as 27 amostras de LLA e as 11 amostras de LMA nesse estudo, empregou-se um método chamado "análise de

vizinhança". O método classifica os genes cujos padrões de expressão nos pacientes são altamente correlacionados com a classe da amostra (LLA ou LMA). Um gene expresso em altos níveis em todos os pacientes com LLA, porém em baixos níveis naqueles com LMA, por exemplo, será classificado de forma alta. O significado, ou qual a probabilidade de a correlação ser por acaso, é avaliado pela atribuição aleatória de rótulos de classe a cada uma das amostras e pela repetição da análise. Cerca de 1.100 genes foram significativamente correlacionados com os rótulos de classe e, em seguida, os 50 genes do topo da lista foram utilizados em um algoritmo de predição de classes do tipo votação ponderada, que prediz a classe de amostras desconhecidas. Cada um dos 50 genes emite um voto que indica a classe da nova amostra. O "voto" de cada gene, quer para LMA ou LLA, é determinado, calculando-se se o valor de expressão para o gene na amostra desconhecida está mais perto do valor médio de expressão para o gene em todos os pacientes com LLA ou em todos aqueles com LMA. Os votos, então, são ponderados, de acordo com a força da correlação entre os níveis da expressão gênica e o vetor da classe. Os votos para cada classe são somados, sendo atribuída a amostra desconhecida à classe com o maior voto total. Uma métrica adicional, conhecida como a força de predição, pode ser calculada para determinar a margem de vitória (para mais detalhes, ver http://www.broad.mit.edu/cancer/software/genecluster2/gc2.html e Reich, 2004). A acurácia do método de predição foi avaliada por validação cruzada "deixando uma amostra de fora" (*leave one out*), em que se retira uma das 38 amostras, repete-se a análise e prediz-se a classe da amostra deixada de fora. Utilizando essa abordagem, esse estudo descobriu que 36 das 38 amostras foram classificadas de modo correto e duas delas, como incertas na validação cruzada. O preditor também foi testado em um conjunto independente de 34 amostras adicionais e corretamente classificado em 29 das 34 amostras. O grupo de 50 genes continha marcadores conhecidos de linhagem de células linfoides *versus* mieloides, bem como genes relacionados à carcinogênese.

Além de identificar os marcadores capazes de distinguir entre LMA e LLA, Golub et al. utilizaram um método de agrupamento sem supervisão, conhecido como mapas auto-organizáveis (SOM, *self-organizing maps*), para avaliar se os dois subtipos de leucemia podiam ser encontrados dentro dos dados de expressão gênica sem o conhecimento prévio das duas classes de leucemia. As amostras do grupo de SOM em um número de agrupamentos definido pelo usuário baseavam-se nas similaridades dos padrões de expressão gênica. SOM de dois agrupamentos produziam um agrupamento contendo 24 das 25 amostras de LLA e outro agrupamento com 10 das 13 amostras de LMA. Um SOM de 4 agrupamentos também era capaz de distinguir entre LLA de linhagem T, LLA de linhagem B e LMA. O sucesso desse experimento inicial e de suas implicações animadoras, bem como os avanços na tecnologia, na análise e na viabilidade dos microarranjos de DNA, têm resultado em um aumento exponencial de estudos clínicos com o uso de microarranjos. Os resultados de alguns desses estudos recentes serão apresentados a seguir.

Tumores de pequenas células redondas e azuis da infância: mudança do paradigma para tumores maciços

Outro câncer de difícil diagnóstico com o uso de diversas análises moleculares especializadas e histológicas é representado pelos tumores de pequenas células redondas e azuis (SRBT, *small round blue cell tumors*) da infância, que incluem o neuroblastoma, o rabdomiossarcoma, o linfoma não Hodgkin e a família de tumores de Ewing (EWS, *Ewing family of tumors*). Khan et al. estão entre os primeiros pesquisadores a identificar marcadores moleculares preditivos dos subtipos de SRBT (Khan, 2001). Foram selecionados genes preditivos com o uso de redes neurais artificiais (ANN, *artificial neural networks*), que representam programas computadorizados de reconhecimento de padrões modelados a partir da estrutura e do comportamento neurais do cérebro humano. Semelhantemente ao cérebro humano, as ANN são capazes de aprender com a experiência. Um neurônio pode aceitar muitos aportes neurais (ou seja, impulsos), mas possui apenas uma única saída e, de maneira análoga, os neurônios artificiais emitem um sinal com base nos vários aportes neurais. As ANN consistem em vários neurônios artificiais conectados, capazes de reconhecer padrões nos dados de treinamento por meio da otimização de vários parâmetros (os pesos atribuídos às ligações entre os neurônios) para predizer o tipo de tumor de amostras desconhecidas com precisão.

Khan et al. utilizaram microarranjos de cDNA contendo 6.567 genes para medir a expressão gênica de 63 amostras, que incluíam tanto biópsias tumorais (13 EWS e 10 rabdomiossarcomas) quanto linhagens celulares (10 EWS, 10 rabdomiossarcomas, 12 neuroblastomas e 8 linfomas de Burkitt, um subgrupo de linfoma não-Hodgkin). Utilizando um conjunto filtrado de 2.308 genes, as 63 amostras representativas de quatro categoriais diagnosticadas de SRBT foram usadas para preparar modelos lineares de ANN. Noventa e seis sondas correspondentes a 93 genes foram selecionadas com base nos modelos de ANN, pois minimizavam a taxa de erro de classificação para 0%. O algoritmo foi validado em um conjunto de teste de 25 amostras que correspondiam a uma mistura de linhagens celulares, biópsias tumorais e cinco tumores não SRBTs. Dezessete amostras de teste de SRBT foram classificadas de modo correto e as três amostras remanescentes de SRBTs, junto com as cinco amostras de não SRBTs, não puderam ser subtipadas. Interessantemente, ainda que apenas os dados de linhagens celulares de neuroblastoma tenham sido utilizados no conjunto de treinamento, o modelo predisse com precisão as amostras de biópsia tumoral de neuroblastoma nesse conjunto de teste. Os resultados sugerem que o uso de linhagens celulares pode ser benéfico na redução do ruído criado por contaminação estromal das amostras tumorais.

Muitos dos 96 genes preditivos relatados no estudo mencionado antes estavam expressos em altos níveis em uma, duas ou três das quatro categoriais diagnósticas. Um único marcador, *MIC2*, é utilizado na atualidade para diagnóstico de EWS. Contudo, o *MIC2* era altamente expresso em EWS e em alguns rabdomiossarcomas, sugerindo que o marcador possa carecer de especificidade se utilizado de modo isolado. Outro marcador molecular, *FGFR4*, um receptor tirosina quinase relacionado à miogênese e suprarregulado (ou seja, regulado de forma positiva) apenas em amostras de rabdomiossarcoma, foi investigado por imunocoloração em uma variedade de tecidos. Foi descoberto que o *FGFR4* esteja suprarregulado em alguns outros cânceres e tecidos normais, fornecendo indícios quanto à sua potencial importância biológica, ao mesmo tempo em que se diminui seu potencial como marcador molecular específico. A descoberta ilustra que uma coleção de genes, em vez de um único marcador molecular, pode aumentar a sensibilidade e a especificidade diagnósticas. Isso complementa as conclusões do Capítulo 76 sobre oncoproteínas no diagnóstico de tumores: os arranjos de oncoproteínas são mais eficazes na detecção precoce de tumor do que oncoproteínas individuais isoladas.

Aplicações diagnósticas adicionais no câncer

Além desses estudos, vários outros experimentos de microarranjos de DNA e SAGE foram conduzidos para o desenvolvimento de testes diagnósticos em cânceres humanos de difícil classificação por métodos histológicos convencionais (ver também Cap. 68). O esôfago de Barrett, em que o revestimento do esôfago é substituído por células colunares metaplásicas, é um distúrbio associado com doença do refluxo gastresofágico, que pode levar ao desenvolvimento de carcinoma ou adenocarcinoma de células escamosas. Além de ser de difícil detecção em um estágio precoce, o câncer esofágico possui alta taxa de mortalidade. Os agrupamentos hierárquicos e as ANN foram utilizadas para descobrir os perfis de expressão gênica medidos por microarranjos de cDNA, que podem distinguir entre amostras de câncer de esôfago e metaplasia de Barrett (Selaru, 2002; Xu, 2002). Os níveis de expressão de um pequeno subgrupo de genes preditores foram quantificados com ensaio de PCR por transcriptase reversa quantitativa de Taqman (AppliedBiosystems, Inc.) em 39 pacientes com metaplasia de Barrett ou câncer de esôfago para avaliar a utilidade clínica desses níveis de expressão (Brabender, 2004).

Também há necessidade de novos marcadores moleculares diagnósticos para distinguir entre lesões de padrão folicular da tireoide. O carcinoma papilar da tireoide costuma ser diagnosticado com aspirado por agulha fina após a detecção de algum nódulo nessa glândula; no entanto, esse teste não é capaz de diferenciar entre adenoma folicular da tireoide (FTA, *follicular thyroid adenoma*) e carcinoma folicular da tireoide (FTC, *follicular thyroid carcinoma*), sendo comumente justificável a realização de biópsia cirúrgica mais invasiva. Cerutti et

al. tentaram desenvolver um teste diagnóstico pré-operatório, elaborando e analisando três bibliotecas de SAGE com o uso de amostra de FTA, FTC e tireoide normal (Cerutti, 2004). Mais de 360.000 *tags* foram sequenciadas entre as três bibliotecas, mas 305 genes estavam significativa e diferencialmente expressos entre os três grupos. Um subgrupo desses genes foi selecionado para validação com PCR-RT em amostras independentes que incluíam 10 FTA, 13 FTC e tecidos normais da tireoide de 8 pacientes compatíveis. A técnica de PCR-RT foi realizada em um subgrupo dos 305 genes: 12 dos genes mais altamente expressos em FTC e 5 dos genes mais altamente expressos em FTA/tireoide normal foram escolhidos para validação com PCR-RT. Quatro genes (*DDIT3*, *ARG2*, *ITM1* e *C1orf24*) validaram os resultados da SAGE e foram capazes de predizer de modo correto 19 das 23 amostras em uma validação cruzada deixando uma amostra de fora. Além disso, a imuno-histoquímica foi realizada em 32 tecidos de FTA e 27 tecidos de FTC embebidos em parafina, utilizando anticorpos contra dois dos quatro genes, *DDIT3* e *ARG2*. Esses genes exibiram coloração positiva para FTC, mas coloração negativa para *ARG2* em grande parte das amostras, sugerindo que esses marcadores possam melhorar o diagnóstico pré-operatório de nódulos da tireoide.

Também pode ser difícil a identificação histológica do local do tumor primário nos pacientes que apresentam adenocarcinoma metastático. O conjunto de dados da SAGE sugeriu que os adenocarcinomas primários e metastáticos agrupados de acordo com seu local de origem, e uma variedade de métodos de quantificação do RNA, incluindo microarranjos de DNA e SAGE, bem como a literatura especializada foram utilizados para selecionar marcadores moleculares tumor- e local-específicos (Dennis, 2002). Buckhaults et al. analisaram um conjunto de 11 bibliotecas de SAGE de adenocarcinomas de ovário, mama, pâncreas e cólon, até selecionar cinco genes que eram capazes de diferenciar esses carcinomas de diferentes origens teciduais (Buckhaults, 2003). Um algoritmo de predição de classes, conhecido como mapa bidimensional de classificação com base na expressão gênica, foi capaz de classificar corretamente a origem do tecido em 81% das 62 amostras independentes de carcinomas de ovário, mama, pâncreas e região colorretal com base em dados de PCR-RT dos 5 genes. Um estudo relacionado, que tinha por objetivo a identificação de marcadores moleculares de metástase em tumores primários, comparou os perfis de expressão gênica de adenocarcinomas primários e nódulos metastáticos não pareados de diferentes indivíduos em um amplo espectro de tipos de tumores. Foram identificados 128 genes, cujos padrões de expressão possibilitavam a distinção entre adenocarcinoma primário e metastático (Ramaswamy, 2003). Ramaswamy et al. demonstraram que um subgrupo dos 128 genes estava associado com metástase em um conjunto de dados independentes de adenocarcinomas primários de pulmão, mama e próstata, bem como de meduloblastomas e linfomas de células B grandes. Esses achados desafiam a hipótese de que o potencial metastático surge em algumas células no tumor primário, mas sugere que a capacidade de sofrer metástase preexiste no tumor primário. Se isso for correto, os padrões de expressão gênica em tumores primários podem predizer o risco futuro de metástase a distância.

Tecnologias genômicas de alto desempenho também já foram utilizadas em diversas outras doenças, incluindo carcinoma de bexiga (Dyrskjot, 2003), tumores embrionários do sistema nervoso central (Pomeroy, 2002), câncer de ovário (Sawiris, 2002), câncer de mama (Perou, 2000, Porter, 2001, 2003a), câncer pancreático (Iacobuzio-Donahue, 2002), câncer de pulmão (Bhattacharjee, 2001) e câncer colorretal (Buckhaults, 2001) para ajudar no diagnóstico da doença e na identificação de novos subtipos patológicos. O uso de tecnologias genômicas de alto desempenho para o desenvolvimento de testes diagnósticos de doenças é um problema inerentemente difícil, pois os genes preditivos identificados por um conjunto de treinamento baseiam-se em diagnósticos histopatológicos. Os métodos histológicos para classificação de certos cânceres, no entanto, podem não ser perfeitos, dificultando a avaliação da real acurácia dos marcadores moleculares. Além disso, é difícil verificar a existência de novos subtipos patológicos encontrados em experimentos de microarranjos de DNA se nenhuma prova histológica complementar estiver disponível. No futuro, é provável que os patologistas façam uso da tecnologia genômica de alto desempenho para facilitar o diagnóstico preciso em casos difíceis. Portanto, a maioria dos estudos conduzidos com o uso de tecnologias genômicas de alto desempenho decidiu focar a identificação dos perfis de expressão gênica preditivos do prognóstico da doença, dado o número limitado de indicadores histológicos ou clínicos para predizer o desfecho da mesma (ver adiante).

Tecnologia proteômica

No Capítulo 75, uma nova abordagem para a detecção precoce de vários tipos diferentes de câncer com base nos padrões de expressão proteica, chamada tecnologia proteômica, foi discutida como uma tecnologia de grande potencial. Essa abordagem não busca por proteínas específicas conhecidas, mas, sim, por diferenças nos padrões de expressão proteica (a identidade de muitas dessas proteínas é desconhecida), com base no uso da MS. Aqui, discutiremos essa abordagem com mais detalhes para ilustrar o potencial de métodos pós-genômicos de alto desempenho na detecção de câncer. Conforme mencionado, essa abordagem não identifica as proteínas envolvidas, mas, em vez disso, repousa nas amplitudes variadas de várias relações m/z distintas presentes nas amostras (Fig. 76.6). Dado o prognóstico mais favorável observado em casos de malignidades diagnosticadas em estágios mais precoces, há um grande interesse no uso de ferramentas proteômicas para buscar por marcadores diagnósticos em amostras biológicas facilmente disponíveis, como sangue, urina ou saliva (Capítulo 75).

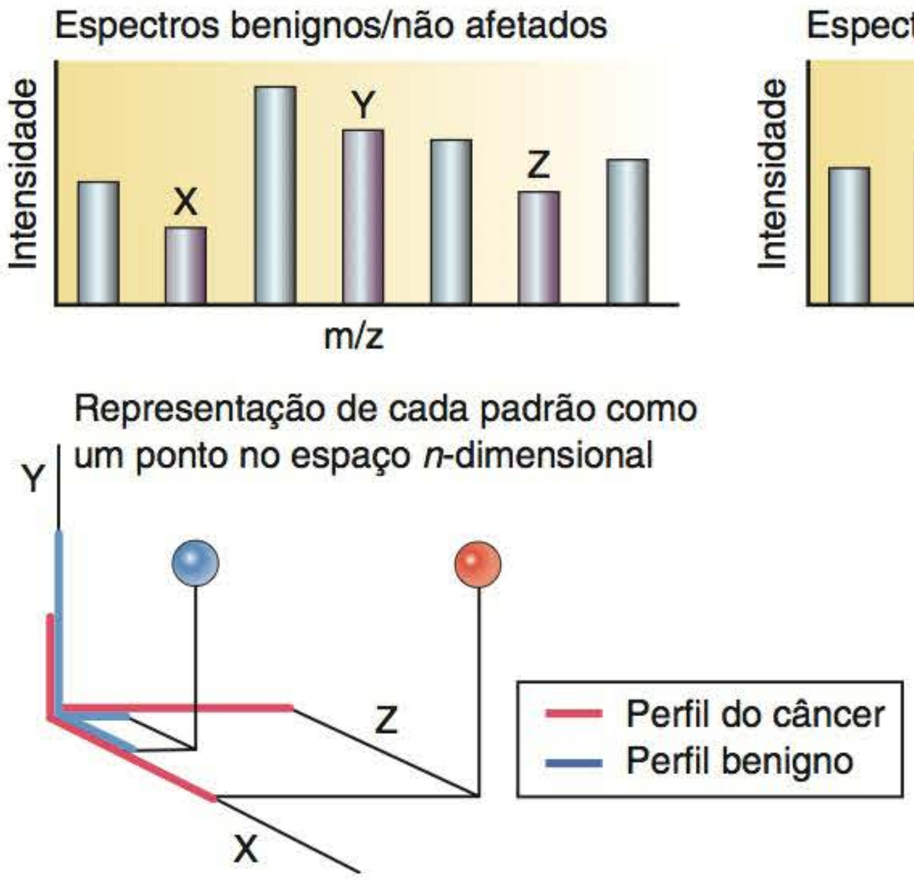


Figura 76.6 Uso do padrão proteômico para diagnóstico. A análise do padrão identifica as relações m/z com a combinação "mais adequada" de proteínas para distinguir os estados clínicos de interesse. (Reproduzida de Petricoin EF et al. Nature Reviews Drug Discovery 1, 683–695 (2002).)

Câncer de ovário: um novo paradigma para detecção precoce

As pacientes com câncer de ovário com frequência apresentam um prognóstico pior do que aquelas com outras malignidades, em parte por causa do estágio avançado da doença no momento do diagnóstico. Na tentativa de desenvolver um teste de triagem para mulheres de alto risco, Liotta et al. utilizaram uma plataforma à base de MS para analisar amostras séricas de pacientes com câncer de ovário comparadas com controles e descobriram que seu modelo era capaz de distinguir entre o soro de mulheres com e sem esse tipo de câncer com grau de precisão notavelmente alto (Petricoin, 2002).

O método de Liotta et al. utiliza a técnica de SELDI-TOF MS: ionização por dessorção a laser realçada por superfície (SELDI, *surface-enhanced laser desorption ionization*) aliada com espectrômetro de massa que mede o tempo de voo (TOF, *time of flight*) das proteínas ionizadas, do laser para o detector. As amostras séricas são colocadas em um *chip* com cátions fracos embebidos, que conferem o "realce da superfície" da técnica de SELDI. O excesso de soro é removido, mas as proteínas ligadas aos cátions fracos permanecem no *chip*, no qual se combinam com uma solução matriz e ionizam-se quando expostas a um laser.

Cada amostra de soro resulta em valores de aproximadamente 15.000 m/z de amplitude variada. As ferramentas de bioinformática utilizadas para análise, como um complexo conjunto de dados, contam com a predição de classe, utilizando um algoritmo genético. A predição de classe envolve um conjunto de "treinamento" de amostras cancerígenas e não cancerígenas conhecidas. O algoritmo genético seleciona um painel de valores m/z e testa sua capacidade de diferenciar entre câncer e controle. A "genética" de um algoritmo genético representa uma analogia biológica que descreve a mistura e a compatibilidade repetidas dos valores de m/z mais bem-sucedidos, permitindo a "sobrevivência dos valores mais fortes" (ou seja, a "lei do mais forte") em gerações sucessivas de teste e, produzindo, por fim, os painéis mais discriminatórios, que são testados em um grupo mascarado de pacientes e controles.

Embora o painel utilizado nesse estudo tenha resultado em um teste com sensibilidade de 100% e especificidade de 95%, a validação em um quadro clínico mais realista ainda tem de ser feita. A ideia de estudar um grupo de marcadores em paralelo parecia adequada, dada a complexidade da biologia tumoral e de sua interação com o hospedeiro. A ausência de identificação proteica com essa técnica restringe o teste. Não está claro se os valores incluídos representam os componentes da biologia tumoral liberados na corrente sanguínea ou os marcadores inespecíficos de inflamação. Com 15.000 dados pontuais para escolher de cada amostra sérica, há um risco significativo de *overfitting* de qualquer modelo, o que teria pouca utilidade clínica na prática.

Outros cânceres

O trabalho de Liotta representa uma das primeiras tentativas mais significativas em atrelar e aproveitar a MS na busca por um biomarcador clinicamente útil e foi adotado por inúmeros estudos semelhantes em pacientes com câncer de mama (Kuerer, 2002), próstata (Ornstein, 2004b) e pulmão (Chen, 2003). Aplicando-se essas técnicas de detecção e análise ao câncer de próstata, dados preliminares de homens com elevação indeterminada do antígeno prostático-específico (PSA, *prostate specific antigen*) sugerem a existência de uma "assinatura iônica" que distingue entre homens com câncer de próstata e aqueles com hipertrofia prostática benigna com sensibilidade de 100% e especificidade de 67% (Ornstein, 2004a).

Como o soro representa uma amostra em particular complexa para análise proteômica à base de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE, *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*), outras amostras próximas ao tecido em questão podem estar mais prontamente disponíveis e ser mais simples de trabalhar. O líquido aspirado do mamilo é obtido de modo fácil e, no caso de doença unilateral, permite a aquisição de amostra pareada simples da mama não afetada. Kuerer et al. utilizaram a 2D-PAGE em um estudo descritivo inicial, comparando a expressão proteica no aspirado do mamilo de ambas as mamas em pacientes com câncer de mama unilateral e uma voluntária saudável (Kuerer, 2002). Os resultados desses pesquisadores demonstraram padrões muito concordantes de eletroforese proteica quando se comparou o líquido aspirado do mamilo de cada mama no indivíduo controle, exatamente o oposto às amostras obtidas de pacientes com câncer de mama, que exibiam uma quantidade maior de proteínas peculiares à mama afetada em comparação à mama não afetada na mesma paciente. O achado sugere que a malignidade mamária localizada altera, de modo significativo, a expressão proteica no líquido aspirado do mamilo, levantando a possibilidade de um marcador diagnóstico.

Marcadores moleculares prognósticos de doença

Genômica

Os pacientes diagnosticados com o mesmo tipo de câncer e tratados com a utilização de protocolos semelhantes frequentemente respondem de forma muito distinta e apresentam taxas de sobrevida variadas. Diversas variáveis clínicas e histológicas, como idade, níveis séricos de proteína e estágio ou grau de tumor, podem ser utilizadas para avaliar o prognóstico de um paciente com precisão variável. Muitos estudos empregaram tecnologias genômicas de alto desempenho, em especial microarranjos de DNA, conforme descrito em detalhes no Capítulo 68, para identificar as assinaturas de expressão gênica que predizem as taxas de sobrevida ou recidiva do paciente. Em vez de comparar dois estados patológicos diferentes, conforme detalhado anteriormente na seção sobre diagnóstico, o modelo experimental para o desenvolvimento de indicadores prognósticos moleculares, em geral, tenta estratificar um câncer específico em subtipos de acordo com o desfecho, utilizando abordagens computacionais com ou sem supervisão (Fig. 76.3). O marcador associado com prognóstico mau pode fornecer indícios sobre os mecanismos biológicos subjacentes à resistência aos quimioterápicos e ajudar na identificação de novos alvos medicamentosos.

Linfoma de grandes células B difuso

A identificação de marcadores moleculares que predizem a sobrevida do paciente envolve a distinção de diferenças sutis entre as amostras e, conforme exposto anteriormente na seção de diagnóstico, foram conduzidos muitos estudos sobre malignidades hematológicas em que uma população homogênea de células pode ser isolada de modo fácil. O linfoma de grandes células B difuso (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) é a neoplasia linfoide mais comum em adultos e compreende entre 30 e 40% de todos os linfomas não Hodgkin. A resposta à quimioterapia é altamente variável e menos da metade dos pacientes tratados alcança a remissão a longo prazo. Na atualidade, o Índice Prognóstico Internacional (IPI, *International Prognostic Index*) é utilizado para aproximar o desfecho dos pacientes diagnosticados com DLBCL com base nos vários fatores clínicos, como o nível da lactato desidrogenase sérica e o estágio do tumor. Alizadeh et al. construíram um microarranjo de cDNA especializado, conhecido como *Linfochip*, com 17.856 sondas selecionadas a partir de bibliotecas de cDNA de células B do centro germinativo, de DLBCL e de outro tipo de linfoma (Alizadeh, 2000). Foram utilizados 128 *Linfochips* para analisar 96 amostras normais e malignas de linhagens celulares de leucemia e linfoma, bem como de pacientes com DLBCL, linfoma folicular e leucemia linfocítica crônica. O agrupamento hierárquico dos microarranjos revelou três subgrupos de amostras de DLBCL com base nos genes relacionados à proliferação, às células T, à biologia do linfonodo e às células B do centro germinativo. Acredita-se que os DLBCL se originem em diferentes estágios de diferenciação das células B, mas o agrupamento hierárquico apenas das amostras de DLBCL nos genes relacionados às células B do centro germinativo separou a amostra em dois agrupamentos distintos – DLBCL do tipo células B do centro germinativo e DLBCL do tipo células B ativadas. Foi demonstrado que os dois subtipos apresentam sobrevida global diferente em termos estatísticos (72% dos indivíduos com DLBCL do tipo células B do centro germinativo permaneceram vivos após 5 anos em comparação a 16% daqueles com DLBCL do tipo células B ativadas) e essas duas classes podiam ser utilizadas para estratificar ainda mais os pacientes identificados sob baixo risco pelo IPI. Esse estudo foi um dos primeiros a relacionar os subtipos de tumor identificados pelo perfil de expressão gênica global ao desfecho do paciente. O uso de microarranjos de DNA no diagnóstico desse distúrbio e na subsequente subtipagem em linfoma do tipo células B do centro germinativo e do tipo células B ativadas foi abordado no Capítulo 71.

Um estudo de acompanhamento conduzido por Shipp et al. testou se um perfil de expressão gênica poderia ser identificado sem a descoberta prévia dos subtipos que previam a sobrevida em pacientes com DLBCL (Shipp, 2002). Os microarranjos Affymetrix HuGeneFL contendo aproximadamente 6.800 sondas foram utilizados para medir os perfis de expressão gênica global em 58 pacientes com DLBCL (32 pacientes com doença curada, 26 pacientes com doença refratária/fatal). O algoritmo de predição de classes do tipo votação ponderada com validação cruzada foi usado para identificar uma assinatura de expressão gênica de 13 genes capazes de distinguir entre os pacientes com doença curada (ou seja, livres de doença) e doença fatal. O modelo de predição também era capaz de estratificar os pacientes em grupos de prognóstico bom e mau dentro das categorias definidas pelo IPI. Como validação adicional, o estudo atual foi comparado com os achados prévios relatados pelo grupo de Alizadeh. Os estudos utilizaram plataformas de microarranjos que pesquisaram dois grupos diferentes, porém sobrejacentes, de genes. Os genes que foram utilizados para distinguir os dois subtipos de DLBCL no estudo de Alizadeh e que também estavam presentes no microarranjo HuGeneFL separaram os 58 DLBCL em dois grupos, mas os grupos não se correlacionaram com as taxas de sobrevida global. Contudo, 3 dos 13 genes preditivos identificados por Shipp et al. estavam presentes no *Linfochip* e correlacionavam-se com a sobrevida dos pacientes no estudo de Alizadeh.

Em um estudo relacionado, Rosenwald et al. utilizaram o *Linfochip* para estudar 240 pacientes que tinham DLBCL não tratado e, subsequentemente, receberam quimioterapia à base de antraciclina (Rosenwald, 2002). Com o uso de um conjunto de treinamento de 160 amostras, os níveis de expressão gênica foram correlacionados com os tempos de sobrevida, utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox. Seiscentos e setenta genes exibiam padrões de expressão que estavam correlacionados, de modo significativo, com o prognóstico, mas esses genes foram agrupados para identificar grupos de genes com padrões de expressão similares. Os genes altamente correlacionados estavam envolvidos em processos biológicos semelhantes, mas quatro grupos de genes correlacionados referidos à proliferação, à classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*), à biologia do linfonodo e às células B do centro germinativo foram usados para desenvolver um modelo de predição de classes. A média dos níveis de expressão gênica dos genes dentro de cada grupo foi calculada e tais valores compostos foram utilizados para construir um modelo de predição multivariado. O modelo era capaz de atribuir a cada amostra no conjunto de teste um escore relacionado ao risco de sucumbir à doença. Os escores atribuídos pelo modelo a todo o conjunto de amostras foram estratificados em quartis, com sobrevida de 73% em um período de 5 anos no primeiro grupo comparado a 15% no quarto grupo.

Linfoma folicular

Um modelo de predição de sobrevida semelhante foi utilizado para predizer o prognóstico de pacientes com linfoma folicular, um câncer que, de forma semelhante, se origina das células B do centro germinativo (Dave, 2004). Os tratamentos podem envolver quimioterapia, terapia imunológica ou transplante de células-tronco hematopoéticas; no entanto, não há um consenso sobre qual esquema terapêutico é superior. Além disso, o resultado é muito variável. As biópsias tumorais de 191 pacientes com linfoma folicular foram divididas em um conjunto de treinamento e outro de teste. Utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox para correlacionar os genes com a sobrevida, dois grupos de genes altamente correlacionados foram escolhidos para construir um modelo preditivo multivariado. O grupo associado com prognóstico favorável continha genes altamente expressos em células T e macrófagos, enquanto aquele associado com prognóstico mau continha genes expressos em macrófagos e células dendríticas. Em outros experimentos em amostras de biópsia separadas em frações malignas e não malignas, os dois grupos de genes encontravam-se altamente expressos apenas nas frações não malignas. Os resultados sugerem que o microambiente do tumor influencia, de modo significativo, o prognóstico.

Os estudos mencionados anteriormente sobre linfoma demonstram que os microarranjos podem ser bem-sucedidos na predição do prognóstico do paciente com precisão e podem complementar os métodos utilizados na atualidade, como o IPI. Os resultados implicam que as biópsias obtidas no momento do diagnóstico podem ser usadas para predizer o prognóstico, podendo influenciar as decisões terapêuticas. Conforme observado antes, entretanto, há uma divergência entre os estudos em consequência de diversos fatores, incluindo a plataforma de microarranjos de DNA utilizada, a população de pacientes, as diferenças nos esquemas terapêuticos, o tamanho da amostra, a qualidade variável de dados de acompanhamento a longo prazo e a escolha da metodologia de predição (ver seção sobre "Armadilhas", adiante). O estudo sobre linfoma folicular também demonstra a importância do microambiente do tumor, algo que não é tipicamente explorado em estudos de microarranjos de DNA.

Leucemia mieloide aguda

Apesar dos problemas potenciais, muitos outros estudos foram conduzidos em uma ampla variedade de tipos de tumor. Em 2004, dois estudos publicados no *New England Journal of Medicine* identificaram os perfis de expressão gênica que podem ser utilizados como indicadores prognósticos em casos de LMA (Bullinger, 2004; Valk, 2004). O grupo de Bullinger utilizou microarranjos de cDNA (~39.000 sondas) para obter os perfis de expressão gênica global em 116 pacientes com LMA, enquanto o grupo de Valf empregou microarranjos U133A Affymetrix humanos (~22.000 sondas) para analisar 285 pacientes com LMA. O agrupamento hierárquico não supervisionado em ambos os estudos revelou agrupamentos que se correlacionavam com anormalidades citogenéticas e moleculares presentes nos tumores. Utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox implementado no *software* de análise de significância de microarranjos (SAM, *Significance Analysis of Microarray*) (Tusher, 2001), Bullinger et al. identificaram os padrões de expressão gênica que se correlacionavam com a sobrevida. O agrupamento por k-médias foi utilizado para dividir as amostras de treinamento em dois grupos, representando os desfechos bons e maus, com base nos genes selecionados pela SAM. O algoritmo da análise de predição de microarranjos (PAM, *Prediction Analysis of Microarrays*) foi empregado para desenvolver um preditor de desfecho, utilizando 133 genes com base nos dois grupos identificados no conjunto de treinamento. O algoritmo de predição foi aplicado às amostras de teste e era capaz de separá-las em dois grupos que se diferenciavam de modo significativo em relação aos tempos de sobrevida. O grupo de Valk usou métodos semelhantes para identificar os genes que poderiam classificar as amostras em subgrupos patológicos previamente identificados pela análise de agrupamento. Os subgrupos foram associados com as anormalidades citogenéticas e moleculares, bem como com o prognóstico do paciente. Ambos os estudos demonstram a utilidade da análise de expressão gênica global em dissecar a heterogeneidade existente dentro dos tumores do mesmo tipo. O alto grau de sobreposição dos resultados entre esses dois estudos demonstra o potencial da tecnologia de microarranjos para distinguir entre subtipos tumorais sutis e acrescentar informações prognósticas à prática clínica atual.

Câncer de mama

Embora estudos semelhantes sobre biomarcadores prognósticos tenham sido efetuados em casos de câncer de próstata (Dhanasekaran, 2001), adenocarcinoma de pulmão (Beer, 2002) e mieloma múltiplo (Tian, 2003b), a identificação desse tipo de biomarcadores em câncer de mama, no entanto, melhor demonstra como estudos genômicos de alto desempenho bem-sucedidos podem se traduzir em ferramentas clínicas importantes. Marcadores moleculares prognósticos foram identificados a partir de estudos de expressão gênica, utilizando biópsias de câncer de mama primário de pacientes com menos de 55 anos de idade e doença esporádica com nodo negativo, que desenvolveram e não desenvolveram metástases dentro de um período de 5 anos. O potencial preditivo desses marcadores moleculares foi considerado superior ao de outros fatores clínicos e histológicos, como grau e tamanho do tumor, angioinvasão ou estado de receptores estrogênicos (van't Veer, 2002). Estudos semelhantes sobre câncer de mama foram subsequentemente conduzidos (van de Vijver, 2002; Huang, 2003, Sotiriou, 2003) e um trabalho recente descreve o desenvolvimento de um modelo preditivo que utiliza a expressão gênica, bem como dados clínicos e histológicos, para estimar o prognóstico com maior precisão (Pittman, 2004).

Um obstáculo para a realização de estudos de microarranjos de DNA está na escassez de tecidos congelados de forma instantânea, obtidos de pacientes com acompanhamento a longo prazo. O tecido congelado de forma instantânea preserva a integridade do RNA, sendo ideal para experimentos de microarranjos de DNA; no entanto, a maioria dos bancos de tecido ou ensaios clínicos coleta tecido embebido em parafina. Esse tipo de tecido embebido em parafina contém RNA parcialmente degradado, que costuma ser insuficiente para a obtenção de resultados de microarranjos de DNA de alta qualidade (embora os avanços nessa área estejam em andamento). Tecnologias, como PCR competitiva real e PCR em tempo real, estão sendo utilizadas para medir os níveis de expressão gênica nesses tecidos, mas a quantidade de RNA obtida de blocos de tecido com frequência limita os ensaios a algumas centenas de genes. Utilizando a técnica de PCR-RT, Paik et al. estudaram 21 genes (16 genes relacionados ao câncer e 5 genes de referência para normalização) selecionados a partir dos estudos de microarranjos de DNA de câncer de mama esboçados anteriormente. As amostras incluíam 675 blocos de tecidos embebidos em parafina obtidos de pacientes inscritas nos ensaios do National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 (Paik, 2004). Todos os blocos de tecido foram obtidos de pacientes que foram tratadas com tamoxifeno e tinham câncer de mama primário negativo para nodos e positivo para receptores estrogênicos. Os níveis de expressão dos 16 genes relacionados ao câncer foram utilizados para calcular um escore representativo do risco de recorrência do câncer em um local a distância. As pacientes foram estratificadas em grupos de risco baixo, intermediário e alto, com base no escore de recorrência. O escore de recorrência forneceu informações preditivas significativas, além do grau, da idade e do tamanho do tumor. O ensaio de 21 genes simplificado pode ser mais facilmente traduzido em um teste prognóstico clínico destinado a ajudar os médicos na decisão de quais pacientes com câncer de mama tratadas com tamoxifeno, negativas para nodos e positivas para receptores estrogênicos devem receber a quimioterapia.

Também foram identificados marcadores moleculares prognósticos para câncer de mama, utilizando a tecnologia SAGE. Ao contrário dos microarranjos de DNA, a SAGE não pode ser utilizada para analisar centenas de amostras clínicas; entretanto, ela não fica restrita a genes conhecidos nem limitada pela seleção de sondas em um microarranjo. A SAGE é capaz de identificar novos transcritos sem descrição prévia, possivelmente por causa de sua expressão tecido-específica (uma vantagem na terapêutica em desenvolvimento). Dois estudos realizados com o uso de bibliotecas de SAGE obtidas de tecido normal, carcinoma ductal *in situ* (DCIS, *ductal carcinoma in situ*), tumores de mama invasivos e metastáticos foram utilizados para identificar os transcritos que sofriam alterações entre cada um dos estados patológicos (Porter, 2001, 2003a). Vários genes de DCIS ou genes "específicos" invasivos/metastáticos foram analisados por hibridização do mRNA *in situ*, utilizando 18 amostras congeladas de DCIS e câncer de mama invasivo, e por imuno-histoquímica, utilizando 769 amostras de DCIS e tumor de mama invasivo/metastático. O S100A7, um membro da família S100 de proteínas ligantes de cálcio, estava preferencialmente expresso em DCIS (com níveis mais altos restritos ao DCIS tipo comedo de alto grau) *versus* tecido normal ou tumores invasivos/metastáticos. Embora o gene da proteína ligante de cálcio S100A7 seja expresso com menor intensidade em tumores invasivos, os níveis são mais altos em tumores negativos para receptores estrogênicos, pouco diferenciados e positivos para linfonodos, sugerindo que sua expressão em DCIS possa ser um indicador prognóstico útil. Em um estudo de acompanhamento, Porter et al. ainda caracterizaram a dermocidina, identificada nos estudos anteriores como um gene preferencialmente expresso em tumores invasivos e metastáticos. A dermocidina é um gene recém-caracterizado expresso nas glândulas sudoríferas e na ponte cerebral (Porter, 2003b). O marcador era expresso em um subgrupo de tumores invasivos por imuno-histoquímica e sua expressão correlacionava-se com o tamanho maior do tumor e a presença de linfonodos metastáticos. Em um subgrupo de casos, os níveis mais altos de expressão eram atribuídos à amplificação do gene no *locus* gênico do cromossomo 12. Foi demonstrado que a dermocidina aumenta o crescimento e a sobrevida das células, podendo ser um indicador prognóstico promissor de sobrevida global e sobrevida livre de metástase a distância.

Integração de tecnologias genômicas e proteômicas: o câncer pulmonar como o novo paradigma

O desenvolvimento de tecnologia de alto desempenho possibilita não só a pesquisa de como inúmeros genes ou proteínas podem predizer um aspecto clínico de interesse, mas também o estudo da sobreposição de atividade transcricional e tradução proteica. Beer et al. pesquisaram a capacidade do perfil genético e da tradução proteica em predizer a sobrevida do paciente em casos de adenocarcinoma de pulmão (Chen, 2003). Depois de filtrar os genes de baixa abundância, esses pesquisadores descobriram cerca de 5.000 genes consistentemente expressos em uma coorte de 86 amostras de adenocarcinoma e 10 amostras de tecido normal. O agrupamento hierárquico e a validação cruzada "deixando uma amostra de fora" geraram uma lista dos 50 genes mais eficazes na divisão de pacientes em grupos de alto e baixo risco em termos de mortalidade durante vários anos de acompanhamento. Era de particular interesse a observação de que os pacientes em estágio I, aqueles que mais provavelmente exibiriam uma cura cirúrgica de sua doença, também podiam ser divididos em grupos de alto e baixo risco, identificando um novo grupo em potencial que se beneficiaria com a quimioterapia adjuvante.

Ao todo, 76 amostras de tumor foram submetidas à análise de microarranjos e de proteomas. Nos exemplos de genes encontrados junto com seu produto proteico correspondente, a correlação atingiu o pico em 0,39. Embora significativo do ponto de vista estatístico, o baixo grau de correlação reforça a questão de que o modelo supersimplificado de transcrição e tradução é, na realidade, um sistema muito mais elaborado de regulação traducional, glicosilação, fosforilação e mais modificações a jusante. Conforme conclusão tirada pelos autores, muitos dos transcritos provavelmente não se correlacionam bem como suas contrapartes proteicas em consequência desse desenvolvimento pós-tradução contínuo.

A extensão dessa pesquisa, incluindo as tecnologias genômicas e proteômicas, desvendou uma coorte significativa de genes e proteínas envolvidas na via glicolítica e reguladas de forma positiva entre os pacientes com alto risco de mortalidade, sugerindo que essa integração de genomas e proteomas tem um valor especial no esclarecimento sobre a patogênese molecular de estados patológicos.

Armadilhas de marcadores moleculares em termos de prognóstico e diagnóstico

Discordância entre conjuntos de dados relacionados de microarranjos de DNA

Os estudos sobre linfoma difuso de grandes células B conduzidos por Alizadeh e Shipp identificaram subgrupos de genes que especificaram dois subtipos de pacientes com DLBCL; tais pacientes diferiam em termos de sobrevida. Shipp et al. também identificaram dois subtipos de pacientes com DLBCL; no entanto, esses pesquisadores não os correlacionaram com a sobrevida. O exemplo supramencionado ilustra um dos muitos estudos de microarranjos de DNA, em que há pouca ou nenhuma sobreposição dos resultados. Existem várias causas potenciais no modelo experimental e nas análises dos resultados de microarranjos de DNA que podem ser responsáveis pelas discrepâncias generalizadas (Simon, 2003). Dois estudos diferentes realizados com o uso de amostras teciduais semelhantes podem ter tamanhos de amostras e populações de pacientes levemente distintos. A heterogeneidade do tecido também é um problema – as biópsias obtidas de diferentes locais contêm uma quantidade variada de células normais que contaminam as amostras de tumores. Além disso, não existe um "padrão" para o pré-processamento e a análise dos dados de microarranjos. Novas abordagens computacionais estão surgindo continuamente e dois grupos que analisam o mesmo conjunto de dados com frequência produzirão listas diferentes de genes. Por fim, estão sendo desenvolvidas, na atualidade, metodologias para comparar o conjunto de dados gerados com o uso de diferentes plataformas de microarranjos de DNA, mas estudos semelhantes com resultados sem sobreposição podem ter empregado métodos inadequados de comparação (ver também Cap. 68).

Overfitting do preditor

De modo tradicional, os estudos clínicos visam associar um "punhado" de variáveis em algumas centenas de pacientes, enquanto os estudos de microarranjos de DNA contêm milhares de variáveis (níveis de expressão gênica) em um número relativamente pequeno de pacientes (em geral, entre 20 e 200 indivíduos). Muitos algoritmos de predição de classes produzem resultados precisos para as amostras no estudo de origem, mas, quando aplicados a uma amostra independente de pacientes, o desempenho cai significativamente – um fenômeno conhecido como *overfitting* (Ransohoff, 2004). Portanto, os resultados dos estudos de microarranjos de DNA são mais sólidos quando os dados são divididos em um conjunto de treinamento e um conjunto de teste ou validação (Ntzani, 2003). Além da necessidade de validação em amostras independentes, também é importante validar os níveis de expressão gênica com o uso de tecnologia diferente. Para cumprir a real promessa dessas tecnologias, torna-se crítico o desenvolvimento de métodos que combinem vários estudos de expressão gênica a fim de identificar os marcadores consistentemente correlacionados com a classe ou o desfecho da doença e, depois, validar esses marcadores com o uso de tecnologia diferente e coorte de pacientes.

O efeito *bystander*

Miklos et al. compararam estudos de microarranjos de DNA, que medem a expressão dos genes do córtex pré-frontal em pacientes acometidos ou não por esquizofrenia, com estudos não relacionados a microarranjos, que incluíam medidas de genes, RNA e proteínas por meio de diversas abordagens (Miklos, 2004). Foi constatada pouca sobreposição entre os experimentos de microarranjos de DNA e aqueles não vinculados a microarranjos. Uma razão para isso pode ser o fato de que os genes identificados com estudos de microarranjos de DNA sejam *bystander* (circunstantes), ou seja, não estejam envolvidos na patogênese do estado patológico. Os genes identificados por estudos de ligação (*linkage*) genética costumam ter relação causal com alguma doença; no entanto, os níveis de expressão desses genes podem permanecer constantes, já que a alteração genética afeta apenas a junção do mRNA ou a regulação pós-transcricional. Além disso, as tecnologias de microarranjos de DNA podem não ser sensíveis o suficiente a ponto de medir com precisão as alterações na expressão gênica em genes expressos em baixos níveis.

Apesar das advertências expostas anteriormente, os estudos de microarranjos de DNA na literatura especializada recente começaram a explorar o significado biológico e o potencial terapêutico de genes promissores com maior profundidade, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, pelo uso de microarranjos de DNA, Tian et al. identificaram um gene, *DKK1*, que era diferencialmente expresso em pacientes acometidos por mieloma múltiplo com e sem lesões ósseas focais (Tian, 2003a). Os pacientes com lesões ósseas expressavam níveis mais altos de RNA e proteína codificados pelo gene *DKK1*. O gene *DKK1* está envolvido na formação óssea por meio da via de sinalização Wnt; além disso, foi demonstrado que o plasma da medula óssea obtido de pacientes com lesões ósseas bloqueia a diferenciação de osteoblastos *in vitro*, indicando um papel causal na evolução da doença e um possível alvo terapêutico. Outro estudo, conduzido com o uso de microarranjos de cDNA para avaliar amostras de fígado de pacientes com carcinomas hepatocelulares positivos para hepatite B, com e sem metástases intra-hepáticas, descobriu que tumores primários e metastáticos pareados exibiam padrões de expressão gênica similares (Ye, 2003). Muitos genes diferencialmente expressos, no entanto, foram identificados entre carcinomas primários que sofreram e não sofreram metástase. A osteopontina, uma fosfoproteína glicosilada que atua como citocina, encontrava-se superexpressa em tumores primários com metástase. Outros estudos experimentais revelaram que a invasividade celular era reduzida em linhagens celulares derivadas de hepatoma tratadas com anticorpo neutralizante de osteopontina. Além disso, camundongos glabros submetidos à injeção com células de carcinoma hepatocelular apresentavam incidência reduzida de metástase se fossem tratados com anticorpo osteopontina-específico.

Limitações das técnicas proteômicas

Os estudos proteômicos sofrem dos mesmos problemas que aqueles esboçados anteriormente para microarranjos de DNA, incluindo heterogeneidade do tecido, *overfitting* dos modelos preditivos e identificação de proteínas patológicas causais. A crítica específica do uso de técnicas proteômicas para o diagnóstico de câncer concentra-se basicamente na técnica SELDI-TOF MS. Diamandis foi o crítico mais publicado dessa abordagem e apontou várias falhas da tecnologia (Diamandis, 2004a, 2004b). Embora diversos trabalhos tenham publicado resultados diagnósticos notáveis com o uso de painel de espectros de massa, ou "assinaturas iônicas", havia poucas identificações positivas de proteínas responsáveis por aqueles picos. Algumas dessas proteínas identificadas foram antes estudadas como marcadores tumorais, mas rejeitadas como reagentes de fase aguda. A ausência de identificação proteica mais positiva limita a interpretação dos resultados publicados, que potencialmente registram diferenças atribuídas a algum processo além do câncer subjacente, como inflamação generalizada.

A faixa estreita de detecção dinâmica da tecnologia de espectroscopia de massa também limita os estudos proteômicos. No caso de amostras séricas, em geral, há um pré-processamento mínimo antes da análise de MS, envolvendo realce da superfície por meio de incubação em um *chip* de proteína fracamente catiônica – um processo inespecífico que, de modo provável, se ligaria apenas às proteínas mais abundantes na amostra, falhando na detecção de proteínas de baixa abundância potencialmente informativas. É provável que não se esperasse que as proteínas disseminadas por uma malignidade, como câncer de próstata, fossem a proteína mais abundante em um amostra sérica. Segundo algumas estimativas, a SELDI-TOF MS não consegue detectar proteínas abaixo de 1 mg/dL, uma concentração muitas vezes mais alta do que aquela dos marcadores tumorais mais conhecidos (Diamandis, 2003).

Considerações finais e desafios futuros

A recente conclusão do projeto genoma humano e os avanços na área de biotecnologia oferecem oportunidades sem precedentes (ou seja, únicas) para identificação de biomarcadores associados com câncer e outras doenças. Os dados da sequência do genoma combinados com a descoberta de biomarcadores de alto rendimento facilitarão a correlação de variação genética com o diagnóstico da doença e as consequências biológicas. Os campos emergentes das tecnologias genômicas e proteômicas funcionais oferecem a oportunidade de traduzir esses avanços em uma plena compreensão da fisiopatologia do câncer e de outras doenças multigênicas complexas.

As tecnologias genômicas e proteômicas de alto desempenho têm o potencial de transformar a prática clínica e, provavelmente, podem levar à complementação ou à substituição de biomarcadores diagnósticos e prognósticos tradicionais. Muitos dos estudos detalhados neste capítulo demonstraram a utilidade dos perfis de expressão gênica para a classificação de tumores em subtipos distintos clinicamente relevantes e a predição dos desfechos clínicos. Além disso, as plataformas proteômicas emergentes só começaram a acrescentar outra camada de informações moleculares ao estudo das doenças humanas. Essas tecnologias devem conduzir a uma nova era de medicina molecular individualizada, por meio do qual todo paciente será tratado com base nas alterações genéticas em seu tumor e sua própria constituição genética, resultando na aplicação de terapia mais eficaz e menos tóxica.

Embora essas plataformas de alto desempenho ofereçam a promessa de impactar a prática da medicina, ainda existe uma série de obstáculos à implementação clínica disseminada dessas tecnologias. Os biomarcadores genômicos e proteômicos constituem uma classe emergente de testes laboratoriais que apresentam desafios peculiares de implementação para o laboratório clínico, incluindo questões analíticas e bioéticas, além de problemas relacionados à bioinformática. São necessários esforços consideráveis para fornecer a infraestrutura laboratorial clínica necessária para os analisadores-padrão de alto desempenho capazes de detectar alterações genômicas e proteômicas em uma variedade de amostras biológicas, computação de alto desempenho e recursos avançados de gerenciamento de dados.

Também há necessidade de melhorias significativas nas ferramentas analíticas, bem como esforços para padronizar as técnicas, os controles e os padrões de referência. A aplicação dessas informações ao diagnóstico e ao tratamento médico exigirá mudanças substanciais na formação de médicos. A necessidade mais urgente, no entanto, é a extensiva validação independente dos perfis descritos nas seções anteriores, utilizando amplo conjunto de dados analisados por meio da estatística. A inclusão de técnicas de perfil molecular à base de genoma e proteoma em protocolos de ensaios clínicos será necessária para compreender o potencial dessa tecnologia na melhoria do diagnóstico e do tratamento personalizado de doenças humanas.

Referências bibliográficas

Affymetrix I: Affymetrix Microarray Suite User Guide, version 5. Santa Clara, CA, Affymetrix Technical Report, 2001.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; 403:503–511.

Este estudo analisou amostras de pacientes com linfoma difuso de células B grandes utilizando microarranjos de DNA e foi um dos primeiros a relacionar subtipos de tumor identificados por perfil de expressão gênica global aos resultados do paciente.

Anderson NL, Anderson NG: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics 2002; 1:845–867.

Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al: Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nat Med 2002; 8:816–824.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al: Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:13790–13795.

Boon K, Osorio EC, Greenhut SF, et al: An anatomy of normal and malignant gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:11287–11292.

Brabender J, Marjoram P, Salonga D, et al: A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. Oncogene 2004; 23:4780–4788.

Brown MP, Grundy WN, Lin D, et al: Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:262–267.

Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, et al: Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. J Natl Cancer Inst 1999; 91:1758–1764.

Buckhaults P, Rago C, St Croix B, et al: Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. Cancer Res 2001; 61:6996–7001.

Buckhaults P, Zhang Z, Chen YC, et al: Identifying tumor origin using a gene expression-based classification map. Cancer Res 2003; 63:4144–4149.

Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2004; 350:1605–1616.

Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, et al: A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. J Clin Invest 2004; 113:1234–1242.

Chen G, Gharib TG, Wang H, et al: Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:13537–13542.

Esta referência analisa tumores pulmonares submetidos à ressecção que passaram tanto por análise de microarranjos de DNA quanto análise proteômica, bem como por medida de níveis de expressão gênica e proteica, e basicamente foram pouco correlacionados. Contudo, a integração das duas técnicas revelou componentes da via glicolítica associados com baixa sobrevida do paciente.

Claverie JM: Gene number. What if there are only 30 000 human genes? Science 2001; 291:1255–1257.

Collins FS, Morgan M, and Patrinos A: The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. Science 2003; 300:286–290.

Datson NA, van der Perk-de Jong, van den Berg MP, et al: MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. Nucleic Acids Res 1999; 27:1300–1307.

Dave SS, Wright G, Tan B, et al: Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. N Engl J Med 2004; 351:2159–2169.

Dennis JL, Vass JK, Wit EC, et al: Identification from public data of molecular markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin. Cancer Res 2002; 62:5999–6005.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. Nature 2001; 412:822–826.

Diamandis EP: Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? Clin Chem 2003; 49:1272–1275.

Diamandis EP: Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems. J Natl Cancer Inst 2004a; 96:353–356.

Diamandis EP: Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. Mol Cell Proteomics 2004b; 3:367–378.

Ding C, Cantor CR: A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:3059–3064.

Ding C, Maier E, Roscher AA, et al: Simultaneous quantitative and allele-specific expression analysis with real competitive PCR. BMC Genet 2004; 5:8.

Dudoit S: FJST: comparison of discrimination methods for the classification of tumors using gene expression data. J Am Statistical Assoc 2002; 97:77–87.

Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, et al: Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. Nat Genet 2003; 33:90–96.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:14863–14868.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al: Laser capture microdissection. Science 1996; 274:998–1001.

Genome International Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409:860–921. Available on line at: http://www.nature.com/genomics/human/index.html.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286:531–537.

Esta referência descreve o primeiro uso de microarranjos de DNA para analisar a expressão gênica de milhares de genes em amostras clínicas (leucemias agudas humanas) tanto para identificar novas classes de câncer quanto para predizer a classe de amostras desconhecidas.

Huang E, Cheng SH, Dressman H, et al: Gene expression predictors of breast cancer outcomes. Lancet 2003; 361:1590–1596.

Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, et al: Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. Am J Pathol 2002; 160:1239–1249.

International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 2004; 431:931–945.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, et al: Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res 2003; 31:e15.

Kaminski N, Friedman N: Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. Am J Respir Cell Mol Biol 2002; 27:125–132.

Khan J, Wei JS, Ringner M, et al: Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. Nat Med 2001; 7:673–679.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med 1998; 4:844–847.

Kuerer HM, Goldknopf IL, Fritsche H, et al: Identification of distinct protein expression patterns in bilateral matched pair breast ductal fluid specimens from women with unilateral invasive breast carcinoma. High-throughput biomarker discovery. Cancer 2002; 95:2276–2282.

Lal A, Lash AE, Altschul SF, et al: A public database for gene expression in human cancers. Cancer Res 1999; 59:5403–5407.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860–921, 2001.

Uma apresentação completa e minuciosa da história do projeto genoma humano, da metodologia utilizada pelo consórcio público, da qualidade da sequência de esboço do genoma, e dos insights biológicos revelados pelas análises iniciais.

Lash AE, Tolstoshev CM, Wagner L, et al: SAGEmap: a public gene expression resource. Genome Res 2000; 10:1051–1060.

Leung YF, Cavalieri D: Fundamentals of cDNA microarray data analysis. Trends Genet 2003; 19:649–659.

Li C, Wong WH: Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:31–36.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol 1996; 14:1675–1680.

Madden SL, Wang CJ, Landes G: Serial analysis of gene expression: from gene discovery to target identification. Drug Discov Today 2000; 5:415–425.

Mathe C, Sagot MF, Schiex T, et al: Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses. Nucleic Acids Res 2002; 30:4103–4117.

Miklos GL, Maleszka R: Microarray reality checks in the context of a complex disease. Nat Biotechnol 2004; 22:615–621.

Ntzani EE, Ioannidis JP: Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment. Lancet 2003; 362:1439–1444.

Oh P, Li Y, Yu J, et al: Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. Nature 2004; 429:629–635.

Olson MV: The maps. Clone by clone by clone. Nature 2001; 409:816–818.

Ornstein DK, Rayford W, Fusaro VA, et al: Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total prostate specific antigen levels between 2.5 and 15.0 ng/ml. J Urol 2004a; 172:1302–1305.

Ornstein DK, Rayford W, Fusaro VA, et al: Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total prostate specific antigen levels between 2.5 and 15.0 ng/ml. J Urol 2004b; 172:1302–1305.

Paik S, Shak S, Tang G, et al: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med 2004; 351:2817–2826.

Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, et al: Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. Oncogene 2001; 20:1981–1989.

Pennisi E: And the gene number is…? Science 2000; 288:1146–1147

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406:747–752.

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet 2002; 359:572–577.

Esta referência descreve como uma plataforma baseada em espectrometria de massa é utilizada para analisar as proteínas presentes em amostras séricas de pacientes com e sem câncer de ovário, com o objetivo de desenvolver um modelo capaz de distinguir entre os dois estados patológicos com precisão.

Phimister B: Going global. Nat Genet Suppl 1999; 21:1.

Pittman J, Huang E, Dressman H, et al: Integrated modeling of clinical and gene expression information for personalized prediction of disease outcomes. Proc Natl

Acad Sci USA 2004; 101:8431–8436.
Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al: Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. Nature 2002; 415:436–442.
Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, et al: Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. Mol Cancer Res 2003a; 1:362–375.
Porter D, Weremowicz S, Chin K, et al: A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2003b; 100:10931–10936.
Porter DA, Krop IE, Nasser S, et al: A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. Cancer Res 2001; 61:5697–5702.
Quackenbush J: Computational analysis of microarray data. Nat Rev Genet 2001; 2:418–427.
Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nat Genet 2003; 33:49–54.
Ransohoff DF: Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. Nat Rev Cancer 2004; 4:309–314.
Reich M, Ohm K, Angelo M, et al: GeneCluster 2.0: an advanced toolset for bioarray analysis. Bioinformatics 2004; 20:1797–1798.
Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002; 346:1937–1947.
Russo G, Zegar C, Giordano A: Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. Oncogene 2003; 22:6497–6507.
Sawiris GP, Sherman-Baust CA, Becker KG, et al: Development of a highly specialized cDNA array for the study and diagnosis of epithelial ovarian cancer. Cancer Res 2002; 62:2923–2928.
Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270:467–470.
Selaru FM, Zou T, Xu Y, et al: Global gene expression profiling in Barrett's esophagus and esophageal cancer: a comparative analysis using cDNA microarrays. Oncogene 2002; 21:475–478.
Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al: Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. Nat Med 2002; 8:68–74.
Simon R, Lam AP: BRB ArrayTools, 2004.
Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, et al: Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. J Natl Cancer Inst 2003; 95:14–18.
Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:10393–10398.
Spira A, Beane J, Schembri F, et al: Noninvasive method for obtaining RNA from buccal mucosa epithelial cells for gene expression profiling. Biotechniques 2004; 36:484–487.
Stankiewicz P, Lupski JR: Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends Genet 2002; 18:74–82.
Syvanen AC: Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nat Rev Genet 2001; 2:930–942.
Tian E, Zhan F, Walker R, et al: The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. N Engl J Med 2003a; 349:2483–2494.
Tian E, Zhan F, Walker R, et al: The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. N Engl J Med 2003b; 349:2483–2494.
Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, et al: Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:6567–6572.
Tumor Analysis Best Practices Working Group: Expression profiling – best practices for data generation and interpretation in clinical trials. Nat Rev Genet 2004; 5:229–237.
Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:5116–5121.
Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, et al: Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2004; 350:1617–1628.
Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med 2002; 347:1999–2009.
Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002; 415:530–536.
Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, et al: Serial analysis of gene expression. Science 1995; 270:484–487.
Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. Science 2001; 291:1304–1351. The paper and other information can be accessed on line at http://www.sciencemag.org/content/vol291/issue5507/.
Xu Y, Selaru FM, Yin J, et al: Artificial neural networks and gene filtering distinguish between global gene expression profiles of Barrett's esophagus and esophageal cancer. Cancer Res 2002; 62:3493–3497.
Yamamoto M, Wakatsuki T, Hada A, Ryo A: Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. J Immunol Methods 2001; 250:45–66
Ye QH, Qin LX, Forgues M, et al: Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. Nat Med 2003; 9:416–423.

APÊNDICE 1

Soluções fisiológicas, tampões, indicadores acidobásicos, materiais de referência padrão, e conversões de temperatura

Soluções fisiológicas

Uma solução fisiológica é aquela que contém vários sais em concentrações estreitamente próximas à composição dos líquidos do corpo humano. A mais simples delas é o soro fisiológico, que possui a mesma pressão osmótica que o sangue. Existem soluções mais elaboradas – por exemplo, para manter os tecidos em um estado metabolicamente ativo por períodos de tempo mais longos. A Tabela A1.1 fornece as fórmulas de algumas soluções isotônicas em relação ao sangue.

Tampões*

Os tampões têm a capacidade de resistir a alterações do pH. Em geral, eles consistem em um ácido fraco e seu sal ou uma base fraca e seu sal. A equação de Henderson-Hasselbalch, a seguir, é útil para calcular a relação ácido (ou base):sal necessária para estabelecer um pH desejado do sistema tampão.

$$pH = pK + \log [sal]/[ácido] \quad (1)$$

1º exemplo:

Se o pH de um tampão acetato 0,1 M for sabidamente de 4,9, calcular a concentração de ácido acético e acetato de sódio no tampão (pK para o ácido acético = 4,76)

Substituindo os valores de pH e pK na Equação 1:

$\log[acetato]/[ácido\ acético] = 4,90 - 4,76 = 0,14$

$[acetato]/[ácido\ acético] = 1,38$

$[acetato] = 1,38[ácido\ acético]$

Como a concentração total do tampão/L é de 0,1 M,

$$[acetato] + [ácido\ acético] = 0,1\ M \quad (2)$$

Substituindo o valor do acetato na Equação 2:

$1,38[ácido\ acético] + [ácido\ acético] = 0,1\ M$

Logo

$[ácido\ acético] = 0,042\ M$

$[ácido\ acético] = 2,52\ g/L$

$[acetato] = 0,058\ M$

$= 4,76\ g/L$

2º exemplo:

Se 648 mL de ácido dietilbarbitúrico 0,025 M e 10 mL de dietilbarbiturato de sódio 0,5 M forem misturados e diluídos em 1 L, calcular o pH do sódio (pK para o ácido dietilbarbitúrico = 7,98 e concentração molar = moles/litro).

Existe a seguinte relação entre a molaridade e o volume de uma solução:

$$M1V1 = M2V2 \quad (3)$$

onde:

$M1$ = molaridade da solução inicial

$V1$ = volume da solução inicial

$M2$ = molaridade da solução final

$V2$ = volume da solução final

Utilizar a Equação 3 para calcular as mudanças nas concentrações de sal e após diluição em 1L:

$[Dietilbarbiturato\ de\ sódio] = 0,025 \times 0,648 = 0,0162\ mol/L$

$[Ácido\ dietilbarbitúrico] = 0,5 \times 0,01$

$= 0,005\ mol/L$

Calcular o pH da solução, utilizando a Equação 1:

$pH = 7,98 - \log(0,0162/0,005)$

$= 7,98 - \log 3,24$

$= 7,98 - 0,51$

$= 7,47$

A capacidade máxima de tamponamento está no valor de pK do ácido fraco ou da base fraca. Por exemplo, para o ácido acético com valor de pH de 4,76, há necessidade de maior quantidade de ácido para alterar o pH de um tampão acetato de 4,76 para 4,66 do que de 4,20 para 4,10. A eficiência da capacidade de tamponamento cobre uma faixa de pH de cerca de 1 unidade para cada lado do valor de pK do ácido fraco ou da base fraca. Para o ácido acético, essa faixa de pH seria em torno de 3,8 a 5,8.

Tampões de fosfato de Sorensen

Essas soluções tampões costumam ser úteis, pois a faixa de pH das misturas é de 5-8.

Tabela A1.1 Soluções fisiológicas

	Soro fisiológico (salina)	Solução de Locke	Solução de Ringer	Solução de Tyrode
Cloreto de sódio	0,85 g	0,9 g	0,7 g	0,8 g
Cloreto de cálcio		0,024 g	0,0026 g	0,02 g
Cloreto de potássio		0,042 g	0,035 g	0,02 g
Bicarbonato de sódio		0,01–0,03 g		0,1 g
D-Glicose		0,01–0,25 g		0,1 g
Cloreto de magnésio				0,01 g
Fosfato monossódico				0,005 g
Água destilada	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

** Em busca de uma discussão abrangente, inclusive sobre o preparo das soluções tampões de força iônica definida, consultar Bates RG: Determination of pH – Theory and Practice, 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1973.*

Tabela A1.2 Tabela de Sorensen de misturas de tampões

Solução de Na_2HPO_4 (mL)	Solução de KH_2PO_4 (mL)	pH
0,25	9,75	5,288
0,5	9,5	5,589
1,0	9,0	5,906
2,0	8,0	6,239
3,0	7,0	6,468
4,0	6,0	6,643
5,0	5,0	6,813
6,0	4,0	6,979
7,0	3,0	7,168
8,0	2,0	7,381
9,0	1,0	7,731
9,5	0,5	8,043

Tabela A1.3 Tampão tris(hidroximetil)aminometano

mL adicionado de HCl 0,1 N	pH resultante a 23°C	pH resultante a 37°C
5,0	9,10	8,95
7,5	8,92	8,78
10,0	8,74	8,60
12,5	8,62	8,48
15,0	8,50	8,37
17,5	8,40	8,27
20,0	8,32	8,18
22,5	8,23	8,10
25,0	8,14	8,00
27,5	8,05	7,90
30,0	7,96	7,82
32,5	7,87	7,73
35,0	7,77	7,63
37,5	7,66	7,52
40,0	7,54	7,40
42,5	7,36	7,22
45,0	7,20	7,05

Preparar soluções de 0,1M de fosfato de potássio monobásico (13,6 g/L) e fosfato de sódio dibásico (14,2 g/L). Misturar as soluções na relação indicada na Tabela A1.2 para obter o tampão de pH desejado.

Tampão tris(hidroximetil)aminometano*

O tampão tris(hidroximetil)aminometano pode ser utilizado para uma faixa de pH entre 7,0 e 9,0, mas sua melhor capacidade de tamponamento está entre 7,5 e 8,5. É praticamente ineficaz em pH abaixo de 7,0 e acima de 9,0. Uma vantagem desse tampão está em sua excelente estabilidade. O tampão pode ser preparado, pesando-se a quantidade desejada do tris(hidroximetil)aminometano, dissolvendo-o em água e ajustando-se o pH ao valor desejado com HCl. Por exemplo, caso se desejem 100 mL de tampão 0,05 M, colocar 0,6057 g de tris(hidroximetil)aminometano em um frasco volumétrico de 100 mL. Isso é dissolvido em aproximadamente 50 mL de água destilada. Adicionar HCl 0,1 N, conforme indicado na Tabela A1.3, e preencher até a marca com água destilada. A tabela exibe os valores de pH obtidos quando 0,6057 g de tris(hidroximetil)aminometano dissolvido em água são misturados com as quantidades indicadas de HCl 0,1 N e diluídos em 100 mL.

Tabela A1.4 Indicadores acidobásicos

Indicador	Faixa de pH	Quantidade de indicador por 10 mL	Cor	
			Ácido	Alcalino
Azul de timol (A)*†	1,2–2,8	1-2 gotas de solução a 0,1% em água	Vermelho	Amarelo
Laranja de metila[1] (B)	3,1–4,4	1 gota de solução a 0,1% em água	Vermelho	Laranja
Azul de bromofenol (A)†	3,0–4,6	1 gota de solução a 0,1% em água	Amarelo	Azul-violeta
Verde de bromocresol (A)†	4,0–5,6	1 gota de solução a 0,1% em água	Amarelo	Azul
Vermelho de metila (A)†	4,4–6,2	1 gota de solução a 0,1% em água	Vermelho	Amarelo
Púrpura de bromocresol (A)†	5,2–6,8	1 gota de solução a 0,1% em água	Amarelo	Púrpura
Azul de bromotimol (A)†	6,2–7,6	1 gota de solução a 0,1% em água	Amarelo	Azul
Vermelho de fenol (A)†	6,4–8,0	1 gota de solução a 0,1% em água	Amarelo	Vermelho
Vermelho neutro (B)	6,8–8,0	1 gota de solução a 0,1% em solução alcalina a 70%	Vermelho	Amarelo
Azul de timol (A)†‡	8,0–9,6	1-5 gotas de solução a 0,1% em água	Amarelo	Azul
Fenolftaleína (A)	8,0–10,0	1-5 gotas de solução a 0,1% em solução alcalina a 70%	Incolor	Vermelho
Timolftaleína (A)	9,4–10,6	1 gota de solução a 0,1% em solução alcalina a 90%	Incolor	Azul

As letras A ou B depois do nome do indicador significam, respectivamente, que o composto é *ácido* ou *básico*.

* Para a faixa ácida.

† Sal de sódio.

‡ Para a faixa alcalina.

[1] N. de T.: Também conhecido como alaranjado de metila, alaranjado de metilo, laranja de metilo, heliantina ou ainda metilorange.

Indicadores acidobásicos**

Um indicador acidobásico corresponde a um ácido fraco ou uma base fraca, cuja forma não dissociada tem cor e constituição diferentes da forma iogênica. A mudança de cor ocorre em certa faixa estreita de concentrações de íons de hidrogênio. Essa faixa recebe o nome de intervalo de mudança de cor, sendo expressa em termos de pH (o logaritmo

Tabela A1.5 Ácidos e álcalis comumente utilizados*

Solução	Peso molecular	Densidade†	g/L†	Molaridade†	Normalidade†	Número aproximado de mL requerido para fazer 1.000 mL de solução 1N
HCl concentrado	36,46	1,19	440	12	12	83
H_2SO_4 concentrado	98,08	1,84	1.730	18	36	28
HNO_3 concentrado	63,02	1,42	990	16	16	64
Ácido láctico concentrado	90,08	1,21	1.030	11	11	87
Ácido acético glacial	60,08	1,06	1.060	17,5	17,5	57
NH_4OH concentrado	35,05	0,90	250	15	15	67

* Disponíveis no mercado.

† Os valores podem variar um pouco, de acordo com o lote do fabricante.

** Caso se desejem tampões de molaridade mais alta, o HCl 0,1N talvez tenha de ser substituído por HCL 1,0N.*

*** Com base em Dean JA (ed.): Handbook of Chemistry, 13.ed. revisada. New York, McGraw-Hill, 1985.*

Tabela A1.6 Materiais de referência padrão (MRP) para mensurações clínicas

Número do MRP	Tipo de MRP	Fração da massa de pureza estequiométrica em %	Uso certificado	Tamanho da unidade (em g)
40h	Oxalato de sódio	99,972	Padrão reduciométrico	60
83d	Trióxido de arsênico	99,9926	Padrão reduciométrico	60
84k	Hidrogênio ftalato de potássio	99,9911	Padrão acidimétrico	60
136e	Dicromato de potássio	99,984	Padrão oximétrico	60
350a	Ácido benzoico	99,9958	Padrão acidimétrico	30
723c	Tris(hidroximetil)aminometano	99,901	Padrão acidimétrico	50
911b	Colesterol	99,8	Identidade e pureza	2,0
912a	Ureia	99,9	Identidade e pureza	25
913	Ácido úrico	99,7	Identidade e pureza	10
914a	Creatinina	99,7	Identidade e pureza	10
915a	Carbonato de cálcio	99,9	Identidade e pureza	20
916a	Bilirrubina	98,3	Identidade e pureza	0,1
917a	D-glicose (dextrose)	99,7	Identidade e pureza	25
918a	Cloreto de potássio	99,9817	Identidade e pureza	30
919a	Cloreto de sódio	99,89	Identidade e pureza	30
930e	Filtros de vidro, transmitância		Faixa de comprimento de onda (440-635 nm)	3 filtros
931f	Filtros de líquidos, absorbância		Faixa de comprimento de onda (302-678 nm)	Ampolas
934	Termômetros de laboratório clínico (0, 25, 30, 37)		Temperatura	Cada um
937	Metal ferro	99,90		50
955b	Chumbo no sangue			Conjunto de 4 ampolas

negativo da concentração de íons de hidrogênio). Um grande número de substâncias possui propriedades de indicador, embora relativamente poucas delas sejam praticamente aplicadas para reações de neutralização e determinações de pH. A Tabela A1.4 exibe alguns indicadores acidobásicos comumente utilizados. Em geral, os ácidos fracos devem ser titulados na presença de indicadores que mudam em soluções levemente alcalinas. As bases fracas devem ser tituladas na presença de indicadores que mudam em soluções levemente ácidas. A Tabela A1.5 lista alguns ácidos e álcalis utilizados com maior frequência.

A disponibilidade dos medidores de pH de precisão permite a titulação até um ponto final selecionado (pH) e pode substituir o uso de indicadores para várias aplicações.

Dean JA (ed): Handbook of Chemistry, 13th ed. New York, McGraw-Hill, 1985.
Fasman GD (ed): Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed. Cleveland, CRC Press, 1976.
Meinke WW: Standard Reference Materials for Clinical Measurements. Anal Chem 1971; 43:28A.
The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 12th ed. Whitehouse Station, NJ, Merck and Co., 1996.

Tabela A1.7 Conversões de temperatura

Centígrado	Fahrenheit	Centígrado	Fahrenheit
110°	230°	38°	100,4°
100	212	37,5	99,5
95	203	37	98,6
90	194	36,5	97,7
85	185	36	96,8
80	176	35,5	95,9
75	167	35	95
70	158	34	93,2
65	149	33	91,4
60	140	32	89,6
55	131	31	87,8
50	122	30	86
45	113	25	77
44	111,2	20	68
43	109,4	15	59
42	107,6	10	50
41	105,8	+5	41
40,5	104,9	0	32
40	104	–5	23
39,5	103,1	–10	14
39	102,2	–15	+5
38,5	101,3	–20	–4
		1°F = –17,2°C	
		1°C = 33,8°F	

Para converter Fahrenheit em centígrado, subtrair 32 e multiplicar por 0,555.
Para converter centígrado em Fahrenheit, multiplicar por 1,8 e somar 32.

APÊNDICE 2

Pesos, área de superfície corporal e índice de massa corporal (IMC) desejáveis

Tabela A2.1 Comparação das tabelas de peso em relação à altura provenientes de dados atuariais: recomendações da Metropolitan Life Insurance Company, com valores não corrigidos por idade, e do Gerontology Research Center, com valores de idade específicos

Altura (em m)	Valores de peso da Metropolitan do ano de 1983* (25–59 anos)		Gerontology Research Center* (faixa de peso por idade-específica para homens e mulheres)				
	Homens	Mulheres	20–29 anos	30–39 anos	40–49 anos	50–59 anos	60–79 anos
1,45		45,00 - 58,95	37,80 - 49,95	41,40 - 53,55	44,55 - 57,15	48,15 - 60,75	51,75 - 63,90
1,48		45,45 - 60,30	39,15 - 51,75	42,75 - 55,35	46,35 - 58,95	49,95 - 62,55	53,55 - 66,15
1,50		46,35 - 61,65	40,05 - 53,55	44,10 - 57,15	47,70 - 60,75	51,30 - 64,35	55,35 - 68,40
1,53	55,35 - 65,25	47,25 - 63,00	41,85 - 55,35	45,45 - 58,95	49,50 - 63,00	53,10 - 66,60	57,15 - 70,65
1,55	56,25 - 66,60	48,60 - 64,80	43,20 - 57,15	47,25 - 61,20	50,85 - 64,80	54,90 - 68,85	58,95 - 73,35
1,58	57,15 - 67,95	49,95 - 66,60	44,55 - 58,95	48,60 - 63,00	52,65 - 67,05	56,70 - 71,10	60,75 - 75,60
1,60	58,05 - 69,75	51,30 - 68,40	45,90 - 60,75	50,40 - 65,25	54,45 - 69,30	58,50 - 73,35	63,00 - 77,85
1,63	58,95 - 71,55	52,65 - 70,20	47,70 - 63,00	51,75 - 67,05	56,25 - 71,55	60,30 - 75,60	64,80 - 80,55
1,65	59,85 - 73,35	54,00 - 72,00	49,05 - 64,80	53,55 - 69,30	58,05 - 73,80	62,10 - 78,30	66,60 - 82,80
1,68	60,75 - 75,15	55,35 - 73,80	50,40 - 66,60	54,90 - 71,55	59,85 - 76,05	64,35 - 80,55	68,85 - 85,50
1,70	61,65 - 76,95	56,70 - 75,15	52,20 - 68,85	56,70 - 73,35	61,65 - 78,30	66,15 - 82,80	71,10 - 88,20
1,73	62,55 - 78,75	58,05 - 76,50	53,55 - 70,65	58,50 - 75,60	63,45 - 80,55	67,95 - 85,50	72,90 - 90,45
1,75	63,45 - 80,55	59,40 - 77,85	54,90 - 72,90	60,30 - 77,85	65,25 - 82,80	70,20 - 87,75	75,15 - 93,15
1,78	64,80 - 82,35	60,75 - 79,20	56,70 - 75,15	61,65 - 80,10	67,05 - 85,50	72,00 - 90,45	77,40 - 95,85
1,80	66,15 - 84,15		58,05 - 76,95	63,45 - 82,35	68,85 - 87,75	74,25 - 93,15	79,65 - 98,55
1,83	67,50 - 86,40		59,85 - 79,20	65,25 - 84,60	70,65 - 90,00	76,05 - 95,85	81,90 - 101,25
1,85	68,85 - 88,65		61,65 - 81,45	67,05 - 87,30	72,90 - 92,70	78,30 - 98,55	84,15 - 104,40
1,88	70,65 - 90,90		63,45 - 83,70	68,85 - 87,75	74,70 - 95,40	80,55 - 101,25	86,40 - 107,10
1,90			64,80 - 85,95	70,65 - 92,25	76,95 - 98,10	82,80 - 103,95	88,65 - 109,80

* Os valores dessa tabela são para altura sem sapatos e peso sem roupas. A Metropolitan Life Insurance Company (1983 Metropolitan Height and Weight Tables. Stat Bull Metropol Life Ins Co, 1983; 64[Jan-Jun]:2) apresentou uma tabela para alturas e pesos sem roupa (Tabela 4), bem como uma tabela para alturas e pesos com roupa (Tabela 1).

De Andres R: Mortality and obesity: The rationale for age-specific height-weight tables. In Hazzard WR, Bierman El, Blass JP, Ettinger WH Jr, Halter JB (eds.): Principles of Geriatric Medicine and Gerontology, 3.ed. New York, McGraw-Hill, 1994, p. 847, com permissão.

Tabela A2.2 Tabela de índice de massa corporal (IMC)

Para usar esta tabela, encontre a altura apropriada na coluna da esquerda e percorra a linha até um determinado peso.
O número localizado no topo da coluna é o IMC para a altura e o peso em questão. Os valores expressos em kg (quilograma) foram arredondados.

IMC	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
	Peso Corporal (kg)																
Altura	1,47	40,95	43,20	45,00	47,25	49,50	51,75	53,55	55,80	58,05	60,30	62,10	64,35	66,60	68,85	71,10	72,90	75,15
metros (m)	1,50	42,30	44,55	46,80	49,05	51,30	53,55	55,80	57,60	59,85	62,10	64,35	66,60	68,85	71,10	73,35	75,60	77,85
	1,52	43,65	45,90	48,15	50,40	53,10	55,35	57,60	59,85	62,10	64,35	66,60	68,85	71,10	73,35	75,60	78,30	80,55
	1,55	45,00	47,70	4,95	52,20	54,90	57,15	59,40	61,65	64,35	66,60	68,85	71,10	73,80	76,05	78,30	81,00	83,25
	1,57	46,80	49,05	51,75	54,00	56,70	58,95	61,20	63,90	66,15	68,85	71,10	73,80	76,05	78,75	81,00	83,70	85,95
	1,60	48,15	50,85	53,10	55,80	58,50	60,75	63,45	65,70	68,40	71,10	73,35	76,05	78,75	81,00	83,70	85,95	88,65
	1,63	49,50	52,20	54,90	57,60	60,30	63,00	65,25	67,95	70,65	73,35	76,05	78,30	81,00	83,70	86,40	88,65	91,80
	1,65	51,30	54,00	56,70	59,40	62,10	64,80	67,50	70,20	72,90	75,60	78,30	81,00	83,70	86,40	89,10	91,80	94,50
	1,68	53,10	55,80	58,50	61,20	63,90	66,60	69,75	72,45	75,15	77,85	80,55	83,70	86,40	89,10	91,80	94,50	97,20
	1,70	54,45	57,15	60,30	63,00	65,70	68,85	71,55	74,70	77,40	80,10	83,25	85,95	89,10	91,80	94,95	97,65	100,35
	1,73	56,25	58,95	62,10	64,80	67,95	71,10	73,80	76,95	79,65	82,80	85,50	88,65	91,35	94,50	97,20	100,35	103,50
	1,75	57,60	60,75	63,90	67,05	69,75	72,90	76,05	79,20	81,90	85,05	88,20	91,35	94,05	97,20	100,35	103,50	106,20
	1,78	59,40	62,55	65,70	68,85	72,00	75,15	78,30	81,45	84,60	87,75	90,90	94,05	97,20	99,90	103,05	106,20	109,35
	1,80	61,20	64,35	67,50	70,65	74,25	77,40	80,55	83,70	86,85	90,00	93,60	96,75	99,90	103,05	106,20	109,35	112,50
	1,83	63,00	66,15	69,30	72,90	76,05	79,65	82,80	85,95	89,55	92,70	95,85	99,45	102,60	105,75	108,90	112,50	116,10
	1,85	64,80	67,95	71,55	74,70	78,30	81,90	85,05	88,65	91,80	95,40	98,55	102,15	105,75	108,90	112,50	115,65	119,25
	1,88	66,60	69,75	73,35	76,95	80,55	83,70	87,30	90,90	94,50	98,10	101,25	104,85	108,45	112,05	115,20	118,80	122,40
	1,91	68,40	72,00	75,60	79,20	82,80	86,40	90,00	93,60	97,20	100,80	104,40	108,00	111,60	115,20	118,80	122,40	125,55
	1,93	70,20	73,80	77,40	81,00	85,05	88,65	92,25	95,85	99,45	103,50	107,10	110,70	114,30	118,35	121,95	125,55	129,15

IMC	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
	Peso Corporal (kg)																
Altura	1,47	77,40	79,65	81,45	83,70	85,95	88,20	90,45	92,25	94,50	96,75	99,00	100,80	103,05	105,30	107,55	109,80	111,60
metros (m)	1,50	80,10	82,35	84,60	86,85	89,10	91,35	93,60	95,40	97,65	99,90	102,15	104,40	106,65	108,90	111,15	113,40	115,65
	1,52	82,80	85,05	87,30	89,55	91,80	94,05	96,75	99,00	101,25	103,50	105,75	108,00	110,25	112,50	114,75	117,45	119,70
	1,55	85,50	87,75	90,45	92,70	94,95	97,65	99,90	102,15	104,40	107,10	109,35	111,60	114,30	116,55	118,80	121,05	123,75
	1,57	88,20	90,90	93,15	95,85	98,10	100,80	103,05	105,75	108,00	110,70	112,95	115,20	117,90	120,15	122,85	125,10	127,80
	1,60	91,35	93,60	96,30	99,00	101,25	103,95	106,65	108,90	111,60	114,30	116,55	119,25	121,50	125,10	126,90	129,15	131,85
	1,63	94,05	96,75	99,45	102,15	104,40	107,10	109,80	112,50	115,20	117,90	120,15	122,85	125,55	128,25	130,95	133,20	135,90
	1,65	97,20	99,90	102,60	105,30	108,00	110,70	113,40	116,10	118,80	121,50	124,20	126,90	129,60	132,30	135,00	137,70	140,40
	1,68	100,35	103,05	105,75	108,45	111,15	113,85	117,00	119,70	122,40	125,10	127,80	130,95	133,65	136,35	139,05	141,75	144,90
	1,70	103,50	106,20	108,90	112,05	114,75	117,45	120,60	123,30	126,00	129,15	131,85	134,55	137,70	140,40	143,55	146,25	148,95
	1,73	106,20	109,35	112,05	115,20	117,90	121,05	124,20	126,90	130,05	132,75	135,90	138,60	141,75	144,90	147,60	150,75	153,45
	1,75	109,35	112,50	115,65	118,35	121,50	120,15	127,80	130,95	133,65	136,80	139,95	143,10	145,80	148,95	152,10	155,25	157,95
	1,78	112,50	115,65	118,80	121,95	125,10	128,25	131,40	134,55	137,70	140,85	144,00	147,15	150,30	153,45	156,60	159,75	162,90
	1,80	115,65	119,25	122,40	125,55	128,70	131,85	135,45	138,60	141,75	144,90	148,05	152,10	154,35	157,95	161,10	164,25	167,40
	1,83	119,25	122,40	125,55	129,15	132,30	135,90	139,05	142,20	145,80	148,95	152,10	155,70	158,85	162,45	165,60	168,75	172,35
	1,85	122,40	126,00	129,60	132,75	135,90	139,50	143,10	146,25	149,85	153,00	156,60	159,75	163,35	166,95	170,10	173,70	176,85
	1,88	126,00	129,15	132,75	136,35	139,95	143,55	146,70	150,30	153,90	157,50	161,10	164,25	167,85	171,45	175,05	178,20	181,80
	1,91	129,15	132,75	136,35	139,95	143,55	147,15	150,75	154,35	157,95	161,55	165,15	168,75	172,35	175,95	179,55	183,15	186,75
	1,93	132,75	136,80	140,40	144,00	147,60	149,85	154,80	158,85	162,45	166,05	169,65	173,25	177,30	180,90	184,50	188,10	191,70

Fonte: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/bmi_tbl.htm.

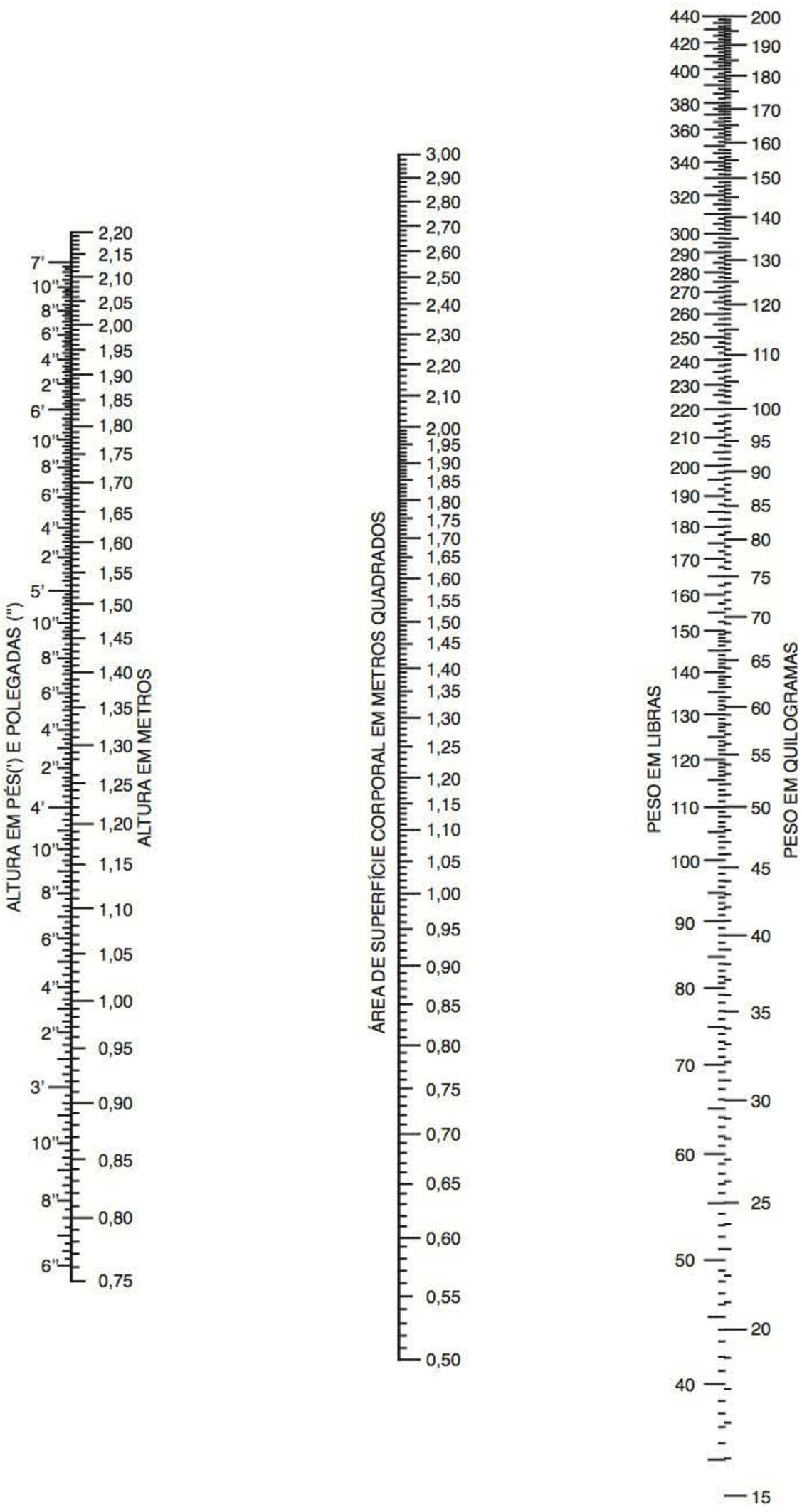


Figura A2.1 Normograma para a determinação da área de superfície corporal de crianças e adultos. (De Boothby WM, Sandiford RB: Boston Med Surg J 1921; 185:337, com permissão.)

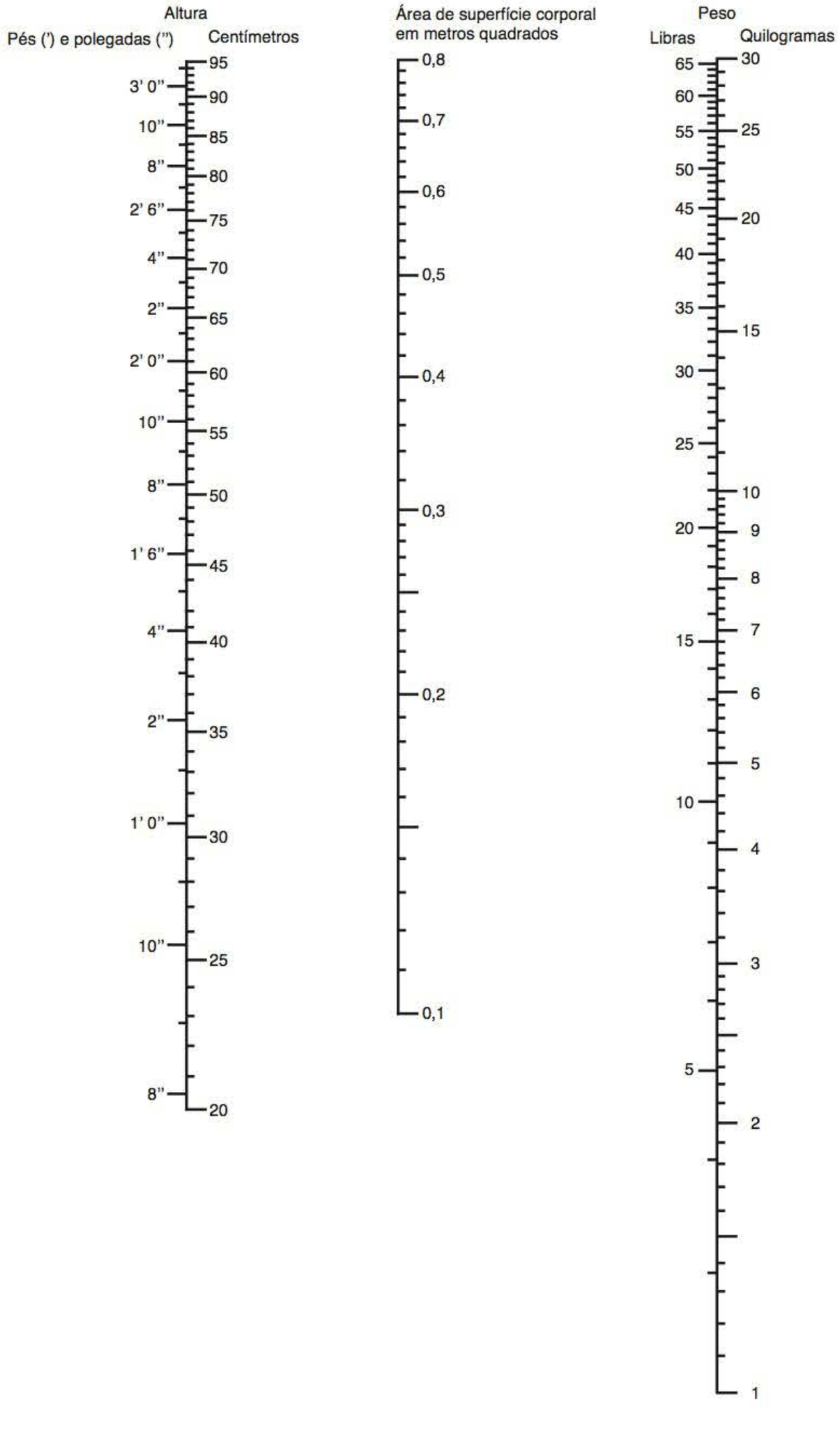


Figura A2.2 Normograma para a determinação da área de superfície corporal de crianças. (De DuBois EF: Basal Metabolism in Health and Disease. Philadelphia, Lea & Febiger, 1936).

APÊNDICE 3

Aproximações do volume sanguíneo total (VST)

Ao estimar o volume sanguíneo total (VST) de um paciente, a aproximação comumente utilizada é a de 70 mL de VST por quilograma de peso corporal. Apesar de útil em muitos pacientes, em outros, particularmente adultos acima do peso ideal ou magros e crianças, esse valor oferece apenas uma aproximação insatisfatória do VST real. Nesses pacientes, existem outros métodos mais adequados de estimativa do VST.

Adultos

O COBE Spectra utiliza a fórmula de Nadler e Allen para calcular o VST aproximado em pacientes humanos (COBE Spectra Apheresis System Operator' Manual [Manual de Operação do Sistema de Aférese COBE Spectra], 1997). Essa fórmula emprega a altura, o peso e o sexo do paciente para calcular o VST. Especificamente, a fórmula é a seguinte:

Homens: $VST(mL) = 604 + [367 \times altura^3\ (m)] + [32{,}2 \times peso\ (kg)]$

Mulheres: $VST(mL) = 183 + [356 \times altura^3\ (m)] + [33{,}1 \times peso\ (kg)]$

O VST também pode ser aproximado, utilizando a área de superfície corporal calculada do paciente (Shoemaker, 1989):

Homens: $VST = 2.740\ mL/m^2$

Mulheres: $VST = 2.370\ mL/m^2$

Outra aproximação relativamente simples usa a assim chamada "regra dos cinco" de Gilcher, reproduzida abaixo, como estimativa do volume sanguíneo, mais adaptada a cada paciente do que a regra de 70 mL/kg (Gilcher, 1996).

	Obeso(a)	Magro(a)	Normal	Musculoso(a)
Homens	60	65	70	75
Mulheres	55	60	65	70

Crianças

O cálculo de Nadler e Allen pode ser particularmente impreciso em crianças, sobretudo meninos pré-púberes; por essa razão, é recomendável que o sexo feminino seja inserido para melhorar a estimativa (Kim, 2000). Podem ser utilizados os seguintes valores para o VST por quilograma de peso corporal (Oski, 1993):

Bebês prematuros	89–105mL/kg
Recém-nascidos a termo	82–86mL/kg
Bebês e crianças em idade pré-escolar	73–82mL/kg

COBE Spectra Apheresis System Operator's Manual: Lakewood, CO, Gambro BCT, 1997, p 1.

Gilcher RO: Apheresis: Principles and practices. *In* Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould SA (eds): Principles of Transfusion Medicine, 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, p 542.

Kim HC: Therapeutic pediatric apheresis. J Clin Apheresis 2000; 15:129–157.

Oski FA: The erythrocyte and its disorders. *In* Nathan DG, Oski FA (eds): Hematology of Infancy and Childhood, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1993, p 28.

Shoemaker WC: Fluids and electrolytes in the acutely ill adult. *In* Shoemaker WC, Ayres S, Grenvik A, et al. (eds): Textbook of Critical Care, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1989, p 1130.

Tabela periódica dos elementos químicos

Tabela A4.1 Tabela periódica dos elementos químicos

1 Grupo IA	2 IIA	3 IIIA IIIB	4 IVA IVB	5 VA VB	6 VIA VIB	7 VIIA VIIB	8	9 VIIIA VIII	10	11 IB	12 IIB	13 IIIB IIIA	14 IVB IVA	15 VB VA	16 VIB VIA	17 VIIB VIIA	18 VIIIA	Camada
1 +1 **H** −1 1,00794 1																	**2** 0 **He** 4,00206022	K
3 +1 **Li** 6,941 2-1	**4** +1 **Be** 9,012182 2-2											**5** +3 **B** 10,811 2-3	**6** +2 +4 −4 **C** 12,011 2-4	**7** +1 +2 +3 +4 +5 −1 −2 −3 **N** 14,00674 2-5	**8** −2 **O** 15,9994 2-6	**9** −1 **F** 18,9984032	**10** 0 **Ne** 20,1797 2-8	K-L
11 +1 **Na** 22,989768 2-8-1	**12** +2 **Mg** 24,3050 2-8-2											**13** +3 **Al** 26,981539 2-8-3	**14** +2 +4 −4 **Si** 28,0855 2-8-4	**15** +3 +5 −3 **P** 30,97362 2-8-5	**16** +3 +5 −2 **S** 32,066 2-8-6	**17** +1 +5 +7 −1 **Cl** 35,4527 2-8-7	**18** 0 **Ar** 39,948 2-8-8	K-L-M
19 +1 **K** 39,0983 -8-8-1	**20** +2 **Ca** 40,078 -8-8-2	**21** +3 **Sc** 44,955910 -8-9-2	**22** +2 +3 +4 **Ti** 47,88 -8-10-2	**23** +2 +3 +4 +5 **V** 50,9415 -8-11-2	**24** +2 +3 +6 **Cr** 51,9961 -8-13-1	**25** +2 +3 +4 +7 **Mn** 54,93085 -8-13-2	**26** +2 +3 **Fe** 55,847 -8-14-2	**27** +2 +3 **Co** 58,93320 -8-15-2	**28** +2 +3 **Ni** 58,6934 -8-16-2	**29** +1 +2 **Ni** 63,546 -8-18-1	**30** +2 **Zn** 65,39 -8-18-2	**31** +3 **Ga** 69,723 -8-18-3	**32** +2 +4 **Ge** 72,61 -8-18-4	**33** +2 +5 −3 **As** 74,92159 -8-18-5	**34** +4 +6 −2 **Se** 78,96 -8-18-6	**35** +1 +5 −1 **Br** 79,904 -8-18-7	**36** 0 **Kr** 83,80 -8-18-8	-L-M-N
37 +1 **Rb** 85,4678 -18-8-1	**38** +2 **Sr** 87,62 -18-8-2	**39** +3 **Y** 88,90585 -18-9-2	**40** +4 **Zr** 91,224 -18-12-1	**41** +3 +5 **Nb** 92,90638 -18-10-2	**42** +6 **Mo** 95,94 -18-13-1	**43** +4 +6 +7 **Tc** (98) -18-13-2	**44** +3 **Ru** 101,07 -18-15-1	**45** +3 **Rh** 102,90550 -18-16-1	**46** +2 +4 **Pd** 106,42 -18-18-0	**47** +1 **Ag** 107,8682 -18-18-1	**48** +2 **Cd** 112,411 -18-18-2	**49** +3 **In** 114,818 -18-18-3	**50** +2 +4 **Sn** 118,710 -18-18-4	**51** +3 +5 −3 **Sb** 121,757 -18-18-5	**52** +4 +6 −2 **Te** 127,60 -18-18-6	**53** +1 +5 +7 −1 **I** 126,90447 -18-18-7	**54** 0 **Xe** 131,29 -18-18-8	-M-N-O
55 +1 **Cs** 132,90543 -18-8-1	**56** +2 **Ba** 137,327 -18-8-2	**59*** +3 **La** 139,9055 -18-9-2	**72** +4 **Hf** 178,49 -32-10-2	**73** +5 **Ta** 180,9479 -32-11-2	**74** +6 **W** 183,84 -32-12-2	**75** +4 +6 +7 **Re** 186,207 -32-13-2	**76** +3 +4 **Os** 190,23 -32-14-2	**77** +3 +4 **Ir** 192,22 -32-15-2	**78** +2 +4 **Pt** 195,08 -32-16-2	**79** +1 +3 **Au** 196,96654 -32-18-1	**80** +1 +2 **Hg** 200,59 -32-18-2	**81** +1 +3 **Tl** 204,3833 -32-18-3	**82** +2 +4 **Pb** 207,2 -32-18-4	**83** +3 +5 **Bi** 208,98037 -32-18-5	**84** +2 +4 **Po** (209) -32-18-6	**85** **At** (210) -32-18-7	**86** 0 **Rn** (222) -32-18-8	-N-O-P
87 +1 **Fr** (223) -18-8-1	**88** +2 **Ra** 226,025 -18-8-2	**89**** +3 **Ac** 227,08 -18-9-2	**104** **Unq** +4 (261) -32-10-2	**105** **Unp** (262) -32-11-2	**106** **Unh** (263) -32-12-2	**107** **Uns** (262) -32-13-2												OPQ

*Latanídeos	**58** +3 +4 **Ce** 140,115 -19-9-2	**59** +3 **Pr** 140,90765 -21-8-2	**60** +3 **Nd** 144,24 -22-8-2	**61** +3 **Pm** (145) -23-8-2	**62** +2 +3 **Sm** 150,36 -24-8-2	**63** +2 +3 **Eu** 151,965 -25-8-2	**64** +3 **Gd** 157,25 -25-9-2	**65** +3 **Tb** 158,92534 -27-8-2	**66** +3 **Dy** 162,50 -28-8-2	**67** +3 **Ho** 164,93032 -29-8-2	**68** +3 **Er** 167,26 -30-8-2	**69** +3 **Tm** 168,93421 -32-8-2	**70** +2 +3 **Yb** 173,04 -32-8-2	**71** +3 **Lu** 174,967 -32-9-2	NOP
**Actinídeos	**90** +4 **Th** 232,0381 -18-10-2	**91** +5 +4 **Pa** 231,03588 -20-9-2	**92** +3 +4 +5 +6 **U** 238,0289 -21-9-2	**93** +3 +4 +5 +6 **Np** 237,048 -22-9-2	**94** +3 +4 +5 +6 **Pu** (244) -24-8-2	**95** +3 +4 +5 +6 **Am** (243) -25-8-2	**96** +3 **Cm** (247) -25-9-2	**97** +3 +4 **Bk** (247) -27-8-2	**98** +3 **Cf** (251) -28-8-2	**99** +3 **Es** (252) -29-8-2	**100** +3 **Fm** (257) -30-8-2	**101** +2 +3 **Md** (258) -31-8-2	**102** +2 +3 **No** (259) -32-8-2	**103** +3 **Lr** (260) -32-9-2	OPQ

Novo sistema de registro → 13 14 15 16 17 18

Forma anterior da IUPAC → IIIB IVB VB VIB VIIB VIIIA

Versão da CAS → IIIA IVA VA VIA VIIA VIIIA

LEGENDA

Número atômico → **50** +2 ← Estado de oxidação

Símbolo → **Sn** +4

Peso atômico de 1989 → 118,71

← Configuração do elétron 18 18 4

O novo formato da IUPAC numera os grupos de 1 a 18. O sistema de numeração prévio da IUPAC e o sistema utilizado pelo Chemical Abstracts Service (CAS) também estão ilustrados.

Para os elementos radioativos que não ocorrem na natureza, o número de massa do isótopo mais estável está entre parênteses.

De Lide DR, Frederikse HPR: CRC Handbook of Chemistry and Physics, 74. ed. 1993–1994, Boca Raton, FL, CRC Press, 1993.

Leigh GJ (ed): Nomenclature of Inorganic Chemistry, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1990.

Chemical and Engineering News, 1985, 63:27.

APÊNDICE 5

Unidades do Sistema Internacional (SI)

H. Peter Lehmann PhD, John Bernard Henry MD

O sistema internacional (SI) consiste em sete unidades de base dimensionalmente independentes, que se encontram listadas na Tabela A5.1, juntamente com os símbolos utilizados para indicar tais unidades. A Tabela A5.2 lista uma série de unidades derivadas do SI, usadas no laboratório clínico. Existem dois tipos de unidades derivadas: as coerentes, derivadas diretamente das unidades de base sem o uso de fatores de conversão; e as não coerentes, elaboradas a partir das unidades de base e com fator numérico em seu conteúdo a fim de tornar mais conveniente o uso dos números. A Tabela A5.3 fornece os prefixos indicativos de frações ou múltiplos de base, bem como as unidades derivadas do SI. Uma descrição completa do SI e de sua aplicação em medicina pode ser encontrada em *The SI for the Health Professions* (O SI para Profissionais de Saúde) publicado pela Organização Mundial de Saúde (1977). Uma lista abrangente de quantidades e de suas unidades (SI) internacionalmente recomendadas é fornecida em Tietz, 1995.

Para fazer a conversão às unidades (SI) recomendadas (Tabs. A5.4 a A5.13), foram adotadas as seguintes diretrizes:

1. todos os intervalos de referência foram convertidos em unidades do SI, exceto nos casos em que as medidas não são quantitativas;
2. os nomes químicos não foram alterados; por exemplo, o nome *ureia* foi mantido no lugar de carbamida;
3. os fatores são aqueles publicados pelo American National Metric Council [Conselho Métrico Norte-americano] (Lundberg, 1986; Beeler, 1987; Young, 1987), com base nos fatores da Metric Commission of Canada [Comissão Métrica do Canadá] (1981);
4. os fatores são calculados em relação à unidade de base para o volume de 1 L;
5. a ordem de magnitude dos fatores é calculada para transformar os valores em números convenientes das unidades de medidas do SI – ou seja, com prefixos, um número não superior a 1.000 ou inferior a 0,001;
6. o número das unidades (SI) recomendadas equivale ao número em unidades convencionais vezes o fator;
7. para os compostos, cujas massas moleculares relativas não são definitivamente conhecidas (p. ex., proteínas), os intervalos de referência são convertidos em quantidades de massa por litro;
8. para misturas de composição indeterminada (p. ex., fosfolipídeos), os intervalos de referência são convertidos em quantidades de massa por litro ou baseados em um determinado padrão – por exemplo, DHEA para 17-cetosteroides;
9. as quantidades de natureza relativa que costumam ser expressas em porcentagens – por exemplo, frações de isozimas de LDH – são fornecidas sob a forma de frações;
10. as unidades enzimáticas são fornecidas como a Unidade Internacional por litro (U/L). Embora a unidade SI coerente de atividade catalítica (inclusive das enzimas), a *katal*, tenha sido definida como o número de moles de substrato convertido por segundo sob condições definidas, sua adoção é limitada;

Tabela A5.1 Unidades de base do SI

Quantidade	Nome	Símbolo
Comprimento	metro	m
Massa	quilograma	kg
Tempo	segundo	s
Corrente elétrica	ampère	A
Temperatura termodinâmica	kelvin	K
Intensidade luminosa	candela	cd
Quantidade de substância	mol	mol

Tabela A5.2 Unidades derivadas do SI

Quantidade	Nome da unidade	Símbolo da unidade
Área	metro quadrado*	m^2
Volume	metro cúbico*	m^3
	litro†	$L = dm^3$‡
Concentração		
Massa	quilograma/litro†	kg/L
Substância	mol/litro†	mol/L
Molalidade	mol/quilograma	mol/kg
Densidade	quilograma/litro†	kg/L
Fração de massa	quilograma/quilograma	kg/kg
Fração de mol	mol/mol	mol/mol
Concentração numérica	número/litro	L^{-1}
Temperatura	graus celsius*	°C = °K – 273,15
Pressão	pascal*	$Pa = kg/m^2$
Frequência	hertz*	Hz = 1 ciclo/s
Depuração	litro/segundo†	L/s
Potencial elétrico	volt*	$V = kg\ m^2/s^3A$
Energia	joule*	$J = kg\ m^2/s^2$

* Unidade derivada coerente. † Unidade derivada não coerente. ‡ Tanto "L" como "l" são símbolos para o litro.

Tabela A5.3 Prefixos

Prefixo	Símbolo do prefixo	Fator
exa	E	10^{18}
peta	P	10^{15}
tera	T	10^{12}
giga	G	10^9
mega	M	10^6
quilo	k	10^3
hecto	h	10^2
deca	da	10^1
deci	d	10^{-1}
centi	c	10^{-2}
mili	m	10^{-3}
micro	µ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}
pico	p	10^{-12}
fento	f	10^{-15}
ato	a	10^{-18}

11. a escala de pH é mantida para mensuração das concentrações dos íons hidrogênio;
12. no presente momento, é recomendável que a unidade de milímetros de mercúrio (mmHg) seja mantida para as pressões (PCO_2, PO_2);
13. as porcentagens são expressas em frações no SI, em que uma fração corresponde a uma quantidade adimensional fornecida pelo número de partículas definidas constitutivas de componente especificado dividido pelo número total de partículas definidas no sistema.

Referências bibliográficas

Beeler MF: SI units and the AJCP. Am J Clin Pathol 1987; 87:140.

Lundberg GD, Iverson C, Radulescu G: Now read this: the SI units are here. JAMA 1986; 255:2329.

Metric Commission of Canada: The SI Manual in Health Care. Ottawa, Sector 9.10 Health and Welfare, Metric Commission of Canada, 1981.

Tietz NW (ed): Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1995.

World Health Organization: The SI for the Health Professions. Geneva, WHO, 1977.

Young DS: Implementation of SI units for clinical laboratory data: style specifications and conversion tables. Ann Intern Med 1987, 106:114.

Tabela A5.4 Bioquímica do sangue total, soro e plasma

Componente	Sistema	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Ácido acetoacético				
qualitativo	Soro	Negativo	–	Negativo
quantitativo	Soro	0,2–1,0 mg/dL	97,95	20–100 µmol/L
Acetona				
qualitativo	Soro	Negativo	–	Negativo
quantitativo	Soro	0,3–2,0 mg/dL	172,95	20–340 µmol/L
Albumina				
qualitativa	Soro	3,2–4,5 g/dL (fracionamento do sal) 3,2–5,6 g/dL (eletroforese) 3,8–5,0 g/dL (interação proteína-corante)	10	32–45 g/L 32–56 g/L 38–50 g/L
Álcool, etílico	Soro ou sangue total	Negativo - mas apresentado como mmol/L	0,2171	Negativo – mas apresentado como mmol/L
Aldolase	Soro			
	adultos	3–8 Sibley-Lehninger U/dL a 37°C	7,4	22–59 mU/L a 37°C
	crianças	Aproximadamente 2× os níveis de adultos	–	Aproximadamente 2× os níveis de adultos
	recém-nascidos	Aproximadamente 4× os níveis de adultos	–	Aproximadamente 4× os níveis de adultos
Nitrogênio do α-aminoácido	Soro	3,6–7,0 mg/dL	0,7139	2,6–5,0 mmol/L
Ácido δ-aminolevulínico	Soro	0,01–0,03 mg/dL	76,26	0,8–2,3 µmol/L
Amônia	Plasma	20–120 µg/dL (difusão) 40–80 µg/dL (método enzimático) 12–48 µg/dL (método com resina)	0,5872	12–70 µmol/L 23–47 µmol/L 7–28 µmol/L
Amilase	Soro	16–120 unidades Somogyi/dL	1,85	30–220 U/L
Argininosuccinato liase	Soro	0–4 U/dL	10	0–40 U/L
Arsênico‡	Sangue total	<7 µg/dL	0,05055	<0,4 µmol/L
Ácido ascórbico (vitamina C)	Plasma	0,6–1,6 mg/dL	56,78	34–91 µmol/L
	Sangue total	0,7–2,0 mg/dL		40–114 µmol/L
Barbituratos	Soro, plasma, ou sangue total	Negativo	–	Negativo
Excesso de base	Sangue total			
	homens	–3,3 a +1,2 mEq/L	1	–3,3 a +1,2 mmol/L
	mulheres	–2,4 a +2,3 mEq/L		–2,4 a +2,3 mmol/L
Base, total	Soro	145–160 mEq/L	1	145–160 mmol/L
Bicarbonato	Plasma	21–28 mmol/L	1	21–28 mmol/L
Ácidos biliares	Soro	0,3–3,0 mg/dL	10	3,0–30,0 mg/L
Bilirrubina				
direta (conjugada)	Soro	<0,3 mg/dL	17,10	<5 µmol/L
indireta (não conjugada)	Soro	0,1–1,0 mg/dL		2–17 µmol/L
total	Soro	0,1–1,2 mg/dL		2–21 µmol/L
total dos recém-nascidos	Soro	1,0–12,0 mg/dL		17–205 µol/L
Gases sanguíneos (ver Cap. 15)				
pH	Sangue total	7,38–7,44 (arterial) 7,36–7,41 (venoso)	1	7,38–7,44 7,36–7,41
PCO_2	Sangue total	35–40 mm Hg (arterial) 40–45 mm Hg (venoso)	0,1333	4,7–5,3 kPa 5,3–6,0 kPa
PO_2	Sangue total	95–100 mm Hg (arterial)	0,1333	12,7–13,3 kPa
Brometo	Soro	<5 mg/dL	0,125	<0,63 mmol/L
Cálcio		4,0–4,8 mg/dL	0,2500	1,00–1,20 mmol/L
ionizado	Soro	2,0–2,4 mEq/L	0,5000	
		30–58% do total	0,01	0,30–1,58 do total
total	Soro	9,2–11,0 mg/dL	0,2500	2,30–2,74 mmol/L
		4,6–5,5 mEq/L	0,5000	

Tabela A5.4 Bioquímica do sangue total, soro e plasma (*continuação*)

Componente	Sistema	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Dióxido de carbono (teor de CO_2)	Sangue total (arterial)	19–24 mmol/L	1	19–24 mmol/L
	Plasma ou soro (arterial)	21–28 mmol/L		21–28 mmol/L
Dióxido de carbono	Sangue total (venoso)	22–26 mmol/L	1	22–26 mmol/L
	Plasma ou soro (venoso)	24–30 mmol/L		24–30 mmol/L
Pó combinado com CO_2	Plasma ou soro (venoso)	24–30 mmol/L	1	24–30 mmol/L
Pressão parcial de CO_2 (Pco_2)	Sangue total (arterial)	35–40 mm Hg	0,1333	4,7–5,3 kPa
	Sangue total (venoso)	40–45 mm Hg		5,3–6,0 kPa
Ácido carbônico (H_2CO_3)	Sangue total (arterial)	1,05–1,45 mmol/L	1	1,05–1,45 mmol/L
	Sangue total (venoso)	1,15–1,50 mmol/L		1,15–1,50 mmol/L
	Plasma (venoso)	1,02–1,38 mmol/L		1,02–1,38 mmol/L
Carboxiemoglobina (hemoglobina do monóxido de carbono)	Sangue total periférico			
	não fumantes	saturação <1,5% de hemoglobina	0,01	Fração de hemoglobina saturada: <0,015
	fumantes	saturação de 1,5–5,0%		0,015–0,050
	fumantes inveterados	saturação de 5,0–9,0%		0,050–0,090
Caroteno, beta	Soro	40–200 µg/dL	0,01863	0,7–3,7 µmol/L
Ceruloplasmina	Soro	23–50 mg/dL	10	230–500 mg/L
Cloreto	Soro	95–103 mEq/L	1	95–103 mmol/L
Colesterol				
total (ver Cap. 17)	Soro	150–250 mg/dL (varia c/ dieta, sexo e idade)	0,02586	3,88–6,47 mmol/L
ésteres	Soro	65–75% do colesterol total	0,01	Fração de colesterol total: 0,65–0,75
Colinesterase (pseudocolinesterase)	Eritrócitos	pH de 0,65–1,3 unidades	1	0,65–1,3 unidades§
	Plasma	pH de 0,5–1,3 unidades	1	0,5–1,3 unidades
		8–18 U/L a 37°C		
Citrato	Soro ou plasma	1,7–3,0 mg/dL	52,05	88–156 µmol/L
Cobre	Soro, plasma			
	homens	70–140 µg/dL	0,1574	11–22 µmol/L
	mulheres	80–155 µg/dL		13–24 µmol/L
Cortisol	Plasma			
	8–10 h	5–23 µg/dL	27,59	138–635 nmol/L
	16–18 h	3–13 µg/dL	83–359 nmol/L	
Creatina	Soro ou plasma			
	homens	0,1–0,4 mg/dL	76,25	8–31 µmol/L
	mulheres	0,2–0,7 mg/dL		15–53 µmol/L
Creatina quinase (CK)	Soro			
	homens	55–170 U/L a 37°C	1	55–170 U/L a 37°C
	mulheres	30–135 U/L a 37°C	1	30–135 U/L a 37°C
Creatinina (ver Cap. 15)	Soro ou plasma	0,6–1,2 mg/dL (adulto)	88,40	53–106 µmol/L
		0,3–0,6 mg/dL (crianças com <2 anos)		27–53 µmol/L
Depuração da creatinina (endógena) (ver Cap. 14)	Soro ou plasma e urina			
	homens	107–139 mL/min	0,01667	1,78–2,32 mL/s
	mulheres	87–107 mL/min		1,45–1,78 mL/s
Crioglobulinas	Soro	Negativo	–	Negativo
Eletroforese, proteica	Soro			
albumina		52–65% da proteína total	0,01	Fração da proteína total: 0,52–0,65
α-1		2,5–5,0% da proteína total	0,01	0,025–0,05
α-2		7,0–13,0% da proteína total	0,01	0,07–0,13
β		8,0–14,0% da proteína total	0,1	0,08–0,14
γ		12,0–22,0% da proteína total	0,01	0,12–0,22
	Soro	Concentração		
albumina		3,2–5,6 g/dL	10	32–56 g/L
α-1		0,1–0,4 g/dL		1–4 g/L
α-2		0,4–1,2 g/dL		4–12 g/L
β		0,5–1,1 g/dL		5–11 g/L
γ		0,5–1,6 g/dL		5–16 g/L
Gorduras, neutras (ver Triglicerídeos)				
Ácidos graxos				
totais (livres e esterificados)	Soro	9–15 mmol/L	1	9–15 mmol/L
livres (não esterificados)	Plasma	300–480 µEq/L	1	300–480 µmol/L
Ferritina	Soro			
homens		15–200 ng/mL	1	15–200 µg/L
mulheres		12–150 ng/mL	1	15–150 µg/L
Fibrinogênio	Plasma	200–400 mg/dL	0,01	2,00–4,00 g/L
Fluoreto	Sangue total	<0,05 mg/dL	0,5263	<0,027 mmol/L

Tabela A5.4 Bioquímica do sangue total, soro e plasma (*continuação*)

Componente	Sistema	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	**Fator***	**Unidades do SI recomendadas†**
Folato	Soro			11–57 nmol/L
		≥3,5 ng/mL (radioensaio)	2,266	>5 nmol/L
	Eritrócitos	166–640 ng/mL (bioensaio)		376–1450 nmol/L
		>140 ng/mL (radioensaio)		>317 nmol/L
Galactose	Sangue total			
	adultos	Nenhum	–	Nenhum
	crianças	<20 mg/dL	0,05551	<1,11 mmol/L
Gamaglobulina	Soro	0,5–1,6 g/dL	10	5–16 g/L
Globulinas, totais	Soro	2,3–3,5 g/dL	10	23–35 g/L
Glicose, jejum	Soro ou plasma	70–110 mg/dL	0,05551	3,9–6,1 mmol/L
	Sangue total	60–100 mg/dL		3,3–5,6 mmol/L
Tolerância à glicose oral	Soro ou plasma			
	jejum	70–110 mg/dL	0,05551	3,9–6,1 mmol/L
	30 min	30–60 mg/dL acima do valor em jejum		1,7–3,3 mmol/L acima do valor em jejum
	60 min	20–50 mg/dL acima do valor em jejum		1,1–2,8 mmol/L acima do valor em jejum
	120 min	5–15 mg/dL acima do valor em jejum		0,3–0,8 mmol/L acima do valor em jejum
	180 min	Nível em jejum ou abaixo	–	Nível em jejum ou abaixo
intravenosa	Soro ou plasma			
	jejum	70–110 mg/dL	0,05551	3,9–6,1 mmol/L
	5 min	Máximo de 250 mg/dL		Máximo de 13,9 mmol/L
	60 min	Declínio significativo	–	Declínio significativo
	120 min	Abaixo de 120 mg/dL	0,05551	Abaixo de 6,7 mmol/L
	180 min	Nível em jejum	–	Nível em jejum
Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) hemácias	Eritrócitos	250–5.000 unidades/10^6 células	1	250–5.000 µunidades/célula
		1.200–2.000 mU/mL de concent. de hemácias	1	1.200–2.000 U/L de concent. de
γ-Glutamiltransferase	Soro	5–40 U/L	1	5–40 U/L a 37°C
Glutationa	Sangue total	24–37 mg/dL	0,03254	0,78–1,20 mmol/L
Hormônio de crescimento	Soro	<10 ng/mL	1	<10 µg/L
Guanase	Soro	<3 nmol/mL/min	1	<3 U/L a 37°C
Haptoglobina	Soro	60–270 mg/dL	0,01	0,6–2,7 g/L
Hemoglobina	Soro ou plasma			
	qualitativa	Negativo	–	Negativo
	quantitativa	0,5–5,0 mg/dL	10	5–50 mg/L
	Sangue total			
	mulheres	12,0–16,0 g/dL	10	120–160 g/L
	homens	13,5–18,0 g/dL		135–180 g/L
α-Hidroxibutirato desidrogenase	Soro	140–350 U/mL	1	140–350 kU/L
17-Hidroxicorticosteroides	Plasma			
	homens	7–19 µg/dL	25,59¶	193–524 mmol/L
	mulheres	9–21 µg/dL		248–579 mmol/L
	após 24 unidades (USP) de ACTH por via intramuscular	35–55 µg/dL		966–1517 nmol/L
Imunoglobulinas:	Soro			
IgG		800–1801 mg/dL	0,01	8,0–18,0 g/L
IgA		113–563 mg/dL		1,1–5,6 g/L
IgM		54–222 mg/dL		0,5–2,2 g/L
IgD		0,5–3,0 mg/dL	10	5,0–30,0 mg/L
IgE		0,01–0,04 mg/dL		0,1–0,4 mg/L
Insulina	Bioensaio do plasma	11–240 µU/mL	7,175‖	79–1722 pmol/L
	radioimunoensaio	4–24 µU/mL		29–172 pmol/L
Tolerância à insulina	Soro			
(0,1 unit/kg)	Jejum	Glicose de 70–110 mg/dL	0,05551	Glicose de 3,9–6,1 mmol/L
	30 min	Queda para 50% do nível em jejum	0,01	Queda para 0,5 do nível em jejum
	90 min	Nível em jejum	–	Nível em jejum
Ferro, total	Soro	60–150 µg/dL	0,1791	10,7–26,9 µmol/L
Capac. de ligação do ferro	Soro	250–400 µg/dL	0,1791	44,8–71,6 µmol/L
Saturação de ferro	Soro	20–55%	0,01	Fração da capac. total de ligação do ferro: 0,20–0,55
Desidrogenase isocítrica	Soro	50–240 U/mL a 25°C (unidades Wolfson-Williams-Ashman)	0,0166	0,83–4,18 U/L a 25°C
Corpos cetônicos	Soro	Negativo	–	Negativo
17-Cetosteroides	Plasma	25–125 µg/dL	34,67**	866–4334 nmol/L

Tabela A5.4 Bioquímica do sangue total, soro e plasma (*continuação*)

Componente	Sistema	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Ácido láctico (como lactato)	Sangue total			
	venoso	5–20 mg/dL	0,1110	0,6–2,2 mmol/L
	arterial	3–7 mg/dL		0,3–0,8 mmol/L
Lactato desidrogenase (LDH)	Soro	(lactato → piruvato) 80–120 unidades a 30°C	0,48	38–62 U/L a 30°C
		(piruvato → lactato) 185–640 unidades a 30°C	0,48	90–310 U/L a 30°C
		(lactato → piruvato) 100–190 U/L a 37°C	1	100–190 U/L a 37°C
Isozimas de lactato desidrogenase	Soro			Fração de LDH total
LD_1 (ânodo)		17–27%	0,01	0,17–0,27
LD_2		27–37%		0,27–0,37
LD_3		18–25%		0,18–0,25
LD_4		3–8%		0,03–0,08
LD_5 (cátodo)		0–5%		0,00–0,05
Lactato desidrogenase (estável ao calor)	Soro	30–60% of total	0,01	Fração de LDH total: 0,30–0,60
Tolerância à lactose	Soro	Alterações glicêmicas semelhantes ao teste de tolerância à glicose	–	Alterações glicêmicas semelhantes ao teste de tolerância à glicose
Chumbo	Sangue total	<50 µg/dL	0,04826	<2,41 µmol/L
Leucina aminopeptidase (LAP)	Soro			
	homens	80–200 U/mL (Goldbarg–Rutenberg)	0,24	19,2–48,0 U/L
	mulheres	75–185 U/mL (Goldbarg–Rutenberg)		18,0–44,4 U/L
Lipase	Soro	0–1,5 U/mL (Cherry–Crandall)	278	0–417 U/L
		14–280 mU/mL	1	14–280 U/L
Lipídeos, totais	Soro	400–800 mg/dL	0,01	4,00–8,00 g/L
colesterol (ver Cap. 17)		150–250 mg/dL	0,02586	3,88–6,47 mmol/L
triglicerídeos (ver Cap. 17)		10–90 mg/dL	0,01129††	0,11–2,15 mmol/L
fosfolipídeos		150–380 mg/dL	0,01	1,50–3,80 g/L
ácidos graxos (livres)		9,0–15,0 mmol/L	1	9,0–15,0 mmol/L
fósforo fosfolipídico		8,0–11,0 mg/dL	0,3229	2,58–3,55 mmol/L
Lítio	Soro	Negativo	–	Negativo
intervalo terapêutico		0,5–1,4 mEq/L	1	0,5–1,4 mmol/L
Hormônio tireoestimulante de ação prolongada (LATS, *long-acting thyroid-stimulating hormone*	Soro	Não detectado	–	Não detectado
Hormônio luteinizante (LH)	Soro			
	homens	6–30 mU/mL	1	6–30 U/L
	mulheres	Pico na metade do ciclo: 3× o valor basal	–	Pico na metade do ciclo: 3× o valor basal
		Pré-menopausa <30 mU/mL	1	Pré-menopausa <30 U/L
		Pós-menopausa >35 mU/mL		Pós-menopausa >35 U/L
Macroglobulinas, totais	Soro	70–430 mg/dL	0,01	0,7–4,3 g/L
Magnésio	Soro	1,3–2,1 mEq/L	0,5000	0,65–1,05 mmol/L
		1,8–3,0 mg/dL	0,4114	0,74–1,23 mmol/L
Metemoglobina	Sangue total	<0,24 g/dL	10	<2,4 g/L
		<1% da hemoglobina total	0,01	Fração da hemoglobina total <0,01
Mucoproteína	Soro	80–200 mg/dL	0,01	0,8–2,0 g/L
Muramidase	Soro	4–13 mg/L	1	4–13 mg/L
Mioglobina	Soro	<90 µg/L	1	<90 µg/L
Nitrogênio não proteico (NNP)	Soro ou plasma	20–35 mg/dL	0,7139	14,3–25,0 mmol/L
	Sangue total	25–50 mg/dL		17,8–35,7 mmol/L
5′-Nucleotidase	Soro	0–1,6 unidades a 37°C	1	0–1,6 unidades a 37°C
Ornitina carbamil transferase	Soro	8–20 mU/mL a 37°C	1	8–20 U/L a 37°C
Osmolalidade	Soro	280–295 mOsm/kg	1	280–295 mmol/kg
Oxigênio (ver Cap. 14)				
pressão (Po_2)	Sangue total (arterial)	95–100 mmHg	0,1333	12,7–13,3 kPa
teor	Sangue total (arterial)	15–23 volume	0,01	Fração de volume: 0,15–0,23
saturação	Sangue total (arterial)	94–100%	0,01	Fração saturada: 0,94–1,00
pH	Sangue total (arterial)	7,38–7,44	1	7,38–7,44
	Sangue total (venoso)	7,36–7,41		7,36–7,41
	Soro ou plasma (venoso)	7,35–7,45		7,35–7,45
Fenilalanina	Soro			
	adultos	<3,0 mg/dL	60,54	<182 µmol/L
	recém-nascidos (a termo)	1,2–3,5 mg/dL		73–212 µmol/L

Tabela A5.4 Bioquímica do sangue total, soro e plasma (*continuação*)

Componente	Sistema	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Fosfatase				
fosfatase ácida	Soro	0,13–0,63 U/L a 37°C (*p*-nitrofenilfosfato)	16,67	2,2–10,5 U/L a 37°C
fosfatase alcalina	Soro	20–130 U/L a 37°C (*p*-(*p*-nitrofenilfosfato em tampão AMP)	1	20–130 U/L a 37°C
Fósforo fosfolipídico (ver Lipídeos, totais)				
Fosfolipídeos (ver Lipídeos, totais)				
Fósforo, inorgânico	Soro			
	adultos	2,3–4,7 mg/dL	0,3229	0,74–1,52 mmol/L
	crianças	4,0–7,0 mg/dL		1,29–2,26 mmol/L
Potássio	Plasma	3,8–5,0 mEq/L	1	3,8–5,0 mmol/L
Prolactina	Soro			
	mulheres	1–25 ng/mL	1	1–25 µg/L
	homens	1–20 ng/mL		1–20 µg/L
Proteínas (ver Cap. 19)	Soro			
totais		6,0–7,8 g/dL	10	60–78 g/L
albumina		3,2–4,5 g/dL		32–45 g/L
globulina		2,3–3,5 g/dL		23–35 g/L
Fracionamento proteico, ver Eletroforese				
Protoporfirina	Eritrócitos	15–50 mg/dL	0,01777	0,27–0,89 µmol/L
Piruvato	Sangue total	0,3–0,9 mg/dL	113,6	34–102 µmol/L
Salicilatos	Soro	Negativo	–	Negativo
intervalo terapêutico		15–30 mg/dL	0,07240	1,08–2,17 mmol/L
Sódio	Plasma	136–142 mEq/L	1	136–142 mmol/L
Sulfato, inorgânico	Serum	0,2–1,3 mEq/L	0,5	0,10–0,65 mmol/L
		0,9–6,0 in mg/dL como SO_4^-	0,1042	0,09–0,63 mmol/L como SO_4^-
Sulfemoglobina	Sangue total	Negativo	–	Negativo
Sulfonamidas	Soro ou sangue total	Negativo	–	Negativo
Testosterona	Soro ou plasma			
	homens	300–1200 ng/dL	0,03467	10,4–41,6 nmol/L
	mulheres	30–95 ng/dL		1,0–3,3 mmol/L
Tiocianato	Soro	Negativo	–	Negativo
Testes dos hormônios Tireoidianos (ver Cap. 24)	Soro			
tiroxina, total (T_4)		5,5–12,5 µg/dL	12,87	71–161 nmol/L
tiroxina, livre (FT_4)		0,9–2,3 ng/dL	12,87	12–30 pmol/L
captação de T_3 em resina		captação relativa de 25–38	0,01	Fração de captação relativa: 0,25–0,38
globulina ligadora de tiroxina (TBG)	Soro	10–26 µg/dL	10	100–260 µg/L
tirotrofina (TSH)	Soro	0,5–5 µU/mL	1	0,5–5 µU/L
tri-iodotironina (T_3)		80–200 mg/dL	0,0154	1,23–3 de nmol/L
Transferases				
aspartato aminotransferase (AST ou TGO)	Soro	8–33 U/L a 37°C	1	8–33 U/L a 37°C
alanina aminotransferase (ALT ou TGP)	Soro	4–36 U/L a 37°C	1	4–36 U/L a 37°C
γ glutamiltransferase (GGT)		5–40 U/L a 37°C	1	5–40 U/L a 37°C
Triglicerídeos (ver Cap. 17)	Soro	10–190 mg/dL	0,01129††	0,11–2,15 mmol/L
Troponina I	Soro	<2,0 mg/mL		0–0,6 µg/L 0–0,1 µg/L
Nitrogenio ureico	Soro	8–23 mg/dL	0,357	2,9–8,2 mmol/L
Depuração da ureia	Soro e urina			
depuração máxima		64–99 mL/min	0,01667	1,07–1,65 L/s
depuração padrão		41–65 mL/min, ou mais de 75% da depuração normal		0,68–1,08 L/s ou mais de 0,75 da depuração normal
Ácido úrico	Soro			
	homens	4,0–8,5 mg/dL	0,05948	0,24–0,51 mmol/L
	mulheres	2,7–7,3 mg/dL		0,16–0,43 mmol/L
Vitamina A	Soro	15–60 µg/dL	0,03491	0,52–2,09 µmol/L

Tabela A5.4 Bioquímica do sangue total, soro e plasma (*continuação*)

Componente	Sistema	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Tolerância à vitamina A	Soro	15–60 µg/dL	0,03491	0,52–2,09 µmol/L
	jejum de 3 ou 6 h após 5.000 unidades de vitamina A/kg	200–600 µg/dL	0,03491	6,98–20,95 µmol/L
	24 h	Valores em jejum ou um pouco maior	–	Valores em jejum ou um pouco maior
Vitamina B_{12}	Soro	160–950 pg/mL	0,7378	118–701 pmol/L
Capacidade não saturada de ligação da vitamina B_{12}	Soro	1.000–2.000 pg/mL	0,7378	738–1475 pmol/L
Vitamina C	Plasma	0,6–1,6 mg/dL	56,78	34–91 µmol/L
Absorção de xilose	Soro, normal	25–40 mg/dL 1–2 h	0,06661	1,67–2,66 mmol/L 1–2 h
	em má-absorção	Máximo ≈10 mg/dL Dose: adultos 25 g de D-xilose crianças 0,5 g de D-xilose/kg		Máximo ≈0,67 mmol/L
Zinco	Soro	50–150 µg/dL	0,1530	7,7–23,0 µmol/L

* Fator = fator numérico (notar que as unidades não estão exibidas). † Valor em unidades do SI = valor em unidades convencionais × fator. ‡ Geralmente não mensurados no sangue (a amostra de preferência é a urina, o cabelo ou as unhas, exceto em casos agudos, quando se utiliza conteúdo gástrico). § Unidade com base na concentração de íons hidrogênio. ¶ Como cortisol. ‖ 1 Unidade Internacional de insulina corresponde a 0,04167 mg do 4º Padrão Internacional (uma mistura de insulina bovina a 52% e insulina suína a 48%). ** Como DHEA (desidroepiandrosterona). †† Como trioleína.

Tabela A5.5 Urina

Componente	Tipo de sistema urinário	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Ácido acetoacético	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Acetona	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Contagem de Addis (avaliação quantitativa de elementos do sedimento urinário)	Urina de 12h	Leucócitos e células epiteliais: 1.800.000/12 h Hemácias 500.000/12 h Cilindros hialinos: < 5.000/12 h	1 1 1	$1,8 \times 10^6$ 12 h $0,5 \times 10^6$ 12 h $<5,0 \times 10^3$ 12 h
Albumina				
qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
quantitativa	24 h	15–150 mg/d	0,001	0,015–0,150 g/d
Aldosterona	24 h	2–26 µg/d	2,774	6–72 nmol/d
Corpos alcaptonúricos	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Nitrogênio do α-aminoácido	24 h	100–290 mg/d	0,07139	7,1–20,7 mmol/d
Ácido δ-aminolevulínico	Amostra aleatória			
	adultos	0,1–0,6 mg/dL	76,26	8–46 µmol/L
	crianças	<0,5 mg/dL		<38 µmol/L
	24 h	1,5–7,5 mg/d	7,626	11–57 µmol/d
Nitrogênio da amônia	24 h	20–70 mEq/d 500–1200 mg/d	1 0,07139	20–70 mmol/d 35,6–85,7 mmol/d
Amilase	2 h	35–260 unidades Somogyi/h	0,1850	6,5–48,1 U/h
Arsênico	24 h	<50 µg/L	0,01335	<0,67 µmol/L
Ácido ascórbico	Amostra aleatória	1–7 mg/dL	56,78	57–397 µmol/L
	24 h	>50 mg/d	5,678	>284 µmol/d
Proteína de Bence Jones	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Berílio	24 h	<0,05 µg/d	111,0	<5,55 nmol/d
Bilirrubina, qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Sangue, oculto	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Borato	24 h	<2 mg/L	16,44	<32 µmol/L
Cálcio				
qualitativo (Sulkowitch)	Amostra aleatória	turbidez 1 +	1	turbidez 1 +
quantitativo	24 h			
	dieta média	100–240 mg/d	0,02495	2,5–6,0 mmol/d
	dieta pobre em cálcio	<150 mg/d		<3,7 mmol/d
	dieta rica em cálcio	240–300 mg/d		6,0–7,5 mmol/d
Catecolaminas	Amostra aleatória	<14 µg/dL	59,11*	<828 nmol/L
	24 h	<100 µg/d (varia com a atividade)	5,911*	<591 nmol/d
adrenalina		<10 ng/d	5,458	<55 nmol/d
noradrenalina		<100 ng/d	5,911	<591 nmol/d
catecolaminas livres totais		4–126 µg/d	5,911*	24–745 nmol/d
metanefrinas totais		0,1–1,6 mg/d	5,458†	0,5–8,7 µmol/d

Tabela A5.5 Urina (*continuação*)

Componente	Tipo de sistema urinário	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Cloreto	24 h	140–250 mEq/d	1	140–250 nmol/d
Teste de concentração (Fishberg)	Amostra aleatória – após restrição hídrica			
densidade		>1,025	1	>1,025
osmolalidade		>850 mOsm/kg	1	>850 mmol/kg
Cobre	24 h	<50 µg/d	0,01574	<0,8 µmol/d
Coproporfirina	Amostra aleatória			
	adultos	3–20 µg/dL	15,27	46–305 nmol/L
	24 h			
	adultos	50–160 µg/d	1,527	76–244 nmol/d
	crianças	<80 µg/d		<122 nmol/d
Creatina	24 h			
	homens	<40 mg/d	7,625	<305 µmol/d
	mulheres	<100 mg/d		<763 µmol/d
		Mais alta em crianças e durante a gestação	–	Mais alta em crianças e durante a gestação
Creatinina	24 h			
	homens	20–26 mg/kg/d	8,840	177–230 µmol/kg/d
		1,0–2,0 g/d	8,840	8,8–17,7 mmol/d
	mulheres	14–22 mg/kg/d	8,840	124–195 µmol/kg/d
		0,8–1,8 g/d	8,840	7,1–15,9 mmol/d
Cistina, qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Cistina e cisteína	24 h	10–100 mg/d	4,161‡	42–416 µmol/d
Desidroepiandrosterona	24 h			
	homens	0,2–2,0 mg/d	3,467	0,7–6,9 µmol/d
	mulheres	0,2–1,8 mg/d		0,7–6,2 µmol/d
Ácido diacético	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Adrenalina	24 h	<20 µg/d	5,458	<109 nmol/d
Estrogênios, totais	24 h			
	homens	5–18 µg/d	3,468§	17–62 nmol/d
	mulheres			
	ovulação	28–100 µg/d	3,468	97–347 nmol/d
	pico luteal	22–80 µg/d		76–364 nmol/d
	na menstruação	4–25 µg/d		14–87 nmol/d
	gravidez	Até 45.000 µg/d	0,003468	Até 156 µmol/d
	pós-menopausa	Até 10 µg/d	3,468	Até 35 nmol/d
Estrogênios, fracionados	24h, não gestante, no meio do ciclo			
estrona (E_1)	–	2–25 µg/d	3,699	7–93 nmol/d
estradiol (E_2)	–	<10 µg/d	3,671	<37 nmol/d
estriol (E_3)	–	2–30 µg/d	3,468	7–104 nmol/d
Etiocolanolona	24 h			
	homens	1,4–5,0 mg/d	3,443	4,8–17,2 µmol/d
	mulheres	0,8–4,0 mg/d		2,8–13,8 µmol/d
Gordura, qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
FIGLU (ácido *N*-formiminoglutâmico)	24 h	<3 mg/d	5,740	<7,2 µmol/d
	após 15 g de L-histidina	4 mg/8 h		23,0 µmol/8 h
Fluoreto	24 h	<1 mg/d	52,63	<53 µmol/d
Hormônio foliculoestimulante (FSH)	24 h			
	adultos	4–25 U/L	1	4–25 U/L
	fase pré-púbere	4–30 U/L	1	4–30 U/L
	pós-menopausa	40–50 U/L	1	40–50 U/L
	meio do ciclo	2 × o valor basal	1	2 × o valor basal
Frutose	24 h	30–65 mg/d	0,005551	0,17–0,36 mmol/d
Glicose, qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Glicose, quantitativa	24 h			
substâncias redutoras de cobre		0,5–1,5 g/d	1	0,5–1,5 g/d
açúcares totais		Média de 250 mg/d	1	Média de 250 mg/d
glicose		Média de 130 mg/d	0,005551	Média de 0,72 mmol/d
Gonadotrofinas, hipofisárias (FSH e LH)	24 h	10–50 U/L	1	10–50 U/d
11-Hidroxiandrosterona	24 h			
	homens	0,1–0,8 mg/d	3,263	0,3–2,6 µmol/d
	mulheres	<0,5 mg/d		<1,6 µmol/d

Tabela A5.5 Urina (*continuação*)

Componente	Tipo de sistema urinário	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
11-Hidroxietiocolanolona	24 h			
	homens	0,2–0,6 mg/d	3,26	0,7–2,0 µmol/d
	mulheres	0,1–1,1 mg/d		0,3–3,63 µmol/d
11-Cetoandrosterona	24 h			
	homens	0,2–1,0 mg/d	3,274	0,7–3,3 µmol/d
	mulheres	0,2–0,8 mg/d		0,7–2,6 µmol/d
11-Cetoetiocolanolona	24 h			
	homens	0,2–1,0 mg/d	3,274	0,7–3,3 µmol/d
	mulheres	0,2–0,8 mg/d		0,7–2,6 µmol/d
Lactose	24 h	14–40 mg/d	2,291	41–117 µmol/d
Chumbo	24 h	<100 µg/d	0,004826	<0,48 µmol/d
Magnésio	24 h	6,0–8,5 mEq/d	0,5000	3,0–4,3 mmol/d
Melanina, qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Mucina	24 h	100–150 mg/d	1	100–150 mg/d
Muramidase (lisozima)	24 h	1,3–36 mg/d	1	1,3–36 mg/d
Mioglobina				
qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
quantitativa	24 h	<4 mg/L	1	<4 mg/L
Osmolalidade	Amostra aleatória	500–800 mOsm/kg de água	1	500–800 mmol/kg
Pentoses	24 h	2–5 mg/kg/d	1	2–5 mg/kg/d
pH	Amostra aleatória	4,6–8,0	1	4,6–8,0
Fenolsulfonaftaleína (PSP)	Teste de toda urina produzida pelo corpo após 6 mg de PSP IV			Fração de corante excretado:
	15 min	20–50% de corante excretado	0,01	0,20–0,50
	30 min	16–24% de corante excretado		0,16–0,24
	60 min	9–17% de corante excretado		0,09–0,17
	120 min	3–10% de corante excretado		0,03–0,10
Ácido fenilpirúvico, qualitativo	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Fósforo	Amostra aleatória	0,9–1,3 g/d	32,29	29–42 mmol/d
Porfobilinogênio				
qualitativo	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
quantitativo	24 h	<1,0 mg/d	4,420	<4,4 µmol/d
Potássio	24 h	40–80 mEq/d	1	40–80 mmol/d
Testes de gravidez	Amostra concentrada da manhã	Positivo em gestações normais ou com tumores produtores de gonadotrofina coriônica	–	Positivo em gestações normais ou com tumores produtores de gonadotrofina coriônica
Pregnanediol	24 h			
	homens	<1,5 mg/d	3,120	<4,7 µmol/d
	mulheres	1–8 mg/d	3,120	3–25 µmol/d
	pico	1 semana pós-ovulação	–	1 semana pós-ovulação
	gravidez	<50 mg/d	3,120	<156 µmol/d
	crianças	Negativo	–	Negativo
Pregnanetriol	24 h			
	homens	0,4–2,4 mg/d	2,972	1,2–7,0 µmol/d
	mulheres	0,5–2,0 mg/d		1,5–5,9 µmol/d
	crianças	Até 1 mg/d		Até 3 µmol/d
Proteína, qualitativa	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
	24 h	40–150 mg/d	1	40–150 mg/d
Substâncias redutoras, totais	24 h	0,5–1,5 mg/d	1	0,5–1,5 mg/d
Sódio	24 h	75–200 mEq/d	1	75–200 mmol/d
Sólidos, totais	24 h	55–70 g/d	1	55–70 g/d
		O nível diminui com a idade para 30 g/d	–	O nível diminui com a idade para 30 g/d
Densidade	Amostra aleatória			Dens. relativa (U a 20°C/água a 20°C):
		1,016–1,022 (ingestão hídrica normal)	1	1,016–1,022 (ingest. hídrica normal)
		1,001–1,035 (faixa)		1,001–1,035 (faixa)
Açúcares (excluindo glicose)	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
Acidez titulável	24 h	20–50 mEq/d	1	20–50 mmol/d

Tabela A5.5 Urina (*continuação*)

Componente	Tipo de sistema urinário	Intervalos de referência típicos		
		Unidades convencionais	Fator*	Unidades do SI recomendadas†
Nitrogênio ureico	24 h	6–17 g/d	35,70	214–607 mmol/d
Ácido úrico	24 h	250–750 mg/d	0,005948	1,5–4,5 mmol/d
Urobilinogênio	2 h	0,3–1,0 unidades Ehrlich	1	0,3–1,0 U
	24 h	0,05–2,5 mg/d ou	1,693	0,1–4,2 µmol/d
		0,5–4,0 unidades Ehrlich/d	1	0,5–4,0 U/d
Uropepsina	Amostra aleatória	15–45 unidades/h (Anson)	7,37	111–332 U/h
	24 h	1.500–5.000 unidades/d (Anson)		11–37 kU/h
Uroporfirinas				
qualitativas	Amostra aleatória	Negativo	–	Negativo
quantitativas	24 h	10–30 µg/d	1,204	12–36 nmol/d
Ácido vanililmandélico (VMA)	24 h	1,5–7,5 mg/d	5,046	7,6–37,9 µmol/d
Volume, total	24 h	600–1600 mL/d	0,001	0,6–1,6 L/d
Zinco	24 h	0,15–1,2 mg/d	15,30	2,3–18,4 µmol/d

* Como noradrenalina. † Como normetanefrina. ‡ Com base na cistina. § Com base no estriol.

Tabela A5.6 Líquido sinovial

Componente	Intervalos de referência típicos		
	Unidades convencionais	Fator	Unidades do SI recomendadas
Diferença de glicose no soro e no líquido sinovial	<10 mg/dL	0,05551	<0,56 mmol/L
Contagem diferencial	Granulócitos < 25% das células nucleadas	0,01	Fração numérica de granulócitos: < 0,25 das células nucleadas
Coágulo de fibrina	Ausente	–	Ausente
Coágulo de mucina	Abundante	–	Abundante
Contagem de células nucleadas	<200 células/µL	10^6	<200 × 10^6 células/L
Viscosidade	Elevada	–	Elevada
Volume	<3,5 mL	0,001	<0,0035 L

Tabela A5.7 Líquido seminal

Componente	Intervalos de referência típicos		
	Unidades convencionais	Fator	Unidades do SI recomendadas
Liquefação	Em até 20 min		Em até 20 min
Morfologia dos espermatozoides	>70% normal, espermatozoides maduros	0,01	Fração numérica: >0,70 normal, espermatozoides maduros
Motilidade dos espermatozoides	>60%	0,01	Fração numérica: >0,60
pH	>7,0 (média de 7,7)	1	>7,0 (média de 7,7)
Contagem de espermatozoides	60–150 × 10^6/mL	10^3	60–150 × 10^9/L
Volume	1,5–5,0 mL	0,001	0,0015–0,005 L

Tabela A5.8 Líquido gástrico

Componente	Intervalos de referência típicos		
	Unidades convencionais	Fator	Unidades do SI recomendadas
Volume residual em jejum	20–100 mL	0,001	0,02–0,10 L
pH	<2,0	1	<2,0
Produção ácida basal (PAB)*	0–6 mEq/h	1	0–6 mmol/h
Produção ácida máxima (PAM) (após estimulação com histamina)	5–40 mEq/h	1	5–40 mmol/h
Relação de PAB/PAM	<0,4	1	<0,4

* Varia entre os sexos e as idades.

Tabela A5.9 Hematologia

Componente	Intervalos de referência típicos		
	Unidades convencionais	**Fator**	**Unidades do SI recomendadas**
Volume eritrocitário			
homens	20–36 mL/kg de peso corporal	0,001	0,020–0,036 L/kg de peso corporal
mulheres	19–32 mL/kg de peso corporal		0,019–0,032 L/kg de peso corporal
Volume plasmático			
homens	25–43 mL/kg de peso corporal	0,001	0,025–0,043 L/kg de peso corporal
mulheres	28–45 mL/kg de peso corporal		0,028–0,045 L/kg de peso corporal
Testes de coagulação e testes hemostáticos			
tempo de sangramento	Depende do local e da orientação do corte, bem como do dispositivo em particular, tipicamente 2–8 min		
Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)	Depende dos reagentes ativadores e fosfolipídicos utilizados, tipicamente 25–35 s		
Antitrombina III			
imunológica	20–30 mg/dL	10	200–300 mg/L
funcional	80–120 U/dL	10	800–1.200 U/L
Tempo de lise do coágulo			
fator de euglobulina	1½–4 h a 37°C		
sangue total	Nenhum em 24 h a 37°C		
Retração do coágulo	Completo em 4 h a 37°C		
Fatores de coagulação	0,50–1,50 µ/mL	1.000	500–1.500 U/L
Fator XIII (teste de triagem)	Coágulo insolúvel em 5 mol/L de ureia em 24 h		
Fibrinogênio	200–400 mg/dL	0,01	2,0–4,0 g/L
Produtos de degradação da fibrina ou do fibrinogênio (FDP)			
FDP séricos	<10 µg/mL	1	<10 mg/L
D-dímeros plasmáticos	<200 ng/mL	1	<200 µg/L
Plasminogênio			
imunológico	10–20 mg/dL	10	100–200 mg/L
funcional	80–120 U/dL	10	800–1.200 U/L
Proteína C	0,7–1,4 µ/mL	10	700–1.400 U/L
Proteína S (total)	0,7–1,4 µ/mL	10	700–1.400 U/L
Tempo de protrombina	Depende do reagente de tromboplastina utilizado, tipicamente 10–13 s		
Tempo de trombina	Depende da concentração do reagente de trombina utilizado, tipicamente 17–25 s		
Fator de von Willebrand			
imunológico	50–150 U/dL	10	500–1.500 U/L
atividade do cofator de ristocetina	50–150 U/dL		500–1.500 U/L
Hemograma completo			
Hematócrito			Fração do volume:
homens	41,5–50,4%	0,01	0,415–0,504
mulheres	35,9–44,6%		0,359–0,446
Hemoglobina			
homens	14,0–17,5 g/dL	10	140–175 g/L
mulheres	12,3–15,3 g/dL		123–153 g/L
Eritrograma			
homens	$4,5–5,9 \times 10^6$/µL	10^6	$4,5–5,9 \times 10^{12}$/L
mulheres	$4,5,–5,1 \times 10^6$/µL		$4,1–5,1 \times 10^{12}$/L
Leucograma	$4,4–11,0 \times 10^3$/µL	10^6	$4,4–11,3 \times 10^9$/L
Índices eritrocitários			
Volume corpuscular médio (VCM)	80–96 μm^3	1	80–96 fL
Hemoglobina corpuscular média (HCM)	27,5–33,2 pg	1	27,5–33,2 pg
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	33,4–35,5%	0,01	Fração da concentração: 0,334–0,355

Leucograma diferencial (adultos)	% Média	Faixa de contagem absoluta		Fração numérica média*
Faixa de contagem absoluta				
neutrófilos segmentados	56	1.800–7.800/µL	10^6	0,56	$1,8–7,8 \times 10^9$/L
bastonetes	3	0–700/µL		0,03	$0–0,70 \times 10^9$/L
eosinófilos	2,7	0–450/µL		0,027	$0–0,45 \times 10^9$/L
basófilos	0,3	0–200/µL		0,003	$0–0,20 \times 10^9$/L
linfócitos	34	1.000–4.800/µL		0,34	$1,0–4,8 \times 10^9$/L
monócitos	4	0–800/µL		0,04	$0–0,80 \times 10^9$/L
Hemoglobina A_2	1,5–3,5% da hemoglobina total	0,01	Fração de massa: 0,015–0,035 da hemoglobina total	
Hemoglobina F	<2%	0,01	Fração de massa: <0,02	

Tabela A5.9 Hematologia (*continuação*)

Componente	Intervalos de referência típicos					
	Unidades convencionais		Fator	Unidades do SI recomendadas		
Fragilidade osmótica		Lise em %	0,01		Fração Lisada	
	% (w/v) NaCl	24 h a 37°C	NaCl em % – 171 Lise em % – 0,01	NaCl mmol/L		24 h a 37°C
		Sangue fresco			Sangue fresco	
	0,2	–		34,2	–	0,95–1,00
	0,3	97–100	95–100	51,3	0,97–1,00	0,85–1,00
	0,35	90–99	85–100	59,8	0,90–0,99	0,75–1,00
	0,4	50–95	75–100	68,4	0,50–0,95	0,65–1,00
	0,45	5–45	65–100	77,0	0,05–0,45	0,55–0,95
	0,5	0,6	55–95	85,5	0–0,06	0,40–0,85
	0,55	–	40–85	94,1	0	0,15–0,70
	0,6	–	15–70	102,6	–	0–0,40
	0,65	–	0–40	111,2	–	0–0,10
	0,7	–	0–10	119,7	–	0–0,05
	0,75	–	0–5	128,3	–	0
Contagem de plaquetas	150.000–450.000/μL		10^6	150–450 × 10^9/L		
Contagem de reticulócitos	0,5–1,5%		0,01	Fração numérica: 0,005–0,015		
	25.000–75.000 células/∝L		10^6	25–75 × 10^9/L		
Taxa de sedimentação (Westergren)						
homens abaixo de 50 anos	<15 mm/h					
homens de 50-85 anos	<20 mm/h					
homens acima de 85 anos	<30 mm/h					
mulheres abaixo de 50 anos	<20 mm/h					
mulheres de 50-85 anos	<30 mm/h					
mulheres acima de 85 anos	<42 mm/h					
Viscosidade	1,4–1,8 vezes a água		1	1,4–1,8 vezes a água		
Taxa de sedimentação Zeta	41–54%		0,01	fração: 0,41–0,54		

* Todas as porcentagens são multiplicadas por 0,01 para gerar a fração.

APÊNDICE

Tabela A5.10 Líquido amniótico

Componente	Intervalos de referência típicos			
	Unidades convencionais	Fator	Unidades do SI recomendadas	
Aspecto				
início da gestação	Claro	–	Claro	
a termo	Claro ou levemente opalescente	–	Claro ou levemente opalescente	
Albumina				
início da gestação	0,39 g/dL	10	3,9 g/L	
a termo	0,19 g/dL		1,9 g/L	
Bilirrubina				
início da gestação	<0,075 mg/dL	17,10	<1,3 μmol/L	
a termo	<0,025 mg/dL		<0,41 μmol/L	
Cloreto				
início da gestação	Aproximadamente igual ao cloreto sérico	–	Aproximadamente igual ao cloreto sérico	
a termo	Geralmente 1–3} mEq/L mais baixo que o cloreto sérico	1	Geralmente 1–3 mmol/L mais baixo que o cloreto sérico	
Creatinina				
início da gestação	0,8–1,1 mg/dL	88,40	71–97 μmol/L	
a termo	1,8–4,0 mg/dL (geralmente >2 mg/dL)		159–354 μmol/L (geralmente >177 μmol/L)	
Estriol				
início da gestação	<10 μg/dL	3,468	<347 nmol/L	
a termo	<60 μg/dL		>2081 nmol/L	
Lecitina:esfingomielina				
início da gestação (imaturo)	<1:1	1	<1:1	
a termo (maturo)	>2:1		>2:1	
Osmolalidade				
início da gestação	Aproximadamente igual à osmolalidade sérica	–	início da gestação	Aproximadamente igual à osmolalidade sérica
a termo	230–270 mOsm/kg	1	230–270 mmol/kg	

Tabela A5.10 Líquido amniótico (*continuação*)

Componente	Intervalos de referência típicos		
	Unidades convencionais	**Fator**	**Unidades do SI recomendadas**
P_{CO_2}			
início da gestação	33–55 mm Hg	0,1333	4,4–7,3 kPa
a termo	42–55 mm Hg (aumenta perto do final da gestação)		5,6–7,3 kPa (aumenta perto do final da gestação)
pH			
início da gestação	7,12–7,38	1	7,12–7,38
a termo	6,91–7,43 (diminui perto do final da gestação)		6,91–7,43
Proteína, total			
início da gestação	0,60 ± 0,24 g/dL	10	60 ± 2,4 g/L
a termo	0,26 ± 0,19 g/dL		2,6 ± 1,9 g/L
Sódio			
início da gestação	Aproximadamente igual ao sódio sérico	–	Aproximadamente igual ao sódio sérico
a termo	7–10 mEq/L mais baixo que o sódio sérico	1	7–10 mmol/L mais baixo que o sódio sérico
Corante, citológico			
Corante vermelho "Oil Red O"			
início da gestação	Fração corada: <10%	0,01	Fração corada: <0,1
a termo	Fração corada: >50%		>0,5
Sulfato azul de Nilo			
início da gestação	Fração corada: 0	0,01	Fração corada: <0,0
a termo	Fração corada: >20%		>0,2
Ureia			
início da gestação	18,0 ± 5,9 mg/dL	0,1665	3,00 ± 0,98 mmol/L
a termo	30,3 ± 11,4 mg/dL		5,04 ± 1,90 mmol/L
Ácido úrico			
início da gestação	3,72 ± 0,96 mg/dL	59,48	221 ± 57 µmol/L
a termo	9,90 ± 2,23 mg/dL		589 ± 133 µmol/L
Volume			
início da gestação	450–1.200 mL	0,001	0,45–1,2 L
a termo	500–1.400 mL (aumenta perto do final da gestação)		0,5–1,4 L (aumenta perto do final da gestação)

Tabela A5.11 Líquido cerebrospinal

Componente	Intervalos de referência típicos		
	Unidades convencionais	**Fator**	**Unidades do SI recomendadas**
Albumina	<10–30 mg/dL	10	100–300 mg/L
Contagem de células	<5 células/µL	10^6	$<5 \times 10^6$/L
Glicose	40–80 mg/dL	0,05551	2,8–4,4 mmol/L
Lactato desidrogenase (LDH) sérico	Aproximadamente 10% do nível sérico	–	Fração de atividade: aproximadamente 0,1 do nível sérico
Proteínas	12–60 mg/dL	10	120–600 mg/L
Eletroforese proteica			Fração:
pré-albumina	2–7%	0,01	0,2–0,07
albumina	56–76%		0,56–0,76
α-1 globulina	2–7%		0,02–0,07
α-2 globulina	4–12%		0,04–0,12
β globulina	8–18%		0,08–0,18
γ globulina	3–12%		0,03–0,12
Xantocromia	Negativo	–	Negativo

Tabela A5.12 Diversos

Componente	Intervalos de referência típicos			
	Amostra	**Unidades convencionais**	**Fator**	**Unidades do SI recomendadas**
Bile, qualitativa	Amostra aleatória de fezes	Negativo em adultos	–	Negativo em adultos
		Positivo em crianças	–	Positivo em crianças
Cloreto	Suor	4–60 mEq/L	1	4–60 mmol/L
Depuração	Soro e urina (toda)			
creatinina, endógena		115 ± 20 mL/min	0,01667	1,92 ± 0,33 mL/s
Diodrast		600–720 mL/min		10,00–12,00 mL/s
inulina		100–150 mL/min		1,67–2,50 mL/s
ácido para-amino-hipúrico (PAH)		600–750 mL/min		10,00–12,50 mL/s
Diagnex blue (análise gástrica sem sonda)	Urina	Presença de ácido livre	–	Presença de ácido livre
Gordura	Fezes, 72 h			
gordura total		<5 g/24 h	1	<5 g/d
		10–25% da matéria seca	0,01	Fração de massa: 0,1–0,25 da matéria seca
gordura neutra		1–5% da matéria seca		0,01–0,05 da matéria seca
ácidos graxos livres		5–13% da matéria seca		0,05–0,13 da matéria seca
ácidos graxos combinados		5–15% da matéria seca		0,05–0,15 da matéria seca
Nitrogênio, total	Fezes, 24 h	10% da ingestão		Fração de massa: 0,1 da ingestão
		1–2 g/24 h	71,39	71–143 mmol/d
Sódio	Suor	10–80 mEq/L	1	10–80 mmol/L
Atividade da tripsina	Amostra aleatória fresca	Positivo (2+ a 4+)	–	Positivo (2+ a 4+)
Captação de iodo-131 pela tireoide	de fezes	7,5–25% in 6 h	0,01	Fração de captação: 0,075–0,25 em 6 h
Urobilinogênio				
qualitativo	Amostra aleatória de fezes	Positivo	–	Positivo
quantitativo	Fezes, 24 h	40–200 mg/24 h	1,693	68–339 µmol/d
		80–280 unidades Ehrlich/24 h		

Tabela A5.13 Valores de referência pediátricos selecionados

Parâmetro	Valor	
S-Fosfatase ácida		
recém-nascido	7,4–19,4 U/L	
2–13 anos	6,4–15,2 U/L	
S-Aldolase		
recém-nascido	até 4× o valor de adultos	
criança	até 2× o valor de adultos	
S-Fosfatase alcalina		
recém-nascido	40–300 U/L	
criança	60–270 U/L	
S-α-fetoproteína		
recém-nascido	Até 100 mg/L	
2 semanas	Indetectável	
S-Amilase		
recém-nascido	Atividade pequena, se alguma, da amilase	
1 ano	Valores de adultos	
S-Aspartato aminotransferase		
recém-nascido	16–74 U/L	
1–3 anos	6–30 U/L	
S-Bilirrubina, recém-nascido	Pré-termo	A termo
24 h	17–103 µmol/L (10–60 mg/L)	34–103 µmol/L (20–60 mg/L)
48 h	17–103 µmol/L (10–60 mg/L)	103–120 µmol/L (60–70 mg/L)
3–5 d	171–257 µmol/L (100–150 mg/L)	68–205 µmol/L (40–120 mg/L)
S-Cálcio		
pré-termo, primeira semana	1,50–2,50 mmol/L (60–100 mg/L)	
a termo, primeira semana	1,75–3,00 mmol/L (70–120 mg/L)	
1–2 anos	2,50–3,00 mmol/L (100–120 mg/L)	
2–16 anos	2,25–2,87 mmol/L (90–115 mg/L)	
U-Catecolaminas	Noradrenalina	Adrenalina
1 ano	30–90 nmol/d (5,4–15,9 µg/d)	1–23 nmol/d (0,1–4,3 µg/d)
1–5 anos	50–180 nmol/d (8,1–30,8 µg/d)	4–50 nmol/d (0,8–9,1 µg/d)
6–15 anos	110–420 nmol/d (19,0–71,1 µg/d)	7–339 nmol/d (1,3–10,5 µg/d)
>15 anos	200–510 nmol/d (34,4–87,0 µg/d)	19–72 nmol/d (3,5–13,2 µg/d)

Tabe;a A5.13 Valores de referência pediátricos selecionados (*continuação*)

Parâmetro	Valor
U-Cloreto (varia com a ingestão de cloreto)	
bebê	1,7–8,5 mmol/d
criança	17–34 mmol/d
S-Colesterol	
sangue do cordão umbilical	1,2–2,5 mmol/L (460–980 mg/L)
1–2 anos	1,8–4,9 mmol/L (700–1.900 mg/L)
2–16 anos	3,5–6,5 mmol/L (1.350–2.500 mg/L)
U-Cortisol (livre)	
4 meses–10 anos	6–74 nmol/d (2–27 µg/d)
11–20 anos	2–152 nmol/d (0,7–55 µg/d)
S-Creatina quinase	
recém-nascido	3× os valores de adultos
3 semanas–3 meses	1,5× os valores de adultos
>1 ano	Valores de adultos
S-Creatinina	Valor superior de referência:
até 5 anos	44 µmol/L (5,0 mg/L)
até 6 anos	53 µmol/L (6,0 mg/L)
até 7 anos	62 µmol/L (7,0 mg/L)
até 8 anos	71 µmol/L (8,0 mg/L)
até 9 anos	80 µmol/L (9,0 mg/L)
até 10 anos	88 µmol/L (10,0 mg/L)
>10 anos	106 µmol/L (12,0 mg/L)
S-Estradiol	
0–2 anos	0–26 pmol/L (0–7 pg/mL)
2–4 anos	0–26 pmol/L (0–7 pg/mL)
4–6 anos	0–51 pmol/L (0–14 pg/mL)
6–8 anos	0–37 pmol/L (0–10 pg/mL)
8–10 anos	0–367 pmol/L (0–100 pg/mL)
10–12 anos	0–367 pmol/L (0–100 pg/mL)
12–14 anos	0–367 pmol/L (0–100 pg/mL)
14–16 anos	26–385 pmol/L (7–105 pg/mL)
16–26 anos	26–1.175 pmol/L (7–320 pg/mL)
Gordura fecal	
recém-nascido pré-termo	Excreção de até 0,40
recém-nascido a termo	Excreção de até 0,20
3 meses–1 ano	Excreção de até 0,15
1 ano	Excreção de até 0,085
P-Ácidos graxos não esterificados	
recém-nascido	0–1.845 mmol/L
4 meses–10 anos	300–1.100 mmol/L
S-Glicose	
recém-nascido pré-termo	1,1–3,6 mmol/L (200–656 mg/L)
recém-nascido a termo	1,1–6,1 mmol/L (200–1.100 mg/L)
criança	3,3–5,8 mmol/L (600–1.050 mg/L)
S-γ-Glutamiltransferase	
recém-nascido prematuro	56–233 U/L
recém-nascido–3 semanas	10–103 U/L
3 semanas–3 meses	4–111 U/L
1–5 anos	2–23 U/L
6–15 anos	2–23 U/L
16 anos–adulto	2–35 U/L
S-Haptoglobina	
recém-nascido	Haptoglobina detectável em apenas 0,1–0,2
≥1 ano	Valores de adultos
S-Imunoglobulina IgG	
0–5 semanas	7.500–15.000 mg/L
6 meses	1.500–7.000 mg/L
1 ano	1.400–10.300 mg/L
5 anos	3.700–15.000 mg/L
10 anos	4.400–15.500 mg/L
S-Imunoglobulina IgA	
0–5 semanas	Nenhuma
6 meses	200–1.300 mg/L
1 ano	200–1.300 mg/L
5 anos	300–2.000 mg/L
10 anos	500–2.300 mg/L

Tabe;a A5.13 Valores de referência pediátricos selecionados (*continuação*)

Parâmetro	Valor	
S - Imunoglobulina IgM		
0–5 semanas	<200 mg/L	
6 meses	300–600 mg/L	
1 ano	300–1.600 mg/L	
5 anos	200–2.200 mg/L	
10 anos	300–1.700 mg/L	
Depuração de inulina		
<1 mês	29–88 mL/min por 1,73 m^2 da superfície corporal	
1–6 meses	40–112 mL/min por 1,73 m^2 da superfície corporal	
6–12 meses	62–121 mL/min por 1,73 m^2 da superfície corporal	
>1 ano	78–164 mL/min por 1,73 m^2 da superfície corporal	
U-17-Cetosteroides*		
0–3 dias	0–0,2 µmol/d (0–0,5 mg/d)	
1–3 anos	<7,0 µmol/d (<2,0 mg/d)	
3–6 anos	2–10 µmol/d (0,5–3,0 mg/d)	
6–9 anos	3–14 µmol/d (0,8–4,0 mg/d)	
	Homens	Mulheres
10–12 anos	2–21 µmol/d (0,7–6,0 mg/d)	2–17 µmol/d(0,7–5,0 mg/d)
Adolescente	10–52 µmol/d (3–15 mg/d)	10–42 µmol/d (3–12 mg/d)
S-Lactato desidrogenase		
1–3 dias	Até 2× os valores de temperatura letal superior	
S-Fósforo (inorgânico)		
	Pré-termo	A termo
recém-nascido	1,81–2,58 mmol/L (56,0–80,0 mg/L)	1,61–2,52 mmol/L (50,0–78,0 mg/L)
6–10 dias	1,97–3,78 mmol/L (61–117 mg/L)	1,58–2,87 mmol/L (49–89 mg/L)
4 meses	1,55–2,62 mmol/L (48–81 mg/L)	
1 ano	1,26–1,94 mmol/L (39–60 mg/L)	
2–16 anos	0,84–1,61 mmol/L (26–50 mg/L)	
S-Potássio		
recém-nascido pré-termo	4,5–7,2 mmol/L	
recém-nascido a termo	5,0–7,7 mmol/L	
2 dias–2 semanas	4,0–6,4 mmol/L	
2 semanas–3 meses	4,0–6,2 mmol/L	
3 meses–1 ano	3,7–5,6 mmol/L	
1–16 anos	3,6–5,2 mmol/L	
S-Testosterona	Homens	Mulheres
0–2 anos	0,14–1,28 nmol/L (0–0,4 ng/mL)	0,24–0,62 nmol/L (0,1–0,2 ng/mL)
2–4 anos	0,17–5,55 nmol/L (0–1,6 ng/mL)	0,24–0,69 nmol/L (0,1–0,2 ng/mL)
4–6 anos	0,28–1,39 nmol/L (0,1–0,4 ng/mL)	0,35–0,69 nmol/L (0,1–0,2 ng/mL)
6–8 anos	0,21–9,72 nmol/L (0,1–2,8 ng/mL)	0,52–1,04 nmol/L (0,1–0,3 ng/mL)
8–10 anos	0,31–1,74 nmol/L (0,1–0,5 ng/mL)	0,69–1,39 nmol/L (0,2–0,4 ng/mL)
10–12 anos	0,29–10,06 nmol/L (0,1–2,9 ng/mL)	0,69–1,74 nmol/L (0,2–0,5 ng/mL)
12–14 anos	0,17–26,37 nmol/L (0–7,6 ng/mL)	1,04–2,43 nmol/L (0,3–0,7 ng/mL)
14–16 anos	3,12–19,43 nmol/L (0,9–5,6 ng/mL)	1,21–3,30 nmol/L (0,3–1,0 ng/mL)
16–18 anos	9,02–25,33 nmol/L (2,6–7,3 ng/mL)	1,39–3,30 nmol/L (0,4–1,0 ng/mL)
18–20 anos	13,88–24,98 nmol/L (4,0–7,2 ng/mL)	1,39–3,30 nmol/L (0,4–1,0 ng/mL)
20–25 anos	11,80–38,86 nmol/L (3,4–11,2 ng/mL)	1,39–3,30 nmol/L (0,4–1,0 ng/mL)
S-Tiroxina		
1–3 dias	142–296 nmol/L (11,0–23,0 µg/dL)	
1 semana–1 mês	116–232 nmol/L (9,0–18,0 µg/dL)	
1–4 meses	97–212 nmol/L (7,5–16,5 µg/dL)	
4–12 meses	71–187 nmol/L (5,5–14,5 µg/dL)	
1–6 anos	71–174 nmol/L (5,5–13,5 µg/dL)	
6–10 anos	64–161 nmol/L (5,0–12,5 µg/dL)	

Informações obtidas com base em Meites S (ed): Pediatric Clinical Chemistry. Washington, DC, American Association for Clinical Chemistry, 1977.

* Como DHEA (desidroepiandrosterona).

P = plasma; S = soro; U = urina.

APÊNDICE 6

Genes quiméricos comuns identificados em malignidades humanas

Naif Z. Abraham Jr MD PhD

As Tabelas A6.1 e A6.2 fornecem exemplos bem conhecidos de translocações recorrentes comuns identificadas em uma série de malignidades. A Tabela A6.1 correlaciona a translocação específica e os genes envolvidos com a respectiva malignidade. Por exemplo, em casos de leucemia mielógena crônica (LMC), a translocação cromossômica típica presente é a t(9;22)(q34q11), em que tipicamente os braços longos dos cromossomos 22 e 9 estão envolvidos em uma translocação recíproca ou fusão genética. O gene *bcr* está localizado no cromossomo 22q11, enquanto o oncogene *abl* reside no cromossomo 9q34. Essa translocação produz uma fusão gênica *bcr/abl* anormal. Esse gene, por sua vez, é transcrito em um mRNA da fusão gênica *bcr/abl* anormal, que, por sua vez, é traduzido na molécula proteica bcr/abl produtora de leucemia. Essa proteína de fusão possui uma atividade tirosina quinase anormalmente acentuada, envolvida na transformação maligna de células hematopoéticas para produção da LMC.

A Tabela A6.2 indica os genes e suas localizações cromossômicas, seu suposto produto proteico, bem como a abreviatura ou nomenclatura utilizada nas pesquisas e na literatura médica para identificá-los. Por exemplo, na transformação em LMC, os genes-chave envolvidos são bcr e abl. A nomenclatura "bcr" significa, em inglês, ***b**reakpoint **c**luster **r**egion* (região de reagrupamento do ponto de ruptura), enquanto "abl", do inglês ***Ab**elson murine **l**eukemia*, se refere ao homólogo humano do oncogene do vírus da leucemia murina de Abelson ou v-***abl***. Espera-se que essas tabelas com "explicações" da nomenclatura dos genes sejam úteis para esclarecer para o estudante de patologia molecular e clínica, assuntos como a função e/ou o histórico de pesquisas des-

Tabela A6.1 Alterações cromossômicas recorrentes comuns com genes quiméricos comuns e fusões proteicas identificadas em malignidades

Malignidade	Translocação, genes/proteínas envolvidos
Malignidades hematopoéticas	
Leucemia mielógena crônica	t(9;22)(q34q11), BCR/ABL
Leucemia mieloide aguda	t(8;21)(q22;q22), AML1/ETO
Leucemia promielocítica aguda	t(15;17)(q22;q12), PML/RAR alpha
LMA com eosinófilos anormais	t(16;16)(p13;q22) ou inv(16)(p13q22), CBFb/MYH11
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32), c-MYC/*locus* da cadeia pesada de Ig
Leucemia/linfoma linfoblástico agudo de precursores de células B	t(9;22)(q34;q11.2), BCR/ABL t(4;11)(q21;q23), AF4/MLL t(1;19)(q23;p13.3), PBX/E2A t(12;21)(p13;q22), TEL/AML1
Linfoma de células de revestimento	t(11;14)(q13;q32), *locus* da cadeia pesada de Ig /BCL1
Linfoma folicular	t(14;18)(q32;q21), BCL2 rearranjado
Linfoma do tecido linfoide associado à mucosa	t(11;18)(q21;q21), API2/MLT
Linfoma anaplásico de células grandes	t(2;5)(p23;q35), ALK/NPM
Leucemia prolinfocítica de células T	t(14;14)(q11;q32), TCR α/TCL1 inv14q(q11;q32), TCR α/TCL1
Malignidades mesenquimais	
Sarcoma alveolar de partes moles	t(X;17)(p11;q25), ASPL/TFE3
Rabdomiossarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14), PAX3/FKHR
Fibrossarcoma congênito	t(12;15)(p13;q25), ETV6/NTRK3
Dermatofibrossarcoma protuberante	t(17;22)(q22;q13), COLIA1/PDGFB
Tumor desmoplásico de pequenas células redondas	t(11;22)(p13q;12), EWS/WT1
Sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo periférico	t(11;22)(q24;q12), EWS/FLI1
Condrossarcoma mixoide extraesquelético	t(9;22)(q22;q12), EWS/TEC
Melanoma maligno de partes moles/sarcoma de células claras	t(12;22)(q13;q12), EWS/ATF1
Lipossarcoma mixoide/lipossarcoma de células redondas	t(12;16)(q13;p11), TLS/CHOP
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11.23;q11), SYT/SSX1
Carcinomas	
Carcinoma de células renais, tipo papilar	t(X;1)(p11;q21), TFE3/PRCC t(X;1)(p11;p34), TFE3/PSF
Carcinoma papilar da tireoide	2 proto-oncogenes identificados em alguns cânceres: *RET* e *NTRK1* fundidos à extremidade aminoterminal de diferentes produtos gênicos

Fontes: Alberti, 2003; Barone, 1994; Beckmann, 1990; Bernard, 1996; Bongarzone, 2003; Bursen, 2004; Cooper, 2002; Deng, 1993; DiMartino, 1999; Ernst, 2002; Hart, 2002; Hisaoka, 2004; Jaffe, 2001; Kundu, 2002; Labelle, 1995; Lasota, 2003; Lerman, 1983; Mathur, 2003; Oikawa, 2003; Patton, 1993; Pekarsky, 2001a,b; Pierotti, 1995, 2001; Ponder, 2002; Pulford, 1997; Ro, 1991; Rosenwald, 2004; Santoro, 1995, 2004; Schaefer, 2004; Sidhar, 1996; Soulez, 1999; Takahashi, 1985, 1987; Thayer, 1983; Thompson, 2004; Tong, 1986; Whitman, 2001; Yonezumi, 2001.

Tabela A6.2 Genes e proteínas envolvidos em malignidades

Malignidades hematopoéticas	
BCR	Do inglês ***b**reakpoint **c**luster **r**egion* (gene da região de reagrupamento do ponto de ruptura) – codifica a proteína putativa serina/treonina quinase. Gene mapeado no cromossomo 22q11.
ABL	Homólogo humano do oncogene do v-***abl*** (do inglês ***Ab**elson murine **l**eukemia virus* [vírus da leucemia murina de Abelson]) – codifica a proteína tirosina quinase não receptora. Gene mapeado no cromossomo 9q34.
AML1	Do inglês ***a**cute **m**yelogenous **l**eukemia-**1*** (gene da leucemia mielógena aguda-1) – codifica um fator de transcrição; gene mapeado no cromossomo 21q22; também conhecido como fator α2 ou CBF-α de ligação nuclear, RUNX1, PEBP2 αB.
ETO	Do inglês ***e**ight-**t**wenty-**o**ne* (gene oito-vinte-um) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 21q22.
PML	Do inglês ***pro**myelocytic **l**eukemia* (gene da leucemia promielocítica) – codifica um fator nuclear, que pode influenciar a transcrição. Gene mapeado no cromossomo 15q22.
RAR α	Do inglês ***r**etinoic **a**cid **r**eceptor **alpha*** (gene do receptor alfa do ácido retinoico) – codifica um receptor nuclear dependente de ligante do ácido retinoico com atividade de fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 17q21.
CBF β	Do inglês ***c**ore **b**inding **f**actor **beta*** (subunidade beta do fator de ligação nuclear) – codifica um fator de transcrição; gene mapeado no cromossomo 16q22; também conhecido como *PEBP*2B (do inglês *polyoma enhancer binding protein* [proteína de ligação ao intensificador de polioma]).
MYH11	Do inglês ***my**osin **h**eavy chain **11*** (gene da cadeia pesada da miosina 11) – codifica a cadeia pesada de miosina da musculatura lisa. Gene mapeado no cromossomo 16p13.
c-MYC	Do inglês ***c**ellular homologue of the v-**myc*** (homólogo celular do oncogene v-***myc***) do retrovírus da mielocitomatose aviária — codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 8q24.
Locus da cadeia pesada de Ig	Codifica o principal constituinte (ou seja, a cadeia pesada ou H, do inglês *heavy*) da molécula de imunoglobulina e determina a classe (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) da molécula. Gene mapeado no cromossomo 14q32.
AF4	Do inglês ***ALL-1 f**used gene on chromosome **4*** (gene ALL-1 fundido no cromossomo 4) – codifica um fator de transcrição putativo. Gene mapeado no cromossomo 4q21; também conhecido como FEL.
MLL	Do inglês ***m**ixed **l**ineage **l**eukemia ou **m**yeloid/**l**ymphoid **l**eukemia* (gene da leucemia de linhagem mista ou da leucemia mieloide/linfoide) – codifica um regulador de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 11q23; também conhecido como HRX e ALL-1.
PBX1	Do inglês ***p**re-**B** cell leukemic homeobo**x** **1*** (gene homeobox-1 leucêmico de células pré-B) – codifica um ativador de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 1q23.
E2A	Do inglês ***e**nhancer binding **A*** (gene A de ligação a intensificador), responsável pela codificação de duas proteínas que se ligam ao sítio **κ E2** na região intensificadora do gene da cadeia leve κ. Além disso, esse gene codifica um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento das células B. Gene mapeado no cromossomo 19p13.3.
TEL	Do inglês ***t**ranslocated **ETS*** [**E**26-transformation specific] **l**eukemia (gene translocado da família E26 transformação-específica da leucemia) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 12p13; também conhecido como *ETV6*.
BCL1	Do *inglês **B** **c**ell **l**eukemia/lymphoma **1*** (gene de leucemia/linfoma de células B-1) – codifica uma proteína sensora do fator de crescimento envolvida na regulação da divisão do ciclo celular. Gene mapeado no cromossomo 11q13; também conhecido como PRDA1/CCND1 ou ciclina D1.
BCL2	Do inglês ***B** **c**ell **l**eukemia/lymphoma **2*** (gene de leucemia/linfoma de células B-2) – codifica a proteína BCL-2, que inibe a apoptose (morte celular programada). Gene mapeado no cromossomo 18q21.3.
API2	Do inglês ***ap**optosis **i**nhibitor **2*** (gene inibidor da apoptose-2) – codifica um inibidor da apoptose. Gene mapeado no cromossomo 11q21; também conhecido como c-IAP2, HIAP1, MIHC.
MLT	Do inglês ***M**ALT* [mucosa-associated *l*ymphoid *t*issue] ***l**ymphoma-associated **t**ranslocation* (gene de translocação associado a linfoma do tecido linfoide associado à mucosa) – codifica uma proteína de função desconhecida. Gene mapeado no cromossomo 18q21.
ALK	Do inglês ***a**naplastic **l**ymphoma **k**inase* (gene quinase de linfoma anaplásico) — codifica um receptor tirosina quinase (expresso no tecido neural). Gene mapeado no cromossomo 2p23.
NPM	Do inglês ***nucleophosmin*** (nucleofosmina), uma fosfoproteína nucleolar não ribossomal envolvida no transporte de componentes ribossomais entre o núcleo e o citoplasma para montagem dos ribossomos, codificada pelo gene NPM. Gene mapeado no cromossomo 5q35.
TCR	Do inglês ***T** **c**ell antigen **r**eceptor* (receptor antigênico de células T), um receptor de membrana/superfície das células T para antígeno, composto de cadeias polipeptídicas provenientes dos conjuntos de genes α/Δ (cromossomo 14q11), β (cromossomo 7q34) e/ou γ (cromossomo 7p).
TCL1	Do inglês ***T** **c**ell **l**eukemia/lymphoma **1*** (gene de leucemia/linfoma de células T-1) – codifica uma proteína de função desconhecida, mas pode estar envolvido na proliferação e/ou sobrevida de células linfoides. Gene mapeado no cromossomo 14q32.1.
Malignidades mesenquimais	
ASPL	Do inglês ***a**lveolar **s**oft **p**art sarcoma **locus*** (*locus* do sarcoma alveolar de partes moles), com função desconhecida. Gene mapeado no cromossomo 17q25.
TFE3	Do inglês ***t**ranscription **f**actor **E3*** (gene responsável pela codificação do fator de transcrição que se liga à região mu***E3*** intensificadora intrônica IgH do DNA). Gene mapeado no cromossomo Xp11.2
PAX3	Do inglês ***pa**ired bo**x** transcription factor **3*** (gene do fator de transcrição box pareado-3) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 2q35.
FKHR	Do inglês ***f**or**kh**ead-**r**elated* (gene relacionado à família de genes *forkhead* ["cabeça bifurcada ou de forquilha"]) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 13q14; também conhecido como *FOXO1A*.
ETV6	Do inglês ***Ets v**ariant **6*** (gene variante do *Ets-6*) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 12p13; também conhecido como *TEL*.
NTRK3	Do inglês ***n**eurotrophin **t**ransmembrane **r**eceptor tyrosine **k**inase **3** gene* (gene do receptor tirosina quinase transmembrana de neurotrofina-3) – codifica um receptor que induz à liberação de neurotrofinas. Gene mapeado no cromossomo 15q25; também conhecido como *TRKC* (do inglês *transmembrane receptor tyrosine kinase C* [receptor tirosina quinase C transmembrana]).
COL1A1	Do inglês ***col**lagen type **1** alfa **1** chain* (gene da cadeia alfa 1 do colágeno tipo 1) – codifica uma proteína da matriz extracelular. Gene mapeado no cromossomo 17q22.
PDGFB	Do inglês ***p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor beta chain* (gene da cadeia beta do fator de crescimento derivado de plaquetas) — codifica um fator de crescimento ou mitógeno. Gene mapeado no cromossomo 22q13; um homólogo humano do oncogene v-*sis* (do in glês *simian sarcoma virus* [vírus do sarcoma dos símios]).

Tabela A6.2 Genes e proteínas envolvidos em malignidades *(continuação)*

EWS	Do inglês ***Ew**ing **s**arcoma* (gene do sarcoma de Ewing), uma proteína putativa de ligação ao RNA nuclear. Gene mapeado no cromossomo 22q12.
WT1	Do inglês ***W**ilms' **t**umor protein **1*** (gene da proteína relacionada ao tumor de Wilms-1) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 11p13.
FLI1	Do inglês ***F**reund's **l**eukemia **i**ntegration site **1*** (gene do sítio de integração da leucemia de Freund-1) e um gene da família do ETS – codifica uma proteína reguladora da transcrição. Gene mapeado no cromossomo 11q.
TEC	Do inglês ***t**ranslocated in **e**xtraskeletal **c**hondrosarcoma* (gene translocado em condrossarcoma extraesquelético) — codifica um receptor/fator de transcrição nuclear esteroide que, supostamente, está envolvido no controle de proliferação e apoptose celular. Gene mapeado no cromossomo 9q22; também conhecido como *CHN* (do inglês *chondrosarcoma* [condrossarcoma]), *NOR1* (do inglês *neuron derived orphan receptor 1* [receptor órfão derivado de neurônio-1]). Um receptor recebe o nome de *órfão* quando seu ligante não foi isolado.
ATF1	Do inglês ***a**ctivating **t**ranscription **f**actor **1*** (gene do fator de transcrição ativador-1) – codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 12q13.
TLS	Do inglês ***t**ranslocated in **l**ipo**s**arcoma* (translocado no gene do lipossarcoma), uma proteína putativa de ligação ao RNA nuclear. Gene mapeado no cromossomo 16p11; também conhecido como FUS (do inglês *fusion* [fusão]).
CHOP	Do inglês ***C**/EBP **ho**mologous **p**rotein* (proteína homóloga C/EBP) – em que C/EBP (do inglês *CCAAT/enhancer-binding protein*) se refere à proteína intensificadora de ligação a CCAAT — codifica um fator de transcrição. Gene mapeado no cromossomo 12q13; também conhecido como *GADD153*, *DDIT3*.
SYT	Do inglês ***sy**novial sarcoma **t**ranslocation* (gene de translocação do sarcoma sinovial), um ativador de transcrição putativo. Gene mapeado no cromossomo 18q11.
SSX1	Do inglês ***s**ynovial **s**arcoma **X** chromosome breakpoint gene **1*** (gene do ponto de ruptura do cromossomo X do sarcoma sinovial-1), um fator de ligação ao DNA/repressor de transcrição putativo. Gene mapeado no cromossomo Xp11.
Carcinomas	
TFE3	Do inglês ***t**ranscription **f**actor **E3*** (gene responsável pela codificação do fator de transcrição que se liga à região mu***E3*** intensificadora intrônica IgH do DNA). Gene mapeado no cromossomo Xp11.2.
PRCC	Do inglês ***p**apillary **r**enal **c**ell **c**arcinoma* (gene do carcinoma de células renais papilar), uma proteína nuclear expressa de forma ubíqua. Gene mapeado no cromossomo 1q21.1.
PSF	Do inglês ***P**TB-associated **s**plicing **f**actor* (gene do fator de emenda associado à PTB, do inglês *polypyrimidine tract-binding protein*, proteína de ligação no trato das polimiridinas) – codifica uma proteína nuclear putativa multifuncional, expressa de forma ubíqua, possivelmente envolvida na transcrição. Gene mapeado no cromossomo 1p34.
RET	Do inglês ***r**earranged du**r**ing **t**ransfection* (gene rearranjado durante transfecção) – codifica um receptor tirosina quinase. Gene mapeado no cromossomo 10q11.
NTRK1	Do inglês ***n**eurotrophin **t**ransmembrane **r**eceptor tyrosine **k**inase **1*** (gene do receptor tirosina quinase transmembrana de neurotrofina-1) – codifica um receptor tirosina quinase para o fator de crescimento neurotrófico. Gene mapeado no cromossomo 1q21-22; também conhecido como TRKA (do inglês *transmembrane receptor tyrosine kinase A,* receptor tirosina quinase A transmembrana).

Fontes: Alberti, 2003; Barone, 1994; Beckmann, 1990; Bernard, 1996; Bongarzone, 2003; Bursen, 2004; Cooper, 2002; Deng, 1993; DiMartino, 1999; Ernst, 2002; Hart, 2002; Hisaoka, 2004; Jaffe, 2001; Kundu, 2002; Labelle, 1995; Lasota, 2003; Lerman, 1983; Mathur, 2003; Oikawa, 2003; Patton, 1993; Pekarsky, 2001a,b; Pierotti, 1995, 2001; Ponder, 2002; Pulford, 1997; Ro, 1991; Rosenwald, 2004; Santoro, 1995, 2004; Schaefer, 2004; Sidhar, 1996; Soulez, 1999; Takahashi, 1985, 1987; Thayer, 1983; Thompson, 2004; Tong, 1986; Whitman, 2001; Yonezumi, 2001.

ses genes e de seus produtos proteicos. Todas as informações contidas nessas tabelas foram localizadas e identificadas nas referências bibliográficas listadas no final do Apêndice 6.

Alberti L, Carniti C, Miranda C, et al: RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. J Cell Physiol 2003; 195:168–186.

Barone MV, Crozat A, Tabaee A, et al: CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. Genes Dev 1994; 8:453–464.

Beckmann H, Su LK, Kadesch T: TFE3: A helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. Genes Dev 1990; 4:167–179.

Bernard OA, Romana SP, Poirel H, Berger R: Molecular cytogenetics of t(12;21)(p13;q22). Leuk Lymphoma 1996; 23:459–465.

Bongarzone I, Pierotti MA: The molecular basis of thyroid epithelial tumorigenesis. Tumori 2003; 89:514–516.

Bursen A, Moritz S, Gaussmann A, et al: Interaction of AF4 wild-type and AF4-MLL fusion protein with SIAH proteins: Indication for t(4;11) pathobiology? Oncogene 2004; 23:6237–6249.

Cooper CS (ed): Translocations in Solid Tumors. Georgetown, Texas, Landes Bioscience, 2002.

Deng Z, Liu P, Marlton P, et al: Smooth muscle myosin heavy chain locus (*MYH11*) maps to 16p13.13-p13.12 and establishes a new region of conserved synteny between human 16p and mouse 16. Genomics 1993; 18:156–159.

DiMartino JF, Cleary ML: MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. Br J Haematol 1999; 106: 614–626.

Ernst P, Wang J, Korsmeyer SJ: The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. Curr Opin Hematol 2002; 9:282–287.

Hart SM, Foroni L: Core binding factor genes and human leukemia. Haematologica 2002; 87:1307–1323.

Hisaoka M, Ishida T, Imamura T, Hashimoto H: TFG is a novel fusion partner of NOR1 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. Genes Chromosomes Cancer 2004; 40:325–328.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001.

Kundu M, Chen A, Anderson S, et al: Role of *Cbfb* in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene *Cbfb-MYH11*. Blood 2002; 100:2449–2456.

Labelle Y, Zucman J, Stenman G, et al: Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. Hum Mol Genet 1995; 4:2219–2226.

Lasota J: Genetics of soft tissue tumors. *In* Miettinen M: Diagnostic Soft Tissue Pathology. New York, Churchill Livingstone, 2003, pp 99–142.

Lerman MI, Thayer RE, Singer MF: Kpn I family of long interspersed repeated DNA sequences in primates: Polymorphism of family members and evidence for transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 1983; 80:3966–3970.

Mathur M, Das S, Samuels HH: PSF-TFE3 oncoprotein in papillary renal cell carcinoma inactivates TFE3 and p53 through cytoplasmic sequestration. Oncogene 2003; 22:5031–5044.

Oikawa T, Yamada T: Molecular biology of the Ets family of transcription factors. Gene 2003; 303:11–34.

Patton JG, Porro EB, Galceran J, et al: Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. Genes Dev 1993; 7:393–406.

Pekarsky Y, Hallas C, Croce CM: Molecular basis of mature T-cell leukemia. JAMA 2001a; 286:2308–2314.

Pekarsky Y, Hallas C, Croce CM: The role of *TCL1* in human T-cell leukemia. Oncogene 2001b; 20: 5638–5643.

Pierotti MA: Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: A recombination or death dilemma. Cancer Lett 2001; 166:1–7.

Pierotti MA, Bongarzone I, Borrello MG, et al: Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. J Endocrinol Invest 1995; 18:130–133.

Ponder BAJ: Multiple endocrine neoplasia type 2. *In* Vogelstein B, Kinzler KW (eds): The Genetic Basis of Human Cancer, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 501–513.

Pulford K, Lamant L, Morris SW, et al: Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. Blood 1997; 89:1394–1404.

Ro HS, Roncari DAK: The C/EBP-binding region and adjacent sites regulate expression of the adipose P2 gene in human preadipocytes. Mol Cell Biol 1991; 11:2303–2306.

Rosenwald A, Staudt LM, Duyster JG, Morris SW: Molecular aspects of non-Hodgkin lymphomagenesis. *In* Greer JP, Foerster J, Lukens JN, et al: (eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 11th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, pp 2325–2361.

Santoro M, Grieco M, Melillo RM, et al: Molecular defects in thyroid carcinomas: Role of the RET oncogene in thyroid neoplastic transformation. Eur J Endocrinol 1995; 133:513–522.

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, et al: RET: Normal and abnormal functions. Endocrinology 2004 145:5448–5451; Epub 2004, Aug 26.

Schaefer KL, Brachwitz K, Wai DH, et al: Expression profiling of t(12;22) positive clear cell sarcoma of soft tissue cell lines reveals characteristic up-regulation of potential new marker genes including *ERBB3*. Cancer Res 2004; 64:3395–3405.

Sidhar SK, Clark J, Gill S, et al: The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene *PRCC* to the *TFE3* transcription factor gene. Hum Mol Genet 1996; 5:1333–1338.

Soulez M, Saurin AJ, Freemont PS, Knight JC: SSX and the synovial-sarcoma-specfic chimaeric protein SYT-SSX co-localize with the human polycomb group complex. Oncogene 1999; 18:2739–2746.

Takahashi M, Cooper GM: Ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. Mol Cell Biol 1987; 7:1378–1385.

Takahashi M, Ritz J, Cooper GM: Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell 1985; 42:581–588.

Thayer RE, Singer MF: Interruption of an alpha-satellite array by a short member of the KpnI family of interspersed, highly repeated monkey DNA sequences. Mol Cell Biol 1983; 3:967–973.

Thompson MA: Molecular genetics of acute leukemia. *In* Greer JP, Foerster J, Lukens JN, et al: (eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, pp 2045–2062.

Tong BD, Levine SE, Jaye M, et al: Isolation and sequencing of a cDNA clone homologous to the v-sis oncogene from human endothelial cells. Mol Cell Biol 1986; 6:3018–3022.

Whitman SP, Strout MP, Marcucci G, et al: The partial nontandem duplication of the MLL (ALL1) gene is a novel rearrangement that generates three distinct fusion transcripts in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 2001; 61:59–63.

Yonezumi M, Suzuki R, Suzuki H, et al: Detection of API2-MALT1 chimaeric gene in extranodal and nodal marginal zone B-cell lymphoma by reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) and genomic long and accurate PCR analyses. Br J Haematol 2001; 115:588–594.

Índice remissivo

A
α_1-antitripsina, 275-276
  síntese, 312-313
Abelhas, 1320
Abetalipoproteinemia, 252
Abscesso(s), 1366
  de Pautrier, 683
  paraespinal, 500
Acanthamoeba spp., 1292-1293
Acantócitos, 552
Ácaros, 1322
Acesso venoso central, 31-32
Acetaminofeno, 371-372
Acetilcolinesterase, 287, 300-301
  bioquímica e fisiologia, 300-301
  intervalos de referência, 301
  quantificação, 301
  resultados anormais, 301
  variação pré-analítica, 301
Acidemia
  glutárica, 462
  isovalérica, 462
Ácido(s), 64
  acetilsalicílico, 370-371
  e bases corrosivas, 167
  formiminoglutâmico (FIGLU), 596
  5-hidroxi-indolacético, 478
  lipoico, 288
  nicotínico *ver* Niacina
  pantotênico, 445, 449
    avaliação laboratorial, 446
    fontes alimentares, 446
    RDA, 446
  tuberculoesteárico
    líquido peritoneal, 526
    líquido pleural, 521
  úrico, 516-517
    cristalino, 486
    critérios para aceitação, 122-123
    variabilidade biológica, 80
  valproico, 368
  orgânicos, 516
Ácido fólico, 445, 449
  avaliação laboratorial, 446
  deficiência, 91, 596-597
    absorção defeituosa, 596
    aumento da demanda, 597
    diagnóstico, 597
    ingestão inadequada, 596
    utilização inadequada, 597
  fontes alimentares, 446
  metabolismo, 596
  RDA, 446
  variabilidade biológica, 80
Ácidos nucleicos
  análises, 1400-1405
    ensaios baseados em polimorfismo, 1405
    separação eletroforética, 1400-1401
  bioquímica e biologia, 1394-1400
    composição e estrutura molecular, 1394-1396
    controle transcricional, 1398
    enzimas associadas a ácidos nucleicos, 1396
    mecanismos de reparo de DNA, 1398-1399
    modificação pós-transcricional, 1397
    mutações no DNA, 1399-1400
    replicação do DNA, 1396-1397
    tradução do RNA em proteína, 1397-1398
    transcrição do DNA em RNA, 1397
  sequenciamento, 1011
Acidose
  extrarrenal, 189
  lática, 190, 227-230, 471
  metabólica, 189-192
    causas da, 189
    compensação da, 192
    diagnóstico diferencial, 191-192
    hiato aniônico sérico, 191
    orgânica, 190-191
    renal, 190
  orgânica, 190-191
  renal, 190
  respiratória, 192-193
Acordos contratuais, 145
Acreditação, 7-9
  laboratorial, 1468
Acrodermatite enteropática, 454
Acromegalia, 387
ACTH, 410-412
  quantificação, 412
Actinetobacter spp., 1177
Actinobacillus spp., 1182-1183
Acurácia, 79, 84, 114
  diagnóstica, 81-87
    curvas ROC, 84-85
    e necessidade clínica, 86-87
    eficiência do teste, 85
    probabilidade da doença, 83-84
    razão de probabilidade, 85-86
    sensibilidade e especificidade, 81-83
Adeno-hipófise, 383
Adenosina deaminase
  LCE, 509
  líquido pericárdico, 523
  líquido peritoneal, 526
  líquido pleural, 520
Aderência, 77-78
Administração
  características, 4
  de *marketing*, 4
  do laboratório, 3-6
  financeira, 4, 142-154
    aquisição de capital, 153-154
    avaliação de projetos orçamentários, 151-153
    definição e identificação de custos, 143-144
    desempenho e monitoramento financeiro, 149-151
    pagadores e reembolso, 145-147
    receita, 144-145
    sistemas de codificação de reembolso, 147-149
    valor financeiro/conclusões, 154
    visão geral da indústria, 142-143
  operacional, 4
  qualidade total, 4
  recursos humanos, 6
  responsabilidades, 4
  sistemas de qualidade, 5-6
Aerococcus spp., 1164-1165
Aeromonas spp., 1179
Afibrinogenemia, 855
Agamaglobulinemia
  de Bruton, 282
  ligada ao X, 641
Agências governamentais, 131
Agentes
  de categoria A, 157
  de categoria B, 157
  de categoria C, 157
  descontaminantes, 11
  nervosos, 167
  psicotomiméticos, 167
  quimioterápicos, 375-376
  sanguíneos, 167
  vesicantes, 167
Agentes antimicrobianos, testes *in vitro*, 1193-1205
  definições, 1193-1194
  indicações para, 1198-1199
  métodos inibitórios
    considerações técnicas, 1195-1197
    difusão em disco, 1195
    E-teste, 1194-1195
    teste de diluição, 1194
    testes diretos para β-lactamase, 1195
  relatórios de suscetibilidade antimicrobiana cumulativos, 1202
  seleção dos agentes, 1199-1202
  seleção para o relatório, 1202
  sistemas instrumentais automatizados comerciais, 1197-1198
  testes bactericidas, 1202-1204
    concentração bactericida ou letal mínima, 1203
    estudos sobre taxa de destruição, 1203-1204
    teste bactericida sorológico, 1204
Agentes biológicos/doenças, 157-165
  antraz, 157-159
  brucelose, 160-161
  encefalite equina venezuelana, 163-164
  febre da Crimeia-Congo e febres hemorrágicas, 164-165
  peste, 159-160
  toxina botulínica, 162
  tularemia, 161-162
  varíola, 162-163
Agitação, 63, 69
Agitadores
  de tubo único, 63
  de tubos múltiplos, 63
Aglutinação
  de partículas de gelatina, 917
  do látex, 917
Aglutininas frias, 980-981
Agranulocitose genética infantil, 641
Água, 59
  corporal total, 172
  monitoramento da pureza, 59
  perda insensível a partir da pele, 176
  perda pelo trato gastrintestinal, 176
  purificação, 59
  respiratória, 176
  retenção, 187
  tipos de pureza da água, 59
Alanina aminotransferase, 27
  critérios para aceitação, 122-123
  diferenças entre os sexos, 298
  ensaios para, 315
  mecanismos de liberação, 314-315
  meia-vida, 315
  pancreatite aguda, 329-330
  variabilidade biológica, 80
Albumina, 274-275, 333
  critérios para aceitação, 122-123
  LCE, 506

modificada por isquemia, 259
síntese, 312
variabilidade biológica, 80
Alça de Henle, 185
Álcalis, 64
Alcalose metabólica, 192
causas e patogênese, 192
compensação, 192
respiratória, 193
Alcaptonúria, 496
Álcool isopropílico, 378
Aldosterona 174-176, 417-418, 428
concentração plasmática, 181-182
deficiência, 96
efeitos fisiológicos, 406
hiperaldosteronismo, 97
causas, 421
primário, 420
secundário, 183
quantificação, 421
Alelo, 1002
Alemtuzamab, 706, 712
Alfavírus, 1383-1384
Aloanticorpos para grupo sanguíneo, 719
Alterações microssatélite, 1559
Alumínio, 450
Ameba, 1294-1298
de vida livre oportunistas, 1292-1293
não patogênica, 1296-1297
núcleos da, 1297
Amenorreia, 434-435
American Association of Blood Banks (AABB), 10
American Society of Clinical Pathology (ASCP), 10
Amilase, 327, 330, 337
critérios para aceitação, 122-123
interpretação, 337
líquido peritoneal, 525
líquido pleural, 520
Amilopectinose, 228
Aminas, LCE, 509-510
Aminoácidos, LCE, 509-510
Aminoacidúrias, 495-497
Amiodarona, 365
Amitriptilina, 374
Amônia, 310-311
ensaios, 311
LCE, 509-510
Amostras
coleta, 26-27, 1350-1351, 1521-1522
doenças causadas por fungos, 1242
erros na, 25
infecções herpéticas mucocutâneas, 1117-1119
infecções virais, 1117
líquido cerebrospinal, 33, 499-500, 1354
líquido pericárdico, 34, 523
líquido peritoneal, 34, 524
líquido pleural, 34, 517
líquido sinovial, 33-34, 513
momento da, 26
solicitação do exame, 26
urina, 32-33
variáveis associadas à coleta, 26-27
vírus do trato respiratório, 1120-1121
cultura, 1230-1232
da nasofaringe, 1357
de broncoscopia, 1359-1360
de escarro, 1278, 1358-1359
de tecido, 1356
diretrizes para retenção, 10
inaceitável, 1350-1351
momento da coleta, 1351
número de, 1351-1352
processamento, 34-35, 1157-1158
coloração de Gram, 1157-1158
seleção do meio, 1159
técnicas de cultura, 1157-1158
rejeição, 27
transporte, 34, 1350
urogenitais, 1278
volume, 1350-1351
Amperometria, 51
Amplificação
baseada em transcrição, 1411-1412
de ácido nucleico, 1142-1143, 1333-1340, 1405, 1407-1418
detecção de fungos, 1337-1338
detecção de parasitas, 1338
detecção de patógenos bacterianos, 1336-1337
detecção de resistência antimicrobiana, 1338-1340
diagnóstico de infecção viral, 1334-1336
identificação de culturas, 1338
transcrição, 1411-1412
de alvo, 1407-1413
baseada em transcrição, 1411-1412
por deslocamento de fita, 1412-1413
reação em cadeia da polimerase, 1407-1411
de sinal, 1415-1416
DNA ramificado, 1416
ensaios de captura híbrida, 1416
de sonda, 1413-1415
reação de amplificação da ligase, 1414
tecnologia *cleavase/invader,* 1414-1415
por deslocamento de fita, 1412-1413
Amplitude da distribuição das células sanguíneas, 90-91
Anaerobiospirillum succiniciproducens, 1218
Anafilatoxinas, 975
Anafilaxia
e hemaférese, 821
reações transfusionais, 785-787
Analgésicos, 370-372
Análise(s)
custos dos testes, 144-145
de covariância (ANCOVA), 1113
de fagócitos 1041-1042
de heteroduplex, 1011
de sêmen, 431
análise de imagens, 433
avaliação microscópica, 432
coleta da amostra, 431-432
exame macroscópico, 432
glândulas acessórias, 433
testes imunológicos, 432-433
de variância, 150
de variância (ANOVA), 113
em tubo, 16
SWOT, 4
Análise de identidade, 1520-1530
amostras e coleta, 1521-1522
análise e uso dos dados do teste
exclusão de paternidade, 1525-1526
laboratório de criminalística, 1525
laboratório de patologia, 1525
poder de exclusão, 1526
probabilidade de exclusão cumulativa, 1526
extração do DNA, 1522
garantia da qualidade, 1528-1529
história, 1520-1521
inclusão de paternidade, 1526-1528
ausência de genitor, 1528
cálculo do índice de paternidade, 1527
probabilidade de paternidade, 1528
reconstrução de famílias, 1528
métodos de teste e sistemas de marcação
marcadores de cromossomos X e Y, 1523-1524
repetições curtas em tandem, 1523
sequenciamento de DNA mitocondrial, 1524-1525
seleção dos marcadores genéticos, 1521
vantagens do DNA, 1521
Anaplasma spp. *ver* Infecções por riquétsias
Anaplasmose granulocitotrópica humana, 1145, 1148
ANCA, 317, 1067-1069
Ancilostomídeos, 1305-1306
Ancylostoma braziliense, 646
Andrógenos, 427-429
efeitos fisiológicos, 406
Androstenediol, 428
Androstenediona, 427-428
Anéis
de Cabot, 553
de Kayser-Fleischer, 278, 453
Anemia(s), 90-93, 589-607
aplasia eritrocitária pura, 601-602
aplásica, 92-94, 97, 599-601
características clínicas, 599
doença imunológica, 601
etiologia, 599
gravidez, 601
hemoglobinúria paroxística noturna, 601
hereditária, 601
hipersensível, 600-601
idiopática, 600
infecção, 601
patogênese, 599-600
prognóstico, 600
radiação ionizante, 600
supervisão, 600
timoma, 601
tóxica, 600
da insuficiência renal, 598
de Cooley, 618-619
de Diamond-Blackfan, 602
de doença crônica, 90-91, 598
de Fanconi, 467, 601, 640-641, 1453, 1512
diagnóstico laboratorial, 630-632
anemia macrocítica, 630-631
anemia microcítica e hipocrômica, 631
anemia normocítica e normocrômica, 631-632
diseritropoética congênita, 603
falciforme, 614-617, 782
diagnóstico molecular, 1506
eritroférese, 807-808
hemolítica, 603-605
macroangiopática, 626
hemolíticas imunes, 627-628
anemia hemolítica autoimune, 627-628
doença por aglutinina fria, 629
hemoglobinúria paroxística fria, 628-630
hipoplástica congênita, 602
macrocítica, 93
megaloblástica, 592-594
aguda, 597
terapia, 597
microangiopática, 92
microcítica, 90-91
mielotísica, 599
na endocrinopatia, 599
na hepatopatia, 598-599
normocítica, 91-93
hipoproliferativa, 92-93
perniciosa, 594-596, 1091
absorção defeituosa de cobalamina, 595
achados gástricos, 594
anomalias imunológicas, 594
anormalidades imunológicas, 594
características clínicas, 594
causa da deficiência de cobalamina, 595-596
defeito na absorção de cobalamina, 595
diagnóstico da deficiência de cobalamina, 595
em crianças, 595
gastrectomia, 595
por deficiência de ferro (ferropriva), 90-91, 282, 589-592
características clínicas, 591
características laboratoriais, 591-592
diagnóstico diferencial, 592
supervisão, 592
por perda de sangue, 603
pós-hemorrágica, 603
refratária, 603, 660, 1446
com excesso de blastos, 660-661, 1446
com sideroblastos em anel, 660, 1446
sideroblástica, 602-603
valores de referência, 590
Anemia hemolítica autoimune, 627-628
investigação da, 768-769
anemia hemolítica autoimune fria, 769
testes diretos positivos da antiglobulina e anemia hemolítica medicamentosa, 770
quente, 768
Aneuploidias de cromossomos sexuais, 1448-1450
Anfetamina, 359
estrutura, 357
Angiite primária do sistema nervoso central, 1075
Angina pectoris, 255
Angiomatose bacilar, 1145, 1150
Angiostrongylus cantonensis, 1315
Angiostrongylus costaricensis, 1315
Ângulo crítico, 48
Anidrase carbônica III, 258
Anisakis spp., 1316
Anisocitose, 551
Anomalia
de Alder-Reilly, 643

de May-Hegglin, 642
de Pelger-Hüet, 643
Anormalidades
da glicoproteína Ia, 873
da glicoproteína Iia, 873
da glicoproteína VI, 873
leucocitárias, 93-94
contagem leucocitária baixa, 94
infecção, 93-94
leucemia linfocítica crônica, 94
leucemia mielógena crônica, 94
leucocitose, 94
reação leucemoide, 94
na gasometria do sangue, 98-100
hiato aniônico, 98-99
oxigenação, 99-100
Anormalidades cromossômicas, 1438-1444
estrutural, 1439-1444, 1450
nomenclatura, 1444
numérica, 1438-1444
aneuploidia, 1438-1439
euploidia, 1438
sexuais, 1450
Anormalidades eletrolíticas, 95-98
hemaférese, 819-821
hipercalemia, 97
causas e patogênese, 183-184
diagnóstico diferencial, 184
hipernatremia, 96-97
causas e patogênese, 187-188
hipocalemia, 97
causas e patogênese, 182-183
diagnóstico diferencial, 183
hiponatremia, 95-96
causas e patogênese, 186-187
classificação, 187
pseudo-hiponatremia, 96
Antagonistas de vitamina K, 895-897
Antiasmáticos, monitoramento de fármacos terapêuticos, 368-370
Anticoagulantes
lúpico, 890
monitoramento por teste rápido, 900
ver também Terapia antitrombótica
Anticonvulsivos, monitoramento de fármacos terapêuticos, 365-368
Anticorpo
antigliadina, 333, 335
anti-HLA específico, 1015
antimitocôndria, 316-317
antineutrofílico citoplasmático, 317, 1067
endomísio, 333
Anticorpos, 912
ABO, 724
anti-histona, 1050-1051
anti-K_i, 1049
anti-K_u, 1049
anti-p53, 1556
anti-RA33, 1054
anticromatina, 1050-1051
antipeptídeos citrulinados, 1053-1054
antiplaqueta, 880
antiproteína c-myc, 1556-1557
antiproteína ribossômica P, 1050
antiproteína Sm, 1049
antiqueratina, 1053
antirregião organizadora nucleolar, 1052
antirribonucleoproteína nuclear, 1049
antivaricela, variabilidade biológica, 80
bases genéticas da diversidade, 958-960
contra-antígenos centroméricos, 1052
contra RNA polimerases, 1052
DNA, 1048-1049
eritrócito, 721-751
Colton, 746
Cromer, 748
Diego, 743
Dombrock, 744-745
Duffy, 740
Gerbich, 747-748
grupo sanguíneo P, 729
JMH, 750
Kell, 737
Kidd, 741
Lewis, 739
Lutheran, 734-735
MNSs, 727
Rh, 733-734
Scianna, 744
IgE, 1101-1107
IgG de Donath-Landsteiner, 981
ligação de fármacos a, 350
monoclonal, 912
no escleroderma, 1051-1052
para grupo sanguíneo, 718-719
imunoglobulinas e ligação ao antígeno, 718
para Scl-70, 1052
policlonal, 912
propriedades estruturais, 956-958
proteína Sm, 1049
proteínas ribossômicas, P 1050
SS-A/Ro, 1049
SS-B/La, 1049
Antidepressivos tricíclicos, 373-375
Antígeno(s), 911-912
carcinoembrionário, 1541
LCE, 510
de grupo sanguíneo, 717-718
de histocompatibilidade, 909-910
de tumor da bexiga, 1557
características químicas, 718
densidade antigênica, 718
imunogenicidade, 718
eritrocitários e anticorpos, 721-751
sistema de grupo sanguíneo ABO, 721-724
sistema de grupo sanguíneo Cartwright, 743-744
sistema de grupo sanguíneo Chido/Rodgers, 746-747
sistema de grupo sanguíneo Colton, 745-746
sistema de grupo sanguíneo Cromer, 748-749
sistema de grupo sanguíneo Diego, 741-743
sistema de grupo sanguíneo Dombrock, 744-745
sistema de grupo sanguíneo Duffy, 739-741
sistema de grupo sanguíneo Gerbich, 747-748
sistema de grupo sanguíneo GIL, 751
sistema de grupo sanguíneo I, 750-751
sistema de grupo sanguíneo Indian, 749-750
sistema de grupo sanguíneo JMH, 750
sistema de grupo sanguíneo Kell e Kx, 735-738
sistema de grupo sanguíneo Kidd, 741
sistema de grupo sanguíneo Knops, 749
sistema de grupo sanguíneo Lewis, 738-739
sistema de grupo sanguíneo Lutheran, 734-735
sistema de grupo sanguíneo LW, 746
sistema de grupo sanguíneo MNSs, 724-727
sistema de grupo sanguíneo OK, 750
sistema de grupo sanguíneo P, 727-729
sistema de grupo sanguíneo RAPH, 750
sistema de grupo sanguíneo Rh, 729-734
sistema de grupo sanguíneo Scianna, 744
sistema de grupo sanguíneo Xg, 744
eritrócito, 721-751
leucocitário humano *ver* HLA
prostático específico, 1543-1544
Antimônio, 450
Antitrombina, 847-848, 888
Antraz, 157-159, 1371
características clínicas, 158-159
cutâneo, 158, 1373, 1375
gastrintestinal, 159, 1373, 1375
história e fundamento, 157-158
inalatória, 158, 1373, 1375
ver também Bacillus anthracis
Aplasia eritrocitária pura, 601-602
adquirida, 602
congênita, 602
eritroblastopenia transitória da infância, 602
retardo transitório da eritropoese, 601-602
Apo B *ver* Apolipoproteína B
Apolipoproteína(s), 236-237, 246
A, variabilidade biológica, 80
A-I
deficiência, 252-253
variantes, 253
análise, 246
B
defeito familial, 249-251
variabilidade biológica, 80
variação fisiológica, 239-240
Apoptose, 638
Aprimoramento da qualidade contínuo, 4-5
Aquaporinas, 184-185, 388
Aquisição de capital, 153-154
Aquisições estratégicas, 22
Aracnídeos, 1321-1322
ácaros, 1322
aranhas, 1321-1322
carrapatos, 1322
escorpiões, 1321
Aranhas, 1321-1322
Arcanobacterium spp., 1165-1166
Área de superfície corporal, 1587-1588
Argatroban, 900
Arginina vasopressina *ver* Hormônio antidiurético
Armas
nucleares, 142-143
químicas, 167
Arranjos de genes, 1559
Arranjos de proteínas, 1573
Arranjos de sequenciamento, 1422-1423
Arrendamento operacional, 153
Arsênico, 167, 378, 450
Arterite
da célula gigante (temporal), 1065, 1074
de Takayasu, 1065, 1074-1075
reumatoide, 1029, 1053-1054
anti-RA33, 1054
anticorpo antiqueratina, 1053
antipeptídeos citrulinados, 1053-1054
fator antiperinuclear, 1053
fator reumatoide, 1053
Artrocentese, 513
Artrópodes, 1317-1323
aracnídeos, 1321-1322
características biológicas, 1318
identificação laboratorial, 1319
insetos, 1319-1321
mecanismos de lesão, 1318-1319
envenenamento, 1318
invasão tecidual direta, 1318
manifestações psicológicas, 1318-1319
perda sanguínea, 1318
reações de hipersensibilidade, 1318
transmissão de agentes infecciosos, 1318
vesicação, 1318
milípedes, 1322-1323
ASCA, 327
Ascaris lumbricoides, 646, 1304-1305
Ascorbato *ver* Vitamina C
Asfixia fetal, 442
Aspartato aminotransferase, 27
critérios para aceitação, 122-123
diferenças entre os sexos, 298
ensaios para, 315
mecanismo de liberação, 314-315
meia-vida, 314-315
pancreatite aguda, 329-330
variabilidade biológica, 80
Aspergillus spp., 1262-1264
Aspirados, 1278, 1358-1359
traqueais, 1278, 1358-1359
Aspirina, 370-371, 901-902
Ataxia
de Friedreich, diagnóstico molecular, 1509
espinocerebelar, diagnóstico molecular,1509
telangiectasia, 1453, 1512
Aterosclerose, 233, 256
em crianças, 247-248
fatores de risco, 247
Atividade de renina plasmática, 181-182
Atividade enzimática, 294-295
concentração de sal e proteína, 296
determinação da atividade, 295-296
técnicas à base de anticorpos, 296-297
fatores que afetam a, 295-297
inibidores e interferências, 296
pH, 296
temperatura, 296
Atorvastatina, 248
ATP-binding cassete protein A-I, 238
Atrofia
dentatorubral-palidoluisiana, diagnóstico molecular, 1509
muscular espinal, diagnóstico molecular, 1516
muscular espinobulbar, diagnóstico molecular, 1509

Auditoria, 15, 17
  instrumentos, 15-17
Autoanticorpos, 719, 1016
  anticélula de ilhota, 1091
  antidescarboxilase do ácido glutâmico, 1091
  antifibrilarina antigênica nucleolar, 1052
  antigangliosídeo neuronal, 1093
  anti-insulina, 1091
  antimiocárdico, 1093
  antimitocondrial, 1084
  antimúsculo esquelético, 1094
  antimúsculo liso, 1085
  antinuclear, 1084
  antiproteína neuronal, 1093
  antirreceptor do hormônio estimulador da tireoide, 1089
  antirrecombinante, 912
  antitireoide, 398, 1087-1089
  antitireoperoxidase, 1088
  doença reumática sistêmica, 1065
  farmacodependente, 771
  lúpus eritematoso sistêmico, 1048
  microssomal hepático-renal, 1085
  para grupo sanguíneo, 719
Autoantígenos, no escleroderma, 1052
Autoesplenectomia, 614
Automação, 65-73
  análise automatizada, 66
  configuração(ões) de sistemas totalmente integrados de módulos automatizados, 71-73
    células de trabalho, 71-72
    conectores de instrumento, 73
    consolidação da estação de trabalho, 71
    middleware, 73
    sistemas totalmente integrados, 72-73
  estágio analítico, 67-70
    agitação, 69
    detecção, 70
    incubação, 69-70
    introdução da amostra, 67-69
    reagentes, 69
  estágio pós-analítico, 70-71
  estágio pré-analítico, 66-67
    processamento da amostra, 67
  fatores direcionadores, 66
  laboratorial total, 71
  perspectivas futuras, 63
  sistemas automatizados, 71
Avaliação de tendência, 111-113
Avaliação por grupo de pares, 127
Azatioprina, 1013
Azoospermia, 433
Azul brilhante de Coomassie, 507

B

Babesiose, 627, 790, 1289, 1323-1324
Bacillus anthracis, 1332, 1373-1374
  fluxograma do laboratório sentinela, 1377
  identificação provável, 1376
  manifestações clínicas, 1373
  seleção e teste da amostra, 1374
  ver também Antraz
Bacillus spp., 1167-1168
Bactéria anaeróbica, 1188-1190
  definições e características, 1188
  diagnóstico laboratorial, 1189-1190
  patogênese e fatores de virulência, 1188-1189
  suscetibilidade antimicrobiana, 1190
Bactérias Gram-negativas, 1173-1176
  bacilos, 1173-1176
    Enterobacteriaceas, 1173-1175
    Plesiomonas, 1175-1176
  bacilos não fermentadores, 1176-1182
    Acinetobacter, 1177
    Aeromonas, 1179
    Burkholderia spp., 1177
    Campylobacter, 1179-1180
    Haemophilus, 1180-1181
    Helicobacter, 1180
    Pseudomonas, 1176-1177
    Stenotrophomonas maltophilia, 1178
    Vibrio, 1178-1179
  bactérias HACEK, 1182-1183
  Actinobacillus, 1182-1183
  Cardiobacterium hominis, 1183
  Eikenella, 1183
  Haemophilus spp., 1182
  Kingella spp., 1183
  Bordetella, 1184-1185
  Brucella, 1185
  Calymmatobacterium, 1187
  Capnocytophaga, 1187
  cocos, 1170-1173
    Moraxella catarrhalis, 1172-1173
    Neisseria, 1170-1172
  Francisella, 1186
  Gardnerella, 1186-1187
  Legionella, 1183-1184
  Pasteurella, 1185-1186
  Streptobacillus, 1187-1188
Bacteriologia médica, 1157-1192
  bactérias anaeróbicas, 1188-1190
  bastonetes Gram-positivos, 1165-1170
    Bacillus, 1167-1168
    Corynebacterium e *Arcanobacterium*, 1165-1166
    Erysipelothrix, 1167
    Listeria, 1166-1167
    Nocardia, 1168-1169
  cocos Gram-positivos, 1158-1165
    estafilococos, 1158-1161
    estreptococos e enterococos, 1161-1164
    Gemella e *Aerococcus* spp., 1164-1165
  processamento da amostra, 1157-1158
    coloração de Gram, 1157-1158
    técnicas de cultura, 1158
Balamuthia mandrillaris, 1293
Balança(s), 59-60
  calibração, 60
  com prato superior, 59-60
  de restauração de força magnética, 59
  (de substituição) de braços desiguais, 59
  eletrônicas, 60
Balancete, 150
Balantidium coli,1294, 1299
Banco de sangue, 137, 719-721
Banco de tecidos, 829-839
  atividades relacionadas ao, 830-831
    criopreservação, 831
    triagem de doador, 830-831
  células progenitoras hematopoéticas, 833-888
  de córnea, 832
  fontes de tecido, 829-830
  pele, 831
  tecidos musculoesqueléticos, 831-832
  válvulas cardíacas, 832
Bandas oligoclonais, 282
Banhos de água, 62-63
Baratas, 1318-1320
Barbeiros, 1320
Barbitúricos, 360
  estrutura, 356
Barreira hematoencefálica, 499
Bartonella spp., *ver* Infecções por riquétsias
Basofilia, 646
Basófilos, 556, 580-581, 909
  distribuição e cinética, 580
  função, 580-581
  medula óssea, 562
  morfologia, 580
Beckman Coulter SYNCHRON LX i725 Clinical System, 70
Benchmarking, 151
Benzodiazepínicos, 359-360
Benzoilecgonina, 357-358
Beribéri, 447
Besouros, 1320
Bicarbonato
  sistema tampão, 188
  variabilidade biológica, 80
Bilirrubina, 307-311
  conjugada, níveis séricos elevados
    obstrução biliar, 310
    síndrome de Dubin-Johnson, 309-310
  cristais, 487
  critérios para aceitação, 122-123
  LCE, 508-509
  líquido peritoneal, 525
  metabolismo normal, 307-309
  não conjugada, níveis séricos elevados
    hemólise, 309
    síndrome de Crigler-Najjar, 309
    síndrome de Gilbert, 309
  testes laboratoriais, 310
  variabilidade biológica, 80
Bilirrubinúria, 474-475
Biocompatibilidade, 981
Biodefesa, 1369
Bioinformática, 1424-1425
Biologia celular, 1549-1550
Biópsias, 1278
  de cólon, 333
  intestinal, 333
Bioterrorismo, 155-166, 1368-1388
  agentes biológicos/doenças, 157-165
    antraz, 157-159
    brucelose, 160-161
    da categoria A, 1371
    da categoria B, 1372
    encefalite equina venezuelana, 163-164
    febre da Crimeia-Congo e febres hemorrágicas, 164-165
    peste, 159-160
    toxina botulínica, 162
    tularemia, 161-162
    varíola, 162-163
  agentes infecciosos, 1368-1370
  armas biológicas, 1370-1372
  exemplos de, 1369
  Laboratory Response Network, 1372-1387
    Burkholderia mallei e *Burkhlderia pseudomallei*, 1376-1378
    classificação, 1372-1373
    Coxiella burnetti, 1378-1380
    diretrizes para a expedição e manuseio de materiais infecciosos, 1373
    Francisella tularensis, 1380-1382
    responsabilidade do laboratório clínico, 1373
    vírus desconhecidos, 1382-1384
    Yersinia pestis, 1384-1387
  papel do laboratório de nível A, 156
    designações laboratoriais, 153
    questões legais, 156-157
    questões envolvendo segurança, 156
  potenciais agentes, 1370
  riquétsias como agentes, 1146-1147
  tipos de ataque, 1370
Biotina, 288, 445-447, 449
  avaliação laboratorial, 446
  fontes alimentares, 446
  RDA, 446
Bismuto, 450
Blastocystis hominis, 1298
Blastomyces dermatitidis, 1331
Blastomyces spp., 1254-1255
Blastoschizomyces capitatus, 1252
Blocos de aquecimento, 63
Bolhas, 1365
Borboletas, 1320
Bordetella coqueluche, 1332
Bordetella spp., 1184-1185
Boro, 450
Borrelia spp., 1212-1218
  doença de Lyme, 1212-1217
  febre recidivante, 1217-1218
Botulismo, 1371
Bromo, 450
Brucella spp., 1185, 1374-1376
  fluxograma do laboratório sentinela, 1377
  manifestações clínicas, 1374
  seleção e teste da amostra, 1374-1376
Brucelose, 157-158, 160-161
Brugia malayi, 1313
BUN, 97
  critérios para aceitação, 122-123
Bunyaviridae, 1383
Burkholderia
  mallei, 1376-1378
    manifestações clínicas, 1376-1377
    seleção e teste da amostra, 1377-1378
  pseudomallei, 1376-1378
    manifestações clínicas, 1376-1377
    seleção e teste da amostra, 1377-1378

Burkholderia spp., 1177
Busulfan, 376

C
CA 125, 1542
CA 15-3, 1541
CA 19-5, 1541-1542
CA 19-9, 1541-1542
CA 27-29, 1541
CA 50, 1541-1542
CA 72-4, 1542
Cádmio, 450
Cálcio, 27, 97-98, 197-199
  critérios para aceitação, 122-123
  fisiologia, 197-199
  hipercalcemia, 98, 204-206
    associada à malignidade, 206
    causas, 205
  hipocalcemia, 98, 207
  homeostasia, 198-199
  ingestão dietética, 198
  intervalo de referência, 199
  ionizado, 199
    sérico, 333
  técnicas analíticas, 199
  total, 199
  variabilidade biológica, 80
Calcitonina, 203, 401, 1542
  sérica, 333
Cálculos urinários, 492-494
  cálculos de cistina, 494
  hipercalcinúria e cálculos de cálcio, 493
  hiperoxalúria, 494
  hiperuricúria, 494
  testes laboratoriais, 495
    análise do cálculo, 495
    bioquímica do soro, 495
    exame radiológico, 495
    exames de urina, 495
Calibração, 115, 123-125
  balanças, 59-60
  pipetas, 61
Calymmatobacterium spp., 1187
Campylobacter spp., 1179-1180, 1331
Canais de Havers, 205
Câncer, 941
  citometria de fluxo e de imagem, 946-949
  colorretal hereditário não ligado à polipose, 1513
  da bexiga, deterioração do, 1557
    de cólon, detecção do, 1556
  de mama
  de mama-ovário hereditário, 1513
    de pulmão, detecção do, 1556
    decisão de realizar o teste, 939
    desnutrição e resposta imune, 940-941
    imunodeficiência primária *versus* secundária, 940
    significado dos resultados dos testes, 939-940
  de ovário, 1576
de ovário, 1576
detecção do, 1556
familiar, 1511-1515
função do granulócito, 946
gatting e análise, 949-952
  análise do DNA, 950
  imunofenotipagem, 949-950
  medidas da intensidade da fluorescência, 951-952
genes quiméricos, 1607-1610
genética, 1445-1448
imunidade celular, 939-941
marcadores moleculares, 1573-1576
  genômica, 1576-1578
  prognósticos, 1576-1578
  proteômica, 1575-1576
marcadores tumorais séricos, 1533-1548
  aplicações clínicas, 1536-1537
  classificação funcional, 1534-1536
  marcadores individuais, 1538-1545
  perspectivas futuras, 1546
  recomendações para solicitação dos testes, 1537-1538
  teste de sangue oculto nas fezes, 1545-1546
método da proliferação de linfócitos, 944-946
  imunologia celular, 944-945
  metodologia, 945-946
metodologia do teste, 941-944
  controle e garantia da qualidade, 952
  estudos imunoanalíticos, 942-944
  fase de confirmação, 942
  fase de triagem, 941-942
oncoproteínas na detecção tumoral, 1549-1564
origens do, 1560
  genômica, 1576-1578
  pulmonar, 1578
Candida albicans, 1331
Candida spp., 1248-1250
  candidíase
    gastrintestinal, 1249
    invasiva, 1249
    oral, 1249
    vaginal, 1249
  diagnóstico laboratorial, 1249
  doença cutânea, 1249
  fatores de risco, 1248
  infecção do trato urinário, 1249
  patologia, 1249
Cannabis, 361
Capacidade de ligação ao ferro, 91
  sérico, 591
  variabilidade biológica, 80
Capillaria
  hepática, 1315-1316
  philippinensis, 1304
Capital orçamentário, 149-150
Capnocytophaga spp., 1187
Captação e descarboxilação de precursor de amina (APUD), 401
Carbamatos, 380
Carbamazepina, 367-368
Carboidratos, 215-232
  erros inatos do metabolismo, 227-330
    deficiência de galactoquinase, 227
    frutose, 227
    galactosemia, 227
  função pancreática, 216-218
    glucagon, 217-218
    incretinas, 218
    insulina, 216-217
    somatostatina, 218
  glicose *ver* Glicose
Carboxiemoglobina, 536-537
Carcinógenos ambientais, 376
Carcinoma gástrico difuso hereditário, 1512
Carcinoma hepatocelular, detecção do, 1554-1555
Carcinoma papilar renal hereditário, 1512
Cardiobacterium hominis, 1183
Cardiotrópicos, monitoramento de fármacos terapêuticos, 363-365
Cariorrexe, 571, 593
Cariótipo, 1433-1434
Caroteno
  sérico, 333
  variabilidade biológica, 80
Carrapatos, 1322
Carve outs (serviços não inclusos), 146
Cascata de coagulação, 843
Caspases, 638
Catecolaminas
  ver também Glândula suprarrenal
  vias biossintéticas, 402
CD59 (protectina), 976
Cegueira noturna, 449
Célula
  apresentadoras de antígeno, 908-909
  com inclusão viral, 490
  contraídas, 558
  crenadas, 552
  criopreservação, 838
  de Kupffer, 307
  de Reiter, 514
  de Sertoli, 429
  de trabalho, 71-72
  do lúpus eritematoso, líquido sinovial, 514
  em cesta, 557-558
  endoteliais, 558
  ensaios, 1041
enxertos hematopoéticos não mieloablativos, 836
ependimárias, LCE, 502
epiteliais, na urina, 482-483
fontes de, 834-836
  células progenitoras do sangue periférico, 835-836
  medula óssea, 834-835
  sangue do cordão umbilical, 836
fotovoltaica, 43
linfócitos
  B, 583-587, 908
  T, 585, 907-908
linfoides, 907-909
mesoteliais, líquido pleural, 519
mobilização de células progenitoras, 802-803
natural killer, 586, 909
neoplasias, 680-685
nulas *ver* Célula *natural killer*
progenitoras hematopoéticas, 567
  banco, 833-838
  coleta, 794, 801-804
    aspectos associados ao doador, 804
    benefícios da, 801
    dose de células progenitoras, 801-802
    procedimento de coleta, 803
  purga, 836-838
    depleção de células T, 837-838
  reinfusão, 838
  rompidas, 557
  sinoviais, 514
  tumorais, 490
Células-alvo, 552
Células-tronco *ver* Células progenitoras hematopoéticas
Centers for
  Disease Control, 11, 75
  Medicare e da Medicaid Services (CMS), 9
Centopeias, 1322-1323
Centros de custos, 145
Cenurose, 1317
Ceratite por *Acanthamoeba*, 1293
Certificado
  de acreditação, 75
  de aderência, 75
  de dispensa, 75
  de registro, 75
  para Procedimentos de Microscopia Realizados pelo Prestador (PPMP), 75-76
Ceruloplasmina, 278
  síntese, 313
Cestódeos, 1307-1309
  cenurose, 1317
  cisticercose, 1316
  Diphyllobothrium spp., 1309
  Dipylidium caninum, 1309
  esparganose, 1317
  hidatidose, 1317
  Hymenolepis
    diminuta, 1309
    nana, 1308-1309
  Taenia
    saginata, 1308
    solium, 1308
Cetoacidose, 189-191
Cetonúria, 471
  acidose lática, 471
  diabética, 471
  não diabética, 471
Checagem delta, 125
Chilomastix mesnili, 1294, 1299-1300
Chlamydia trachomatis, 1140-1141, 1331-1332
  diagnóstico laboratorial, 1142-1143
Chlamydophila
  pneumoniae, 1141
    diagnóstico laboratorial, 1143
  psittaci, 1141
    diagnóstico laboratorial, 1143
Chopper, 45
Chumbo, 379-380, 450
Cianeto, 376-377
Ciclosporíase, 1324
Ciclosporina, 373, 1013
Ciliados, 1299-1302
Cilindros

celular, 484-485
céreos, 484
epitelial tubular renal, 484-485
eritrócito, 484
leucócito, 484
misto, 485
classificação dos, 484
de bilirrubina, 486
de células epiteliais tubulares renais, 484-485
de cristal, 485
de eritrócito, 484
de gordura, 485
de leucócito, 484
de mioglobina, 486
granulares, 485
hialinos, 480, 484
inclusão, 485
pigmentado, 485-486
urinários, 483-486
Cininas, 984
Cintilação líquida, 57
Cirrose, 100, 282, 310-311, 321
biliar, 323
primária, 316-317, 323, 1086-1087
secundária, 323
de Laennec, 321
macronodular, 321
Cistatina C, 179
Cisticercose, 1316
Cistinúria, 496-497
Cistite, 492
Citaférese, 794-795
Citaférese de doação, 796-804
aférese de doação de componentes múltiplos, 801
coleta de células progenitoras hematopoéticas, 801-804
aspectos associados ao doador, 804
benefícios da, 801
dose de células progenitoras, 801-802
mobilização de células progenitoras, 802-803
procedimento de coleta, 803
eritroférese, 800-801
aspectos associados ao doador, 800-801
benefícios da, 800
indicações para, 807
requisitos para o produto, 800
seleção do doador, 800
leucaférese, 797-800
aspectos associados ao doador, 799-800
estimulação do doador, 798-799
indicações para, 807
procedimento de coleta, 799
requisitos para o produto, 798
seleção do doador, 798
transfusões de granulócito, 797-798
plaquetaférese, 796-797
aspectos associados ao doador, 797
benefícios da, 796
indicações para, 806-807
requisitos para o produto, 796
seleção do doador, 796-797
Citocinas, 909, 984-992, 1042
ver também citocinas e interleucinas individuais
Citocromo P450, 311-312
Citogenética, 1430-1454
anormalidades cromossômicas, 1438-1444
estrutural, 1439-1444
nomenclatura, 1444
numérica, 1438-1444
aplicações clínicas, 1444-1448
citogenética pré-natal, 1444-1445
na infância e no adulto, 1445
pós-natal, 1445
cromossomos, 1431-1438
cariótipo, 1433-1434
coloração, 1433
cultura de células, 1432-1433
estrutura, 1431-1432
hibridização *in situ* por fluorescência, 1435-1436
imagem assistida por computador, 1434-1435
definições, 1430-1431
distúrbios citogenéticos
anomalias em cromossomos estruturais, 1450
anomalias em cromossomos sexuais, 1448-1450
síndromes de aneuploidia cromossômica, 1448-1450
síndromes de genes contíguos e de microdeleções, 1450-1452
síndromes de quebra, 1452
genética do câncer, 1445-1448
pré-natal, 1444-1445
sensibilidade, 1472
Citomegalovírus, 650, 790, 1125-1126, 1330, 1332
Citometria de fluxo, 49-50, 349-350
ensaio de proliferação de linfócitos, 945-946
neoplasia hematopoética, 698-716
aquisição de dados, 702
equipamento, 698-699
expressão antigênica, 703
interpretação, 702-714
manuseio e preparo das amostras, 702
planejamento do painel, 700-702
reagentes, 699-700
quantitativa, 951-952
Citometria de fluxo e de imagem, 946-949
célula de fluxo, 947-948
fluorocromos, 948-949
fonte luminosa e processamento do sinal, 847
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens, 660
Citoquímica, 547
Citotoxicidade celular dependente de anticorpos, 961
Citotoxicidade dependente de complemento, 1015-1016
Citrato, efeito sobre testes sanguíneos, 29
CK *ver* Creatina quinase
Classificação
de despesas, 143
de Fredrickson, 249
FAB, 664
Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),10
Clinical Context Object Workgroup (CCOW), 140-141
padrão, 140-141
Clinical Laboratories Improvement Act, 8, 74-75
Clonorchis sinensis, 1311
Cloreto
critérios para aceitação, 122-123
no suor, 333, 341
variabilidade biológica, 80
Clorose, 653
Clostridium difficile, 333-334
Clusterina, 976
CMS National Coverage Determinations, 8
Coagulação intravascular disseminada, 857-858
Cobalamina
absorção defeituosa, 595
deficiência, 594
causas, 595-596
diagnóstico, 595
ensaio, 595
metabolismo, 593-594
ver também Vitamina B_{12}
Cobalto, 450
deficiência, 451
função, 451
propriedades, 452
toxicidade, 451
Cobre, 450-453
deficiência, 451
função, 451
propriedades, 452
toxicidade, 451
Cocaína, 355, 357-358
estrutura, 357
metabolismo, 358
Coccidioides immitis, 1331
Coccidioides spp., 1255-1256
Coccídios, 1299-1302
Cryptosporidium spp., 1300-1301
Cyclospora cayetanensis, 1301-1302
Isospora belli, 1294, 1300
Sarcocystis spp., 1300
Cocos, 1170-1173
Moraxella catarrhalis, 1172-1173
Neisseria, 1170-1172
Cocos Gram-positivos, 1158-1165
estafilococos, 1158-1161
estreptococos e enterococos, 1161-1164
Gemella e *Aerococcus* spp., 1164-1165
Codeína, 358-359
estrutura, 356
Codominância, 1002
Coeficiente de variação, 80-107
Coenzima(s)
A, 288
Q, 288
da flavina, 288
de cobalamina (B_{12}), 288
de nicotinamida, 288
do ácido fólico, 288
Cofator da heparina II, 890
Cofatores, 287-288
COLA, 10
Colangite/colangiopatia autoimune, 1087
Colangite esclerosante primária, 271, 952-953
Colecalciferol *ver* Vitamina D
Colesevelam, 248
Colestase, 311
Colesterol, 311, 428
alto, 248-251
com triglicérides elevados, 251-252
cristais, 487, 516
critérios para aceitação, 122-123
líquido
peritoneal, 526
pleural, 521
metas, 246-247
quantificação, 241
diretrizes do NCEP para erros aceitáveis, 246-248
variabilidade biológica, 80
Colesterol HDL
classificação ATPIII, 247
determinação do, 243-244
diretrizes NCEP para erro de quantificação, 246
variabilidade biológica, 80
Colesterol LDL, 234
classificação ATPIII, 247
em crianças, 248
metas, 247
nível elevado, com nível de colesterol elevado, 248-251
quantificação, 243-245
diretrizes do NCEP para erros aceitáveis, 246-248
Colesterol total
baixa concentração isolada, 252
classificação ATPIII, 247
em crianças, 248
Colestipol, 248
Colestiramina, 248
Coleta à recepção, 21
Coleta da amostra, 15, 134-135
Coleta de dados, 14-18
análise em estação de trabalho, 16-17
análise em tubo, 16
entrevistas, 17-18
mapeamento da amostra e do exame, 14-15
mapeamento de tarefa, 18
Coleta de sangue, 26-30, 776-777
anticoagulantes e aditivos, 28-29
armazenamento e preservação, 29-30
cor dos tubos, 27
dispositivos de coleta, 29
políticas e procedimentos, 30
técnicas, 30-32
acesso venoso central, 31-32
punção arterial, 30-31
punção cutânea, 31
ver também Transfusões sanguíneas
Colinesterase, 300-301
Colite ulcerativa, 1092
College of American Pathologists (CAP), 10
Coloração de Gram, 1129, 1157-1158
Coloração de Wright, 549-550
Coloração por hematoxilina férrica, 1277
Coloração tricrômica de Wheatley, 1277
Colorações
acidorresistentes (*acid-fast*), 1277
modificadas, 1276
calcofluor White, 1244
de Gram, 1129, 1157-1158
de Romanowsky, 560, 653
de Wright, 549-550, 1242
Giemsa, 1242
hematoxilina férrica, 1277
histoquímicos, 1244
para microsporídios, 1277

permanente, 1277
sangue, 549-550
tricrômica de Wheatley, 1277
Compatibilidade ABO, 779-781
Compensação renal, 192-193
Complexo de ataque à membrana, 975
Complexo de protrombinase, 846
Complexo enzima-substrato, 286
modelo da "chave e fechadura", 286
modelo de ajuste induzido, 286
Complexo multiproteico do antígeno nuclear da célula proliferante, 1050
Complexo *Mycobacterium avium*, 1225-1226, 1331
prevenção, 1233-1234
Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, 1331
Complexo Principal de Histocompatibilidade *ver* MHC
Complexo tenase, 846
Componente secretor, 962
Componentes do sangue
componentes leucocitários, 778
concentrados de plaqueta, 778
especial, 778-779
fator anti-hemofílico crioprecipitado, 778
hemácias, 777
plasma, 777-778
redução de patógenos, 779
terapia com, 782-784
Componentes leucocitários, 778
Compra exagerada, 20
Concentração bactericida mínima, 1203
Concentração de proteína, e atividade enzimática, 296
Concentração de sal, e atividade enzimática, 296
Concentração letal mínima, 1203
Concentração média de hemoglobina celular, 539, 573
Concentrações de eletrólitos
líquido extracelular, 172-173
líquido intracelular, 172-173
Concentrados de plaquetas, 778
Condições associadas a retrovírus, 648
Condutância, 51
Condutividade por radiofrequência, 547
Conectores de instrumento, 73
Congestão passiva crônica, 321
Conjugação química, 913
Consolidação, 21-22
Constante de Michaelis, 289
Contabilidade financeira, 149-151
Contador de cintilação, 56-57
Contagem
de células sanguíneas, manual, 539-543
eritrócitos, 539-540
de colônias bacterianas, 333
de eritrócito, 739-740
de leucócitos, 540-541
diferencial
automatizada, 559
fontes de erro, 558-559
de plaquetas, 541-542
reticuladas, 542-543
de reticulócitos, 574
automatizada, 548
manual, 540
Contratos de capitação, 146
Contribuintes do governo, 146-147
Controle
da contaminação, 1457
da infecção, 137
glicêmico, 223-224
Controle de processo, 113-116
implantação do, 116-123
ação corretiva, 121
frequência do ensaio de CQ de materiais, 117
mudança de lote de calibrador de método, 123
mudança de lote de reagentes, 121-123
regras para a avaliação dos resultados de CQ, 119-121
seleção dos materiais de CQ, 116-117
valor-alvo de CQ, 118-119
Controle de qualidade, 115-129, 952
calibração, 123-125
controle do processo estatístico, 115-116
implantação do, 116-123
de equipamento, 1467
diagnóstico molecular, 1466-1468
teste de proficiência, 126-129
uso de dados do paciente,125-126
variabilidade analítica e calibração, 115
Controles
da prática de trabalho, 10
de engenharia, 10
Convenção sobre a proibição de armas biológicas e químicas, 166
Coproporfiria hereditária, 576-577
Coqueluche, 648
Coração, doença autoimune, 1093
Coronavírus da SARS, 1332
Corpo lúteo, 429-430
Corpúsculos
de Auer, 662
de Döhle, 641-642
de Heinz, 624
de Howel-Jolly, 553, 571
lipídicos, 514
riciformes, 514
Corticosteroides, cristalinos, 516
Corticotrofos, 383-384
tumores de, 385
Cortisol, 428
efeitos fisiológicos, 406
hipercortisolismo *ver* Síndrome de Cushing
salivar, 413
sérico, 413
urinário, 413-414
Corynebacterium spp., 1165-1166
Coulometria, 51
Coxilella burnetii, 1149-1150, 1378-1380
CQ *ver* Controle de qualidade
Creatinina, 97
critérios para aceitação, 122-123
líquido peritoneal, 526
proporção ureia/creatinina, 179
quantificação, 177-178
variabilidade biológica, 80
Creatina quinase, 80, 303-304
critérios para aceitação, 122-123
isoformas, 259
LCE, 509
Crianças
anemia perniciosa, 594-595
aterosclerose, 247
colesterol
LDL, 248-249
total, 248-249
leucemia linfoblástica aguda, 1477-1480
transfusão sanguínea, 784-785
Crioglobulinas, 965
teste para, 966-967
Crioglobulinemia, 817
Criptosporidiose, 1324
Cristais
de ácido hipúrico, 487
de ácido úrico, 487-488
de ampicilina, 487, 489
de biurato de amônio, 487-489
de carbonato de cálcio, 487-488
de cistina, 487-489
de hematina, 487
de leucina, 489
de sulfonamida, 487, 489
de tirosina, 487, 489
de xantina, 487
lipídicos, 515
Cristais urinários, 486-491
células anormais, 490
contaminantes e artefatos, 490-491
urina
ácida, 486-488
alcalina, 488
anormal, 488-489
Cromatografia, 52-55, 350-355
de partição, 54
de troca catiônica, 272
de troca iônica, 54, 271-272
em camada delgada, 350-352
gasosa, 53-54
gasosa-espectroscopia de massa, 354
líquida, 54-55
líquida de alto desempenho, 352-354
líquida-espectroscopia de massa, 354-355
por adsorção, 54
por afinidade, 54, 272
Cromo, 450
deficiência, 451
função, 451
propriedades, 452
toxicidade, 451
Cromoblastomicose, 1260-1261
Cromossomos, 1002, 1431-1438
A, 403, 1542
cariótipo, 1433-1434
coloração, 1433
cultura de células, 1432-1433
em anel, 1444
estrutura, 1431-1432
hibridização *in situ* por fluorescência, 1435-1436
homólogos, 1002
imagem assistida por computador, 1434-1435
marcador, 1444
Crupe, 1120
Crustáceos, 1323
Cryptococcus spp., 1250-1251
diagnóstico laboratorial, 1250-1251
doença clínica, 1250
fatores de risco, 1250
patologia, 1250
Cryptosporidium spp., 1300-1301
Cultura, 1157-1158, 1230-1232
de células, 1432-1433
de parasitas, 1279
herpes simples, 1117-1119
micobactéria, 1230-1232
nematódeos, 1278
parasitas, 1277-1278
Curva característica de operação do receptor (ROC), 79, 84-85
Curvas de dissociação do oxigênio, 571
Custo total de propriedade, 144
Cutoff do teste, 79
Cyclospora cayetanensis, 1301-1302

D

11-desoxicorticosterona, 428
11-desoxicortisol, 428
Da recepção ao resultado, 21
Da solicitação ao resultado, 21
Dade Behring Dimension Xpand Plus integrated chemistry system, 70
Dade Behring StreamLab Analytical Workcell, 72
Dados do paciente em procedimentos de CQ, 125-126
DAF (CD55), 976
Declaração de renda, 150
Defeito da ApoB familiar, 249-251
Defeitos
da síntese de nucleoproteína, 597-598
no tubo neural, 437-438
por milhão de oportunidades, 5-6
Defeitos de proteínas de coagulação
adquiridos, 857-859
coagulação intravascular disseminada, 857-858
deficiência de vitamina K, 858
doença hepática, 858
inibidores de proteínas de coagulação adquiridos, 858
transfusão em massa, 743
hereditária, 852-857
deficiência de cininogênio de alto peso molecular, 855
deficiência de pré-calicreína, 855
deficiência do fator II, 856
deficiência do fator V, 856
deficiência do fator VII, 856-857
deficiência do fator VIII, 856
deficiência do fator IX, 852-854
deficiência do fator X, 856
deficiência do fator XI, 854-855
deficiência do fator XII, 855
deficiência do fator XIII, 857
deficiência dos fatores V e VIII, 856
distúrbios do fibrinogênio, 855-856
fatores de coagulação da deficiência combinada de vitamina K, 856
Deficiência
de adesão leucocitária, 644-645

de aldosterona sintase, 406, 410
de apolipoproteína
C-II, 251
C-III, 251
de dissacaridase, 336
de fosfoglicerato
mutase, 229
quinase, 229
de fosforilase quinase muscular, 229
de frutose-1,6-bifosfato, 227
de galactoquinase, 227
de glicose-6-fosfato desidrogenase, 623-624
de grânulos densos, 865, 874-875
de 3β-hidroxiesteroide, 406, 409-410
de 11β-hidroxilase, 406, 408-409, 411
de 17-hidroxilase 406, 409-411
de 21-hidroxilase, 406-408
de lactato desidrogenase, 229
de pirimidina-5'-nucleotidase, 625
de piruvato quinase, 229, 625
de pré-calicreína, 855
de uridina difosfato galactose-4-epimerase, 227
hormonais, 225-226
Deficit Reduction Act, 8
Definição
de Arrhenius para ácidos e bases, 188
de Bronsted-Lowry para ácidos e bases, 188
de Lewis para ácidos e bases, 188
De-hidroepiandrosterona, 427-428
Demonstrativo de fluxo de caixa, 150
Densitometria, 51-52
Departamento de transporte (DOT), 9
Depósito de dados da empresa, 131
Depreciação, 144
Depuração
da creatinina
estimação da, 178
intensificada pela cimetidina, 178
de água livre, 180
negativa, 180
renal, 176
cálculo da, 176
Derivados do ácido fíbrico, 247
Dermatite herpetiforme, 1083
Dermatofitoses, 1257-1259
diagnóstico laboratorial, 1257-1259
doenças clínicas, 1257
fatores de risco, 1257
Dermatomiosite, 1054
Dermatose linear por IgA, 1083-1084
Des-γ-carboxiprotrombina, 313-314
Desempenho, 14-25
otimização, 21-23
Desequilíbrio da ligação genética, 1002, 1007
Desipramina, 374
Desoxipiridinolina, 210
Despesa
de incrementação, 144
diretas, 143
fixas, 143
operacionais, 143-144
por resultado comunicável, 144
salariais, 143
total acumulada, 144
variáveis, 143
Destruição de eritrócito, 573-574
Desvio de Rapoport-Luebering, 623
Detecção, 70
de antógeno, 1279-1280
Detecção de anticorpo, 758-764
eritrócitos reativos, 759
identificação do anticorpo, 759-762
protocolos de detecção de anticorpo, 759
tecnologias de aglutinação em coluna, 759-760
teste de aderência em fase sólida, 760
testes em tubo de ensaio, 759
prova cruzada (*crossmatching*), 762-764
antiglobulina, 763
eletrônico, 762-763
protocolos pré-operatórios, 763-764
sorológico de centrifugação imediata, 762
Detecção de fármaco, 349-356
cromatografia em camada delgada, 350-352
cromatografia gasosa-espectroscopia de massa, 354
cromatografia líquida de alto desempenho, 352-354
cromatografia líquida-espectroscopia de massa, 354-355
drogas ilícitas, 355-356
métodos imunoquímicos, 349-350
ligação de fármacos a anticorpos, 350
técnicas cromatográficas, 350-355
Diabetes
causas, 391
classificação, 221
controle glicêmico, 223-224
diagnóstico, 220
gestacional, 220, 440
insípido, 389-390, 462-463
juvenil, 221
melito, 219-224, 468-469, 1090-1091
metas glicêmicas, 223
nefrogênico, 391
teste de cetonas, 224
tipo 1, 221-222, 1028
tipo 2, 222-223
Diagnóstico molecular, 1394-1406
ácidos nucleicos
análises, 1400-1405
bioquímica e biologia, 1394-400
armadilhas, 1578-1579
avaliação laboratorial da doença, 1405-1406
doença residual, 1490-1492
doenças genéticas, 1500-1519
anemia falciforme, 1506
atrofia muscular espinal, 1503-1504
cânceres familiares, 1511-1515
conceitos especiais, 1503-1504
distrofia muscular de Duchenne, 1505-1506
distúrbios de expansão de repetições de nucleotídeos, 1507-1509
distúrbios do DNA mitocondrial, 1516
fibrose cística, 1504-1505
hemocromatose, 1515-1516
leucemias, 1471-1481
linfoma não Hodgkin, 1481-1490
neoplasmas hematopoéticos, 1470-1499
perfil de expressão gênica, 1492-1494
perspectivas futuras, 1517
seleção das aplicações, 1502-1503
seleção das técnicas, 1501-1502
síndromes de Prader-Willi e Angelman, 1509-1511
trombofilias hereditárias, 1506-1507
Diagnóstico pré-natal
distúrbios de imunodeficiência, 1043
distúrbios genéticos, 1503-1504
Diálise peritoneal, 524
Diarreia, 327
associada ao HIV, 332
crônica, 331-332
diagnóstico diferencial, 333
nosocomial 332-334
osmótica, 333-334
secretória, 333
Diazepam, estrutura, 356
Dientamoeba fragilis, 1294-1295, 1297-1298
Dieta, 24-25
Dietilamida do ácido lisérgico, 361
estrutura, 357
Diferenciação eritroide, 704
Digital Image Communications in Medicine (DICOM), 141
Digitoxina, 364
Digoxina, 364
Di-hidrotestosterona, 428
Dilantina *ver* Fenitoína
Diluições, 64
Dióxido de carbono
critérios para aceitação, 122-123
teste respiratório, 333
sistema tampão, 188
Dioxinas, 142
Diphyllobothrium spp., 1309
Dipylidium caninum, 1309
Diretoria do laboratório, 76-77, 1458
ver também Equipe
Diretrizes do NCEP, 246-248
confiabilidade das quantificações, 246
teste e tratamento, 246-248
Disbetalipoproteinemia, 252
Diseritropoese, 658
Disfibrinogenemia, 856, 890
Disgranulopoese, 658
Dislipidemia
diabética, 251
secundária, 249
Dismegacariocitopoese, 658
Dispersão, 108-109
de luz, 547
de Raman, 39
de Rayleigh, 39
Dispositivos portáteis de coleta, 134
Disproteinemias, 879
Disqueratose congênita de Williams, 939
Distribuição Gaussiana (normal), 108
Distrofia
miotônica, diagnóstico molecular, 1509
muscular de Duchenne, diagnóstico molecular, 1505-1506
Distúrbio(s)
acidobásicos, 188-193
acidose metabólica, 189-192
acidose respiratória, 192-193
alcalose metabólica, 192
alcalose respiratória, 193
definição de ácido e base, 188
equilíbrio acidobásico corporal, 188-189
hemaférese, 819-821
misto, 193
sistema tampão HCO^-_3/CO_2, 188
de afoiçamento
anemia falciforme, 614-617
traço falciforme, 614
variantes estruturais da hemoglobina, 612-613
de coagulação, 94-95
abordagem clínica para pacientes, 851-852
testes de triagem para, 849
ver também Hemostasia
de expansão da repetição de nucleotídeos, 1507-1509
de imunodeficiência, 1035-1045
avaliação do sistema imune, 1037
sinais e sintomas clínicos, 1036
de plaquetas de Quebec, 874-875
gástricos, 327-328
intestinais, 331-337
deficiência de dissacaridase, 336
diarreia associada ao HIV, 332
diarreia crônica, 331-332
diarreia nosocomial, 332-334
Doença de Whipple, 336
enteropatia inflamatória, 336
espru celíaco, 335-336
síndromes de má absorção, 334-335
tumores neuroendócrinos, 336-337
linfoproliferativo de células T $CD30^+$ cutâneo primário, 684
linfoproliferativo ligado ao X, 939
Distúrbios da hemoglobina, 607-618
função e estabilidade, 617-618
alta afinidade pelo oxigênio e policitemia, 617
baixa afinidade pelo oxigênio, 617
hemoglobinas instáveis, 617-618
pseudocianose, 617
investigações laboratoriais, 609-612
hemoglobinas normais, 607-609
agrupamentos genéticos da globina, 608-609
embrionárias, 608
glicosiladas, 609
síndromes de hemoglobina anormal, 612-614
triagem e diagnóstico pré-natal, 622
Distúrbios do potássio, 155-158
anormalidades metabólicas, 156
hipercalemia, 97
causas e patogênese, 183-184
diagnóstico diferencial, 184
hipocalemia, 97
causas e patogênese, 182-183
diagnóstico diferencial, 183
Distúrbios eritrocitários, 589-636
anemia *ver* Anemia
distúrbios de hemoglobina, 607-618
afoiçamento, 614-616
função e estabilidade, 617-618

hemoglobinas normais, 607-609
investigações laboratoriais, 609-612
síndromes de hemoglobina anormal, 612-614
triagem e diagnóstico pré-natal, 622
variantes estruturais da hemoglobina 612-613
distúrbios de membrana, 605-607
distúrbios metabólicos, 622-625
hemólise, 605-607
adquirida, 625-630
destruição de hemoglobina, 604-605
policitemia, 617, 632-633
Distúrbios leucocitários, 637-697
não neoplásicos, 639-653
distúrbios linfocíticos e plasmacíticos, 647-652
granulócitos, distúrbios de, 639-647
reações leucemoides, 652-653
neoplásicos, 653-691
distúrbios linfoproliferativos associados à imunodeficiência, 688
distúrbios mieloproliferativos crônicos, 653-657
doença de mastócitos, 690
doenças mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas, 657-661
leucemias mieloides agudas, 661-667
linfoma de Hodgkin, 686-688
neoplasias de células B maduras, 669-680
neoplasias de células *natural killer* e de células T, 680-685
neoplasias de precursores de células B e T (linfoblásticas), 667-669
neoplasmas histiocíticos e de células dendríticas, 688-690
Distúrbios linfocíticos e plasmacíticos, 647-652
linfocitopenia, 651-652
linfócitos
distúrbios funcionais, 652
normal, 647
linfocitose, 647-651
plasmacitose, 652
Distúrbios linfoproliferativos associados à imunodeficiência, 688
Distúrbios linfoproliferativos pós-transplante, 688
Distúrbios mieloproliferativos, 879
Distúrbios pancreáticos, 328-329
autoimune, 1090-1091
fibrose cística, 330-331
macroamilasemia, 328-329
pancreatite
aguda, 329-330
crônica, 330
Diurese, 184-185
hídrica, 186
causas da, 160
osmótica, 186
Diuréticos, 96
DNA
amplificação, 1010
análise, 950-951
anticorpos, 1048-1049
extração, 1522
mecanismos de reparo, 1398-1399
mutações, 1399
ramificado, 1416
replicação, 1396-1397
transcrição, 1397
mitocondrial
distúrbios, 1516
ver também distúrbios individuais
sequenciamento, 1524-1525
Doença(s)
ácido péptica, 327-328
cardiovascular, complemento na, 981
da arranhadura de gato, 1145, 1150
da cadeia pesada γ, 672-673
da floresta de Kyasanur, 1382, 1385
da Hb SC, 615
da Hb SD, 615
da HbC, 616
da HbE, 616
da retenção de quilomícrons, 252
da tireoide, 400
da tireoide, autoimune, 1087-1088
da urina em xarope de bordo, 462, 496
de Addison 183, 417, 421, 1090
de Andersen, 228
de Brill-Zinsser, 1145
de Chagas, 1290, 1324
de Cori, 228
de Creutzfeldt-Jakob, 508
de Crohn, 1092
de Forbes, 228
de Gaucher, 641-642
de Graves, 395, 1087
de Hers, 228
de Huntington, diagnóstico molecular, 1509
de Kawasaki, 1065, 1075-1076
de Lyme, 1212-1217
de mastócitos, 690
de McArdle, 229
de Paget, 213
de Pompe, 227, 229
de Tangier, 253
de Tarui, 229
de von Gierke, 228
de von Hippel-Lindau, 1512
de von Willebrand, 876-878
adquirida, 878
subtipos, 876-878
de Whipple, 336
de Willebrand, 868
de Wilson, 278, 313, 321, 323, 453
dermatológica, complemento na, 980
do anticorpo antimembrana basal, 817
do anticorpo antimembrana basal glomerular, 1089-1090
do compartimento de armazenamento adquirida, 880
do enxerto *versus* hospedeiro, 788-789
fotoférese, 808-810
do parênquima renal, 463
gastrintestinal, marcadores genéticos, 346-347
granulomatosa, 208
hematológica, complemento na, 981
hemolítica aloimune do recém-nascido, 629
mielodisplásicas mieloproliferativas, 657-661
citometria de fluxo, 713-714
maturação celular anormal, 658
não classificáveis, 660
mieloproliferativa crônica, 653-657
leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica, 655
leucemia mielógena crônica, 653-655
leucemia neutrofílica crônica, 655
mielofibrose idiopática crônica, 656-657
não classificável, 657
policitemia vera, 633-665
trombocitemia essencial, 657
mista do tecido conjuntivo, 1054
não tireoidiana, 399
neurológica, complemento na, 981
óssea metabólica, 211-213
doença de Paget, 213
osteodistrofia renal, 212-213
osteomalacia, 205-206, 208, 212
osteoporose, 211-212
raquitismo, 207-208, 212
por aglutinina fria, 628
por hemaglutinina fria, 769-770
renal, 463
complemento na, 980
residual mínima, 1490-1492
reumática, complemento na, 979-980
transmitida por transfusão, 789-791
babesiose, 790
citomegalovírus, 790
encefalopatia espongiforme transmissível, 791
hepatite, 790
malária, 790
parvovírus B-19, 790
Trypanosoma cruzi, 790-791
vírus da imunodeficiência humana, 790
vírus linfotrópicos de células T humanas, 790
vírus West Nile, 790
Doença autoimune órgão-específica, 1078-1095
coração, 1093
fígado, 1085-1087
autoanticorpos, 1084-1085
doenças hepáticas, 1085-1087
glândulasuprarrenal, 1090
métodos de detecção, 1078-1081
músculo, 1094
pâncreas, 1090-1091
pele, 1080-1084
dermatite herpetiforme, 1083
dermatose linear por IgA, 1083
epidermólise bolhosa *acquisita*, 1082-1083
lúpus eritematoso, 1083-1084
lúpus eritematoso bolhoso, 1082-1083
pênfigo, 1080-1081
penfigoide, 1081-1082
vasculite, 1084
rim, 1089-1090
sistema nervoso, 1092-1093
tireoide, 1087-1089
autoanticorpos, 1088-1089
doenças da tireoide, 1087-1088
trato gastrintestinal, 1091-1092
Doença cardíaca coronariana, 233, 255-256
fatores de risco, 247, 256
marcadores de risco, 261-263
homocisteína, 262-263
proteína C reativa, 261-262
ver também Apolipoproteínas; Lipoproteínas
Doença hepática
autoanticorpos, 1085
autoimune, 1085-1087
defeitos de coagulação, 858
diagnóstico, 320-324
cirrose, 321
congestão passiva crônica, 321
hepatite, 320-321
insuficiência hepática fulminante, 323-324
lesões que ocupam espaço, 323
obstrução biliar pós-hepática, 323
Doença infecciosa
complemento na, 980
manipulação da amostra, 1350-1367
amostras inaceitáveis, 1350-1351
coleta da amostra, 1350
encaminhamento para testes, 1351
fezes, 1363-1365
lesões cutâneas e subcutâneas, 1365-1366
líquidos corporais, 1354-1356
momento da, 1350
olho, 1356-1357
precauções universais, 1351
sangue, 1351-1354
tecidos, 1356
transporte da amostra, 1350
trato genital, 1361-1363
trato respiratório, 1357-1360
trato urinário, 1360-1361
volume de amostra, 1350
patologia molecular, 1329-1349
amplificação de ácido nucleico, 1333-1340
detecção de organismos patogênicos, 1330-1332
epidemiologia molecular, 1340-1343
métodos moleculares em microbiologia clínica, 1330
padronização, controle de qualidade e testes de proficiência, 1343-1344
sondas de ácido nucleico, 1332-1333
Doenças alérgicas, 1096-1108
hipersensibilidade imediata, 1096-1100
células e mediadores, 1099-1100
fenótipo alérgico, 1097
IgE, 1098-1099
regulação da síntese de IgE, 1097-1098
testes laboratoriais, 1100-1107
anticorpos IgE, 1101-1107
fundamento do, 1100
mediadores da hipersensibilidade imediata, 1107
quantificação de IgE, 1101-1102
testes cutâneos e testes de provocação de órgão-alvo, 1100-1101
Doenças genéticas, diagnóstico molecular, 1500-1519
anemia falciforme, 1506
atrofia muscular espinal, 1516
cânceres familiares, 1511-1515
câncer de mama-ovário hereditário, 1513
neoplasia endócrina múltipla, 1512
retinoblastoma, 1511-1512

síndromes do câncer colorretal hereditário, 1513
testes laboratoriais, 1514-1515
conceitos especiais, 1503-1504
antecipação, 1504
crossing over, 1504
dissomia uniparental, 1504
frequências alélicas e triagem populacional em massa, 1504
heterogeneidade molecular, 1503
imprinting, 1504
influências epigenéticas e herança não mendeliana, 1504
penetrância e expressividade variável, 1503-1504
distrofia muscular de Duchenne, 1505-1506
distúrbios de expansão da repetição de nucleotídeos, 1507-1509
ataxia de Friedreich, 1509
distrofia miotônica, 1509
distúrbios neurodegenerativos, 1509
síndromes do XA frágil e do XE frágil, 1507-1509
testes laboratoriais, 1509
distúrbios do DNA mitocondrial, 1516
fibrose cística, 1504-1505
hemocromatose, 1515-1516
perspectivas futuras, 1517
seleção das aplicações, 1502-1503
seleção das técnicas, 1501-1502
síndromes de Prader-Willi e Angelman, 1509-1511
trombofilias hereditárias, 1506-1507
Doenças micóticas, 1236-1271
Candida spp., 1248-1250
Cryptococcus spp., 1250-1251
dermatofitose, 1258-1259
fungos dermatiáceos, 1259-1261
cromoblastomicose, 1260-1261
feoifomicose, 1261
micetoma, 1260
fungos dimórficos
Blastomyces spp., 1254-1255
Coccidioides spp., 1255-1256
Histoplasma spp., 1252-1254
Sporothrix spp., 1256-1257
fungos hialinos
Aspergillus spp., 1262-1264
Fusarium spp., 1264-1265
Scedosporium spp., 1265
Malassezia spp., 1251
nomenclatura, taxonomia e fungos
colônia fúngica, 1237-1238
dimorfismo, 1241-1242
estrutura de leveduras e hifas, 1238
estruturas reprodutivas, 1239-1241
morfologia, 1237-1238
pigmento das hifas, 1239
pneumonia por *Pneumocystis*, 1265-1266
prototecose, 1266-1267
técnicas diagnósticas
coleta e transporte de amostras, 1242
exame direto, 1242-1244
identificação bioquímica, 1246-1247
identificação molecular, 1247-1248
identificação morfológica, 1245-1246
identificação sorológica, 1247
isolamento em cultura, 1244-1245
segurança, no laboratório, 1242
taxa de crescimento, 1245
temperatura de crescimento, 1245
testes de suscetibilidade, 1248
zigomicose, 1261-1262
Doenças reumáticas sistêmicas, 1046-1063
artrite reumatoide, 1053-1054
biologia molecular, 1054-1055
classificação, 1046
dermatomiosite, 1054
detecção de autoanticorpo, 1055-1060
ELISA, 1056-1060
imunoblotting, 1060-1061
escleroderma, 1051-1052
lúpus eritematoso sistêmico, 1046-1051
perfis de autoanticorpo, 1055
polimiosite, 1054
síndrome de Sjögren, 1051
síndromes de sobreposição, 1054
work up diagnóstico, 1055
Doxepina, 374
Dracunculus medinensis, 1314
Drogas ilícitas, 356-361
anfetaminas, 359
barbitúricos, 360
benzodiazepínicos, 359-360
cocaína, 355, 357-358
dietilamina do ácido lisérgico, 361
fenciclidina, 360
maconha, 361
mecanismos de ação, 356-358
metadona, 359
opiáceos, 358-359
propoxifeno, 360
triagem para, 355-356

E

E-teste, 1194-1195
Eclâmpsia, 627
EDTA, efeito sobre testes sanguíneos, 28-29
Efeito
bystander, 1579
de Tyndall, 39, 501
Prozona, 958
Efusões
hemorrágicas, 513
inflamatórias, 513
não inflamatórias, 512
purulentas, 513
quilosas, 519
Ehrlichia ewingii, 1145, 1148
Ehrlichia spp. *ver* Infecções por riquétsias
Eikenella spp., 1183
Eixo
hipotálamo-hipófise-suprarrenal, 411
hipotálamo-hipófise-hormônio do crescimento, 386
Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, 394-401
autoanticorpos antitireoide, 398
calcitonina, 401
doença da tireoide, 400
doença não tireoidiana, 399
globulina ligadora de tiroxina, 398
hormônio estimulador da tireoide, 395-396
hormônio liberador de tireotrofina, 394-395
L-tiroxina, 400-401
medicamentos e teste de função da tireoide, 399-400
quantificação de iodo urinário, 398
tireoglobulina, 397-398
tiroxina, 396
tiroxina livre, 396-397
triagem
doença da tireoide, 400
hipotireoidismo neonatal, 398-399
tri-iodotironina, 397
tri-iodotironina reversa, 397
variáveis fisiológicas, 399
Eixo renina-aldosterona, 417-421
quantificações de aldosterona, 421
quantificações de renina, 421
renina e hipertensão, 418-421
Elastase fecal, 345-346
Eletrocardiograma, 255
Eletroforese, 51-52, 269-271, 506-508
hemoglobinas, 609-611
capilar, 57-58, 272
em gel de agarose de alta resolução, 506
em gel de poliacrilamida, 507
Eletroquímica, 50-51
amperometria, 51
coulometria, 51
potenciometria, 50-51
voltametria, 51
Eletrosmose, 270
Eliptócitos, 552
Eliptocitose hereditária, 606
ELISA, 328, 346, 1056-1060
Êmbolo de ar, 822
EMIT, 350
Encaminhamento para teste, 1351
Encefalite, 1127-1128
amébica granulomatosa, 1324
equina venezuelana, 158, 163-164, 1382
viral, 500
Encefalopatia espongiforme transmissível, 790
Encephalitozoon intestinalis, 1302
Endocardite, 1145
Endolimax nana, 1294, 1296, 1300-1301
Endométrio, 429-430
Endosmose, 270
Endotélio, 844-845
Energia livre de ativação, 286
Ensaio(s)
com ácido metilmalônico, 595
de captura híbrida, 1416
de CK-MB massa, 257
de fluorescência por polarização, 928
de incorporação de timidina tritiada, 946
de *killing* polimorfonuclear, 1040-1041
de microcitotoxicidade de linfócitos, 1012
do lisado de *Limulus*, 511
imunofluorimétrico de partição radial, 928
imunossorvente ligado à enzima *ver* ELISA
MicroSpot, 934-935
turbidimétrico com látex, 917
Entamoeba
coli, 1294, 1296-1297
hartmanni, 1294, 1296-1298, 1301
histolytica, 333,1294-1298, 1301
polecki, 1294
Enterobacteriaceae, 1173-1175, 1331
Enterobius
técnica da fita de celulose, 1277
vermicularis 1303-1304
Enterococos, 1161-1164
características, 1161-1162
diagnóstico laboratorial, 1163-1164
manifestações clínicas e patogênese, 1162-1163
suscetibilidade antimicrobiana, 1164
Enterocytozoon bieneusi, 1302
Enteromonas hominis, 1294, 1299
Enteropatia
com perda proteica, 271, 280-281
de sensibilidade ao glúten, 1028, 1092
inflamatória, 336
Enterovírus, 1126-1127, 1332
Entrevistas, 17-18
Envenenamento, 1318
Environmental Protection Agency (EPA), 9
Enzima(s)
cinética, 289-290
cofatores, 287-288
conversora de angiotensina (ACE), 287, 299-300
bioquímica e fisiologia, 299-300
intervalos de referência, 300
quantificação, 300
resultados anormais, 300
variação pré-analítica, 300
defeitos, 293
distribuição nos órgãos, 297
eficiência catalítica, 290-291
energia livre de ativação, 286
ensaio, 293-294
fatores que afetam a atividade, 288
inibição, 291-293
lipolíticas, 237
localização celular, 314
mecanismos de liberação, 314-315
nomenclatura, 286-287
propriedades, 285-286
ver também enzimas individuais
Enzimologia clínica, 285-306
eficiência catalítica, 290-291
ver também Enzimas
Eosinofilia, 645-646
causas, 645
pulmonar tropical, 646
Eosinófilos, 555-556, 579-580, 909
distribuição e cinética, 580
função, 580
LCE, 502-503
líquido peritoneal, 525
medula óssea, 562
morfologia dos precursores, 579-580
urina, 482
Eosinopenia, 556
Epidemiologia molecular, 1340-1343
Epidermólise bolhosa, 939
adquirida, 980, 1082-1083
Epratuzamab, 705
Equação de Henderson-Hasselbalch, 188

Equal Employment Opportunity Commission (EEOC), 9
Equilíbrio
  acidobásico, 188-189
  de carga, 17
  eletrolítico
  excreção líquida de ácidos, 189
  hídrico, controle não renal, 176
  produção líquida de ácidos, 188-189
    controle não renal, 176
    controle renal, 174-176
Equinócitos, 552-553
Equipamento, 1457, 1461
  controle de qualidade, 1467
  de proteção pessoal, 10
  de segurança pessoal, 10
Equipe, 1458-1460
  certificação, 1458-1460
  diretor do laboratório, 1458
  laboratórios de teste rápido, 77
  residentes, bolsistas e estudantes de graduação, 1458
  supervisor técnico, 1458
  tecnólogos médicos e técnicos de biologia molecular, 1458
Equivalente de tempo integral, 6
Ergonomic Safe and Health Program Management Guidelines, 8
Eritroblastopenia transitória da infância, 602
Eritroblastos definitivos, 569
Eritroblastose fetal, 439-440
Eritrocinética, 574-575
  destruição total de eritrócitos e hemoglobina, 574
  produção efetiva de eritrócitos, 574-575
  produção total de eritrócitos e hemoglobina, 491
  sobrevida efetiva de eritrócitos no sangue, 575
Eritrócitos, 550-554
  cor, 550-551
    conteúdo de hemoglobina, 550
    policromatofilia, 551
  dismórficos, 481
  estrutura, 553-554
    anéis de Cabot, 553
    corpúsculos de Howell-Jolly, 553
    formação *rouleaux,* 554
    pontilhado basofílico, 553
    pontilhado malárico, 553
  formato, 551-553
  hemácias nucleadas, 554
  líquido sinovial, 514
  na urina, 481
  produção efetiva, 574-575
  sobrevida efetiva, 575
  transfusão, 777, 779-780, 782-783
  variação fisiológica, 543-544
Eritroférese, 794, 800-801
  aspectos associados ao doador, 797
  benefícios da, 800
  indicações para, 807-808
  requisitos para o produto, 800
  seleção do doador, 796-797
Eritroleucemia, 665-666
Eritropoese, retardo transiente da, 601-602
Eritropoetina, 568
  produção inadequada, 632-633
Erliquiose monocitotrópica humana, 1145, 1148
Erro de tipo I, 107
Erro de tipo II, 107
Erro padrão da média, 109
Erysipelothrix spp., 1167
Escabiose, 1324
Escala
  intervalar, 107
  nominal, 107
  ordinal, 107
Escleroderma, 1051-1052
Esclerose
  múltipla, 500, 1028, 1093
  nodular, 687
Escorbuto, 449
Escorpiões, 1321
Esferócitos, 551-552
Esferocitose hereditária, 605-606
Esfregaços de sangue, 548-560
  confecção e coloração, 548-550
  coloração de lâminas automatizada, 550
  coloração de Wright, 549-550
  colorações para sangue, 549-550
  método da centrifugação, 549
  método da lamínula, 549
  método em cunha, 548-549
  eritrócitos, 550-554
  infecções parasitárias, 1274-1275
    coloração, 1274-1275
    esfregaços delgados e espessos, 1274
    exame dos esfregaços, 1275
    preparo da lâmina, 1274
    técnicas de concentração, 1275
  preparações a fresco, 548
Esparganose, 1317
Especificidade, 81-83
Especificidade analítica, 114
Espectrofotometria, 37-45
  dispersão da radiação, 39
  energia de RME, 38-39
  garantia da qualidade, 45
  lei de Beer-Lambert, 39-40
  velocidade de propagação, 38
Espectrofotômetro, 44-45
  filtros, 41-43
  fontes de energia radiante, 40-41
  fotodetectores, 43-44
  processadores de sinal e leitura, 44
  recipientes para amostra (cubetas), 43
  seletores de comprimento de onda, 41
Espectrometria
  de luminescência molecular, 46-47
  de massa, 55-57, 1572-1573
    detector de íons, 56
    ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), 55
    ionização por dessorção a laser de superfície melhorada, 55
    pesos atômicos, 55
    relação massa/carga, 55
    unidade analisadora, 55-56
    unidade de fonte iônica, 55
  de ressonância magnética nuclear, 58
Espermatozoides, 432-433
Espondilite anquilosante, 1028
Espru celíaco, 335-336
Esquistócitos, 552
Estação de trabalho
  análise, 16-17
  consolidação, 71
Estado hiperosmolar diabético, 96
Estados hipercoaguláveis, adquiridos, 890-892
  anticoagulante lúpico, 890-892
  hiper-homocisteinemia, 892
  síndrome antifosfolipídio, 890-892
Estafilococos, 1158-1161
  características, 1158-1160
  diagnóstico laboratorial, 1161-1162
  manifestações clínicas e patogênese, 1160
  suscetibilidade antimicrobiana, 1161
Estanho, 450
Estatinas, 212
Estatística
  comparativa, 109-111
  de correlação, 111-113
  descritiva, 108-109
  laboratorial, 106-114
    análise de dados discretos, 111
    avaliação de tendência e estatística de correlação, 111-113
    comparativa, 109-111
    definições, 106-107
    descritiva, 108-109
    preparo para análise de dados, 107-108
    validação de método e controle de processo, 113-114
  paramétrica, 107
Esteatorreia, testes para, 342
Esterase leucocitária, teste para, 477
Esteroides
  efeitos fisiológicos, 406
  sexuais, 427-429
Estimativa orçamentária, 149-150
Estomatocitose hereditária, 606-607
Estradiol, 428
Estreptococos, 1161-1164
  características, 1161-1162
  diagnóstico laboratorial, 1163-1164
  manifestações clínicas e patogênese, 1162-1163
  suscetibilidade antimicrobiana, 1164
Estresse, 25
Estrias gordurosas, 256
Estriol, 428
Estrógenos, 427-431
Estrona, 428
Estrôncio, 450
Estrongiloidíase, 1324
Estudos
  de pares de irmãos, 1030
  populacionais, 1030
  sobre taxa de destruição 1203-1204
Etanol, 377
Etilenoglicol, 377-378
Etossuximida, 367
Evacuação *ver* Fezes
Exame a fresco direto, 1276
Exclusão alélica, 960
Excreção fracionada, 180
Exercício, 24-25
Extratores de ácido nucleico, 1459
Extravasamento de leucócitos, 993

F

α-fetoproteína, 316, 1538
Família
  de proteínas antiapoptóticas *Bcl-2,* 638
  de proteínas pró-apoptóticas *Bcl-2,* 638
Farmacocinética 361-363
Fármacos
  anti-inflamatórios, 370-372
  hipoglicêmicos, 224-225
  neurolépticos, 375
  para hiperlipidemia, 248
Fas/CD95 ligante, 638
Fasciola hepática, 1311
Fasciolopsis buski, 1310
Fator(es)
  angiogênicos, 1538-1541
  anti-hemofílico crioprecipitado, 778
  antiperinuclear, 1053
  de coagulação da vitamina K, deficiência combinada, 856
  de coagulação *ver* Defeitos de proteínas de coagulação; Sistema de proteínas de coagulação
  de crescimento, 1551-1552
    derivado de plaqueta, 1551-1552
    do fibroblasto básico, 1552
    do hepatócito, 1552
    epidérmico, 1552
    fatores de transformação do crescimento α e β ,1551
    hematopoéticos, 568-569
  de necrose tumoral, 992
  de restrição homólogo, 976
  de von Willebrand, 313, 322, 778, 844, 876-878
    biologia, 876
    testes laboratoriais, 878
  estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), 586
  estimulador de colônias de monócitos/macrófagos (M-CSF), 568
  H, 976
  humorais, 909
  J, 976
  nuclear-κB, 639
  reumatoide, 517, 1053
  transformador
    do crescimento α, 1551
    do crescimento β, 991-992, 1551
  V_{Leiden}, 889
Faturamento, 137
Febre(s)

africana transmitida pela mordida do carrapato, 1144-1145
amarela, 164, 1383
americana transmitida pela mordida do carrapato, 1145
argentina, 165
boliviana, 164-165
botonosa, 1144-1446
da dengue hemorrágica, 164-165, 1383
das trincheiras, 1145, 1150-1151
de Lassa, 164, 1382-1383, 1385
de Oroya, 1145, 1151
do Vale de Rift, 164-165, 1383, 1385
hemorrágica da Crimeia-Congo, 164-165, 1382-1383, 1385
hemorrágica de Omsk, 1383, 1385
hemorrágica viral, 165, 1371, 1384
hemorrágicas, 157, 164-165
maculosa da Ilha de Flinders, 1145
maculosa das Montanhas Rochosas, 1144-1145
maculosa japonesa, 1145
maculosa por *R. Felis,* 1145-1146
Q, 1145, 1149-1150
ver também Coxiella burnetii
mordedura de rato, 1218
recidivante, 1217-1218
Felbamato, 368
Fenciclidina, 360
estrutura, 357
Fenilcetonúria, 462, 495-496
Fenitoína, 366-367
Fenobarbital, 365-367
Fenótipo, 1002
alérgico, 1097
Feocromocitoma, 218, 402-404
algoritmo de avaliação, 405
efeito de medicamentos sobre o teste, 403
níveis hormonais, 403
teste de estimulação com glucagon, 403
teste de supressão com clonidina, 403, 405
triagem, 402
Feoifomicose, 1261
Ferramentas de gerenciamento, 137
Ferritina, níveis séricos, 90-91, 592
Ferro, 450
critérios para aceitação, 122-123
deficiência, 451
envenenamento, 379
função, 451
metabolismo, 589-590
níveis séricos, 90-91
propriedades, 452
toxicidade, 451
variabilidade biológica, 80
Feto, hematopoese, 569
Fezes, 1363-1365
açúcares redutores, 333
alcalinização, 333
antígeno de *Giardia,* 333
coleta, 343
cultura de bactérias, 333
cultura especial, 333
exame
macroscópico, 343-344
microscópico, 344
infecções bacterianas, 1363-1364
infecções parasíticas, 1275-1278, 1364-1365
coleta da amostra, manipulação e preservação, 1275-1276
coloração por hematoxilina férrica, 1277
coloração tricrômica de Wheatley, 1277
colorações acidorresistentes modificadas, 1277
colorações para microsporídios, 1277
colorações permanentes, 1277
cultura e recuperação de nematódeos, 1278
estudo de ovos, 1277-1278
exame a fresco direto, 1276
exame macroscópico, 1276
exame microscópico, 1276
objetos semelhantes a parasitas entéricos, 1278
técnica da fita de celulose para *Enterobius,* 1277
técnicas de concentração, 1276-1277
infecções virais, 1363
micobactéria, 333
ovos e parasitas, 333
protozoários, 333
triagem de rotavírus, 333
Fibras de carne, fecal, 344
Fibrina, 846
Fibrinogênio, 277-278
distúrbios, 855-856
variabilidade biológica, 80
Fibrinólise, 846
distúrbios hemorrágicos hereditários da, 857
Fibronectina
LCE, 507-508
líquido peritoneal, 526
Fibrose cística, 327, 330-331
diagnóstico molecular, 1504-1505
Filária, 1313
Filaríase zoonótica, 1314
Filoviridae, 1383
Filtros, 41-43
FISH *ver* Hibridização *in situ* por fluorescência
Fitomenadiona *ver* Vitamina K
FK506, 1013
Flagelados, 1298-1299
Chilomatix mesnili, 1298
Dientamoeba fragilis, 1294-1295, 1297-1298
Giardia lamblia, 1298-1300
Pentatrichomonas hominis, 1298
Trichomonas vaginalis, 1298-1299
Flaviviridae, 1383
Flúor, 450
deficiência, 451
função, 451
toxicidade, 451
Fluorescência, 47
Fluoretos, efeito sobre testes sanguíneos, 29
Fluorocromos, 699-700, 948-949
Fluoroimunoensaio de resolução temporal, 928
Fluorometria, 46-47
Fluvastatina, 248
Fluxo
de informação, 130-135
coleta e identificação da amostra, 134-135
realização de exames e liberação de resultados, 134-135
registro/identificação do paciente, 131-133
relatório, 135
solicitação de exames, 133-134
de trabalho, 14-23
análise, 18-19
coleta de dados, 14-18
compreensão, 19-21
formulação, 19
métrica, 21
plasmático renal, 179-180
Focagem isoelétrica, 52, 270-271
hemoglobinas, 609-610, 613-614
Fondaparinux, 900-901
Fontes de energia radiante, 40-41
Food and Drug Administration (FDA), 9
Formação de coágulo, 846
Formação *rouleaux,* 554
Formigas, 1320
Fórmula de Friedewald, 233, 244
Fornos, 63
Fosfatase
ácida, 287, 297-298
bioquímica e fisiologia, 297
intervalos de referência, 297-298
quantificação, 298
resultados anormais, 298
variação pré-analítica, 297-298
alcalina, 210, 287, 298
bioquímica e fisiologia, 298
critérios para aceitação, 122-123
diferenças entre os sexos, 298
intervalos de referência, 299
líquido peritoneal, 525
mecanismo de liberação, 315-316
neutrofílica, 654
quantificação, 299
resultados anormais, 299
variabilidade biológica, 80
variação pré-analítica, 299
Fosfato(s) 97-98
amorfos, 488
de cálcio básico, 514-515
de piridoxal, 288
hiperfosfatemia, 208
hipofosfatemia, 208
inorgânico, 27
Fosfenitoína, 367
Fosfolipídeos, quantificações, 242-243
Fosfoquinase 303-304
Fósforo 199-200
critérios para aceitação, 122-123
fisiologia, 199-200
homeostasia, 200
intervalo de referência, 200
técnicas analíticas, 199
variabilidade biológica, 80
Fosgênio, 167
Fotodetectores, 43-44
Fotoférese, 808-810
Fototubos a vácuo, 43-44
Fração
de ejeção ventricular esquerda, 256
de filtração, 179-180
Fragmento(s)
de citoqueratina 19, 1542
Fab, 957-958
Framboesia, 1208
Francisella spp., 1186
Francisella tularensis, 1380-1382
manifestação clínica, 1380
seleção da amostra, 1380-1382
ver também Tularemia
Frascos volumétricos, 62
Frequências
fenotípicas, 1029-1030
genéticas, 1029-1030
Frutosamina, 274
Frutose-1,6-bifosfato aldolase, 227, 229
Frutosúria, 227, 469
Função
endócrina, 383-426
eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, 394-401
eixo renina-aldosterona, 417-421
glândula suprarrenal, 401-417
glândula tireoide, 391-401
hipófise, 383-391
pancreática, 216-218
glucagon, 217-218
incretinas, 218
insulina, 216-217
somatostatina, 218
testes de, 102
Função hepática, 307-326
metabólica
amônia, 310
bilirrubina, 307-309
lipídeos, 311
metabolismo de fármacos, 311-312
normal, 307-309
síntese proteica, 312-314
sistema hepatobiliar, 307
sistema hepatocítico bioquímico, 307
sistema reticuloendotelial, 307
Função renal, 176-180
depuração, 176
cálculo da, 176
depuração de água livre, 180
negativa, 180
excreção fracionada, 180
fluxo plasmático renal, 179-80
fração de filtração, 179-180
índice de insuficiência renal, 180
reabsorção fracionada, 180
taxa de filtração glomerular, 179-180
creatinina, 177-178
cistatina C, 179
depuração de ureia e proporção ureia/creatinina, 179
quantificação com substâncias endógenas, 177
quantificação com substâncias exógenas, 177
ureia, 178-179
Função reprodutora, 427-443

avaliação laboratorial, 431-436
homem, 431-434
mulher, 434-435
tecnologia reprodutiva assistida, 435-436
fisiologia normal, 427-431
esteroides sexuais, 427-429
gravidez, 430-431
reprodução feminina, 429-430
reprodução masculina, 429
Fungos, 490
dermatiáceos, 1259-1261
cromoblastomicose, 1260-1261
feoifomicose, 1261
micetoma, 1260
dimórficos, 1241-1242
Blastomyces spp., 1254-1255
Coccidioides spp., 1255-1256
Histoplasma spp., 1104-1105
Sporothrix spp., 1104-1105
hialinos
Aspergillus spp., 1262-1264
Fusarium spp., 1264-1265
Scedosporium spp., 1265
Fusarium spp., 1264-1265

G

α_1-glicoproteína ácida, 279
γ-glutamil transferase
critérios para aceitação, 122-123
diferenças entre os sexos, 298
mecanismos de liberação, 314-315
variabilidade biológica, 80
G-CSF, 638
Gabapentina, 368
Galactosemia, 227
Galactosúria, 469
Gamopatia monoclonal, 281-282
de importância indeterminada, 674, 965
Garantia da qualidade, 952, 1393
análise de identidade, 1529
diagnóstico molecular, 1468
Gardnerella spp., 1186-1187
Gás cloro, 167
Gastrina, 328, 339
sérica, 333
Gastrinoma, 336
Gastroenterite, viral, 1131
Gc-globulina, 278-279
GCH *ver* Lipoproteína de alta densidade
Gel filtração, 271
Gemella spp., 1164-1165
Gemfibrozil, 248
Gemtuzumab ozogamicina, 705
Gene(s), 1002
BF, 1023-1025
C2, 1023-1024
C4, 1023-1024
da linfotoxina, 1023
da proteína do choque térmico 70, 1023
do fator de necrose tumoral, 1023
NOTCH-4, 1022
quiméricos, 1607-1610
Genética, 1002
Complexo Principal de Histocompatibilidade, 1002
distúrbios de imunodeficiência, 1043
sistema complemento, 977-978
transplante de tecido/órgão, 1013
Genômica, 1546, 1568-1572
análise seriada da expressão genética, 1569
comparação de tecnologias, 1572
marcadores moleculares, 1576-1578
microarranjos de DNA, 1569-1570
reação em cadeia da polimerase competitiva real, 1571-1572
Genótipo, 1002
Geração
eletrônica de solicitação de exames, 133-134
manual de solicitação (em papel), 134
Germânio, 450
Giardia lamblia, 1298-1300
Giardíase, 1324
Gigantismo, 387
Ginecomastia, 3
Glândula suprarrenal, 401-417
doença autoimune, 1090
hiperplasia suprarrenal congênita, 406
hormônios corticais, 404-417
cortisol e glicocorticoides, 410-417
distúrbios congênitos das deficiências, 404-410
eixo mineralocorticoide, 404
vias esteroidogênicas, 407
hormônios medulares, 401-404
feocromocitoma, 402-404
neuroblastoma, 404
Glândula tireoide, 391-401
hipertireoidismo, 393-394
hipotireoidismo, 91, 393-394
síntese e metabolismo de hormônio, 394
Glico-hemoglobina, variabilidade biológica, 80
Glicocorticoides, 410-417, 1013
estrutura, 428
Glicogênio fosforilase, 258
Glicogenoses
hepática, 228-229
muscular, 229
Glicoproteína associada à mielina, 965
Glicoquinase, 226
Glicose, 27, 218-219
anormalidades, 100
considerações sobre a amostra, 218
critérios para aceitação, 122-123
intersticial, 219
LCE, 508-509
líquido
pericárdico, 522-523
peritoneal, 525
pleural, 520
quantificação, 218-219
sangue total, 219
variabilidade biológica, 80
Glicosídeos digitálicos, 364
Glicosúria, 468-469
testes, 402
Gligogenoses musculares, 229
Globina, síntese, 572
Globulina ligadora
de hormônio sexual, 427
de tiroxina, 398
Glomerulonefrite, 1089
aguda, 492
crônica, 492
plasmaférese, 816-819
Glucagon, 217-218
Glucagonoma, 217, 336
Gonadotrofina(s), 384
coriônica humana, 430, 1542-1543
e gravidez precoce, 436-437
Gordura
fecal, 344
má absorção, 334-335
Gota, 514-516
Gradiente de albumina soro-ascite, 523-524
Gráfico de Shewhart, 116, 122, 124
Granulócitos
distúrbios dos, 639-647
basofilia, 646
eosinofilia, 645-646
neutrofilia, 555, 639-640
neutropenia, 555, 640-642
neutrófilos
na imunidade mediada por células, 946
alterações morfológicas, 642-644
distúrbios funcionais, 644-645
Granulomatose
de Wegener, 1065
linfomatoide, 680, 1072
Granulômero, 559
Grânulos
densos (olho de boi), 861
neutrofílicos, 555-556
Gravidade específica, 174, 272
Gravidez, 430-431
anemia aplásica na, 601
avaliação laboratorial, 436-442
asfixia fetal, 442
defeitos do tubo neural, 437-438
diabetes gestacional, 440
eritroblastose fetal, 439-440
GCH e gravidez precoce, 436-437
maturidade pulmonar fetal, 440-441
rompimento de membranas prematuro, 441-442
síndrome de Down, 438-439
toxemia da gravidez (pré-eclâmpsia), 441
infecção na, 442
Guerra biológica, 1368-1369

H

17α-Hidroxipregnenolona, 428
18-Hidroxicorticosterona, 428
Haemophilus influenza, 1331
Haemophilus spp., 1180-1182
Hantavírus, 164, 1382-1383
Haplótipo, 1002
Haptoglobina, 276
Hazardous Materials Regulations, 8
HAZMAT, 166
Hb
Chesapeake, 617
Constant Spring, 622
Kansas, 617
Kenya, 621
Lepore, 620
HbA, 608
HbA_2, 608
HbC/β^+-talassemia, 616
HbC/β^o-talassemia, 616
HbD Los Angeles (Punjab), 616
HbE, 616
HbE/β-talassemia, 616
HbF, 608
persistência hereditária da, 620-621
HbG Philadelphia, 616
HbH, 621
HbS/Asy-talassemia, 614-615
HbS/O Arab, 615-616
HbSS/α-talassemia, 615
Health
Alert Network, 156
Insurance Portability and Accountability Act (HIPA), 8
Level, 7, 139-140
Maintenance Organization Act, 145-146
Helicobacter pylori, 327-328
Helicobacter spp., 1180
Helmintos
intestinal, 1302-1303
cestódeos, 1307-1309
nematódeos, 1303-1309
trematódeos, 1309-1313
tissulares, 1313-1316
cestódeos, 1316-1317
nematódeos, 1313-1316
trematódeos, 1317
Hemaférese, 794-828
citaférese de doação, 796-804
aférese de doação de componentes múltiplos, 801
coleta de células progenitoras hematopoéticas, 801-804
eritroférese, 800-801
leucaférese, 797-800
plaquetaférese, 796-797
complicações doador/paciente, 818-822
distúrbios eletrolíticos e ácido-básico, 819-821
êmbolos de ar, 822
hidroxietilamido e coagulopatia, 822
hipovolemia e reações vasovagais, 822
inibidores de ACE, 821-822
reações alérgicas, anafilactoides e anafiláticas, 821
definições, 794
indicações para, 804-818
plasmaférese, 804
princípios básicos, 795-796
Hemaglutinação, 751-753, 915-917
fatores que afetam a, 751-752
gradação das reações, 752-753
Hematócrito, 330, 538-539
exame macroscópico, 538
quantificação pelo micrométodo, 538-539

Hematogônias, 562
Hematologia, resultados anormais, 90-95
  anemias, 90-93
  anomalias quantitativas de leucócitos, 93-94
  distúrbios de coagulação, 94-95
Hematoma subdural, 500
Hematopoese, 566-588
  após o nascimento, 569
  basófilos *ver* Basófilos
  células-tronco, 566-569
    e células progenitoras hematopoéticas, 567
    fatores de crescimento hematopoéticos, 568-569
    moléculas de adesão, 569
  destruição de eritrócitos, 573-574
  destruição total de eritrócitos ou hemoglobina, 574
  embrionária e fetal, 569
  eosinófilos *ver* Eosinófilos
  eritrocinética, 574-575
  porfirias, 575-577
    coproporfiria hereditária, 576-577
    porfiria cutânea tardia, 576-577
    porfiria eritropoética congênita, 576-577
    porfiria intermitente aguda, 576-577
    porfiria variegada, 576-577
  produção de eritrócitos, 569-573
    efetiva, 574-575
    estrutura e função da hemoglobina, 572-573
    maturação megaloblástica, 571
    maturação normoblástica, 569-571
    regulação da, 571
    síntese de hemoglobina, 571-572
  produção total de eritrócitos ou hemoglobina, 574
  sobrevida efetiva de eritrócitos no sangue, 575
Hematúria, 472-473
  causas, 473
Heme, síntese, 571-572
Hemocitômetro, 540-541
Hemocromatose, 1027-1028
  diagnóstico genético, 1515-1516
Hemofilia, 852-854
  avaliação de portadores, 853
  classificação, 853
  complicações do tratamento, 853-854
  tratamento, 853
Hemoflagelados, 1289-1291
  leishmania, 1291
  tripanossoma, 1290-1291
Hemoglobina(s), 535-538
  celular média, 539
  cilindros, 485-486
  degradação, 573-574
  derivados
    carboxiemoglobina, 536-537
    metemoglobina, 535-536
    sulfemoglobina, 536
  destruição, 573-574, 604-605
  determinação espectrofotométrica, 538
  estrutura e função, 572-573
  fetal *ver* HbF
  glicosilada, 223, 609
  hemoglobinometria, erros na, 538
  Lepore, 620
  método da ciano-hemoglobina, 537
  síntese, 571-574
  ver também Hb
Hemoglobinopatia de alta afinidade pelo oxigênio, 617, 632
Hemoglobinúria, 472-473
  da marcha, 626
  paroxística fria, 628-630, 770, 981
  paroxística noturna, 601, 607, 981
    citometria de fluxo, 714
Hemólise, 309, 603-605
  adquirida, 625-630
    agentes físicos, 626
    agentes infecciosos, 627
    agentes químicos, 625-626
    anemias hemolíticas imunes, 627-628
  deficiência de piruvato quinase, 625
  destruição de hemoglobina, 604-605
  distúrbios de membrana
    eliptocitose hereditária, 606
    esferocitose hereditária, 605-606
    estomatocitose hereditária, 606-607
    hemoglobinúria paroxística noturna, 607
  distúrbios metabólicos, 622-625
    deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, 623-624
    metabolismo eritrocitário, 622-623
  extravascular, 720
  intravascular, 720
  não imune, 789
  pirimidina-5'-nucleotidase, 625
  sobrevida de eritrócitos, 604
  traumática, 626
Hemopexina, 279
Hemorragia
  intracraniana, 500
  subaracnóidea, 500
Hemossiderina
  cilindros, 486
  cristais, 485
  na urina, 472
Hemostasia, 843-852
  distúrbios, 849
  ensaios, 849-851
  fisiológica *versus* ensaios clínicos, 848-849
  iniciação da, 848
  interpretação dos testes de triagem, 851
  laboratório clínico, 848
  papel das plaquetas na, 844-845
    agregação e secreção, 866-868
    ativação plaquetária, 862-864
    coagulação, 868-869
    função, 864-866
    vias de sinalização intracelular, 869
  papel do endotélio na, 844-845
  sistema(s)
    de proteínas de anticoagulação, 846-848
    de proteínas de coagulação, 845-846
    fibrinolítico, 846
Heparina, 94-95, 897-900
  de baixo peso molecular, 898
  efeitos sobre testes sanguíneos, 29
  trombocitopenia induzida por heparina, 871, 898-900
Hepatite, 319-320, 790, 1131-1134
  A, 317
  alcoólica, 321
  autoimune, 1085-1086
    marcadores séricos, 317
  B, 11, 317-319, 1127, 1331-1332
  C, 319-320, 1331-1332
  crônica, 321
  D, 320
  E, 320
  G, 320
  marcadores virais, 317-320
Herança, 1002
Heroína, 358-359
  estrutura, 356
Herpes simples, 1125-1127, 1331-1332
  detecção direta, 1119
  isolamento em cultura de células, 1117-1119
Heterophyes hetrophyes, 1310
Heterozigoto, 1002
Hialômero, 559
Hiato aniônico, 98-99
Hibridização
  de oligonucleotídeos sequência-específicos, 1010-1011
  in situ por fluorescência, 1435-1436
    multicolorida, 1404-1405
    sensibilidade, 1404-1405
    técnica, 1401-1405
    teste de DNA celular para câncer, 1559-1560
  por *Southern blot*, 1472
    rearranjos genéticos de receptor de antígeno, 1481-1485
Hibridização de ácido nucleico, 1401-1405
  amostra, 1402
  detecção dos híbridos, 1402-1403
  formatos, 1403-1045
    fase líquida ou solução, 1403
    fase sólida, 1403
    hibridização *dot/blot*, 1404
    hibridização *in situ*, 1404-1405
    hibridizações *Southern* e *Northern*, 1404
    microarrays, 1404
  pares de bases complementares, 1402
  sonda, 1401-1402
Hidatidose, 1317
Hidrolases, 287
Hidropsia fetal da Hb de Bart, 621
Hidroxiapatita de cálcio, 515
Hidroxicobalamina *ver* Vitamina B_{12}
Hill-Burton Act, 145
Hiperaldosteronismo, 97
  causas, 420-421
  primário, 420
  secundário, 182-183
Hiperamilasemia, 328-329
Hiperbilirrubinemia, 322-323
Hipercalcemia, 98, 204-206
  associada à malignidade, 206
  causas, 205
Hipercalciúria, 493-494
Hipercalemia, 97
  causas e patogênese, 183-184
  diagnóstico diferencial, 184
Hipercarbia, 99
Hipercolesterolemia
  familiar, 249
  poligênica (não familiar), 249
Hipercortisolismo, 103
Hipercrômico, 550
Hiperfosfatemia, 208
Hipergamaglobulinemia policlonal, 963
Hiperglicemia
  e hiponatremia, 186
  efeito sobre o sódio sérico, 174
Hiper-hidratação, 95-96
Hiper-homocisteinemia, 892
Hiperimunoglobulinemia, 963-964
  monoclonal, 963
  policlonal, 964
Hiperinsulinismo, endógeno, 226
Hiperleucocitose, 807
Hiperlipidemia combinada familiar, 25
Hiperlipoproteinemia de tipo 1, 251
Hipermagnesemia, 208
Hipermetilação de promotor, 1559
Hipernatremia, 96-97
  causas e patogênese, 187-188
Hiperoxalúria, 494
Hiperparatireoidismo
  primário, 205, 208
  secundário, 205-206, 208
  terciário, 206, 208
Hiperplasia
  suprarrenal
    congênita, 406, 1028
    lipoide congênita, 410, 412
  lipoide, 406
Hiperprolactinemia, 385, 434
Hiperquilomicronemia, 251
Hipersensibilidade imediata, 1096-1100
  células e mediadores, 1099-1100
  fenótipo alérgico, 1096-1100
  IgE, 1098-1099
  regulação da síntese de IgE, 1097-1098
  testes para, 1107
Hipertensão, induzida pela renina, 418-420
Hipertireoxinemia eutireóidea, 396
Hipertônico, 175-176
Hipertrigliceridemia, 247
  familiar, 251
Hiperuricúria, 494
Hipoaldosteronismo
  hiporrenina, 421
  hiporreninêmico, 184
Hipoalfalipoproteinemia familiar, 252
Hipobetalipoproteinemia, 252
Hipocalcemia, 98, 207
Hipocalemia, 97
  causas e patogênese, 182-183
  diagnóstico diferencial, 183
Hipocrômico, 550
Hipofibrinólise, 890
Hipófise, 383-391
  hormônios, 384
    deficiência, 384
    hormônio antidiurético, 388-391
    hormônio de crescimento, 386-388
    ocitocina, 388
    prolactina, 385-3866
  tumores, 383-84, 385

Hipofosfatemia, 208
Hipogamaglobulinemia, 281-282
Hipoglicemia, 100, 217, 224
  alimentar, 226-227
  autoimune, 226
  hiperinsulinêmica persistente da infância, 226
Hipogonadismo masculino, 433
Hipomagnesemia, 209
Hiponatremia, 95-96
  avaliação, 392
  causas e patogênese, 186-187
  classificação, 187
Hipoparatireoidismo, 207
Hipoproteinemia, 280-281
Hipotireoidismo, 91, 393-394
Hipotônico, 174
Hipovolemia, induzida por hemaférese, 822
Hirudina, 900
Histiócitos, LCE, 502
Histiocitose de Langerhans, 689-690
Histoplasma capsulatum, 1331
Histoplasma spp., 1252-1254
  diagnóstico laboratorial, 1253-1254
  doenças clínicas, 1252-1253
  fatores de risco, 1252
  patologia, 1253
HIV, 511-512, 789, 1029, 1126-1127, 1331-1332
HLA
  compatibilidade, 1012-1015
  detecção de polimorfismo, 1010-1012
    detecção celular de moléculas de classe II, 1012
    detecção sorológica de moléculas de classes I e II, 1012
    tipagem dos alelos de classes I e II baseada no DNA, 1010-1012
  nomenclatura, 1009-1010
    designações de alelos baseadas no DNA, 1009-1010
    especificidades sorológicas e celulares, 1009
  reação cruzada para transplante de células progenitoras, 1017
  ver também Complexo Principal de Histocompatibilidade
HLA-A, 1003-1006
HLA-B, 1003-1006
HLA-C, 1003-1006
HLA-DP, 1006-1008
HLA-DQ, 1006-1008
HLA-DR, 1006-1008
HLA-E, 1006
HLA-F, 1006
HLA-G, 1005-1006
Homeostasia hídrica, 390
Homocisteína, 262-263
  ensaio, 595
  variabilidade biológica, 80
Homocistinúria, 497
Homozigoto, 1002
Hormônio
  estimulador da tireoide, 384, 395-396
  folículo-estimulante, 384, 429-430
  liberador
    de corticotropina, 413
    de gonadotrofina, 429
  luteinizante, 384, 429
Hormônio antidiurético, 174, 383, 388-391
  diabetes insípido, 389-390
  regulação da liberação, 184
  síndrome da secreção inadequada de ADH, 96, 187, 390-391
Hormônio do crescimento, 384, 386-388
  deficiência, 387
  excesso, 387-388
HPLC de troca catiônica, 609
Hymenolepis
  diminuta, 1309
  nana, 1308-1309

I

Icterícia
  achados na urina, 475
  achados nas fezes, 475
Ictiose, 1451
Idade, 25-26
  e resposta imune, 940
Idaparinux, 900-901
Identificação da amostra, 134-135
Identificação de paciente positivo, 131-133
Ilhas eritroblásticas, 571
Ilhotas de Langerhans, 216
Imagem assistida por computador, 1434-1435
Imipramina, 374
Immunoblotting, 1060-1061
Impedância, 51
  elétrica, 546-547
Implementação, 137-138
Imunidade adquirida
  papel do complemento, 978
Imunidade celular, 938-955
  critérios clínicos para avaliação, 939-941
    efeito da idade sobre a resposta imune, 940
Imunidade humoral, 956-970
  anticorpos *ver* Anticorpos
  diagnóstico da doença, 965-970
    bandas de imunoglobulinas oligoclonais no LCE, 968-969
    imunoeletroforese, 966
    imunofixação, 966
    prevenção da doença e terapia, 969-970
    teste de crioglobulina, 966-967
  imunoglobulinas *ver* Imunoglobulinas
Imuno-hematologia, 717-774
  anticorpos para grupo sanguíneo, 718-719
    aloanticorpos e autoanticorpos para grupo sanguíneo, 719
    imunoglobulinas e ligação ao antígeno, 718
antígenos de grupo sanguíneo, 717-718
  características químicas, 718
  densidade antigênica, 718
  imunogenicidade, 718
antígenos eritrocitários e anticorpos, 721-751
  sistema de grupo sanguíneo ABO, 721-724
  sistema de grupo sanguíneo Cartwright, 743-744
  sistema de grupo sanguíneo Chido/Rodgers, 746-747
  sistema de grupo sanguíneo Colton, 745-746
  sistema de grupo sanguíneo Cromer, 748-749
  sistema de grupo sanguíneo Diego, 741-743
  sistema de grupo sanguíneo Dombrock, 744-745
  sistema de grupo sanguíneo Duffy, 739-741
  sistema de grupo sanguíneo Gerbich, 747-748
  sistema de grupo sanguíneo GIL, 751
  sistema de grupo sanguíneo I, 750-751
  sistema de grupo sanguíneo Indian, 749-750
  sistema de grupo sanguíneo JMH, 750
  sistema de grupo sanguíneo Kell e Kx, 735-738
  sistema de grupo sanguíneo Kidd, 741
  sistema de grupo sanguíneo Knops, 749
  sistema de grupo sanguíneo Lewis, 738-739
  sistema de grupo sanguíneo Lutheran, 734-735
  sistema de grupo sanguíneo LW, 746
  sistema de grupo sanguíneo MNSs, 724-727
  sistema de grupo sanguíneo OK, 750
  sistema de grupo sanguíneo P, 727-729
  sistema de grupo sanguíneo RAPH, 750
  sistema de grupo sanguíneo Rh, 729-734
  sistema de grupo sanguíneo Scianna, 744
  sistema de grupo sanguíneo Xg, 744
  sistema complemento e banco de sangue, 719-721
  testes e procedimentos, 751-771
    anemia hemolítica autoimune, 768-771
    detecção de anticorpos, 758-764
    hemaglutinação, 751-753
    técnicas de identificação de anticorpos, 764-768
    teste de antiglobulina humana, 753-755
    teste de compatibilidade, 755-758
Imunodeficiência, 939-940
Imunoeletroforese, 966
Imunoensaio(s)
  automação instrumental, 930-932
    amostragem e distribuição de líquidos, 931
    considerações sobre o fluxo prático, 930-931
    cubeta de reação, 931
    separação de moléculas ligadas/fixas e sistemas de lavagem, 931
    sistemas de ensaio heterogêneo, 930
    sistemas modulares, 932
    transporte, 931
  características da fase sólida, 914
  classes de, 912-913
  colorimétrico, 923
  com doador de enzima clonado, 926
  com microarranjos para analitos múltiplos, 934
  com precipitina, 915-919
  conjugação química, 913
  de aglutinação de partículas, 914
  de contagem de partículas, 919
  de precipitação, 913
  de proteção de fluorescência, 929
  de quimioluminescência, 913, 923-924, 929-930
  de reativação com apoenzima, 925
  de transferência de fluorescência por excitação, 928-929
  eletroquimioluminescente, 930
  enzimático homogêneo inibitório (EIHIA), 925-926
  fluorescente, 913, 923, 925-929
    com substrato marcado, 925
    ensaio de fluorescência por polarização, 349-351, 928
    ensaio imunofluorimétrico de partição radial, 928
    ensaio imunofluorimétrico de resolução temporal, 928
    fluoroimunométrico, 928
    fundamento e classificação, 925
    heterogêneo, 928
    homogêneo, 928
    imunoensaio de proteção de fluorescência, 929
    imunoensaio de transferência de fluorescência por excitação, 928-929
  homogêneo, 349-351
  imunoensaio enzimático, 921-927
    fundamento e classificação, 921-922
    heterogêneo, 922-924
    homogêneo, 924-927
  imunoquímica, 911-912
  múltiplos simultâneos, 934-935
    ensaio de microcanais com disco compacto, 935
    ensaio MicroSpot, 934-935
    fundamento, 934
    imunoensaio com microarranjos para analitos múltiplos, 935
    imunoensaio por citometria de fluxo, 935
  nefelométricos, 915
  partícula, 913-919
    aglutinação de partículas de gelatina, 917
    aglutinação do látex, 917
    ensaio turbidimétrico com látex, 917
    hemaglutinação, 915-917
    imunoensaio de contagem de partículas, 919
  por citometria de fluxo, 935
  precipitina e nefelométrico, 915-919
  quimioluminescente, 930
    ésteres de acridina como indicadores, 930
    fundamento, 929
    imunoensaio eletroquimioluminescente, 930
  radioimunoensaio, 919-920
  teste rápido, 932-934
    dispositivos de ensaio de fluxo contínuo, 932
    dispositivos imunocromatográficos, 932-933
    tira reagente, 932
Imunoensaio enzimático, 913, 921-927, 1142-1143
  fundamento e classificação, 921-922
  heterogêneo, 922-924
    colorimétrico, 923
    fluorescente, 923
    quimioluminescente, 923-924
  homogêneo, 924-927
    imunoensaio com doador de enzima clonado, 926
    imunoensaio de reativação com apoenzima, 925
    imunoensaio enzimático homogêneo inibitório (EIHIA), 925-926
    imunoensaio fluorescente com substrato marcado, 925
    técnica de imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT), 924-925
Imunofenotipagem, 949-950
Imunofixação, 507, 966
Imunofluorescência indireta, 1057-1059
  padrões citoplasmáticos, 1056
Imunoglobulina A, 962-963
Imunoglobulina D, 963
Imunoglobulina E, 963, 1097-1099
  anticorpos, 1102-1107
  estrutura, 1098-1099
  intervalos de referência séricos, 1101
  propriedades físico-químicas, 1098

quantificação, 1101-1103
aplicações clínicas, 1103-1107
regulação da síntese, 1097-1098
Imunoglobulina G, 961
LCE, 506
subclasses, 1039
Imunoglobulina M, 960-961
cadeia J, 960
Imunoglobulina(s), 718, 909, 960-963, 1038-1039
humana, 960
monoclonal, 964-965
policlonal, 964
propriedades físicas, 960
quantificação, 333
significado clínico, 963-965
crioglobulinas, 965
hiperimunoglobulinemia, 963-964
imunoglobulinas monoclonais, 964-965
variantes, 960
ver também imunoglobulinas individuais
Imunoquímica, 911-912
anticorpos *ver* Anticorpos
antígenos, 911-912
reação antígeno-anticorpo, 911
Imunossupressores, monitoramento de fármacos terapêuticos, 372-373
Incretinas, 218
Incubação, 69-70
Incubadoras a seco, 63
Indicadores acidobásicos, 1583-1584
Índice(s)
de desvio-padrão, 107
de massa corporal, 1586
de refração, 272
eritrocitários, 539
relativo, 257
Infarto do miocárdio, diagnóstico, 101-102
Infecção
anormalidades leucocitárias, 93-94
na gravidez, 442
risco de, 12
Infecções
de ferida, 1366
herpéticas mucocutâneas, 1117-1119
coleta e manipulação da amostra, 1117
detecção direta do herpes simples, 1119
diagnóstico sorológico, 1119
isolamento em cultura de células herpes simples, 1117-1119
por clamídias, 1139-1143
diagnóstico laboratorial, 1142-1143
estrutura, 1139-1140
replicação, 1140
tratamento, 1143
ver também organismos individuais
por micoplasma, 1151-1153
diagnóstico laboratorial, 1152-1153
micoplasmas genitais, 1152-1153
Mycoplasma pneumoniae, 1151-1152
tratamento, 1153
por riquétsias, 1143-1151
Anaplasma, 1147-1149
Bartonella, 1150-1151
como agentes de bioterrorismo, 1146
Coxiella burnetii, 1149-1150
diagnóstico laboratorial, 1146-1147
Ehrlichia, 1148
febre africana transmitida pela mordida do carrapato, 1144-1145
febre botonosa, 1144-1146
febre maculosa das Montanhas Rochosas, 1144-1145
febre maculosa por *R. felis*, 1145
riquetsiose variceliforme, 1145
tifo, 1146
tifo rural, 1147
tratamento, 1147
virais congênita e perinatal, 1124-1127
citomegalovírus, 1125-1126
enterovírus, 1126-1127
herpes simples, 1125, 1127
HIV, 1126-1127
parvovírus, 1126-1127
rubéola, 1125-1126
vírus da hepatite B, 1127
Infecções por espiroqueta, 1206-1222
Anaerobiospirillum succiniciproducens, 1218
Borrelia spp., 1212-1218
doença de Lyme, 1212-1217
febre recidivante, 1217-1218
espiroquetose intestinal, 1218-1219
febre por mordedura de rato, 1218
Leptospira spp., 1211-1212
clínica, 1212
descrição, 1211
diagnóstico laboratorial, 1212
epidemiologia, 1211
patologia e patogênese, 1211-1212
tratamento, 1212
sífilis endêmica, 1208
tratamento, 1211, 1126-1127
Treponema spp., 1207-1211
diagnóstico laboratorial, 1209-1210
framboesia, 1208
pinta, 1208-1209
sífilis, 1207-1208
Infecções virais, 1111-1138
coleta da amostra, 1120-1121
coleta e manipulação da amostra, 1117
coleta e transporte da amostra, 1116
congênita e perinatal, 1124-1127
citomegalovírus, 1125-1126
enterovírus, 1126-1127
herpes simples, 1125-1127
HIV, 1126-1127
parvovírus, 1126-1127
rubéola, 1125-1126
vírus da hepatite B, 1126-1127
crupe, 1120
cultura viral, 1112-1114
detecção
de antígeno viral, 1114-1115
direta do herpes simples, 1119
molecular, 1114-1115
diagnóstico sorológico, 1119
equipamento e suprimentos, 1117
ensaio de antígeno viral, 1121-1122
gastroenterite viral, 1131
hepatite viral e infecção retroviral, 1131-1134
hospedeiros imunocomprometidos, 1134-1135
infecções
cutâneas e exantemas virais, 1128-1131
herpéticas mucocutâneas, 1117-1119
virais do trato respiratório, 1119-1122
influenza, 1119-1120
isolamento
de vírus, 1122
em cultura de células do herpes simples, 1117-1119
meningite e encefalite viral, 1127-1128
metapneumovírus, 112
mononucleose infecciosa e infecções relacionadas, 1122-1124
diagnóstico sorológico, 1123-1124
mononucleose infecciosa heterófila negativa, 1124
síndrome(s)
da fadiga crônica, 1124
infecciosas virais clínicas, 1117
sorologia viral, 1115-1116
variação sazonal, 1112
vírus sincicial respiratório, 1120
Informática, 130-141
coleta e identificação da amostra, 134-135
fluxo de informação, 130-135
padrões de comunicação, 138-141
realização de exames e liberação de resultados, 134-135
registro/identificação do paciente, 131-133
relatório, 135
sistema de informação laboratorial, 136-138
solicitação de exames, 133-134
Ingestão
adequada, 444
dietética de referência, 444-445
Inibição
competitiva, 291
mista, 291
não competitiva, 291-292
Inibidor de C1, 976
ensaio, 984
Inibidores
da coagulação, 848
de ACE, e hemaférese, 821-822
de protease, 279-280
de serina-protease do tipo Kunitz, 848
de trombina diretos, 900
Inibina, 429-430
Insensibilidade parcial a andrógenos, 431
Insetos, 1319-1321
abelhas, vespas e formigas, 1320
baratas, 1318-1320
besouros, 1320
mariposas e borboletas, 1320
moscas e mosquitos, 1320-1321
percevejos e barbeiros, 1320
piolhos, 1319
pulgas, 1319
Instrumentação, 37-64
citometria de fluxo, 49-50
condutância, 51
contador de cintilação, 56-57
cromatografia, 52-55
eletroforese capilar, 57-58
eletroforese e densitometria, 51-52
eletroquímica, 50-51
espectrofotometria, 37-45
espectrometria de massa, 55-56
espectroscopia de luminescência molecular, 46-47
espectroscopia de ressonância magnética nuclear, 58
focagem isoelétrica, 52
impedância, 51
nefelometria e turbidimetria, 47-48
osmometria, 48-49
reflectometria, 45-46
refratometria, 48
Instrumentos para contagem celular, 546-548
citoquímica, 547
condutividade por radiofrequência, 547
contagem de reticulócitos automatizada, 548
descrição/sinalização, 547-548
dispersão da luz, 547
impedância elétrica, 546-547
Insuficiência
suprarrenal, 416-417
cardíaca, 256-257
cardíaca congestiva, 102
marcadores, 263-264
hepática aguda fulminante, 101, 323-324
hepática fulminante, 323-324
renal, 462-463
anemia da, 91, 93
níveis de minerais na, 208
tubular seminífera, 431-432
Insulina, 216-217
variabilidade biológica, 80
Insulinoma, 336
Integração, 21-22
Integrinas, 992-993
Interação antígeno-anticorpo, 958
Interferon-γ, 992
líquido pericárdico, 523
líquido pleural, 518, 520
Interleucina-1, 985
Interleucina-2, 985-986
Interleucina-3, 568, 986
Interleucina-4, 986
Interleucina-5, 568, 986
Interleucina-6, 568, 986-987
Interleucina-7, 987
Interleucina-8, 987-988
líquido peritoneal, 526
Interleucina-9, 568, 988
Interleucina-10, 988
Interleucina-11, 568, 988-989
Interleucina-12, 989
Interleucina-13, 989
Interleucina-14, 989
Interleucina-15, 989-990
Interleucina-16, 990
Interleucina-17, 990
Interleucina-18, 990
Interleucina-19, 990
Interleucina-20, 990
Interleucina-21, 991
Interleucina-22, 991

Interleucina-23, 991
Interleucina-25, 991
Interleucina-26, 991
Interleucina-27, 991
Internal Revenue Service, 150
International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 58
Intervalo(s)
  de confiança, 107
  de referência, 79-81, 113-114
  osmótico fecal, 333
Intolerância
  à frutose, hereditária, 227
  à lactose, 327
Intoxicação por 25(OH)D, 208
  investigações de primeiro nível, história clínica, exame físico e contagem sanguínea inicial, 1037-1038
    funções pulmonares, 1039
    imagem radiológica, 1039
    imunoglobulinas, 1038-1039
  investigações de segundo nível
    avaliação do complemento, 1041
    avaliação funcional da célula T, 1040
    imunidade mediada por células T, 1039-1040
    produção de anticorpos, 1039
    subclasses de Ig, 1039
  investigações de terceiro nível
    análises da fagocitose, 1042
    citocinas e receptores de citocinas, 1042
    ensaios para células *natural killer,* 1041
    genética molecular e diagnóstico pré-natal, 1043
    marcadores de superfície celular, 1042-1043
    produção de anticorpo, 1043
    quantificação de enzimas, 1041
Iodamoeba bütschlii, 1294, 1296-1298, 1301
Iodo, 394, 450
  deficiência, 451
  função, 451
  propriedades, 452
  toxicidade, 451
  urinário, quantificação, 398
Ionização por dessorção a laser de superfície melhorada, 55
Isoamilase, 338-339
Isocromossomos, 1443-1444
Isomerases, 287
Isoprostanas F2, LCE, 509
Isospora belli, 1294, 1300
Isosporíase, 1324
Isotônico, 176
Isozimas, 287

J

Jejum, quantificação de lipídeos, 240
Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO), 10

K

Kingella spp., 1183
Klebsiella pneumoniae, 1331
K_m, 293

L

β-lipoproteína, 276
Laboratório(s)
  aberto, 7
  centrais, 7
  de consultório médico, 74-78
  de criminalística, teste de DNA em, 1525
  de referência, 7, 131
    testes por, 21
  de teste rápido, 7, 74-78
    contratação de funcionários, 76
    protocolo recomendado, 77
  fechados, 7
  regionais, 7
  sem mercúrio, 62
  sentinela, 156
  stat, 6-7
Laboratório de diagnóstico molecular, 1455-1469
  acreditação laboratorial, 1468
    garantia da qualidade, 1468
  controle de contaminação, 1457
  controle de qualidade, 1466-1468
    do equipamento, 1467
  equipamento, 1457, 1461
  equipe, 1458-1460
    certificação, 1458-1460
    diretor do laboratório, 1458
    residentes, bolsistas e estudantes de graduação, 1458
    supervisor técnico, 1458
    tecnólogos médicos e técnicos de biologia molecular, 1458
  formas de teste clínico, 1460-1461
    métodos manuais à base de *kit,* 1460
    plataformas automatizadas para testes moleculares, 1460-1461
    testes desenvolvidos no laboratório, 1460
  planejamento, 1456-1457
  seleção do teste, 1461-1462
    aspectos relacionados a patentes, 1463
    reembolso, 1462-1463
  validação analítica e clínica dos testes, 1463-1466
    reagentes analito-específicos, 1465-1466
    teste genético, 1466
Laboratório de nível A
  papel no terrorismo biológico, 156
    designações laboratoriais, 156
    questões envolvendo segurança, 156
    questões legais, 156-157
  papel no terrorismo nuclear, 168
  papel no terrorismo químico, 166-167
Laboratory Response Network, 1372-1387
  Burkholderia mallei e *Burkholderia pseudomallei,* 1376-1378
  classificação, 1376-1378
  Coxiella burnetii, 1378-1380
  diretrizes para a expedição e manuseio de materiais infecciosos, 1373
  Francisella tularensis, 1380-1382
  responsabilidade do laboratório clínico, 1373
  vírus desconhecidos, 1382-1384
Lactato
  critérios para aceitação, 122-123
  desidrogenase, 27, 287-288, 301-303, 516
    bioquímica e fisiologia, 301-302
    critérios para aceitação, 122-123
    intervalos de referência, 301
    líquido peritoneal, 525-526
    mecanismo de liberação, 314-315
    quantificação, 302
    resultados anormais, 302-303
    variabilidade biológica, 80
    variação pré-analítica, 301
  LCE, 508-509
  líquido
    peritoneal, 526
    pleural, 520
Lactógeno placental humano, 430
Lactosúria, 469
Lactotrofos, 383-384
  tumores de, 385
Lacunas de Howship, 205
Lamotrigina, 368
Larva migrans, 1315
Lavagens peritoneais, 524
Laxantes, 331
LCE *ver* Líquido cerebrospinal
LDL, 234-236
Lecitina: colesterol aciltransferase, 236, 238, 253
Lectinas, 767
Leflunamida, 373
Legionella spp., 1183-1184
Legislação, 7-8
Lei
  de Beer-Lambert, 39-40
  de Michaelis-Menten, 289, 292-293
Leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais, 1512
Leishmaniose, 1291, 1324
  cutânea, 1291
  diagnóstico, 1291
  mucocutânea, 1291
  visceral, 1291
Leptospira spp., 1211-1212
  clínica, 1212
  descrição, 1211
  diagnóstico laboratorial, 1212
  epidemiologia, 1211
  patologia e patogênese, 1211-1212
  tratamento, 1212
Lesão cardíaca, 255-267
Lesão hepática, 314-320
  α-fetoproteína, 316
  induzida por álcool, 311
  marcadores autoimunes, 316-317
  marcadores de infecção pelo vírus da hepatite, 317-320
    hepatite A, 317
    hepatite B, 317-319
    hepatite C, 319-320
    hepatite D, 320
    hepatite E, 320
    hepatite G, 320
  níveis de enzimas plasmáticas, 314-316
    lesão canalicular, 315-316
    liberação de enzimas, 314-315
    localização celular das enzimas, 314
Lesão miocárdica, marcadores da, 257-261
  albumina modificada por isquemia, 259
  anidrase carbônica III, 258
  diagnóstico da síndrome coronariana aguda, 260
  ensaio de CK-MB massa, 257
  evolução histórica, 257
  glicogênio fosforilase, 258
  isoformas de creatina quinase, 259
  mioglobina, 258
  miosina, 259
  procedimentos do ensaio, 259-260
  proteína ligadora de ácidos graxos cardíaca, 259
  troponina cardíaca, 257-258
Lesão musculoesquelética, 303-304
Lesão pulmonar aguda associada à transfusão (TRALI), 787-788
Lesões
  hepáticas que ocupam espaço, 323
  por picada de agulha, 11
Leucaférese, 794, 797-800
  aspectos associados ao doador, 799-800
  estimulação do doador, 798-799
  indicações para, 807
  procedimento de coleta, 799
  requisitos para o, 798
  seleção do doador, 798
  transfusões de granulócito, 797-798
Leucemia
  basofílica aguda, 666
  bifenotípica, 667
  bilinear aguda, 667
  de células *killer,* 681
  de células pilosas, 671
    citometria de fluxo, 711
  de linfócitos grandes granulares, 681
  de plasmócitos, 674
  diagnóstico molecular, 1471-1481
  eosinofílica crônica, 655
  indiferenciada, 667
  linfoblástica de precursor de células B, 667-668
  linfoblástica de precursor de células T, 668-669
  megacarioblástica aguda, 666
  mieloblástica aguda, 504
  mielógena crônica, 94, 653-655
  mieloide crônica, atípica, 659
  mielomonocítica aguda, 709
  mielomonocítica crônica, 658-659
  mielomonocítica juvenil, 659
  neutrofílica crônica, 655
  pró-linfocítica de células B, 669-671
  pró-linfocítica de células T, 680
  reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa, 1471-1472
  translocações na, 1473
ver também tipos individuais de leucemia
Leucemia aguda, 879
  bilinear, 867
  citometria de fluxo, 703-706
    alvos terapêuticos, 705-706
    diagnóstico e classificação, 703-705
    fatores prognósticos, 705
    monitoramento da doença residual, 706
  indiferenciada, 667
Leucemia linfoblástica aguda, 504
  diagnóstico molecular, 1472-1474, 1477-1480

pediátrica, 1477-1479
perfil de expressão gênica, 1492-1494
Leucemia linfocítica
crônica, 94, 520, 1446
citometria de fluxo, 710
perfil de expressão gênica, 1493-1494
crônica/linfoma linfocítico pequeno, 669
pequena, 1446
Leucemia mieloide aguda, 661-667, 1446
anormalidades genéticas recorrentes, 662-663
aspectos clínicos e laboratoriais, 661
associada a agente alquilante, 664
características principais, 662
citometria de fluxo, 707
com displasia de múltiplas linhagens, 664
relacionadas à terapia, 664
diagnóstico molecular, 1474-1477
linhagem ambígua, 677
marcadores prognósticos, 1577
não classificada, 664-667
perfil de expressão gênica, 1492-1494
Leucemia mieloide crônica, diagnóstico molecular, 1471-1474
Leucemia pró-mielocítica aguda, 663
citometria de fluxo, 708
diagnóstico molecular, 1475-1476
Leucemia/linfoma de células T do adulto, 682
Leucócitos, 554-559, 637-639
alterações degenerativas, 557-558
artefatos, 559
células contraídas, 558
células endoteliais, 558
células rompidas, 577
fecais, 333, 344
na urina, 481-482
normalmente presentes, 555-557
pseudofagocitose, 558
segmentação nuclear radial, 558
vacuolização, 558
variação fisiológica, 544-545
ver também tipos individuais
Leucocitose, 93-94
fisiológica, 639
patológica, 639-640
Leveduras, 490
morfologia, 1246
ver também Doenças micóticas
Liases, 287
Liderança, 3-6
características, 4
Lidocaína, 364-365
Ligação do antígeno, 718
Ligações dissulfeto, 269
Ligante
de kit, 486
Flt-3, 568
Ligases, 287
Linfadenopatia transmitida pelo carrapato, 1145
Linfocitopenia, 651-652
Linfócitos, 556-557, 583-587
ativação e proliferação, 945-946
células B *ver* Linfócitos B
células *natural killer*, 586
células T *ver* Linfócitos T
urina, 482
distúrbios funcionais, 652
função e fisiologia, 586-587
imunofenotipagem, 943
LCE, 502-503
líquido pleural, 519
medula óssea, 562
normal, 647
tecido linfoide
primário, 583-586
secundário, 586
Linfócitos B, 583-587, 908
anticorpos, 1015-1016
diferenciação, 703
Linfócitos T, 585, 907-908
ativação e proliferação, 945-946
avaliação funcional, 1040
diferenciação, 703
imunidade, 1039-1040
Linfocitose, 647-651
citomegalovírus, 650
coqueluche, 648
crônica, 648
doenças e condições associadas a retrovírus, 648
infecciosa aguda, 647-648
mononucleose infecciosa e vírus Eipstein-Barr, 648-650
toxoplasmose, 651
Linfoma
alvos terapêuticos, 712
angioimunoblástico de células T, 684
associado à infecção pelo HIV, 688
blástico de células NK, 683
Burkitt, 679, 1446, 1489
atípico, 679
células anaplásicas grandes, 685
células B, 1486-1487
células de revestimento, 677, 1487
citometria de fluxo, 710
células T anaplásicas grandes, 1489-1490
células T hepatoesplênico, 683
células T/NK periféricas, 684-685
células T tipo paniculite subcutânea, 683
centro folicular difuso, 677
citometria de fluxo, 706-713
de células B da zona marginal (MALT), 674-675, 1446
de células B da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa, 674-675
de células T do tipo enteropático, 682-683
de células T tipo paniculite, 683
de células T/NK extranodal, tipo nasal, 682
de grandes células B intravascular, 678
de grandes células B mediastínicas (tímicas), 678
de grandes células B rico em células T/histiócitos, 678
detecção de doença residual mínima, 712-713
diagnóstico e classificação, 706-712
diagnóstico molecular, 1481-1490
difuso, 1488-1489
e arranjos genéticos de receptor de antígeno, 1481-1485
efusão primária, 678-679
fatores prognósticos, 712
folicular, 676-677, 1446
citometria de fluxo, 711
marcadores prognósticos, 1577
fundamento da análise genética molecular, 1481
grandes células B difuso, 677-678
marcadores prognósticos, 1576-1577
grandes células B intravascular, 678
grandes células B mediastínicas (tímicas), 678
grandes células B rico em células T/histiócitos, 678
Hodgkin, 686-688
celularidade mista, 687
depleção de linfócitos, 687-688
esclerose nodular, 687
nodular com predominância linfocítica, 686-687
linfoblástico, 667-669
linfocítico pequeno, 669
linfoplasmocítico, 672
marcadores prognósticos, 1577
translocações cromossômicas, 1485-1490
zona marginal
esplênico, 675
extranodal, 674-675,1488
nodal, 675
Linfoma não Hodgkin, 504, 520
diagnóstico molecular, 1481-1490
fundamento da análise genética molecular, 1481
rearranjos genéticos de receptor de antígeno, 1481-1485
translocações cromossômicas, 1485-1490
linfoma de Burkitt, 679, 1446, 1489
atípico, 679-80
linfomas de células B, 1486-1487
difuso, 1488-1489
zona marginal extranodal, 1488
linfoma de células de revestimento, 677, 1487
linfoma de células T anaplásicas grandes, 1489-1490
perfil de expressão gênica, 1493-1494
Linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células B, 667-668, 1446
citometria de fluxo, 706
Linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células T, 668-669, 1446
Lipase, 329-330, 337-338
endotelial, 237-238
hepática, 238
deficiência, 252
Lipídeos, 311
classificação de Fredrickson, 249
e doença, 248-253
líquido
pericárdico, 523
pleural, 521
sinovial, 517
quantificação, 239-246
transporte, 237-239
Lipidúria, 462
Lipoproteína (a), 236
detecção de, 245-246
Lipoproteína(s), 233-237
"β flutuante", 236
de alta densidade, 234, 236
alta concentração isolada, 253
baixa concentração isolada, 252-253
de baixa densidade *ver* LDL
de densidade
intermediária, 234-236
muito baixa *ver* VLDL
e doença, 248-253
lipase, 237-238
deficiência, 251
Lipoproteína (X), 236
classificação de Fredrickson, 249
metabolismo, 235-239
quantificação, 243-245
coleta e armazenamento de sangue, 239-241
métodos de precipitação com poliânions, 243
métodos de ultracentrifugação, 243
métodos eletroforéticos, 243
variação fisiológica, 240
Líquido cerebrospinal, 33, 499-512, 1354-1355
análise bioquímica, 504-510
coleta da amostra, 1354
e pressão de abertura, 499-500
cor do sobrenadante, 501
exame
macroscópico, 500-501
microbiológico, 510-512
exame microscópico, 501-504
contagem celular diferencial, 502-504
contagem celular total, 501-502
indicações e testes recomendados, 500
plasmacitose, 503
pleocitose eosinofílica, 503
processamento da amostra, 1354-1356
transporte da amostra, 1354
valores de referência, 505
Líquido extracelular, 288-289
concentrações de eletrólitos, 173
volume, 174-176
Líquido intracelular, 288-289
concentrações de eletrólitos, 173
Líquido pericárdico, 34, 522-523
análise bioquímica, 522-23
coleta da amostra, 522
estudos imunológicos, 523
exame
macroscópico, 522
microbiológico, 523
microscópico, 522
exsudatos e transudatos, 522
Líquido peritoneal, 34, 523-527
análise bioquímica, 525-526
coleta da amostra, 525
exame
macroscópico, 525
microbiológico, 526-527
microscópico, 525
testes recomendados, 524
transudatos e exsudatos, 523-524
Líquido pleural, 34, 517-22
análise bioquímica, 520-521
coleta da amostra, 517
estudos imunológicos, 521
exame
macroscópico, 518-519
microbiológico, 521-522
microscópico, 519-520

testes recomendados, 518
transudatos e exsudatos, 517
Líquido sinovial, 33-34, 512-517
análise bioquímica, 516-517
coleta da amostra, 513
estudos imunológicos, 517
exame
macroscópico, 513-514
microbiológico, 517
exame microscópico, 514-516
contagem de células total, 514
contagem de leucócitos diferencial, 514
exame de cristais, 514-516
intervalos de referência, 516
testes recomendados, 513
Líquidos corporais, 171-173
composição, 172-173
extracelular, 172
intracelular, 172-173
obtenção da amostra para detecção de patógenos, 1354-1356
volume, 171-172
extracelular, 174-176
Lisossomos, 861
Lisozima, LCE, 509
Lissencefalia, 1451
Listeria monocytogenes, 1331
Listeria spp., 1166-1167
Lítio, 318, 450
LMA associada a agente alquilante, 664
LMA relacionada ao inibidor de topoisomerase II, 664
LMA *ver* Leucemia mieloide aguda
Loa loa, 1313
Locus, 1002
Lod score, 1030-1031
Logical Observation Identifier Names and Codes (LOINC), 140
Lovastatina, 248
Lúpus
bolhoso, 1082-1083
eritematoso, 1083-1084
sistêmico, 1046-1051
autoanticorpos no, 1048
critérios para o diagnóstico, 1047
etiologia, 1047
induzido por fármacos, 1050-1051
lúpus discoide crônico, 1050

M

α_2-macroglobulina, 276
LCE, 507
β_2-microglobulina, 1540-1541
LCE, 507
Má absorção
de metionina, 462
entérica, 334-335
gordura, 334-335
testes para, 342-343
Má digestão hepática, 334-335
Maconha, 361
Macroamilasemia, 328-329
Macroarranjos, 1420
Macrócitos, 551
Macrocitose, 592
Macrófagos, 581-582
distribuição e cinética, 582
função, 582
líquido sinovial, 514
morfologia, 581-582
Macroglobulinemia de Waldenström, 672, 1446
plasmaférese, 815-817
Macrotrombocitopenia, 865
Magnésio, 200-201
critérios para aceitação, 122-123
fisiologia, 200-201
hipermagnesemia, 208
hipomagnesemia, 209
homeostasia, 200
intervalo de referência, 201
ionizado, 201
técnicas analíticas, 200
total, 201
Malária, 790, 1282-1289
ciclo de vida, 1282-1283
diagnóstico, 1286-1289
doença clínica, 1284-1286
epidemiologia, 1283-1284
Malassezia spp., 1251
diagnóstico laboratorial, 1251-1252
fatores de risco, 1251
infecção sistêmica, 1251
patologia, 1251
pitiríase versicolor, 1251
Malignidades *ver* Câncer
Manganês, 450
deficiência, 451
função, 451
propriedades, 452
toxicidade, 451
Mansonella spp., 1313
Mapeamento da amostra, 12-13
Mapeamento de tarefa, 18
Mapeamento do exame, 14-15
Marcadores
autoimunes, 316-317
de cromossomo X, 1523-1524
de cromossomo Y, 1523-1524
de formação óssea, 210
de reabsorção óssea, 209-210
genéticos
análise de identidade, 1521
doença gastrintestinal, 346-347
inflamatórios, 102
Marcadores moleculares diagnósticos
câncer de pulmão, 1578
genômicos, 1576-1578
câncer de mama, 1577-1578
leucemia mieloide aguda, 1577
linfoma de grandes células B difuso, 1576-1577
linfoma folicular, 1577
Marcadores tumorais
definidos por anticorpos monoclonais, 1536
LCE, 510
líquido
peritoneal, 526
pleural, 521
Marcadores tumorais séricos, 1533-1548
aplicações clínicas, 1536-1537
classificação funcional, 1534-1536
marcadores tumorais definidos por anticorpos monoclonais, 1536
moléculas de adesão e metástase, 1535
oncoproteínas, 1535
marcadores individuais, 1538-1545
α-fetoproteína, 1538
β_2-microglobulina, 1540-, 1541
antígeno carcinoembrionário, 1541
antígeno prostático específico, 1543-1544
CA 15-3 e CA 27-29, 1541
CA 19-9, CA 50 e CA 19-5, 1541-1542
CA 72-4, 1542
CA 125, 1542
calcitonina, 1542
cromogranina A, 1542
fatores angiogênicos, 1538-1541
fragmento de citoqueratina 19, 1542
gonadotrofina coriônica humana, 1542-1543
oncoproteína HER2/*neu* (c-erB-2), 1543
p53, 1543
peptídeo relacionado ao paratormônio, 1543
perspectivas futuras, 1546
recomendações para solicitação dos testes, 1537-1538
teste de sangue oculto nas fezes, 1545-1546
Margem de contribuição, 145
Mariposas, 1320-1321
Massa, quantificação da, 59-60
Mastócitos, 909
distribuição e cinética, 580
função, 580
morfologia, 580
teciduais, 563
Materiais plásticos, 60-61
Material volumétrico de uso laboratorial, 61-62
Maturação da afinidade, 958
Maturidade pulmonar fetal, 440-441
MCP (CD46), 976
Média, 107
Mediadores inflamatórios
citocinas, 984-992
extravasamento de leucócitos, 991-992
moléculas de adesão celular, 992-993
sistema complemento, 971-984
Mediana, 108-109
Medicaid, 147
Medicare, 146
reembolso, 147-149
Medicina baseada em evidência, 79, 87
Medidas
de produtividade, 151
não paramétricas, 109
Medula óssea
células progenitoras hematopoéticas, 833-836
exame, 560-564
anemia ferropriva, 590-592
anemia megaloblástica, 592-593
avaliação de amostra de biópsia, 563-564
celularidade, 561
coloração de preparações, 560-561
contagens celulares diferenciais, 562
cortes histológicos, 560
distribuição das células, 561-562
esfregaços de medula, 560
esfregaços diretos, 560
imprints, 560
indicações para, 564
interpretação, 564
maturação, 563
preparações por compressão, 560
sangue periférico, 561
tipos celulares raros e células anormais, 563
hipoplasia, 92-93
Megacariócitos, 582-583
distribuição e cinética, 583
função, 582
medula óssea, 562
morfologia, 582
no sangue, 582-583
Megaloblastos, 554
maturação, 571
Meia-vida, 242-244
Meio radiográfico, cristais urinários, 487, 489
Meio, seleção do, 1159, 1244-1245
Melagatran, 900
Melanina, 478
Melanoma hereditário, 1512
Meningite, 500, 1375-1376
bacteriana, 510-511
espiroqueta, 511
fúngica, 512
tuberculosa, 512
viral, 511, 1127-1128
Meningoencefalite amébica primária, 512
Menopausa, 431
Mercúrio, 322, 450
Metabolismo
da frutose, defeitos no, 227
de fármacos, 311-312, 363
Metabolismo mineral, 197-204
distúrbios do
associada à malignidade, 205-206
hipercalcemia, 98, 204-206
hiperfosfatemia, 208
hipermagnesemia, 208
hipocalcemia, 98, 207
hipofosfatemia, 208
hipomagnesemia, 209
regulação hormonal, 201-204
calcitonina, 203
paratormônio, 201-203
peptídeo relacionado ao paratormônio, 203
vitamina D, 203-204
ver também minerais individuais
Metabolismo ósseo, 197-204
distúrbios do, *ver* Doença óssea metabólica
Metadona, 359
estrutura, 356
Metagonimus yokogawai, 1310
Metanfetamina, 357
Metanol, 377
Metapneumovírus, 1120

Metaqualona, 357
Metemoglobina, 535-536
  LCE, 508
Metilfenidato, 357
Método da proliferação de linfócitos, 944-946
  imunologia celular, 944-945
    ativação induzida por antígeno, 944
    ativação e proliferação de linfócitos, 944
  metodologia, 945-946
    ativação e proliferação de células T, 945
    citometria de fluxo, 946
    ensaio de incorporação de timidina tritiada, 946
  resposta da célula T, 945
    transdução de sinal após estimulação antigênica, 944-945
Método(s)
  analíticos, 58-64
    agitação, 63
    água, 59
    banhos de água, 62-63
    blocos de aquecimento, incubadoras a seco e fornos, 63
    material volumétrico de uso laboratorial, 61-62
    quantificação de massa, 59-60
    solução aquosa, 63-64
    substâncias químicas, 58
    termometria, 62
    vidraria e plásticos, 60-61
  do gotejamento, 464
Metotrexato, 375-376
MHC, 1000-1034
  classe I, 1003-1006, 1042-1043
    estrutura das moléculas de classe I, 1003
    fragmentos antigênicos ligados por, 1008
    função, 1004-1005
    organização dos genes de classe I, 1003
    regulação da expressão dos genes de classe I, 1004
  classe II, 1006-1008, 1042-1043
    desequilíbrio da ligação genética, 1007
    estrutura das moléculas de classe II, 1006
    fragmentos antigênicos ligados pelo, 1008
    função das moléculas de classe II, 1008-1009
    organização dos genes de classe II, 1006-1007
    regulação da expressão do gene de classe II, 1007
  complexo de genes *MHC*, 1002
  detecção da ligação genética da doença, 1029-1031
    análise de pares de irmãos, 1030
    estudos populacionais, 1030
    força de associação, 1030
    frequências genéticas e fenotípicas, 1029-1030
    Lod score, 1030
    polimorfismo genético, 1029-1030
  doenças associadas, 1027-1028
    artrite reumatoide, 1029
    diabetes de tipo 1, 1028-1029
    hemocromatose, 1027-1028
    hiperplasia suprarrenal congênita, 1028
    infecção pelo HIV e progressão da AIDS, 1029
    tuberculose, 1029
  genes na região não HLA ou região de classe III, 1022-1025
    complótipos, 1025
    doenças associadas aos genes *C2*, *C4* e *BF*, 1024-1025
    fator de necrose tumoral e linfotoxinas α e β ,1023
    genes da proteína do choque térmico, 70, 1023
  genética, 1002
    composição do MHC, 1002
    desequilíbrio da ligação genética, 1002
    herança, 1002
    localização dos genes do MHC, 1002
    variação étnica, 1002
  haplótipos estendidos, 1025-1027
  moléculas de histocompatibilidade menor, 1008-1009
  reconhecimento de moléculas de MHC estranhas, 1008
  sequência de DNA, 1022
  ver também Antígeno leucocitário humano
Miastenia grave, 1092-1093
Micetoma, 1260
Micobactéria, 1223-1235
  classificação, 1224
  crescimento rápido, 1227
  diagnóstico laboratorial
    amostras, 1228-1229
    colorações microbianas, 1229-1230
    métodos de cultura, 1230-1232
    teste de suscetibilidade, 1232-1233
    testes de identificação, 1232
  prevenção, 1233-1234
  teste cutâneo, 1228
  tratamento, 1233
Micofenolato mofetil, 1013
Micose fungoide, 683-684
Microalbuminúria, 467-468
Microangiopatia trombótica, 626
Microarranjos, 1569-1570
  cDNA, 1422
  discordância entre conjuntos de dados, 1578
  fabricação, 1420-1421
  perfil de expressão gênica, 1492-1494
  oligonucleotídeos, 1422
  substratos, 1420
Microbiologia, 136-137
Micrócitos, 551
Microcusteio, 144
Micronutrientes *ver* Oligoelementos; Vitaminas
Micropipetas, 61
Microscopia
  de campo escuro, 1209
  de fluorescência, 1209
  de imuno-histoquímica, 1209
Microsporídios, 1302
  colorações para, 1277
Microsporidiose, 1324
Middleware, 73
Mieloblastos, 577-578
Mielocatexia 641, 644
Mielofibrose
  idiopática crônica, 656-657, 1446
  primária autoimune, 641
Mieloma
  indolente, 674
  latente, 674
  múltiplo, 673-674
  plasmacítico, 1446
Mieloperoxidase, 644, 661-662
Mielose eritrêmica, 665
Milípedes, 1322-1323
Mineralocorticoides, 404
  estrutura, 428
Mioglobina, 258
Mioglobinúria, 473
Miosina, 259
Mitogênese, 1549-1550
Modelos de serviço, 6-7
Modo de processamento, 17
Molalidade, 63-64
Molaridade, 63
Moléculas de adesão, 569, 1535
  celular, 992-993
  integrinas, 992-993
  selectinas, 993
Moléculas de histocompatibilidade menor, 1008-1009
Molibdênio, 450
  deficiência, 451
  função, 451
  propriedades, 452
  toxicidade, 451
Monitoramento de fármacos terapêuticos, 361-376
  agentes quimioterápicos, 375-376
  antiasmáticos, 368-370
  anticonvulsivos, 365-368
  cardiotrópicos, 363-365
  farmacocinética, 361-363
  fármacos anti-inflamatórios e analgésicos, 370-372
  fármacos neurolépticos, 375
  imunossupressores, 372-373
  lítio e antidepressivos tricíclicos, 373-375
Monócitos, 556
  diferenciação, 704
  distribuição e cinética, 582
  distúrbios de, 646-647
    monocitopenia, 647
    monocitose, 646-647
  função, 582
  LCE, 502
  líquido sinovial, 514
  medula óssea, 562
  morfologia, 581-582
  urina, 482
Monocitose, 646-647
Mononucleose infecciosa, 648-650
  heterofila negativa, 1124
Monóxido de carbono, 377
Moraxella catarrhalis, 1172-1173
Morfina, 358-359
  estrutura, 356
Moscas, 1320-1321
Mosquito, 1320-1321
Muco, fecal, 343-344
Músculo
  cardíaco, 256-257
  doença autoimune, 1094
Mycobacterium
  africanum, 1225
  bovis, 1225
  canettii, 1225
    não tuberculoso, 1225-1227
  gordonae, 1331
  haemophilum, 1226
  kansasii, 1226, 1331
  leprae, 1227-1228
  marinum, 1226
  simiae, 1226
  tuberculosis, 1223-1224, 1331
    prevenção, 1233-1234
  ulcerans, 1226-1227
  xenopi, 1226

N

5'-nucleotidase, 287, 303
  bioquímica e fisiologia, 303
  intervalos de referência, 303
  quantificação, 303
  resultados anormais, 303
  variação pré-analítica, 303
Naegleria fowleri, 1292-1293
Naloxona, estrutura, 356
Nanophyetus salmincola, 1310-1311
Narcolepsia, 1028
Nateglinida, 224-225
National
  Archives and Records Administration (NARA), 9
  Cholesterol Education Program ver Diretrizes do NCEP
  Institute
    of Health (NIH), 9
    of Occupational Safety and Health (NIOSH), 9
    of Standards and Technology (NIST), 9
    on Drug Abuse (NIDA), 9
Necessidade médica ambulatorial, 131
Necrose tubular aguda, 492
Nefelometria, 47-48
Nefrite com perda de sal, 183
Negativos verdadeiros, 81
Neisseria gonorrhoeae, 1331-1332
Neisseria spp., 1170-1172
Nematódeos, 1303-1309, 1313
  ancilostomídeos, 1305-1306
  Angiostrongylus cantonesis, 1315
  Angiostrongylus costaricensis, 1315
  Anisakis spp., 1316
  Ascaris lumbricoides, 646, 1304-1305
  Brugia malayi, 1313
  Capillaria hepática, 1315-1316
  Capillaria philippinensis, 1304
  cultura e recuperação, 1278
  Dracunculus medinensis, 1314
  Enterobius vermicularis, 1303-1304
  Eustrongylides spp., 1316
  filária, 1313
  filárias zoonóticas, 1314
  larva migrans, 1315
  Loa loa, 1313
  Mansonella spp., 1313
  Onchocerca volvulus, 1313-1314
  Pseudoterranova spp., 1316
  Strongyloides stercoralis, 1306-1307

Trichinella spiralis, 1315
Trichostrongylus spp., 1305
Trichuris trichiuria, 1304
Wuchereria bancrofti, 462, 1313
Neonato
doença de Grave, 395
hipotireoidismo, 398-399
transfusão sanguínea, 784-785
Neoplasia(s)
de células B maduras, 669-680
doença da cadeia pesada, 673
doença da cadeia pesada α, 673
doença da cadeia pesada γ, 672-673
gamopatia monoclonal de importância indeterminada, 674
granulomatose linfomatoide, 680
leucemia de células pilosas, 671
leucemia de plasmócitos, 674
leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico pequeno, 669
leucemia pró-linfocítica de células B, 669-771
macroglobulinemia de Waldenström, 672
mieloma indolente, 674
mieloma latente, 674
mieloma múltiplo, 673-674
variantes da célula pilosa, 671-672
de células T, 680-685
de precursores de células B e T (linfoblásticas), 667-669
endócrina múltipla, 205
tipo 1, 1512
tipo 2, 1512
hematopoética *ver* Leucemia; Linfoma; Síndromes mielodisplásicas
Neoplasma(s)
de células dendríticas, 688-690
de células histiocíticas, 688-690
de plasmócitos, 713
Neorickettsia spp. *ver* Infecções por riquétsias
Neuroblastoma, 404
Neurofibromatose
tipo 1, 1512
tipo 2, 1512
Neuro-hipófise, 383-384
Neuropatias, 1093
Neutrofilia, 555, 639-640
determinantes, 640
mecanismos, 639
Neutrófilos, 555, 577-579, 909
alterações morfológicas, 642-644
bastonete, 555-556, 577-578
diferenciação, 704
distribuição e cinética, 578-579
distúrbios funcionais, 644-645
função, 579
LCE, 502-503
líquido
pleural, 519
sinovial, 514
medula óssea, 562
morfologia dos precursores, 577-578
segmentado, 555, 578
urina, 481
Neutropenia, 555, 640-642
causas, 640
Niacina, 248, 445, 448
avaliação laboratorial, 446
fontes alimentares, 446
RDA, 446
Níquel, 450
Nitrito, testes para, 476-477
Nitrogênio ureico
sanguíneo *ver* BUN
variabilidade biológica, 80
Nível
de biossegurança, 156
de ingestão máxima tolerada, 444
de significância, 107
Nocardia spp., 1168-1169
Normalidade, 63
Normoblastos
basofílicos, 570, 571
maturação, 569-571
ortocromático, 570-571
policromatofílico, 570-571
Nortriptilina, 374
Notificação prévia do beneficiário, 149
Nuclear Regulatory Commission (NRC), 9

O

Obstrução
biliar, 100-101, 310
pós-hepática, 323
Occupational
Exposure
to Blood Borne Pathogens, 8
to Hazardous Chemicals in Laboratories, 8
Safety and Health Administration (OSHA), 9
Ocitocina, 388, 431
Octreotida, 328
Office of the Inspector General (OIG), 9
OIG *Compliance Guidelines*, 8
Olho, 1356-1357
amostras
de conjuntiva, 1356
de córnea, 1357
Oligoelementos, 444, 450-458
classificação, 450
ver também oligoelementos individuais
Oligoespemia, 433-434
Oligomenorreia, 434
Oligúria, 462-463
Olympus OLA2500 Lab Automation System, 68
Onchocerca volvulus, 1313-1314
Oncogenes, detecção de, 1558-1560
arranjos genéticos, 1559
FISH, 1376
teste de ácido nucleico livre de célula, 1558-1559
Oncoproteína(s), 1535
e tamanho do tumor, 1561-1562
eficácia diagnóstica, 1560
HER-2/*neu* (c-erb-2), 1543
múltiplos marcadores, 1557-1558
na detecção de tumores, 1549-1564
nuclear, 1555-1557
detecção de malignidades, 1555-1556
proteínas p-53 e c-myc, 1555
Opiáceos, 358-359
Opisthorchis viverrini, 1311
Organofosfatos, 380
Orientia spp. *ver* Infecções por riquétsias
Osmolaridade, 171-174
e gravidade específica, 174
urina, 186
Osmometria, 48-49
Osmômetro de ponto de congelamento, 48-49
Osso
cortical (compacto), 197-198
trabecular (esponjoso), 197-198
Osteíte fibrosa cística, 205-206
Osteoblastos, 563
Osteocalcina, 210
Osteodistrofia
hereditária de Albright, 207
renal, 212-213
Osteogênese imperfeita, 211
Osteomalácia, 206, 208, 212
Osteopenia, 211
Osteoporose, 211-212
pós-menopáusica, 208
senil, 208
Ovalocitose do Sudeste Asiático, 606
Overfitting, 1579
Ovulação, 429-430
Oxalato
de cálcio, 487-488, 515
cristais, 487-488
di-hidratado, 515
efeito sobre testes sanguíneos, 29
Oxazerpam, estrutura, 356
Oxidorredutases, 287
Oxigenação, 99-100

P

17α-progesterona, 428
Pacientes idosos, proteinúria em, 466
Padrão de resposta
imediata, 281-282
tardia, 271-272
Padrões
citoplasmáticos, 1056
de comunicação, 138-141
Health Level, 7, 139-140
LOINC, 140
Padronização, 22
Pagadores e reembolso, 145-147
P-ANCA, 327
Pan-hipopituitarismo, 431
Pancreatite
aguda, 329-330
crônica, 330
Panmielose aguda com mielofibrose, 666
Papaína, 957
Papilomavírus humano, 1331-1332
Paracentese, 524
Paraganglioma hereditário, 1512
Paragonimus spp., 1311
Paraproteína, 277, 281
Parasitas, 490
Parasitologia médica, 1272-1328
artrópodes, 1317-1323
aracnídeos, 1321-1322
características biológicas, 1318
identificação laboratorial, 1319
insetos, 1319-1321
mecanismos de lesão, 1318-1319
milípedes, 1322-1323
helmintos intestinais, 1302-1303
cestódeos, 1307-1309
nematódeos, 1303-1309
trematódeos, 1309-1313
hospedeiro imunocomprometido, 1323-1324
métodos laboratoriais, 1273-1282
amostras de fezes, 1275-1278
cestódeos, 1316-1317
controle de qualidade, melhoria da qualidade e segurança, 1281-1282
helmintos tissulares, 1313-1316
métodos diagnósticos moleculares, 1281
métodos imunodiagnósticos, 1279-1281
nematódeos, 1313-1316
prevalência de parasitas, 1274
sangue, 1274-1275
técnicas de cultura de parasitas, 1279
trematódeos, 1317
urogenital, escarro, aspirados e biópsias, 1278
protozoários do sangue e dos tecidos, 1282-1293
amebas de vida livre oportunistas, 1292-1293
babesiose, 627, 790, 1289
hemoflagelados, 1289-1291
malária, 790, 1282-1289
Toxoplasma gondii, 1291-1292
protozoários intestinais e urogenitais, 1293-1302
ameba e *Blastocystis hominis*, 1294-1298
ciliados, 1299-1302
coccídios, 1299-1302
flagelados, 1298-1299
microsporídios, 1302
Paratormônio, 201-203
biointacto, 202
fisiologia, 201-202
função, 201
heterogeneidade, 202
intervalo de referência, 201
intraoperatório, 202
secreção, 201
síntese, 201
técnicas analíticas, 201-202
Parto, 431
Parvovírus, 1126-1127
Parvovírus B-19, 790
Pasteurella spp., 1185-1186
Patentes, 1463
Paternidade
ausência de genitor, 1528
cálculo do índice de paternidade, 1527
exclusão de, 1525-1526
inclusão de, 1526-1528
probabilidade de paternidade, 1528
reconstrução de famílias, 1528
Patógenos hematogênicos, 1351-1354
coleta da amostra, 1351
culturas positivas, 1383

momento da coleta da amostra, 1351
número de amostras, 1351-1353
organismos raros, 1353
recuperação de microrganismos, 1352
sistemas de hemocultura, 1353
volume de amostra, 1351
Patologia molecular, 1391-1393
diagnóstica, 1391-1392
implicações da, 1392-1393
Payback, 152
Pelagra, 448
Pele, 1365-1366
banco, 831
doença autoimune, 1080-1084
dermatite herpetiforme, 1083
dermatose linear por IgA, 1083
epidermólise bolhosa adquirida, 1082-1083
lúpus eritematoso, 1083-1084
lúpus eritematoso bolhoso, 1082-1083
pênfigo, 1080-1081
penfigoide, 1081-1082
vasculite, 1084
Peliose bacilar, 1145, 1150
Pênfigo
foliáceo, 1081
paraneoplásico, 1081
vulgar, 1028, 1080-1081
Penfigoide
benigno de membrana mucosa, 1082
bolhoso, 980, 1081
cicatricial, 1028
gestacional, 1082
vulgar, 980
Pentamidina, 225
Pentastomídeos, 1323
Pentatrichomonas hominis, 1298, 1300
Pentosúria, 469
Pepsina, 339-340, 957
Pepsinogênio, 339-340
Peptídeo(s)
análogo do glucagon 1, 218
ativador de tripsinogênio, 330
C, 216-217, 224-226
variabilidade biológica, 80
insulinotrópico dependente de glicose, 218
intestinal vasoativo, 340-341
natriuréticos cardíacos, 263-264
relacionado ao paratormônio, 203, 1543
Percevejos, 1320
Perfil de expressão gênica, 1492-1494
Permuta (*crossing over*), 878
Peroxidase eosinofílica, 644
Peroxissomos, 861
Pesos corporais, 1585
Peste, 157-160, 1371, 1384-1387
bubônica, 159-160, 1384, 1386-1387
pneumônica, 159-160, 1384, 1386-1387
pH 64
da urina, 464-465
e atividade enzimática, 296
líquido pericárdico, 522-523
líquido peritoneal, 526
líquido pleural, 520-521
Physician Self-referral Ban, 8
Pielonefrite
aguda, 492
crônica, 492
Pinta, 1208-1209
Piolho, 1319
Pipetas, 61
calibração, 61
designação de classe A, 61
micropipetas, 61
tipos de, 61
Piridinolina, 210
Piridoxina *ver* Vitamina B_6
Pirofosfato
de cálcio di-hidratado, 515
de tiamina, 288
Piropoiquilocitose hereditária, 606
Piúria, 481-482
Planejamento
estratégico, 4-5
laboratorial, 6-7, 1456-1457
Plaquetaférese, 778, 796-797
aspectos associados ao doador, 797
benefícios da, 796
indicações para, 806-807
requisitos para o, 796
seleção do doador, 796-797
Plaquetas, 490, 559-560, 780, 844-845
avaliação de pacientes, 881
defeitos congênitos, tratamento, 881
destruição, 870
distúrbios de função adquiridos, 978-981
anticorpos antiplaqueta, 880
disproteinemias, 879
distúrbios mieloproliferativos, 879
doença do compartimento de armazenamento adquirida, 880
fármacos inibidores da função plaquetária, 880-881
leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas, 879
uremia, 879-880
distúrbios de função hereditários, 872-876
defeitos na montagem do citoesqueleto, 875
distúrbios da atividade pró-coagulante plaquetária, 875-876
distúrbios de adesão plaquetária, 873
distúrbios de agregação plaquetária, 873-874
distúrbios de transdução de sinal e secreção, 874-875
ver também Doença de von Willebrand
distúrbios quantitativos
trombocitopenia, 869-872
trombocitose, 872
estrutura, 861
transfusão, 783
glicoproteína de membrana, 861-882
papel na hemostasia
agregação e secreção, 866-868
ativação plaquetária, 862-864
coagulação, 868-869
função, 864-866
vias de sinalização intracelular, 869
reticulada, 542-543, 864
variação fisiológica, 545
Plasma, 777-778
osmolaridade, 171-174
transfusão, 783-784
Plasmacitose, 652
Plasmaférese, 794, 804
aspectos associados ao paciente, 811-812
colunas com proteína estafilocócica A, 812-813
eficácia da remoção, 810-811
indicações para, 814-818
distúrbios hematológicos, 815-816
distúrbios nefrológicos, 817
distúrbios neurológicos, 814-815
rim do mieloma, 816-817
terapia de condicionamento para transplante renal, 817-818
líquidos de reposição, 811
remoção seletiva de componentes do plasma, 812
remoção seletiva de lipoproteínas de baixa densidade, 813-814
Plasmócitos, 586-887
LCE, 503
líquido pleural, 519
medula óssea, 562
Plasmodium
falciparum, 1286, 1288
malariae, 1285, 1288
ovale, 1287-1288
vivax, 1284, 1288
Plesiomonas spp., 1175-1176
Plotagem de Levey-Jennings, 116, 122, 124
Pneumonia por *Pneumocystis,* 1265-1266
Poliangiite microscópica, 1065, 1070-1071
Poliarterite nodosa, 1065-1066, 1069-1070
Policitemia, 617, 632-633
absoluta, 632-633
de Chuvash, 571
relativa, 632
vera, 1446
Policromatofilia, 551
Polidipsia, 186, 389-390
Polimiosite, 1054
Polimorfismo(s), 1002-1003, 1521
conformacional sequência-específico, 1011
de nucleotídeo único, 1008
genético, 1029-1030
HLA, 1009-1012
detecção celular de moléculas de classe II, 1012
detecção sorológica de moléculas de classes I e II, 1012
tipagem de alelos de classes I e II com base no DNA, 1010-1012
Polineurite infecciosa, 500
Polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, 814-815
Polipose
adenomatosa familiar, 1512, 1514
associada ao MYH, 1512-1513
Poliúria, 186
diurese hídrica, 186
diurese osmótica, 186
Pontilhado
basofílico, 553
malárico, 553
Ponto(s)
de equilíbrio, 152
fortes, deficiências, oportunidades e ameaças *ver* Análise SWOT
isoelétrico, 269
Porfirias, 575-577
coproporfiria hereditária, 576-577
fisiologia, 575
porfiria
cutânea tardia, 576-577
eritropoética congênita, 576-577
intermitente aguda, 576-577
variegada, 576-577
técnicas analíticas, 575-576
Porfirinas, 478-480
eritrocitárias, 592
Porfobilinogênio, 476
Positivos verdadeiros, 81
Postura, 25
quantificação de lipídeos, 240
Potássio, 27
controle do fluxo transcelular, 180-181
critérios para aceitação, 122-123
excreção renal de, 155-156
hipercalemia, 97
causas e patogênese, 183-184
diagnóstico diferencial, 184
hipocalemia, 97
causas e patogênese, 182-183
diagnóstico diferencial, 183
hiponatremia, classificação, 187
variabilidade biológica, 80
Potencial zeta (ζ), 752
Potenciometria, 50-51
Poxviridae, 1383
Prata, 450
Pravastatina, 248
Pré-albumina, 273-274
Pré-análise, 24-36
automatizada, 66
coleta da amostra, 26-27
líquido cerebroespinal, 33
líquido pericárdico, 34
líquido peritoneal, 34
líquido pleural, 34
líquido sinovial, 33-24
urina, 32-33
coleta de sangue, 26-30
técnicas, 30-32
processamento da amostra, 34-35
transporte da amostra, 34
variáveis pré-coleta, 24-26
Pré-eclâmpsia, 441, 627
Precipitação, 271
Precisão, 114
Pregnenolona, 428
Prevalência, 83
Prevenção de riscos, 10
Primidona, 367
Priming sequência-específico, 1010
Princípios de contabilidade geralmente aceitos, 150

Pró-glucagon, 217-218
Pró-insulina, 216-217
Pró-opiomelanocortina, 383-384
Probabilidade pré-teste, 83
Procainamida, 364-365
Procedimentos operacionais padrão, 116
Processadores de sinal, 44
Processamento da amostra, 15
Produção de eritrócitos, 569-573
  hemoglobina
    estrutura e função, 572-573
    síntese, 571-572
  maturação
    megaloblástica, 571
    normoblástica, 569-571
  regulação da, 571
Produzir *versus* comprar, 22, 144
Progesterona, 428
Programas de *marketing*, 5
Projeto Genoma Humano, 1566-1568
  esforços de sequenciamento
    privados, 1567
    públicos, 1566-1567
  finalização do, 1567-1568
Projetos orçamentários, 151-153
  interpretação dos cálculos financeiros, 153
  payback, 153
  ponto de equilíbrio, 152
  retorno do investimento, 152
  taxa de retorno interna, 153
  valor atual líquido, 152-153
Prolactina, 384-386, 430
  deficiência, 385
  hiperprolactinemia, 385
  valor de referência, 385
Prolactinoma, 385
Promonócitos, 661
Prontuários médicos eletrônicos, 131
Proporção
  $CD4^+/CD8^+$, 939-940
  lipase/amilase, 330
  ureia/creatinina, 154
  VLDL-C/triglicerídeos plasmáticos, 246
Propoxifeno, 360
  estrutura, 356
Propranolol, 365
Prospective Payment System, 8
Proteína
  14-3-3, 508
  β-amiloide, 42, 507-508
  básica da mielina, 507
  C, 888-889
  C3, 973
  C ativada, 846-847
    resistência, 889
  c-myc, 1555
    anticorpos, 1556-1557
  codificada pelo oncogene *myc*, 1556
  CR1, 976-977
  C reativa, 261-262, 279, 330
    LCE, 507
    líquido pleural, 507
  de membrana externa principal, 1139
  de transferência de éster de colesterol, 238
    defeitos genéticos, 253
  de transferência de fosfolipídeos, 238
  do lobo intermediário corticotrofina-símile (CLIP), 410
  ligadora de ácidos graxos do coração, 259
  ligadora de C4, 976
  p53
    anticorpos, 1556
    ensaio na detecção de malignidade, 1555-1556
  S, 889, 976
  τ, 508
Proteínas, 268-284
  critérios para aceitação, 122-123
  da matriz nuclear, 1557
  de anticoagulação, 846-848
  detecção e quantificação, 272-273
  estrutura, 268-269
  G, 1554-1555
  LCE, 504
  líquido
    pericárdico, 522-523
    peritoneal, 525
    pleural, 520
  padrões de anomalias, 280-282
  proteínas plasmáticas
    α_1-antitripsina, 275-276
    α_1-glicoproteína ácida, 279
    α_2-macroglobulina, 276
    β-lipoproteína, 276
    albumina, 274-275
    ceruloplasmina, 278
    complemento, 277
    fibrinogênio, 277-278
    Gc-globulina, 278-279
    haptoglobina, 276
    hemopexina, 279
    inibidores de protease, 279-280
    pré-albumina, 273-274
    proteína C reativa, 279
    reagentes de fase aguda, 280
    transferrina, 276-277
  regulatórias associadas à célula, 976
  síntese, 312-314
  soro, 333
  trombofílicas, 887-90
    antitrombina, 888
    disfibrinogenemia, 890
    fator V de Leiden, 889
    hipofibrinólise, 890
    níveis elevados de fatores de coagulação, 889-890
    proteína C, 889
    proteína S, 889
    protrombina-20, 210, 889
    resistência da proteína C ativada, 889
  variabilidade biológica, 80
Proteinúria, 465-468
  Bence Jones, 467
  categorias qualitativas, 466-467
  em pacientes idosos, 466
  extravasamento, 467
  glomerular, 466-467
  intensa, 466
  métodos, 467-468
  microalbuminúria, 467
  mínima, 466
  moderada, 466
  padrão tubular, 466-67
  postural, 466
  quantificação da, 466
Proteólise, 269
Proteômica, 1546, 1572-1573
  arranjos de proteínas, 1573
  espectrometria de massa, 1572-1573
  limitações da, 1579
  marcadores moleculares, 1575-1576
  na detecção do câncer, 1558
Protocolo de Genebra, 165-166
Protoporfirina, 572
Prototecose, 1266-1267
Protozoários
  intestinais e urogenitais, 1293-1302
    amebas e *Blastocystis hominis*, 1294-1298
    ciliados, 1299-1302
    coccídios, 1299-1302
    flagelados, 1298-1299
    microsporídios, 1302
  sangue e tecidos, 1282-1293
    amebas de vida livre oportunistas, 1292-1293
    babesiose, 627, 790, 1289
    hemoflagelados, 1289-1291
    malária, 790, 1282-1289
    Toxoplasma gondii, 1291-1292
Protrombina-20, 210, 889
Prova de reação cruzada, 755-758
  documentação e manutenção de registros, 757
  exigências quanto à amostra, 754-757
  grupo ABO, 757-758
  tipagem Rh, 758
P-selectina, 861-863, 993
Pseudocianose, 617
Pseudocolinesterase, 287
Pseudofagocitose, 558
Pseudogota, 514-515
Pseudo-hipercalemia, 184
Pseudo-hipoaldosteronismo, 184
Pseudo-hiponatremia, 96, 186
Pseudo-hipoparatireoidismo, 207
Pseudomonas aeruginosa, 1331
Pseudomonas spp., 1176-1177
Pseudoneutropenia, 642
Pseudoterranova spp., 1316
Psitacose, 1141
Puberdade precoce, 431
Pulgas, 1319
Punção lombar, 33
Púrpura
  de Henoch-Schönlein, 1065, 1072-1074
  trombocitopênica imune, 783, 869-870
    características clínicas, 870
  trombocitopênica trombótica, 626-627, 871-872
    plasmaférese, 815-816
Pus, fecal, 343-344
Pústulas, 1365

Q

Quantificações de enzima, 1041
Quilomícrons, 233, 235-236
Quilúria, 461-462
Quimiocinas, 569, 638, 987-988
Quimioluminescência, 47
Quinases mitogênicas citosólicas, 1555
Quinidina, 365

R

Rabdomiólise, 473
Radioimunoensaio, 913, 919-920
  fundamento, 919-920
  princípios e métodos de ensaio, 920
  raf, 1555
RANKL, 199
Rapamicina, 373, 1013
Raquitismo, 207-208, 212
Razão de probabilidade, 79, 85-86
Reabsorção fracionada, 180
Reação
  antígeno-anticorpo, 911
    cinética, 912
  cruzada, 762-764, 1015-1016
    antiglobulina, 763
    eletrônica, 762-763
    protocolos pré-operatórios, 763-764
    sorológica de centrifugação imediata, 762
    transplante de células progenitoras, 1017
  de amplificação da ligase, 1414
  em cadeia da polimerase, 1407-1411
    ciclo rápido, 1411
    competitiva real, 1571-1572
    em tempo real, 1409-1411
    líquido pericárdico, 523
    multiplex, 1409
    nested, 1408-1409
    quantitativa de ponto final, 1409
    rearranjos genéticos de receptor de antígeno, 1482-1484
    sensibilidade, 1472
    transcriptase reversa, 1407-1408
  leucemoide, 94, 555, 652-653
  leucoeritroblastótica, 554
Reações
  alérgicas
    hemaférese, 821
    transfusão sanguínea, 785-786
  ao hidroxietilamido, 822
  de hipersensibilidade, 1318
  leucemoides eosinofílicas, 652
  leucemoides linfocíticas, 653
  leucemoides neutrofílicas, 652
  transfusionais, 785-791
    alérgica, 785-786
    anafilática, 786
    contaminação bacteriana de componentes do sangue, 787
    doença do enxerto *versus* hospedeiro, 788-789
    doença transmitida por transfusão, 789-791
    hemólise não imune, 789
    hemolítica aguda, 786-787
    hemolítica tardia, 787

lesão pulmonar aguda associada à transfusão (TRALI), 787-788
não hemolítica febril, 785
reações hipotensivas, 789
sobrecarga circulatória associada à transfusão, 789
Reagente(s)
analito-específicos, 1465-1466
de fase aguda negativo, 275
de fase aguda, 261, 280
sistemas automatizados, 69
Rearranjos gênicos de receptor de antígeno, 1481-1485
detecção de, 1482-1484
hibridização por *Southern blot*, 1482, 1484-1485
reação em cadeia da polimerase, 1482-1484
mecanismo dos, 1481-1482
Reatividade cruzada, 1012
Receita, 144-145
bruta advinda de pacientes, 144
líquida advinda de pacientes, 145
Recepção da amostra, 15
Receptor(es)
acoplados à proteína G, 645
de citocina, 1042
de fator de crescimento, 1552-1554
receptor do fator de crescimento epidérmico, 1553
receptor de HER-2/*neu*, 1553-1554
de lectina tipo C, 1005
de morte celular, 638-639
do complemento, 720, 976-977
do fator de crescimento epidérmico, 1553
do tipo imunoglobulina da célula *killer*, 1005
HER-2/*neu*, 1553-1554
Recipientes para amostra (cubetas), 43
Reconhecimento da acreditação, 7-9
Recrutamento de funcionários *ver* Equipe
Recuperação de desastre, 138
Reembolso, 145-147
para testes, 1462-1463
sistemas de codificação, 147-149
Reflectometria, 45-46
Reflexo de ejeção do leite, 431
Refractometria, 463
Refratividade, 48
Regionalização, 7
Registro(s)
de pacientes da empresa, 131
diretrizes para retenção, 10
Registro/identificação do paciente, 131-133
Regressão linear, 107, 111-112
Reguladores de fase líquida, 976
Regulamentação(ões), 7-8
de Stark, 78
do laboratório, 74-76
Clinical Laboratories Improvement Act, 74-75
requisitos para certificação e licenciamento, 75-76
Rejeição aguda a aloenxerto renal, 492
Relatório, 15, 135
Remarcação de preços rápida, 22
Remodelamento ósseo, marcadores bioquímicos do, 209
Renina, 418-421
quantificações, 421
Repaglinida, 225
Repetições curtas em tandem, 1008, 1523
Repositório de dados da empresa, 131
Reprodução
feminina, 429-430
avaliação laboratorial, 434-435
masculina, 429
avaliação laboratorial, 431-434
Requerimento médio estimado, 444
Resinas de ácido biliar, 248
Resposta imune
adaptativa, 1004
desenvolvimento da, 943-944
efeito da idade sobre a, 940
imunidade humoral *ver* Imunidade humoral
inata, 1004
ver também Imunidade celular; Imunidade humoral
Restrição pelo MHC, 1004
Reticulócitos, 570-571
conteúdo de hemoglobina, 592
Retinoblastoma, 1451, 1511-1512
Retinol *ver* Vitamina A
Retorno do investimento, 152
Retortamonas intestinalis, 1294, 1299
Retrovírus, 1132-1134
Riboflavina, 445, 448
avaliação laboratorial, 446
fontes alimentares, 446
RDA, 446
Ribonuclease, 287
Rim
do mieloma, 816-817
doença autoimune, 1089-1090
Riquetsiose
sennetsu, 1145
variceliforme, 1145
Riscos
biológicos, 11
ergonômicos, 12
químicos, 11-12
plano de informação, 11
Rituxamab, 712
RNA
tradução em proteína, 1397-1398
transcrição do DNA, 1397
Roche MODULAR ANALYTICS, 73
Roche MODULAR PRE-ANALYTICS, 68
Rogue testing, 77
Rompimento de membranas prematuro, 441-442
Rubéola, 1125-1126

S

Sais biliares, 311
Sangue de cordão umbilical, células progenitoras hematopoéticas no, 836
Sarcocystis spp., 1300
Sarcoma
de células dendríticas
foliculares, 690
interdigitantes, 690
granulocítico, 666-667
SCARB1, 235, 237-238
Scedosporium spp., 1265
Schistosoma
haematobium, 1313
intercalatum, 1313
japonicum, 1312
mansoni, 1312
mekongi,1312-1313
spp., 1311-1313
Scianna, 744
anticorpos de Scianna, 744
biologia molecular, 744
bioquímica, 744
papel biológico, 744
Xg, 744
Sede, 184
Sedimento urinário, 480-491
cilindros hialinos, 480
componentes microscópicos
cilindros, 483-486
células, 481-483
cristais, 486-491
exame do, 480-481
Segurança, 8-12
prevenção de riscos, 10
riscos
biológicos, 11
ergonômicos, 12
químicos, 11-12
Seguro privado, 145-146
Selectinas, 638, 993
Selênio, 450
deficiência, 451
função, 451
propriedades, 452
toxicidade, 451
variabilidade biológica, 80
Seletores de comprimento de onda, 41
Sensibilidade, 81-83
analítica, 114
Separação
de proteínas, 269-272
eletroforese, 269-271
precipitação, 271
separações em coluna, 271-272
de proteínas em coluna, 271-272
Separador de células ativado por fluorescência, 49-50
Sepse, Gram-negativa, 94
Serotonina, sanguínea, 333
Serviços limitados, 7
Sexo do paciente, 26
Sialomucinas, 569
Sideroblastos, 561
Sífilis, 1207-1208
endêmica, 1028
sistema nervoso central, 500
Silício, 450
Simvastatina, 248
Síndrome(s)
5q, 661
antifosfolipídeo, 890-892
Churg-Strauss, 1065, 1070
coronariana aguda
diagnóstico, 101-102
da angústia respiratória do adulto, 980
da fadiga crônica, 1124
da fragmentação eritrocitária, 626
da hiperviscosidade, 816
da imunodeficiência adquirida, 651-652
da mão-pé, 614
da piúria-disúria, 492
da plaqueta cinzenta, 865, 875
da polipose juvenil, 1512
da secreção inadequada de ADH, 96, 187, 390-391
causas da, 392
de aneuploidia cromossômica, 1448-1450
de Angelman, 1451
diagnóstico molecular, 1509-1511
de Bartter, 96, 182-183
de Bernard-Soulier, 868, 873
de Bloom, 939, 1453, 1512
de Chediak-Higashi, 640, 643-644, 874
de Cockayne, 1453
de Cowden, 1512
de Cri-du-chat, 1450
de Crigler-Najjar, 309
de Cushing, 408, 412, 414-415, 421
teste para, 414-416
de DiGeorge, 939-940, 1451
de Down, 438-439, 939, 1448-1449
de Dubin-Johnson, 309-310
de Duncan, 939
de Edwards, 1448-1449
de Ehlers-Danlos, 211-212
de Fanconi-Bickel, 229
de Felty, 641, 648
de Froin, 501
de genes contíguos, 1450-1452
de Gilbert, 309
de Gitelman, 182-183
de Goodpasture, 817
de Griscelli, 874
de Guillain-Barré, 814
de Hermansky-Pudlak, 865, 874
de Kallmann, 1451
de Klinefelter, 431, 433, 1448-1450
de Kostmann, 640-641
de Langer-Giedion, 1451
de Liddle, 182, 421
de Li-Fraumeni, 1512
de Loffler, 646
de má absorção, 334-335
de Marfan, 211
de Menke, 454
de microdeleção, 1450-1452
de Miller-Dieker, 1451
de Nelson, 410
de Patau, 1448
de Peutz-Jeghers 1512
de quebra, 1452
de Prader-Willi, 1451
diagnóstico molecular, 1509-1511
de Rubinstein-Taybi, 1451

de Schwachman-Diamond, 641
de Sézary, 683-684
de Sheehan, 431
de Sjögren, 1051
de Smith-Magenis, 1451
de sobreposição, 1054
de trombocitopenia e ausência do rádio, 874
de Turner, 1449-1450
de Wernicke-Korsakoff, 447
de Williams, 1451-1452
de Wiskott-Aldrich, 869, 874-875, 939
de Wolf-Hirschhorn,1450
de Zollinger-Ellison, 205, 328, 333
do câncer de mama-ovário hereditária, 1512-1513
do leite-álcali, 206
do nevo basocelular (Gorlin), 1512
do túnel carpal, 12
do X frágil, 1452
  diagnóstico molecular, 1507-1509
dos ovários policísticos, 431, 434
hemofagocíticas, 688-689
hipereosinofílica, 655
infecciosas virais clínicas, 1117
lúpus-símile, 1048
metabólica, 220, 247
  ver também Diabetes melito
mielodisplásicas, 92-93, 660-661, 879, 1446
  associadas à anormalidade del(5q) isolada, 661
  não classificada, 661
nefrótica, 275, 466, 492
  pseudo Cushing, 415-416
  urêmica hemolítica, 626
  uretral aguda, 1140
  velocardiofacial, 940, 1451-1452
Sirolimus *ver* Rapamicina
Sistema complemento, 277, 719-721, 909, 971-984
  anafilatoxinas, 975
  atividade na doença, 978-979
  avaliação, 1041
  biossíntese do complemento, 977
  componentes terminais do complemento, 975
  deficiências genéticas, 978
  e imunidade adquirida, 978
  em estados patológicos, 979-982
    biocompatibilidade, 981
    doença dermatológica, 980
    doença infecciosa, 980
    doença reumática, 979-980
    doenças cardiovasculares, 981
    doenças hematológicas, 981
    doenças neurológicas, 981
    doenças renais, 980
    transplante de órgão, 981-982
  ensaio do complemento, 982-984
    ensaios antigênicos, 984
    inibidor de C1, 984
    via alternativa, 984
    via clássica, 983-984
  estrutura e função, 972-978
  genética do complemento, 977-978
  inibidores clinicamente úteis, 982
  nomenclatura, 972-973
  papel na destruição de eritrócitos, 719-721
  proteína C3, 973
  proteínas do complemento, 973
    proteínas reguladoras associadas à célula, 976
    regulação da ativação, 976
    reguladores de fase líquida, 976
  via
    alternativa, 974
    clássica, 972, 974
    da lectina ligadora de manana, 974-975
Sistema de grupo sanguíneo
  ABO, 721-724
    anticorpos ABO, 724
    biologia molecular, 724
    bioquímica, 723
    fenótipos nulo e fraco, 721-723
    papel biológico, 724
  Cartwright, 743-744
  Chido/Rodgers, 746-747
  Colton, 745-746
    anticorpos Colton, 746
    biologia molecular, 745-746
    bioquímica, 745
    papéis biológicos, 746
  Cromer, 748-749
    anticorpos de Cromer, 748
    biologia molecular, 748
    bioquímica, 748
    fenótipos nulo/fraco, 748
    papel biológico, 748-749
  Diego, 741-743
    anticorpos Diego, 743
    biologia molecular, 743
    bioquímica, 742-743
    papel biológico, 743
  Dombrock, 744-745
    anticorpos de Dombrock, 744-745
    bioquímica, 745
    fenótipos nulo/fraco, 745
    papel biológico, 745
    papel molecular, 745
  Duffy, 739-741
    anticorpos de Duffy, 740
    biologia molecular, 740
    bioquímica, 740
    frequências fenotípicas, 739
    papel biológico, 740
  Gerbich, 747-748
    anticorpos de Gerbich, 748
    biologia molecular, 748
    bioquímica, 747-748
    fenótipos nulo/fraco, 747
    papel biológico, 748
  GIL, 751
  I, 750-751
  Indian, 749-750
  JMH, 750
    anticorpos JMH, 750
    bioquímica e biologia molecular, 750
    papel biológico, 750
  Kidd, 741
    anticorpos Kidd, 741
    biologia molecular, 741
    bioquímica, 741
    fenótipos nulos, 741
    papel biológico, 741
  Knops, 749
  Lewis, 738-739
    anticorpos Lewis, 739
    biologia molecular, 739
    bioquímica, 738-739
    papel biológico, 739
  Lutheran, 734-735
    anticorpos de Lutheran, 734-735
    antígenos, 735
    biologia molecular, 734
    bioquímica, 734
    fenótipos nulo/fraco, 734
    papel biológico, 735
  LW, 746
  MNSs, 724-727
    anticorpos MNSs, 727
    antígenos MNSs, 726
    biologia molecular, 725-727
    bioquímica, 725
    fenótipos nulo/fraco, 725
    fenótipos nulos, 725
    papel biológico, 727
  OK, 750
  P, 727-729
    anticorpos do grupo sanguíneo P, 729
    biologia molecular, 728-729
    bioquímica, 728
    fenótipos nulos/fracos, 728
    papel biológico, 729
  RAPH, 750
Sistema de grupo sanguíneo Rh, 729-734
  anticorpos para Rh, 733-734
  antígeno D, 730-732
  antígeno D parcial, 732
  antígeno G, 732
  antígenos C/c, E/e e Rh-composto, 732
  biologia molecular, 730-733
  bioquímica, 730
  fenótipo Rh negativo, 732
    antígeno D fraco, 731-732
    fenótipo Rh_{mod}, 732-733
    fenótipo Rh_{nulo}, 732
    fenótipos C/c e E/e fracos e deleção, 732
  herança e classificação Rh, 729-730
  papel biológico, 734
Sistema de informação laboratorial, 136-138
  definição, 136-137
  funções especiais, 136
  seleção, implementação e supervisão, 137-138
Sistema de proteínas
  C/S, 846-848
  de coagulação, 845-846
    caracterização das proteínas de coagulação, 845
    montagens fisiológicas de proteínas, 845-846
    níveis elevados, 889
    síntese, 313
Sistema(s)
  de grupo sanguíneo Kell e Kx, 735-738
    anticorpos Kell, 737
    biologia molecular, 737
    bioquímica, 736-737
    fenótipos nulo e fraco, 735-736
    papel biológico, 737-738
  de informação hospitalar, 131-133
  fibrinolítico, 846
  hepatobiliar, 307
  hepatocítico bioquímico, 307
  imune, 907-910
    antígenos de histocompatibilidade, 909-910
    aplicações laboratoriais da avaliação imunológica, 910
    células apresentadoras de antígeno, 908-909
    células linfoides, 907-909
    células não linfoides, 909
    células *natural killer*, 909
    fatores humorais, 909
    imunidade celular *ver* Imunidade celular
    lesão imunológica, 910
    linfócitos B, 583-587, 908
    linfócitos T, 585, 907-908
  integrado totalmente automatizado *Olympus AU5400*, 72
  nervoso, doença autoimune, 1092-1093
  reticuloendotelial, 307
  modulares integrados, 71
Sitosterolemia, 251
Six Sigma, 5
SNOMED, 141
Sobrecarga circulatória associada à transfusão, 789
Sódio, 27
  critérios para aceitação, 122-123
  efeito da hiperglicemia, 174
  hipernatremia, 96-97
    causas e patogênese, 187-188
  hiponatremia, 95-96
    avaliação de, 392
    causas e patogênese, 186-187
  variabilidade biológica, 80
Solicitação de exame, 15, 133-134
Solução aquosa, 63-64
  diluições, 64
  molal, 63-64
  molaridade, 63
  normalidade, 63
Soluções fisiológicas, 1582
Somatostatina, 218
  sérica, 333
Somatostatinoma, 336
Somatotrófo, tumores de, 385
Sondas de ácido nucleico, 1332-1333
Soro
  detecção de fármaco, 349-356
  hiato aniônico, 191
Sorologia para HIV, 333
Sporothrix spp., 1256-1257
Staphylococcus aureus, 1331
State Departments of Health, 9
Sternotrophomonas maltophilia, 1178
Streptobacillus spp., 1187-1188
Streptococcus pyogenes, 1331
Streptococcus spp., 1331

Strongyloides stercoralis, 1306-1307
Substâncias químicas, 58
Sucrosúria, 469
Sulfato de dehidroepiandrosterona, 427-428
Sulfemoglobina, 536
Sulfonilureias, 225
Suor, 176
Supervisão de qualidade total, 4-5

T

Tabagismo, 25
Tabela
  da verdade, 81
  periódica, 1590
Tacrolimo, 373
Taenia
  saginata, 1308
  solium, 1308
Talassemias, 618-622
  α-talassemias, 621
    doença da hemoglobina H, 621
    hidropsia fetal por Hb de Bart, 621
  β-talassemias, 618-620
    heterozigoto, 620
    homozigoto, 620
    $(\delta\beta)^{+}$-talassemia, 620
    $(\delta\beta)^{0}$-talassemia, 620
  defeitos moleculares, 619
  deleções causadoras, 618-619
  persistência hereditária da hemoglobina fetal, 620-621
  síndromes de α-talassemia, 621-622
  triagem e diagnóstico pré-natal, 622
Talco de luva, 516
Tálio, 450
Tampão de tris-(hidroximetil)-aminometano, 1583-1584
Tampões, 64, 1582-1583
  fosfato de Sorensen, 1582-1583
  tris (hidroximetil) aminometano, 1583
Tamponamento tecidual, 192
Taxa de filtração glomerular, 174, 179-180
  cistatina C, 179
  creatinina, 177-178
  ureia, 178-179
Taxa de retorno interna, 153
Taxa de sedimentação eritrocitária, 545-546
  aplicação, 546
  fatores
    eritrocitários, 545
    plasmáticos, 545
  método
    de micro-ESR, 546
    de Westergren, 545
    de Westergren modificado, 545
  VES-MATIC 20 instrument, 546
Technicon Auto Analyser, 55
Tecido musculoesquelético, banco de, 831-832
Tecidos hematopoéticos, 569
Técnica de imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT), 924-925
Técnicas de identificação de anticorpo, 764-768
  adsorção de anticorpo, 765
  inibição da hemaglutinação, 764-765
  procedimentos eritrocitários, 766-768
    destruição de antígenos eritrocitários, 766
    eluição de anticorpo, 766-767
    remoção de anticorpos dos eritrócitos, 767-768
    separação de células autólogas e transfundidas, 768
    tipagem de eritrócito com reagentes à base de lectina, 768
  reagentes à base de tiol, 765-766
  titulação de anticorpo sérico, 766
Tecnologia, 18-21
  cleavase/invader, 1414-1415
  corrente, 20
  de ponta, 19-20
  derivada, 20
  reprodutiva assistida, 435-436
  secundária, 20
Tecnologias de alto desempenho, 1568-1573
  genômica, 1568-1572
    análise seriada da expressão genética, 1569
    comparação de tecnologias, 1572
    microarranjos de DNA, 1569-1570
    reação em cadeia da polimerase competitiva real, 1571-1572
  proteômica, 1572-1573
Tecnologias de arranjo (*array*), 1419-1427
  aplicações clínicas, 1426-1427
  arranjos de sequenciamento, 1422-1423
  aspectos de propriedade intelectual, 1425-1426
  bioinformática, 1424-1425
  hibridização, detecção e análise de imagem, 1423-1424
  macroarranjos, 1420
  microarranjos
    cDNA, 1422
    fabricação, 1420-1421
    oligonucleotídeos, 1422
    substratos, 1420
Tegretol *ver* Carbamazepina
Telomerase, líquido peritoneal, 526
Telopeptídeos, em ligação cruzada, 210
Temperatura, e atividade enzimática, 296
Tempo
  de *payback*, 152
  de protrombina, 313, 849
    prolongado, 855-856
  de reptilase, 856, 858
  de trombina, 849
    ativada, 849
  de tromboplastina parcial, 313
    prolongado, 855-856
Tendência central, 108
Teofilina, 370
Teorema de Bayes, 83
Terapia antitrombótica, 895-904
  antagonistas da vitamina K, 895-897
  controles e variáveis pré-analíticas, 895
  heparina, 897-898
    baixo peso molecular, 898
    trombocitopenia induzida por heparina, 898-900
  inibidores de trombina diretos, 900
  monitoramento de anticoagulação com teste rápido, 900
  novos anticoagulantes, 900-901
  terapia antiplaquetária, 901-902
Termometria, 62
Termômetros, 62
Terrorismo, 155-168
  bioterrorismo, 155-166, 1368-1388
    agentes biológicos de categoria A, 1371
    agentes biológicos de categoria B, 1372
    agentes biológicos/doenças, 157-165
    agentes infecciosos, 1368-1370
    agentes riquétsicos, 1146
    armas biológicas, 1370-1372
    exemplos de, 1369
    Laboratory Response Network, 1372-1387
    papel do laboratório de nível A, 156
    potenciais agentes, 1370
  nuclear, 167-168
    papel do laboratório de nível, 168
  químico, 165-167
    categorias de armas químicas, 166
    convenção sobre a proibição de armas biológicas e químicas, 166
    papel do laboratório de nível A, 166-167
    Protocolo de Genebra, 165-166
    transformação em arma e distribuição de agentes químicos, 166
Teste(s), 15
  Apt, 341
  bactericida sorológico, 1202-1204
  centralizado no paciente *ver* Laboratórios de teste rápido
  cobráveis, 21
  com anticorpo fluorescente direto, 1142-1143
  com hormônio liberador de corticotropina, 417
  cutâneos, 942, 1100-1101
  da pentagastrina, 401
  de β-lactamase direto, 1195
  de absorção de D-xilose, 333-343
  de afoiçamento, 610
  de Allen modificado, 30
  de antiglobulina humana, 753-755
    controle de qualidade, 754-755
    direto, 755-756
    indireto, 755-756
    reagentes e procedimentos, 754
    sensibilidade, 755
    com ACTH, 417
    com glucagon, 403
  de carga hídrica, 391
  de cinco gotas, 470
  de Coomb, 631
  de deprivação hídrica, 389
  de desnaturação alcalina, 610
  de difusão em disco, 1195
  de duas gotas, 470-471
  de estimulação
  de fragilidade osmótica, 605
  de função
    suprarrenal, 103
    cardíaca, 101-102
    endócrina, 102-103
    hepática, 100-101
    imune diferencial, 943
    tireoidiana, 102-103
  de Ham, 607
  de hibridização de ácido nucleico, 1142-1143
  de histocompatibilidade, 1013-1016
    compatibilidade HLA, 1013-1015
    detecção de anticorpos, 1015-1016
    detecção de anticorpos anti-HLA específicos, 1015
    reação cruzada doador-específica, 1015-1016
    triagem sorológica, 1015
  de lactulose-manitol, 342
  de lâmina de eluição ácida, 610
  de metirapona de um dia a outro, 417
  de Perl para ferro, 560-561
  de permeabilidade com celobiose e manitol, 342
  de pré-transfusional, 780-781
  de proficiência, 126-129
    ajuste de um método em conformidade com outro, 127-128
    avaliação por grupo de pares, 127
    interpretação dos resultados, 128
    programas baseados na acurácia, 128-129
  de provocação de órgão-alvo, 1100-1101
  de Qui-quadrado, 111
  de redução de cobre, 469-470
  de sangue oculto nas fezes, 327, 343-345, 1545-1546
  de Schilling, 343
  de solubilidade falciforme, 610
  de supressão
    com clonidina, 403, 405
    com dexametasona, 103
    da desoxiuridina, 595
  de suscetibilidade
    enterococos, 1164
    estafilococos, 1161
    estreptococos, 1164
    micobactéria, 1232-1233
  de tolerância à glicose, 215-216, 220
  de tolerância à lactose, 333, 346
  de triagem de coagulação, 849
    tempo de protrombina, 313, 849
    tempo de trombina, 849
    tempo de tromboplastina parcial ativada, 849
  de Wilcoxon (*signed ranks*), 111
  do coágulo de mucina, 516
  do plasma em repouso, 245
  do veneno de víbora de Russel diluído, 891
  em local alternativo *ver* Laboratórios de teste rápido
  estourados, 21
  genético, 1466
  genético diagnóstico, 1500-1502
  Hemoccult, 333
  por hora, 21
  pré-sintomático de DNA, 1503
  rápido, 137
  realizado onde o paciente está *ver* Laboratórios de teste rápido
  respiratório de H_2, 333
  t-Student, 107, 109-11
Testículos, 429
Testosterona, 427-428
  diminuída, 433

Tetra-hidrocanabinol, 357
Three-Day Rule, 8
Tiamina, 445, 447-448
  avaliação laboratorial, 446
  fontes alimentares, 446
  RDA, 446
Tifo, 1145
  do esquilo voador, 1145
  epidêmico, 1145
  murino, 1145-1146
  rural, 1145, 1147
  transmitido pelo carrapato de Queensland, 1145
  transmitido pelo carrapato do Norte da Ásia, 1145
  transmitido por piolhos, 1145
Timo, 585
  testes para presença, 842
Tipagem Rh, 758
Tireoglobulina, 395, 397-398
Tireoidite de Hashimoto, 395, 1087-1088
Tireotrofos, 383-384
  tumores de, 385
Tirosinemia, 462
Tirosinúria, 496
Tirotoxina, 394, 396, 400-401
  livre, 396-397
Titânio, 450
Tocoferol *ver* Vitamina E
Tomada de decisão médica, 79-88
  acurácia diagnóstica, 81-87
  baseada em evidência, 87
  intervalos de referência, 79-81
Tonicidade, 174
Topiramato, 368
Toxemia da gravidez, 441
Toxicologia, 349-382
Toxilab, 350, 353
Toxina botulínica, 158, 162
Toxinas e envenenamento, 376-380
  álcoois e glicóis, 377-378
  arsênico, 378
  carcinógenos ambientais, 376
  chumbo, 379-380
  cianeto, 376-377
  ferro, 379
  mercúrio, 378-379
  monóxido de carbono, 377
  organofosfatos e carbamatos, 380
Toxocara canis, 646
Toxoplasma gondii, 1291-1292
Toxoplasmose, 651, 1324
Traço
  de Cooley, 619-620
  falciforme, 614
  HbC, 616
  HbE, 616
Tracoma, 1140
Transdutor(es)
  de diodo de silício, 44
  fotoelétrico multicanal, 44
Transferases, 287
Transferrina, 276-277
  deficiente de carboidrato, 330
  LCE, 508
  receptores, 592
Transformação de Lineweaver-Burk, 290, 292-293
Transfusão de crioprecipitado, 784
Transfusões sanguíneas, 775-793
  administração, 781
    terapia com componentes do sangue, 782-784
    transfusão em massa, 784, 858
    transfusão neonatal e pediátrica, 784-785
  coleta de sangue, 776-777
  produção de componentes do sangue, 777-779
    componentes do sangue com redução de leucócitos, 778
    componentes especiais, 778-779
    componentes leucocitários, 778
    concentrados de plaqueta, 778
    fator anti-hemofílico crioprecipitado, 778
    hemácias, 777
    plasma, 777-778
    redução de patógenos, 779
  reações transfusionais, 785-791
    alérgica, 785-786
    anafilática, 786
    contaminação bacteriana de componentes do sangue, 787
    doença do enxerto *versus* hospedeiro, 788-789
    doença transmitida por transfusão, 789-791
    hemólise não imune, 789
    hemolítica aguda, 786-787
    hemolítica tardia, 787
    lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI), 787-788
    não hemolítica febril, 785
    reações hipotensivas, 789
    sobrecarga circulatória associada à transfusão, 789
  seleção de componentes do sangue, 779-780
    hemácias, 779-780
    plaquetas, 780
  teste pré-transfusional, 780-781
Translocações
  cromossômicas, 1485-1490
  Robertsonianas, 1441-1443
Transplante
  alogênico de células progenitoras hematopoéticas, 1017
  renal, 1016
    plasmaférese, 817-1018
Transplante de tecido/órgão, 1013-1017
  base genética, 1013
  complemento no, 980-983
  teste de histocompatibilidade, 1013-1016
    compatibilidade HLA, 1013-1015
    detecção de anticorpos, 1015-1016
    detecção de anticorpos anti-HLA específicos, 1015
    reação cruzada doador-específica, 1015-1016
    triagem sorológica, 1015
  transplante
    de células progenitoras hematopoéticas alogênicas, 1017
    de órgão não renal, 1016-1017
    renal, 817-818, 1016
Transporte, 15
Trato gastrintestinal, doença autoimune, 1091-1092
Trato genital, 1361-1363
  amostras endocervicais e uretrais, 1361-1362
  secreções vaginais, 1361
  úlceras, 1362-1363
  vesículas, 1362
Trato respiratório, 1357-1360
  amostras
    da garganta, 1257-1358
    da nasofaringe, 1357
    de broncoscopia, 1359-1360
  escarro e aspirados traqueais, 1358-1359
  vírus, 1119-1122
    coleta da amostra, 1120-1121
    crupe, 1120
    ensaio do antígeno viral, 1121-1122
    influenza, 1119-1120
    isolamento viral, 1122
    metapneumovírus, 1120
    vírus sincicial respiratório, 1120
Trato urinário, 1360-1361
  coleta e transporte da amostra, 1359
  infecção, 1249
    testes indiretos para, 476-477
  neoplasia, 492
  processamento da amostra, 1359-1360
Treinamento cruzado, 22
Trematódeos, 1309-1313
  Clonorchis sinensis, 1311
  Fasciola hepática, 1311
  *Fasciolopsis buski,*1310
  Heterophyes heterophyes, 1310
  Metagonimus yokogawai, 1310
  Nanophyetus salmincola, 1310-1311
  Opisthorchis viverrini, 1311
  Paragonimus spp., 1311
  Shistosoma spp., 1311-1313
Treponema spp., 1207-1211
  diagnóstico laboratorial, 1209-1210
  framboesia, 1208
  pinta, 1208-1209
  sífilis, 1207-1208
    endêmica, 1208
  tratamento, 1211
Tri-iodotironina, 395, 397
    reversa, 397
Tríade de Whipple, 224
Triagem de portadores, 1503-1504
Trichinella spiralis, 1315
Trichomonas
  hominis, 1294
  vaginalis, 1298-1299
Trichostrongylus spp., 1305
Trichuris trichiura, 1304
Triglicerídeo(s)
  classificação ATPIII, 247
  critérios para aceitação, 122-123
  elevado com colesterol normal, 251
  lipase hepática, 237
  quantificação, 241-242
    diretrizes do NCEP para erros aceitáveis, 246-248
  variabilidade biológica, 80
Trimetilaminúria, 462
Tripanossomíase, 462, 1290-1291
  americana, 1290, 1324
  ver Doença de Chagas
Tripsina, 346
Tripsinogênio 2, 329-330, 340
Trombastenia de Glanzmann, 862-863, 865, 867, 873-874
Trombocitemia essencial, 657, 1446
Trombocitopenia, 869-872
  congênita, 869
  essencial, 657, 1446
  induzida por heparina, 871, 898-900
  medicamentosa, 870-71
  púrpura trombocitopênica imune, 869-870
  púrpura trombocitopênica trombótica, 871-872
Trombocitose, 806, 872
Trombofilia
  avaliação laboratorial do risco, 893
  estados hipercoaguláveis adquiridos, 890-892
    anticoagulante lúpico, 890
    hiper-homocisteinemia, 892
    síndrome antifosfolipídeo, 890-892
  hereditária, diagnóstico genético, 1506-1507
  testes para, 892
Trombomodulina, 844, 890
Trombopoetina, 568
Troponina, 255, 257-258
Trypanosoma cruzi, 790-791
Tuberculose, 1029
Tubos fotomultiplicadores, 43
Tubos por hora, 21
Tularemia, 158, 161-162, 1371, 1381
Tumor(es)
  carcinoide, 327, 336-337
  de células não β, 226
  de pequenas células redondas azuis da infância, 1574
  hipófise, 383-385
  neuroendócrinos, 336-337
  ovariano feminilizante, 431
  ovariano masculinizante, 431
  produtor de gonadotrofina, 431
  testicular, 431
Turbidimetria, 47-48, 273

U

Úlceras
  cutânea, 1365-1366
  trato genital, 1362-1363
Unidades do SI, 1591-1606
  hematologia, 1601-1602
  líquido
    amniótico, 1602-1603
    cerebrospinal, 1603
    gástrico, 1600
    seminal, 1600
    sinovial, 1600
  prefixos, 1591
  sangue total, bioquímica do soro e plasma, 1592-1597
  unidades
    de base, 1591
    derivadas, 1591
  urina, 1597-1600
  valores de referência pediátricos, 1604-1606
Urato(s)
  amorfos, 486
  cristalinos, 486
  monossódico, 515
  monossódico mono-hidratado, 515

Ureia, 178-179
depuração, 179
líquido peritoneal, 526
quantificação de, 178-179
Uremia, 879-880
Urina, 32-33
5-HIAA, 333
ácida, 465
alcalina, 465
armazenamento e preservação, 32-33
aspecto, 461
leitosa, 461
turva, 461
urina vermelha, 460-461
citologia, 298
citometria de fluxo, 349-350
concentração e diluição, 184-186
cor, 460-462
castanho-amarelada ou castanho-esverdeada, 461
castanho-escura ou negra, 461-462
vermelho-alaranjada ou castanho-alaranjada, 461, 462
detecção de fármacos, 349-356
formação, 298
gravidade específica, 306-307
imunoquímica, 349-350
incolor, 461
microbiologia, 298
osmolalidade, 185-186, 464
técnicas de coleta, 32-33
triagem para doenças metabólicas, 495-497
Urinálise, 459-498
ácido ascórbico, 477
ácido 5-hidroxi-indolacético, 478
açúcares, 465-468
aspecto macroscópico/físico, 460-464
bilirrubina, 474-475
cetonas, 471-472
gravidade específica e osmolalidade, 463-464
hematúria, 472
hemoglobinúria, 472
hemossiderina, 472-473
infecção do trato urinário, 476-477
melanina, 478
mioglobinúria, 473
odor, 462
pH, 464-465
porfirinas, 478-480
proteinúria, 465-468
volume de urina, 462
automatizada, 491-492
avaliação da amostra, 460
métodos, 491-492
sedimento, 480-491
triagem bioquímica, 464-480
urobilinogênio, 476
Urinálise a fresco 298
Urinômetro, 464
Urinotórax, 521
Urobilinogênio, 476
fecal, 574

V

Vacuolização, 558
Validação, 138
de método, 113-114
Valor
atual líquido, 152-153
preditivo, 79, 82-83
Valores laboratoriais anormais, 89-90
patologia bioquímica, 95-103
perfil hematológico, 90-95
Válvulas cardíacas, banco de, 832
Vanádio, 450
Variabilidade
aleatória, 80-81
analítica, 115
biológica, 80
fontes de, 118
Variação
diurna, 24-25
interindividual, 80
intraindividual, 80
Variantes da célula pilosa, 671-672
Variável
dependente, 107
independente, 107
Varicela zoster, 1129, 1332
Varíola, 157-158, 162-63, 1332, 1371, 1382-1383, 1385
características clínicas, 163
considerações práticas, 163
história e fundamento, 162-163
Varredura imunológica, 941
Vasculite, 1064-1077, 1084
anticorpo antineutrofílico citoplasmático, 1067
classificação, 1064
crioglobulinêmica essencial, 1065-1066
leucocitoclástica cutânea, 1065
patogênese, 1064-1065
principais síndromes vasculíticas idiopáticas
angiíte primária do sistema nervoso central, 1075
arterite (temporal) de célula gigante, 1074
arterite de Takayasu, 1074-1075
doença de Kawasaki, 1075-1076
granulomatose de Wegener, 1071-1072
granulomatose linfomatoide, 1072
poliangiíte microscópica, 1070-1071
poliarterite nodosa, 1069-1070
púrpura de Henoch-Schölein, 1072-74
síndrome de Churg-Strauss, 1070
teste laboratorial clínico, 1065-1066
Velocidade de propagação, 38
Verapamil, 65
Verruga peruana, 1145, 1151
Vesículas, 1365
Vespas, 1320
Via(s)
alternativa do complemento, 974
ensaio, 1095
anticoagulantes, 886-887
clássica do complemento, 972, 974
ensaio, 1095
da lectina ligadora de manana, 974-975
de Embden-Meyerhoff, 621-625
de transdução de sinal, 1550
Vibrio spp., 1178-1179
Vidraria, 60-61
VIPoma, 336
Vírus
da encefalite equina ocidental, 1382
da encefalite equina oriental, 1382
da imunodeficiência humana *ver* HIV
da varíola *ver* Varíola
Ebola, 164, 1382, 1385
Epstein-Barr, 648-650, 1331-1332
Guanarito, 1382, 1385
Junin, 1382-1383, 1385
linfotrópicos de células T humanas, 790
Machupo, 1382, 1385
Marburg, 164, 1382, 1385
Sabia, 1385
sincicial respiratório, 1120
T-linfotrópicos humanos de tipo 1, 648
West Nile, 790, 1112, 1332
Vitamina(s), 444-450
A, 449
avaliação laboratorial, 446
fontes alimentares, 446
RDA, 446
variabilidade biológica, 80
B_1 *ver* Tiamina
B_2 *ver* Riboflavina
B_3 *ver* Ácido pantontênico
B_6, 445, 448
avaliação laboratorial, 446
fontes alimentares, 446
RDA, 446
B_{12}, 445, 448
avaliação laboratorial, 446
deficiência, 91, 594
fontes alimentares, 446
metabolismo, 596-594
RDA, 446
variabilidade biológica, 80
C, 445, 448-449
avaliação laboratorial, 446
fontes alimentares, 446
na urina, 477
RDA, 446
D, 203-204, 445, 450
avaliação laboratorial, 446
deficiência, 207-208
fontes alimentares, 446
intervalo de referência, 204
intoxicação, 206
raquitismo, 207, 208
RDA, 446
síntese e metabolismo, 203-204
técnicas analíticas, 204
E, 445, 450
avaliação laboratorial, 447
fontes alimentares, 447
RDA, 447
variabilidade biológica, 80
hidrossolúveis, 447-449
K, 445, 450
avaliação laboratorial, 447
deficiência, 858
fontes alimentares, 447
RDA, 447
lipossolúveis, 449-450
ver também vitaminas individuais
VLDL, 234-236
detecção de, 245-246
$V_{máx}$, 293
Vitronectina, 976
Voltametria, 51
Volume
celular médio, 539
de distribuição, 363
de eritrócitos, 633
talassemias, 618-622
globular *ver* Hematócrito
plasmático, 633
sanguíneo total, 1589

W

WAGR, 1451
Warfarina, 896-897
World Wide Web, acesso aos resultados do paciente, 135
Wuchereria bancrofti, 462,1313

X

Xantocromia, 501
Xeroderma pigmentoso, 1453, 1512
Ximelagatran, 900-901

Y

Yersinia pestis ver Peste

Z

Zigomicose, 1261-1262
Zinco, 450, 453-454
deficiência, 451
função, 451
propriedades, 452
toxicidade, 451
Zona
fasciculada, 404
reticular, 404

DIRETRIZES PARA REQUISIÇÃO DE SANGUE PARA CIRURGIA ELETIVA

Denominada também *Maximum Surgical Blood Order Schedule* (MSBOS, Lista de Requisição Máxima de Sangue para Cirurgia)

Estas diretrizes apresentam um limite numérico de unidades de sangue a serem requisitadas conforme a prática em três instituições distintas: University Hospital SUNY Upstate Medical Center, em Siracusa, NY; Virginia Commonwealth University Medical Center, Richmond, VA; e University of Michigan Hospitals, Ann Arbor, MI. Cada instituição deve estabelecer suas próprias diretrizes para requisição de produtos do sangue, a fim de considerar as inconstantes necessidades e práticas médicas, em colaboração com a equipe de médicos e cirurgiões do hospital.

CHAVE:0 = nenhum teste requerido
T&T = tipo e triagem
1-6 = número de unidades com reação cruzada
CR = conforme requisitado
* = varia de acordo com o propósito

Cardiopulmonar/cardiotorácica

Reparo de canal A-V.....3
Angioplastia .....T&T
Reparo de aneurisma aórtico ou ventricular..4
Dissecação aórtica 6
Reposição de válvula aórtica .....2 a 3
Reparo de defeito septal atrial 3
Septectomia atrial 3
Derivação de Blalock-Taussing 1
Derivação bidirecional de Glenn 2
CABG (enxerto da veia coronária)..... 2 a 4
Reparo de coarctação 3
Esofagogastrectomia 2
Hérnia/hiato esofágico .....0 ou T&T
Esofagoscopia 0
Procedimento de Fontan .....3 a 4
Desvio em vaso calibroso 3
Lobectomia .....T&T ou 1
Mediastinoscopia .....0 ou T&T
Comissurotomia mitral 3
Valvuloplastia mitral 2
Anuloplastia da válvula mitral 3
Reposição da válvula mitral .....2 a 3
Procedimento de Mustard 3
Biópsia pulmonar aberta .....T&T
Inserção de marca-passo 0
Ligação de dutos arterioso patente.....T&T
Pericardectomia 2
Janela pericárdica .....0 ou T&T
Pneumonectomia .....T&T ou 2
Reposição de válvula pulmonar .....2 a 3
Valvulotomia pulmonar 3
Redo e reparo 6
Septectomia 2
Remoção de arame esternal 0
Tetralogia de Fallot .....3 a 4
Toracotomia/lobectomia 1
Toracoscopia 0
Reparo de transposição 3
Reparo de defeito septal ventricular.....3
Ressecção em cunha .....T&T

Cirurgia geral

Ressecção abdominal .....T&T a 3
Amputações .....T&T
Apendectomia 0
Broncoscopia .....0 ou T&T
Inserção/remoção de cateter 0
Colecistojejunostomia .....T&T
Colecistectomia .....T&T
Ressecção de cólon .....T&T a 2
Fechamento/desmonte de colostomia ..T&T
Debridamento (ferida, queimadura) .... CR
Inserção da derivação peritoneal de Denver..0
Revisão da derivação de Denver 0
Troca de curativo 0
Laparotomia exploratória .....T&T a 2
Bypass gástrico .....T&T
Inserção de tubo gástrico .....0 ou T&T
Hemicolectomia 2
Hemorroidectomia 0
Lobectomia hepática .....3 a 6
Reparo de hérnia, inguinal .....0 ou T&T
Ileostomia .....T&T
Bypass da ilíaca profunda 1
Colocação de tubo de jejunostomia 0
Lumpectomia, massa mamária 0
Mastectomia, simples 0
Mastectomia, radical modificada .....T&T
Mediastinoscopia .....0 ou T&T
Miotomia (pilórica) 0
Parotidectomia .....0 ou T&T
Cisto pilonidal 0
Derivação portocaval .....4 a 6
Reparo de pseudoaneurisma 6
Ressecção de costela 0
Sigmoidectomia .....T&T
Sigmoidoscopia 0
Ressecção do intestino delgado .....T&T
Esplenectomia .....T&T a 2
Simpatectomia .....T&T
Tireoidectomia .....0 ou T&T
Ressecção total do cólon .....T&T
Vagotomia .....0 ou T&T
Fleboextração .....T&T
Procedimento de Whipple 2

Ginecologia

Reparo anteroposterior .....T&T a 1
Biópsia em cone (laser de CO_2) 0
Dilatação e curetagem (D&C).....0 a 2
Gravidez ectópica .....T&T a 2
Ablação do endométrio 0
Exame sob anestesia (EUA) 0
Laparotomia exploratória .....T&T a 2
Procedimento de exenteração 4
Inserção de cateter de Groshong 0
Histerectomia, total abdominal ....T&T a 2
Histeroscopia 0
Laparoscopia 0
Vaporização a laser 0
Neosalpingostomia .....T&T
Ooforectomia .....T&T
Ressecção ovariana em cunha .....T&T
Salpingo-ooforectomia 0
Suspensão uterina 0
Ligação tubárica 0
Tuboplastia .....0 ou T&T
Vaginectomia .....T&T a 2
Vulvectomia .....T&T a 2

Neurocirurgia

Grampeamento de aneurisma .....2 a 6
Biópsia (cervical/cerebral) .....T&T a 1
Abertura de orifício com trépano.....T&T
Liberação do túnel carpal 0
Descompressão cervical .....T&T a 2
Discectomia cervical .....0 ou T&T
Cordotomia .....T&T
Cordectomia 1
Craniectomia 2
Cranioplastia .....T&T a 2
Craniotomia 2
Endartectomia, carótida 2
Hipofisectomia .....T&T a 1
Laninectomia .....T&T a 2
Lobectomia 2
Remoção de neuroma .....T&T
Reparo de nervo .....T&T
Ressecção de tumor hipofisário 1
Fusão espinhal .....T&T a 1
Biópsia cerebral esterostática.....0 ou T&T
Hematoma estereostático .....T&T
Transplante de nervo ulnar 0
Inserção de derivação ventricular-peritoneal.....0 ou T&T

Ortopedia

Acromioplastia 0
Amputação .....T&T
Artroscopia .....0 ou T&T
Artroplastia.....T&T
Artrotomia 0
Biópsia, excisional 0
Transferência bipolar .....T&T
Liberação do túnel carpal 0
Redução fechada 0
Debridamento ..... CR
Laminectomia de descompressão .....T&T
Disquectomia .....T&T
Fraturas 0
*Fusões, outros .....T&T a 2
Remoção de *hardware*.....0
Revisão de costela .....2 a 4
Emparafusamento e encravamento de costela .....T&T
Laminectomia lombar.....T&T

Menisquetomia 0
Transposição de nervo 0
Excisão de neuroma 0
Redução aberta ..... T&T a 2
Osteotomia 0
Fusão da haste posterior 2
Remoção de prótese ..... T&T
Liberações 0
Revascularização e exploração ..... T&T
Colocação de haste (Grosse e Kempf) .. T&T
Reparo de manguito rotator ..... T&T
Reposição de ombro ..... T&T
Reparo de ombro 0
Fusões espinhais ..... 1 a 3
Reparo do tendão 0
Cotovelo total ..... T&T
Costela total ..... 2 a 3
Joelho total ..... T&T

Otorrinolaringologia/cirurgia de cabeça e pescoço

Antrotomia 0
Áticoantrotomia 0
Broncoscopia 0
Caldwell-Luc ..... 0 ou T&T
Implante coclear 0
Ressecção composta 4
Laringoscopia dissecante 0
Endoscopia 0
Reconstrução esofágica ..... T&T
Esofagoscopia 0
Ligação da artéria etmoide 4
Etmoidectomia ..... T&T
Biópsia excisional 0
Exploração de seio frontal ..... T&T
Glossectomia ..... T&T
Labirintectomia 0
Laringectomia ..... T&T a 2
Laringoscopia 0
Mandibulectomia ..... T&T a 2
Mastoidectomia ..... 0 ou T&T
Fixação maxilar ..... T&T
Maxilarectomia ..... T&T a 2
Miringotomia 0
Nasofaringoscopia 0
Dissecação cervical ..... T&T a 2
Neurectomia ..... 0 ou T&T
Panendoscopia ..... 0 ou T&T
Parotidectomia ..... 0 ou T&T
Remoção de placa 0
Septoplastia ..... 0 ou T&T
Septorrinoplastia ..... 0 ou T&T
Esfenoetmoidectomia ..... T&T
Esfenoidectomia ..... T&T
Estapedectomia 0
Tireoidectomia 0
Tonsilectomia 0
Traqueoscopia 0
Inserção de tubo de traqueostomia 0
Traqueotomia ..... T&T
Timpanomastoidectomia ..... 0 ou T&T
Timpanoplastia 0

Cirurgia plástica

Reparo de Millard ..... T&T
Orbitotomia ..... T&T
Mamoplastia de redução ..... 0 ou T&T
Septorrinoplastia ..... 0 ou T&T

Transplantação renal

Fístula arteriovenosa 0
Nefrectomia doadora ..... T&T
Transplante de pâncreas 4
Remendo (*patch*) arteriovenoso renal 3
Transplante renal ..... T&T a 2
Inserção/remoção de cateter vascular (Tenckhoff) 0

Urologia

Adrenalectomia 2
Ressecção da bexiga ..... T&T
Circuncisão 0
Cistectomia 2
Cistoscopia 0
Cistotomia ..... T&T a 4
Fulguração, bexiga com sangramento 0
Hidrocelectomia 0
Conduto ileal 1
Litotomia, ureteral ..... T&T
Litotripsia, onda de choque 0
Meatotomia ..... T&T
Biópsia por agulha da próstata 0
Nefrectomia, doadora 1
Nefrectomia, radical ..... 2 a 4
Nefrolitotripsia 1
Nefrostomia ..... T&T
Orquiopexia 0
Orquiectomia 0
Penectomia 2
Inserção de prótese peniana 0
Prostatectomia ..... T&T a 2
Pielolitotomia ..... T&T
Reimplantação do ureter ..... T&T
Procedimento de Stamey ..... 0 ou T&T
Ressecção transuretral da próstata ..... T&T
Ureterectomia 0
Ureterolitotomia ..... T&T
Ureteroscopia 0
Excisão de fístula uretral ..... T&T
Vasectomia 0
Vasovasostomia 0

Cirurgia vascular

Cirurgia abdominal aórtica ..... 2 a 4
Reparo de aneurisma 2
Bypass aortoilíaco 4
Bypass arteriofemoral 2
Fístula arteriovenosa 0
Endarterectomia carótida ..... T&T
Inserção/remoção de cateter 0
Bypass femoral ..... T&T
Bypass da ilíaca profunda 1
Reparo da artéria renal 3
Bypass arterial esplenorrenal ..... T&T

Referências bibliográficas

Boral LI, Henry JB: The type and screen: A safe alternative and supplement in selected surgical procedures. Transfusion 1977; 17:163.

British Committee for Standards in Haematology: Blood Transfusion Task Force: Guidelines for implementation of a maximum surgical blood order schedule. Clin Lab Haematol 1990; 12:321.

Friedman BA: The maximum surgical blood order schedule and surgical blood use in the United States. Transfusion 1976; 16:380.

Friedman BA: A blood ordering strategy for hospital blood banks derived from a computer simulation. Am J Clin Pathol 1982; 78:154.

Henry JB, Mintz PD: Waste not, want not—improved blood utilization through realistic hemotherapy guidelines. Qual Rev Bull 1977; 3:7.

Henry JB, Mintz PD, Webb W: Optimal blood ordering for elective surgery. JAMA 1977; 237:451.

Mintz PD: Type and screen. (Letter.) Transfusion 1991; 31:382.

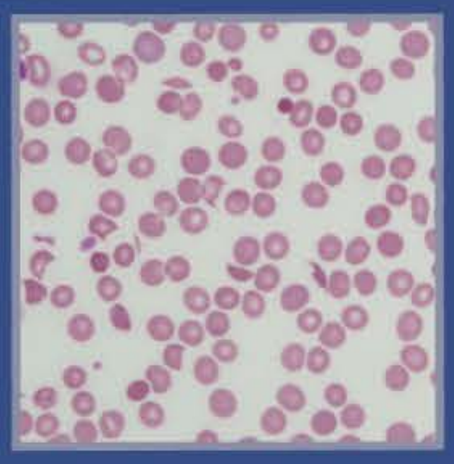
Mintz PD, Henry JB, Boral LI: The type and antibody screen. In Myhre, BH. (ed): Clinics in Laboratory Medicine: Symposium on blood banking and hemotherapy. 1982. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1982.

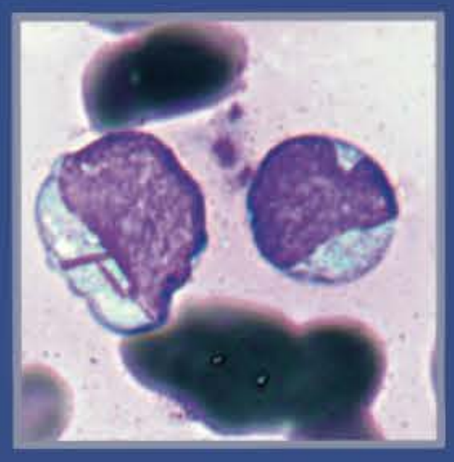
Mintz PD: Lauenstein K, Hume J, Henry JB: Expected hemotherapy in elective surgery. A follow-up. JAMA 1978; 239:623.

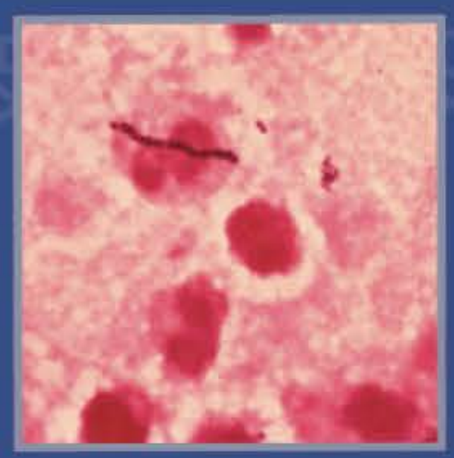
Mintz PD, Nordine RB, Henry JB, Webb WR: Expected hemotherapy in elective surgery. NY State J Med 1976; 76:532.

Rouault C, Gruenhagen J: Reorganization of blood ordering practices. Transfusion 1978; 18:448.

Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais de Henry







Manole